

***In vitro* Analysen**
prokaryotischer Transkriptionsmechanismen
während der exponentiellen und stationären Phase
der Genexpression

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von
Britta Reckendrees
aus Enniger

Düsseldorf 2004

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

Vorsitz: Prof. Dr. G. Wenzens

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

Tag der mündlichen Prüfung: 14.12.2004

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Physikalische Biologie der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf in der Zeit von November 2000 bis Februar 2004.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. R. Wagner danke ich für die wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit.

Allen Mitgliedern der AG Wagner möchte ich für die ausgesprochen gute Arbeitsatmosphäre danken.

Bei Frau Reinhild Wurm möchte ich mich für die tatkräftige Unterstützung und die angenehme Pausengestaltung bedanken.

Ein besonders herzlicher Dank gebührt meiner Familie und meinen Freunden, die viel Geduld und Verständnis für mich aufgebracht haben und mich stets unterstützt haben.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung

Kapitel I Allgemeine Einleitung

1	Einleitung	1
1.1	Die Transkription und ihre zentrale Rolle bei der Genexpression während verschiedener Wachstums- und Stressphasen	1
1.2	Struktur und Funktion von Promotoren	1
1.2.1	Der σ^{70} -abhängige Konsensuspromotor	2
1.2.2	Merkmale σ^{38} -abhängiger Promotoren	3
1.3	Struktur und Funktion der DNA-abhängigen RNA-Polymerase	3
1.3.1	Die α -Untereinheit	4
1.3.2	Die β - und die β' -Untereinheit	4
1.3.3	Die ω -Untereinheit	5
1.3.3.1	Der σ^{70} -Faktor	5
1.3.3.2	Der σ^{38} -Faktor	8
1.3.4	Die dreidimensionale Struktur der RNA-Polymerase	9
1.4	Die Transkription	11
1.4.1	Die Initiation	11
1.4.2	Die Elongation	12
1.4.3	Die Termination	13
1.5	Regulation der Transkription während verschiedener Wachstumsphasen	13
1.5.1	Die Stringente Kontrolle	14
1.5.1.1	Regulation der Synthese ribosomaler RNA am Beispiel des <i>rrnB</i> P1 Promotors	14
1.5.1.2	Regulationsmodelle der Stringenten Kontrolle	17
1.5.2	Das RpoS-Regulon	19
1.5.2.1	Kontrolle der σ^{38} Synthese und Proteolyse	19
1.5.2.2	Regulation der σ^{38} -spezifischen Transkription	20
1.5.2.2.1	Kompetition der σ -Faktoren um die Bindung an das Core-Enzym der RNA-Polymerase	20
1.5.2.2.2	Modulation der Promotorspezifität	21
1.5.2.2.3	Der σ^{38} -abhängige <i>bolA</i> Promotor	21
2	Fragestellung und Konzeption der Arbeit	22

Kapitel II	Transkriptionsregulation unter dem Einfluss von ppGpp	
1	'mismatch bubble' Templates und ihre Transkriptionseigenschaften	25
1.1	Problemstellung und experimenteller Ansatz	27
2	Ergebnisse	28
2.1	Konstruktion und Präparation von Transkriptionskomponenten	28
2.1.1	Das Holo- und Core-Enzym der DNA-abhängigen RNA-Polymerase	28
2.1.2	Präparation eines Quantifizierungsstandards	28
2.1.3	Konstruktion und Präparation von 'mismatch bubble' Templates	28
2.1.3.1	Konstruktion der 'mismatch bubble' Templates BR-I und BR-I/ <i>XmnI</i>	30
2.1.3.2	Präparation von 'mismatch bubble' Templates	31
2.1.3.3	Analyse der 'mismatch bubble' Templates mittels chemischer DNA-Modifikation	31
2.2	Bestimmung der Transkriptionsstartstellen der 'mismatch bubble' Templates	34
2.3	Transkriptionsregulation an 'mismatch bubble' Templates unter dem Einfluss von ppGpp	38
3	Diskussion	41
3.1	Spezifität der Transkription an 'mismatch bubble' Templates	41
3.2	Molekularer Mechanismus der negativen Stringenten Kontrolle	43
Kapitel III	Transkriptionsregulation in verschiedenen Wachstumsphasen	
1	Problemstellung und experimenteller Ansatz	47
2	Ergebnisse	48
2.1	Konstruktion und Präparation von Transkriptions- komponenten	48
2.1.1	Die Transkriptionsmatrizen	48
2.1.1.1	Der \square^{70} -abhängige Promotor <i>rnb</i> P1	49
2.1.1.2	Der \square^{38} -abhängige Promotor <i>bolA</i>	49
2.1.2	DNA-abhängige RNA-Polymerasen	51
2.1.3	Präparation eines internen Standards	52
2.2	Analyse von RNA-Polymerase-Promotorkomplexen homo- und heterologer Transkriptionssysteme	53

2.2.1	Retardierungsanalysen	53
2.2.1.1	Promotorspezifität der RNA-Polymerasen E70 und E38	53
2.2.1.2	Abhängigkeit der Promotorbindung von der Salzkonzentration	56
2.2.1.3	Einfluss von ppGpp auf die Promotorbindung im heterologen und homologen Transkriptionssystem	58
2.2.2	Footprint-Analysen der homo- und heterologen Transkriptionssysteme	60
2.2.2.1	Protektion der Promotoren durch Bindung der RNA-Polymerase	60
2.2.2.2	Analyse der DNA-Isomerisierung im binären und ternären Initiationskomplex verschiedener Transkriptionssysteme	65
2.2.2.3	Bestimmung der Transkriptionsstartpunkte im hetero- und homologen Transkriptionssystem	69
2.3	<i>In vitro</i> Regulation im homologen und heterologen Transkriptionssystem	70
2.3.1	Etablierung von <i>in vitro</i> Transkriptionen unter superhelikalen und linearen Template-Bedingungen	71
2.3.2	Die generelle Promotorspezifität	72
2.3.3	Der Salzeffekt, die Superhelikalität und das Effektmolekül ppGpp als mögliche Modulatoren der σ -Faktor-spezifischen Transkription	73
2.3.3.1	Spezifitätsmodulation unter superhelikalen Template-Bedingungen	74
2.3.3.2	Spezifitätsanalyse mit linearen Templates	77
2.3.3.3	Die ppGpp-Wirkkonzentration	80
2.3.3.3.1	ppGpp-Titration mit superhelikalen Templates	81
2.3.3.3.2	ppGpp-Titration mit linearen Templates	83
2.3.3.4	Der ppGpp-Effekt bei RNA-Polymerase-Überschuss	85
3	Diskussion	88
3.1	Theoretische Grundlage der σ -Faktor-abhängigen Promotorspezifität der RNA-Polymerasen	89
3.2	Modulation der σ -Faktor-abhängigen Transkription	92
3.2.1	Einfluss der Promotortopologie auf die σ -Faktor-abhängige Transkription	92
3.2.2	Kaliumglutamat als Spezifitätsfaktor der σ -Faktor-abhängigen Transkription	93
3.2.3	Der Einfluss von ppGpp auf die σ -Faktor-abhängige Transkription	94
3.3	Transkriptionsregulation während verschiedener Wachstumsphasen	98
3.4	Ausblick	100

Kapitel IV Material und Methoden

1	Material	101
1.1	Allgemeines	101
1.2	Bakterienstämme und Vektoren	101
1.2.1	<i>Escherichia coli</i> Stämme	101
1.2.2	Plasmide	102
1.2.3	Phagenderivate	103
1.3	DNA-Fragmente	104
1.4	Nukleinsäuren und Nukleotide	105
1.4.1	Verschiedene Nukleinsäuren	105
1.4.2	Desoxyoligonukleotide	105
1.4.3	Nukleotide	107
1.5	Proteine	107
1.6	Allgemeine Puffer und Medien	109
1.7	Feinchemikalien	110
1.8	Verschiedenes	111
2	Methoden	112
2.1	Allgemeine mikrobiologische Methoden	112
2.1.1	Sterilisation von Lösungen und Glasgeräten	112
2.1.2	Haltung und Sicherung von Zellstämmen	112
2.1.3	Anzucht von Bakterienkulturen	112
2.1.4	Herstellung kompetenter Bakterienzellen	112
2.1.5	Transformation von Plasmid-DNA in kompetente <i>E. coli</i> Zellen	113
2.1.6	Bestimmung eines Phagentiters	113
2.1.7	Haltung und Sicherung von Phagenstämmen	114
2.2	Allgemeine molekularbiologische Methoden	114
2.2.1	Messen von Konzentrationen	114
2.2.1.1	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	114
2.2.1.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleotiden	114
2.2.1.3	Bestimmung der Zelldichte von Flüssigkulturen	115
2.2.1.4	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	115
2.2.1.5	Messung von Radioaktivität	115
2.2.2	Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren	116
2.2.2.1	Extraktion mit Phenol und Chloroform	116
2.2.2.2	Fällung von Nukleinsäuren	116
2.2.2.3	Dialyse von Nukleinsäurelösungen	116
2.2.3	Isolation von DNA	117
2.2.3.1	Isolierung analytischer Mengen Plasmid-DNA	117
2.2.3.2	Präparative Isolation von Plasmid-DNA	117
2.2.3.3	Isolation chromosomaler <i>E. coli</i> DNA	118
2.2.3.4	Isolierung analytischer Mengen RF-DNA des M13 Phagen	119
2.2.3.5	Isolation analytischer Mengen ssDNA des M13 Phagen	119
2.2.3.6	Präparative Isolierung von ssDNA aus M13 Phagen	120

2.2.4	Enzymatische Reaktionen	121
2.2.4.1	Restriktionshydrolysen	121
2.2.4.2	Dephosphorylierung von 5'-DNA-Enden	121
2.2.4.3	Ligation von DNA-Fragmenten mit T4 DNA-Ligase	121
2.2.4.4	Klenow-Reaktion zum Auffüllen überhängender 5'-DNA-Enden	122
2.2.4.5	Radioaktive Markierung einzelsträngiger DNA-Oligonukleotide	122
2.2.4.6	Amplifikation von DNA mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)	123
2.2.4.7	DNA-Sequenzierung nach Sanger	125
2.2.5	Gelelektrophorese	126
2.2.5.1	Agarose-Gelelektrophorese	126
2.2.5.2	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) von Nukleinsäuren unter nativen Bedingungen	126
2.2.5.3	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) von Nukleinsäuren unter denaturierenden Bedingungen	127
2.2.5.4	Diskontinuierliche SDS-PAGE	128
2.2.6	Nachweis von Nukleinsäuren und Proteinen in Polyacrylamidgelen	129
2.2.6.1	Silberfärbung von Nukleinsäuren	129
2.2.6.2	Silberfärbung von Proteinen	129
2.2.6.3	Autoradiographie	130
2.2.6.4	Densitometrie	130
2.2.6.5	Northern-Blotting	131
2.2.7	Präparative DNA-Gelelution	132
2.2.7.1	DNA-Gelelution aus Agarosegelen nach der 'freeze-squeeze'-Methode	132
2.2.7.2	DNA-Gelelution aus Agarosegelen mittels Zentrifugation über silikonisierte Glaswolle	132
2.3	Spezielle Methoden	133
2.3.1	Präparative Isolation von Ribosomen aus <i>E. coli</i>	133
2.3.2	Präparation und Isolation von Guanosintetraphosphat (ppGpp)	134
2.3.2.1	Synthese von ppGpp	134
2.3.2.2	Analytischer Nachweis von ppGpp durch Dünnschichtchromatographie (DC)	134
2.3.2.3	Anionenaustauschchromatographie	134
2.3.2.4	Gelfiltration	135
2.3.2.5	Messung der Leitfähigkeit	136
2.3.3	Konstruktion von 'mismatch bubble' Templates	136
2.3.3.1	Klonierung von M13 Phagenderivaten für die 'mismatch bubble' Template-Präparation	136
2.3.3.2	Präparation eines 'mismatch bubble' Templates	137
2.3.4	'multiple round' <i>in vitro</i> Transkriptionen	138

2.3.4.1	'multiple round' <i>in vitro</i> Transkriptionen mit 'mismatch bubble' Templates	139
2.3.4.2	'multiple round' <i>in vitro</i> Transkriptionen mit dem \square^{70} - bzw. \square^{38} -Holoenzym (E70 bzw. E38) der RNAP von <i>E. coli</i>	140
2.3.4.2.1	Rekonstitution von RNA-Polymerasen	140
2.3.4.2.2	<i>In vitro</i> Transkriptionen mit E70 bzw. E38 und superhelikalen Templates	140
2.3.4.2.3	<i>In vitro</i> Transkriptionen mit E70 bzw. E38 und linearen Templates	141
2.3.5	Bestimmung von Transkriptionsstartstellen	141
2.3.5.1	<i>In vitro</i> Transkription zur Bestimmung von Transkriptionsstarts von 'mismatch bubble' Templates	142
2.3.5.2	<i>In vitro</i> Transkription zur Bestimmung der Transkriptionsstarts am <i>rrnB</i> P1, <i>bolA1</i> und RNA1 Promotor	142
2.3.5.3	Primer-Extension-Analyse von <i>in vitro</i> Transkriptionsprodukten mit AMV (Reverse Transkriptase)	142
2.3.6	Verzögerungsgelelektrophorese ('gel shift assay')	143
2.3.7	Footprint-Techniken	144
2.3.7.1	Chemische DNA-Modifikation durch Kaliumpermanganat	144
2.3.7.1.1	Allgemeines	144
2.3.7.1.2	Analyse von 'mismatch bubble' Templates mittels chemischer DNA-Modifikation durch Kaliumpermanganat	145
2.3.7.1.3	Kaliumpermanganat-Modifikation von RNAP-Promotorkomplexen	145
2.3.7.2	Enzymatische DNA-Modifikation von RNAP-Promotorkomplexen mit DNase I	146
2.3.7.3	Primer-Extension-Analyse (PE) chemisch bzw. enzymatisch modifizierter DNA	147
	Literaturverzeichnis	149
	Abkürzungsverzeichnis	161

Zusammenfassung

In vivo sind Bakterien einer Vielzahl von Stresssituationen ausgesetzt. Eine spezifische Anpassung an die jeweiligen Wachstumsbedingungen ist dabei essentiell. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei prokaryotische Stressantworten, die Stringente Kontrolle und die generelle Stressantwort, näher charakterisiert.

Unter der Stringenten Kontrolle versteht man die schnelle Antwort der Zelle auf Aminosäuremangel. Die auffälligste Reaktion ist die unmittelbare Inhibierung der stabilen RNA-Synthese. Darüber hinaus sind jedoch auch positiv stringently regulierte Gene bekannt. Die Regulation wird durch das Effektormolekül ppGpp vermittelt. Als weitere relevante Komponenten werden die DNA-abhängige RNA-Polymerase (RNAP) und die jeweiligen Promotoren angesehen. Ein notwendiges, aber nicht hinreichendes Promotorelement der positiven bzw. negativen Stringenten Kontrolle stellt die promotornahe Diskriminatorregion dar. Als Hauptregulationsstufe wird die Initiation der Transkription angesehen. Der entscheidende ppGpp-abhängige Schritt in diesem mehrphasigen Prozess wird jedoch kontrovers diskutiert.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde mit synthetisch konstruierten 'mismatch bubble' Templates die Rolle der zweiten Initiationsphase (offene Komplexbildung) sowie die Rolle der σ -Untereinheit der RNAP und die Funktion der Diskriminatorregion im Rahmen der Stringenten Kontrolle analysiert. 'Mismatch bubble' Templates sind DNA-Fragmente, die über einen definierten Bereich permanent geöffnet sind, wodurch sie eine Transkriptionsblase nachahmen können. Neben der Untersuchung der ppGpp-abhängigen Transkription stand die Analyse der Spezifität der Erkennung der künstlichen Templates im Mittelpunkt. Dazu wurden detaillierte *in vitro* Untersuchungen an drei verschiedenen 'mismatch bubble' Templates mit Homologie zum *rrnB* P1 Promotor durchgeführt. In Verbindung mit früheren Analysen lassen die hier erzielten Ergebnisse folgende Schlussfolgerungen zu:

- Die Erkennung der 'mismatch bubble' Templates durch die RNAP erfolgt in Abhängigkeit von der Promotorsequenz. Dabei ist die Spezifität der RNAP abhängig von der Größe und Lage des ungepaarten Bereichs.
- Der entscheidende Schritt der ppGpp-vermittelten Inhibierung ist der Bildung des offenen Promotorkomplexes nachgeschaltet. Dies untermauert ein aktuelles Regulationsmodell, das von einer ppGpp-abhängigen Inhibierung der Bildung der ternärer Initiationskomplexe ausgeht.
- Die σ -Untereinheit und die Diskriminatorregion sind nicht zwingend notwendig für die negative stringente Regulation, können diese jedoch beeinflussen.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Transkriptionsregulation während der generellen Stressantwort in *E. coli*, deren Hauptregulator die σ^{38} -Untereinheit der RNAP ist (RpoS-Regulon). Sie beschreibt den Wechsel zwischen σ^{70} - und σ^{38} -abhängiger Transkription beim Übergang in die

stationäre Wachstumsphase und bei verschiedenen Stresssituationen. Aufgrund der zellulären Konzentrationen beider σ -Faktoren sowie deren unterschiedlichen Affinitäten zum Core-Enzym der RNAP und der geringen *in vitro* Promotorspezifität der beiden Holoenzyme, ist eine σ^{38} -vermittelte Transkription ohne die Beteiligung weiterer Faktoren nicht vorstellbar.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Modulation der Promotorspezifität durch folgende potenzielle Spezifitätsfaktoren untersucht: Superhelikalität, Kaliumglutamat und ppGpp. In detaillierten strukturellen und funktionellen *in vitro* Analysen an je einem σ^{70} - bzw. σ^{38} -abhängigen Promotor konnten für das σ^{70} - und σ^{38} -Holoenzym der RNAP folgende Ergebnisse ermittelt werden:

- Eine Kreuzerkennung der untersuchten Promotoren durch beide Holoenzyme ist möglich.
- Die Strukturen der RNAP-Promotorkomplexe der beiden Holoenzyme unterscheiden sich nur geringfügig.
- Bei der Bildung der ternären Komplexe ist die notwendige Konzentration der Startnukleotide für den σ^{38} -abhängigen Promotor geringer als für den σ^{70} -abhängigen Promotor.
- Die Spezifität der beiden Holoenzyme zeigt unterschiedliche Abhängigkeiten von der Superhelikalität des Promotors.
- Neben Kaliumglutamat wird hier erstmals für ppGpp die Aktivierung eines σ^{38} -abhängigen Promotors in einem *in vitro* Transkriptionssystem gezeigt.

Kapitel I Allgemeine Einleitung

1 Einleitung

1.1 Die Transkription und ihre zentrale Rolle bei der Genexpression während verschiedener Wachstums- und Stressphasen

Für prokaryotische Zellen ist es essentiell, ihr Wachstum an die jeweiligen Umweltbedingungen möglichst schnell und effektiv anzupassen. Voraussetzung hierfür ist eine effiziente Regulation der Genexpression, d.h. die Umsetzung der im Genom gespeicherten Information in funktionelle Proteine und Nucleinsäuren. Dies wird gewährleistet durch komplexe Kontrollmechanismen aller Teilprozesse der Genexpression: Transkription, RNA-Prozessierung und -Abbau, Translation und posttranslationale Modifikation. Der Transkription als zentraler Prozess kommt in diesem Zusammenhang jedoch eine besondere Bedeutung zu.

Da die Transkriptionsregulation beim Übergang in die stationäre Wachstumsphase und unter diversen Stressbedingungen, darunter vor allem bei Aminosäuremangel, im Mittelpunkt dieser Arbeit steht, sollen im Folgenden zunächst die einzelnen Komponenten und Prozesse der Transkription vorgestellt werden. Anschließend wird näher auf die Regulationsmechanismen der Stringenten Kontrolle und des RpoS-Regulons eingegangen.

1.2 Struktur und Funktion von Promotoren

Promotoren sind die spezifischen DNA-Bindestellen der RNA-Polymerase (RNAP). An ihnen wird die Transkription initiiert. Das Holoenzym der RNAP erkennt in Abhängigkeit vom jeweiligen σ -Faktor (Kapitel I, 1.3.3) verschiedene Promotorstrukturen. Dabei zeigen einige σ -Faktoren eine strikte Spezifität zu den jeweiligen Promotoren, während andere, wie z.B. das mit σ^{70} und mit σ^{38} assoziierte Holoenzym (E70 bzw. E38), überlappende *in vitro* Promotorspezifitäten aufweisen. Da die Spezifität der Holoenzyme, E70 und E38, einen Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit bildet, soll im Folgenden auf die allgemeinen, charakteristischen Merkmale σ^{70} - und σ^{38} -spezifischer Promotoren eingegangen werden.

1.2.1 Der σ^{70} -abhängige Konsensuspromotor

Für σ^{70} -spezifische Promotoren sind konservierte Motive aus Vergleichen von mehr als 300 Promotoren abgeleitet worden (Lisser und Margalit, 1993). Der sogenannte Core-Promotor ist demnach durch drei Elemente gekennzeichnet: die - 10 und die - 35 Region und den diese Sequenzmotive verbindenden 'spacer' (Abb. 1).

Für die - 10 und die - 35 Region, deren Bezeichnung ihre Position relativ zum Transkriptionsstart + 1 wiedergibt, konnten die Konsensussequenzen TATAAT (- 10) und TTGACA (- 35) ermittelt werden. Das dritte Core-Promotorelement, der 'spacer', ist sequenzunabhängig durch eine charakteristische Länge von 17 ± 1 Basenpaare (bp) ausgezeichnet. Es handelt sich bei diesem Element also eher um ein Strukturmotiv, das durch die konservierte Länge, im Zusammenhang mit der Bindung der RNAP, eine optimale Orientierung der - 10 und - 35 Region zueinander bedingt.

Bis heute wurde kein natürlicher Promotor mit 100 %iger Konsensussequenz gefunden, jedoch weisen starke Promotoren meist nicht mehr als drei Abweichungen von der Sequenz und/oder der 'spacer'-Länge auf (Mulligan, 1984).

Neben diesen Grundelementen wurden in einigen Promotoren stromauf- ('upstream') und stromabwärts ('downstream') weitere konservierte Motive gefunden, die die Aktivität des Promotors beeinflussen. So kann der Core-Promotor auf der einen Seite von der 'downstream' Region (DSR) und im 'upstream' Bereich von der UAS-Region ('upstream activating sequence') und dem UP-Element flankiert werden. Das UP-Element, eine AT-reiche Region, wird in zwei Abschnitte (- 38 bis - 46 und - 47 bis - 57) unterteilt, die jeweils mit einer C-terminalen Domäne der σ -Untereinheiten der RNAP (Kapitel I, 1.3.1) interagieren, wodurch die Transkription um ein Vielfaches stimuliert werden kann. Für beide Einheiten des UP-Elementes konnte eine Konsensussequenz postuliert werden (Estrem *et al.*, 1999).

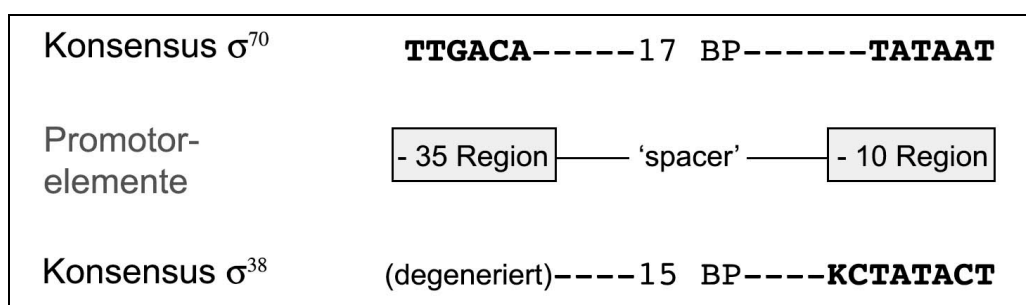


Abb. 1: Übersicht über die minimalen Konsensuspromotor-Elemente σ^{70} - und σ^{38} -abhängiger Promotoren. Dargestellt sind die - 10, 'extended - 10' und - 35 Regionen. Das Kürzel K steht für G oder T.

1.2.2 Merkmale σ^{38} -abhängiger Promotoren

Bis heute konnte noch keine strikte Konsensussequenz für σ^{38} -abhängige Promotoren ermittelt werden, jedoch wurden einige typische Sequenzmerkmale, die zur Selektivität des σ^{38} -Holoenzym beitragen, beschrieben.

Eine Vielzahl σ^{38} -spezifischer Promotoren weist im 'upstream' Bereich eine verlängerte -10 Region ('extended -10') auf, die etwa von Position -14 bis -7 reicht und folgende Konsensussequenz besitzt: KCTATACT (K steht für T oder G) (Abb. 1). Besonders hervorzuheben ist dabei die Position -13. Hier besitzen mehr als 85 % der σ^{38} -abhängigen Promotoren ein C (Espinosa-Urgel *et al.*, 1996; Becker und Hengge-Aronis, 2001). Die -35 Region hingegen ist in den meisten σ^{38} -spezifischen Promotoren degeneriert (Gaal *et al.*, 2001).

Neben diesen klassischen Sequenzmotiven konnte für einige σ^{38} -abhängige Transkriptionseinheiten ein hoher Anteil an AT-Basenpaaren zwischen der -10 Region und dem Transkriptionsstart +1 gezeigt werden (Ojangu, 2000). Zudem scheint so etwas wie ein halbes UP-Element um Position -50 die σ^{38} -Selektivität zu steigern (Germer *et al.*, 2001).

Auch sollte erwähnt werden, dass die allgemeinen σ^{38} -spezifischen Promotormotive in großer Übereinstimmung mit den sogenannten 'gearbox'-Promotoren (Kapitel III, Abb. 1) sind, deren Expression invers zur Wachstumsrate erfolgt.

Außerdem muss darauf hingewiesen werden, dass trotz der beschriebenen Merkmale σ^{38} -abhängiger Promotoren *in vitro* keine strikte σ -Faktor-spezifische Selektion bei der Erkennung der Promotoren erfolgt.

1.3 Struktur und Funktion der DNA-abhängigen RNA-Polymerase

Im Gegensatz zu der eukaryotischen erfolgt die prokaryotische Transkription durch eine einzige DNA-abhängige RNA-Polymerase (RNAP). Das Core-Enzym der RNAP von *E. coli* besteht aus vier verschiedenen Untereinheiten mit folgender Stöchiometrie: $\alpha_2\beta\beta'$.

Die Assemblierung des Enzyms wird durch die Dimerisierung der beiden α -Untereinheiten initiiert, danach folgt zunächst die Bindung der β - und abschließend der β' -Untereinheit (Ishihama, 1981). Die β -Untereinheit wird dabei als Assemblierungshilfe der α -Untereinheiten (Minakhin, 2001) und als Stabilisierungsfaktor der RNAP (Mukherjee *et al.*, 1999) angesehen. Das Core-Enzym kann zwar die Transkription an teilweise aufgeschmolzenen DNA-Regionen und Strangbrüchen initiieren (Burgess, 1969) und besitzt die Fähigkeit der Transkriptelongation und Termination, benötigt jedoch zur spezifischen Promotorerkennung und Initiation der Transkription eine weitere Untereinheit: den σ -Faktor. Das durch die Assoziation des σ -Faktors gebildete Holoenzym der RNAP hat eine Dimension von 90 x 95 x 160 Å und hat ein Molekulargewicht von ca. 460 kDa.

1.3.1 Die α -Untereinheit

Die α -Untereinheit der RNAP von *E. coli* besteht aus 329 Aminosäuren (AS) und hat eine Masse von 36,5 kDa. Sie besteht aus zwei unabhängigen Domänen, die durch einen flexiblen Linker voneinander getrennt sind (Negishi *et al.*, 1995). Dabei unterscheidet man zwischen der N-terminalen Domäne (α -NTD) und der C-terminalen Domäne (α -CTD).

Die α -NTD vermittelt die Initiation der Assemblierung des Core-Enzyms, d.h. sie ist die Dimerisierungsdomäne der beiden α -Untereinheiten. Zudem besitzt sie Kontaktstellen für die Wechselwirkung mit der β - und β' -Untereinheit (Igarashi *et al.*, 1991).

Die α -CTD ist an der Wechselwirkung mit diversen Transkriptionsfaktoren im RNAP-Promotor-Komplex beteiligt (Igarashi *et al.*, 1991). Außerdem bindet sie an das sogenannte UP-Element, wodurch die Transkription um ein Vielfaches verstärkt wird (Kapitel I, 1.2.1).

1.3.2 Die β - und β' -Untereinheiten

Die β - (150 kDa) und die β' -Untereinheit (155 kDa) sind die größten Untereinheiten der RNA-Polymerase von *E. coli*. Sie bilden das katalytische Zentrum der RNA-Polymerase und haben somit eine Funktion bei der NTP- und DNA-Bindung (Gross *et al.*, 1996). Beide Untereinheiten zeigen eine große Homologie zu den entsprechenden Untereinheiten eukaryotischer RNA-Polymerasen.

Die β -Untereinheit besitzt mehrere funktionelle Bereiche. So konnten für den C-Terminus Wechselwirkungen mit der β - und β' -Untereinheit gezeigt werden. Im mittleren Bereich der Untereinheit konnten Mutationen mit Auswirkungen auf Pausierungen und die Termination der Transkription identifiziert werden. Außerdem sind mehrere Mutationen beschrieben, die die Stringente Antwort (Kapitel I, 1.5.1) auf Aminosäuremangel beeinflussen. Auch wurden zahlreiche gegen das Antibiotikum Rifampicin resistente Mutanten charakterisiert. Rifampicin inhibiert die Bildung der ersten Phosphodiesterbindung der naszierenden RNA, hat jedoch keinen Einfluss auf die fortgeschrittene Elongation der Transkription. Dabei ist die Bindestelle des Antibiotikums in der Nähe der NTP-Bindestelle im aktiven Zentrum lokalisiert (Severinov *et al.*, 1995).

Für die β' -Untereinheit konnten Mutationen charakterisiert werden, die die Termination der Transkription beeinflussen. Außerdem konnte eine Interaktion mit dem Antibiotikum Streptolydigin, dessen Wirkort die Transkriptionselongation ist, gezeigt werden. Am N-terminalen Bereich der β' -Untereinheit befindet sich eine Zinkfinger-Struktur, die ein DNA-Bindemotiv darstellt. Zudem zeigt diese Untereinheit Kontaktstellen zu der β -Untereinheit (Wagner, 2000).

1.3.3 Die σ -Untereinheit

Das *E. coli* Genom kodiert für mindestens sieben verschiedene σ -Faktoren. Neben dem σ^{70} -Faktor, der für die Transkription der meisten Gene während des exponentiellen Wachstums verantwortlich ist, werden alternative Sigmafaktoren synthetisiert, die für die Transkription der stationären Phase-spezifischen Gene (σ^{38}), der Hitzeschock-Gene (σ^{24} und σ^{32}), der Gene der Flagellensynthese (σ^{28}), des Eisencitrat-Transportes (σ^{19}) und der Stickstoffassimilation (σ^{54}) essentiell sind (Abb. 2).















σ -Faktoren der RNA-Polymerase von <i>E. coli</i>		
σ -Faktoren		σ -spezifische Gene
σ^{70} (RpoD) (613 AS)		 1000 Gene
σ^{54} (RpoN) (477 AS)		 15 Gene
σ^{38} (RpoS) (330 AS)		 100 Gene
σ^{32} (RpoH) (284 AS)		 30 Gene
σ^{28} (RpoF) (239 AS)		 40 Gene
σ^{24} (RpoE) (202 AS)		 5 Gene
σ^{19} (Fecl) (173 AS)		 5 Gene

Abb. 2: σ -Faktoren der RNA-Polymerase von *E. coli*. Dargestellt sind die sieben σ -Faktoren der RNAP, ihre Größe in Aminosäuren (AS) und eine ungefähre Anzahl ihrer spezifischen, bis heute identifizierten Gene (verändert nach: Ishihama, 2000).

Mit Ausnahme des σ^{54} sind die erwähnten Spezifitätsfaktoren der RNAP homolog und werden der σ^{70} -Familie zugeordnet. Besonderes Augenmerk soll hier auf den exponentielle Phase (σ^{70}) und den stationäre Phase σ -Faktor (σ^{38}) gelegt werden.

Generell werden dem an das Core-Enzym der RNAP assoziierten σ -Faktor folgenden Funktionen zugeordnet: Erkennung des jeweiligen Core-Promotors, Isomerisation der DNA zum offenen Promotorkomplex, Wechselwirkung mit Transkriptionsfaktoren und Direktion des Transkriptionsstarts + 1 (Record *et al.*, 1996; Fredrick, 1997).

1.3.3.1 Der σ^{70} -Faktor

Der σ^{70} -Faktor ist 613 Aminosäuren lang, hat ein Molekulargewicht von 70,2 kDa und ist das Produkt des *rpoD* Gens. Er ist verantwortlich für die Transkription der meisten Gene während der exponentiellen Wachstumsphase.

Als repräsentativer Vertreter der σ^{70} -Familie ist er anhand genetischer und biochemischer Analysen gut untersucht und wird in mehrere konservierte Regionen gegliedert, denen bestimmte Funktionen zugeordnet werden (Abb. 4). Darüber hinaus ist seit einigen Jahren die hochauflösende Röntgenkristallstruktur (2.6 Å) des σ^{70} von *E. coli*, mit Ausnahme der ersten 73 AS (N-Terminus, Region 1.1), bekannt (Abb.3). Die Struktur des σ^{70} -Fragmentes ist V-ähnlich und kann in vier strukturelle Domänen untergliedert werden: σ_2 , σ_3 , einen 'linker' und σ_4 (Abb. 3).

(a)

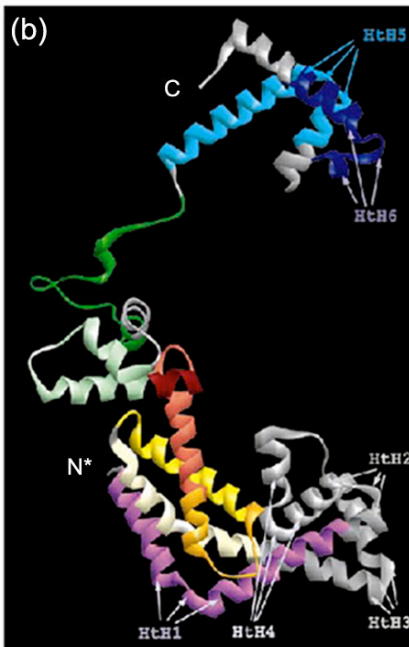


Abb. 3: Röntgenkristallstruktur des σ^{70} -Faktors von *E. coli*. (a) Schematische Darstellung der strukturellen Domänen (σ_{2-4} und der 'linker') und konservierten Regionen (1.1-4.2). α -Helices sind durch rosa farbene Balken dargestellt. (b) Dreidimensionale Struktur des σ^{70} -Faktors (AS 73 bis 613). Die Farbkodierung der Strukturen entspricht der Farbe der zugehörigen konservierten Region in (a). Wenig konservierte Bereiche sind in grau dargestellt. Der C-Terminus (C) und der N-Terminus des σ -Fragmentes (N^*) sind gekennzeichnet (verändert nach: (Vassylyev *et al.*, 2002))

σ_2 besitzt acht α -Helices, die vier 'helix-turn-helix'-Motive (HTH) bilden. Sie erstreckt sich über die konservierten Regionen 1.2 bis 2.4. Die σ_3 Domäne wird durch drei α -Helices gebildet und reicht von Region 2.4 bis 3.1. Diese beiden globulären N-terminalen Domänen werden durch einen 30 AS langen 'linker', der bis auf eine 'hairpin-loop' Struktur nahezu ungefaltet ist, von einer weiteren globulären C-terminalen Domäne (σ_4) getrennt. σ_4 erstreckt sich über die Domänen 4.1 und 4.2 und besitzt vier α -Helices, die zwei HTH-Motive bilden. Mit Hilfe der Röntgenkristallstruktur von σ^{70} konnte gezeigt werden, dass die Aminosäuren, die mit dem Core-Enzym interagieren, auf einer Seite der Struktur liegen, während die Interaktion mit der -10 Region auf der anderen Seite des Enzyms erfolgt.

Für die Bindung an das Core-Enzym der RNAP konnten Protein-Protein-Wechselwirkungen mit der σ - und der σ' -Untereinheit in den Regionen 2.1, 2.2

und 3.2 von σ^{70} identifiziert werden. Dabei wird den folgenden Aminosäuren in den Regionen 2.1 und 2.2 eine besondere Rolle zugeordnet: L384, V387, L402, D403, Q406, E407, N409 und M413 (Campbell *et al.*, 2002).

Auch der DNA-Bindung können bestimmte Regionen zugeordnet werden. Die Erkennung der -10 Region erfolgt durch die Region 2.4 (Record *et al.*, 1996). Es wird angenommen, dass die basenspezifische DNA-Erkennung durch eine direkte Interaktion mit den Positionen -12 (Q437 und T440) und -13 (R441) des 'non template' Strangs erfolgt. Die Funktion der Isomerisierung vom geschlossenen zum offenen RNAP-Promotor-Komplex wird vor allem der Region 2.3 zugeordnet. Neben der Erkennung der Positionen -10 und -11 ('non template' Strang) durch die AS Y430 und W433, sollen zwei weitere AS (Y425 und W434) für den Aufschmelzprozess der DNA essentiell sein (Malhotra *et al.*, 1996; Campbell *et al.*, 2002).

Die Erkennung des 'upstream' gelegenen TG-Motivs sogenannter verlängerter -10 Regionen ('extended -10') wird der konservierten Region 2.5, die auch als Region 3.0 bezeichnet wird, zugeschrieben (Barne *et al.*, 1997). Auch für diese Promotor-Erkennung konnten zwei wichtige AS (E458 und H 455) identifiziert werden (Campbell *et al.*, 2002). Zudem soll die konservierte Region 3 im RNAP-Promotor-Komplex nahe der Nukleotid-Bindestelle und des Transkriptionsstarts am 'template' Strang lokalisiert sein (Severinov *et al.*, 1994).

Bei der Erkennung der -35 Region des Promotors spielen die Regionen 4.1 und 4.2 des σ -Faktors eine wesentliche Rolle. Am 'non template' Strang sollen die Interaktionen an den Positionen -35 bis -38 und am 'template' Strang von der Position -31' bis -33' erfolgen. Die Protein-DNA-Wechselwirkungen sollen dabei vor allem auf Interaktionen mit dem Phosphatrückgrat beruhen (Campbell *et al.*, 2002).

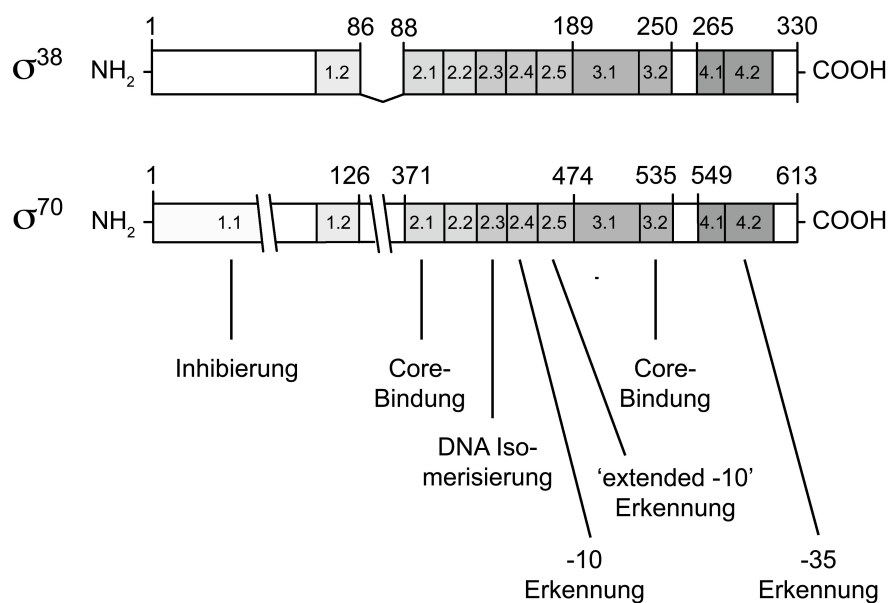


Abb. 4: Schematischer Vergleich der funktionellen Domänen der Spezifitätsfaktoren σ^{38} und σ^{70} . Die Positionen der konservierten Bereiche sind anhand der Aminosäuren gekennzeichnet. Zusätzlich sind die einzelnen Funktionen der konservierten Regionen 1 bis 4 hervorgehoben.

Der σ^{70} -Faktor besitzt die Fähigkeit der DNA-Bindung und Promotor-Erkennung jedoch nur im Verbund mit dem Core-Enzym der RNAP. Im freien σ^{70} wird die DNA-Bindung durch die saure Region 1.1, dessen Struktur bis heute nicht aufgeklärt werden konnte, unterbunden (Dombroski *et al.*, 1992; Dombroski *et al.*, 1993; Camarero, 2002). Es wird angenommen, dass die saure Domäne die Regionen der DNA-Bindung im ungebundenen σ^{70} -Faktor maskiert (Autoinhibition). Die Inhibierung der DNA-Bindung wird durch die Assemblierung an das Core-Enzym und der daran gekoppelten Konformationsänderung aufgehoben (Kapitel I, 1.3.4).

1.3.3.2 Der σ^{38} -Faktor

Ein weiterer Vertreter der σ^{70} -Familie ist der alternative Spezifitätsfaktor σ^{38} bzw. σ^S . Er ist verantwortlich für die Transkription von zahlreichen Genen während der stationären Phase, aber auch unter diversen Stressbedingungen, wie z.B. Hunger, hohe Osmolarität des umgebenden Mediums, hohe und niedrige Temperaturen (Hengge-Aronis, 1996; Muffler *et al.*, 1997). Insgesamt sind mehr als 70 σ^{38} -spezifische Gene beschrieben. Die Synthese und Degradation des σ^{38} -Faktors unterliegt komplexen Regulationsmechanismen. Während der exponentiellen Phase ist σ^{38} in der Zelle kaum nachweisbar, erst unter den oben beschriebenen Bedingungen nimmt seine Expression um das drei- bis 20fache zu (Hengge-Aronis, 2003). Trotzdem soll seine maximale Konzentration nur bis zu 30 % von der des σ^{70} -Faktors erreichen (Ishihama, 2000).

σ^{38} ist das Produkt des *rpoS*-Gens. Er hat eine Länge von 330 Aminosäuren und ein Molekulargewicht von 37.8 kDa. Er ist der alternative σ -Faktor mit der größten Homologie zu σ^{70} (Abb. 3). Trotz der großen Übereinstimmung soll die Affinität zum Core-Enzym der RNAP fünffach geringer sein als für σ^{70} (Colland *et al.*, 2002).

Die genaue Struktur des Sigmafaktors konnte bis heute noch nicht aufgeklärt werden. Wie alle Spezifitätsfaktoren der σ^{70} -Familie gliedert sich der stationäre Phase σ -Faktor jedoch ebenfalls in vier konservierte Regionen (Abb. 2). Im Vergleich zum σ^{70} fehlt ihm allerdings der wenig konservierte 'spacer' zwischen den Regionen 1.2 und 2.1. Außerdem besitzt σ^{38} eine kürzere Region 1.1, die zudem wenig homolog zu der des σ^{70} ist (Dombroski *et al.*, 1993; Wilson und Dombroski, 1997). Im Gegensatz dazu sind die Regionen der DNA-Erkennung der beiden Sigmafaktoren stark konserviert, die Regionen 4.2 und 2.3 bis 2.5 zeigen eine Homologie von mehr als 70 %.

Im Allgemeinen wird heute eine vergleichbare, aber keineswegs identische Organisation der beiden Sigmafaktoren im Holoenzymkomplex angenommen. Verschiedene Protein-Footprint-Analysen der beiden Holoenzyme E70 und E38 weisen neben einer Vielzahl von übereinstimmenden Signalen auf unterschiedliche Interaktionen der Region 2 (2.2 bis 2.4) sowohl mit der σ - als auch der σ' -Untereinheit der RNAP hin (Datwyler und Meares, 2000; Colland *et al.*,

2002). Ein weiterer Unterschied zwischen σ^{70} und σ^{38} ist in den Regionen 4.1 und 4.2 (-35 Erkennung) lokalisiert. Diese konservierten Regionen erfahren bei der Bindung an das Core-Enzym unterschiedliche Konformationsänderungen und weisen im Holoenzymkomplex verschiedene Zugänglichkeiten auf (Datwyler und Meares, 2000; Colland *et al.*, 2002). Trotz des Unterschiedes dieser Regionen und obwohl σ^{38} -abhängige Promotoren in der Regel eine degenerierte -35 Region aufweisen, kann das σ^{38} -Holoenzym die -35 Elemente einiger Promotoren erkennen (Lonetto *et al.*, 1992).

Wie für σ^{70} beschrieben, wird die Erkennung der -10 und der 'extended -10' Region den konservierten Regionen 2.4 und 2.5 bzw. 3.0 zugeordnet. Dabei konnte für die essentielle -13C-Erkennung σ^{38} -spezifischer Promotoren eine Interaktion mit den Aminosäuren Q152, E155 und K173 ermittelt werden (Checroun *et al.*, 2004). Bemerkenswert ist dabei, dass die den Aminosäuren Q152 und E155 entsprechenden Aminosäuren Q437 und T440 von σ^{70} der direkten DNA-Interaktion mit der Position -12 zugeordnet sind (Kapitel I, 1.3.3.1).

1.3.4 Die dreidimensionale Struktur der RNA-Polymerase

Bis heute ist keine hochauflösende Struktur der *E. coli* RNA-Polymerase bekannt. In den letzten Jahren konnte jedoch die Kristallstruktur des Core- und Holoenzym der RNAP von *Thermus thermophilus* mit einer Auflösung von 2.6 Å aufgeklärt werden (Vassylyev *et al.*, 2002). Aufgrund der großen Homologie der beiden RNA-Polymerasen gibt diese näheren Einblick in die Gesamtstruktur bakterieller RNA-Polymerasen (Abb. 5).

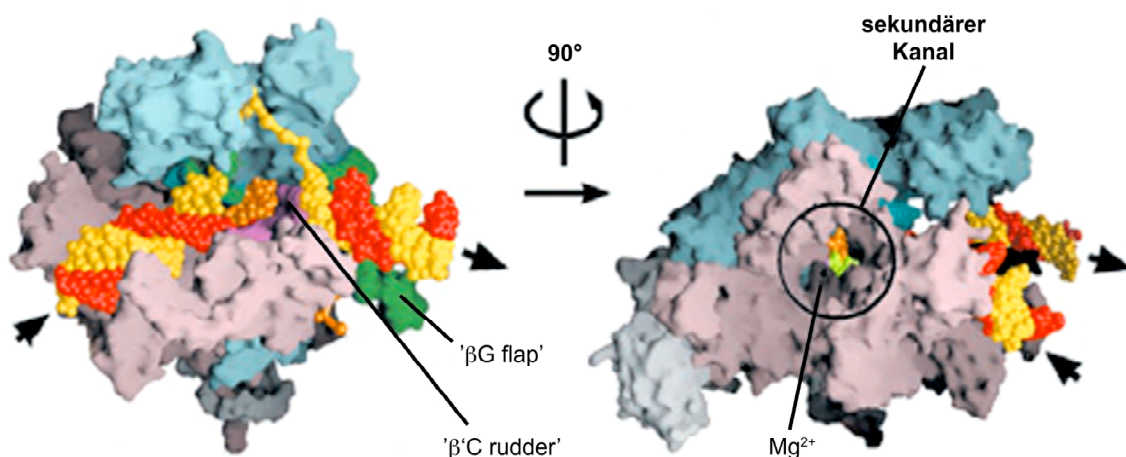


Abb. 5: Zwei Ansichten der dreidimensionalen Struktur des ternären Elongationskomplexes der RNA-Polymerase (*Thermus aquaticus*). Die einzelnen Untereinheiten des Core-Enzyms sind mit folgenden Farben kodiert: \square = grün-blau; \square = violett; \square und \square = grau-weiß. Der 'template' Strang ist in rot und der 'non template' Strang in gelb dargestellt. Das RNA-Transkript ist in orange hervorgehoben. Die Ein- und Austrittsstelle der DNA ist jeweils mit großen Pfeilen gekennzeichnet (Korzheva *et al.*, 2000).

Die beschriebene Struktur der RNAP gleicht einer Krabberschere ('crab-claw'). Dabei wird der eine Arm der Krabberschere von der β -Untereinheit und der andere Teil von der β' -Untereinheit gebildet. Das aktive Zentrum des Enzyms befindet sich am Schnittpunkt der beiden Krabberscheren und hat ein Mg^{2+} -Ion gebunden. Zwischen den Krabberscheren liegt ein Kanal, der durch die sogenannte 'bridging Helix', die von einer Domäne der β -Untereinheit und Interaktion mit der β' -Untereinheit gebildet wird, in einen Hauptkanal und einen kleineren sekundären Kanal geteilt wird. Der sekundäre Kanal ist die Eintrittsstelle der Nukleotide und verschiedener Transkriptionseffektoren zum aktiven Zentrum. Im Hauptkanal liegen die geöffnete DNA und das naszierende RNA-Transkript als verbundenes RNA-DNA-Hybrid.

Im Elongationskomplex reicht das Hybrid vom aktiven Zentrum bis zu einem weiteren Strukturmotiv, dem sogenannten Ruder (' β '-C-rudder'), welches von einer konservierten Domäne der β -Untereinheit gebildet wird. Die gebildete RNA wird anschließend durch den Kanal unterhalb einer flexiblen Domäne der β -Untereinheit (' β '-G-flap') herausgeschleust. Innerhalb der Transkriptionsblase werden die DNA-Stränge durch Domänen der β -Untereinheit voneinander getrennt (Finn, 2000).

Zum besseren Verständnis der Anordnung der Untereinheiten der RNAP sind in Abbildung 6 drei verschiedene Konformationen des Enzyms dargestellt:

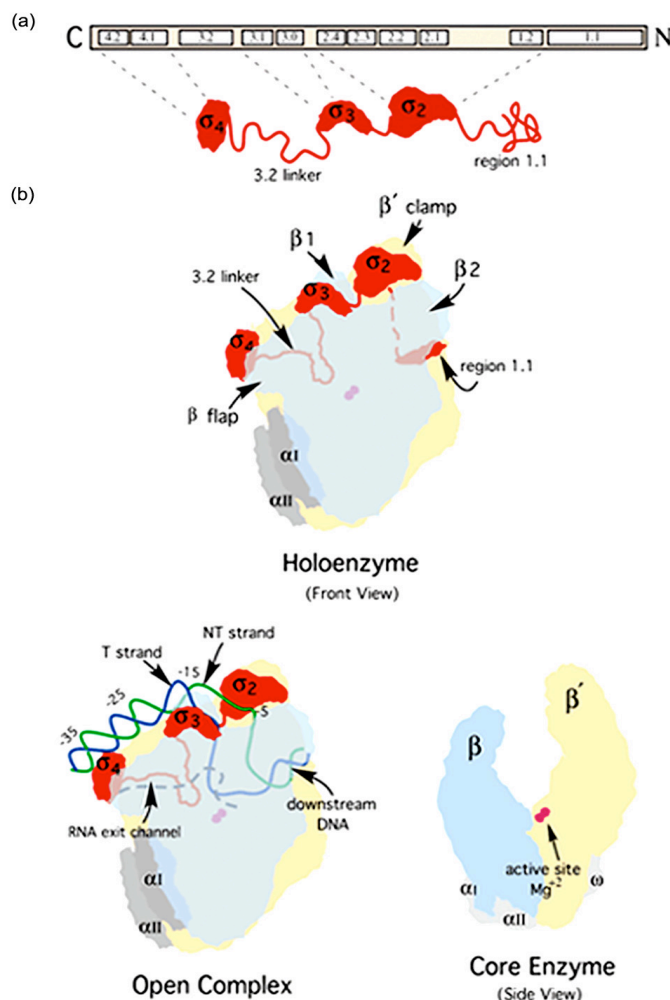


Abb. 6: Schematische Darstellung der Struktur des σ -Faktors und der RNAP.

(a) Darstellung der konservierten Regionen 1.1 bis 4.2 des σ -Faktors und Übersicht über die globulären Domänen (σ_{2-4}).

(b) Schematische Darstellung von drei RNAP-Konformationen (Holoenzym, offener Komplex ('Open Complex') und Core-Enzym). Verschiedene β - und β' -Domänen sind angezeigt.

Farbkodierung: β ' = beige; β = blau; α I und α II = grau; σ = rot; Mg^{2+} (im aktiven Zentrum) = magenta; 'template' Strang (T) = dunkelblau; 'non template' Strang (NT) = grün (Hsu, 2002).

Im Holoenzym und im Initiationskomplex soll durch die Bindung des Sigmafaktors eine Verringerung der Größe der beschriebenen Kanäle erfolgen. Der Sigmafaktor ist dabei hauptsächlich an der Oberfläche des Core-Enzyms lokalisiert (Abb. 6). Nur ein kleiner Teil (AS 313-342) dringt in das Core-Enzym ein. Außerdem befindet sich ein Bereich des Sigmafaktors, darunter auch die konservierten Regionen 2.4 - 2.5 und 3.1, in der Nähe des DNA-bindenden Hauptkanals (Vassilyev *et al.*, 2002).

1.4 Die Transkription

Die Transkription kann in drei Phasen unterteilt werden: Initiation, Elongation und Termination. Im Folgenden sollen diese Phasen näher erläutert werden, wobei der Schwerpunkt auf der Initiation der Transkription liegen soll, da die Regulation dieses Prozesses im Focus der vorliegenden Arbeit steht.

1.4.1 Die Initiation

Die Initiation der Transkription umfasst die Erkennung und Bindung des Promotors durch die RNA-Polymerase und die Synthese der ersten Nukleotide bis zum Verlassen des Promotors und Übergang in den Elongationskomplex. Der Initiationsprozess lässt sich in vier Hauptphasen untergliedern, die schematisch in Abbildung 7 dargestellt sind.

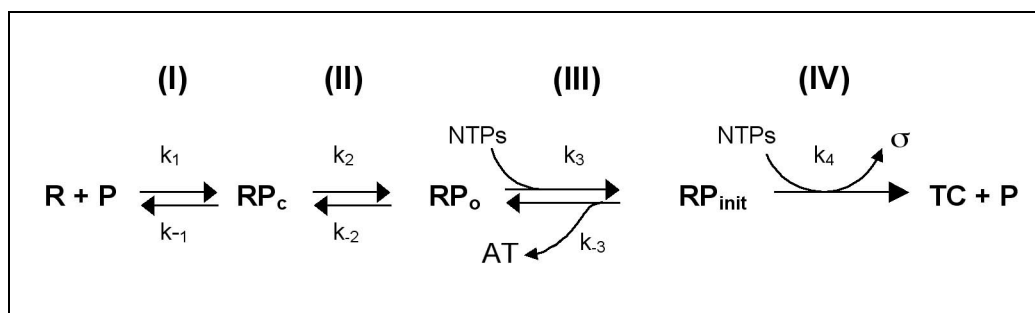


Abb. 7: Schematische Darstellung der vier Phasen der Transkriptionsinitiation. Dargestellt sind die Phasen (I-IV) der Initiation von der Bindung der RNAP (R) an den Promotor (P), der Bildung des binären geschlossenen Promotorkomplexes (RP_c), der Isomerisierung zum offenen Komplex (RP_o), der Bildung des ternären Initiationskomplexes (RP_{init}), bis zum Entlassen des σ -Faktors und Übergang zum Elongationskomplex (TC). AT = abortive Transkripte (Record *et al.*, 1996).

Der erste Schritt (I) der Initiation ist durch die reversible, spezifische Bindung des Holoenzym der RNA-Polymerase an den Promotor und die Ausbildung des initialen geschlossenen Komplexes (RP_c) gekennzeichnet. Dieser Komplex wird als geschlossen bezeichnet, da die DNA in dieser Phase der Initiation doppelsträngig vorliegt. Hierbei bedeckt die RNAP einen Bereich von etwa 60 Basenpaaren (bp), der sich von Position - 55 bis + 5 erstreckt (Mecsas *et al.*, 1991). Für einige Promotoren konnte ein weiterer geschlossener Komplex (RP_{c2}) identifiziert werden, in dem die RNAP auch 'downstream' des

Transkriptionsstarts + 1 mit dem Promotor interagiert. Die Protektion des Promotors durch die RNAP reicht in diesem Fall von Position - 55 bis + 20 (Mecasas *et al.*, 1991).

Im zweiten Schritt (II) der Initiation erfolgt die reversible Öffnung des DNA-Doppelstrangs über einen zehn bis fünfzehn Basenpaare langen Bereich. Das Aufschmelzen der DNA beginnt 'upstream' des Transkriptionsstarts und reicht im finalen, binären offenen Komplex (RP_o) von der - 10 Region (- 12) bis zur Position + 2. Bei den meisten Promotoren wird die Bildung des offenen Komplexes allein durch die Bindungsenthalpie der RNAP angetrieben, d.h. in der Regel ist keine externe Energie für die Isomerisierung notwendig. Die ermittelte Ausdehnung des RP_o entspricht der des beschriebenen RP_{c2} .

Mit dem Einbau des ersten Startnukleotids geht der binäre offene Promotorkomplex schließlich in einen ternären Initiationskomplex (RP_{init}) über, dessen Protektionsfootprint bis zum Einbau des dritten Nukleotids vergleichbar ist mit dem von binären offenen Komplexen (Spassky, 1986; Newlands *et al.*, 1991). Erst bei dem weiteren Einbau von Nukleotiden (nt) kann eine 'downstream' Bewegung der RNAP beobachtet werden ('promoter clearance'). Im Folgenden kann die Initiation zwei Wege beschreiten. Zum Einen kann durch den Einbau weiterer Nukleotide der Übergang in den Elongationskomplex mit Verlassen des Core-Promotors ('promoter escape') erfolgen und zum Anderen kann der Initiationskomplex durch die Abspaltung der naszierenden RNA wieder in den binären offenen Komplex übergehen. Die im letzteren Fall erfolgende zyklische Synthese kurzer RNA-Moleküle mit einer Länge von 7 bis 12 nt wird als abortive Transkription (AT) bezeichnet.

Erst wenn ein Transkript mit einer Länge von mehr als 12 Nukleotiden gebildet wird, geht der Komplex in den Elongationskomplex über. Dieser vierte Schritt (IV) der Initiation ist durch das Entlassen des σ -Faktors, Konformationsänderungen der RNA-Polymerase und das Verlassen des Core-Promotors gekennzeichnet. Neuere *in vitro* Untersuchungen weisen darauf hin, dass der Spezifitätsfaktor σ nicht zwingend während der 'promoter escape' entlassen wird, sondern auch während der Elongation an dem Core-Enzym der RNAP assoziiert bleiben kann (Mukhopadhyay *et al.*, 2001).

1.4.2 Die Elongation

Beim Übergang in den Elongationskomplex erfährt der Promotorkomplex eine strukturelle Veränderung. Die Protektion des Core-Enzyms umfasst in diesem Stadium nur noch 30 bis 40 bp (Krummel und Chamberlin, 1992), während die Transkriptionsblase eine Erweiterung bis auf eine Größe von 17 nt erfährt (Sasse-Dwight und Gralla, 1989). Außerdem bildet das 3'-Ende der naszierenden RNA ein RNA-DNA-Hybrid mit dem 'template' Strang. Dabei wird eine Hybridlänge von acht bzw. neun Basenpaarungen postuliert (Nudler *et al.*, 1998; von Hippel, 1998).

Die durchschnittliche Syntheserate der Elongation beträgt zwischen 40 und 50 nt/s. Für nichttranslatierte RNAs, wie die ribosomalen RNAs, wurde sogar eine

maximale Syntheserate von 90 nt/s ermittelt (Vogel und Jensen, 1994). Die Elongation ist jedoch kein kontinuierlicher Prozess, die Synthese kann durch unterschiedliche Pausierungen der RNAP unterbrochen werden (Kingston *et al.*, 1981; Krohn und Wagner, 1996; Artsimovitch *et al.*, 2000). Diese Pausen besitzen in vielen Fällen eine regulatorische Funktion, wie z.B. Synchronisation der Transkription mit der Translation oder der Ausbildung funktionell wichtiger RNA-Strukturen.

1.4.3 Die Termination

Die Termination der Transkription umfasst das Ende des Polymerisationsvorganges sowie die Entlassung des fertigen Transkriptes und die Dissoziation der RNA-Polymerase von der DNA-Matrize. In *E. coli* werden zwei Terminationsmechanismen unterschieden: die faktorunabhängige bzw. intrinsische und die faktorabhängige Termination.

Bei der faktorunabhängigen Termination wird die Elongation durch intrinsische Strukturen innerhalb der RNA gestoppt. Dabei ist in einer Entfernung von etwa 30 nt vom Terminationspunkt eine GC-reiche Region lokalisiert, die eine stabile Haarnadelstruktur ('hairpin') ausbilden kann. An diesen 'hairpin' schließen sich drei bis acht Uracil-Reste an, die das RNA-DNA-Hybrid destabilisieren (Martin und Tinoco, 1980). Die Terminationseffizienz korreliert mit der Stabilität des 'hairpins'. Es wird angenommen, dass sowohl die Ausbildung der Sekundärstruktur als auch das dArU-Hybrid die ternären Elongationskomplexe destabilisieren (Mooney *et al.*, 1998). Etwa 50 % der Terminationsereignisse erfolgen an solchen intrinsischen Terminatoren. Oft findet man sogar, wie z.B. beim *rnmB* Operon, zwei hintereinander geschaltete intrinsische Terminatoren.

Die faktorabhängige Termination wird durch den Terminationsfaktor Rho vermittelt. Er besteht aus sechs identischen Untereinheiten mit einer Größe von je 46 kDa. Eingeleitet wird die Rho-abhängige Termination durch die Bindung des Hexamers an die sogenannte '*rut*-site' ('Rho utilization site'), eine weitgehend unstrukturierte Region mit einer minimalen Länge von 85 nt (Hart, 1994). Unter Hydrolyse von ATP kann sich der Rho-Faktor auf dem Transkript in Richtung 3'-Ende bewegen und die RNAP aufgrund von Pausierungstellen 'downstream' der '*rut*-site' (Jin, 1992) einholen. Mit Hilfe der Helikaseaktivität des Rho-Faktors erfolgt die Trennung des RNA-DNA-Hybrids, wodurch das Transkript aus dem Komplex entlassen wird. Die resultierenden Transkriptenden der faktorabhängigen Termination sind sehr heterogen. Sie weisen Längenunterschiede von bis zu 50 nt auf.

1.5 Regulation der Transkription während verschiedener Wachstumsphasen

Die *E. coli* Zelle muss schnell und effektiv auf eine Vielzahl externer Stressestimuli reagieren. Dies ist unweigerlich an sich ändernde Expressions-

muster gekoppelt, die nicht selten die Morphologie der Zellen und vor allem die Wachstumsrate betreffen. Die wichtigste Kontrollstelle ist dabei die Transkription.

Im Folgenden werden zwei essentielle prokaryotische Stressantworten erläutert: die Stringente Kontrolle und die generelle σ^{38} -abhängige Stressregulation.

1.5.1 Die Stringente Kontrolle

Unter der Stringenten Kontrolle versteht man die schnelle Antwort der Bakterienzelle auf Aminosäuremangel. Schon vor Jahrzehnten konnte Guanosintetraphosphat (ppGpp) als Effektormolekül dieser Regulation identifiziert werden.

Als Sensor der ppGpp-Synthese fungieren deacylierte tRNAs, die codongerecht an die A-Site der Ribosomen binden (Cashel, 1969; Haseltine und Block, 1973). Dies stimuliert die Synthese von Guanosinpenta- (pppGpp) bzw. Guanosintetraphosphat (ppGpp) durch das ribosomassoziierte Enzym RelA. RelA phosphoryliert enzymatisch GDP bzw. GTP, wobei ATP als Diphosphat-Donor dient. Nach Auslösen der stringenten Kontrolle führt die RelA-vermittelte Synthese rasch zu einer Konzentrationszunahme bis in den millimolaren Bereich.

Neben dieser ppGpp-Synthetase verfügt die Zelle über ein weiteres Enzym zur ppGpp-Synthese: das cytoplasmatische SpoT-Protein. SpoT ist nicht nur für die Synthese des basalen ppGpp-Niveaus, sondern auch für den Abbau des Effektormoleküls verantwortlich (Xiao *et al.*, 1991).

Die Folge des Aminosäuremangels ist eine Inhibierung der Nukleinsäure- und Proteinsynthese sowie eine Aktivierung von Proteinabbau und Aminosäuresynthese. Dabei wirkt das Effektormolekül hauptsächlich auf der Ebene der Transkriptionsinitiation.

Bevor auf die heutigen Erkenntnisse des Mechanismus der negativen als auch positiven Regulation eingegangen wird, soll zunächst ein negativ stringent kontrollierter Promotor, der ribosomale *rrnB* P1, dessen Analyse auch Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist, vorgestellt werden.

1.5.1.1 Regulation der Synthese ribosomaler RNA am Beispiel des *rrnB* P1 Promotors

Der *rrnB* P1 Promotor ist einer von zwei Tandempromotoren des ribosomalen B Operons von *E. coli*. Insgesamt verfügt *E. coli* über sieben nahezu identische ribosomale Operons (*rrnA*, *rrnB*, *rrnC*, *rrnD*, *rrnE*, *rrnG* und *rrnH*) (Ellwood und Nomura, 1982), die jeweils für drei verschiedene rRNAs (5S, 16S und 23S) und einige tRNAs kodieren. Die ribosomalen RNAs bilden zusammen mit insgesamt 52 Proteinen die Ribosomen. Sie sind die Orte der Proteinbiosynthese, deren Effizienz mit dem Zellwachstum eng verknüpft ist.

Neben der Stringenten Kontrolle spielt auch die Wachstumsratenregulation der Synthese ribosomaler RNAs eine zentrale Rolle. Unter der Wachstumsratenkontrolle versteht man die Anpassung der Transkription stabiler RNAs an die jeweilige Wachstumsrate. Dabei verhält sich die Syntheserate annähernd proportional zu dem Quadrat der Wachstumsrate, während die Synthese der mRNA unbeeinflusst bleibt. Bis heute konnte kein alleiniger Regulator für diesen Kontrollmechanismus identifiziert werden, vielmehr wird ein komplexes Zusammenspiel mehrerer Effektoren angenommen. Seit Jahren wird in diesem Zusammenhang z.B. die Beteiligung von ppGpp kontrovers diskutiert. Dabei soll vor allem der durch das SpoT-Protein synthetisierte basale ppGpp-Level, der sich invers zur Wachstumsrate verhält, regulativ wirken (Hernandez und Bremer, 1991). Dem widersprechend konnte *in vivo* eine Wachstumsratenregulation in Abwesenheit von ppGpp gezeigt werden (Gaal und Gourse, 1990; Bartlett und Gourse, 1994). Zusätzlich wurde eine Regulation über die Konzentration der Initiationsnukleotide postuliert (Gaal *et al.*, 1997). Jüngere Analysen weisen jedoch keine Korrelation zwischen der Wachstumsrate und der Nukleotidkonzentration auf (Petersen und Møller, 2000; Schneider und Gourse, 2003). Darüber hinaus wird die wachstumsphasen-abhängige Synthese der ribosomalen RNAs durch mehrere Transkriptionsfaktoren, wie z.B. FIS und H-NS (s.u.), beeinflusst.

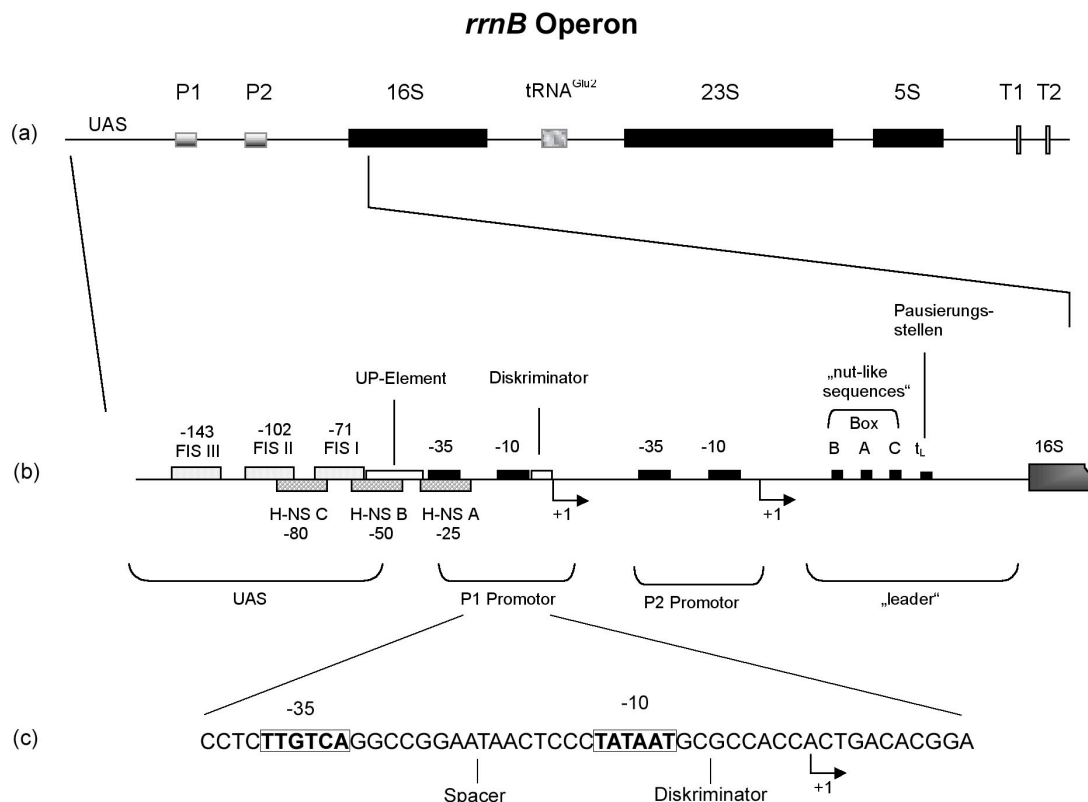


Abb. 8: Schematische Darstellung des *rrnB* Operons von *E. coli*. (a) Organisation des *rrnB* Operons. (b) Vergrößerte Darstellung der Promotorregion bis zur 16S RNA. Abgebildet sind die UAS-Region, inklusive FIS- und H-NS-Bindestellen, das UP-Element, die Tandempromotoren P1 und P2, inklusive Diskriminatorregion des P1 und die regulatorischen Sequenzen des 'leader'-Bereichs. (c) Core-Promotorsequenz des *rrnB* P1. Der Transkriptionsstart + 1 ist durch einen Pfeil markiert (Wagner, 2000).

In Abbildung 8 (a) ist exemplarisch für die sieben ribosomalen Transkriptionseinheiten das *rrnB* Operon dargestellt. Im 'upstream' Bereich flankiert von der regulatorischen UAS-Region liegen in einem Abstand von 119 Basenpaaren die zwei tandemartig angeordneten Promotoren. Beide Promotoren besitzen annähernd die für σ^{70} -abhängige Promotoren beschriebene Konsensussequenzen, weichen jedoch mit einer 'spacer'-Länge von 16 bp um ein Basenpaar von der Konsensuslänge ab.

Von den beiden Promotoren wird die Transkription eines stark konservierten, strukturierten und regulatorisch wirkenden 'leader'-Bereichs und der drei distal folgenden rRNA-Strukturgene und tRNAs gestartet. Die Termination der Transkription erfolgt an zwei tandemartig angeordneten, intrinsischen Terminatoren (T1 und T2).

Der ribosomale P1 Promotor ist *in vivo* unter exponentiellen Wachstumsbedingungen stärker frequentiert als der P2 Promotor und gehört zu den stärksten Promotoren der Zelle. Lange Zeit galt der P2 Promotor zudem als relativ unreguliert. Jüngere Analysen konnten jedoch ebenfalls eine Regulation der P2 Promotoren in Abhängigkeit von der Wachstumsrate, als auch unter Bedingungen der Stringenten Kontrolle zeigen (Liebig und Wagner, 1995; Murray *et al.*, 2003; Murray, 2004).

Im Folgenden wird jedoch hauptsächlich auf die Transkriptionsregulation am *rrnB* P1 Promotor eingegangen, die durch eine Vielzahl faktorunabhängiger (*cis*) und faktorabhängiger (*trans*) Elemente gewährleistet wird. Die UAS-Region, die von der - 35 Region bis etwa zur Position - 150 reicht und durch eine AT-reiche Sequenz mit intrinsischer Krümmung charakterisiert ist, vereint dabei beide Regulationsmechanismen. Sie enthält Bindestellen für Transkriptionsfaktoren, wie z.B. FIS ('factor of inversion stimulation') und H-NS ('histone-like nucleoid structuring protein'). Dabei bewirkt die Bindung des FIS-Proteins eine Aktivierung der Transkription (Ross *et al.*, 1990; Aiyar *et al.*, 2002; Zhi *et al.*, 2003), während H-NS als Repressor der rRNA-Synthese fungiert (Afflerbach *et al.*, 1999; Schröder und Wagner, 2000; Dame *et al.*, 2002) (Abb. 8 (b)). Außerdem wirkt die UAS-Region in zweierlei Hinsicht faktorunabhängig regulativ. Zum Einen wird ihr aufgrund ihrer intrinsischen Krümmung eine Erleichterung der primären RNAP-Bindung an die DNA zugesprochen (Ross *et al.*, 1993). Zum Anderen trägt sie das schon beschriebene UP-Element, welches mit den σ -Untereinheiten der RNAP interagiert, wodurch eine 16- bis 170fache Aktivierung der Transkription erzielt werden kann (Kapitel I, 1.2.1).

Vor allem im Zusammenhang mit der Stringenten Kontrolle ist ein weiteres regulatives Element des *rrnB* P1 Promotors von zentraler Bedeutung: die Diskriminatorregion (Abb. 8 (b), (c)). Dieses Sequenzmotiv flankiert die - 10 Region im 'downstream' Bereich. Negativ stringent regulierte Promotoren, wie der *rrnB* P1 Promotor, weisen hier die Sequenzfolge GCGC auf (Travers, 1980). Für positiv stringent regulierte Promotoren, wie z.B. den *his* Promotor oder auch das *rpoS*-Gen, wurde eine aus AT-Basenpaaren bestehende Diskriminatorregion ermittelt (Riggs *et al.*, 1986). Eine Vielzahl von Untersuchungen weisen jedoch darauf hin, dass dieses Motiv ein notwendiges, aber

kein hinreichendes *cis*-wirkendes Element darstellt (Zacharias *et al.*, 1989; Schwarzenberg, 1999; Reckendrees, 2000).

1.5.1.2 Regulationsmodelle der Stringenten Kontrolle

Trotz intensiver Forschung konnten die Mechanismen der positiven und negativen Stringenten Kontrolle bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt werden. Seit Jahren wird die RNA-Polymerase als Zielort des Effektormoleküls angesehen. Dies basiert auf der Identifikation von RNAP Mutanten, die einen relaxierten Phänotyp (Tedin und Bremer, 1992) haben und anderen Mutanten, die einen stringenten Phänotyp ohne Auslösung der Stringenten Kontrolle zeigen (Zhou und Jin, 1998). Außerdem konnte eine Bindung von ppGpp nahe dem aktiven Zentrum, welches von der σ - und σ' -Untereinheit der RNAP gebildet wird, gezeigt werden (Chatterji *et al.*, 1998; Touloukhonov *et al.*, 2001). Nicht nur für die σ - und σ' -Untereinheiten, sondern auch für den Spezifitätsfaktor σ^{70} wurden Mutanten identifiziert, die eine abweichende ppGpp-Sensitivität und veränderte Wechselwirkungen mit dem Core-Enzym der RNAP zeigen (Hernandez und Cashel, 1995). Erst kürzlich konnte mit Hilfe von kristallographischen Analysen der bakteriellen RNAP eine Bindung von ppGpp mit zwei möglichen Orientierungen nahe des aktiven Zentrums, im sekundären Kanal (Kapitel I, 1.3.4), d.h. der Eintrittsstelle der Nukleotide, ermittelt werden (Artsimovitch, 2004; Perederina, 2004).

Seit Jahren werden verschiedene Regulationsmodelle für den Mechanismus der Stringenten Kontrolle diskutiert. Ein Modell ist das sogenannte 'partition model', welches von zwei verschiedenen RNA-Polymerase Populationen ausgeht, die durch ppGpp reversibel ineinander überführbar sind. Dabei sollen nicht mit ppGpp assoziierte RNAP eine höhere Affinität zu rRNA Promotoren besitzen. Eine Erhöhung des ppGpp-Levels hätte somit eine Inhibierung der rRNA-Synthese zur Folge (Ryals, 1982). Ein zweiter Erklärungsansatz, das sogenannte 'trapping model', geht von einer ppGpp-abhängigen Konformationsänderung der RNAP aus, die die Affinität zu ribosomalen Promotoren erhöht. Dabei wird die Inhibierung der Transkription durch eine Stabilisierung der geschlossenen binären Promotorkomplexe in Anwesenheit von ppGpp erklärt (Heinemann und Wagner, 1997). Ein weiteres Regulationsmodell, das 'RNA chain elongation' Modell, geht von einer ppGpp-abhängigen Regulation auf der Ebene der Elongation aus. Demnach werden Pausierungen während der Transkription in Gegenwart von ppGpp verstärkt (Krohn und Wagner, 1996). Frühe Pausen könnten das Verlassen des Core-Promotors verhindern, wodurch eine Neuinitiation unterbunden werden könnte. Da auch eine ppGpp-induzierte Pausenverlängerung bei der Synthese von mRNA beobachtet wurde (Jensen und Pedersen, 1990), wird ebenfalls eine Verminderung der freien RNAP mit steigender Effektormolekül-Konzentration für die Inhibierung herangezogen. Die aufgeführten Modelle der Stringenten Kontrolle schließen sich jedoch nicht notwendigerweise gegenseitig aus, da sie überwiegend von einer ppGpp-abhängigen Regulation auf verschiedenen Ebenen der Transkription ausgehen.

Auf molekularer Ebene geht man heute davon aus, dass negativ stringent kontrollierte Promotoren durch eine Instabilität bzw. geringe Halbwertszeit der binären offenen Komplexe charakterisiert sind. Auch konnte für einige stringent regulierte Promotoren, wie z.B. den *rrnB* P1, eine ppGpp-abhängige Destabilisierung der binären offenen Komplexe gezeigt werden (Raghavan *et al.*, 1998; Barker *et al.*, 2001). Darüber hinaus wird davon ausgegangen, dass vor allem die Bildung der ternären Initiationskomplexe inhibiert wird. Als regulatives Moment wird dabei die Konkurrenz des Effektormoleküls und der Initiationsnukleotide um den Eintritt in den sekundären Kanal der RNAP und die Nukleotidbindestelle angesehen (Jöres und Wagner, 2003) (Abb. 9). Dabei spielt die Konzentration des Startnukleotides und dessen K_m -Wert eine wesentliche Rolle. Gerade im Fall der negativ stringent regulierten rRNA Promotoren ist der K_m -Wert des Initiationsnukleotides bemerkenswert hoch (Gaal *et al.*, 1997).

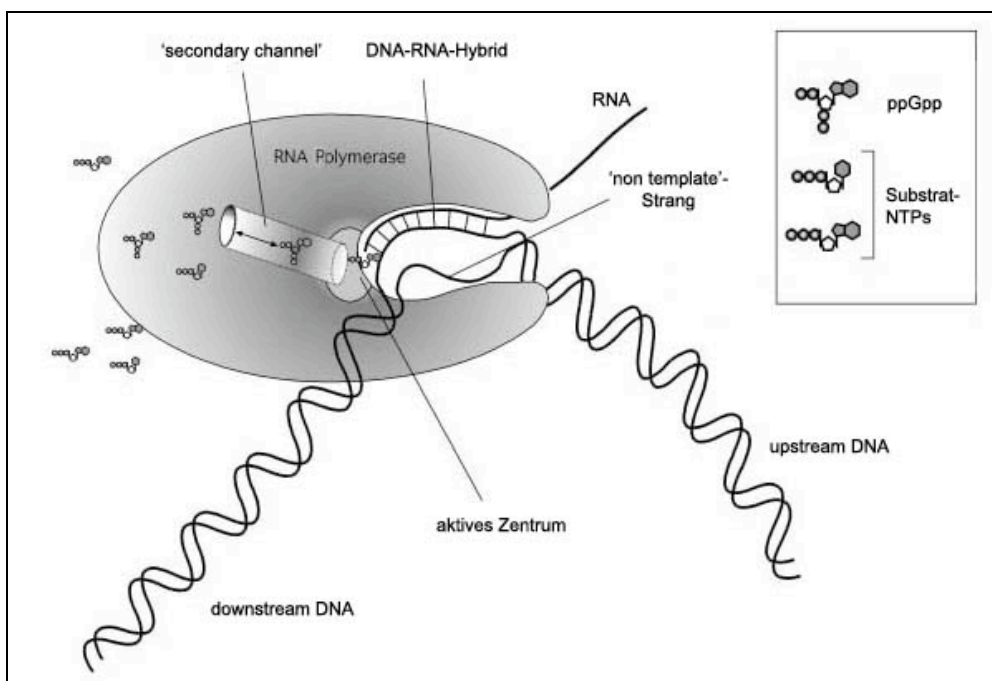


Abb. 9: Schematische Darstellung der negativen stringenter Transkriptionsregulation (Kompetitionsmodell). Gezeigt ist ein Schema eines ternären Initiationskomplexes in Gegenwart von ppGpp. Nach diesem Modell kompetieren die Effektormoleküle (ppGpp) mit den Startnukleotiden im sekundären Kanal der RNAP um den Eintritt ins aktive Zentrum. (Quelle: (Wagner, 2002).

Im Vergleich zur negativen Stringenten Kontrolle ist der Mechanismus des positiven ppGpp-Effektes noch unverstandener. Bis heute besteht kein Konsens darüber, ob der positive Einfluss von ppGpp passiver oder aktiver Natur ist. Bei dem Modell der passiven Regulation wird die Aktivierung der Transkription anhand der Zunahme freier RNA-Polymerasen, die aus der Inhibierung an negativ stringent kontrollierten Promotoren resultiert, erklärt (Barker *et al.*, 2001). Im Widerspruch zu diesem passiven Regulationsmodell konnte in gekoppelten Transkription-Translations-Systemen eine direkte Aktivierung positiv stringent kontrollierter Promotoren beobachtet werden. Da für diese

Analysen jedoch S-30 Zellextrakte verwendet wurden, war eine Beteiligung weiterer Transkriptionsfaktoren bis heute nicht auszuschließen (Riggs *et al.*, 1986; Choy, 2000). Kürzlich konnte jedoch anhand von σ^{70} -abhängigen *in vitro* Transkriptionen eine direkte Stimulation des σ paQ Promotors um das 1,5 bis 1,8 Fache gezeigt werden (Potrykus, 2004). Als Regulationsmodell wird eine Zunahme transkriptions-aktiver offener Komplexe vorgeschlagen.

Neueste Analysen weisen auf einen möglichen Modulator des ppGpp-Effektes hin: das DksA-Protein. DksA ist ein Transkriptionsfaktor, der mit der RNA-Polymerase interagiert. Die dreidimensionale Struktur des DksA-Polymerase-Komplexes zeigt, dass eine Domäne dieses Proteins in den sekundären Kanal eindringen und den ppGpp-Polymerase-Komplex stabilisieren kann (Paul, 2004; Perederina, 2004).

1.5.2 Das RpoS-Regulon

Das RpoS-Regulon vereint eine Reihe von Expressionsmustern beim Übergang in die stationäre Wachstumsphase und als Folge diverser Stresssituationen, wie z.B. hohe Osmolarität oder auch suboptimale Temperaturen. Das Produkt des *rpoS*-Gens, der σ^{38} -Faktor (Kapitel I, 1.3.3.2), wird als direkter und indirekter Hauptregulator dieses vielseitigen Kontrollmechanismus angesehen. Im Folgenden soll kurz die umfangreiche Regulation der Synthese und der Degradation des σ^{38} -Faktors erläutert werden. Schwerpunktmäßig soll dann auf die Regulation der Spezifität der σ^{38} -abhängigen Transkription eingegangen werden.

1.5.2.1 Kontrolle der σ^{38} Synthese und Proteolyse

Wie bereits erwähnt, erfolgt eine starke Induktion der *rpoS*-Expression beim Übergang in die stationäre Wachstumsphase. Heute wird davon ausgegangen, dass die meisten Stressstimuli posttranskriptionelle Kontrollmechanismen induzieren und der Transkriptlevel von *rpoS* nur wenig reguliert wird. Als negativer Regulator der Transkription konnte jedoch der Transkriptionsfaktor CRP ('catabolite repressor protein') identifiziert werden. Zudem konnte das Effektormolekül der Stringenten Kontrolle (ppGpp) nicht nur als positiver Regulator der σ^{38} -abhängigen Transkription (siehe Kapitel I, 1.5.2.2), sondern auch als Stimulator der *rpoS*-Expression ermittelt werden. Dabei wird angenommen, dass die ppGpp-abhängige Aktivierung der *rpoS*-Transkription eher auf der Ebene der Elongation als während der Initiation erfolgt (Gentry *et al.*, 1993; Lange *et al.*, 1995; Hirsch und Elliott, 2002). Neben diesem direkten ppGpp-Effekt auf die Transkription der *rpoS* mRNA, wird alternativ ebenfalls ein indirekter Einfluss von ppGpp auf die Stimulation der Synthese anorganischer Polyphosphate (Poly-P), die wiederum einen positiven Einfluss auf die *rpoS*-Transkription ausüben, diskutiert. Der Mechanismus der Poly-P-abhängigen Transkriptionsregulation ist jedoch noch nicht aufgeklärt. Es wird nicht

ausgeschlossen, dass weitere Faktoren beteiligt sind und der Poly-P-Effekt eher indirekt ist (Shiba *et al.*, 1997).

Überdies wird ein indirekter, positiver Einfluss von ppGpp auf die *rpoS* Translation angenommen (Brown *et al.*, 2002).

Insgesamt weisen die heutigen Erkenntnisse über die Regulation der Translation der *rpoS* mRNA auf ein komplexes Regulationsnetzwerk aus *cis*- und *trans*-wirkenden Faktoren hin. So weist die *rpoS* mRNA im Bereich der Ribosomenbindestelle und des Initiationscodons eine ausgeprägte Sekundärstruktur auf, die die Initiation der Translation unterbinden kann. Es wird vermutet, dass bestimmte Stressbedingungen eine Strukturveränderung der mRNA verursachen, wodurch die Ribosomenbindestelle zugänglich wird.

Als *trans*-wirkende Aktivatoren der Translation konnten das Histon-ähnliche HU-Protein und das RNA-bindende Hfq-Protein identifiziert werden. Als Inhibitor hingegen gilt das eigentlich DNA-bindende H-NS-Protein. Außerdem wurden drei kleine regulatorische RNAs beschrieben, die eine wesentliche Rolle bei der Translationskontrolle der *rpoS* mRNA spielen. DsrA, deren Synthese bei niedrigen Temperaturen induziert wird, ist teilweise komplementär zur *rpoS* mRNA und soll mit Hilfe eines 'anti-antisense'-Mechanismus die Translation der *rpoS* mRNA stimulieren. Ein ähnlicher Mechanismus wird für eine weitere kleine RNA, RprA, vorgeschlagen. Eine dritte kleine stabile RNA, OxyS, die infolge von oxidativem Stress synthetisiert wird, konnte als Inhibitor der Translation identifiziert werden.

Auch die Regulation des Abbaus des σ^{38} -Faktors ist eng geknüpft an diverse Stressbedingungen. Der generelle Mechanismus der σ^{38} Proteolyse ist wie folgt beschrieben: das Regulator Protein RssB erkennt σ^{38} in Abhängigkeit von dem Grad der Phosphorylierung seiner Receiverdomäne und präsentiert den gebundenen Sigmafaktor der ATP-abhängigen ClpXP Protease (Hengge-Aronis, 2003).

1.5.2.2 Regulation der σ^{38} -spezifischen Transkription

Für die stressspezifische Kontrolle des RpoS-Regulons muss nicht nur eine empfindliche Regulation der Promotorspezifität sondern auch eine effektive Konkurrenz der verschiedenen Sigmafaktoren um das Core-Enzym der RNA-Polymerase gewährleistet sein.

1.5.2.2.1 Konkurrenz der σ -Faktoren um die Bindung an das Core-Enzym der RNA-Polymerase

Wie bereits erwähnt, erreicht der zelluläre σ^{38} -Level unter keinen Wachstumsbedingungen den von σ^{70} (Kapitel I, 1.3.3.2). Außerdem konnte für σ^{38} eine fünffach geringere Affinität zum Core-Enzym der RNAP ermittelt werden (Colland *et al.*, 2002). Zudem soll *in vivo* das freie Core-Enzym der RNA-Polymerase limitiert vorliegen (Farewell, 1998).

Dies wirft unweigerlich folgende Frage auf: Wie kann unter diesen Umständen *in vivo* eine effektive Assoziation von σ^{38} an das Core-Enzym gewährleistet sein? Diesbezüglich wird dem Anti- σ -Faktor Rsd eine entscheidende Rolle zugesprochen. Rsd ist ein kleines Protein, dessen Expression während der stationären Phase induziert wird. Es interagiert mit dem exponentiellen Phase σ -Faktor (σ^{70}) und unterbindet dadurch die Bindung an das Core-Enzym (Ilag *et al.*, 2004). Auch die während der stationären Phase synthetisierte kleine, stabile 6S RNA wird als Inhibitor der σ^{70} -gerichteten Transkription angesehen. Dabei beruht ihre Wirkung ebenfalls auf einer Interaktion mit dem σ^{70} -Holoenzym. Erst kürzlich konnte außerdem eine 6S RNA abhängige Aktivierung σ^{38} -spezifischer Promotoren gezeigt werden (Trotochaud, 2004). Zudem konnte in Anwesenheit von ppGpp eine verminderte Konkurrenz von σ^{70} gegenüber den alternativen Sigmafaktoren, σ^{32} und σ^{38} , um das Core-Enzym der RNAP gezeigt werden (Jishage *et al.*, 2002).

1.5.2.2 Modulation der Promotorspezifität

Die Promotorspezifität der σ^{38} -Transkription ist vor allem von besonderem Interesse, weil *in vitro* für viele σ^{38} - und σ^{70} -abhängige Promotoren eine Kreuzerkennung durch die Holoenzyme E70 und E38 gezeigt werden konnte. Heute geht man davon aus, dass die ermittelte *in vivo* Spezifität der σ -abhängigen Transkription durch das komplexe Zusammenspiel mehrerer Transkriptionseffektoren erzielt wird.

Für einige σ^{38} -abhängige Promotoren konnte eine Zunahme der Transkription bei hohen Kaliumglutamat-Konzentrationen (Ding *et al.*, 1995; Nguyen und Burgess, 1997) und bei niedriger superhelikaler Dichte der DNA-Templates (Kusano *et al.*, 1996) beobachtet werden. Kontrovers wird die Modulation der Transkription durch Trehalose diskutiert (Kusano und Ishihama, 1997; Germer *et al.*, 1998). Überdies konnten Transkriptionsfaktoren, wie z.B. H-NS, CRP oder auch Lrp ('leucin responsiv regulatory protein'), identifiziert werden, die an der Regulation der σ^{38} -abhängigen Transkription beteiligt sind (Barth *et al.*, 1995; Colland *et al.*, 2000).

In vivo konnte zudem für einige σ^{38} -spezifische Promotoren sogar bei hohen σ^{38} -Konzentrationen in der Zelle eine effektive Expression ausschließlich in Anwesenheit von ppGpp ermittelt werden (Kvint *et al.*, 2000).

Die einzelnen Mechanismen der verschiedenen Transkriptionsmodulationen durch die beschriebenen Effektoren sind dabei noch weitgehend unbekannt.

1.5.2.3 Der σ^{38} -abhängige *bolA* Promotor

Während der stationären Phase oder auch infolge unterschiedlicher Stresssituation erfahren *Escherichia coli* Zellen morphologische Veränderungen. Sie werden kleiner und runder. Das im Rahmen dieser Arbeit untersuchte

Morphogen *bolA* soll dabei eine wichtige Funktion bei der Kontrolle der Zellteilung und bei Änderungen der Zellmorphologie übernehmen. Die Überexpression von *bolA* resultiert in einer runden Zellform (Aldea, 1988). Das Genprodukt des *bolA* ist ein kleines regulatives Protein, welches für die Expression des Penicillin-Bindeproteins PBP6 benötigt wird. PBP6 ist eine Carboxypeptidase, die an der Septumbildung beteiligt ist (Lange und Hengge-Aronis, 1991).

Zunächst konnte für *bolA* eine sieben- bis zehnfache Zunahme der Expression beim Übergang in die stationäre Phase ermittelt werden. Weitere Analysen zeigten jedoch, dass die *bolA*-Expression unter verschiedenen Stressbedingungen auch während der exponentiellen Phase induziert wird (Santos *et al.*, 1999).

Die Transkription des *bolA*-Gens kann von zwei Promotoren (P1 und P2) erfolgen. Dabei soll der 'upstream' vom P1 liegende Promotor P2 σ^{70} -abhängig, konstitutiv und schwach exprimiert werden. Der Hauptpromotor P1 (*bolA1*) hingegen ist unter der Kontrolle des σ^{38} -Holoenzym der RNA-Polymerase und wird invers zur Wachstumsrate transkribiert. Er weist die typischen Merkmale eines 'gearbox'-Promotors (Kapitel I, 1.2.2; Kapitel III, Abb. 1) auf und besitzt eine große Homologie zum beschriebenen σ^{38} -Konsensuspromotor (Kapitel I, 1.2.2; Kapitel III, Abb. 1) (Lange und Hengge-Aronis, 1991).

Wie für viele σ^{38} -spezifische Promotoren zuvor beobachtet (Kapitel I, 1.5.2.2.2), konnte in ersten *in vitro* Analysen eine Erkennung des *bolA* Promotors sowohl durch das σ^{38} - als auch durch das σ^{70} -Holoenzym der RNA-Polymerase gezeigt werden. Zudem weisen diese Analysen auf eine Modulation der Promotor- bzw. Transkriptionsspezifität durch Kaliumglutamat hin (Nguyen und Burgess, 1997). Darüber hinaus sind bis heute keine weiteren Modulatoren der σ^{38} -abhängigen Transkription am *bolA* Promotor untersucht bzw. bekannt.

2 Fragestellung und Konzeption der Arbeit

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der prokaryotischen Regulation der Transkriptionsinitiation während verschiedener Wachstums- und Stressphasen. Dabei ist sie in folgende Schwerpunkte untergliedert:

1. Molekulare Analyse des Mechanismus der Stringenten Kontrolle (Kapitel II).
2. Untersuchung der σ -Faktor-spezifischen Transkription beim Übergang von der exponentiellen in die stationäre Wachstumsphase und während verschiedener Stresssituationen (RpoS-Regulon) (Kapitel III).

Der Zielort des Effektormoleküls der Stringenten Kontrolle (ppGpp) ist die RNA-Polymerase (RNAP). Zudem sind Promotormerkmale stringent kontrollierter Promotoren, wie z.B. die Diskriminatorregion, identifiziert. Als Hauptregulations-

stufe der Stringenten Antwort wird seit langem die Initiation der Transkription angesehen. Der molekulare Mechanismus der ppGpp-abhängigen Transkriptionsregulation des mehrstufigen Initiationsmechanismus ist bis heute jedoch noch nicht vollständig verstanden. Es wird sowohl ein ppGpp-Effekt auf die Bildung und Stabilität der offenen RNAP-Promotorkomplexe als auch eine Regulation der ternären Initiationskomplexe diskutiert.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit (Kapitel II) soll der Einfluss von ppGpp auf die Initiation der Transkription nach der Ausbildung des offenen RNAP-Promotorkomplexes analysiert werden. Zudem soll in diesem Zusammenhang die Rolle des σ -Faktors und die Funktion der Diskriminatorregion in Abhängigkeit von der Sequenz und Lage im offenen RNAP-Promotor-Komplex untersucht werden. Zur Analyse dieser Fragen an die ppGpp-abhängige Transkriptionsregulation eignen sich sogenannte 'mismatch bubble' Templates. 'Mismatch bubble' Templates sind synthetisch konstruierte DNA-Fragmente, die über einen definierten Bereich, durch Verlust der Komplementarität der DNA-Stränge, permanent geöffnet vorliegen. Von diesen künstlichen Transkriptionsblasen ist eine Transkription sowohl mit dem Holo- als auch mit dem Core-Enzym der RNAP möglich. Damit entfällt die Notwendigkeit der Anwesenheit des σ -Faktors bei der Initiation der Transkription.

Für die beschriebene Analyse des ppGpp-Effektes lagen vor Beginn dieser Arbeit zwei von Schwarzenberg (1999) konstruierte 'mismatch bubble' Templates auf der Basis des ribosomalen *rrnB* P1 Promotors vor. Für eine weitreichendere Untersuchung der spezifischen Erkennung der synthetischen DNA-Templates durch die RNAP und des ppGpp-Effektes soll im Rahmen dieser Arbeit zunächst eine weitere 'mismatch bubble', mit geringfügiger Veränderung der Lage und Größe des ungepaarten Bereichs, konstruiert werden. Im Anschluss soll für die erwähnten drei 'mismatch bubble' Templates die Spezifität der Transkription durch eine nukleotidgenaue Analyse der Transkriptionsstartstellen bestimmt werden. Außerdem soll durch vergleichende *in vitro* Transkriptionen der drei 'mismatch bubble' Templates die ppGpp-abhängige Regulation in Abhängigkeit von der Größe und Lage des permanent geöffneten Bereichs und der Lage, Konformation und Sequenz der Diskriminatorregion näher charakterisiert werden.

Der zweite Teil der Arbeit (Kapitel III) befasst sich schwerpunktmäßig mit den molekularen Grundlagen des Wechsels zwischen σ^{70} - und σ^{38} -spezifischer Transkription infolge veränderter Wachstumsbedingungen.

In vivo erfolgt unter exponentiellen Wachstumsbedingungen die Transkription der meisten Gene durch das σ^{70} -abhängige Holoenzym der RNA-Polymerase, während beim Übergang in die stationäre Phase und unter verschiedenen Stressbedingungen eine Expression σ^{38} -spezifischer Gene beobachtet werden kann. Voraussetzung für diese σ -spezifische Transkription ist eine effektive Konkurrenz der beiden σ -Faktoren um die Bindung an das freie Core-Enzym und eine spezifische Promotorerkennung der beiden Holoenzyme der RNAP. In diesem Zusammenhang zeigen jedoch die zellulären Level der beiden σ -Faktoren, deren Affinitäten zum Core-Enzym der RNAP und die jeweiligen

Promotorspezifitäten drei Paradoxa auf, die eine Beteiligung weiterer Faktoren bzw. Effektoren bei dieser Transkriptionsregulation implizieren.

Ziel des zweiten Teils der Arbeit (Kapitel III) ist es, ein besseres Verständnis der molekularen Grundlagen der Promotorspezifität beider Holoenzyme zu erhalten. Neben der generellen Promotorspezifität von E70 und E38 soll der Einfluss folgender potenzieller Spezifitätseffektoren der σ -Faktor-abhängigen Transkription untersucht werden: Superhelikalität des Templates, Kaliumglutamat-Konzentration und ppGpp. Hierfür soll zunächst das Bindeverhalten der beiden Holoenzyme an je einem σ^{70} - und σ^{38} -spezifischen Promotor in 'gel-shift'-Analysen analysiert werden. Dabei ist sowohl die Affinität der Holoenzyme als auch die Stabilität der gebildeten Komplexe von besonderem Interesse. Darüber hinaus soll durch verschiedene Footprint-Analysen die Struktur der RNAP-Promotorkomplexe untersucht werden. Besonderes Augenmerk soll außerdem auf die generelle Transkriptionseffizienz der beiden Holoenzyme und vor allem die Transkriptionsmodulation durch zusätzliche Effektoren gelegt werden. Hierzu sollen *in vitro* Transkriptionsanalysen beider Holoenzyme mit superhelikalen und linearen DNA-Templates in Abhängigkeit von der Kaliumglutamat- und der ppGpp-Konzentration durchgeführt werden.

Kapitel II Transkriptionsregulation unter dem Einfluss von ppGpp

Einen Schwerpunkt dieser Arbeit bildet die mechanistische Untersuchung des Einflusses des Effektormoleküls der Stringenten Kontrolle (ppGpp) auf die Initiation der Transkription. Dabei sollte mit Hilfe artifizierlicher Promotoren, den sogenannten 'mismatch bubble' Templates, der ppGpp-Effekt auf die Initiation nach Bildung des offenen binären RNAP-Promotorkomplexes untersucht werden. Bevor näher auf die spezielle Fragestellung dieses Kapitels eingegangen wird, sollen zunächst der allgemeine Aufbau und die bisherigen Erkenntnisse über die Transkription von 'mismatch bubble' Templates erläutert werden.

1 'Mismatch bubble' Templates und ihre Transkriptionseigenschaften

Unter 'mismatch bubble' Templates versteht man DNA-Fragmente, die über einen definierten Bereich ungepaart vorliegen, wodurch sie im Initiationsprozess (Kapitel I, Abb. 7) die Strangöffnung im offenen RNAP-Promotorkomplex vorwegnehmen. Vorangegangene Analysen an solchen artifizierlichen Transkriptionssystemen zeigten sowohl mit dem Holo- als auch mit dem Core-Enzym der RNAP eine spezifische Transkriptionsinitiation von beiden Enden des ungepaarten Bereichs. Dies ermöglicht eine vom σ -Faktor entkoppelte Analyse der Transkriptionsinitiation. Die Assoziation des σ -Faktors verleiht den 'mismatch bubble'-RNAP-Komplexen jedoch eine höhere Stabilität gegenüber dem Kompetitor Heparin. Zudem zeigt die Transkription mit dem Holoenzym die Fähigkeit zur Synthese abortiver Produkte. Außerdem weist die Initiation eine Sensitivität gegenüber Rifampicin auf (Tripatara und deHaseth, 1993; Aiyar *et al.*, 1994; Fredrick, 1997).

Aufgrund dieser für Initiationskomplexe typischen Merkmale eignen sich 'mismatch bubble' Templates zur mechanistischen Analyse des ppGpp-Effektes nach der Ausbildung des offenen binären RNAP-Promotorkomplexes (RP_0). Im Zusammenhang mit der Stringenten Kontrolle spielt dies eine wichtige Rolle, da die offenen binären Komplexe negativ stringent regulierter Promotoren meist geringe Halbwertszeiten aufweisen und *in vitro* oft erst durch den Einbau der

ersten Nukleotide stabilisiert werden. Gleichzeitig bieten die 'mismatch bubble' Templates, da sie sowohl für das Holo- als auch das Core-Enzym der RNAP als Matrize dienen, die Möglichkeit die Rolle des σ -Faktors bei der ppGpp-abhängigen Regulation zu analysieren.

Für erste Analysen des ppGpp-Effektes auf die Transkription von 'mismatch bubble' Templates wurden von Schwarzenberg (1999) zwei DNA-Fragmente auf der Basis des ribosomalen *rrnB* P1 Promotors, die im Bereich der -10 Region durch eine permanente Öffnung des DNA-Doppelstrangs charakterisiert sind, konstruiert. Im 'upstream' und 'downstream' Bereich wird die *rrnB* P1 Sequenz (Position -40 bis +5) präparationsbedingt von Sequenzen des M13 Phagen flankiert. Die beiden 'mismatch bubble' Templates, mit der Bezeichnung AS-A und AS-R, unterscheiden sich ausschließlich in der Sequenz der Diskriminatorregion (Kapitel I, 1.5.1.1). AS-A ist durch die aktivierende Diskriminatorsequenz (AAA) ausgezeichnet und AS-R besitzt die reprimierende Diskriminatorregion (GCGC), wie sie bei den ribosomalen Promotoren zu finden ist (Abb. 1). Diese 'mismatch bubble' Derivate ermöglichen somit zusätzlich eine nähere Charakterisierung der Rolle der Diskriminatorregion bei der Stringenten Kontrolle.

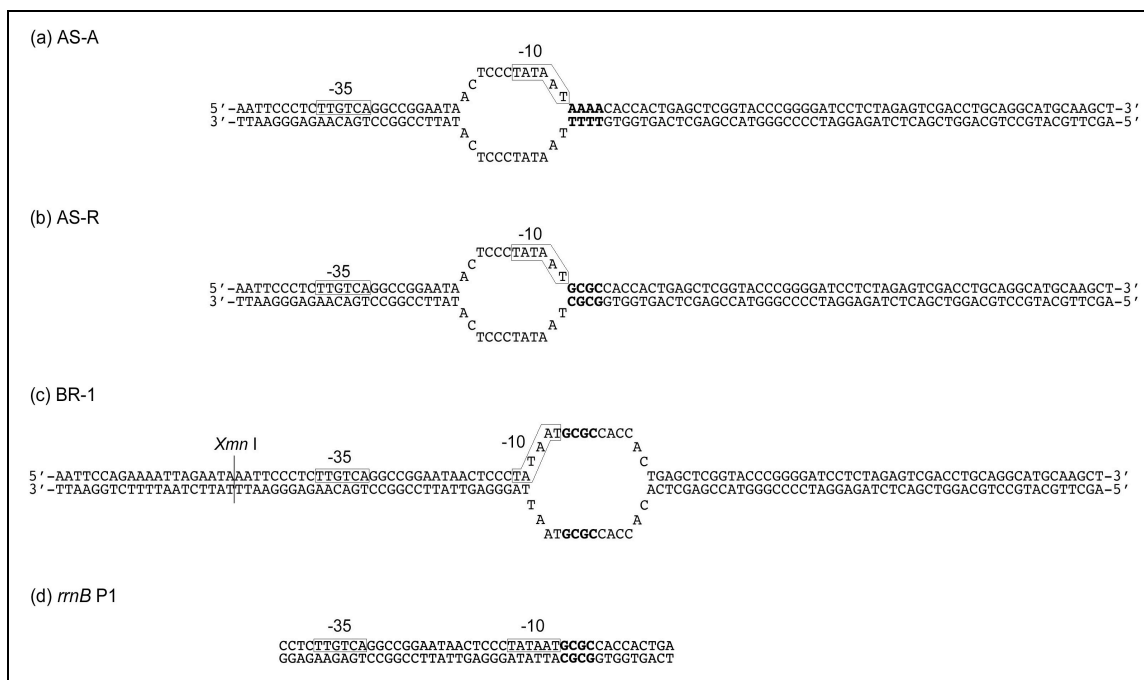


Abb. 1: Schematische Darstellung der "mismatch bubble" Templates AS-A (a), AS-R (b), BR-I (c) und der *rrnB* P1-Kernpromotorsequenz (d). Alle 'mismatch bubble' Templates basieren auf der Kernpromotorsequenz des *rrnB* P1 Promotors. (a+b) Die 'mismatch bubble' Templates AS-A und AS-R unterscheiden sich lediglich in der Sequenz der Diskriminatorregion (fett gedruckt). Gemeinsam ist ihnen eine Länge von 98 bp, ein ungepaarter DNA-Bereich mit einer Größe von 12 nt von Position -9 bis -20 (relativ zum Transkriptionsstart +1 des *rrnB* P1). (c) BR-I unterscheidet sich von (a) und (b) durch die Größe des ungepaarten Bereichs (14 nt), der Lage (Position +2 bis -12) und einen um 20 nt längeren 'upstream' Bereich. Durch *Xmn*I-Restriktion kann BR-I um diese Nukleotide gekürzt werden. Die *Xmn*I-Schnittstelle und die -10 und -35 Regionen sind hervorgehoben.

In ersten funktionellen Analysen der Transkriptionsregulation an den 'mismatch bubble' Templates AS-A und AS-R (Schwarzenberg, 1999; Reckendrees, 2000) konnte eine effiziente Transkription sowohl mit dem Holo- als auch mit dem Core-Enzym der RNAP gezeigt werden. Bei der näheren Charakterisierung der RNAP-'mismatch bubble'-Komplexe konnte eine höhere Stabilität der Holoenzym-Komplexe gegenüber dem Kompetitor Heparin ermittelt werden. In Footprint-Analysen wurde mit beiden Polymerasetypen eine spezifische Protektion der 'mismatch bubble'-Bereiche detektiert. Im Vergleich zum Core-Enzym zeigte das Holoenzym bei beiden 'mismatch bubble' Templates sowohl im 'upstream' als auch 'downstream' Bereich einen verlängerten Footprint, der als weiteres Indiz für die spezifische Erkennung der Kernpromotorsequenz (*rrnB* P1) gedeutet wird. In *in vitro* Transkriptionsanalysen unter dem Einfluss von ppGpp konnte für beide 'mismatch bubble' Templates, unabhängig von der jeweiligen Diskriminatorregion, eine Inhibierung der Transkription mit dem Holo- sowie dem Core-Enzym beobachtet werden.

Unter der Annahme der promotorspezifischen Erkennung der 'mismatch bubble' Templates wurde vermutet, dass der entscheidende Schritt der ppGpp-vermittelten Inhibierung der offenen Komplexbildung nachgeschaltet ist. Darüber hinaus scheint der σ -Faktor nicht zwingend essentiell und die Diskriminatorregion kein ausreichendes Motiv für die Stringente Regulation zu sein.

1.1 Problemstellung und experimenteller Ansatz

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Spezifität der sequenz-abhängigen Erkennung von 'mismatch bubble' Templates durch die RNAP und damit die Spezifität des ppGpp-Effektes eingehender untersucht werden. Dazu sollte eine zusätzliche 'mismatch bubble' konstruiert werden, die im Folgenden als BR-I bezeichnet wird (Abb. 1). Die 'mismatch bubble' BR-I hat eine Länge von 118 bp und basiert, wie die Templates AS-A und AS-R, auf der Kernpromotorsequenz des ribosomalen *rrnB* P1 Promotors. Dabei trägt BR-I, homolog zu dem *rrnB* P1 Promotor und dem 'mismatch bubble' Template AS-R, die negative Diskriminatorregion (GCGC). Im Vergleich zu den beiden 'mismatch bubbles' AS-A und AS-R ist BR-I im 'upstream' Bereich um 20 bp verlängert, der ungepaarte Bereich in Richtung 'downstream' verschoben und um zwei Nukleotide größer, d.h. die 'mismatch bubble' reicht von Position - 12 bis + 2 (*rrnB* P1-Nomenklatur; Abb. 1). Damit entspricht die Lage der Transkriptionsblase eher der natürlichen Isomerisierung im finalen binären offenen RNAP-Promotorkomplex (Record *et al.*, 1996).

Zur besseren Vergleichbarkeit aller 'mismatch bubble' Templates (AS-A, AS-R und BR-I), wurde bei der Konstruktion von BR-I im 'upstream' Bereich eine *XmnI*-Schnittstelle eingefügt. Die Restriktion mit diesem Enzym führt zu einer Verkürzung um 20 nt ('upstream'), wodurch das resultierende 'mismatch bubble' Template, BR-I/*XmnI*, die gleiche Länge wie AS-A und AS-R erhält (98 nt) und

sich ausschließlich durch die Lage des ungepaarten Bereichs von diesen unterscheidet.

Die Promotorsequenz-abhängige Erkennung der 'mismatch bubble' Templates wurde durch die Bestimmung der Transkriptionsrichtung und der Initiationsstellen untersucht. Die Analyse des ppGpp-Effektes erfolgte durch *in vitro* Transkriptionen.

2 Ergebnisse

2.1 Konstruktion und Präparation von Transkriptionskomponenten

2.1.1 Das Holo- und Core-Enzym der DNA-abhängigen RNA-Polymerase

Das für diesen Teilaspekt der vorliegenden Arbeit verwendete Holo- bzw. Core-Enzym der RNA-Polymerase von *E. coli* wurde in Anlehnung an die in Kapitel IV Abschnitt 1.5 aufgeführten Vorschriften isoliert und lag jeweils in hoher Reinheit vor.

Die Aktivitätsbestimmung des isolierten Holoenzym erfolgte nach der von Chamberlin *et al.* (1979) beschriebenen Methode. Die Aktivitätsmessung des Core-Enzyms erfolgte durch vergleichende *in vitro* Transkriptionen am *rrnB* P1 Promotor mit $^{70}\square$ -gesättigtem Core-Enzym bzw. Holoenzym.

2.1.2 Präparation eines Quantifizierungsstandards

Als Auftragsstandard für die Quantifizierung von *in vitro* Transkriptionen diente ein 165 bp langes DNA-Fragment, welches durch *Hind*III und *Nar*I Restriktionen aus dem Plasmid pUC18 gewonnen wurde (Kapitel IV, 1.3). Nach der Aufreinigung des DNA-Fragmentes (Kapitel IV, 2.2.7.2) wurden die überhängenden Enden mit Hilfe des Klenow-Enzyms aufgefüllt und gleichzeitig radioaktiv markiert (Kapitel IV, 2.2.4.4).

2.1.3 Konstruktion und Präparation von 'mismatch bubble' Templates

Der ungepaarte, einzelsträngige Bereich von 'mismatch bubble' Templates wird durch das Einfügen identischer Sequenzen in beide DNA-Stränge und dem daraus resultierenden Verlust der Komplementarität erzielt. Damit eine Sequenz-spezifische Erkennung des $^{70}\square$ -Holoenzym gewährleistet war, wurde bei den hier konstruierten und analysierten 'mismatch bubble' Templates jeweils

die natürliche 'non template' Strangsequenz des *rrnB* P1 Promotors beibehalten und in den 'template' Strang eingefügt.

Aufgrund des ungepaarten DNA-Bereichs kann die Synthese von sogenannten 'mismatch bubble' Fragmenten nicht durch Transformation von Bakterienzellen und *in vivo* Amplifikation erfolgen, da schon nach der ersten Replikation wieder ein vollständig gepaarter DNA-Doppelstrang vorliegen würde. Daher muss die Präparation solcher teilweise ungepaarten DNA-Fragmente über die Isolation einzelsträngiger DNA (ssDNA) mit anschließender Hybridisierung erfolgen.

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Amplifikation der ssDNA mit Hilfe des Bakteriophagen M13. Der fadenförmige M13 Phage mit einer 6,4 kb langen, ringförmigen, einzelsträngigen und mit über 2000 identischen Hüllproteinen assoziierten DNA, eignet sich aus zwei Gründen besonders für die Konstruktion und Synthese von ssDNA. Erstens verfügt er über eine doppelsträngige, replikative DNA (RF-DNA), die einen geeigneten Klonierungsvektor darstellt. Zweitens verlässt die synthetisierte ssDNA die infizierte Zelle über die Bakterienmembran. Demnach erfolgt die Vermehrung des M13 Phagen ohne Lyse des Wirtes und die ssDNA kann leicht aus Flüssigkulturen isoliert werden.

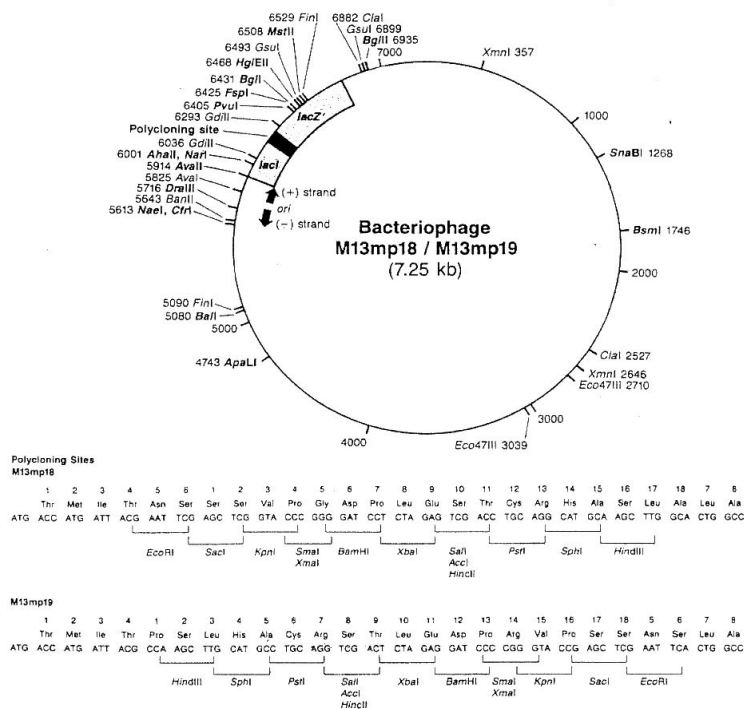


Abb. 2: Restriktionskarte der Phagenvektoren M13mp18 und M13mp19. Gezeigt sind die Erkennungsstellen von Restriktionsendonukleasen in der doppelsträngigen RF-Form der Phagen-DNA. Die 'polycoding site' der Phagenvektoren ist jeweils vergrößert dargestellt (Maniatis *et al.*, 1982).

Als Klonierungsvektoren dienten hier folgende rekombinante M13 Phagen mit 'polycoding site' (mp-Serie): M13mp18 und M13mp19 (Abb. 2). Diese beiden Vektoren eignen sich besonders für die Konstruktion von 'mismatch bubble' Templates, da sie sich ausschließlich in der Orientierung der 'polycoding site' unterscheiden. Hybridisiert man die ssDNA der beiden Phagenderivate, so sind die Einzelstränge ausschließlich im Bereich der 'polycoding site' komplementär

(Messing *et al.*, 1981; Messing und Vieira, 1982; Norrander *et al.*, 1983; Yanisch-Peron *et al.*, 1985).

2.1.3.1 Konstruktion der 'mismatch bubble' Templates BR-I und BR-I/*XmnI*

Zunächst mussten für die 'mismatch bubble' Templates BR-I und BR-I/*XmnI* folgende Phagenderivate hergestellt werden: M13br-I18 und M13br-I19.

Die Klonierung der 'mismatch bubble'-bildenden Inserts auf der Basis des *rrnB* P1 Promotors in die Phagenderivate konnte durch die Hybridisierung langer Oligonukleotide und anschließender gerichteter Ligation in die 'polycloning site' der RF-DNA der betreffenden M13 Phagen erzielt werden (Kapitel IV, 2.3.3). Dazu wurde die isolierte RF-DNA mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *SacI* geöffnet (siehe Abb. 2). Für das Phagenderivat M13br-I-18 wurden die Oligonukleotide # WT-*XmnI*-up(+) und # WT-*XmnI*-low(-) und für M13br-I-19 # Mut-*XmnI*-up(+) und # Mut-*XmnI*-low(-) hybridisiert (Kapitel IV, 1.4.2). Dabei wurden die Oligonukleotide so gewählt, dass die resultierenden DNA-Fragmente überstehende und zur restringierten RF-DNA komplementäre Enden besaßen.

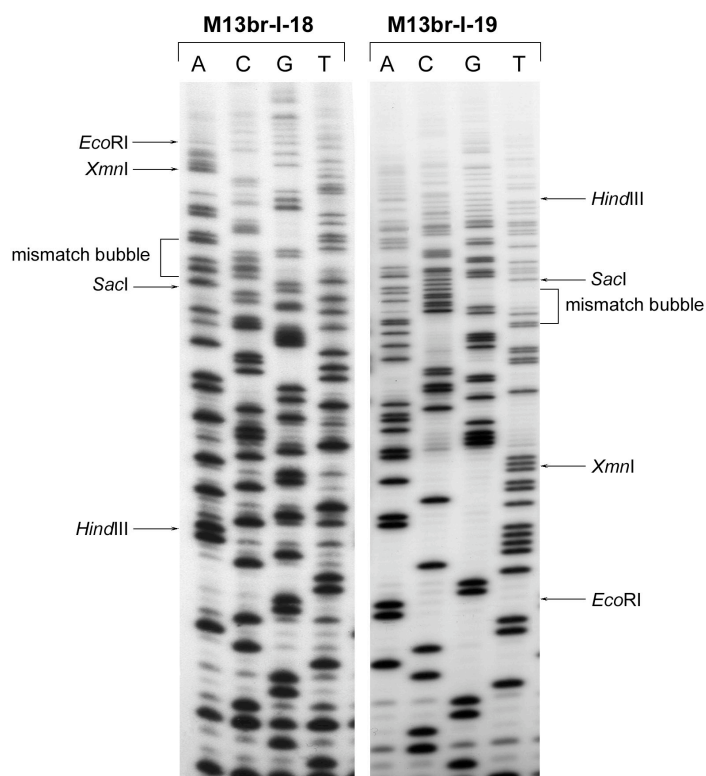


Abb. 3: Sequenzierung der ssDNA von M13br-I-18 und M13br-I-19. Die Bereiche der 'mismatch bubble' sind mit Klammern gekennzeichnet. Die Ligationsregionen sind mit den betreffenden Restriktionsenzymen (*EcoRI* und *SacI*) markiert. Die Schnittstellen *HindIII* und *XmnI* sind bedeutend bei der Präparation der beiden BR-I Templates (Kapitel II, 1.2.2).

Nach erfolgreicher Ligation, Transformation und ssDNA-Isolation wurde die korrekte Klonierung durch eine Sequenzierung überprüft (Abb. 3). Dabei entspricht die ssDNA des M13br-I-18 bzw. M13br-I-19 Phagen zwischen der *EcoRI*- und der *SacI*-Schnittstelle der Sequenz von # WT-*XmnI*-up(+) bzw. # Mut-*XmnI*-low(-).

2.1.3.2 Präparation von 'mismatch bubble' Templates

Die Präparation der 'mismatch bubble' Templates AS-A, AS-R und der beiden BR-I Derivate erfolgte bis auf wenige Ausnahmen nach dem von Schwarzenberg (1999) beschriebenen Protokoll (Kapitel IV, 2.3.3.2). Vor der Hybridisierung zum doppelsträngigen 'mismatch bubble' Fragment wurden die isolierten Einzelstränge zur Entfernung präparationsbedingter bakterieller RNA (tRNA) mit RNase A behandelt. Danach wurde die isolierte ssDNA der in Tabelle 1 aufgeführten Phagenderivate hybridisiert (Abb. 4) und anschließend mit den jeweiligen Enzymen (Tabelle 1) restringiert.

'mismatch bubble'	M13 Derivat	Restriktion mit...
AS-A	M13asa18	<i>EcoRI</i>
	M13asa19	<i>HindIII</i>
AS-R	M13asr18	<i>EcoRI</i>
	M13asr19	<i>HindIII</i>
BR-I	M13br-I-18	<i>EcoRI</i>
	M13br-I-19	<i>HindIII</i>
BR-I/ <i>XmnI</i>	M13br-I-18	<i>EcoRI</i>
	M13br-I-19	<i>XmnI</i>

Tab. 1: M13 Derivate der 'mismatch bubble' Templates AS-A, AS-R, BR-I und BR-I/*XmnI* und die jeweiligen Restriktionsenzyme zur Isolation der 'mismatch bubble' Fragmente.

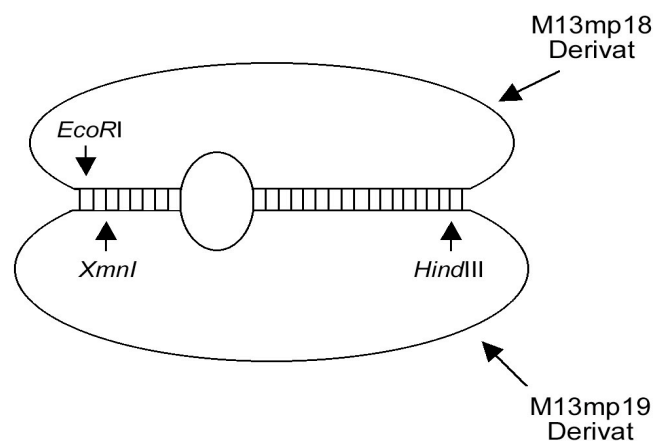


Abb. 4: Schematische Darstellung der hybridisierten M13mp18 und 19 Derivate. Die Schnittstellen der Restriktionsenzyme sind durch Pfeile markiert.

Die Trennung der 'mismatch bubble' Fragmente vom linearisierten Einzelstrang erfolgte durch Auftrennung über ein präparatives Agarosegel mit anschließender 'freeze-squeeze'-Elution. Im Anschluss wurde die Präparation mittels PAA-Gelelektrophorese überprüft. Abschließend wurden die 5'-überhängenden Enden der 'mismatch bubble' Templates mit Hilfe des Klenow-Enzyms aufgefüllt.

2.1.3.3 Analyse der 'mismatch bubble' Templates mittels chemischer DNA-Modifikation

Nach der Isolation der 'mismatch bubble' Templates erfolgte eine genaue Charakterisierung der korrekten Hybridisierung und der tatsächlichen Ausmaße

der ungepaarten Bereiche durch einzelstrangspezifische Modifikation mit Kaliumpermanganat (Kapitel IV, 2.3.7.1.2). Das Reagens Kaliumpermanganat oxidiert bevorzugt ungepaarte Thymin- und mit verminderter Reaktivität auch Cytidinreste. Bei dem nukleophilen Angriff auf die 5,6-Doppelbindung entstehen *cis*-Glycole, die mittels Primer-Extension mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase detektiert werden können (Hayatsu und Ukita, 1967; Hayatsu, 1996). Hierbei wird das dem modifizierten Rest komplementäre Nukleotid in den gebildeten DNA-Strang inseriert und danach kommt es zum Kettenabbruch. Zudem kann es gelegentlich zu Syntheseabbrüchen an Adeninresten kommen, wenn diese sich 5'-seitig eines modifizierten Thymins befinden (Sasse-Dwight und Gralla, 1989).

Die Modifikationsreaktionen erfolgten jeweils mit 7 ng 'mismatch bubble' Template in 1x KGlu80-Puffer und 0, 4, 8 bzw. 16 mM Kaliumpermanganat in einem Gesamtvolumen von 22 μ l bei 30°C. Nach der Aufreinigung der modifizierten DNA-Fragmente konnten diese direkt in eine Primer-Extension mit dem Klenow-Enzym der DNA-Polymerase I eingesetzt werden (Kapitel IV, 2.3.7.3). In Abbildung 5 ist exemplarisch eine Primer-Extension-Analyse der mit Kaliumpermanganat modifizierten 'mismatch bubble' Templates AS-A, AS-R und BR-I/*XmnI* dargestellt.

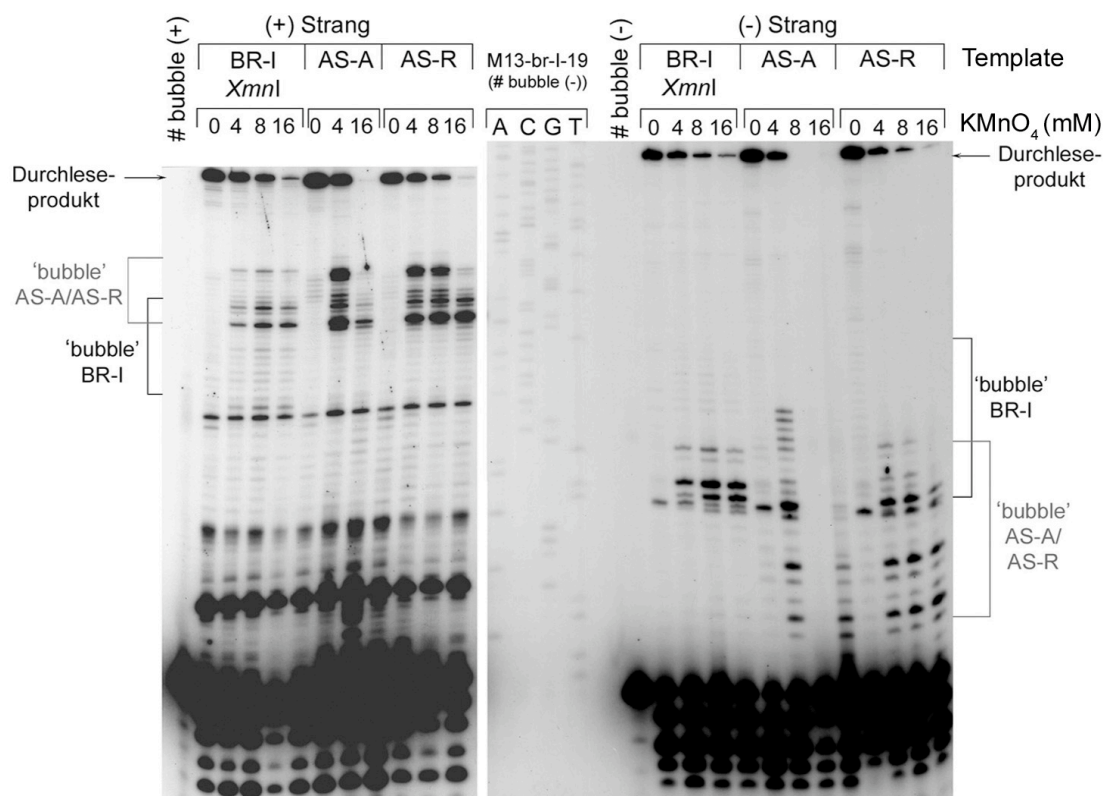


Abb. 5: Kaliumpermanganat-Modifikation der 'mismatch bubble' Templates AS-A, AS-R und BR-I/*XmnI*. Die jeweiligen Templates, die analysierten Stränge (+ bzw. -), die Oligonukleotide ('bubble' (-) bzw. (+)) und die Kaliumpermanganat-Konzentrationen (mM) sind angegeben. Als Orientierungshilfe diente eine Sequenzierung von M13br-I-19. Die ungepaarten Bereiche von BR-I (schwarz) und AS-A bzw. AS-R (grau) sind mit Klammern gekennzeichnet. Die Durchleseprodukte sind mit Pfeilen markiert.

Wie schon in früheren Analysen für AS-A und AS-R gezeigt werden konnte, befinden sich die Modifikationsstellen beider DNA-Stränge (+ und -) im Bereich der 'mismatch bubble'. Auch die Thyminer der 'mismatch bubble' BR-I sind im festgelegten ungepaarten Bereich modifiziert.

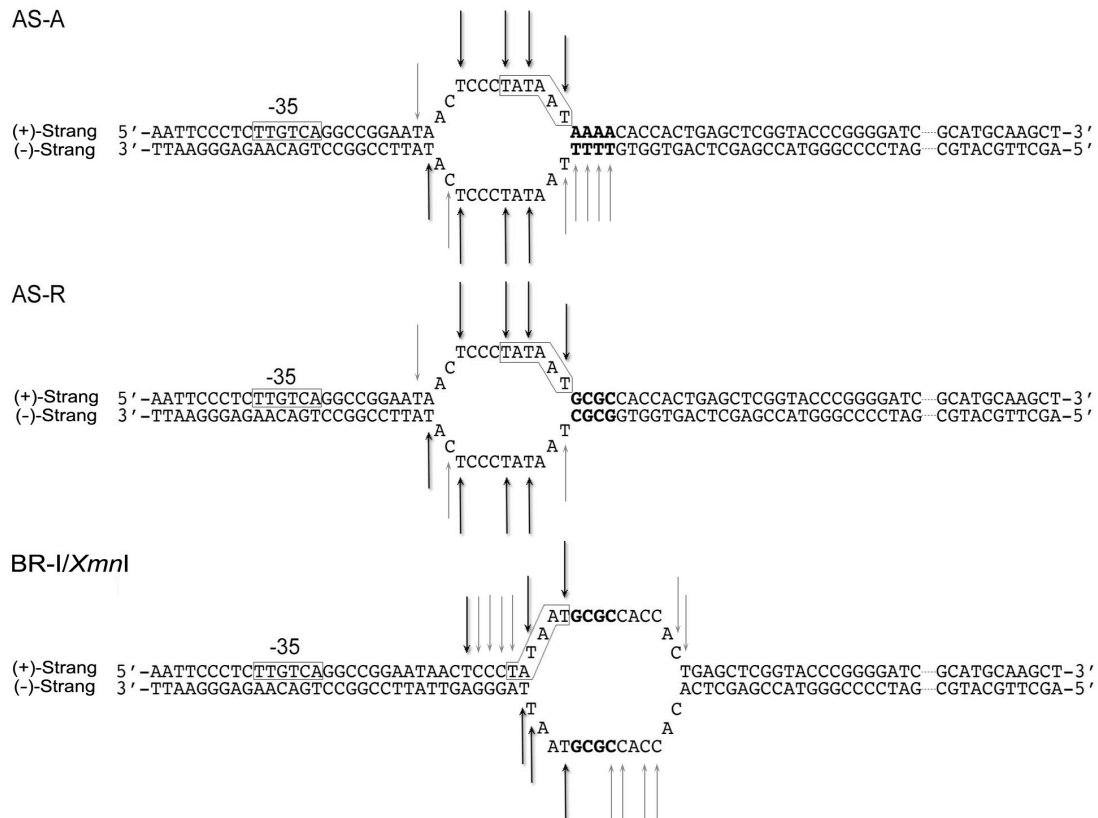


Abb. 6: Schematische Darstellung der Kaliumpermanganat-Modifikation der 'mismatch bubble' Templates AS-A, AS-R und BR-I/*Xmnl*. Starke PE-Signale sind durch schwarze und schwache durch graue Pfeile gekennzeichnet. Der (+)- und (-)-Strang ist jeweils gekennzeichnet.

Die nukleotidgenaue Auswertung der Modifikationsreaktion (Abb. 6) zeigt jedoch für alle untersuchten Templates weitere, die 'mismatch bubble' flankierende Modifikationen. Im Fall von AS-R betrifft dies die ersten beiden Thyminer 'upstream' des ungepaarten Bereichs. AS-A weist neben diesen beiden Modifikationsstellen noch zusätzliche schwächere Signale im Bereich des Diskriminators auf. Die 'mismatch bubble' BR-I/*Xmnl* hingegen zeigt ausschließlich im angrenzenden 'upstream' Bereich fünf weitere Signale. Da es sich bei den Modifikationsstellen außerhalb des angelegten ungepaarten Bereiches fast ausschließlich um schwache PE-Signale handelt, wird davon ausgegangen, dass diese Nukleotide nur zeitweise einzelsträngig und damit zugänglich sind.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Hybridisierung der Phagenderivate zum 'mismatch bubble' in allen Fällen den Erwartungen entspricht. Angrenzende AT-Basenpaare garantieren jedoch keine strikte Begrenzung des ungepaarten Bereichs. Daraus resultiert eine zeitweise Vergrößerung der künstlichen Transkriptionsblase im 'upstream' und 'downstream' Bereich, die durch die geringeren T_m -Werte von AT- gegenüber GC-Basenpaaren zustande kommt.

2.2 Bestimmung der Transkriptionsstartstellen der 'mismatch bubble' Templates

In vorangegangenen Analysen (Schwarzenberg, 1999) konnte für die 'mismatch bubble' Templates AS-A und AS-R eine spezifische Transkription mit natürlicher Transkriptionsrichtung (*rrnB* P1) vom 'downstream' Ende des ungepaarten Bereichs beobachtet werden. Trotz Ähnlichkeit zum *rrnB* P1 Promotor erfolgte jedoch keine Transkriptionsinitiation an +1. In anderen Untersuchungen an 'mismatch bubble' Templates mit Promotorhomologie wurden neben der natürlichen Transkriptionsrichtung zusätzliche, schwächere Starts von den Enden des ungepaarten Bereichs in die entgegengesetzte Richtung detektiert (Tripatara und deHaseh, 1993). Hier soll zum Einen eine nähere Charakterisierung möglicher Transkriptionsinitiationen vom eigentlichen 'non template' Strang ((-)-Strang der 'mismatch bubbles') und zum Anderen eine erste Transkriptionsstartbestimmung von BR-I mRNAs erfolgen. Besonders interessant ist dabei der Einfluss der Lage und der Größe des ungepaarten Bereichs auf die Startwahl. Außerdem soll mit Hilfe der langen und verkürzten 'mismatch bubble' BR-I der Einfluss der Länge des 'upstream' Bereichs auf die Promotorbindung untersucht werden.

Für die Bestimmung der Transkriptionsrichtung und der Startstellen wurden zwei verschiedene Nachweismethoden angewandt. Die Transkriptionsrichtung wurde zunächst durch einen Northern-Blot der Transkriptionsprodukte (Abb. 7) ermittelt. Für die nukleotidgenaue Bestimmung der Startstellen wurde anschließend eine Primer-Extension-Analyse der mRNAs durchgeführt (Abb. 8). Beiden Nachweismethoden ist die Synthese von Transkriptionsprodukten in großem Maßstab gemein. Die *in vitro* Synthese der RNA erfolgte in Anlehnung an 'multiple round' Transkriptionsbedingungen (Kapitel IV, 2.3.5.1). Dabei wurde jedoch auf den Einbau radioaktiv markierter Nukleotide verzichtet. Zur Steigerung der RNA-Ausbeuten wurden die Ansätze verdoppelt.

Für den Northern-Blot (Kapitel IV, 2.2.6.5) wurden die Transkriptionsansätze über ein denaturierendes PAA-Gel aufgetrennt und anschließend mit Hilfe des Kapillartransfer-Verfahrens auf eine Membran übertragen. Zur Visualisierung der Transkripte erfolgte eine Hybridisierung radioaktiv markierter Oligonukleotide (Abb. 7a). Dabei entsprechen die mit dem Oligonukleotid #bubble(+) detektierten Banden den Transkripten mit natürlicher *rrnB* P1 Syntheserichtung, während die mit #bubble(-) erfassten Banden vom Gegenstrang stammen.

In Abbildung 7b sind exemplarisch Northern-Blots für beide Transkriptionsrichtungen dargestellt. Für die natürliche Transkriptionsrichtung (Abb. 7b; #bubble(+)) zeigen die 'mismatch bubble' Templates AS-A und AS-R mit beiden Polymerasetypen mRNAs zwischen etwa 60 und 70 nt. Bei der Transkription mit dem Holoenzym sind zusätzliche Signale bei etwa 57 nt detektierbar. Da die Transkription an den Fragmentenden der 'mismatch bubble' Templates terminiert wird ('run-off' Transkripte), können die hier detektierten Transkripte anhand ihrer Länge den zuvor ermittelten Starts am 'downstream' Ende des ungepaarten Bereichs zugeordnet werden (Schwarzenberg, 1999). Auch in der entgegengesetzten Transkriptionsrichtung sind Signale detektierbar (Abb. 7;

#bubble(-)). Es handelt sich dabei um kurze Transkripte, deren exakte Länge aufgrund des gewählten Längenstandards nicht genau bestimmt werden kann. Es wird jedoch angenommen, dass sie etwa 25 bis 35 nt lang sind und somit ebenfalls ihren Ursprung an den Enden des ungepaarten Bereichs haben könnten. Das Holoenzym produziert auch hier einige kürzere Produkte als das Core-Enzym der RNAP.

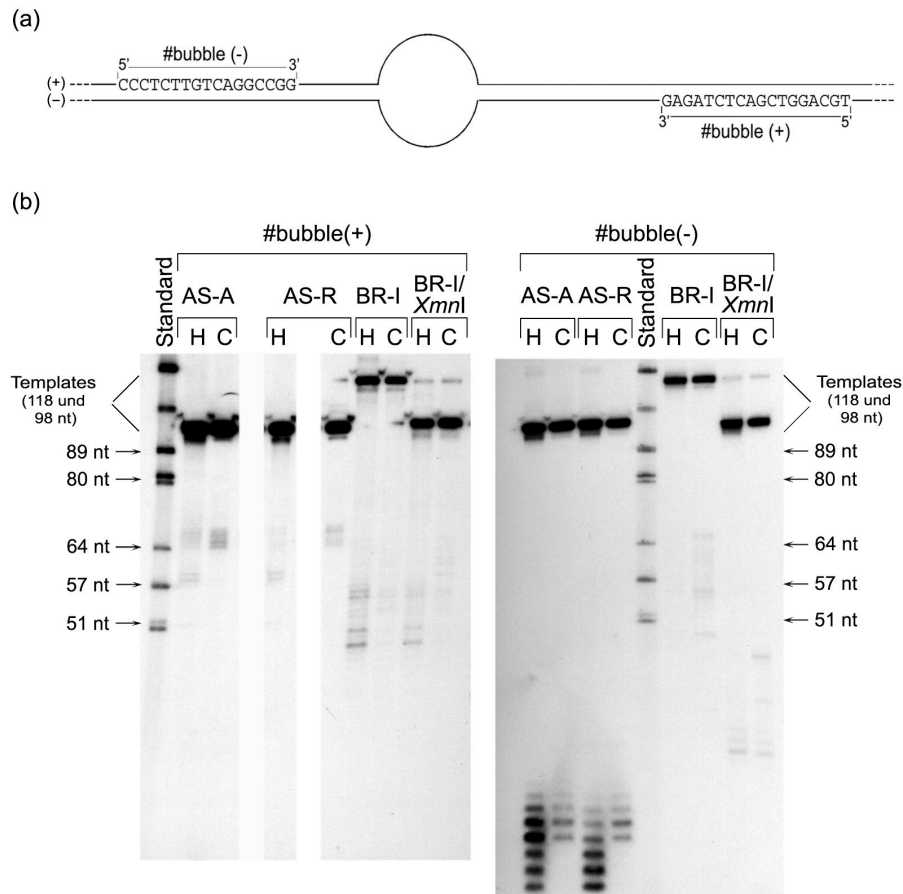


Abb. 7: Northern-Blot-Analyse zur Bestimmung der Transkriptionsrichtung der 'mismatch bubble' Templates. (a) Schematische Darstellung der Sequenzen und Bindestellen der verwendeten Oligonukleotide. #bubble(+) ist komplementär zu Transkripten vom (-)-Strang (= 'template' Strang) und #bubble(-) zu Transkripten vom (+)-Strang. (b) Northern-Blot einer über ein denaturierendes PAA-Gel aufgetrennten *in vitro* Transkription der 'mismatch bubble' Templates (AS-A, AS-R, BR-I und BR-I/*Xmn*I) mit dem Holo- (H) und dem Core-Enzym (C) der RNAP. Die Visualisierung der mRNA erfolgte durch Hybridisierung radioaktiv markierter Oligonukleotide. Als Längenstandard diente das restringierte (*Hae*I) und radioaktiv markierte Plasmid pBR322. Die entsprechenden Längen der Fragmente sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

Wie erwartet zeigen die lange (BR-I) und die im 'upstream' Bereich verkürzte (BR-I/*Xmn*I) 'mismatch bubble' identische Transkripte mit natürlicher Transkriptionsrichtung. Die Längen der mRNAs betragen etwa 50 bis 57 nt. Außerdem sind schwächere Signale um 60 nt detektierbar. Die Transkriptionseffizienz des Core-Enzyms ist dabei jeweils geringer als die des Holoenzym der RNAP. In der entgegengesetzten Transkriptionsrichtung verhalten sich die Produktstärken der beiden Polymerasetypen invers. Mit dem Holoenzym sind fast keine Transkripte nachweisbar. Das Core-Enzym zeigt bei der Transkription von BR-I mRNAs zwischen 50 und 70 nt. Entsprechend dem verkürzten

'upstream' Bereich sind die Produkte bei der Transkription von BR-I/*Xmn*I um etwa 20 nt kürzer. Die Transkriptionseffizienz und die Wahl der Transkriptionsstartstellen scheinen hier jedoch nahezu unabhängig von der Länge des 'upstream' Bereichs.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass bei der Transkription aller 'mismatch bubble' Templates eine Transkriptionsinitiation an den Enden der ungepaarten Bereiche von beiden DNA-Strängen erfolgt. Im Fall der Transkription von BR-I scheint jedoch die natürliche und *rrnB* P1-spezifische Transkription vom Holoenzym dominiert zu sein, während die Transkription in die andere Richtung hauptsächlich durch das Core-Enzym erfolgt. Dies deutet auf eine spezifischere Erkennung der *rrnB* P1-Kernpromotorsequenz durch das Holoenzym aufgrund der veränderten Größe und Lage des ungepaarten Bereichs hin.

Anschließend wurde zur nukleotidgenauen Untersuchung der Transkriptionsstartstellen eine Primer-Extension-Analyse der Transkriptionsprodukte durchgeführt. Der Nachweis der Startstellen erfolgte mit Hilfe der AMV Reversen Transkriptase (Kapitel IV, 2.3.5.3).

Die Abbildung 8 zeigt exemplarisch das Autoradiogramm einer solchen Primer-Extension-Analyse.

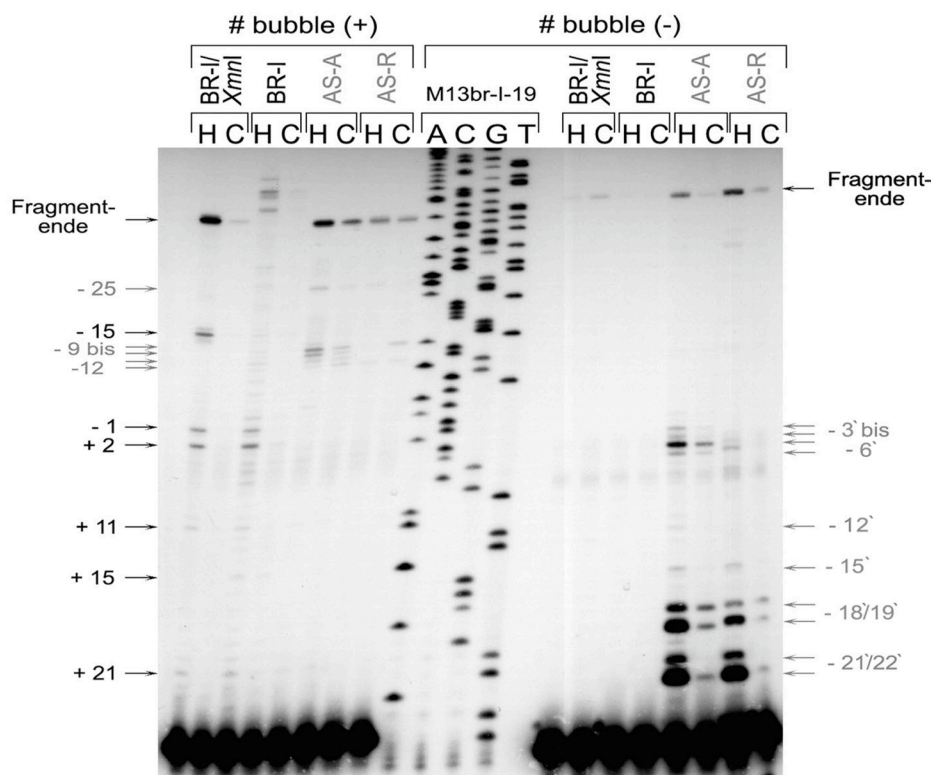


Abb. 8: Autoradiogramm einer Primer-Extension (PE) zur Startbestimmung der 'mismatch bubble' Templates (AS-A, AS-R, BR-I und BR-I/*Xmn*I) bei der Transkription mit dem Holo- (H) und Core-Enzym (C) der RNAP. Die verwendeten Oligonukleotide entsprechen denen aus Abb. 6. Zur Zuordnung der cDNA-Längen diente eine Sequenzierung von M13br-I-19 mit #bubble (-). Die ermittelten Startstellen sind mit Pfeilen gekennzeichnet und nach der Nomenklatur des *rrnB* P1 bezeichnet (z.B.: + 1 = Start an +1 mit natürlicher Transkriptionsrichtung; + 1' = Start an + 1 vom Gegenstrang). Die Signale von AS-A und AS-R sind grau und die der BR-I Derivate schwarz dargestellt.

Bei näherer Betrachtung der Startstellen (Abb. 9) fällt auf, dass bei der Transkription der 'mismatch bubble' Templates AS-A und AS-R die Orte der Initiation nahezu unabhängig sind vom jeweiligen Polymerasetyp. Die Effizienz der jeweiligen Transkription ist jedoch verschieden. Wie bei der Northern-Blot-Analyse vermutet, erfolgen Transkriptionsstarts von den Enden des ungepaarten Bereichs. Bei der natürlichen Transkriptionsrichtung ist dies hauptsächlich auf den 'downstream' Bereich der 'mismatch bubble' begrenzt, während die Transkription vom anderen Strang über den gesamten ungepaarten Bereich verteilt ist. Die Transkriptionsstartstellen der beiden 'mismatch bubble' Templates (AS-A und AS-R) unterscheiden sich vornehmlich bei der Transkription mit natürlicher Syntheserichtung. Während bei AS-A an den Positionen - 9 bis -12 (relativ zum + 1 des *rrnB* P1) initiiert wird, erfolgt der Transkriptionsstart bei AS-R an den Positionen - 9 und -12. Dies bedeutet, dass die Diskriminatorregion im Kontext dieser 'mismatch bubble' Templates oder die Größe des ungepaarten Bereichs (Kapitel II, 2.1.2.3) die Wahl der Initiationsorte beeinflusst.

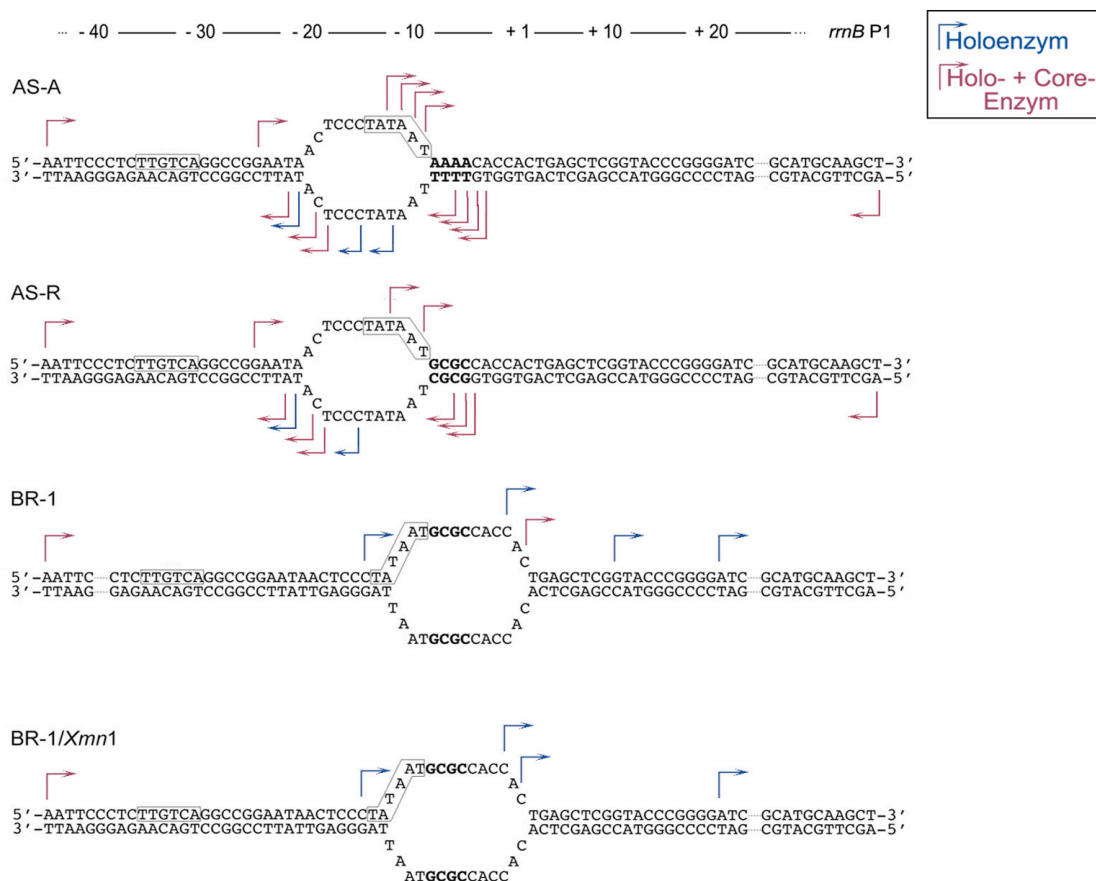


Abb. 9: Qualitative Auswertung der Transkriptionsinitiationen an den untersuchten 'mismatch bubble' Templates. Gemeinsame Signale des Holo- und Core-Enzyms sind in magenta und spezifische Holoenzym-Startstellen in blau hervorgehoben. Die - 10 Regionen sind umrandet.

Die Primer-Extension Analysen der Transkripte der BR-I Derivate zeigen ausschließlich für die natürliche Syntheserichtung Signale, die hauptsächlich vom Holoenzym der RNAP stammen. Es wird angenommen, dass die Transkription des Core-Enzyms von diesem Strang und die Transkription beider

Polymerasetypen vom anderen DNA-Strang unterhalb der Nachweisgrenze der angewendeten Methode liegen. Dies ist konform mit den im Northern-Blot ermittelten Transkriptstärken.

Bei natürlicher Transkriptionsrichtung erfolgt bei den BR-I Templates eine effiziente Initiation an den Positionen - 15 ('upstream' Ende des ungepaarten Bereichs) und vor allem an den Positionen - 1 und + 2. Eine Transkription vom natürlichen *rrnB* P1-Start + 1 kann nicht verzeichnet werden. Möglicherweise ist dies in der veränderten Nukleotidsituation der 'mismatch bubble' begründet. Durch die Positionierung des natürlichen + 1 innerhalb des ungepaarten Bereichs entspricht zwar die Sequenz des 'non template' Strangs der *rrnB* P1 Sequenz, nicht jedoch die Sequenz des 'template' Strangs, der als Matrize für die mRNA fungiert. Würde die Transkription der BR-I Derivate an der + 1 Position initiieren, wäre das Startnukleotid nicht wie im Fall des *rrnB* P1 Promotors ein ATP, sondern ein UTP. Zum Einen erweist sich UTP als ungünstiges Startnukleotid aufgrund der methodischen UTP-Limitierung bei der *in vitro* Transkription (Kapitel IV, 2.3.4.1). Zum Anderen konnte unabhängig davon für die Wahl der Transkriptionsstartstellen mehrerer σ^{70} -abhängiger Promotoren eine Variation der Startpositionen zwischen sechs bis neun bzw. zwölf Basenpaaren 'downstream' der -10 Region und folgende Startnukleotidpräferenz ATP > GTP > UTP \geq CTP gezeigt werden (Jeong, 1994; Walker und Osuna, 2002). Für die Transkriptionsinitiation an den BR-I Derivaten könnte somit eine Variation der Startpositionen (- 1 und + 2 statt + 1) zugunsten der Startnukleotide (GTP statt UTP) erfolgen.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Transkription der 'mismatch bubble' Templates AS-A und AS-R mit beiden Polymerasetypen bei natürlicher Syntheserichtung promotorspezifisch von den 'downstream' Enden des ungepaarten Bereichs erfolgt, während die Synthese vom anderen DNA-Strang über den gesamten Bereich der 'mismatch bubble' verteilt ist. Auch die BR-I Derivate zeigen bei der natürlichen Transkriptionsrichtung eine spezifische Initiation vom 'downstream' Ende des ungepaarten Bereichs. Im Gegensatz zu den anderen 'mismatch bubble' Templates erfolgt diese Transkription jedoch vornehmlich mit dem Holoenzym der RNAP. Zudem ist die Syntheserate von dem anderen DNA-Strang nicht nur sehr schwach sondern verhält sich auch invers, d.h. die Transkription von BR-I ist mit dem Core-Enzym stärker als mit dem Holoenzym. Dies zeigt, dass die veränderte Lage und Position des ungepaarten Bereichs die Spezifität des Holoenzym zu dem artifiziellen Promotor erhöht.

2.3 Transkriptionsregulation an 'mismatch bubble' Templates unter dem Einfluss von ppGpp

Im Anschluss an die Transkriptionsstartbestimmung sollte der Einfluss des Effektormoleküls der Stringenten Kontrolle auf die Transkription der 'mismatch bubble' BR-I erfolgen. Vergleichend wurde parallel eine wiederholte Analyse der anderen beiden 'mismatch bubble' Templates (AS-A und AS-R) einbezogen.

Dazu wurden 'multiple round' *in vitro* Transkriptionen mit 1 nM DNA-Template und 3 nM aktivem Holo- bzw. Core-Enzym der RNAP durchgeführt (Kapitel IV, 2.3.4.1.1). Der Start der Transkription erfolgte durch Zugabe von ATP, CTP und GTP in einer Konzentration von 65 µM und 20 nM [³²P]-UTP (3000 Ci/mmol). Nach 15minütiger Inkubation bei 30°C erfolgte ein 'chase' mit sättigender Nukleotidkonzentration und dem Kompetitor Heparin. Nach weiteren sechs Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von Stopp-Lösung beendet. Die Transkriptionsansätze wurden anschließend auf einen 10 % denaturierenden PAA-Gel aufgetrennt.

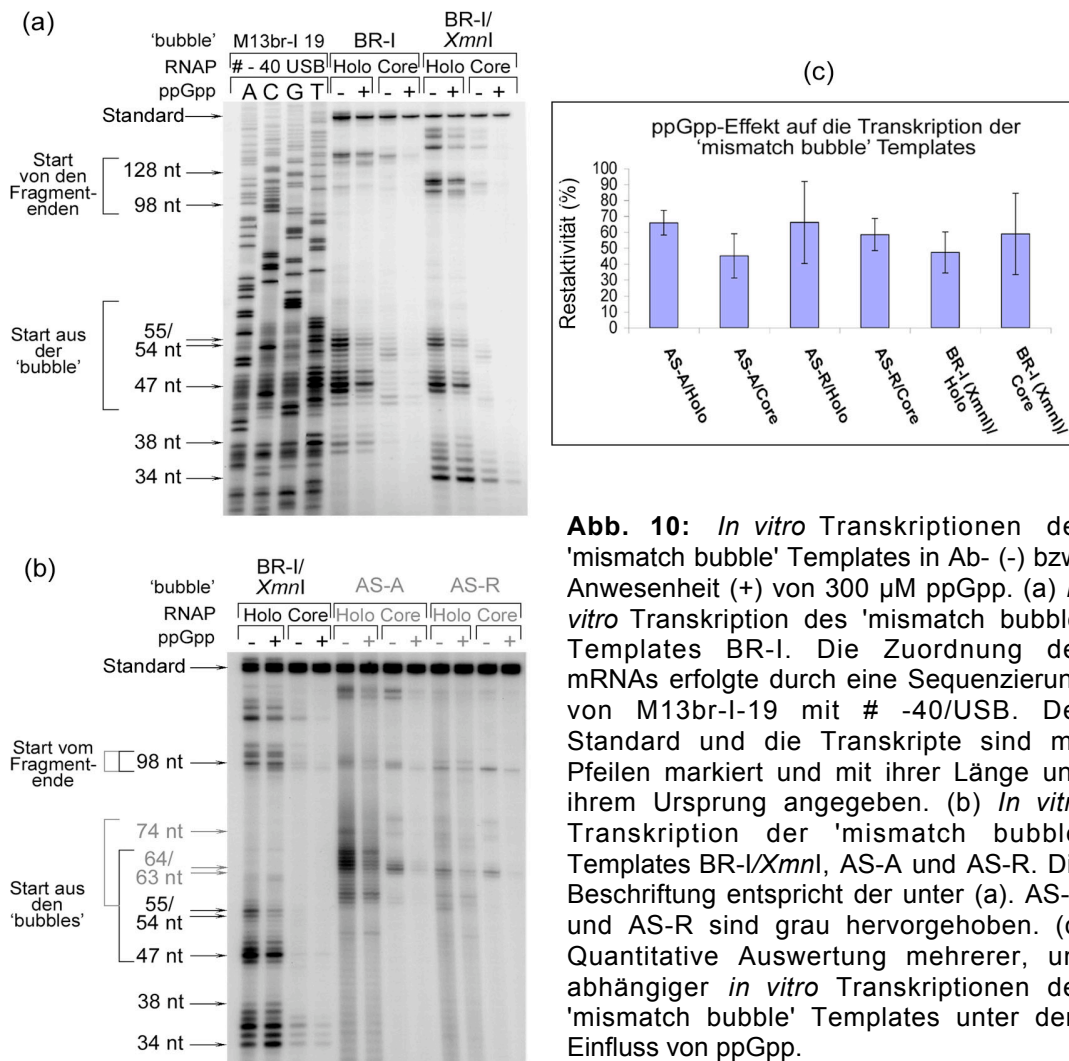


Abb. 10: *In vitro* Transkriptionen der 'mismatch bubble' Templates in Ab- (-) bzw. Anwesenheit (+) von 300 µM ppGpp. (a) *In vitro* Transkription des 'mismatch bubble' Templates BR-I. Die Zuordnung der mRNAs erfolgte durch eine Sequenzierung von M13br-I-19 mit # -40/USB. Der Standard und die Transkripte sind mit Pfeilen markiert und mit ihrer Länge und ihrem Ursprung angegeben. (b) *In vitro* Transkription der 'mismatch bubble' Templates BR-I/*XmnI*, AS-A und AS-R. Die Beschriftung entspricht der unter (a). AS-A und AS-R sind grau hervorgehoben. (c) Quantitative Auswertung mehrerer, unabhängiger *in vitro* Transkriptionen der 'mismatch bubble' Templates unter dem Einfluss von ppGpp.

Abbildung 10a zeigt zunächst die Transkription des langen und des im 'upstream' Bereich verkürzten BR-I Derivats. Beide DNA-Fragmente zeigen mit beiden Polymerasetypen spezifische Starts aus dem ungepaarten DNA-Bereich und auch vom Fragmentende. Wie schon bei der Northern-Blot-Analyse und der Primer-Extension der Transkriptionsprodukte vermutet (Kapitel II, 2.2), erfolgt die Transkription mit dem Core-Enzym der RNAP mit geringer Effizienz. Bei einem ersten Blick scheint die Transkription aus der 'bubble' bei der langen 'mismatch bubble' BR-I stärker als bei BR-I/*XmnI*. Dies resultiert aus der Überlagerung von Transkriptionsprodukten von beiden DNA-Strängen, da der

ungepaarte Bereich bei dem 'mismatch bubble' Template BR-I genau in der Mitte des DNA-Fragmentes positioniert ist. Aus diesem Grund eignen sich die *in vitro* Transkriptionsanalysen von BR-I nicht für die quantitative Betrachtung des ppGpp-Effektes. In diesem Zusammenhang können jedoch die Experimente mit dem 'mismatch bubble' Template BR-I/*Xmnl* herangezogen werden. Hier besitzen die Transkriptionsprodukte aus der 'bubble' mit natürlicher Transkriptionsrichtung ebenfalls eine Länge von etwa 50 bis 65 nt. Die Produkte vom anderen DNA-Strang sind jedoch 20 nt kürzer und besitzen somit eine Länge von etwa 30 bis 45 nt. Die Transkriptionseffizienz dieser kurzen mRNAs (34-39 nt) scheint zunächst stärker als bei der Transkriptionsstartbestimmung vermutet (Kapitel II, 2.2), kann aber, im Vergleich zu der Synthese vom Gegenstrang, durch einen sequenzabhängigen zweifach höheren Einbau von radioaktiv markiertem UTP erklärt werden.

Unter dem Einfluss von ppGpp zeigen beide BR-I Derivate eine Inhibierung der Transkription. Dabei zeigen die aus der Gegenstrangsynthese resultierenden Transkripte von BR-I/*Xmnl* (34-37 nt) nur eine schwache Inhibierung. Aus diesem Grund wird der ppGpp-Effekt auf die Transkription vom Gegenstrang als unspezifisch angesehen. Im Gegensatz dazu erfahren die Transkriptionsprodukte aus der 'bubble' mit natürlicher Syntheserichtung mit beiden Polymerasetypen eine ppGpp-spezifische Inhibierung.

Wie erwartet, erfolgt auch bei den beiden anderen 'mismatch bubble' Templates AS-A und AS-R sowohl mit dem Holo- als auch mit dem Core-Enzym eine ppGpp-abhängige Inhibierung der Transkription (Abb. 10b). Generell ist hier die Transkriptionseffizienz von AS-A größer als die von AS-R. Als Grund für die erhöhte Produktausbeute bei der Transkription von AS-A wird eine erleichterte Isomerisierung der AT-reichen gegenüber der GC-reichen Diskriminatorregion (AS-R) angesehen.

Die quantitative Auswertung (Abb. 10c) des ppGpp-Effektes auf die Transkription der spezifischen Produkte aus der 'bubble' zeigt für AS-A und AS-R bei der Transkription mit dem Holoenzym eine spezifische Inhibierung um 35 %. Bei der Transkription durch das Core-Enzym der RNAP beträgt die Inhibierung von AS-A etwa 55 % und von AS-R ca. 40 %, d.h. die Aktivität des Core-Enzyms wird stärker inhibiert als die des Holoenzym (vgl. auch Reckendrees, 2000). Bei der Transkription von BR-I/*Xmnl* verhalten sich die Inhibierungsstärken invers. Die Transkription mit dem Holoenzym wird hier um etwa 53 % und die des Core-Enzyms um etwa 41 % inhibiert. Möglicherweise verleiht der BR-I-'mismatch bubble'-Kontext dem Holoenzym der RNAP nicht nur eine größere promotorabhängige Transkriptionsspezifität (Kapitel II, 2.2), sondern auch eine höhere Spezifität gegenüber dem Effektormolekül der Stringenten Kontrolle. Betrachtet man jedoch den allgemeinen Fehler der quantitativen Auswertungen, so liegen die Unterschiede des ppGpp-Effektes beider Polymerasetypen jeweils im Rahmen der Abweichungen.

Abschließend kann für die Transkription der 'mismatch bubble' Templates AS-A, AS-R und BR-I unter dem Einfluss von ppGpp festgehalten werden, dass auch nach Bildung der offenen RNAP-Promotorkomplexe eine spezifische und effektive Inhibierung der Transkription erfolgt. Für die 'mismatch bubble'

Templates AS-A und AS-R konnte erneut keine Abhängigkeit des ppGpp-Effektes von der Diskriminatorregion und von der Assemblierung des σ -Faktors an das Core-Enzym der RNAP gezeigt werden. Die 'mismatch bubble' BR-I zeigt tendenziell vergleichbare Ergebnisse, jedoch weist sie insgesamt eine höhere Spezifität für das Holoenzym auf. Außerdem erfahren die Produkte bei der Transkription mit dem Core-Enzym der RNAP bei der natürlichen Syntheserichtung eine schwächere und bei der Transkription vom anderen DNA-Strang sogar fast keine ppGpp-abhängige Inhibierung, wodurch eine Beteiligung des σ -Faktors bei der Stringenten Regulation nicht vollständig ausgeschlossen werden kann.

3 Diskussion

Seit langem ist die Transkriptionsinitiation als Hauptregulationsort der Stringenten Kontrolle bekannt. Dabei ist jedoch noch relativ unklar, welcher Schritt des mehrphasigen Initiationsprozesses (Kapitel I, Abb. 7) durch das Effektormolekül ppGpp beeinflusst wird. Ein Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war daher die Analyse des ppGpp-Effektes nach Bildung der binären offenen RNAP-Promotorkomplexe. Da die binären Komplexe (RP_c und RP_o) vieler stringent kontrollierter Promotoren eine große Instabilität aufweisen und oft erst durch die Zugabe von Substrat-NTPs in stabile Komplexe übergehen, erfolgte diese Analyse an synthetisch konstruierten sogenannten 'mismatch bubble' Templates, die eine permanente Transkriptionsblase simulieren. Aufgrund der Transkriptionseigenschaften solcher 'mismatch bubble' Templates war zudem eine Analyse der Rolle des σ -Faktors während der Stringenten Kontrolle möglich. Durch die Konstruktion verschiedener 'mismatch bubble' Templates konnte außerdem die Funktion der Diskriminatorregion in Abhängigkeit von der Sequenz und Lage im RP_o untersucht werden.

Bevor die Ergebnisse der ppGpp-abhängigen Transkription an 'mismatch bubble' Templates diskutiert werden, soll im Folgenden zunächst auf die Spezifität der Transkription an den synthetischen DNA-Templates eingegangen werden.

3.1 Spezifität der Transkription an 'mismatch bubble' Templates

Voraussetzung für die Betrachtung des ppGpp-Effektes unter den oben genannten Gesichtspunkten ist die spezifische Erkennung der synthetisch konstruierten Promotorstrukturen. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Analyse der Spezifität der Startpunkte bei der Transkription an 'mismatch bubble' Templates durchgeführt (Kapitel II, Abb. 7 und 8). Für die 'mismatch bubble' Templates AS-A und AS-R konnte bei natürlicher, promotor-spezifischer Syntheserichtung vor allem eine Transkription vom 'downstream' Ende des ungepaarten Bereichs gezeigt werden. Im Gegensatz dazu waren

Transkriptionsinitiationen am Gegenstrang über den gesamten einzelsträngigen Bereich verteilt. Vor allem bei natürlicher Transkriptionsrichtung wurden für AS-A und AS-R, die mit Ausnahme der Diskriminatorsequenz homolog sind, verschiedene Transkriptionsstartstellen ermittelt. Bis auf wenige Ausnahmen zeigten das Holo- und Core-Enzym qualitativ übereinstimmende Transkriptionsstartstellen.

Die dritte 'mismatch bubble' BR-I, die bis auf die Lage und Größe des ungepaarten Bereichs homolog zu AS-R ist, zeigte bei natürlicher Syntheserichtung vor allem Transkriptionsinitiationen in der Nähe des natürlichen + 1 Starts. Die Transkription durch das Holoenzym war dabei um ein Vielfaches stärker als die des Core-Enzyms. Vom Gegenstrang erfolgte generell eine schwache mRNA Synthese, die im Verhältnis zur natürlichen Transkriptionsrichtung eher vom Core-Enzym präferiert wurde.

Welche Informationen liefern diese Ergebnisse über die Spezifität der RNAP an den untersuchten 'mismatch bubble' Templates? Die ausschließlich bei der Transkription mit natürlicher Syntheserichtung beobachtete Beschränkung der Transkriptionsstartstellen aller 'mismatch bubble' Templates auf die 'downstream' Enden der ungepaarten Bereiche ist ein Indiz für eine promotorspezifische Bindung der RNAP. Bei den 'mismatch bubble' Templates AS-A und AS-R scheint diese Promotor- bzw. Sequenzspezifität jedoch zunächst unabhängig von der Erkennung durch den σ -Faktor zu sein. Die in früheren Retardierungs- und Footprint-Analysen von binären RNAP-'mismatch bubble'-Komplexen (Reckendrees, 2000) ermittelte höhere Stabilität der Holoenzym-Komplexe gegenüber dem Kompetitor Heparin, weist jedoch auf eine höhere Spezifität dieser Komplexe gegenüber den Core-Enzym-Komplexen hin.

Abweichend von AS-A und AS-R zeigt das 'mismatch bubble' Template BR-I bei der Transkription mit natürlicher Syntheserichtung eine signifikant höhere Spezifität für das Holoenzym der RNAP. Dies weist auf eine σ -Faktor-spezifische Erkennung des 'non template' Strangs hin. Dabei kann jedoch ein zusätzlicher Effekt durch die veränderte Größe des ungepaarten Bereichs der 'mismatch bubble' BR-I nicht ausgeschlossen werden. Möglicherweise bedingt die Größe des ungepaarten Bereichs, der im Fall von BR-I der Transkriptionsblase eines finalen offenen Komplexes entspricht, sogar die σ -Faktor-spezifische Erkennung des 'mismatch bubble' Templates.

Da die gebildeten RNAP-Promotorkomplexe kein starres Gefüge darstellen, sondern im Laufe der Transkriptionsinitiation steten Veränderungen unterliegen, die Konformationsänderungen und damit auch unterschiedliche Protein-DNA-Wechselwirkungen beinhalten, könnte die Rolle der σ -Untereinheit als Spezifitätsfaktor während des Initiationsprozesses veränderlich sein. Für die spezifische Bindung der RNAP an 'mismatch bubble' Templates kann dies bedeuten, dass die σ -Faktor-abhängige Erkennung in Intermediaten der offenen Komplexbildung, wie sie bei der Bindung an AS-A und AS-R simuliert werden, weniger relevant ist, als im finalen offenen Promotorkomplex, der bei der Bindung an BR-I nachgeahmt wird. Dies wird unterstützt durch Analysen an sogenannten 'fork junction' Templates, die durch einen überhängenden

einzelsträngigen DNA-Bereich ausgezeichnet sind. In Bindungsstudien an 'fork junction' Templates mit Promotorhomologie konnte eine sequenz- und basenspezifische Erkennung der Konsensuspromotormotive im doppelsträngigen geschlossenen RNAP-Promotorkomplex sowie eine auf der Interaktion mit dem Phosphatrückrat beruhende basenunspezifische Erkennung der einzelsträngigen -10 Region bei der Isomerisierung zum offenen Komplex und eine σ -Faktor-abhängige Bildung des finalen heparinresistenten offenen Promotorkomplexes beobachtet werden (Fenton und Gralla, 2001; Fenton und Gralla, 2003). Im Zusammenhang mit den im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Templatespezifitäten der beiden Polymerasetypen impliziert dies die Frage nach einer möglichen sequenzspezifischen Erkennung durch die σ - und σ' -Untereinheit der RNAP.

Abschließend kann für die Spezifität der RNAP festgehalten werden, dass das Einfügen der Promotorsequenzen des *rrnB* P1 Promotors in die 'mismatch bubble' Templates keine strikte aber doch signifikante sequenzspezifische Erkennung durch die RNAP vermittelt. Die σ -Faktor-abhängige Erkennung der 'mismatch bubble' Templates ist dabei jedoch abhängig von der Lage und möglicherweise der Größe des ungepaarten Bereichs.

3.2 Molekularer Mechanismus der negativen Stringenten Kontrolle

Der vorliegenden Arbeit vorangegangene Analysen der 'mismatch bubble' Templates AS-A und AS-R unter dem Einfluss von ppGpp legten folgende Aussagen nahe:

1. Die Bildung der offenen binären RNAP-Promotorkomplexe ist nicht der entscheidende Schritt der ppGpp-vermittelten Transkriptionsregulation.
2. Unter den gegebenen Bedingungen ist die Anwesenheit des σ -Faktors nicht zwingend notwendig für die Regulation der Stringenten Kontrolle.
3. Die Diskriminatorregion ist kein ausreichendes Motiv für die Richtung (positiv bzw. negativ) der Stringenten Regulation.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten diese Ergebnisse verifiziert und vor allem durch die Untersuchungen an der 'mismatch bubble' BR-I konkretisiert werden. Mit allen drei 'mismatch bubble' Templates erfolgte sowohl mit dem Holo- als auch mit dem Core-Enzym der RNAP eine ppGpp-abhängige Inhibierung der Transkription. Dies bedeutet, dass der entscheidende Schritt der ppGpp-vermittelten Transkriptionsregulation der Isomerisierung zum offenen RNAP-Promotorkomplexbildung nachgeschaltet sein muss. Es wird davon ausgegangen, dass der ppGpp-Effekt vornehmlich auf einer Beeinflussung der Bildung der ternären Initiationskomplexe beruht. Diese Annahme ist konform mit dem von Jöres (Jöres, 2001; Jöres und Wagner, 2003) beschriebenen

Kompetitionsmodell der ppGpp-abhängigen Regulation der Transkription. Dieses Modell geht von einer Inhibierung der Bildung der ternären Initiationskomplexe aus, die durch eine Konkurrenz der Startnukleotide und des Effektormoleküls ppGpp um den Eintritt in den sekundären Kanal und die Bindung an die NTP-Bindestelle im aktiven Zentrum der RNAP verursacht wird. Unterstützend für dieses Modell konnte in Röntgenstrukturanalysen von RNAP-Komplexen eine Bindung von ppGpp nahe des aktiven Zentrums und der NTP-Bindestelle gezeigt werden (Artsimovitch, 2004).

Welche Rolle spielt der σ -Faktor bei der negativ stringenten Regulation? Da bei der Transkription der 'mismatch bubble' Templates AS-A und AS-R (Reckendrees, 2000; diese Arbeit) die ppGpp-vermittelte Inhibierung der Transkription jeweils mit dem Core-Enzym stärker war als mit dem Holoenzym der RNAP, wurde der σ -Faktor als nicht essentiell für die Stringente Regulation angesehen. Aufgrund der Erkenntnisse der ppGpp-abhängigen Transkriptionsregulation am 'mismatch bubble' Template BR-I, das sich ausschließlich durch eine veränderte Größe und Lage des ungepaarten Bereichs von AS-R unterscheidet, muss diese Aussage jedoch eingeschränkt werden. Hier wurde tendenziell eine inverse Inhibierungsstärke der beiden Polymerasetypen festgestellt, d.h. die Transkription mit dem Holoenzym wurde stärker inhibiert. Es wird angenommen, dass der σ -Faktor, auch wenn er für die ppGpp-abhängige Inhibierung nicht zwingend notwendig ist, den ppGpp-Effekt in Abhängigkeit von der jeweiligen Struktur bzw. Konformation der Initiationskomplexe modulieren kann.

Ähnliches gilt auch für die Funktion der Diskriminatorregion. Bei dem 'mismatch bubble' Template AS-A konnte trotz des Einfügens der positiven Diskriminatorsequenz eine ppGpp-abhängige Inhibierung der Transkription ermittelt werden (Reckendrees, 2000; diese Arbeit). Aus diesem Grund wurde davon ausgegangen, dass dieses Promotorelement kein ausreichendes Motiv für die Richtung des ppGpp-Effektes darstellt. Die hier erfolgten Analysen weisen jedoch daraufhin, dass die Funktion der Diskriminatorregion abhängig von der Positionierung im RNAP-Promotorkomplex ist. Diese Annahme stützt sich auf die Beobachtung unterschiedlicher Inhibierungsstärken bei der ppGpp-abhängigen Transkription der 'mismatch bubble' Templates AS-R und BR-I, die mit Ausnahme der Lage und Größe des ungepaarten Bereichs homolog sind. Dabei betrug die Inhibierung bei der Transkription von AS-R mit dem Holoenzym der RNAP im Mittel 35 %, während die entsprechende Transkription von BR-I um etwa 53 % inhibiert wurde. Die Tatsache, dass der Inhibierungsunterschied nur im Fall der Holoenzymtranskription beobachtet werden konnte, untermauert die Spezifität des Effektes. Für die 'mismatch bubble' BR-I könnte die strukturelle Ähnlichkeit zu natürlichen Initiationskomplexen eine ppGpp-Wechselwirkung herbeiführen, wie man sie in stringent kontrollierten RNAP-Promotorkomplexen findet. Ob die Zunahme der ppGpp-abhängigen Inhibierung im RNAP-BR-I-Komplex ausschließlich auf die sequenzspezifische Erkennung der Diskriminatorregion zurückzuführen ist oder gleichzeitig auf der veränderten Größe und Lage des ungepaarten Bereichs beruht, kann hier nicht differenziert werden. Die Ergebnisse lassen jedoch die Aussage zu, dass auch

der Einfluss der Diskriminatorregion auf die negative ppGpp-spezifische Transkriptionsregulation eine Abhängigkeit von der jeweiligen Struktur bzw. Konformation der Initiationskomplexe zeigt.

Damit konnte im Rahmen dieser Arbeit erneut die Bildung der binären Komplexe als Hauptregulationsschritt der ppGpp-abhängigen Transkription ausgeschlossen werden. Darüber hinaus konnte eine Beeinflussung des ppGpp-Effektes sowohl durch den σ -Faktor als auch die Diskriminatorregion ermittelt werden. Dabei muss betont werden, dass die Stärke dieses Einflusses von der individuellen Struktur der Promotorkomplexe abhängt.

Kapitel III Transkriptionsregulation in verschiedenen Wachstumsphasen

1 Problemstellung und experimenteller Ansatz

Einen weiteren Schwerpunkt dieser Arbeit bildet die durch die Spezifitätsfaktoren σ^{70} und σ^{38} der RNAP von *Escherichia coli* vermittelte differentielle Transkriptionsregulation während der exponentiellen und der stationären Wachstumsphase als auch unter verschiedenen Stressbedingungen.

Während *in vivo* eine strikte wachstumsphasen-abhängige Regulation der Transkription erfolgt, konnte in zahlreichen *in vitro* Analysen eine Kreuzerkennung der RNA-Polymerasen E70 und E38 und der jeweiligen Promotoren gezeigt werden (Hengge-Aronis, 2003). Die Mechanismen bzw. Faktoren, die diese *in vivo* Spezifität vermitteln, sind jedoch noch relativ unbekannt. Aus diesem Grund sollten im Rahmen dieser Arbeit die generellen *in vitro* Promotorspezifitäten in je einem homologen und heterologen σ -Faktorspezifischen Transkriptionssystem untersucht werden. Außerdem sollten, basierend auf früheren Arbeiten (Ding *et al.*, 1995; Kusano *et al.*, 1996; Kusano und Ishihama, 1997; Germer *et al.*, 1998), weitere mögliche Spezifitätsfaktoren, wie z.B. die Superhelikalität des Templates oder die Salzkonzentration untersucht werden. Im Mittelpunkt stand dabei ebenfalls der Einfluss des Effektormoleküls der Stringenten Kontrolle (ppGpp) auf die wachstumsphasenspezifische Transkription.

Hierzu wurden im Rahmen dieser Arbeit sowohl funktionelle als auch strukturelle Analysen der σ^{70} - bzw. σ^{38} -spezifischen Transkriptionsapparate durchgeführt. Als repräsentativer σ^{70} -abhängiger und zudem stringent kontrollierter Promotor wurde der P1-Promotor des ribosomalen B Operons von *E. coli* (*rrnB* P1) gewählt (Abb. 1).

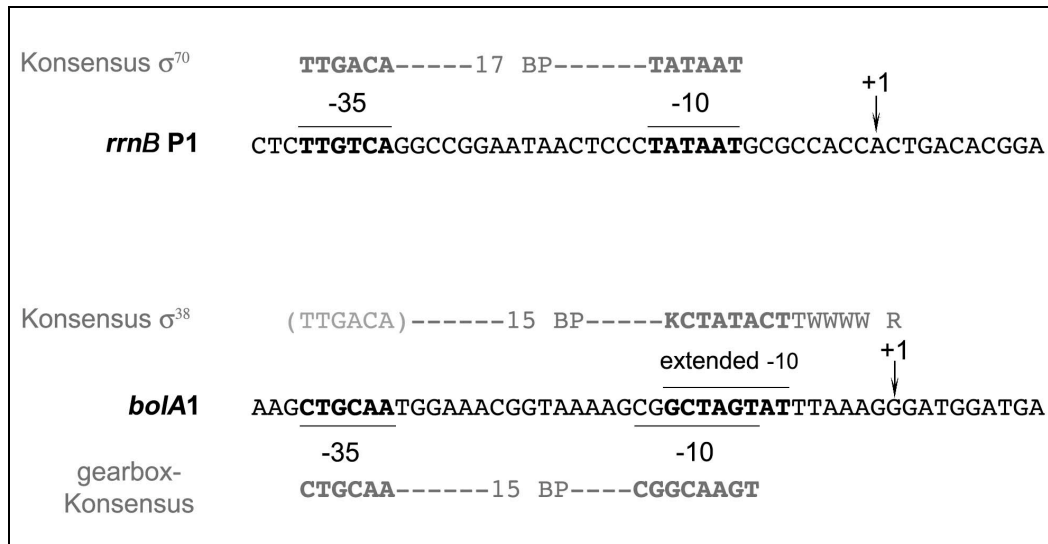


Abb. 1: Kernpromotorsequenzen der untersuchten Promotoren *rrnB* P1 und *bolA1* ('non template' Strang) und ihre zugehörigen Konsensussequenzen. Hervorgehoben sind die -35, die -10 Regionen und die Transkriptionsstarts +1. σ^{38} -abhängige Promotoren weisen in der Regel keine strikte -35-Konsensussequenz auf, als Orientierungshilfe wurde hier die σ^{70} -Konsensussequenz eingefügt (siehe Klammern). Das Nukleotidkürzel K steht für G/T, R für A/G und W steht für A/T. Sequenzquellen: Konsensus σ^{70} , *rrnB* P1 und 'gearbox'-Konsensus (Wagner, 2000); *bolA1* und Konsensus σ^{38} (Becker und Hengge-Aronis, 2001).

Für die Analyse der Transkriptionsregulation an einem σ^{38} -abhängigen Promotor wurde der *bolA* Promotor von *E. coli* herangezogen (Abb. 3.1), der sowohl eine für σ^{38} -abhängige Promotoren typische verlängerte ('extended') -10 Region (Becker und Hengge-Aronis, 2001), als auch die Merkmale eines 'gearbox'-Promotors aufweist (siehe Kapitel I).

2 Ergebnisse

2.1 Konstruktion und Präparation von Transkriptionskomponenten

2.1.1 Die Transkriptionsmatritzen

Die Analysen der Transkriptionssysteme unter superhelikalen Bedingungen erfolgten an Plasmiden in der 'supercoiled' Form. Dazu mussten die jeweiligen Promotoren plasmidär vorliegen und zudem musste für *in vitro* Transkriptionen eine definierte Terminationsstelle sichergestellt werden. Dies wurde durch 'downstream' liegende intrinsische Terminatoren erzielt. Die Präparation der superhelikalen DNA-Matritzen erfolgte über das Verfahren der Plasmidisolation im großen Maßstab (2.2.3.2). Der Anteil an superhelikaler Plasmid-DNA wurde mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese bestimmt und lag in allen Fällen bei mindestens 90 %.

Für Untersuchungen mit linearisierten Templates wurden ausschließlich DNA-Fragmente mit glatten Enden benutzt. Dies sollte eine mögliche, unspezifische

Bindung der RNAP an überhängenden Fragmentenden unterbinden (Melancon *et al.*, 1983). Hierzu erfolgten die Restriktionshydrolysen (Kapitel IV, 2.2.4.1) entweder mit Enzymen, die glatte Enden produzieren oder im Fall von überhängenden Restriktionsstellen wurden diese mit Hilfe des Klenow-Enzyms nachträglich aufgefüllt (Kapitel IV, 2.2.4.4).

Die restringierten DNA-Fragmente wurden über präparative Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt (Kapitel IV, 2.2.5.1), mit Hilfe der DNA-Gel-elution über Glaswolle bzw. nach dem 'freeze-squeeze'-Verfahren isoliert (Kapitel IV, 2.2.7.1 und 2.2.7.2) und anschließend einer Mikrotropfendialyse unterzogen (Kapitel IV, 2.2.2.3).

2.1.1.1 Der \square^{70} -abhängige Promotor *rrnB* P1

Für Analysen unter superhelikalen Bedingungen lag der \square^{70} -spezifische *rrnB* P1 Promotor mit 'downstream' liegenden Terminatoren T1 und T2 des *rrnB* Operons von *E. coli* auf dem Plasmid pRT3H \square P2 vor (Kapitel IV, 1.2.2).

Für vergleichende *in vitro* Transkriptionen unter linearisierten Bedingungen konnte das Plasmid pRT3H \square P2 mit dem Restriktionsenzym *Sca1* 'downstream' der Terminatoren T1 und T2 linearisiert werden. Diese Hydrolyse produziert glatte DNA-Enden und außerdem bleiben die Terminatorstrukturen erhalten.

Für Retardierungsanalysen wurde der *rrnB* P1 durch *EcoRI* und *BamHI* Restriktion aus dem Plasmid pUC18-1 isoliert (Kapitel IV, 1.3) und anschließend mittels Auffüllreaktion durch das Klenow-Enzym radioaktiv markiert.

2.1.1.2 Der \square^{38} -abhängige Promotor *bolA*

Für die Untersuchungen an dem \square^{38} -spezifischen *bolA* Promotor musste dieser zunächst aus dem Genom von *E. coli* isoliert werden. Da für das *bolA*-Gen neben dem \square^{38} -abhängigen P1 Promotor ein weiterer, 'upstream' liegender konstitutiver \square^{70} -spezifischer Promotor P2 (an Position - 73 relativ zum P1 Start) postuliert wurde (Santos *et al.*, 1999), wurden folgende *bolA* Promotor-Klone konstruiert:

1. *bolA* Promotor mit 'upstream' Region
(Position - 233 bis + 97)
2. *bolA1*-Promotor ohne 'upstream' Region
(Position - 50 bis + 97).

Dies ermöglichte die quantitative und qualitative Analyse des postulierten *bolA* P2 Promotors. Gleichzeitig konnte der Einfluss regulativer Elemente im 'upstream' Bereich untersucht werden.

Die Isolation des *bolA* Promotors erfolgte via PCR (Kapitel IV, 2.2.4.6) mit den Primern # *bolA1*-up und # *bolA1*-down (Kapitel IV, 1.4.2). Für den *bolA*-Klon inklusive 'upstream' Bereich konnte das resultierende PCR-Fragment direkt in

die *Ec136II*-Schnittstelle des linearisierten Plasmids pUC18 ligiert werden (pUC18-*bolA*; Kapitel IV, 1.2.2), während das Promotorfragment für den *bolA1*-Promotor ohne 'upstream' Region zuvor mit *SspI* restringiert werden musste (pUC18-*bolA1*; Kapitel IV, 1.2.2). Zur Selektion und anschließenden Amplifikation der Plasmid-DNA wurden die Ligationsansätze in den *E. coli* Stamm XL-1 transformiert. Nach der Isolation der Plasmid-DNA wurde die korrekte Insertion der *bolA* Promotoren durch DNA-Sequenzierung (Kapitel IV, 2.2.4.7) verifiziert (Abb. 2).

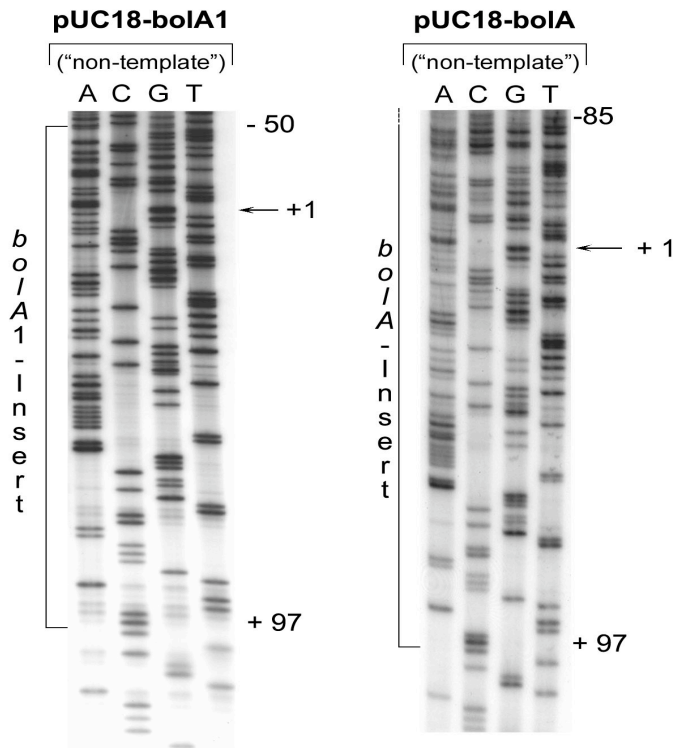


Abb. 2: Sequenzierung der Plasmide pUC18-*bolA1* und pUC18-*bolA*. Dargestellt ist jeweils die Sequenz des 'non-template' Strangs der klonierten Plasmide. Die Insertion der *bolA* Promotorfragmente erfolgte in die *Ec136II*-Schnittstelle des pUC18. Das *bolA1*-Insert ist vollständig sequenziert und reicht von Position + 97 bis - 50. Die Sequenz des *bolA*-Inserts (+ 97 bis - 233) ist bis Position - 85 abgebildet. Der Transkriptionsstart des *bolA1*-Promotors ist mit + 1 gekennzeichnet.

Für *in vitro* Transkriptionen mit Promotorfragmenten konnte aus dem Plasmid pUC18-*bolA* durch *HincII*-Restriktion das *bolA*-Fragment mit 'upstream' Region (*bolA*-Fragment) und durch *HincII*- und *SspI*-Hydrolyse das zweite *bolA*-Fragment ohne 'upstream' Bereich (*bolA1*-Fragment) gewonnen werden (Kapitel IV, 1.3).

Für Retardierungsanalysen wurde das *bolA*-Fragment durch Restriktionshydrolyse mit *XbaI* und *HincII* und das *bolA1*-Fragment durch *XbaI* und *SspI* Restriktion ebenfalls aus pUC18-*bolA* isoliert (Kapitel IV, 1.3). Anschließend wurde die *XbaI*-Schnittstelle mit Hilfe der Klenow-Reaktion radioaktiv markiert. Zur Analyse des Transkriptionssystems unter superhelikalen Bedingungen erfolgte eine erneute Klonierung der *bolA* Promotoren in ein Plasmid mit den *rrnB*-Terminatoren T1 und T2 (pCP1). Hierzu wurden die Plasmide pUC18-*bolA* und pUC18-*bolA1* mit *EcoRI* und *BsaAI* restringiert, die Promotor-Fragmente isoliert (Kapitel IV, 2.2.7.1) und gerichtet in den zuvor mit *Ec136* und *EcoRI* geöffneten Vektor pCP1 (Kapitel IV, 1.2.2) ligiert.

Die Selektion, Amplifikation und Sequenzüberprüfung der Terminator-Plasmide *pbolA-T1T2* und *pbolA1-T1T2* (Kapitel IV, 1.2.2) erfolgte, wie für die Plasmide *pUC18-bolA* und *pUC18-bolA1* beschrieben (Abb. 3).

Für einen direkten Vergleich der Transkriptionen unter superhelikalen und linearen Template-Bedingungen konnten die Plasmide *pbolA-T1T2* und *pbolA1-T1T2* 'downstream' der Terminatormotive mit dem Restriktionsenzym *Ehe1*, welches glatte DNA-Enden produziert, linearisiert werden.

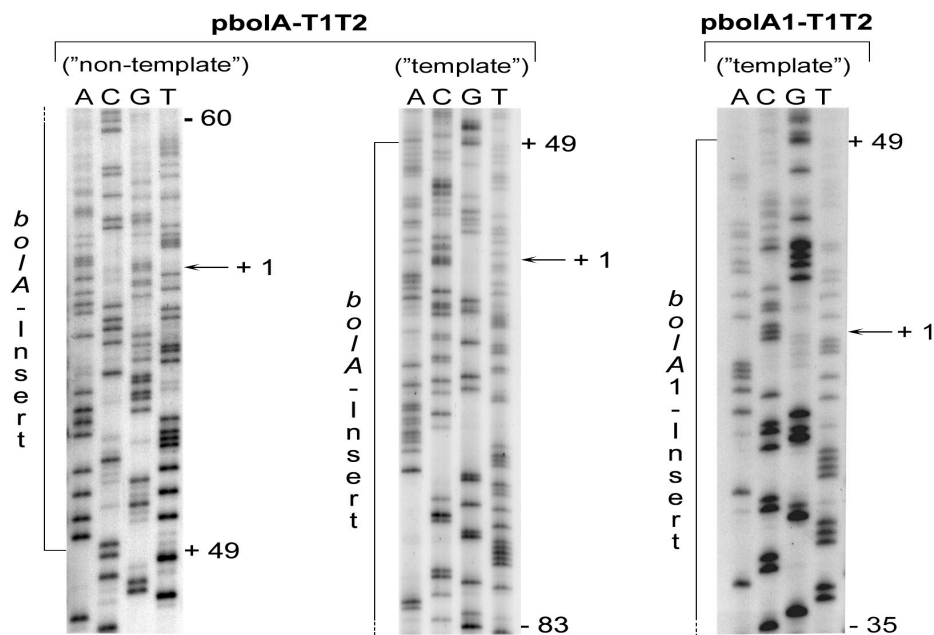


Abb. 3: Sequenzierung der Plasmide *pbolA1-T1T2* und *pbolA-T1T2*. Das vollständige *bolA1*-Insert reicht von Position + 48 bis - 50 und das entsprechende *bolA*-Insert ist ausschließlich im 'upstream' Bereich bis Position - 233 verlängert. Für das Plasmid *pbolA-T1T2* ist sowohl eine Sequenzierung des 'template' und des 'non template' Strangs abgebildet, während für das Plasmid *pbolA1-T1T2* die Sequenz des 'template' Strangs dargestellt ist. Der Transkriptionsstart des *bolA1*-Promotors ist mit + 1 gekennzeichnet.

2.1.2 DNA-abhängige RNA-Polymerasen

Die in dieser Arbeit untersuchten RNA-Polymerasen E70 und E38 wurden durch Reassemblierung des Core-Enzyms der RNAP von *E. coli* und des jeweiligen σ -Faktors erhalten (Kapitel IV; 2.3.4.2.1). Die benötigten Untereinheiten der RNAP wurden in Anlehnung an die in Kapitel IV Abschnitt 1.5 aufgeführten Vorschriften isoliert und lagen in hoher Reinheit vor.

Die Aktivität des rekonstituierten σ^{70} -Holoenzym wurde mit Hilfe des so genannten Chamberlin-Assays bestimmt (Chamberlin *et al.*, 1979). Die Aktivitätsmessung des rekonstituierten σ^{38} -Holoenzym erfolgte über vergleichende *in vitro* Transkriptionen im 'multiple round' Ansatz (Kapitel IV, 2.3.4.2.2). Dabei wurde erst bei einem molaren Core-Enzym : σ^{38} -Faktor-Verhältnis von 1:100 eine effiziente Transkription am *bolA1* Promotor detektiert, die noch bis zu einem Core : σ -Faktor-Verhältnis von 1:1000 gesteigert werden konnte. Im Vergleich dazu war die Transkription am *rrnB* P1 mit

rekonstituiertem σ^{70} -Holoenzym bei einem molaren Verhältnis von 1:30 schon nahezu in der Sättigung. Zunächst wurde eine präparationsbedingte, unvollständige Renaturierung des Proteins als Ursache für die verminderte Affinität des σ^{38} -Faktors angenommen, jedoch konnte durch weitere Renaturierungsversuche des Proteins, wie z.B. eine erneute Denaturierung mit 6 M Guanidiniumhydrochlorid und anschließend stufenweiser Renaturierung keine Aktivitätssteigerung erzielt werden.

Überdies war aus früheren direkten Bindungsstudien (Colland *et al.*, 2002) bereits bekannt, dass σ^{38} eine bis zu fünffach niedrigere Affinität als σ^{70} zum Core-Enzym der RNAP besitzt. Berücksichtigt man, dass die *in vitro* Transkription eine indirekte Aktivitätsmessung ist, bei der neben den Bindungsaffinitäten der σ -Faktoren zum Core-Enzym die jeweiligen Promotorstärken Einfluss nehmen, kann die ermittelte etwa 30fach geringe Aktivität des rekonstituierten σ^{38} -Holoenzym damit annähernd erklärt werden.

Außerdem wurden im Rahmen einer vergleichenden *in vitro* Transkription mit einer anderen σ^{38} -Präparation (freundliche Gabe von A. Kolb und Mitarbeitern) annähernd übereinstimmende Transkriptionseffizienzen ermittelt (Abb. 4).

Aus diesem Grund wurden für alle funktionellen und auch strukturellen Analysen folgende Core-Enzym : σ -Faktor-Verhältnisse eingesetzt:

$$\text{Core} : \sigma^{70} = 1 : 15$$

$$\text{Core} : \sigma^{38} = 1 : 500.$$

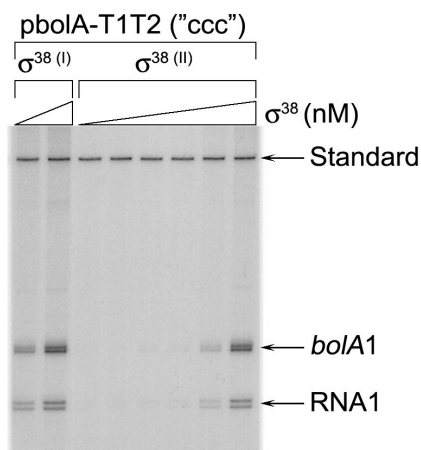


Abb. 4: Vergleichende *in vitro* Transkription mit zwei verschiedenen σ^{38} -Präparationen am *bolA1*-Promotor unter superhelikalen Bedingungen. Die Konzentration des Templates betrug in allen Ansätzen 1 nM, das Core-Enzym wurde konstant bei 3 nM gehalten. Bei der σ^{38} -Titration mit $\sigma^{38(I)}$ (eigene Präparation) wurden 300 und 900 nM eingesetzt. Mit $\sigma^{38(II)}$ (freundliche Gabe von A. Kolb und Mitarbeitern) wurde folgende Konzentrationssteigerung durchgeführt: 15, 30, 60, 90, 150 bis 300 nM. Der Auftragsstandard, das am Terminator T1 terminierte *bolA1*-Transkript und die RNA1 sind mit Pfeilen markiert.

2.1.3 Präparation eines internen Standards

Als Auftragsstandard für *in vitro* Transkriptionen wurde radioaktiv-markiertes *rrnB* P1 Fragment (Kapitel IV, 1.3) verwendet. Die Präparation dieses DNA-Standards erfolgte durch Restriktionshydrolyse des Plasmids pUC18-1 mit *EcoRI* und *BamHI* (Kapitel IV, 2.2.4.1) und radioaktiver Markierung mit Hilfe einer Klenow-Auffüllreaktion (Kapitel IV, 2.2.4.4).

2.2 Analyse von RNA-Polymerase-Promotorkomplexen homo- und heterologer Transkriptionssysteme

2.2.1 Retardierungsanalysen

Zunächst wurde mit Hilfe der Verzögerungsgelelektrophorese (Kapitel IV, 2.3.6) das direkte Bindungsverhalten der RNA-Polymerasen E70 und E38 an die Promotoren *rrnB* P1 und *bolA* untersucht. Besonderes Interesse galt dabei den Bindungsspezifitäten und Komplexstabilitäten im homologen und heterologen System. Zudem wurde die Abhängigkeit der Ausbildung stabiler Komplexe von der Startnukleotid-Konzentration sowie der Einfluss der Salzkonzentration und des Effektormoleküls ppGpp untersucht.

2.2.1.1 Promotorspezifität der RNA-Polymerasen E70 und E38

Aus zahlreichen vorangegangenen Transkriptionsstudien war eine *in vitro* Kreuzerkennung der RNA-Polymerasen E70 und E38 von *in vivo* ermittelten \square^{70} - bzw. \square^{38} -abhängigen Promotoren bekannt (Hengge-Aronis, 2003). Auch für die hier untersuchten Promotoren *rrnB* P1 und *bolA* konnten L. H. Nguyen und R. R. Burgess in ersten Analysen mittels *in vitro* Transkriptionen und Footprint-Analysen eine überlappende Promotorerkennung zeigen (Nguyen und Burgess, 1997). Aus diesem Grund erfolgte hier zunächst eine genauere Analyse der Bindungsaffinitäten beider RNA-Polymerasen zu den Promotoren *rrnB* P1 und *bolA* unter folgenden Gesichtspunkten:

1. Spezifität und Stabilität der Nukleoproteinkomplexe
2. Abhängigkeit der Komplexbildung von der Anwesenheit der ersten beiden Startnukleotide.

Zudem wurde eine mögliche, alleinige DNA-Bindung des Core-Enzyms und der Sigma-Faktoren untersucht. Dazu wurden 1,5 nM radioaktiv markiertes Promotorfragment, 6 nM rekonstituiertes Holoenzym bzw. Core-Enzym oder 60 nM \square^{70} bzw. 900 nM \square^{38} eingesetzt (Kapitel III, 2.3.6). Die Komplexbildung erfolgte jeweils in Ab- bzw. Anwesenheit von 65 μ M der ersten beiden Startnukleotide. Falls nicht anders vermerkt, wurde die Bindungsreaktion durch Zugabe der angegebenen Heparinkonzentration beendet. Die Abbildung 5 zeigt exemplarisch das Ergebnis eines solchen Bindungsassays.

Im Allgemeinen kann festgehalten werden, dass in keinem Fall eine vollständige Komplexbildung der DNA-Fragmente erfolgt, obwohl die RNA-Polymerasen im Überschuss vorliegen. Außerdem wird keine Bindung der Sigma-Faktoren ohne Assoziation an das Core-Enzym detektiert. Das Core-Enzym bildet je nur einen Promotorkomplex (siehe Core) aus, der nicht stabil gegenüber dem Kompetitor Heparin ist.

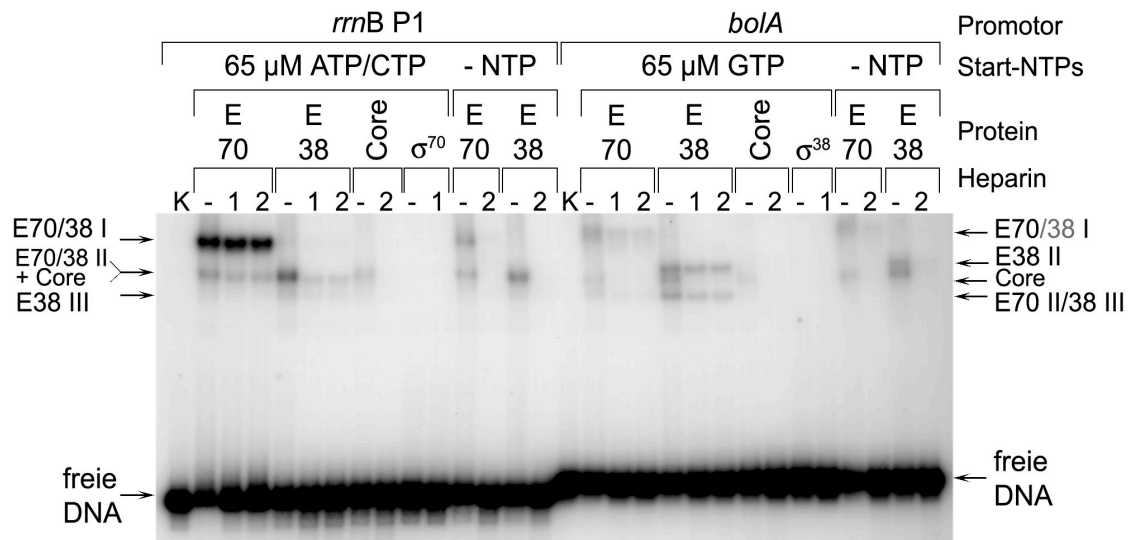


Abb. 5: DNA-Bindungsanalyse von RNA-Polymerasen und ihren Untereinheiten (σ -Faktoren und Core-Enzym) an die Promotoren *rrnB* P1 und *bolA* (inklusive 'upstream' Region). Gezeigt ist eine Autoradiographie eines Retardierungsgels (Kapitel IV, 2.3.6) von RNAP-Promotorkomplexen in Abhängigkeit von der Heparinkonzentration (1 = 100 ng/ μ l; 2 = 200 ng/ μ l) und der Anwesenheit der ersten beiden Startnukleotide ATP und CTP (*rrnB* P1) bzw. GTP (*bolA*). Es wurden jeweils 1,5 nM radioaktiv markiertes Promotorfragment, 6 nM rekonstituiertes Holoenzym bzw. Core-Enzym eingesetzt; die Sigma-Faktorkonzentration betrug 60 nM für σ^{70} und 900 nM für σ^{38} . Die Komplexe sind mit Pfeilen gekennzeichnet und wurden anhand ihrer Migration im PAA-Gel eingeteilt. Als Kontrolle (K) diente jeweils das freie, ungebundene Promotorfragment.

Das rekonstituierte σ^{70} -Holoenzym bildet mit dem P1-Fragment in Abwesenheit von Heparin unabhängig von der Nukleotidpräsenz drei Komplexe aus, einen stark retardierten (E70 I) und einen weiteren Komplex (E70 II), der von dem Core-Komplex überlagert wird. Die Core-Enzymbindung ist in diesem Fall durch eine unvollständige Assoziation des Sigma-Faktors an das Core-Enzym erklärbar. Bei den Komplexen E70 I und II könnte es sich um instabile offene und geschlossene Promotorkomplexe handeln. In Abwesenheit der Startnukleotide ist keiner der beschriebenen Komplexe heparinstabil. Die Anwesenheit der Startnukleotide verändert nicht das Migrationsverhalten, verleiht den Komplexen E70 I und II aber eine hohe Resistenz gegenüber Heparin und zudem nimmt die Konzentration des E70 I-Komplexes drastisch zu. Für die ribosomalen Promotoren ist diese niedrige Stabilität der offenen Komplexe in Abwesenheit von Startnukleotiden schon lange bekannt (Ohlsen und Gralla, 1992). Zudem ist beschrieben, dass erst durch die Inkorporation der ersten beiden Initiationsnukleotide heparinstabile Komplexe gebildet werden (Gourse, 1988), die mit Hilfe der Verzögerungselektrophorese detektiert werden können. Auch die Zunahme des E70 I-Komplexes in Anwesenheit von ATP und CTP ist konform mit Ergebnissen früherer Arbeiten, bei denen dieser als Initiationskomplex nachgewiesen werden konnte, während E70 II als Elongationskomplex identifiziert wurde (Jöres, 2001).

Das σ^{38} -Holoenzym geht mit dem *rrnB* P1 in Abwesenheit der Initiationsnukleotide ausschließlich den heparinsensitiven Core-Komplex ein, der zudem stärker vertreten ist als bei den Bindungsanalysen mit dem

rekonstituierten σ^{70} -Holoenzym. Dies unterstützt die zuvor ermittelte geringere Affinität des σ^{38} -Faktors zum Core-Enzym der RNAP (Kapitel III, 2.1.2).

Bei Anwesenheit der Startnukleotide bildet das σ^{38} -Holoenzym am *rrnB* P1 neben heparinstabilen Komplexen mit vergleichbarem Migrationsverhalten wie für das σ^{70} -Holoenzym beobachtet, einen weiteren Komplex (E38 III) mit größerer Gelmobilität. Auffällig ist jedoch, dass die Komplexintensitäten von E38 viel geringer sind und sich im Vergleich zu den E70 Komplexen invers verhalten, d.h. während für E70 der Komplex I am stärksten vertreten ist, ist es bei E38 der Komplex II. Auch durch eine zehnfache Erhöhung der ATP-Konzentration konnte nur eine minimale Zunahme des Komplexes I beobachtet werden (siehe Abb. 7), d.h. die geringe Bindeaffinität ist nicht durch einen höheren Nukleotidbedarf bei der Ausbildung stabiler Komplexe erklärbar.

Am *bolA* Promotor bildet das σ^{38} -Holoenzym in Anwesenheit des Initiationsnukleotids GTP ebenfalls zwei signifikante Holoenzym-Komplexe und einen heparinsensitiven Core-Enzym-Komplex. Diese Komplexe weisen jedoch alle eine größere Gelmobilität als die E70-Komplexe am *rrnB* P1 auf. Zusätzlich ist ein stark retardierter, sehr schwacher Komplex (E38 I) erkennbar.

Im Gegensatz zum homologen P1-Transkriptionssystem besitzen die Hauptkomplexe (E38 II und E38 III) des homologen *bolA* Systems vergleichbare Intensitäten. Außerdem führt eine zehnfache Erhöhung der Initiationsnukleotid-Konzentration nur zu einer minimalen Zunahme des unteren Komplexes (E38 III) (siehe Abb. 7) und nicht des oberen Komplexes, wie im Fall des homologen E70 Systems beobachtet.

Unter der Annahme, dass der *bolA* Promotor einem dem *rrnB* P1 vergleichbaren Initiationsmechanismus unterliegt, wird im homologen *bolA* System der untere Komplex (E38 III) dem ternären Initiationskomplex zugeordnet. Untermauert wird dies dadurch, dass in Abwesenheit von GTP dieser Komplex (E38 III) nicht detektierbar ist. Ausschließlich der Core-Komplex und der mittlere Komplex (E38 II) werden unter diesen Bedingungen gebildet. Beide sind, vergleichbar mit den Komplexen am *rrnB* P1, ohne Inkorporation der Startnukleotide nicht stabil gegenüber Heparin.

Mit dem σ^{70} -Holoenzym kann an dem *bolA* Promotor nur eine geringe Bindeaffinität beobachtet werden. Das Bandenmuster weicht von dem mit E38 erzielten ab und zwar ist neben dem Core-Enzym-Komplex und dem E38 II Komplex hauptsächlich der Komplex mit sehr geringer Gelmobilität detektierbar (E70 I, vgl. auch E38 I). Dieser ist auch in Abwesenheit des Startnukleotids minimal gegenüber dem Kompetitor Heparin resistent. Eine Erhöhung der Startnukleotid-Konzentration (Abb. 7) führt, wie auch für die Bindung von E38 beobachtet, zur Intensitätssteigerung des Komplexes III. Als Erklärungsansatz könnte folgendes Modell herangezogen werden: Wird davon ausgegangen, dass der Komplex III den Initiationskomplex am *bolA* Promotor widerspiegelt, so könnte es sich bei den stark retardierten Komplexen um RNAP-Promotor-Komplexe an dem postulierten, 'upstream' liegenden P2 Promotor handeln (Santos *et al.*, 1999), der hauptsächlich von dem σ^{70} -Holoenzym erkannt wird. Die geringe Gelmobilität könnte zum Einen durch eine stärkere protein-

induzierte Krümmung der DNA und zum Anderen durch eine gleichzeitige Bindung beider Promotoren erklärt werden.

Auch wenn die Bindungsassays keine genaue Charakterisierung und Identifikation der gebildeten Komplexe zulässt, können zusammenfassend folgende Aussagen festgehalten werden:

1. Bis auf eine Ausnahme (*boI*A-E70 I Komplexe) sind die Nukleoproteinkomplexe von E70 und E38 mit beiden Promotoren ausschließlich in Anwesenheit der Initiationsnukleotide heparinstabil, d.h. offene und geschlossene Promotorkomplexe weisen keine ausreichende Stabilität für eine Analyse durch Verzögerungsgelelektrophorese auf.
2. Eine Kreuzerkennung der wachstumsphasen-spezifischen Transkriptionssysteme ist möglich. Im homologen System jedoch erfolgt die Bindung jeweils mit höherer Effizienz.

2.2.1.2 Abhängigkeit der Promotorbindung von der Salzkonzentration

In einem nächsten Schritt wurde der Einfluss der Salzkonzentration auf die Spezifität und Stabilität der Promotorbindung der beiden RNA-Polymerasen untersucht. Dazu wurde ein DNA-Bindungsassay mit steigenden Kaliumglutamat-Konzentrationen (K_{Glu}-Konzentrationen) durchgeführt. Die Grundlage dieses Experiments bildeten *in vitro* Transkriptionsanalysen diverser stationäre Phase-abhängiger Promotoren, darunter auch zahlreiche Osmoschock-Gene, bei denen bei hohen K_{Glu}-Konzentrationen eine Aktivierung der \square^{38} -abhängigen und eine Inhibierung der \square^{70} -vermittelten Transkription gezeigt werden konnte (Ding *et al.*, 1995; Rajkumari *et al.*, 1996). Auch für den hier untersuchten *boI*A Promotor konnte diese K_{Glu}-vermittelte differentielle Regulation der Promotorspezifität zuvor in Filterbindungsanalysen und *in vitro* Transkriptionen gezeigt werden (Nguyen und Burgess, 1997).

Im folgenden Experiment (Abb. 6) war daher neben dem generellen Salzeffekt auf die Promotorspezifität vor allem auch die Auswirkung auf die einzelnen Nukleoproteinkomplexe der heterologen und homologen Transkriptionssysteme von besonderem Interesse.

Die Komplexbildung erfolgte jeweils mit 1,5 nM radioaktiv markiertem Promotorfragment und 6 nM aktivem E70 bzw. E38 in Anwesenheit von je 65 μ M der ersten beiden Startnukleotide. Die K_{Glu}-Konzentration wurde von 80 bis 200 mM variiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 200 ng/ μ l Heparin beendet.

Im Allgemeinen zeigt die K_{Glu}-Konzentration keinen Einfluss auf das Bandenmuster, d.h. es werden keine Nukleoproteinkomplexe mit abweichender Gelmobilität (vgl. Abb. 5) gebildet. Außerdem ist zu erkennen, dass in allen Fällen die Bindung der linearen Promotorfragmente bei 80 mM Kaliumglutamat maximal ist.

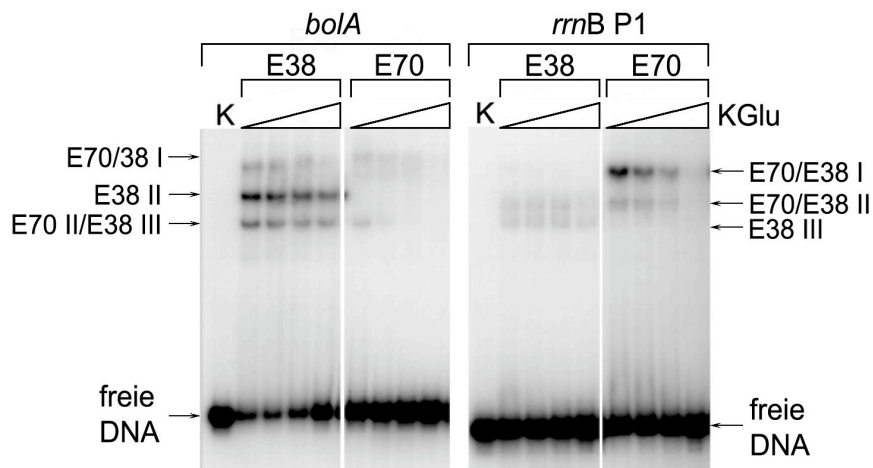


Abb. 6: DNA-Bindungsassay der heterologen und homologen Transkriptionssysteme in Abhängigkeit von der K Glu-Konzentration. Es wurden jeweils 1,5 nM radioaktiv markiertes Promotorfragment und 6 nM aktive RNAP (E70 und E38) eingesetzt. Für die K Glu-Titration wurden folgende Konzentrationen gewählt: 80, 120, 160 und 200 mM. Die Komplexe sind mit Pfeilen gekennzeichnet und wurden anhand ihrer Migration im PAA-Gel eingeteilt. Als Kontrolle (K) diente jeweils das freie, ungebundene Promotor-Fragment.

Für das \square^{38} -Holoenzym wird mit steigender K Glu-Konzentration eine stete Abnahme aller *bolA* Promotor-Komplexe beobachtet, dabei erreichen die Bandenintensitäten bei 200 mM Kaliumglutamat noch mindestens 50 % der Bandenstärke bei 80 mM.

Am *rrnB* P1 ist die \square^{38} -abhängige Komplexbildung des Komplexes E38 I schon bei 120 mM Kaliumglutamat vermindert, während die der Komplexe E38 II und III bis zu 160 mM nahezu konstant bleibt, dann wird vor allem die Ausbildung des Komplexes E38 II inhibiert.

Im Gegensatz dazu wird die *bolA*-Bindung des \square^{70} -Holoenzym schon bei 120 mM Kaliumglutamat signifikant inhibiert und bei 200 mM ist nahezu keine Komplexbildung mehr detektierbar.

Am *rrnB* P1 nimmt die Intensität des Komplexes E70 I mit steigender Salzkonzentration ab, während die Bildung des Komplexes E70 II erst ab 160 mM Kaliumglutamat vermindert ist. Auch hier ist bei 200 mM nur eine sehr schwache Promotorbindung nachweisbar.

Konform mit den oben erwähnten Arbeiten weist die Bindung von E38 an das *bolA* Promotorfragment die größte Salztoleranz auf. Zudem zeigen alle E38 Komplexe einen vergleichbaren Salzeffekt. Am *rrnB* P1 hingegen weisen die Komplexe unterschiedliche Salztoleranzen auf. Für die E38-Komplexe am *rrnB* P1 könnte folgende K Glu-Toleranzreihung vorgenommen werden: E38 III > E38 II > E38 I.

Die DNA-Bindung des \square^{70} -Holoenzym zeigt, wie erwartet, insgesamt eine höhere Sensitivität gegenüber Kaliumglutamat, aber auch hier besitzen die einzelnen Komplexe im homologen System eine vergleichbare und im heterologen System eine differentielle Stabilität.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass der hier untersuchte Salzeffekt sowohl vom jeweiligen Holoenzym als auch vom Promotor abhängig ist.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass Kaliumglutamat ein Spezifitätsfaktor der Komplexbildung ist.

Überdies ist die salzabhängige Komplexbildung der heterologen Transkriptionssysteme interessant, da sie auf unterschiedliche Spezifitäten bzw. Stabilitäten der Komplexe hinweist, die möglicherweise durch abweichende Protein-Nukleinsäure-Wechselwirkungen hervorgerufen oder in unterschiedlichen Initiationsmechanismen begründet sein könnten.

2.2.1.3 Einfluss von ppGpp auf die Promotorbindung im heterologen und homologen Transkriptionssystem

Für den *rrnB* P1, wie auch für die anderen ribosomalen P1 Promotoren, ist schon seit vielen Jahren eine durch ppGpp vermittelte negative Regulation der Transkriptionsinitiation beschrieben, die in zahlreichen Analysen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden konnte (Kapitel I, 1.5.1.1). Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten heterologen Transkriptionssysteme und auch der *bolA* Promotor sind in diesem Zusammenhang jedoch noch relativ unerforscht. Hier wurde zunächst der Einfluss von ppGpp auf die *in vitro* Promotorerkennung der beiden RNA-Polymerasen näher charakterisiert. Aufgrund des postulierten NTP-Kompetitionsmodells (Potrykus *et al.*, 2002; Jöres und Wagner, 2003) wurde dabei auch die Abhängigkeit des ppGpp-Effektes von der Startnukleotid-Konzentration untersucht. Dazu wurden jeweils 1,5 nM radioaktiv markiertes Promotorfragment und 6 nM aktives E70 bzw. E38 Holoenzym eingesetzt. Die Komplexbildung erfolgte in Anwesenheit von je 65 µM der ersten beiden Startnukleotide bzw. 650 µM des ersten und 65 µM des zweiten Nukleotids und wurde gegebenenfalls durch die Zugabe von 200 ng/µl Heparin beendet. Die ppGpp-Konzentration betrug 300 µM.

Wie die Autoradiographie eines solchen DNA-Bindungsassays (Abb. 7) zeigt, führt eine zehnfache Erhöhung der Konzentration des ersten Initiationsnukleotids in Anwesenheit von Heparin am *bolA* Promotor hauptsächlich zu einer Zunahme des unteren Komplexes und zwar unabhängig vom jeweiligen Holoenzym der RNAP (E70 II/ E38 III). Am *rrnB* P1 hingegen nimmt vornehmlich die Intensität des oberen Komplexes (E70/E38 I) zu (siehe auch Kapitel III, 2.2.1.1).

In Anwesenheit von ppGpp erfolgt am *bolA* Promotor im Fall des E70 eine Inhibierung des Komplexes E70 II. Auch bei der Bindung von E38 wird die Bildung dieses Komplexes inhibiert, jedoch ist eine Verschiebung des Komplexgleichgewichts zum Komplex E38 II erkennbar, d.h. letzterer Komplex wird unter dem Einfluss von ppGpp aktiviert. Dabei scheint der beschriebene ppGpp-Effekt unabhängig von der NTP-Konzentration zu sein.

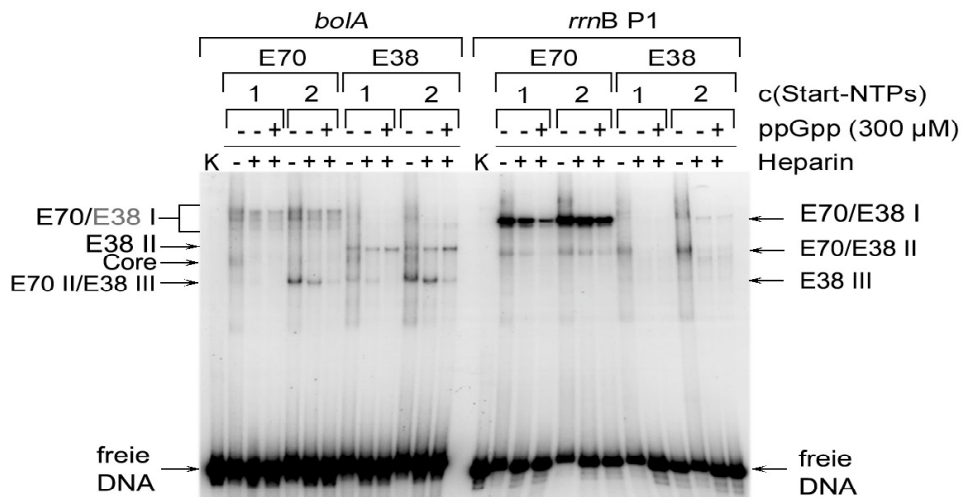


Abb. 7: Einfluss von ppGpp auf die Promotorbindung im hetero- und homologen Transkriptionssystem in Abhängigkeit von der Initiationsnukleotid-Konzentration. Es wurden jeweils 1,5 nM radioaktiv markiertes Promotorfragment und 6 nM aktive RNAP (E70 und E38) eingesetzt. Die Komplexbildung erfolgte in Anwesenheit von je 65 μ M der ersten beiden Startnukleotide (1) bzw. 650 μ M des ersten und 65 μ M des zweiten Nukleotids (2) und wurde gegebenenfalls durch die Zugabe von 200 ng/ μ l Heparin beendet. Die ppGpp-Konzentration betrug 300 μ M. Die Komplexe sind mit Pfeilen gekennzeichnet und wurden anhand ihrer Migration im PAA-Gel eingeteilt. Als Kontrolle (K) diente jeweils das freie, ungebundene Promotor-Fragment.

Die Bindung von E70 an den *rrnB* P1 Promotor zeigt sowohl eine starke Inhibierung des RP_{ini} (E70 I) als auch des RP_{elong} (E70 II), wobei der Grad der Inhibierung durch die Erhöhung der ATP Konzentration abnimmt. Dieses Ergebnis entspricht den Erwartungen, da in vorangegangenen DNA-Bindungsanalysen gezeigt werden konnte, dass ppGpp eine Verzögerung der Initiationskomplexbildung hervorruft, die jedoch mit steigender Startnukleotid-Konzentration abnimmt (Jöres, 2001; Jöres und Wagner, 2003).

Die ermittelte ppGpp-abhängige Komplexbildung von E38 mit dem ribosomalen Promotor weicht von der mit E70 erzielten ab. Hier erfolgt bei hoher Startnukleotid-Konzentration zwar ebenfalls eine minimale Inhibierung des Komplexes E38 I (RP_{ini}), der Komplex E38 II (RP_{elong}) wird jedoch schwach aktiviert.

Da die vier Transkriptionssysteme jeweils sowohl aktivierende als auch inhibierende ppGpp-Effekte zeigen, wird der detektierte Einfluss auf die Nukleoproteinkomplex-Bildung sowohl als Funktion des Promotors, als auch des jeweiligen Holoenzym angesehen. Daneben weisen die unterschiedlichen Abhängigkeit des ppGpp-Effektes von der Startnukleotid-Konzentration der homologen Transkriptionssysteme auf differenzielle Regulationsmechanismen hin.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass neben der KGlu-Konzentration (siehe 2.2.1.2) ebenfalls das Effektormolekül der Stringenten Kontrolle (ppGpp) als Modulator der Promotorspezifität der untersuchten RNA-Polymerasen angesehen werden kann.

2.2.2 Footprint-Analysen der homo- und heterologen Transkriptionssysteme

Zum besseren Verständnis der unter 2.2.1 detektierten RNAP-Promotor-Komplexe und des generellen Transkriptionsmechanismus des σ^{38} -abhängigen Holoenzym der RNAP sollte im Folgenden eine strukturelle Analyse der Nukleoproteinkomplexe in Abhängigkeit von der Startnukleotidkonzentration erfolgen.

2.2.2.1 Protektion der Promotoren durch Bindung der RNA-Polymerasen

Für die Analyse der Protektion der Promotor-DNA durch die RNA-Polymerasen wurde die enzymatische Modifikation mittels DNase I gewählt. Die DNase I besitzt eine Bindungsspezifität für die kleine Furche doppelsträngiger DNA. Sie spaltet ebenfalls einzelsträngige DNA, jedoch mit einer wesentlich geringeren Effizienz. Die Spaltung erfolgt durch Hydrolyse des DNA-Rückgrats, wobei 3'-OH- und 5'-Enden, die einen Phosphatrest tragen, gebildet werden (Lottspeich, 1998).

Methodisch erfolgte die Komplexbildung in Anlehnung an die *in vitro* Transkriptionsanalysen und Retardierungsassays, jedoch wurde zur Minimierung des Signalhintergrundes, hervorgerufen durch die Spaltung ungebundener DNA-Moleküle, ein Überschuss an RNAP eingesetzt. Dazu wurden 5 nM Plasmid-DNA mit 20 nM aktiver RNAP inkubiert. Vor der Modifikation mit DNase I wurden die Ansätze je mit 100 ng/ μ l Heparin versetzt. Danach erfolgte die Detektion der DNase I-Spaltstellen durch Primer-Extension mit dem Klenow-Enzym (Kapitel IV, 2.3.7.2 und 2.3.7.3). Als Primer für den 'template' Strang diente das Oligonukleotid # bola-1-up und für den 'non template' Strang # bola (Kapitel IV, 1.4.2).

Das homologe *rrnB* P1 System war durch Footprint-Analysen *in vitro* bereits gut analysiert (Gourse, 1988; Newlands *et al.*, 1991), während das *boIA* Transkriptionssystem hingegen nur wenig untersucht war (Nguyen und Burgess, 1997). Aus diesem Grund erfolgte an dieser Stelle eine Analyse des homologen σ^{38} -Systems und vergleichend eine Untersuchung der Bindung des σ^{38} -Holoenzym an den *rrnB* P1.

In Abbildung 8 sind exemplarisch die DNase-Footprints des 'template' und 'non template' Strangs des *boIA* Promotors mit E38 dargestellt. Um die Abhängigkeit der Komplexbildung von der Initiationsnukleotid-Konzentration, wie sie für den P1 Promotor bekannt ist, zu überprüfen und somit auch die Stabilitäten möglicher binärer, offener Komplexe zu analysieren, erfolgten die DNase-Modifikationsreaktionen bei verschiedenen NTP-Konzentrationen.

Der 'non template' Strang zeigt kein typisches DNase-Pattern, welches normalerweise durch eine signifikante Schwächung der Banden im Bereich der Proteinbindung gekennzeichnet ist. In diesem Fall ist solch eine protein-induzierte Bandenschwächung nur in dem Bereich von + 10 bis - 5, an den Positionen - 28, - 29 und - 36 und von - 46 bis etwa - 51 (relativ zum

Transkriptionsstart + 1) erkennbar. Trotzdem kann die Lokalisierung der RNA-Polymerasebindung erfolgen, da es durch die Bindung des Proteins auch zu einer Konformationsänderung kommen kann, die bestimmte DNA-Bereiche für die DNase zugänglicher machen, wodurch eine Verstärkung der Bandenintensitäten hervorgerufen wird. Solche sogenannten hyperreaktiven Stellen finden sich an den Positionen + 11, + 3, -10, - 21, - 32/33 und - 64. Bemerkenswert ist dabei, dass die Positionen - 21 und - 32/33 eine besonders auffällige Verstärkung erfahren. Aufgrund der erwähnten Veränderungen der DNase-Spaltung durch die Bindung des σ^{38} -Holoenzym an den Promotor kann folgender Bereich als E38-Footprint angesehen werden: + 18 bis - 65. Dieser Footprint ist auch in Abwesenheit von Startnukleotiden detektierbar, wird durch die Anwesenheit von 65 μM GTP signifikanter und erfährt nahezu keine Änderung durch eine zehnfache Erhöhung der GTP Konzentration. Dies bedeutet für den *bolA* Promotor im homologen System, dass er detektierbare binäre Komplexe bildet, die durch die Inkorporation von GTP stabilisiert werden, aber keine mit dieser Footprintmethode erkennbare Strukturänderung erfahren. Zudem scheint der *bolA* Promotor im Vergleich zum *rrnB* P1 (Gaal *et al.*, 1997) einen niedrigeren K_M -Wert für das erste Nukleotid zu besitzen.

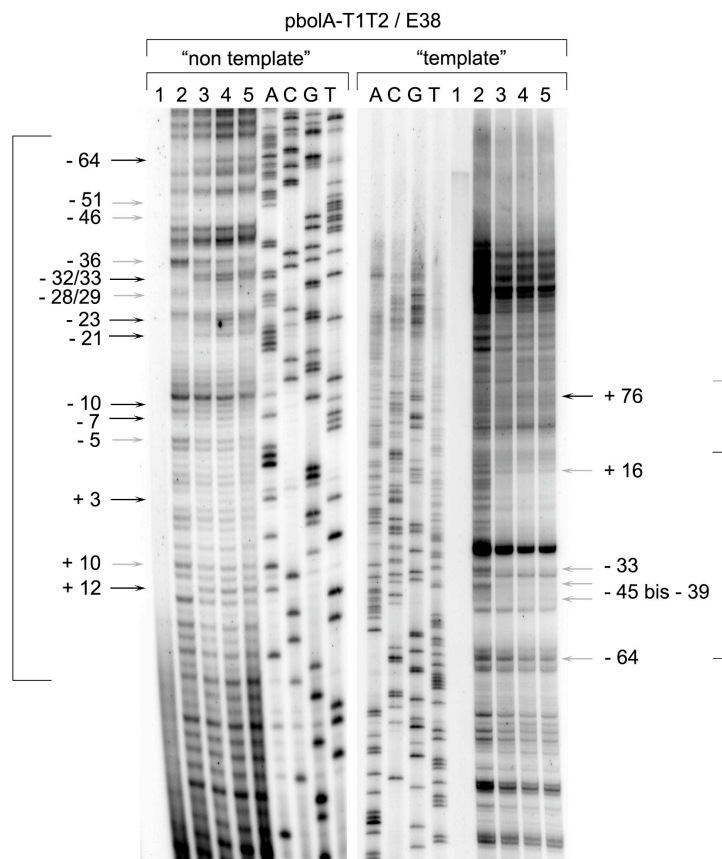


Abb. 8: DNase-Footprint am superhelikalen *bolA*1 Promotor mit dem σ^{38} -Holoenzym der RNAP. Die Visualisierung der DNase-Spaltstellen erfolgte mit Hilfe der Primer-Extension mit dem Klenow-Enzym. Die Nummerierung der Gelspuren erklärt sich wie folgt: (1) ungebundene DNA ohne DNase-Behandlung, (2) ungebundene DNA nach DNase-Behandlung, (3) Nukleoproteinkomplex mit E38, (4) Nukleoproteinkomplex mit E38 in Anwesenheit von 65 μM bzw. (5) 650 μM GTP. Verstärkte Modifikationsstellen sind mit schwarzen und verminderte mit grauen Pfeilen gekennzeichnet. Die Protektion ist je nach Stärke mit schwarzen bzw. grauen Klammern gekennzeichnet.

Im Gegensatz zum 'non template' Strang ist am 'template' Strang der Protektionsbereich deutlich erkennbar. Er erstreckt sich von etwa + 20 bis - 64 und weist an folgenden Positionen eine besonders starke Abnahme der Bandenintensitäten auf: - 45 bis - 39 und - 33. Eine Zunahme der Bandenstärke ist ausschließlich an der Position + 76 erkennbar. Da die angrenzende DNA jedoch keine proteininduzierte Änderung des DNase-Patterns aufweist, wird davon ausgegangen, dass diese Modifikation in einer DNase-Zugänglichkeitsänderung durch die Bindung der RNAP an den Core-Promotorbereich, welcher sich um das Enzym windet ('wrapping'), hervorgerufen wurde. Die Nukleotidabhängigkeit der Komplexbildung ist vergleichbar mit der am 'non template' Strang beobachteten Abhängigkeit. Der Vergleich der Protektionsbereiche am 'non template' und 'template' Strang zeigt, dass die 'upstream' und 'downstream' Grenzen der Protektion nahezu identisch sind.

Nach Nguyen und Burgess (1997) reicht der binäre E38-*bolA*-Komplex am 'non template' Strang von Position + 22 bis - 61 mit vier hypersensitiven Stellen an den Positionen - 35, - 34 und - 26, - 25. Am 'template' Strang konnte ein Footprint von + 20 bis - 56 mit einer hypersensitiven Position bei - 37 detektiert werden. D.h. die hier erzielten Footprints ähneln den von Nguyen und Burgess publizierten, sind jedoch nicht identisch. Diese Abweichungen könnten möglicherweise in der Templatestruktur begründet sein, da im Rahmen dieser Arbeit mit superhelikalen Templates gearbeitet wurde, während die frühere Analyse an linearen Promotor-Fragmenten erfolgte.

Ein direkter Vergleich mit der Bindung des \square^{70} -Holoenzym an den *bolA* Promotor kann an dieser Stelle nicht gezogen werden, da der E70-*bolA*-Footprint aufgrund geringer Bindungsaffinität nicht ausgewertet werden konnte. Laut Nguyen und Burgess (1997) sind die Footprints der beiden Holoenzyme jedoch annähernd identisch, außer das E70 am 'template' Strang einen bis zur Position + 30 verlängerten Footprint aufweist.

Am *rrnB* P1 Promotor ist mit dem \square^{38} -Holoenzym sowohl am 'template' als auch 'non template' Strang nur ein schwacher Footprint erkennbar (Abb. 9). Dieses Ergebnis ist konform mit der durch Retardierungsanalyse ermittelten Bindungsspezifität (2.2.1.1). Wie schon für die E70 Bindung an den *rrnB* P1 Promotor beschrieben (Gourse, 1988; Newlands *et al.*, 1991), kann auch mit dem \square^{38} -Holoenzym keine Komplexbildung in Abwesenheit von Startnukleotiden nachgewiesen werden (siehe jeweils Spuren 2).

In Anwesenheit von Startnukleotiden ist am 'non template' Strang des *rrnB* P1 eine Protektion von Position + 16 bis - 51 erkennbar. Zudem weist dieser Footprint eine Signalverstärkung an Position - 88 auf. Die verstärkte Zugänglichkeit dieser weit 'upstream' liegenden Position wird jedoch als sekundärer Effekt des 'wrapping' des Core-Promotors um die RNAP angesehen.

Am 'template' Strang kann für den ternären Initiationskomplex eine E38- Protektion der DNA im Bereich von + 22 bis - 60/61 detektiert werden. Ausschließlich an Position - 40 wird hier durch die Bindung der RNAP eine Signalverstärkung hervorgerufen. Zudem ist zu erkennen, dass die Bildung des Initiationskomplexes durch eine zehnfache Erhöhung der ATP-Konzentration

(650 μM) begünstigt wird. Für das homologe *rrnB* P1 System wurde in früheren Arbeiten eine etwas größere Protektion des 'non template' Strangs und für den 'template' Strang eine mit dem E38 vergleichbare Protektion detektiert. Neben der hyperreaktiven Stelle an Position - 40 ('template'), konnten bei der Bindung von E70 zwei weitere verstärkte Signale an - 39 und - 17 beobachtet werden (Gourse, 1988; Newlands *et al.*, 1991).

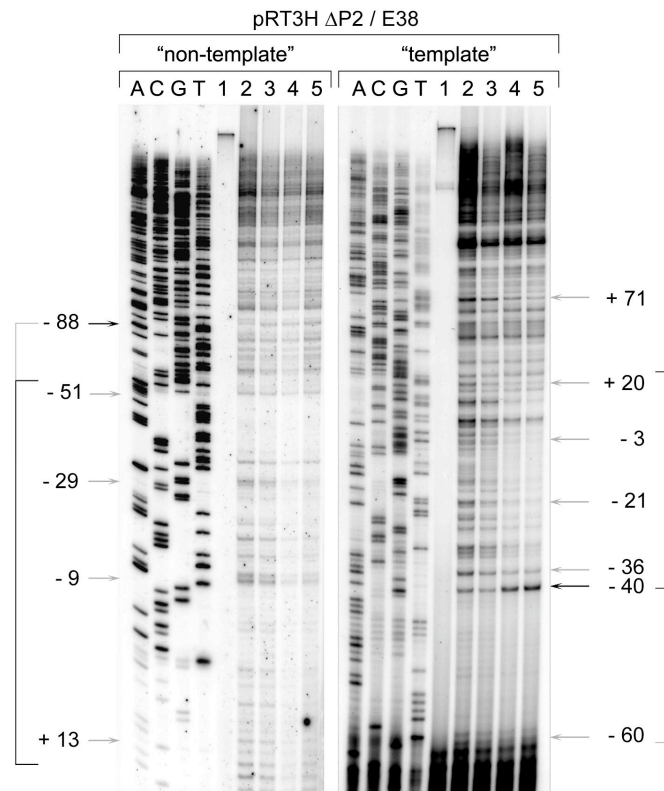


Abb. 9: DNase-Footprint des *rrnB* P1 mit dem \square^{38} -Holoenzym der RNAP. Die Visualisierung der DNase-Spaltstellen erfolgte mit Hilfe der Primer-Extension mit dem Klenow-Enzym. Als Primer für den 'template' Strang diente das Oligonukleotid # 220302 und für den 'non template' Strang # 81194 (Kapitel IV, 1.4.2). Zur Zuordnung der Modifikationsstellen erfolgte jeweils eine DNA-Sequenzierung (Kapitel IV, 1.4.2) mit diesen Oligonukleotiden. Die Komplexbildung und Nummerierung entspricht der in Abb. 8, wobei hier ATP (4 = 65 μM ; 5 = 650 μM) als erstes und CTP (4 und 5 = 65 μM) als zweites Nukleotid eingesetzt wurden. Verstärkte Signale sind mit schwarzen und Protektionen mit grauen Pfeilen gekennzeichnet. Die Protektion ist je nach Stärke mit schwarzen bzw. grauen Klammern gekennzeichnet.

Wie in Abbildung 10 zusammenfassend dargestellt, unterscheiden sich die DNase-geschützten Bereiche sowohl der heterologen als auch homologen Transkriptionssysteme im 'upstream' und auch 'downstream' Bereich jeweils nur um wenige Nukleotide. Dies entspricht den Erwartungen, da die beiden Holoenzyme der RNAP ausschließlich durch die Assoziation der verschiedenen Spezifitätsfaktoren divergieren. Aber gerade diese minimalen Abweichungen können näheren Einblick in die unterschiedliche Promotorbindung der beiden Holoenzyme gewähren.

Bei Vergleich der E70 bzw. E38 Bindung an den *rrnB* P1 fällt auf, dass der E38-Footprint am 'non template' Strang im 'upstream' Bereich zehn Nukleotide kürzer ist. Dies könnte auf eine vermindert spezifische Wechselwirkung der

RNAP mit dem UP-Element des *rrnB* P1 hinweisen, vor allem da das σ^{38} -Holoenzym am *bolA* Promotor eine DNA-Bindung bis Position - 64 zeigt. Die E70 Bindung an den *bolA* Promotor ist im Vergleich zum E38 Holoenzym im 'upstream' Bereich um sieben ('non template') bzw. acht ('template') Nukleotide verkürzt.

Diese jeweils in den heterologen Systemen detektierte veränderte Wechselwirkung mit dem 'upstream' Bereich könnte als Erklärungsansatz für die verminderte Spezifität bzw. Affinität gegenüber den homologen Systemen dienen.

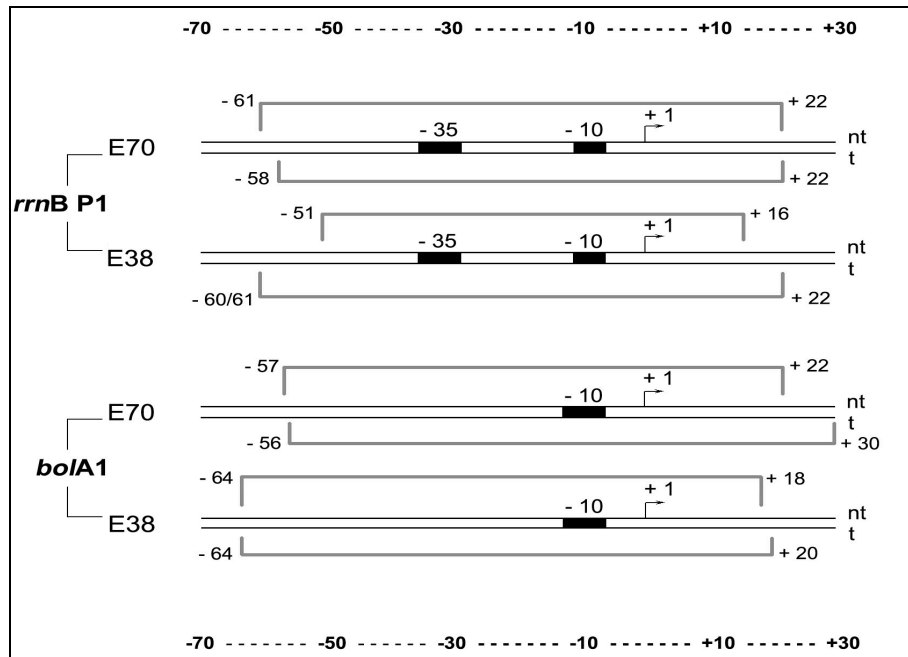


Abb. 10: Zusammenfassung der DNase-Footprints der homo- und heterologen Transkriptionssysteme. Die Promotoren *rrnB* P1 und *bolA1* sind schematisch dargestellt. Die - 35 Region, - 10 Region und der Transkriptionsstart + 1 sind gekennzeichnet. Die Protektionen des 'non template' (nt) und 'template' (t) Strangs sind mit Hilfe von Klammern dargestellt. Die Daten für die E38 Bindung an die beiden Promotoren entstammen dieser Arbeit, der E70-*rrnB* P1-Footprint bezieht sich auf die Arbeiten von Gourse (1988) und Newlands *et al.* (1991) und der E70-*bolA1*-Footprint wurde der Arbeit von Nguyen und Burgess (1997) entnommen.

Überdies zeigt das σ^{38} -Holoenzym im Vergleich zu E70 an beiden Promotoren einen um vier bzw. sechs Nukleotide kürzeren Footprint im 'downstream' Bereich des 'non template' Strangs. Dies weist auf eine dem σ^{38} -Holoenzym spezifische 'downstream' Wechselwirkung hin, die unabhängig vom jeweiligen Promotor sein könnte.

Auch lassen ähnliche DNA-Protektionen nicht den Schluss zu, dass die Strukturen der ternären Initiationskomplexe und im Fall des *bolA* Promotors auch der binären Komplexe im hetero- und homologen System identisch sind. Frühere Arbeiten am *rrnB* P1 (Gaal *et al.*, 2001), *bolA* (Nguyen und Burgess, 1997) und anderen σ^{38} -abhängigen Promotoren (Lacour *et al.*, 2002) weisen unter Verwendung anderer Footprintmethoden auf unterschiedliche Wechselwirkungen der beiden Holoenzyme mit den Nukleotiden des Core-Promotors und vor allem der - 10 Region hin.

Neben der Protektion des Promotors geben die Analysen weiteren Einblick in die Stabilitäten der verschiedenen Nukleoproteinkomplexe. So wird die Stabilität oder Halbwertszeit binärer offener Komplexe und der Nukleotidbedarf der ternären Initiationskomplexe hauptsächlich durch den jeweiligen Promotor bestimmt und ist nahezu unabhängig vom jeweiligen Holoenzym (E70 bzw. E38). Gerade unter dem Gesichtspunkt der Stringenten Kontrolle könnten diese Abweichungen des Initiationsmechanismus unterschiedliche ppGpp-Effekte hervorrufen.

2.2.2.2 Analyse der DNA-Isomerisierung im binären und ternären Initiationskomplex verschiedener Transkriptionssysteme

Im Folgenden sollte mit Hilfe von Kaliumpermanganat-Modifikationen eine nähere Charakterisierung des aufgeschmolzenen Promotorbereichs von offenen binären und ternären Initiationskomplexen an den Promotoren *rrnB* P1 und *bolA1* mit dem \square^{70} - bzw. \square^{38} -Holoenzym der RNA-Polymerase von *E. coli* erfolgen. Da diese Modifikation einzelstrangspezifisch ist, eignet sich diese Footprint-Methode zur Analyse partiell entwundener oder in Transkriptionskomplexen aufgeschmolzener DNA-Bereiche.

Im Allgemeinen erfolgten die Kaliumpermanganat-Footprints der Nukleoproteinkomplexe in Anlehnung an die *in vitro* Transkriptionsbedingungen, jedoch wurde aufgrund schwacher Signale jeweils zusätzlich eine Analyse mit RNAP im Überschuss durchgeführt. Für die Komplexbildung wurden jeweils 5 nM superhelikales Template und 3 bzw. 10 nM aktive RNAP eingesetzt. Zur Analyse spezifischer Komplexe wurde Heparin in einer Endkonzentration von 200 ng/ μ l zugesetzt. Die Modifikationsreaktion wurde mit 13,3 mM Kaliumpermanganat durchgeführt. Im Anschluss erfolgte der Nachweis der modifizierten Nukleotide mittels Primer-Extension mit dem Klenow-Enzym (Kapitel IV, 2.3.7.3).

Grundsätzlich sind die Kaliumpermanganat-Footprints unter *in vitro* Transkriptionsbedingungen sehr schwach, konnten aber durch eine Erhöhung der RNAP-Konzentration (10 nM) verstärkt werden (Abb. 11). Zudem erfahren die Bandenintensitäten wie erwartet eine Schwächung in Anwesenheit des Kompetitors Heparin. Im Folgenden erfolgt hauptsächlich eine Betrachtung dieser spezifischen und heparinstabilen Komplexe.

Das homologe *rrnB* P1 System ist durch Kaliumpermanganat-Analysen schon gut beschrieben. So konnte in früheren Arbeiten gezeigt werden, dass sich die Transkriptionsblasen des ternären Initiationskomplexes und des binären offenen Komplexes nur wenig unterscheiden. Eine signifikante Abweichung dieser Komplexe besteht jedoch in einer erhöhten Reaktivität an Position + 3 im ternären Komplex (Newlands *et al.*, 1991; Ohlsen und Gralla, 1992). Für den 'non template' Strang konnte ein aufgeschmolzener DNA-Bereich von + 3 bis - 12 ermittelt werden. Zudem wurde für den *rrnB* P1 Promotor ein charakteristisches Signal an der Position - 18 nachgewiesen, die in anderen E70-Promotor-Komplexen normalerweise doppelsträngig vorliegt (Kirkegaard *et*

al., 1983). Für den 'template' Strang wurde ein schwaches Signal an - 3 und weitere Signale in der - 10 Region von - 10 bis - 14 detektiert.

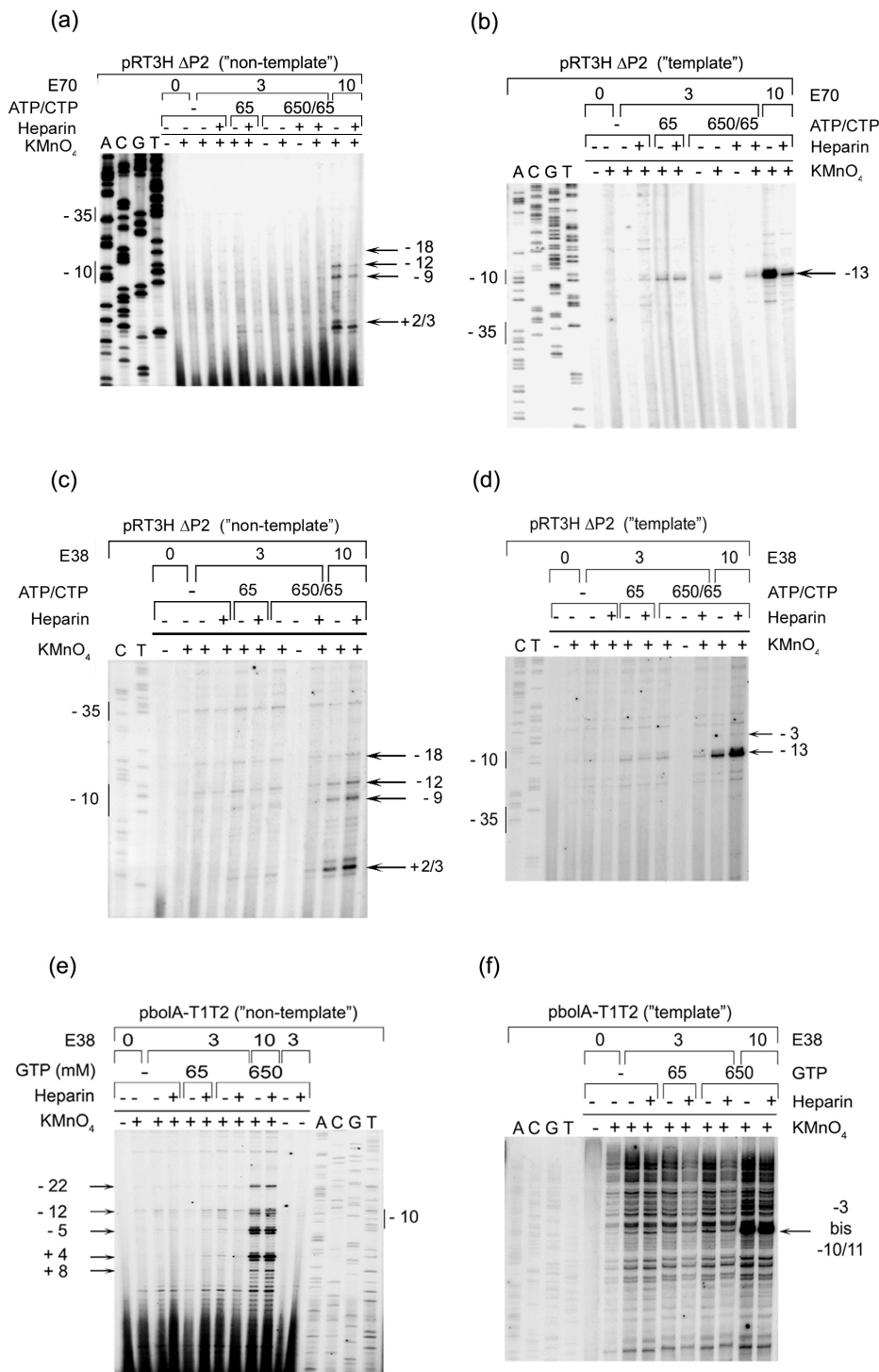


Abb. 11: Kaliumpermanganat-Footprints von binären und ternären Initiationskomplexen am *rrnB* P1 (a-d) und *bolA* Promotor (e und f) mit E70 (a und b) bzw. E38 (c-f). Als Kontrolle diente unkomplexierte Template-DNA (siehe jeweils Spuren mit 0 nM E38 bzw. E70; a-f). Die jeweiligen RNAP (nM) und Startnukleotid-Konzentrationen sind (μM) angegeben. Der Nachweis der modifizierten Nukleotide (siehe Pfeile) erfolgte mittels Primer-Extension mit der AMV Reversen Transkriptase und den Oligonukleotiden # 81194 ('non template', *rrnB* P1), # 220302 ('template', *rrnB* P1), # *bola* ('non template', *bolA*) und # *bola*- 1-up ('template', *bolA*)(Kapitel IV, 1.4.2). Zur Zuordnung der Modifikationsstellen erfolgte jeweils eine DNA-Sequenzierung mit diesen Oligonukleotiden.

Wie die Abbildung 11 (a/b) zeigt, sind die hier erzielten Ergebnisse für das homologe *rrnB* P1 System in guter Übereinstimmung mit den zuvor dargestellten Ergebnissen. In Abwesenheit von Startnukleotiden sind am 'non template' Strang (Abb. 11a) nur sehr schwache Signale an Position + 3, - 9, - 12 und - 18 erkennbar. Durch die Anwesenheit der Nukleotide ATP und CTP verstärken sich diese Signale, zudem sind weitere schwache Modifikationen an den Positionen - 1/2 und - 4/5 detektierbar. Der Footprint mit RNAP-Überschuss trägt zur Verdeutlichung der Hauptmodifikationsstellen an den Positionen + 2/3, - 9 und - 12 bei. Für den 'template' Strang (Abb. 11b) sind vergleichbare Nukleotidabhängigkeiten zu beobachten. Eine Modifikation ist hier hauptsächlich an der Position - 13 erkennbar. Neben diesem Hauptsignal können vor allem bei RNAP-Überschuss weitere schwache Modifikationen im Bereich der - 10 Region und an den Positionen + 10/11 detektiert werden.

Zieht man vergleichend den Kaliumpermanganat-Footprint des heterologen *rrnB* P1 Systems heran, so ist zu erkennen, dass die E70 und E38 Footprints nahezu identisch sind (Abb. 11c/d). Eine Ausnahme bildet die Position - 3 ('template'), die im E38 Komplex stärker modifiziert ist. Da diese Position annähernd in der Mitte der Transkriptionsblase liegt, wird davon ausgegangen, dass die unterschiedliche Modifikationseffizienz im Komplex mit den beiden Holoenzymen durch unterschiedliche Wechselwirkungen mit dem Core-Promotor oder abweichende DNA-Konformationen hervorgerufen wird.

Zudem zeigen die Footprints am *rrnB* P1 Promotor noch einmal für beide Holoenzyme die starke Abhängigkeit der Bildung stabiler, offener Initiationskomplexe von der Startnukleotid-Konzentration.

Auf die Betrachtung des Kaliumpermanganat-Footprints des heterologen *boIA* Systems muss hier, aufgrund geringer Signalstärke, verzichtet werden.

Der 'non template'-Footprint des homologen \square^{38} -abhängigen Systems (*boIA* + E38) weist starke einzelstrangspezifische Modifikationen an den Positionen - 5 und + 4 auf und weitere schwächere Signale an Position - 12, + 8 und - 22. Dies ist in guter Übereinstimmung mit dem Ergebnis einer früheren Arbeit (Nguyen und Burgess, 1997), in der für die binären und ternären Initiationskomplexe am linearen *boIA* Promotor eine Transkriptionsblase von Position - 11 bis + 10 ermittelt wurde. Zusätzlich konnten mit E70 weitere Signale um Position - 20 erfasst werden, die mit einem \square^{70} -spezifischen Transkriptionsstart in Zusammenhang gebracht werden (siehe auch Kapitel III, 2.2.2.3). Hier konnte letztere Modifikation auch mit E38 gemappt werden. Möglicherweise ist diese Zugänglichkeit in der Superhelikalität des Templates begründet. Zum Einen könnte sie die Bindung von E38 an diesen weiteren Transkriptionsstart ermöglichen und zum Anderen könnte allein die Torsionsspannung die Isomerisierung der DNA begünstigen.

Am 'template' Strang des *boIA* Promotors sind mit E38 hauptsächlich starke Kaliumpermanganat-Reaktivitäten im Bereich von etwa - 3 bis - 10/11 zu beobachten. Auffällig ist, dass die Initiationskomplexe des *boIA* Promotors im Vergleich zum DNase-Footprint eine stärkere Abhängigkeit von der Anwesenheit der Startnukleotide aufweisen, d.h. in Abwesenheit von GTP kann hier nur ein sehr schwacher Footprint detektiert werden. Da eine zehnfache

Erhöhung der Initiationsnukleotid-Konzentration von 65 auf 650 μM jedoch keinen Einfluss auf die Stärke des Footprints nimmt, wird davon ausgegangen, dass die scheinbare Instabilität der binären Komplexe methodisch bedingt ist, denn die Reaktionszeit nach Heparinzugabe ist bei der Kaliumpermanganat-Modifikation um ein Vierfaches länger als bei dem DNase-Footprint. Die zweiminütige Modifikationszeit könnte ein Vielfaches der Halbwertszeit dieser Komplexe bedeuten, vor allem wenn man bedenkt, dass für den binären E70-*rrnB* P1-Komplex je nach Salzgehalt und Templatekonformation eine Halbwertszeit von nur wenigen Sekunden bis maximal einer Minute beschrieben ist (Barker *et al.*, 2001).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Transkriptionsblasen der ternären Initiationskomplexe (Abb. 12) des homologen und auch heterologen *rrnB* P1 Systems bis auf eine Abweichung an Position - 3 ('template' Strang) vergleichbar sind. Der entwundene DNA-Bereich erstreckt sich in beiden Fällen von Position - 13 bis Position + 3, d.h. die Transkriptionsblase besitzt eine Größe von 16 Nukleotiden. Im homologen *bolA* System hingegen reicht die Transkriptionsblase von Position - 12 bis + 4 bzw. + 8 und ist somit nicht nur in Richtung 'downstream' verschoben, sondern auch um bis zu vier Nukleotide größer als am *rrnB* P1 Promotor. Neben diesen Hauptmodifikationsstellen zeigen alle Kaliumpermanganat-Footprints noch weitere Signale im 'downstream' und 'upstream' Bereich, die jedoch als partiell zugängliche Nukleotide angesehen werden und aus diesem Grund der eigentlichen Transkriptionsblase nicht zugeordnet werden.

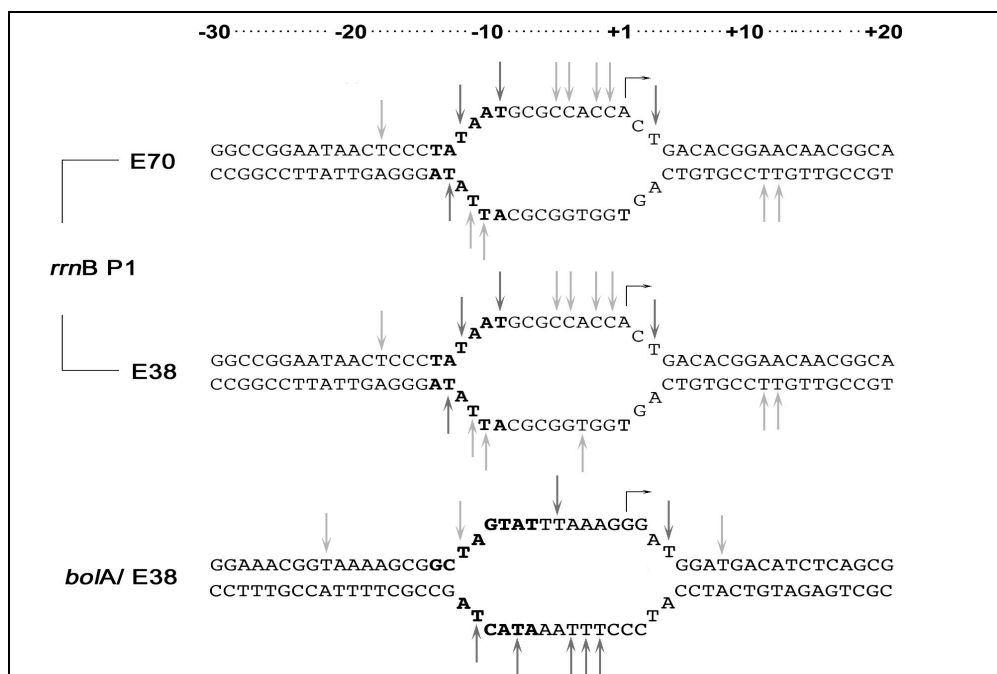


Abb. 12: Schematische Darstellung der Kaliumpermanganat-Footprints (Abb. 11) von Initiationskomplexen der homo- und heterologen Transkriptionssysteme. Dargestellt sind die Promotorsequenzen von Position - 30 bis + 20. Der Transkriptionsstart + 1 ist mit einem Eckpfeil gekennzeichnet. Die Modifikationen sind je nach Intensität mit grauen (stark) bzw. hellgrauen (schwach) Pfeilen markiert.

2.2.2.3 Bestimmung der Transkriptionsstartpunkte im hetero- und homologen Transkriptionssystem

Die nukleotidgenaue Analyse der Transkriptionsinitiation war vor allem von Interesse, da der Transkriptionsstart am ribosomalen P1 mit E38 nicht beschrieben war und eine genauere Analyse des postulierten *bolA* P2 Promotors erfolgen konnte.

Hierzu wurden zunächst *in vitro* Transkriptionen mit superhelikalen Templates, aber ohne radioaktiven Einbau eines Nukleotids durchgeführt. Zur Erhöhung der RNA-Ausbeute erfolgten diese Transkriptionen in einem fünfzehnfachen Ansatz und mit längerer Reaktionszeit. Dies war möglich, da zuvor gezeigt werden konnte, dass die Elongationszeit keinen Einfluss auf die Wahl der Startstellen nimmt. Nach Aufarbeitung der Transkriptionsansätze erfolgte zum Nachweis der Transkriptionsstarts eine Primer-Extension mit der AMV Reversen Transkriptase (Kapitel IV, 2.3.5.2 und 2.3.5.3).

Abbildung 13 zeigt exemplarisch das Ergebnis einer solchen Transkriptionsstartbestimmung. Für den *rrnB* P1 Promotor kann für beide Holoenzyme der erwartete Transkriptionsstart + 1 und ein weiterer Start an Position - 3, der auf eine 'slippage'-Reaktion der RNAP bei Anwesenheit der ersten beiden Startnukleotide und Limitierung des dritten Nukleotids zurückgeführt wird (Borukhov *et al.*, 1993), ermittelt werden.

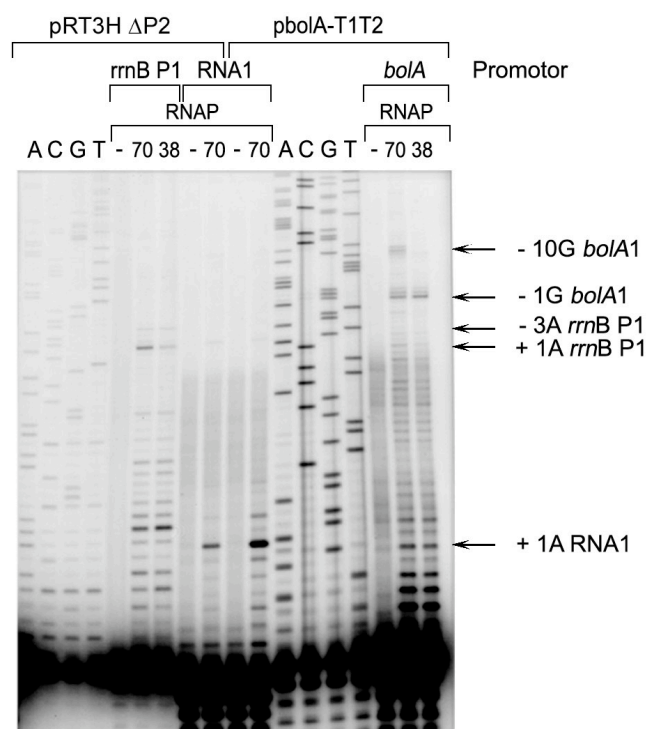


Abb. 13: Bestimmung der Transkriptionsstartstellen am *rrnB* P1, *bolA* und RNA1 Promotor mit den Holoenzymen E70 und E38. Die Detektion der Startstellen erfolgte an *in vitro* transkribierter RNA mit Hilfe der AMV Reversen Transkriptase. Als Primer für die *rrnB* P1 Produkte diente das Oligonukleotid # 81194, für *bolA* # *bolA* und für die RNA1 # RNA1 (Kapitel IV, 1.4.2). Zur Bandenzuordnung erfolgte je eine Sequenzierung der Plasmide pRT3H ΔP2 (# 81194) und pbolA-T1T2 (# *bolA*). Als Kontrollen dienten Transkriptionsansätze ohne RNAP. Die Transkriptionsstarts sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

Auch für die RNA1 ist neben dem postulierten + 1 Start ein schwacher Start an Position - 2 erkennbar, dem möglicherweise ebenfalls ein RNAP-'slippage' zugrunde liegt. Dieses Ergebnis erklärt die in *in vitro* Transkriptionen detektierte Doppelbande (Kapitel III, 2.1.2 und 2.3.1).

Am *boIA* Promotor kann mit beiden Holoenzymen ein von dem zuvor beschriebenen Transkriptionsstart + 1 abweichendes Signal beobachtet werden (Nguyen und Burgess, 1997; Gaal *et al.*, 2001). Laut Transkriptions-Startbestimmung erfolgen die Initiationen an den Position - 1 bis + 2 (je ein GTP), wobei das GTP an Position - 1 bevorzugt genutzt wird. Aufgrund der besseren Vergleichbarkeit mit früheren Analysen wird jedoch im Folgenden die alte Nomenklatur des *boIA* Promotors beibehalten.

Zusätzlich kann mit E70 eine weitere Startstelle an Position - 10 detektiert werden, der auch in *in vitro* Transkriptionen (Kapitel III, 2.3) ein entsprechendes Transkript zugeordnet werden kann (diese Arbeit; (Nguyen und Burgess, 1997). Eine Initiation an der Position - 73 des postulierten \square^{70} -abhängigen P2 Promotors (Santos *et al.*, 1999) kann hier nicht bestätigt werden. Jedoch weist die Transkriptionsstartbestimmung ein sehr schwaches Signal an Position - 84 (Daten nicht gezeigt) auf, dem sowohl mit E70 und schwach auch mit E38 ein *in vitro* Transkriptionsprodukt (Kapitel III, 2.3.1) zugeordnet werden kann. Da dieses Produkte nicht eindeutig dem postulierten P2 Promotor des *boIA* zugeordnet werden kann, und zudem die Signale unabhängig von der Nachweismethode sehr schwach sind, wird es im Folgenden nicht weiter berücksichtigt.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass sowohl im hetero- als auch homologen System eine spezifische Erkennung und Nutzung des Core-Promotors erfolgt.

2.3 In vitro Regulation im homologen und heterologen Transkriptionssystem

Von besonderem Interesse war hier, wie auf transkriptioneller Ebene ein Wechsel der Nutzung der Holoenzyme E70 und E38 beim Übergang in die stationäre Phase oder während diverser Stresssituationen erfolgen kann (Kapitel I, 1.5.2). Neben der generellen Transkriptionsspezifität der beiden Holoenzyme der RNAP stand die Modulation dieser Spezifität durch folgende potenzielle Transkriptionseffektoren im Mittelpunkt:

1. Superhelikalität
2. Salzkonzentration
3. ppGpp.

Da diese Parameter in der Zelle nicht unabhängig voneinander variieren, erfolgte jeweils auch eine Kombinationsanalyse der einzelnen Faktoren (siehe Kapitel III, 2.3.2 und 2.3.3).

2.3.1 Etablierung von *in vitro* Transkriptionen unter superhelikalen und linearen Template-Bedingungen

Wie unter 2.1.2 (Kapitel III) erläutert, erfolgten alle *in vitro* Transkriptionen mit rekonstituierten Holoenzymen der RNAP. Nachdem die optimalen Core-Enzym : σ -Faktor-Verhältnisse gefunden waren, sollten die Produktausbeuten der Transkriptionssysteme optimiert werden. Dies erfolgte zunächst anhand der Transkription mit superhelikalen Templates ('ccc') durch Variation der Inkubationszeiten und der RNAP : Template Verhältnisse. Zur Maximierung der RNA-Synthese wurde die RNAP anfangs im Überschuss eingesetzt. Erste *in vitro* Transkriptionsanalysen zeigten dabei eine unerwartete Abnahme der Produktstärke bei zunehmender Inkubationszeit. Durch Beobachtung der Templatetopologie während der Reaktion mittels Agarose-Gelelektrophorese konnte eine 'nicking'- bzw. Linearisierungsaktivität der rekonstituierten Holoenzyme als Ursache nachgewiesen werden. Da vor der NTP-Zugabe eine Vorinkubation von RNAP und Template zur Bildung binärer Nukleoprotein-komplexe erfolgte, lagen die Templates zum Zeitpunkt der eigentlichen Initiation größtenteils in linearer statt superhelikaler Form vor. Beachtet man, dass die Initiationsrate bei der Transkription mit linearen Templates gegenüber superhelikalen Templates vermindert ist, kann die beobachtete Linearisierung der DNA-Templates als Erklärung für die Produktabnahme mit zunehmender Inkubationszeit dienen. Aus diesem Grund erfolgte bei allen folgenden *in vitro* Transkriptionen keine Vorinkubation von Template und RNAP in Abwesenheit von Nukleotiden. Darüber hinaus wurde das RNAP : Template Verhältnis so gewählt, dass nach Ablauf der neu gewählten Reaktionszeit (8 min) noch mindestens 50 % des Templates superhelikal vorlag (Abb. 14a).

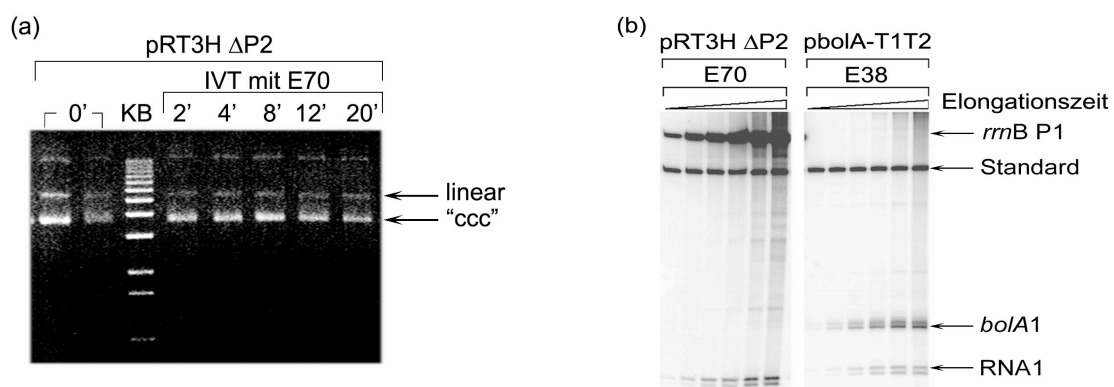


Abb. 14: Analyse der 'nicking'-Aktivität der RNAP von *E. coli*. (a) Analyse der Templatekonformation während der *in vitro* Transkription mit zunehmender Elongationszeit (2, 4, 8, 12 und 20 min). Das RNAP : Template Verhältnis betrug 3 nM : 5 nM. Als Kontrolle wurde pRT3H Δ P2 ohne Inkubation mit der RNAP aufgetragen (0'). Die Zuordnung der Banden erfolgte mit Hilfe eines DNA-Standards (KB-Marker). Die superhelikale und lineare Form des Plasmids sind mit Pfeilen gekennzeichnet. (b) *In vitro* Transkription mit superhelikalen Templates bei zunehmender Elongationszeit (2, 4, 8, 16, 32 und 64 min). Die Reaktionsbedingungen entsprechen Abb. 14a. Die jeweiligen Templates und Holoenzyme der RNAP sind angegeben. Die Transkripte und der Auftragsstandard sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

Als weitere Kontrolle wurde eine Produktanalyse über eine Elongationszeit von bis zu 64 Minuten durchgeführt (Abb. 14b). Diese zeigt in den ersten 12 bis 16 Minuten eine Produktzunahme und erfährt dann eine Sättigung.

Alle folgenden *in vitro* Transkriptionen unter superhelikalen Bedingungen erfolgten somit mit 3 nM aktiver RNAP und 5 nM superhelikalem Plasmid in Anwesenheit von je 65 μ M ATP, CTP und GTP, 5 μ M UTP und 133 nM μ Ci \square -³²P-UTP für acht Minuten bei 30 °C. Im Anschluss daran wurde die Reaktion durch hohe Nukleotidkonzentrationen und den Kompetitor Heparin für weitere zehn Minuten einem 'chase' unterzogen (Kapitel IV, 2.3.4.2.2).

Zur besseren Vergleichbarkeit der Transkriptionen mit linearen und superhelikalen Templates sollten die Reaktionsbedingungen möglichst übereinstimmen. Aufgrund der geringen Transkriptaubeute bei der Transkription unter linearen Bedingungen musste jedoch die Elongationszeit verdoppelt werden (16 min), die K_{Glu}-Konzentration (80 mM) herabgesetzt und der Anteil an \square -³²P-UTP erhöht werden (Kapitel IV, 2.3.4.2.3). Dabei erfolgte die Transkription mit linearisierten Plasmiden unter Erhalt der intrinsischen Terminatoren oder mit DNA-Promotorfragmenten, so dass 'run off'-Transkriptionsprodukte erhalten wurden.

2.3.2 Die generelle Promotorspezifität

Da zu Beginn dieser Arbeit nur wenig über die Transkription des *boIA* Promotors mit den hier untersuchten Holoenzymen der RNAP bekannt war und über die Transkription am \square ⁷⁰-abhängigen *rrnB* P1 durch E38 keine Angaben vorlagen, war zunächst die generelle Promotorspezifität und damit auch die Kreuzerkennung der heterologen Systeme von besonderem Interesse.

Die *in vitro* Transkriptionen erfolgten mit 3 nM aktivem rekonstituierten Holoenzym der RNAP und 5 nM linearem bzw. superhelikalem DNA-Template (Kapitel IV, 2.3.4.2.2). Die Reaktion mit linearen Promotor-Fragmenten erfolgte in Anwesenheit von 80 mM Kaliumglutamat, während unter superhelikalen Bedingungen 160 mM eingesetzt wurden (Kapitel IV, 2.3.4.2.2).

Wie die Abbildungen 15a und 17 (siehe jeweils die mit * gekennzeichneten Spuren) zeigen, erfolgt unter superhelikalen und auch linearen Templatebedingungen eine effektive *in vitro* Transkription im homo- und heterologen *rrnB* P1 System. Dabei ist zu beachten, dass die \square ³⁸-abhängige Transkription mindestens 50 % von der mit E70 erzielten erreicht. Zudem zeigt die Analyse unter superhelikalen Bedingungen eine signifikante Synthese der eigentlich ebenfalls \square ⁷⁰-abhängigen RNA1 mit dem \square ³⁸-assoziierten Holoenzym der RNAP (Abb. 15). Unter linearen Bedingungen ist die RNA1 Transkription unabhängig vom Holoenzym der RNAP stark herabgesetzt (Abb. 17). Dies zeigt, dass ihre Transkription in hohem Maße abhängig ist von der Superhelikalität des Templates.

Auch die Transkription des *boIA* Promotors weist eine starke Abhängigkeit von der Superhelikalität des Templates auf. Im homologen *boIA* System kann unter superhelikalen Bedingungen (Abb. 15) eine starke Transkription beobachtet werden, die unter linearen Templatebedingungen (Abb. 17) stark herabgesetzt

ist. Im Fall des heterologen *bolA* Systems ist sogar ausschließlich unter superhelikalen Templatebedingungen eine schwache Transkription zu beobachten. Wie zuvor mit Hilfe der Transkriptionsstartbestimmung ermittelt wurde (siehe Kapitel III, 2.2.2.3), erfolgt die mRNA Synthese von E70 sowohl vom Transkriptionsstart + 1 als auch von der Position - 10. Dieses Ergebnis ist in guter Übereinstimmung mit vorangegangenen Arbeiten (Nguyen und Burgess, 1997; Gaal *et al.*, 2001).

Vergleicht man die Transkriptionseffizienz der Holoenzyme mit der in Retardierungs- und Footprint-Analysen ermittelten Promotorspezifität, so sind sie bis auf eine Ausnahme konform. Nur das \square^{38} -assoziierte Holoenzym zeigt eine stärkere Transkription des *rnnB* P1 Promotors, als die schwache Komplexbildung vermuten lassen würde. Da es sich bei den Transkriptionsanalysen jedoch um 'multiple round' Reaktionen handelt, wobei jede Transkriptionseinheit mehrmals abgelesen wird, kann dies durch eine vermehrte Reinitiation erklärt werden.

Im Allgemeinen kann festgehalten werden, dass mit beiden Holoenzymen eine funktionelle und produktive *in vitro* Kreuzerkennung des *rnnB* P1, *bolA* und RNA1 Promotors erfolgt. Dabei ist die Spezifität im homologen Transkriptionssystem jeweils bedeutend größer als im Heterologen. Besonders im Fall des heterologen *bolA* Systems ist die Transkription sehr schwach. Dieses Resultat wirft unweigerlich folgende Frage auf: Welche weiteren Faktoren können die hohe *in vivo* Spezifität der jeweiligen Transkriptionssysteme vermitteln?

2.3.3 Der Salzeffekt, die Superhelikalität und das Effektormolekül ppGpp als mögliche Modulatoren der \square -Faktor-spezifischen Transkription

Hierzu wurde im Folgenden der Einfluss der KGlu-Konzentration und des Effektormoleküls ppGpp auf die Transkription in den heterologen und homologen Systemen *rnnB* P1 und *bolA* näher charakterisiert. Die Wahl der potenziellen Transkriptionsmodulatoren erfolgte in Anlehnung an vorangegangene Arbeiten, bei denen die KGlu-Konzentration als Spezifitätsfaktor der beiden Holoenzyme beschrieben wurde. Dabei zeigte das \square^{38} -assoziierte Holoenzym generell eine höhere Salztoleranz (Ding *et al.*, 1995; Nguyen und Burgess, 1997).

Zudem war der Einfluss von ppGpp auf die Promotorspezifität beider Holoenzyme von Interesse. Dabei war die Wirkung von ppGpp auf die Transkription im homologen *rnnB* P1 System bereits sehr gut untersucht (Kapitel I, 1.5.1), so dass dieses System als Referenz herangezogen werden konnte. Für die ppGpp-vermittelte Regulation der Transkription des *rnnB* P1 mit E38 lagen zu Beginn dieser Arbeit jedoch keine Ergebnisse vor. Auch für die Regulation des *bolA* Promotors war nur eine *in vivo* Analyse bekannt, die eine effektive Transkriptionsinduktion ausschließlich in Anwesenheit von ppGpp postuliert (Kvint *et al.*, 2000).

Zudem wurde jeweils der Einfluss der Templatetopologie berücksichtigt, da bekannt war, dass der ppGpp-vermittelte Effekt auf die *in vitro* Transkription

unter superhelikalen Bedingungen nicht oder nur bei hohen Salzkonzentrationen detektiert werden konnte (Ohlsen und Gralla, 1992; Barker *et al.*, 2001). Außerdem konnte für einige \square^{38} - und auch \square^{70} -abhängige Promotoren gezeigt werden, dass eine geringere Superhelikalität des Templates zur \square^{38} -abhängigen Transkription beitragen kann (Kusano *et al.*, 1996).

Für diese Analysen wurden 'multiple round' *in vitro* Transkriptionen unter linearen und superhelikalen Bedingungen mit Variation der K_{Glu}-Konzentration in An- bzw. Abwesenheit des Effektormoleküls ppGpp durchgeführt (Kapitel IV, 2.3.4.2).

2.3.3.1 Spezifitätsmodulation unter superhelikalen Template-Bedingungen

In Abbildung 15 ist exemplarisch eine Reaktion aller vier Transkriptionssysteme mit superhelikalen Templates in Abhängigkeit von der Salzkonzentration dargestellt. Die Reaktionen erfolgten mit 5 nM superhelikalem Template und 3 nM aktiver RNAP in An- bzw. Abwesenheit von 300 μ M ppGpp (Kapitel IV, 2.3.4.2.2). Für die K_{Glu}-Titration wurden Konzentrationen von 80 bis 400 mM gewählt.

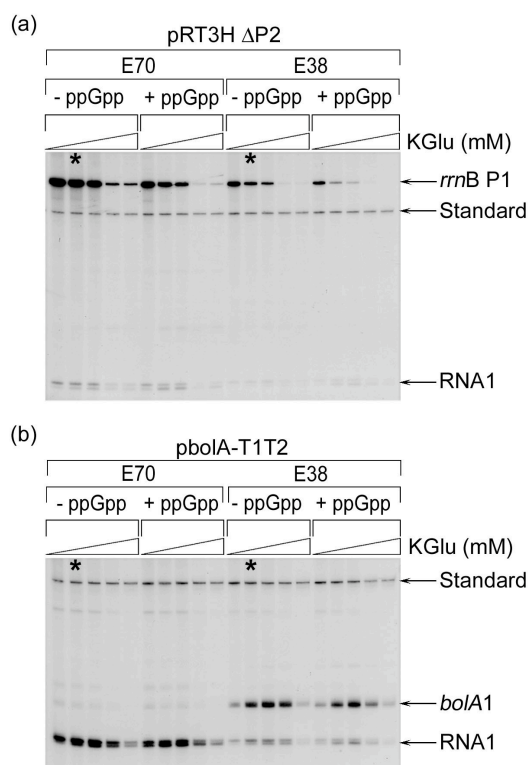


Abb. 15: *In vitro* Transkription ('ccc') im homo- und heterologen System in Abhängigkeit von der K_{Glu}-Konzentration und dem Effektormolekül ppGpp. (a) Transkription am *rrnB* P1 mit E70 und E38 und (b) Transkription am *bolA* mit beiden Holoenzymen. Die Reaktion erfolgte mit 5 nM superhelikalem Template und 3 nM aktiver RNAP in An- (+) bzw. Abwesenheit (-) von 300 μ M ppGpp. Für die K_{Glu}-Titration wurden folgende Konzentrationen gewählt: 80, 160, 240, 320 und 400 mM. Die an dem intrinsischen Terminator T1 beendeten Transkriptionsprodukte (*rrnB* P1, *bolA*1 und RNA1) und der Auftragsstandard sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Die mit \square gekennzeichneten Spuren wurden zur Analyse der generellen Promotorspezifität herangezogen (siehe Kapitel III, 2.3.2).

Zur genaueren Analyse der Spezifitätsmodulation erfolgte eine quantitative Auswertung dreier unabhängiger Experimente (Abb. 16), wobei die RNA1 jeweils als interner Standard der Transkription angesehen werden kann.

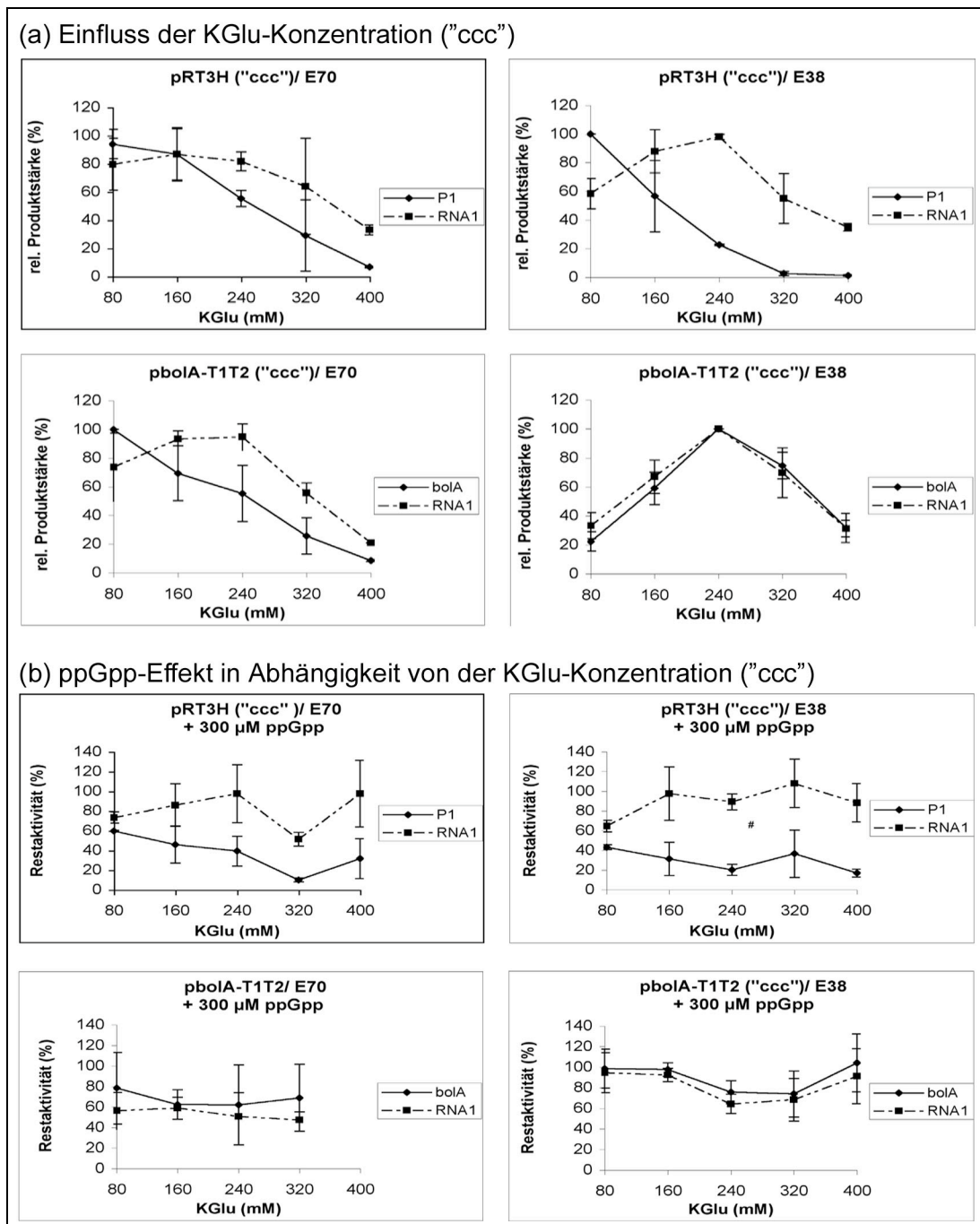


Abb. 16: Quantifizierung dreier unabhängiger *in vitro* Transkriptionen unter superhelikalen Template-Bedingungen ('ccc') in Abhängigkeit von der KGlu-Konzentration und in An- bzw. Abwesenheit von 300 μ M ppGpp. (a) Einfluss von KGlu auf die Transkription des *rrnB* P1 bzw. *boIA* und der RNA1 Promotors. Aufgetragen ist die relative Produktstärke (%) gegen die KGlu-Konzentration (mM). Die stärkste Produktbande innerhalb eines Transkriptionssystems (z.B. pRT3H □P2/E70) wurde dabei jeweils als 100 % gesetzt. (b) ppGpp-Effekt auf die Transkription des *rrnB* P1 bzw. *boIA* und der RNA1 in Abhängigkeit von der KGlu-Konzentration. Bei der Auswertung des ppGpp-Effektes wurde jeweils die Produktausbeute in Abwesenheit von ppGpp gleich 100 % gesetzt. Aufgetragen ist die resultierende Restaktivität (%) gegen die KGlu-Konzentration (mM).

Wie die quantitative Auswertung der Transkription des *rrnB* P1 Promotors in Abhängigkeit von der KGlu-Konzentration (Abb. 16a) zeigt, ist die Produktausbeute unabhängig vom Holoenzym bei 80 mM maximal. Bei der Transkription des *rrnB* P1 mit E70 bleibt sie bis 160 mM annähernd konstant,

nimmt dann langsam ab und zeigt bei 400 mM noch etwa 10 % der Ausgangsintensität. Im Gegensatz dazu wird die Transkription des *rrnB* P1 mit E38 mit steigender Salzkonzentration in hohem Maße inhibiert und ist ab 320 mM sogar kaum noch nachweisbar. Dies zeigt, dass das heterologe *rrnB* P1 Transkriptionssystem empfindlicher gegenüber hohen Salzkonzentrationen ist, als das homologe System.

Die Transkription des *boIA* Promotors (+ 1) mit E70 ist ebenfalls bei 80 mM Kaliumglutamat maximal und nimmt dann stetig ab. Abweichend von den anderen Transkriptionen ist die des homologen *boIA* Systems erst bei 240 mM maximal und beträgt bei 400 mM noch mindestens 30 % der maximalen Produktausbeute.

Die RNA1 zeigt eine höhere Salztoleranz als der *rrnB* P1 Promotor und erreicht wie der *boIA* Promotor bei der Transkription mit E38 je ein Maximum bei 240 mM Kaliumglutamat.

Der KGlu-Effekt unter superhelikalen Template-Bedingungen lässt sich wie folgt zusammenfassen:

1. Die Transkriptionen im heterologen System sind gegenüber Kaliumglutamat empfindlicher als im homologen System.
2. Die Salzempfindlichkeiten der Holoenzyme sind promotorspezifisch bzw. abhängig von der Stabilität der RNAP-Promotorkomplexe (siehe auch Retardierungen und Footprint-Analysen).
3. Die Transkription am *boIA* Promotor mit E38 hat ein höheres Salzoptimum als die anderen Transkriptionssysteme und ist toleranter gegenüber hohen Salzkonzentrationen.

Im Fall des *rrnB* P1 Promotors erfolgt unabhängig von der Salzkonzentration die Transkription mit E70 bevorzugt. Bei der *boIA* Transkription ist der KGlu-Einfluss auf die Spezifität der Holoenzyme allerdings noch stärker ausgeprägt. Je mehr die Transkription mit E38 aktiviert wird, desto stärker wird die schwache Transkription mit E70 inhibiert. So könnte eine hohe KGlu-Konzentration in der Zelle, wie z.B. bei osmotischem Stress (Richey *et al.*, 1987), die Transkription am *boIA* Promotor zugunsten E38 dirigieren.

Den Einfluss von ppGpp betreffend, zeigt die Transkription des *rrnB* P1 Promotors (Abb. 15a und 16b) mit beiden Holoenzymen der RNAP eine ppGpp-abhängige Inhibierung. Im Fall des mit \square^{70} -assoziiertem Holoenzym ist der ppGpp-Effekt bei niedrigen KGlu-Konzentrationen (80 mM) am schwächsten ausgeprägt und nimmt bis zu einer KGlu-Konzentration von 240 bzw. 320 mM zu. Die maximale Inhibierung beträgt 70- 90 %.

Die Transkription des *rrnB* P1 Promotors mit E38 zeigt eine vergleichbare Salzabhängigkeit, jedoch ist der Grad der Inhibierung bei niedrigen KGlu-Konzentrationen höher als bei der Transkription mit E70. Die maximale Inhibierung hingegen liegt bei 70- 83 %.

Für die RNA1 kann mit beiden Holoenzymen bei niedriger Salzkonzentration eine maximale Inhibierung von etwa 30 % beobachtet werden, ab 160 mM ist jedoch kein ppGpp-Effekt mehr nachweisbar. Die geringe Inhibierung der RNA1 Synthese wird als unspezifischer ppGpp-Effekt angesehen (Liang *et al.*, 1999).

Der Grund für die Abnahme der unspezifischen Inhibierung der RNA1 ab 160 mM wird eher einer RNAP-Umverteilung durch Zunahme der Inhibierung am *rrnB* P1 Promotor, als der KGlu-Konzentration zugeordnet. Diese Schlussfolgerung wird durch die Analysen mit dem Plasmid *pboIA-T1T2* (Abb. 15b und 16b) unterstützt. Hier zeigt die unspezifische Inhibierung der RNA1 Transkription keine signifikante Salzabhängigkeit und liegt nahezu konstant bei 20-30 %.

Für die Transkription am *boIA* Promotor in Abhängigkeit von der ppGpp-Konzentration (Abb. 15b und 16b) kann für beide Holoenzyme nur eine geringe Inhibierung festgestellt werden, die in beiden Fällen annähernd salzunabhängig ist. Bemerkenswert ist dabei, dass die Herabsetzung der Transkriptionseffizienz in Anwesenheit von ppGpp jeweils geringer als bei dem unspezifischen ppGpp-Effekt auf die Transkription der RNA1 ist. Im Fall der *boIA* Transkription mit E70 liegt die Inhibierung bei 22-38 % und für das E38 Holoenzym kann eine maximale Inhibierung von 24 % und sogar auch eine Aktivierung von 4 % ermittelt werden. Dieses Ergebnis wirft folgende Fragen auf:

Handelt es sich bei dem *boIA* um einen ppGpp-insensitiven Promotor? Oder deutet die geringere Inhibierung im Vergleich zum Referenzpromotor RNA1 auf eine Aktivierung des *boIA* Promotors in Abhängigkeit von ppGpp hin?

Eine genaue Einteilung in einen spezifischen bzw. unspezifischen ppGpp-Effekt auf die Transkription am *boIA* Promotor kann anhand dieses Experimentes nicht erfolgen. Jedoch weisen die Ergebnisse der Retardierungen in Anwesenheit von ppGpp auf einen spezifisch aktivierenden Effekt hin, der möglicherweise unter den hier gewählten Reaktionsbedingungen mit superhelikalen Templates nur schwach ausgeprägt ist. Da in früheren Arbeiten für den *rrnB* P1 Promotor bei der Transkription mit linearen Promotorfragmenten eine stärkere ppGpp-abhängige Inhibierung als bei der Reaktion unter superhelikalen Bedingungen detektiert werden konnte, könnte eine Transkriptionsanalyse des *boIA* Promotors unter linearen Bedingungen näheren Einblick in die Spezifität des ppGpp-Effektes gewähren.

2.3.3.2 Spezifitätsanalyse mit linearen Templates

In Abbildung 17 ist exemplarisch eine *in vitro* Transkription unter linearen Templatebedingungen in Abhängigkeit von der Salzkonzentration und in An- bzw. Abwesenheit von ppGpp dargestellt. Die Reaktionen erfolgten mit 5 nM linearisiertem Plasmid (*pRT3H* □P2 bzw. *pboIA-T1T2*) unter Erhalt der Terminatorstrukturen T1T2 bzw. mit dem Promotor-Fragment *boIA* und 3 nM aktiver RNAP in An- bzw. Abwesenheit von 300 µM ppGpp (Kapitel IV, 2.3.4.2.3). Die KGlu-Konzentrationen wurden von 0 bis 240 mM variiert.

Aufgrund der geringen Transkriptionseffizienz des E70 am linearen *boIA* Promotor wird im Folgenden auf diesen Datensatz verzichtet.

Im Allgemeinen ist die Transkription mit linearen Promotor-Templates sowohl am *rrnB* P1 als auch am *bolA* Promotor schwächer als unter superhelikalen Bedingungen (siehe auch Kapitel III, 2.3.2).

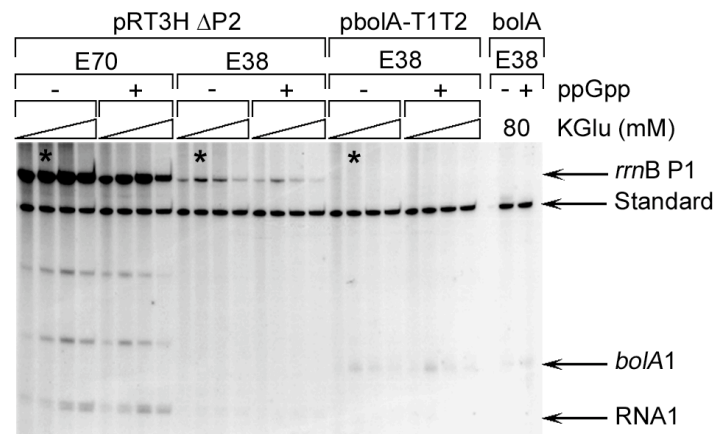


Abb. 17: *In vitro* Transkription mit linearen Templates im homo- und heterologen System in Abhängigkeit von der KGlut-Konzentration und dem Effektormolekül ppGpp. Die Reaktion erfolgte mit 5 nM linearem Template und 3 nM aktiver RNAP in An- (+) bzw. Abwesenheit (-) von 300 μ M ppGpp. Für die KGlut-Titration wurden folgende Konzentrationen gewählt: 0, 80, 160, 240 mM. Die Transkriptionsprodukte und der Auftragsstandard sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Die mit * gekennzeichneten Spuren wurden zur Analyse der generellen Promotorspezifität herangezogen (siehe Kapitel III, 2.3.2).

Wie die quantitative Auswertung des Salzeffektes (Abb. 18 a) zeigt, ist die Transkription im homologen *rrnB* P1 System bis zu einer KGlut-Konzentration von 240 mM nahezu konstant, während im heterologen System ein Transkriptionsmaximum bei 80 mM erreicht und bei 240 mM nur noch annähernd 40 % dieser Produktstärke erzielt wird. Vergleicht man dieses Ergebnis mit dem unter superhelikalen Bedingungen erzielten, so zeigen die Transkriptionen im homo- und heterologen *rrnB* P1 System unabhängig von der Templatetopologie in dem gemessenen Bereich bis 240 mM nahezu identische KGlut-Abhängigkeiten.

Anders ist dies im homologen *bolA* System. Hier erreicht die Transkription mit superhelikalen Templates erst bei 240 mM Kaliumglutamat ihr Maximum und ist auch bei hohen Salzkonzentrationen noch produktiv, wogegen sie unter linearen Template-Bedingungen bei 80 mM maximal ist und bei 240 mM nur noch 30 % dieser Transkriptionseffizienz aufweist.

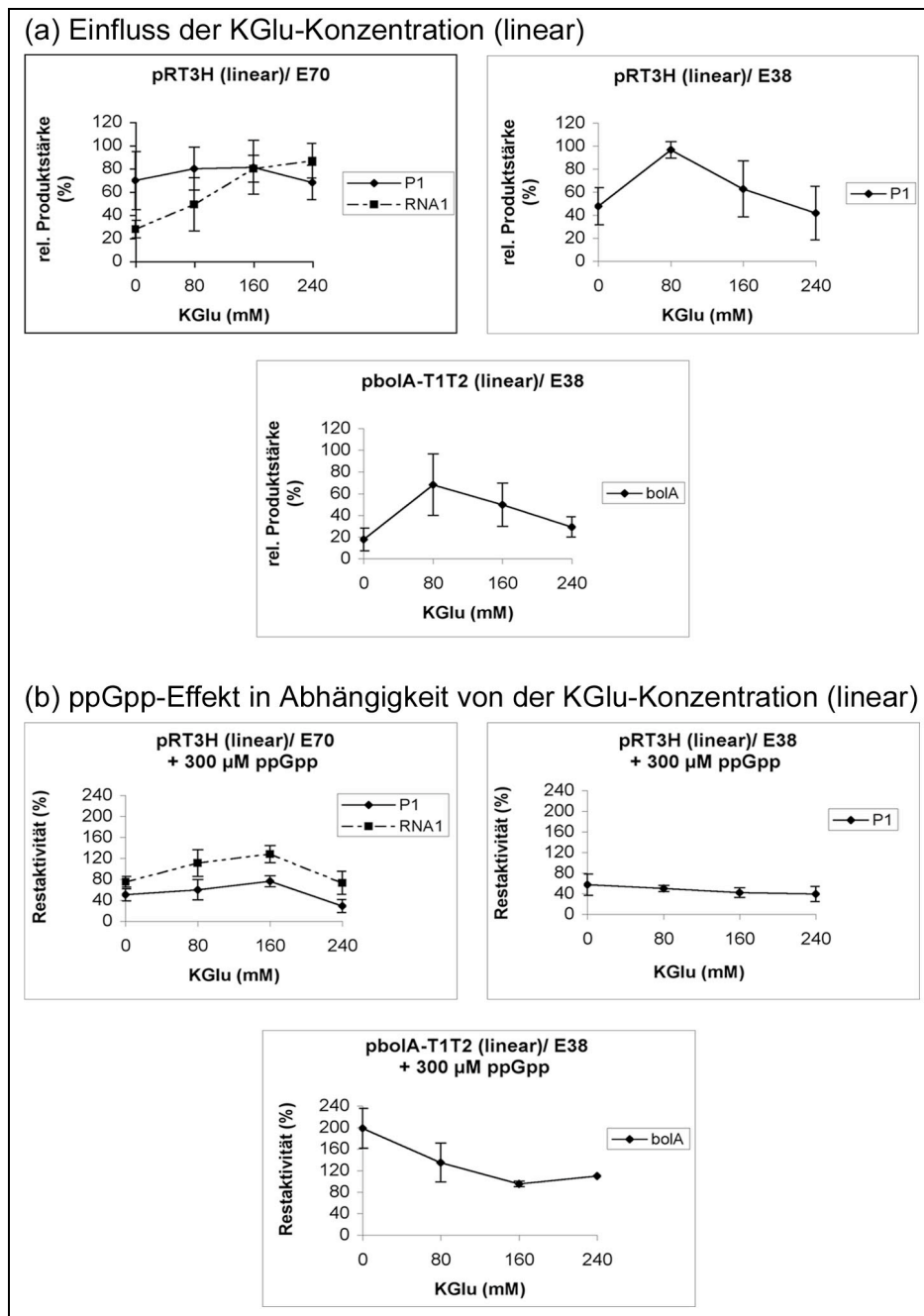


Abb. 18: Quantitative Auswertung von vier unabhängigen *in vitro* Transkriptionen unter linearen Template-Bedingungen in Abhängigkeit von der KGlu-Konzentration und in An- bzw. Abwesenheit von 300 μM ppGpp. (a) Einfluss von KGlu auf die Transkription des *rrnB* P1 bzw. *bolA* Promotors und der RNA1. Aufgetragen ist die relative Produktstärke (%) gegen die KGlu-Konzentration (mM). Die stärkste Produktbande innerhalb eines Transkriptionssystems (z.B. pRT3H □P2 / E70) wurde dabei jeweils als 100 % gesetzt. (b) ppGpp-Effekt auf die Transkription des *rrnB* P1 bzw. *bolA* Promotors und der RNA1 in Abhängigkeit von der KGlu-Konzentration. Bei der Auswertung des ppGpp-Effektes wurde jeweils die Produktausbeute in Abwesenheit des Effektormoleküls gleich 100 % gesetzt. Aufgetragen ist die resultierende Restaktivität (%) gegen die KGlu-Konzentration (mM).

Zusammenfassend lässt sich für die vergleichende Transkriptionsanalyse mit linearen und superhelikalen Templates in Abhängigkeit von der Salzkonzentration festhalten, dass das jeweilige KGlu-Optimum nicht ausschließlich von der Promotorsequenz abhängig ist, sondern ebenfalls von der DNA-Topologie und damit von der Konformation der RNAP-Promotor-Komplexe.

Dies wird in Zusammenhang gebracht mit der Stabilität der Initiationskomplexe und kann am Beispiel der Transkription des *boIA* Promotors mit E38 verdeutlicht werden. Hier besteht eine starke Korrelation zwischen der Effizienz und der Salztoleranz der Transkription. Unter superhelikalen Bedingungen, wenn eine vermehrte Transkriptionsinitiation erfolgt, wirkt eine hohe KGlu-Konzentration aktivierend, während unter linearen Bedingungen, wenn die Produktivität des Systems stark herabgesetzt ist, hohe KGlu-Konzentrationen eher inhibierend wirken.

Für die Transkription des homologen *rrnB* P1 Systems unter linearen Bedingungen konnte eine ppGpp-abhängige Inhibierung ermittelt werden (Abb. 18 b), die annähernd vergleichbar ist mit der unter superhelikalen Template-Bedingungen detektierten. Die maximale Inhibierung beträgt in diesem Fall jedoch nur 71 % statt 80- 90 % (siehe auch Abb. 16 b). Ähnliches gilt ebenfalls für das heterologe *rrnB* P1 System. Wie unter superhelikalen Bedingungen nimmt der inhibierende Einfluss von ppGpp mit steigender KGlu-Konzentration zu, erreicht allerdings maximal 61 % statt 70-83 %.

Die Transkription des *boIA* Promotors mit E38 zeigt in Abwesenheit von KGlu eine ppGpp-abhängige Aktivierung von 98 %, die mit steigender Salzkonzentration abnimmt und ab 160 mM keinen ppGpp-Effekt mehr aufweist. Im Gegensatz dazu wird die Transkription unter superhelikalen Bedingungen je nach KGlu-Konzentration im Mittel um 0- 20 % inhibiert (siehe Abb. 16). Dies zeigt, dass nicht nur die generelle Transkription des *boIA* Promotors von der Templatetopologie und der Salzkonzentration abhängig ist, sondern auch der ppGpp-Effekt in Abhängigkeit von diesen Faktoren variiert.

Wie kann die ermittelte Aktivierung des *boIA* Promotors bei niedrigen Salzkonzentrationen und linearen Templates erklärt werden? Ein Ansatzpunkt wäre die methodisch bedingte Zunahme von Ladungsträgern in Anwesenheit von ppGpp, denn dieses enthält präparationsbedingt eine geringe Konzentration an Lithiumchlorid-Ionen. Die maximale LiCl-Konzentration im Ansatz beträgt allerdings nur 3 mM und ist somit als Erklärungsmodell für die Aktivierung bei 80 mM KGlu nicht hinreichend.

Aus diesem Grund sollte im Folgenden eine nähere Charakterisierung der Spezifität des ppGpp-Effektes erfolgen.

2.3.3.3 Die ppGpp-Wirkkonzentration

Um die Sensitivität der einzelnen Transkriptionssysteme gegenüber ppGpp zu untersuchen, wurden 'multiple round' *in vitro* Transkriptionen unter superhelikalen und linearen Bedingungen durchgeführt. Dabei wurde die ppGpp-Konzentration von 0 bis 500 μ M variiert.

2.3.3.3.1 ppGpp-Titration mit superhelikalen Templates

Die Transkription unter superhelikalen Bedingungen erfolgte mit 5 nM 'ccc'-Template und 3 nM aktiver RNAP bei 160 mM Kaliumglutamat (Kapitel IV, 2.3.4.2.2). Die Abbildung 20 zeigt eine repräsentative ppGpp-Titration mit den homo- und heterologen *rrnB* P1, *bolA* und *bolA1* Systemen.

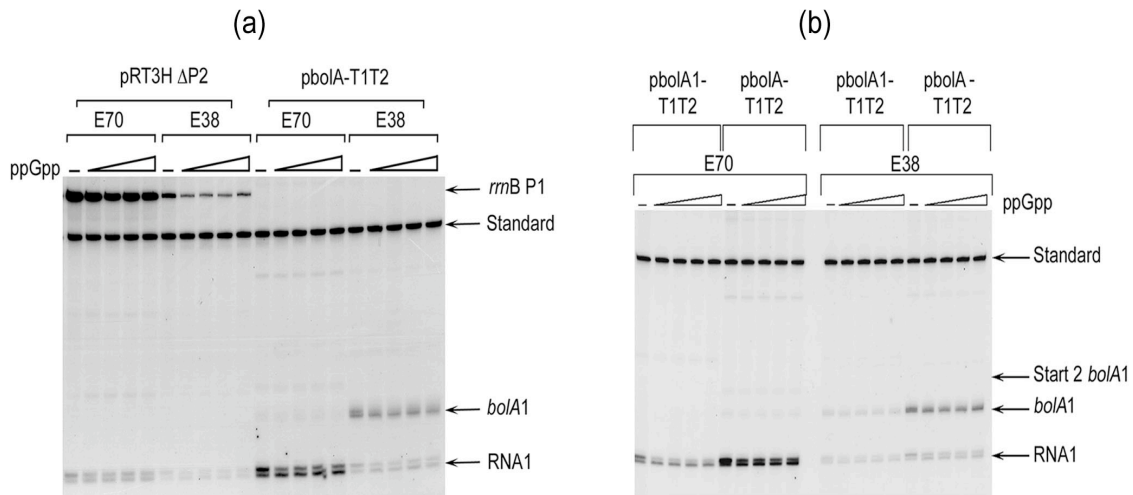


Abb. 19: *In vitro* Transkription ('ccc') im homo- und heterologen System in Abhängigkeit von der ppGpp-Konzentration. (a) Transkription am *rrnB* P1 und *bolA* mit E70 und E38. (b) Transkription am *bolA* und *bolA1* Promotor mit beiden Holoenzymen. Die Reaktion erfolgte mit 5 nM superhelikalem Template und 3 nM aktiver RNAP bei 160 mM KGLu und steigenden ppGpp-Konzentrationen. Die ppGpp-Titration erfolgte mit: 0, 75, 150, 300 und 500 mM. Die an dem intrinsischen Terminator T1 beendeten Transkriptionsprodukte (*rrnB* P1, *bolA1* und RNA1) und der Auftragsstandard sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

Zunächst soll kurz auf die Transkription des *bolA1* Templates (p*bolA1*-T1T2) eingegangen werden (Abb. 19b), welches durch einen verkürzten 'upstream' Bereich bis Position - 50 gekennzeichnet ist und somit den postulierten \square^{70} -spezifischen P2 Promotor an Position - 73 nicht trägt. Wie man an der Produktstärke der RNA1, die als interner Transkriptionsstandard angesehen werden kann, erkennt, ist die Transkription im Vergleich zum p*bolA*-T1T2 Template vermindert. Dies wird entweder auf eine fehlerhafte Konzentrationsbestimmung des Plasmids oder einen geringeren Anteil an superhelikalem Template zurückgeführt. Trotzdem lässt die Analyse folgende Schlüsse zu: Bei der Transkription des *bolA1* Templates mit E70 erfolgt sowohl am + 1 als auch an dem \square^{70} -spezifischen, zweiten Transkriptionsstart um Position - 10 keine signifikante Transkriptionsinitiation. Die Transkription mit E38 ist am *bolA1* im Vergleich zum *bolA* Template (*bolA* Promotor mit 'upstream' Bereich bis Position - 233) ebenfalls herabgesetzt. Die verminderte Transkriptionseffizienz im homo- und heterologen *bolA1* System weist auf eine aktivierende Wechselwirkung der RNAP mit dem Promotor 'upstream' von der Position - 50 hin. Dies ist konform mit der im DNase-Footprint ermittelten Protektion bis Position - 56/57 für E70 und Position - 64/65 für E38 (Kapitel III, 2.2.2.1).

Der ppGpp-Effekt auf die Transkription des *bolA1* Templates mit E38 scheint nahezu unabhängig vom 'upstream' Bereich jenseits der Position - 50 zu sein,

da mit beiden Templates (p*bolA*-T1T2 und p*bolA*1-T1T2) ein vergleichbarer ppGpp-Effekt erzielt wird (Tab. 1; siehe auch Abb. 20).

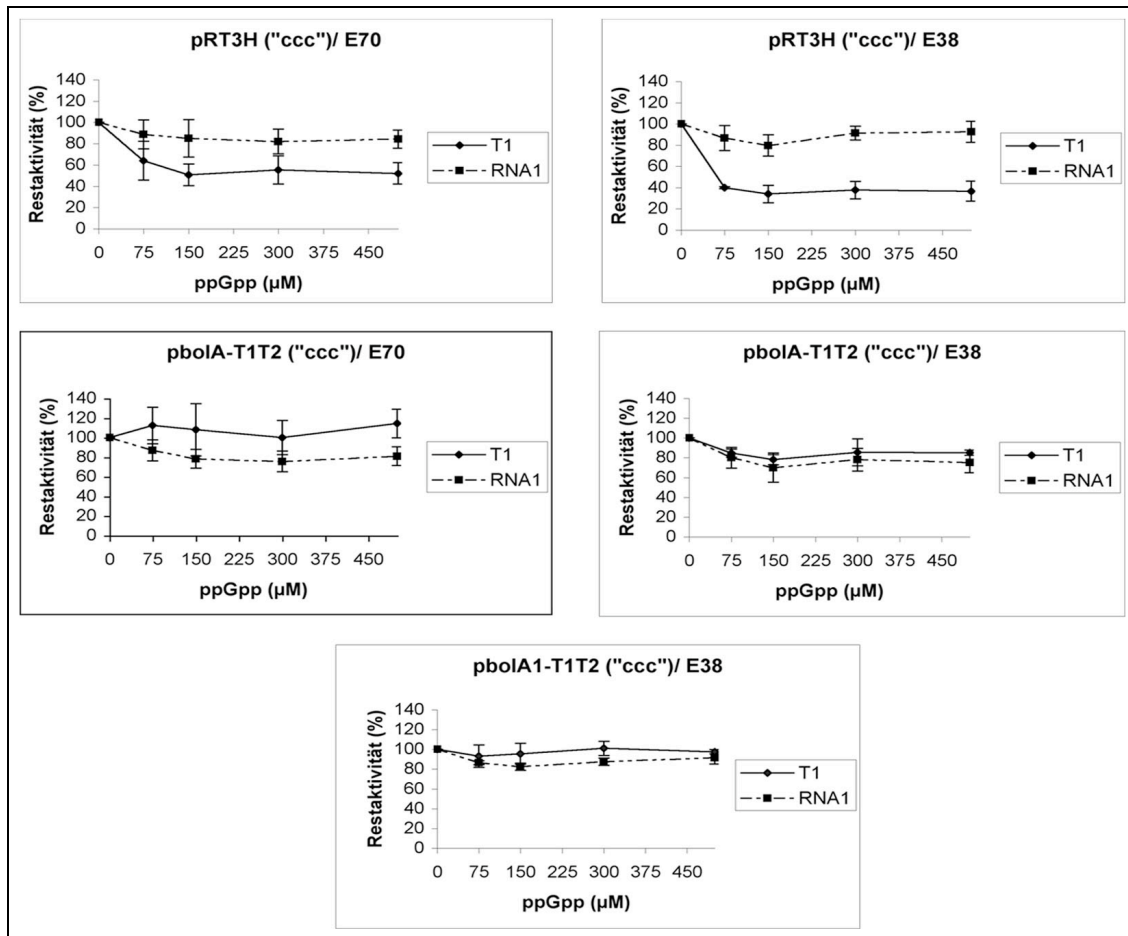


Abb. 20: Quantitative Auswertung dreier unabhängiger *in vitro* Transkriptionen am *rrnB* P1 und *bolA* Promotor mit E38 und E70 unter superhelikalen Template-Bedingungen in Abhängigkeit von der ppGpp-Konzentration. Die RNA1 wird als interner Transkriptionsstandard angesehen. Aufgetragen ist die Restaktivität (%) gegen die ppGpp-Konzentration (µM). Dabei wurde jeweils die Produktstärke in Abwesenheit des Effektormoleküls gleich 100 % gesetzt. Die Bezeichnung T1 entspricht den am Terminator T1 beendeten Transkripten des *rrnB* P1 bzw. *bolA* Promotors.

Wie die quantitative Auswertung der Titrationsexperimente (Abb. 20) zeigt, weisen alle untersuchten Transkriptionssysteme eine hohe Sensitivität gegenüber ppGpp auf. Für das homologe *rrnB* P1 System als auch für die RNA1 kann jeweils eine Zunahme des ppGpp-Effektes bis 150 µM Effektormolekül beobachtet werden. Weitere ppGpp-Konzentrationssteigerungen bis 500 µM führen zu keiner Änderung des ppGpp-Effektes, d.h. die Inhibierung erreicht bei 150 µM ppGpp ein Plateau. Im Fall des heterologen *rrnB* P1 sowie des homo- und heterologen *bolA* Transkriptionssystems wird dieses Plateau sogar schon bei 75 µM ppGpp erreicht. Für das homologe *rrnB* P1 System konnte in früheren Analysen unter superhelikalen Template-Bedingungen ebenfalls eine Wirkkonzentration von 60 µM ermittelt werden (Barker *et al.*, 2001).

Der maximale Einfluss bei sättigender ppGpp-Konzentration (300 μ M) ist in Tabelle 1 zusammenfassend dargestellt:

Promotor	RNAP	Restaktivität T1 (%)		Restaktivität RNA1 (%)	
		Mittelwert	s	Mittelwert	s
<i>rrnB</i> P1	E70	55	13	82	12
	E38	38	8	91	7
<i>bolA</i>	E70	100	18	76	11
	E38	85	14	78	12
<i>bolA1</i>	E38	101	7	88	4

Tab. 1: Zusammenfassende Darstellung der maximalen ppGpp-Effekte auf die homo- und heterologe Transkription des *rrnB* P1, *bolA* und RNA1 Promotors unter superhelikalen Template-Bedingungen. Dargestellt sind die von drei unabhängigen 'multiple round' *in vitro* Transkriptionen ermittelten Restaktivitäten (%) und die jeweiligen Standardabweichungen (s).

Beachtet man, dass die ppGpp-Konzentration *in vivo* im Sekundenbereich nach Auslösen der Stringenten Kontrolle bis in den millimolaren Bereich ansteigt, so untermauert die ermittelte, geringe *in vitro* Wirkkonzentration von 75 bzw. 150 μ M des Effektormoleküls die Empfindlichkeit der ppGpp-vermittelten Transkriptionsregulation. Sie sagt jedoch nichts über die Spezifität des ppGpp-Effektes aus, denn auch die nicht stringent regulierte RNA1 weist diese niedrige Wirkkonzentration auf. Dies bedeutet ebenfalls, dass dieses Experiment keinen näheren Aufschluss über die Spezifität des ppGpp-Effektes am *bolA* Promotor liefert. Wie die ppGpp-Titration zeigt, erfolgten die zuvor durchgeführten Analysen in Anwesenheit von 300 μ M ppGpp (Kapitel III, 2.3.3.1) im Optimum des Effektes. Dabei ist der Einfluss des Effektormoleküls im Vergleich zur unspezifisch regulierten RNA1 im homologen Fall verschwindend klein, während die heterologe Transkription des *bolA* Promotors bis zu 20 % aktiviert wird. Aus diesem Grund kann an dieser Stelle für den *bolA* Promotor weiterhin nicht ausgeschlossen werden, dass die beobachtete Inhibierung bzw. Aktivierung durch eine RNAP-Umverteilung zwischen RNA1 und *bolA* verursacht wird. Da bei den *in vitro* Transkriptionen die RNAP im Unterschuss eingesetzt wurde, kann die unspezifische Inhibierung der RNA1 zur scheinbaren Aktivierung anderer Promotoren führen und zwar vor allem bei starken Affinitätsunterschieden, wie es z.B. bei der heterologen pbolA-T1T2 Transkription der Fall ist.

2.3.3.3.2 ppGpp-Titration mit linearen Templates

Das auf einer Promotorumverteilung basierende Erklärungsmodell des ppGpp-Effektes auf die Transkription des *bolA* Promotors ist unter superhelikalen Reaktionsbedingungen hinreichend, kann jedoch die unter linearen Templatebedingungen beobachtete Aktivierung der Transkription in Anwesenheit von ppGpp nicht erklären. Um so mehr war im Folgenden die Sensitivität dieser Aktivierung gegenüber ppGpp von Bedeutung.

Dabei erfolgten die Reaktionen mit 5 nM linearisierter Plasmid-DNA und 3 nM aktiver RNAP bei 80 mM Kaliumglutamat (Kapitel IV, 2.3.4.2.3).

Die Abbildung 21 zeigt exemplarisch eine ppGpp-Titration unter linearen Template-Bedingungen. Wie zuvor beobachtet, ist die Transkription des *bolA* Promotors durch das σ^{70} -Holoenzym unter diesen Reaktionsbedingungen kaum nachweisbar und somit nicht quantifizierbar.

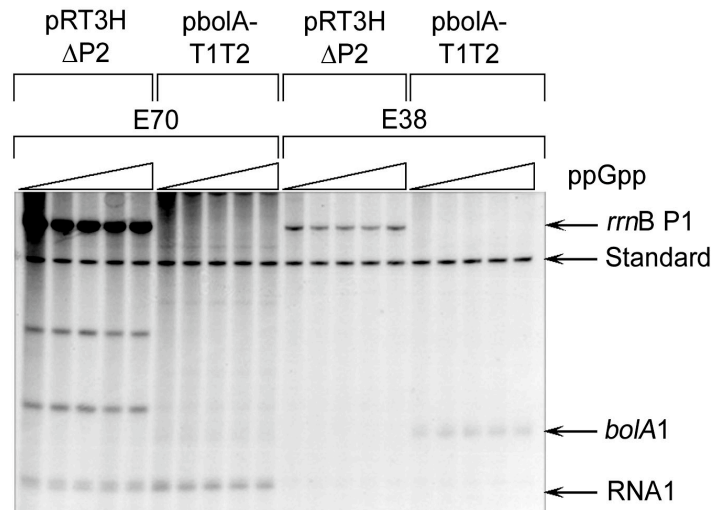


Abb. 21: 'multiple round' *in vitro* Transkription mit linearen Templates im homo- und heterologen System in Abhängigkeit von der ppGpp-Konzentration. Die Reaktion erfolgte mit 5 nM linearisierter Plasmid-DNA und 3 nM aktiver RNAP bei 80 mM KGlu und steigenden ppGpp-Konzentrationen. Die ppGpp-Titration erfolgte mit: 0, 75, 150, 300 und 500 mM. Die an dem intrinsischen Terminator T1 beendeten Transkriptionsprodukte (*rrnB* P1, *bolA*1 und RNA1) und der Auftragsstandard sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

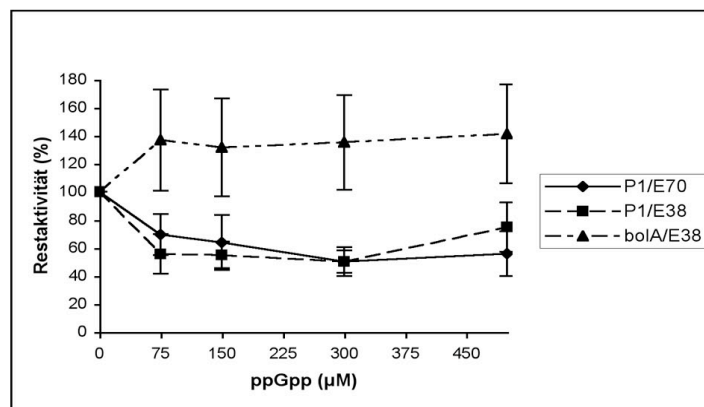


Abb. 22: Quantitative Auswertung von drei unabhängigen *in vitro* Transkriptionen am *rrnB* P1 und *bolA* Promotor mit E38 und E70 unter linearen Template-Bedingungen in Abhängigkeit von der ppGpp-Konzentration. Aufgetragen ist die Restaktivität (%) gegen die ppGpp-Konzentration (μM). Dabei wurde jeweils die Produktstärke in Abwesenheit des Effektormoleküls gleich 100 % gesetzt.

Die quantitative Auswertung (Abb. 22) zeigt, dass bei der Transkription mit E38, unabhängig vom Promotor und der jeweiligen Wirkung des Effektormoleküls, das Maximum des ppGpp-Effektes bei 75 μM erreicht wird. Im Gegensatz dazu erreicht die Transkription des *rrnB* P1 mit E70 erst zwischen 150 und 300 μM ppGpp ein Maximum. Die für das homologe *rrnB* P1 System ermittelte Wirkkonzentration von etwa 300 μM ist in guter Übereinstimmung mit früheren *in vitro* Transkriptionsanalysen unter linearen Template-Bedingungen (Jöres, 2001).

Der maximale Einfluss bei sättigender ppGpp-Konzentration (300 μ M) ist in Tabelle 2 zusammenfassend dargestellt:

Promotor	RNAP	Restaktivität T1 (%)	
		Mittelwert	s
<i>rrnB</i> P1	E70	50	10
	E38	50	8
<i>bolA</i>	E38	135	34

Tab. 2: Zusammenfassende Darstellung der maximalen ppGpp-Effekte auf die homo- und heterologe Transkription des *rrnB* P1 und *bolA* Promotors unter linearen Template-Bedingungen. Dargestellt sind die von drei unabhängigen 'multiple round' *in vitro* Transkriptionen ermittelten Restaktivitäten (%) und die jeweiligen Standardabweichungen (s).

Der direkte Vergleich der ermittelten ppGpp-Wirkkonzentrationen unter superhelikalen bzw. linearen Template-Bedingungen zeigt ausschließlich für das homologe *rrnB* P1 System eine minimale Änderung der ppGpp-Sensitivität in Abhängigkeit von der Templatetopologie. Zusammenfassend kann also festgehalten werden, dass die hier untersuchten Transkriptionssysteme sowohl mit linearen als auch superhelikalen Templates eine große Sensitivität gegenüber dem Effektormolekül der Stringenten Kontrolle aufweisen. Dies bedeutet jedoch auch, dass alle vorangegangenen Transkriptionsanalysen jeweils im Optimum des ppGpp-Effektes erfolgten und somit die Aktivierung des *bolA* Promotors bei Transkription mit linearen Templates (Tab. 1) bzw. der geringe ppGpp-Einfluss auf die *bolA* Transkription unter superhelikalen Bedingungen nicht anhand der ppGpp-Wirkkonzentration erklärt werden können (Tab. 2).

Zur Minimierung von Promotorumverteilungen zwischen *RNA1* und *bolA* Promotor und zur potenziellen Verstärkung des ppGpp-Effektes wurde im Anschluss eine ppGpp-abhängige Transkriptionsanalyse mit RNAP-Überschuss durchgeführt.

2.3.3.4 Der ppGpp-Effekt bei RNA-Polymerase-Überschuss

Die Analyse des ppGpp-Effektes auf die Transkription am *rrnB* P1 und *bolA* Promotor bei RNAP-Überschuss konnte ausschließlich unter linearen Template-Bedingungen durchgeführt werden, da durch die ermittelte 'nicking'-Aktivität der RNAP, bei deren überschüssigen Einsatz, die Superhelikalität der Templates nicht gewährleistet wäre (siehe auch Kapitel III, 2.3.1).

Die Reaktionen erfolgten demnach mit 5 nM linearisierter Plasmid-DNA bzw. Promotorfragment und 10 bzw. 15 nM aktiver RNAP in An- bzw. Abwesenheit von 300 μ M ppGpp bei 80 mM Kaliumglutamat (Kapitel IV, 2.3.4.2.3). Die Autoradiographie eines solchen Experimentes ist in Abbildung 23 dargestellt:

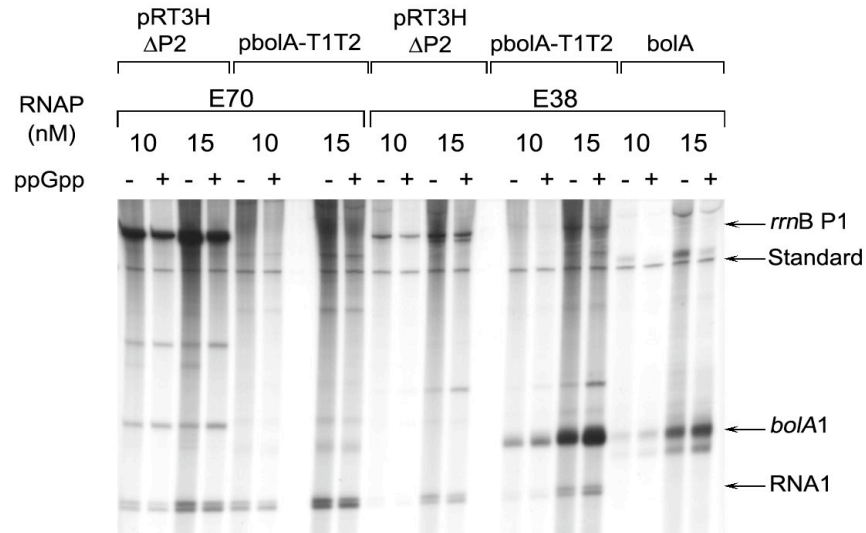


Abb. 23: 'multiple round' *in vitro* Transkription mit RNAP-Überschuss in An- bzw. Abwesenheit von 300 μ M ppGpp. Die Reaktion erfolgte mit 5 nM linearer Plasmid-DNA bzw. linearem Promotor-Fragment (*boIA*) und 10 bzw. 15 nM aktiver RNAP bei 80 mM Kaliumglutamat. Die Transkriptionsprodukte (*rrnB* P1, *boIA*1 und RNA1) und der Auftragsstandard sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

Die Konzentrationserhöhung der RNAP führt in allen Fällen zu einer Zunahme der Transkriptionsprodukte. Dies bedeutet, dass die Transkription bis zu einer Holoenzym-Konzentration von 15 nM keine Sättigung erreicht.

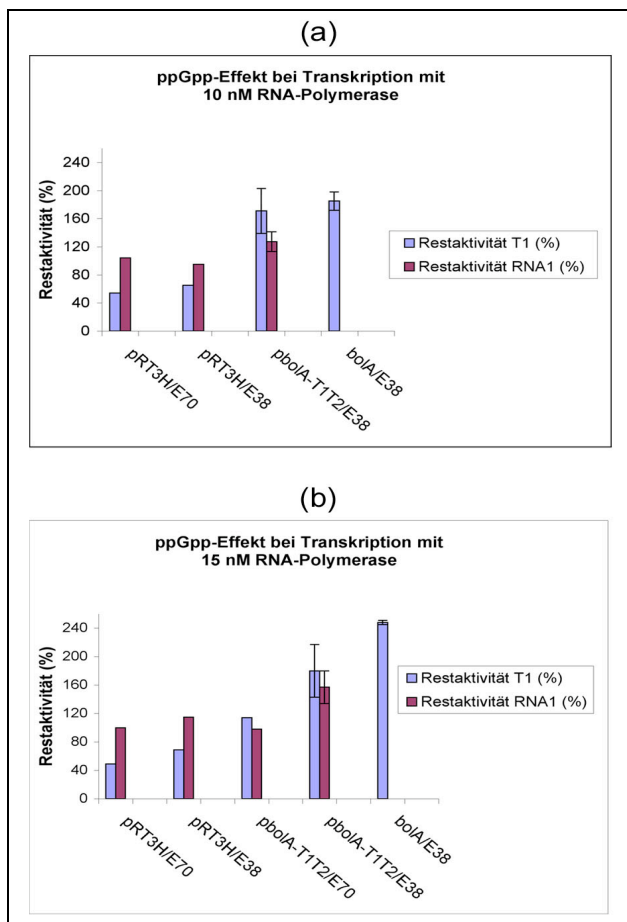


Abb. 24: Quantitative Auswertung der *in vitro* Transkriptionen mit 10 nM (a) bzw. 15 nM (b) RNAP unter dem Einfluss von 300 μ M ppGpp. Im Fall der *rrnB* P1 und heterologen *boIA* Transkription handelt es sich um Einzelexperimente, während für die Auswertung der homologen *boIA* Transkription jeweils drei unabhängige Experimente herangezogen wurden. Aufgetragen ist die ermittelte Restaktivität (%) der Promotoren *rrnB* P1, *boIA* (T1 = Transkript von + 1) und der RNA1. Dabei wurde jeweils die Produktstärke in Abwesenheit des Effektormoleküls gleich 100 % gesetzt.

Die Inhibierung des *rrnB* P1 Promotors beträgt mit 10 nM E70 46 % und mit 15 nM RNAP 51 %, während die Transkription der RNA1 keinen ppGpp-Effekt aufweist. Im heterologen *rrnB* P1 System wird die Transkription bei 10 nM E38 um 35 % und bei 15 nM um 31 % inhibiert. Hier erfährt die RNA1 bei 15 nM E38 eine Aktivierung um 15 %. Bei der Betrachtung dieser Ergebnisse muss allerdings beachtet werden, dass es sich im Fall der Transkription am *rrnB* P1 Promotors und des heterologen *bolA* Systems um Einzelexperimente handelt. Die teilweise geringen Abweichungen des ppGpp-Effektes im Vergleich zu vorherigen *in vitro* Transkriptionen unter linearen Bedingungen bewegen sich dabei im Rahmen des allgemeinen Quantifizierungsfehlers (< 10 %).

Welche Auswirkung hat eine RNAP-Konzentrationssteigerung auf den ppGpp-Effekt am *bolA* Promotor?

Im Fall des heterologen *bolA* Transkriptionssystems erfolgt ausschließlich bei 15 nM eine signifikante Transkription von den Positionen + 1 und - 10. Die Quantifizierung der + 1 Transkription (Einzelexperiment) zeigt in Anwesenheit von ppGpp eine Aktivierung des *bolA* Promotors um 14 %, während die RNA1 nahezu unbeeinflusst bleibt.

Bei der Transkription des *pbolA-T1T2* mit E38 ist dieser aktivierende ppGpp-Effekt noch stärker ausgeprägt: die Transkription wird in Anwesenheit von ppGpp bei 10 nM E38 um bis zu 71 % und bei 15 nM um bis zu 80 % gesteigert. Allerdings erfährt die RNA1 ebenfalls eine Aktivierung von 27 bzw. 57 %. Da die Analysen mit dem *bolA*-Fragment, welches ausschließlich diesen Promotor trägt, ebenfalls eine starke Aktivierung von 85 % (10 nM E38) bzw. 148 % (15 nM E38) zeigen, kann für den *bolA* Promotor eine spezifische ppGpp-abhängige Aktivierung der Transkription gefolgert werden.

Die Zunahme der Aktivierung mit steigender RNAP-Konzentration wird dadurch erklärt, dass zu keiner Zeit im Sättigungsbereich der Polymerase gemessen wurde und eine Aktivierung der Transkription im 'multiple round' Ansatz eine vermehrte Initiation zulässt.

Die scheinbar ppGpp-abhängige Aktivierung der nicht stringent kontrollierten RNA1 im Fall der Transkription des linearisierten Plasmids *pbolA-T1T2* mit E38 wird aus folgenden Gründen als indirekt angesehen:

1. Bei der Transkription des linearisierten Plasmids *pRT3H* □P2 mit E38 wird die RNA1 nur in sehr geringem Maße aktiviert.
2. Eine Aktivierung der Transkription am *bolA* Promotor kann zu einer scheinbaren Erhöhung des Anteils an freier RNAP führen, vor allem wenn sich der starke Promotor, hier der *bolA*, nahezu in der Sättigung befindet und der zweite Promotor sehr schwach ist, wie es für den RNA1 Promotor unter linearen Template-Bedingungen und auch bei der Transkription mit E38 der Fall ist (Abb. 24).

Auch kann ein positiver ppGpp-Effekt auf die Bindung von □³⁸ an das Core-Enzym der RNAP nicht vollständig ausgeschlossen werden, wodurch ebenfalls der Anteil an rekonstituiertem E38 steigen würde. Der mögliche positive ppGpp-

Einfluss auf die Bildung des E38 Holoenzym, der schon früher beschrieben wurde (Jishage *et al.*, 2002), wird jedoch nicht als Hauptfaktor angesehen, da sonst die ppGpp-abhängige Inhibierung des von E38 transkribierten *rrnB* P1 Promotors geringer sein müsste.

Dieses Experiment zeigt somit deutlich, dass die Transkription des stationäre Phase Promotors *boIA* positiv stringent reguliert ist. Dabei ist die Aktivierung bei der linearen Transkription mit E38 bedeutend größer als mit E70.

Der unter superhelikalen Template-Bedingungen ermittelte geringe ppGpp-Effekt widerlegt diese Aussage nicht, denn auch für das homologe *rrnB* P1 System variiert der Grad der Inhibierung stark in Abhängigkeit von den Transkriptionsbedingungen (Kapitel III, 2.3.3.1) und konnte sogar zuvor unter bestimmten Bedingungen nicht festgestellt werden (Ohlsen und Gralla, 1992; Jöres, 2001).

Aus diesem Grund sollten im Anschluss an diese Arbeit weitergehende Analysen der ppGpp-vermittelten Aktivierung am superhelikalen *boIA* und dem Mechanismus der positiven Stringenten Kontrolle am Beispiel des *boIA* Promotors erfolgen.

3 Diskussion

Die Holoenzyme E38 und E70 der RNAP von *E. coli* zeigen trotz großer Sequenzhomologie der beiden Spezifitätsfaktoren *in vivo* eine spezifische Genexpression in Abhängigkeit von der Wachstumsphase, d.h. σ^{70} -abhängige Transkription während der exponentiellen und eine σ^{38} -abhängige Transkription zu Beginn der stationären Phase und unter verschiedenen Stressbedingungen. Hier konnte, wie zuvor auch in anderen *in vitro* Analysen, diese strikte Promotorspezifität jedoch nicht gezeigt werden. Vielmehr wird *in vitro* ein Promotor oftmals von beiden Holoenzymen erkannt. Trotz jahrelanger intensiver Forschung sind die der Spezifität zugrunde liegenden Promotorsequenzen und *trans*-wirkenden Faktoren noch relativ unbekannt. Aus diesem Grund bildete die Analyse der *in vitro* Promotorspezifitäten der beiden Holoenzyme E70 und E38 am Beispiel des *rrnB* P1 und *boIA* Promotors einen Schwerpunkt dieser Arbeit. Dabei war vor allem die Modulation der σ -Faktorspezifischen Transkription durch verschiedene, potenzielle Spezifitätsfaktoren von besonderem Interesse. Im Folgenden sollen zunächst die Ergebnisse dieser Untersuchungen anhand der Konsensuspromotorsequenzen diskutiert werden, bevor näher auf die Wirkungsweise und Bedeutung der potenziellen Spezifitätsfaktoren eingegangen wird.

3.1 Theoretische Grundlage der σ -Faktor-abhängigen Promotorspezifität der RNA-Polymerasen

In einem ersten Schritt sollen hier die ermittelten generellen *in vitro* Promotorspezifitäten der homo- und heterologen Transkriptionssysteme anhand der beschriebenen Konsensussequenzen σ^{70} - bzw. σ^{38} -abhängiger Promotoren diskutiert werden (Abb. 25, siehe auch Kapitel I).

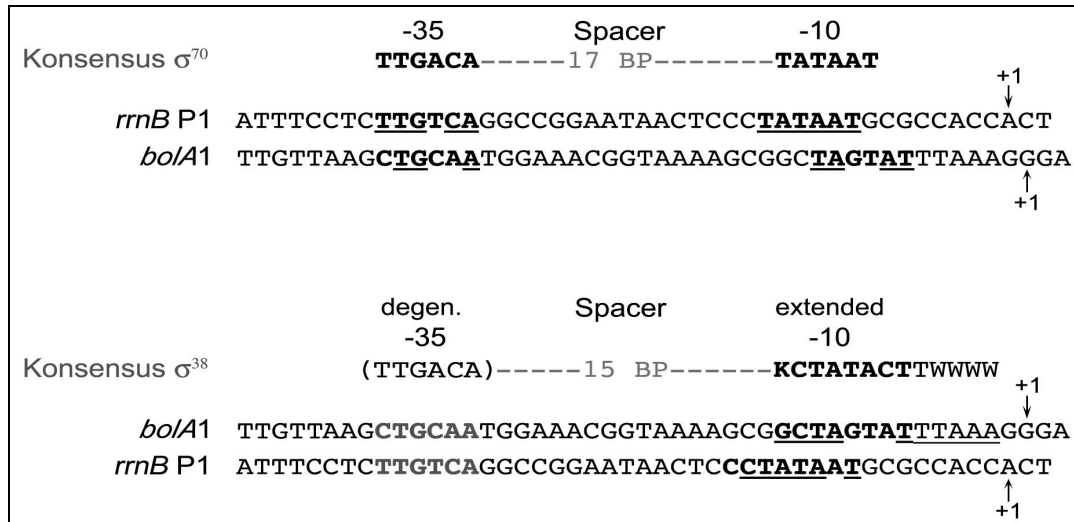


Abb. 25: Übereinstimmung der Promotoren *rrnB* P1 und *boIA* mit der σ^{70} - bzw. σ^{38} -Konsensussequenz. Hervorgehoben sind die - 35, die - 10 Region, der 'spacer' und der Transkriptionsstart + 1. σ^{38} -abhängige Promotoren weisen in der Regel eine degenerierte σ^{70} -spezifische - 35 Region auf (siehe Klammern). Die Übereinstimmungen der Promotoren mit den Konsensussequenzen sind unterstrichen. Das Nukleotidkürzel K steht für G oder T und W steht für A oder T. Sequenzquellen: Konsensus σ^{70} und *rrnB* P1 (Wagner, 2000); Konsensus σ^{38} und *boIA* (Becker und Henge-Aronis, 2001).

Der σ^{70} -Konsensus besitzt eine konservierte - 35 (TTGACA) und - 10 Region (TATAAT), die im Idealfall durch einem 17 Basenpaar langen 'spacer' voneinander getrennt werden (Record *et al.*, 1996). Mit einer hohen Frequenz initiierte Promotoren weisen in der Regel nicht mehr als drei Abweichungen von diesen Merkmalen auf (Mulligan, 1984). Der untersuchte *rrnB* P1 Promotor weicht ausschließlich in zwei Punkten von dem postulierten σ^{70} -Konsensus ab. Er besitzt einen 'mismatch' in der - 35 Region und ist durch einen um ein Basenpaar kürzeren 'spacer' gekennzeichnet. Der *boIA* Promotor hingegen weist zwei Abweichungen von der σ^{70} -spezifischen - 10 Region auf und ist durch eine degenerierte - 35 Region gekennzeichnet, die nur an drei Positionen mit der σ^{70} -Konsensussequenz übereinstimmt. Dem zweiten *boIA* Transkriptionsstart an Position - 10 kann eine - 35 Region von Position - 45 bis - 40 (TTGTTA), ein 17 bp langer 'spacer' und eine - 10 Region von Position - 22 bis - 17 (TAAAAG) zugeordnet werden. Beide Sequenzmotive weichen jeweils um zwei Basenpaare von der σ^{70} -Konsensussequenz ab. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass dem Initiationsprozess an Position - 10 eine Erkennung des eigentlichen *boIA* Promotors mit anschließender Rückwärtsbewegung der RNAP zugrunde liegt.

Die beschriebene \square^{38} -Konsensussequenz ist durch eine degenerierte - 35 Region und eine im 'upstream' Bereich um zwei Nukleotide verlängerte ('extended') - 10 Region (KCTATACT) gekennzeichnet. Der 'downstream' Bereich der 'extended - 10' Region unterscheidet sich dabei von der \square^{70} -spezifischen - 10 Region nur in einer Base: TATACT statt TATAAT. Im Rahmen der \square^{38} -Selektivität wird der Position - 13C eine besondere Rolle zugeordnet (Becker und Hengge-Aronis, 2001). Außerdem wird eine Relevanz der Sequenzen 'downstream' der - 10 Region diskutiert, die nahezu in allen \square^{38} -abhängigen Promotoren AT-reich sind (Hengge-Aronis, 2003).

Der im Rahmen dieser Arbeit untersuchte stationäre Phase Promotor *bolA* mit Transkriptionsstart an + 1 besitzt annähernd diese \square^{38} -spezifischen Merkmale. Er weicht ausschließlich an drei Positionen von dem 'extended - 10' Konsensus ab (Abb. 25). Die zum zweiten Transkriptionsstart (- 10) zugehörige 'extended - 10' Region (Position - 24 bis - 17) unterscheidet sich hingegen an vier Positionen von dem beschriebenen Konsensus. Hervorzuheben ist dabei die Abweichung (G statt C) an der 13 Nukleotide 'upstream' vom Transkriptionsstart - 10 liegenden Position. Zudem ist die Sequenz 'downstream' der 'extended - 10' Region GC- statt AT-reich.

Der \square^{70} -spezifische *rrnB* P1 Promotor zeigt sogar eine größere Homologie zum 'extended - 10' Konsensus als der *bolA* Promotor. Er divergiert nur an zwei Positionen von der \square^{38} -Konsensussequenz. Allerdings trägt er an Position - 13 ein A und kein C. Zudem ist er durch eine GC-reiche Sequenz 'downstream' der - 10 Region gekennzeichnet.

Geht man davon aus, dass die Promotorstärke bzw. -spezifität ausschließlich von der Core-Promotorsequenz abhängt und alle spezifischen Merkmale eine vergleichbare Relevanz besitzen, müsste die Transkription mit beiden Holoenzymen in folgenden Reihenungen abnehmen:

1. **E70:** *rrnB* P1 > *bolA* (- 10) > *bolA* (+ 1)
2. **E38:** *bolA* (+ 1) \geq *rrnB* P1 > *bolA* (- 10).

Qualitativ entsprechen die hier unter superhelikalen Reaktionsbedingungen ermittelten Ergebnisse diesen theoretischen Promotorspezifitäten (Kapitel III, 2.3.2). Quantitativ sind die Transkriptionseffizienzen gemessen an den Homologien zu den Konsensussequenzen jedoch unverhältnismäßig. So zeigen z.B. die beiden Promotoren *rrnB* P1 und *bolA*, trotz größerer Übereinstimmung des *bolA* Promotors mit den \square^{38} -spezifischen Promotormerkmalen, unter standardisierten Reaktionsbedingungen bei der Transkription mit E38 vergleichbare Aktivitäten.

Dieser Vergleich der theoretischen mit den realen *in vitro* Promotorspezifitäten unterstreicht die Relevanz der Konsensusmotive bei der Erkennung und Nutzung eines Promotors und verweist gleichzeitig darauf, dass diese Sequenzmotive die tatsächlichen Promotorstärken nicht hinreichend erklären können. Vielmehr wird zur Zeit davon ausgegangen, dass die Abweichungen von der Konsensussequenz unterschiedlich gut von den beiden Holoenzymen

toleriert werden können (Gaal *et al.*, 2001) und außerdem weitere *cis*-wirkende Elemente die Spezifität beeinflussen. Für den *rrnB* P1 Promotor ist hier beispielsweise das zwischen Position - 60 bis - 40 lokalisierte UP-Element zu nennen, welches durch Interaktion mit der σ -Untereinheit der RNAP eine Aktivierung der Transkription verursacht (Ross *et al.*, 1993; Blatter *et al.*, 1994; Meng *et al.*, 2001). Auch für σ^{38} -kontrollierte Promotoren wird ein distales AT-reiches UP-Element um Position - 50 diskutiert (Ballesteros *et al.*, 1998; Germer *et al.*, 2001). Ebenfalls könnte die sequenzabhängige Krümmung der DNA im Promotorbereich die Wechselwirkungen der Holoenzyme mit den Promotoren beeinflussen. Für den *rrnB* P1 Promotor ist eine aktivierende intrinsische Krümmung 'upstream' der - 35 Region bis etwa zur Position - 150 (UAS-Region) beschrieben (Ross *et al.*, 1993; Rao *et al.*, 1994). Auch die den *bolA* Promotor umgebende DNA soll durch eine intrinsische Krümmung gekennzeichnet sein (Espinosa-Urgel und Tormo, 1993). Während die intrinsische Krümmung am *rrnB* P1 Promotor (UAS-Region) für die Bindung regulativer Proteine essentiell ist, könnte sie bei σ^{38} -abhängigen Promotoren einen direkteren Einfluss auf die RNAP-Bindung nehmen. Zudem könnte der Abstand zwischen der - 10 Region und dem Transkriptionsstart + 1, der beim *rrnB* P1 acht Nukleotide und beim *bolA* Promotor nur fünf bis sechs Nukleotide beträgt, die Konformation und damit die Stabilität der RNAP-Promotorkomplexe beeinflussen.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Promotorspezifität der untersuchten Holoenzyme nicht ausschließlich eine Funktion der Konsensussequenzen ist, sondern vielmehr das Resultat der individuellen und komplexen Gesamtstruktur der RNAP-Promotorkomplexe darstellt. Dies wird unterstützt durch Footprint-Analysen von RNAP-Promotorkomplexen homo- und heterologer Transkriptionssysteme, die trotz großer Ähnlichkeit auch immer unterschiedliche Protektionen der Promotoren (Kapitel III 2.2.2.1) und Varianzen in den Nukleoprotein-Wechselwirkungen zeigen (Nguyen und Burgess, 1997; Gaal *et al.*, 2001). Dabei ist vor allem die unterschiedliche Wechselwirkung der beiden Holoenzyme mit den Nukleotiden der -10 Region ('non template' Strangs) erwähnenswert. Während für σ^{70} eine direkte Interaktion der AS Q437 und T440 mit der Position -12 gezeigt werden konnte, interagieren die entsprechenden Aminosäuren (Q152 und E155) und eine zusätzliche AS (K173) von σ^{38} mit der Position - 13. Zudem soll die konservierte Region 4.2, die der -35 Erkennung zugeordnet wird, in den beiden Holoenzymkomplexen eine unterschiedliche Organisation aufweisen. Da das σ^{38} -Holoenzym trotzdem die - 35 Regionen einiger Promotoren erkennen kann, werden für diese DNA-Protein-Interaktion der beiden Holoenzyme verschiedene Wechselwirkungen vermutet. Zudem konnten in Footprint-Analysen für die Protein-Protein-Interaktionen der σ -Faktoren mit der σ - und σ '-Untereinheit teilweise verschiedene Zugänglichkeiten gezeigt werden (Colland *et al.*, 2002). Wie die Abbildung 26 jedoch zeigt, weisen die Überallesstrukturen der beiden Holoenzyme trotz der erwähnten Unterschiede eine sehr große Ähnlichkeit auf.

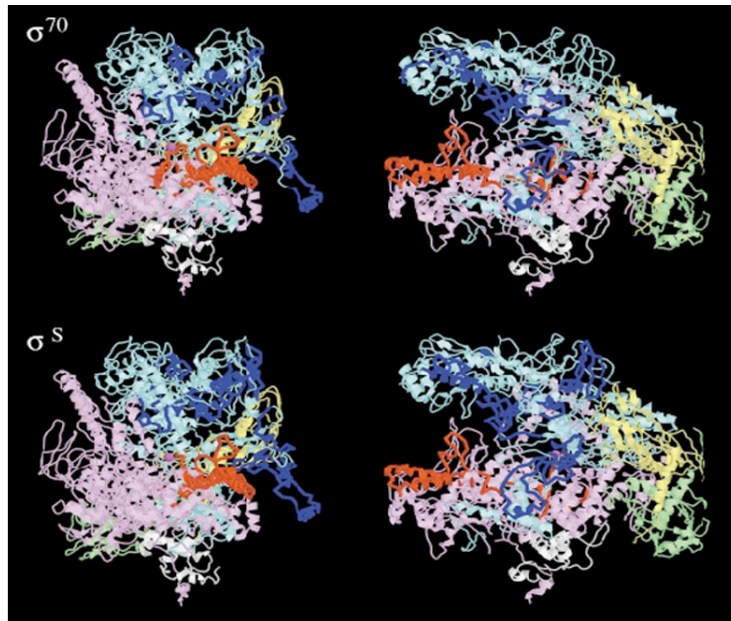


Abb. 26: 'Ribbon' Diagramm der dreidimensionalen Struktur des Core-Enzyms der RNAP von *T. aquaticus* zur Verdeutlichung der Wechselwirkungen des σ^{70} - und σ^{38} -Faktors mit der β - (blau) und β' -Untereinheit (pink). Die β -Untereinheiten sind in grün und gelb hervorgehoben. Bereiche der β - β bzw. β - β' -Interaktion sind in violett bzw. rot dargestellt (Colland *et al.*, 2002).

Abschließend muss angemerkt werden, dass mit Hilfe dieser theoretischen Betrachtung der Affinitäten der beiden Holoenzyme zu den untersuchten Promotoren zwar die ermittelten *in vitro* Transkriptionseffizienzen, nicht jedoch die wachstumsphasen-abhängigen *in vivo* Spezifitäten erklärt werden können. Dabei drängt sich vor allem folgende Frage auf: Welche Faktoren verleihen der σ^{38} -gerichteten Transkription Spezifität?

3.2 Modulation der σ -Faktor-abhängigen Transkription

3.2.1 Einfluss der Promotortopologie auf die σ -Faktor-abhängige Transkription

Aus vorangegangenen Analysen der σ -Faktor-spezifischen Transkription vor allem osmo-regulierter Promotoren, wie z.B. *osmB*, *osmY* und *proU*, war eine Verstärkung der σ^{38} -abhängigen Transkription bei abnehmender superhelikaler Dichte der Template-DNA bekannt (Ding *et al.*, 1995; Kusano *et al.*, 1996). Aufgrund der Abhängigkeit der Superhelikalität der DNA von den Wachstumsbedingungen der Zelle und der Abnahme der superhelikalen Dichte während der stationären Phase und diverser Stresssituationen (Balke, 1987; Adam Jaworski, 1991), wird die Promotortopologie als Spezifitätskriterium der σ^{38} -gerichteten Transkription angesehen (Bordes, 2003; Hengge-Aronis, 2003). Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher der Einfluss der Superhelikalität auf die Transkription des *rrnB* P1 und *bolA1* mit E70 bzw. E38 untersucht. Dazu wurden vergleichende *in vitro* Transkriptionen mit superhelikalen bzw. linearen DNA-Templates durchgeführt (Kapitel III, 2.3.2, 2.3.3). Dabei zeigten alle

untersuchten Transkriptionssysteme unter linearen Templatebedingungen eine geringere Effizienz. Der *bolA* Promotor wies jedoch die größte Abhängigkeit von der Superhelikalität auf. Da die Template-Plasmide jedoch aus stationäre Phase Zellen präpariert wurden (Kapitel IV, 2.2.3.2) wird vermutet, dass vor allem für den *bolA* Promotor bei der Transkription mit superhelikalen Promotoren nahe zu im Optimum der Superhelikalitätsdichte gemessen wurde. Außerdem ist davon auszugehen, dass sich die Konformationen von relaxierter und linearer DNA unterscheiden und somit eine verminderte Transkriptionseffizienz unter linearen Template-Bedingungen nicht zwingend im Widerspruch steht zu einer starken Transkription bei geringer superhelikaler Dichte. Auch für den *rrnB* P1 konnte ein größerer Anteil stabiler RNAP-Komplexe an superhelikalen im Vergleich zu linearen Templates gezeigt werden (Ohlsen und Gralla, 1992). Für eine genauere Charakterisierung des Effektes der Superhelikalität auf die Transkription des *rrnB* P1 und *bolA*1 Promotors müssten zukünftig Transkriptionsanalysen bei verschiedenen superhelikalen Dichten durchgeführt werden.

3.2.2 Kaliumglutamat als Spezifitätsfaktor der σ -Factor-abhängigen Transkription

Gelangen *E. coli* Zellen in eine Umgebung hoher Osmolarität, so erfolgt als rasche Antwort eine Akkumulation von Kaliumglutamat bis zu einer Konzentration von etwa 400 mM (Dinnbier, 1988). Aus diesem Grund wird vor allem im Zusammenhang mit der σ^{38} -abhängigen Osmoschock-Regulation das Salz Kaliumglutamat als Spezifitätsfaktor der Transkription angesehen (Hengge-Aronis, 2003). Neben dieser salzabhängigen Regulation, wird der Einfluss weiterer, elektroneutraler Osmolyte, wie z.B. Trehalose, kontrovers diskutiert (Kusano und Ishihama, 1997; Germer *et al.*, 1998). In einer kürzlich erschienen Studie konnte jedoch erneut keine Transkriptionsmodulation durch elektroneutrale Osmolyte nachgewiesen werden, während der aktivierende Effekt des Kaliumglutamats auf die Transkription des *osmY* Promotors mit E38 abermals bestätigt werden konnte (Lee, 2004). Bis heute ist der Mechanismus der *in vitro* detektierten KGlu-abhängigen Stimulation der σ^{38} -spezifischen Transkription und der häufig inversen Reaktion der σ^{70} -abhängigen Transkription noch relativ unverstanden. Folgende Wirkmechanismen von KGlu sind vorstellbar:

1. Hohe KGlu-Konzentrationen können die Ausbildung von Salzbrücken verhindern und somit Komplexstabilitäten verändern (Saecker, 2002).
2. Mit zunehmender Salzkonzentration steigt die Schmelztemperatur der DNA, wodurch die offene Komplexbildung beeinflusst werden könnte (Ohlsen und Gralla, 1992).

3. Steigende K^+ -Konzentrationen erhöhen das DNA-'twisting' (Anderson, 1978), wodurch die Orientierung bestimmter Promotorelemente, wie z.B. der - 10 und - 35 Region verändert wird.

Aufgrund dieser Salzeffekte wird angenommen, dass durch hohe KGlu-Konzentrationen hauptsächlich die Bildung der geschlossenen und/oder offenen binären RNAP-Promotorkomplexe beeinflusst wird. Erst kürzlich wurde für die KGlu-abhängige Stimulation der σ^{38} -spezifischen Transkription eine Aktivierung inaktiver Promotor-E38-Komplexe, die zusätzlich eine vermehrte Reinitiation erlaubt, vorgeschlagen (Lee, 2004). Auch wird einer konservierten, kurzen Aminosäuresequenz (AS 315 bis 330) im carboxyterminalen Bereich des σ^{38} -Faktors eine besondere Rolle bei der Transkription bei hohen Salzkonzentrationen zugeschrieben (Ohnuma, 2000).

Der in Abhängigkeit vom Holoenzym der RNAP beschriebene aktivierende bzw. inhibierende Kaliumglutamat-Effekt auf die Transkription mehrerer osmoregulierter Gene wird durch die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse der Transkriptions- und Bindungsstudien gestützt. So konnte für die Transkription des *bolA* Promotors mit E38 unter superhelikalen Templatebedingungen ein Maximum bei 240 mM Kaliumglutamat festgestellt werden und auch bei hohen KGlu-Konzentrationen war noch eine effektive Transkription nachweisbar. Im Gegensatz zur homologen *bolA* Transkription erfolgte sowohl bei der homo- und heterologen *rrnB* P1 als auch bei der heterologen *bolA* Transkription eine Inhibierung mit steigenden KGlu-Konzentrationen. Dieses Ergebnis unterstreicht nicht nur die Sensibilität des KGlu-Effektes, sondern untermauert am Beispiel der *bolA* Transkription auch seine Rolle als effizienten Spezifitätsfaktor auf die σ^{38} -gerichtete Transkription. Dabei sollte erwähnt werden, dass das *bolA* Gen nicht einzig dem Osmoschock-Regulon zuzuordnen ist. *In vivo* zeigt es jedoch bei hoher Osmolarität eine Expressionsaktivierung um ein Vielfaches (Hengge-Aronis, 1993; Santos *et al.*, 1999). Dabei besitzt der *bolA* Promotor nur bedingt die spezifischen Merkmale der kürzlich postulierten Osmoschock-Konsensussequenz (- 7T, - 8C, - 11A, - 12T, - 13C, - 29G, - 30G, - 31C und - 32G; vgl. Abb. 25), die allerdings auf dem Alignement von nur sechs Promotoren beruht (Lee, 2004).

3.2.3 Der Einfluss von ppGpp auf die σ -Faktor-abhängige Transkription

Schon lange wird die Rolle von ppGpp, dem Effektormolekül der Stringenten Kontrolle, als multifunktionaler Regulator der σ^{38} -spezifischen Stressantwort in *E. coli* diskutiert. *In vivo* ist für die Expression des alternativen Spezifitätsfaktors σ^{38} eine ppGpp-abhängige Stimulation bekannt (Gentry *et al.*, 1993; Lange *et al.*, 1995). Auch konnte für σ^{38} in Anwesenheit von ppGpp eine verbesserte Konkurrenz um die Bindung an das Core-Enzym der RNAP gegenüber σ^{70} gezeigt werden (Jishage *et al.*, 2002). Zudem erfolgt *in vivo* die

Induktion einer Reihe σ^{38} -abhängige Promotoren ausschließlich in Anwesenheit des Effektormoleküls (Kvint *et al.*, 2000). *In vitro* konnte diese ppGpp-abhängige Regulation der σ^{38} -abhängigen Transkription bis heute jedoch noch nicht bestätigt werden. Eine signifikante ppGpp-vermittelte *in vivo* Aktivierung und eine nur schwache *in vitro* Aktivierung der Transkription konnte auch für einen anderen alternativen Sigmafaktor, den σ^{54} -Faktor, beobachtet werden. In diesem Fall wird vor allem eine ppGpp-abhängige Zunahme der Kompetitionsfähigkeit um die Bindung an das Core-Enzym der RNAP angenommen (Sze und Shingler, 1999; Carmona *et al.*, 2000; Laurie *et al.*, 2002). Da der σ^{54} -Faktor nur wenig Homologie zu den Spezifitätsfaktoren der σ^{70} -Familie besitzt und zudem einen anderen Mechanismus der Transkriptionsinitiation aufweist, können die Sigmafaktoren jedoch ebenso unterschiedlichen ppGpp-abhängigen Regulationsmechanismen unterliegen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte für die *bolA*-Transkription bei Verwendung superhelikaler Templates ebenfalls kein signifikanter ppGpp-Effekt beobachtet werden. Es muss jedoch bemerkt werden, dass die Transkription der nicht stringent regulierten RNA1 in Anwesenheit des Effektormoleküls jeweils stärker als die des *bolA* Promotors inhibiert wurde (Kapitel III, 2.3.3.1).

Da zuvor für andere ppGpp-abhängige Promotoren, je nach Reaktionsbedingung, eine Verminderung oder sogar der Verlust des ppGpp-Effektes bei der Transkription mit superhelikalen Templates beschrieben wurde, erfolgte eine vergleichende Analyse mit linearisierten Templates (Kapitel III, 2.3.3.2 und 2.3.3.4). Im Gegensatz zu den *in vitro* Transkriptionen an superhelikalen Templates erfolgte bei linearen Templates eine Zunahme der Transkription in Gegenwart von ppGpp. Damit konnte hier zum ersten Mal *in vitro* eine signifikante, ppGpp-spezifische Aktivierung der Transkription eines σ^{38} -abhängigen Promotors gezeigt werden. Vor allem bei hohen, aber nicht sättigenden RNAP-Konzentrationen (Kapitel III, 2.3.3.4) konnte eine Stimulierung der σ^{38} -abhängigen Transkription des *bolA* Promotors um 80 bis 148 % ermittelt werden. Für die σ^{70} -abhängige Transkription des *bolA* Promotors hingegen konnte eine signifikant geringere Aktivierung um 14 % detektiert werden. Während für den *bolA* Promotor mit beiden Holoenzymen der RNAP ein aktivierender ppGpp-Effekt beobachtet wurde, zeigte die Transkription des negativ stringent regulierten Referenzsystems (*rrnB* P1), nahezu unabhängig von der Template-Topologie, nicht nur bei der Transkription mit E70, sondern auch mit E38 eine Inhibierung von etwa 50 %. Dabei ist der Grad der Inhibierung im linearen *rrnB* P1 Transkriptionssystem unabhängig vom jeweiligen Holoenzym. Bei der Verwendung superhelikaler Templates konnte mit E38 sogar eine um ca. 10 % stärkere Inhibierung als mit E70 ermittelt werden.

Zusammenfassend kann daraus gefolgert werden, dass der jeweilige ppGpp-Effekt im großen Maße vom Promotor bestimmt wird, d.h. der *rrnB* P1 wird unabhängig vom Holoenzym der RNAP inhibiert und der *bolA* Promotor aktiviert. Wie kann diese kontroverse Regulation, d.h. der negative und positive ppGpp-Einfluss auf die Transkription des *rrnB* P1 bzw. *bolA* Promotors erklärt werden? Bis heute sind die dieser Regulation zugrunde liegenden

Mechanismen noch nicht vollständig verstanden. Obwohl ppGpp nicht ausschließlich den Initiationsprozess der Transkription beeinflusst, wird dieser heute jedoch als Hauptregulationsphase verstanden. Dabei wird die RNAP als Zielort der Regulation angesehen. Eine Vielzahl von Analysen weisen auf eine ppGpp-Wechselwirkung mit der σ -, σ' - und σ^{70} -Untereinheit hin (siehe auch Kapitel I). Als weitere Voraussetzung für stringent kontrollierte Gene wird die Promotorsequenz angesehen. Als notwendiges Sequenzmotiv gilt dabei die Diskriminatorsequenz (siehe Kapitel I, 1.5.1.1). Der hier untersuchte *rrnB* P1 Promotor trägt den für negativ stringent regulierte Promotoren typischen GCGC Diskriminator und, falls dieses Motiv auf die ppGpp-abhängige Regulation der σ^{38} -spezifischen Transkription übertragbar ist, trägt auch der *bolA* Promotor eine typische positive, AT-reiche Diskriminatorsequenz.

Was ist über die Mechanismen der Regulation bekannt? Im Laufe der Jahre wurden für die negative Stringente Kontrolle mehrere Regulationsmodelle vorgeschlagen (Kapitel I, 1.5.1.2). Heute geht man jedoch zunehmend davon aus, dass ppGpp die Bildung der ternären Initiationskomplexe entscheidend inhibiert. Dabei wird allerdings eine Instabilität bzw. geringe Halbwertszeit der binären offenen Promotorkomplexe (RP_o) vorausgesetzt. Als entscheidender Schritt bei der Inhibierung der Initiationskomplexbildung wird jedoch die Konkurrenz von ppGpp und dem Initiationsnukleotid um den Eintritt in den sekundären Kanal hin zum aktiven Zentrum der RNAP und damit um die Bindung an das aktive Zentrum angesehen (Kompetitionsmodell; (Jöres und Wagner, 2003). Das Kompetitionsmodell wird durch kristallographische Analysen von RNAP-Komplexen (*Thermus thermophilus*) gestützt, die zwei mögliche Orientierungen für die Bindung von ppGpp nahe des aktiven Zentrums und damit in der Nähe der NTP-Bindestelle zeigen. Dabei wird auch eine Orientierung von ppGpp im Rahmen der positiven Stringenten Kontrolle diskutiert. Außerdem konnte im Rahmen dieser Strukturanalyse von RNAP-Promotorkomplexen eine Wechselwirkung von ppGpp mit Cytosinen des 'non template' Strangs gezeigt werden, der eine regulative Wirkung zugeordnet wird (Artsimovitch, 2004).

Auch der Mechanismus der positiven, ppGpp-abhängigen Regulation wurde in den vergangenen Jahren eingehend untersucht. Trotzdem wird er heute noch immer kontrovers diskutiert. Einerseits wird die positive Stringente Regulation indirekt durch die Zunahme freier RNA-Polymerasen, hervorgerufen durch die Inhibierung negativ stringent regulierter Gene, erklärt (Barker *et al.*, 2001). Andererseits gibt es mehrere Hinweise auf eine aktive Regulation der positiven Stringenten Antwort (siehe auch Kapitel I, 1.5.1.2). Erst kürzlich konnte anhand von σ^{70} -abhängigen *in vitro* Transkriptionen eine direkte Stimulation des σ paQ Promotors um das 1,5- bis 1,8-Fache gezeigt werden (Potrykus, 2004). Dabei schließen die Autoren einen ppGpp-Einfluss auf die initiale RNAP-Bindung an den paQ Promotor aus. Allerdings ermittelten sie eine Abnahme der Halbwertszeit der offenen Komplexe von 30 auf 8 min. Für den Mechanismus der aktiven Stimulation schlagen sie eine Zunahme transkriptionsaktiver, offener Komplexe vor und setzen somit ein Vorhandensein mehrerer Intermediate voraus.

Wie kann anhand der heutigen Erkenntnisse über die negative bzw. positive Regulation stringent kontrollierter Promotoren die ppGpp-abhängige Aktivierung der *bolA* Transkription erklärt werden? Zunächst wird aufgrund der ermittelten Aktivierung im minimalen Transkriptionsansatz kein ausschließlich passiver ppGpp-Effekt am *bolA* Promotor angenommen. Auch kann am *bolA* Promotor eine effektive Konkurrenz mit dem ersten Startnukleotid ausgeschlossen werden, da im Gegensatz zum *rrnB* P1 Promotor die ternäre Komplexbildung in Anwesenheit von ppGpp nahezu unabhängig von der Startnukleotid-Konzentration ist (Kapitel III, 2.2.1.3). Allerdings nimmt das Effektormolekül Einfluss auf die RNAP-Promotor-Komplexverhältnisse im Retardierungsgel und damit auf die Komplexbildung. Grundsätzlich weisen die binären Komplexe am *bolA* im Vergleich zum *rrnB* P1 eine höhere Stabilität beziehungsweise Halbwertszeit auf (siehe Kapitel III, 2.2.2.1). Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Transkriptionsinitiation am *bolA* eher die Merkmale des σ paQ als die des *rrnB* P1 aufweist. Dies wirft aber auch gleichzeitig erneut die Frage auf, ob der positiven bzw. negativen Stringenten Regulation zwei unterschiedliche Mechanismen zugrunde liegen. Aus diesem Grund bleibt die weitere Analyse des Mechanismus bzw. der Mechanismen der kontroversen ppGpp-Regulation unabdinglich (Kapitel III, 3.4).

Unabhängig von der positiven bzw. negativen Wirkung des Effektormoleküls, konnte durch die Analyse der ppGpp-Wirkkonzentration für alle untersuchten Transkriptionssysteme eine hohe Sensibilität gegenüber dem Effektormolekül gezeigt werden. Dabei wurde für die homologe *rrnB* P1 Transkription eine maximale Inhibierung ab etwa 150 μ M ppGpp beobachtet und für die anderen hier untersuchten Transkriptionssysteme war ein maximaler ppGpp-Effekt sogar schon ab 75 μ M detektierbar. Beachtet man, dass sich der basale ppGpp Level der Zelle invers zur Wachstumsrate verhält und zwischen 10 und 80 μ M liegt (Wagner, 2000), so könnte *in vivo* schon beim Eintritt in die stationäre Phase eine ppGpp-abhängige Aktivierung der σ^{38} -spezifischen Transkription erfolgen. Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass die minimale ppGpp-Konzentration *in vivo* durch die Beteiligung weiterer Faktoren sowohl herabgesetzt als auch erhöht sein könnte.

Außerdem sollte bemerkt werden, dass der ppGpp-Effekt im Fall des *rrnB* P1 unter superhelikalen Bedingungen mit steigenden K_{Glu}-Konzentrationen zunimmt, während er im linearen Transkriptionssystem relativ unbeeinflusst von der Salzkonzentration bleibt. Die ppGpp-abhängige Transkription des *bolA* Promotors zeigt davon abweichende K_{Glu}-Abhängigkeiten. In diesem Fall ist die ppGpp-abhängige Transkription mit superhelikalen Templates relativ unabhängig von der K_{Glu}-Konzentration und bei der Verwendung linearer Templates nimmt der Grad der Aktivierung mit steigenden Salzkonzentrationen ab.

Die ermittelten Abhängigkeiten der einzelnen Modulatoren der σ -Faktor-Spezifität (Superhelikalität, Kaliumglutamat und ppGpp) zeigen, dass die einzelnen Regulationsmechanismen ineinander übergreifen und unterstreichen damit noch einmal die Komplexität und Sensibilität der Regulation der wachstumsphasen-abhängigen Transkription.

3.3 Transkriptionsregulation während verschiedener Wachstumsphasen

Abschließend sollen an dieser Stelle die Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit im Gesamtkontext mit weiteren, heute bekannten regulativen Faktoren der σ^{70} - bzw. σ^{38} -spezifischen Genexpression diskutiert werden. Der Wechsel der Genexpression aufgrund sich ändernder Wachstumsbedingungen ist besonders interessant, da er zwei scheinbare Paradoxa aufwirft.

Das erste Paradoxon betrifft die Bildung des σ^{38} -Holoenzym. Eine Assoziation von σ^{38} an das Core-Enzym der RNAP ist *in vivo*, bei einer limitierenden Core-Enzym-Konzentration, einem maximalen $\sigma^{38} : \sigma^{70}$ -Verhältnis von etwa 1 : 3 und einer geringeren Affinität von σ^{38} zum Core-Enzym, ohne die Beteiligung weiterer Faktoren nicht vorstellbar. Diskutiert wird in diesem Zusammenhang der Anti-Sigmafaktor Rsd, ein Protein, dessen Expression während der stationären Phase induziert wird. Dabei soll Rsd durch die Bindung an den σ^{70} -Faktor zu einer Inhibierung der Bildung des σ^{70} -Holoenzym führen (Ilag *et al.*, 2004). Überdies könnte die kleine stabile 6S RNA beim Übergang in die stationäre Phase als dualer Regulator fungieren, da sowohl eine Interaktion der 6S RNA mit dem σ^{70} -Faktor als auch eine 6S RNA-abhängige Inhibierung der σ^{70} -gerichteten Transkription gezeigt werden konnte. Neuere Analysen weisen zudem auf eine 6S RNA-vermittelte Aktivierung der σ^{38} -abhängigen Transkription hin (Trotochaud, 2004). Auch konnte in Anwesenheit von ppGpp eine verminderte Konkurrenz von σ^{70} gegenüber σ^{38} um die Bindung ans Core-Enzym der RNAP gezeigt werden (Jishage *et al.*, 2002). Darüber hinaus wird eine Beteiligung weiterer Assoziationsfaktoren (Hengge-Aronis, 2000) oder auch eine wachstumsphasen-abhängige Modifikation des Core-Enzym der RNAP nicht ausgeschlossen (Pratt und Silhavy, 1998).

Das zweite Paradoxon des Umschaltens zwischen σ^{70} - und σ^{38} -spezifischer Genexpression wird durch die geringen Unterschiede in der *in vitro* Promotorspezifität der beiden Holoenzyme gebildet. Wie auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit am Beispiel der Promotoren *rrnB* P1 und *bolA* veranschaulicht werden konnte, wird die *in vivo* Spezifität der beiden Holoenzyme durch den Einfluss und das Zusammenspiel mehrerer Transkriptionsmodulatoren erzielt. So konnte hier *in vitro* gezeigt werden, dass durch den Einfluss von ppGpp und bei hohen K_{Glu}-Konzentrationen vor allem die σ^{38} -abhängige Transkription stimuliert wird, während unter diesen Bedingungen die Transkription am *rrnB* P1 mit beiden Holoenzymen inhibiert wird (Abb. 27a). Gerade im Zusammenhang mit der ppGpp-abhängigen Transkriptionsmodulation sollte noch ein weiterer möglicher Transkriptionsfaktor genannt werden. Dabei handelt es sich um das Protein DksA, welches als Transkriptionsregulator diverser zellulärer Prozesse, wie Zellteilung, Stringente Antwort und Quorum Sensing, angesehen wird. DksA wird an dieser Stelle erwähnt, da es nicht nur als Modulator des ppGpp-Effektes vorgeschlagen wurde, sondern vor allem auch, weil im Rahmen von Röntgenkristallstrukturanalysen eine Interaktion sowohl mit dem Effektormolekül als auch mit

der RNAP ermittelt werden konnte (Perederina, 2004). Auch wenn die Bindestellen des DksA und der Sigmafaktoren nicht überlappen, könnte es möglicherweise die Affinitäten der Sigmafaktoren zum Core-Enzym, durch Veränderung der RNAP-Konformation, beeinflussen.

Auch lassen die Ergebnisse dieser Arbeit eine unterschiedliche Abhängigkeit der beiden Holoenzyme von der Superhelikalität der Templates vermuten. Dies wird gestützt durch frühere Analysen an anderen σ^{38} -spezifischen Promotoren, bei denen eine Aktivierung der Transkription bei geringer negativer Superhelikalität festgestellt werden konnte (Ding *et al.*, 1995; Kusano *et al.*, 1996).

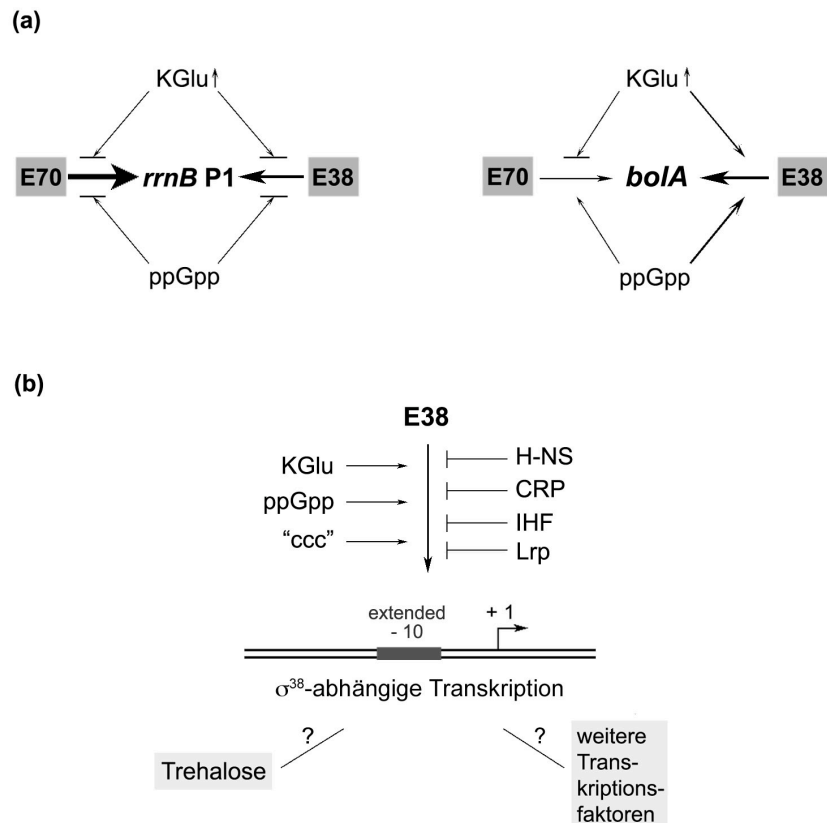


Abb. 27: (a) Einfluss von ppGpp und Kaliumglutamat auf die homo- und heterologe Transkription des *rrnB* P1 und *bolA* Promotors. Die generelle Promotorspezifität ist durch die Stärke der horizontalen Pfeile dargestellt. Der regulative Einfluss der beiden Effektoren ist entweder durch geblockte Pfeile (Inhibierung) oder Pfeile (Aktivierung) hervorgehoben. (b) Allgemeine Übersicht über mögliche Spezifitätsfaktoren der σ^{38} -abhängigen Transkription. Die Kennzeichnung der Inhibierung bzw. Aktivierung erfolgte wie unter (a).

Neben den hier untersuchten Effektoren wird eine Modulation der σ -Faktor-Spezifität durch weitere Metabolite, wie z.B. Trehalose diskutiert (Kusano und Ishihama, 1997; Germer *et al.*, 1998). Überdies wird der Beteiligung diverser Transkriptionsfaktoren eine große Rolle bei der Regulation der σ^{38} -Selektivität zugesprochen. So konnte für viele σ^{38} -abhängige Promotoren eine Inhibierung in Anwesenheit des H-NS-Proteins ermittelt werden (Barth *et al.*, 1995; Yamashino *et al.*, 1995). Auch für die Transkriptionsfaktoren CRP ('cAMP-repressor protein'), IHF ('integration host factor') und Lrp ('leucine responsive regulatory protein') konnte ein Effekt auf die σ^{38} -Selektivität detektiert werden. Dieser soll auf einer starken Inhibierung der σ^{70} -gerichteten Transkription und

einer nur geringen Inhibierung der σ^{38} -spezifischen Transkription beruhen (Colland *et al.*, 2000) (Abb. 27b).

Dabei ist zu betonen, dass einige Effektoren, wie z.B. ppGpp, nicht nur Einfluss auf die Transkription σ^{38} -abhängiger Promotoren nehmen, sondern ebenfalls an der σ -Faktorkompetition um das Core-Enzym der RNAP und an der Regulation der RpoS Expression beteiligt sind und somit eher als generelle Regulatoren angesehen werden können. Im Gegensatz dazu scheinen andere Modulatoren, wie z.B. Kaliumglutamat, welches bei hoher Osmolarität des umgebenden Mediums in der Zelle akkumuliert wird, eine stress-spezifische Funktion bei der Regulation einzunehmen.

3.4 Ausblick

Gerade der hier untersuchte *boIA* Promotor eignet sich für zukünftige Untersuchungen weiterer wachstumsphasen- und stress-spezifischer Effektoren bzw. Transkriptionsfaktoren, da es sich um ein Morphogen handelt, welches unter Bedingungen des Zellarrestes exprimiert wird und somit eine vielfältige, von der jeweiligen Stresssituation abhängige Regulation der σ^{38} -spezifischen Transkription erwartet wird.

Zudem eignet sich dieses Transkriptionssystem zur genaueren Analyse des Mechanismus der positiven Stringenten Kontrolle. Dabei können genauere Untersuchungen der Komplexbildung (RP_o und RP_{ini}) und der Halbwertszeiten der RNAP-Promotorkomplexe am *boIA* Promotor unter dem Einfluss von ppGpp aufschlussreich sein. Außerdem sollte eine exaktere Charakterisierung des Anteils des indirekten ppGpp-Einflusses, der z.B. durch Veränderung der Affinität der Sigmafaktoren zum Core-Enzym hervorgerufen werden kann, und des direkten Einflusses von ppGpp auf die Transkriptionsinitiation und die Elongation erfolgen. Hierzu können direkte Holoenzym-Assemblierungsstudien und 'single round' *in vitro* Transkriptionsanalysen in Anwesenheit von ppGpp durchgeführt werden.

Kapitel IV Material und Methoden

1 Material

1.1 Allgemeines

Alle verwendeten Chemikalien besaßen, sofern nicht anders vermerkt, den Reinheitsgrad 'pro analysis'.

Alle Lösungen und Medien wurden mittels hochreinem Milli-Q-Wasser (Hausanlage mit nachgeschaltetem 'water purification system EPA Est. 41237-MA-1', Millipore GmbH, Neu Isenburg) angesetzt, das im Folgenden als *Aqua dest.* bezeichnet wird.

1.2 Bakterienstämme und Vektoren

1.2.1 *Escherichia coli* Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
DG 156	RNase 1 ⁻	(Gesteland, 1966)
HB 101	F ⁻ , <i>pro</i> A2, <i>recA13</i> , <i>ara-14</i> , <i>lacY1</i> , <i>galK2</i> , <i>xyl-5</i> , <i>mtl-1</i> , <i>rps L20</i> (Str ^r)	(Boyer und Roulland-Dussoix, 1969)
MG1655	F ⁻	(Bachmann, 1987)
MRE 600	RNase 1 ⁻	(Cammack und Wade, 1965)
XL-1	<i>recA1</i> , <i>lac</i> ⁻ , <i>end A1</i> <i>gyr A96</i> , <i>thi</i> , <i>hsd R17</i> , <i>sup E44</i> , <i>rel A1</i> , [F ⁻ : <i>pro</i> AB, <i>lac</i> ^{iq} , <i>lacZ</i> □M15, Tn 10]	Stratagene

1.2.2 Plasmide

pCP1	Derivat des pUC18 (Vieira und Messing, 1982; Yanish-Perron <i>et al.</i> , 1985); trägt die Terminatoren T1T2 des <i>rrnB</i> -Operons aus pKK232-8 in der <i>KpnI</i> -Site des pUC18; freundliche Gabe von C. Pohl
pPtacW	pKK232-8-Derivat mit dem Ptacl-Promotor vor dem <i>cat</i> -Gen, Amp ^r (Zacharias <i>et al.</i> , 1989); freundliche Gabe von L. Jöres
pUC18	pBR322/M13mp18-Derivat mit 'multicloning site' (MCS) Polylinker (Yanisch-Peron <i>et al.</i> , 1985)
pUC18-1	Derivat des pUC18 (Vieira und Messing, 1982; Yanish-Perron <i>et al.</i> , 1985), trägt P1-Fragment des <i>rrnB</i> -Operons aus pKK3535 (<i>SspI/DdeI</i> , 235 bp) in der <i>SmaI</i> -Schnittstelle des pUC18 (Zacharias <i>et al.</i> , 1990); freundliche Gabe von R. Wurm
pRT3H□P2	Derivat des pBR322, trägt <i>rrnB</i> P1, einen Teil des 16S RNA- und des 5S-RNA-Gens vor den Terminatoren T1T2 des <i>rrnB</i> P1-Operons (auch pRT4) (Bradaczek, 1991)
pUC18-bolA1	Derivat des pUC18 (Vieira und Messing, 1982; Yanish-Perron <i>et al.</i> , 1985), trägt <i>bolA</i> -Promotor ohne 'upstream'-Region (via PCR mit #bola1-up und #bola1-down von chromosomaler DNA aus MG1655 und Restriktion mit <i>SspI</i> erhalten) in der <i>EcI136II</i> -Schnittstelle des pUC18 (Zacharias <i>et al.</i> , 1990); diese Arbeit
pUC18-bolA	Derivat des pUC18 (Vieira und Messing, 1982; Yanish-Perron <i>et al.</i> , 1985), trägt <i>bolA</i> -Promotor mit 'upstream'-Region (via PCR mit #bola1-up und #bola1-down von chromosomaler DNA aus MG1655 erhalten) in der <i>EcI136II</i> -Schnittstelle des pUC18 (s.o.); diese Arbeit
pbolA1-T1T2	Derivat des pCP1 (s.o.), trägt <i>bolA</i> -Promotor ohne 'upstream'-Region aus pUC18-bolA1 (<i>EcoRI/BsaAI</i> ; 107 bp) zwischen <i>EcoRI</i> - und <i>EcI136II</i> -Schnittstelle des pCP1; diese Arbeit
pbolA-T1T2	Derivat des pCP1 (s.o.), trägt <i>bolA</i> -Promotor mit 'upstream'-Region aus pUC18-bolA (<i>EcoRI/BsaAI</i> ; 209 bp) zwischen <i>EcoRI</i> - und <i>EcI136II</i> -Schnittstelle des pCP1; diese Arbeit

1.2.3 Phagenderivate

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ausschließlich mit Derivaten der Phagenvektoren M13mp18 und M13mp19 gearbeitet. Diese Vektoren leiten sich von dem rekombinanten M13 Phagen (M13mp1) ab, der ein kurzes *E. coli* Segment mit den ersten 146 Aminosäuren des β -Galactosidasegens enthält (Messing *et al.*, 1977). In dieses DNA-Segment ist eine 'polycloning site' eingefügt, die sich im Falle der Phagen M13mp18 und M13mp19 nur in der inversen Orientierung unterscheidet (Messing, 1983; Yanisch-Peron *et al.*, 1985).

- M13asa18 Derivat vom M13mp18 Phagen mit 5'-AAT TCC CTC TTG TCA GGC CGG AAT AAC TCC CTA TAA TAA AAC ACC ACT GAG CT-3' als Insert zwischen *EcoRI*- und *SacI*-Schnittstelle; freundliche Gabe von A. Schwarzenberg
- M13asa19 Derivat vom M13mp19 Phagen mit 5'-CAG TGG TGT TTT TAA TAT CCC TCA TAT TCC GGC CTG ACA AGA GGG-3' als Insert zwischen *EcoRI*- und *SacI*-Schnittstelle; freundliche Gabe von A. Schwarzenberg
- M13asr18 Derivat vom M13mp18 Phagen mit 5'-AAT TCC CTC TTG TCA GGC CGG AAT AAC TCC CTA TAA TGC GCC ACC ACT GAG CT-3' als Insert zwischen *EcoRI*- und *SacI*-Schnittstelle; freundliche Gabe von A. Schwarzenberg
- M13asr19 Derivat vom M13mp19 Phagen mit 5'-CAG TGG TGG CGC TAA TAT CCC TCA TAT TCC GGC CTG ACA AGA GGG-3' als Insert zwischen *EcoRI*- und *SacI*-Schnittstelle; freundliche Gabe von A. Schwarzenberg
- M13br-118 Derivat vom M13mp18 Phagen mit 5'-AAT TCC AGA AAA TTA GAA TAA ATT CCC TCT TGT CAG GCC GGA ATA ACT CCC TAT AAT GCG CCA CCA CTG AGC T-3' als Insert zwischen *EcoRI*- und *SacI*-Schnittstelle; diese Arbeit
- M13br-119 Derivat vom M13mp19 Phagen mit 5'-CAC ACC ACC GCG TAA TTA GGG AGT TAT TCC GGC CTG ACA AGA GGG AAT TTA TTC TAA TTT TCT GG-3' als Insert zwischen *EcoRI*- und *SacI*-Schnittstelle; diese Arbeit

1.3 DNA-Fragmente

- AS-A 'mismatch bubble' Template mit aktivierender Diskriminatorregion, gewonnen durch Hybridisierung von M13asa18 und M13asa19 (1.2.3) und Restriktion mit *EcoRI* und *HindIII*
- AS-R 'mismatch bubble' Template mit reprimierender Diskriminatorregion; gewonnen durch Hybridisierung von M13asr18 und M13asr19 (1.2.3) und Restriktion mit *EcoRI* und *HindIII*
- BR-I 'mismatch bubble' Template mit reprimierender Diskriminatorregion, gewonnen durch Hybridisierung von M13br-I18 und M13br-I19 (1.2.3) und Restriktion mit *EcoRI* und *HindIII*
- BR-I/*XmnI* 'mismatch bubble' Template mit reprimierender Diskriminatorregion, gewonnen durch Hybridisierung von M13br-I18 und M13br-I19 (1.2.3) und Restriktion mit *XmnI* und *HindIII*
- P1-Fragment
- für *in vitro* Transkriptionen: gewonnen durch *Ecl136II* und *HincII* Restriktion aus pUC18-1, Länge 256 bp, *rrnB*-P1-Sequenz von - 193 bis + 63 relativ zum P1-Start
 - für Retardierungsanalysen: gewonnen durch *EcoRI* und *BamHI* Restriktion aus pUC18-1, Länge 260 bp, *rrnB*-P1-Sequenz von - 201 bis + 59 relativ zum P1-Start
- bolA*-Fragment
- für *in vitro* Transkriptionen: gewonnen durch *HincII* Restriktion aus pUC18-*bolA*, Länge 284 bp, *bolA*-Sequenz von - 160 bis + 124 relativ zum *bolA*-Start
 - für Retardierungsanalysen: gewonnen durch *XbaI* und *HincII* Restriktion aus pUC18-*bolA*, Länge 276 bp, *bolA*-Sequenz von - 160 bis + 116 relativ zum *bolA*-Start
- bolA1*-Fragment
- für *in vitro* Transkriptionen: gewonnen durch *HincII* und *SspI* Restriktion aus pUC18-*bolA*, Länge 174 bp, *bolA*-Sequenz von - 51 bis + 124 relativ zum *bolA*-Start

- für Retardierungsanalysen: gewonnen durch *Xba*I und *Ssp*I
Restriktion aus pUC18-*bol*A, Länge
166 bp, *bol*A-Sequenz von - 51 bis + 116
relativ zum *bol*A-Start

165 bp-Standard gewonnen durch *Hind*III/*Nar*I Restriktion aus pUC18; diente
als Standard bei der *in vitro* Transkription (Kapitel II)

1.4 Nukleinsäuren und Nukleotide

1.4.1 Verschiedene Nukleinsäuren

Kb-Leiter BRL, Eggenstein

SmartLadder (SmL) Eurogentec,
Seraing, Belgien

1.4.2 Desoxyoligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz und Spezifität
# <i>bol</i> a	5'-GGT ACC GAG GTA TCA TCA TG-3' komplementär von + 57 bis + 38 zum 'non template' Strang des <i>bol</i> A-Promotors; dient als Primer für die Transkriptionsstartbestimmung, Footprint-Analysen und die Sequenzierung; ThermoHybaid, Interactiva Division, Ulm
# <i>bol</i> a1-up	5'-GGT AAA AAT TCC CGC CAT CAT AAC-3' komplementär von - 233 bis - 210 zum 'template' Strang des <i>bol</i> A-Promotors; dient als Primer für die PCR, Primer-Extension-Analysen und die Sequenzierung; ThermoHybaid, Interactiva Division, Ulm
# <i>bol</i> a1-down	5'-GGA ATA CGG GTT GGA ACG CC-3' komplementär von + 97 bis + 78 zum 'non template' Strang des <i>bol</i> A-Promotors; dient als Primer für die PCR und die Sequenzierung; ThermoHybaid, Interactiva Division, Ulm

- # bubble(-) 5'-CCC TCT TGT CAG GCC GG-3'
komplementär zum (-)-Strang der 'mismatch bubble'
Templates im Bereich der - 35-Region, dient als
Primer für die Primer-Extension-Reaktion und die
Sequenzierung; INTERACTIVA Biotechnologie
GmbH, Ulm
- # bubble(+) 5'-TGC AGG TCG ACT CTA GAG-3'
komplementär zum (+)-Strang der 'mismatch bubble'
Templates von Position + 24 bis + 41, dient als
Primer für die Primer-Extension-Reaktion und die
Sequenzierung; INTERACTIVA Biotechnologie
GmbH, Ulm
- # Mut-Xmnl-up(+) 5'- CAC ACC ACC GCG TAA TTA GGG AGT TAT
TCC GGC CTG ACA AGA GGG AAT TTA TTC TAA
TTT TCT GG-3'
komplementär zu # Mut-Xmnl-low(-); Oligonukleotid
für die Klonierung von M13br-I19; INTERACTIVA
Biotechnologie GmbH, Ulm
- # Mut-Xmnl-low(-) 5'-AAT TCC AGA AAA TTA GAA TAA ATT CCC
TCT TGT CAG GCC GGA ATA ACT CCC TAA TTA
CGC GGT GGT GTG AGC T-3'
komplementär zu # Mut-Xmnl-up(+) von Nukleotid 5
bis 65 einschließlich; Oligonukleotid für die
Klonierung von M13br-I19; INTERACTIVA
Biotechnologie GmbH, Ulm
- # RNAI 5'-TCA GCA GAG CGC AGA TAC CA-3'
komplementär von + 28 bis + 9 zum 'non template'
Strang des RNA1-Promotors; dient als Primer für die
Transkriptionsstartbestimmung; INTERACTIVA Bio-
technologie GmbH, Ulm
- # WT-Xmnl-up(+) 5'-AAT TCC AGA AAA TTA GAA TAA ATT CCC
TCT TGT CAG GCC GGA ATA ACT CCC TAT AAT
GCG CCA CCA CTG AGC T-3'
komplementär zu # WT-Xmnl-low(-) von Nukleotid 5
bis 65 einschließlich; Oligonukleotid für die
Klonierung von M13br-I18; INTERACTIVA
Biotechnologie GmbH, Ulm

# WT-Xmnl-low(-)	5'-CAG TGG TGG CGC ATT ATA GGG AGT TAT TCC GGC CTG ACA AGA GGG AAT TTA TTC TAA TTT TCT GG-3' komplementär zu # WT-Xmnl-up(+); Oligonukleotid für die Klonierung von M13br-I18; INTERACTIVA Biotechnologie GmbH, Ulm
# 81194	5'-GGA GAA CCC CGC TGA CCC GG-3' komplementär von + 29 bis + 48 zum 'non-template'- Strang des <i>rrnB</i> P1; dient als Primer für Footprint- Analysen und die Sequenzierung; INTERACTIVA Biotechnologie GmbH, Ulm
# 220302	5'-AAA CTG GCA GTT TTA GGC TG-3' komplementär von - 102 bis - 83 zum 'template' Strang des <i>rrnB</i> P1; dient als Primer für Footprint- Analysen und die Sequenzierung; INTERACTIVA Biotechnologie GmbH, Ulm
# - 40 Primer/M13	5'-GTT TTC CCA GTC ACG AC-3' komplementär zum M13 für die Sequenzierung; USB, Cleveland, USA

1.4.3 Nukleotide

Adenosin-5`-triphosphat	Boehringer, Mannheim
Adenosin-5`-triphosphat, "FPLC ultra pure"	Pharmacia, München
Adenosin-5`- $[\alpha^{32}\text{P}]$ triphosphat	Hartmann, Braunschweig
Cytidin-5`-triphosphat	Boehringer, Mannheim
Cytidin-5`-triphosphat, "FPLC ultra pure"	Pharmacia, München
Cytidin-5`- $[\alpha^{32}\text{P}]$ triphosphat	Hartmann, Braunschweig
Guanosin-5`-triphosphat	Boehringer, Mannheim
Guanosin-5`-triphosphat, "FPLC ultra pure"	Pharmacia, München
Guanosin-3`,5`-bis(di)phosphat (auch: Guanosintetraphosphat, ppGpp)	diese Arbeit
Uridin-5`-triphosphat	Boehringer, Mannheim
Uridin-5`-triphosphat, "FPLC ultra pure"	Pharmacia, München
Uridin-5`- $[\alpha^{32}\text{P}]$ triphosphat	Hartmann, Braunschweig
2`-Desoxyadenosin-5`-triphosphat	Boehringer, Mannheim
2`-Desoxyadenosin-5`- $[\alpha^{32}\text{P}]$ triphosphat	Hartmann, Braunschweig
2`-Desoxycytidin-5`-triphosphat	Boehringer, Mannheim
2`-Desoxycytidin-5`- $[\alpha^{32}\text{P}]$ triphosphat	Hartmann, Braunschweig
2`-Desoxyguanosin-5`-triphosphat	Boehringer, Mannheim
2`-Desoxythymidin-5`-triphosphat	Boehringer, Mannheim
2`,3`- Dideoxyadenosin-5`-triphosphat	Boehringer, Mannheim

2',3'- Dideoxycytidin-5'-triphosphat	Boehringer, Mannheim
2',3'- Dideoxyguanosin-5'-triphosphat	Boehringer, Mannheim
2',3'- Dideoxythymidin-5'-triphosphat	Boehringer, Mannheim

1.5 Proteine

Alkalische Phosphatase (CIP)	Roche, Mannheim
DNase I (RNase-frei)	Boehringer, Mannheim
Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I	Promega, Madison, USA
<i>Pfu</i> -Turbo	Stratagene, USA
Proteinase K	Roche, Mannheim
Restriktionsendonukleasen:	
<i>Ecl</i> 136 II	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Eco</i> RI	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Ehe</i> I	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Bam</i> HI	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Bfa</i> I	New England Biolabs, USA
<i>Bsa</i> AI	New England Biolabs, USA
<i>Bsr</i> BI	New England Biolabs, USA
<i>Hinc</i> II	New England Biolabs, USA
<i>Hind</i> III	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Hha</i> I	New England Biolabs, USA
<i>Kpn</i> I	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Nar</i> I	Boehringer, Mannheim
<i>Scal</i>	New England Biolabs, USA
<i>Ssp</i> I	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Xba</i> I	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Xmn</i> I	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Ribonuklease A (RNase A)	Sigma, St. Louis, USA
Rinderserumalbumin (BSA), acetyliert	New England Biolabs, USA
RNA-Polymerase aus <i>Escherichia coli</i>	
- Holoenzym:	nach: (Burgess und Jendrisak, 1975), verändert nach: (Gonzales <i>et al.</i> , 1977), charakterisiert nach: (Chamberlin <i>et al.</i> , 1979); freundlicherweise zur Verfügung gestellt von R. Wurm
- Core-Enzym:	nach: (Burgess und Jendrisak, 1975; Lowe <i>et al.</i> , 1979); freundliche Gabe von R. Wurm

α^{70} -Untereinheit der RNA-Polymerase	nach: (Igarashi, 1991), verändert nach: (Borukhov und Goldfarb, 1993); freundlicherweise zur Verfügung gestellt von M. Heinemann
α^{38} -Untereinheit der RNA-Polymerase	nach: (Tanaka <i>et al.</i> , 1993); freundliche Gabe von R. Wurm
Taq-DNA-Polymerase	Boehringer, Mannheim
T4 Polynukleotid-Kinase	Boehringer, Mannheim
T7 DNA-Polymerase (Sequenase 2.0)	Unites States Biochemical, USA

1.6 Allgemeine Puffer und Medien

Formamid-Probenpuffer:	0.1 % (w/v) Bromphenolblau 0.1 % (w/v) Xylencyanol 95 % (v/v) deionisiertes Formamid 25 mM EDTA, pH 8.0
1x KGlu80-Puffer:	50 mM Tris-Acetat, pH 8.0 10 mM Mg-Acetat 1 mM Dithiothreitol (DTT) 0.1 mM EDTA, pH 8.0 100 µg/ml BSA, acetyliert 80 mM Kaliumglutamat
1x KGlu160-Puffer:	50 mM Tris-Acetat, pH 8.0 10 mM Mg-Acetat 1 mM Dithiothreitol (DTT) 0.1 mM EDTA, pH 8.0 100 µg/ml BSA, acetyliert 160 mM Kaliumglutamat
1x TAE-Puffer:	40 mM Tris-Acetat, pH 7.5 1 mM EDTA, pH 8.0
2x TAE-Probenpuffer:	0.025 % (w/v) Bromphenolblau 0.025 % (w/v) Xylencyanol 30 % Glycerin in 2x TAE-Puffer
1x TBE-Puffer:	89 mM Tris-Borat, pH 8.3 2.5 mM EDTA, pH 8.0

2x TBE-Probenpuffer:	0,025 % (w/v) Bromphenolblau 0,025 % (w/v) Xylencyanol 30 % Glycerin in 2x TBE-Puffer
TE-Puffer:	10 mM Tris-HCl, pH 8.0 1 mM EDTA, pH 8.0
TES-Puffer:	20 mM Tris-HCl, pH 7.5 0.1 mM EDTA, pH 8.0 10 mM NaCl
Top-Agar:	10 g/l Trypton 8 g/l NaCl 6 g/l Agar in <i>Aqua dest.</i> , auf pH 7.0 einstellen und autoklavieren
YT-Medium:	8 g/l Trypton 5 g/l Hefe-Extrakt 5 g/l NaCl in <i>Aqua dest.</i> , auf pH 7.4 mit NaOH eingestellt
YT-Festmedium:	YT- Medium mit 15 g/l Agar

1.7 Feinchemikalien

Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agar	Gibco, Eggenstein
Agarose	Sigma, St. Louis, USA
Agarose, 'ultra pure'	Seakem, Hamburg
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Dichlordimethylsilan	Janssen Chimica, Brüggen
Dithiothreitol (DTT)	Jansen, Beerse, Belgien
Ethidiumbromid	Boehringer, Mannheim
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck, Darmstadt
Formaldehyd	Riedel-de-Haën, Seelze
Formamid	J.T. Baker, Groß-Gerau
Glycerin	J.T. Baker, Groß-Gerau
Glykogen	Boehringer, Mannheim
Harnstoff	J.T. Baker, Groß-Gerau
Hefe-Extrakt	Gibco BRL, Eggenstein
Heparin	Sigma, St. Louis, USA

Kaliumglutamat	Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Kaliumpermanganat	Merck, Darmstadt
Lithiumchlorid	Merck, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
N,N`-Methylenbisacrylamid	Serva, Heidelberg
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Polyethylenglykol (PEG ₈₀₀₀)	ICN Biomedicals Inc., Ohio
Saccharose	J.T. Baker, Groß-Gerau
Sephadex DEAE A25	Pharmacia, München
Sephadex G10	Pharmacia, München
Tetracyclin	Boehringer, Mannheim
N,N,N`,N`-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Merck, Darmstadt
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Merck, Darmstadt
Trypton	Difco, Detroit, USA
Xylencyanol	Serva, Heidelberg

1.8 Verschiedenes

Chromatographiepapier 3MM	Whatman, England
DE-52 Papier	Whatman, England
Nylonmembran; 'Hybond N'	AMERSHAM, England
QIAquick Nucleotide Removal Kit	QIAGEN, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN, Hilden
Röntgenfilme RX	Fuji, Japan
Röntgenfilme X-OMAT AR	Kodak, New Haven, USA
Röntgen-Rapid-Entwickler, Tetenal Roentogen liquid	Tetenal Photowerk, Norderstedt
Röntgenfixierer, Tetenal Roentogen Superfix	Tetenal Photowerk, Norderstedt
Sterilfilter FB 030/3 (0.2 µm)	Schleicher & Schuell, Dassel
Verstärkerfolie DuPont Cronex, Lightning Plus Screen	DuPont, Bad Homburg
VS Filtermembran (Porengröße 0.025 µm, Ø 2.5 cm)	Millipore, Neu Isenburg

2 Methoden

2.1 Allgemeine mikrobiologische Methoden

Bei dem Umgang mit mikrobiologischem Material wurden die geltenden biologischen Sicherheitsvorschriften beachtet.

2.1.1 Sterilisation von Lösungen und Glasgeräten

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

2.1.2 Haltung und Sicherung von Zellstämmen

Alle Bakterienstämme wurden vor der Benutzung aus Sicherheitsstocks auf YT-Platten (Kapitel IV, 1.6), die gegebenenfalls mit einem selektiven Antibiotikum supplementiert wurden, mit einer sterilen Impföse ausgestrichen und bei 37°C bis zum sichtbaren Wachstum von Einzelkolonien inkubiert. Die kurzfristige Sicherung der Stämme erfolgte durch Haltung auf YT-Platten (Kapitel IV, 1.6; versehen mit selektiven Antibiotika).

2.1.3 Anzucht von Bakterienkulturen

Zur Anzucht von Über-Nacht-Kulturen (üN-Kulturen) wurden Einzelkolonien von einer YT-Platte (Kapitel IV, 1.6) in 3 ml YT-Medium (Kapitel IV, 1.6), dem gegebenenfalls Antibiotikum zugesetzt wurde, übergeimpft und über Nacht auf einem Rundschtüttler (New Brunswick Scientific Gio Gyrotory) bei 37°C inkubiert.

Zur Anzucht größerer Flüssigkulturen wurde das sterile, gegebenenfalls mit Antibiotikum supplementierte Medium auf 37°C vorgewärmt. Anschließend wurde 1/100 Volumen der Flüssigkultur aus einer üN-Kultur zugefügt. Das Wachstum wurde mittels Streumessung verfolgt (Kapitel IV, 2.2.1.3).

2.1.4 Herstellung kompetenter Bakterienzellen

Die Herstellung kompetenter Zellen erfolgte nach der von (Dagert, 1979) beschriebenen Methode. Dazu wurden 100 ml YT-Medium mit 1/100 Volumen einer üN-Kultur (Kapitel IV, 2.1.3) des entsprechenden *E. coli* Stammes angeimpft und auf einem Rundschtüttler (New Brunswick Scientific Gio Gyrotory) bis zu einer OD₆₀₀ von 0.5 bei 37°C inkubiert.

Im Anschluss wurden die Kulturen in 50 ml Corex-Zentrifugenröhrchen überführt und für 20 min auf Eis abgekühlt, 5 min bei 4000 rpm (Heraeus Kühlzentrifuge, Megafuge 1.0 R) zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Pellet in 20 ml eisgekühltem 0.1 M CaCl_2 vorsichtig resuspendiert. Die Zellsuspension wurde dann für 60 min auf Eis inkubiert und erneut, wie oben beschrieben, zentrifugiert und dekantiert. Das Zellpellet wurde in 2 ml eiskaltem 85 mM CaCl_2 in 15 % Glycerin aufgenommen, zu je 200 μl aliquotiert, für 1 bis 24 Stunden bei 4°C inkubiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

2.1.5 Transformation von Plasmid-DNA in kompetente *E. coli* Zellen

Die Transformation kompetenter *E. coli* Zellen (Kapitel IV, 2.1.4) erfolgte nach der von (Hanahan, 1985) entwickelten Methode. Dazu wurden 200 μl kompetente Zellen langsam auf Eis aufgetaut, mit 20 μl einer DNA-Lösung (5-10 ng Plasmid-DNA bzw. 1-10 μl eines Ligationsansatzes) versetzt und für 60 min auf Eis inkubiert. Anschließend folgte der Hitzeschock zur Aufnahme der DNA in die Zellen durch 3minütige Inkubation bei 42°C. Danach wurde der Transformationsansatz mit 800 μl vorgewärmten (37°C) YT-Medium (Kapitel IV, 1.6) versetzt und für weitere 60 min bei 37°C inkubiert. Von diesem Transformationsansatz wurden 100-500 μl auf einer selektionierenden YT-Platte (Kapitel IV, 1.6) ausgestrichen und bis zum Sichtbarwerden von Einzelkolonien bei 37°C inkubiert.

2.1.6 Bestimmung eines Phagentiters

Für die Bestimmung des Phagentiters wurden 25 ml YT-Medium mit 250 μl einer üN-Bakterienkultur angeimpft und bis zur log-Phase inkubiert. Währenddessen wurde von den M13 Phagen eine Verdünnungsreihe mit YT-Medium (Kapitel IV, 1.6) im Bereich von 10^{-2} bis 10^{-12} angesetzt. Nach Erreichen der log-Phase wurden jeweils 200 μl der Phagenverdünnungen und 200 μl log-Zellen mit 3 ml eines auf 48°C temperierten Top-Agars (Kapitel IV, 1.6) gemischt und auf einer vorgewärmten YT-Platte gleichmäßig verteilt. Nach Verfestigung des Top-Agars wurden die Platten umgekehrt für ca. 8 h bzw. bis zum Sichtbarwerden von Phagen-Plaques bei 37°C inkubiert. Mit Hilfe der Anzahl der Plaques auf den einzelnen Platten konnte, unter Berücksichtigung der jeweiligen Verdünnung, der Phagentiter in 'plaque forming units' (pfu) ermittelt werden. Es sollte ein Phagentiter von mindestens 5×10^{11} pfu vorliegen.

2.1.7 Haltung und Sicherung von Phagenstämmen

Von einer YT-Platte (Kapitel IV, 1.6), bei der ein Phagentiter von mindestens 5×10^{11} pfu vorlag, wurde ein Plaque mit einer Pasteur-Pipette ausgestochen und in 2 ml YT-Medium (Kapitel IV, 1.6) mit 50 μ l Bakterien aus der log-Phase gegeben. Das Plaque durfte dabei nicht länger als 12 h gewachsen sein. Die Inkubation dieses Ansatzes erfolgte für mindestens 4 h oder über Nacht auf einem Rundschtüttler (New Brunswick Scientific Gio Gryotory) bei 37°C. Danach wurde 1 ml in ein Eppendorfgefäß überführt und bei 12000 rpm (Heraeus, Biofuge 15) für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und eventuell mit einem Tropfen Chloroform versetzt. Dieser Phagenstock konnte bei 4°C oder - 20°C für längere Zeit gelagert werden.

2.2 Allgemeine molekularbiologische Methoden

2.2.1 Messen von Konzentrationen

2.2.1.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte durch Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 260 nm im Beckmann UV/VIS-Spektralphotometer (Typ DU 64). Zur Messung wurden ausschließlich Suprasil-Quarzküvetten verwendet.

Zur Berechnung der Konzentration wurden vereinfacht folgende Beziehungen herangezogen:

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

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

Der Reinheitsgrad der Nukleinsäure wurde mit UV-Spektren der Wellenlänge von 220 nm bis 320 nm überprüft.

2.2.1.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleotiden

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleotiden erfolgte nach dem gleichen Messprinzip wie die der Nukleinsäuren (Kapitel IV, 2.2.1.1). Die Konzentration wurde jedoch mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes über den jeweiligen molaren Extinktionskoeffizienten ermittelt. Danach gilt:

$$c = E_{260} / (\epsilon_{260} \times d)$$

mit c als der Nukleinsäurekonzentration in M, E_{260} als der gemessenen Extinktion bei der Wellenlänge von 260 nm, ϵ_{260} als molaren

Extinktionskoeffizienten in $M^{-1}cm^{-1}$ bei 260 nm und der Schichtdicke d der Küvette in cm (hier: 1 cm).

Die folgende Tabelle gibt die molaren Extinktionskoeffizienten bei neutralem pH-Wert für verschiedene Nukleotide bei bestimmten Wellenlängen an (Fasman, 1979):

Nukleotid	molarer Extinktionskoeffizient ($M^{-1}cm^{-1}$)	Wellenlänge (nm)
ATP	15400	259
CTP	9100	271
GTP	13700	253
TTP	7400	260
ppGpp	13100	252

2.2.1.3 Bestimmung der Zelldichte von Flüssigkulturen

Das Bakterienwachstum wurde im Spektralphotometer (Beckmann, Typ DU 64) mittels Streumessung bei einer Wellenlänge von 600 nm verfolgt. Um im linearen Bereich messen zu können, wurden die Zellsuspensionen durch Verdünnung in YT-Medium (Kapitel IV, 1.6) auf OD-Werte von maximal 1.0 eingestellt.

2.2.1.4 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen erfolgte mit Hilfe des 'Bradford-Microassays' der Firma Bio Rad. Hierzu wurden 800 μ l Proteinlösung mit 200 μ l 'Dye-Reagenz' versetzt, 30 min bei RT inkubiert und anschließend bei 595 nm in einem Beckmann Spektralphotometer (Modell DU 64) vermessen. Gleichzeitig wurde mit Hilfe eines BSA-Standards verschiedener Konzentrationen eine Eichgerade ermittelt, anhand deren Geradengleichung die unbekannte Proteinkonzentration errechnet werden konnte.

2.2.1.5 Messung von Radioaktivität

Radioaktivitätsbestimmungen von ^{32}P -Proben wurden im Tritium-Kanal eines Beckmann LS 5000 TD Szintillationszählers ohne Szintillationsflüssigkeit durch Messung der Cerenkov-Strahlung durchgeführt.

2.2.2 Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren

2.2.2.1 Extraktion mit Phenol und Chloroform

Zur Entfernung von Proteinen aus einer wässrigen Nukleinsäurelösung wurde eine proteindenaturierende Phenol/Chloroform-Extraktion durchgeführt. Dazu wurden die Nukleinsäurelösungen mit einem Volumen Phenol/Chloroform (1:1) versetzt, mindestens 1 min lang gemischt und anschließend in einer Tischzentrifuge (Heraeus, Biofuge 15, 12000 rpm) bis zur Phasentrennung für 5 min zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß überführt, wohingegen die Interphase und die organische Phase verworfen wurden. Diese Extraktion wurde solange wiederholt, bis keine Interphase mehr vorhanden war.

Zur Entfernung von Phenolresten wurden die Proben im Anschluss zweimal mit einem Volumen Chloroform extrahiert.

2.2.2.2 Fällung von Nukleinsäuren

Zur Präzipitation von Nukleinsäurelösungen wurden diese mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5.5) und 2 bis 3 Volumen absolutem Ethanol (- 20°C) versetzt. Bei geringen Nukleinsäurekonzentrationen wurde zusätzlich Glykogen (1 µg/ml) als Fällungshilfe zugegeben. Die Fällung erfolgte für 30 bis 60 min bei - 20°C oder durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff. Danach wurden die gefällten Nukleinsäuren durch 30minütige Zentrifugation bei 12000 rpm (Heraeus, Biofuge 15) pelletiert. Der Niederschlag wurde einmal mit 80 %igem Ethanol gewaschen und nach erneuter Zentrifugation (Heraeus, Biofuge 15, 12000 rpm, 10-15 min) im Vakuumkonzentrator (Heto VR-1 Speedvac Concentrator) lyophilisiert. Die präzipitierten Nukleinsäuren wurden anschließend in einem geeigneten Volumen *Aqua dest.* oder TE-Puffer (Kapitel IV, 1.6) aufgenommen.

2.2.2.3 Dialyse von Nukleinsäurelösungen

DNA-Lösungen bis zu einem Volumen von 100 µl wurden mit Hilfe der Mikrotropfendialyse entsalzt. Hierzu wurden sterile Petrischalen mit 30 bis 40 ml Dialysepuffer gefüllt und der VS Millipore Membranfilter (Durchmesser 2,5 cm, Porengröße 0,025 µm) mit der glänzenden Seite nach oben auf die Flüssigkeitsoberfläche aufgesetzt. Anschließend wurde die zu dialysierende Probe auf den Membranfilter pipettiert. Die Dialyse erfolgte für bis zu 2 h bei Raumtemperatur (RT).

Die Dialyse größerer Volumina erfolgte im Dialyseschlauch über Nacht bei 4°C.

2.2.3 Isolation von DNA

2.2.3.1 Isolierung analytischer Mengen Plasmid-DNA

Zur schnellen analytischen Präparation von Plasmid-DNA wurde nach der von (Ish-Horowicz und Burke, 1981) beschriebenen Methode vorgegangen. Dazu wurde eine 3 ml üN-Kultur (Kapitel IV, 2.1.3) in zwei Schritten in einem Eppendorfgefäß zentrifugiert (5 min, 13000 rpm, Heraeus, Biofuge 15), das Zellpellet in 100 µl Lyselösung I sorgfältig resuspendiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl frisch angesetzter Lyselösung II und vorsichtigem Mischen folgten 5 min Inkubation auf Eis. Anschließend wurden 150 µl 3 M Kaliumacetat (pH 4.8), zum Einen zur Renaturierung der plasmidären DNA und zum Anderen zur Fällung von chromosomaler DNA und Zelltrümmern, zugesetzt, für 5 min auf Eis gehalten und für 10 min bei 12000 rpm (Heraeus, Biofuge 15) zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und es folgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion (Kapitel IV, 2.2.2.1) mit anschließender Ethanolpräzipitation (Kapitel IV, 2.2.2.2) der Plasmid-DNA mit 2 Volumen absolutem Ethanol für 15 min auf Eis. Nach der Lyophilisation (Heto VR-1 Speedvac Concentrator) wurde die Plasmid-DNA in 25 µl TE-Puffer (Kapitel IV, 1.6) resuspendiert und zur Hydrolyse von RNA mit DNase-freier RNase A in einer Endkonzentration von 20 µg/ml versetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Durch eine weitere Phenol/Chloroform-Extraktion wurde die RNase A aus der Lösung entfernt und die Plasmid-DNA wurde durch eine erneute Ethanolfällung aufkonzentriert. Die DNA wurde schließlich in 20 bis 25 µl TE-Puffer aufgenommen.

Lyselösung I	25 mM Tris-HCl, pH 8.0 50 mM Glukose 10 mM EDTA, pH 8.0 4 mg/ml Lysozymchlorid
--------------	---

Lyselösung II	200 mM NaOH 1 % (v/v) SDS
---------------	------------------------------

2.2.3.2 Präparative Isolation von Plasmid-DNA

Die präparative Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte nach der von Hillen *et al.* (Hillen *et al.*, 1981) beschriebenen Methode. Hierzu wurden 500 ml YT-Medium (Kapitel IV, 1.6), supplementiert mit dem entsprechenden Antibiotikum, mit 1/100 Volumen aus einer üN-Kultur angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt (New Brunswick Scientific Gio Gyrotory). Die so gewonnenen Zellen wurden durch Zentrifugation für 5 min (8000 rpm, 4°C, Beckmann Zentrifuge J2-21, Rotor JA-10) sedimentiert, das Zellpellet in 8 ml Saccharose-Lösung

vorsichtig resuspendiert und in ein Ti 55.2-Polycarbonatröhrchen (Beckmann) überführt. Nach Zugabe von 3 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0) und 3 ml Lysozymlösung wurde die Suspension 15 min auf Eis inkubiert, danach wurden 2 ml Brij-Doc-Lösung zugegeben und für weitere 10 min auf Eis inkubiert. Die Lösung wurde dann 30 min bei 44 000 rpm und 4°C zentrifugiert (Beckmann L8-55 Ultrazentrifuge, Rotor Ti 55.2), der klare Überstand in einen Messzylinder dekantiert, mit 50 µg RNase A/ml Überstand versetzt und 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 50 µg Proteinase K/ml Überstand wurde für weitere 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Plasmid-DNA durch Zugabe von 0.5 Volumen PEG-Lösung 30 min auf Eis gefällt und für 30 min bei 10000 rpm und 4°C pelletiert (Beckmann Zentrifuge J2-21, Rotor JA-17). Das erhaltenen DNA-Pellet wurde in 10 ml TE-Puffer (Kapitel IV, 1.6) resuspendiert und mindestens zweimal mit Phenol/Chloroform (Kapitel IV, 2.2.2.1) und einmal mit Chloroform extrahiert. Zur Aufkonzentrierung der DNA-Lösung folgte dann nach Zugabe von 0.1 Volumen 3 M NaOAc (pH 5.5) eine Fällung mit 2 Volumen absolutem Ethanol für 30 min bei - 20°C. Nach 30 min Zentrifugation (Heraeus Megafuge 1.0R), Waschen mit 80 % Ethanol und Trocknung des Pellets wurde die DNA schließlich in 0.3 bis 1.5 ml TE-Puffer (Kapitel IV, 1.6) gelöst.

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 Volumenteile 10 % (w/v) Brij 35 1 Volumenteil 10 % (w/v) Na-Deoxycholat in <i>Aqua dest.</i> , pH 8.0
RNase A	200 mg/ml RNase A in 100 mM NaOAc, pH 5.0 (die RNase wurde nach (Maniatis <i>et al.</i> , 1982) von DNase-Aktivität befreit)
Proteinase K	20 mg/ml in <i>Aqua dest.</i>
PEG-Lösung	30 % (w/v) PEG ₆₀₀₀ in 1.5 M NaCl

2.2.3.3 Isolation chromosomaler *E. coli* DNA

Für die Isolation chromosomaler *E. coli* DNA wurde eine 25 ml YT-Kultur (Kapitel IV, 1.6) mit 250 µl einer üN-Kultur des gewünschten Bakterienstammes angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ 0.8 bis 0.9 schüttelnd inkubiert. 2 ml wurden nacheinander in einem Eppendorfgefäß zentrifugiert (3 min, 13000 rpm, Heraeus Biofuge 1.5), das Pellet mit 200 µl Lösung I und 22 µl Proteinase K versetzt, resuspendiert und 10 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl

Lösung II wurde erneut 10 min bei RT inkubiert. Anschließend folgten 4 Phenol/Chloroform-Extraktionen (Kapitel IV, 2.2.2.1), wobei aufgrund der hohen Viskosität der wässrigen Phase und der ausgeprägten Interphase mindestens 30 min zentrifugiert wurde. Danach wurde die Probe zweimal mit Chloroform extrahiert und anschließend nach Zugabe von 1/10 Volumen 3 M NaOAc (pH 5.5) und 2 Volumen absolutem Ethanol über Nacht bei - 20°C präzipitiert. Das DNA-Pellet wurde in 50 µl TE-Puffer (Kapitel IV, 1.6) aufgenommen und nach Zugabe von 2.5 µl RNase A (200 µg/ml in 10 mM Tris-HCl, pH 8.0) 1 h bei 37°C inkubiert. Es folgte eine erneute Phenol/Chloroform- und Chloroform-Extraktion (Kapitel IV, 2.2.2.1).

Lösung I	50 mM Glukose 25 mM Tris-HCl, pH 8.0 10 mM EDTA, pH 8.0
Lösung II	1 % (w/v) SDS
Proteinase K	20 mg/ml in <i>Aqua dest.</i>

2.2.3.4 Isolierung analytischer Mengen RF-DNA des M13 Phagen

Die analytische Präparation von RF-DNA (RF = replikative Form) erfolgte nach der von (Ish-Horowicz und Burke, 1981) beschriebenen Methode. Dazu wurden 25 ml YT-Medium (Kapitel IV, 1.6) mit 1/100 Volumen einer *E. coli* üN-Kultur (Kapitel IV, 2.1.3) angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0.4 - 0.6 bei 37°C schüttelnd inkubiert. Danach wurde die Zellkultur mit 25 µl aus einem M13-Phagenstock versetzt und für weitere 4 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Suspension in zwei Schritten in einem Eppendorfgefäß sedimentiert (5 min, 13000 rpm, Hettich Tischzentrifuge). Die folgende Lyse der Bakterienzellen und die Isolation der M13-RF-DNA erfolgte nach der Vorschrift der analytischen Isolation plasmidärer DNA (Kapitel IV, 2.2.3.1).

2.2.3.5 Isolation analytischer Mengen ssDNA des M13 Phagen

Die analytische Isolierung von ssDNA erfolgte nach der von Maniatis *et al.* (1982) beschriebenen Methode. Hierzu wurden 3 ml YT-Medium (Kapitel IV, 1.6) mit einem Phagen-Plaques und 10 µl einer üN-Kultur (Kapitel IV, 2.1.3) angeimpft und mindestens 6 h bei 37°C geschüttelt (New Brunswick Scientific Gio Gyrotory). Die so gewonnene Kultur wurde anschließend auf Eppendorfgefäße verteilt und für 10 min durch Zentrifugation (8000 rpm, 4°C, Sigma MK202) sedimentiert. Ein Teil des Überstandes konnte als Phagenstock (Kapitel IV, 2.1.7) verwahrt werden.

Für die analytische Isolation von ssDNA wurden 1.2 -1.3 ml des Überstandes mit 200 µl 20 % PEG-Lösung versetzt, die ssDNA für 15 min bei RT gefällt und

danach zweimal für 5 min bei 12000 rpm (4°C, Sigma MK202) pelletiert. Das erhaltene Pellet wurde in 100 µl TES-Puffer (Kapitel IV, 1.6) aufgenommen und zweimal mit 100 µl Phenol/Chloroform (Kapitel IV, 2.2.2.1) und einmal mit Chloroform extrahiert. Danach wurde die ssDNA, nach Zugabe von 0.1 Volumen 3 M NaOAc (pH 5.5), mit 2 Volumen absolutem Ethanol für 20 min bei - 20°C gefällt. Nach 10minütiger Zentrifugation (12000 rpm, Sigma MK202), Waschen und Lyophilisation (Heto VR-1 Speedvac Concentrator) wurde das ssDNA-Pellet schließlich in 20 µl TE-Puffer (Kapitel IV, 1.6) gelöst. Die Ausbeuten lagen dabei bei 3 bis 6 µg ssDNA pro Milliliter infizierter Kultur.

PEG-Lösung 20 % (w/v) PEG₈₀₀₀ in 2.5 M NaCl

2.2.3.6 Präparative Isolierung von ssDNA aus M13 Phagen

Die präparative Isolation von ssDNA aus M13 Phagen erfolgte nach der von Maniatis *et al.* (1982) beschriebenen Methode. Danach wurden 250 ml YT-Medium (Kapitel IV, 1.6) mit 1/100 Volumen aus einer üN-Kultur und 100 bis 200 µl Phagen (10^{12} pfu) angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt (New Brunswick Scientific Gio Gyrotory). Die so gewonnene Kultur wurde für 30 min durch Zentrifugation (6500 rpm, 4°C, Beckmann J2-21, Rotor JA-14) sedimentiert, der Überstand in JA-10-Becher überführt und die Phagen mit 10 g PEG₈₀₀₀ und 7.5 g NaCl für 30 min bis 1 h bei RT durch Rühren gefällt. Anschließend wurde die gefällte Phagen-DNA durch Zentrifugation bei 10000 rpm für 20 min (Beckmann J2-21, 4°C, Rotor JA-10) pelletiert, der Überstand sorgfältig abgegossen und das Zentrifugengefäß für 2 bis 3 min umgekehrt stehen gelassen, damit der Überstand vollständig ablaufen konnte. Der restliche Überstand wurde vorsichtig mit einem Tuch ausgewischt. Das Pellet wurde in 10 ml 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) resuspendiert und die Phagensuspension in Falcon-Röhrchen überführt.

Zur Entfernung der ssDNA-bindenden Proteine erfolgte eine Extraktion mit 1 Volumen TE-gesättigtem Phenol, Phenol/Chloroform-Extraktionen (Kapitel IV, 2.2.2.1) bis keine Interphase mehr sichtbar war und abschließend wurde eine Chloroform-Extraktion durchgeführt.

Im Anschluss wurde die ssDNA-Lösung durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M NaOAc (pH 5.5) und 2 Volumen absolutem Ethanol für 60 min bei - 20°C gefällt. Nach 20minütiger Zentrifugation (6000 rpm, Heraeus Kühlzentrifuge, Megafuge 1.0 R) bei 4°C, Waschen und Lyophilisation (Heto VR-1 Speedvac Concentrator) wurde das DNA-Pellet schließlich in 1 ml TE-Puffer (Kapitel IV, 1.6) aufgenommen. Die Ausbeuten lagen zwischen 350 µg bis 1 mg ssDNA pro 250 ml infizierter Kultur.

2.2.4 Enzymatische Reaktionen

2.2.4.1 Restriktionshydrolysen

Bei allen in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzymen handelt es sich um Endonukleasen vom Typ II (Zabeau, 1979), bei welchen die Erkennungs- und Spaltungssequenz übereinstimmen. Die hydrolytische Spaltung doppelsträngiger DNA führte, abhängig von der eingesetzten Restriktionsendonuklease, entweder zu glatten oder zu 3'- bzw. 5'-überhängenden Enden an den resultierenden dsDNA-Fragmenten. Die hier benutzten Restriktionsenzyme wurden den Herstellerangaben entsprechend eingesetzt. Zum Stoppen der Reaktion wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt (Kapitel IV, 2.2.2.1). Die entstandenen Restriktionsfragmente wurden anschließend auf Agarose- (Kapitel IV, 2.2.5.1) bzw. Polyacrylamidgelen (Kapitel IV, 2.2.5.2) analysiert.

2.2.4.2 Dephosphorylierung von 5'-DNA-Enden

Die Dephosphorylierung von 5'-DNA-Enden erfolgte mit Hilfe der alkalischen Phosphatase (CIP). Hierzu wurden 2 pmol DNA-Enden mit 1 Unit (U) alkalischer Phosphatase in 1x CIP-Puffer (Maniatis *et al.*, 1982) für 30-60 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde mittels zweimaliger Phenol/Chloroform-Extraktion (Kapitel IV, 2.2.2.1) gestoppt. Die dephosphorylierte DNA wurde anschließend durch eine Ethanol-fällung (Kapitel IV, 2.2.2.2) aufkonzentriert und für den weiteren Gebrauch in TE-Puffer (Kapitel IV, 1.6) aufgenommen.

1x CIP-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 8.3
	1 mM ZnCl ₂
	1 mM MgCl ₂

2.2.4.3 Ligation von DNA-Fragmenten mit T4 DNA-Ligase

Für die Ligation zweier Nukleinsäuremoleküle wurden die DNA-Fragmente in einem molaren Vektor zu Fragment bzw. Insert Verhältnis von 1:10 bis 1:30 über Nacht bei 20°C mit 1 U der T4 DNA-Ligase in 1x Ligasepuffer inkubiert. Das Reaktionsvolumen betrug dabei 10 µl und von dem Vektor wurden je 20 ng eingesetzt.

1x Ligasepuffer:	66 mM Tris-HCl, pH 7.5
	5 mM MgCl ₂
	1 mM DTT
	1 mM ATP

2.2.4.4 Klenow-Reaktion zum Auffüllen überhängender 5`-DNA-Enden

Mit Hilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase I können, aufgrund der fehlenden 5`-3`-Exonukleaseaktivität, doppelsträngige DNA-Fragmente mit 5`-überhängenden Enden mit den entsprechend komplementären Nukleotiden aufgefüllt werden.

Reaktionsansatz	x µl DNA (max. 1 µg) 2,5 µl 10x NTB ('nick-translation-buffer') je 1 µl 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP 1 µl Klenow-Enzym (5 U/µl) ad 25 µl <i>Aqua dest.</i>
10x 'nick-translation-buffer'	500 mM Tris-HCl, pH 7.2 100 mM MgSO ₄ 1 mM DTT 500 µg/ml BSA

Der Reaktionsansatz wurde für 30 min bei RT inkubiert, anschließend zweimal mit Phenol/Chloroform extrahiert (Kapitel IV, 2.2.2.1) und dann mit 2 Volumen absolutem Ethanol gefällt (Kapitel IV, 2.2.2.2). Das lyophilisierte Pellet wurde in TE-Puffer (Kapitel IV, 1.6) aufgenommen.

Die oben beschriebene Klenow-Reaktion kann durch den Einbau von [³²P]-dNTPs auch zur radioaktiven Endmarkierung von DNA-Fragmenten genutzt werden. Dazu wurde im Reaktionsansatz die Zugabe von einem NTP durch 10 µCi des entsprechenden [³²P]-Nukleotids (3000 Ci/mmol) ersetzt.

2.2.4.5 Radioaktive Markierung einzelsträngiger DNA-Oligonukleotide

Synthetisierte ssDNA-Oligonukleotide wurden in einer direkten Phosphorylierungsreaktion, durch Übertragung der γ -Phosphatgruppe des [³²P]-ATP auf die freie 5`-Hydroxylgruppe markiert. In einem Reaktionsansatz von insgesamt 20 µl wurden 10 pmol Oligonukleotid mit 5 µl 2 µM [³²P]-ATP (50 µCi; 5000 Ci/mmol) und 1 U T4-Polynukleotidkinase für 45 min bei 37°C in 1x Kinasepuffer inkubiert. Anschließend folgte eine Inkubation für 10 min bei 68°C, wodurch die Reaktion aufgrund der Hitzeinaktivierung des Enzyms gestoppt wurde.

Die kinasierten Oligonukleotide wurden nach Zugabe von 1/10 Volumen 7.5 M NH₄OAc (pH 5.0), 1/20 Volumen Glykogen (20 µg/ml) und 5 Volumen absolutem Ethanol in flüssigem Stickstoff gefällt und für 30 min bei 12000 rpm (Heraeus, Biofuge A) pelletiert. Nach zweimaligem Waschen der Pellets mit 80 % Ethanol und anschließender Lyophilisation (Savant Speedvac Concentrator) wurden die Proben in 20 µl TE-Puffer (Kapitel IV, 1.6)

aufgenommen und für mindestens 2 h auf einem Eppendorfschüttler (Mixer 5432) resuspendiert.

Zur Bestimmung der Reaktionseffizienz wurde 1 µl dieser Lösung im Szintillationszähler gemessen (Kapitel IV, 2.2.1.5).

1x Kinasepuffer	50 mM Tris-HCl, pH 7.6
	10 mM MgCl ₂
	5 mM DTT
	0.1 mM EDTA, pH 8.0
	0.1 mM Spermidin

2.2.4.6 Amplifikation von DNA mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)

Dieses von (Mullis und Faloona, 1987) beschriebene Verfahren ist eine *in vitro* Methode zur enzymatischen Synthese spezifischer DNA-Sequenzen. Mit Hilfe zweier synthetischer Oligonukleotide (Primer), welche an die flankierenden Bereiche der beiden gegenüberliegenden Stränge der Ziel-DNA hybridisieren, ist es möglich, durch wiederholte Zyklen der DNA-Denaturierung, Oligonukleotidbindung und Verlängerung der gebundenen Oligonukleotide geringste Mengen an Ziel-DNA exponentiell zu amplifizieren.

Die PCR erfolgte entweder mit der temperaturstabilen *Taq*-DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* oder der *Pfu*-DNA-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus*, welche neben der Hitzestabilität eine 3'→5'-Exonukleaseaktivität besitzt und durch dieses 'proofreading' eine höhere Genauigkeit als die *Taq*-DNA-Polymerase erreicht. In den Reaktionsansatz wurden jeweils 5 U der *Taq*-DNA-Polymerase bzw. 1.25 U der *Pfu*-DNA-Polymerase eingesetzt, die Zugabe erfolgte nach dem ersten Denaturierungsschritt (siehe Reaktionsprofil) der Matrizen-DNA.

Für die Reaktion wurden Matrizen-DNA (50 ng Plasmid-DNA bzw. 250 ng chromosomale DNA), jeweils 5-40 pmol der jeweiligen Oligonukleotide (Kapitel IV, 1.4.2) und 5 µl dNTP-Lösung in 1x PCR-Puffer in einem Gesamtvolumen von 50 µl gemischt, mit 50 µl Paraffinöl überschichtet und in einem Landgraf Thermocycler folgendem Reaktionsprofil unterzogen:

1. 2 min 94°C (Denaturierung)
2. + 5 U *Taq*-Polymerase bzw.
+ 1.25 U *Pfu*-DNA-Polymerase
3. 1 min 94°C (Denaturierung)
60 sec T_m-Wert minus 5 bis 10°C
(Hybridisierung)
60 sec 72°C (Primerverlängerung)
→ 25-30 Zyklen
4. 10 min 72°C (Verlängerung)
5. 100 min 4°C (langsames Abkühlen)

Die gewählte Annealingtemperatur ist abhängig von der Schmelztemperatur (T_m -Wert) der Primer und sollte 5-10°C unter dem T_m -Wert liegen. Die Berechnung der Schmelztemperaturen erfolgte nach einer von Maniatis *et al.* (1982) angegebenen Formel:

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

mit L der Länge des Oligonukleotids.

Nach Durchlaufen der Reaktionszyklen wurde das Paraffin abgehoben und das PCR-Produkt gereinigt. Dies geschah durch zweifache Extraktion mit Phenol/Chloroform, einer Extraktion mit Chloroform (Kapitel IV, 2.2.2.1) und anschließender Ethanolfällung (Kapitel IV, 2.2.2.2). Nach dem Trocknen des Pellets wurde dieses in TE-Puffer (Kapitel IV, 1.6) aufgenommen und entweder über ein präparatives Agarosegel mit anschließender Gelelution (Kapitel IV, 2.2.7) der PCR-Produkte oder mittels Spin Columns (QIAquick PCR Purification Kit, QIAGEN) aufgereinigt.

Die Aufreinigung der PCR-Produkte über Spin Columns erfolgte nach den Herstellerangaben. Diese Methode zur Reinigung einzelsträngiger und doppelsträngiger DNA (0.1-10 kb) beruht auf einer speziellen Silicagel-Membran, die in geeigneten Bindungspuffern bis zu 10 µg DNA adsorbiert. Für die Trennung der PCR-Produkte von den Primern, Nukleotiden und der *Taq*-Polymerase bzw. *Pfu*-DNA-Polymerase wurde der Reaktionsansatz (50 µl) mit 500 µl PB-Puffer (QIAGEN, enthält kaotrope Salze) gemischt, auf die Säule gegeben und für 30-60 sec bei 12000 rpm (Heraeus Biofuge 15) zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen und die an die Säule gebundene Nukleinsäure zweimal mit 750 µl PE-Puffer (QIAGEN, enthält Ethanol) durch erneute Zentrifugation für 30-60 sec bei 12000 rpm gewaschen. Zur Entfernung von Pufferrückständen wurde die Säule nach dem letzten Waschschrift nochmals für 60 sec bei 12000 rpm zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Elution der Nukleinsäure mit 50 µl TE-Puffer (Kapitel IV, 1.6), dazu wurde der Puffer auf die Mitte der Säule gegeben und erneut für 60 sec bei 12000 rpm zentrifugiert.

dNTP-Lösung	je 2 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP
1x <i>Taq</i> -Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 9.0 50 mM KCl 1.5 mM MgCl ₂ 0.1 % Triton X-100
1x <i>Pfu</i> -Puffer	10 mM KCl 20 mM Tris-HCl, pH 8.8 10 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 2 mM MgSO ₄ 100 µg/ml BSA 0.1 % Triton X-100

2.2.4.7 DNA-Sequenzierung nach Sanger

Die Sequenzierung von ssDNA und dsDNA nach der Sanger-Methode (Sanger *et al.*, 1977) wurde mit Hilfe des 'Sequenase Kit Version 2.0' nach der Vorschrift der Firma USB durchgeführt. Doppelsträngige DNA musste vor der Sequenzierung denaturiert werden. Für diese Denaturierung wurden 0.06–1 µg DNA-Fragmente bzw. Plasmid-DNA in 16 µl *Aqua dest.* nach Zugabe von 4 µl 1 N NaOH für 10 min bei 37°C inkubiert und anschließend durch Zugabe von 6 µl 3 M NaOAc (pH 5.5) und 60 µl absolutem Ethanol in flüssigem Stickstoff präzipitiert. Das Pellet wurde nach zweimaligem Waschen mit 80 % Ethanol und Lyophilisation (Heto VR-1 Speedvac Concentrator) entweder für eine spätere Verwendung bei - 20°C gelagert oder in 7 µl *Aqua dest.* aufgenommen und sofort zur Hybridisierung eingesetzt.

Die ssDNA des M13 Phagen aus einem präparativen Isolationsansatz konnte ohne vorherige Denaturierung in die Hybridisierung eingesetzt werden. Es wurde jeweils 1 µg ssDNA sequenziert, die mit *Aqua dest.* ebenfalls auf ein Volumen von 7 µl eingestellt wurde. Für die Hybridisierung wurde wie folgt vorgegangen: Nach Zugabe von 2 µl 'Sequenase-Reaction-Buffer' und 1 µl Sequenzier-Oligonukleotid (0.1-0.4 pmol/µl) zu der DNA wurde dieser Hybridisierungsansatz 2 min bei 65°C inkubiert und dann langsam (1°C/min) auf RT abgekühlt.

Für die anschließende Markierungs- bzw. Abbruchreaktion wurde der Markierungsansatz auf Eis vorbereitet, mit dem abgekühlten Hybridisierungsansatz vermischt und 3 min bei RT inkubiert. Nach 2 min wurden je 2.5 µl A, C, G, T-Lösung für 1 min bei 37°C vorinkubiert, bevor jeweils 3.5 µl des Markierungs-/Hybridisierungsansatzes zugegeben wurden. Es folgte eine Inkubation für 5 min bei 37°C. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 4 µl 'Stop-Solution' beendet, die Proben 3 min bei 96°C denaturiert und auf Eis überführt. Die Auftrennung erfolgte auf denaturierenden 10 % Polyacrylamidgelen (Kapitel IV, 2.2.5.3).

Für die Sequenzierung von kurzen DNA-Fragmenten (<100 bp) wurde dem Markierungsansatz 1 µl Mn-Puffer zugesetzt.

Erfolgte die Sequenzierung mit zuvor radioaktiv endmarkierten Oligonukleotiden (Kapitel IV, 2.2.4.5), so wurden dem Markierungsansatz statt des [32 P]-dATP 0.5 µl 3.3 µM nicht-markiertes dATP zugesetzt.

'Sequenase-Reaction-Buffer'	200 mM Tris-HCl, pH 7.5 100 mM MgCl ₂ 250 mM NaCl
-----------------------------	--

Markierungsansatz	1 µl 0.1 M DTT 2 µl 'Labeling-Mix' (je 7.5 µM dCTP, dGTP, dTTP; 1:5 verdünnt in <i>Aqua dest.</i>) 0.5 µl [32 P]-dATP (5 µCi), 3000 Ci/mmol 2 µl Sequenase 2.0 (1:8 verdünnt in 'Enzyme-Dilution-Buffer')
-------------------	---

'Enzyme-Dilution-Buffer'	10 mM Tris-HCl, pH 7.5 5 mM DTT 0.5 mg/ml BSA
A-, C-, G-, T-Lösung	50 mM NaCl je 80 μ M dATP, dCTP, dGTP, dTTP zusätzlich je 8 μ M des ihrer Bezeichnung entsprechende ddNTP
'Mn-Buffer'	0.15 M Na-Citrat 0.1 M MnCl ₂

2.2.5 Gelelektrophorese

2.2.5.1 Agarose-Gelelektrophorese

Zur analytischen und präparativen Auftrennung doppelsträngiger und einzelsträngiger DNA im Bereich von 0.1 kb bis 10 kb wurden horizontale Agarosegele verwendet (Maniatis *et al.*, 1982). Dazu wurde die Agarose in Konzentrationen von 0.8 % bis 2.0 % (w/v) in 1x TAE-Puffer (Kapitel IV, 1.6) durch dreimaliges Aufkochen gelöst, nach Abkühlung auf ca. 60°C mit 0.5 μ g/ml Ethidiumbromid versetzt und als Flachbettgel (14 cm x 11 cm) gegossen. Nach Verfestigung der Gelmatrix wurde das Agarosegel in der Elektrophoresekammer mit 1x TAE-Puffer (Kapitel IV, 1.6), der ebenfalls mit 0.5 μ g/ml Ethidiumbromid versetzt wurde, überschichtet. Die DNA-Proben wurden mit 1 Volumen 2x TAE-Probenpuffer (Kapitel IV, 1.6) gemischt, unterschichtend in die ausgesparten Geltaschen pipettiert und bei einer Spannung von ca. 0.6 V/cm elektrophoretisch aufgetrennt.

Die Visualisierung der DNA erfolgte anschließend über die Fluoreszenz des interkalierten Ethidiumbromids bei Bestrahlung mit langwelligem UV-Licht (302 nm) auf einem UV-Transluminator (Herolab UVT 2035). Zur Dokumentation wurden die Gele über eine SW-Kamera (Sanyo B/W CCD Kamera, Model VC25-12) mit entsprechendem Filter aufgenommen und mit Hilfe eines Videoprinters ausgedruckt.

2.2.5.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) von Nukleinsäuren unter nativen Bedingungen

Durch Kopolymerisation von Acrylamid und Methylenbisacrylamid als Vernetzungsreagens erhält man stabile und inerte hydrophile Gele. Die Porengröße und damit der Auftrennungsbereich wird durch die Acrylamidkonzentration und den Vernetzungsgrad definiert.

Die Polymerisation erfolgte durch eine Radikalkettenreaktion. Hier diente N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) als Polymerisationskatalysator

und Ammoniumperoxodisulfat ((NH₄)₂S₂O₈, APS), welches in wässriger Lösung freie SO₄⁻-Radikale bildet, als Polymerisationsstarter. Die verwendeten Glasplatten wurden vor jedem Gebrauch schrittweise mit 0.1 % SDS, *Aqua dest.* und Ethanol gereinigt.

Zur Auftrennung kurzer DNA-Fragmente wurden Polyacrylamid-Gelelektrophoresen unter nativen Bedingungen durchgeführt. Je nach benötigten Auftrennungsbereich wurden aus einer 40 %igen Acrylamid-stammlösung (Acrylamid/Bisacrylamid 19+1, 1 h mit Mixed Bed Resin TMD-8 vorsichtig gerührt und durch Faltenfilter abfiltriert) Gellösungen verschiedener Prozentigkeit hergestellt (Maniatis *et al.*, 1982). Als Gel- und Elektrophoresepuffer diente 1x TBE-Puffer (Kapitel IV, 1.6). Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 0.06 % (v/v) TEMED und 0.6 % (v/v) 10 % APS gestartet; die Polymerisationszeit betrug mindestens 30 min. Die DNA-Proben wurden mit 1 Volumen 2x TBE-Probenpuffer (Kapitel IV, 1.6) versetzt und für 2 bis 4 h bei 200 V bzw. 20 mA bei RT elektrophoretisch getrennt.

Der Nachweis der Nukleinsäuren erfolgte durch Silberfärbung (Kapitel IV, 2.2.6.1). Zur Dokumentation wurden die Gele mit einem Durchlichtscanner (Hewlett Packard, Scan Jet 4c/T) eingescannt.

2.2.5.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) von Nukleinsäuren unter denaturierenden Bedingungen

Zur Produktanalyse von *in vitro* Transkriptionen, Primer-Extension-Reaktionen, Footprint-Analysen und DNA-Sequenzierungen wurden denaturierende Polyacrylamidgele mit einer Prozentigkeit zwischen 10 % und 15 % verwendet. Als denaturierendes Agens wurde der Gellösung 7 M Harnstoff zugesetzt.

Die Dimension des Gels betrug 390 x 335 x 0.4 mm. Vor der Benutzung wurden die Glasplatten mit 0.1% SDS, *Aqua dest.*, Aceton und Ethanol gereinigt und durch Behandlung mit 0.04% Dimethyldichlorsilan in 1,1,1-Trichlorethan (Repelcote) silikonisiert. Die Gellösung wurde vor dem Gießen des Gels ca. 3 min entgast. Als Elektrophoresepuffer diente 1x TBE-Puffer (Kapitel IV, 1.6). Die aufzutrennenden Nukleinsäureproben wurden in Formamid-Probenpuffer (Kapitel IV, 1.6) aufgenommen, vor dem Auftrag 3 min bei 96°C denaturiert und anschließend sofort auf Eis überführt. Die Gele wurden vor dem Probenauftrag in drei Schritten von jeweils 10 min auf eine konstante Leistung von 75 W gebracht. Die Dauer der Elektrophorese betrug je nach Länge der zu analysierenden Fragmente 1 bis 4 h.

Gellösung (10 %)	42 g Harnstoff
	10 ml 10x TBE-Puffer (Kapitel IV, 1.6)
	25 ml 40 % Acrylamid-Stammlösung (19+1)
	ad 100 ml <i>Aqua dest.</i>

2.2.5.4 Diskontinuierliche SDS-PAGE

Zur Auftrennung von Proteinen in Abhängigkeit ihres Molekulargewichtes wurde die diskontinuierliche Gelelektrophorese nach (Laemmli, 1970) durchgeführt. Als denaturierendes Agens diente Natriumdodecylsulfat (SDS), welches als amphiphiles Detergens die native Proteinstruktur auffaltet. Die Geldimension betrug 180 x 165 x 1 mm, die Proteine wurden zunächst in einem Sammelgel (ca. 30 x 180 mm) fokussiert und dann in einem Trenngel (ca. 130 x 180 mm) aufgetrennt.

Dazu wurden die Proteinproben (ca. 0.05 - 2 µg Protein in 10-20 µl) mit 5 µl β-Mercaptoethanol und 10 µl Probenpuffer vermischt und 5 min aufgeköcht. Die Elektrophorese erfolgte zu Beginn bei einer Spannung von 60 V, bis der Bromphenolblau-Marker die Grenzschicht zwischen Sammel- und Trenngel erreicht hatte. Danach wurde die Spannung auf 120 V erhöht (5-6 h). Erfolgte die Elektrophorese über Nacht, so wurde die Spannung konstant bei 60 V gehalten.

Lösung A (30 % Acrylamidlösung)	300 g/l Acrylamid 8 g/l Bisacrylamid mit Amberlit deionisiert und filtriert
------------------------------------	---

Lösung B	1.5 M Tris-HCl, pH 8.8
----------	------------------------

Lösung C	10 % (w/v) SDS
----------	----------------

Lösung D	500 mM Tris-HCl, pH 6.8
----------	-------------------------

Elektrophoresepuffer	28.8 g/l Glycin 6 g/l Tris 1 g/l SDS mit HCl auf pH 8.8 einstellen
----------------------	---

Probenpuffer	2.5 ml Lösung D 2 ml Lösung C 2 ml Glycerin 0.1 ml 0.1 % (w/v) Bromphenolblau 3.4 ml <i>Aqua dest.</i>
--------------	--

Für ein 15 % SDS-Gel wurde wie folgt vorgegangen:

15 % Trenngel	50 ml Lösung A 25 ml Lösung B 1 ml Lösung C ad 100 ml <i>Aqua dest.</i>
---------------	--

6 % Sammelgel	2 ml Lösung A
	0.1 ml Lösung C
	2.5 ml Lösung D
	5.4 ml <i>Aqua dest.</i>

2.2.6 Nachweis von Nukleinsäuren und Proteinen in Polyacrylamidgelen

2.2.6.1 Silberfärbung von Nukleinsäuren

Die von (Beidler *et al.*, 1982) beschriebene Methode der Silberfärbung erlaubt den Nachweis von Nukleinsäuren im Nanogrammbereich.

Nach der Elektrophorese wurden die Nukleinsäuren in Fixierer I unter leichtem Schütteln (Gerhardt Schüttelmaschine LS 10) für mindestens 5 min fixiert und danach für 9 min in der Färbelösung gefärbt. Anschließend wurde drei- bis viermal für 30 bis 60 sec mit *Aqua dest.* gewaschen, in frisch angesetztem Entwickler bis zur gewünschten Intensität entwickelt und der Prozess durch 10minütige Inkubation mit Fixierer II gestoppt. Zur Lagerung wurde das Gel in Folie eingeschweißt und zur Dokumentation mit einem Durchlichtscanner (Hewlett Packard, Scan Jet 4c/T) eingescannt.

Fixierer I	10 % Ethanol
	0.5 % Essigsäure
Färbelösung	0.19 % (w/v) Silbernitrat
Entwickler	15 g/l NaOH
	0.08 g/l Natriumborhydrid (NaBH ₄)
	0.148 % (v/v)Formaldehyd (CH ₂ O)
Fixierer II	0.75 % (w/v) Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)

2.2.6.2 Silberfärbung von Proteinen

Der Nachweis von Proteinen in Polyacrylamidgelen durch Silberfärbung erfolgte nach der von Blum *et al.* (Blum *et al.*, 1987) beschriebenen Methode. Hierzu wurde das Gel nach abgeschlossener Elektrophorese für mindestens 3 h in Fixierer I unter leichtem Schütteln fixiert. Danach wurde das Gel zweimal für 10 min in 50 % Methanol und einmal für 10 min in 30 % Ethanol gewaschen. Anschließend folgte zur Verstärkung der Signale eine Inkubation in einer Natriumthiosulfatlösung (0.2 g/l) für 1 min. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 20 sec mit *Aqua dest.* wurde das Gel für 20 min in der Färbelösung inkubiert. Dann wurde das Gel bis zur gewünschten Bandenintensität in

Entwickler geschwenkt und die Reaktion durch 10 min Inkubation in Fixierer II gestoppt.

Fixierer I	50 % (v/v) Methanol 12 % (v/v) Essigsäure 0.0185 % (v/v) Formaldehyd (37 %)
Färbelösung	2 g/l Silbernitrat 0.028 % (v/v) Formaldehyd
Entwickler	60 g/l Natriumcarbonat 0.04 g/l Natriumthiosulfat 0.0185 % (v/v) Formaldehyd (37 %) (immer frisch angesetzt)
Fixierer II	25 % (v/v) Methanol 12 % (v/v) Essigsäure

2.2.6.3 Autoradiographie

Der Nachweis radioaktiv markierter Proben in Polyacrylamidgelen erfolgte über die Belichtung von Röntgenfilmen. Die Gele wurden dazu nach der Elektrophorese auf einen alten Röntgenfilm bzw. auf Whatman 3MM Papier aufgezogen, mit Polyethylenfolie bedeckt und in eine Expositionskassette (Siemens) eingepasst. Danach wurde in der Dunkelkammer ein Röntgenfilm (FUJI RX oder Kodak X-OMAT AR) und, falls nötig, zusätzlich eine Verstärkerfolie aufgelegt. Die Exposition erfolgte je nach Strahlungsintensität der Proben für 1 h 30 min bis 10 Tage bei - 20°C bzw. - 70°C (Exposition mit Verstärkerfolie). Die Entwicklung der Filme erfolgte in einem Tetenal Roentogen Entwicklerbad für 2 bis 5 min. Der Entwicklungsprozess wurde in 3 % (v/v) Essigsäure gestoppt, anschließend wurde in einem Tetenal Roentgen Fixierbad für 2 bis 5 min fixiert. Abschließend wurden die Filme mit Leitungswasser gewaschen und bei 37°C luftgetrocknet.

2.2.6.4 Densitometrie

Zur quantitativen Analyse der Autoradiographien (Röntgenfilme) wurden diese mit Hilfe eines Durchlichtscanners (Hewlett Packard, Scan Jet 4c/T) eingescannt und mit der Quantifizierungssoftware 'Scion Image' (Release Beta 3b, Scion Corporation) ausgewertet.

Zudem wurden zur Quantifizierung von radioaktiv markierten Nukleinsäuren Phosphoimager-Screens verwendet. Die Exposition dieser Screens (41 x 23.5 cm) erfolgte methodisch wie bei der Autoradiographie mit Röntgenfilmen, jedoch fand die Belichtung bei RT statt. Anschließend wurden die Screens mit

einem Phosphoimager gescannt (Biolumager FAS 3000) und mit Hilfe der Computersoftware *Image Reader Fla. V.18 E* und *Image Gauge V3.0* ausgewertet.

2.2.6.5 Northern-Blotting

Die Methode des Northern-Blotting ist ein Kapillartransfer-Verfahren zur Übertragung gelelektrophoretisch aufgetrennter RNA auf eine Membran aus Nitrocellulose oder Nylon (Sambrook *et al.*, 1989). Der Northern-Transfer wurde zum Nachweis von *in vitro* Transkriptionsprodukten (Kapitel IV, 2.3.4.1.2) ausgenutzt. Hierzu wurde die in denaturierenden 15 % PAA-Gelen (Kapitel IV, 2.2.5.3) aufgetrennte RNA unmittelbar nach der Elektrophorese in Gegenwart von 5x SSC-Puffer auf eine Nylonmembran ('Hybond N', AMERSHAM) übertragen. Der Kapillartransfer dauerte ca. 14-16 h. Anschließend wurde die transferierte RNA mit UV-Licht (120 mJ) in einer UV-Crosslink-Apparatur ('Stratalinker', STRATGENE) kovalent fixiert.

Danach wurde die Membran in eine Hybridisierungsreaktion mit einer ³²P-markierten Oligonukleotidsonde eingesetzt. Die Hybridisierung wurde in einem Hybridisierungssofen (Fa. BIOMETRA) in um die Längsachse rotierenden Glasflaschen durchgeführt. Dazu wurde die Nylonmembran mit der RNA-Seite nach innen auf eine Glaspipette aufgerollt und an der Innenwand der Glasflasche vorsichtig abgerollt. Nach Zugabe von 50 ml Hybridisierungslösung erfolgte eine Vorhybridisierung für mindestens 2 h im Hybridisierungssofen bei einer Hybridisierungstemperatur von 8°C unterhalb des, nach der von Maniatis *et al.* (1982) beschriebenen Formel (Kapitel IV, 2.2.4.6), berechneten T_m-Wertes der Sonde. Die eigentliche Annealingreaktion erfolgte durch Zugabe der Oligonukleotidsonde (ca. 3 x 10⁶ cpm) und dauerte 12-16 h. Anschließend wurden überschüssige sowie unspezifisch gebundene Sondenmoleküle durch dreimaliges Waschen für 30 min mit jeweils 50 ml Waschlösung entfernt.

Zum Nachweis der gebundenen ³²P-Oligonukleotidsonden wurde die Membran in Polyethylenfolie eingeschlagen und autoradiographiert (Kapitel IV, 2.2.6.3).

20x SSC-Puffer	3 M NaCl	
	0.3 M Trinatriumcitrat	
	ad pH 7.0 mit HCl	
(Vor-)Hybridisierungslösung	5x	SSC-Puffer
	7.5 % (w/v)	SDS
	50 µg/ml	Heringssperm-DNA
Waschlösung	5x	SSC-Puffer
	0.1 % (w/v)	SDS

2.2.7 Präparative DNA-Gelelution

2.2.7.1 DNA-Gelelution aus Agarosegelen nach der 'freeze-squeeze'-Methode

Bei der präparativen Elution von dsDNA-Fragmenten aus Agarosegelen (Seakem, ultrapure) wurde nach der von Silhavy *et al.* (Silhavy, 1984) beschriebenen 'freeze-squeeze'-Methode verfahren.

Nach der Elektrophorese wurde die zu isolierende Bande mit Hilfe eines sterilen Skalpell's ausgeschnitten und durch eine Spritze ohne Kanüle, je nach Größe des Gelstückes, in ein oder mehrere Eppendorf-Reaktionsgefäße bzw. Greiner-Röhrchen gepresst. Anschließend wurde die Spritze dem Gelvolumen entsprechend mit 0.6 bis 3.5 ml Phenol gewaschen und die zerkleinerte Agarose damit überschichtet. Nach sorgfältigem vortexen für ca. 5 min wurde die Probe für 5 bis 15 min bei -70°C eingefroren und nach dem Auftauen für 15 min bei 12000 rpm (Heraeus, Biofuge 15) bzw. 6000 rpm (Heraeus Kühlzentrifuge, Megafuge 1.0 R) zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Phenolphase erneut insgesamt zweimal mit 0.3 bis 1 ml TE-Puffer (Kapitel IV, 1.6) versetzt, für 1 min gevortext, 5 bis 15 min bei -70°C eingefroren und für 15 min zentrifugiert (s.o.). Die wässrigen Phasen wurden vereinigt und einmal mit Phenol/Chloroform (Kapitel IV, 2.2.2.1), dann mit Chloroform extrahiert. Anschließend wurde die Nukleinsäure durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M NaOAc (pH 5.5) und 2-3 Volumen absolutem Ethanol präzipitiert (Kapitel IV, 2.2.2.2). Nach dem Waschen mit 80 % Ethanol und Lyophilisation (Heto VR-1 Speedvac Concentrator) wurde das Pellet in TE-Puffer (Kapitel IV, 1.6) aufgenommen. Die Ausbeuten lagen bei 50-95 %.

Im Anschluss wurde zur Entsalzung der Proben eine Mikrotropfendialyse (Kapitel IV, 2.2.2.3) durchgeführt.

2.2.7.2 DNA-Gelelution aus Agarosegelen mittels Zentrifugation über silikonisierte Glaswolle

Alternativ erfolgte die Elution aus Agarosegelen über silikonisierte Glaswolle. Dazu wurde in den Boden eines Eppendorf-PCR-Gefäßes mit einer heißen Kanüle ein kleines Loch (~1 mm Durchmesser) gestochen und danach etwa ein Viertel des Reaktionsgefäßes mit silikonisierter Glaswolle, die dicht gepackt wurde, befüllt und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gestellt.

Die zu isolierende Bande wurde nach der Elektrophorese mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und in ein zuvor präpariertes Eppendorf-PCR-Gefäß überführt. Die Elution der Nukleinsäure erfolgte durch zweimalige Zentrifugation über die Glaswolle (Heraeus Biofuge 15, 12000 rpm, 5 min). Im Anschluss wurde das Eluat zweimal mit Phenol/Chloroform und einmal mit Chloroform (Kapitel IV, 2.2.2.1) extrahiert, durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M NaOAc (pH 5.5) und 2-3 Volumen absolutem Ethanol präzipitiert (Kapitel IV, 2.2.2.2),

mit 80 % Ethanol gewaschen, lyophilisiert und in TE-Puffer (Kapitel IV, 1.6) aufgenommen. Die Ausbeuten lagen bei 30 bis 70 %.

Anschließend wurde eine Mikrotropfendialyse (Kapitel IV, 2.2.2.3) durchgeführt.

2.3 Spezielle Methoden

2.3.1 Präparative Isolation von Ribosomen aus *E. coli*

Zur Synthese des Nukleotids Guanosintetraphosphat (ppGpp) (Kapitel IV, 2.3.2) war es notwendig, Ribosomen zu isolieren, an die die (p)ppGpp-Synthetase-I (Rel A) assoziiert war. Die Isolierung erfolgte in Anlehnung an eine von (Cashel, 1974) beschriebene Methode aus *E. coli* MRE 600 bzw. DG 156 Zellen (Kapitel IV, 1.2.1), die als tiefgefrorene Zellen vorlagen.

Wenn nicht anders vermerkt, erfolgte die gesamte Ribosomenpräparation bei 4°C mit vorgekühlten Geräten und Lösungen.

Für den Zellaufschluss wurden 50 g angetaute Zellen mit 100 g Aluminiumoxid (Alcoa) auf Eis in einem Mörser zu einer homogenen Paste zerrieben und nach Zugabe von 100 ml Standardpuffer zu einer flüssigen Suspension homogenisiert. Anschließend wurde eine DNase I-Behandlung (0.5 µg/ml RNase freie DNase I) für 20 min bei 0°C durchgeführt. Zur Entfernung grober Zellbestandteile und dem Alcoa erfolgte eine Zentrifugation für 15 min bei 4°C und 5000 rpm (Beckmann J2-21, JA-17 Rotor). Der Überstand wurde ein zweites Mal zentrifugiert (Beckmann J2-21, JA-17 Rotor, 30 min, 4°C, 15000 rpm). Der resultierende klare Überstand wurde in eine Saccharose-Gradienten-Zentrifugation eingesetzt. Dazu wurden 5 ml 1 M Saccharoselösung (in 1x Standardpuffer) in ein Ti55.2-Röhrchen (Beckmann) gefüllt und vorsichtig mit 5 ml 0.5 M Saccharoselösung (in 1x Standardpuffer) überschichtet. Nach Überzug dieses Stufengradienten mit dem Überstand des Zellaufschlusses erfolgte eine Ultrazentrifugation für mindestens 3 h bei 40000 rpm und 4°C (Beckmann L8-55, Ti55.2-Rotor). Der erhaltene Überstand wurde verworfen, und das honigfarbende Ribosomenpellet gegebenenfalls durch vorsichtiges Waschen mit etwa 1 ml Standardpuffer von einer aufliegenden bräunlichen Schicht befreit. Anschließend wurden die Ribosomen für 2-8 h auf Eis auf einem Horizontalschüttler in 1 bis 2 ml Standardpuffer resuspendiert. Die optische Dichte der Ribosomenlösung wurde nach Messung im Spektralphotometer auf 500 OD_{260nm}/ml eingestellt. Zur Lagerung bei -70°C wurde die Lösung aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

1x Standardpuffer	50 mM Tris-Acetat, pH 8.0
	15 mM Mg(OAc) ₂
	60 mM KOAc
	27 mM NH ₄ OAc
	1 mM DTT
	0,2 mM EDTA, pH 8.0

2.3.2 Präparation und Isolation von Guanosintetraphosphat (ppGpp)

Die Präparation und Isolation von Guanosintetraphosphat (ppGpp) erfolgte in Anlehnung an die von Krohn und Wagner (Krohn und Wagner, 1995) beschriebene Methode. Die Synthese von ppGpp geschah mittels der ribosomenassoziierten ppGpp-Synthetase-I (RelA).

2.3.2.1 Synthese von ppGpp

In einem auf zwei Reaktionsgefäße aufgeteilten Gesamtvolumen von 11 ml wurden die Ausgangssubstanzen ATP (4 mM) und GDP (2 mM) in 1x Standardpuffer (Kapitel IV, 2.3.1) mit 63 OD_{260nm} Ribosomen pro ml Ansatz bei RT für mindestens 4 h inkubiert. Um den Ablauf der Synthese zu verfolgen wurden nach jeder Stunde 5 µl Aliquots entnommen und mittels Dünnschichtchromatographie (Kapitel IV, 2.3.2.2) analysiert. Die Reaktion wurde durch dreimalige Phenol/Chloroform- und anschließende Chloroform-Extraktion (Kapitel IV, 2.2.2.1) gestoppt. Die wässrige Phase der Extraktion wurde in eine Ionenaustauschchromatographie (Kapitel IV, 2.3.2.3) eingesetzt.

2.3.2.2 Analytischer Nachweis von ppGpp durch Dünnschichtchromatographie (DC)

Das Nukleotid ppGpp wurde mittels Dünnschichtchromatographie (DC) auf fluoreszenzbeschichteten Polyethyleniminplatten (Machery & Nagel) nachgewiesen. Als Laufmittel diente eine 1.5 M KH₂PO₄-Lösung (pH 3.4). Die DC-Platte wurde vor dem Probenauftrag mit *Aqua dest.* gewässert und getrocknet. Der Auftrag der Proben erfolgte stufenweise, d.h. es wurden je nur Volumina von 2 µl aufgetragen und danach wurde die DC-Platte vor dem nächsten Auftrag luftgetrocknet, so konnten auf minimaler Fläche 5 bis 15 µl Probe aufgebracht werden. Nach einem ein- bis zweistündigen Lauf wurde die DC-Platte an der Luft getrocknet. Anschließend konnten die Nukleotide unter UV-Licht (256 nm) anhand ihrer Fluoreszenzlösung (Quench) detektiert werden. Für die einzelnen Substanzen wurden folgende RF-Werte ermittelt: 0.63 für ATP, 0.54 für GDP, 0.43 für pGpp bzw. ppGp, 0.26 für ppGpp und 0.18 für pppGpp.

2.3.2.3 Anionenaustauschchromatographie

Die Ionenaustauschchromatographie wurde mit dem Econo-System (Bio-Rad) bei 4 °C durchgeführt. Dabei wurde eine DEAE-Sephadex A25-Säule mit einer Länge von 12 cm und einem Durchmesser von 1.5 cm eingesetzt, die mit 60 ml TL1-Puffer gewaschen und dann mit mindestens 200 ml *Aqua dest.* bei einer

Flussrate von 1.2 ml/min äquilibriert wurde. Nachdem der von Proteinen befreite ppGpp-Syntheseansatz (Kapitel IV, 2.3.2.1) auf die Säule aufgezogen wurde, erfolgte eine 30minütige Bindung der Nukleotide an das Säulenmaterial. Danach wurde die Säule mit 200 bis 300 ml *Aqua dest.* gewaschen und anschließend wurden die Nukleotide bei einer Flussrate von 1.2 ml/min über einen linearen LiCl-Gradienten von 0.1 M (TL 0.1-Puffer) nach 0.4 M (TL 0.5-Puffer) eluiert und zu 12 ml (80 Fraktionen; Gesamtvolumen: 960 ml) fraktioniert.

Die Detektion der Nukleotide erfolgte bei einer Wellenlänge von 254 nm. ppGpp eluierte bei einer LiCl-Konzentration von etwa 250 bis 270 mM, pppGpp dicht dahinter. Die ppGpp enthaltenden Fraktionen wurden anhand des Schreiberprofils und mittels Dünnschichtchromatographie (Kapitel IV, 2.3.2.2) identifiziert und in einem 'Speed-Vac'-Konzentrator auf ein Volumen von 2 ml eingeeengt. Dann wurden die Nukleotide mit 10 ml absolutem Ethanol für mindestens 2 h bzw. über Nacht bei - 70°C gefällt und für 30 min bei 6000 rpm (Heraeus Megafuge 1.0R) zentrifugiert, das Pellet mit 80 % Ethanol gewaschen, lyophilisiert und in 100 bis 150 µl *Aqua dest.* aufgenommen.

Nachdem die ppGpp-haltigen Fraktionen vereint wurden, erfolgte eine erneute Aufreinigung mit Hilfe einer Q-Sepharose-Chromatographie (High Performance, Pharmacia). Hierzu wurde eine Q-Sepharose-Säule mit einem Durchmesser von 1 cm und einer Länge von 14 cm mit *Aqua dest.* äquilibriert. Im Anschluss wurden die ppGpp-haltigen Fraktionen (2-3 ml) auf die Säule aufgetragen, mit 40-50 ml *Aqua dest.* gewaschen bevor die Nukleotide über einen LiCl-Gradienten von 0 nach 0.2 M eluiert wurden. Die Flussrate betrug dabei 0.8 ml/min, das Elutionsvolumen 300 ml und je Fraktion wurden 4 ml aufgefangen. Auch hier erfolgte die Detektion der Nukleotide mit Hilfe eines Flussspektrometers bei 254 nm. Bevor die ppGpp-Fraktionen in die Gelfiltration (Kapitel IV, 2.3.2.4) eingesetzt wurden, erfolgte eine Einengung des Volumens auf ca. 1 ml mit anschließender Fällung mit 5 ml absolutem Ethanol, Waschen des Pellets mit 80 % Ethanol, Trocknung des Pellets und Resuspension in je 150 µl *Aqua dest.*

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

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

TL1-Puffer 50 mM Tris-HCl, pH 7.4
 1 M LiCl

2.3.2.4 Gelfiltration

Die konzentrierte ppGpp-Lösung wurde von den hohen LiCl-Konzentrationen durch Gelfiltration befreit. Dazu wurden ca. 1.5 ml der Lösung auf eine, zuvor

mit *Aqua dest.* äquilibrierte Sephadex G10-Säule (70 cm lang, 1 cm Durchmesser) aufgetragen. Die Elution des Nukleotids erfolgte bei einer Flussrate von 0.6 ml/min anhand des Econo-Systems (Bio-Rad). Die Elution wurde wie unter 2.3.2.3 beschrieben verfolgt. Es wurden 4.5 ml Fraktionen gesammelt (Gesamtvolumen: 360 ml), die ppGpp-haltigen Fraktionen anhand des Schreiberprofils identifiziert und mittels Dünnschichtchromatographie (Kapitel IV, 2.3.2.2) analysiert und schließlich im Vakuum aufkonzentriert (Endvolumen je ppGpp-Fraktion: ca. 500 µl). Die Bestimmung der ppGpp-Konzentration erfolgte durch Messung der Absorption bei 252 nm (Kapitel IV, 2.2.1.2).

2.3.2.5 Messung der Leitfähigkeit

Da sich LiCl-Konzentrationen über 100 mM inhibierend auf die Transkription mit der *E. coli* RNA-Polymerase auswirken (Krohn, 1994), könnte durch gegebenenfalls hohe LiCl-Konzentrationen in der ppGpp-Lösung eine Transkriptionshemmung durch ppGpp vorgetäuscht werden. Um dies auszuschließen, wurde die maximale LiCl-Konzentration in der ppGpp-Präparation über die elektrische Leitfähigkeit bestimmt. Dazu wurde die elektrische Leitfähigkeit der ppGpp-Lösungen und verschiedener LiCl-Lösungen bekannter Konzentrationen (Eichreihe) gemessen. Anhand der LiCl-Eichgerade, die durch Auftragung der Leitfähigkeit gegen die Konzentration erhalten wurde, konnte die maximale LiCl-Konzentration der ppGpp-Lösung ermittelt werden. Maximal deshalb, weil es sich bei ppGpp um einen Ladungsträger handelt, der ebenfalls zur elektrischen Leitfähigkeit beiträgt.

2.3.3 Konstruktion von 'mismatch bubble' Templates

Die sogenannten 'mismatch bubble' Templates sind gekennzeichnet durch einen Bereich permanenter DNA-Strangöffnung, der durch identische Basensequenzen beider Stränge und damit Verlust der Komplementarität erzielt wurde. Da die Strangöffnungen nach der Replikation wieder als vollständig gepaarte Doppelstränge vorliegen würden, erfolgte die Synthese dieser 'mismatch bubbles' durch Hybridisierung von DNA-Einzelsträngen. Dazu diente ssDNA aus dem Bakteriophagen M13.

2.3.3.1 Klonierung von M13-Phagenderivaten für die 'mismatch bubble' Template-Präparation

Die Konstruktion von M13-Phagenderivaten für die 'mismatch bubble' Templates erfolgte mit Hilfe von M13-Derivaten des Typs mp18 und mp19. Als Klonierungsvektor diente die doppelsträngige RF-DNA von M13mp18 bzw. 19, die aus infizierten *E. coli* Zellen isoliert wurde (Kapitel IV, 2.2.3.3). Im Anschluss

wurde die RF-DNA, für eine spätere gerichtete Ligation mit dem Insert, mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *SacI* geöffnet (Kapitel IV, 2.2.4.1) und über ein 1,5 % Agarosegel mit anschließender Gelelektion (Kapitel IV, 2.2.7.1) aufgereinigt.

Die Inserts, die die Grundlage der zu konstruierenden 'mismatch bubble' Templates bilden, wurden durch die Hybridisierung langer DNA-Oligonukleotide erhalten (Kapitel IV, 1.4.2). Hierzu wurden je 20 pmol Oligonukleotid in 1x Annealingpuffer in einem Reaktionsvolumen von 20 µl für 10 min je nach T_m -Wert der Oligonukleotide bei 75 bzw. 90°C inkubiert und dann langsam auf RT abgekühlt.

Durch die Wahl der Oligonukleotidsequenzen enthielten die hybridisierten DNA-Fragmente überhängenden Enden, die einer Hydrolyse mit den Enzymen *EcoRI* und *SacI* entsprachen und somit komplementär zu den DNA-Enden der Klonierungsvektoren waren. Aus diesem Grund konnten Vektor und Insert direkt in eine Ligrationsreaktion eingesetzt werden (Kapitel IV, 2.2.4.3).

Anschließend wurde die rekombinante RF-DNA mit Hilfe des Hitzeschocks in kompetente *E. coli* Zellen transformiert. Abweichend von dem beschriebenen Transformationsprotokoll (Kapitel IV, 2.1.5) wurde der Ansatz im Anschluss an den Hitzeschock mit 200 µl *E. coli* Zellen aus der log-Phase versetzt. Davon wurden 200 µl mit 2 ml eines auf 48°C temperierten Top-Agars (Kapitel IV, 1.6) gemischt und auf einer vorgewärmten YT-Platte gleichmäßig verteilt. Nach Verfestigung des Top-Agars wurden die Platten umgekehrt für ca. 8 h bzw. bis zum Sichtbarwerden von Phagen-Plaques bei 37°C inkubiert. Zur Selektion der 'positiven' Klone wurde die Methode des sogenannten 'blue white'-Screens herangezogen.

Zur Analyse der Klone wurden, wie unter 2.2.3.5 beschrieben, mit Hilfe der 'positiven' Phagen-Plaques 3 ml infizierte Flüssigkulturen hergestellt und in Eppendorfgefäße sedimentiert. Aus den resultierenden Zellpellets konnte die RF-DNA der M13-Klone isoliert werden (Kapitel IV, 2.2.3.4) und anschließend durch Restriktionshydrolyse (Kapitel IV, 2.2.4.1) und Agarose-Gelelektrophorese (Kapitel IV, 2.2.5.1) qualitativ analysiert werden. Der Überstand der infizierten Flüssigkulturen konnte zum Teil als Phagenstock verwahrt werden und außerdem zur Isolation von ssDNA der M13-Klone (Kapitel IV, 2.2.3.5) genutzt werden, die dann sequenziert (Kapitel IV, 2.2.4.7) werden konnte.

10x Annealingpuffer	400 mM Tris-HCl, pH 7.5
	500 mM NaCl
	200 mM MgCl ₂

2.3.3.2 Präparation eines 'mismatch bubble' Templates

Die Präparation von 'mismatch bubble' Templates erfolgte weitgehend nach der von Schwarzenberg (Schwarzenberg, 1999) beschriebenen Methode. Dazu wurde die aus den Phagenderivaten M13asa18 und M13asa19, M13asr18 und M13asr19 sowie M13br-118 und M13br-119 (Kapitel IV, 1.2.3) isolierte ssDNA

(Kapitel IV, 2.2.3.6) zu den 'mismatch bubble' Templates AS-A, AS-R und BR-I (Kapitel IV, 1.3) hybridisiert.

Zuvor wurde die isolierte ssDNA jedoch zur Entfernung von tRNA-Kontaminationen, resultierend aus einer partiellen Lyse von *E. coli* Zellen, vor der Hybridisierung mit RNase A behandelt. Hierzu wurden 0.5 bis 0.75 mg ssDNA (Endkonzentration: 1.2 – 1.5 µg/µl) in TE-Puffer (Kapitel IV, 1.6) mit 6 µg/ml RNase A für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgten zur restlosen Entfernung der RNase mindestens fünf Phenol/Chloroform- und eine Chloroform-Extraktion. Die RNA-freie ssDNA wurde dann durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M NaOAc (pH 5.5) und 2 Volumen absolutem Ethanol gefällt (Kapitel IV, 2.2.2.2), gewaschen, lyophilisiert und in TE-Puffer aufgenommen.

Die Annealing-Reaktion der ssDNA erfolgte wie von (Tripatara und deHaseth, 1993) publiziert. Dazu wurden 10 bis 450 µg ssDNA (max. Endkonzentration: 0.5 µg/µl) in 1x Annealingpuffer (Kapitel IV, 2.3.3.1) für 15 min bei 75°C inkubiert und anschließend langsam auf RT abgekühlt (ca. 1°C/min).

Um die überhängende ssDNA zu entfernen wurde eine Restriktionshydrolyse (Kapitel IV, 2.2.4.1) mit *EcoRI* bzw. *XmnI* und *HindIII* (Kapitel IV, 1.5) durchgeführt.

Zur Trennung der 'mismatch bubble' Fragmente von der ssDNA erfolgte eine präparative 1,5% Agarose-Gelelektrophorese (Kapitel IV, 2.2.5.1) und Gelelution der gewünschten Bande nach der 'freeze-squeeze'-Methode (Kapitel IV, 2.2.7.1).

Im Anschluss wurden die 5'-überhängenden DNA-Fragmentenden mit Hilfe des Klenow-Enzyms der DNA-Polymerase I aufgefüllt (Kapitel IV, 2.2.4.4). Zur Entfernung von Desoxynukleotiden aus der Klenow-Reaktion erfolgte eine Aufreinigung der 'mismatch bubble' Templates über G50-SpinColumns (G50 Sephadex Quick Spin Columns, Boehringer Mannheim). Hierzu wurden die Säulen vorsichtig invertiert, danach wurde zunächst der obere und dann der untere Verschluss geöffnet. Nachdem die überschüssige Pufferlösung abgelaufen war, wurden die Säulen in ein Sammelgefäß gestellt und für 2 min bei 2500 rpm (Heraeus Megafuge 1.0R) zentrifugiert. Danach wurden die Säulen in ein neues Sammelgefäß überführt und die DNA-Probe auf die Mitte der Säule gegeben und nochmals für 4 min bei 2500 rpm zentrifugiert. Zur Konzentrierung der DNA-Lösungen wurden die Eluate mit Ethanol präzipitiert (Kapitel IV, 2.2.2.2) und anschließend in TE-Puffer (Kapitel IV, 1.6) aufgenommen.

Die isolierten und aufgereinigten 'mismatch bubble' Templates wurden für alle folgenden Analysen durch Mikrotropfendialyse (Kapitel IV, 2.2.2.3) entsalzt.

2.3.4 'multiple round' *in vitro* Transkriptionen

Die folgenden Reaktionsansätze beschreiben 'multiple round' Transkriptionen, bei denen jede Transkriptionseinheit mehrmals von der DNA-abhängigen RNAP abgelesen werden kann. Erst nach einer bestimmten Reaktionszeit werden mit dem sogenannten 'chase', durch die Zugabe von Heparin die Neuinitiationen

der Transkription gestoppt und gleichzeitig alle unvollständigen Transkripte durch eine hohe Konzentration aller NTPs vollendet.

2.3.4.1 'multiple round' *in vitro* Transkriptionen mit 'mismatch bubble' Templates

Aus dem unten beschriebenen Reaktionsansatz resultierte für die unmarkierten Nukleotide jeweils eine Endkonzentration (vor dem 'chase') von 65 μM , während das [^{32}P]-UTP nur 20 nM eingesetzt wurde. Die Reaktionen erfolgten jeweils mit dem Holo- bzw. Core-Enzym der RNAP von *E. coli*.

In einem Gesamtvolumen von 50 μl wurden 1 nM 'mismatch bubble' Template und 0 bis 500 μM ppGpp mit 3 nM aktiver RNAP, die gegebenenfalls vorsichtig mit AB-Diluent verdünnt wurde, in 1x KGl80-Puffer (Kapitel IV, 1.6) für 8 min bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde dann durch Zugabe von 3.25 μl NTP-Mix gestartet und weitere 15 min bei 30°C inkubiert. Um alle initiierten Transkripte zu beenden, ohne das erneute Initiationen erfolgten, wurde der Ansatz mit 7.6 μl 'chase'-Lösung versetzt und die Reaktion nach 6 min bei 30°C durch Zugabe von 12 μl Stopp-Lösung und 3 Volumen absolutem Ethanol beendet und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Nach 30minütiger Zentrifugation, Waschen mit 80 % Ethanol und Lyophilisation (Savant, Speedvac Concentrator) wurde die mRNA in 6 μl Formamid-Probenpuffer (Kapitel IV, 1.6) aufgenommen. Die Proben wurden 3 min bei 96°C denaturiert, auf Eis abgekühlt und auf einem denaturierenden 10 % Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt.

AB-Diluent	10 mM Tris-HCl, pH 8.0 10 mM MgCl_2 10 mM β -Mercaptoethanol 50 mM NaCl 100 $\mu\text{g/ml}$ BSA, acetyliert 0.1 mM EDTA, pH 8.0 5 % (v/v) Glycerin
NTP-Mix	je 1 mM ATP, CTP, GTP 0.31 μM [^{32}P]-UTP (3000 Ci/mmol)
'chase'-Lösung	je 2 mM ATP, CTP, GTP, UTP 2 mg/ml Heparin 1 mM Tris-HCl, pH 7.0
Stopp-Lösung	1.5 M NaOAc, pH 5.5 50 mM EDTA, pH 8.0 12 $\mu\text{g/ml}$ Glykogen

2.3.4.2 'multiple round' *in vitro* Transkriptionen mit dem σ^{70} - bzw. σ^{38} -Holoenzym der RNAP von *E. coli*

Zur Analyse prokaryotischer Transkriptionsregulation in der exponentiellen bzw. stationären Phase wurden *in vitro* Transkriptionen mit dem exponentielle Phase spezifischen σ^{70} -Holoenzym (E70) bzw. stationäre Phase spezifischen σ^{38} -Holoenzym (E38) der RNAP und entsprechenden σ -spezifischen Promotoren durchgeführt.

2.3.4.2.1 Rekonstitution von RNA-Polymerasen

Die beiden in dieser Arbeit verwendeten DNA-abhängigen RNA-Polymerasen, E70 und E38, wurden durch Reassemblierung des Core-Enzyms der RNAP von *E. coli* und des jeweiligen σ -Faktors (Kapitel IV, 1.5) erhalten. Hierzu lagen sowohl das Core-Enzym als auch die beiden σ -Untereinheiten in hoher Reinheit vor.

Die Rekonstitution erfolgte durch Vorlage der Core-Enzymlösung, die gegebenenfalls zuvor mit AB-Diluent (Kapitel IV, 2.3.4.1.1) verdünnt wurde, und vorsichtiger Zugabe des entsprechenden σ -Faktors, der gegebenenfalls mit 1x TGED-Puffer verdünnt wurde. Anschließend wurde ebenfalls vorsichtig mit AB-Diluent das benötigte Volumen eingestellt und der Ansatz zur Rekonstitution für 1 h auf Eis inkubiert.

Experimentell konnten für die verschiedenen Holoenzyme der RNAP die folgenden molaren Core-Enzym : σ -Faktor-Verhältnisse als optimal ermittelt werden:

Core : $\sigma^{70} = 1 : 15$

Core : $\sigma^{38} = 1 : 500$.

1x TGED-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 8.0
	5 % Glycerin
	0.1 mM EDTA, pH 8.0
	0.1 mM DTT

2.3.4.2.2 *In vitro* Transkriptionen mit E70 bzw. E38 und superhelikalen Templates

Für diese *in vitro* Transkriptionen wurden Plasmide (Kapitel IV, 1.2.2) in superhelikaler Form verwendet. Die Termination der Transkripte erfolgte in allen Fällen an intrinsischen Terminatoren.

Für die Analyse des ppGpp-Effektes wurden Konzentrationen von 0 bis 500 μM eingesetzt und die Untersuchung der Salzabhängigkeit der Transkription erfolgte in Anwesenheit von 0 bis 400 mM Kaliumglutamat.

Für einen Standardansatz wurden in einem Reaktionsvolumen von 10 µl 5 nM des superhelikalen Templates und 3 nM aktive RNAP (E70 bzw. E38; 2.4.3.2.1) mit je 65 µM ATP, CTP, GTP und 133 nM [32 P]-UTP supplementiert mit 5 µM UTP in 1x Kglu160-Puffer (Kapitel IV, 1.6) für 8 min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden 1.5 µl 'chase'-Lösung (Kapitel IV, 2.3.4.1.1) zugesetzt und für weitere 10 min inkubiert. Durch die Zugabe von 11 µl Formamid-Probenpuffer (Kapitel IV, 1.6), der mit einem radioaktiv markiertem DNA-Auftragstandard versetzt war, wurde die Transkription beendet. Die Proben wurden 3 min bei 96°C denaturiert, auf Eis abgekühlt und auf einem denaturierenden 10 % Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt.

2.3.4.2.3 *In vitro* Transkriptionen mit E70 bzw. E38 und linearen Templates

Die *in vitro* Transkriptionen mit linearisierten Templates sollten den Reaktionen unter superhelikalen Bedingungen vergleichend gegenübergestellt werden. Als Templates dienten hierfür isolierte Promotor-Fragmente bzw. linearisierte Plasmide mit Erhalt der Terminatoren (Kapitel IV, 1.2.2; 1.3). Aufgrund der geringeren Transkriptionseffizienz bei Verwendung linearer Templates, im Vergleich zu den *in vitro* Transkriptionen unter superhelikalen Bedingungen, mussten die Reaktionsbedingungen jedoch geringfügig modifiziert werden.

Die ppGpp-Konzentrationen wurden wie unter 2.3.4.2.2 beschrieben zwischen 0 und 500 µM variiert. Kaliumglutamat-Titrationsen erfolgten jedoch nur bis zu einer Konzentration von 240 mM, da bei höheren Konzentrationen keine signifikante Transkription nachweisbar war.

Generell wurden für einen Standardansatz in einem Gesamtvolumen von 10 µl 5 nM linearisiertes Plasmid bzw. Promotor-Fragment und 3 nM aktive RNAP (E70 bzw. E38; 2.3.4.2.1) mit 65 µM ATP, CTP, GTP und 266 nM [32 P]-UTP supplementiert mit 5 µM UTP in 1x Kglu80-Puffer (Kapitel IV, 1.6) für 16 min bei 30°C inkubiert. Im Anschluss wurden 1.5 µl 'chase'-Lösung (Kapitel IV, 2.3.4.1.1) zugesetzt und nach einer weiteren Inkubationszeit von 10 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 µl Formamid-Probenpuffer (Kapitel IV, 1.6), der mit einem radioaktiv markiertem DNA-Auftragsstandard versehen war, gestoppt. Die Proben konnten dann nach 3minütiger Denaturierung bei 96°C auf einem denaturierenden 10 % Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt werden.

2.3.5 Bestimmung von Transkriptionsstartstellen

Die nukleotidgenaue Bestimmung der Transkriptionsstarts von 'mismatch bubble' Templates und anderer Promotoren erfolgte durch die indirekte Betrachtung von *in vitro* synthetisierten Transkripten über die Synthese einer cDNA. Bei dieser Primer-Extension (PE) wird an die RNA ein Primer hybridisiert, der mit Hilfe einer viralen Reversen Transkriptase (RT) verlängert werden kann.

2.3.5.1 *In vitro* Transkription zur Bestimmung von Transkriptionsstarts von 'mismatch bubble' Templates

Die *in vitro* Synthese der RNA erfolgte in Anlehnung an die 'multiple round' Transkriptionsbedingungen (Kapitel IV, 2.3.4.1.1), jedoch ohne den Einbau radioaktiv markierter Nukleotide. Hierzu wurden in einem Reaktionsvolumen von 100 μ l 1 nM 'mismatch bubble' Template mit 3 nM aktivem Holo- bzw. Core-Enzym der RNAP von *E. coli* in 1x KGlu80-Puffer (Kapitel IV, 1.6) für 8 min bei 30°C inkubiert. Durch Zugabe von 6.5 μ l des NTP-Mixes wurde die Reaktion gestartet und für 15 min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden dem Ansatz 15.2 μ l 'chase'-Lösung (Kapitel IV, 2.3.4.1.1) zugesetzt und nach weiteren 6 min bei 30°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 24 μ l Stopp-Lösung (Kapitel IV, 2.3.4.1.1) beendet. Die Nukleinsäuren wurden dann durch Zugabe von 2.5 Volumen absolutem Ethanol gefällt (Kapitel IV, 2.2.2.2), das resultierende Pellet mit 80 % Ethanol gewaschen und lyophilisiert. Das getrocknete Pellet konnte direkt in die Primer-Extension-Reaktion mit der Reversen Transkriptase (AMV) eingesetzt werden (Kapitel IV, 2.3.5.3).

NTP-Mix	je 1 mM ATP, CTP, GTP 300 nM UTP
---------	-------------------------------------

2.3.5.2 *In vitro* Transkription zur Bestimmung der Transkriptionsstarts am *rrnB* P1, *bolA1* und RNA1 Promotor

Die *in vitro* Synthese der mRNA von den Promotoren *rrnB* P1, *bolA1* und RNA1 erfolgte in Anlehnung an die Transkriptionsbedingungen mit superhelikalen Templates (Kapitel IV, 2.3.4.2.2). Da die Elongationszeit nicht die Qualität sondern nur die Quantität der Transkriptionsprodukte beeinflusst, wurde zur Erhöhung der mRNA-Ausbeuten die Inkubationszeit dieser *in vitro* Transkriptionen verlängert.

In einem Reaktionsvolumen von 150 μ l wurden 1.5 nM 'supercoiled' ('ccc') Template mit 6 nM aktivem 70 - bzw. 38 -Holoenzym der RNA-Polymerase von *E. coli* und 65 μ M ATP, CTP, GTP und 5 μ M UTP in 1x KGlu160-Puffer (Kapitel IV, 1.6) für 30 min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden dem Ansatz 22.5 μ l 'chase'-Lösung (Kapitel IV, 2.3.4.1.1) zugesetzt und nach weiteren 10 min bei 30°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 40 μ l Stopp-Lösung (Kapitel IV, 2.3.4.1.1) beendet. Die weitere Aufarbeitung der synthetisierten mRNA erfolgte wie unter 2.3.5.1 beschrieben.

2.3.5.3 Primer-Extension-Analyse von *in vitro* Transkriptionsprodukten mit AMV (Reverse Transkriptase)

Die Primer-Extension-Analyse erfolgte nach einem abgewandelten Protokoll von (Stern *et al.*, 1988). Dazu wurden die mRNA-Pellets aus 2.3.5.1 bzw.

2.3.5.2 mit 1 μl 5'-markiertem Oligonukleotid (1×10^6 cpm/ μl) in 1x Hybridisierungspuffer und einem Gesamtvolumen von 4.5 μl resuspendiert, für 3 min bei 65°C inkubiert und durch langsames Abkühlen auf RT hybridisiert.

Für die Primer-Extension-Reaktion wurden 2 μl des Hybridisierungsansatz mit 1 μl 5x Primer-Extension-Puffer und 2 μl 4x dNTP-Lösung mit 1 U AMV gemischt und für 30 min bei 42°C inkubiert. Durch Zugabe von 5 μl Formamid-Probenpuffer (Kapitel IV, 1.6) und 3minütiger Denaturierung bei 96°C wurde die Reaktion gestoppt. Die Proben wurden anschließend auf einem 10 % denaturierenden PAA-Gel (Kapitel IV, 2.2.5.3) analysiert.

5x Primer-Extension-Puffer	125 mM Tris-HCl, pH 8.3 125 mM KCl 125 mM MgCl ₂ 125 mM DTT
----------------------------	---

4x dNTP-Lösung	je 250 μM dATP, dCTP, dGTP, dTTP 1 U AMV/Ansatz in 10 mM Tris-HCl, pH 7.5
----------------	--

2.3.6 Verzögerungsgelelektrophorese ('gel shift assay')

Die Retardierungsgelelektrophorese wurde, in Anlehnung an beschriebene Methoden (Straney und Crothers, 1985; Wellington und Spiegelman, 1993), zur qualitativen und quantitativen Analyse von RNAP-Promotorkomplexen herangezogen. Diese Methode beruht auf einer Verringerung der gelelektrophoretischen Mobilität von Protein-DNA-Komplexen im Vergleich zur freien DNA. Die Retardierung kann zum Einen durch das erhöhte Molekulargewicht des Komplexes und zum Anderen durch proteininduzierte Konformationsänderungen der DNA hervorgerufen werden.

Die 'gel shift' Analysen erfolgten mit radioaktiv markierten Promotorfragmenten (Kapitel IV, 2.2.4.4). Generell wurde die Bindungsreaktion in einem Gesamtvolumen von 10 μl in 1x KGlu80-Puffer (Kapitel IV, 1.6) mit 5 % Glycerin für 15 min bei 30°C inkubiert.

Folgende Bindungsreaktionen wurden durchgeführt:

- 1.) Das Template-RNAP-Verhältnis wurde bei konstanter Template-Konzentration von 1.5 nM durch steigende RNAP-Konzentrationen (3 nM, 6 nM, 9 nM) variiert.
- 2.) Durch Zugabe von 65 bzw. 650 μM des ersten und 65 μM des zweiten (*rrnB* P1: ATP, CTP; *boIA1*: GTP) Nukleotides sollte die Analyse von Initiationskomplexen und deren Abhängigkeit von der Startnukleotid-Konzentration erfolgen. Dies erfolgte bei einem DNA/Protein-Verhältnis von 1.5 nM : 6 nM.

- 3.) Durch die Variation der Kaliumglutamat-Konzentration (80, 160 und 320 mM) sollte die Salzabhängigkeit der Komplexbildung untersucht werden.
- 4.) Zur Überprüfung des ppGpp-Effektes auf die Ausbildung der Promotor-RNAP-Komplexe wurden bei einem Template-RNAP-Verhältnis von 1.5 nM : 6 nM 300 µM ppGpp eingesetzt.

Nach Ablauf der Bindungsreaktion wurden unspezifische Komplexe durch die Zugabe von 1 µl Heparin (2.2 bzw. 1.1 µg/µl) abgefangen und die Ansätze bis zum Auftrag auf das Gel auf Eis gehalten. Je 10 µl eines Bindungsansatzes wurden auf ein natives 5 % Polyacrylamidgel (0.5x TBE) aufgetragen. Als Laufpuffer diente 0.5x TBE-Puffer (Kapitel IV, 1.6). Den Proben wurde kein Farbmarker zugesetzt, da dieser eine Destabilisierung der Komplexe bewirken könnte (Wellington und Spiegelman, 1993). Stattdessen wurde zur Verfolgung des Gellaufs in eine gesonderte Geltasche TBE-Probenpuffer (Kapitel IV, 1.6) gegeben. Die Gelelektrophorese erfolgte bei RT für 3 bis 4 h bei 30 mA. Anschließend wurden die aufgetrennten Proben autoradiographiert (Kapitel IV, 2.2.6.3).

5 % Gellösung	12.5 ml 40 % Acrylamid/Bisacrylamidlösung (46:1)
	5 ml 10x TBE (Kapitel IV, 1.6)
	ad 100 ml mit <i>Aqua dest.</i>
	+ 60 µl TEMED
	+ 600 µl 10 % (w/v) APS

2.3.7 Footprint-Techniken

2.3.7.1 Chemische DNA-Modifikation durch Kaliumpermanganat

2.3.7.1.1 Allgemeines

Die chemische DNA-Modifikation mit Kaliumpermanganat wurde in Anlehnung an das von Sasse-Dwight und Gralla (Sasse-Dwight und Gralla, 1991) beschriebene Protokoll durchgeführt.

Zur Herstellung einer 0.37 M KMnO₄-Stammlösung (MW= 158.04 g/mol, Löslichkeitslimit 60 g/l bzw. 0.37 M) wurden 12 g Permanganat eingewogen, auf etwas mehr als 200 ml *Aqua dest.* aufgefüllt und bis zum Kochen erhitzt. Die Lösung wurde dann vorsichtig solange gekocht, bis ein Volumen von genau 200 ml erreicht war und danach langsam abgekühlt. Diese Stammlösung konnte für 2 bis 3 Monate in einer braunen Glasflasche gelagert werden.

2.3.7.1.2 Analyse von 'mismatch bubble' Templates mittels chemischer DNA-Modifikation durch Kaliumpermanganat

Aufgrund der Einzelstrangspezifität des Kaliumpermanganats konnte diese Modifikationsreaktion zum Nachweis der korrekten Hybridisierung der 'mismatch bubble' Templates und zur Analyse der Positionierung der ungepaarten Bereiche genutzt werden. Die Modifikation erfolgt durch Oxidation der Doppelbindung zwischen dem C₅- und C₆-Atom von einzelsträngigen Pyrimidinen, wobei Thymin mit wesentlich höherer Effizienz als Cytosin oxidiert wird.

Die Modifikation erfolgte unter *in vitro* Transkriptionsbedingungen (Kapitel IV, 2.3.4.1) bei 30°C und in 1x KGlü80-Puffer (Kapitel IV, 1.6).

Für die Reaktion wurden jeweils 7 ng DNA-Fragment in 18 µl 1x KGlü80-Puffer vorgelegt. Die Modifikation erfolgte durch Zugabe von 2 µl 320 mM, 160 mM, 80 mM, 40 mM bzw. 8 mM KMnO₄ (frisch angesetzt von der 0.37 M Stammlösung) und Inkubation für 2 min bei 30°C. Zum Stoppen der Reaktion wurden 2 µl β-Mercaptoethanol (99.0 %) zugegeben und der Ansatz auf Eis überführt. Nach Zugabe von 6 µl 0.2 M EDTA (pH 8.0) und 27 µl *Aqua dest.* wurde die Probe über Spin Columns (QIAquick Nucleotide Removal Kit, QIAGEN) aufgearbeitet. Hierzu wurde den Herstellerangaben entsprechend verfahren: Die chemisch modifizierte DNA (55 µl) wurde mit 500 µl PN-Puffer (QIAGEN, enthält kaotrope Salze) vermischt, auf die Säule gegeben und 1 min bei 6000 rpm (Heraeus Biofuge 15) zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen. Auf die Säule wurde zum Waschen der gebundenen DNA 750 µl PE-Puffer (QIAGEN, enthält Ethanol) pipettiert und nach erneuter Zentrifugation für 1 min bei 6000 rpm wurde das Eluat wiederum verworfen. Nach Wiederholung des Waschschruttes mit 500 µl PE-Puffer wurde die Säule zur Entfernung von Pufferrückständen für 1 min bei 12000 rpm (Heraeus Biofuge 15) zentrifugiert. Die Elution erfolgte mit 75 µl TE-Puffer (Kapitel IV, 1.6), das Eluat wurde in einem sterilen Eppendorf-Reaktionsgefäß aufgefangen. Zum Nachweis der DNA-Modifikationen wurde eine Primer-Extension-Reaktion mit dem Klenow-Enzym der DNA-Polymerase durchgeführt (Kapitel IV, 2.3.7.3)

2.3.7.1.3 Kaliumpermanganat-Modifikation von RNAP-Promotor-komplexen

Die einzelstrang-spezifische KMnO₄-Modifikation diente der Charakterisierung des aufgeschmolzenen Promotorbereichs von offenen und Initiationskomplexen an den Promotoren *rrnB* P1 und *bolA1* mit dem \square^{70} - bzw. \square^{38} -Holoenzym der RNA-Polymerase von *E. coli*. Im Allgemeinen erfolgte die Modifikation in Anlehnung an die *in vitro* Transkriptionsbedingungen mit superhelikalen Templates (Kapitel IV, 2.3.4.2.2).

Dazu wurden 5 nM des jeweiligen Templates in superhelikaler Form in 1x KGlü160-Puffer (Kapitel IV, 1.6) mit 3 bzw. 10 nM rekonstituiertem, aktivem \square^{70} - bzw. \square^{38} -Holoenzym der RNAP in einem Reaktionsvolumen von 40 µl für 6 min

bei 30°C inkubiert. Die Bildung der offenen RNAP-Promotor-Komplexe erfolgte in Abwesenheit von Startnukleotiden und für die Analyse der Initiationskomplexe wurden dem Ansatz 65 bzw. 650 µM des ersten Nukleotids (*rrnB* P1: ATP; *bolA1*: GTP) und 65 µM des zweiten Nukleotids (*rrnB* P1: CTP; *bolA1*: GTP) zugesetzt. Nach der Bildung der RNAP-Promotorkomplexe wurden die Ansätze mit 4 µl Heparin (2.2 µg/µl) bzw. *Aqua dest.* versetzt. Anschließend erfolgte die Modifikation durch Zugabe von 4 µl 160 mM KMnO₄-Lösung (frisch angesetzt von der 0.37 M Stammlösung) und Inkubation für 2 min bei 30°C. Zum Stoppen der Reaktion wurden 4.8 µl β-Mercaptoethanol (99.0 %) zugegeben und der Ansatz auf Eis überführt. Nach Zugabe von 13.2 µl 0.2 M EDTA (pH 8.0) und 80 µl *Aqua dest.* wurde die Probe wie unter 2.3.7.1.2 beschrieben über Spin Columns (QIAquick Nucleotide Removal Kit, QIAGEN) aufgearbeitet. Zum Nachweis der Modifikationen konnte das Eluat direkt in eine Primer-Extension-Reaktion mit dem Klenow-Enzym der DNA-Polymerase I eingesetzt werden (Kapitel IV, 2.3.7.3).

2.3.7.2 Enzymatische DNA-Modifikation von RNAP-Promotor-komplexen mit DNase I

Die unten beschriebene Methode zur enzymatischen Footprint-Analyse von DNA-RNAP-Komplexen geht auf die Arbeiten von Galas und Schmitz (Galas, 1978) sowie (Straney *et al.*, 1989) zurück und wurde der Problemstellung dieser Arbeit entsprechend modifiziert.

Die Komplexbildung erfolgte in Anlehnung an die *in vitro* Transkriptionsbedingungen mit superhelikalen Templates. Hierzu wurde in einem Reaktionsvolumen von 20 µl 5 nM superhelikales DNA-Template mit 20 nM aktiver, rekonstituierter RNA-Polymerase in 1x KGlu160-Puffer (Kapitel IV, 1.6) für 8 min bei 30°C inkubiert. Die binären RNAP-Promotor-Komplexe wurden in Abwesenheit von Startnukleotiden untersucht und für die Analyse von Initiationskomplexen wurden dem Ansatz 65 bzw. 650 µM des ersten Nukleotids (*rrnB* P1: ATP; *bolA1*: GTP) und 65 µM des zweiten Nukleotids (*rrnB* P1: CTP; *bolA1*: GTP) zugesetzt. Anschließend wurden die Ansätze mit 1 µl Heparin (1.1 µg/µl) bzw. 1 µl *Aqua dest.* versetzt. Zum Start der DNase-Spaltung wurde der Ansatz, nach Beendigung der Komplexbildung, mit 3 µl DNase I (10 U/µl; 1:1000 mit DNase-Diluent) versetzt und 30 sec bei RT inkubiert. Nach Beendigung der Reaktion durch Zugabe von 4 Volumen Stopp-Puffer erfolgten zwei Phenol/Chloroform- und eine Chloroform-Extraktion (Kapitel IV, 2.2.2.1). Danach wurde die modifizierte DNA mit absolutem Ethanol präzipitiert (Kapitel IV, 2.2.2.2) und das lyophilisierte Pellet (Savant, Speedvac Concentrator) in 75 µl TE-Puffer (Kapitel IV, 1.6) resuspendiert.

Die Analyse der DNase-Spaltstellen erfolgte durch eine anschließende Primer-Extension-Reaktion mit der Klenow-Polymerase (Kapitel IV, 2.3.7.3).

DNase I-Diluent	20 mM Tris-HCl, pH 7.8 10 mM CaCl ₂ 20 mM MgCl ₂
Stopp-Puffer (frisch ansetzen)	330 mM NaOAc, pH 5.5 5 mM EDTA, pH 8.0 10 µg/ml Glykogen

2.3.7.3 Primer-Extension-Analyse (PE) chemisch bzw. enzymatisch modifizierter DNA

Die Primer-Extension-Analyse der modifizierten DNA erfolgte über die Methode der alkalischen Denaturierung. Diese Methode beinhaltet die Denaturierung der modifizierten DNA mit Alkali, die anschließende Neutralisierung und Hybridisierung und Verlängerung eines Primers mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I. Dazu wurde wie folgt vorgegangen:

Zu 35 µl modifizierter DNA wurden 1 µl radioaktiv endmarkiertes ssDNA-Oligonukleotid (Kapitel IV, 2.2.4.5; $0.4-0.7 \times 10^6$ cpm/µl) und 4 µl 10 mM NaOH gegeben und sorgfältig vermischt. Die Proben wurden danach für 2 min bei 80°C denaturiert, anschließend auf Eis überführt und dort weitere 5 min inkubiert. Nach Zugabe von 5 µl 10x TMD-Puffer wurde die Hybridisierung des Oligonukleotid-Primers durchgeführt.

Hierzu wurde die Probe 3 min bei dem für den entsprechenden Primer berechneten T_m -Wert inkubiert und anschließend wiederum sofort auf Eis überführt. Die Berechnung des jeweiligen T_m -wertes erfolgte nach einer von Maniatis *et al.* (1982) beschriebenen Formel (Kapitel IV, 2.2.4.6).

Im Anschluss an die Hybridisierung wurden dem Reaktionsansatz auf Eis 5 µl 2x dNTP-Lösung und 1 µl Klenow-Enzym (5U/µl) zugegeben, gemischt und dann exakt 10 min bei 50°C inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurde 1/3 Volumen PE-Quench-Lösung zugesetzt, die Probe auf Eis überführt und mit 3 Volumen absolutem Ethanol in flüssigem Stickstoff gefällt (Kapitel IV, 2.2.2.2). Das getrocknete Pellet wurde in 6 µl Formamid-Probenpuffer (Kapitel IV, 1.6) aufgenommen und schließlich unter denaturierenden Bedingungen gelelektrophoretisch analysiert.

10x TMD-Puffer	0.5 M Tris-HCl, pH 7.2 0.1 M MgSO ₄ 2 mM DTT
4x dNTP-Lösung	je 5 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP in 10 mM TE-Puffer (Kapitel IV, 1.6)
PE-Quench-Lösung	4 M NH ₄ OAc 20 mM EDTA, pH 8.0

Literaturverzeichnis

- Adam Jaworski, N. P. H., Robert D. Wells, and Wolfgang Zacharias (1991). "Topoisomerase Mutants and Physiological Conditions Control Supercoiling and Z-DNA Formation *in Vivo*." Journal of Biological Chemistry **266**(4): 2576-2581.
- Afflerbach, H., O. Schröder and R. Wagner (1999). "Conformational changes of the upstream DNA mediated by H-NS and FIS regulate *E. coli* *rnnB* P1 promoter activity." J. Mol. Biol. **286**(2): 339-53.
- Aiyar, S. E., J. D. Helmann and P. L. deHaseth (1994). "A mismatch bubble in double-stranded DNA suffices to direct precise transcription initiation by *Escherichia coli* RNA polymerase." Journal of Biological Chemistry **269**: 13179-13184.
- Aiyar, S. E. *et al.* (2002). "Architecture of FIS-activated transcription complexes at the *Escherichia coli* *rnnB* P1 promoters." J. Mol. Biol. **316**: 501-516.
- Aldea, M., Hernandez-Chico, H., De la Campa, A. G., Kushner, S. R. and Vincente, M. (1988). "Identification, cloning and expression of *bolA*, an *ftsZ*-dependent morphogene of *E. coli*." J. Bacteriol. **170**: 5169-5176.
- Anderson, P. a. B., W. (1978). "Supercoiling in closed circular DNA: dependence upon ion type and concentration." Biochemistry **17**: 594-601.
- Artsimovitch, I., Patlan, V., Sekine, S., Vassylyeva, MN., Hosaka, T., Ochi, K., Yokoyama, S. and DG.Vassylyev (2004). "Structural basis for transcription regulation by alarmone ppGpp." Cell **117**(3): 299-310.
- Artsimovitch, I. *et al.* (2000). "RNA polymerase from *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* differ in recognition of regulatory signals *in vitro*." J. Bacteriol. **182**: 6027-6035.
- Bachmann, B. J. (1987). "Derivations and genotypes of some mutant derivatives of *E. coli* K12." *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* : cellular and molecular biology. Ingraham, J. L., Low, K. B., Magasanik, B., Schaechter, M. and Umberger (eds). American Society for Microbiology. Washington DC: 1191-1219.
- Balke, V. L. a. J. D. G. (1987). "Changes in the Linking Number of Supercoiled DNA Accompany Growth Transitions in *Escherichia coli*." Journal of Bacteriology **169**(10): 4499-4506.
- Ballesteros, M., S. Kusano, A. Ishihama and M. Vicente (1998). "The *ftsQ1p* gearbox promoter of *Escherichia coli* is a major sigma S- dependent promoter in the *ddlB-ftsA* region." Mol Microbiol **30**(2): 419-30.
- Barker, M. M., T. Gaal and R. L. Gourse (2001). "Mechanism of regulation of transcription initiation by ppGpp. II. Models for positive control based on properties of RNAP mutants and competition for RNAP." J. Mol. Biol. **305**: 689-702.
- Barker, M. M., T. Gaal, C. A. Josaitis and R. L. Gourse (2001). "Mechanism of regulation of transcription initiation by ppGpp. I. Effects of ppGpp on transcription initiation *in vivo* and *in vitro*." J. Mol. Biol. **305**: 673-688.
- Barne, K. A., J. A. Bown, S. J. W. Busby and S. D. Michin (1997). "Region 2.5 of the *Escherichia coli* RNA polymerase σ^{70} subunit is responsible for the recognition of the "extended -10" motif at promoters." EMBO Journal **16**: 4034-4040.

- Barth, M. *et al.* (1995). "Role for the histone-like protein H-NS in growth phase-dependent and osmotic regulation of sigma S and many sigma S-dependent genes in *Escherichia coli*." J. Bacteriol **177**(12): 3455-64.
- Bartlett, M. S. and R. L. Gourse (1994). "Growth rate-dependent control of the *rrnB* P1 core promoter in *Escherichia coli*." J. Bacteriol. **176**: 5560-5564.
- Becker, G. and R. Hengge-Aronis (2001). "What makes an *Escherichia coli* promoter σ^S dependent? Role of the -13/-14 nucleotide promoter positions and region 2.5 of σ^S ." Mol. Microbiol. **39**: 1153-1165.
- Beidler, J. L., P. R. Hillard and R. L. Rill (1982). "Ultrasensitive staining of nucleic acids with silver." Analytical. Biochem. **126**: 374-380.
- Blatter, E. E. *et al.* (1994). "Domain organization of RNA polymerase σ subunit: C-terminal 85 amino acids constitute a domain capable of dimerization and DNA binding." Cell **78**: 889-896.
- Blum, H., H. Beier and H. J. Gross (1987). "Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels." Electrophoresis **8**: 93-99.
- Bordes, P., Conter, A. Morales, V., Bouvier, J., Kolb, A. and C. Gutierrez (2003). "DNA supercoiling contributes to disconnect σ^S accumulation from σ^S -dependent transcription in *Escherichia coli*." Molecular Microbiology **48**((2)): 561-571.
- Borukhov, S. and A. Goldfarb (1993). "Recombinant *Escherichia coli* RNA polymerase: purification of individually overexpressed subunits and *in vitro* assembly." Protein expression and Purification **4**: 503-511.
- Borukhov, S. *et al.* (1993). "Two modes of transcription initiation *in vitro* at the *rrnB* P1 promoter of *Escherichia coli*." J. Biol. Chem. **268**: 23477-23482.
- Boyer, H. W. and D. Roulland-Dussoix (1969). "A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*." J. Mol. Biol. **41**: 459-472.
- Bradaczek, C. (1991). "Untersuchung nahe am Promotor P1 des *rrnB*-Operons bindender Proteine aus *E. coli*." Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- Brown, L., D. Gentry, T. Elliot and M. Cashel (2002). "DksA affects ppGpp induction of RpoS at a translational level." J. Bacteriol. **184**: 4455-4465.
- Burgess, R. R. and J. J. Jendrisak (1975). "A procedure for the rapid, large scale purification of *E. coli* DNA-dependent RNA polymerase involving Polymin P precipitation and DNA cellulose chromatography." Biochemistry **14**: 4636-4638.
- Burgess, R. R., Travers, A. A., Dunn, J. J. and Bautz, E. K. F. (1969). "Factor stimulating transcription by RNA polymerase." Nature **221**: 43-46.
- Camarero, J. A., Shekhtman, A., Campbell, E. A., Chlenov, M., Gruber, T. M., Bryant, D.A., Darst, S. A., Cowburn, D. and T. W. Muir (2002). "Autoregulation of a bacterial factor explored by using segmental isotopic labeling and NMR." Proc Natl Acad Sci USA **99**: 8536-8541.
- Cammack, K. A. and H. E. Wade (1965). "The sedimentation behaviour of ribonuclease-active and inactive ribosomes from bacteria." Biochem. J. **96**: 679-680.
- Campbell, E. A. *et al.* (2002). "Structure of the bacterial RNA polymerase promoter specificity σ subunit." Molecular Cell **9**: 527-538.

- Carmona, M., M. J. Rodriguez, O. Martinez-Costa and V. De Lorenzo (2000). "In vivo and in vitro effects of (p)ppGpp on the sigma(54) promoter Pu of the TOL plasmid of *Pseudomonas putida*." J Bacteriol **182**(17): 4711-8.
- Cashel, M. (1969). "The control of ribonucleic acid synthesis in *Escherichia coli*. IV. Relevance of unusual phosphorylated compounds from amino acid starved stringent strains." J. Biol. Chem. **244**: 3133-3141.
- Cashel, M. (1974). "Preparation of guanosine tetraphosphate (ppGpp) and guanosine pentaphosphate (pppGpp) from *Escherichia coli* ribosomes." Analytical Biochemistry **57**: 100-107.
- Chamberlin, M. J., W. C. Nierman, J. Wiggs and N. Neff (1979). "A quantitative assay for bacterial RNA polymerases." J. Biol. Chem. **254**: 10061-10069.
- Chatterji, D., N. Fujita and A. Ishihama (1998). "The mediator for stringent control, ppGpp, binds to the beta-subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase." Genes Cells **3**(5): 279-87.
- Checroun, C. *et al.* (2004). "Interactions between the 2.4 and 4.2 regions of σ^S , the stress-specific σ factor of *Escherichia coli*, and the -10 and -35 promoter elements." Nucleic Acids Res. **32**: 45-53.
- Choy, H. E. (2000). "The study of guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate-mediated transcription regulation in vitro using a coupled transcription-translation system." J Biol Chem **275**(10): 6783-9.
- Colland, F., M. Barth, R. Hengge-Aronis and A. Kolb (2000). "Sigma factor selectivity of *Escherichia coli* RNA polymerase: role for CRP, IHF and Lrp transcription factors." EMBO Journal **19**: 3028-3037.
- Colland, F., N. Fujita, A. Ishihama and A. Kolb (2002). "The interaction between σ^S , the stationary phase sigma factor, and the core enzyme of *Escherichia coli* RNA polymerase." Genes Cells **7**: 233-247.
- Dagert, A. a. E., S. D. (1979). "Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli*." Gene **6**: 23-26.
- Dame, R. T. *et al.* (2002). "Structural basis for H-NS-mediated trapping of RNA polymerase in the open initiation complex at *rmB* P1." J. Biol. Chem. **277**: 2146-2150.
- Datwyler, S. A. and C. F. Meares (2000). "Protein-protein interactions mapped by artificial proteases: where sigma factors bind to RNA polymerase." Trends Biochem. Sci. **25**: 408-414.
- Ding, Q., S. Kusano, M. Villarejo and A. Ishihama (1995). "Promoter selectivity control of *Escherichia coli* RNA polymerase by ionic strength: differential recognition of osmoregulated promoters by E sigma D and E sigma S holoenzymes." Mol Microbiol **16**(4): 649-56.
- Dinnbier, U., Limpinsel, E., Schmid, R. and Bakker, E.P. (1988). "Transient accumulation of potassium glutamate and its replacement by trehalose during adaptation of growing cells of *Escherichia coli* K-12 to elevated sodium chloride concentrations." Arch. Microbiol. **150**: 348-357.
- Dombroski, A. J., W. A. Walter and C. A. Gross (1993). "Amino-terminal amino acids modulate σ -factor DNA-binding activity." Genes & Development **7**: 2446-2455.
- Dombroski, A. J. *et al.* (1992). "Polypeptides containing highly conserved regions of transcription factor sigma 70 exhibit specificity of binding to promoter DNA." Cell **70**: 501-512.
- Ellwood, M. and M. Nomura (1982). "Chromosomal locations of the genes for rRNA in *Escherichia coli*." J. Bacteriol. **149**: 458-468.

- Espinosa-Urgel, M., C. Chamizo and A. Tormo (1996). "A consensus structure for σ^s -dependent promoters." Molecular Microbiology **21**: 657-659.
- Espinosa-Urgel, M. and A. Tormo (1993). " σ^s -dependent promoters in *Escherichia coli* are located in DNA regions with intrinsic curvature." Nucleic Acids Research **21**: 3667-3670.
- Estrem, S. T. *et al.* (1999). "Bacterial promoter architecture: subsite structure of UP elements and interactions with the carboxy-terminal domain of the RNA polymerase σ subunit." Genes & Development **13**: 2134-2147.
- Farewell, A., Kvint, K. and Nystrom, T (1998). "Negative regulation by Rpos: a case of sigma factor competition." Mol. Microbiol. **29**: 1039-1051.
- Fasman, G. D. (1979). "Handbook of biochemistry and molecularbiology." 3rd Ed., Vol. 1, CRC Press Cleveland, Ohio.
- Fenton, M. S. and J. D. Gralla (2001). "Function of the bacterial TATAAT -10 element as single-stranded DNA during RNA polymerase isomerization." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **98**: 9020-9025.
- Fenton, M. S. and J. D. Gralla (2003). "Effect of DNA bases and backbone on sigma70 holoenzyme binding and isomerization using fork junction probes." Nucleic Acids Res **31**(11): 2745-50.
- Finn, R. D., Orlova, B. G., Buck, M. and M. van Heel (2000). "*Escherichia coli* RNA polymerase core and holoenzyme structures." Embo J **19**(24): 6833-6844.
- Fredrick, K. a. H., J. D. (1997). "RNA polymerase sigma factor determines start-site selection but is not required for upstream promotor element activation on heteroduplex (bubble) templates." Proc Natl Acad Sci **94**: 4982-4987.
- Gaal, T. *et al.* (1997). "Transcription regulation by initiating NTP concentration: rRNA synthesis in bacteria." Science **278**: 2092-2097.
- Gaal, T. and R. L. Gourse (1990). "Guanosine 3'-diphosphate 5'-diphosphate is not required for growth rate-dependent regulation of rRNA transcription in *Escherichia coli*." Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A. **87**: 5533-5537.
- Gaal, T. *et al.* (2001). "Promoter recognition and discrimination by E σ^s RNA polymerase." Molecular Microbiology **42**: 939-954.
- Galas, D. J. (1978). "DNase I footprinting: a simple method for the detection of protein-DNA binding specificity." Nucleic Acids Research **5**: 3157-3170.
- Gentry, D. *et al.* (1993). "Synthesis of stationary-phase sigma factor σ^s is positively regulated by ppGpp." Journal of Bacterioloy **175**: 7982-7989.
- Germer, J., G. Becker, M. Metzner and R. Hengge-Aronis (2001). "Role of activator site position and a distal UP-element half-site for sigma factor selectivity at a CRP/H-NS-activated sigma-dependent promoter in *Escherichia coli*." Mol Microbiol **41**(3): 705-16.
- Germer, J., A. Muffler and R. Hengge-Aronis (1998). "Trehalose is not relevant for in vivo activity of sigmaS-containing RNA polymerase in *Escherichia coli*." J Bacteriol **180**(6): 1603-6.
- Gesteland, R. F. (1966). "Isolation and characterization of ribonuclease I mutants of *Escherichia coli*." J. Mol. Biol. **16**: 67-84.
- Gourse, R. L. (1988). "Visualization and quantitative analysis of complex formation between *E. coli* RNA polymerase and an rRNA promoter *in vitro*." Nucleic Acids Research **16**: 9789-9809.

- Gross, C. A., C. L. Chan and M. A. Lonetto (1996). "A structure/function analysis of *Escherichia coli* RNA polymerase." Philosophical Transactions of the Royal Society London **351**: 475-482.
- Hanahan, D. (1985). "Techniques for transformation of *E. coli*." DNA cloning, D. M. Glover (ed.) **Vol. 1**: 121-124.
- Hart, C. M. a. R., J. W. (1994). "Deletion analysis of the lambda tR1 termination region: effect of sequences near the transcript release site and the minimum length of Rho-dependent transcripts." J. Mol. Biol. **237**: 255-265.
- Haseltine, W. and R. Block (1973). "Synthesis of guanosine tetra- and pentaphosphate requires the presence of a codon-specific, uncharged transfer ribonucleic acid in the acceptor sites of ribosomes." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **70**: 1564-1568.
- Hayatsu, H. (1996). "The 5,6-double bond of pyrimidine nucleosides, a fragile site in nucleic acids." J Biochem (Tokyo) **119**: 391-395.
- Hayatsu, H. and T. Ukita (1967). "The selective degradation of pyrimidines in nucleic acids by permanganate oxidation." Biochem. Biophys. Res. Commun. **29**: 556-561.
- Heinemann, M. and R. Wagner (1997). "Guanosine 3',5'-bis(diphosphate) (ppGpp)-dependent inhibition of transcription from stringently controlled *Escherichia coli* promoters can be explained by an altered initiation pathway that traps RNA polymerase." Eur. J. Biochem. **247**: 990-999.
- Hengge-Aronis, R. (1996). "Back to log phase: sigma S as a global regulator in the osmotic control of gene expression in *Escherichia coli*." Mol Microbiol **21**(5): 887-93.
- Hengge-Aronis, R. (2000). "Bacterial Stress Responses, Chapter 11: The General Stress Response in *Escherichia coli*." ASM Press: 161-178.
- Hengge-Aronis, R. (2003). "The General Stress Response Regulatory Network in *Escherichia coli*." Horizon Scientific Press: Chapter 26, 174-179.
- Hengge-Aronis, R., Lange, R., Henneberg, N. and Fischer, D. (1993). "Osmotic Regulation of *rpoS*-Dependent Genes in *Escherichia coli*." Journal of Bacteriology **175**(1): 259-265.
- Hernandez, V. J. and H. Bremer (1991). "*Escherichia coli* ppGpp synthetase II activity requires *spoT*." J. Biol. Chem. **266**: 5991-5999.
- Hernandez, V. J. and M. Cashel (1995). "Changes in conserved region 3 of *Escherichia coli* σ^{70} mediate ppGpp-dependent functions *in vivo*." J. Mol. Biol. **252**: 536-549.
- Hillen, W., R. D. Klein and R. D. Wells (1981). "Preparation of milligram amounts of 21 deoxyribonucleic acid restriction fragments." Biochemistry **20**(13): 3748-56.
- Hirsch, M. and T. Elliott (2002). "Role of ppGpp in *rpoS* stationary-phase regulation in *Escherichia coli*." J. Bacteriol. **184**: 5077-5087.
- Hsu, L. M. (2002). "Open season on RNA polymerase." Nature **9**(7): 502-504.
- Igarashi, K., N. Fujita and A. Ishihama (1991). "Identification of a subunit assembly domain in the alpha subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase." Journal of Molecular Biology **218**: 1-6.
- Igarashi, K. *et al.* (1991). "Functional map of the α subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase: Two modes of transcription activation by positive factors." Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A. **88**: 8958-8962.

- Igarashi, K. a. I., A. (1991). "Bipartite functional map of the *E. coli* RNA polymerase σ subunit: Involvement of the C-terminal region in transcription activation by cAMP-CRP." Cell **65**: 1015-1022.
- Ilag, L. L. *et al.* (2004). "Mass Spectrometry of Escherichia coli RNA Polymerase; Interactions of the Core Enzyme with sigma(70) and Rsd Protein." Structure (Camb) **12**(2): 269-75.
- Ish-Horowicz, D. and J. F. Burke (1981). "Rapid and efficient cosmid cloning." Nucleic Acids Res **9**(13): 2989-98.
- Ishihama, A. (1981). "Subunit assembly of *Escherichia coli* RNA polymerase." Advanced Biophysics **14**: 1-35.
- Ishihama, A. (2000). "Functional modulation of *Escherichia coli* RNA polymerase." Annu Rev Microbiol **18**: 499-518.
- Jensen, K. F. and S. Pedersen (1990). "Metabolic growth rate control in *Escherichia coli* may be a consequence of subsaturation of the macromolecular biosynthetic apparatus with substrates and catalytic components." Microbiological Reviews **54**: 89-100.
- Jeong, W. a. K., C. (1994). "Start site selection at *lacUV5* promoter affected by the sequence context around the initiation sites." Nucleic Acids Res **22**: 4667-4672.
- Jin, D. J., Burgess, R. R., Richardson, J. P. and Gross, C. A. (1992). "Termination efficiency at rho-dependent terminators depends on kinetic coupling between RNA polymerase and rho." proc Natl Acad Sci USA **89**: 1453-1457.
- Jishage, M., K. Kvint, V. Shingler and T. Nystrom (2002). "Regulation of sigma factor competition by the alarmone ppGpp." Genes & Development **16**: 1260-1270.
- Jöres, L. (2001). "Einfluss von Guanosintetraphosphat auf die Transkriptionsinitiation ribosomaler RNA P1-Promotoren von *Escherichia coli*." Doktorarbeit, Physikalische Biologie, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- Jöres, L. and R. Wagner (2003). "Essential steps in the ppGpp-dependent regulation of bacterial ribosomal RNA promoters can be explained by substrate competition." J. Biol. Chem. **278**: 16834-16843.
- Kingston, R. E., W. C. Nierman and C. M. J. (1981). "A direct effect of guanosine tetraphosphate on pausing of *Escherichia coli* RNA polymerase during RNA chain elongation." Journal of Biological Chemistry **256**: 2787-2797.
- Kirkegaard, K., H. Buc, A. Spassky and J. C. Wang (1983). "Mapping of single-stranded regions in duplex DNA at the sequence level: Single-strand-specific cytosine methylation in RNA polymerase-promoter complexes." Proc Natl Acad Sci U S A **80**: 2544-2548.
- Korzheva, N. *et al.* (2000). "A structural model of transcription elongation." Science **289**: 619-625.
- Krohn, M. (1994). "Pausierung der DNA-abhängigen RNA-Polymerase als eine Mittel der globalen Transkriptionskontrolle in *Escherichia coli*." Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- Krohn, M. and R. Wagner (1995). "A procedure for the rapid preparation of guanosine tetraphosphate (ppGpp) from *Escherichia coli* ribosomes." Anal. Biochem. **225**: 188-190.

- Krohn, M. and R. Wagner (1996). "Transcriptional pausing of RNA polymerase in the presence of guanosine tetraphosphate depends on the promoter and gene sequence." J. Biol. Chem. **271**: 23884-23894.
- Krummel, B. and M. J. Chamberlin (1992). "Structural analysis of ternary complexes of *Escherichia coli* RNA polymerase. Deoxyribonuclease I footprinting of defined complexes." J. Mol. Biol. **225**: 239-250.
- Kusano, S., Q. Ding, N. Fujita and A. Ishihama (1996). "Promoter selectivity of *Escherichia coli* RNA polymerase E σ^{70} and E σ^{38} holoenzymes." Journal of Biological Chemistry **271**: 1989-2004.
- Kusano, S. and A. Ishihama (1997). "Stimulatory effect of trehalose on formation and activity of *Escherichia coli* RNA polymerase E sigma38 holoenzyme." J Bacteriol **179**(11): 3649-54.
- Kvint, K., A. Farewell and T. Nystrom (2000). "RpoS-dependent promoters require guanosine tetraphosphate for induction even in the presence of high levels of sigma(s)." J Biol Chem **275**(20): 14795-14798.
- Lacour, S., A. Kolb, Z. Boris and P. Landini (2002). "Mechanism of specific recognition of the *aidB* promoter by σ^S -RNA." Biochem. Biophys. Res. Commun. **292**: 922-930.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**: 680-685.
- Lange, R., D. Fischer and R. Hengge-Aronis (1995). "Identification of transcriptional start sites and the role of ppGpp in the expression of rpoS, the structural gene for the sigma S subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli*." J Bacteriol **177**(16): 4676-80.
- Lange, R. and R. Hengge-Aronis (1991). "Growth phase-regulated expression of *bolA* and morphology of stationary- phase *Escherichia coli* cells are controlled by the novel sigma factor sigma S." J Bacteriol **173**(14): 4474-81.
- Laurie, A. D. *et al.* (2002). "The role of the alarmone (p)ppGpp in s^N competition for core RNA polymerase." J. Biol. Chem. **277**: in press.
- Lee, S. J. a. G., J.D. (2004). "Osmo-Regulation of Bacterial Transcription via poised RNA Polymerase." Molecular c **14**: 153-162.
- Liang, S.-T. *et al.* (1999). "Activities of constitutive promoters in *Escherichia coli*." Journal of Molecular Biology **292**: 19-37.
- Liebig, B. and R. Wagner (1995). "Effects of different growth conditions on the *in vivo* activity of the tandem *Escherichia coli* ribosomal RNA promoters P1 and P2." Mol. Gen. Genet. **249**: 328-335.
- Lisser, S. and H. Margalit (1993). "Compilation of *E. coli* mRNA promoter sequences." Nucleic Acids Research **21**: 1507-1516.
- Lonetto, M., M. Gribskov and C. A. Gross (1992). "The σ^{70} family: sequence conservation and evolutionary relationships." Journal of Bacteriology **174**: 3843-3849.
- Lottspeich, F. a. Z., H. (Hrsg.) (1998). "Bioanalytik." Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg/Berlin.
- Lowe, P. A., D. A. Hager and R. R. Burgess (1979). "Purification and properties of the sigma subunit of *Escherichia coli* DNA-dependent RNA polymerase." Biochemistry **18**(7): 1344-52.
- Malhotra, A., E. Severinova and S. A. Darst (1996). "Crystal structure of a σ^{70} subunit fragment from *E. coli* RNA polymerase." Cell **87**: 127-136.

- Maniatis, T., E. F. Fritsch and J. Sambrook (1982). Molecular cloning: A laboratory manual. New York, Cold Spring Harbor.
- Martin, F. H. and I. J. Tinoco (1980). "DNA-RNA hybrid duplexes containing oligo(dA:rU) sequences are exceptionally unstable and may facilitate termination of transcription." Nucleic Acids Research **8**: 2295-2299.
- Mecasas, J., D. W. Cowing and C. A. Gross (1991). "Development of RNA polymerase-promoter contacts during open complex formation." J. Mol. Biol. **220**: 585-597.
- Melancon, P., R. R. Burgess and R. T. (1983). "Direct evidence for the preferential binding of *Escherichia coli* RNA polymerase to the ends of deoxyribonucleic acid restriction fragments." Biochemistry **22**: 5169-5176.
- Meng, W. *et al.* (2001). "UP element-dependent transcription at the *Escherichia coli* *rrnB* P1 promoter: positional requirements and role of the RNA polymerase σ subunit linker." Nucleic Acids Research **29**: 4166-4178.
- Messing, J. (1983). "New M13 vectors for cloning." Methods Enzymol **101**: 20-78.
- Messing, J., R. Crea and P. H. Seeburg (1981). "A system for shotgun DNA sequencing." Nucleic Acids Res **9**(2): 309-21.
- Messing, J., B. Gronenborn, B. Muller-Hill and P. Hans Hopschneider (1977). "Filamentous coliphage M13 as a cloning vehicle: insertion of a HindIII fragment of the lac regulatory region in M13 replicative form in vitro." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(9): 3642-6.
- Messing, J. and J. Vieira (1982). "A new pair of M13 vectors for selecting either DNA strand of double-digest restriction fragments." Gene **19**(3): 269-76.
- Minakhin, L., Bhagat, S., Brunning, A., Campell E.A., Darst, S. A., Ebright, R. H. and Severinov, K. (2001). "Bacterial RNA polymerase subunit omega and eukaryotic RNA polymerase subunit RPB6 are sequence, structural and functional homologs and promote RNA polymerase assembly." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(892-987).
- Mooney, R. A., I. Artsimovitch and R. Landick (1998). "Information processing by RNA polymerase: recognition of regulatory signals during RNA chain elongation." Journal of Bacteriology **180**: 3265-3275.
- Muffler, A., M. Barth, C. Marschall and R. Hengge-Aronis (1997). "Heat shock regulation of σ^s turnover: a role for DnaK and relationship between stress responses mediated by σ^s and σ^{32} in *Escherichia coli*." Journal of Bacteriology **179**: 445-452.
- Mukherjee, K., H. Nagai, N. Shimamoto and D. Chatterji (1999). "GroEL is involved in activation of *Escherichia coli* RNA polymerase devoid of the σ subunit *in vivo*." European Journal of Biochemistry **266**: 228-235.
- Mukhopadhyay, J. *et al.* (2001). "Translocation of σ^{70} with RNA polymerase during transcription: fluorescence resonance energy transfer assay for movement relative to DNA." Cell **106**: 453-463.
- Mulligan, M. E., Hawley, D. K., Entriken, R. and W. R. McClure (1984). "*Escherichia coli* promoter sequences predict *in vitro* RNA polymerase selectivity." Nucleic Acids Res. **12**: 789-800.
- Mullis, K. B. and F. A. Faloona (1987). "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction." Methods Enzymol **155**: 335-50.
- Murray, H. D., J. A. Appleman and R. L. Gourse (2003). "Regulation of the *Escherichia coli* *rrnB* P2 promoter." J Bacteriol **185**(1): 28-34.

- Murray, H. D. a. G., R. L. (2004). "Unique roles of the *rrn* P2 rRNA promoters in *Escherichia coli*." Molecular Microbiology **52**(5): 1375-1387.
- Negishi, T., N. Fujita and A. Ishihama (1995). "Structural map of the alpha subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase: structural domains identified by proteolytic cleavage." Journal of Molecular Biology **248**: 723-728.
- Newlands, J. T., W. Ross, K. K. Gosink and R. L. Gourse (1991). "Factor-independent activation of *Escherichia coli* rRNA transcription II. Characterization of complexes of *rrnB* P1 promoters containing or lacking the upstream activator region with *Escherichia coli* RNA polymerase." Journal of Molecular Biology **220**: 569-583.
- Nguyen, L. H. and R. R. Burgess (1997). "Comparative Analysis of the Interactions of *Escherichia Coli* σ^s and σ^{70} RNA Polymerase Holoenzyme with the Stationary-Phase-Specific *bolAp1* Promoter." Biochemistry **36**: 1748-1754.
- Norlander, J., T. Kempe and J. Messing (1983). "Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis." Gene **26**(1): 101-6.
- Nudler, E. *et al.* (1998). "Spatial organization of transcription elongation complex in *Escherichia coli*." Science **281**: 424-428.
- Ohlsen, K. and J. D. Gralla (1992). "Interrelated effects of DNA supercoiling, ppGpp, and low salt on melting within the *Escherichia coli* ribosomal *rrnB* P1 promoter." Molecular Microbiology **6**: 2243-2251.
- Ohlsen, K. L. and J. D. Gralla (1992). "DNA melting within stable closed complexes at the *Escherichia coli* *rrnB* P1 promoter." J. Biol. Chem. **267**: 19813-19818.
- Ohnuma, M., Fujita, N., Ishihama, A., Tanaka, K. and H. Takahashi (2000). "A Carboxy-Terminal 16-Amino-Acid Region of σ^{38} of *Escherichia coli* Is Important for Transcription under High-Salt Conditions and Sigma Activities *In Vivo*." Journal of Bacteriology **182**(16): 4628-4631.
- Ojangu, E. L., Tover, A., Teras, R. and Kivisaar, M. (2000). "Effects of combination of different -10 hexamers and downstream sequences on stationary phase-specific sigma factor σ^s -dependent transcription in *Pseudomonas putida*." J. Bacteriol. **182**: 6707-6713.
- Paul, B. L., Barker, M. M., Ross, W., Schneider, D. A., Webb, c., Foster, J. W. and Gourse, R. L. (2004). "DksA: A Critical Component of the transcription Initiation Machinery that Potentiates the Regulation of rRNA Promoters by ppGpp and the Initiating NTP." Cell **2004**(118): 311-322.
- Perederina, A., Svetlov, V., Vassylyeva, M.N., Tahirov, T.H., Yokoyama, S., Artsimovitch, I., Vassylyev, D.G. (2004). "Regulation through the secondary channel--structural framework for ppGpp-DksA synergism during transcription." cell **118**(3): 297-309.
- Petersen, C. and L. B. Møller (2000). "Invariance of the nucleoside triphosphate pools of *Escherichia coli* with growth rate." Journal of Biological Chemistry **275**: 3931-3935.
- Polyakov, A., E. Severinova and S. A. Darst (1995). "Three-dimensional structure of *E. coli* core RNA polymerase: promoter binding and elongation conformations of the enzyme." Cell **83**: 365-373.
- Potrykus, K., G. Wegrzyn and V. J. Hernandez (2002). "Multiple mechanisms of transcription inhibition by ppGpp at the Lambda PR promoter." J. Biol. Chem. **277**: 43785-43791.

- Potrykus, K., Wegrzyn, G. and Hernandez VJ. (2004). "Direct stimulation of the lambda paQ promoter by the transcription effector guanosine-3',5'-(bis)pyrophosphate in a defined in vitro system." Journal of Biological Chemistry **279**(19): 19860-6.
- Pratt, L. A. and T. J. Silhavy (1998). "Crl stimulates RpoS activity during stationary phase." Mol Microbiol **29**(5): 1225-36.
- Raghavan, A., D. B. Kameshwari and D. Chatterji (1998). "The differential effects of guanosine tetraphosphate on open complex formation at the Escherichia coli ribosomal protein promoters rplJ and rpsA P1." Biophys Chem **75**(1): 7-19.
- Rajkumari, K. *et al.* (1996). "Effects of H-NS and potassium glutamate on sigmaS- and sigma70-directed transcription in vitro from osmotically regulated P1 and P2 promoters of proU in Escherichia coli." J Bacteriol **178**(14): 4176-81.
- Rao, L. *et al.* (1994). "Factor-independent activation of *rrnB* P1: An "extended" promoter with an upstream element that dramatically increases promoter strength." Journal of Molecular Biology **235**: 1421-1435.
- Reckendrees, B. (2000). "Strukturelle und funktionelle Analysen von RNA-Polymerasekomplexen mit "mismatch bubble" Templates in Gegenwart von Guanosintetraphosphat." Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- Record, M. T. *et al.* (1996). Escherichia coli RNA polymerase (E σ ⁷⁰), promoters, and the kinetics of the steps of transcription initiation. Washington, D. C., ASM Press.
- Richey, B. *et al.* (1987). "Variability of the intercellular ionic environment of *Escherichia coli*. Differences between *in vitro* and *in vivo* effects of ion concentrations on protein-DNA interactions and gene expression." J Biol Chem **262**: 7157-7164.
- Riggs, D. L., R. D. Müller, H.-S. Kwan and S. W. Artz (1986). "Promoter domain mediates guanosine tetraphosphate activation of the histidine operon." Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A. **83**: 9333-9337.
- Ross, W. *et al.* (1993). "A third recognition element in bacterial promoters: DNA binding by the σ subunit of RNA polymerase." Science **262**: 1407-1413.
- Ross, W., J. F. Thompson, J. T. Newlands and R. L. Gourse (1990). "*E. coli* Fis protein activates ribosomal RNA transcription *in vitro* and *in vivo*." EMBO Journal **9**: 3733-3742.
- Ryals, J., Little, R. and Bremer, H. (1982). "Control of rRNA and tRNA synthesis in *Escherichia coli* by guanosine tetraphosphate." J. Bacteriol. **151**: 1261-1268.
- Saecker, R. M. a. R., M.T., Jr. (2002). "Protein surface salt bridges and paths for DNA wrapping." Curr Opin Struct Biol **12**: 311-319.
- Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(12): 5463-7.
- Santos, J. M., P. Freire, M. Vicente and C. M. Arraiano (1999). "The stationary-phase morphogene *bolA* from *Escherichia coli* is induced by stress during early stages of growth." Mol Microbiol **32**(4): 789-98.
- Sasse-Dwight, S. and J. D. Gralla (1989). "KMnO₄ as probe for *lac* promoter DNA melting and mechanism *in vivo*." J. Biol. Chem. **264**: 8074-8081.
- Sasse-Dwight, S. and J. D. Gralla (1991). "Footprinting protein-DNA complexes *in vivo*." Methods Enzymology **208**: 146-168.

- Schneider, D. A. and R. L. Gourse (2003). "Relationship between growth rate and ATP concentration in *Escherichia coli*: A bioassay for available cellular ATP." J Biol Chem.
- Schröder, O. and R. Wagner (2000). "The bacterial DNA-binding protein H-NS represses ribosomal RNA transcription by trapping RNA polymerase in the initiation complex." J Mol Biol **298**(5): 737-48.
- Schwarzenberg, A. (1999). "Konstruktion und Analyse eines "mismatch bubble" Templates für die *in vitro* Transkription." Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- Severinov, K. *et al.* (1994). "The sigma subunit conserved region 3 is part of "5'-face" of active center of *Escherichia coli* RNA polymerase." Journal Biological Chemistry **269**: 20826-20828.
- Severinov, K. *et al.* (1995). "The σ -subunit Rif cluster I is only angstroms away from the active center of *Escherichia coli* RNA polymerase." Journal of Biological Chemistry **270**: 29428-29432.
- Shiba, T. *et al.* (1997). "Inorganic polyphosphate and the induction of rpoS expression." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(21): 11210-5.
- Silhavy, P. G., Berman, M. L. and enquist, L. W. (1984). "Experiments with gene fusions." Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, New York.
- Spassky, A. (1986). "Visualization of the movement of the *E. coli* RNA polymerase along the *lac* UV5 promoter during the initiation of transcription." Journal of Molecular Biology **188**: 99-103.
- Stern, S., D. Moazed and H. F. Noller (1988). "Structural analysis of RNA using chemical and enzymatic probing monitored by primer extension." Methods Enzymol. **164**: 481-489.
- Straney, D. C., S. B. Straney and D. M. Crothers (1989). "Synergy between *Escherichia coli* CAP protein and RNA polymerase in the *lac* promoter open complex." J Mol Biol **206**(1): 41-57.
- Sze, C. C. and V. Shingler (1999). "The alarmone (p)ppGpp mediates physiological-responsive control at the sigma 54-dependent *Po* promoter." Mol Microbiol **31**(4): 1217-28.
- Tanaka, K. *et al.* (1993). "Heterogeneity of the principal σ factor in *Escherichia coli*: the *rpoS* gene product, σ^{38} , is a second principal σ factor of RNA polymerase in stationary-phase *Escherichia coli*." Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A. **90**: 3511-3515.
- Tedin, K. and H. Bremer (1992). "Toxic effects of high levels of ppGpp in *Escherichia coli* are relieved by *rpoB* mutations." J. Biol. Chem. **267**: 2337-2344.
- Touloukhonov, I. I., I. Shulgina and V. J. Hernandez (2001). "Binding of the transcription effector ppGpp to *E. coli* RNA polymerase is allosteric, modular, and occurs near the N-terminus of the β '-subunit." Journal of Biological Chemistry **276**: 1220-1225.
- Travers, A. A. (1980). "Promoter sequence for stringent control of bacterial RNA synthesis." J. Bacteriol. **141**: 973-976.
- Tripatara, A. and P. L. deHaseth (1993). "A new start site for *Escherichia coli* RNA polymerase at an engineered short region of non-complementarity in double-stranded DNA." J Mol Biol **233**(3): 349-58.
- Trotochaud, A. E. a. K. M. W. (2004). "6S RNA Function Enhances Long-Term Cell Survival." J. Bacteriol. **186**(15): 4978-4985.

- Vassilyev, D. G. *et al.* (2002). "Crystal structure of a bacterial RNA polymerase holoenzyme at 2.6 Å resolution." Nature **417**: 712-719.
- Vogel, U. and K. F. Jensen (1994). "The RNA chain elongation rate in *Escherichia coli* depends on the growth rate." J. Bacteriol. **176**: 2807-2813.
- von Hippel, P. H. (1998). "An integrated model of the transcription complex in elongation, termination, and editing." Science **281**: 660-665.
- Wagner, R. (2000). Transcription Regulation in Prokaryotes. Oxford, Oxford University Press.
- Wagner, R. (2002). "Regulation of ribosomal RNA synthesis in *E. coli*: Effects of the global regulator guanosine tetraphosphate (ppGpp)." J. Mol. Microbiol. Biotechnol. **4**: 331-340.
- Walker, K. A. and R. Osuna (2002). "Factors affecting start site selection at the *Escherichia coli* *fis* promoter." J. Bacteriol. **184**: 4783-4791.
- Wellington, S. R. and G. B. Spiegelman (1993). "The kinetics of formation of complexes between *Escherichia coli* RNA polymerase and the *rrnB* P1 and P2 promoters of *Bacillus subtilis*." J. Biol. Chem. **268**: 7205-7214.
- Wilson, C. and A. J. Dombroski (1997). "Region 1 of sigma 70 is required for efficient isomerization and initiation of transcription by *Escherichia coli* RNA polymerase." Journal of Molecular Biology **267**: 60-74.
- Xiao, H. *et al.* (1991). "Residual guanosine 3',5'-bispyrophosphate synthetic activity of *relA* null mutants can be eliminated by *spoT* null mutations." J Biol Chem **266**(9): 5980-90.
- Yamashino, T., C. Ueguchi and T. Mizuno (1995). "Quantitative control of the stationary phase-specific sigma factor, sigma S, in *Escherichia coli*: involvement of the nucleoid protein H-NS." Embo J **14**(3): 594-602.
- Yanisch-Peron, C., J. Vieira and J. Messing (1985). "Improved M13 mp18 pUC19 vectors." Gene **33**: 103-119.
- Zabeau, M. a. R., R. (1979). "The role of restriction endonucleases in molecular genetics." Molecular Genetics, J. H. Taylor.
- Zacharias, M., H. U. Göringer and R. Wagner (1989). "Influence of the GCGC discriminator motif introduced into the ribosomal RNA P2- and *tac* promoter on growth rate control and stringent sensitivity." EMBO J. **11**: 3357-3363.
- Zacharias, M., H. U. Göringer and R. Wagner (1990). "The signal for growth rate control and stringent sensitivity in *E. coli* is not restricted to a particular sequence motif within the promoter region." Nucleic Acids Res. **18**: 6271-6275.
- Zhi, H. *et al.* (2003). "Fis stabilizes the interaction between RNA polymerase and the ribosomal promoter *rrnB* P1, leading to transcriptional activation." J Biol Chem **278**(47): 47340-9.
- Zhou, Y. N. and D. J. Jin (1998). "The *rpoB* mutants destabilizing initiation complexes at stringently controlled promoters behave like 'stingent' RNA polymerases in *Escherichia coli*." Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A. **95**: 2908-2913.

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
Å	Ångström
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Bis	Bisacrylamid
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytidin
'ccc'	superhelikale DNA
°C	Grad Celsius
Ci	Curie
cm	Zentimeter
cpm	'counts per minute'
CTP	Cytidintriphosphat
D, Asp	Asparaginsäure
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddATP	Didesoxyadenosintriphosphat
ddCTP	Didesoxycytidintriphosphat
ddGTP	Didesoxyguanosintriphosphat
ddTTP	Didesoxythymidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DC	Dünnschichtchromatographie
E, Glu	Glutaminsäure
E ₂₆₀	Extinktion bei 260 nm
E70	\square^{70} -Holoenzym der RNAP von <i>E. coli</i>
E38	\square^{38} -Holoenzym der RNAP von <i>E. coli</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
evtl.	eventuell
FIS	'factor for inversion stimulation'
G	Guanosin
g	Gramm
GTP	Guanosintriphosphat
H, His	Histidin

h	Stunde
H-NS	'histone-like nucleoid structuring protein'
K, Lys	Lysin
k	kilo (10^3)
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KGlu	Kaliumglutamat
L, Leu	Leucin
l	Liter
m	milli (10^{-3})
M	Molar
mA	Milliamper
min	Minute
mm	Millimeter
mRNA	'messenger RNA'
μ	mikro (10^{-6})
n	nano (10^{-9})
nt	Nukleotid(e)
OD	Optische Dichte
p	pico (10^{-12})
P	Promotor
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PE	Primer-Extension
PEG	Polyethylenglycol
pfu	'plaque forming units'
ppGpp	Guanosintetraphosphat
pppGpp	Guanosinpentaphosphat
PSI	(p)ppGpp-Synthetase I
PSII	(p)ppGpp-Synthetase II
Q, Gln	Gutamin
R, Arg	Arginin
RNA	Ribonukleinsäure
RNAP	RNA-Polymerase
RNase	Ribonuklease
RP _c	geschlossener Promotorkomplex
rpm	'rounds per minute'
RP _o	offener Promotorkomplex
RP _{init}	Initiationskomplex
rrn	ribosomale Transkriptionseinheit
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
S	Siemens
SDS	Natriumdodecylsulfat
s	Sekunde
ss	einzelsträngig

t	Zeit
T	Thymidin
T, Thr	Threonin
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
U	Uridin
UAS	'upstream activating sequence'
üN	über Nacht
UTP	Uridintriphosphat
UP-Element	'upstream element'
UV	ultraviolett
V	Volt
V, Val	Valin
v/v	'volume per volume'
W	Watt
w/v	'weight per volume'
Y ,Tyr	Tyrosin
z.B.	zum Beispiel