

**Analyse bakterieller Ribosomenpools
- gibt es streßbedingte Unterschiede ?**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von
Marc Meißner
aus Viersen

Düsseldorf 2004

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

Referent: Rolf Wagner

Korreferent: Ulrich Rüter

Tag der mündlichen Prüfung: 23.7.2004

Meiner Familie

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Rolf Wagner, der durch seine stete Diskussionsbereitschaft und wissenschaftliche Betreuung wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beitrug.

Ich danke allen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe für ihre Ratschläge, Diskussions- und Hilfsbereitschaft und für ein hervorragendes Arbeitsklima.

Bei meinen Kollginnen Britta Reckendrees, Corinna Pohl und Bianca Komp bedanke ich mich für die wissenschaftlichen und nicht so wissenschaftlichen Diskussionen und Gespräche mit denen sie mich schon seit dem Studium begleiten.

Dank gilt auch Frau Reinhild Wurm, die immer mit Rat und Tat zur Stelle war.

Den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Prof. Dr. D. Riesner danke ich für gute Zusammenarbeit, vor allem den Kollegen der Rechnergruppe, die sich jedem noch so banalen Problem annahmen.

Ich danke meinen Freunden für alle Hilfe und Geduld, die ich ihnen abverlangt habe.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern, meiner Schwester und meinem Schwager für ihre Unterstützung.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Aufbau und Struktur der RNA	1
1.2	Funktionen der RNA	3
1.3	Aufbau eines ribosomalen Operons	5
1.4	Prozessierung der ribosomalen RNA	6
1.5	Assemblierung der ribosomalen Untereinheiten	7
1.6	Die Redundanz ribosomaler Operons in <i>Escherichia coli</i>	7
1.6.1	Verteilung der ribosomalen Operons auf dem <i>E.coli</i> -Genom	9
1.7	Die Anpassung des bakteriellen Wachstums an wechselnde Umweltbedingungen	10
1.7.1	Reaktion auf wechselnde Nährstoffangebote	10
1.7.2	Die Hitzeschock-Reaktion von <i>E.coli</i>	11
1.7.3	Die Kälteschock-Reaktion von <i>E. coli</i>	11
1.8	Fragestellung und Konzeption der Arbeit	12
2	Ergebnisse	14
2.1	Theoretische Vorbemerkungen	14
2.1.1	Sequenzalignments	14
2.1.2	Sekundärstruktur	18
2.2	Analysen der Ribosomenpools im <i>E. coli</i> -Stamm MC4100	20
2.2.1	Hitzeschock Analysen im MC4100	20
2.2.2	Polysomenpräparation aus MC4100	21
2.2.3	Primer-Extension-Analysen der Ribosomenpopulationen	24
2.3	Analysen der Ribosomenpools im <i>E. coli</i> -Stamm MG1655	36
2.3.1	Analysen des MG1655-Ribosomenpools nach Hitzeschock	36

2.3.2	Analysen des MG1655-Ribosomenpools nach Kälteschock	46
2.4	Primer-Extension-Analysen der 16 rRNA des <i>rrnC</i> -Operons	54
2.5	Konstruktion und Analyse von Vektoren mit verschiedenen 16S rRNAs . .	57
2.5.1	Konstruktion der Vektoren pKK16S-C und pKK16S-H	57
2.5.2	Transformation der pKK-Vektoren in TA554	59
2.5.3	Bestimmung der relativen Plasmidkopienzahl der pKK-Vektoren in TA554	59
2.5.4	Analyse der Polysomenprofile der pKK-Vektoren in TA554	61
2.5.5	Primer-Extension-Analysen der Ribosomen aus den TA554/pKK- Stämmen	61
2.5.6	Wachstumsanalysen der pKK-Vektoren in TA554	65
3	Diskussion	71
3.1	Die differentielle Nutzung von Ribosomen mit rRNAs unterschiedlicher Herkunft	71
3.2	Analysen verschiedener Ribosomenpools vor und nach Streß-Induktion . .	72
3.2.1	Der Einfluß von Hitzeschock auf die Ribosomenpools	72
3.2.2	Der Einfluß von Kälteschock auf die Ribosomenpools	78
3.2.3	Analysen des <i>rrnC</i> -Operons	79
3.2.4	Wachstumsanalysen der TA554/pKK-Stämme	82
3.2.5	Zusammenfassung und Einordnung der Ergebnisse	84
3.2.6	Redundanz der ribosomalen Operons in <i>E. coli</i> - Gendosis kontra funktionelle Anpassung	87
3.2.7	Ausblick	89
4	Material	91
4.1	Allgemeine Vorbemerkung	91
4.2	Bakterienstämme und Plasmide	91
4.2.1	Verwendete <i>Escherichia coli</i> Stämme	91
4.2.2	Verwendete Plasmide	92
4.3	Enzyme	92
4.4	Nukleinsäuren und Nukleotide	93
4.4.1	Oligonukleotide	93
4.4.2	Molekulargewichtsmarker	94

4.4.3	Nukleotide	94
4.5	Standardpuffer	95
4.6	Medien	96
4.7	Feinchemikalien	97
4.8	Verschiedenes	98
5	Methoden	99
5.1	Mikrobiologische Methoden	99
5.1.1	Sterilisation von Lösungen und Geräten	99
5.1.2	Kultivierung von Bakterienstämmen	99
5.1.3	Herstellen von Glycerinstocks	99
5.1.4	Aufnehmen von Wachstumskurven mittels VIS-Spektroskopie . . .	100
5.1.5	Herstellen kompetenter Zellen nach Dagert und Ehrlich	101
5.1.6	Transformation kompetenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen nach Hanahan	102
5.1.7	Heilen des <i>E. coli</i> -Stamms TA554 von pSt1-Km	102
5.2	Molekularbiologische Methoden	102
5.2.1	Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nucleinsäuren mit- tels UV-Spektroskopie	102
5.2.2	Gelelektrophorese von Nucleinsäuren	103
5.2.3	Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	103
5.2.4	Nachweis von Nucleinsäuren in PAA-Gelen	104
5.2.5	Enzymatische Reaktionen	105
5.2.6	Isolation von Nucleinsäuren	106
5.2.7	Aufreinigung von Nucleinsäuren	110
5.3	Spezielle Methoden	112
5.3.1	Bestimmung der relativen Plasmidkopienzahl	112
5.3.2	Präparation von Polysomen aus <i>E. coli</i>	112
5.3.3	Phosphorylierung von DNA-Oligonucleotiden	114
5.3.4	Primer-Extension-Analysen	115
5.3.5	Polymerasekettenreaktion (PCR)	116
6	Abkürzungsverzeichnis	119

Zusammenfassung

Die ribosomalen Operons sind in *Escherichia coli* redundant. Sie liegen in sieben Transkriptionseinheiten vor, die differentiell reguliert werden. Die Strukturgene der verschiedenen Operons sind weitgehend homolog, weisen aber konservierte Heterogenitäten auf. Diese Sequenzunterschiede können zu veränderten Strukturen der rRNAs führen, die Einfluß auf die Funktion der resultierenden Ribosomen haben können.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Anteile der verschiedenen 16S rRNA-Varianten in *E. coli* bestimmt. Bei diesen Analysen wurde zwischen dem Gesamt-Ribosomenpool und dem Polysomenpool unterschieden. Die Anteile im Gesamt-Ribosomenpool spiegeln dabei die Verteilung der 16S rRNAs in allen Ribosomen wider, während der Polysomenpool die Verteilung in den aktiven Ribosomen widerspiegelt. Unterschiede in den Anteilen einer 16S rRNA-Variante zwischen den beiden Ribosomenpools zeigen Unterschiede in der Fitness der resultierenden 30S Untereinheit. Diese Analysen wurden unter Hitze- als auch Kälteschock vorgenommen, um Veränderungen der 16S rRNA-Verteilung in den Ribosomenpools zu beobachten.

In diesen Analysen konnten unter Hitzeschock Effekte auf die Anteile der *rrnD*- und *rrnH*-16S rRNAs gezeigt werden. Der Anteil der *rrnD*-16S rRNA sinkt dabei deutlich nach Hitzeschock in beiden Ribosomenpopulationen. Dies zeigt, daß die 16S rRNA des D-Operons bei hohen Temperaturen ungeeignet ist. Dabei ist allerdings nicht eindeutig, ob die entsprechenden 30S Untereinheiten eine geringere Fitness unter Hitzeschock aufweisen, als andere 30S Untereinheiten, da der beobachtete Abfall des *rrnD*-16S rRNA-Anteils auch durch Regulation des Operons erklärt werden kann.

Der Anteil der *rrnH*-16S rRNA zeigt einen deutlichen Anstieg im Polysomenpool nach Hitzeschock. Sie ist unter diesen Bedingungen in jedem dritten aktiven Ribosom zu finden. Die 16S rRNA des H-Operons vermittelt also unter Hitzeschock eine höhere Fitness der 30S Untereinheit. Hier konnte erstmals ein funktioneller Vorteil einer rRNA-Variante gezeigt werden.

Unter Kälteschock konnten keine deutliche Effekte auf die Verteilung der 16S rRNAs gezeigt werden. Aufgrund präparativer Limitierungen kann es sein, daß die Veränderungen in den Ribosomenpools in den Analysen zu abgeschwächt waren, um sie zu erfassen.

In keiner der Analysen konnte ein meßbarer Anteil der *rrnC*-16S rRNA beobachtet werden. Da kein systematischer Fehler gefunden wurde, es aber ausgeschlossen werden kann, daß das *rrnC*-Operon nicht exprimiert wird, bleibt die genaue Ursache unklar.

Wachstumsanalysen im TA554, einem Stamm ohne chromosomales *rrn*-Operon, mit pKK-Plasmiden, die verschiedene 16S rRNA-Varianten kodieren, zeigten keinen unterschiedlichen Einfluß der *rrnB*, *rrnC* oder *rrnH*-16S rRNA auf das Wachstum. Aufgrund der Konstruktion des TA554-Stammes, ist es möglich, daß solche Effekte durch die generelle Belastung der Zellen nicht meßbar sind.

1 Einleitung

1.1 Aufbau und Struktur der RNA

RNA ist eine weitgehend einzelsträngige Nukleinsäurekette. Dies ermöglicht es ihr, im Gegensatz zur doppelsträngigen DNA, vielfältige und komplexe Strukturen auszubilden. Komplementäre Sequenzen innerhalb einer RNA sind in der Lage, Watson-Crick-Basenpaarungen (G-C, A-U) sowie ungewöhnliche Basenpaarungen (G-U, G-A) zu bilden. Durch diese Wechselwirkungen kommt es zu einem Gewinn an freier Energie, was zur Stabilisierung der Struktur beiträgt. Auf diese Weise entstehen die häufigsten Sekundärstrukturen wie Haarnadelschleifen, Helices, interne Schleifen und nichtpaarende Basen innerhalb eines Helixstammes, sogenannte “bulges” (vgl. Abbildung 1.1). Der Tetraloop, eine spezielle Form der Haarnadelschleife, bei der vier konservierte Nukleotide die Schleife bilden, stellt ein besonders stabiles Sekundärstrukturelement dar. Man findet es häufig in funktionellen RNA-Molekülen, wie rRNAs oder Ribozymen. Durch syn-Stellung einzelner Basen und Änderungen in der Zuckerkonformation (endo-, exo-Form) kommt es zu Wechselwirkungen innerhalb der Schleife. Diese führen zu einem zusätzlichen Energiegewinn und damit einer Stabilisierung der Struktur.

Durch Wechselwirkungen zwischen Sekundärstrukturen oder entfernten Bereichen eines RNA-Stranges bilden sich Tertiärstrukturen aus, die die räumliche Gestalt des Moleküls bestimmen. Das erste detailliert untersuchte RNA-Molekül war die transfer-RNA (tRNA). Trotz der hohen Anzahl von 60 verschiedenen tRNAs weisen alle eine einheitliche, kleeblattähnliche Sekundärstruktur auf. In der Tertiärstruktur bilden sie eine L-förmige Konformation [77] aus. Die Aufklärung dieser Strukturen trug viel zum Verständnis der Kopplung zwischen Struktur und Funktion der tRNA in der Translation bei.

Ein weiteres Beispiel für ein Tertiärstrukturelement ist der Pseudoknoten. Er bildet sich durch Wechselwirkungen zwischen Basen einer Haarnadelschleife mit Basen, die ausserhalb des Helixstammes liegen (vgl. Abbildung 1.2). Dadurch entsteht ein zweiter

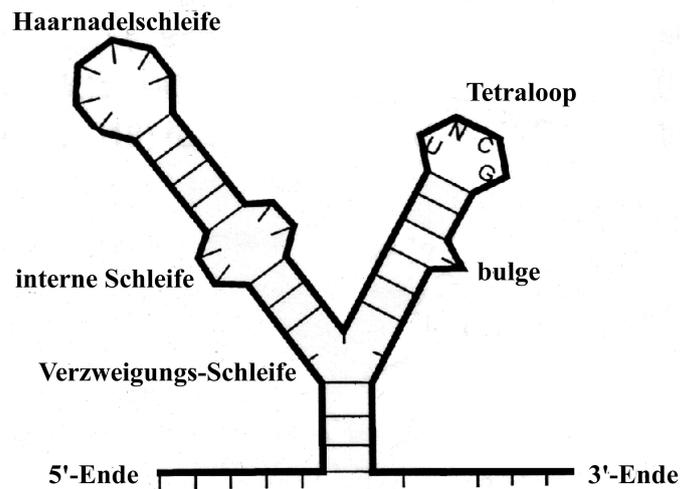


Abbildung 1.1: Beispiele für die verschiedenen RNA-Sekundärstrukturen.

Helixstamm und eine zweite Schleife. Die entstehenden Schleifen können lange Sequenzen umfassen, so daß diese in sich Sekundärstrukturen ausbilden können. Ein Beispiel hierfür findet man in der 16S rRNA von *Escherichia coli*. Eine der Schleifen hat eine Länge von 890 Nukleotiden und bildet eine komplexe Struktur (vgl. Abbildung 1.2). Der Pseudoknoten ist in der 16S rRNA zentral gelegen und arrangiert ihre drei Hauptdomänen [74]. Man findet in allen Organismen bei der entsprechenden rRNA einen Pseudoknoten mit ähnlicher Funktion [68]. Dies zeigt seine hohe, phylogenetische Konservierung und unterstreicht die essentielle Bedeutung des zentralen Pseudoknotens für die Ausbildung und Funktion der Ribosomen.

RNAs liegen oftmals in strukturellen Gleichgewichten vor. Dabei zeigen verschiedene Moleküle der gleichen RNA unterschiedliche Strukturen, die sich in ihrer Stabilität kaum unterscheiden und somit leicht ineinander überführbar sind. Solche Strukturgleichgewichte ermöglichen RNA-Molekülen dynamisch auf Wechselwirkungen mit anderen RNAs oder Proteinen zu reagieren. In katalytischen Prozessen, wie der Translation, ist die Dynamik der RNAs oft von entscheidender Bedeutung für die Funktion [83].

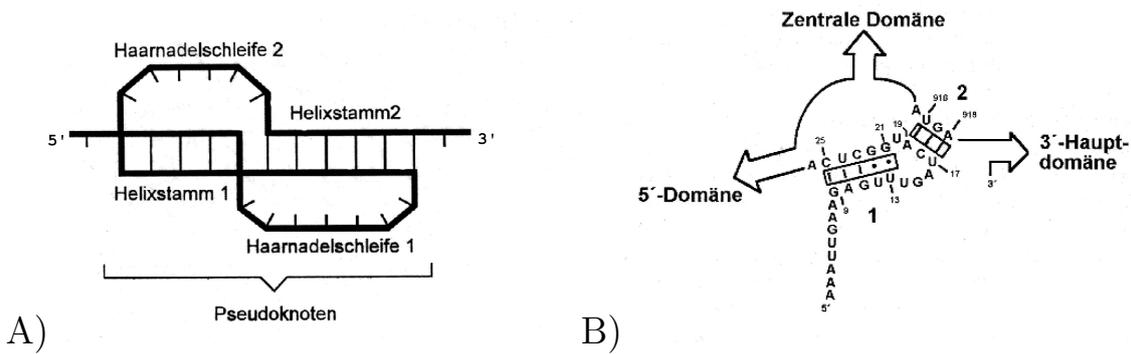


Abbildung 1.2: Darstellung eines Pseudoknotens, einer Tertiärstruktur der RNA. A) zeigt den allgemeinen Aufbau eines Pseudoknotens B) zeigt den zentralen Pseudoknoten der 16S rRNA.

1.2 Funktionen der RNA

Die klassischen Aufgaben der RNA als transfer-RNA (tRNA), messenger-RNA (mRNA) oder ribosomale RNA (rRNA) finden in der Proteinbiosynthese Anwendung. Man hat für RNAs mittlerweile weitere Funktionen gefunden, die weit über die genannten hinausgehen. Sie zeigen, daß RNAs in der Lage sind, DNA-, enzymatische- oder regulatorische Funktionen auszuüben.

Enzymatische Funktionen der RNA lassen sich an einer Vielzahl von Beispielen zeigen. So wird z.B. die Peptidyltransferaseaktivität der Ribosomen von der 23S rRNA katalysiert [71][70][38]. Wie in diesem Beispiel sind die meisten katalytischen RNAs mit Proteinen assoziiert. Das autokatalytische Spleißen von RNAs ist das klassische Beispiel für enzymatische Aktivitäten von RNAs ohne Proteinbeteiligung.

RNA kann auch als Speicher der genetischen Information dienen, z.B. bei Retroviren. Bekanntestes Beispiel ist das Humane-Immundefizienz-Virus (HIV) mit zwei identischen RNA-Molekülen als Informationsspeicher [31]. Unter den Viroiden dient dem Kartoffel-Mosaik-Viroid ein einzelnes RNA-Molekül als Träger der Erbinformation [55].

Beim RNA-Editing, einer post-transkriptionellen Modifikation von mRNAs, dient eine "guide"-RNA als Matrize. Hierbei werden einzelne Nukleotide der prä-mRNA inseriert, deletiert oder substituiert.

Im Rahmen der Replikation dient RNA als Primer für die DNA-Polymerase. Dabei bildet die RNA-Primase [50] kurze RNA-Moleküle, deren freies 3'OH-Ende als Startstelle

der DNA-Polymerase dienen [13][53]. Dies ist notwendig, da die DNA-Polymerase nicht in der Lage ist, DNA *de novo* zu synthetisieren. Die RNA-Primer werden später durch die DNA-Polymerase I entfernt und durch Verlängerung der flankierenden DNA-Sequenzen ersetzt.

RNAs zeigen auch chaperonartige Funktionen. Die eukaryontische U3 snoRNA ist in der Lage, die Faltung der 18S rRNA so zu beeinflussen, daß sich der zentrale Pseudoknoten ausbilden kann. Sie stellt ein in *trans* wirkendes Element dar, daß die korrekte Faltung eines anderen Moleküls ermöglicht.

Darüberhinaus sind RNAs auch in der Lage, regulatorische Funktionen auszuüben. Bei der Regulation der Replikation von Col EI-Plasmiden werden zwei einander komplementäre RNAs gebildet, die durch die Anwesenheit einer Antisense-RNA die Initiation der Replikation regulieren [54]. Unter den regulatorischen RNAs gewinnt das Phänomen der sogenannten “Riboswitches” immer mehr an Bedeutung. Damit sind Strukturumlagerungen in RNAs gemeint, die einen regulatorischen Einfluß ausüben und sozusagen als “Schalter” fungieren. Ein Beispiel hierfür ist die mRNA des Hitzeschock-Sigmafaktors σ^{32} in *E. coli*. Ihre Struktur dient als Sensor für einen plötzlichen Temperaturanstieg und “schaltet” durch eine Umlagerung die Translation von σ^{32} an.

Gilbert prägte, basierend auf dem phylogenetisch älteren Ursprung und der Tatsache, daß RNAs potentiell in der Lage sind, die Funktionen anderer Biopolymere zu ersetzen, den Begriff der “RNA-Welt” [34].

Die “RNA-Welt” beschreibt eine sehr frühe Phase der Evolution, in der RNAs Träger der Erbinformation waren und alle katalytische Funktionen ausübten. Diese RNAs waren in der Lage, Proteine zu synthetisieren, deren ursprüngliche Funktion in der Protektion der RNAs bestand. Sie übernahmen im Laufe der Zeit helfende Funktionen bei enzymatischen Reaktionen, bis diese schließlich größtenteils durch die Protein selbst ausgeübt wurden. Diese Hypothese wird von der Tatsache gestützt, daß auch heute noch RNAs maßgeblich an der Proteinsynthese beteiligt sind: als Matrize für das Protein (mRNA), als katalytisch aktive rRNA bei der Peptidyltransferase und als Adapter zwischen RNA-Triplett und Aminosäure (tRNA).

Die Proteinbiosynthese findet bei heutigen Organismen an den Ribosomen statt. Daran sind, neben den rRNAs, auch Proteine beteiligt. Da der Prozess der Proteinbildung in allen Organismen essentiell ist, gehören die beteiligten rRNAs zu den phylogenetisch konserviertesten Sequenzen. Sie werden zusammen als eine Vorläufer-RNA transkribiert, die die verschiedenen rRNAs enthält. Diese Arbeit beschäftigt sich im Folgenden mit den

verschiedenen ribosomalen Operons in *E. coli*.

1.3 Aufbau eines ribosomalen Operons

In *Escherichia coli* gibt es sieben verschiedene ribosomale Operons [59], die mit den Buchstaben A, B, C, D, E, G und H bezeichnet werden. Sie sind polycistronisch und codieren alle die 16S rRNA, 23S rRNA, 5S rRNA und mindestens eine tRNA. Die 16S rRNA bildet mit den ribosomalen Proteinen die 30S Untereinheit der Ribosomen, die 23S und 5S rRNAs die 50S Untereinheit. Die beiden Untereinheiten bilden zusammen ein funktionsfähiges 70S Ribosom. Der Aufbau der ribosomalen Operons ist im wesentlichen identisch [11], so daß im folgenden der Aufbau des *rrnB*-Operons näher beschrieben wird, welches das meistuntersuchte Operon in *Escherichia coli* ist (s. Abbildung 1.3).



Abbildung 1.3: Schematischer Aufbau des *rrnB*-Operons.

Die ribosomalen Operons stehen unter der Kontrolle eines Tandempromotors mit den Promotoren P1 und P2. Dabei wird der P1-Promotor differentiell durch eine Vielzahl von Proteinen, wie H-NS [1], StpA [92], FIS [78] oder LRP, reguliert. Er unterliegt auch der sogenannten stringenten Kontrolle. Dieser Mechanismus wird bei Aminosäuremangel ausgelöst und durch das Alarmon ppGpp vermittelt [89] und führt zur drastischen Reduktion der Promotoraktivität. Der P2-Promotor wird häufig als unreguliert bezeichnet, allerdings konnte auch hier schon eine Regulation durch z.B. ppGpp gezeigt werden [58][43].

Nach den Strukturgenen wird die Transkription des Operons durch zwei starke, faktorunabhängige Terminatoren beendet. Dies ist allerdings nicht für alle Operons beschrieben. In Fall des *rrnG* Operons findet sich ein Tandemterminator aus einem faktorunabhängigen und einem rho-abhängigen Terminator [3]. Eine effiziente Termination ist hier essentiell, da die ribosomalen Gene stark exprimiert werden und ein häufiges Durchlesen die Zelle drastisch belasten würde.

1.4 Prozessierung der ribosomalen RNA

Da die ribosomalen Operons in *Escherichia coli* polycistronisch sind, muß das Transkript prozessiert werden, damit man die rRNAs und tRNA(s) erhält. Hieran sind die Endonukleasen RNase III, RNase P, RNase E und RNase F beteiligt [90]. Die Abbildung 1.4 gibt einen Überblick der wichtigsten Prozessierungsstellen des rRNA-Primärtranskriptes. Die Prozessierung erfolgt, sobald sich die Strukturen ausbilden, die von den RNasen als Schnittstellen erkannt werden. Somit liegt das rRNA-Vollängentranskript nur zu einem sehr geringen Anteil von 1-2% vor [51]. Die RNase III erkennt einen RNA-Doppelstrang, der sich aus upstream- und downstream-Bereichen der 16S und 23S rRNA bildet [95] und leitet so die Prozessierungskaskade ein. Trotzdem ist ihre Funktion nicht essentiell, denn auch in Abwesenheit von RNase III werden die rRNAs und die tRNA(s) korrekt prozessiert. Einzig die 23S rRNA zeigt keine korrekt getrimmten Enden, was allerdings keine phänotypischen Auswirkungen zeigt.

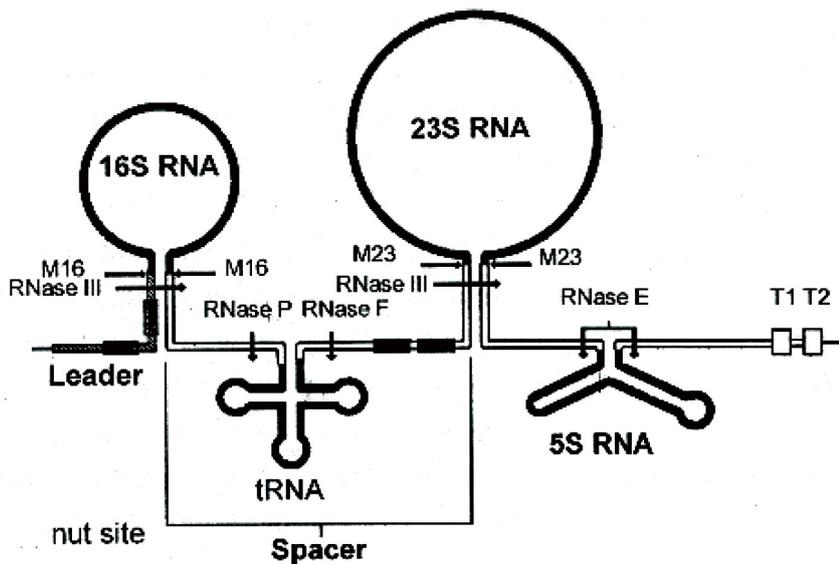


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der wichtigsten Prozessierungsstellen des Vollängentranskriptes des *rrnB*-Operons.

Auch die 5S rRNA wird zuerst von RNase III prozessiert. Die interne tRNA wird durch RNase F und RNase P herausgeschnitten. Die Enden der RNAs werden durch verschiedene Exonukleasen bis zur reifen RNA getrimmt.

1.5 Assemblierung der ribosomalen Untereinheiten

Die rRNAs bilden zusammen mit einer Vielzahl von Proteinen die beiden ribosomalen Untereinheiten. In *E. coli* wird die kleine ribosomale Untereinheit, die sogenannte 30S Untereinheit, von der 16S rRNA und 21 Proteinen gebildet, die mit S1 bis S21 bezeichnet werden. Die große 50S Untereinheit besteht aus den verbleibenden rRNAs, der 23S und 5S rRNA, sowie 33 weiteren Proteinen, die mit L1 bis L33 benannt wurden.

Die Assemblierung der ribosomalen Proteine mit den rRNAs erfolgt in einem selbst-ablaufenden Prozeß. Dieser konnte für die 30S Untereinheit *in vitro* mit aufgereinigten Komponenten reproduziert werden [45]. Dies ermöglichte es, die Reihenfolge der Proteinbindung an die 16S rRNA zu untersuchen [44]. Es gibt eine Reihe sogenannter "primär-bindender" Proteine. Diese lagern sich an die 16S rRNA an und modulieren deren Struktur, so daß die Erkennungsmotive für die nachfolgend bindenden Proteine gebildet werden. Hierdurch konnte die Abhängigkeiten der Proteinbindung bei der Assemblierung der kleinen Untereinheit aufgelöst werden. In Abbildung 1.5 sind diese Abhängigkeiten dargestellt. Die Proteine S4, S7, S8, S15, S17 und S20 sind die primär-bindenden Proteine. Sie sind bei der Assemblierung der 30S Untereinheit essentiell. Die endgültige Faltung der 16S rRNA in der ribosomalen Untereinheit entsteht somit durch das Zusammenspiel von RNA-Strukturen und deren Modulation durch die ribosomalen Proteine. Mittlerweile wurde die Struktur der ribosomalen 30S Untereinheit bis zu einer Auflösung von 3 Å [93] aufgeklärt.

1.6 Die Redundanz ribosomaler Operons in *Escherichia coli*

Die Redundanz von Genen ist sowohl für Pro- als auch Eukaryonten beschrieben. Während dieses Phänomen bei Eukaryonten nicht außergewöhnlich ist, findet man es bei Prokaryonten sehr selten. Die ribosomalen Gene bilden hier eine Ausnahme, da sie in einer Vielzahl von Prokaryonten redundant sind [52]. In Eukaryonten findet man mehrere hundert ribosomale Transkriptionseinheiten [60], während in Prokaryonten die Anzahl zwischen einer und bis zu 15 Kopien variiert [12][49][29][80]. Die Anzahl ist zwar zwischen den verschiedenen Prokaryonten unterschiedlich, für jeden Organismus allerdings hoch konserviert. So findet man, z.B. in *Bacillus subtilis* 10 und in *Escherichia coli* sieben *rrn*-Operon [52].

Genredundanz ist in Prokaryonten eher ungewöhnlich, so daß sich die Frage nach ihrer

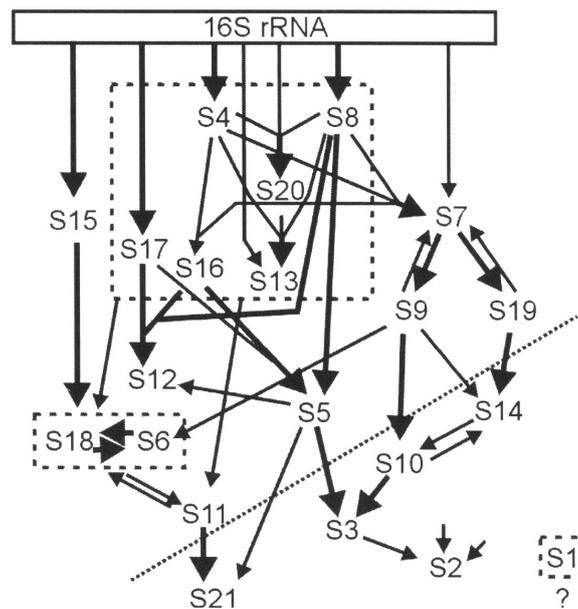


Abbildung 1.5: Die Abbildung zeigt schematisch den Ablauf der Proteinassoziation an die 16S rRNA.

Funktion stellt. Die naheliegendste Erklärung ist die simple Erhöhung der Gendosis, um eine ausreichende Transkription der ribosomalen Operons zu gewährleisten. Dies liegt nahe, da in Bakterien die Transkriptionsrate der rRNA direkt mit der Wachstumsrate gekoppelt ist [32]. Es konnte allerdings für *E. coli* gezeigt werden, daß fünf Kopien der ribosomalen Operons durchaus ausreichend sind um, schnelles Wachstum zu ermöglichen. *E. coli* benötigt die sieben Kopien zur schnellen Adaption an Temperaturveränderungen, oder Schwankungen im Nährstoffangebot [21].

Die Sequenzen der rRNA-Strukturgene sind zwischen den einzelnen Operons nahezu identisch [66]. Allerdings zeigen sich einzelne, hochkonservierte Heterogenitäten, die in den verschiedenen *E. coli*-Stämmen zu finden sind. [46]. Diese können in den resultierenden Ribosomen zu Unterschieden in der Sekundär- oder Tertiärstruktur der rRNAs führen, was die Funktion der Ribosomen beeinflussen kann. Dabei kann direkt die Funktion der rRNA selbst betroffen sein oder sich ein Veränderung in der Bindung zu den ribosomalen Proteinen ergeben. Auch die Bindung von nicht ribosomalen Proteinen an die rRNAs oder die fertigen Untereinheiten kann dadurch beeinflusst werden.

Für die verschiedenen ribosomalen Operons konnte eine differentielle Regulation am P1 Promotor gezeigt werden [47][75]. Eine solche Regulation erscheint nur sinnvoll, wenn

die entstehenden Produkte Unterschiede aufweisen. So läßt sich vermuten, daß die ribosomalen Untereinheiten mit den rRNAs verschiedener Operons unterschiedliche Funktionen übernehmen könnten [46][72].

1.6.1 Verteilung der ribosomalen Operons auf dem *E.coli*-Genom

Die sieben ribosomalen Operons sind in verschiedenen Abständen um den bidirektionalen Replikationsursprung (*oriC*) arrangiert (vgl. Abbildung 1.6)[27]. Dabei entspricht ihre Transkriptionsrichtung der Replikationsrichtung, was sicherstellt, daß die beiden Prozesse sich nicht gegenseitig stören [30]. Dies ist gerade bei raschem Wachstum von Bedeutung, da in *E. coli* bis zu vier Replikationsgabeln gleichzeitig vorliegen, während gleichzeitig hohe Transkriptionsraten an den ribosomalen Operons erforderlich sind. [32][33].

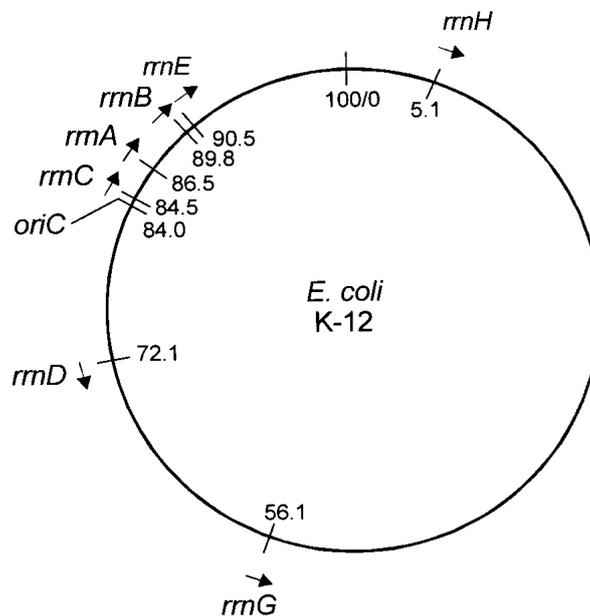


Abbildung 1.6: Die Abbildung zeigt die Verteilung der *rrn*-Operons auf dem *E.coli*-Genom.

Bei raschem Wachstum werden in *E. coli* nacheinander bis zu vier Replikationsgabeln initiiert [23]. Dies führt zu einer Polyploidie der *oriC*-nahen Gene. Dadurch erhöht sich die Gendosis der nahe am Replikationsursprung gelegenen *rrn*-Operons stärker als die der weiter entfernten. Es wurde gezeigt, daß bei hohen Wachstumsraten das *rrnG*- und *rrnH*-Operon zu einem geringeren Anteil exprimiert werden als bei langsamen Wachstum [22]. Dies wird auf die Distanz der beiden Operons zum *oriC* zurückgeführt, wodurch

die Gendosis des *rrnG* und *rrnH*-Operons bei raschem Wachstum geringer ist, als bei den *oriC*-nahen Operons. Die Auswirkungen der Polyloidie *oriC*-naher Gene tragen sicherlich zu der differentiellen Regulation der ribosomalen Operons bei.

1.7 Die Anpassung des bakteriellen Wachstums an wechselnde Umweltbedingungen

Bei wechselnden Umweltbedingungen müssen Bakterien sich schnell an die veränderten Umstände anpassen. Hierzu stehen ihnen regulatorische Netzwerke zur Verfügung, die ein schnelles Anpassen der Proteinbiosynthese an die vorherrschenden Umweltbedingungen ermöglicht. Diese versetzen z.B. *E. coli* in die Lage, rasch auf äußere Einflüsse - wie plötzliche pH-Änderungen, osmotischen Streß, drastische Temperaturveränderungen, wechselnde Nährstoffangebote oder Wirtswechsel - zu reagieren.

E. coli nutzt dazu mehrere regulatorische Netzwerke, die spezifische Reaktionen auf die verschiedenen Einflüsse einleiten. Im folgenden werden Streßreaktionen näher betrachtet, die in dieser Arbeit Anwendung fanden.

1.7.1 Reaktion auf wechselnde Nährstoffangebote

E. coli reagiert auf wechselndes Nährstoffangebot mit einer Anpassung der Wachstumsrate. Dabei ist die Geschwindigkeit des Wachstums stark von den Synthesekapazitäten der Zelle abhängig. Die Translationsgeschwindigkeit der Ribosomen ist auf 20 Aminosäuren pro Sekunde limitiert [28]. Um hohe Proteinsyntheseraten zu erreichen, muß die Zahl der Ribosomen bei raschem Wachstum drastisch erhöht werden. Das Wachstum von Bakterien ist somit stark an die Synthese der ribosomalen RNA gekoppelt. Die Transkriptionsrate der rRNAs ist dabei proportional zum Quadrat der Wachstumsrate [32][33]. Dies führt dazu, daß Aktivatoren und Repressoren der rRNA-Transkription mit der Wachstumsrate oder der Wachstumsphase reguliert werden. So wird z.B. das FIS-Protein, das die Transkription der *rrn*-Operons aktiviert, bei Erhöhung des Nährstoffangebots oder in der logarithmischen Phase stärker exprimiert [6][69]. Für ppGpp, einen Effektor, der die Transkription an den *rrn*-Operon reduziert, ist gezeigt worden, daß er sich invers proportional zur Wachstumsrate verhält [97]. Bei hohen Wachstumsraten ist seine Konzentration in der Zelle geringer als bei niedrigen Wachstumsraten.

Generell läßt sich sagen, daß *E. coli* unter Streß mit einer Anpassung der Wachstums-

rate reagiert, was immer über eine Regulation der rRNA-Synthese erfolgt.

1.7.2 Die Hitzeschock-Reaktion von *E. coli*

Die Hitzeschock-Antwort in *E. coli* wird durch einen plötzlichen Temperaturanstieg ausgelöst. Dabei kommt es zu einer Reihe von Effekten in der Zelle: Denaturieren von Proteinen, Aufschmelzen von RNA-Strukturen, usw. Als Reaktion wird die Expression von ca. 20 sogenannten "Heat-Shock"-Proteinen (HSPs) drastisch erhöht. Dabei handelt es sich hauptsächlich um Chaperone, Proteasen und regulatorische Proteine. Die Regulation erfolgt auf Transkriptionsebene und wird durch den alternativen Sigmafaktor σ^{32} vermittelt. Die RNA-Polymerase in *E. coli* setzt sich aus einem Core-Enzym und einem Sigmafaktor zusammen, wobei der Sigmafaktor eine spezifische Promotorerkennung ermöglicht. Bei Hitzeschock bewirkt der alternative Sigmafaktor σ^{32} die verstärkte Transkription der *hsp*-Gene. σ^{32} wird unter normalen physiologischen Bedingungen durch eine spezifische Protease abgebaut. In Anwesenheit von denaturierten Proteinen z.B. nach Hitzeschock, wird eine Kaskade in Gang gesetzt, die ihn stabilisiert. Zusätzlich wird seine Translation aktiviert. Die mRNA des σ^{32} bildet eine Struktur aus, die seine Translation erschwert. Diese schmilzt beim Hitzeschock auf und erhöht so seine Synthese.

Unter den Heat-Shock-Proteinen befinden sich auch die Chaperone DnaK und GroEL. Für beide konnte in den letzten Jahren eine Beteiligung an den späten Stadien der Ribosomen-Biogenese *in vivo* gezeigt werden. [62][41].

1.7.3 Die Kälteschock-Reaktion von *E. coli*

Die Kälteschock-Reaktion in *E. coli* wird durch eine plötzliche Erniedrigung der Temperatur von 10°C oder mehr erreicht. Der Sensor des Kälteschocks ist noch nicht bekannt. Es wird angenommen, daß die Plasmamembran, die Nukleinsäuren als auch die Ribosomen als Thermosensoren fungieren [91].

Nach Streßauslösung kommt es zur erhöhten Expression einer Vielzahl von Proteinen, darunter die Familie der "Cold-Shock"-Proteine (Csp), RbfA und CsdA [88]. Diese Proteine sind größtenteils RNA/DNA-Chaperone oder ribosomenassoziierte Proteine.

Probleme durch die plötzliche Temperaturerniedrigung ergeben sich für die Zelle weniger durch denaturierte Proteine, wie beim Hitzeschock, als viel mehr durch die Veränderung der Membranfluidität, Beeinträchtigung der Proteinsynthese und eine erhöhte Sta-

bilität von Nukleinsäurestrukturen.

Die Membranfluidität wird durch eine Erhöhung des Fettsäureanteils in den Phospholipiden erhöht.

Die Proteinsynthese an den Ribosomen kommt unter diesen Bedingungen fast zum Erliegen. Die niedrige Temperatur verursacht eine "einfrieren" der RNA-Strukturen. Da die Translation dynamische rRNA-Strukturen erfordert [83], ist dieser Prozeß durch die Rigidität der RNA-Strukturen stark betroffen. Durch verschiedene Proteine wie RbfA und CsdA wird die Translation bei niedrigen Temperaturen ermöglicht. RbfA bindet dabei an die kleine Untereinheit der Ribosomen, CsdA an das 70S Ribosom.

Bei den Cold-Shock-Proteinen handelt es sich größtenteils um RNA/DNA-Chaperone, die das Aufschmelzen von Nukleinsäurestrukturen erleichtern. Dadurch können z.B. mRNA-Strukturen, die bei niedrigen Temperaturen sehr stabil sind und eine Translation verhindern würden, aufgelöst werden. Solche Chaperone werden auch benötigt, um Prozesse wie die Transkription und Replikation aufrecht zu erhalten. Es konnte gezeigt werden, daß CspA und die Initiationsfaktoren der Translation IF1 und IF3 die Translation bei niedrigen Temperaturen stimulieren [36].

1.8 Fragestellung und Konzeption der Arbeit

Die ribosomalen Operons sind in den meisten Prokaryonten redundant. Die Anzahl der *rrn*-Operons ist dabei für jeden Organismus hoch konserviert. Da Genredundanz im Genom von Prokaryonten ungewöhnlich ist, stellt sich die Frage, warum die ribosomalen Operons redundant vorliegen.

Die naheliegendste Erklärung ist die Erhöhung der Gendosis, um bei raschem Wachstum ausreichende Transkription der ribosomalen RNAs zu gewährleisten. In *Escherichia coli* konnte gezeigt werden, daß fünf der sieben vorhandenen *rrn*-Operons ausreichen, um schnelles Wachstum zu garantieren. Allerdings ermöglichen die sieben *rrn*-Operons eine schnellere Anpassung an plötzliche Änderungen der Umweltbedingungen, wie Temperaturveränderungen oder wechselndes Nährstoffangebot. Darüber hinaus konnte für die Promotoren der sieben *rrn*-Operons gezeigt werden, daß sie differentiell reguliert werden.

Dies läßt vermuten, daß die Produkte der sieben Operons Unterschiede aufweisen, da sonst eine differentielle Regulation unnötig wäre. Tatsächlich finden sich in den Strukturen der *rrn*-Operons wenige, dafür aber konservierte Sequenzabweichungen, die die

resultierende Struktur der rRNAs und damit deren Funktion beeinflussen können. Dies würde bedeuten, daß Ribosomen mit rRNAs verschiedener *rrn*-Operons unterschiedliche Funktionen ausüben könnten.

Ziel dieser Arbeit ist es, die unterschiedliche Funktionalität von Ribosomen mit verschiedenen rRNAs zu untersuchen. Dazu sollten die Anteile der verschiedenen 16S rRNA-Varianten in *E. coli* bestimmt und ihre Veränderung nach Auslösen von Temperaturstreß beobachtet werden. Um funktionelle Unterschiede aufzeigen zu können, muß dabei zwischen der Gesamtpopulation der Ribosomen und den translationsaktiven Ribosomen unterschieden werden. Hierzu soll zum einen Gesamt-RNA isoliert werden, die die rRNAs des Gesamt-Ribosomenpools repräsentiert. Zum anderen soll die rRNA aus Polysomen isoliert werden. Dieser Polysomenpool repräsentiert die rRNAs der translationsaktiven Ribosomen. Zur Bestimmung der Anteile der verschiedenen 16S rRNAs sollen die Ribosomenpools über eine Primer-Extension analysiert, die an den heterogenen Positionen der rRNAs unterschiedlich lange Transkripte liefert. Nach Quantifizieren der Produktbanden kann so der Anteil der verschiedenen 16S rRNA in den Ribosomenpools bestimmt werden.

Im weitem sollen auffällige 16S rRNA-Varianten in ein plasmidär vorliegendes *rrnB*-Operon inkloniert werden. Die so erhaltenen Plasmide unterscheiden sich dann nur in der Sequenz der 16S rRNA. Sie sollen in einen Stamm transformiert werden, der kein genomisches *rrn*-Operon besitzt und auf ein plasmidäres Operon angewiesen ist. In diesem Stamm werden alle Ribosomen mit einheitlichen rRNAs gebildet. In diesem System gemessene Wachstumsunterschiede können dann direkt mit den Sequenzunterschieden der 16S rRNA-Varianten korreliert werden.

2 Ergebnisse

2.1 Theoretische Vorbemerkungen

Diese Arbeit beschäftigt sich mit den Sequenzvariationen zwischen den sieben ribosomalen Operons in *E. coli*. Dabei wurden verschiedene Ribosomenpopulationen auf ihren Anteil an spezifischen 16S rRNAs hin untersucht.

Im Vorfeld der Analysen verschiedener Ribosomenpools wurden die Sequenzheterogenitäten näher betrachtet. Hierzu wurden Sequenzvergleiche der sieben 16S rRNA Sequenzen vorgenommen und die ermittelten Unterschiede mit der Sekundärstruktur korreliert.

2.1.1 Sequenzalignments

Die hier verglichenen Sequenzen stammen aus dem *E. coli*-Stamm MG1655, dessen Genom vollständig sequenziert vorliegt [11]. Das Sequenzalignment wurde mit dem Programm *ClustalX* mit den Standard-Parametern durchgeführt [2] und ist in Abbildung 2.1 dargestellt. Dabei sind nur die Sequenzbereiche abgebildet, die heterogene Positionen enthalten.

In Tabelle 2.1 sind die Positionen der Sequenzunterschiede aufgelistet. Die Abweichungen beziehen sich alle auf das *rrnB*-Operon, welches am besten untersucht ist, und hier als "Standard"-Operon betrachtet wird.

In Abbildung 2.2 ist die Verteilung der Heterogenitäten in den Strukturgenen dargestellt. Das *rrnB*-Operon wurde wieder als Standard verwendet, so daß sich hier keine Abweichungen zeigen. Es wurden für die 16S rRNA 25 abweichende Postitionen gefunden, für die 23S rRNA 40 und für die 5S rRNA nur zwei. Dabei fällt auf, daß die Sequenzunterschiede, z.B. in der 16S rRNA ungleichmäßig über die Operons verteilt sind. Während das *rrnC*-, *rrnD*- und *rrnG*-Operon nur im 5'-Bereich der 16S rRNA Heterogenitäten aufweisen, ist das *rrnH*-Operon das einzige mit Abweichungen im 3'-Bereich.

		****	*****	**	*****	*****	***	****	****	****
rrnA-16S	rRNA	GGAAGAAGCTTGCTTCTTTGCTGAC				GGGAAACTG	TAACGTCG		GACCTTCG	
rrnB-16S	rRNA	GGAAGAAGCTTGCTTCTTTGCTGAC				GGGAAACTG	TAACGTCG		GACCTTCG	
rrnC-16S	rRNA	GGAACAGCTTGCTGTTTCGCTGAC				GGGAAACTG	TAACGTCG		GACCTTCG	
rrnD-16S	rRNA	GGAACAGCTTGCTGTTTCGCTGAC				GGGAAACTG	TAACGTCG		GACCTTCG	
rrnE-16S	rRNA	GGAAGAAGCTTGCTTCTTTGCTGAC				GGGAAACTG	TAACGTCG		GACCTTCG	
rrnG-16S	rRNA	GGAAGCAGCTTGCTGTTTCGCTGAC				GGGAAACTG	TAACGTCG		GACCTTCG	
rrnH-16S	rRNA	GGAAGAAGCTTGCTTCTTTGCTGAC				GGGAAACTG	TAACGTCG		GACCTTCG	
		75..80.....90.....98				126..132	180..185		204..209	
		***	****	***	**	****	****	***	****	****
rrnA-16S	rRNA	ATCGGATG	GCTAGTAGGT			ACCTAGGC	GCGGTTTG-TTAAG		AAGTTAA	
rrnB-16S	rRNA	ATCGGATG	GCTAGTAGGT			ACCTAGGC	GCGGTTTG-TTAAG		AAGTTAA	
rrnC-16S	rRNA	ATCAGATG	GCTAGTAGGT			ACCTAGGC	GCGGTTTG-TTAAG		AAG-TTAA	
rrnD-16S	rRNA	ATCGGATG	GCTTGTGGT			ACCAAGGC	GCGGTTTG-TTAAG		AAGTTAA	
rrnE-16S	rRNA	ATCGGATG	GCTAGTAGGT			ACCTAGGC	GCGGTTTG-TTAAG		AAGTTAA	
rrnG-16S	rRNA	ATCGGATG	GCTTGTGGT			ACCAAGGC	GCGGTTTG-TTAAG		AAGTTAA	
rrnH-16S	rRNA	ATCGGATG	GCTAGTAGGT			ACCTAGGC	GCGGTTTG-TTAAG		AAGTTAA	
		223..228	247...254			270..275	585.....596		900..905	
		****	***	***	*****	***	****	*****	****	*****
rrnA-16S	rRNA	CCACGGAAGTTTTTCAGAGATGAGAATGTG				GAACCGTGAG	TATCCTTTGT			
rrnB-16S	rRNA	CCACGGAAGTTTTTCAGAGATGAGAATGTG				GAACCGTGAG	TATCCTTTGT			
rrnC-16S	rRNA	CCACGGAAGTTTTTCAGAGATGAGAATGTG				GAACCGTGAG	TATCCTTTGT			
rrnD-16S	rRNA	CCACGGAAGTTTTTCAGAGATGAGAATGTG				GAACCGTGAG	TATCCTTTGT			
rrnE-16S	rRNA	CCACGGAAGTTTTTCAGAGATGAGAATGTG				GAACCGTGAG	TATCCTTTGT			
rrnG-16S	rRNA	CCACGGAAGTTTTTCAGAGATGAGAATGTG				GAACCGTGAG	TATCCTTTGT			
rrnH-16S	rRNA	CCACAGAACTTTTCAGAGATGGATTGGTG				GAACGTGAG	TATCTTTTGT			
		998.....1023				1034..1040	1116..1122			

Abbildung 2.1: Sequenzalignment der 16S rDNAs aus *E. coli*: Die Abbildung zeigt den Sequenzvergleich zwischen den 16S rDNAs der verschiedenen ribosomalen Operons aus *E. coli*. Das Alignment wurde mit dem Programm *ClustalX* durchgeführt. Dargestellt sind nur die Sequenzbereiche, die Unterschiede zwischen den verschiedenen *rrn*-Operons aufweisen.

Position	Nukleotid in <i>rrnB</i> -16S rRNA	Nukleotid in der abweichenden Sequenz	Vorkommen in den Operons
79	G	A	<i>rrnC</i> , <i>rrnD</i>
80	A	C	<i>rrnC</i> , <i>rrnD</i> , <i>rrnG</i>
89	U	G	<i>rrnC</i> , <i>rrnD</i> , <i>rrnG</i>
90	C	U	<i>rrnC</i> , <i>rrnD</i>
93	U	C	<i>rrnC</i> , <i>rrnD</i> , <i>rrnG</i>
131	A	G	<i>rrnG</i>
183	C	U	<i>rrnG</i>
208	U	C	<i>rrnD</i>
226	G	A	<i>rrnC</i>
250	A	U	<i>rrnD</i> , <i>rrnG</i>
253	A	U	<i>rrnD</i> , <i>rrnG</i>
273	U	A	<i>rrnD</i> , <i>rrnG</i>
589	U	G	<i>rrnG</i>
592	-	Insertion von G	<i>rrnG</i>
903	G	Deletion	<i>rrnC</i>
1002	G	A	<i>rrnH</i>
1006	G	C	<i>rrnH</i>
1010	U	C	<i>rrnH</i>
1019	A	G	<i>rrnH</i>
1020	G	A	<i>rrnH</i>
1021	A	U	<i>rrnH</i>
1022	A	U	<i>rrnH</i>
1023	U	G	<i>rrnH</i>
1038	C	T	<i>rrnH</i>
1120	C	T	<i>rrnH</i>

Tabelle 2.1: Die heterogenen Positionen zwischen den 16S rRNAs in *E. coli*. Aufgelistet sind die betroffene Position in der 16S rRNA, das entsprechende Nukleotid in der *rrnB*-Sequenz, das Nukleotid in der abweichenden Sequenz sowie die ribosomalen Operons, in denen diese Sequenzabweichung auftritt.

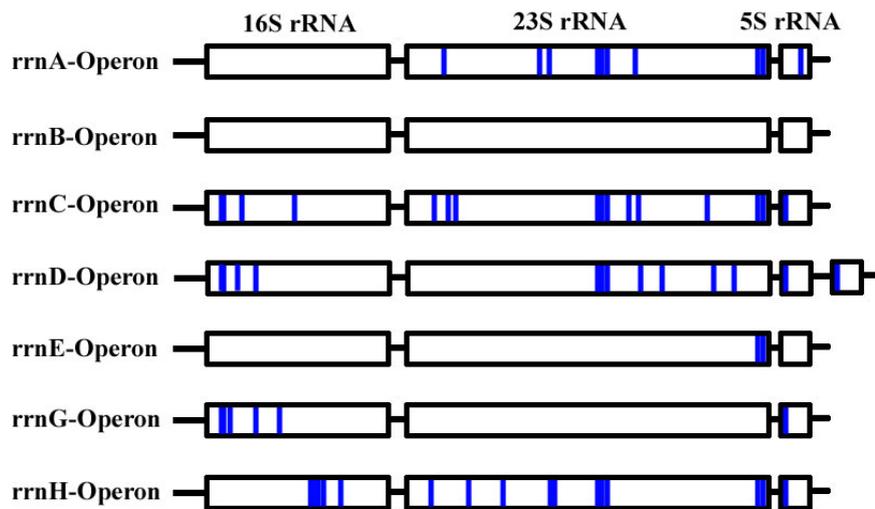


Abbildung 2.2: Verteilung der heterogenen Positionen in den Strukturgenen der ribosomalen Operons von *E. coli*. Jede blaue Linie markiert dabei die Position von mindestens einer Sequenzabweichung.

2.1.2 Sekundärstruktur

Abbildung 2.3 zeigt die Sekundärstruktur der 16S rRNA. Die Positionen der Heterogenitäten sind farbig markiert.

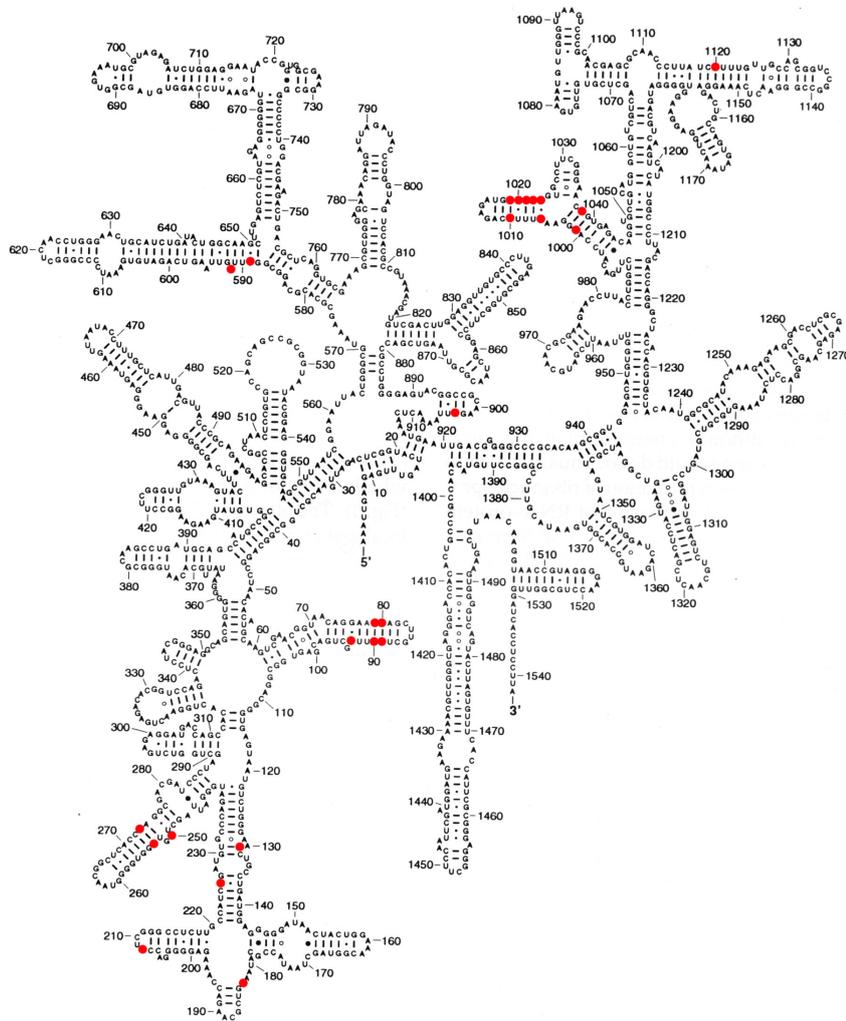


Abbildung 2.3: Die Sekundärstruktur der *rrnB*-16S rRNA. Die markierten Positionen zeigen Sequenzabweichungen in anderen *rrn*-Operons.

Vergleicht man die heterogenen Positionen mit ihrer Verteilung auf die Operons, so stellt man fest, daß einige Sequenzunterschiede nur gekoppelt auftreten. Beispiele hierfür finden sich im Sequenzbereich zwischen Position 79 und 93. Hier treten innerhalb des Helix-Stamms nur kompensatorische Heterogenitäten auf. Wenn ein Nukleotid verändert

ist, so ist auch das in der Helix gegenüberliegende Nukleotid entsprechend verändert, so daß die Sekundärstruktur erhalten bleibt. Im *rrnC*-Operon ist an Position 79 das Guanin der *rrnB*-Sequenz durch ein Adenin ersetzt. Diese Veränderung findet sich aber nur im Zusammenhang mit einem Cytosin zu Uracil Austausch an Position 90, die in der Helix gegenüber liegt, so daß die Basenpaarung erhalten bleibt.

Es finden sich auch Sequenzabweichungen, die ein Aufrechterhalten der beschriebenen 16S rRNA-Sekundärstruktur nicht mehr ermöglichen. Beispiele hierfür finden sich in der Sequenz der *rrnH*-16S rRNA. An den Positionen 1021 bis 1023 ist die Sequenz AAU des *rrnB*-Operons durch UUG ersetzt, was eine Ausbildung der betroffenen Helix nicht mehr ermöglicht. Dadurch bilden sich eine alternative Sekundärstruktur und damit auch eine abweichende Tertiärstruktur aus. Diese alternativen Strukturen können Einfluß auf die Funktionen der 16S rRNA bei der Assemblierung, der Translation oder bei der Bindung nicht ribosomaler Proteine nehmen.

An anderer Stelle findet man wiederum einzelne Heterogenitäten, Insertionen sowie Deletionen, deren Auswirkungen aufgrund der komplexen Faltung der 16S rRNA nur schwer abgeschätzt werden können. Die Faltung der 16S rRNA entspricht nicht der thermodynamisch stabilsten Struktur. Dies ergibt sich *in vivo* aus der sequentiellen Synthese, bei der sich metastabile Strukturelemente in benachbarten Sequenzbereichen ausbilden. Sie verhindern eine spätere stabilere Wechselwirkung mit entfernteren Bereichen, die noch transkribiert werden. Hinzu kommt die Modulation und Stabilisierung solcher Strukturen durch die Bindung der ribosomalen Proteine.

2.2 Analysen der Ribosomenpools im *E. coli*-Stamm MC4100

Ziel dieser Untersuchungen war es, Unterschiede in der Funktionalität von Ribosomen mit rRNAs unterschiedlicher Herkunft aufzuzeigen. Hierzu wurde zwischen zwei Ribosomenpools unterschieden: Dem Pool aller Ribosomen und dem Pool der translationsaktiven Ribosomen. In diesen Ribosomenpools wurden die Anteile der verschiedenen 16S rRNAs ermittelt und verglichen. Falls alle 16S rRNA - unabhängig von ihren Heterogenitäten - gleiche Funktionalität ermöglichen, sollten die Anteile der 16S rRNA zwischen den beiden Ribosomenpools kaum variieren. Falls die Sequenzvariationen eines Operons hingegen eine höhere oder geringere Aktivität der Ribosomen verursachen, sollte der entsprechende 16S rRNA Anteil in dem translationsaktiven Ribosomenpool entsprechend erniedrigt, bzw. erhöht sein.

Der Vorteil solch konservierter Heterogenitäten liegt in geringfügig unterschiedlich strukturierten Ribosomen. Bei schnellem Wechsel von physikalischen Parametern oder Habitaten könnte so einem Teil der Ribosomen ihre Aktivität noch erhalten bleiben, während andere ihre Aktivität verringern oder ganz einbüßen. So ist es vorstellbar, daß ein Operon Ribosomen hervorbringt, die trotz Hitzeschock noch hohe Aktivität zeigen, während die Ribosomen eines anderen Operons z.B. bei Kälteschock noch hohe Aktivität aufweisen. Eine solche "Spezialisierung" von Ribosomen hätte den Vorteil, daß bei Streß die Protein-Biosynthese mit hoher Rate weiterläuft, auch wenn ein Teil der Ribosomen betroffen ist und noch keine Streßanpassung stattgefunden hat. Um solche Spezialisierungen zu finden, wurden Ribosomen und Polysomenpools unter Hitze- und Kälteschock präpariert und analysiert.

Die Polysomenbildung diente als Kriterium, um zwischen den beiden Ribosomenpools zu unterscheiden. Dabei wurden Polysomen als Population der translationsaktiven Ribosomen präpariert. Aus den gleichen Präparationen entnommene Aliquots vor der Polysomenauftrennung dienten als Proben für den Gesamt-Ribosomenpool.

Nach Präparation der Polysomen wurden die Anteile der 16S rRNA aus den verschiedenen Operons durch eine Primer-Extension-Analyse bestimmt, die selektive Abbrüche für die verschiedenen 16S rRNAs erzeugt.

2.2.1 Hitzeschock Analysen im MC4100

Die nachfolgenden Analysen wurden im *E. coli*-Stamm MC4100 durchgeführt. Zum Auslösen des Hitzeschocks wurden Kulturen des Stamms bei 30°C angezogen und bei

logarithmischem Wachstum auf 42°C umgesetzt (vgl. 5.1.4.1). Nach verschiedenen Zeiten wurden Proben entnommen und sowohl die Gesamt-RNA als auch die Polysomen isoliert. In den erhaltenen RNA-Proben wurde die 16S rRNA Verteilung mittels Primer-Extension analysiert.

2.2.2 Polysomenpräparation aus MC4100

Um einen Funktionsvorteil bestimmter Ribosomen bestimmen zu können, mußte zwischen translationsaktiven und inaktiven Ribosomen unterschieden werden. Als Kriterium für Translationsaktivität wurde die Bildung von Polysomen gewählt. Dies bedeutet nicht, daß sich unter den Monosomen keine translationsaktiven Ribosomen befinden. Diese können allerdings nur schwer identifiziert werden, während nur translationsaktive Ribosomen zur Polysomenbildung beitragen.

Die Polysomen wurden wie in 5.3.2 beschrieben präpariert. Dabei wurden die Kulturen bei 30°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,55 angezogen und dann einem Hitzeschock ausgesetzt. Dazu wurden die Kulturen in ein auf 42°C geheiztes Wasserbad gestellt. Die Polysomen wurden 5, 10, 20, 30 und 60 Minuten nach Hitzeschock präpariert. Vor dem Auftrennen der Polysomen über einen Saccharosegradienten wurde jeweils ein Aliquot entnommen, das als Probe für den Gesamt-Ribosomenpool verwendet wurde. Die Gradienten wurden abgepumpt und fraktioniert gesammelt. Dabei wurde die Extinktion bei 280 nm verfolgt und über einen Schreiber aufgezeichnet.

Die Elutionsprofile der Polysomenpräparationen sind in Abbildung 2.4 dargestellt. Die Dichte im Gradienten nimmt in den Profilen von links nach rechts ab. Die 30S und 50S Untereinheiten finden sich in den Gradienten geringer Dichte, in der Nähe des rechten Randes, zusammen mit Proteinen und Zellbestandteilen, die nicht vollständig oder kaum in den Gradienten eingelaufen sind. Oft werden die Peaks der Untereinheiten vom Hintergrund dieser Bestandteile überlagert.

Der 70S-Peak ist im Profil 2.4 A markiert. Links davon befinden sich die Polysomen-peaks. Diese wurden gesammelt und die rRNA daraus extrahiert, wie in 5.3.2 beschrieben.

So wurden Proben der Polysomen-rRNA - für den translationsaktiven Ribosomenpool - und Proben mit der entsprechenden Gesamt-RNA - für den Gesamt-Ribosomenpool - 5, 10, 20, 30 und 60 Minuten nach Hitzeschock präpariert. Als Referenz wurden auch Proben bei 0 Minuten (d.h. bei OD₆₀₀ 0,5-0,55) und vorheriger Inkubation bei 30°

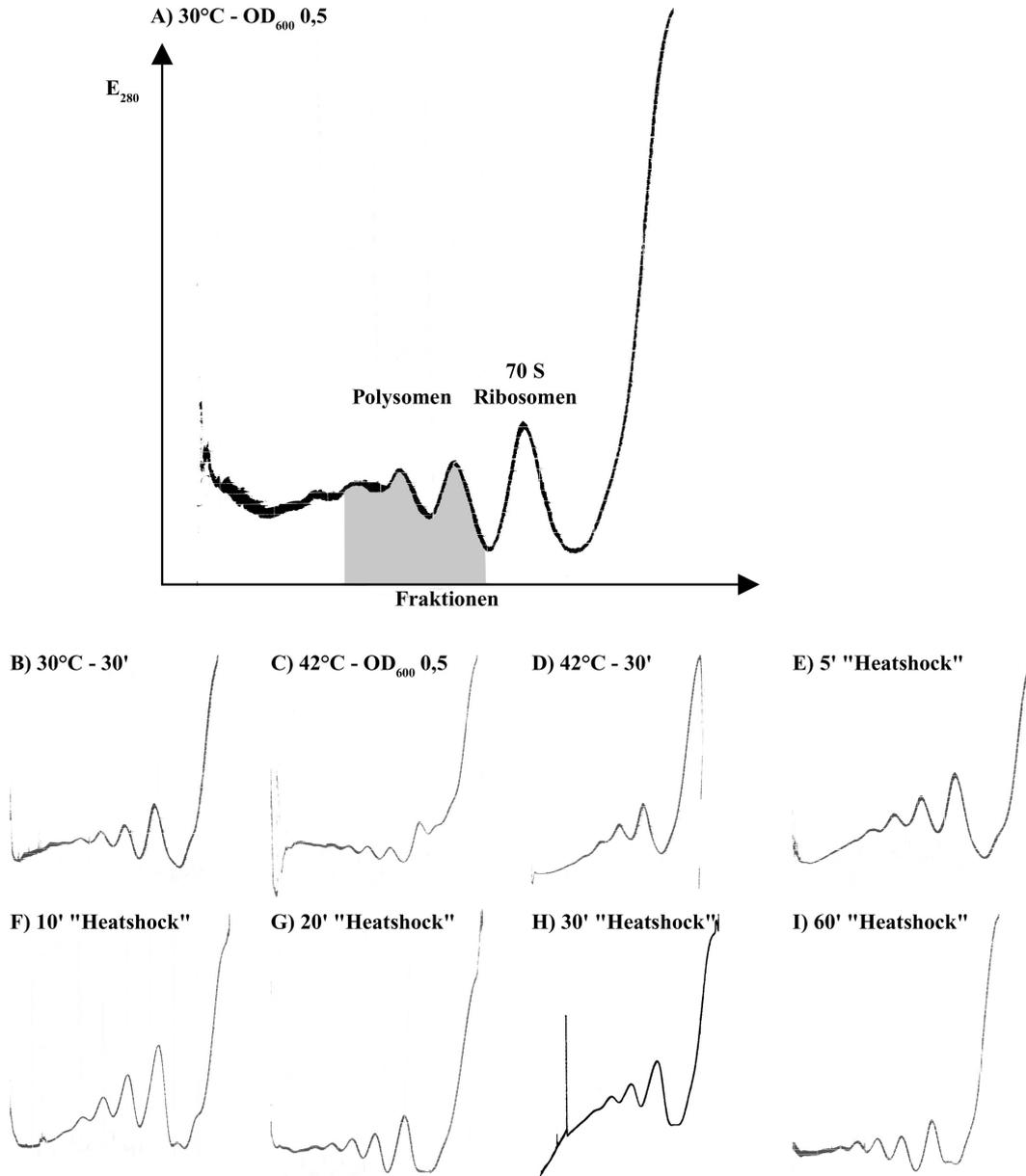


Abbildung 2.4: Die Abbildung zeigt die Elutionsprofile der Polysomenpräparationen aus dem *E. coli*-Stamm MC4100. Der linke Rand eines Profils entspricht dem Boden des Gradienten, d.h. 30% Saccharose-Lösung, und der rechte Rand einer 15%igen Saccharose-Lösung. Abbildung A) zeigt das Profil bei 30°C und einer OD₆₀₀ von ca. 0,5. B) zeigt das Profil einer Kultur, die bei 30°C und einer OD₆₀₀ von ca. 0,5 noch weitere 30 Minuten bei 30°C gewachsen ist. C) und D) zeigen entsprechende Profile für das Wachstum bei 42°C. Die Profile E) bis H) zeigen Profile von Kulturen, die bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,5 angezogen wurden und danach die angegebene Zeit auf 42° inkubiert wurden.

bzw. 42°C präpariert. Zusätzliche Proben wurden nach weiteren 30 Minuten (30°C) und bei einer OD₆₀₀ von 1,0 (42°C) genommen. Aufgrund des raschen Wachstums bei 42°C wurde nicht nach 30 Minuten präpariert, sondern bei einer OD₆₀₀ von 1,0, die der Zelldichte nach 30minütigen Hitzeschock entspricht.

2.2.3 Primer-Extension-Analysen der Ribosomenpopulationen

Die in 2.2.2 erhaltenen RNA-Proben wurden über Primer-Extension wie in 5.3.4.1 beschrieben analysiert. Dabei war es durch Wahl verschiedener Primer und Nukleotidangebote möglich, spezifische Abbrüche für 16S rRNAs unterschiedlicher Operons zu erzeugen. Abbildung 2.5 zeigt am Beispiel der 16S rRNA-Sequenzen und des Primers für die Analyse des *rrnH*-Operons, wie ein spezifischer Abbruch erzwungen wird.

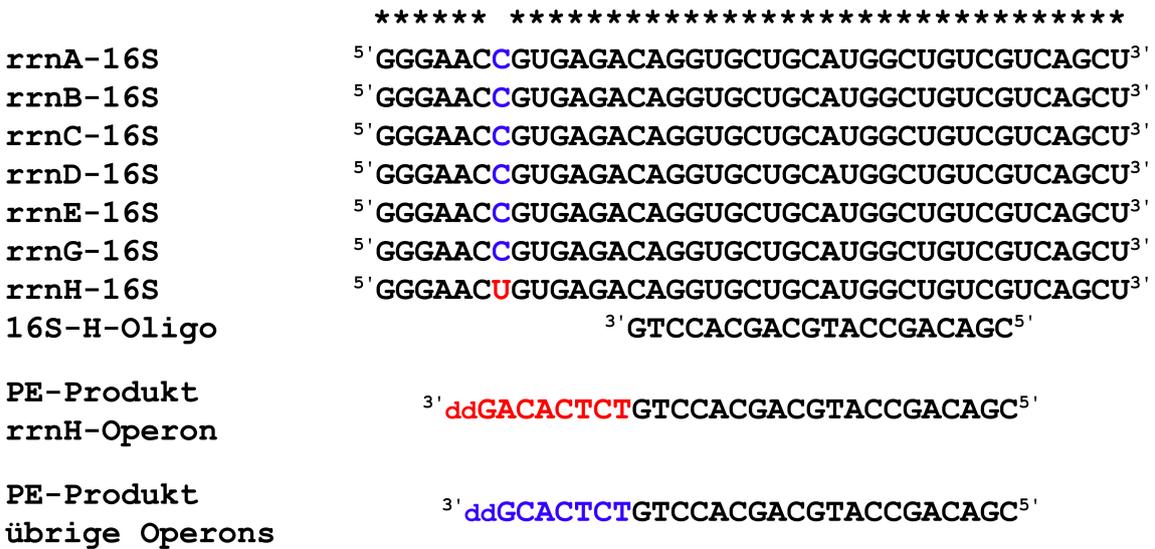


Abbildung 2.5: Dargestellt sind die 16S rRNA-Sequenzen an der Hybridisierungsposition des 16S-H-Oligos. Das 16S-H-Oligo und die resultierenden Primer-Extension-Produkte sind ebenfalls dargestellt. Das Transkript bei Hybridisierung an die 16S-*rrnH*-Sequenz ist rot dargestellt. Das Transkript der anderen 16S rRNAs ist blau dargestellt.

Durch das Ersetzen des dGTPs durch ddGTP wird die Primer-Extension-Reaktion mit dem Einbau des ersten ddGTPs beendet. Dadurch führt das erste Cytosin in der rRNA-Sequenz nach dem Primer zum Abbruch der Reaktion. In der 16S rRNA des H-Operons ist dieses Cytosin durch ein Uracil ersetzt, wodurch ein längeres Transkript erzeugt wird. Der Abbruch der *rrnH*-16S rRNA erfolgt nach acht Nukleotiden, für die übrigen 16S rRNAs nach sieben Nukleotiden. Die beiden Transkripte lassen sich elektrophoretisch auftrennen (vgl. 5.3.4.1) und ihre Intensitäten quantifizieren (vgl. 5.2.4.2).

Zur Bestimmung der Anteile der verschiedenen 16S rRNAs wurden unterschiedliche Primer eingesetzt. Ihre Sequenzen und die erzeugten Abbrüche sind in Abbildung 2.6 dargestellt.

Für das *rrnG*- und *rrnH*-Operon werden durch diese Primer spezifische Abbrüche

16S-C-Oligo:

<i>rrnA</i> + <i>B</i> + <i>E</i> + <i>H</i> 16S	5'CTTGCT TTT TGCTGACCAGTGGCGGACGGGTGAGTAA ^{3'}	dCTP wird für die PE durch ddCTP ersetzt
<i>rrnC</i> + <i>D</i> + <i>G</i> 16S	5'CTTGCT GT TT CG CTGACCAGTGGCGGACGGGTGAGTAA ^{3'}	
PE-Produkt-ABEH	3' ddCGAAGAAA CGACTGCTCACCGCTGCC ^{5'}	Länge: 28 nt
PE-Produkt-CDG	3' ddCAAAG CGACTGCTCACCGCTGCC ^{5'}	Länge: 25 nt

16S-D-Oligo:

<i>rrnA</i> + <i>B</i> + <i>C</i> + <i>E</i> + <i>H</i> 16S	5'CGGCTCAC CT AGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGCAT ^{3'}	dATP wird für die PE durch ddATP ersetzt
<i>rrnD</i> + <i>G</i> 16S	5'CGGCTCAC CA AGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGCAT ^{3'}	
PE-Produkt-ABCEH	3' ddATCCGCTG CTAGGGATCGACCAGACTC ^{5'}	Länge: 27 nt
PE-Produkt-DG	3' ddAGTGGT TC CGCTG CTAGGGATCGACCAGACTC ^{5'}	Länge: 32 nt

16S-G-Oligo:

<i>rrnA</i> + <i>B</i> + <i>C</i> + <i>D</i> + <i>E</i> + <i>H</i> 16S	5'CCGCATA AC GTGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTT ^{3'}	dGTP wird für die PE durch ddGTP ersetzt
<i>rrnG</i> 16S	5'CCGCATA AT GTGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTT ^{3'}	
PE-Produkt-ABCDEH	3' ddGCA GC GT TCTGGTTCTCCCC ^{5'}	Länge: 22 nt
PE-Produkt-G	3' ddGTAT T ACA GC GT TCTGGTTCTCCCC ^{5'}	Länge: 27 nt

16S-H-Oligo:

<i>rrnA</i> + <i>B</i> + <i>C</i> + <i>D</i> + <i>E</i> + <i>G</i> 16S	5'GGGA AC CGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAG ^{3'}	dGTP wird für die PE durch ddGTP ersetzt
<i>rrnH</i> 16S	5'GGGA AT CGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAG ^{3'}	
PE-Produkt-ABCDEG	3' ddGCACT CTGTCCACGACGTACCGACAGC ^{5'}	Länge: 27 nt
PE-Produkt-H	3' ddGACT CTGTCCACGACGTACCGACAGC ^{5'}	Länge: 28 nt

Abbildung 2.6: Die Abbildung zeigt die verwendeten Primer zur Analyse der Ribosomenpopulationen. Gezeigt sind jeweils die verschiedenen 16S rRNA-Sequenzen sowie die resultierenden Transkripte. Die Oligo-Sequenzen sind dabei kursiv dargestellt. Heterologe Positionen in den 16S rRNA-Sequenzen sind farbig markiert.

erzeugt. Für das *rrnD* und *rrnC*-Operon erhält man Abbrüche, die mehrere Operons beinhalten. So erzeugt das 16S-D-Oligo eine gemeinsame Abbruchbande für das *rrnG*- und *rrnD*-Operon. Um den Anteil des *rrnD*-Operons zu erhalten, muß der quantifizierte Wert für die *rrnD*-Abbruchbande noch um den entsprechenden *rrnG*-Anteil korrigiert werden.

Die 16S-rRNAs der Operons A, B und E haben identische Nukleotidsequenzen und sind somit in den beschriebenen Analysen nicht unterscheidbar. Da davon auszugehen ist, das die resultierenden ribosomalen Untereinheiten ebenfalls identisch sind, kann man von identischer Funktionalität der erhaltenen Ribosomen ausgehen.

Die Oligonukleotide zeigten bei Lieferung noch zusätzlich Banden zur erwarteten Oligobande. Deshalb wurden diese wie in 5.2.7.2 beschrieben aufgereinigt, bevor sie für die Primer-Extension-Analysen eingesetzt wurden.

Die Analysen mit dem 16S-C-Oligo lieferten keine brauchbaren Ergebnisse. Sie werden deshalb gesondert in 2.4 behandelt.

Die Ergebnisse der Primer-Extension-Analysen sind nachfolgend dargestellt. Dabei wird zuerst auf die Analysen der *rrnG*- und *rrnH*-16S rRNA eingegangen, da diese Abbrüche für nur ein Operon erzeugen. Die Analysen der *rrnD*-16S rRNA werden anschließend dargestellt, da für ihre Auswertung die Ergebnisse der anderen Analysen notwendig sind.

2.2.3.1 Analyse des *rrnG*-16S rRNA Anteils

In Abbildung 2.7 ist die Primer-Extension-Analyse des Gesamt-Ribosomen- und des Polysomenpools dargestellt. Gezeigt werden die Abbruchbanden des 16S-G-Oligos.

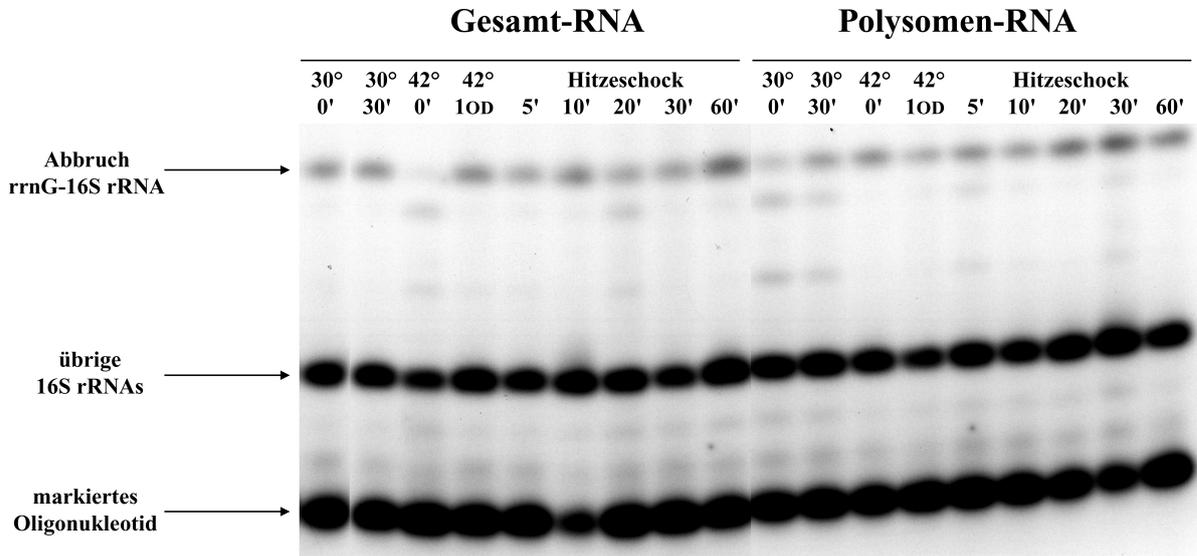


Abbildung 2.7: Die Abbildung zeigt die Analyse der MC4100-Ribosomenpools nach Hitzeschock mit dem 16S-G-Oligo. Die Primer-Extension-Produkte für die verschiedenen Operons sind markiert. An den Spuren ist zum einen die Temperatur, als auch der Zeitpunkt der Entnahme angegeben. Der Zeitpunkt 0' entspricht einer OD_{600} von 0,5-0,55 und kennzeichnet den Beginn des Hitzeschocks. Aufgrund des starken Wachstums bei 42°C wurde keine 30' Probe entnommen, sondern eine Probe bei einer OD_{600} von 1,0. Dies entspricht der OD_{600} bei Hitzeschock nach ca. 30'.

Man erhält zwei Hauptabbruchbanden der Primerextension. Die obere Bande enthält den PE-Abbruch für das *rrnG*-Operon, die untere Bande den Abbruch der übrigen Operons. Die Banden wurden wie beschrieben (vgl. 5.2.4.2) quantifiziert und mit der Hintergrundintensität verrechnet. So erhält man für jede Bande einen Wert, der dem Schwärzungsgrad und damit der Menge der Transkripte entspricht.

Gesamt-Ribosomenpool-Analysen

	Intensität der <i>rrnG</i> -Bande	Intensität der <i>rrnA+B+C+D+E+H</i> -Bande	Anteil der <i>rrnG</i> -16S rRNA im Gesamt-Ribosomenpool
30° 0'	816,16	8277,48	0,09
30° 30'	975	8638,8	0,10
42° 0'	198,16	5771,12	0,03
42° OD ₆₀₀ 1,0	1082,04	10573,84	0,09
HS 5'	761,16	8068,44	0,09
HS 10'	1123,96	10384,32	0,10
HS 20'	704,32	10186,48	0,06
HS 30'	783,00	6586,60	0,11
HS 60'	1738,00	15430,00	0,10

Polysomenpool-Analysen

	Intensität der <i>rrnG</i> -Bande	Intensität der <i>rrnA+B+C+D+E+H</i> -Bande	Anteil der <i>rrnG</i> -16S rRNA im Polysomenpool
30° 0'	1866,00	49885,52	0,04
30° 30'	4098,88	57184,04	0,07
42° 0'	4637,52	44431,12	0,09
42° OD ₆₀₀ 1,0	2849,72	28549,96	0,09
HS 5'	4284,00	52656,80	0,08
HS 10'	3934,56	40214,48	0,09
HS 20'	6207,44	58848,00	0,10
HS 30'	7543,40	71002,40	0,10
HS 60'	5453,92	44265,96	0,11

Tabelle 2.2: Die Tabelle zeigt die Anteile der *rrnG*-16S rRNA aus MC4100 vor und nach Hitzeschock.

Durch die radioaktive Markierung des Oligos ist die Schwärzung jedes Transkripts unabhängig von seiner Länge. Dadurch können die Werte direkt miteinander verrechnet werden. Nach der folgenden Formel wurden die Anteile der *rrnG*-16S rRNA am Gesamt-16S-rRNA-Pool berechnet:

$$\text{Anteil der } rrnG\text{-16S rRNA} = \frac{\text{Intensität der G-Bande}}{\text{Intensität der G-Bande} + \text{Intensität der A+B+C+D+E+H-Bande}}$$

Die erhaltenen Quantifizierungsdaten und die daraus errechneten Anteile des *rrnG*-Operons am 16S rRNA Pools sind in Tabelle 2.2 zusammengefaßt.

Die daraus resultierenden Graphen in Abbildung 2.8 zeigen den Verlauf des *rrnG*-16S rRNA Anteils nach Hitzeschock.

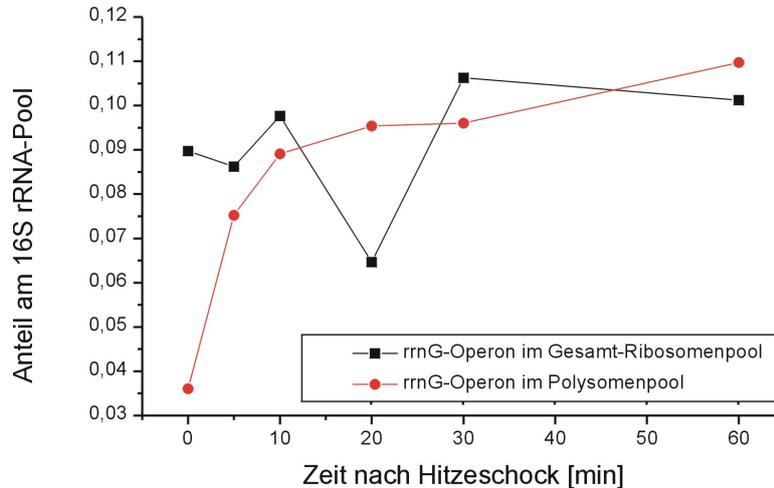


Abbildung 2.8: Dargestellt ist der Verlauf des *rrnG*-16S rRNA Anteils in den verschiedenen Ribosomenpools in Abhängigkeit von der Dauer des Hitzeschocks. Die roten Graphen zeigen den Anteil im Polysomenpool, die schwarzen im Gesamt-Ribosomenpool.

Der Anteil der *rrnG*-16S rRNA im Gesamt-Ribosomenpool liegt vor dem Schock bei 9% und steigt nur unwesentlich an. Auffällig ist hier der 20 Minuten Wert, der auf 6% abfällt, nach 30 Minuten aber wieder auf 11% angesteigt. Bei 42°C ist der *rrnG*-Anteil im 0 Minuten-Wert mit 3% ebenfalls extrem niedrig, steigt aber bei einer OD_{600} von 1,0 auf 9% an.

Im Polysomenpool ist der *rrnG*-Anteil bei 30°C zum Zeitpunkt 0 mit 4% ebenfalls sehr gering, steigt nach Hitzeschock aber auf das Niveau des Gesamt-Ribosomenpools an. Auch die 42°C-Anteile sind bei 9% und zeigten keine Unterschiede bei verschiedenen Zelldichten.

Unterschiede zwischen den Gesamt-Ribosomen und Polysomen zeigen sich hier hauptsächlich beim 0 Minuten Wert. Dies zeigt, daß bei 30°C das *rrnG*-Operon weniger genutzt wird, als man aufgrund seines Anteils in den Gesamt-Ribosomen erwarten würde. Abgesehen davon verlaufen die beiden Kurven auf einem ähnlichen Niveau. Der 20 Minuten-Wert in der Gesamt-Ribosomenpopulation scheint ein Artefakt zu sein, da er sich in späteren Analysen nicht wiederfindet und ein so plötzlicher Abbau und Neusynthese von *rrnG*-16S rRNAs nicht wahrscheinlich ist.

Es zeigt sich auch hier keine spezialisierte Nutzung der *rrnG*-16S rRNA, mit Ausnahme des Wachstums bei 30°C, wo die *rrnG*-16S rRNA nur in geringen Anteilen in den Polysomen zu finden ist.

2.2.3.2 Analyse des *rrnH*-16S rRNA Anteils

Die Primer-Extension-Analyse der verschiedenen Ribosomenpopulationen mit dem 16S-H-Oligo ist in Abbildung 2.9 dargestellt. Der Abbruch der *rrnH*-16S rRNA ergibt die obere Bande, während die Abbrüche der anderen Operons die Untere bilden.

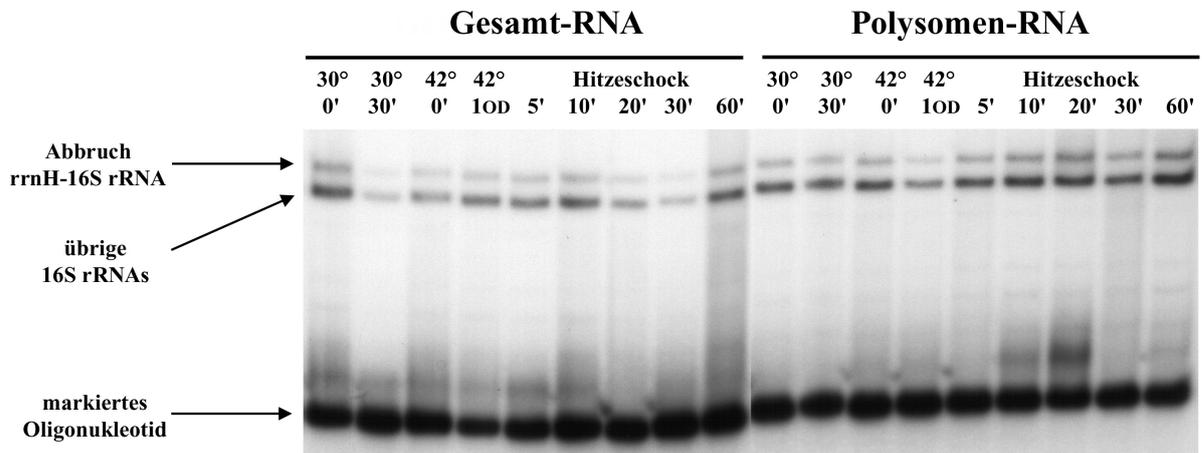


Abbildung 2.9: Die Abbildung zeigt die Analyse der MC4100-Ribosomenpools nach Hitzeschock mit dem 16S-H-Oligo. Die Primer-Extension-Produkte für die verschiedenen Operons sind markiert. An den Spuren ist zum einen die Temperatur als auch der Zeitpunkt der Entnahme angegeben. Der Zeitpunkt 0' entspricht einer OD₆₀₀ von 0,5-0,55 und kennzeichnet den Beginn des Hitzeschocks. Aufgrund des starken Wachstums bei 42°C wurde keine 30' Probe entnommen, sondern eine Probe bei einer OD₆₀₀ von 1,0. Dies entspricht der OD₆₀₀ bei Hitzeschock nach ca. 30'.

Nach Quantifizierung der Abbruchbanden und Verrechnung der erhaltenen Werte ergeben sich die in Tabelle 2.3 dargestellten Anteile für die *rrnH*-16S rRNA am jeweiligen Ribosomenpool.

Abbildung 2.10 zeigt den Verlauf des *rrnH*-Anteils nach Auslösen des Hitzeschocks.

Im Gesamt-Ribosomenpool sinkt der Anteil der *rrnH*-16S rRNA kurz nach Hitzeschock und zeigt danach nur einen kurzfristigen Anstieg nach 20 Minuten. Allerdings ist der Anstieg nur sehr gering. Im Polysomenpool steigt der *rrnH*-Anteil nach dem Schock bis zum 20 Minuten Wert drastisch an und pendelt sich danach auf einen Wert ein, der dem Anteil im Gesamt-Ribosomenpool entspricht. Dabei entspricht der Anteil der *rrnH*-16S rRNA ca 30%.

	Anteil der <i>rrnH</i> -16S rRNA im Gesamt-Ribosomenpool	Anteil der <i>rrnH</i> -16S rRNA im Polysomenpool
30° 0'	0,27	0,19
30° 30'	0,26	0,18
42° 0'	0,26	0,19
42° OD ₆₀₀ 1,0	0,23	0,18
HS 5'	0,24	0,19
HS 10'	0,24	0,21
HS 20'	0,26	0,30
HS 30'	0,24	0,23
HS 60'	0,25	0,26

Tabelle 2.3: Die Tabelle zeigt die Quantifizierungsergebnisse der Primer-Extension-Analysen mit dem 16S-H-Oligo. Analysiert wurden die Ribosomenpopulationen aus MC4100 vor und nach Hitzeschock.

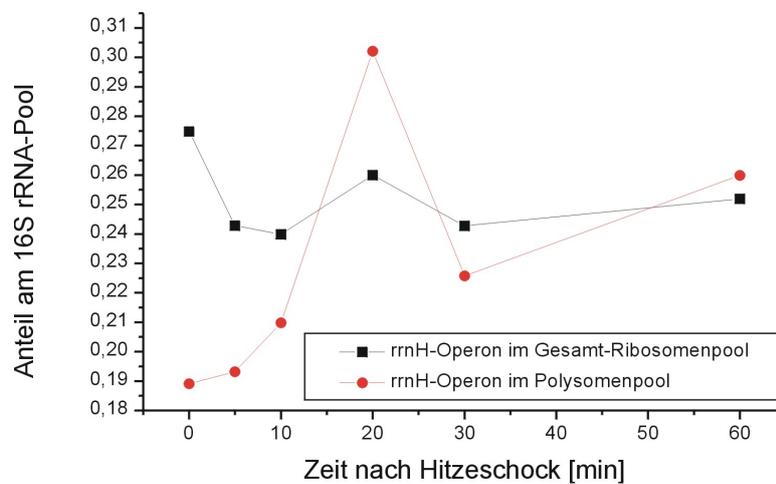


Abbildung 2.10: Dargestellt ist der Verlauf des *rrnH*-16S rRNA Anteils in den verschiedenen Ribosomenpools in Abhängigkeit von der Dauer des Hitzeschocks. Der roten Graph zeigt den Anteil im Polysomenpool, der schwarze im Gesamt-Ribosomenpool.

Bei gleichmäßiger Nutzung aller Operons, hätte jedes Operon einen 14,3%igen-Anteil am Ribosomenpool. Verglichen damit ist der Anteil der *rrnH*-16S rRNA unerwartet hoch, da hier größtenteils Werte über 20% gemessen wurden. Die entfernte Lage des *rrnH*-Operons vom Replikationsursprung hätte eher einen geringeren als einen höheren Anteil am 16S rRNA-Pool vermuten lassen.

Hier zeigt sich ein deutlicher Unterschied in der Nutzung der *rrnH*-16S rRNA. Vor Hitzeschock ist der Anteil der *rrnH* 16S rRNA in den Polysomen deutlich geringer und steigt nach Hitzeschock dramatisch an, bis es den Anteil in den Gesamt-Ribosomen sogar deutlich übertrifft. Danach bewegen sich die Anteile in beiden Populationen auf ähnlichem Niveau. Dies ist ein klarer Hinweis auf eine differentielle Nutzung der *rrnH*-16S rRNA nach Auslösen des Hitzeschocks.

2.2.3.3 Analyse des *rrnD*-16S rRNA Anteils

In Abbildung 2.11 sind die Ergebnisse der Primer-Extension-Reaktion mit dem 16S-D-Oligo dargestellt.

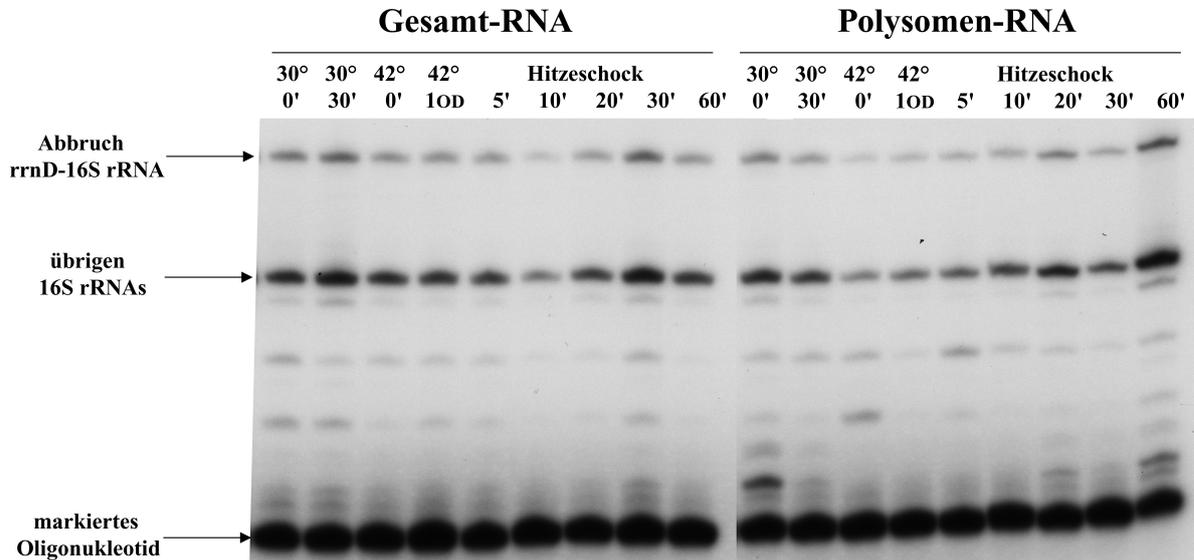


Abbildung 2.11: Die Abbildung zeigt die Analyse der MC4100-Ribosomenpools nach Hitzeschock mit dem 16S-D-Oligo. Die Primer-Extension-Produkte für die verschiedenen Operons sind markiert. Der *rrnD*-16S rRNA Abbruch beinhaltet den Abbruch für das *rrnD* als auch für das *rrnG*-Operon. An den Spuren ist zum einen die Temperatur als auch der Zeitpunkt der Entnahme angegeben. Der Zeitpunkt 0' entspricht einer OD₆₀₀ von 0,5-0,55 und bezeichnet den Beginn des Hitzeschocks. Aufgrund des starken Wachstums bei 42° wurde keine 30' Probe entnommen, sondern eine Probe bei einer OD₆₀₀ von 1,0. Dies entspricht der OD₆₀₀ bei Hitzeschock nach ca. 30'.

Da die Abbruchbande für das *rrnD*-Operon zusätzlich die Abbrüche des *rrnG*-Operons enthält, müssen diese abgezogen werden. Dazu werden die erhaltenen Anteile für das *rrnD*-Operon direkt mit den Anteilen der *rrnG*-Operon aus 2.2.3.1 verrechnet. Die erhaltenen Quantifizierungsdaten und die daraus erhaltenen Anteile des *rrnD*-Operons sind in Tabelle 2.4 zusammengefaßt.

Die Anteile des *rrnD*-Operons sind in Abbildung 2.12 gegen die Zeit nach Hitzeschock aufgetragen. Dabei dient der 30°C 0'-Wert als Nullpunkt.

Der Anteil der *rrnD*-16S rRNA sinkt nach Hitzeschock, bis ca. 10 Minuten nach Streßauslösung. Danach bleibt der Anteil im Polysomenpool konstant, während er im Gesamt-Ribosomenpool 20 Minuten nach Hitzeschock nochmal ansteigt, danach aber wieder auf

	Anteil der <i>rrnD</i> +G-16S rRNA im Gesamt-Ribosomenpool	Anteil der <i>rrnD</i> -16S rRNA im Gesamt-Ribosomenpool	Anteil der <i>rrnD</i> +G-16S rRNA im Polysomenpool	Anteil der <i>rrnD</i> -16S rRNA im Polysomenpool
30° 0'	0,21	0,12	0,19	0,15
30° 30'	0,19	0,09	0,17	0,10
42° 0'	0,18	0,14	0,18	0,08
42° OD ₆₀₀ 1,0	0,19	0,10	0,18	0,09
HS 5'	0,19	0,10	0,18	0,11
HS 10'	0,18	0,08	0,16	0,07
HS 20'	0,19	0,12	0,18	0,08
HS 30'	0,19	0,08	0,18	0,08
HS 60'	0,18	0,08	0,18	0,07

Tabelle 2.4: Quantifizierungsdaten der MC4100-RNA-Analysen mit dem 16S-D-Oligo.

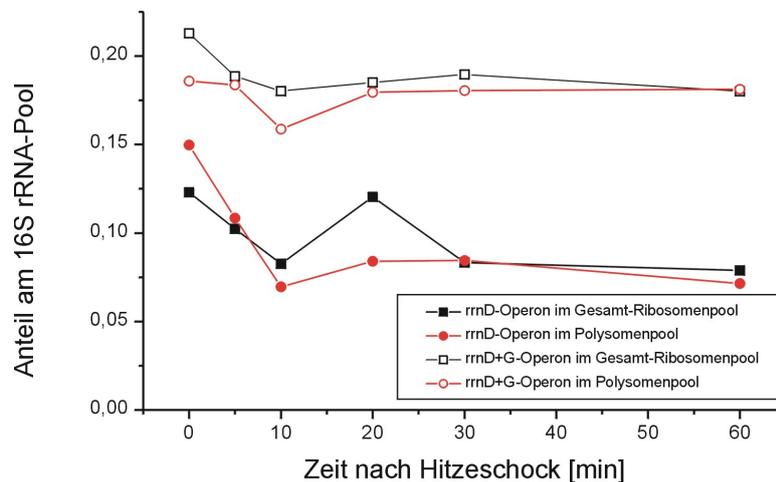


Abbildung 2.12: Dargestellt ist der Verlauf des *rrnD*-16S rRNA Anteils in den verschiedenen Ribosomenpools. Die Graphen mit den hohlen Symbolen repräsentieren die gemessenen Anteile aus der Primer-Extension-Reaktion. Sie enthalten die Anteile für das *rrnD* und *rrnG*-Operon. Die Graphen mit den gefüllten Symbolen zeigen den Verlauf der *rrnD*-16S rRNA nach Substraktion des *rrnG*-Anteils.

das vorherige Niveau zurückfällt. Der *rrnD*-16S RNA-Anteil liegt vor Hitzeschock bei logarithmischem Wachstum bei 12% im Gesamt-Ribosomenpool und bei 15% im Polysomenpool. Nach Hitzeschock sinkt er in beiden Ribosomenpools auf ca. 8%. Wie der Tabelle 2.4 zu entnehmen ist, sinkt der *rrnD*-Anteil auch ohne Streßauslösung auf einen

niedrigeren Wert. Auffällig ist hier der Unterschied zwischen den 42°C-Werten der beiden Ribosomenpools: Bei einer OD₆₀₀ von 0,5 findet man im Gesamt-Ribosomenpool einen Anteil von 14%, der bei einer OD₆₀₀ von 1,0 auf 10% gesunken ist. Im Polysomenpool hingegen ist der Anteil bei einer OD₆₀₀ von 0,5 schon bei 8% und zeigt bei höherer OD₆₀₀ keine deutliche Veränderung.

Abgesehen vom Anstieg bei 20 Minuten im Gesamt-Ribosomenpool sind die Anteile in beiden RNA-Populationen identisch. Dieser Anstieg ist vermutlich auf einen zu geringen Wert des *rrnG*-Operons bei 20 Minuten zurückzuführen (vgl. 2.2.3.1 und 2.3.1.3). So findet sich hier kein deutlicher Unterschied zwischen den Polysomen- und Gesamt-Ribosomen-Anteilen. Der Verlauf der Kurve spiegelt somit die Adaption der Zelle wieder. Der deutliche Abfall des *rrnD*-16S rRNA Anteils deutet allerdings darauf hin, daß die *rrnD*-16S rRNA unter Hitzeschock ungeeigneter ist, als die anderen 16S rRNAs.

2.3 Analysen der Ribosomenpools im *E. coli*-Stamm MG1655

Der bisher verwendete *E. coli*-Stamm MC4100 wurde für weitere Analysen durch den Stamm MG1655 ersetzt. Mit ihm wurden die Analysen nach Hitzeschock wiederholt. Bei anderen Analysen im Labor traten Probleme dadurch auf, daß die im theoretischen Teil analysierten Sequenzen von MG1655 stammen und nicht vom MC4100. Da der Stamm MC4100 nicht sequenziert ist, sind andere Heterogenitäten oder Unterschiede zu den für MG1655 gezeigten nicht völlig auszuschließen. Wenn sich auch bei den Analysen der 16S rRNAs keine Probleme gezeigt haben, so wurde doch zur Vergleichbarkeit mit anderen Arbeiten und um derartigen Schwierigkeiten vorzubeugen, der Stamm für die weiteren Analysen gewechselt. Die Analysen nach Hitzeschock wurden in diesem Stamm wiederholt. Zusätzlich wurden noch Analysen nach Auslösen von Kälteschock durchgeführt.

2.3.1 Analysen des MG1655-Ribosomenpools nach Hitzeschock

2.3.1.1 Polysomenpräparation nach Hitzeschock aus MG1655

Wie zuvor aus MC4100 wurden aus dem *E. coli*-Stamm MG1655 Gesamt-Ribosomenfraktionen und Polysomenfraktionen präpariert. Da sich in den vorherigen Analysen der Ribosomenpools Effekte hauptsächlich in den ersten 20 Minuten zeigten, wurden die Zeitpunkte für die Probenentnahme entsprechend angepaßt. Es wurden Proben 5, 10, 15, 20 und 30 Minuten nach Auslösen des Hitzeschocks präpariert. Wieder wurden Proben, die bei 30° und 42°C ohne Hitzeschock aufgewachsen waren, als Referenzen verwendet. Die Proben wurden doppelt präpariert, so daß zwei komplette Sätze der Ribosomenpools vorlagen. In Abbildung 2.13 sind die Elutionsprofile einer der Polysomenpräparationen exemplarisch dargestellt.

2.3.1.2 Primer-Extension-Analysen der Ribosomenpools aus MG1655 nach Hitzeschock

Die Primer-Extension-Analysen ermöglichen die Bestimmung der Anteile einer 16S rRNA bestimmter Herkunft, d.h. eines bestimmten ribosomalen Operon, zu ermitteln. Dies wurde durchgeführt wie in 5.3.4.1 und 2.2.3.1 beschrieben. Die Primer-Extension-Analysen zum *rrnC*-Operon waren wieder problematisch und werden in 2.4 gesondert behandelt.

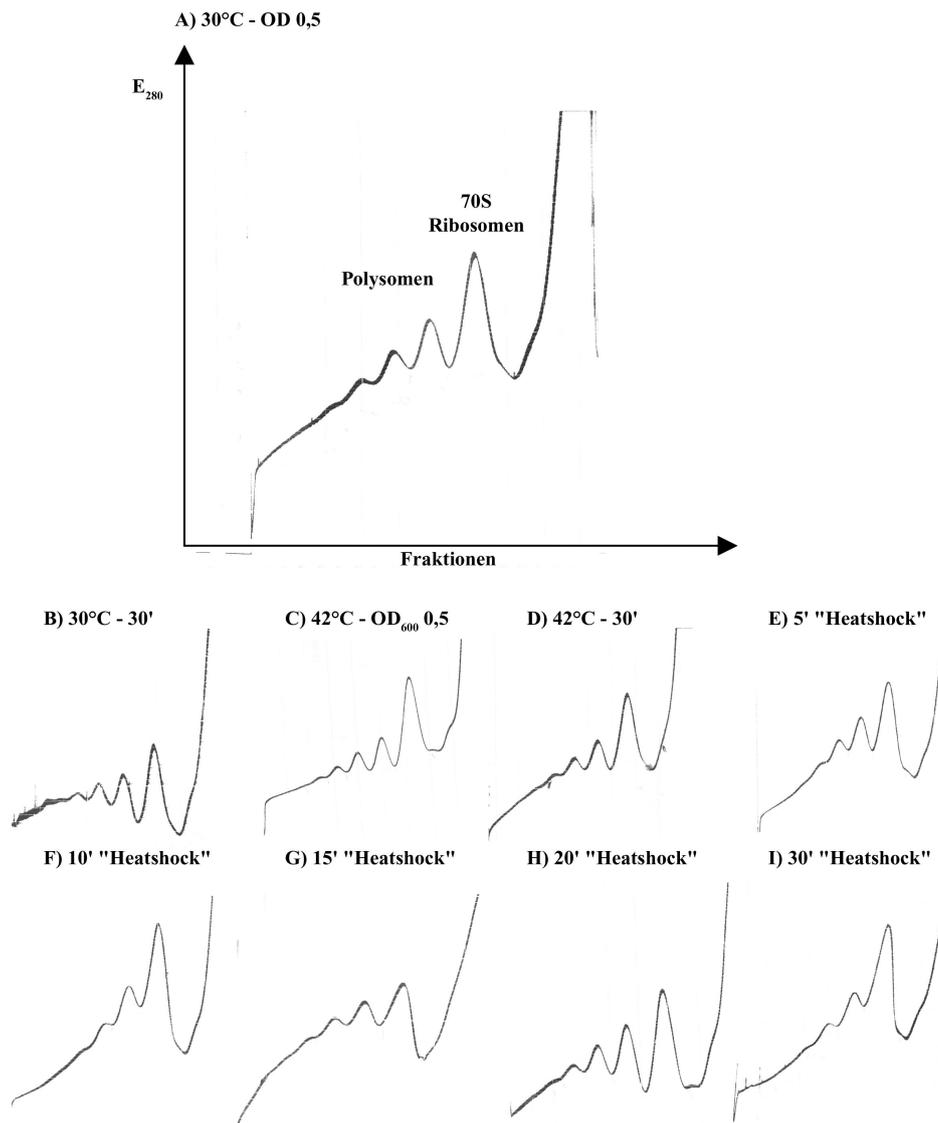


Abbildung 2.13: Die Abbildung zeigt die Elutionsprofile der Polysomenpräparationen aus dem *E. coli*-Stamm MG1655. Der linke Rand eines Profils entspricht dem Boden des Gradienten, d.h. 30% Saccharose-Lösung, und der rechte Rand einer 15%igen Saccharose-Lösung. Abbildung A) zeigt das Profil bei 30°C und einer OD_{600} von ca. 0,5. B) zeigt das Profil einer Kultur, die bei 30°C und einer OD_{600} von ca. 0,5 noch weitere 30 Minuten bei 30°C gewachsen ist. C) und D) zeigen entsprechende Profile für das Wachstum bei 42°C. Die Profile E) bis H) zeigen Profile von Kulturen, die bis zu einer OD_{600} von ca. 0,5 angezogen wurden und danach die angegebene Zeit auf 42°C inkubiert wurden.

2.3.1.3 Analyse des *rrnG*-16S rRNA Anteils

In Abbildung 2.14 sind die Primer-Extension-Analysen der MG1655 Ribosomenpopulationen mit dem 16S-G-Oligo dargestellt. Dabei erhält man für 16S rRNAs des *rrnG*-Operons Abbruchbanden mit einer Länge von 27 nt, und Abbruchbanden einer Länge 22 nt für die restlichen 16S rRNAs.

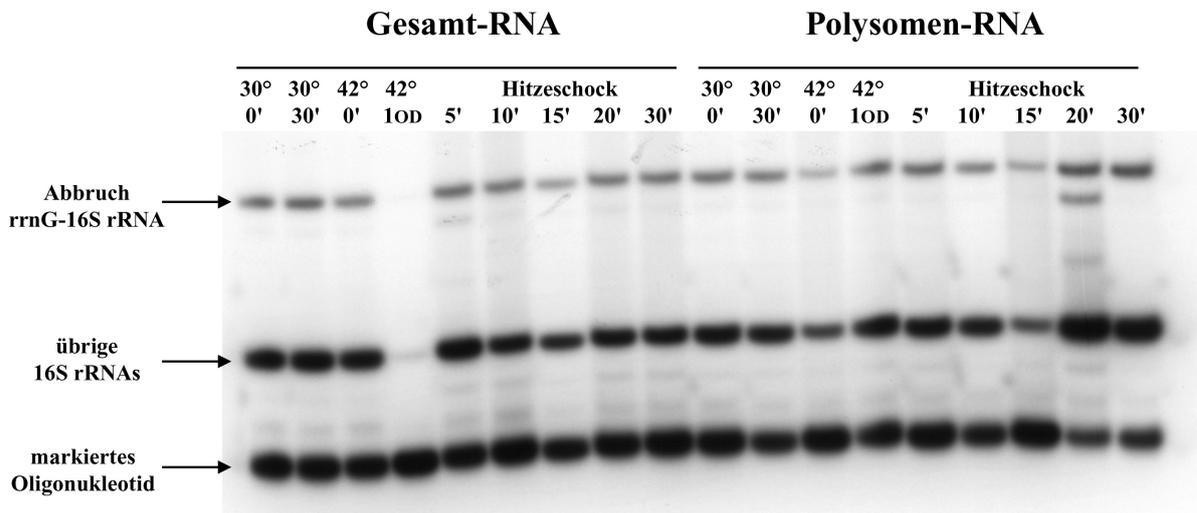


Abbildung 2.14: Die Abbildung zeigt die Analyse des MG1655-Ribosomenpools nach Hitzeschock mit dem 16S-G-Oligo. Die Primer-Extension-Produkte für die verschiedenen Operons sind markiert. An den Spuren sind Temperatur und Zeitpunkt der Entnahme angegeben. Der Zeitpunkt 0' entspricht einer OD_{600} von 0,5-0,55 und bezeichnet den Beginn des Hitzeschocks. Aufgrund des starken Wachstums bei 42°C wurde keine 30' Probe entnommen sondern eine Proben bei einer OD_{600} von 1,0. Dies entspricht der OD_{600} bei Hitzeschock nach ca. 30'.

Die Abbruchbanden wurden wie beschrieben quantifiziert (vgl. 5.2.4.2). In Tabelle 2.5 sind die erhaltenen *rrnG*-Anteile in den verschiedenen Ribosomenpopulationen und Präparationen festgehalten.

Die Abbildung 2.15 zeigt den Verlauf der *rrnG*-16S rRNA Anteile nach Auslösen des Hitzeschocks.

Der Verlauf der Kurven ist in beiden Präparationen sehr ähnlich. Der Anteil des *rrnG*-Operons ist fast immer in den Polysomen höher als in den Gesamt-Ribosomen. Nach Hitzeschock steigt der Anteil in den Polysomenpools an, fällt dann über die Zeit wieder auf das ursprünglich Niveau zurück. In den Gesamt-Ribosomenpools steigt der Anteil nach Hitzeschock nur gering und verändert sich danach nicht mehr. Im Vergleich zum

	Präparation I		Präparation II	
	Anteil der <i>rrnG</i> -16S rRNA im Gesamt-Ribosomenpool	Anteil der <i>rrnG</i> -16S rRNA im Polysomenpool	Anteil der <i>rrnG</i> -16S rRNA im Gesamt-Ribosomenpool	Anteil der <i>rrnG</i> -16S rRNA im Polysomenpool
30° 0'	0,07	0,09	0,07	0,11
30° 30'	0,09	0,11	0,09	0,11
42° 0'	0,08	0,10	0,11	0,10
42° OD ₆₀₀ 1,0	0,08	0,11	0,11	0,10
HS 5'	0,08	0,13	0,11	0,15
HS 10'	0,07	0,11	0,11	0,11
HS 15'	0,08	0,11	0,11	0,14
HS 20'	0,08	0,10	0,11	0,12
HS 30'	0,08	0,10	0,10	0,11

Tabelle 2.5: Die Tabelle zeigt die *rrnG*-16S rRNA-Anteile in den MG1655 Ribosomenpopulationen. Es sind die Werte beider Präparationen aufgeführt.

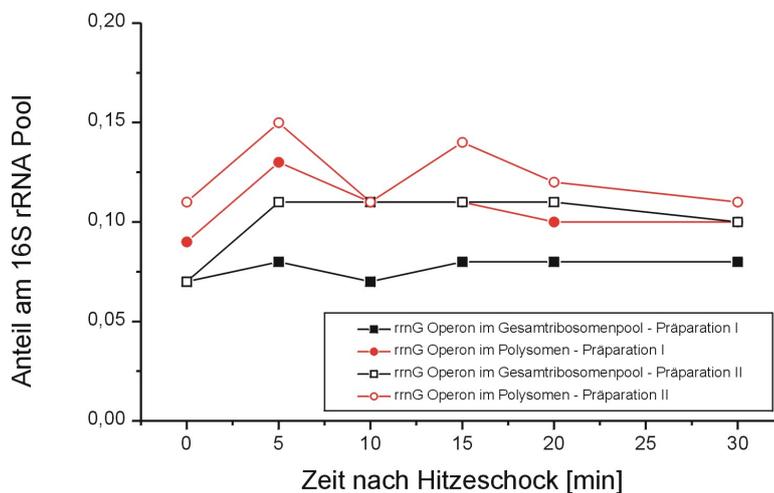


Abbildung 2.15: Dargestellt ist der Verlauf des *rrnG*-16S rRNA-Anteils in den verschiedenen Ribosomenpools in Abhängigkeit von der Dauer des Hitzeschocks.

MC4100 fällt auf, daß der Gesamt-Ribosomenpool sich ähnlich verhält. Mit Ausnahme des 20 min Wertes, der bei den MC4100-Analysen extrem gering ausgefallen ist, steigt hier der *rrnG*-Anteil auch gering an und verändert sich kaum über die Zeit. Der Anteil in den Polysomen hingegen ist im MC4100 geringer als in den Gesamt-Ribosomen. Nach einem raschen, initialen Anstieg steigt der *rrnG*-Anteil weiter, bis er den Wert in den

Gesamt-Ribosomen entspricht.

2.3.1.4 Analyse des *rrnH*-16S rRNA Anteils

Die folgende Abbildung 2.16 zeigt die Primer-Extension-Analysen der MG1655-Polysomenpopulationen nach Hitzeschock mit dem 16S-H-Oligo. Der Abbruch der *rrnH* 16S rRNA hat eine Länge von 28 Nukleotiden. Die übrigen Operons ergeben eine Abbruchbande mit einer Länge von 27 Nukleotiden.

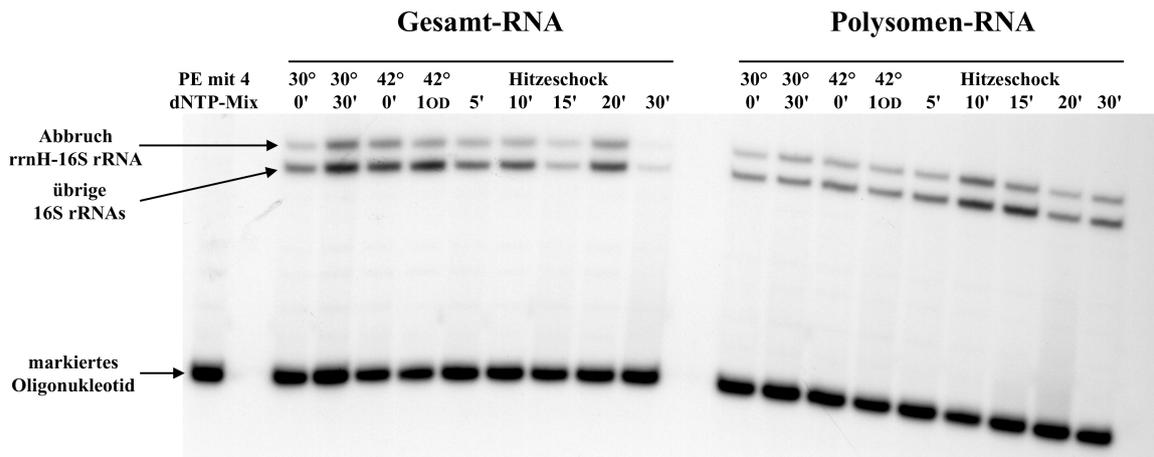


Abbildung 2.16: Die Abbildung zeigt die Analyse des MG1655-Ribosomenpools nach Hitzeschock mit dem 16S-H-Oligo. Die Primer-Extension-Produkte für die verschiedenen Operons sind markiert. An den Spuren ist zum einen die Temperatur, als auch der Zeitpunkt der Entnahme angegeben.

Die Abbruchbanden wurden wie zuvor beschrieben quantifiziert und miteinander verrechnet. Die erhaltenen Anteile der *rrnH* 16S rRNA an der Gesamtmenge der 16S rRNA sind in Tabelle 2.6 angegeben.

Die Graphen in Abbildung 2.17 zeigen den Verlauf des *rrnH*-Anteils am 16S rRNA-Pool nach dem Hitzeschock.

Der Anteil der *rrnH*-16S rRNA steigt nach Hitzeschock an, sowohl in den Gesamt-Ribosomenpools als auch in den Polysomenpools. Dabei ist der Anstieg in den Polysomen nach 10 Minuten maximal und übersteigt den Anteil in den Gesamt-Ribosomen deutlich. 15 Minuten nach Hitzeschock fällt der Anteil allerdings stark ab, kurzfristig sogar geringfügig unter das Niveau in den Gesamt-Ribosomen.

Zwischen den beiden Präparationen gibt es im Verlauf der Polysomenpools keine Un-

	Präparation I		Präparation II	
	Anteil der <i>rrnH</i> -16S rRNA im Gesamt-Ribosomenpool	Anteil der <i>rrnH</i> -16S rRNA im Polysomenpool	Anteil der <i>rrnH</i> -16S rRNA im Gesamt-Ribosomenpool	Anteil der <i>rrnH</i> -16S rRNA im Polysomenpool
30° 0'	0,28	0,31	0,25	0,32
30° 30'	0,19	0,37	0,35	0,40
42° 0'	0,25	0,31	0,36	0,35
42° OD ₆₀₀ 1,0	0,27	0,33	0,26	0,38
HS 5'	0,26	0,32	0,31	0,32
HS 10'	0,26	0,35	0,29	0,40
HS 15'	0,28	0,26	0,35	0,30
HS 20'	0,32	0,32	0,32	0,34
HS 30'	0,31	0,29	0,25	0,35

Tabelle 2.6: Die Tabelle zeigt die *rrnH*-16S rRNA Anteile in MG1655 vor und nach Auslösen von Hitzeschock.

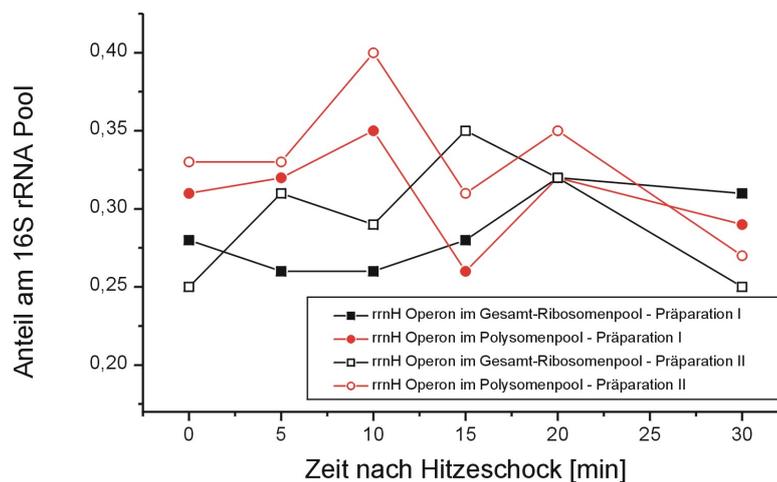


Abbildung 2.17: Dargestellt ist der Verlauf des *rrnH*-16S rRNA Anteils in den verschiedenen Ribosomenpools in Abhängigkeit von der Dauer des Hitzeschocks.

terschiede. Der Verlauf der Gesamt-Ribosomenpools steigt zwar bei beiden an, jedoch im Falle von Präparation I erfolgt der Anstieg erst nach 10 Minuten, während in den Gesamt-Ribosomen der Präparation II der Anstieg direkt nach Schockauslösung beginnt und sein Maximum bei 15 Minuten hat, danach aber wieder abfällt.

Beim Stamm MC4100 zeigte sich ein starker Anstieg des Anteils in den Polysomen

nach 20 Minuten. Wenn auch das Maximum hier nicht bei 10 Minuten liegt, so ist in beiden Stämmen ein drastischer Anstieg der *rrnH*-16S rRNA in den Polysomen zu verzeichnen, der sich in seiner Intensität nicht im Gesamt-Ribosomenpool wiederfindet.

2.3.1.5 Analyse des *rrnD*-16S rRNA Anteils

Abbildung 2.18 zeigt eine Primer-Extension-Analyse mit dem 16S-D-Operon. Als Template wurden die gesamt RNAs aus den verschiedenen Ribosomenpools aus MG1655 vor und nach Hitzeschock eingesetzt.

Wie Abbildung 2.6 zu entnehmen ist, erzeugt diese Primer-Extension zwei Abbruchbanden: eine 32 nt langes Transkript, das durch die *rrnD*+*G* 16S rRNA erzeugt wird, und ein 27 nt langes Transkript, das durch die verbleibenden 16S rRNAs erzeugt wird.

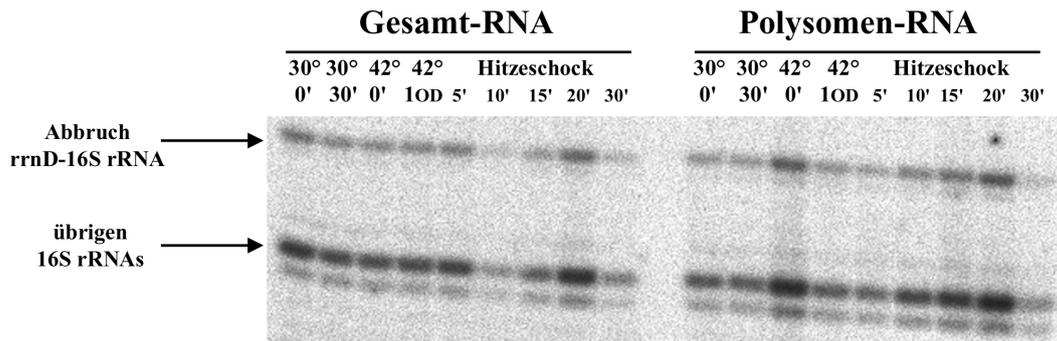


Abbildung 2.18: Die Abbildung zeigt die Analyse der MG1655-Ribosomenpools nach Hitzeschock mit dem 16S-D-Oligo. Die Primer-Extension-Produkte für die verschiedenen Operons sind markiert. Der *rrnD*-16S rRNA Abbruch beinhaltet den Abbruch fürs *rrnD* als auch fürs *rrnG*-Operon. An den Spuren ist zum einen die Temperatur als auch der Zeitpunkt der Entnahme angegeben.

Da die Primer-Extension-Analysen ähnliche Ergebnisse lieferten, ist nur eines der Gele abgebildet. In Tabelle 2.7 sind die quantifizierten Werte beider Probensätze angegeben und in Abbildung 2.19 die entsprechenden Graphen.

Die Graphen zeigen, daß der Anteil der *rrnD*-16S rRNA vor Auslösen des Hitzeschocks im Gesamt-Ribosomenpool höher ist als im Polysomenpool. Fünf Minuten nach Schockauslösung fällt der Anteil in beiden Ribosomenpopulationen ab, steigt danach allerdings wieder an und erreicht in beiden Ribosomenpools ein ähnliches Niveau. Dieser Verlauf läßt sich in beiden Präparationen finden, wenn auch die absoluten Anteile in den Präparationen variieren. Im Gegensatz zur Präparation vom MC4100 findet sich kein starker Anstieg des *rrnD*-Anteils im Gesamt-Ribosomenpool nach 20 min Hitzeschock (vgl. 2.2.3.3). Dieser kommt durch einen extrem niedrigen Wert des *rrnG*-Anteils nach 20 min zustande, was nach der Verrechnung mit den *rrnD*+*G*-Anteilen zu einem erhöhten *rrnD*-Anteil führt. Da dieser starke Abfall des *rrnG*-Anteils aus dem restlichen

Präparation I

	Anteil der <i>rrnD</i> +G-16S rRNA im Gesamt-Ribosomenpool	Anteil der <i>rrnD</i> -16S rRNA im Gesamt-Ribosomenpool	Anteil der <i>rrnD</i> +G-16S rRNA im Polysomenpool	Anteil der <i>rrnD</i> -16S rRNA im Polysomenpool
30° 0'	0,22	0,15	0,18	0,08
30° 30'	0,23	0,13	0,18	0,07
42° 0'	0,21	0,13	0,19	0,09
42° OD ₆₀₀ 1,0	0,19	0,12	0,20	0,09
HS 5'	0,20	0,12	0,18	0,05
HS 10'	0,20	0,12	0,19	0,07
HS 15'	0,20	0,12	0,18	0,07
HS 20'	0,18	0,10	0,19	0,09
HS 30'	0,17	0,09	0,16	0,06

Präparation II

	Anteil der <i>rrnD</i> +G-16S rRNA im Gesamt-Ribosomenpool	Anteil der <i>rrnD</i> -16S rRNA im Gesamt-Ribosomenpool	Anteil der <i>rrnD</i> +G-16S rRNA im Polysomenpool	Anteil der <i>rrnD</i> -16S rRNA im Polysomenpool
30° 0'	0,20	0,13	0,19	0,08
30° 30'	0,15	0,05	0,18	0,07
42° 0'	0,17	0,06	0,18	0,08
42° OD ₆₀₀ 1,0	0,19	0,08	0,23	0,13
HS 5'	0,17	0,06	0,16	0,01
HS 10'	0,19	0,08	0,18	0,07
HS 15'	0,17	0,06	0,19	0,05
HS 20'	0,18	0,07	0,19	0,07
HS 30'	0,17	0,07	0,18	0,07

Tabelle 2.7: Die Tabelle zeigt die Anteile der *rrnD*-16S rRNA nach Hitzeschock im MG1655.

Es sind die Werte beider Präparationen aufgeführt. Die Tabelle enthält zum einen die durch Quantifizierung der Bandenintensitäten erhaltenen Anteile für *rrnD*+G, als auch die korrigierten *rrnD*-Anteile.

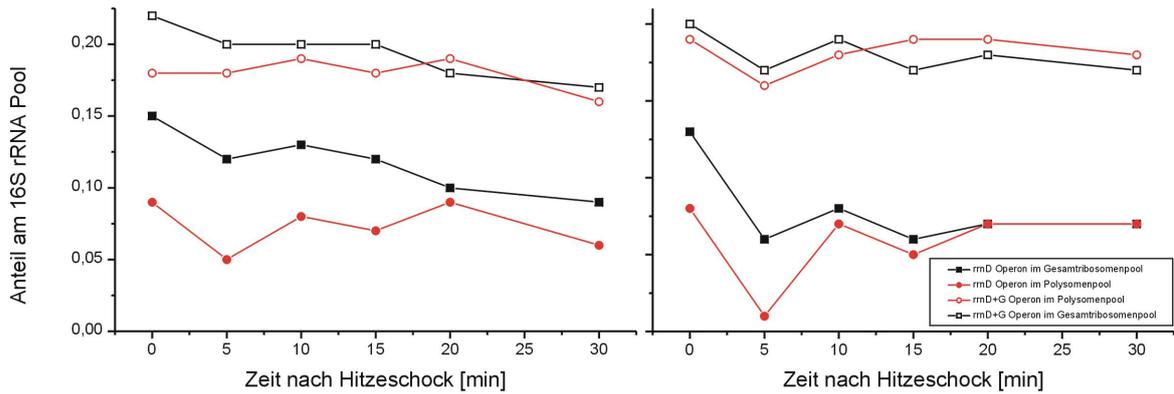


Abbildung 2.19: Dargestellt ist der Verlauf des *rrnD*-16S rRNA Anteils in den verschiedenen Ribosomenpools. Der linke Teil der Abbildung zeigt den Verlauf in den RNA Proben aus Präparation I, der rechte aus Präparation II. Die Kurven mit den offenen Symbolen repräsentieren die gemessenen Anteile aus der Primer-Extension-Reaktion, d.h. sie enthalten die Anteile für das *rrnD* und *rrnG*-Operon. Die Kurven mit den gefüllten Symbolen zeigen den Verlauf der *rrnD*-16S rRNA nach Substraktion des *rrnG*-Anteils.

Kurvenverlauf in 2.2.3.1 herausfällt und sich in den Analysen des MG1655 auch nicht wiederfindet (vgl. 2.3.1.3), handelt es sich vermutlich um einen Ausreißer. Läßt man diesen Wert bei der Betrachtung Außen vor, so ähnelt der Kurvenverlauf im MC4100 den Kurven im MG1655.

2.3.2 Analysen des MG1655-Ribosomenpools nach Kälteschock

2.3.2.1 Polysomenpräparation nach Hitzeschock aus MG1655

In ähnlicher Weise wie zuvor unter Hitzeschockbedingungen wurden Gesamt-Ribosomen und Polysomenpopulation unter Kälteschockbedingungen präpariert. Hierzu wurden Zellen vom *E.coli*-Stamm MG1655 bei 37°C angezogen und in der logarithmischen Wachstumsphase bei einer OD₆₀₀ von 0,5-0,55 der Kälteschock ausgelöst, indem die Kulturen in einen Schüttler mit einer Wassertemperatur von 15-16°C umgesetzt wurden. Nach 5, 10, 15, 20 und 30 Minuten wurden die verschiedenen Ribosomenpopulationen präpariert. Zusätzlich wurden Proben isoliert, die nur bei 37°C bzw. nur bei 15°C aufgewachsen. Es wurden, wie bei den Hitzeschockanalysen im MG1655, zwei unabhängige Präparationen durchgeführt. Die Elutionsprofile einer der Polysomenpräparationen ist in Abbildung 2.20 exemplarisch dargestellt.

Wie aus den Profilen zu ersehen ist, konnte auch aus Kulturen, die bei 15°C aufwachsen, Polysomen isoliert werden (siehe 2.20 C) und D). Nach Auslösen des Kälteschocks hingegen sind die Polysomenanteile minimal und die Ribosomen liegen größtenteils als Monosomen vor. Auch 30 min nach Schock kommt es nicht zu einer Polysomenbildung, die mit der Langzeitinkubation bei 15°C vergleichbar wäre (siehe C), D) mit I).

Auch wenn nach Kälteschock die Polysomenpeaks sehr gering sind, wurden die entsprechenden Fraktionen gepoolt und die rRNAs isoliert. Die RNA-Mengen waren sehr gering, aber für die Primer-Extension-Analysen ausreichend.

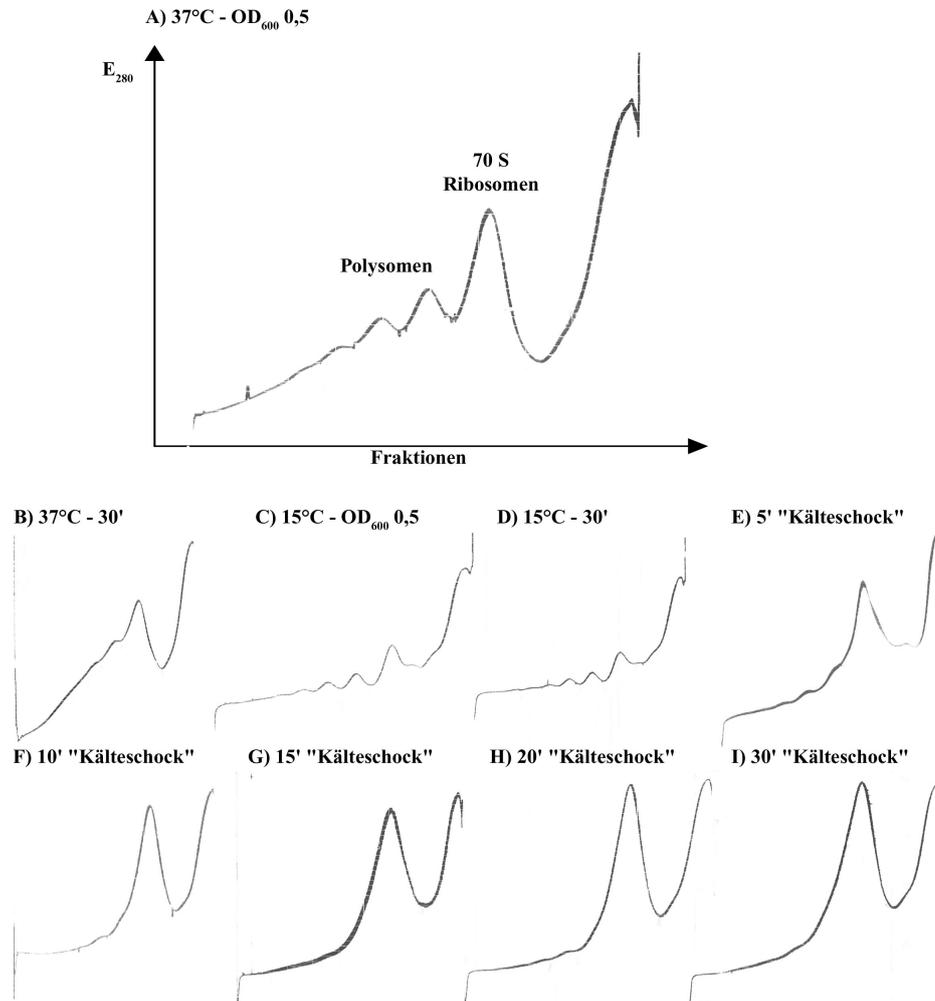


Abbildung 2.20: Die Abbildung zeigt die Elutionsprofile der Polysomenpräparationen nach Kälteschock. Der linke Rand eines Profils entspricht dem Boden des Gradienten, d.h. 30% Saccharose-Lösung, und der rechte Rand einer 15%igen Saccharose-Lösung. Abbildung A) zeigt das Profil bei 37°C und einer OD_{600} von ca. 0,5. B) zeigt das Profil einer Kultur, die bei 37°C und einer OD_{600} von ca. 0,5 noch weitere 30 Minuten bei gleicher Temperatur gewachsen ist. C) und D) zeigen entsprechende Profile für das Wachstum bei 15°C . Die Profile E) bis H) zeigen Profile von Kulturen, die bis zu einer OD_{600} von 0,5 auf 37°C angezogen wurden und danach die angegebene Zeit auf 15° inkubiert wurden.

2.3.2.2 Primer-Extension-Analysen der Ribosomenpools aus MG1655 nach Kälteschock

Da die RNA-Mengen aus den Präparationen der Polysomen sehr gering waren, wurden nicht für alle Proben gut meßbare Primer-Extension-Signale erhalten. Deshalb wurden die Ergebnisse aus beiden RNA-Präparationen gemittelt, falls aus beiden Meßreihen verwertbare Daten ermittelt wurden, und ergänzt, wo mit den RNAs einer Präparation keine Werte gewonnen werden konnten. Die nachfolgenden Graphen und Tabellen enthalten die so gewonnenen Daten. Dabei wurden nur Werte gemittelt, die maximal 0,01 bis 0,02 auseinander lagen. Ansonsten wurden die Werte der besser quantifizierbaren Primer-Extension-Signale verwendet.

2.3.2.3 Analyse des *rrnG*-16S rRNA Anteils

Die Analysen mit dem 16S-G-Oligo sind in der Abbildung 2.21 dargestellt. Die Primer-Extension liefert die erwarteten Abbruchbanden. Zum einen ein 27 nt langes Transkript durch die Abbrüche der *rrnG*-16S rRNA und ein 22 nt langes Transkript durch die Abbrüche der verbleibenden 16S rRNAs.

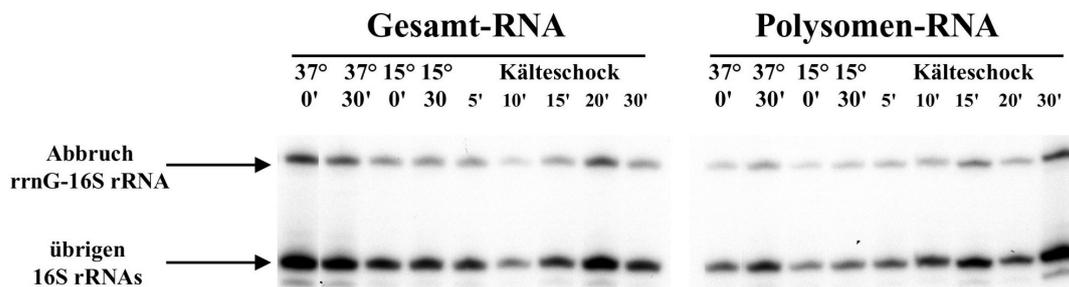


Abbildung 2.21: Die Abbildung zeigt die Analyse des MG1655-Ribosomenpools nach Kälteschock mit dem 16S-G-Oligo. Die Primer-Extension Produkte für die verschiedenen Operons sind markiert. An den Spuren ist zum einen die Temperatur, als auch der Zeitpunkt der Entnahme angegeben. Der Zeitpunkt 0' entspricht einer OD_{600} von 0,5-0,55 und bezeichnet den Beginn des Kälteschocks.

Die Quantifizierungsergebnisse sind in Tabelle 2.8 zusammengefaßt. Die Anteile der *rrnG*-16S rRNA wurden wie beschrieben berechnet.

Abbildung 2.22 zeigt den Verlauf des *rrnG*-Anteils nach Auslösen des Kälteschocks, aufgetragen gegen die Zeit.

	Anteil der <i>rrnG</i> -16S rRNA im Gesamt-Ribosomenpool	Anteil der <i>rrnG</i> -16S rRNA im Polysomenpool
37° 0'	0,075	0,052
37° 30'	0,083	0,120
15° 0'	0,083	0,097
15° 30'	0,123	0,092
KS 5'	0,088	0,095
KS 10'	0,097	0,089
KS 15'	0,096	0,097
KS 20'	0,108	0,082
KS 30'	0,118	0,125

Tabelle 2.8: Die Tabelle zeigt die Quantifizierungsergebnisse der Primer-Extension-Analysen mit dem 16S-G-Oligo. Angegeben sind die Anteile der *rrnG*-16S rRNA nach Kälteschock Einwirkung.

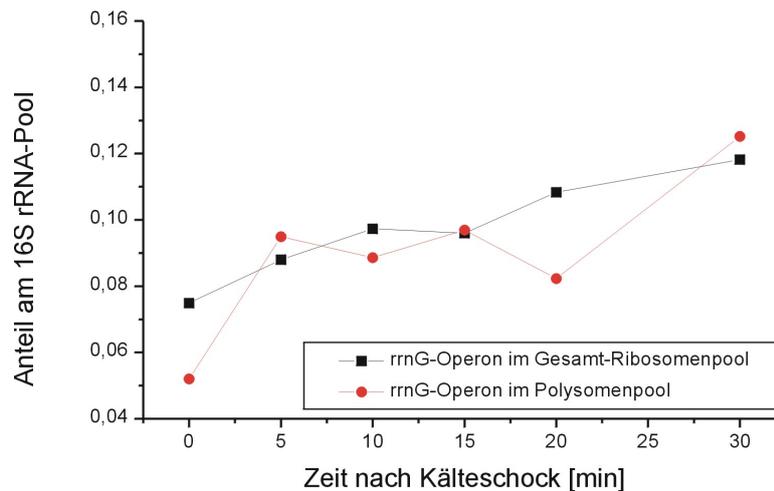


Abbildung 2.22: Dargestellt ist der Verlauf des *rrnG*-16S rRNA Anteils in den verschiedenen Ribosomenpools. Der schwarze Kurve zeigt den Verlauf im Gesamt-Ribosomen-Pool, die rote den Verlauf im Polysomenpool.

Der Anteil des *rrnG*-Operons am 16S rRNA Pool steigt nach Kälteschock kontinuierlich an. Allerdings ist der Anstieg nur geringfügig, von anfänglich 7,5% in der Gesamt-RNA auf einen Wert von 11,8% nach 30 minütigen Kälteschock. Der Verlauf in der

Polysomen-RNA ist ähnlich. Unterschiede finden sich zur Gesamt-RNA-Population nur beim 0- und beim 20-Minuten-Wert, die jeweils ca. 2% geringer in den Polysomen als in den Gesamt-Ribosomen sind. Allerdings sind diese Unterschiede kaum signifikant. Man kann auch hier zusammenfassend feststellen, daß der Kurvenverlauf nur die Adaption widerspiegelt und auch für die *rrnG*-16S rRNA keine differentielle Nutzung vorliegt.

2.3.2.4 Analyse des *rrnH*-16S rRNA Anteils

Die Analysen mit dem 16S-H-Oligo ergaben die erwarteten Abbruchbanden. Das 28 nt lange Transkript wird dabei durch die Abbrüche der *rrnH*-16S rRNA verursacht, während das 27 nt lange Transkript durch die restlichen 16S rRNAs erzeugt wird.

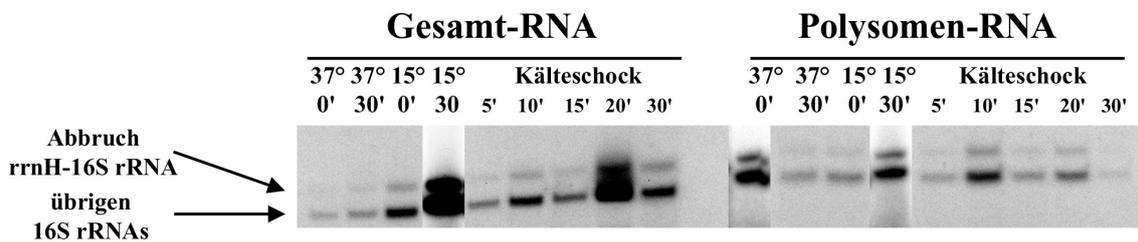


Abbildung 2.23: Die Abbildung zeigt die Analyse des MG1655-Ribosomenpools nach Kälteschock mit dem 16S-H-Oligo. Die Primer-Extension Produkte für die verschiedenen Operons sind markiert. An den Spuren ist zum einen die Temperatur als auch der Zeitpunkt der Entnahme angegeben. Der Zeitpunkt 0' entspricht einer OD_{600} von 0,5-0,55 und bezeichnet den Beginn des Kälteschocks.

Die Quantifizierung der Bandenintensitäten und deren Verrechnung ergaben die in Tabelle 2.9 dargestellten Anteile für die *rrnH*-16S rRNA am 16S rRNA-Pool.

Der Verlauf des Anteils der *rrnH*-16S RNA ist in Abbildung 2.24 dargestellt.

Der Anteil der *rrnH*-16S rRNA ist in den Gesamt-Ribosomen bei ca. 17% und bleibt auf diesem Niveau, bis 10 Minuten nach Kälteschock. Danach steigt der Anteil in den Gesamt-Ribosomen an, bis zu einem Wert von 21,5% nach 30 Minuten Kälteschock. In den Polysomen ist der Anteil zu Beginn geringfügig höher, d.h. ca. 20% und behält diese Höhe auch bis zum 10 Minuten Wert bei. Danach verlaufen die beiden Graphen parallel, wobei der Anteil in den Polysomen geringfügig niedriger ist. Allerdings lassen sich auch hier keine signifikanten Unterschiede zwischen Gesamt-RNA-Pool und Polysomenpool finden. Die Differenzen liegen bei maximal 2% und meist deutlich darunter, so daß auch

	Anteil der <i>rrnH</i> -16S rRNA im Gesamt-Ribosomenpool	Anteil der <i>rrnH</i> -16S rRNA im Polysomenpool
37° 0'	0,173	0,195
37° 30'	0,175	0,192
15° 0'	0,145	0,186
15° 30'	0,264	0,187
KS 5'	0,177	0,197
KS 10'	0,174	0,199
KS 15'	0,186	0,173
KS 20'	0,190	0,188
KS 30'	0,215	0,209

Tabelle 2.9: Dargestellt sind die Anteile der *rrnH*-16S rRNA am Pool aller 16S rRNAs nach Auslösen des Kälteschocks.

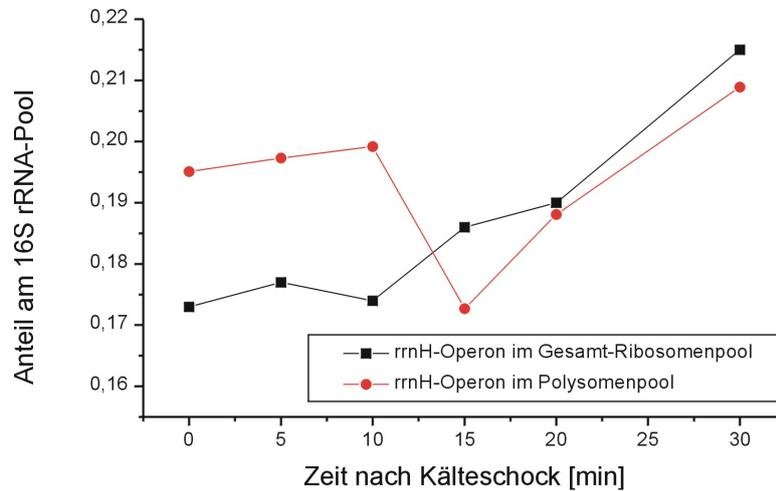


Abbildung 2.24: Dargestellt ist der Verlauf des *rrnH*-16S rRNA-Anteils in den verschiedenen Ribosomenpools.

hier nicht von einer differentielle Nutzung gesprochen werden kann.

2.3.2.5 Analyse des *rrnD*-16S rRNA Anteils

Die folgende Abbildung 2.25 zeigt die Primer-Extension-Analyse der Kälteschock-RNAs mit den 16S-D-Oligo. Die beiden erwarteten Transkriptbanden sind entsprechend markiert. Für die 16S rRNA des *rrnD* und *G*-Operons lieferte die Reaktion ein Transkript von 32 nt Länge. Die verbleibenden 16S rRNA ergeben eine 22 nt langes Transkript.



Abbildung 2.25: Die Abbildung zeigt die Analyse des MG1655-Ribosomenpools nach Kälteschock mit dem 16S-D-Oligo. Die Primer-Extension Produkte für die verschiedenen Operons sind markiert. Der *rrnD*-16S rRNA Abbruch beinhaltet den Abbruch fürs *rrnD* als auch fürs *rrnG*-Operon. An den Spuren ist zum einen die Temperatur, als auch der Zeitpunkt der Entnahme angegeben. Der Zeitpunkt 0' entspricht einer OD₆₀₀ von 0,5-0,55 und bezeichnet den Beginn des Kälteschocks.

Die erhaltenen Transkriptbanden wurden wie beschrieben quantifiziert (vgl. 5.2.4.2) und die Anteile der *rrnD*-16S rRNA berechnet. Die erhaltenen Werte sind in Tabelle 2.10 zusammengefaßt.

In Abbildung 2.26 sind die Anteile gegen die Zeit nach Kälteschock aufgetragen.

Der Anteil der *rrnD*-16S rRNA sinkt über die Zeit nach Kälteschock von ca. 15% auf ca. 9%. Dabei zeigen sich keine auffälligen Maxima oder Minima in den Kurven. Auch zwischen den Gesamt-RNA- und Polysomenproben zeigen sich keine Unterschiede. Der Verlauf der Kurven spiegelt somit die Adaption der Zellen an die niedrigere Temperatur wieder. Eine differentielle Nutzung des *rrnD*-Operons während des Kälteschocks ist nicht zu erkennen.

	Anteil der <i>rrnD</i> +G-16S rRNA im Gesamt-Ribosomenpool	Anteil der <i>rrnD</i> -16S rRNA im Gesamt-Ribosomenpool	Anteil der <i>rrnD</i> +G-16S rRNA im Polysomenpool	Anteil der <i>rrnD</i> -16S rRNA im Polysomenpool
37° 0'	0,223	0,148	0,192	0,14
37° 30'	0,197	0,114	0,196	0,076
15° 0'	0,197	0,114	0,167	0,070
15° 30'	0,213	0,090	0,216	0,124
KS 5'	0,214	0,126	0,200	0,106
KS 10'	0,207	0,110	0,207	0,119
KS 15'	0,218	0,122	0,199	0,102
KS 20'	0,208	0,100	0,209	0,127
KS 30'	0,203	0,085	0,213	0,088

Tabelle 2.10: Die Tabelle zeigt die Quantifizierungsergebnisse der Primer-Extension-Analysen mit dem 16S-D-Oligo. Analysiert wurden RNAs aus MG1655 nach Kälteschock-Einwirkung.

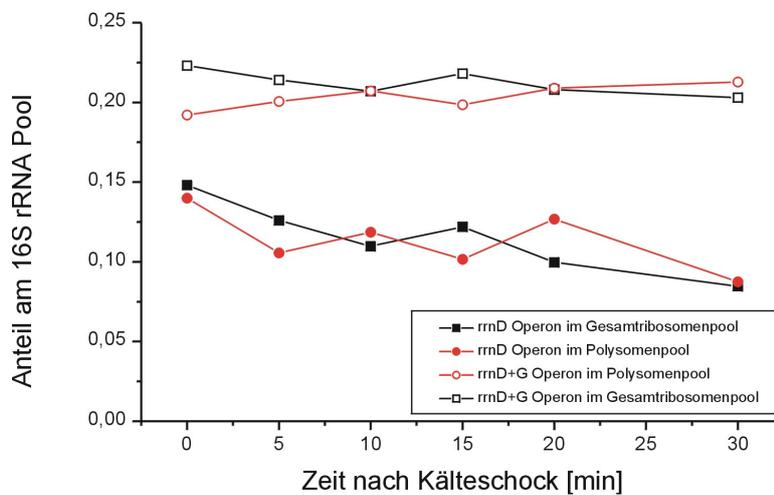


Abbildung 2.26: Dargestellt ist der Verlauf des *rrnD*-16S rRNA Anteils in den verschiedenen Ribosomenpools nach Kälteschock. Sowohl die gemessenen *rrnD*+G-Anteile als auch die gerechneten *rrnD*-Anteile sind dargestellt.

2.4 Primer-Extension-Analysen der 16 rRNA des *rrnC*-Operons

In den beschriebenen Analysen wurden die Anteile für die 16S rRNAs des *rrnD*-, *G*- und *H*-Operons bestimmt. Darüber hinaus wurden auch Primer-Extension-Analysen mit dem Primer 16S-C-Oligo durchgeführt, um den Anteil der *rrnC*-16S rRNA zu bestimmen. Abbildung 2.27 zeigt eine solche Analyse am Beispiel der Ribosomenpopulationen aus MC4100.

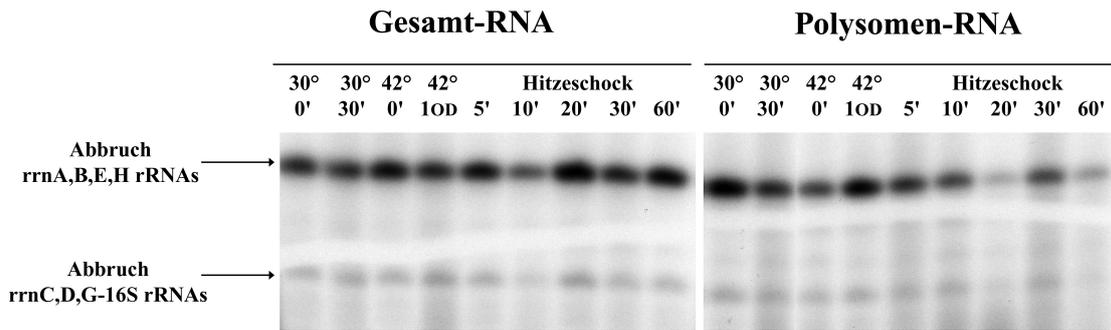


Abbildung 2.27: Die Abbildung zeigt eine Primer-Extension-Analyse mit dem 16S-C-Oligo. Verwendet wurden Gesamt-Ribosomen- und Polysomen-RNAs aus MC4100 nach Hitzeschock. Die erhaltenen Abbruchbanden sind entsprechend markiert.

Die Primer-Extension erzeugt mit dem Oligo-16S-C ein 25 nt langes Transkript, für die 16S rRNAs aus den Operons C, D und G, und ein 28 nt langes Transkript für die verbleibenden Operons (vgl. Abb. 2.6). Wie in der Autoradiographie schon zu erkennen ist, sind die Abbrüche für die *rrnC*-, *D*- und *G*-16S rRNAs schwach. Nach Quantifizierung und Verrechnung mit den Werten für die Operons D und G erhält man keinen meßbaren Anteil für das *rrnC*-Operon. Die errechneten Werte bewegen sich nur knapp oberhalb von 0%, teilweise sogar darunter. Da die Analysen im Stamm MC4100 durchgeführt wurden und nicht im MG1655, aus dem die in 2.1 analysierten 16S rRNA-Sequenzen stammen, lag die Vermutung nahe, daß die hier vermessene Heterogenität im MC4100 vielleicht nicht erhalten geblieben ist. Analysen mit den rRNAs aus MG1655 ergaben allerdings vergleichbare Ergebnisse.

Parallel wurden im Labor ähnliche Analysen an der 23S rRNA aus MG1655 durchgeführt. Auch hier konnte kein nennenswerter Anteil der 23S rRNA des C-Operons nachgewiesen werden. Um zumindest das Vorkommen der 16S rRNA des *rrnC*-Operons in den Ribosomen nachzuweisen, wurde eine Primer-Extension-Analyse mit einem weiteren Primer durchgeführt. Dieser ergibt bei der Analyse eine Abbruchbande, die nur von der

rrnC-16S rRNA verursacht wird. Hierzu wurde Gesamt-RNA aus MG1655 eingesetzt, die bei logarithmischem Wachstum bei 37°C präpariert wurde. Die Abbildung 2.28 zeigt die erwarteten Transkripte, sowie die erhaltenen Primer-Extension-Produkte.

A)

16S-C2-Oligo:

<i>rrnA</i> + <i>B</i> + <i>D</i> + <i>E</i> + <i>G</i> + <i>H</i> 16S	5'GCAAGTTAAAAC TCAAATGAATTGACGGGGG 3'	dTTP wird für die PE durch ddTTP ersetzt
<i>rrnC</i> 16S	5'GCAAGTTAAAAC TCAAATGAATTGACGGGGG 3'	
	..900.....910.....920.....	
PE-Produkt-ABDEGH	3' ddTCCAATTTT GAGTTTACTTTAACAGCCCC ^{5'}	Länge 29 nt
PE-Produkt-C	3' ddTCAA TTTTGAGTTTACTTTAACAGCCCC ^{5'}	Länge 28 nt

B)

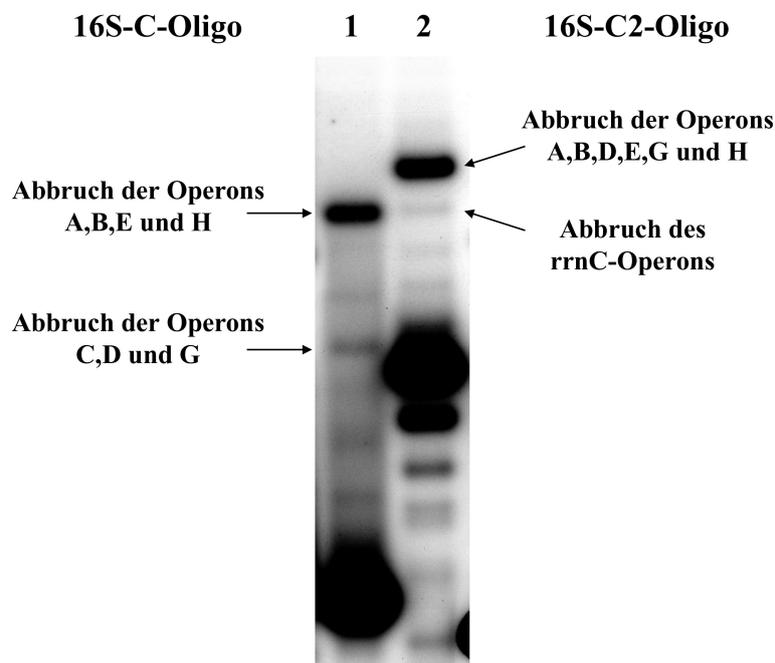


Abbildung 2.28: Die Abbildung A) zeigt die Sequenzen der 16S rRNAs und ihre Heterogenitäten in der Nähe der Hybridisierungsposition des 16S-C2-Oligos. Die in der Primer-Extension-Analyse erwarteten Transkripte sind ebenfalls dargestellt. Die Oligo-Sequenz ist kursiv hervorgehoben. Abbildung B) zeigt die Primer-Extension-Analyse mit den Primern 16S-C-Oligo (Spur 1) und 16S-C2-Oligo (Spur 2). Für diese Analysen wurde Gesamt-RNA aus MG1655 verwendet.

Der Primer 16S-C2-Oligo erzeugt Transkripte mit einer Länge von 28 nt für die 16S rRNA des C-Operons und ein Transkript einer Länge von 29 nt für die verbleibenden Operons. Doch auch die Analysen mit diesem Primer ergaben keine nennenswerten

Transkripte für die *rrnC*-16S rRNA.

Auch wenn das *rrnC*-Operon eindeutige Heterogenitäten im Vergleich zu den anderen Operons aufweist, konnte in den Analysen mit den Primern 16S-C-Oligo und 16S-C2-Oligo keine nennenswerten Anteile für die *rrnC*-16S rRNA gefunden werden. Auch unter Hitzeschock- und Kälteschock-Bedingungen konnte weder in den Gesamt-Ribosomen, noch in den Polysomen Anteile des *rrnC*-Operons nachgewiesen werden.

2.5 Konstruktion und Analyse von Vektoren mit verschiedenen 16S rRNAs

Bei den Analysen der Ribosomenpopulationen in den *E. coli*-Stämmen MC4100 und MG1655 (vgl. 2.2 und 2.3) zeigte die 16S rRNA des H-Operons den deutlichsten Unterschied zwischen dem Gesamt-Ribosomenpool und dem Polysomenpool. Dies deutet darauf hin, daß die *rrnH*-16S rRNA, z.B. unter Hitzeschockbedingungen, verstärkt bei der Translation genutzt wird, stärker als man aufgrund ihres Anteils an allen Ribosomen erwarten würde. Das *rrnC*-Operon hingegen scheint unter keinen der getesteten Bedingungen genutzt zu werden. Es läßt sich weder in den Gesamt-Ribosomen, noch in den Polysomen-Populationen in nennenswerten Anteilen nachweisen.

Um diese 16S rRNAs *in vivo* analysieren zu können, wurden die Sequenzen der 16S rRNA aus dem H- und C-Operon in einen Vektor kloniert, der das vollständige *rrnB*-Operon enthält. Dazu wurde der Vektor pKK3535 verwendet. Dieser enthält unter der Kontrolle des *rrnB*-Tandempromotors die entsprechenden Strukturgene für die verschiedenen rRNAs und tRNAs des *rrnB*-Operons, sowie die beiden Terminatoren.

Bei der Klonierung wurden Teile des *rrnB*-16S rRNA Strukturgens gegen die entsprechenden Sequenzen des *rrnC*, bzw *rrnH*-Operons ausgetauscht. Die so erzeugten Vektoren pKK16S-C und pKK16S-H entsprechen dem Vektor pKK3535, mit Ausnahme der 16S rRNA-Sequenzen, die die jeweiligen Heterogenitäten der *rrnC*- bzw *rrnH*-16S rRNA enthalten.

Zur *in vivo*-Analyse wurden diese in den Stamm TA554 transformiert. Dieser *E. coli*-Stamm wurde im Labor von C. Squires konstruiert [4] und enthält kein aktives, ribosomales Operon im Chromosom. Durch Disruption mit Antibiotika-Kassetten wurden die chromosomalen *rrn*-Operons inaktiviert, so daß der Stamm nur durch ein plasmidär vorliegendes Operon lebensfähig ist. Da das Wachstum von Bakterien stark an die Anzahl und Aktivität der Ribosomen gekoppelt ist, kann man in diesem System die Auswirkungen von Heterogenitäten anhand des Wachstums beobachten.

2.5.1 Konstruktion der Vektoren pKK16S-C und pKK16S-H

Es wurden die Vektoren pKK16S-C und pKK16S-H konstruiert. Als Ausgangsvektor dient das Plasmid pKK3535. Dieses enthält das vollständige *rrnB*-Operon aus *E. coli*. Dabei bleibt der Großteil des Vektors erhalten. Es wurden nur Teile des 16S rRNA-

Strukturgenen auf dem pKK3535 ausgetauscht, damit die 16S rRNA-Sequenz die Heterogenität des *rrnC*- bzw. *rrnH*-Operons erhält. Die Promotoren, Spacersequenzen, anderen rRNAs und das tRNA-Gen blieben in der ursprünglichen Sequenz des *rrnB*-Operons erhalten.

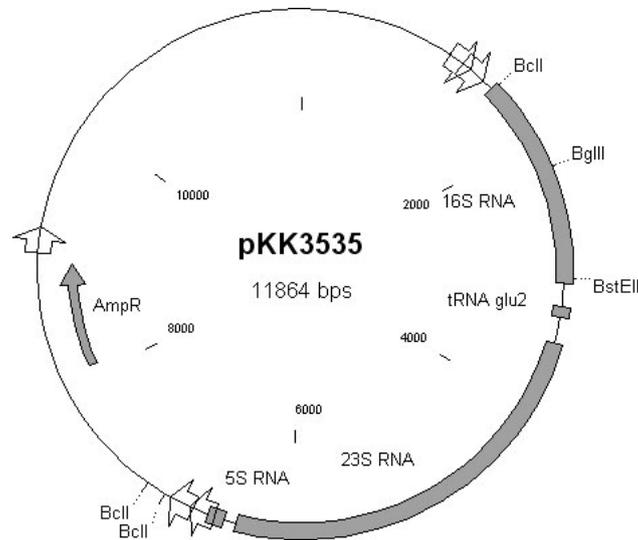


Abbildung 2.29: Die Abbildung zeigt die Plasmidkarte von pKK3535. Die zur Klonierung verwendeten Schnittpositionen der Enzyme sind markiert.

Hierzu wurden zuerst die ribosomalen Operons C und H über PCR amplifiziert (vgl. 5.3.5) und mittels Restriktion überprüft. Dabei wurde das *rrnC*-Operon über die Primer *rrnC*-5'-Oligo und *rrnC*-3'-Oligo amplifiziert. Das erhaltene Operon-Fragment umfaßt 6541 nt und reicht von Position -580 upstream des P1-Promotors bis Position +450 downstream der Terminatoren. Das *rrnH*-Operon wurde analog über die Primer *rrnH*-5'-Oligo und *rrnH*-3'-Oligo gewonnen. Das PCR-Produkt umfaßt die *rrnH*-Operon-Sequenz von Position -518 upstream des P1-Promotors bis +350 downstream der Terminatoren und besitzt eine Länge von 6474 nt.

Die so erhaltenen Operon-Fragmente wurden dann als Template für eine weitere PCR eingesetzt, in der die 16S rRNAs amplifiziert wurden. Durch die Primer 16S-5'-Oligo und 16S-3'-Oligo konnte aus den beiden Operon-Fragmenten die 16S rRNA Sequenz amplifiziert werden. Der Primer 16S-5'-Oligo bindet an Position -63 upstream des 16S rRNA-Strukturgenes und der Primer 16S-3'-Oligo +57 downstream des 16S rRNA-Strukturgenes. Dadurch erhält man ein PCR-Produkt der Länge 1669 nt, das die gesamte 16S rRNA-

Sequenz umfaßt.

Da die Heterogenitäten der 16S rRNA des C-Operon im 5'-Bereich der 16S rRNA liegen (vgl. 2.1.1), wurde auch nur dieser im pKK3535 ausgetauscht. Hierzu wurde die amplifizierte *rrnC*-16S RNA-Sequenz mit den Enzymen *Bcl*I und *Bgl*II restringiert und das erhaltene 5'-16S-rRNA-Fragment in den entsprechend geöffneten pKK3535-Vektor kloniert (vgl. 5.2.5.2).

Beim *rrnH*-Operon liegen die Heterogenitäten im 3'-Bereich der 16S rRNA (vgl. 2.1.1). Deshalb wurde der entsprechende Bereich aus der amplifizierten *rrnH*-16S RNA-Sequenz mit den Enzymen *Bgl*II und *Bst*EI herausgeschnitten und in den entsprechend geöffneten pKK3535-Vektor kloniert. Nach Ligation wurden die Produkte in den *E. coli*-Stamm HB101 (vgl. 5.1.6) transformiert und erhaltene Klone durch Restriktion identifiziert. Die isolierten Plasmide pKK16S-C und pKK16S-H wurden dann zur weiteren Verwendung in den Stamm TA554 transformiert.

2.5.2 Transformation der pKK-Vektoren in TA554

Der Stamm TA554 enthält kein aktives *rrn*-Operon auf dem Chromosom. Zum Überleben benötigt er zwei Plasmide: pSt1-Km mit einem ribosomalen Operon und das Plasmid pTRNA mit den tRNA-Sequenzen der inaktivierten, chromosomalen Operons. Auf dem Plasmid pSt1-Km ist das *rrnC*-Operon aus *S. typhimurium* codiert, sowie eine Kanamycinresistenz zur Selektion. Für die nachfolgenden Analysen wurde das pSt1-Km-Plasmid durch jeweils eines der pKK-Plasmide ausgetauscht. Dazu wurden die pKK-Plasmide in den Stamm TA554 transformiert und danach über mehrere Generationen in Gegenwart von Ampicilin angezogen. Da die pKK-Stämme eine Ampicilinresistenz vermitteln, blieben diese durch den Selektionsdruck erhalten, während das pSt1-Km-Plasmid verloren ging (s. 5.1.7). Durch Replikaplatierung auf Ampicilin und Kanamycin-Platten konnten die Zellen identifiziert werden, die nur noch das entsprechende pKK-Plasmid enthielten.

2.5.3 Bestimmung der relativen Plasmidkopienzahl der pKK-Vektoren in TA554

Um in den nachfolgenden Untersuchungen Effekte aufgrund unterschiedlicher Plasmidmengen in den verschiedenen TA554/pKK-Stämmen auszuschließen, wurde die relative Plasmidkopienzahl der drei Stämme bestimmt (vgl. 5.3.1). Hierzu wurden die Stämme bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 angezogen und drei OD-Zellen mit der gleichen Menge an

	pKK3535	pKK16S-C	pKK16S-H
Intensität der pKK-Bande	93,84	99,78	95,64
Intensität der pUC-18-Bande	101,47	104,76	111,91
Verhältnis der Bandenintensitäten	0,925	0,952	0,855
relatives Plasmidkopienzahlverhältnis	1,08	1,11	1,00

Tabelle 2.11: Die Tabelle zeigt die Quantifizierungsergebnisse der Plasmidkopienzahlbestimmung der verschiedenen pKK-Klone. Dabei wurde die Plasmidkopienzahl von pKK16-H auf 1 gesetzt und die anderen relativ dazu bestimmt.

Zellen gemischt, die das Plasmid pUC-18 enthielten. Danach wurden aus diesem Zellgemisch die Plasmide präpariert und mit *XhoI* verdaut. Das Enzym ist sowohl in den pKK-Plasmiden als auch im pUC-18 ein "single-cutter", so daß die Plasmide linearisiert werden. Nach Auftrennung auf einem Agarosegel (s. Abbildung 2.30), wurde die Intensität der beiden Banden quantifiziert und das Verhältnis gebildet. Durch den Vergleich dieser Verhältnisse zwischen den verschiedenen TA554/pKK-Stämmen konnten die relativen Plasmidkopienzahlen bestimmt werden. Die erhaltenen Werte sind in Tabelle 2.11 zusammengefaßt.

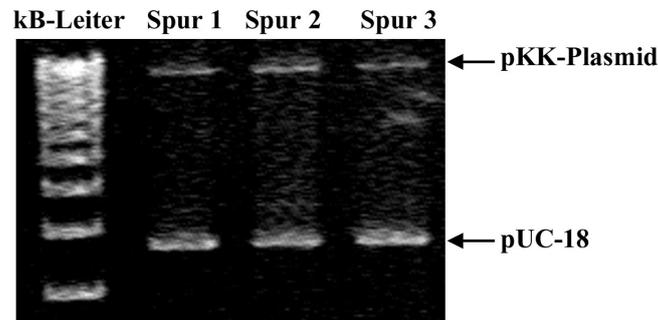


Abbildung 2.30: Das Agarosegel zeigt die Auftrennung der pKK-Plasmide aus den TA554-Stämmen nach Vermischen mit dem pUC-18-Plasmiden. Die Plasmide wurden mit *XhoI* linearisiert. Spur 1 zeigt das Plasmidgemisch mit pKK3535, Spur 2 mit pKK16S-C und Spur 3 mit pKK16S-H. Die quantifizierten Intensitäten der Banden, sowie die Verhältnisse sind in Tabelle 2.11 angegeben.

Die Plasmidkopienzahl der pKK-Klone unterschieden sich nur geringfügig. Somit sollte es keinen Einfluß auf das Wachstum der Stämme durch diese geringen Unterschiede geben. Zusätzlich kann davon ausgegangen werden, daß die Plasmidkopienzahl derart hoch

ist, daß die Anzahl der Ribosomen durch die zellulären Kontrollmechanismen limitiert wird und nicht durch die Verfügbarkeit von Kopien eines *rrn*-Operon.

2.5.4 Analyse der Polysomenprofile der pKK-Vektoren in TA554

In den TA554-Stämmen stammen alle Ribosomen vom gleichen, ribosomalen Operon, so daß Unterschiede zwischen zwei dieser Stämme in der Bildung von Polysomen direkt auf die Variationen zwischen den enthaltenen Operons zurückgeführt werden können. Zu diesem Zwecke wurden aus den Stämmen TA554/pKK3535, TA554/pKK16S-C, TA554/pKK16S-H, TA554 und MG1655 Polysomen präpariert und die erhaltenen Elutionsprofile verglichen. Die Polysomen wurden bei logarithmischem Wachstum nach Aufzucht bei 37°C präpariert. Die Elutionsprofile sind in Abbildung 2.31 dargestellt.

Die verschiedenen TA554-Stämme zeigen keine Unterschiede in ihrer Fähigkeit, Polysomen zu bilden. Selbst der Stamm TA554, der ein ribosomales Operon aus *S. typhimurium* enthält, zeigt kein auffälliges Profil. Im Stamm MG1655 ist der Anteil der Polysomen in Verhältnis zu den 70S-Ribosomen deutlich höher, als in den TA554-Stämmen. Dies kommt eher durch das schnellere Wachstum des WT-Stammes zustande, als durch eine verminderte Fähigkeit der TA554-Stämme Polysomen, zu bilden.

2.5.5 Primer-Extension-Analysen der Ribosomen aus den TA554/pKK-Stämmen

Die erhaltenen TA554-Stämme sollten nur jeweils das plasmidär enthaltene *rrn*-Operon exprimieren. Um dies zu überprüfen, wurde Gesamt-RNA aus den Stämmen präpariert (vgl. 5.2.6.5) und über Primer-Extension-Reaktionen analysiert. Hierzu wurden die Primer aus den vorherigen Analysen verwendet (vgl. Abbildung 2.6). Da jeweils nur ein Operon enthalten ist, sollten die Analysen nur jeweils eine der Abbruchbanden liefern. Abbildung 2.32 zeigt die Primer-Extension-Analysen mit den RNAs aus den TA554-Stämmen. Als Kontrolle wurden zusätzlich die Analysen mit RNA aus MG1655 durchgeführt.

Bei Analysen mit den 16S-C-Oligo erhält man bei RNAs aus MG1655 die erwartete Abbruchbande bei 28 nt für die 16S rRNA der Operons A, B, E, H, als auch die Abbruchbande bei 25 nt für die Operons C, D, G (vgl. 2.32, A), 1). Erwartungsgemäß findet sich bei den Analysen in TA554/pKK3535 und TA554/pKK16S-H nur die 28 nt Abbruchbande (vgl. 2.32, B) und D), 1). Im Stamm TA554/pKK16S-C hingegen ist nur

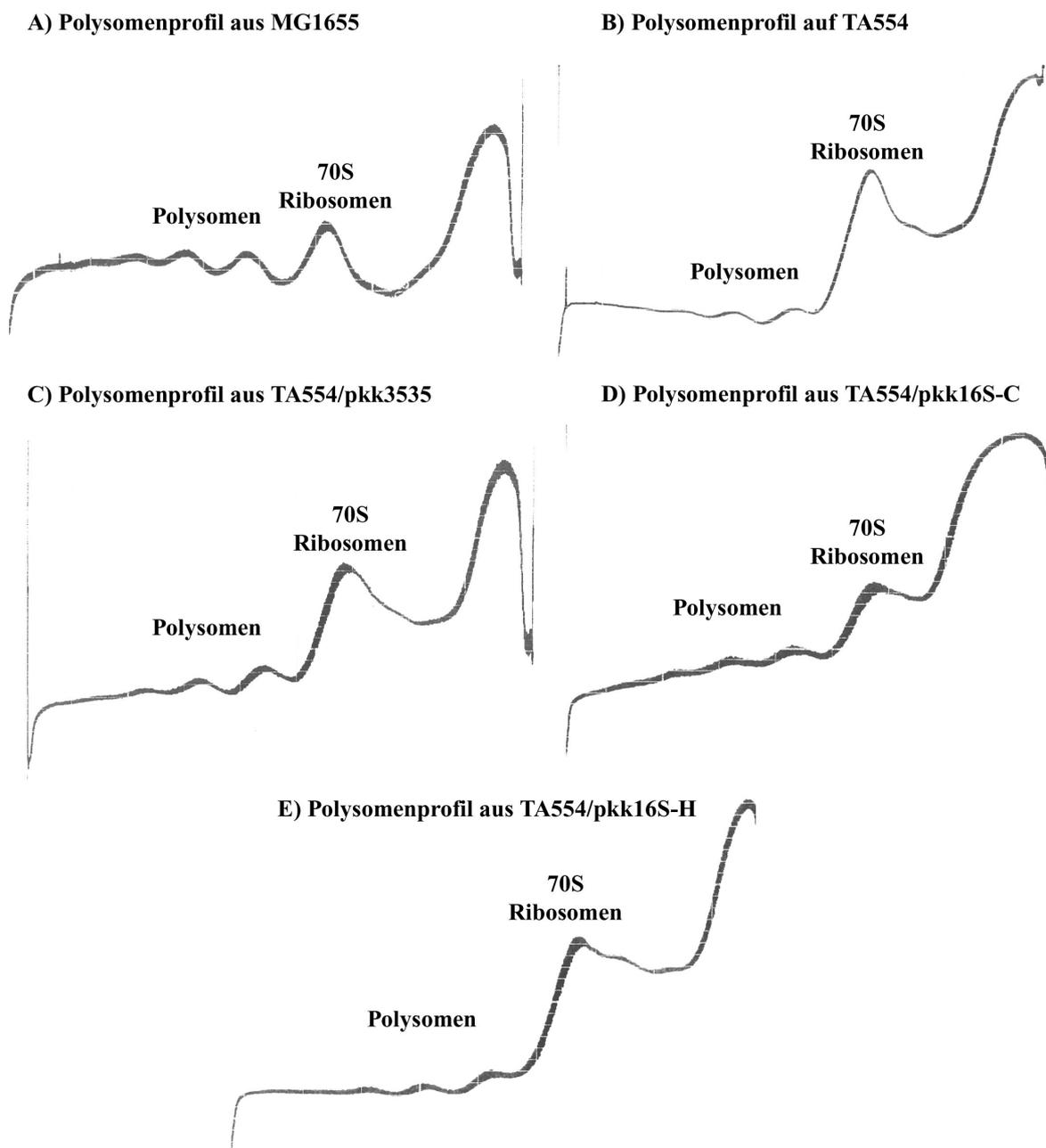


Abbildung 2.31: Dargestellt sind die Elutionsprofile der Polysomenisolation aus den verschiedenen TA554-Stämmen. Zum Vergleich wurden auch Polysomen aus MG1655 präpariert. Die Stämme wurden bei 37°C angezogen und die Polysomen in der logarithmischen Phase isoliert.

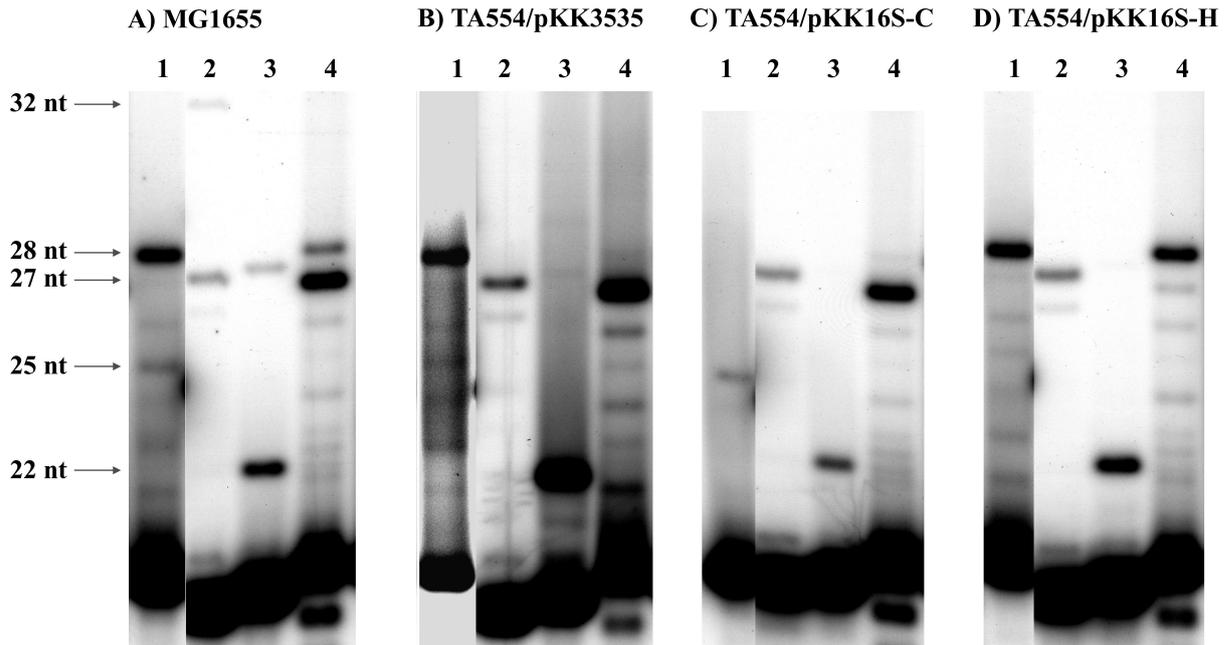


Abbildung 2.32: Die Abbildung zeigt Primer-Extension-Analysen mit MG1655 und den verschiedenen TA554-Stämmen. Die Spuren 1 zeigen die PE-Analysen mit dem 16S-C-Oligo, die Spuren 2 mit dem 16S-D-Oligo, die Spuren 3 mit dem 16S-G-Oligo und die Spuren 4 mit dem 16S-H-Oligo.

die 25 nt-Bande vorhanden (vgl. 2.32, C), 1).

Analysen mit dem 16S-D-Oligo ergeben im MG1655 ein 27 nt langes Transkript der Operons A, B, C, E, H und ein 32 nt langes Transkript der Operons D und G (vgl. 2.32, A), 2). In den TA554-Stämmen ist kein exprimiertes D oder G Operon vorhanden, so daß hier nur die 27 nt langen Abbruchbanden zu finden sind (vgl. 2.32, B) bis D), 2).

Auch bei Analysen mit dem Primer 16S-G-Oligo zeigen sich die beiden erwarteten Transkripte, ein 22 nt langes Transkript für die Operons A, B, C, D, E, H und ein 27 nt langes für das *rrnG*-Operon. Das 27 nt lange Transkript ist nur in den Analysen der MG1655-RNA zu finden (vgl. 2.32, A), 3). In den TA554-Stämmen zeigt sich nur die 22 nt lange Abbruchbande, da keiner ein aktives *rrnG*-Operon enthält (vgl. 2.32, B) bis D), 3).

Analysen mit dem 16S-H-Oligo zeigen in der MG1655-RNA die zwei bekannten Abbruchbanden, ein 28 nt langes Transkript für die *rrnH*-16S rRNA und ein 27 nt langes Transkript für die anderen Operons (vgl. 2.32, A), 4). In den TA554/pKK3535 und TA554/pKK16S-C erhält man nur das 27 nt lange Transkript (vgl. 2.32, B) und C), 4),

während man im Stamm TA554/pKK16S-H nur das 28 nt lange Transkript erhält (vgl. 2.32, D), 4).

Die Analysen zeigen, daß die RNAs aus den TA554-Stämme nur die Trankriptbanden ergaben, die man aufgrund des enthaltenen *rrn*-Operons erwarten würde. Dies zeigt, daß die chromosomal enthaltenen *rrn*-Operons tatsächlich keine funktionellen rRNAs mehr liefern und daß nach dem Heilen der Stämme vom Plasmid pSt1-Km auch nur noch das pKK-kodierte Operon exprimiert wird.

2.5.6 Wachstumsanalysen der pKK-Vektoren in TA554

Das Wachstum von Bakterien ist stark an die Protein-Biosynthese gekoppelt. Dadurch sollten Variationen des Biosyntheseapparates, in diesem Fall der Ribosomen, direkten Einfluß auf das Wachstumsverhalten zeigen.

Hierzu wurden die TA554/pKK-Stämme angezogen und ihr Wachstum unter verschiedenen Einflüssen verfolgt. Da die Stämme sich nur in den Heterogenitäten der plasmidkodierten 16S rRNA unterscheiden und dies die einzig verfügbare 16S rRNA-Sequenz für die Zelle ist, können Unterschiede im Wachstum direkt auf die Variationen in der 16S rRNA-Sequenz zurückgeführt werden. Im folgenden sind die Wachstumskurven und -raten der Stämme TA554/pKK3535, TA554/pKK16S-C, TA554/pKK16S-H und TA554 dargestellt. Dabei wurden Wachstumskurven ohne Streß, unter Hitzeschock, Kälteschock, Osmoschock und Nährstoff-“upshift” aufgenommen. Der Streß wurde jeweils bei logarithmischem Wachstum ausgelöst, da sich Wachstums- oder Anpassungsunterschiede hier deutlicher zeigen als in anderen Wachstumsphasen.

2.5.6.1 Wachstumskurven der TA554-Stämme bei 37°C

Zunächst wurde das Wachstum bei optimalen Bedingungen beobachtet. Hierzu wurden die TA554-Stämme bei 37°C angezogen und alle 30 Minuten die Optische Dichte der Zellkulturen bei 600 nm gemessen. Es wurden mehrfach Wachstumskurven aufgenommen, allerdings unterschied sich deren Verlauf nicht, so daß in Abbildung 2.33 nur jeweils eine Wachstumskurve exemplarisch dargestellt wurde.

Das Wachstum der TA554/pKK-Stämme ist nahezu identisch. Nur der TA554 mit dem pSt1-Km-Plasmid zeigt ein langsames Wachstum. Die Heterogenitäten in den 16S rRNAs der pKK-Plasmide verursachen keinen Unterschied im normalen Wachstum der Zellkulturen.

2.5.6.2 Wachstumskurven der TA554-Stämme unter Hitzeschock

Die TA554-Stämme wurden hierzu bei 30°C angezogen und bei einer OD_{600} von 0,5 auf 42°C umgesetzt. Das Wachstum der Kulturen wurde durch Messung der OD_{600} verfolgt.

In Abbildung 2.34 sind die Wachstumskurven der TA554-Stämme vor und nach Hitzeschock dargestellt. Nach Hitzeschock kommt es bei allen Stämmen zu einem drastischen Einbruch der Optischen Dichte, was nur durch Absterben von Zellen erklärt werden kann. Auch bei mehrfacher Wiederholung des Experimentes kam es zu diesem Einbruch

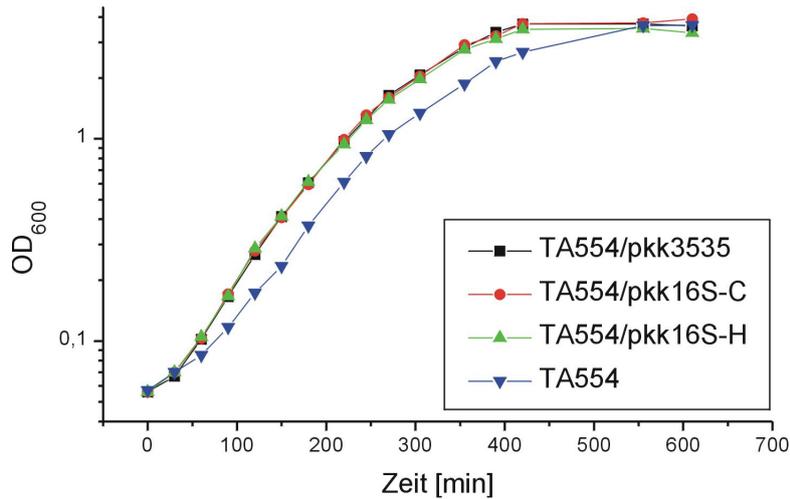


Abbildung 2.33: Die Abbildung zeigt die Wachstumskurven der TAA554-Stämme bei 37°C. Gemessen wurde die optische Dichte der Zellkulturen bei 600 nm.

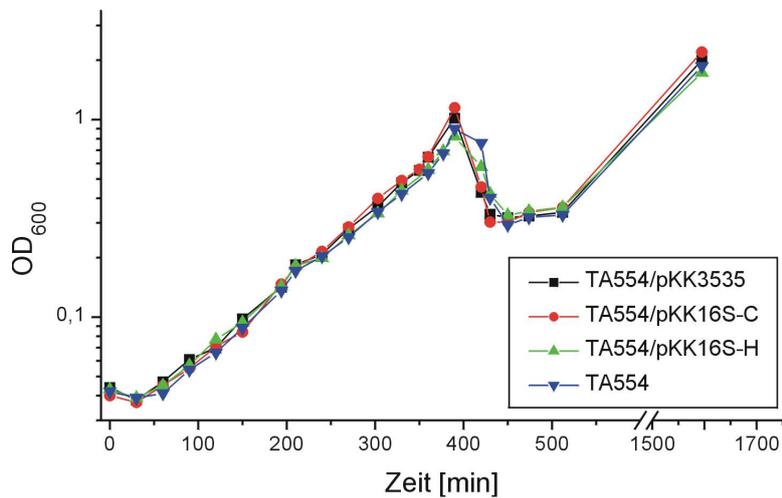


Abbildung 2.34: Die Abbildung zeigt die Wachstumskurven der TAA554-Stämme bei Hitzeschock. Vor dem Auslösen des Hitzeschocks wurden die Zellen bei 30°C angezogen und bei einer OD_{600} auf 42° umgesetzt.

im Zellwachstum. Da dies bei anderen Streißformen nicht zu beobachten ist, bedeutet dies, daß die TA554-Stämme nicht in der Lage sind, auf Hitzeschock zu reagieren oder, was wahrscheinlicher ist, daß der Stamm einen Phagen enthält, der durch den Hitzeschock aktiviert wird. Deshalb konnten keine verlässlichen Aussagen zum Wachstum der TA554-Stämme unter Hitzeschock getroffen werden.

2.5.6.3 Wachstumskurven der TA554-Stämme unter Kälteschock

Bei den Wachstumsanalysen unter Kälteschockbedingungen wurden die Kulturen bei 37°C angezogen und bei einer OD_{600} von 0,5 auf 15-16°C umgesetzt. Nach dem Umsetzen zeigen die Zellen kein weiteres Wachstum. Nach zwei bis drei Stunden beginnen die Kulturen wieder zu Wachsen, aber mit einer deutlich verringerten Rate (vgl. 2.35).

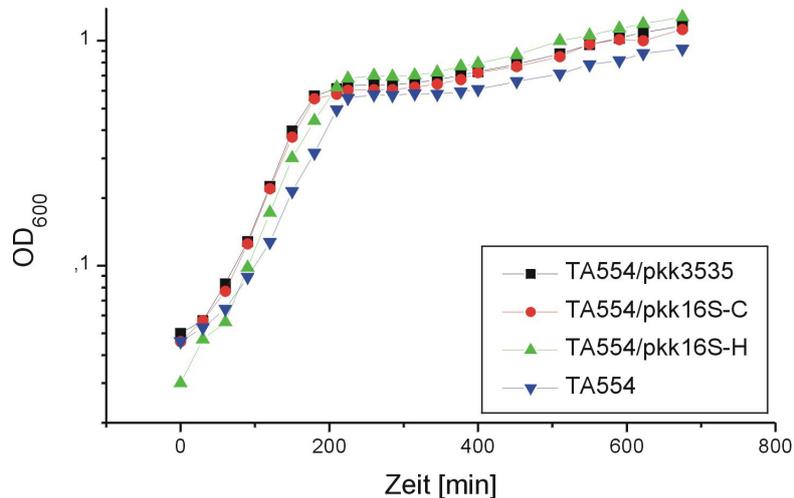


Abbildung 2.35: Die Abbildung zeigt die Wachstumskurven der TAA554-Stämme bei Kälteschock. Die Kulturen wurden bei 37°C angezogen bis zu einer OD_{600} von 0,5. Danach wurden die Kulturen bei 15-16° inkubiert.

Allerdings zeigen die einzelnen TA554/pKK-Stämme keinen Unterschied im Wachstum. Die Kurven haben alle einen ähnlichen Verlauf. Einzig der TA554 zeigt wieder ein langsamerer Wachstum, sowohl vor als auch nach dem Kälteschock.

2.5.6.4 Wachstumskurven der TA554-Stämme unter Osmoschock

Zellkulturen der TA554-Stämme wurden hierzu bei 37°C angezogen und bei einer OD_{600} von 0,5 mit konzentrierter Saccharoselösung versetzt, um die Osmolarität des Mediums sprunghaft zu erhöhen. Das Wachstum der Kulturen wurde über die Optische Dichte vor und nach der Saccharose-Zugabe verfolgt.

In Abbildung 2.36 sind die erhaltenen Wachstumskurven dargestellt. Durch die Verdünnung der Zellkultur bei der Saccharosezugabe, kommt es in den Kulturen zu einem Absinken der Optischen Dichte, was nicht, wie bei den Hitzeschockanalysen, auf ein Absterben der Zellen zurückzuführen ist. Nach dem Schock kommt es zu einem langsameren Wachs-

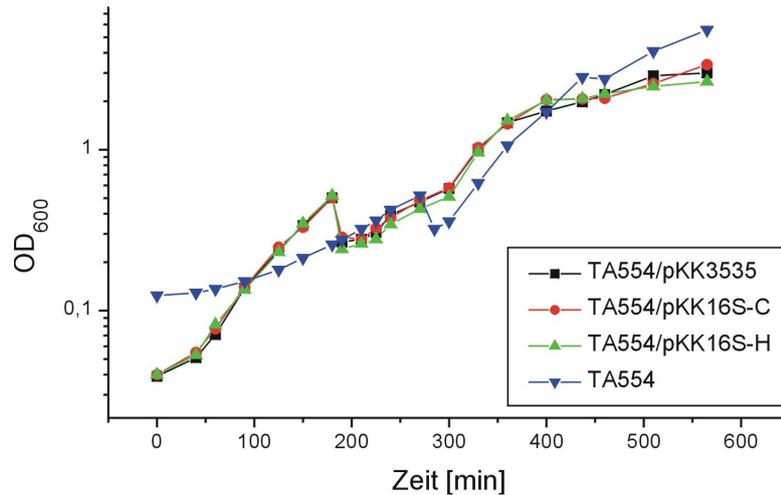


Abbildung 2.36: Die Abbildung zeigt die Wachstumskurven der TAA554-Stämme unter osmotischen Streß. Die Kulturen wurden bis zu einer OD_{600} von 0,5 angezogen und dann mit konzentrierter Saccharose-Lösung versetzt.

tum in den TA554/pKK-Stämmen, das nach ca. zwei Stunden nochmal eine höhere Rate erreicht. Zwischen den verschiedenen TA554/pKK-Stämmen zeigen sich auch bei osmotischen Streß keine Unterschiede in den Wachstumskurven. Im TA554-Stamm hingegen ist das Wachstum vor Streß wieder langsamer als in den TA554/pKK-Stämmen, erreicht aber schnell nach dem osmotischen Schock eine höhere Wachstumsrate als zuvor.

2.5.6.5 Wachstumskurven der TA554-Stämme unter 'upshift'-Bedingungen

Die TA554-Stämme wurden hierzu in M9-Medium mit 0,2% Glukose angezogen und bei einer OD_{600} von ca. 0,11 mit zehnfach konzentriertem YT-Vollmedium versetzt. Der Wachstumsverlauf wurde wieder anhand der Optischen Dichte verfolgt und ist in Abbildung 2.37 dargestellt.

Die Zellkulturen zeigen kaum Wachstum bis zur Zugabe des Vollmediums. Danach kommt es schnell zu logarithmischem Wachstum der verschiedenen Stämme. Dabei zeigen die TA554/pKK-Stämme keine Unterschiede, während der TA554-Stamm eine längere Phase zur Adaption benötigt, als auch eine geringere Wachstumsrate erreicht.

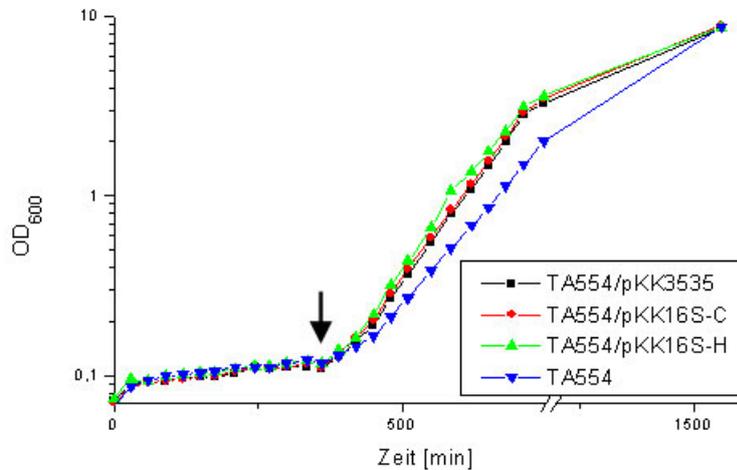


Abbildung 2.37: Die Abbildung zeigt die Wachstumskurven der TAA554-Stämme beim “up-shift”. Die Kulturen wurden bei 37°C bis zu einer OD_{600} von ca. 0,11 in M9-Medium angezogen und dann mit konzentrierten Vollmedium versetzt. Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Mediumszugabe.

2.5.6.6 Wachstumsraten der TA554-Stämme bei verschiedenen physikalischen Streßeinwirkungen

Zur Zusammenfassung der verschiedenen Wachstumsanalysen sind in Tabelle 2.12 die verschiedenen Wachstumsraten vor und nach Streßauslösung aufgelistet.

Die Wachstumsraten bestätigen den Eindruck, der schon durch die Wachstumskurven gewonnen wurde. Zwischen den TA554/pKK-Stämmen zeigen sich keine deutlichen Unterschiede, weder im Verlauf der Kurven noch in den resultierenden Raten. Auffällig ist einzig der Stamm TA554, der immer geringere Wachstumsraten zeigt. Nur nach osmotischen Schock zeigt er eine deutlich höhere Wachstumsrate als die TA554/pKK-Stämme.

Die Unterschiede in den 16S rRNA-Sequenzen der pKK-Plasmide führen zu keinem sichtbaren Unterschied im Wachstum der Zellen. Auch unter verschiedenen Streßbedingungen zeigen sich keine Unterschiede im Wachstumsverlauf. Dies kann bedeuten, daß die Heterogenitäten einen zu geringen Einfluß haben, oder dieser sich in der Messung von Wachstumskurven nicht nachweisen läßt. Da sich hier kurzzeitig auftretende Unterschiede in Wachstumskurven nicht nachweisen lassen, können zeitweilige Vorteile oder

		TA554/ pKK3535	TA554/ pKK16S-C	TA554/ pKK16S-H	TA554
Wachstum bei 37°C		1,01	1,07	0,99	1,11
Kälteschock	vor	1,45	1,43	1,46	1,24
	nach	0,12	0,15	0,13	0,04
Osmotischer Schock	vor	1,24	1,21	1,30	0,59
	nach	0,68	0,66	0,68	1,28
Upshift		0,92	0,92	0,96	0,72

Tabelle 2.12: Die Tabelle zeigt die Wachstumsraten der verschiedenen TA554-Stämme aus den vorherigen Wachstumsanalysen. Dabei sind die Wachstumsraten jeweils vor und nach Streßwirkung angegeben. Die Rate gibt die Zahl der Verdopplungen pro Stunde wieder.

Nachteile einer 16S rRNA durchaus in diesen Analysen nicht meßbar sein.

Es ist auch denkbar, daß die TA554-Stämme aufgrund ihrer Konstruktion schon ein derart verlangsamtes Wachstum zeigen, daß die Unterschiede durch die pKK-Plasmide keine weiteren Effekte zeigen.

3 Diskussion

3.1 Die differentielle Nutzung von Ribosomen mit rRNAs unterschiedlicher Herkunft

In *E. coli* existieren sieben ribosomale Operons, die einen einheitlichen Aufbau aufweisen [27]. Sie codieren für die drei ribosomalen RNAs, 16S, 23S und 5S rRNA, die in einem einzigen Transkript gemeinsam exprimiert werden. In den Spacer-Regionen zwischen den rRNAs, sowie in der Region zwischen 5S rRNA und den Terminatoren, sind - operonspezifisch - zusätzliche tRNA-Strukturgene kodiert. Das *rrnC*-Operon enthält in seinem 3'-terminalen Bereich die ^{trp}tRNA. Dies ist die einzige Kopie dieser tRNA auf dem Chromosom und die einzige essentielle tRNA innerhalb der *rrn*-Operons. Im *rrnD*-Operon findet sich in diesem Bereich eine weitere 5S rRNA Sequenz.

Schon während der Transkription werden die verschiedenen RNAs durch komplexe Prozessierungsschritte herausgeschnitten und alle Spacer-Regionen entfernt. Obwohl die verschiedenen rRNAs der einzelnen Operons eine hohe Homologie aufweisen, finden sich dort Heterogenitäten, die im Laufe der Evolution konserviert wurden [46]. Solche Sequenzunterschiede können zu unterschiedlichen Sekundär- oder Tertiärstrukturen führen. Dies deutet auf einen funktionellen Unterschied zwischen den verschiedenen Varianten einer rRNA hin. Diese Hypothese wird dadurch gestützt, daß eine differentielle Regulation der sieben ribosomalen Operons nachgewiesen werden konnte [47][75].

Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit eine unterschiedliche Funktionalität der verschiedenen rRNA-Varianten, im speziellen der 16S rRNAs, untersucht werden. Hierzu wurden hauptsächlich Primer-Extension-Analysen verwendet, die eine quantitative Betrachtung der verschiedenen 16S rRNAs ermöglichte.

3.2 Analysen verschiedener Ribosomenpools vor und nach Streß-Induktion

Um funktionelle Unterschiede zwischen den verschiedenen 16S rRNAs aufzuzeigen, wurden mittels Primer-Extension-Analysen die Anteile der verschiedenen 16S rRNAs an deren Gesamtmenge bestimmt. Dabei wurde die Veränderung dieser Anteile nach Auslösen von Hitze- bzw. Kälteschock analysiert (vgl. 2.2.1 bis 2.3.2).

In diesen Analysen wurden zwei Gruppen von ribosomalen RNAs unterschieden: zum einen der Gesamt-Ribosomenpool, der ohne Selektion sämtliche RNAs der Zelle enthält, und zum anderen der Polysomenpool, der nur rRNAs aus Polysomen enthält, und so die Anteile der verschiedenen 16S rRNAs in den translationsaktiven Ribosomen wieder spiegelt. Damit erhält man ein Bild von der Expression einer bestimmten 16S rRNA, sowie von ihrer Häufigkeit in den translatierenden Ribosomen. Dies erlaubt einerseits die Analyse von regulatorischen Prozessen, die sich in der Veränderung des Anteils einer bestimmten 16S rRNA im Gesamt-Ribosomenpool widerspiegeln. Andererseits erlaubt die Untersuchung der Anteile in den Polysomen, funktionelle Unterschiede zwischen den verschiedenen 16S rRNAs aufzuzeigen. Solche Effekte erkennt man an abweichenden Anteilen einer bestimmten 16S rRNA in den beiden Ribosomenpools. Beim Einfluß von Streß auf den Ribosomenpool kann so zwischen den adaptiven Reaktionen der Zelle und der Vermittlung einer höheren Fitness durch eine 16S rRNA unterschieden werden.

Dabei konnten die 16S rRNAs der ribosomalen Operons D, G und H unterschieden werden. Der Anteil des *rrnC*-Operons konnte nicht bestimmt werden, was in 3.2.3 diskutiert wird. Die verbleibenden Operons enthalten keine Sequenzunterschiede in der 16S rRNA und sind somit in den Analysen nicht unterscheidbar. Aufgrund fehlender Heterogenitäten ist allerdings kein funktioneller Unterschied in diesen Operons zu erwarten, da die 16S rRNAs identische Strukturen einnehmen sollten.

3.2.1 Der Einfluß von Hitzeschock auf die Ribosomenpools

Die Untersuchungen unter Einfluß von Hitzeschock wurden in zwei *E. coli*-K12-Stämmen durchgeführt. Dabei wurde der Stamm MC4100 verwendet, vom dem eine Vielzahl an Expressionsdaten über die sieben ribosomalen Operons vorliegen [47]. Außerdem wurde der Stamm MG1655 verwendet, dessen komplette Genomsequenz bekannt ist [11]. Hieraus ergibt sich die Problematik, daß die Heterogenitäten im MC4100 nicht sequenziert wur-

den. Diese könnten also potentiell andere Positionen umfassen oder anders verteilt sein als im MG1655. Eine starke Abweichung ist aufgrund der phylogenetischen Nähe nicht zu erwarten, aber nicht auszuschließen. Deshalb wurde für die späteren Analysen nur noch auf den MG1655 zurückgegriffen. Die erhaltenen Primer-Extension-Produkte aus beiden Stämmen zeigten keine Längenunterschiede (vgl. 2.2.1 und 2.3.1.2). Es kann davon ausgegangen werden, daß die untersuchten Heterogenitäten in beiden Stämmen gleichermaßen vorliegen.

Unter Einfluß von Hitzeschock konnten eine Reihe von Veränderungen in den Ribosomenpools gemessen werden:

3.2.1.1 Effekte des Hitzeschocks auf den *rrnD*-16S rRNA-Anteil

Der Anteil der *rrnD*-16S rRNA sank nach Auslösen des Hitzeschocks deutlich und blieb ab ca. 15 min nach Hitzeschock auf einem gleichbleibenden, niedrigeren Niveau (vgl. 2.2.3.3 und 2.3.1.5) Dieser Effekt war sowohl im Gesamt-Ribosomenpool als auch im Polysomenpool zu beobachten. Hierbei zeigten sich keine deutlichen Unterschiede zwischen den beiden Ribosomenpools. Dies zeigt, daß die *rrnD*-16S rRNA durch ihre Heterogenitäten in ihrer Funktion unter Hitzeschock nicht beeinträchtigt ist, da sich ihr Anteil in den Polysomen sonst anders verhalten sollte, als in den Gesamt-Ribosomen.

Das Absinken der *rrnD*-16S rRNA läßt sich sowohl durch strukturelle als auch adaptive Effekte erklären. Auch wenn sich zwischen den beiden Ribosomenpools keine Unterschiede zeigen ließen, kann die Struktur der *rrnD*-16S rRNA unter Hitzeschock instabiler sein als die anderer 16S rRNAs. Dies würde bedeuten, daß es in einem Teil der *rrnD*-16S rRNA-Moleküle bei Temperaturanstieg zu einer strukturellen Veränderung kommt, die so dramatisch ist, daß die umgefaltete 16S rRNA abgebaut wird. Dies würde den starken Abfall des *rrnD*-16S rRNA-Anteils zu Beginn des Hitzeschocks im Gesamt-Ribosomenpool und somit auch in den Polysomen erklären. Der verbleibende Anteil der *rrnD*-16S rRNA durchläuft diese Strukturänderung nicht und ist weiterhin translationsaktiv.

Es ist denkbar, daß die fehlerhafte Struktur bei der erhöhten Temperatur auch von einem Teil der neu synthetisierten *rrnD*-16S rRNAs eingenommen wird. In diesem Fall würde ein strukturelles Gleichgewicht zwischen der korrekten und fehlerhaften Struktur vorliegen. So würde der Anteil der *rrnD*-16S rRNA - auch ohne eine Regulation der Expression - vermindert sein und könnte sein altes Niveau nicht wieder erreichen. Ähnli-

che Temperaturabhängigkeiten sind für die Leader-Region der 16S rRNA gezeigt worden [9]. Auch hier wird eine falsche Struktur durch eine Temperaturveränderung begünstigt, ohne daß sämtliche Transkriptionsprodukte davon betroffen sind.

Nach Auslösen von Hitzestreß kommt es in *E. coli* innerhalb von 30 Minuten zur Adaption der Zelle. Dabei wird die Expression einer Vielzahl von Operons reguliert. Auch eine solche Regulation am *rrnD*-Operon ist denkbar, bei der die Transkription verringert wird. Es ist zwar kein Protein bekannt, daß speziell am *rrnD*-Operon reguliert, allerdings könnte die differentielle Regulation durch die bekannten Proteine bei hohen Temperaturen einen entsprechenden Effekt zeigen. Dabei muß nicht zwangsweise das *rrnD*-Operon reprimiert werden. Eine Aktivierung anderer *rrn*-Operons würde ebenfalls zu einem verringerten Anteil der *rrnD*-16S rRNA führen.

Es ist naheliegend, daß beide Mechanismen hier zusammenspielen: Nach Auslösen des Hitzeschocks verändert sich die Struktur eines Teils der *rrnD*-16S rRNA-Moleküle und wird abgebaut. Eine solche Strukturänderung kann, muß sich aber nicht bei den neusynthetisierten *rrnD*-16S rRNAs wiederfinden. Es ist denkbar, daß sie allein durch den initialen Temperatursprung verursacht wird. Dies erklärt das schnelle Absinken des *rrnD*-16S rRNA-Anteils nach Hitzeschock. Eine Verminderung der Syntheserate sollte sich nicht so unmittelbar auswirken, da die vorhandenen 16S rRNAs in ihrer korrekten Faltung eine lange Halbwertszeit aufweisen. Da die Operons differentiell reguliert werden, ist es wahrscheinlich, daß im weiteren Verlauf des Hitzestresses die Syntheserate des *rrnD*-Operons reduziert wird, bzw. die Rate geeigneter *rrn*-Operons erhöht wird, so daß sich der *rrnD*-16S rRNA Anteil auf einem konstanten Niveau einpendelt.

Zwischen den beiden Stämmen MC4100 und MG1655 zeigen sich keine signifikanten Unterschiede im Kurvenverlauf des *rrnD*-16S rRNA-Anteils. Einzige Ausnahme hierzu bildet der 20 Minuten Wert im MC4100, der eine plötzliche Erhöhung des *rrnD*-16S rRNA-Anteils zeigt (vgl. 2.2.3.3). Bei den Primer-Extension-Analysen konnte der Anteil des *rrnD*-Operons nur indirekt bestimmt werden, d.h. die aus der Primer-Extension erhaltenen Werte mußten mit den Anteilen des *rrnG*-Operons verrechnet werden. Dies führt in diesem Fall dazu, daß ein extrem niedriger Wert der *rrnG*-16S rRNA bei 20 Minuten nach Hitzeschock (s. 2.2.3.1) zu einem erhöhten Wert im *rrnD*-16S rRNA-Anteil führt. Da sich dieser extrem niedrige Wert für das *rrnG*-Operon in den weiteren Analysen nicht bestätigen ließ (s. 2.3.1.3) und die primären *rrnD*-Analysen immer ähnliche Kurven lieferten, ist davon auszugehen, daß es sich hierbei um einen Ausreißer handelt.

3.2.1.2 Effekte des Hitzeschocks auf den *rrnG*-16S rRNA-Anteil

Mit Ausnahme des beschriebenen Ausreißers nach 20 Minuten Hitzeschock im MC4100 zeigten die Anteile der *rrnG*-16S rRNA kaum Veränderungen im Gesamt-Ribosomenpool (vgl. 2.2.3.1 und 2.3.1.3). In den Polysomen von MG1655 kam es zu einem geringfügigen Anstieg nach Auslösen des Hitzeschocks, allerdings fiel der *rrnG*-16S rRNA-Anteil schnell wieder auf sein altes Niveau zurück. Dieser Anstieg war fünf Minuten nach Streßinduktion zu beobachten, nach 10 Minuten allerdings schon wieder vorbei. Er ist vermutlich nicht das Resultat einer besondere Eigenschaft der *rrnG*-16S rRNA, sondern wird indirekt durch die Reaktionen der anderen *rrn*-Operons verursacht. Der leichte Anstieg nach fünf Minuten resultiert vermutlich aus dem Abfall des *rrnD*-Anteils, der damit indirekt die Anteile der anderen Operons erhöht. Das schnelle Zurückfallen auf das vorherige Niveau hat seine Ursache in dem starken Anstieg des *rrnH*-Anteil 10 Minuten nach Hitzeschock (vgl. 2.2.3.2 und 2.3.1.4), wodurch die Anteile aller anderen Operons in den Polysomen sinken.

Angesichts dessen scheint die *rrnG*-16S rRNA im MG1655 vom Hitzestress unbeeinflusst zu sein, da sowohl im Gesamt-Ribosomen- als auch Polysomenpool keine spezifischen Effekte gezeigt werden konnten. Etwas anders verhielt es sich im MC4100. Hier zeigte sich in den Polysomen ein starker Anstieg zu Beginn des Hitzeschocks. Der Anteil der *rrnG*-16S rRNA war zum Zeitpunkt null extrem gering und stieg nach Streßinduktion sehr schnell auf das Niveau in den Gesamt-Ribosomen an. Da hier nur ein Wert für diesen Kurvenverlauf verantwortlich war und dieser nur einfach bestimmt wurde, sind die Ergebnisse aus MG1655 glaubhafter, welche aus einer höheren Anzahl von Analysen und Präparationen gewonnen wurden.

3.2.1.3 Effekte des Hitzeschocks auf den *rrnH*-16S rRNA-Anteil

Die Anteile des *rrnH*-Operons an den 16S rRNA-Pools zeigten den deutlichsten Effekt in diesen Analysen. In den Polysomenfraktionen erreichte der *rrnH*-Anteil sein Maximum 10 Minuten nach Hitzeschock und lag dabei deutlich über dem Niveau in den Gesamt-Ribosomen (s. 2.2.3.2 und 2.3.1.4). Ein Anstieg fand sich zwar auch in den Gesamt-Ribosomen, allerdings in einem wesentlich geringeren Ausmaß. Dieser Effekt war sowohl im MC4100 als auch im MG1655 zu beobachten. Dies zeigt deutlich, daß unter Hitzeschock-Bedingungen 30S Untereinheiten, die aus der *rrnH*-16S rRNA gebildet wurden, bevorzugt in translatierenden Ribosomen vorkommen. Im Maximum enthält ca.

jedes dritte Ribosom in den Polysomen die 16S rRNA des *rrnH*-Operon. Dabei war der Anteil in den Polysomen ungefähr anderthalbmal so hoch wie in den Gesamt-Ribosomen.

Die Veränderungen in der *rrnH* 16S rRNA-Struktur durch die Heterogenitäten führen zu einer höheren Fitness des Ribosoms unter Hitzeschock-Bedingungen. Dies kann auf verschiedene Arten vermittelt werden.

Zum einen kann durch die veränderte Nukleotidsequenz im Bereich zwischen Position 1000 und 1040 ein alternatives Strukturelement zu den anderen 16S rRNAs ausgebildet werden (s. Abbildung 3.1). In diesem Bereich finden sich im *rrnH*-Operon neun Sequenzabweichungen zu den übrigen *rrn*-Operons, die in dieser Region alle identische Sequenzen aufweisen.

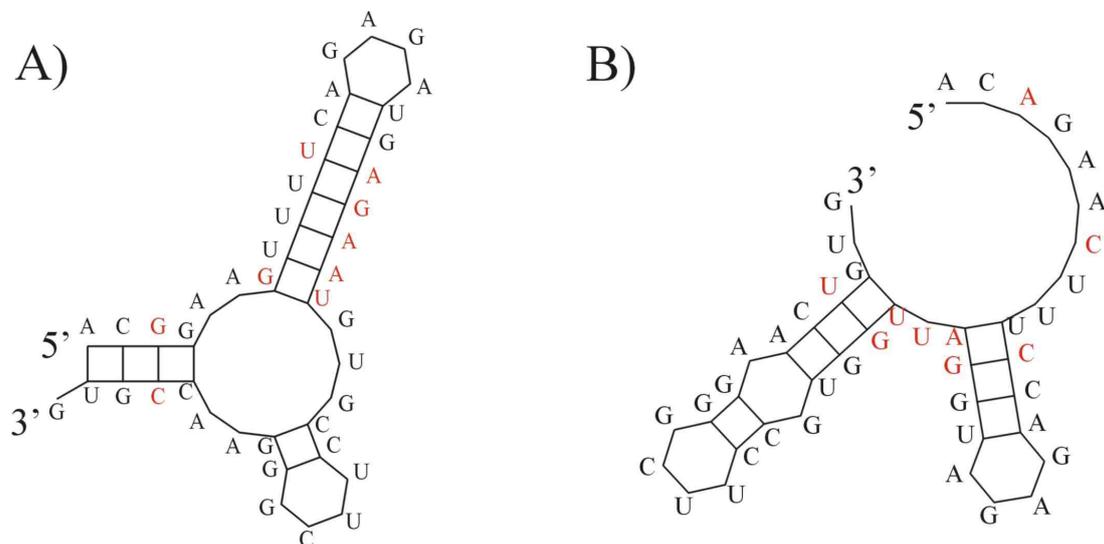


Abbildung 3.1: Die Abbildung zeigt die berechneten Sekundärstrukturen der 16S rRNA zwischen Position 1000 und 1041. A) zeigt die Struktur der *rrnB*-Sequenz, B) die Struktur der *rrnH*-Sequenz.

In Berechnungen mit dem Programm *Linall* [81] wurde die Sekundärstrukturen der 16S rRNAs im Bereich zwischen Position 1000 und 1041 für das *rrnH* und *rrnB*-Operon vorhergesagt. Dabei erhält man eine freie Energie von 36,7 kJ/mol für die *rrnB*-Struktur und 30,1 kJ/mol für die *rrnH*-Struktur. Beim Vergleich mit der 3D-Struktur der 30S Untereinheit [93] findet man die *rrnB*-Struktur bestätigt. Es scheint, daß die alternative Struktur in der *rrnH*-16S rRNA thermodynamisch instabiler ist. Dies deutet darauf hin, daß die höhere Fitness unter Hitzeschock nicht durch eine einfache Stabilisie-

rung eines aufschmelzenden Bereiches vermittelt wird. Da der 5'-Bereich der alternativen *rrnH*-Struktur ungepaart ist, kann es allerdings auch sein, daß er in der gesamten *rrnH*-16S rRNA noch weitere Basenpaarungen eingeht. Dadurch kann das resultierende Strukturelement ähnlich stabil oder sogar stabiler sein, als die entsprechende *rrnB*-Struktur.

Die 16S rRNA nimmt nicht ihre thermodynamisch stabilste Struktur ein, wie man sie aus den meisten Sekundärstrukturvorhersagen erhält. Ihre Struktur ergibt sich aus der sequentiellen Faltung bei der Synthese und durch Modulation bei der Bindung ribosomaler Proteine. Somit ist eine exakte Vorhersage der alternativen Struktur in der *rrnH*-16S rRNA nur ansatzweise möglich. Mit diesen Berechnungen kann aber gezeigt werden, daß sich in diesem lokalen Abschnitt der *rrnH*-16S rRNA eine alternative Struktur ausbildet. Da diese Struktur sich deutlich von der *rrnB*-Struktur unterscheidet, kann sie eventuell andere tertiäre Wechselwirkungen eingehen, oder eine stabilere Bindung ribosomaler Proteine ermöglichen. Auch eine Veränderung in der Wechselwirkung zu nicht ribosomalen Proteinen ist denkbar. Bekanntermaßen binden z.B. DnaK und GroEL an das Ribosom. Die erhöhte Bindung solcher Chaperone durch die Strukturveränderungen der *rrnH*-16S rRNA könnten eine Stabilisierung unter Hitzeschock erklären.

Die Ausbildung einer thermodynamisch instabileren Struktur kann auch eine höhere Dynamik der rRNA zur Folge haben. Sehr stabile RNA-Strukturen sind statisch, während zwischen weniger stabilen Strukturen sich Gleichgewichte ausbilden. Dies erhöht die Dynamik einer solchen RNA, wodurch die strukturellen Veränderungen durch einen plötzlichen Temperatursprung weniger drastisch sind. Eine stabile Struktur schmilzt unter solchen Umständen in allen 16S rRNAs zeitgleich auf, während eine instabilere Struktur ohnehin schon teilweise aufgeschmolzen vorliegt. So kann die *rrnH*-16S rRNA die Funktionalität der 30S Untereinheit unter Hitzeschock erhalten oder verbessern, während bei 30S Untereinheiten anderer 16S rRNAs diese zumindest teilweise verloren geht oder reduziert wird.

Eine weitere Erklärung ist die Bindung an die mRNA. 30S Untereinheiten mit der *rrnH*-16S rRNA könnten bevorzugt in der Lage sein, die mRNAs von Heatshock-Proteinen (HSP) zu erkennen und hier die Translation zu initiieren. Dadurch würden ebenfalls Ribosomen mit der *rrnH*-16S rRNA verstärkt in den Polysomen vorhanden sein, weil die Reaktion der Zelle auf einen Hitzeschock zu einer hohen Expression von *hsp*-Genen führt [39].

3.2.2 Der Einfluß von Kälteschock auf die Ribosomenpools

Die Analysen nach Kälteschock wurden nur mit dem *E. coli*-Stamm MG1655 durchgeführt. Dabei verursachte der plötzliche Temperatursturz nur sehr wenige und geringe Effekte in den Ribosomenpools.

Die 16S rRNAs des *rrnD*, *G* und *H*-Operons zeigten zwischen den Gesamt-Ribosomen- und Polysomenpool keine signifikanten Unterschiede. Dies zeigt, daß die resultierenden 30S-Untereinheiten unter Kälteschock keinen auffälligen Fitnessverlust oder -gewinn aufweisen.

Über die Zeit sank der Anteil des *rrnD*-Operons am 16S rRNA-Pool, während die Anteile der *rrnG*- und *rrnH*-16S rRNA stiegen. Diese Effekte waren allerdings sehr gering und basieren vermutlich auf adaptive Prozesse, was für eine Regulation der Expression spricht. Derartige Änderungen in der Regulation zeigen unter Kälteschock nur geringe Auswirkung auf den Ribosomenpool, da der Anteil der neusynthetisierten rRNA im Verhältnis zu den akkumulierten rRNAs gering ist. Im Gegensatz zum Hitzeschock, bei dem sich nach Schockinduktion eine höhere Wachstumsrate einstellt als zuvor, wird das Wachstum nach Kälteschock stark verlangsamt [26] und kommt fast ganz zum Erliegen. Die Expression der ribosomalen Operons ist direkt proportional zum Quadrat der Wachstumsrate [32][33]. Durch diesen Umstand wird nach Hitzeschock die Syntheserate der *rrn*-Operons erhöht, wodurch eine Veränderung der Regulation im Gesamt-Ribosomenpool deutlich zu sehen sein sollte. Dagegen ist beim Kälteschock die Syntheserate der rRNAs sehr niedrig, wodurch sich eine adaptive Regulation nur gering auswirkt. Der Anteil neusynthetisierter rRNAs ist im Verhältnis zu den akkumulierten rRNAs minimal und ändert an den vorherrschenden Verhältnissen nur wenig.

Ein struktureller Effekt, der zu einer Umlagerung in einer der 16S rRNA geführt hätte, müßte sich in einem deutlicheren und spontaneren Anstieg bzw. Abfall des entsprechenden 16S rRNA-Anteils auswirken, als er hier beobachtet wurde. Ein entsprechend plötzliches Absinken läßt sich nur bei der *rrnH*-16S rRNA feststellen: Bis 10 Minuten nach Kälteschock ist der Anteil der *rrnH*-16S rRNA in den Polysomen erhöht, fällt danach aber auf das Niveau in den Gesamt-Ribosomen ab. Allerdings umfaßt dieser Unterschied nur wenige Prozent und ist nicht mit den vorher beschriebenen Effekten vergleichbar.

Aufgrund der Präparation der Polysomen sind die Analysen der translationsaktiven Ribosomen zusätzlich erschwert. Die Polysomenfraktionen waren nach Kälteschock zwar noch identifizierbar (s. 2.3.2.1), wiesen allerdings nur sehr geringe Peaks auf. Demnach ist

die Menge der Polysomen sehr gering. Bei der Aufreinigung werden die Polysomen nicht völlig von den 70S-Ribosomen abgetrennt, da die Ränder des freien Ribosomenpeaks mit den Polysomenpeaks überlagern. Dadurch enthalten die Polysomenfraktionen einen Hintergrund von 70S-Ribosomen. Dies ist bei den Hitzeschockanalysen kein Problem, da die Polysomenpeaks ausreichend groß sind, so daß der Hintergrund durch die freien Ribosomen kaum ins Gewicht fällt. Bei den Polysomempräparationen nach Kälteschock ist der Anteil der 70S-Ribosomen in den Polysomenfraktionen sicherlich deutlich größer, so daß ein Unterschied zwischen Gesamt-Ribosomenpool und Polysomenpool durch den 70S-Ribosomenhintergrund in den Polysomen-RNAs stark abgeschwächt wird. Deswegen waren Unterschiede zwischen Polysomen- und Gesamt-Ribosomenpool nur schwer zu detektieren.

3.2.3 Analysen des *rrnC*-Operons

Die Analysen des *rrnC*-Operons ergaben keinen meßbaren Anteil der *rrnC*-16S rRNA, weder im MC4100 noch im MG1655 (vgl. 2.4). Da der für die Primer-Extension-Analyse verwendete Primer 16S-C-Oligo bei den Analysen keinen alleinigen Abbruch für die *rrnC*-16S rRNA erzeugt, wurden mit einem weiteren Primer Analysen durchgeführt, um so den Anteil der *rrnC*-16S rRNA zu bestimmen. Der hierzu verwendete Primer 16S-C2-Oligo wurde so gewählt, daß er bei der Primer-Extension einen alleinigen Abbruch für die *rrnC*-16S rRNA erzeugt und einen weiteren Abbruch für die übrigen 16S rRNAs. Auch mit diesem Primer konnte in der Gesamt-RNA von MG1655, präpariert bei logarithmischem Wachstum bei 37°C, kein meßbarer Anteil für die *rrnC*-16S rRNA ermittelt werden.

In Analysen der 23S rRNA, die in ähnlicher Weise wie die Primer-Extension-Analysen in dieser Arbeit durchgeführt wurden, konnte ebenfalls kein Anteil für das Produkt des *rrnC*-Operons nachgewiesen werden [87]. Für diese Analysen wurden ebenfalls verschiedene Primer verwendet. Weder die verwendeten Primer bei den Analysen der 16S oder 23S rRNA, noch die resultierenden Transkripte weisen gemeinsame Merkmale auf, die einen systematischen Fehler nahelegen. Die Verwendung verschiedener Abbruchnukleotide bei den Analysen, welche zum Teil auch in den Analysen anderer Operons erfolgreich eingesetzt wurden, läßt die Verwendung einer unsaubereren Charge eines ddNTPs, das z.B. dNTPS enthält unwahrscheinlich erscheinen. Es ergeben sich somit keine klaren Hinweise auf einen systematischen Fehler.

Weiterhin besteht die Möglichkeit, daß die sequenzierten Heterogenitäten in der veröffentlichten Genomsequenz von *E. coli* [11] fehlerhaft sind. Dies ist angesichts der Tatsache, daß sowohl in dieser Arbeit, als auch in einer Arbeit zur 23S rRNA [87], mehrere heterogene Positionen zur Analyse genutzt wurden, nicht wahrscheinlich, aber auch nicht auszuschließen. Da die Sequenzunterschiede der anderen Operons korrekt waren, müßten sich die Sequenzierungsfehler im wesentlichen auf das *rrnC*-Operon beschränken.

Daß das *rrnC*-Operon nicht exprimiert wird, kann ausgeschlossen werden. Wie zuvor beschrieben, enthält das *rrnC*-Operon hinter der 5S rRNA-Sequenz das Strukturgen der ^{trp}tRNA [27]. Da dies die einzige Kopie der ^{trp}tRNA auf dem Chromosom ist, ist die Transkription des *rrnC*-Operon für die *E. coli*-Zelle essentiell.

Aus Expressionsanalysen im MC4100 ist bekannt, daß das *rrnC*-Operon in ähnlichem Umfang wie das *rrnA*, *B*, *D* und *G*-Operon transkribiert wird [47]. Diese Analysen wurden mit Multicopy-Plasmiden durchgeführt, die vor einem Reporter gen den P1 Promotors eines der *rrn*-Operons enthalten. Dadurch konnte die Regulation und Expression an den P1 Promotoren der ribosomalen Operons gemessen werden. Allerdings ist dieses System von allen posttranskriptionellen Regulationsmechanismen entkoppelt. Einflüsse durch Prozessierung, Maturierung, Assemblierung der ribosomalen Untereinheiten oder Abbau gehen in diesem System verloren. So könnte das C-Operon zwar in hoher Menge transkribiert werden, die Konzentration der *rrnC*-16S rRNA trotzdem durch z.B. Prozessierungs-, Maturierungs- oder Assemblierungsdefizite nur in geringer Konzentration vorliegen. Auch ein Regulator, der in geringer Molekülzahl vorliegen, würde aufgrund der hohen Kopienzahl an *rrnC*-Promotoren in diesem System seine Effizienz einbüßen.

Einflüsse der chromosomalen Umgebung auf die Expression des *rrnC*-Operons gehen in diesem System verloren. Das C-Operon liegt von allen ribosomalen Operons am nächsten am Replikationsursprung. Dies bedeutet, daß es bei raschem Wachstum die höchste Gendosis aufweist (vgl. Tabelle 3.1). Trotzdem zeigt sich keine meßbarer Anteil im 16S rRNA-Pool. Vielleicht ist die Nähe zum *oriC* und die hohe Initiationsrate der Replikation dafür verantwortlich, daß das C-Operon für die Transkription unzugänglicher ist als die anderen Operons.

So könnte die Expression des *rrnC*-Operons im Wildtyp trotzdem derart stark reduziert sein, daß in dem hier gewählten Analysesystem der Anteil nicht mehr detektierbar war. Dies würde allerdings bedeuten, daß die Transkriptionsrate am *rrnC*-Operon mindestens eine Zehnerpotenz geringer sein müßte als an den anderen Operons. In dem

Fall müßte der *rrnC*-Anteil kleiner als 1% sein. Da das *rrnC*-Operon in verschiedenen Expressionsanalysen nicht auffällig war ist dies sehr unwahrscheinlich, wenn auch nicht völlig auszuschließen.

Eine weitere Erklärung könnte eine erhöhte Instabilität der *rrnC*-16S rRNA sein. Dies würde bedeuten, daß die Strukturgene zwar transkribiert werden, die 16S rRNA allerdings eine derartige Fehlfaltung aufweist, daß sie, bis auf einen hier nicht mehr nachweisbaren Anteil, abgebaut wird. Sieht man sich die heterogenen Positionen in der *rrnC*-16S rRNA an, so handelt es sich nahezu ausschließlich um Positionen in Helices, die zumeist kompensatorisch ausgetauscht sind, d.h. wenn eine Nukleotid betroffen ist, dann auch immer das korrespondierende Nukleotid auf der gegenüberliegenden Helixseite. Einzige Ausnahme ist die Deletion des Nukleotids 903, die zum Aufweiten eines Tetraloops führt und damit die Struktur destabilisiert. (s. Abbildung 3.2). Die Strukturen wurden mit dem Programm *Linall* berechnet und ergaben für die dargestellte *rrnB*-Struktur eine freie Energie von -9,3 kJ/mol und für die *rrnC*-Struktur einen Wert von +6,4 kJ/mol. In der 3D-Struktur [93] läßt sich die für die *rrnB*-16S rRNA gerechnete Struktur finden.

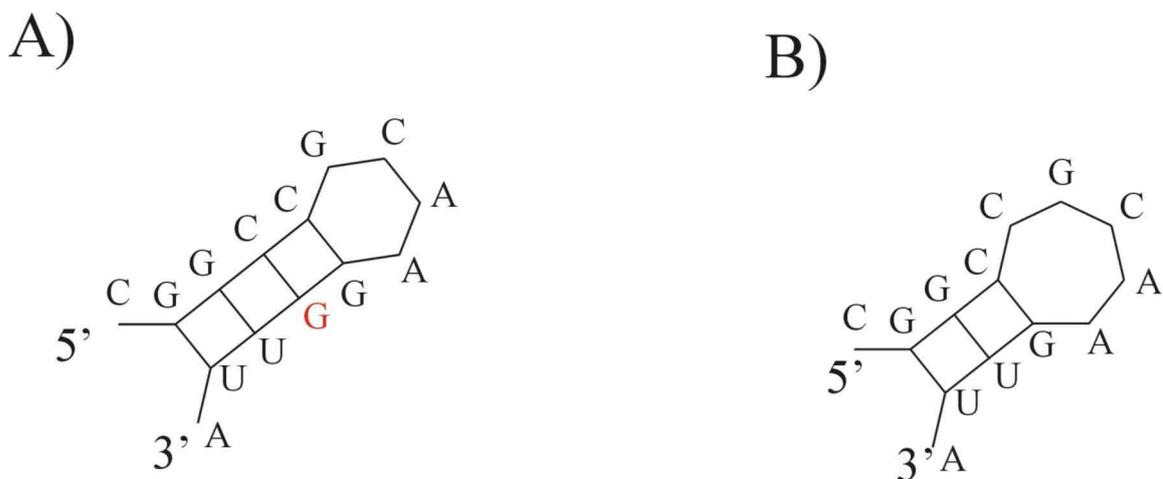


Abbildung 3.2: Die Abbildung zeigt die berechneten Sekundärstrukturen der 16S rRNA zwischen Position 893 und 906. A) zeigt die Struktur der *rrnB*-Sequenz, B) die Struktur der *rrnC*-Sequenz.

Die Position 903 wurde bei Hydroxyradikal-Footprint-Analysen als Interaktionsposition mit dem ribosomalen Protein S12 gefunden [76]. Das Protein S12 bindet am zentralen Pseudoknoten und stabilisiert und moduliert dieses essentielle Strukturelement der

16S rRNA. Darüber hinaus konnte die Beteiligung von S12 an der Translokation [24] und Assemblierung [86] der 70S-Ribosomen gezeigt werden. So ist es durchaus denkbar, daß die Deletion an Position 903 einen drastischen Effekt auf die Assemblierung der 30S-Untereinheiten hat. Wären diese inaktiv, würde es zum Abbau der *rrnC*-16S rRNA kommen, was wiederum zu einem derart geringen Anteil im Ribosomenpool führen würde, daß er in den Primer-Extension-Analysen nicht mehr nachgewiesen werden könnte. Allerdings stellt sich dann die Frage, warum *E. coli* sich ein ribosomales Operon mit einer konservierten Heterogenität leistet, die zu inaktiven Ribosomen führt. Es ist durchaus denkbar, daß es Bedingungen gibt, bei denen die *rrnC*-16S rRNA benötigt wird. Dies könnten sowohl ein physischer Streß, ein bestimmtes Nährstoffangebot, ein extremer Lebensraum, oder auch eine spezifische Interaktionen mit einem Wirt sein.

Das die *rrnC*-16S rRNA keine funktionsfähigen 30S Untereinheiten bilden kann ist auszuschließen, denn in den Wachstumsanalysen (vgl. 2.5.6) zeigt der Stamm TA554/pKK16S-C ähnliches Wachstum, wie die anderen TA554/pKK-Stämme. Dies zeigt, daß die *rrnC*-16S rRNA durchaus in der Lage ist translationsaktive 30S Untereinheiten zu bilden. Sollten diese allerdings im Vergleich zu den 30S Untereinheiten anderer Operons eine geringere Effizienz aufweisen, würden sie in einem Wildtyp-Stamm in den freien 30S Untereinheiten akkumulieren. Diese weisen eine deutlich höhere "turn-over" Rate auf, als die translatierenden Untereinheiten. Dies könnte erklären, warum der Anteil der *rrnC*-16S rRNA in den Primer-Extension-Analysen nicht meßbar war, trotzdem aber funktionsfähige Untereinheiten mit der *rrnC*-16S rRNA gebildet wurden.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Ursache für das Fehlen der *rrnC*-16S rRNA in den Primer-Extension-Analysen nicht geklärt werden konnte. Auch wenn kein systematischer Fehler gefunden wurde, so schließt die Tatsache, daß im *rrnC*-Operon eine essentielle tRNA-Sequenz vorliegt, eine zu geringe Expression aus.

3.2.4 Wachstumsanalysen der TA554/pKK-Stämme

Für *in vivo* Studien wurden Plasmide verwendet, die die 16S rRNA-Strukturgene des *rrnH* bzw. *rrnC*-Operons beinhalten. Zu ihrer Konstruktion wurde das Plasmid pKK3535 [17] verwendet, welches das *rrnB*-Operon enthält und in diesem das 16S rRNA Strukturgen durch die oben genannten ersetzt. So wurden drei pKK-Plasmide erhalten, die jeweils ein *rrn*-Operon kodieren und sich untereinander nur in der 16S rRNA-Sequenz unterscheiden (s. 2.5.1).

Diese Plasmide wurden in den Stamm TA554 transformiert, der kein aktives, chromosomales *rrn*-Operon mehr enthält [4]. Er ist somit auf das plasmidäre-kodierte ribosomale Operon angewiesen und hat, im Gegensatz zu anderen Stämmen, Ribosomen, die alle rRNAs des gleichen Operons enthalten. In diesem System können Unterschiede, die die verschiedenen 16S rRNA-Strukturgene verursachen, untersucht werden.

Es ist gezeigt worden, daß sich die Deletion eines ribosomalen Operons nicht auf das Wachstum von *E. coli* auswirkt [21]. Ein Effekt zeigt sich erst, wenn die Zellen danach physikalischen Streß oder wechselnden Nährstoffangebot ausgesetzt werden. Hier verzögern sich die Reaktionszeiten, wenn ein ribosomales Operon fehlt. Davon ausgehend wurden Wachstumskurven unter verschiedenen Streßbedingungen aufgenommen (vgl. 2.5.6). Unterschiede durch die verschiedenen Strukturgene sollten in den Wachstumskurven abzulesen sein.

Es wurden unter Hitze-, Kälte- und Osmo-Streß, sowie unter plötzlich erhöhten Nährstoffangebot ("upshift") Wachstumskurven aufgenommen (vgl. 2.5.6.1 bis 2.5.6.5). Dabei konnten keine Unterschiede im Wachstumsverhalten oder in den Reaktionszeiten der verschiedenen TA554/pKK-Stämme gefunden werden. Einzig der Stamm TA554 mit einem ribosomalen Operon aus *S. typhimurium* zeigte deutlich verlangsamte Reaktionen. Dieses trägt zwar auch eine Vielzahl von Heterogenitäten in der 16S rRNA, allerdings steht es auch unter Kontrolle anderer Promotoren und enthält weitere Strukturgene, wie die 23S rRNA, die ebenfalls Sequenzunterschiede aufweisen. Deshalb lassen sich die Wachstumsunterschiede zu den TA554/pKK-Stämmen nicht auf die 16S rRNA-Unterschiede zurückführen.

Das Fehlen von Wachstumseffekten bedeutet nicht, daß die verschiedenen Strukturgene keine unterschiedliche Funktionen ausüben können. Durch seine Konstruktion ist der Stamm TA554 relativ stark belastet und erreicht nur geringe Wachstumsraten im Vergleich zu Wildtyp-Stämmen. Während die TA554-Stämme Wachstumsraten bis maximal 1,4 erreichen, findet man bei z.B. MG1655 Wachstumsraten die größer als 2,0 sind. Die Heterogenitäten in den 16S rRNAs umfassen nur wenige Positionen. Daher sind keine dramatischen Effekte zwischen den verschiedenen Spezies zu erwarten, wie z.B. Inaktivität aller resultierenden Ribosomen oder vollständiger Funktionsverlust unter bestimmten Bedingungen. Vermutlich sind die Wachstumsunterschiede, die durch die verschiedenen 16S rRNA-Spezies bedingt werden, geringer als die Wachstumsverlangsamung durch die Konstruktion des Stammes. In diesem Fall ist das System nicht geeignet, Unterschiede im Wachstumsverhalten nachzuweisen.

Davon abgesehen ist es denkbar, daß sich der Einfluß durch die heterogenen Strukturgene nur sehr unmittelbar nach Auslösen des Stresses zeigt. In dem Fall ist das Aufnehmen einer Wachstumskurve, bei der mehrere Minuten zwischen zwei Messungen liegen, nicht geeignet solche Effekte zeitlich aufzulösen.

3.2.5 Zusammenfassung und Einordnung der Ergebnisse

In dieser Arbeit wurden Veränderungen im Ribosomenpool von *E. coli* nach Auslösen verschiedener Streßeinflüsse untersucht. Dabei wurde zwischen den 16S rRNAs verschiedener Operons unterschieden und ihr Anteil im Ribosomen, bzw. Polysomenpool bestimmt.

Weder Hitze- noch Kälteschock-Bedingungen übten einen deutlichen Einfluß auf den Anteil der *rrnG*-16S rRNA aus. Es zeigte sich ein geringfügiger Anstieg des *rrnG*-Anteils nach Kälteschock, was aber höchstens auf regulatorische Einflüsse zurückzuführen ist.

Der Anteil der *rrnD*-16S rRNA zeigte nach Hitzeschock eine deutliche Abnahme, die sowohl auf einen strukturellen Unterschied der rRNA, als auch auf eine Adaption der Syntheserate zurückgeführt werden kann. Unter Kälteschock bleibt der *rrnD*-16S rRNA-Anteil nahezu konstant. Eine geringe Erniedrigung kann über die Zeit festgestellt werden, was auf eine Regulation der *rrnD*-Transkription hindeuten könnte.

Die möglichen strukturellen Unterschiede in der *rrnD*-16S rRNA im Vergleich zur *rrnB*-16S rRNA lassen sich anhand der Sequenzheterogenitäten abschätzen. Das *rrnD*-Operon zeigt Sequenzabweichungen im Bereich zwischen Position 79 und 93. Hier weichen fünf Positionen von der bekannten *rrnB*-Sequenz ab. Allerdings sind alle Sequenzabweichungen kompensatorisch. Da in diesem Bereich keine Kontaktstellen zu einem der ribosomalen Proteine gefunden wurden, ist nicht anzunehmen, daß diese Abweichungen einen starken Einfluß auf die Sekundärstruktur, bzw. auf die Assemblierung der 30S-Untereinheit ausüben. Dieses schließt keine Effekte auf die Tertiärstruktur ein, da diese anhand der Primärsequenz nicht abgeschätzt werden kann. Solche Tertiärstruktureffekte sind durchaus möglich, allerdings nicht wahrscheinlich, da die Sekundärstruktur durch kompensatorischen Sequenzveränderungen erhalten bleibt.

Weitere Sequenzunterschiede finden sich im Bereich zwischen Position 250 und 273. Dies sind Binderegionen für die ribosomalen Proteine S17 und S20 [76]. Beide Proteine sind primär bindende Proteine der 30S Untereinheit [44], d.h. sie binden direkt an die 16S rRNA und benötigen keine vorherige Bindung anderer Proteine. Sie selbst sind

wiederum für die Anlagerung sekundär bindender Proteine notwendig. Beide sind an der Genauigkeit der Translation beteiligt [65]. S20 wird darüber hinaus für das Wachstum bei 42°C benötigt [79]. Eine Beeinträchtigung der Bindung von S20 kann einen Effekt auf den *rrnD*-16S rRNA-Anteil sicher erklären, allerdings finden sich im *rrnG*-Operon im Bereich von Position 250 bis 273 die gleichen Sequenzheterogenitäten. Der *rrnG*-Anteil verändert sich nach Hitzeschock allerdings nicht. Deshalb können diese Heterogenitäten nicht alleine dafür verantwortlich sein. Beim *rrnD*-Operon gibt es zusätzlich eine weitere Sequenzabweichung an Position 208. Dies ist zwar keine direkte Wechselwirkungsposition mit dem S20-Protein, allerdings befindet sich 13 Nukleotide entfernt an Position 195 eine Kontaktstelle der 16S rRNA mit dem S20 Protein [76]. Da die Heterogenität an Position 208 einen UUCG-Tetraloop, ein sehr stabiles Strukturelement, betrifft, wird die Struktur durch die Sequenzabweichung instabiler. Dies könnte ein Aufschmelzen der Struktur bei Hitzeschock erleichtern, was auch eine Umlagerung bis hin zur Position 195 zur Folge hätte. Die Bindung von S20 könnte so indirekt gestört werden. Hierzu müßten weiterführende Experimente durchgeführt werden.

Der Anteil der *rrnH*-16S rRNA zeigte nach Kälteschock ebenfalls keine deutlichen Veränderungen. Unter Hitzeschock war 10 Minuten nach Streßinduktion der Anteil der *rrnH*-16S rRNA in den Polysomen im Vergleich zum Anteil in den Gesamt-Ribosomen deutlich erhöht. Dies zeigt eine höhere Fitness der 30S Untereinheiten mit *rrnH*-16S rRNA nach Hitzeschock, im Vergleich zu 30S-Untereinheiten mit 16S rRNAs der anderen Operons.

Das *rrnH*-Operon weist in der 16S rRNA Sequenz-Heterogenitäten zwischen den Positionen 1001 und 1038 auf. Hier finden sich viele nicht kompensatorische Veränderungen. Dadurch bildet die *rrnH*-16S rRNA eine alternative Struktur aus, die sich stark von der Struktur in den anderen *rrn*-16S rRNAs unterscheidet (vgl. Abbildung 3.1). Diese könnte eine höhere Toleranz gegenüber einem plötzlichen Temperaturanstieg vermitteln.

Unter den heterogenen Positionen der *rrnH*-16S rRNA gibt es Kontaktstellen zu drei der ribosomalen Proteine. Die Proteine S14 [16] und S19 [76] binden an der 16S rRNA Region zwischen Position 1000 und 1038, das S9 Protein an die Region um Position 1120. Diese Position zeigt in der *rrnH*-16S rRNA Sequenz ebenfalls eine Abweichung von der Sequenz der anderen *rrn*-Operons. Die Proteine S14 und S19 sind am tRNA-Kontakt beteiligt [84]. Dabei konnte eine direkte Interaktion mit der ^{fmet}tRNA nachgewiesen werden. Dadurch sind die Proteine S14 und S19 direkt an der Initiation der Translation

beteiligt. Für das S9 Protein konnten sowohl zur tRNA als auch zur mRNA Kontakte gezeigt werden [35] [7].

Sollte durch die Struktur- und Sequenzveränderungen in der *rrnH*-16S rRNA die Bindung von S9, S14 oder S19 stabiler sein, so erklärt dies die höhere Fitness der 30S Untereinheiten bei Hitzeschock. Dies würde bedeuten, daß die S9-, S14- oder S19-Bindung an die anderen 16S rRNAs bei Hitzeschock instabiler ist. Um einen solchen Mechanismus aufzuklären, sind allerdings weiterreichende Experimente nötig.

Darüber hinaus sind die absoluten Anteile, die für die verschiedenen *rrn*-Operons gemessen wurden, auffällig. Bei logarithmischem Wachstum bei 37°C wurde für das *rrnD*-Operon ein Anteil am 16S rRNA-Pool von 14% ermittelt, für das *rrnG*-Operon ein Anteil von 7,5% und für das *rrnH*-Operon ein Anteil von 17,3%. Geht man von einer gleichmäßigen Expression der Operons aus, so müßte die Menge der Transkripte direkt von der Gendosis des entsprechenden Operons abhängen. Da in *E. coli* während eines Replikationszyklus schon weitere gestartet werden [23], liegen Gene in der Nähe des Replikationsursprungs (*oriC*) in einer erhöhten Gendosis vor. Diese läßt sich nach folgender Formel berechnen[19][15]:

$$x = 2^{[C(1-f) + D]/g}$$

Dabei entspricht x der Genkopienzahl, C der Zeit, die benötigt wird, um das Chromosom zu replizieren, und D dem Zeitraum zwischen Replikation und Zellteilung. Die Zahl f gibt den prozentualen Abstand des Gens zum *oriC* an, während g der Generationszeit in Minuten entspricht. C und D wurden für *E. coli* empirisch bestimmt [64] und nehmen die folgenden Werte an:

$$C = 40,5 + 4,5/k^2$$

$$D = 21 + 4/k$$

Dabei entspricht k der spezifischen Wachstumsrate pro Stunde.

Mit dieser Formel ließ sich die Genkopienzahl der verschiedenen *rrn*-Operons berechnen. Die erhaltenen Zahlen sind in Tabelle 3.1 zusammengefaßt.

Die Anteile des *rrnD* und *G*-Operons am 16S rRNA-Pool entsprechen annähernd den errechneten Werten. Allerdings ist der Anteil der *rrnH*-16S rRNA viel höher, als man es aufgrund der Gendosis erwarten würde. Dies zeigt sich auch in den Analysen bei anderen Temperaturen, z.B. 15 und 30°C, wo der Anteil für *rrnH*-Operon oberhalb von 20% liegt.

Operon	<i>rrnA</i>	<i>rrnB</i>	<i>rrnC</i>	<i>rrnD</i>	<i>rrnE</i>	<i>rrnG</i>	<i>rrnH</i>
Gendosis	3,9	3,7	4,1	3,3	3,7	2,5	2,8
Anteil in %	16,3	15,4	17,1	13,8	15,4	10,4	11,7

Tabelle 3.1: Die Tabelle zeigt die Genkopienzahl der verschiedenen *rrn*-Operons bei logarithmischem Wachstum bei 37°C. Zusätzlich ist der prozentuale Anteil jedes einzelnen Operons an der Gesamtmenge der *rrn*-Operons angegeben.

Dies deckt sich mit gemessenen Expressionsdaten aus MC4100 [47], die zeigen, daß das *rrnH*-Operon von allen ribosomalen Operons die stärkste Expression zeigt..

3.2.6 Redundanz der ribosomalen Operons in *E. coli* - Gendosis kontra funktionelle Anpassung

Die sieben ribosomalen Operons sind eines der wenigen Beispiele für Genredundanz in *E. coli* [46]. Die Anzahl der *rrn*-Operons ist dabei konserviert und läßt sich sowohl in den üblichen Laborstämmen, z.B. den K-12-Stämmen, als auch in pathogenen *E. coli*-Stämmen, wie den O157:H7 Sakai-Stamm, finden [73]. Es stellt sich dabei die Frage, ob die Anzahl notwendig ist, um eine hohe Transkriptionrate sicherzustellen, oder ob die resultierenden Genprodukte unterschiedliche Funktionen wahrnehmen.

In einer Reihe von Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß Deletion eines ribosomalen Operons in *E. coli* zu keinem veränderten Wachstum unter Laborbedingungen führte [21]. Die Wachstumsraten solcher Stämme unterschieden sich nicht merklich von den Raten der Wildtyp-Stämme. Erst nach Deletion von drei oder mehr ribosomalen Operons konnte ein Effekt auf das Wachstum gemessen werden. *E. coli* benötigt somit maximal fünf ribosomale Operons, um sein rasches Wachstum aufrechtzuerhalten [21]. Dabei erhöhen die verbleibenden ribosomalen Operons ihre Transkriptionsrate, um den Verlust der deletierten Operons auszugleichen [20]. Die Transkriptionsraten der einzelnen Operons sind dabei noch nicht maximal. Höhere Trankriptionsraten führen allerdings zu einer fehlerhaften Faltung der 16S rRNA [56] .

Setzt man diese Zellen unter Streß, z.B. Hitzeschock oder einem plötzlichen Nährstoffanstieg, weisen die Stämme mit einem deletierten *rrn*-Operon eine verzögerte Reaktion auf. Sie benötigen länger, bis sie wieder logarithmisches Wachstum zeigen[21]. Diese Experimente zeigen, daß die Zahl der *rrn*-Operons nicht notwendig ist, um eine ausrei-

chende Expression zu gewährleisten, sondern um eine schnellere Adaption an wechselnde Umweltbedingungen zu ermöglichen.

Andere Arbeiten zeigten, daß die sieben ribosomalen Operons durch verschieden Regulatoren, wie H-NS, FIS und ppGpp differentiell reguliert werden [47][75]. Diese Ergebnisse konnten hier für das *rrnH*-Operon anhand des 16S rRNA-Anteils bestätigt werden.

Eine solche differentielle Regulation erscheint nur sinnvoll, wenn die erhaltenen Produkte auch funktionelle Variationen aufweisen. Dazu wurde nach Unterschieden zwischen den rRNAs verschiedener *rrn*-Operons gesucht. Es konnten eine Vielzahl von Sequenzabweichungen gefunden werden. So lassen sich zwischen den 16S rRNAs der verschiedenen Operons 25 Positionen finden, die über die verschiedenen Strukturgene verteilt Variationen aufweisen. In der 23S rRNA sind es immerhin 40 Positionen, in der 5S rRNA nur zwei. Dabei wurde die Sequenz der *rrnB*-Strukturgene als Referenz genommen, da diese am besten untersucht sind. Diese Sequenzabweichungen sind konserviert. Sie sind in ähnlicher Weise in allen *E. coli*-Stämmen zu finden, auch wenn sie dort anders auf die Operons verteilt sind [46]. Selbst nach längerer Kultivierung gehen diese Sequenzunterschiede nicht durch Rekombination verloren, was bei der hohen Homologie zu erwarten wäre.

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, daß eine ribosomale Untereinheit unter Streßbedingungen abhängig von der Herkunft ihrer rRNA unterschiedliche Fitness aufweist. 30S Untereinheiten mit der *rrnH*-16S rRNA ließen sich nach Hitzeschock in einem Drittel der translatierenden Ribosomen nachweisen. Dies liegt weit über dem Anteil der *rrnH*-16S rRNA in den Ribosomen und zeigt deutlich die höhere Fitness dieser Untereinheiten.

Für die *rrnD*-16S rRNA konnte ebenfalls ein deutlicher Effekt gezeigt werden. Dieser ließ sich allerdings nicht eindeutig auf die Sequenzabweichungen zurückführen, da auch regulatorische Einflüsse diesen Effekt erklären können. Hier zeigt sich auf jeden Fall, daß die 30S Untereinheiten mit *rrnD*-16S rRNA unter Hitzeschock für die Translation ungeeigneter sind.

Vermutlich lassen sich für viele der Heterogenitäten in den Strukturgenen Bedingungen finden, unter denen sie einen Fitnessunterschied des Ribosoms vermitteln. Dies deutet darauf hin, daß die Sequenzunterschiede genutzt werden, um eine bessere Anpassung an physikalischen Streß, wechselndes Nährstoffangebot oder Wirtswechsel zu gewährleisten. Eine spezifische Nutzung ribosomaler Operons ist z.B. für den Malaria-Erreger, *Plasmodium*, beschrieben worden[40]. Hier wird je nach Wirt eine andere 18S rRNA

exprimiert.

Vergleicht man die Anzahl an ribosomalen Operons in verschiedenen Prokaryonten, so findet man bei Organismen, die ökologische Nischen besiedeln häufig eine geringere Anzahl. Beispiele hierfür sind Symbionten (z.B. Rhizobien oder Agrobakterien), Parasiten (z.B. Mycoplasmen) oder Bakterien die extreme Habitate besiedeln (z.B. Halobakterien, thermophile Bakterien). Diese Organismen haben drei oder weniger ribosomale Operons [52]. Vermutlich sind solche Organismen seltener wechselnden Lebensräumen oder Umweltbedingungen ausgesetzt, als z.B. *E. coli* oder *Bacillus subtilis*, die sieben, bzw. zehn ribosomale Operons aufweisen.

Die Genredundanz in den ribosomalen Operons dient sicherlich *auch* der Aufrechterhaltung hoher Transkriptionsraten. Allerdings ermöglichen Variationen in den Strukturgenen zusätzlich eine effizientere Anpassung an schnell wechselnde Umweltbedingungen.

3.2.7 Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß die Heterogenitäten in den 16S rRNA-Strukturgenen von *Escherichia coli* zu Unterschieden in der Funktionalität der 30S Untereinheiten führen. Allerdings ergaben sich auch eine Reihe von Fragen, die Klärung durch weiterführende Experimente erfordern.

Für die *rrnH*-16S rRNA konnte ein funktioneller Unterschied unter Hitzeschock gezeigt werden. Allerdings ist der Mechanismus hinter diesem Effekt noch unklar. Zur weiteren Klärung sind eine Reihe von Experimenten denkbar. Mutationen an den heterogenen Positionen in der *rrnH*-16S rRNA könnten die exakten Nukleotide aufzeigen, welche die höhere Fitness unter Hitzeschock vermitteln. Untersuchungen der Proteinzusammensetzung von *rrnH*-30S Untereinheiten im Vergleich zu den anderen 30S Untereinheiten würden mögliche Veränderungen in der Proteinkomposition der Untereinheit oder die Bindung zusätzlicher Proteine aufklären. Hierzu eignet sich der Stamm TA554/pKK16S-H, da alle 30S Untereinheiten in diesem Stamm die *rrnH*-16S rRNA enthalten.

Die Analysen der *rrnD*-16S rRNA ergaben ein geringere Nutzung unter Hitzeschock. Dabei ist unklar, ob regulatorische oder strukturelle Einflüsse dafür verantwortlich sind. Um dies zu klären müßten *in vivo* Expressionsanalysen unter Hitzeschock vorgenommen werden. Darüber hinaus könnten auch hier Mutationsanalysen der heterogenen Positionen Klarheit über mögliche strukturelle Einflüsse verschaffen. Untersuchungen der Pro-

teinzusammensetzung von *rrnD*-30S Untereinheiten vor und nach Hitzeschock würden Verluste von ribosomalen Proteinen durch Strukturänderung aufzeigen.

Das Fehlen der *rrnC*-16S rRNA in den vorliegenden Analysen legt eine Vielzahl von weiteren Untersuchungen nahe. Analysen der *rrnC*-Expression *in vivo* würden klären, ob die Expression tatsächlich derart gering ist, daß die *rrnC*-Abbrüche hier nicht nachzuweisen waren. Ansonsten müßte der Anteil der *rrnC*-16S rRNA in den Zwischenprodukten des 16S rRNA-Abbaus analysiert werden. Dies könnte eine erhöhte Abbaurate der *rrnC*-16S rRNA aufzeigen.

Generell wären Sekundär- und Tertiärstrukturuntersuchungen der verschiedenen 16S rRNA-Varianten und ihrer 30S Untereinheiten von großem Nutzen. Sie würden den strukturellen Einfluß der Heterogenitäten direkt zeigen und würden eine Korrelation mit physiologischen Effekten ermöglichen.

4 Material

4.1 Allgemeine Vorbemerkung

Die verwendeten Chemikalien besaßen, soweit nicht anders vermerkt, den Reinheitsgrad “*pro analysis*”. Die Lösungen und Medien wurden alle mit hochreinem Milli-Q-Wasser (Hausanlage mit nachgeschalteten “water purification system EPA Est. 41237-MA-1”, Millipore GmbH, Neu Isenburg) angesetzt, das im folgenden als “*Aqua dest.*” bezeichnet wird.

4.2 Bakterienstämme und Plasmide

4.2.1 Verwendete *Escherichia coli* Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
HB101	F ⁻ , <i>pro</i> A2, <i>rec</i> A13, <i>ara</i> -14, <i>lac</i> Y1, <i>gal</i> K2, <i>xyl</i> -5, <i>mtl</i> -1, <i>rps</i> L20(Str ^r), <i>sup</i> E44, <i>hsd</i> S20(r _B ⁻ m _B ⁻), λ ⁻	Boyer und Roullander-D(1969)[14]
MC4100	F ⁻ , <i>ara</i> D139, Δ(<i>argF-lac</i>) U169, <i>deo</i> C1, <i>flb</i> 5301, <i>rel</i> A1, <i>rps</i> L150, <i>pts</i> F25, <i>rbs</i> R	Casabadan (1976)[18]
MG1655	F ⁻	Bachmann (1969)[5]
TA554	<i>ilv</i> ⁺ , <i>pol</i> A1, <i>pol</i> A ⁺ , Δ(<i>rrsA-ileT-alaT-rrlA</i>)34, Δ(<i>rrsB-gltT-rrlB</i>)101, Δ(<i>rrsC-gltU-rrlC</i>)15:: <i>cat</i> ⁺ , Δ(<i>rrsD-ileU-alaU-rrlD</i>)25:: <i>cat</i> ⁺ , Δ(<i>purDH-rrnE-metA</i>), Δ(<i>rrsG-gltW-rrlG</i>)30:: <i>lacZ</i> ⁺ , Δ(<i>rrsH-ileV-alaV-rrlH</i>)103/pTRNA66, pHK- <i>rrnC</i> ⁺	Squires. (1999)[4]

4.2.2 Verwendete Plasmide

Plasmid	Kurzbeschreibung
pKK3535	pBR322-Derivat mit komplettem <i>rrnB</i> -Operon, kloniert in die <i>Bam</i> HI-Schnittstelle.[17]
pKK16S-C	pKK3535-Derivat, in dem das 16S rRNA-Strukturgen durch das <i>rrnC</i> -16S rRNA-Strukturgen ersetzt wurde.
pKK16S-H	pKK3535-Derivat, in dem das 16S rRNA-Strukturgen durch das <i>rrnH</i> -16S rRNA-Strukturgen ersetzt wurde.
pUC 18	<i>E. coli</i> -Klonierungsvektor mit <i>oriC</i> und Amp-Resistenz aus pBR322 [94]

4.3 Enzyme

AMV-Reverse Transkriptase	Promega USA
DNase I, RNase-frei	Boehringer Mannheim
Lysozymchlorid	Sigma, St. Louis, USA
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	Startagene, La Jolle, USA
<i>Pfu</i> -Turbo-DNA-Polymerase	Stratagene, La Jolle, USA
Proteinase K	Merck, Darmstadt
T4-DNA-Ligase	Boehringer Mannheim
Restriktionsenzyme	
<i>Bcl</i> I	New England Biolabs, USA
<i>Bgl</i> II	New England Biolabs, USA
<i>Bst</i> EI	New England Biolabs, USA

4.4 Nucleinsäuren und Nucleotide

4.4.1 Oligonucleotide

Bezeichnung	Sequenz(5'-3')	Hersteller
16S-3'-Oligo	caa cgc gta aac gcc ttg c	Interactiva, Ulm
Komplementär zur Sequenz +57 bis +75 downstream des 16S rRNA-Strukturgens.		
16S-5'-Oligo	cca agt ctc aag agt gaa c	Interactiva, Ulm
Komplementär zur Sequenz -63 bis -45 upstream des 16S rRNA-Strukturgens.		
16S-C-Oligo	ccc gtc cgc cac tgc tca gc	Interactiva, Ulm
Komplementär zur 16S rRNA-Sequenz von Position 113 bis 94.		
16S-C2-Oligo	ccc ccg aca att cat ttg agt ttt	Interactiva, Ulm
Komplementär zur 16S rRNA-Sequenz von Position 113 bis 94.		
16S-D-Oligo	ctc aga cca gct agg gat c	Interactiva, Ulm
Komplementär zur 16S rRNA-Sequenz von Position 299 bis 281.		
16S-G-Oligo	ccc cct ctt tgg tet tgc g	Interactiva, Ulm
Komplementär zur 16S rRNA-Sequenz von Position 204 bis 186.		
16S-H-Oligo	cga cag cca tgc agc acc tg	Interactiva, Ulm
Komplementär zur 16S rRNA-Sequenz von Position 164 bis 145.		
rrnC-5'-Oligo	gct ttc tgt tct gca gtg cca acc gtt gc	Interactiva, Ulm
Bindet im <i>E. coli</i> -Genom an Position -580 upstream des <i>rrnC</i> -P1-Promotors.		
rrnC-3'-Oligo	cac ttt agc gct tgg tac cag tgc ccc ttc	Interactiva, Ulm
Bindet im <i>E. coli</i> -Genom an Position +450 downstream des <i>rrnC</i> -Terminators.		
rrnH-5'-Oligo	ggg ctt tgc gct gca ggt agt aac caa cc	Interactiva, Ulm
Bindet im <i>E. coli</i> -Genom an Position -518 upstream des <i>rrnH</i> -P1-Promotors.		
rrnH-3'-Oligo	gcg tca gat caa cat aat cgg tac cca att ttt gc	Interactiva, Ulm
Bindet im <i>E. coli</i> -Genom an Position +350 downstream des <i>rrnH</i> -Terminators.		

4.4.2 Molekulargewichtsmarker

1-Kb-Leiter (Gibco BRL)

Die enthaltenen DNA Fragmente in kb: 0.075, 0.13, 0.16, 0.2, 0.22, 0.3, 0.34, 0.4, 0.5, 1.0, 1.6, 2.0, 3.1, 4.1, 5.1, 6.1, 7.1, 8.1, 9.2, 10.2, 11.2, 12.2

SmartLadder (Eurogentec)

Die enthaltenen DNA Fragmente in kb: 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 8.0, 10.0

4.4.3 Nukleotide

2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat	Boehringer, Mannheim
2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat	Boehringer, Mannheim
2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat	Boehringer, Mannheim
2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat	Boehringer, Mannheim
2',3'-Desoxyadenosin-5'-($\alpha^{32}\text{P}$)triphosphat	Hartmann, Braunschweig
2',3'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat	USB, Cleveland, USA
2',3'-Desoxycytidin-5'-triphosphat	USB, Cleveland, USA
2',3'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat	USB, Cleveland, USA
2',3'-Desoxythymidin-5'-triphosphat	USB, Cleveland, USA

4.5 Standardpuffer

BSCE-Puffer	50 mM Tris/Borat, pH 7,2 150 mM Natriumchlorid 15 mM Natriumcitrat 10 mM EDTA, pH 8,0 1% (w/v) SDS
2x Formamid-Probenpuffer	0,05% (w/v) Bromphenolblau 0,05% (w/v) Xylencyanol 95% (v/v) deionisiertes Formamid 20 mM EDTA, pH 8,0
50 x TAE-Puffer	2 M Tris-Acetat, pH 7,5 50 mM EDTA
10 x TBE-Puffer	0,89 mM Tris-Borat, pH 8,3 25 mM EDTA
1 x TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 8,0 1 mM EDTA
TBE-Probenpuffer	0,025% (w/v) Bromphenolblau 0,025%(w/v) Xylencyanol 30% Glycerin in 2 x TBE-Puffer
TAE-Probenpuffer	0,025% (w/v) Bromphenolblau 0,025% (w/v) Xylencyanol 30% Glycerin in 2 x TAE-Puffer

4.6 Medien

M9-Minimalmedium

6 g/l Na_2HPO_4

3 g/l KH_2PO_4

0,5 g/l NaCl

1 g/l NH_4Cl

nach dem Autoklavieren wurde aus steriler Stammlösung Thiamin (f.c. 1 mg/l) zugegeben; vor Gebrauch wurden MgSO_4 (f.c. 1 mM), CaCl_2 (f.c. 0,1 mM) sowie Casaminoacids und Kohlenstoffquellen in erforderlicher Konzentration (0,2% Glukose) zugegeben.

YT-Medium

8 g/l Trypton

5 g/l Natriumchlorid

5 g/l Hefe-Extrakt

in Aqua dest., auf pH 7,4 mit NaOH einstellen

YT-Festmedium

YT-Medium mit 20 g/l Agar

4.7 Feinchemikalien

Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agar	Sigma, St. Louis, USA
Agarose	Biozym, Hameln
Agarose, hoch gereinigt	Seakam, Hamburg
Amberlite MB-1 (Ionentauscher)	ICN Biomedical, Ohio, USA
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Sigma, St. Louis, USA
Brij 35	Aldrich, Steinheim
Brij 58	Aldrich, Steinheim
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Dichlordimethylsilan	Janssen Chimica, Brüggen
Dithiothreitol (DTT)	Janssen, Beerse, Belgien
Ethidiumbromid	Boehringer, Mannheim
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck, Darmstadt
Formamid	J.T. Baker, Deventer, NL
Glycerin	ICN biomedicals, Ohio, USA
Glykogen	Boehringer, Mannheim
Harnstoff	J.T. Baker, Deventer, NL/Roth, Karlsruhe
Hefe-Extrakt	Gibco BRL, Eggenstein
N,N'-Methylenbisacrylamid	Serva Heidelberg
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Riedel-de Haen, Seelze
Natriumborhydrid	Merck, Darmstadt
Natriumdesoxycholat	DuPont, Bad Homburg
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Paraffinöl für IR-Spektroskopie	Fluka Chemie AG, CH-Buchs
Polyethylenglykol (PEG ₆₀₀₀)	Sigma, St. Louis, USA
Phenol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Tetenal Roentogen Liquid (Entwickler)	Tetenal Photowerk, Norderstedt
Tetenal Roentogen Superfix (Fixierer)	Tetenal Photowerk, Norderstedt
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Difco, Detroit, Michigan, USA
Xylencyanol	Serva, Heidelberg

4.8 Verschiedenes

High Pure Plasmid Isolation Kit

Röntgenfilme RX

Röntgenfilme X-Omat R

Sterilfilter FB 030/3 (0,2 μm)

Boehringer, Mannheim

Fuji Photo Film Co. Ltd., Japan

Kodak, New Haven, USA

Schleicher und Schuell, Dassel

5 Methoden

5.1 Mikrobiologische Methoden

Beim Arbeiten mit Bakterien wurde stets unter sterilen Bedingungen gearbeitet. Der entstandene mikrobiologische Abfall wurde vor seiner Entsorgung rückautoklaviert.

5.1.1 Sterilisation von Lösungen und Geräten

Medien, sterilisierbare Lösungen und Glasgeräte wurden durch Dampfdruck-Sterilisation (20-30 min, 134°C, 2-3 bar) autoklaviert. Nicht sterilisierbare Lösungen wurden sterilfiltriert.

5.1.2 Kultivierung von Bakterienstämmen

5.1.2.1 Anzucht von über Nacht(üN)-Kulturen

Mit einer Kolonie einer YT-Agarplatte wurden 3 ml oder 25 ml YT-Medium angeimpft und bei 37°C über Nacht geschüttelt (New Brunswick Scientific Gio Gyrotory). Dem Medium wurde gegebenenfalls ein entsprechendes Antibiotikum zugesetzt.

5.1.2.2 Kultivierung auf Agar-Platten

Bakterien wurden durch Überführen mit einer Impföse oder durch Ausplattieren auf einer YT-Platte mit dem entsprechenden Antibiotikum verteilt. Anschließend wurden die Platten, falls nicht anders vermerkt, bis zum Wachsen von Kolonien, bei 37°C inkubiert. Die Platten konnten dann bei 4°C gelagert werden oder einzelne Kolonien zum Animpfen von Flüssigkulturen verwendet werden.

5.1.3 Herstellen von Glycerinstocks

Zur längeren Lagerung von Zellkulturen wurden Glycerinstocks angelegt. Hierzu wurde 1 ml einer üN-Kultur der entsprechenden Zellen zu 0,2 ml Glycerin gegeben und 30 -

60 min unter wiederholten Invertieren inkubiert. Zur Aufbewahrung wurde die Lösung bei -70°C eingefroren.

5.1.4 Aufnahmen von Wachstumskurven mittels VIS-Spektroskopie

Das Wachstum von Zellen in Flüssigkulturen wurde über die optische Dichte (OD) verfolgt, die sich annähernd proportional zur Zellzahl verhält. Hierzu wurden 100 ml YT-Medium in einem 250 ml Kolben mit 1 ml einer 25 ml üN-Kultur (vgl. 5.1.2.1) der entsprechenden Zellen angeimpft. Der Kolben wurde bei konstanter Temperatur geschüttelt. Zu den angegebenen Zeiten wurde ein Aliquot aus dem Kolben entnommen und im Spektralphotometer (Beckmann Spektralphotometer Model DU 64) bei 600 nm gemessen. Hierzu wurde das Aliquot mit YT-Medium verdünnt, damit die gemessene OD im linearen Bereich zwischen 0,1 und 1,0 lag. Die gemessenen Werte wurden zur Auswertung logarithmisch gegen die Zeit aufgetragen. Aus der Steigung $m = \frac{\Delta \log \text{OD}_{600}}{\Delta t} [\text{min}^{-1}]$ in der exponentiellen Wachstumsphase ließen sich Wachstumsrate und Verdopplungszeit errechnen. Die Wachstumsrate μ errechnet sich nach der Formel:

$$\mu = \frac{\ln 10}{\ln 2} \cdot m \cdot 60 \text{ [h}^{-1}\text{]} \quad (5.1)$$

Die Verdopplungszeit t_d berechnet sich nach der Formel:

$$t_d = \frac{1}{\mu} \cdot 60 \text{ [min]} \quad (5.2)$$

5.1.4.1 Wachstum von *E. coli* unter Hitzeschock

Zum Auslösen von Hitzeschock wurden 100 ml YT-Kulturen mit 1/100 Volumen einer üN-Kultur des gewünschten *E. coli*-Stammes angeimpft und bei 30°C angezogen. In der Mitte der logarithmischen Phase, bei einer gemessenen OD_{600} zwischen 0,5 und 0,6 wurden die Kulturen in einen Wasserschüttler mit einer Temperatur von 42°C umgesetzt, um den Hitzeschock auszulösen.

5.1.4.2 Wachstum von *E. coli* unter Kälteschock

Es wurden 100 ml YT-Kulturen mit 1/100 Volumen einer üN-Kultur des gewünschten *E. coli*-Stammes angeimpft und bei 37°C angezogen. Zum Auslösen des Kälteschocks wurden die Kulturen in der Mitte der logarithmischen Wachstumshase, bei einer gemessenen OD_{600} zwischen 0,5 und 0,6, in einen Wasserschüttler mit einer Temperatur von 15°C umgesetzt.

5.1.4.3 Wachstum von *E. coli* unter osmotischem Streß

Es wurden 100 ml YT-Kulturen mit 1/100 Volumen einer \bar{u} N-Kultur des gewünschten *E. coli*-Stammes angeimpft und bei 37°C angezogen. Zur plötzlichen Erhöhung der Osmolarität der Lösung, wurde bei einer OD₆₀₀ von 0,5-0,6 die Kultur mit 1/100 Volumen 1 M Saccharoselösung versetzt. Danach wurde das Wachstum der Kultur über die OD₆₀₀ weiterverfolgt.

5.1.4.4 Wachstum von *E. coli* bei plötzlichem Anstieg des Nährstoffangebots (“upshift”)

Hierzu wurden 100 ml M9 Medium-Kulturen mit 1/100 Volumen einer \bar{u} N-Kultur des gewünschten *E. coli*-Stammes angeimpft und bei 37°C angezogen. Nach einigen Stunden Wachstum im Minimalmedium wurde den Kulturen 1/10 Volumen 10x YT-Medium zugesetzt, um den plötzlichen Nährstoffanstieg zu erzeugen. Das weitere Wachstum wurde anhand der optischen Dichte verfolgt.

5.1.5 Herstellen kompetenter Zellen nach Dagert und Ehrlich

100 ml YT-Medium wurde mit einem Milliliter einer Vorkultur des entsprechenden *Escherichia coli*-Stammes (HB101 oder TA554) angeimpft. Die Kultur wurde bei 37°C geschüttelt, bis eine OD₆₀₀ von 0,5-0,6 erreicht war. Die Kultur wurde dann in vorgekühlte 50 ml Corex-Zentrifugengläser überführt und 20 min auf Eis abgekühlt, bevor die Zellen durch Zentrifugation (Haeraeus Kühlzentrifuge, Megafuge 1.0R) 5 min bei 4000 rpm und 4°C pelletiert wurden. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet vorsichtig in einem halben Volumen gekühltem 0,1 M CaCl₂ aufgenommen. Nach einer weiteren Inkubation für 60 min auf Eis wurden die Zellen wie zuvor abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden dann in 1/25 Volumen gekühltem 0,085 M CaCl₂ mit 15% Glycerin resuspendiert und zu je 200 μ l aliquotiert. Nach einer weiteren Inkubation bei 4°C von 1-24 h wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Transformation bei -70°C gelagert.

Die Transformationsraten der kompetenten Zellen wurden durch eine Testtransformation mit 5 ng Plasmid-DNA ermittelt. Sie lag bei allen durchgeführten Präparationen zwischen 5×10^4 und 6×10^5 Transformanten pro μ g-DNA.

5.1.6 Transformation kompetenter *Escherichia coli*-Zellen nach Hanahan

Zur Transformation wurden die kompetenten *Escherichia coli*-Zellen (vgl. 5.1.5) langsam auf Eis aufgetaut. 5-10 ng eines isolierten Plasmides oder ein Ligationsansatz wurden in einem Volumen von 20 μl hinzugegeben und vorsichtig vermischt. Nach 60minütiger Inkubation auf Eis folgte ein 3minütiger Hitzeschock bei 42°C. Der Transformationsansatz wurde dann mit 800 μl vorgewärmten YT-Medium versetzt und für eine weitere Stunde bei 37°C inkubiert. Aliquots des Transformationsansatzes wurden dann auf YT-Platten ausplattiert und bis zum Wachstum von Kolonien bei 37°C inkubiert.

5.1.7 Heilen des *E. coli*-Stamms TA554 von pSt1-Km

Um den Stamm TA554, der mit einem pKK-Plasmid transformiert wurde, vom Plasmid pSt1-Km zu heilen, wurde der Stamm in einer YT-Flüssigkultur mit 50 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin über Nacht inkubiert. Aus der Kultur wurde eine neue angeimpft und ihr Phänotyp auf YT-Ampicillin-Platten und auf YT-Kanamycinplatten untersucht. Nach dreimaliger Wiederholung dieser Prozedur zeigten sich keine Kolonien mehr auf der Kanamycinplatte, allerdings noch auf der Ampicillin-Platte.

Man kann davon ausgehen, daß die Kolonien auf der Agarplatte nicht mehr das Kanamycinresistenzvermittelnde Plasmid pSt1-Km enthält. Eine der Kolonien der Ampicillin-Platte wurde in üN -Kultur angezogen und mehrfach auf Ampicillin- und Kanamycin-Platten ausgestrichen, um den Phänotyp zu bestätigen.

5.2 Molekularbiologische Methoden

5.2.1 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren mittels UV-Spektroskopie

Zur Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen wurde jeweils ein Aliquot in einem Spektralphotometer (Beckmann Spektralphotometer Model DU 64) vermessen. Dabei wurde das Aliquot bis zu einer Extinktion zwischen 0,1 und 1,0 verdünnt. Gemessen wurde in einer UV-Küvette. Das Spektralphotometer wurde mit dem entsprechenden Lösungsmittel kalibriert.

Die Konzentration errechnet sich aus der Extinktion bei 260 nm mittels dem folgenden, vereinfachten Zusammenhang:

$$E_{260} \text{ von } 1,0 \cong 50 \mu\text{g/ml doppelsträngige Nukleinsäuren}$$

Zur Kontrolle der Reinheit von Nukleinsäurelösungen wurden Spektren von 220 nm bis 320 nm aufgenommen. Die Reinheit einer Nukleinsäurelösung wurde über den Quotienten $\frac{E_{260}}{E_{280}}$ abgeschätzt. Für reine Nukleinsäurelösungen erwartet man einen Wert $\geq 1,8$. Verunreinigungen durch Proteine oder Phenol verringern den Wert.

5.2.2 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

5.2.2.1 Agarosegelelektrophorese

Zur analytischen und präparativen Auftrennung von Plasmid-DNA und DNA -Fragmenten wurden 0,75 bis 2,0 %ige Agarosegele [63] verwendet. Hierzu wurde eine 1x TAE-Lösung mit der entsprechenden Agarosemenge angesetzt und aufgeköcht, bis sich die gesamte Agarose gelöst hatte. Nach Abkühlen auf $\sim 60^{\circ}\text{C}$ wurde die Lösung mit $0,5 \mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid(EtBr) versetzt und als Flachbettgel (14 x 11 cm) gegossen. Nach Erstarren des Gels wurde dies in eine Laufkammer gelegt. Als Laufpuffer wurde 1x TAE-Puffer mit $0,5 \mu\text{g/ml}$ EtBr verwendet.

Die aufzutrennenden DNA-Proben wurden mit gleichem Volumen 2x TAE-Probe-Puffer versetzt und für 1-2 Stunden bei 90-110 Volt elektrophoretisch aufgetrennt. Durch die Fluoreszenz von Ethidiumbromid, das in die DNA interkaliert, konnten die Nukleinsäuren auf einem Transilluminator (Herolab UVT 2035) bei 302 nm sichtbar gemacht werden. Die Gele wurden über eine CCD-Videokamera (Sanyo) mit UV-Filter und einem Videoprinter dokumentiert.

Für präparative Gele wurde "ultrapure" Agarose verwendet. Die Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten und wie in 5.2.3 beschrieben isoliert.

5.2.3 Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Isolation eines DNA-Fragmentes aus einem Agarosegel wurde das entsprechende Fragment aus dem Gel mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten.

Dieses Agarosestück wurde in ein Eppendorfgefäß gegeben, daß vorher im Boden durchstochen und im unteren Drittel mit silanisierter Glaswolle gefüllt wurde. Das Eppendorfgefäß wird in ein größeres gestellt und dann bei 13000 rpm in einer Tischzentrifuge (Beckmann Microspin) zentrifugiert. Es wurde zentrifugiert, bis sich die wässrige Lösung aus dem Gelstück vollständig in dem größeren Eppendorfgefäß gesammelt hatte. Die Lösung enthielt die DNA des Agarosegelstücks und wurde durch Phenol/Chloroform-Extraktion (vgl. 5.2.7.1) weiter aufgereinigt.

5.2.3.1 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Die denaturierende PAGE wurde zur analytischen Auftrennung von Primer-Extension-Analysen (vgl. 5.3.4.1) verwendet. Als denaturierendes Agens wurde 7 M Harnstoff eingesetzt.

Standardmäßig wurde eine 20 %ige-Gellösung mit einer Vernetzung von 20:1, (Acrylamid:Bisacrylamid) hergestellt, wobei das Gel die Maße 390 x 335 x 0,4 mm hatte.

Vor Gebrauch wurden die Glasplatten mit Aqua dest., Aceton und Ethanol gereinigt und mit Repelcote (0,04% Dimethyldichlorsilan in Chloroform) silikonisiert. Der Gellösung wurde nach Entgasen 0,5 mM (f.c.) TEMED und APS zugegeben. Anschließend wurde die Lösung zwischen die vorbereiteten Glasplatten gegossen.

Nach dem Auspolymerisieren wurde das Gel in eine entsprechende Apparatur eingespannt. Als Laufpuffer wurde 1 x TBE verwendet. Das Gel wurde vor der Auftragung der Proben vorgeheizt (10 min 25W, 10 min 50W, 10 min 75W). Die Nukleinsäureproben wurden für 3 Minuten bei 96°C denaturiert, auf das vorgeheizte Gel aufgetragen und bei 75 W aufgetrennt.

Die aufgetrennten Proben wurden über Autoradiographie (vgl. 5.2.4.1) sichtbar gemacht.

5.2.4 Nachweis von Nukleinsäuren in PAA-Gelen

5.2.4.1 Nachweis über Autoradiographie

Radioaktiv markierte Proben in Gelen wurden durch Belichtung eines Röntgenfilms nachgewiesen.

Nach dem Gellauf wurden die denaturierenden PAA-Gele (vgl. 5.2.3.1) auf einen Röntgenfilm aufgezogen und mit einer dünnen Folie abgedeckt.

Die Belichtung eines Röntgenfilms erfolgte in einer Expositionskassette über Nacht bei -20°C.

Der Film wurde zum Entwickeln 5 Minuten in Tetenal Röntgen-Rapid-Entwickler inkubiert, für 30 Sekunden in 3% Essigsäure gewaschen und für 2-5 Minuten im Tetenal Röntgenfixierer fixiert.

5.2.4.2 Nachweis mittels Phosphoimager

Alternativ zur Autoradiographie konnten radioaktive Proben in Gelen auch durch Phosphoimager-Platten, sogenannten "Screens" nachgewiesen werden. Hierzu wurden nach dem Gellauf die denaturierten PAA-Gele (vgl. 5.2.3.1) ebenfalls auf einen Röntgenfilm gezogen und mit einer Folie abgedeckt. Anstelle eines Röntgenfilms wurde ein "Screen" auf das Gel gelegt und je nach Intensität der radioaktiv markierten Proben 1 bis 16 h inkubiert. Dabei ist die Empfindlichkeit der Phosphoimager-Platten um den Faktor 5-10 höher als bei den verwendeten Röntgenfilmen.

Anschließend konnten die "Screens" mit Hilfe des BioImagers FAS 3000 ausgelesen werden. Hierzu wurde das Programm *Image Reader Fla V1.8 E* verwendet. Mit dem Programm *Image Gauge V3.0* konnten dann die Intensitäten einzelner Banden quantifiziert werden. Diese Art der Quantifizierung von Bandenintensitäten ist weitaus genauer, als die Quantifizierung über Röntgenfilme, die mit Hilfe eines Scanners digitalisiert wurden.

Die "Screens" können nach Verwendung gelöscht und wiederverwendet werden.

5.2.5 Enzymatische Reaktionen

5.2.5.1 Restriktionshydrolyse von Plasmiden

Durch Restriktionhydrolyse ist es möglich, DNA-Moleküle an spezifischen Positionen zu schneiden. So kann man durch Analyse der erhaltenen Fragmente Schnittstellen in der DNA identifizieren.

In dieser Arbeit wurden nur Restriktionsenzyme vom Typ II [96] verwendet. Die Restriktionsenzyme vom Typ II haben sequenzspezifische Erkennungsstellen, die auch gleichzeitig die Schnittstelle enthalten. Je nach Enzym entstehen so DNA-Moleküle mit glatten Enden ("blunt end") oder an 5' oder 3' überhängende Enden ("sticky end").

Es wurden zwei Arten von Restriktionen durchgeführt: präparative und analytische Restriktionen.

In analytischen Restriktionsansätzen wurden 0,5-1 μg Plasmid-DNA in 10 μl Reaktionsvolumen restringiert. Dabei wurde der Puffer und Enzym nach Angaben des Hersteller eingesetzt. Der Ansatz wurde 2-4 Stunden bei der angegebenen Restriktionstemperatur inkubiert. Zur Analyse der Restriktion wurde der Ansatz durch ein Agarosegel oder PAA-Gel aufgetrennt.

In präparativen Ansätzen wurden 100 μg Plasmid-DNA in 100 μl Reaktionsvolumen restringiert. Hierbei wurde im Vergleich zu analytischen Restriktionen weniger Enzym eingesetzt, da die Reaktionsdauer 16 h betrug. Diese präparativen Restriktionen dienen zur Gewinnung von größeren Mengen eines DNA-Fragments. Ein solcher Restriktionsansatz wurde auf einem analytischen Agarosegel überprüft. Falls die Restriktion unvollständig war, wurde noch Enzym in den Ansatz nachgegeben und nochmals über 16 h inkubiert. Vollständig geschnittene Ansätze wurden auf präparativen Agarosegelen aufgetrennt und die gewünschten Banden isoliert (vgl. 5.2.3).

5.2.5.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation zweier DNA-Fragmente wurde die T4-DNA-Ligase verwendet. Sie katalysiert die Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit kompatiblen Ende. Dabei werden vom Hersteller für "sticky end"- und "blunt end"- Ligationen unterschiedliche Inkubationsbedingungen angegeben.

In dieser Arbeit wurden nur "sticky end"-Ligationen durchgeführt. Dazu wurden das DNA-Fragment und der Vektor, falls nicht anders angegeben, in einem molaren Verhältnis von 100:1 eingesetzt. Die eingesetzte DNA-Menge lag zwischen 10 und 50 ng. Die Ligation wurde in einem Reaktionsvolumen von 10 μl mit 1 x Ligationspuffer und 1 U der Ligase durchgeführt. Der Ansatz wurde 20 h bei 4°C inkubiert und dann unbehandelt zur Transformation eingesetzt.

1 x Ligationspuffer	66 mM Tris-HCl, pH 7,5
	5 mM MgCl_2
	1 mM DTE
	1 mM ATP

5.2.6 Isolation von Nukleinsäuren

5.2.6.1 Plasmidisolation nach Birnboim und Doly

2 ml einer üN -Kultur wurden in ein Eppendorfgesäß überführt und die Zellen für 5 min bei 12000 rpm in einer Tischzentrifuge (Beckmann Microspin) pelletiert. Der klare Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in 100 μl Lyselösung I resuspendiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 200 μl Lyselösung II und 5minütiger Inkubation auf Eis wurden 150 μl KOAc, pH 4,8 zur Fällung hinzugegeben.

Auf eine erneute 5minütige Inkubation auf Eis folgte eine 10minütige Zentrifugation der Lösung bei 12000 rpm. Dadurch pelletierten chromosomale DNA sowie Zelltrümmer und wurden so von den Plasmiden getrennt.

Der klare Überstand wurde mit 500 μ l Phenol/Chloroform extrahiert (vgl. 5.2.7.1). Nach Lyophilisation wurde das Pellet in 25 μ l Aqua dest. aufgenommen. Die Konzentration wurde entweder durch Auftragung auf einem Agarosegel abgeschätzt oder photometrisch (vgl. 5.2.1) bestimmt.

Lyselösung I	50 mM Glucose 10 mM EDTA, pH 8,0 25 mM Tris-HCl, pH 8,0 4 mg/ml Lysozymchlorid 10 μ g/ml RNase A
Lyselösung II	200 mM NaOH 1% SDS

5.2.6.2 Plasmidpräparation über das High Pure Plasmid Isolation Kit von Boehringer

Das Prinzip dieser Plasmid-Isolation beruht wie in 5.2.6.1 auf der alkalischen Hydrolyse. Die Zellen wurden aus 2-5 ml einer \bar{u} N-Kultur pelletiert und nach Entfernen des Überstandes in 250 μ l Suspensionspuffer aufgenommen. Anschließend wurden 250 μ l Lysepuffer hinzugegeben. Nach 5minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden 350 μ l Bindepuffer hinzupipettiert und das Ganze für 5 min auf Eis stehen gelassen. In einer 10minütigen Zentrifugation wurden auch hier Zelltrümmer und die chromosomale DNA entfernt.

Der Überstand wurde auf eine Filter-Tube pipettiert. Durch die Anwesenheit von chaotropen Salzen wurde die DNA an die Silicamatrix des Filter-Tube gebunden. Nach einem Waschschrift mit 500 μ l Waschpuffer wurde die DNA mit Aqua dest. von der Silica-Oberfläche gelöst.

Die Konzentration der isolierten Plasmide wurde photometrisch bestimmt. Die DNA konnte direkt in Sequenzierungen verwendet werden.

Suspensionspuffer	50 mM Tris-HCl 10 mM EDTA, pH 8 0,1 mg/ml RNase A
Lysepuffer	0,2 M NaOH 1% SDS
Bindepuffer	4 M Guanidiniumchlorid 0,5 M Kaliumacetat, pH 4.2
Waschpuffer	5 M Guanidiniumchlorid 20 mM Tris-HCl, pH 6,6 60% Ethanol

5.2.6.3 Isolation von Plasmiden im präparativen Maßstab nach Hillen et al.

800 ml YT-Medium wurden mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt, mit 8 ml einer Vorkultur angeimpft und unter Schütteln 16-18 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Zellkultur wurde auf drei JA-10 Becher verteilt und für 5 min bei 8000 rpm, 4°C (Beckmann Zentrifuge J2-21, JA10-Rotor) abzentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in insgesamt 16 ml Saccharoselösung bei 4°C resuspendiert. Nach Überführen von je 8 ml in ein Ti55.2-Röhrchen wurden je 3 ml 0,5 M EDTA und 3 ml Lysozymlösung hinzugegeben und für 15 min auf Eis inkubiert. Dann wurden je 2 ml Brij-Doc-Lösung hinzugegeben und nach weiteren 10 min Inkubation auf Eis 30 min bei 44000 rpm, 4°C (Beckman L8-55 Ultrazentrifuge, Rotor Ti55.2) zentrifugiert. Der klare Überstand wurde mit RNase A versetzt (Endkonzentration 50µg/ml) und für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurde Proteinase K (Endkonzentration 50µg/ml) hinzupipettiert und weitere 15 min bei 37°C inkubiert. Die Lösung wurde dann in JA 17-Becher überführt und mit einem halben Volumen PEG-Lösung für 30 min auf Eis gefällt. Anschließend wurde für 30 min, 10000 rpm, 4°C (Beckmann Zentrifuge, JA 17-Rotor) zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Das Pellet wurde in 5 ml TE-Puffer aufgenommen und Phenol/Chloroform extrahiert (vgl. 5.2.7.1). Nach der Fällung wurde die DNA in Aqua dest. aufgenommen und ihre Konzentration photometrisch bestimmt (vgl. 5.2.1).

Saccharose-Lösung	25% Saccharose 50 mM Tris-HCl, pH 8,0
Lysozym-Lösung	20 mg/ml Lysozymchlorid 50 mM Tris-HCl, pH 8,0
Brij-Doc-Lösung	2 Volumen 10% Brij 35 1 Volumen 10% Na-Deoxycholat, pH 8,0
RNase A	20 mg/ml in 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 frei von DNase-Aktivität
Proteinase K	20 mg/ml in Aqua dest.
PEG-Lösung	30% PEG ₆₀₀₀ in 1,5 M NaCl

5.2.6.4 Isolation chromosomaler DNA aus *E. coli*

Zur Isolation chromosomaler DNA aus *E. coli* wurde eine Methode von B. Liebig [57] beschriebene Methode angewandt.

Eine 25 ml YT-Kultur wurde mit 1/100 Volumen einer üN-Kultur des gewünschten *E. coli*-Stammes angeimpft und bei 37°C unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 bis 0,9 inkubiert. Danach wurden 2 ml der Bakterienkultur in einem Eppendorfgefäß für 3 min bei 13000 rpm zentrifugiert (Heraeus Biofuge 1.5). Das erhaltene Sediment aus Bakterienzellen wurde in 200 µl Lösung 1 und 22 µl Proteinase K-Lösung resuspendiert. Nach 10 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden 200 µl Lösung 2 zugegeben und für weitere 10 Minuten inkubiert. Es folgten vier Phenol/Chloroform-Extraktionen (s. 5.2.7.1). Hierbei wurden die Öffnungen der Pipettenspitzen erweitert, um die Zerkleinerung der chromosomalen DNA durch Scherkräfte zu vermeiden. Aufgrund der hohen Viskosität der Lösung wurde bei den Phenol/Chloroform-Extraktionen 30 Minuten anstelle von 3 Minuten zentrifugiert. Nach der Extraktion wurde die DNA wie beschrieben gefällt (s. 5.2.7.3). Die Inkubation auf -20°C erfolgte dabei über Nacht.

Das DNA-Pellet wurde anschließend in 50 µl TE-Puffer aufgenommen und nach Zu-

gabe von 2,5 μ l RNase A (200 μ g/ml, 10 mM Tris/HCl pH 8,0) 1 h bei 37°C inkubiert. Darauf folgte eine erneute Phenol/Chloroform-Extraktion. Abschließend wurde die DNA-Lösung 1 h gegen TE-Puffer dialysiert und ihre Reinheit und Konzentration sowohl spektralphotometrisch (s. 5.2.1), als auch elektrophoretisch (s. 5.2.2.1) bestimmt.

Lösung 1	50 mM Glukose 25 mM Tris-HCl, pH 8,0 10 mM EDTA
Proteinase K-Lösung	20 mg/ml Proteinase K in H ₂ O
Lösung 2	1% (w/v) SDS

5.2.6.5 Isolation von Gesamt-RNA aus *E. coli*

Gesamt-RNA aus *E. coli* wurde über eine Methode nach Schollmeier [82] isoliert. Dazu wurde eine Zellkultur bis zur gewünschten OD₆₀₀ zwischen 0,2 und 2,0 angezogen. 10 ml dieser Kultur wurden dann für 5 min bei 4°C und 6000 rpm (Heraeus Megafuge) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 0,5 ml BSCE-Puffer aufgenommen. Nach Überführen in ein Eppendorfgefäß wird die Suspension zweimal mit 60°C heißem, BSCE-gesättigtem Phenol extrahiert. Dazu wurden die Zellen nach Zugabe des heißen Phenols für 5 min bei 60°C inkubiert und danach für 5 min bei 13000 rpm (Heraeus Biofuge) zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde danach erneut mit heißem Phenol extrahiert. Im Anschluß wurde eine Chloroform-Extraktion durchgeführt, um Phenolreste zu entfernen. Danach wurde die RNA wie beschrieben gefällt (s. 5.2.7.3) und das erhaltene Pellet in TE-Puffer aufgenommen. Die Konzentration und Reinheit der präparierten RNA wurde spektralphotometrisch (s. 5.2.1) und elektrophoretisch (s. 5.2.2.1) bestimmt.

5.2.7 Aufreinigung von Nukleinsäuren

5.2.7.1 Extraktion von DNA mit Phenol und Chloroform

Zur Aufreinigung von proteinhaltigen DNA-Lösungen wurde ein Gemisch aus Phenol und Chloroform (1:1) verwendet. Dieses Gemisch wurde im gleichen Volumen zu der DNA-Lösung gegeben und etwa eine Minute lang gemischt. Zur besseren Phasentren-

nung wurde das Gemisch für 3 min bei 9000 rpm in einer Tischzentrifuge (Hettich Mikroliter) zentrifugiert und der wässrige Überstand bis zur Interphase abgenommen. Dies wurde solange wiederholt, bis keine Interphase mehr auftrat. Um verbleibende Phenolreste aus der wässrigen Phase zu entfernen, wurde abschließend einmal mit einem Volumen Chloroform extrahiert. Auf die Chloroformextraktion folgt die Fällung der DNA (vgl. 5.2.7.3).

5.2.7.2 Aufreinigung von Oligonukleotiden

Zur Aufreinigung werden 10 μg des Oligonukleotids auf einem 20% denaturierenden PAA-Gel (s. 5.2.3.1) aufgetrennt. Nach dem Gellauf wurde das Polyacrylamidgel auf eine mit Fluoreszenzindikator beschichtete Dünnschichtchromatographieplatte (DC-Alufolie Kieselgel 60 F₂₅₄, Merck) gelegt und von oben mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm bestrahlt. Der Fluoreszenzindikator wurde durch das UV-Licht zum Leuchten angeregt. An den Positionen der Nukleinsäurebanden im Gel wurde das UV-Licht durch die Nukleinsäuren absorbiert und der darunterliegende Fluoreszenzindikator wurde nicht angeregt. So konnten die Bande des Oligonukleotids identifiziert und aus dem Gel ausgeschnitten werden. Diese Methode nennt man UV-Shadowing.

Aus dem erhaltenen Gelstück wurde die DNA passiv eluiert. Das Gelstück wurde dazu über Nacht bei 4°C in 400-1000 μl Elutionspuffer geschüttelt. Danach wurde der Puffer abgenommen und die aus dem Gel diffundierte Nukleinsäure gefällt (s. 5.2.7.3). Das Pellet wurde in 15 μl TE-Puffer resuspendiert.

Elutionspuffer	250 mM Natriumacetat, pH 5,0 100 mM Tris/HCl, pH 8.0
----------------	---

5.2.7.3 Fällung von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren wurden durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 4,8) und 2,5 bis 3 Volumen absolutes Ethanol präzipitiert. Die Fällung erfolgte durch 30minütige Inkubation bei -20°C. Anschließend wurde die Lösung für 30-60 min bei 12000 rpm in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. Der ethanolische Überstand wurde vorsichtig entfernt. Das Pellet wurde mit 80% Ethanol gewaschen. Nach wiederholter Zentrifugation wurde das Pellet im Vakuumkonzentrator (Heto VR-1 Speedvac Concentrator) lyophil-

siert und in *Aqua dest.* oder TE-Puffer aufgenommen.

5.3 Spezielle Methoden

5.3.1 Bestimmung der relativen Plasmidkopienzahl

Zur Bestimmung der Plasmidkopienzahl kam eine von Zacharias und Wagner [98] beschriebene Methode in abgewandelter Form zur Anwendung.

Vor der Isolation der Plasmide wurde eine Kultur des Stammes bis in die logarithmische Phase aufgewachsen und dann eine definierte OD₆₀₀-Menge geerntet und mit einer definierten Menge einer zweiten Kultur vermischt. Der Stamm der zweiten Kultur enthielt ein Kontroll-Plasmid, daß sich im Agarosegel vom Plasmid der ersten Kultur gut unterscheiden ließ. Die Plasmide wurde dann mit dem High Pure Plasmid Isolation Kit (vgl. 5.2.6.2) isoliert.

Nach Linearisierung der isolierten Plasmide wurden diese durch ein Agarosegel aufgetrennt. Durch Quantifizierung der Bandenintensität kann aus dem Verhältnis zwischen dem Plasmid und dem Kontrollplasmid die relative Plasmidkopienzahl zu anderen derart untersuchten Plasmiden bestimmt werden.

5.3.2 Präparation von Polysomen aus *E. coli*

Für Isolation von Polysomen wurde die Methode von Godson [37] verwendet. Dazu wurden 100 ml einer Bakterienkultur angezogen und bei der gewünschten OD₆₀₀ schnell in ein Becherglas überführt, das in einem EtOH/Trockeneis-Gemisch vorgekühlt wurde. Unter ständiger Kontrolle der Temperatur über ein elektronisches Stabthermometer wurde die Bakterienkultur schnell auf 0°C abgekühlt und danach in einem ebenfalls vorgekühlten Corex-Röhrchen 3 min bei 4000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das restliche Medium vorsichtig mit einer Pipette entfernt. Das Zellpellet wurde in 400 µl 25 % Saccharoselösung, 0,01 M Tris/HCl, pH 8,1 resuspendiert und mit 100 µl Lysozymbilösung II vermischt. Nach 45 Sekunden wurde die Lösung in 400 µl Lysemix mit 15 U RNase-freier DNase I überführt und für weitere 2 min inkubiert. Zur Entfernung von Zelltrümmern wurde abschließend 5 min bei 7000 rpm zentrifugiert und der klare Überstand abgenommen. Bis zur Abtrennung der Polysomen über einen Saccharosegradienten wurde der Überstand in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

Die Dichtegradienten wurden aus jeweils 18 ml 15% bzw. 30%iger (w/v) Saccharoselösung (in 1x Gradientenpuffer mit 10 mM MgCl₂ und 3mM DTT) mittels eines Gradientenmischers in SW 28 Röhrchen gegossen. Nach dem Gießen wurden die Gradienten mindestens 1 h bei 4°C gelagert, bevor das Lysat aufgetragen wurden.

Der Gradientenlauf wurde 15 h bei 15000 rpm durchgeführt. Danach wurden die Gradienten mit einer Peristaltikpumpe (LKB Bromma 12000 Varioperpex Peristaltic-pump) vom Boden des Röhrchens ausgepumpt. Mittels eines Durchflußphotometers (LKB Bromma 2138 Uvicord S) konnten die Ribosomenfraktionen bei 280 nm detektiert werden. Ein Schreiber (LKB Bromma 2210 2-Kanal-Schreiber) ermöglichte die Dokumentation.

Die verschiedenen Ribosomenfraktionen wurden getrennt gesammelt und mit 1 Volumen absolutem Ethanol für 30 Minuten auf Eis gefällt. Nach 30minütiger Zentrifugation bei 6000 rpm wurde das Pellet zwei mal mit 80% Ethanol gewaschen und danach lyophilisiert. Das getrocknete Pellet wurde in BSCE-Puffer aufgenommen. Die Lösung wurde dann 4-5 mal mit BSCE gesättigtem Phenol extrahiert. Nach einer abschließenden Extraktion mit Chloroform wurde die RNA wie beschrieben gefällt (s. 5.2.7.3). Nach dem Lyophilisieren wurde das Pellet in TE-Puffer aufgenommen und die Qualität der Präparation auf einem Agarosegel überprüft (s. 5.2.2.1). Die Konzentration wurde spektralphotometrisch bestimmt (s. 5.2.1). Zur Kontrolle wurde auch immer die Gesamt-RNA aus einem Aliquot des Lysates vor dem Gradientenlauf präpariert.

Lysozymlösung II	1,7 ml/ml Lysozymchlorid 125 mM Tris/HCl, pH 8,0 4 mM EDTA
Lysemix	1,25% (w/v) Brij 58 25 mM MgSO ₄ 0,5% (w/v) Desoxycholat 50 mM Tris/HCl, pH 8,1

10x Gradientenpuffer	500 mM Tris/HCl, pH 7,8 500 mM KCl 10 mM MgCl ₂
15% - 30% (w/v) Saccharoselösung	19,5 g bzw. 39 g Saccharose 13 ml 10x Gradientenpuffer 390 µl DTT 1M ad 130 ml mit <i>Aqua dest.</i>

5.3.3 Phosphorylierung von DNA-Oligonukleotiden (5'-Endmarkierung mit γ [P³²]ATP)

Synthetische Oligonukleotide besitzen aufgrund ihres Herstellungsprozesses kein 5'-Phosphat und können deshalb ohne vorangegangene Dephosphorylierung mit einer Kinase phosphoryliert werden. Dies wurde genutzt, um Oligonukleotide radioaktiv zu markieren.

Mit der T4-Polynukleotidkinase lassen sich Phosphatreste an endständige 5'-Hydroxygruppen anfügen. Als Substrat wurde γ [P³²]ATP verwendet, so daß eine radioaktive Phosphatgruppe übertragen wurde.

In einem Gesamtvolumen von 20 µl wurden 10 pmol des zu markierenden Oligonukleotids und 1 U T4-Polynukleotidkinase in 1x Kinase-Puffer für 45 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde die T4-Polynukleotidkinase durch 10minütige Inkubation bei 68°C inaktiviert. Anschließend wurden die Oligonukleotide nach Zugabe von 1 µl Glykogen [20 µg/ml], 1/10 Volumen 7,5 M Ammoniumacetat (pH 5,0) und 3 Volumen EtOH *abs.* auf flüssigem Stickstoff gefällt. Nach 30minütiger Zentrifugation bei 12000 rpm (Heraeus) wurde das erhaltene Pellet mit 80%igem Ethanol gewaschen und erneut für 30 min zentrifugiert. Das Pellet wurde danach an der Luft getrocknet und anschließend in 20 µl TE-Puffer aufgenommen und mehrere Stunden unter Schütteln vollständig gelöst.

Um die Effizienz der Markierung zu überprüfen, wurde ein 1 µl Aliquot des markierten Oligonukleotids im Szintillationszähler (Beckman LS 5000 TD) gemessen. Für die nachfolgenden Primer-Extension-Reaktionen (s. 5.3.4.1) wurden ca. 8×10^5 bis 2×10^6 cpm des jeweiligen Oligonukleotids eingesetzt.

1 x Kinase-Puffer	50 mM Tris-HCl, pH 7,6
	5 mM DTT ₂
	10 mM MgCl ₂
	0.1 mM EDTA, pH 8,0

5.3.4 Primer-Extension-Analysen

5.3.4.1 Primer-Extension von RNA mit Reverser Transkriptase

Die Primer-Extension-Reaktion wurde ähnlich der von Siegmund [85] beschriebenen Methode durchgeführt. Sie dient der indirekten Analyse von RNAs. Dabei dient die eingesetzte RNA als Matrize für eine *copy*-DNA (cDNA), die in einer *in vitro*-Synthese durch eine Reverse Transkriptase gebildet wird. Die Reverse Transkriptase ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, und so in der Lage Primer, die an eine RNA hybridisiert sind zu, verlängern.

Der eigentlichen Primer-Extension-Reaktion geht somit immer eine Hybridisierung voraus. Hierzu wurden 100 ng RNA mit 8×10^5 bis 2×10^6 cpm eines radioaktiv markierten Oligonukleotids in 100 mM KCl, 50 mM Tris/HCl, pH 8.0 in einem Gesamtvolumen von $4,5 \mu\text{l}$ bei 68°C für 3 min inkubiert. Danach wurde der ganze Ansatz langsam, d.h. ca. $1^\circ\text{C}/\text{min}$, auf Raumtemperatur abgekühlt.

$2 \mu\text{l}$ dieses Hybridisierungsansatzes werden mit $1 \mu\text{l}$ 5x PE-Puffer und $2 \mu\text{l}$ einer 4 dNTP-Lösung versetzt, die 1 U der AMV-Reversen Transkriptase enthält. Dieser Primer-Extension-Ansatz wurde dann 30 min bei 42°C inkubiert. Durch Zugabe von $5 \mu\text{l}$ Formamid-Probenpuffer wurde die Reaktion gestoppt. Die Primer-Extension-Produkte wurden nach Denaturierung (3 min, 96°C) auf 20%igen, denaturierenden PAA-Gelen (s. 5.2.3.1) aufgetrennt.

5x PE-Puffer	125 mM Tris-HCl, pH 8,3 250 mM KCl 50 mM MgCl ₂ 50 mM DTT 2,5 mM Spermidin
4 dNTP-Lösung	je 250 μ M dATP, dCTG, dGTP, dTTP und eine Ein- heit AMV-Reverse Transkrip- tase pro Ansatz in 10 mM Tris/HCl, pH 7,5

5.3.4.2 Primer-Extension-Analysen mit stringentem Abbruch

Diese Variante der Primer-Extension-Reaktion (s. 5.3.4.1) basiert auf der Verwendung eines ddNTPs anstelle eines dNTPs. Ersetzt man z.B. dATP durch ddATP in der Primer-Extension, so bricht diese an der nächsten Position, an der ein Adenin eingebaut werden müßte, ab. Liegen bei der Reaktion verschiedene RNAs vor, die an den Primer hybridisieren können, so erzeugen diese, abhängig von ihrer Sequenz, unterschiedliche Abbruchprodukte. Dies ermöglicht es, zwischen RNA-Molekülen, die nur in wenigen Sequenzpositionen variieren, zu unterscheiden. Diese Methode wurde genutzt, um zwischen den rRNAs verschiedener Operons zu unterscheiden.

5.3.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR [67] dient zur selektiven *in vitro* Anreicherung von Nukleinsäurefragmenten definierter Sequenz und Länge aus einem Gemisch von Nukleinsäuremolekülen. Bei diesem Verfahren wird die Hitzestabilität der *Taq*-DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* ausgenutzt, deren Temperaturoptimum über 70°C liegt. Mit Hilfe dieses Enzyms, der Hitzedenaturierung der Template-DNA und zweier synthetischer Oligonukleotide, die an komplementäre Bereiche dieser Template-DNA binden, kann ein definierter Sequenzbereich nach mehreren Zyklen von Denaturierung, Oligo-Hybridisierung und Polymerisation millionenfach amplifiziert werden. Da die *Taq*-Polymerase keine 3'→5'-Exonukleaseaktivität ("proofreading") besitzen, kann alternativ *Pfu*-DNA-Polymerase verwendet

werden. Dieses Enzym besitzt im Gegensatz zur *Taq*-DNA-Polymerase eine 3'→5'-Exonukleaseaktivität, die im Vergleich eine um Faktor 12 höhere Genauigkeit der Polymerase zur Folge hat [61]. Die Fehlerrate der *Taq*-Polymerase liegt bei 1/9000.

Für PCR wurde in einem Volumen von 50 μ l 10 ng Template-DNA eingesetzt. 5 pmol jedes Oligonukleotids wurden eingesetzt und jedes dNTP in einer Endkonzentration von 200 μ M. Von der *Pfu*-Polymerase wurden 1,25 U eingesetzt. Nach Mischen des Ansatzes wurde dieser mit 30 μ l Paraffinöl überschichtet. Der Ansatz wurde anschließend in einem Thermozykler inkubiert.

Zu Beginn der Inkubation wurde 2 min bei 94°C denaturiert. Die folgenden 30 Zyklen bestanden aus 2 sec 94°C, 1 min 94 °C, 2 sec 48°C, 1 min 48°C, 2 sec 72°C und 1 min 72°C.

Die 2 Sekunden-Intervalle mußten aus programmiertechnischen Gründen durchgeführt werden. Nach Ablauf der Zyklen wurde 10 min bei 72°C weiterinkubiert und innerhalb von 30 min langsam auf 4°C abgekühlt.

Die Hybridisierungstemperatur wurde aus den Angaben des Herstellers und darauf basierender analytischer PCR-Ansätze bei verschiedenen Hybridisierungstemperaturen ermittelt. In den meisten Fällen lieferte eine Hybridisierungstemperatur von 10-15°C unter der niedrigsten Schmelztemperatur der Primer gute Ergebnisse.

Nach der Reaktion wird der PCR-Ansatz ohne Paraffinöl in ein neues Eppendorfgefäß überführt und Phenol/Chloroform extrahiert (vgl.5.2.7.1). Die Reaktionsprodukte wurden auf einem PAA-Gel analysiert.

Bei der Amplifikation von sehr langen PCR-Fragmenten (über 5 kB) wurde anstelle der *Pfu*-Polymerase, die *Pfu*-Turbo-Polymerase verwendet, die eine höhere Thermostabilität aufweist. Diese PCR-Reaktionen wurden in einem Volumen von 100 μ l durchgeführt, mit 1-2 μ g genomischer Template-DNA. Die anderen Komponenten wurden dem erhöhten Volumen entsprechend angepaßt. Die Inkubationszyklen wurden wie folgt geändert:

Zu Beginn der Inkubation wurde 2 min bei 94°C denaturiert. Die folgenden 30 Zyklen bestanden aus 2 sec 94°C, 1 min 94 °C, 2 sec und danach 1 min bei einer entsprechenden Hybridisierungstemperatur, 2 sec 72°C und 15 min 72°C. Nach Ablauf der Zyklen wurde 15 min bei 72°C weiterinkubiert und innerhalb von 30 min langsam auf 4°C abgekühlt.

10 x *Pfu*-Puffer

100 mM KCl

200 mM Tris-HCl, pH 8,8

100 mM (NH₄)₂SO₄

20 mM MgSO₄

1000 µg/ml BSA

1% Triton X-100

6 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
A ₂₆₀	Absorption bei 260 nm
A ₂₈₀	Absorption bei 280 nm
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Acet	Acetat
AMV	<i>Avian myeloblastosis virus</i>
ATP	Adenosintriphosphat
bzw.	beziehungsweise
C	Cytidin
cDNA	copyDNA
cmp	“counts per minute”
CTP	Cytidintriphosphat
°C	Grad Celsius
ddNTP	Didesoxyribonukleinsäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiotheritol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
f.c.	“final concentration”
FIS	“factor of inversion stimulation”
G	Guanosin
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde

kb	Kilobasenpaare
l	Liter
LRP	“Leucine-responsive regulatory Protein”
m	milli (10^{-3})
M	Mol pro Liter
min	Minute
mg	Milligramm
mM	Millimolar
μ	mikro (10^{-6})
μ M	Mikromolar
n	nano (10^{-9})
ng	Nanogramm
PAA	Polyacrylamid
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Primer-Extension
PEG	Polyethylenglycol
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
rrn	ribosomale Transkriptionseinheit
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
ss	einzelsträngig
T	Thymin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
UE	Untereinheit
üN	über Nacht
UTP	Uraciltriphosphat
UV	ultraviolett

V

Volt

VIS

visible

W

Watt

w/v

'weight per volume' (Gewichtsprozent)

Literaturverzeichnis

- [1] H. Afflerbach, O. Schröder, and R. Wagner. Conformational changes of the upstream DNA mediated H-NS and FIS regulate *E. coli* *rrnB* P1 promoter activity. *J. Mol. Biol.*, 286:339–353, 1998.
- [2] A. Aiyar. The use of CLUSTAL W and CLUSTAL X for multiple sequence alignment. *Methods Mol Biol.*, 132:221–241, 2000.
- [3] B. Albrechtsen, B.M. Ross, C. Squires, and C.L. Squires. Transcriptional termination sequence at the end of the *Escherichia coli* ribosomal RNA G operon: complex terminators and antitermination. *Nucleic Acids Res*, 19:1845–1852, 1991.
- [4] T. Asai, C. Condon, J. Voulgaris, D. Zaporozhets, B. Shen, M. Al-Omar, C. Squires, and C.L. Squires. Construction and initial characterization of *Escherichia coli* strains with few or no intact chromosomal rRNA operons. *J. Bacteriol.*, 181:3803–3809, 1999.
- [5] B.J. Bachmann. Derivations and genotypes of some mutant derivatives of *E. coli* K12. In: *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: cellular and molecular biology*. J.L. Ingraham, K.B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter and H.E. Umberger (eds), American Society for Microbiology, Washington D.C., pages 1191–1219, 1987.
- [6] C.A. Ball, R. Osuna, K.C. Ferguson, and R.C. Johnson. Dramatic changes in Fis levels upon nutrient upshift in *Escherichia coli*. *J Bact.*, 174:8043–56, 1992.
- [7] E.V. Bausk, D.M. Graifer, and G.G.Karpova. Study of the photoaffinity modification of *Escherichia coli* ribosomes near the donor tRNA-binding center. *Mol Biol (Mosk)*., 19:542–552, 1985.

-
- [8] J.H. Beidler, P.R. Hillard, and R.L. Rill. Ultrasensitive straining of nucleic acids with silver. *Anal. Biochem.*, 126:374–380, 1982.
- [9] W. Besancon and R. Wagner. Characterization of transient RNA-RNA interactions important for the facilitated structure formation of bacterial ribosomal 16S RNA. *Nucl. Acid Res.*, 27:4353–4362, 1999.
- [10] H. Birnboim and J. Doly. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acid Res.*, 7:1513–1523, 1979.
- [11] F.R. Blattner, G. Plunkett III, C.A. Bloch, N.T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, C.K. Rode, G.F. Mayhew, J. Gregor, N.W. Davis, H.A. Kirkpatrick, M.A. Goede, D.J. Rose, B. Mau, and Y. Shao. The complete genome sequence of *Escherichia coli*. *Science*, 277:1453–1462, 1997.
- [12] K. Bott, G.C. Stewart, and A.G. Anderson. In J.A. Hoch and A.T. Ganesan(eds) *Syntro Conference on Genetics and Biotechnology of Bacilli*. Academic Press, Inc, New York, pages 19–34, 1984.
- [13] J.P. Bouche, L. Rowen, and A. Kornberg. The RNA primer synthesized by primase to initiate phage G4 DNA replikation. *J. Biol. Chem.*, 253:765–769, 1978.
- [14] H.W. Boyer and D.A. Roulland-Dussoix. A complementation analysis of the restriktion and modification of DNA in *E. coli*. *J. Mol. Biol.*, 41:459, 1986.
- [15] H. Bremer and G. Churchward. An examination of the Cooper-Helmstetter theory of DNA replication in bacteria and its underlying assumptions. *J Theor Biol.*, 69:645–654, 1977.
- [16] D.E. Brodersen, W.H. Clemons Jr, A.P. Carter, B.T. Wimberly, and V. Ramakrishnan. Crystal structure of the 30S ribosomal subunit from *Thermus thermophilus*. *J. Mol. Biol.*, 316:725–768, 2000.
- [17] J. Brosius, T.J. Dull, D.D. Sleeter, and H.F. Noller. Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, 148:107–124, 1981.
- [18] M.J. Casadaban. Transposition and fusion of the lac genes to selected promoters in escherichia coli using bacteriophage lambda and Mu. *J Mol Biol*, 104:541–555, 1976.

- [19] M.G. Chandler and R.H. Pritchard. The effect of gene concentration and relative gene dosage on gene output in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet.*, 138:127–141, 1975.
- [20] C. Condon, S. French, C. Squires, and C.L. Squires. Depletion of functional ribosomal RNA operons in *Escherichia coli* causes increased expression of the remaining intact copies. *EMBO J.*, 12:4305–4315, 1993.
- [21] C. Condon, D. Liveris, C. Squires, I. Schwartz, and C.L. Squires. rRNA operon multiplicity in *Escherichia coli* and the physiological implications of *rrn* inactivation. *J. Bact.*, 177:4152–4156, 1995.
- [22] C. Condon, J. Phillips, Z.Y. Fu, and C.L. Squires. Comparison of the expression of the seven ribosomal RNA operons in *Escherichia coli*. *EMBO J.*, 11:4175–4185, 1992.
- [23] S. Cooper and C.E. Helmstetter. Chromosome replication and the division cycle of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, 31:519–540, 1968.
- [24] A.R. Cukras, D.R. Southworth, J.L. Brunelle, G.M. Culver, and R. Green. Ribosomal proteins S12 and S13 function as control elements for translocation of the mRNA:tRNA complex. *Mol Cell*, 12:321–328, 2003.
- [25] M. Dagert and S.D. Ehrlich. Prolonged incubation in calcium chlorid improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene*, 6:23–26, 1979.
- [26] H.K. Das and A. Goldstein. Limited capacity for protein synthesis at zero degrees centigrade in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, 31:209–226, 1968.
- [27] M. Ellwood and M. Nomura. Chromosomal location of genes for rRNA in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.*, 149:458–468, 1982.
- [28] F. Engbaek, N.O. Kjeldgaard, and O. Maaloe. Chain growth rate of beta-galactosidase during exponential growth and aminoacid starvation. *J. Mol. Biol.*, 75:109–118, 1973.
- [29] G. La Fauci, R.L. Widom, E.D. Jarvis, and R. Rudner. Mapping of rRNA genes with integrable plasmids in *Bacillus subtilis*. *J. Bact.*, 165:204–214, 1986.
- [30] S. French. Consequences of replication fork movement through transcription units *in vivo*. *Science*, 258:1362–1365, 1992.

- [31] R.C. Gallo and L. Montagnier. The cronology of AIDS research. *Nature*, 326:435–436, 1987.
- [32] K. Gausing. Regulation of ribosome production in *Escherichia coli*: synthesis and stability of ribosomal RNA and ribosomal protein messenger RNA at different growth rates. *J. Mol. Biol.*, 115:335–354, 1977.
- [33] K. Gausing, G. Chamblis, G.R. Craven, J. Davies, K. Davis, L. Kahan, and M. Nomura. Regulation of ribosome synthesis in *Escherichia coli*. In *Ribosomes: Structure, Function and Genetics*, pages 693–718, 1980.
- [34] W. Gilbert. The RNA world. *Nature*, 319:618, 1986.
- [35] O.I. Gimautdinova, G.G. Karpova, D.G. Knorre, and N.D. Kobetz. The proteins of the messenger RNA binding site of *Escherichia coli* ribosomes. *Nucleic Acids Res*, 9:3465–3481, 1981.
- [36] A.M. Giuliadori, A. Brandi, C.O. Gualerzi, and C.L. Pon. Preferential translation of cold-shock mRNAs during cold adaptation. *RNA*, 10:265–276, 2004.
- [37] G.N. Godson and R. Sinsheimer. Use of brij lysis as a general method to prepare polysomes from *Escherichia coli*. *Bioch. Bioph. Acta*, 149:489–495, 1967.
- [38] R. Green, C. Switzer, and H.F. Noller. ribosome-catalysed peptide-bond formation with an A-site substrate covalently linked to 23S ribosomal RNA. *Science*, 280:286–289, 1998.
- [39] C.A. Gross. Function and regulation of the heat shock proteins. In: *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: cellular and molecular biology*. J.L. Ingraham, K.B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter and H.E. Umbarger (eds), American Society for Microbiology, Washington D.C., pages 1382–1399, 1987.
- [40] J.H. Gunderson, M.L. Sogin, G. Wollett, M. Hollingdale, V.F. de la Cruz, A.P. Waters, and T.F. McCutchan. Structurally distinct, stage-specific ribosomes occur in *Plasmodium*. *Science*, 238:933–937, 1987.
- [41] A. El Hage, M. Sbai, and J.H. Alix. The chaperonin GroEL and other heat-shock proteins, besides DnaK, participate in ribosome biogenesis in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet*, 264:796–808, 2001.

- [42] D. Hanahan. Techniques for transformation of *Escherichia coli*. in *DNA cloning* (D.M. Glover, ed.), 1:121–124, 1985.
- [43] M. Heinemann and R. Wagner. Guanosin 3', 5'-bis(diphosphate)(ppGpp)-dependent inhibition of transcription from stringent controlled *Escherichia coli* promoters can be explained by an altered initiation pathway that traps RNA polymerase. *Eur. J. Biochem.*, 247:990–999, 1997.
- [44] W.A. Held, B. Ballou, S. Mizushima, and M. Nomura. Assembly mapping of 30S ribosomal proteins from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 249:3109–3111, 1974.
- [45] W.A. Held, S. Mizushima, and M. Nomura. Reconstitution of *Escherichia coli* 30S ribosomal subunits from purified molecular components. *J. Biol. Chem.*, 248:5720–5730, 1973.
- [46] C.W. Hill. Large genomic sequence repetitions in bacteria: lessons from rRNA operons and *Rhs* elements. *Res. Microbiol.*, 150:665–674, 1999.
- [47] A. Hillebrand. Transkriptionsfaktor- und wachstumsabhängige Regulation der sieben verschiedenen ribosomalen RNA-Operons in *Escherichia coli*. *Dissertation, Düsseldorf*, 2001.
- [48] W. Hillen, R.D. Klein, and R.D. Wells. Preparation of milligram amounts of 21 DNA restriction fragments. *Biochemistry*, 29:2007–2012, 1981.
- [49] I. Hui and P.P. Dennis. Characterization of the ribosomal RNA gene clusters in *Halobacterium cutirubrum*. *J. Biol. Chem.*, 260:899–906, 1985.
- [50] L.S. Kaguni and I.R. Lehman. Eukaryotic DNA polymerase-primase: structure, mechanism and funktion. *Biochim. Biophys. Acta*, 950:87–101, 1988.
- [51] T.C. King, R. Sirdeskmukh, and D. Schlessinger. S1 nuclease mapping analyses of ribosomal RNA processing in wild type and processing deficient *E. coli*. *J. Biol. Chem.*, 258:12034–12042, 1983.
- [52] J.A. Klappenbach, P.R. Saxman, J.R. Cole, and T.M. Schmidt. rrndb: the ribosomal RNA operon copy number database. *Nucleic Acids Res.*, 29:181–184, 2001.
- [53] A. Kornberg. Mechanism of replikation of the *E. coli* chromosome. *Europ. J. Biochem.*, 137:52–64, 1983.

-
- [54] R.M. Lacatena and G. Cesarini. Base pairing of RNA I with its complementary sequenz in the primer precursor ColE1 replikation. *Nature*, 294:623–626, 1981.
- [55] J. Langowski, K. Henco, D. Riesner, and H.L. Sanger. Common structural features of different viroids: serial arrangement of double helical sections and internal loops. *Nucl. Acid Res.*, 5:1589–1610, 1978.
- [56] B.T. Lewicki, T. Margus, J. Remme, and K.H. Nierhaus. Coupling of rRNA transcription and ribosomal assembly in vivo. Formation of active ribosomal subunits in *Escherichia coli* requires transcription of rRNA genes by host RNA polymerase which cannot be replaced by bacteriophage T7 RNA polymerase. *J Mol Biol*, 231:581–591, 1993.
- [57] B. Liebig. Quantitative Analysen der ribosomalen RNA-Expressionsmuster des Bakteriums *Escherichia coli* unter verschiedenen Wachstumsbedingungen. *Dissertation, Dusseldorf*, 1996.
- [58] B. Liebig and R. Wagner. 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, 1995.
- [59] L. Lindahl and J.M. Zengel. Ribosomal genes in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Genet.*, 249:328–335, 1986.
- [60] E.O. Long and I.B. Dawid. Repeated genes in eukaryotes. *Annu. Rev. Biochem.*, 49:727–764, 1980.
- [61] K.S. Lundberg, D.D. Shoemaker, M.W. Adams, J.M. Short, J.A. Sorge, and E.J. Mathur. High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *pyrococcus furiosus*. *Gene*, 108:1–6, 1991.
- [62] J.A. Maki, D.J. Schnobrich, and G.M. Culver. The DnaK chaperone system facilitates 30S ribosomal subunit assembly. *Molec. Cell*, 10:129–138, 2002.
- [63] T. Maniatis, E.F. Fritsch, and J. Sambrook. Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor, New York*, 1982.
- [64] A.G. Marr. Growth rate of *Escherichia coli*. *Microbiol Rev.*, 55:316–333, 1991.

- [65] B. Matkovic, A. Herzog, A. Bollen, and L. Topisirovic. Translational fidelity in *Escherichia coli*: antagonistic effects of *neaA* and *ramC* gene products on the ribosome function. *Mol Gen Genet*, 179:135–9, 1980.
- [66] H. Mori, C. Dammel, E. Becker, K. Triman, and H.F. Noller. Single base alterations upstream of the *E. coli* 16S RNA coding region results in temperature sensitive 16S RNA expression. *Biochim. Biophys. Acta*, 1050:323–327, 1990.
- [67] K.B. Mullis and F. Faloon. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Meth. Enzymol.*, 155:335–350, 1987.
- [68] J.-M. Neefs, Y. Van de Peer, and R. De Wachter. Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. *Nucl. Acid Res.*, 18:2237–2240, 1990.
- [69] O. Ninnemann, C. Koch, and R. Kahmann. The *E. coli fis* promoter is subject to stringent control and autoregulation. *EMBO J.*, 11:1075–1083, 1992.
- [70] H.F. Noller. Peptidyl transferase: Protein, ribnukleoprotein, or RNA ? *J. Bacteriol.*, 1993.
- [71] H.F. Noller, V. Hoffarth, and L. Zimniak. Unusual resistance of peptidyl transferase to protein extraction procedures. *Science*, 256:1416–1419, 1992.
- [72] M. Nomura. Engineering of bacterial ribosomes: Replacement of all seven *Escherichia coli* rRNA operons by a single plasmid-encoded operon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:1820–1822, 1999.
- [73] M. Ohnishi, T. Murata, K. Nakayama, S. Kuhara, M. Hattori, K. Kurokawa, T. Yasunaga, K. Yokoyama, K. Makino, H. Shinagawa, and T. Hayashi. Comparative analysis of the whole set of rRNA operons between an enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Sakai strain and an *Escherichia coli* K-12 strain MG1655. *Syst Appl Microbiol.*, 23:315–324, 2000.
- [74] C.W.A. Pleij, K. Rietveld, and L. Bosch. A new principle of RNA folding based on pseudoknotting. *Nucl. Acid Res.*, 13:1717–1731, 1985.
- [75] C. Pohl. Differentielle Regulation der Transkription bakterieller, ribosomaler RNA-Operons unter Bedingungen der stringenter Kontrolle. *Diplomarbeit, Düsseldorf*, 2000.

- [76] T. Powers and H.F. Noller. Hydroxyl radical footprinting of ribosomal proteins on 16S rRNA. *RNA*, 1:194–209, 1995.
- [77] A. Rich and S.H. Kim. The three-dimensional structure of transfer RNA. *Scientific America*, 238:52–62, 1978.
- [78] W. Ross, J.F. Thompson, J.T. Newlands, and R.L. Gourse. *E. coli* FIS protein activates ribosomal RNA transcription *in vitro* and *in vivo*. *EMBO J.*, 9:3733–3742, 1990.
- [79] M. Ryden-Aulin, Z. Shaoping, P. Kylsten, and L.A. Isaksson. Ribosome activity and modification of 16S RNA are influenced by deletion of ribosomal protein S20. *Mol Microbiol*, 7:983–992, 1993.
- [80] T.M. Schmidt. Multiplicity of ribosomal RNA operons in prokaryotic genomes. In *F.J. deBruijn, J.R. Lupski and G.M. Weinstock (eds) Bacterial genomes: physical structure and analysis, Chapman and Hall, New York*, pages 221–229, 1997.
- [81] M. Schmitz and G. Steger. Base pair probability profiles of RNA structures. *Comput. Applic. Biosci.*, 8:389–399, 1992.
- [82] K. Schollmeier. Molekulare Struktur Transposon Tn10 kodiert Tetracyclin-resistenzgene und die Regulation der Transkription. *Dissertation, Düsseldorf*, 1985.
- [83] I.N. Serdyuk and A.S. Spirin. Structural dynamics of the translation ribosome. In *B.H. Hardesty, G. Kramer (eds.) Structure, Function, and Genetics of Ribosomes, Springer-Verlag, Berlin*, 1986.
- [84] M. Shimizu and G.R. Craven. Chemical inactivation of *Escherichia coli* 30S ribosomes by iodination. identification of proteins involved in tRNA binding. *Eur J Biochem.*, 61:307–315, 1976.
- [85] C.D. Siegmund, M. Ettayebi, A. Borden, and E. Morgan. Antibiotic resistance mutations in ribosomal RNA genes of *Escherichia coli*. *Methods Enzymol*, 164:673–690, 1988.
- [86] D.R. Southworth, J.L. Brunelle, and R. Green. EFG-independent translocation of the mRNA:tRNA complex is promoted by modification of the ribosome with thiol-specific reagents. *J. Mol. Biol*, 324:611–623, 2002.

- [87] M. Sribar. Einfluß unterschiedlicher Wachstumsbedingungen auf die heterologe Zusammensetzung der rRNAs in bakteriellen Ribosomen. *Diplomarbeit, Düsseldorf*, 2002.
- [88] H.A. Thieringer, P.G. Jones, and M. Inouye. Cold shock and adaptation. *BioEssays*, 20:49–57, 1998.
- [89] R. Wagner. The regulation of ribosomal RNA synthesis and bacterial cell growth. *Arch. Microbiol.*, 161:100–109, 1994.
- [90] R. Wagner, G. Theißen, and M. Zacharias. Regulation of the ribosomal RNA synthesis and control of ribosome formation in *E. coli*. *Plenum Publishing Corporation, New York*, page 1, 1986.
- [91] M.H.W. Weber and M.H. Marahiel. Bacterial cold shock responses. *Sci. Prog.*, 86:9–75, 2003.
- [92] R.M. Williams and S. Rimsky. Molecular aspects of the *E. coli* nucleoid protein, H-NS: a central controller of gene regulatory networks. *FEMS Microbiol. Letters*, 156:175–185, 1997.
- [93] B.T. Wimberly, D.E. Brodersen, W.M. Clemons Jr, R.J. Morgan-Warren, A.P. Carter, T. Hartschk C. Vonnheinß, and V. Ramakrishnan. Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature*, 407:327–339, 2000.
- [94] C. Yanisch-Peron, J. Vieira, and L. Messing. Improved M13 mp18pUC19 vectors. *Gene*, 122:9–15, 1985.
- [95] R.A. Young and J.A. Steitz. Complementary sequences 1700 nucleotides apart from a ribonuclease III cleavage site in *E. coli* ribosomal precursor RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75:3593–3597, 1978.
- [96] M. Zabeau and R. Roberts. in *Molecular Genetics* (Taylor, J.H.Ed.). *Academic Press, New York*, pages 1–63, 1979.
- [97] M. Zacharias, H.U. Göringer, and R. Wagner. Influence of the GCGC discriminator motif introduced into the ribosomal RNA P2- and tac promoter on growth rate control and stringent control. *EMBO J.*, 11:3357–3363, 1989.

- [98] M. Zacharias and R. Wagner. Deletion in the t_l structure upstream to the rRNA genes in the *E. coli rrnB* operon causes transcription polarity. *Nucl. Acid Res.*, 15:8235–8248, 1987.