Charakterisierung zellulärer Interaktionspartner der 6S RNA aus *Escherichia coli* und Analyse des 6S RNA Regulationsnetzwerks

Inaugural-Dissertation

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

> vorgelegt von Sabine Schneider aus Düsseldorf

Düsseldorf, Mai 2014

Aus dem Institut für Physikalische Biologie der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

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

Referent: Prof. Dr. R. Wagner

Koreferent: Prof. Dr. J. Ernst

Tag der mündlichen Prüfung: 23.06.2014

Zusammenfassung

Die 6S RNA aus *E. coli* ist eine stabile regulatorische RNA mit einer charakteristischen hoch konservierten Sekundärstruktur, die sowohl an die σ^{70} -assoziierte RNA-Polymerase als auch an das RNA-Chaperon Hfq bindet. Sie reguliert die Anpassung der Genexpression zwischen der logarithmischen- und stationären Wachstumsphase.

Um einen Einfluss des RNA-Chaperons Hfq auf die Expression der 6S RNA aufzuklären, wurden zelluläre 6S RNA Konzentrationsbestimmungen durchgeführt und die *ssrS*-Promotoraktivität in An- und Abwesenheit von Hfq untersucht. In Abwesenheit von Hfq konnte besonders in der logarithmischen Phase eine erhöhte Konzentration an 6S RNA gezeigt werden und im Gegensatz dazu eine erniedrigte *ssrS*-Syntheseaktivität. Diese Ergebnisse weisen auf ein kompliziertes regulatorisches Netzwerk hin, an dem vermutlich Änderungen der 6S RNA Stabilität beteiligt sind. Um weitere Wechselbeziehungen aufzuzeigen, sollte der globale Regulator ppGpp, der nachweislich mit der Funktion der 6S RNA gekoppelt ist ebenfalls analysiert werden. Messungen des ppGpp-Spiegels haben gezeigt, dass in Abwesenheit von Hfq die basale ppGpp-Konzentration in der Zelle erniedrigt ist. Um den Zusammenhang zwischen der 6S RNA und dem basalen ppGpp-Level genau zu verifizieren, wurden in An- und Abwesenheit von 6S RNA mit Hilfe eines Inhibitors der GMP-Synthetase, der eine Reduktion des GTP-Levels auslösen sollte, exakte Konzentrationsmessungen des ppGpp-Spiegels durchgeführt. Diese Untersuchungen ergaben keine deutlichen Unterschiede, was darauf hin deutet, dass die Wechselbeziehung zwischen der 6S RNA und ppGpp nicht mit dem zellulären GTP-Level in Zusammenhang steht.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde eine Suche nach zellulären Interaktionspartnern der 6S RNA durchgeführt. Dazu wurde erfolgreich eine *in vitro pull down* Methode etabliert und mehrere Proteine gefunden, deren Identität durch MALDI-TOF-Analysen ermittelt wurde. Für das reproduzierbar gefundene Protein PGK (das glykolytische Enzym Phosphoglycerat Kinase) konnte durch *in vitro* Bindestudien eine RNA-Bindungsaffinität, die 6S RNA, tRNA und pRNA einschließt nachgewiesen werden. ATP-Kompetitionsexperimente legen eine Erkennung der RNA durch die ATP-Bindestelle nahe. Footprint Analysen zeigen eine Bindung von PGK an die einzelsträngige Region der 6S RNA, die *central bubble*. Durch LC-MS-Analysen vom *pull down* Eluat konnten darüber hinaus einige ribosomale Proteine detektiert werden. Eine direkte Bindung der 6S RNA an 70S Ribosomen ließ sich jedoch durch mehrere *in vitro* Techniken nicht bestätigen, was eine Bindung an einzelne ribosomale Proteine nicht ausschließt.

Summary

6S RNA from *E. coli* is a stable regulatory RNA with a characteristic highly conserved secondary structure, which binds to both the associated σ^{70} RNA polymerase as well as to the RNA chaperone Hfq. 6S RNA regulates the adaptation of gene expression at the transition from logarithmic- to stationary growth.

To explain the influence of the TNA chaperone Hfq on the expression of 6S RNA the cellular levels of 6S RNA and the *ssrS*-promoter activities were studied in the presence and absence of Hfq. In contrast, a reduced *ssrS*-synthesis activity was found, particularly in the logarithmic phase. The results point to a complex regulatory network, likely involving alterations of the 6S RNA stability. To unravel potential interrelations the global regulator ppGpp, known tob e linked to 6S RNA function, should be also investigated. Measurements of ppGpp level revealed that in the absence of Hfq the basel ppGpp concentration in the cell is lowered. In order to better runderstand the relation between the 6S RNA and the basal ppGpp level, exact measurements of the ppGpp level were performed in the presence and absence of 6S RNA using an inhibitor of GMP synthetase, suggesting that the interconnection between 6S RNA and ppGpp is not associated to the cellular GTP level.

In the second part of this work a search for additional cellular interaction partners that potentially bind to 6S RNA was performed. To this aim an *in vitro pull down* method was successfully established. Several proteins were found by this method and their identify was determined by MALDI-TOF analysis. For one of the reproducibly identified protein, PGK (the glycolytic protein phosphoglycerate kinase) specific binding to RNA molecules including 6S RNA, tRNA and pRNA could be verified *in vitro*. ATP competition experiments indicated that RNA-binding likely occurs through the ATP binding site. Footprint analyses showed that PGK binds to single-stranded sequences of the 6S RNA central bubble. Further LC-MS analyses from pull-down eluates additionally revealed several ribosomal proteins as potential binding partners. The direct binding of 6S RNA to isolated 70S ribosomes could not be verified by several in vitro techniques, still leaving the possibility for an interaction with aingle ribosomal proteins.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Prokaryonten und ihre schnelle Anpassung an veränderte Umweltbedingunge	en 1
1.2 Ablauf und Regulation der Transkription	1
1.3 GIODAIET EINTIUSS VON PPGPP	
1.4 Regulatorische RNAs und ihre Funktionsvielfalt	5
1.5 DIE 65 RNA aus Escherichia coll	8
1.5.1 Struktur, Funktion und pRNA Synthese der 65 KNA	
1.5.2 65 RNA in anderen Organismen	13
1.6 HIQ – ein Weiteres 65 RNA bindendes Protein	15
1.7 Ribosomen in Escherichia coll.	81
1.7.1 FUNKTION der KIDOSOMEN IN der Zelle: die Translation	20
1.8 Phosphoglyceral-Kinase und seine Bedeutung lur <i>E. coll</i>	20
1.9 Fragestenung und Konzeption der Arbeit	23
2. Ergebnisse	24
2.1 Charakterisierung der Wechselwirkung von 6S RNA und Hfq	24
2.1.1 Phänotypische Untersuchung der ∆hfq-Mutante und ihrem isogenen Wildtyp	25
2.1.2 Vergleich der 6S RNA Menge innerhalb verschiedener Stämme und Wachtumsp	hasen
	29
2.1.3 Ist die Syntheseaktivität des ssrS Promotors durch Hfq beeinflusst?	33
2.1.3.1 Rifampicin-Kinetik	35
2.1.4 Hfq bindet an die 6S RNA	
2.2 Analysen des Zusammenspiels zwischen ppGpp und 6S RNA	45
2.2.1 Vergleich des basalen ppGpp-Levels in An- und Abwesenheit von Hfq in	
unterschiedlichen Wachstumsphasen	45
2.2.2 Beeinflussung des zellulären basalen ppGpp-Spiegel durch Decoyinine	
2.3 Suche nach potentiellen Bindungspartnern der 6S RNA	52
2.3.1 Klonierung und Aufreinigung der Phosphoglycerat Kinase	60
2.3.2 Interaktionen von PGK an RNAs	
2.3.2.1 Heterologe Bindungen von PGK	
2.3.2.1 Strukturanalysen des 65 KNA:PGK Komplexes	
2.5.2.2 Deeliiliussi ule os KNA üle Elizyillaktivitat voli PGK?	74
2.4 billuell Ribosoillell all ule os RNA?	
3. Diskussion	80
3.1 Der Zusammenhang zwischen 6S RNA und Hfq	80
3.1.1 Identifizierung der Bindedomänen von Hfq an der 6S RNA	
3.2 Hfq, ppGpp und 6S RNA – ein gemeinsames Regulationsnetzwerk	84
3.3 Suche nach Interaktionspartner der 6S RNA	86
3.3.1 Identifizierung der Bindedomäne von PGK an der 6S RNA	
3.3.2 Ribosomen binden nicht an die 6S RNA	90
3.4 Ausblick	92
4. Material	94
4.1 Allgemeines	94
4.2 Bakterienstämme und Vektoren	94
4.2.2 Plasmide	95
4.3 Nukleinsäuren und Nukleotide	96
4.3.1 RNA- und DNA-Fragmente	

4.3.2 Oligonukleotide	97
4.3.3 Verschiedene Nukleinsäuren	99
4.3.4 Nukleotide	99
4.4 Enzyme und sonstige Proteine	100
4.4.1 Enzyme und Proteine	100
4.4.2 Restriktionsendonukleasen	100
4.5 Allgemeine Puffer und Medien	101
4.6 Feinchemikalien	104
4.7 Verschiedenes	105
5. Methoden	107
5.1. Mikrobiologische Methoden	107
5.1.1 Sterilisation von Glasgeräten und Lösungen	107
5.1.2 Anzucht auf Agarplatten oder Flüssigkulturen	107
5.1.3 Anzucht von üN-Kulturen	108
5.1.4 Haltung und Sicherung von Zellstämmen	108
5.1.5 Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen für die Transformation durch	
Hitzeschock	108
5.1.6 Transformation kompetenter Zellen durch Hitzeschock	108
5.1.7 Bestimmung von Zelldichte in Flüssigkeiten	109
5.1.8 Erstellung von Wachstumskurven und Berechnung von Wachstumsraten	109
5.2 Allgemeine molekularbiologische Arbeiten	109
5.2.1 Isolation von Nukleinsäuren	109
5.2.1.1 Plasmidisolation nach dem Quiagen Plasmid Mini Kit	109
5.2.1.2 Plasmidisolation nach dem Quiagen Plasmid Midi Kit	109
5.2.1.3 Plasmidisolation im präparativen Maßstab	110
5.2.1.4 Isolation von Gesamt-RNA	111
5.2.1.5 Präparation von chromosomaler DNA aus E. coli Zellen	111
5.2.2 Reinigung und Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	112
5.2.2.1 Phenol/Chloroform Extraktion	112
5.2.2.2 Ethanolfällung von Nukleinsäuren	112
5.2.2.3 Dialyse von Nukleinsäuren	113
5.2.2.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	113
5.2.2.5 Praparative Elution von Nukleinsäuren aus Agarosegelen	114
5.2.3 Allgemeine Proteinmethoden	114
5.2.3.1 Gesamtproteinextraktion und Zellaufschluss	115
5.2.3.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen	115
5.2.3.5 Proteinfällung mit Trichleressigsäure (TCA)	110
5.2.5.4 Froteinianung int fritholessigsaure (FCA)	110
5.2.4 Automigung von fing inteels Fi Lo.	110
5.2.4.1 Dialyse von Inquina von PCK	118
5.2.5 Automigung von Führennen	120
5.2.0 Generier fer ung von Kibosonnen	120
5.2.7 Gelelekti opiioi eseli	121
5.2.7.1 Agarosegererekti opnorese	121
5.2.7.2 Native Polyacrylamidgelektronhorese (PAGE)	122
5.2.7.4 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (dPAGE)	
5.2.7.5 Gelelektrophorese von Proteinen	
5.2.8 Nachweis von Nukleinsäuren und Proteinen	124
5.2.8.1 Silberfärbung von Nukleinsäuren	
5.2.8.2 Silberfärbung von Proteinen	124
5.2.8.3 Coomassie-Färbung	125
5.2.8.4 Autoradiographie	126
5.2.9 Enzymatische Reaktionen	126
5.2.9.1 Restriktionahydrolyse	126

5.2.9.2 Polymerase chain reaction (PCR)	126
5.2.9.3 HD Kionierungs Kit	128
5.3.1.5' Phosphorylierung zur radioaktiven Markierung von DNA-Oligonukleotiden	128
5.3.2 3'- Endmarkierung von RNA mit 5`- ³² (P)nCn	
5.3.3 5' OH Markierung der 6S RNA	
5.3.4 In vitro Transkription zur präparativen Gewinnung von RNA (RiboMAX)	
5.3.5 Primer Extension Reaktion	
5.3.6 Gesamt NTP Bestimmung	130
5.3.7 Retardierungsanalyse	131
5.3.8 Northern Blot Analyse	131
5.3.9 Alkalische Hydrolyse von RNA	132
5.3.10 Enzymatischer Footprint mit RNase	133
5.3.11 Hydroxylradikal Footprint Analyse von 6S RNA	133
5.3.12 Filterbindung von Ribosomen an 6S RNA	134
5.3.13 Untersuchung von RNA – Protein Wechselwirkung mit den Adipic acid dihydra	zide-
Agarose Beads	135
5.3.13.1 In vitro RNA pull down	135
5.3.13.2 Geleluation und Niedrigsalz-Probenvorbereitung von Proteinen	136
5.3.14 Inaktivierung chromosomaler Gene nach Datsenko und Wanner	136
5.3.14.1 Generierung der cat-Kassette mittels PCR	137
5.3.14.2 Herstellung elektrochemisch kompertenter Zellen	137
5.3.14.3 Transformation mittels Elektroporation	137
5.3.15 Zellfarbung	138
5.3.16 Enzymtest mit PGK	139
6. Abkürzungsverzeichnis	140
7 Anhong	142
/. Annang	142
7.1 Tabellen für die Charakterisierung der Wechselwirkung von 6S RNA und Hfq 7.2 MALDI-TOF-Analysen und Plasmidkarte	142
	154
8. Literaturverzeichnis	156
9. Veröffentlichungen	165
10. Eidesstattliche Erklärung	166

I

1. Einleitung

1.1 Prokaryonten und ihre schnelle Anpassung an veränderte Umweltbedingungen

Bakterien leben überall auf der Erde unter verschiedensten Bedingungen, was es so schwer macht sie zu erforschen. Einige Mikroorganismen leben in der Tiefsee an siedenden Quellen und andere benötigen eine sehr hohe Salzkonzentration um zu überleben. Um schnell auf veränderte Umweltbedingungen (wie z.B. ein verändertes Nährstoffangebot, Temperatur oder Osmolarität) oder eine eventuelle Immunabwehr einzugehen, benötigen Bakterien einen gut funktionierenden Regulationsmechanismus. Die schnelle und Effiziente Anpassung erfolgt über die Genregulation bei der Replikation, der Transkription, der Translation und der posttranslationellen Modifikation. Ein besonderes Augenmerk wird hier auf die Ebene der Transkription und den *small* RNAs (sRNAs) geworfen. Gerade durch die kleinen regulatorischen RNAs kann die Zelle schnell auf wechselnde Bedingungen reagieren. Sowohl in der Transkription, aber besonderes auch in der Aktivierung oder Inhibierung der Translation sind die sRNA von besonderer Bedeutung. Daher wird der zentrale Bestandteil dieser Arbeit auf der Aufklärung weiterer Bindepartner einer kleinen regulatorischen RNA (6S RNA) liegen sowie in der Charakterisierung dieser Bindepartner.

1.2 Ablauf und Regulation der Transkription

Transkription bedeutet die genetische Information von DNA zu RNA umzuschreiben. Zu Beginn bewegt sich die DNA-abhängige RNA Polymerase (RNAP) entlang der DNA und bindet, wenn eine spezifische Promotorsequenz vorhanden ist. Diese spezifische Sequenz besteht aus der -35 Region mit der Consensus-Sequenz (5'- TTGACA-3') und der -10 Region (5'- TATAAT-3'). Die RNA wird in 5' \rightarrow 3' Richtung synthetisiert und ist der komplementäre Strang zur DNA Matrize. Der Transkriptionsablauf wird in drei Schritte unterteilt. Zu Beginn steht die Initiation, darauf folgt die Elongation und beendet wird die Transkription durch die Termination. Diese kann faktorabhängig oder faktorunabhängig stattfinden. Bei der Initiation bindet zuerst die RNAP an die Promotorsequenz der DNA, es kommt zum geschlossenen Komplex (RPc, s. Abb. 1.1). Die Bildung des geschlossenen Komplexes ist reversibel (Roberts and Roberts, 1996). Anschließend entwindet die RNAP zuerst die DNA-Matrize um 10 - 14 Basenpaare, die etwa 1 - 1 1/2 Helix Windungen entsprechen. Bei diesem Schritt der Transkription geht der RNAP:DNA Komplex vom geschlossenen zum offenen Komplex (RPo, s. Abb. 1.1) über. Indem ein NTP durch den sekundären Kanal zum aktiven Zentrum der RNAP gelangt, ist der Weg frei für die erste Phosphordiesterbindung. Nach der Bildung der ersten Phosphodiesterbindung bildet sich der ternäre Initiationskomplex aus (RPinit, s. Abb. 1.1). Im weiteren Verlauf können ca. 2 - 12 Nukleotide lange abortive Produkte entstehen (abortive Transkription). Die RNAP verbleibt dabei am Promotor. Geht die Transkription weiter und der Punkt der Abortiven Transkription ist überschritten, spaltet sich der Sigmafaktor ab und die wachsende RNA-Kette fädelt sich in den Exit-Kanal ein. Die Elongantionsphase hat begonnen und es bildet sich der Elongationskomplex (EC) aus (Record et al., 1996).

Die wachsende RNA-Kette bildet eine RNA-DNA-Helix und ist ca. 8 - 9 Basenpaare lang (Nudler et al., 1998). Das 3'-Ende der RNA muss dabei im aktiven Zentrum der Polymerase verbleiben, um das α -Phosphoratom des neu eintretenden NTPs anzugreifen. Somit dreht sich das RNA-DNA-Hybrid nach jedem NTP Einbau wieder in Richtung des aktiven Zentrums. Die NTPs werden basenspezifisch am *template*-Strang unter der Abspaltung des Pyrophosphates (PPi) eingebaut.

Bei der Termination gibt es zwei Möglichkeiten: die faktorabhängige und die faktorunabhängige Termination (Richardson, 1993). Bei der faktorunabhängigen Termination wird eine GC-reiche palindromische Region gefolgt von einem U-Rest transkribiert. Diese bildet eine sehr stabile Haarnadelstruktur aus und es kommt zur Destabilisierung des RNA-DNA-Hybrids. Darauf folgend dissoziiert die Polymerase von der DNA und entlässt die RNA aus dem Exit-Kanal (Platt, 1994). Anschließend bildet die DNA wieder einen Doppelstrang aus. Bei der faktorabhängigen Termination bindet das ringförmige Protein Rho (ρ) an die freiwerdende mRNA an der spezifischen *rut site*. Unter Spaltung von ATP bewegt sich Rho in Richtung 3'-Ende entlang der mRNA auf den Elongationskomplex zu. Durch eine Transkriptions-Pause kann Rho zur Polymerase aufschließen und entwindet den RNA-DNA Komplex. Die RNA wird frei und dissoziiert vom Komplex.



Abbildung 1.1: Die einzelnen Schritte der Transkriptionsinitiationsphasen

Die Abbildung zeigt die einzelnen Schritte der Transkription. I die Bindung der RNAP an den Promotor (R + P). Hat die Bindung stattgefunden bildet sich der geschlossenen Komplex (RPc). II nachdem der DNA-Strang aufgewunden wurde, wird der offene Komplex (RPo) ausgebildet. III die Initiation beginnt und die ersten Phosphordiesterbindungen werden geknüpft. Wird die Transkription fortgesetzt kommt es zum Initiationskomplex (RPinit). Bleibt die Polymerase am Promotor entstehen 2 – 12 Nukleotide lange abortive Produkte. IV der Sigmafaktor verlässt den Komplex und es bildet sich der Elongationskomplex (EC) aus. Die Transkription beginnt (Wagner, 2000).

1.3 Globaler Einfluss von ppGpp

Das Effektormolekül ppGpp (Guanosin 3',5'-bispyrophosphat) ist ein bedeutsamer Regulator in der Replikations-, Transkriptions- und Translationsmaschinerie. Die Expression von mehr als 50 % der zellulären Proteine sind betroffen, wenn ppGpp in erhöhter Konzentration vorkommt. ppGpp spielt als globaler Regulator eine wichtige Rolle. Es kann nicht nur die Biofilm-Bildung aktivieren und die Synthese von RpoS, der zentralen Regulator für stationäres Wachstum, begünstigen, sondern ist auch der auslösende Faktor für die Stringente Kontrolle. Die Stringente Kontrolle beschreibt die vielseitigen Reaktionen als Folge eines Mangels an Aminosäuren in der Zelle (Cashel and Rudd; 1987). Zuerst wird die Transkription der stabilen RNAs deutlich reduziert (Cashel, et al., 1996; Baracchini and Bremer 1988). Als Folge wird auch die Translation weiter inhibiert. Durch den Aminosäuremangel binden deacylierte tRNAs an die A-Stelle der Ribosomen. Das Ribosomenassoziierte Protein RelA wird aktiviert und beginnt mit der (p)ppGpp Synthese aus GTP oder GDP und einem Pyrophosphat vom ATP. Nachdem die ppGpp-Konzentrationszunahme bis in den millimolaren Bereich als Antwort auf die Stringente Kontrolle erfolgt (Lund and Kjeldgaard, 1972), werden einige Promotoren effizient repremiert und andere Effektormolekül spielt auch wiederum aktiviert. Das eine große Rolle in der

Wachstumsratenkontrolle. Die intrazelluläre ppGpp-Konzentration steht in einem umgekehrt proportionalem Verhältnis zu der Wachstumsrate (Ryals et al., 1982). Der zweite Syntheseweg wird von dem bifunktionellem Enzym SpoT katalysiert. SpoT befindet sich frei im Cytoplasma der Zelle und regelt den basalen Level von ppGpp im mikromolaren Bereich. Die Hauptaufgabe von SpoT ist ppGpp abzubauen, es kann aber auch (p)ppGpp synthetisieren, wenn Phosphatmangel, Fettsäuremange oder osmotischer Stress in der Zelle herrscht. Durch die Signale induziert synthetisiert SpoT aus GDP und Pyrophosphat (p)ppGpp. Der Abbau von ppGpp wird durch den Kofaktor Mangan (Mn²⁺) katalysiert, wodurch GDP und Pyrophosphat entsteht. Sowohl bei SpoT als auch bei RelA wird zuerst pppGpp synthetisiert, welches anschließend durch die 5'Phosphorhydrolase zu ppGpp in der Zelle gehalten wird ist noch nicht vollständig verstanden.





Abbildung 1.2: Schematische Abbildung für die Synthese und Hydrolyse von ppGpp

Die Abbildung zeigt links im grünen Kästchen den Ablauf der Stringenten Kontrolle durch das Ribosomen assoziierte Protein RelA. Durch den Aminosäuremangel wandert eine deacylierte tRNA an die A-Stelle der Ribosomen und aktiviert somit das RelA Protein. Dies synthetisiert aus GTP und ATP (p)ppGpp, das Vorläufermolekül von ppGpp. Auf der rechten Seite (blau) zeigt die Abbildung den Ablauf bei veränderten Wachstumsbedingungen. Das im Cytoplasma frei vorliegende bifunktionale Protein SpoT hydrolysiert oder synthetisiert (p)ppGpp bei wechselnden Wachstumsbedingungen. Es kann auch durch andere Signale induziert werden, wie zum Beispiel Phosphatmangel oder allgemeine Stressbedingungen (Wagner, 2010).

1.4 Regulatorische RNAs und ihre Funktionsvielfalt

Ursprünglich waren nur die mRNA (messanger RNA), die rRNA (ribosomale RNA) und die tRNA (transfer RNA) bekannt. Mit der Entwicklung weiterer molekularbiologischer Methoden wurde die post-transkriptionelle Genregulation weiter aufgeklärt und es wurden nicht codierende RNAs (ncRNA) gefunden. Diese sind meist kleiner als 300 Nukleotide und werden auch sRNA (small RNA) genannt. Mittlerweile sind in E. coli mehr als 100 sRNAs bekannt (Lalaouna et al., 2013). Ihre Hauptfunktion liegt in der post-transkriptionellen Regulation und Translationsregulation, indem sie an die mRNA binden und/oder die Lebensdauer der mRNA verändern.

Bei der Translationskontrolle binden die meisten sRNAs direkt an der *ribosome-binding site* (RBS) in der 5'-UTR von der Target mRNA und inhibieren so die Translation (Lalaouna et al., 2013). Im Gegensatz dazu gibt es einige wenige sRNAs, die die Translation aktivieren, wie in Abbildung 1.3 B gezeigt. Diese sRNAs binden auch an die 5'-UTR der Target mRNA, jedoch besitzt die mRNA eine intrinsische Sekundärstruktur in der die RBS nicht zugänglich für Ribosomen ist (Lalaouna et al., 2013). Wenn die sRNA gebunden hat, verändert sich die Sekundärstruktur der mRNA, die RBS wird frei und die Translation kann erfolgen. Dieser regulatorische Mechanismus konnte für DsrA und RyhB, sRNAs welche RpoS stimulieren, gezeigt werden (McCullen et al., 2010).

Eine weitere wichtige Rolle in der Genexpression spielen die *trans* und *cis acting* sRNAs. Die *cis encoded* sRNAs werden oft vom komplementären Strang der mRNA, welche sie regulieren, synthetisiert. Zumeist bilden die *cis acting* sRNAs Sekundärstrukturen aus und maskieren so die Shine-Dalgano Region (Nudler and Mironov, 2004). Da *cis acting* sRNA nur mit ihrer mRNA ihres Genlokus interagieren, sind sie ortsspezifisch gebunden und haben überwiegend nur eine Aufgabe. *Trans acting* sRNAs dagegen können unabhängig davon wirken. Die *trans encoded* sRNAs werden von verschiedenen Orten im Genom synthetisiert und gehen eine direkte Basenpaarung (7 – 12 Nukleotide) mit ihrer Ziel RNA ein. Die *trans acting* sRNA wirken sofort aktivierend oder repremierend auf die Translation ein, können aber auch die mRNA Stabilität beeinflussen. Häufig ist dabei das Protein Hfq (*host factor for Qβ*) als RNA-Chaperon beteiligt (Storz, 2002; Storz et al., 2004). Nicht immer muss eine RNA:RNA Interaktion stattfinden. sRNAs können auch Bestandteile von RNA-Protein-Partikel sein, wie zum Beispiel die 4,5S RNA. Sie ist ein integraler Bestandteil des *signal recognition particel* (SRP). Dieser Komplex ist für den Transport spezifischer Proteine zur Zellmembran verantwortlich (Edwards et al., 1981). Auch können sRNAs andere Formen oder Strukturen in der Zelle annehmen (molekularer Mimikry), wie zum Beispiel die 6S RNA. Sie moduliert die bakterielle Promotorregion nach und bindet so an die RNAP als offener Promotorkomplex. Damit ist sie die einzige bakterielle regulatorische RNA, die eine direkte Bindung mit der Transkriptionsmaschinerie (RNAP) eingeht.



Abbildung 1.3: Regulatorische Mechanismen der sRNA

Die Abbildung zeigt einmal eine inhibierende Regulation durch sRNAs in A und eine aktivierende Regulation der Translation in **B**. In A bindet eine sRNA mit Hfq (*host factor for Qβ*) an die RBS einer mRNA und inhibiert die Translation (rechts). Ist die RBS frei, kann Translation erfolgen (links). In **B** bindet eine sRNA mit Hfq an die 5'-UTR einer mRNA (rechts). Durch die Bindung folgt eine Konformationsänderung und die zuvor hoch strukturierte RBS ist frei und kann von Ribosomen gebunden werden. Rechts ist die strukturierte nicht freie RBS gezeigt (verändert nach (Lalaouna et al., 2013).

Eine weitere Gruppe regulatorischer RNAs sind die *Riboswitches*. Dies sind RNA Elemente, die sich im untranslatierten Bereich der 5'-UTR der mRNA befinden. Sie regulieren die Genexpression auf der Ebene der Transkription und Translation. Die RNA Struktur kann veränderte Konformation annehmen, wenn eine direkte Bindung mit intrazellulären Liganden vorliegt. Abhängig von ihrer Konformation können sie aktivierend oder inhibierend wirken. Die meisten *Riboswitches* regulieren normalerweise in *cis*, bis auf die *Riboswitches* SreA und SreB in *Listeria monocytogenes*. Diese können sowohl in *cis* als auch in *trans* regulieren. Sie regulieren die Expression des virulenz Regulators PrfA und binden an die 5'-untranslatierte Region dieser

mRNA und wirken so als rRNAs (Loh et al., 2009). Ein weiteres Beispiel für Riboswitches ist die *lysC*, wie in Abbildung 1.4 gezeigt. *lysC* kontrolliert sowohl die Translation, als auch den mRNA Abbau. Wenn an den *Riboswitch* das Lysin gebunden hat, ist es in der OFF Konformation, die Translation ist geblockt und kann nicht stattfinden. Daraufhin kann die RNase E die RNA angreifen und abbauen. Ist ein Mangel an Aminosäuren in der Zelle, bindet kein Lysin an den *Riboswitch*. Die Konformationsänderung stellt die RBS frei und das Ribosomen kann binden, jedoch kann in dieser Sekundärstruktur die RNase E nicht mehr die RNA angreifen und diese Abbauen. Somit kann die Translation ungehindert fortfahren.



Abbildung 1.4: Riboswitches lysC

Die Abbildung zeigt die Regulation der Translation und des mRNA Abbaus von lysC. Wenn Lysin an den untranslatierbaren Bereich der mRNA bindet, kann keine Translation stattfinden, da durch eine Konformationsänderung die RBS stark strukturiert ist und die Ribosomen nicht binden können. Durch die Strukturveränderung kann die RNase E die RNA angreifen und abbauen. Herrscht ein Mangel an Aminosäuren in der Zelle und es bindet kein Lysin, findet eine Konformationsänderung statt und die RBS wird frei, somit kann die Translation beginnen. Durch die veränderte Struktur ist der Angriffspunkt der RNase E verdeckt und die mRNA kann nicht abgebaut werden (verändert nach (Lalaouna et al., 2013).

Auch in anderen Organismen findet die Genregulation weitestgehend über sRNAs statt. *Antisense* RNA Transkription z. B. werden in der Maus mit 72 % (Zhang et al., 2006), in *Saccharomyces cerevisiae* mit 27 % (Xu et al., 2009) und in *Drosophila melanogaster* mit über 16 % (Zhang et al., 2006) beobachtet.

1.5 Die 6S RNA aus Escherichia coli

Die 6S RNA aus *Escherichia coli* gehört zu den stabilen, regulatorischen RNAs und ist 184 Nukleotide lang. Erstmals wurde sie 1967 beschrieben (Hindley, 1967) und vollkommen sequenziert 1971 (Brownlee, 1971). Erst viele Jahre später konnte sie als Proteinbindepartner der $E\sigma^{70}$ RNA-Polymerase erkannt werden (Wasserman and Storz, 2000) und in den darauf folgenden Jahren als Bindepartner des RNA-Chaperon Hfq identifiziert werden (Windbichler et al., 2008). Lange Zeit konnte kein Phänotyp in den Zellen, die keine 6S RNA exprimieren bestimmt werden. Erst 2004 wurde unter Langzeit stationären Bedingungen ein Überlebens- und Wachstumsnachteil in 6S RNA defizienten Stämmen festgestellt (Trotochaud and Wasserman, 2004).

Das *ssrS*-Gen (*small stable* RNA S) liegt *upstream* des *ygfA*-Gens in einem dicistronischen Leserahmen, dem *ssrS-ygfA* Operon. Das *ygfA*-Gen kodiert für das Protein 5-Formyltetrahydrofolat Cycloligase, dennoch ist die Rolle, welche das Gen im Zusammenhang mit der Expression der 6S RNA spielt noch unbekannt (Jeanguenin et al., 2010). Das 6S RNA Gen steht unter der Kontrolle der tandem Promotoren P1 und P2 (Kim and Lee, 2004). Der proximal gelegene P1 Promotor wird von σ^{70} erkannt und der distal gelegene P2 Promotor ist sowohl von σ^{70} als auch von σ^{38} abhängig. Über 70 % der 6S RNA Expression trägt allein der proximale P1 Promotor. Die entstehenden Primärtranskripte besitzen eine unterschiedliche Länge im Bezug auf das reife 5' –Ende der 6S RNA, deren Startpositionen an dem P1 Promotor bei -9 und dem P2 Promotor bei -224 liegen und unterschiedlich prozessiert werden (Kim and Lee, 2004; Griffin and Baillie, 1973). Das 5'-Ende des P2 Transkriptes wird durch die RNase E prozessiert und das kürzere P1 Transkript durch die RNase E und RNase G (Kim and Lee, 2004). Die 3'-End Prozessierung ist bis heute nicht ganz aufgeklärt, dennoch ist mittlerweile bekannt, dass die 6S RNA Transkriptionstermination Rho (ρ) abhängig ist und einige Rho-Bindestellen im *ygfA*-Gen identifiziert wurden (Chae et al., 2011).



Abbildung 1.5: Schematische Darstellung des *ssrS*-Gens mit beiden Promotoren und den Transkriptionsprodukten

Die Abbildung **A** zeigt das *ssrS-ygfA*-Operon mit beiden Promotoren und den jeweiligen Startpositionen, bei -9 für den σ^{70} abhängigen P1 Promotor und -224 für den σ^{70} und σ^{38} abhängigen P2 Promotor. In **B** sind die Transkriptionsprodukte der 6S RNA von beiden Promotoren gezeigt. Die 5'-End und 3'-End Prozessierungen sind eingezeichnet (Neußer, 2008).

1.5.1 Struktur, Funktion und pRNA Synthese der 6S RNA

Die 6S RNA ist charakterisiert durch ihre spezifische und weitestgehend konservierte Sekundärstruktur. Durch in silico phylogenetische Vergleiche konnten über 100 Homologe der 6S RNA aus berechneten Sekundärstrukturen in zahlreichen Eubakterien entdeckt werden (Brown and Ellis, 2005; Barrick et al., 2005). Das RNA Molekül besteht überwiegend aus doppelsträngigen Bereichen mit einer großen zentralen einzelsträngigen Blase, der central bubble in der Mitte. Flankierend sind zwei doppelsträngige Bereiche (*internal stem* und *closing stem*) mit einigen kleineren loops und ungepaarten Bereichen (Vogel et al., 1987). Der internal stem endet mit einem terminal loop und der closing stem mit dem v-formig aufgespreiztem 3' und 5'Ende der 6S RNA. Die Sekundärstruktur der 6S RNA ist in Abbildung 1.6 gezeigt. Die blauen Regionen (s. Abb. 1.6 A, CRI bis CRIV) zeigen die konservierten Elemente auf Nukleotidebene, die höchste Konserviertheit liegt jedoch auf der Ebene der Sekundärstruktur. Zudem konnte gezeigt werden, dass die 6S RNA eine sehr hohe Lebensdauer besitzt und auch unter speziellen Mangelbedingungen (wie z. B. Phosphatmange) nicht abgebaut wird (Lee et al., 1978). Jedoch ist die Lebensdauer der 6S RNA kurz unter Bedingungen des nutritional upshift (verbessertes Nährstoffangebot) unter pRNA Synthese. Die Halbwertszeit der 6S RNA unter Normalbedingungen beträgt mehrere Stunden und liegt damit über der Generationszeit von E. coli (Neußer, 2008). Durch ihre Stabilität kann die 6S RNA in der Zelle über die

Wachstumsphase akkumulieren. So befinden sich in der logarithmischen Phase ca. 1000 6S RNA Moleküle in der Zelle und in der stationären Phase ca. 10.000 Moleküle pro Zelle (Wasserman and Storz, 2000).

Im unteren Teil der Abbildung 1.6 ist der 6S RNA:pRNA Komplex in der Sekundärstruktur dargestellt, der nach enzymatischen und chemischen *mapping* Analysen konstruiert wurde. Wenn die beiden Moleküle gebunden vorliegen, vergrößert sich die zentrale Blase und der *loop* im 3'*central domain* verlängert sich. Am *internal stem* bildet sich sehr wahrscheinlich ein neuer *loop* aus. Die schwach grau abgebildete Struktur ist eine alternative Faltung der *internal stem* Region (Steuten and Wagner 2012).



Abbildung 1.6: Sekundärstruktur der 6S RNA mit und ohne pRNA aus E. coli

In Abbildung A ist die charakteristische Sekundärstruktur der 6S RNA gezeigt. In blau sind die konservierten Bereiche (CRI, CRII, CRIII und CRIV) dargestellt und der rote Pfeil zeigt die Richtung der pRNA Synthese an, beginnend am Nukleotid U44. Die untere Abbildung (B) zeigt die Strukturänderung, wenn die pRNA an die 6S RNA gebunden ist. Die *central bubble* erweitert sich und der doppelstrang der *3'central domain* verlängert sich, zudem entsteht ein neuer *hairpin* Bereich im *terminal stem* Abschnitt. In schwach grau ist eine alternative Faltung der *terminal stem* Region dargestellt (verändert nach (Steuten and Wagner, 2013).

Durch die spezifische Struktur der 6S RNA ist sie in der Lage, an das Holoenzym der RNAP zu binden. Die Bindung an die RNAP ist nur in Verbindung mit dem σ^{70} Faktor möglich. Die 6S RNA geht keinen Komplex mit dem Coreenzym oder dem σ^{70} Faktor alleine ein (Wasserman and Saecker, 2006; Gildehaus et al., 2007). Auch eine Komplexbildung mit anderen Sigmafaktoren der RNAP konnte nicht gezeigt werden. Die σ^{70} Untereinheit ist für die Transkription der housekeeping Gene verantwortlich, also die Gene, die in der logarithmischen Phase benötigt werden. Es konnte eine direkte Interaktion der β und β' Untereinheiten und mit dem σ^{70} -Faktor der RNAP nachgewiesen werden (Gildehaus et al., 2007; Wasserman and Storz, 2000). Neueste Studien zeigen, dass die 6S RNA Position U44, also die +1 Position der pRNA Transkription, sehr nahe an die σ^{70} Subdomäne 3,2 tief im aktiven Zentrum der RNAP kommt. Durch die Anwendung der chemischen Nuklease FeBABE konnten noch weitere Subdomänen des σ^{70} -Faktors, die in räumlicher Nähe an der 6S RNA liegen, bestimmt werden und eine bessere strukturelle Aufklärung des Komplexes erfolgen (Steuten et al., 2013). Auf Grund der hohen Stabilität der 6S RNA und der Tatsache, dass sie über die Wachstumsphase in der Zelle akkumuliert, ist ein Großteil der 6S RNA in der stationären Phase an die σ^{70} assoziierte RNAP gebunden (Wasserman und Storz, 2000). Dadurch inhibiert sie überwiegend Gene mit σ^{70} abhängigen Promotoren, wodurch die Gene mit σ^{38} -abhängige Promotoren indirekt aktiviert werden. Durch die Umverteilung der Polymerasen verbessert die 6S RNA somit die Anpassung der Zelle beim Übergang von der logarithmischen- zur stationären Phase.

Die Komplexbildung zwischen 6S RNA und dem RNAP Holoenzym kommt zustande, weil die 6S RNA mit der *central bubble* einen offenen DNA-Promotor imitieren kann (Promotormimikry) (Wasserman et al., 2000). Daher liegt die 6S RNA in der stationären Phase meist gebunden an die Polymerase vor. Sie bindet nicht nur die σ^{70} -Polymerase in Abwesenheit von DNA und fängt diese in der stationären Phase weg, sondern dient auch selbst als *template* für die Transkription durch die RNAP. Die dabei entstehenden Transkripte haben eine Länge von ca. 20 Nukleotide und werden pRNA (*product* RNA, dnRNA (*de novo* RNA)) genannt (Wasserman and Saecker, 2006; Gildehaus et al., 2007). Unter Bedingungen des *nutritional upshift*, also verbessertes Nahrungsangebot, dient die 6S RNA als *template* für die Synthese der pRNA. Durch die erhöhte NTP-Konzentration als Folge des *upshifts* wird die Synthese induziert und beginnt an der Startposition U44 der 6S RNA, wobei die Sequenz der gebildeten pRNA über die gesamte Länge komplementär zur 6S RNA ist (Wasserman and Saecker, 2006; Gildehaus et al., 2007). Als Folge der Synthese zerfällt der 6S RNA-RNAP Komplex durch eine Strukturumlagerung der offenen Blase (Wurm et al., 2010; Steuten and Wagner, 2012). Die Polymerase wird wieder frei, wodurch der σ^{70} -Faktor von der RNAP dissoziiert und die Polymerase wieder für die Transkriptionsinitiation bereit ist. Somit wird die Inhibierung der Transkription aufgehoben. Die neu transkribierte pRNA bildet einen stabilen Doppelstrang mit der Templatesequenz der 6S RNA. Durch die veränderte Struktur (s. Abb. 1.6 B) kann der Abbau der 6S RNA und pRNA erfolgen (Neußer et al., 2008; Wurm et al., 2009). Also kodiert die 6S RNA ihre eigene regulatorische RNA (Kugel and Goodrich, 2007).

In der folgenden Abbildung 1.7 ist schematisch der Kreislauf der 6S RNA dargestellt. Von der exponentiellen- (logarithmischen) über die stationäre Wachstumsphase akkumuliert die 6S RNA in der Zelle. In hoher Konzentration vorkommend, bindet sie durch die Imitation eines offenen DNA-Promotors an die RNAP und inhibiert die Transkription der σ^{70} –abhängigen Gene. Durch eine verbesserte Nährstoffzufuhr beginnt die pRNA (dnRNA) Synthese und darauf folgend die Umlagerung der 6S RNA Struktur, wodurch der RNA:RNAP Komplex dissoziiert und σ^{70} Untereinheit von der Polymerase abdissoziiert. So ist die RNAP frei für andere Sigmafaktoren und die 6S RNA wird durch die gebundene pRNA und der veränderten Sekundärstruktur abgebaut und es beginnt ein neuer Kreislauf.



Abbildung 1.7: Schematische Darstellung des 6S RNA Kreislauf und der pRNA Synthese

Die Abbildung zeigt die Akkumulation der 6S RNA über die Wachstumsphasen, von exponentieller- zur stationären Wachstumsphase und die Bindung an die σ^{70} RNAP. Nach NTP Erhöhung durch verbesserte Wachstumsbedingungen (*nutritional upshift*) beginnt die Synthese der pRNA (dnRNA), wodurch eine Veränderung der Sekundärstruktur der 6S RNA dazu führt, dass der RNA:Protein Komplex dissoziiert und der σ^{70} Faktor die RNAP verlässt. Anschließend wird die 6S RNA degradiert und die RNAP ist frei für ihre natürliche Aufgabe, mRNAs zu transkribieren (Wurm et al., 2009).

1.5.2 6S RNA in anderen Organismen

Als erstes wurde die 6S RNA aus *E.coli* charakterisiert bevor durch weitere Sequenz- und Strukturvergleiche über 100 weitere homologe zur 6S RNA in Enterobakterien gefunden wurden (Brown and Ellis, 2005). In *Bacillus subtilis* konnten 2 homologe zur *E. coli* 6S RNA gezeigt werden, die 6S1 RNA (*bsrA*) und die 6S2 RNA (*bsrB*), die beide an die RNAP mit dem *housekeeping* Faktor assoziiert, binden (Barrick et al., 2005; Beckmann et al., 2010). Dennoch kommt es nur bei der 6S1 RNA zu einer pRNA Synthese und auch die 6S1 RNA *template*

Transkription steht in Verbindung mit dem NTP Status der Zelle. Wie bei der *E. coli* 6S RNA hat die 6S1 ihre höchste Konzentration in der stationären Phase. Im Gegensatz zu der 6S2 RNA, die ihr Maximum in der mittleren logarithmischen Phase hat. Phänotypisch zeigt der 6S1 RNA-defiziente Stamm eine frühere Initiierung der Endosporen (Cavanagh et al., 2012).

Auch wurden in mehreren γ -Proteobakterien 6S RNA Homologe gefunden. In Cyanobakterien (gram neg. Bakterien), die die Gewässer bevölkern und Photosynthese betreiben, wurden 6S RNAs gefunden, wie z.B. in *Synechocystis, Synechococcus, Prochlorococcus* und *Nostoc*. An Hand von Gelretardierungsanalysen konnte gezeigt werden, dass die vier 6S RNAs an die *E. coli* RNAP binden. Die *Synechocystis* Zellen ohne 6S RNA erreichen die stationäre Phase unter photoheterotrophen Bedungungen (d.h. unter Zufuhr von Gluccose) eher und zeigen einen weiteren phänotypischen Unterschied bei der Stressantwort, wenn die Zellen unter Stickstoffmangel wachsen. Nach dem Stickstoffmangel und der Stressantwort der Zellen, braucht der 6S RNA defiziente Stamm länger sich wieder auf Normalbedingungen einzustellen (Rediger et al., 2012).

Auch in human pathogenen Keimen wurden zwei Homologe der *E. coli* 6S RNA identifiziert, z.B. in *Legionella pneumophila*. Hier zeigte der 6S RNA⁻ Stamm eine signifikante Reduktion der intrazellulären Vermehrung in Wirtszellen (Faucher et al., 2010). Auch in *Staphylococcus aureus* (Spezies bacilli) und *Helicobacter pylori* (Spezies ε-proteobacteria) wurden 6S RNAs gefunden (Bohn et al., 2010; Sharma et al., 2010). Für letztere konnte auch die Synthese von pRNAs nachgewiesen werden.

Abseits der Prokaryoten wurden auch in eukaryotischen Organismen funktionell ähnliche RNAs zur 6S RNA identifiziert. Die B2 RNA in der Maus und die humane Alu RNA binden wie die *E. coli* 6S RNA auch an die RNAP II (Mariner et al., 2008). Diese werden bei Hitzeschock von der RNAP I transkribiert und bilden einen prä-Initiationskomplex mit der RNAP II und der Promotor-DNA aus und inhibieren so unter Hitzeschock die Transkription von RNAP II Promotoren. Anschließend löst sich die RNA von dem Komplex und die Transkription kann erfolgen (Espinoza et al., 2004; Yakovchuk et al., 2009). Für die B2 RNA konnte schon nachgewiesen werden, dass sie als *template* für ein 18 Nt langes Transkript vom 3'-Ende aus dient. Diese Reaktion destabilisiert den Komplex und die RNA wird freigegeben (Wagner et al., 2013).

1.6 Hfq - ein weiteres 6S RNA bindendes Protein

Das Protein Hfq aus Escherichia coli (host factor required for phage QB RNA replication) ist 11.2 kDa groß, besteht aus 102 Aminosäuren und wurde als erstes endogenes bakterielles Protein für die Replikation des RNA Plus-Strangs des Bakteriophage QB identifiziert (Franze de Fernandez et al., 1968). Die Hfq Konzentration in der Zelle ist wachstumsratenabhängig. In der logarithmischen Phase sind ca. 10.000 Hexamere pro Zelle und in der stationären Phase ca. 5.000 Hexamere vorzufinden (Ali Azam et al., 1999). Lokalisiert ist Hfq zu fast 90 % im Cytoplasma an dem ribosomalen Protein S1 assoziiert (Schuppli et al., 1997). Schon früh zeigte sich, dass Hfg eine hohe Affinität zu Poly (A) und Einzelstrang AU-reichen Sequenzen hat, die in Nachbarschaft zu Stammregionen liegen (Brescia et al., 2003; Sun and Wartell, 2006). So konnten im laufe der Zeit eine Reihe von Interaktionspartnern von Hfg identifiziert und Hfg auch eine Reihe unterschiedlicher Aufgaben zugewiesen werden. Das bekannteste Beispiel an Interaktionspartnern von Hfq ist die simultane Bindung von der ncRNA DsrA und der mRNA rpoS. RpoS ist der primäre Regulator der stationären Phase Gene. Durch die Hybridisierung der beiden RNAs aneinander, wird die Ribosomen Bindestelle zugänglich und die Translation kann beginnen (Mikulecky et al., 2004; Pappenfort et al., 2010). Ein Gegenspieler des RpoS Proteins ist OxyS. Die OxyS RNA bindet an das Hfq und verhindert so die Interaktion mit DsrA (Zhang et al., 1998; Zhang et al., 2002). Weitere kleine regulatorische RNAs, die mit Hfq assoziieren, sind MicF, RhyB und Spot42. Zusätzlich binden auch Proteine an Hfq, wie zum Beispiel S1 oder die B-Untereinheit der RNAP (Windbichler et al., 2008). Hfq hat nicht nur die Aufgabe sRNAmRNA Interaktionen zu ermöglichen, sondern auch als RNA-Chaperon in der Zelle zu fungieren (Schuppli et al., 1997; Moll et al., 2003).

An Hand von Deletionen des Hfq Gens konnte gezeigt werden, dass die Synthese von mehr als 50% Proteinen aktiviert oder inhibiert wird. So konnten in verschiedensten Bakterien Hfq⁻ Phänotypen bestimmt werden. In dem *E. coli* Laborstamm K12 zeigte sich ein reduziertes Wachstum, geringere Toleranz gegenüber osmotischen Stress und UV-Stress und eine geringere Oxidation von diversen C-Quellen (Franze de Fernandez et al., 1972; Tsui et al., 1994).

Auch phylogenetische Vergleiche konnten Hfq Homologe in einer Vielzahl von gram-positiven und gram-negativen Bakterien sowie einigen Archeaen zeigen (Nielsen et al., 2007). Mittlerweile ist Hfq als essenzieller Regulator in der Zelle bekannt. Die Funktionen von Hfq sind breit gefächert, von Interaktionen mit sRNAs und mRNAs, über RNA-RNA Interaktionen, Strukturumwandlungen und Stabilität der verschiedenen RNAs sowohl reduzierend, als auch aktivierend.



Abbildung 1.8: Das globale Regulatorprotein Hfq in den verschiedenen Mechanismen

Teil 1 zeigt die verminderte mRNA Expression durch die simultane Bindung einer kleinen regulatorischen RNA (sRNA) und einer mRNA in der nähe der 30S und 50S ribosomalen Untereinheiten, während ein Degradasom recrutiert wird. In Teil 2 ist Hfq als RNA Chaperon aktiv, indem es an der mRNA in transkriptions Richtung zu der Polymerase wandert und es dort zu einer Pause kommt (Attenuation). In Teil 3 bindet Hfq an die DNA. In Teil 4 ist Hfq auch in der Translationskontrolle aktiv, hier bindet es an eine sRNA und eine mRNA, um diese für die Translation zugänglich zu machen. In Teil 5 interagiert Hfq mit dem terminations Faktor Rho und ist somit in die Translationskontrolle involviert (Sobrero and Valverde 2012).

Die vielen verschiedenen Mechanismen, in die Hfq involviert ist, sind nur möglich, durch die spezifische Struktur und Oberflächenladung von Hfq. Diese ermöglicht dem Protein eine, als auch zwei verschiedene RNAs zu binden oder auch in einen Protein/Protein Kontakt zu treten.

Hfq ist nur aktiv in seiner ringförmigen Hexamer Struktur. Es lagern sich 6 Monomere aneinander und bilden eine Ringform mit einer ca. 8-12 Å großen Pore. Hfq gehört zu der Familie der Sm-Proteine oder Sm-like Proteine, die durch zwei konservierte Regionen charakterisiert sind, die Sm1 und Sm2 Motive. Jedes Monomer besitzt eine N-Terminale α -Helix gefolgt von 5 β -Strängen in der topologischen Anordnung $\beta 5\alpha 1\beta 1\beta 2\beta 3\beta 4$. Das C-Terminale Ende vom *E.coli* Hfq ist etwas umstrittener in seiner Funktion, da 2008 publiziert wurde, dass das C-Terminale Ende für die RNA Interaktion an der Oberfläche spezifisch für mRNA sei (Vecerek et al., 2008). Später konnte demonstriert werden, dass das C-Terminale Ende nur eine kleine untergeordnete Rolle in der Riboregulation spielt. Es wurden kurze Hfq-Mutanten ohne C-Terminalen Ende exprimiert und die positive Regulation von *rpoS*, sowie die Inhibierung von *sodB* und *ybfM* mRNAs konnten demnach gezeigt werden (Olsen et al., 2010). Die genaue Bedeutung des C-Terminalen Endes von Hfq ist somit bis heute noch nicht genau bekannt.

Das *E.coli* Protein Hfq hat sowohl proximal als auch distal eine positive Oberflächenladung und eignet sich gut RNAs zu binden. Die proximale Seite bindet verstärkt U-reiche Sequenzen und die distale Seite A-reiche Sequenzen. Darüber hinaus konnte mit der *Tryptophan fluorescence quenching* (TFQ) Methode gezeigt werden, dass die 5' untranslatierte Region der *hfq* mRNA sowohl an die proximale, als auch an die distale Seite des selbst codierenden Proteins Hfq binden kann. Weiter konnte auch nachgewiesen werden, dass die *hfq* mRNA an das unstrukturierte C-Terminale Ende binden kann (Robinson et al., 2014). Die genaue Bedeutung ist noch nicht ganz verstanden.



Abbildung 1.9: Dreidimensionale Struktur und elektrostatisches Potential von Hfq

In Abbildung **A** ist die dreidimensionale Struktur der proximalen Seite von 4 Hfq im Hexamer übereinander gezeigt (*P. aeruginosa*: cyan, *E. coli*: Lachsfarben, *S. aureus* mit gebundener RNA: gelb und *S. aureus* ohne gebundener RNA: gelb). Die gepunktete Linie umrandet ein Hfq Monomer (verändert nach (Brennan and Link 2007)). Die Abbildung **B** zeigt das Hfq Hexamer in seitlicher Ansicht und in **C** werden die Hfq Oberflächen von verschiedenen Bakterien mit ihrem elektrostatischen Potential dargestellt (verändert nach (Baker et al., 2001; Sobrero and Valverde, 2012)).

So war es zuerst überraschend, dass auch die 6S RNA aus *E. coli* an Hfq bindet, weil die 6S RNA gut strukturiert ist und ihre eigene regulatorische Funktion besitzt (Windbichler et al., 2008). Hfq bindet verstärkt an Poly (U) oder Poly (A) Stränge oder unstrukturierte RNAs. Jedoch ist noch nicht bekannt, welche regulatorischen Auswirkungen diese Bindung in der Zelle hat und an welchen Sequenzbereich der RNA Hfq bindet.

1.7 Ribosomen in Escherichia coli

Ribosomen kommen in allen lebenden Organismen vor. Es sind hochmolekulare Ribonukleoproteinpartikel, die aus vielen Proteinen und ribosomalen RNAs (rRNA) zusammengesetzt sind. Die prokaryotischen Ribosomen besitzen eine Sedimentationskonstante von 70S und bestehen aus zwei Untereinheiten, der 30S- und der 50S-Untereiheit. Die 50S-Untereinheit besteht aus 23S rRNA, 5S rRNA und 31 ribosomalen Proteinen (Ban et al., 2000). Etwas kleiner ist die 30S-Untereinheit, mit der 16S rRNA und 21 ribosomalen Proteinen (Wimberly et al., 2000). Die rRNAs machen etwa zweidrittel der Masse des Ribosoms aus. Sie werden als precursor RNA in einem Strang transkribiert (Ban et al., 2000). Durch komplexe Prozessierungsvorgänge wird die rRNA herausgeschnitten. In rasch wachsenden E. coli Bakterien kommen ca. 70.000 Ribosomen pro Zelle vor, die jeweils eine Größe von ca. 2,5 MDa haben. Ribosomen stellen die Maschinerie für den Translationsprozess in allen Organismen dar. Sie besitzen drei unterschiedliche Bindestellen für die tRNAs (transfer RNA), die (A)minoacyl-Stelle, (P)eptidyl-Stelle und die (E)xit-Stelle. Die ersten elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Ribosomen konnten 1955 von Palade gezeigt werden. 1959 wurde erstmals der Beweis erbracht, dass die Ribosomen für die Biosynthese von Polypeptiden in E. coli notwendig sind (Barrnett and Palade, 1958).

Die ribosomalen Proteine sind relativ klein und haben eine durchschnittliche Molekularmasse von 10 bis 20 kDa. Durch ihren hohen Anteil an Lysin und Arginin sind sie bis auf wenige Ausnahmen sehr basisch. Eine dieser Ausnahmen ist das Protein S1, dass stark sauer ist und mit 61,16 kDa deutlich größer, als das durchschnittliche ribosomale Protein. Ein weiteres sehr saures Protein ist das L7/L12. Alle Proteine liegen einmal im Ribosom vor, bis auf das saure Protein L7/L12, welches vier mal pro Untereinheit vorkommt. Es finden sich nur wenige Sequenzhomologien untereinander, was auf einen unabhängigen phylogenetischen Ursprung hinweist. Bei den rRNAs sind posttranskriptionale Modifikationen bekannt. Die 16S rRNA zum Beispiel besitzt 10 methylierte Nukleotide und die 23S rRNA trägt mehrere modifizierte Nukleotide, darunter Psydouridine und methylierte Basen (Fellner und Sanger, 1968). Die Sekundärstruktur der 16S rRNA besteht aus über 50 doppelsträngigen Helices, die durch einzelsträngige *loops* miteinander verbunden sind und mit den stabilisierenden Proteinen vier unterschiedliche Domänen ausbildet (Wimberly et al., 2000). Das 3'-Ende der 16S rRNA basenpaart an die Shine-Dalgano-Sequenz der mRNA. Auch bei den rRNAs, wie bei den Proteinen sind keine großen Sequenzhomologien bekannt, was dem Komplex eine stark unsymmetrische Struktur verleiht.



Abbildung 1.10: Cryo-EM der 70S Ribosom mit fMet-tRNA und EF-Tu Protein

Die Abbildung zeigt eine Cryo-EM Aufnahme von einem Ribosomen gebunden mit einem EF-Tu Faktor (rot) aus *Escherichia coli*. Der Ribosomentunnel ist nicht zu erkennen, aber die E- (orange), P- (grün) und A-Stellen (lila) sind farblich markiert. Die 50S-Untereinheit ist blau und die 30S-Untereinheit ist beige gefärbt (verändert nach (Villa et al., 2008).

1. Einleitung

1.7.1 Funktion der Ribosomen in der Zelle: die Translation

Auch die Translation, in der die 70S Ribosomen die mRNA in 5' \rightarrow 3'-Richtung entlang wandern, kann in drei Einzelschritte aufgeteilt werden: die Initiation, die Elongation und die Termination. Die Initiation beginnt durch eine spezielle tRNA, die N-Formylmethionin (fMet) (Moll and Blasi, 2002). Ein weiteres Startsignal ist das Startcodon, welches aus AUG oder GUG Nukleotiden auf der mRNA besteht und mit der 16S rRNA wechselwirkt (Boelens and Gualerzi, 2002). Das fMet-tRNA Molekül besetzt die P-Stelle am Ribosom und interagiert mit dem Startcodon der mRNA. Die A- und E-Stelle im Ribosom sind zu dem Zeitpunkt noch unbesetzt. Eine weitere Aminoacyl-tRNA bindet an die A-Stelle im Ribosom. Nach der Ausbildung der Peptidbindung durch die Peptidyltransferase gelangt die freie tRNA an die E-Stelle und die Dipeptidyl-tRNA an die P-Stelle. Für die Translokation der tRNAs wird der Elongationsfaktor EF-G benötigt. Nach der Translokation ist die A-Stelle frei und es kann eine weitere AminoacyltRNA binden. Mit Hilfe des Elongationsfaktors EF-Tu wird eine Aminoacyl-tRNA an die A-Stelle gebracht. Bei korrekter Erkennung hydrolysiert EF-Tu GTP (Nissen et al., 1999) und der Faktor dissoziiert vom Ribosom. Durch die neue Besetzung der A-Stelle kommt es zur Freisetzung der E-Stelle, da nicht beide Stellen gleichzeitig besetzt werden können. Dieser Elongationszyklus setzt sich fort, bis ein Stoppcodon (UAA, UGA oder UAG) auftaucht (Ramakrishnan 2002). Für die Termination werden Freisetzungsfaktoren (RF1 oder RF2) benötigt. Da es keine Aminoacyl-tRNAs für die Stoppcodons gibt, bindet eines der beiden Proteine an die A-Stelle. Diese Bindung aktiviert die Peptidyltransferase, die eine Übertragung der Peptidkette auf Wasser katalysiert und darauf folgend die Polypeptidkette das Ribosom verlässt. Infolge der Freisetzung der Polypeptidkette verlassen dann auch die tRNA und mRNA das Ribosom. Darauf hin dissoziiert das Ribosom in seine 30S- und 50S-Untereinheiten.

1.8 Phosphoglycerat-Kinase und seine Bedeutung für E. coli

Bakterien, Tiere und auch Menschen nehmen Glukose auf und bauen die Zuckermoleküle ab, um Energie zu gewinnen. Der Abbau der Zucker nennt sich Glykolyse. Im Glykolyse Stoffwechsel von *Escherichia coli* spielt Phosphoglycerat-Kinase (PGK) eine bedeutende Rolle. PGK

verstoffwechselt 1,3-Bisphosphoglycerat und ADP zu 3-Phosphoglycerat und ATP. Dieser Schritt in der Glykolyse dient der Energiegewinnung. Durch die Substratketten-Phosphorylierung wird ein Phosphat von dem Substrat 1,3-Bisphosphoglycerat dephosphoryliert und auf das ADP übertragen.

Das *E. coli* PGK-Gen kodiert für ein 41,118 kDa großes Protein, welches von zwei unterschiedlichen Promotorbindestellen transkribiert wird. Der P1 Promotor liegt direkt vor dem Gen und der P2 Promotor liegt *upstream* vor einem 38 kDa Proteinfragment, dessen Funktion noch unbekannt ist. Das PGK Gen steht unter Wachstumsphasenregulation, so dass das Protein in der Übergangsphase zwischen logarithmischer und stationärer Phase deutlich ansteigt. (Nellemann et al., 1988). Die Phosphoglycerat-Kinase besitzt eine ATP Bindestelle. Das Protein besteht aus zwei Domänen, der N-Terminalen und der C-Terminalen Domäne, die durch einen α -Helix Linker miteinander verbunden sind, wie in Abbildung 1.11 gezeigt (Young et al., 2007).

Säugetiere verfügen gewöhnlich über zwei verschiedene PGK Protein Isoformen (gencards.org), das humane PGK Gen liegt auf dem X-Chromosom und das zweite ist auf dem Chromosom 19 lokalisiert. PGK-1 ist ein multifunktionales Protein, welches überwiegend in der Glykolyse aktiv ist, aber auch als Kofaktor für die humane DNA-Polymerase alpha dient. PGK-2 ist das reverse Transkript von PGK-1, Intron frei und befindet sich ausschließlich in den Hoden und ist dort im späten Stadium der Spermatogenese in der Glykolyse aktiv. PGK-1 besitzt eine Nukleotid-Bindungsdomäne und zwei katalytisch aktive Bereiche. Schon vor einiger Zeit konnte beobachtet werden, dass das Enzym in überexpremierter Form das Wachstum von Lungenkrebszellen (Lewis lung carcinoma (LLC-1)) reduzieren kann (Ho et al; 2010). So konnte auch gezeigt werden, dass das PGK Protein spezifisch an die kodierende Region der uPAR mRNA bindet und so die Zelloberflächen uPAR Expression inhibiert (Shetty et al., 2004). uPAR ist ein Urokinase-Typ plasminogen Aktivator Rezeptor, der auch im Wachstum von Lungenkrebszellen involviert ist. Zudem wurde auch das humane PGK-1 mit Darmkrebszellen in Verbindung gebracht (Shichijo et al., 2004). Somit zeigt sich, dass das PGK Protein nicht nur in die katalytische Aufgabe der Glykolyse involviert ist, sondern auch noch andere Funktionen besitzt. In Pflanzen (Nicotiana benthamiana) ist das PGK Protein in den Chloroplasten lokalisiert, bindet an das RNA-Virus Bamboo mosaic virus und ist dort am Infektionscyklus beteiligt (Cheng, Tsai et al., 2013).



Abbildung 1.11: Röntgenkristallstruktur der E.coli Phosphoglycerat Kinase

Die Abbildung zeigt, dass die Phosphoglycerat Kinase aus zwei Domänen besteht. Der graue Bereich ist die N-Terminale Domäne und der gelbe Strukturbereich ist die C-Terminale Domäne. Die beiden Domänen sind durch einen α -Helix Linker miteinander verbunden (braun). Das Protein besitzt eine ATP-Bindestelle und kann dimerisieren (Young et al., 2007).

1.9 Fragestellung und Konzeption der Arbeit

Die 6S RNA aus *E. coli* ist ein globaler Regulator für die Anpassung an veränderte Wachstumsbedingungen oder Stress. Daher stellt sich die zentrale Frage, welche möglichen weiteren Regulatoren und Netzwerke daran beteiligt sind?

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Frage nach der genauen regulatorischen Funktion zwischen dem RNA-Chaperon Hfq und der 6S RNA gestellt. Die Bindung von Hfq an die 6S RNA konnte schon gezeigt werden, jedoch ist die regulatorische Wirkung noch vollkommen unbekannt. Daher sollten mit einer Δhfq -Mutante die Konsequenzen der Abwesenheit des Proteins auf die 6S RNA analysiert werden. Sowohl die 6S RNA Konzentration, als auch die *ssrS*-Promotoraktivität sollten mit Primer Extension Analysen bestimmt werden. Im weiteren Verlauf war beabsichtigt Details der Komplexbildung und die genaue Bindeposition des Hfq Proteins auf der 6S RNA durch Gelretardierung und Footprint Analysen zu untersuchen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollten funktionelle Einzelheiten des Netzwerkes zwischen der 6S RNA und ppGpp, dem zentralen Effektormolekül der Stringenten Kontrolle aufgeklärt werden. Ein Zusammenhang zwischen 6S RNA und dem Effektormolekül ppGpp konnte bereits zuvor gezeigt werden. Im Vordergrund dieser Untersuchungen stand hier jedoch die Frage nach dem regulatorischen Zusammenhang und durch welche weiteren Netzwerk-Komponenten die beiden Moleküle miteinander verbunden sind? Dazu sollte in An- und Abwesenheit von Hfq und mit Hilfe eines GMP-Synthetase Hemmers der zelluläre ppGpp-Spiegel durch Dünnschicht-chromatographie analysiert werden.

Im letzten Teil dieser Arbeit sollte nach möglichen weiteren zellulären Interaktionspartnern der 6S RNA gesucht werden. Da schon zwei Bindepartner (RNAP; Hfq) bekannt sind, ist die Wahrscheinlichkeit groß, noch weitere potentielle Interaktionspartner zu finden, besonders weil die 6S RNA in einem globalen regulatorischen Netzwerk fungiert. Für diese Untersuchungen sollte eine *in vitro pull down* Methode etabliert werden. Die potentiellen Bindepartner der 6S RNA sollten darüber hinaus charakterisiert werden und um deren eventuellen Einfluss auf das 6S RNA Regulationsnetzwerks zu analysieren.

2. Ergebnisse

Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit lag auf der Charakterisierung und Identifikation weiterer Interaktionspartner der 6S RNA. Es ist schon lange bekannt, dass die DNA-abhängige RNA-Polymerase (RNAP) und das RNA Chaperon Hfq an die 6S RNA binden (Wasserman and Saecker, 2006; Gildehaus et al., 2007; Windbichler et al. 2008). So lag die Vermutung nahe, dass auch andere Proteine an die 6S RNA binden können und dadurch einen regulatorischen Effekt auf die Zelle ausüben. Die 6S RNA ist eine kleine regulatorische RNA, die die $E\sigma^{70}$ gebundene RNAP in der stationären Phase bindet und somit indirekt die σ^{38} - und andere σ -abhängige Promotoren verstärkt. Um neue Interaktionspartner zu bestimmen, wurden mehrere Methoden geprüft und die *in vitro pull down* Methode mit Agarose beads etabliert. Die Charakterisierung erfolgte über EMSA Analysen und Footprint Analysen bei dem gefundenen Protein.

Ein weiteres Ziel war die Analyse des 6S RNA Regulationsnetzwerkes, wobei die Beziehung von 6S RNA und Hfq und die Bedeutung von ppGpp in diesem Netzwerk eine wichtige Rolle spielt. Dazu wurde die 6S RNA und das Effektormolekül ppGpp in An- und Abwesenheit von Hfq untersucht. Zudem wurden noch weitere Strukturanalysen durchgeführt, um die Binderegionen von Hfq an die 6S RNA zu identifizieren.

2.1 Charakterisierung der Wechselwirkung von 6S RNA und Hfq

Schon seit den 90er Jahren ist bekannt, dass Hfq (*host factor required for phage* Qß RNA *replication*) als RNA-Chaperon an RNAs binden kann (Arluison et al. 2007). Hfq ist ein 11,2 kDa kleines Protein, aus 102 Aminosäuren und kommt in seiner funktionellen Form als Hexamer vor. Zuerst wurde die Interaktion von Hfq und der 5'-UTR von *ompA* (*outer membrane protein A*) gezeigt. Anschließend konnte eine simultane Bindung an DsrA (sRNA) und der mRNA von *rpoS* bewiesen werden. RpoS ist der primäre Regulator der stationären Phase Gene. Später wurden noch weitere sRNAs aus *E. coli* gefunden, die an Hfq binden. Hfq bindet bevorzugt an A/U-reiche Regionen die an benachbarten Stammregionen liegen. So wurde Hfq zu einem wichtigen post-transkriptionellen Regulator. Im Jahre 2008 konnte auch die Bindung an 6S RNA

festgestellt werden (Windbichler et al. 2008). Dies war zuerst sehr verwunderlich, da die 6S RNA gut strukturiert ist und selbst eine Regulatorfunktion besitzt. Hfq bindet meist an mRNAs oder unstrukturierten RNAs. Dennoch stellte sich die Frage, ob es Auswirkungen auf die 6S RNA hat, wenn das Protein deletiert ist und ob vielleicht die Expression oder Stabilität der RNA beeinträchtigt ist?

2.1.1 Phänotypische Untersuchung der Δhfq -Mutante und ihrem isogenen Wildtyp

Um die Frage zu beantworten, wie sich das Fehlen von Hfq auf die Zelle und den 6S RNA Spiegel verhält, wurden zu Beginn Wachstumsanalysen und zellmorphologische Untersuchungen durchgeführt. Im späteren Verlauf wurden noch 6S RNA Konzentrationsbestimmungen und Promotoraktivitäten sowie Messungen des ppGpp-Spiegels verifiziert. Für diese Fragestellung wurden die beiden Stämme der Keio Collection verwendet: BW25113 als isogener Wildtyp und JW4130 als Δhfq -Mutante. Die Mutante hat anstelle des hfq-Gens eine Kanamycin Resistenzkassette inseriert. Zu Beginn wurde das Wachstum und der Phänotyp der beiden Stämme verglichen und anschließend die zelluläre Menge an 6S RNA bestimmt.

Bei den Wachstumskurven wurden die Zellen, wie im Methodenteil beschrieben (5.1.8) in YT-Medium angezogen und halbstündig die Zelldichte spektralphotometrisch bestimmt. Das Wachstum der beiden Stämme unterscheidet sich deutlich, wenn die Zellen in die stationäre Phase übergehen. In der Abbildung 2.1 ist zu erkennen, dass die Δhfq -Mutante (rot) eine geringere Zelldichte als der Wildtyp (schwarz) erreicht, demnach wird die stationäre Phase früher eingeleitet. Im Graphen ist auch ein leichtes Absinken der roten Kurve der Hfq-Mutante bei ca. 1 OD zu erkennen, anscheinend werden hier andere regulatorische "*back up*" Mechanismen gestartet, die das Fehlen von Hfq ausgleichen. Die Wachstumsraten in der logarithmischen Phase wurden anhand der im Methodenteil (5.1.8) beschriebenen Formel berechnet und unterscheiden sich kaum voneinander. Der Wildtyp Stamm hat eine Wachstumsrate (Verdopplung pro Stunde) von 2,4 und der Δhfq -Stamm von 2,3. Die geringen Unterschiede in der Wachtumsrate spiegeln aber nur die logarithmische Phase wieder und geben keine Auskunft über das Verhalten in der transitions- und stationären Phase wieder.



Abbildung 2.1: Wachstumskurve

Wachstumskurve der Stämme BW25113 (schwarz) und JW4130 (rot), die in YT-Medium angezogen wurden. Es wurde halbstündlich eine spektralphotometrische Messung bei 600 nm durchgeführt. Die gezeigte Wachstumskurve setzt sich aus den Mittelwerten von drei unabhängigen Messungen zusammen (siehe Anhang Tabelle 7.1). Die Pfeile zeigen die logarithmische- und stationäre Wachstumsphase an, in der Zellen geerntet und später deren Gesamt-RNA präpariert wurde.

Da die Wachstumsrate in der logarithmischen Phase aus der Steigung berechnet wurde, ist es nicht verwunderlich, dass die Werte nahe beieinander liegen. Denn die sichtbaren Unterschiede beginnen erst in der transitions Phase und zeigen auch nach über 16 h deutlich geringere Zellzahlen, als bei den Wildtyp Zellen.

Anschließend wurde die Zellmorphologie von beiden Stämmen mikroskopisch untersucht, um die Auswirkungen durch das Fehlen von Hfq Phänotypisch zu beschreiben. Hierfür wurden jeweils 5 ml Zellen in der logarithmischen- und stationären Phase pelletiert. Die Zellen wurden zur gleichen Zeit entnommen - zwecks 6S RNA Konzentrationsbestimmung und Messung des ppGpp-Gehalts in der Zelle (gezeigt in Abb 2.1 mit den zwei schwarzen Pfeilen). Die Zellpellets wurden gewaschen und mit Nilrot und DAPI gefärbt (5.3.15). Nilrot ist ein Farbstoff der Lipoproteine bindet und somit die Zellwand rot färbt. DAPI lagert sich in der kleinen Furche der DNA an und fluoresziert blau.


Abb. 2.2: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der logarithmischen Wildtyp und Hfq-Mutanten Zellen

Zellfärbung der Wiltdyp Zellen (BW25113) und Hfq-Mutanten Zellen (JW4130) mit DAPI und Nilrot in der logarithmische Wachstumsphase. Abbildung **A** zeigt sowohl die DAPI, als auch die Nilrot Färbung mit Durchlicht, in **B** wurde die Überlagerung der einzelnen Bilder mit Auflicht durchgeführt. In Abbildung **C** und **D** sind die einzelnen Filter einmal für die DNA (C bei einem Absorptionsmaximum von 385nm) und einmal für die Zellmembran (D bei einem Absorptionsmaximum von 553nm) gezeigt.

Abb. AI zeigt beide Färbungen im Durchlicht und BI im Auflicht. CI zeigt das mikroskopierte Bild mit dem Filter für die DNA und DI mit dem speziellen Filter für die Nilrotfärbung. Als Beispiel ist in Abb. EI und FI eine von vielen Zellen gezeigt, die eine deutliche Überlänge aufweist. Es wurde eine 5 μ M Skala verwendet.



gefärbte DNA durch DAPI und in Abbildung D ist die Färbung der Zellwand mit Nilrot zu sehen. In Abbildung **AI** und **BI** sind die Bilder der DAPI- und Nilrotfärbung übereinander gelegt worden. Die einzelnen Bilder sind in **CI** und **DI** zu sehen. Als Beispiel sind auch in Abbildung **EI** und **FI** in der stationären Phase Zellen, die deutlich verlängert sind gezeigt. Es wurde eine 5 μ M Skala verwendet.

Sowohl in der logarithmischen- als auch in der stationären Phase sind deutliche Unterschiede der beiden Stämme zu erkennen. Die klassischen *Escherichia coli* Wildtyp Zellen in der logarithmischen Phase besitzen eine Stäbchenform und befinden sich fast alle in der Zellteilung. An beiden Enden der stäbchenförmigen *E. coli* Zellen ist chromosomale DNA zu erkennen (blau leuchtende Punkte), was darauf schließen lässt, dass sie sich in der aktiven Teilungsphase befinden. Im Gegensatz dazu zeigen die hfq-mutanten Zellen einen deutlichen Phänotyp. Sie sind in etwa 2x länger als der Wildtyp. Die durchschnittliche WT Zelle ist 3-4 µm lang, die Mutante ca. 6-7 µm. Es ist auch zu erkennen, dass sich in den mutanten Zellen mehrere Chromosomen befinden (Abb. 2.2 EI/FI und 2.3 EI/FI). Dies deutet darauf hin, dass die Zellen Probleme mit der

Zellteilung und dem Abschnüren der neu entstandenen Zelle haben. Die Verlängerung der Zellen ist in Einzelfällen besonders ausgeprägt, wie Abbildung 2.2: EI und FI eine beispielshaft extrem lange Zelle zeigt. Auch in der stationären Phase sind die Unterschiede zu erkennen. Während die Wildtypzelle in der stationären Phase klein und kugelig rund wird, sind die Zellen vom Stamm JW4130 länglich bis sehr lang und weisen oft mehrere Chromosomen auf, wie in Abb. 2.3: EI und FI anhand der dunklen Punkte in der Zelle zu sehen ist. Die durchschnittliche Länge der mutierten Zellen beträgt auch hier ca. 5 µm.

Bei der Zellteilung von *E. coli* werden zuerst die Proteine FtsZ/ZapA an die Zellwand rekrutiert, anschließend bilden die beiden Proteine FtsZ und ZipA ein Komplex und initiieren an der inneren Membran die Septenbildung. Daraufhin wird ein weiterer Proteinkomplex an das wachsende Septum assembliert, das FtsL/FtsQ/FtsL. Bei einem oder mehreren Schritten muss Hfq eine wesentliche Rolle spielen. Übereinstimmend damit konnte schon 2005 gezeigt werden, dass bei Hfq Überexpression auch eine verminderte Zellteilung stattfindet (Takada et al. 2005). Anhand von vorherigen Studien konnte gezeigt werden, dass die Expression des Zellteilungsprotein FtsZ in Δhfq Zellen in der stationären Phase erhöht ist (Takada et al. 1999).

2.1.2 Vergleich der 6S RNA Menge innerhalb verschiedener Stämme und Wachtumsphasen

Es ist bekannt, dass eine Vielzahl von essentiellen regulatorischen Zellmechanismen durch Hfq beeinflusst werden. So stellte sich die Frage, ob der 6S RNA Level in der Zelle verändert ist, wenn Hfq deletiert ist. Da Hfq ein RNA-Chaperon ist, RNA bindet und diese sowohl vor dem Abbau schützt, als auch für den Abbau markiert, kann auf ein verändertes 6S RNA Level geschlossen werden.

Um der Frage nach dem 6S RNA Level in der Zelle nachzugehen, wurden Primer Extension Analysen (5.3.5) mit zwei verschiedenen 6S RNA spezifischen Primern und einem 5S RNA spezifischen Primer zur Quantifizierung als internen Standard durchgeführt. Die Zellen der beiden Stämme wurden dazu jeweils in der logarithmischen- und in der stationären Phase, wie in der Wachstumskurve Abb. 2.1 mit den beiden Pfeilen markiert, geerntet. Da sich die Zelldichte unterscheidet wurden die Zellzahlen bei dem Pelletieren der Zellen angeglichen. Für die Primer Extension Versuche wurde jeweils 1 µg gRNA (gesamt RNA) in die Reaktion eingesetzt. Es ist deutlich zu erkennen, dass in beiden Abbildungen (2.4: A und B) die 6S cDNA Transkripte in der Δhfq -Mutante in beiden Phasen erhöht ist. Bei dem c6S Primer (Abb. 2.4: A) entstehen zwei 6S cDNA Transkriptlängen die beide in der Δhfg -Mutante verstärkt sind. In der logarithmischen Phase ist die obere 6S cDNA Bande stärker, als die untere Bande (Spur 2). In der Spur 2 entstehen noch weitere Prozessierungsvorläufer der 5S rRNA, die nur in der logarithmischen Phase in beiden Abbildungen beobachtet werden konnten und oberhalb der eigentlichen 5S cDNA Banden liegen. Es ist auch zu erkennen, dass in der stationären Phase die 6S cDNA Transkriptbanden sich fast dem Wildtyp angleichen. In der Mutante ist nur noch ein gering stärkeres Signal zu detektieren (Spur 4 A). Bei dem zweiten 6S RNA spezifischen Primer, welcher an die pRNA Hybridisierungsstelle bindet, sind die Ergebnisse ähnlich (s. Abb. 2.4 B). Auch hier ist anhand der Abbildung zu erkennen, dass die 6S cDNA Transkriptbanden in der Δhfq -Mutante deutlich verstärkt sind. Hier steigen die Bandenintensitäten auch in der stationären Phase sichtbar an (Spur 4 B). Dennoch ist auch in der logarithmischen Phase der Mutante eine Verstärkung der Banden sichtbar. Auffällig ist auch, dass die Prozessierung der 6S cDNA Transkripte in der Δhfg -Mutante anders sind, als die Wildtyptranskriptbanden. In Abb. A ist z.B. die obere 6S cDNA Transkriptbande dunkler, als bei dem Wildtyp, wo die untere Bande in der stationären deutlicher zu erkennen ist. Die quantitative Phase Auswertung der Bandenintensitäten, der beiden Oligonukleotide, wurde von mehreren unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten in Abbildung 2.5 gezeigt.



Abb. 2.4: Autoradiogramm zweier Primer Extension Analysen zur quantitativen Bestimmung der 6S RNA Anteile von der Δhfq -Mutante und dem Wildtyp, in der logarithmischen- und stationären Phase.

Gezeigt sind die cDNA Transkriptbanden die bei der Primer Extension Analyse synthetisiert werden. In diesem Versuch wurde aus beiden Phasen, bei angeglichener Zellzahl, Zellen pelletiert und 1 μ g gRNA in die Reaktion eingesetzt. Der 5S RNA Primer wurde als interner Standard verwendet. Die elektrophoretische Trennung erfolgte über eine 10 %iges dPAGE. A zeigt die Primer Extension mit dem c6S Oligonukleotid und **B** zeigt die Primer Extension mit dem 6S-1 Primer.

Für die quantitative Auswertung wurde als interner Standard die 5S rRNA zusätzlich mit einem spezifischen Oligonukleotid bestimmt. Zuerst wurde der Hintergrund von der Schwärzung der Banden subtrahiert und anschließend die Werte der 6S RNA durch die Werte der 5S rRNA dividiert. Auch im Graph (s. Abb. 2.5) ist ein deutlicher Unterschied in den 6S RNA Konzentrationen der beiden Stämme zu erkennen. In der logarithmischen Phase steigt das 6S RNA Level in der Δhfq -Mutante, im Gegensatz zum Wildtyp 1,5 fach (6S-1 Primer / blau) und 1,4 fach (c6S Primer / rot) an und in der stationären Phase ist anhand der quantifizierten Werte maximal ein geringer Anstieg des 6S RNA Levels zu deuten. Die beiden Autoradiogramme in Abb. 2.4: A/B zeigen eine Zunahme des intrazellulären 6S RNA Levels in der Δhfq -Mutante.



Abb. 2.5: Quantifizierung der Primer Extension Analysen

Gezeigt ist die Quantifizierung aller Primer Extension Analysen zur Bestimmung der 6S RNA Menge in den Zellen. Das Diagramm repräsentiert die 6S cDNA Transkriptmenge für beide Phasen des Wildtyps (BW25113) und der Δhfq -Mutante (JW4130). Für den c6S Primer wurde von drei voneinander unabhängigen Versuchen die Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet und für den 6S-1 Primer von vier voneinander unabhängigen durchgeführten Versuchen. Als externen Standard wurde der 5S RNA Primer verwendet. Die Schwärzung der Banden wurden mit dem Computerprogramm Multi Gouge dedektiert (siehe Werte im Anhang 7.2).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die 6S RNA Konzentration in der logarithmischen Phase des Δhfq -Stamms 1,5 fach höher ist als im Wildtyp und in der stationären Phase der Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante marginal ist. Der geringe Unterschied kann aber auch darauf zurückzuführen sein, dass die 6S RNA zu den stabilen RNAs gehört und in der Zelle über die Zeit akkumuliert. In der stationären Phase liegt die 6S RNA in einer Zahl von ca. 5000 Kopien pro Zelle vor und geringe Unterschiede können dann nicht genau detektiert werden. Auch scheint die Prozessierung der Transkriptbanden in An- und Abwesenheit von Hfq unterschiedlich abzulaufen. Bis heute ist die 3'-End Prozessierung der 6S RNA noch vollkommen unbekannt und die 5'-Enden der 6S RNA werden durch die RNasen E und G prozessiert.

2.1.3 Ist die Syntheseaktivität des ssrS-Promotors durch Hfq beeinflusst?

Da die vorherigen Versuche gezeigt haben, dass die 6S RNA Transkriptmenge besonders in der logarithmischen Phase ansteigt, wenn *hfq* deletiert ist, stellt sich die Frage: repremiert Hfq die Promotoraktivität oder wird durch die Bindung von Hfq an die 6S RNA, diese instabil und kann abgebaut werden? Die Promotoraktivität könnte von Hfq sowohl direkt als auch indirekt beeinflusst sein.

Die 6S RNA besitzt zwei Promotoren, der P1 Promotor liegt proximal 9 Nukleotide vor dem Transkriptionsstart, ist σ^{70} spezifisch und übernimmt 70 % der 6S RNA Expression. Der distale P2 Promotor liegt 224 Nukleotide vor dem Transkriptionsstart und kann von σ^{70} und σ^{38} erkannt werden (Kim and Lee 2004).

Um die Transkriptionsmenge des ssrS-Gens bestimmen zu können, wurde jeweils das Plasmid pCAT-6S-P1 und pCAT-6S-P2 in den Wildtyp Stamm und in die Δhfg -Mutante transformiert. Bei diesen Plasmiden liegt entweder der P1 oder der P2 Promotor des ssrS-Gens upstream des cat-Reportergens (Neußer 2008). Da das cat-Fusionstranskript nur eine relativ kurze Halbwertszeit hat, kann so die aktuelle Transkriptionsrate des Promotors gemessen werden. In der anschließenden Primer Extension Analyse konnte dann mit einem spezifischen Oligonukleotid (CAT-Primer) aufgrund der Schwärzung der Banden im Autoradiogramm Rückschlüsse auf die Promotoraktivität gezogen werden. So wurde die Menge an synthetisierter cat-mRNA gemessen. In Abbildung 2.6 sind die Autoradiogramme der beiden Primer Extension Analysen gezeigt. Das linke Bild zeigt die cDNA Transkripte für den P1 Promotor und das rechte Autoradiogramm für den P2 Promotor. Wie erwartet zeigt der P1 Promotor eine höhere Aktivität als der P2 Promotor. Die P1 cat-Fusionstranskripte zeigen sowohl im Wildtyp als auch in der Δhfq -Mutante eine ähnliche starke Schwärzung im Autoradiogramm. Die Intensität der Schwärzung ist bei dem Wildtyp geringfügig stärker als bei der Mutante, da aber keine klar erkennbaren Unterschiede mit dem Auge wahrnehmbar sind, wurde das Autoradiogramm mit dem Computerprogramm "MultiGauge" quantifiziert. Zuerst wurden die beiden RNAI Bandenintensitätswerte addiert und anschließend durch die einzelnen Werte der Promotoraktivitätsbanden dividiert. Diese Auswertungen sind in Abbildung 2.7 zu sehen. Das Balkendiagramm in 2.7 zeigt, dass die P1 Promotoraktivität in der Mutante um die Hälfte geringer ist als im Wildtyp. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass der Unterschied der P1 Promotoraktivität in der logarithmischen Phase höher ist als in der stationären Phase im Vergleich WT und Mutante. Bei dem P2 cat-Fusionstranskript sind die Banden in der stationären

Phase marginal schwächer als in der logarithmischen Phase. Dennoch sind kaum Disparitäten zwischen dem Wildtyp und der Δhfq -Mutante zu erkennen. Daher wurde auch von diesem Autoradiogramm ein Quantifizierung der Banden durchgeführt. Da die Syntheseaktivität des *ssrS* P2 Promotors sehr gering ist, wurde diese Auswertung in einem eigenen Balkendiagramm dargestellt. Die x-Achsen der beiden Diagramme sind unterschiedlich beschriftet, für die relative Transkriptmenge des P1 Promotors von 0 bis 15 bzw. des P2 Promotors von 0 bis 0,4. Für die Syntheseaktivität des P2 Promotors sind keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Wildtyp und der Δhfq -Mutante zu erkennen. Als internen Standard für die Quantifizierung wurde die RNAI gewählt, da diese auch auf dem Plasmid kodiert ist.



Autoradiogramm zweier Primer Extension Analysen zur Bestimmung der *ssrS*-Syntheseaktivität im Wildtyp und in der Hfq-Mutante. Die Zellen wurden in der logarithmischen- und stationären Phase pelletiert und die gRNA extrahiert. In die Reaktion wurde 1 μ g gRNA eingesetzt und den cat-Primer sowie den RNAI Primer als internen Standard verwendet. Im linken Autoradiogramm wurde die P1- und im rechten Bild die P2 Promotoraktivität untersucht.



Abb. 2.7: Quantifizierung der Syntheseaktivität der beiden *ssrS*-Promotoren Gezeigt ist die Quantifizierung der Primer Extension Analysen aus Abbildung 2.7. Links ist die graphische Auswertung der Transkriptmenge des P1 Promotors und rechts des P2 Promotors des *ssrS*-Gens (siehe Werte im Anhang 7.3).

Abschließend kann gesagt werden, dass die Ergebnisse unerwartet waren, denn die P1 Promotoraktivität ist invers zur 6S RNA Transkriptmenge in der logarithmischen Phase. Das 6S RNA Level in der Mutante steigt an während die *ssrS*-Promotoraktivität in den Zellen erniedrigt ist. Die P2 Promotoraktivität ist in beiden Stämmen relativ gleichbleibend. So muss der erhöhte 6S RNA Level einen anderen Grund haben. Da Hfq an 6S RNA bindet, kann auch dies zu einem rascheren Abbau führen. Es ist bekannt, dass unter Bedingungen des verbesserten Nährstoffangebots die pRNA Synthese beginnt und somit der 6S RNA;pRNA Komplex von der RNAP dissoziiert (Wurm et al., 2009). Vielleicht markiert Hfq die 6S RNA für den Abbau oder die Struktur ändert sich in der Weise, dass sie abgebaut werden kann, da sie sonst eine sehr stabile Doppelstrangstruktur aufweist und in der Zelle über die Zeit akkumuliert.

2.1.3.1 Rifampicin-Kinetik

Um die Möglichkeit auszuschließen, dass das Hfq Protein im Wildtypstamm an das *cat*-Fusionstranskript bindet und die Halbwertszeit verlängert und deshalb die Ergebnisse über die 6S RNA Promotoraktivitäten unter Gleichgewichtsbedingungen verändert, wurde eine Rifampicin-Kinetik in beiden Stämmen durchgeführt.

Für diesen Versuch wurden Zellen in YT-Medium bis zur logarithmischen Wachstumsphase angezogen und zu einem Zeitpunkt 0 das Antibiotikum in einer Konzentration von 0,5 mg/ml hinzugegeben. Rifampicin verhindert alle weiteren Transkriptionsinitiationen, indem es an die β-

Untereinheit der RNAP bindet. Da das *cat*-Fusionstranskript nur eine sehr kurze Halbwertszeit besitzt, sollte schon nach wenigen Minuten eine Abnahme der *cat*-Transkriptbanden zu sehen sein. Nach der Zugabe wurde an festgelegten Zeitpunkten 5 ml Zellkultur entnommen, durch eine heiße Phenollyse (5.2.2.1) aufgeschlossen und die gRNA extrahiert (5.2.1.3). Anschließend wurde jeweils 1 µg gRNA zur Quantifizierung in die Primer Extension Analyse eingesetzt.

Die Abbildung 2.8 zeigt das Autoradiogramm der Rifampicin-Kinetik der beiden Stämme mit den pCAT-6S-P1 Plasmiden. Das linke Autoradiogramm zeigt die Primer Extensions Analyse des Wildtyp und rechts der Mutante. Als internen Standard wurde das RNAI Oligonukleotid verwendet, da in diesem Experiment die Bandenintensitäten sehr schwach sind, ist überwiegend nur eine RNAI Transkriptbande zu erkennen. Das RNAI Oligonukleotid erzugt eine weitere Nebenproduktbande, die für die Fragestellung und Auswertung des Experimentes vernachlässigt werden kann. Um die Abnahme des cat-Fusionstranskriptes nach Zugabe des Rifampicin zu messen wurde das cat-Oligonukleotid in die Reaktion eingesetzt. Der Zeitpunkt 0 ist vor der Zugabe des Rifampicin, Spur 1 und 11 in der Abbildung. In der Δhfq -Mutante rechts in der Abbildung nimmt die ssrS P1 Transkriptbande ab 50 sek leicht ab und bei 2 min in Spur 18 ist keine Produktbande mehr zu erkennen. Bei dem Wildtyp zeigt sich eine ähnliche Bandenabnahme. Nach 2 min in Spur 8 ist fast keine Bande zu detektieren und nach 5 und 10 min ist sie nicht mehr zu sehen. Das Autoradiogramm wurde in Abbildung 2.9 graphisch Dargestellt und zeigt die Abnahme des P1 Produktes in beiden Stämmen. Die Halbwertszeit des cat-Fusionstranskriptes des Wildtyps liegt bei ca. 70 sek und bei der Mutante etwas darunter bei ca. 60 sek. An Hand dieser Rifampicin-Kinetik kann ausgeschlossen werden, dass das Hfq Protein im Wildtypstamm an das cat-Fusionstranskript bindet und so die Halbwertszeit der Transkripte deutlich verlängert.



Fusionstranskriptes in beiden Stämmen

Autoradiogramm einer Primer Extension Analyse mit dem cat-Primer und RNAI Primer. Die Zellen der beiden Stämme wurden angezogen bis zu einer OD_{600} von 0,3 bis 0,4 und vor Zugabe des Antibiotikums 5 ml Zellen zum Zeitpunkt 0 entnommen. Anschließend wurde das Rifampicin (Endkonzentration von 0,5 mg/ml) zugegeben und zu festgelegten Zeitpunkten weitere 5 ml Zellkultur entnommen und die gRNA extrahiert. Es wurde jeweils 1 µg gRNA in die Primer Extension Reaktion eingesetzt und die Produkte auf einem 10 % dPAGE aufgetrennt.



Abbildung 2.9: Graphische Auswertung der Rifampicin-Kinetik von Abb. 2.8

Der Graph zeigt die quantifizierten Daten des Autoradiogramms der Rifampicin-Kinetik. Die Abbildung zeigt deutlich die Abnahme des P1 cat-Fusionstranskripts. Die roten Dreiecke zeigen den Wildtyp (BW 25113) und die schwarzen Kreuze die Mutante (JW4130). Es wurde eine Ausgleichsgerade durch die Punkte gezogen und die Halbwertszeiten bestimmt (Tabelle im Anhang 7.4).

2.1.4 Hfq bindet an die 6S RNA

Schon im Jahre 2008 konnte gezeigt werden das Hfq und 6S RNA einen Komplex eingehen (Windbichler et al., 2008). Um die Bindung zu veranschaulichen und die genauen Positionen zu lokalisieren, wo Hfq an die 6S RNA bindet wurden EMSA (electrophoretic mobility shift assay) Footprint Analysen durchgeführt. Da nachgewiesenermaßen und ein kompliziertes regulatorisches Netzwerk die Verbindung zwischen der 6S RNA und Hfg steuert, könnte die genaue Binderegion und Bindungsaffinität von Hfg an der 6S RNA möglicherweise weiterhelfen. Dazu musste zuerst Hfq überexprimiert und aufgereinigt werden. Hierfür wurde der Überexpressionsstamm BL21(DE3)/pEH10 verwendet. Nach der Überexpression von Hfq, induziert durch 0,5 mM IPTG, wurden die Zellen nach drei Stunden pelletiert und Die Aufreinigung erfolgte über die FPLC (Fast Protein Liquid aufgeschlossen. Chromatographie) hier eine "Äkta prime plus" (5.2.4). Nach der Aufreinigung wurde das Protein dialysiert (5.2.4.1) und die Konzentration mittels Bradford Methode bestimmt (5.2.3.2).

Mit dem aufgereinigtem Hfq wurden Retardierungsanalysen durchgeführt und es konnten Bindungen zwischen der 3'-End radioaktiv markierten 6S RNA und dem Hfq verifiziert werden (5.3.7). Dazu wurde 15 nM 3'-End radioaktiv markierte 6S RNA mit ansteigenden Konzentrationen von Hfq im Hexamer (von 0 bis 0,833 µM) in den Reaktionsansatz hinzu titriert und bei 30 °C 10 min inkubiert. Anschließend kam als Kompetitor Heparin (Endkonzentration von 100 ng/µl) hinzu, um die unspezifischen Bindungen zu minimieren und es wurden weitere 5 min inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Reaktionsansatz auf ein 5 %iges natives PAA-Gel aufgetragen. In Abbildung 2.10 ist das Autoradiogramm der Retardierung zu sehen. In Spur 1 ist die freie 6S RNA ohne Protein aufgetragen. Die RNA zeigt eine klare Bande. In den Spuren 2 bis 11 wurde das Hfq in ansteigenden Konzentration von 83 nM (im Hexamer) detektierbar. Die Komplexbande nimmt dann mit ansteigender Proteinkonzentration deutlich zu. Ab Spur 8 wird leicht eine sekundäre Komplexbande erkennbar. Hier binden vermutlich zwei Hfq Hexamere an ein 6S RNA Molekül. Zudem nimmt die freie 6S RNA Bande ab, je mehr Protein hinzu titriert wurde und die Komplexbanden zunehmen.





Das Autoradiogramm zeigt sowohl den primären- als auch den sekundären Komplex und die freie 6S RNA. In dem 15 μ l Ansatz wurden 15 nM 6S RNA, 1x KGlu80-Puffer, GF-Puffer und 100 ng/ μ l Heparin zu der steigenden Menge an Hfq gegeben. Die Hfq Konzentrationen sind: 0,083 / 0,166 / 0,25 / 0,333 / 0,416 / 0,5 / 0,583 / 0,666 / 0,75 und 0,833 μ M. Die Komplexe wurden durch ein 5 %iges natives PAA Gel bei 30 mA von der freien RNA getrennt.

Nach der Bestätigung der Interaktion zwischen der 6S RNA und Hfq wurden Footprint Analysen durchgeführt. Mit Hilfe dieser Analysen sollten die Bindedomänen von Hfq auf der 6S RNA identifiziert werden. Für die Identifikation dieser Positionen wurden enzymatischen Footprint Analysen (5.3.10) und Footprint Analysen mit Hydroxylradikalen (5.3.11) durchgeführt.

Bei den enzymatischen Footprint Analysen sind die Reaktionsansätze ähnlich den Retardierungsanalysen und wurden nach der Inkubation mit Heparin als Kompetitor, spezifische RNasen hinzugegeben und weitere 15 min bei 30 °C inkubiert. Nach einer anschließenden Phenol/Chloroform Extraktion (5.2.2.1) und Ethanolfällung (5.2.2.2) wurden die Proben auf ein 10 %iges dPAGE aufgetragen. Es wurde eine limitierende RNase T1 und RNase V1 Hydrolyse durchgeführt. Die RNase T1 schneidet einzelsträngige RNAs hinter einem Guanin und die RNase V1 schneidet unspezifisch Doppelstränge. Da zwei Hfq Komplexstellen auf der 6S RNA bekannt sind, wurden die Footprint Analysen mit zwei unterschiedlichen Hfq Konzentrationen durchgeführt, einmal für die einfach besetzte 6S RNA mit einer Hfq Konzentration von 83 nM und einmal eine sehr viel höhere Konzentration von 416 nM für die zweifach besetzte 6S RNA. Wobei in den Ansätzen mit hoher Hfq Konzentration auch überwiegend primäre Komplexe vorkommen und hier ein Gemisch aus verschiedenen Komplexen vorliegt. Einmal die primäre

Komplexbildung, die entweder das Hfq an der einen oder an der anderen Bindestelle auf der 6S RNA besetzt hat und die sekundären Komplexe, die zwei Hfq Hexamere an der RNA gebunden haben. Dies erschwert die Auswertung der Footprint Analysen erheblich. Da die 6S RNA für eine regulatorische RNA mit 186 Nukleotiden sehr lang ist, sind nicht alle Banden vollständig identifizierbar. Daher wurde sowohl das 3' -Ende (5.3.2) als auch das 5' -Ende radioaktiv markiert (5.3.3) und analysiert.

In Abbildung 2.11 ist exemplarisch ein Footprint Experiment einer 3'- und 5'-End markierten RNA gezeigt. Flankierend wurde immer eine OH' Leiter aufgetragen. Das Autoradiogramm A zeigt einen hydrolytischen Verdau der 3 -radioaktiv markierten 6S RNA einmal mit RNase T1 und RNase V1. In Spur 2 und 5 ist die ungeschützte 6S RNA in Abwesenheit von Hfq einmal mit RNase T1 und einmal mit RNase V1 hydrolysiert dargestellt. Im Autoradiogramm sind die frei zugänglichen Guanine gekennzeichnet. Einmal G136 und G143 im 3'-*central domain*, G80 und G97 im *terminal loop* und G30 und G42 im *closing stem* und 5'-*central domain*. Besonders in der V1 Hydolyse (Spur 6, 7) sind deutlich Banden zu erkennen, die in Spur 5 ohne Hfq nur schwach oder gar nicht zu sehen sind. Dies deutet auf einen Doppelstrang hin der evtl. entstehen kann, wenn Hfq gebunden hat. Das veränderte Bandenmuster ist mit roten Linien am Rand des Autoradiogrammes gekennzeichnet. In Abbildung B ist ein verändertes Bandenmuster der 5'-End markierten 6S RNA zu erkennen. In Spur 1 und 5 ist die Hydrolyse ohne Hfq und in den Spuren 3/4 und 6/7 mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen von Hfq zu sehen. Die roten Linien rechts, flankierend zu dem Autoradiogramm, zeigen die veränderten Bandenintensitäten der Hydrolyse mit und ohne Hfq auf.

In Abbildung 2.12 sind repräsentativ zwei Footprint Analysen durch Hydroxylradikale (5.3.11) mit graphischer Auswertung gezeigt. Auch hier ist sowohl eine 3'- als auch eine 5' -End markierte 6S RNA verwendet worden. Durch die Dekompensation von Wasserstoffperoxid mit der Beteiligung von Katalysatoren (hier Eisen) entstehen Hydroxylradikale, die ein starkes Oxidationsmittel sind. Sie sind so reaktiv, dass sie sofort mit RNA Molekülen reagieren. Links flankierend wurde jeweils eine OH⁻ Leiter und darauf folgend einmal die ungeschützte RNA in Abwesenheit von Hfg und der Komplex (6S RNA + Hfg) mit drei verschiedenen Hfg Konzentrationen (83, 416 und 833 nM Hfq) aufgetragen. Da die Autoradiogramme nur schwach erkennbare Unterschiede zeigen, wurde eine graphische Auswertung mit dem Computerprogramm ChemiDocTM angefertigt. Hier sind die Intensitäten der einzelnen Banden der Footprint Analysen in ihrer Schwärzung dargestellt, wobei der Hintergrund zuvor subtrahiert

2. Ergebnisse

wurde. Besonders in der graphischen Darstellung werden die Bandenintensitätsunterschiede verdeutlicht. In Abbildung A, bei der Betrachtung der RNA vom 5' -Ende aus, sind im oberen Teil des Diagramms bei Nukleotid G80 und im unteren Teil bei Nukleotid G30 Intensitätssteigerungen im Gegensatz zu der ungeschützten 6S RNA zu erkennen. Der blaue Graph (0 nM) ist relativ Flach und die (rote (83 nM), grüne (416 nM) und lilane (833 nM)) Graphen zeigen eine gesteigerte Intensität. Die deutlichsten Intensitätsunterschiede zeigt die graphische Auswertung im *closing stem* und leichte Unterschiede in der *central domin*. Wobei der Graph nicht direkt auf das Autoradiogramm übertragen werden kann, weswegen neben dem Autoradiogramm die wichtigen, zentralen Bereiche der 6S RNA gekennzeichnet sind. Ein ähnliches Profil zeigt auch die graphische Auswertung in Abbildung B, hier ist die Intensitätssteigerung um das Nukleotid G 136 zu lokalisieren. Der blaue Graph (0 nM) zeigt wieder die frei zugängliche RNA, während die anderen Graphen (rot (83 nM), lila (416 nM) und grün (833 nM)) eine erhöhte Intensitätssteigerung gezeigt werden konnte.



Die Autoradiogramme zeigten die Footprint ber 5 - und 5 -End markferter 65 KNA mit/ome Hiq Die Autoradiogramme zeigten die Footprint Analysen einer 3`-End (A) und einer 5`-End (B) markierten 6S RNA mit und ohne Hfq, bei einer limitierenden RNase T1 und V1 Hydrolyse. Flankiert sind die Banden von einer OH⁻ Leiter. In den Reaktionsansatz wurden 15 nM 6S RNA, 1x KGlu80-Puffer, GF-Puffer und entweder 83 nM oder 416 nM Hfq (Hexamer) zugegeben. Die RNase T1 wurde mit 1U und die RNase V1 mit 5 mU in die Reaktion eingesetzt und für 15 min bei 30 °C inkubiert. Es wurde ein 10 %iges dPAGE verwendet.



mit, 83 nM, 416 nM und 833 nM Hfq in die Komplexierungsreaktion eingesetzt. Anschließend wurde eine hydroxylradikal Fenton Reaktion durchgeführt. Unter den Footprint Analysen sind die densiometrischen Auswertungen. Das Profil zeigt jeweils die Spuren 2 bis 5 der Footprint Analysen. Diese wurden mit dem Programm Image Lab/ChemiDocTM durchgeführt wobei der Hintergrund im Vorfeld subtrahiert wurde (siehe Werte der Footprint Analysen im Anhang 7.5).

Mit diesen Informationen konnten anschließend genauere Informationen über die Binderegionen des Hfq Protein auf der 6S RNA gegeben werden. In folgender Abbildung 2.13, sind mit lila Strichen die veränderten doppelstrang Bereiche, die geschnittenen Guanine mit grünen Pfeilen und die Bereiche mit verstärkter Intensität (gelbe Halbkreise) markiert worden. Auffallend ist, dass sich die markierten Bereiche auf die *central domain* (der zentralen Blase) und den *terminalen loop* beschränken. Da Hfq bevorzugt an A/U reiche Sequenzen mit anschließender Stammregion bindet, lässt darauf schließen, dass dies die beiden Regionen sind, die Hfq binden. Die Sekundärstruktur von der 6S RNA weist in beiden Bereichen A/U reiche Sequenzen auf, die einseitig oder beidseitig von einer Stammregion flankiert sind.



Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Bindung von Hfg an der central domain und den terminalen loop stattfindet. Besonders die distale Seite von Hfq weist eine hohe elektropositive Ladung auf, die dazu prädestiniert ist RNAs zu binden. Jedoch ist noch nicht bekannt, an welcher beiden Stellen die primäre Komplexbindestelle und welche die sekundäre von Komplexbindestelle ist. Es war bisher noch nicht möglich, die Nukleotidgenauen Sequenzbereiche der Komplexierungsstellen zu bestimmen. Um diese Problematik zu entschlüsseln wurde mit unterschiedlichen Methoden wie z. B. cross linken und anschließender Abbruch Primer Extension Analyse versucht weitere Aufschlüsse darüber zu bekommen. Diese waren jedoch nur schwer auswertbar. Zudem kam die Schwierigkeit hinzu, dass meistens ein

Gemisch aus den verschiedenen Komplexen vorhanden war. So konnte nie genau bestimmt werden an welchem Sequenzbereich Hfq zuerst bindet oder ob beide Bereiche gleichmäßig frequentiert werden. Weiter ist noch offen ob, der Sekundärkomplex schneller zustande kommt, wenn eine kooperative Bindung besteht. Hier könnte noch eine genauere Analyse der Komplexbildung erfolgen.

2.2 Analysen des Zusammenspiels zwischen ppGpp und 6S RNA

Ein Zusammenhang zwischen 6S RNA und ppGpp konnte schon vor einiger Zeit gezeigt werden. Dabei wurde festgestellt, dass in Abwesenheit von 6S RNA der basale ppGpp-Spiegel deutlich ansteigt und bei Überexpression der 6S RNA der ppGpp-Spiegel in der *E. coli* Zelle stark absinkt (Neußer et al., 2009). Bisher ist jedoch noch unverstanden wie die Regulation zwischen den beiden Molekülen funktioniert. Daher wurde im folgenden Abschnitt dieser Arbeit versucht, das Zusammenspiel durch zwei verschiedene Herangehensweisen aufzuklären.

2.2.1 Vergleich des basalen ppGpp-Levels in An- und Abwesenheit von Hfq in unterschiedlichen Wachstumsphasen

In diesem Teil sollte der basale ppGpp-Level zwischen der Δhfq -Mutante und dem isogenen Wildtyp untersucht werden. Aus den vorangegangenen Ergebnissen und der Beziehung zwischen ppGpp und der 6S RNA, stellte sich die Frage, ob sich der ppGpp-Level in der Zelle verändern würde, wenn Hfq fehlt? Der globale Wachstumsregulator ppGpp spielt eine große Rolle in der Wachstumsratenkontrolle und es findet sich stets in der Zelle ein umgekehrt proportionales Verhältnis seiner Konzentration zur Wachstumsrate (Ryals et al., 1982). Wenn der ppGpp-Level verändert ist, stellt sich die Frage, ob damit auch das veränderte Wachstum erklärt werden kann. In der logarithmischen Phase zeigen die Wachstumsraten keinen deutlichen Unterschied nur in der stationären Phase geht das Wachstum der beiden Stämme deutlich auseinander (siehe Abb. 2.1). Wenn ein veränderter ppGpp-Spiegel besonders in der logarithmischen Phase gezeigt werden kann, müsste Hfq noch auf einem anderen Weg Einfluss auf die ppGpp-Konzentration haben. Also im Rückschluss wahrscheinlich auf das SpoT Protein oder die *spoT* Genregulation. SpoT reguliert in der Zelle den basalen ppGpp-Level, es kann ppGpp sowohl synthetisieren als auch hydrolysieren. Die enzymatische Aktivität von SpoT ist dabei von vielen verschiedenen Faktoren abhängig, wie zum Beispiel Phosphatmangel oder Osmotischer Stress, aber auch von der Bindung zellulärer Effektoren (wie z. B. ACP, CgtA) (Wagner, 2010).

Um den basalen ppGpp-Spiegel in An- und Abwesenheit von Hfg zu definieren, wurden ppGpp-Konzentrationsbestimmungen in der logarithmischen und stationären Phase mittels Dünnschichtchromatographie (5.3.6) durchgeführt. Dabei wurde den wachsenden Zellen radioaktiv markierte neutralisierte Phosphorsäure zugegeben und nach einer halben Stunde eine Frier/Tau Lyse durchgeführt. Der Aufschluss wurde mit 1 N Ameisensäure vorgenommen, um nach einer anschließenden Zentrifugation nur die NTPs im Überstand abnehmen zu können. Diese wurden dann auf die Dünnschichtchromatographie Platte gegeben und mit 0,85 M KH₂PO₄ als Laufmittel aufgetrennt. Da ppGpp durch die Reaktion von GTP mit ATP entsteht, werden in Abb. 2.14 A die NTPs und das Effektormolekül gezeigt. So muss nicht nur auf den ppGpp-Spot geachtet werden, sondern auch auf den GTP-Spot. In der logarithmischen Phase zeigt die Mutante eine deutliche Abnahme des ppGpp und GTP-Spots im Gegensatz zum Wildtyp. Die ATP-Spots liegen in der Sättigung und können hier nicht mit berücksichtigt werden. Unter den gegebenen Bedingungen wird der ATP-Level relativ konstant gehalten und ist in E. coli deutlich erhöht gegenüber dem GTP-Level. In der stationären Phase ist die gesamte Spur der Δhfg -Mutante verstärkt. Dies ist auch am Startpunkt (ori) zu erkennen, der mehr radioaktives Material enthält, als die anderen Spuren. So scheint dennoch eine sichtbare Abnahme des ppGpp-Levels in der Mutante vorzuliegen. Um die Aussage bekräftigen, wurde zu die Dünnschichtchromatographie unabhängig voneinander viermal durchgeführt. In Abb. 2.14 B sind im Balkendiagramm die Mittelwerte und die berechneten Standardabweichungen gezeigt. Die quantifizierten Werte für die relativen ppGpp-Mengen wurden aus dem Verhältnis zur Summe aus ppGpp und GTP berechnet. In dem Diagramm kann deutlich gezeigt werden, dass in der Δhfq -Mutante der basale ppGpp-Level abnimmt.



Abb. 2.14: Vergleich des basalen ppGpp-Levels in der Mutante und dem Wildtyp Gezeigt in Abb. A ist eine Dünnschichtchromatographie welche in 0,85 M KH₂PO₄ als Laufmittel aufgetrennt wurde. Es wurden jeweils in der logarithmischen- und in der stationären Phase Zellen mit neutralisierter Phosphorsäure (32 PH₃PO₄) puls markiert, auf eine Dünnschichtmembran aufgetragen und autoradiographiert. Zu sehen ist der NTP-Pool des Wildtyp Stammes (BW25113) und der Δhfq -Mutante (JW4130). In Abb. B ist die Quantifizierung der in Abb. A gezeigten Dünnschichtchromatographie

durchgeführten Experimenten (Werte der vier Versuche im Anhang 7.6).

dargestellt. Der Graph zeigt die Mittelwerte und Standardabweichung von zwei unabhängig voneinander

Durch die Analysen im vorherigen Teil dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die 6S RNA Menge in der Mutante besonders in der logarithmischen Phase ansteigt (siehe Abb. 2.4 / 2.5) und invers dagegen der ppGpp-Level in beiden Phase abnimmt. Dieses Ergebnis zeigt, dass der ppGpp-Level nicht wie erwartet invers zur Wachstumsrate steht, sondern ein erniedrigter basaler ppGpp-Spiegel in der Mutante vorliegt. Da das Wachstum besonders in der stationären Phase verlangsamt ist, würde hier ein erhöhter ppGpp-Spiegel zu erwarten sein. Es müssen folglich noch andere regulatorische Mechanismen durch das Fehlen von Hfq betroffen sein, die den basalen ppGpp-Spiegel reduzieren, wie z. B. die erhöhte 6S RNA-Konzentration. Aufgrund der bisherigen Ergebnisse kann noch nicht genau geschlossen werden, ob durch den erhöhten 6S RNA-Spiegel der ppGpp-Level in der Δhfq -Mutante absinkt.

2. Ergebnisse

2.2.2 Beeinflussung des zellulären basalen ppGpp-Spiegel durch Decoyinine

Im folgenden Abschnitt wurden die Effekte auf den basalen ppGpp-Spiegel in Zusammenhang mit dem Antibiotikum Decoyinine bei einem 6S RNA-defizienten Stamm (KS1) analysiert. Zuvor wurde die AssrS-Mutante (KS1) mit ihrem isogenen Wildtyp (MG1655) phänotypisch verglichen. Bisher konnte noch kein klarer Wachstumsunterschied in der logarithmischen- und früh stationären Phase im 6S RNA-defizienten Stamm in E. coli gefunden werden. In einer vorangegangenen Arbeit konnte gezeigt werden, dass es einen Zusammenhang zwischen dem basalen ppGpp-Level und der 6S RNA gibt. Diese Verbindung ist wahrscheinlich indirekter Natur, aber ihre Auswirkungen konnten dennoch schon charakterisiert werden. Wenn 6S RNA überexpremiert vorlag, war die intrazelluläre ppGpp-Konzentration erniedrigt, wenn die 6S RNA deletiert war, stieg sie an. Auch wenn der Zusammenhang zwischen der 6S RNA und dem basalen ppGpp-Spiegel klar gezeigt werden konnte, war doch bisher unklar, welcher regulatorische Mechanismus diese beiden zellulären Regulatoren verbindet. Deswegen wurden Analysen mit einem Antibiotikum, welches die GMP-Synthetase inhibiert durchgeführt. Decoyinine ist ein Antibiotikum, dass die Zellwandsynthese und die GMP-Synthetase inhibiert und somit den intrazellulären GTP-Level reduziert. Durch das Protein SpoT wird aus GTP und ATP, (p)ppGpp synthetisiert. Wird nun durch das Decovinine der intrazelluläre GTP Level reduziert, sollte nur noch vermindert ppGpp synthetisiert werden. Dieser Überlegung zufolge sollte in der KS1 Mutante, in der der ppGpp-Spiegel erhöht ist, keine Abnahme des ppGpps zu detektieren sein. Sollte dennoch eine deutliche Abnahme zu sehen sein, könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass die GMP-Synthetase ein weiterer Partner zwischen der Verbindung 6S RNA und ppGpp ist. So könnte zum Beispiel 6S RNA die GMP-Synthetase Aktivität regulieren und bei deletierter 6S RNA könnte verstärkt GTP und demnach auch verstärkt ppGpp hergestellt werde. Mit den folgenden Analysen sollte daher versucht werden, einen genaueren Einblick in den regulatorischen Mechanismus zwischen ppGpp und der 6S RNA zu gewinnen.

In *Bacillus subtilis* konnte gezeigt werden, dass durch Zugabe von Decoyinine zu wachsenden Zellen der basale ppGpp-Level deutlich absank, bis kein ppGpp mehr detektiert werden konnte. Auch die Sporulation und das Zellwachstum waren merkbar inhibiert (Sugae et al., 1981; Shigeo et al., 2013). Durch die Inhibierung der GMP-Synthetase sollte nicht nur der ppGpp-Spiegel als Folge des Decoyinine sinken, sondern auch der intrazelluläre GMP-Spiegel. Daher sollte untersucht werden, ob dies auch in *Escherichia coli* und im 6S RNA-defizienten Stamm in dem verstärkt ppGpp vorkommt, gezeigt werden kann. Für diesen Versuch wurde die $\Delta ssrS$ -Mutante (KS1) verwendet. Bei dieser Mutante wurde nach der Datzenko und Wanner Methode das

komplette 6S RNA Gen deletiert (Shanmugarajah 2012). Der isogene Wildtyp dazu ist der Stamm MG 1655. Zu Beginn wurden die phänotypischen Eigenschaften der beiden Stämme verglichen.



Abbildung 2.15: Illustration des molekularer Mechanismus der Stringenten Transkription in *Bacillus subtilis*

Die Abbildung zeigt den molekularen Mechanismus der Stringenten Transkription und an welcher Stelle Decoyinine eingreift. Durch Aminosäure Mangel wird verstärkt ppGpp synthetisiert, welches in die GMP-Kinase Inhibierung involviert ist. Die GMP-Kinase phosphoryliert GMP zu GDP. Durch die Inhibierung der GMP-Kinase durch ppGpp, steigt die intrazelluläre Menge an GMP. Die Zugabe von Decoyinine inhibiert die GMP-Synthetase, welche für die Synthese von XMP zu GMP zuständig ist und im weiteren Verlauf auch GTP inhibiert (verändert nach Shigeo et al., 2013).

Das Wachstum der beiden Stämme war vollkommen identisch und zeigte keine Auffälligkeiten (siehe Abhang Tabelle 7.7). Bei der Morphologie der Zellen konnten auch keine Unterschiede erkannt werden. Die Zellen zeigen in der logarithmischen Wachstumsphase eine längliche Stäbchenform mit jeweils zwei angefärbten Chromosomen an jedem Pol der *E. coli* Bakterienzelle (Abbildung 2.16). Die Zellen sind in der aktiven Teilungsphase. Hier ist kein Unterschied zwischen dem Wildtyp und der 6S RNA Mutante zu erkennen. Die Größe der Zellen liegt bei ca. 4 μ M. In der stationären Phase verändern sich die Zellen und werden kugelförmig. Dies kann sowohl bei den Wildtyp Zellen als auch bei den Mutanten Zellen gezeigt werden. In Abb. 2.16 und 2.17 lässt sich bei der Mutante (KS1) kein morphologischer Phänotyp feststellen. Die Kultivierung der Zellen wurde hier unter Standardbedingungen (YT-Medium 4.5) durchgeführt, es könnte sich jedoch unter Stressbedingungen, wie zum Beispiel Säure-, Hitze-, UV-Stress oder Nahrungsmangel sich ein morphologischer Phänotyp heraus stellen.



Stamms MG 1655 und von **D** bis **E** die Zellen des 6S RNA defizienten Stamm KS1. Die phänotypische Analyse zeigt in Abbildung **A/D** die Zellen in Durchlicht, in **B/E** die Durchlichtbilder der einzelnen Filter in Überlagerung und in **C/F** die Überlagerung der einzelnen Filter mit Auflicht. Die Membran wurde mit Nilrot und die DNA mit DAPI gefärbt. Zum Vergleich ist eine 5 μ M Skala angegeben.



Skala angegeben.

Da keine phänotypisch signifikanten Unterschiede zu erkennen sind, wurde anschließend, um den basale ppGpp-Spiegel zu bestimmen eine Dünnschichtchromatographie durchgeführt (5.3.6). Da das Wachstum der beiden Stämme identisch war, konnte zur gleichen Zeit die radioaktive neutralisierte Phosphorsäure zu den wachsenden Zellen gegeben werden. Die Zellen wurden bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 kultiviert und anschließend mit ³²P Phosphat versetzt. Nach einer 30 minütigen Inkubation und weiterer Kultivierung wurden die ersten Zellproben abgenommen (Wert 0) und anschließend das Decovinine (Endkonzentration 0,4 mg/ml) hinzu gegeben. Es folgten weitere Abnahmen der Zelllösung in 10 min Intervallen. Diese wurden dann wie im Methodenteil 5.3.6 beschrieben behandelt und auf eine Dünnschichtmembran aufgetragen und mit 0,85 M KH₂PO₄ als Laufmittel aufgetrennt. Die Abbildung 2.18 zeigt jeweils ein Autoradiogramm mit und ohne Decoyinine der beiden Stämme. Zuerst ist jeweils die Situation ohne Antibiotikum und unter den ersten beiden Autoradiogrammen die mit Decovinine gezeigt. Der KS1 Stamm zeigt nach Zugabe des Antibiotikums eine deutliche Abnahme des ppGpp-Levels. Nach 50 min steigt der ppGpp-Level wieder an und erreicht die Normalsituation, wie in der Abbildung KS1 ohne Decovinine. Die obere Abbildung zeigt die Normalsituation, hier steigt die Intensität der ppGpp-Spots langsam über die Zeit an. Auf der rechten Seite ist der Wildtyp gezeigt, zuerst die Situation ohne und darunter mit Decoyinine. In der Abbildung Wildtyp mit Antibiotikum ist auch eine leichte Abnahme der ppGpp-Spots im Gegensatz zum Wildtyp ohne Decoyinine zu erkennen. Wie auch schon in der Mutante beobachtet, nimmt der ppGpp-Spot nach 40 min wieder zu.

Um zu analysieren, ob die Zellzahl sich nach der Zugabe des Antibiotikums verändert, wurden Zellzahlbestimmungen durchgeführt. Bei dem Wildtyp, wie auch bei dem 6S RNA-defizienten Stamm ist kein Unterschied in der Zellzahl in An- und Abwesenheit des Decoyinines festgestellt worden.

Abschließend kann gesagt werden, dass sowohl im KS1 Stamm als auch im Wildtyp eine Abnahme der ppGpp-Spots nach Zugabe des Decoyinine zu detektieren war, die nach 40 bis 50 min wieder an Intensität zunahmen. Somit gibt es keinen deutlichen Unterschied zwischen der 6S RNA Mutante und ihrem isogenen Wildtyp, der darauf schließen lässt, dass die indirekte Verbindung zwischen ppGpp und 6S RNA im Zusammenhang mit der GMP-Synthetase steht.



2.3 Suche nach potentiellen Bindungspartnern der 6S RNA

Im nächsten Teil dieser Arbeit wurde nach weiteren Interaktionspartnern der 6S RNA aus *Escherichia coli* gesucht um diese als mögliche Komponenten des Regulationsnetzwerks der 6S RNA zu charakterisieren. Da regulatorische RNAs selten nur ein *target* (oder Ziel-)Gen oder ein - Protein binden, war es durchaus wahrscheinlich, dass auch die 6S RNA weitere Interaktionspartner hat. Auch die Tatsache, dass die ppGpp-Konzentrationen und die 6S RNA in der Zelle einen direkten Zusammenhang zeigen, spricht für eine komplexe Regulation mit mehreren Interaktionspartnern. So war die erste Annahme, dass das Protein SpoT, welches für die basale intrazelluläre ppGpp-Konzentration verantwortlich ist, oder ein Interaktionspartner in der GTP-Synthese mit der 6S RNA interagieren könnte.

Um die möglichen Interaktionspartner von der 6S RNA zu identifizieren, wurde die *in vitro pull down* Methode mit den *Adipic acid dihydrazide-Agarose beads* verwendet. Diese musste zu Beginn etabliert werden. Die Methode bietet im Gegensatz zu vielen anderen Methoden, wie z. B. die *Magnetic-Beads* Methode oder der *EZ-Link Biotin Hydrazides* (einen erweiterten Linker, der an die oxidierte RNA bindet und biotinyliert ist) die Vorteile, dass sie einfach zu handhaben ist, dem Experimentator viele Möglichkeiten der Variation überlässt und preisgünstig ist. Bei dieser Methode wird die 6S RNA kovalent an die Agarose *beads* gekoppelt und die anschließende Inkubation mit dem Gesamtproteinextrakt aus *E. coli* erlaubt eine Bindung an die 6S RNA. Danach ermöglichten LC-MS und MALDI-TOF-Analysen die Identifikation der Interaktionspartner. Für die Kopplung mit der modifizierten Agarose musste zuerst eine Oxidation der RNA am 3'-Ende durchgeführt werden. Dazu wurde die 6S RNA mit Natriumperjodat oxidiert (5.3.13.1), wobei die terminale Ribose irreversibel geöffnet wird, so dass eine Doppelbindung zwischen dem 2' beziehungsweise dem 3' Kohlenstoff-Atom und dem Sauerstoff-Atom entsteht (s. Abb. 2.19).



Gezeigt ist die irreversible Natriumperjodat Oxidation des 3'–Endes einer RNA an der terminalen Ribose. Die Verbindung zwischen dem 2' und 3' Kohlenstoffatom wird geöffnet und es entstehen Doppelbindungen zum Sauerstoffatom.

Bevor die modifizierten 6S RNAs an die Agarose *beads* gekoppelt wurden, wurde deren Qualität mit Hilfe eines PAA-Gels kontrolliert, wie in Abbildung 2.20 A gezeigt. Die so behandelte RNA wurde bei einer über Nacht Inkubation an die Agarose *beads* gebunden und die nicht gebundene RNA ausgewaschen. Um die Durchführbarkeit der *in vitro pull down* Methode mittels 6S RNA-Agarose *beads* nachzuweisen, mussten zuvor einige Kontrollexperimente durchgeführt werden. Um auszuschließen, dass eine mögliche Interaktion zwischen den Agarose *beads* und den zellulären Proteinen von *E. coli* stattfindet. Wurde Gesamtproteinextrakt mit den Agarose *beads*

ohne 6S RNA inkubiert und anschließend die *beads* gewaschen und mit Hochsalzpuffer eluiert. In Abbildung 2.20 B ist exemplarisch ein SDS-Gelbild des Kontrollexperimentes gezeigt. In den Spuren 3 bis 8 sind die Waschfraktionen zu erkennen und es ist deutlich zu sehen, dass die gProteinbanden mit jedem Waschschritt abnehmen. In der Elutionsspur sind keine Proteinbanden mehr detektierbar. Das Ergebnis bestätigt, dass keine unspezifischen Interaktionen zwischen den Agarose *beads* und den zellulären Proteinen erfolgte.



Abbildung 2.20: Qualitätskontrolle der 6S RNA und Etablierung des *in vitro pull down Assays* In Abbildung A ist ein 10 %iges PAA-Gel gezeigt, als Marker wurde der 100 bp DNA Leiter (NEB) und 100 ng 6S RNA aufgetragen. Das Gel wurde anschließend Silber gefärbt. In Abbildung B ist ein 12 %iges SDS-Gel gezeigt, als Marker wurde der *unstained* Protein MM verwendet. Die einzelnen Waschschritte sind mit W1 bis W6 bezeichnet, D ist der Durchfluss, also die Abnahme des gProteins nach der Inkubation und E bezeichnet das Eluat. Die Proben wurden mit Aceton gefällt und auf das SDS-Gel aufgetragen und anschließend Coomassie gefärbt.

Nachdem eine Interaktion zwischen Proteinen und den Agarose *beads* ausgeschlossen wurde, sollte als nächstes gezeigt werden, dass die gekoppelte 6S RNA mit Proteinen interagieren kann. Also wurde die DNA-abhängige RNA-Polymerase (RNAP) und das RNA-Chaperon Hfq ausgewählt, weil deren Bindung an die 6S RNA bereits bekannt ist (Wasserman and Storz, 2000; Windbichler et al., 2008). Dazu wurde der *in vitro pull down* Versuch unabhängig voneinander mit beiden Proteinen durchgeführt und die Ergebnisse im Folgenden vorgestellt. Es wurden

jeweils 500 pmol Perjodat-oxidierte 6S RNA mit 700 pmol Hfq oder 500 pmol RNAP in die Reaktion eingesetzt. Die Inkubation wurde für 30 min bei RT durchgeführt (siehe Methodenteil 5.3.13.1). Das Ergebnis ist in Abbildung 2.21 A und B zu sehen. Abbildung A zeigt das Silber gefärbte 12 %ige SDS-Gel mit dem RNAP-Experiment. Da die SDS-PAGE unter denaturierenden Bedingungen stattfindet, zerfällt die RNAP in ihre einzelnen Untereinheiten. Anhand der Abbildung ist deutlich zu erkennen, dass die Polymerase-spezifischen Banden mit der Anzahl zunehmender Waschschritte abnehmen (vgl. Spur 2 bis 5) bis sie nicht mehr zu detektieren sind (Spur 6). Erst wieder in der Spur 7 sind eindeutig Banden zu erkennen, die genau in der Höhe der Polymerase Untereinheiten β , β ', σ und α liegen. Somit konnte eine Bindung zwischen der 6S RNA und RNAP nachgewiesen werden. Sowohl in der Elutionsspur, als auch in der Spur 5 sind jeweils Banden auf der Höhe der Markerbanden zu identifizieren. Hier ist wahrscheinlich der Proteinmarker horizontal im Gel diffundiert oder beim Auftragen in die angrenzenden Geltaschen geschwemmt worden. Abbildung B repräsentiert das zweiten in vitro pull down Kontrollexperiments mit dem Hfq Protein. Hfq ist sehr stabil und zeigt sich im SDS-Gel als Hexamer bei ca. 66 kDa und als Monomer bei 11.2 kDa. Mit zunehmender Zahl der Waschschritte (Spur 3-8) werden die ungebundenen Hfq-Hexamere entfernt. Dies ist deutlich an den abnehmenden Banden von Hfq zu erkennen. In der Spur 9 wurde das Eluat aufgetragen und es sind schwache Banden sowohl bei 66 kDa, als auch unterhalb von 14 kDa zu sehen. Dieses Ergebnis bestätigt ebenfalls eine Bindung zwischen der 6S RNA und Hfq.

Als negative Kontrolle wurde BSA (*Bovine Serum Albumin*) verwendet. Das globuläre Protein stammt vom Rind und kommt nicht in *E. coli* Zellen vor und bindet nicht an die 6S RNA. Für das *in vitro pull down* Experiment wurden 100 µg BSA zu 500 pmol Perjodat-oxidierte 6S RNA eingesetzt. Nach einer 30 minütigen Inkubation bei RT wurden die einzelnen Proben mit Aceton gefällt und auf ein 10 %iges SDS-Gel aufgetragen. Die Abbildung 2.21 C zeigt das Coomassie gefärbte Gelbild. In Spur 2 ist die erste Abnahme des Durchflusses nach der Inkubation gezeigt. Hier ist die stärkste Bande zu erkennen, was bereits darauf schließen lässt, dass der größte Teil des Proteins nicht gebunden hat. In den Waschschritten Spur 3 bis 8 nimmt die Proteinbande immer weiter ab, bis in Spur 6 keine Bande mehr zu erkennen ist. Auch in der Spur 9 in der das Eluat aufgetragen wurde ist keine Bande zu sehen. Das Ergebnis bestätigt, dass das globuläre BSA Protein nicht an die 6S RNA bindet.



Kontrolle mit BSA

Die Abbildungen A und B zeigen 12 %ige SDS-Gele die mit Silber gefärbt wurden, als Proteinmarker wurde der *unstained* Protein MM verwendet. Abbildung A zeigt den *in vitro pull down* Versuch mit RNAP (500 pmol) und B mit Hfq (700 pmol). Die einzelnen Untereinheiten der RNAP sind links am Gelbildrand gekennzeichnet. Die Abbildung C zeigt ein 10 %iges Coomassie gefärbtes SDS-Gel nach einem *in vitro pull down* Versuch mit BSA. Die Proteinkonzentration betrug 100 µg. Nach der Inkubation und der TCA oder Aceton Fällung wurde Aufgetragen, der Durchfluss (D), die Waschschritt (W1 bis W6) sowie das Eluat (E).

Nachdem die *in vitro pull down* Methode erfolgreich etabliert wurde, konnte nach den potentiellen 6S RNA Interaktionspartnern aus dem *E. coli* Gesamtproteinextrakt gesucht werden. Für die Gewinnung des Gesamtproteinextraktes wurde der 6S RNA-defiziente Stamm (KS1) verwendet um auszuschließen, dass die 6S RNA schon Proteine gebunden hat und diese

möglicherweise wegfängt. Nach der Perjodatoxidation der 6S RNA wurde anschließend 500 µg gProtein aus der Übergangsphase einer Flüssigkultur des KS1 Stamms extrahiert und mit 1,5 mM MgCl₂ im Reaktionsansatz für 30 min inkubiert. Da im Zellaufschluss auch RNasen vorhanden sind, und um den Abbau der 6S RNA zu verhindern, wurden in den Reaktionsansatz immer RNase Inhibitoren (RNasin) hinzugegeben. Nach der Inkubation erfolgten die einzelnen Waschschritte, die die ungebundenen Proteine entfernen und anschließend wurden die an die 6S RNA gebundenen Proteine mit einem Hochsalzpuffer eluiert.

Um die möglichen Interaktionspartner der 6S RNA zu identifizieren, wurden zwei unterschiedliche Verfahren verwendet. Zum einen wurde das Gesamt-Eluat mittels LC-MS-Analyse analysiert und zum Anderen wurde das Eluat zunächst im SDS-Gel aufgetrennt die sichtbaren Banden herausgeschnitten und diese nach Proteolyse mit MALDI-TOF analysiert. Da die Nachweisgrenze von SDS-Gelen sehr hoch ist, wurden zuerst LC-MS-Analysen des Eluats durchgeführt. Die Daten der LC-MS-Analysen sind im Anhang unter Abbildung 7.5 zu finden. In den Auflistungen waren einige bekannte Proteine, wie Hfq, FolE und Untereinheiten der RNAP zu finden. Auch konnte im Nachhinein bestätigt werden, dass die in den Folgenden MALDI-TOF-Analysen gefundenen Proteine identifiziert wurden (PGK und TnaA). Auffällig war jedoch, dass auch zusätzlich eine ganze Reihe von ribosomalen Proteinen gefunden wurde.

Tabelle	2.1:	Ribosomale	Proteine	aus	der	LC-MS-Analyse	des	Eluats	aus	vier
unabhängigen <i>in vitro pull down</i> Experimenten										

Die Tabelle zeigt die gefundenen Proteine der LC-MS-Analyse. Drei Proteine der kleinen 30S ribosomalen Untereinheit und fünf Proteine der großen 50S ribosomalen Untereinheit.

Genname	Proteinname
rpsF	30S ribosomale Untereinheit Protein S6
rps0	30S ribosomale Untereinheit Protein S15
rpsT	30S ribosomale Untereinheit Protein S20
rplR	50S ribosomale Untereinheit Protein L18
rplC	50S ribosomale Untereinheit Protein L3
rplA	50S ribosomale Untereinheit Protein L1
rplL	50S ribosomale Untereinheit Protein L7/L12
rplU	50S ribosomale Untereinheit Protein L21

Anhand dieser Daten lag die Vermutung nahe, dass die 6S RNA auch an den Translationsapparat oder an einzelne Proteine der Ribosomen binden könnte. Damit würde sich ein ganz neuer Bereich der Regulation durch die 6S RNA erschließen. Es stellte sich hier die Frage, ob 6S RNA wirklich an ribosomale Proteine bindet oder ob die Proteine das Ergebnis einer unspezifischen Wechselwirkung darstellen, da ribosomale Proteine oft basisch sind und generell RNAs binden können. Im späteren Ergebnissteil wird noch genauer auf diese Problematik eingegangen.

In Abbildung 2.22 A ist ein exemplarisches Ergebnis eines in vitro pull down Experiments gezeigt. Das SDS-Gel wurde Coomassie gefärbt. Es ist gut zu erkennen, dass die Proteinbanden mit den einzelnen Waschschritten abnehmen. In Spur 6 und 7 bei den Waschschritten 4 und 5 sind kaum Banden zu sehen. In der Elutionsspur 8 sind einige Banden zu erkennen. Um diese besser zu visualisieren ist ein Ausschnitt dieser Spur vergrößert dargestellt und die Banden mit Sternen markiert. Die drei prominentesten Banden sind in der Abbildung mit Sternen gekennzeichnet (bei ca. 50 kDa, knapp oberhalb von 45 kDa und etwas unterhalb von 45 kDa), wurden ausgeschnitten und für die MALDI-TOF-Analysen vorbereitet. In Kooperation mit Dr. Tino Polen (Forschungszentrum Jülich) konnten die MALDI-TOF-Analysen durchgeführt werden (MALDI-TOF-Daten siehe Abhang 7.2). Abbildung 2.22 B zeigt einen weiteren in vitro pull down Versuch, auch hier wurde wieder die deutlichste Bande etwas unterhalb von 45 kDa ausgeschnitten und für weitere Analysen Trypsin gedaut (5.3.13.2). Da bei diesem Versuch nur eine Bande, die ausgeschnitten wurde, im Coomassie gefärbten Gel zu detektieren war, wurde anschließend das SDS-Gel mit Silber gefärbt (5.2.8.2). Die Silberfärbung ist wesentlich sensitiver und somit können auch sehr schwache Banden mit geringen Proteinmengen detektiert werden. Folglich konnten zusätzlich noch einige Banden mit sehr geringem Proteingehalt detektiert werden (mit Pfeilen markiert), die vorher mit der Coomassie Färbung nicht sichtbar waren. Knapp unterhalb der 14,4 kDa Markerbande ist eine Bande zu erkennen. Dies könnte zum Beispiel Hfq oder ein anderes kleines regulatorisches Protein sein. Eine weitere Bande ist oberhalb der 116 kDa Markerbande zu sehen, dies könnte zum Beispiel die ß und ß` Untereinheit der RNAP sein. Schwach erkennbar ist darüber hinaus eine Bande etwas über des 18,4 kDa Markers.



Abbildung 2.22: In vitro pull down Experiment mit 6S RNA und gProtein Es sind zwei 12 %iges SDS-Gele gezeigt, in A Coomassi gefärbt und in B Silber gefärbt. Die beiden Versuche wurden mit gProtein des KS1-Stamms und mit Perjodat oxidierter 6S RNA durchgeführt. Als Marker (M) wurde der *unstained* Protein MM verwendet, D bezeichnet den ersten Überstand nach Inkubation mit dem gProtein, die Waschfraktionen sind mit 1 bis 5 gekennzeichnet und das Eluat mit einem E beschriftet. Ein Ausschnitt des Eluats ist vergrößert und die Banden die für die MALDI-TOF-Analyse ausgeschnitten wurden, sind mit einem Stern markiert. Die Proben wurden nach dem Versuch mit TCA gefällt und anschließend auf ein 12 %iges SDS-Gel aufgetragen. Weitere Banden in der Eluatspur in Abbildung B sind mit Pfeilen gekennzeichnet, die prominenteste Bande etwas unterhalb von 45 kDa wurde vor dem Silberfärben ausgeschnitten und für eine MALD-TOF-Analyse vorbreitet.

Die MALDI-TOF-Analysen (siehe Anhang, Abbildung 7.1, 7.2, 7.3) der drei Banden der Abbildung 2.22 A ergaben drei mögliche Protein Übereinstimmungen. Erstens: DinG (ATPdependent DNA helicase), die Bande wurde etwas unterhalb der 45 kDa Markerbande ausgeschnitten, zweitens: TnaA (*tryptophanase/L-cysteine desulfhydrase*), die Bande wurde kurz oberhalb der 45 kDa Markerbande ausgeschnitten und drittens: BetB (*betaine aldehyde dehydrogenase*, NAD-dependent), diese Bande wurde bei ca. 50 kDa ausgeschnitten. Bei dem ersten Protein (DinG) welches identifiziert wurde deuten viele Peptid-Massen Angaben der Analyse auf falsch positive oder falsch negative Werte hin, so dass nicht eindeutig das DinG-Protein identifiziert werden konnte. Zudem ist das Protein in seiner eigentlichen Form 82 kDa groß. Dies ist ein weiterer Hinweis auf ein fragliches Ergebnis entweder konnte nur ein Teil des Proteins detektiert werden oder das Protein war schon degradiert. Bei dem zweiten Protein TnaA zeigen die Peptid-Massen Werte deutliche Übereistimmungen zwischen theoretischer und gemessener Peptidmasse. Das Protein ist 53 kDa groß und passt genau zu der Höhe der ausgeschnittenen Gelbande. Auch für das dritte Protein BetB wurden passende Peptid-Massen Werte gemessen und auch die Größe des Proteins mit 53 kDa passt perfekt zur Gelbande. Anhand dieser Daten konnten zwei mögliche Interaktionspartner von 6S RNA identifiziert werden. Um die Ergebnisse zu bestätigen und eventuell noch weitere Bindungspartner zu finden, wurde der Versuch viermal durchgeführt. In Abbildung 2.20 B, wie oben erwähnt, ist ein weiteres SDS-Gelbild gezeigt, nachdem die deutlichste Eluatbande ausgeschnitten und das Gel Silber gefärbt wurde. Auch diese Bande, die etwas unterhalb von 45 kDa zu erkennen war, wurde mit der MALDI-TOF-Analyse identifiziert. Als Ergebnis (siehe Anhang, Abbildung 7.4 A/B/C) konnte das Protein PGK (Phosphoglycerat Kinase) reproduzierbar nachgewiesen werden, welches ein Molekulargewicht von 41,1 kDa hat und genau zu der Bandenhöhe im SDS-Gel passt. Die Peptidmassen Werte liegen genau zwischen der theoretischen und den gemessenen Peptidmassen Werten, was darauf hinweist, dass mit großer Wahrscheinlichkeit das Protein PGK in der Gelbande vorhanden war. Wie später gezeigt wurde konnte das PGK Protein reproduzierbar als Bindepartner für die 6S RNA identifiziert werden. Auch in den voran gegangenen LC-MS-Analysen konnte das PGK bestimmt werden. Aus diesem Grund sollte die Bindung zwischen 6S RNA und PGK genauer untersucht werden. Für die dazu notwendigen in vitro Bindeanalysen wurde die Klonierung des Proteins in einen Überexpressionsvektor und die Aufreinigung der Phosphoglycerat Kinase aus E. coli vorgenommen.

2.3.1 Klonierung und Aufreinigung der Phosphoglycerat Kinase

Um das PGK Protein aufzureinigen musste zuerst das *pgk*-Gen in einem Überexpressions Vektor kloniert werden. Dazu wurde das *pgk*-Gen mittels synthetisierter Primer (PGK TEV site und PGK rev+15nt (Material 4.2.2)) von chromosomaler DNA aus MG1655 über PCR isoliert und amplifiziert. Anschließend wurde das PCR-Produkt auf einem Agarosegel kontrolliert und aufgereinigt (5.2.9.2). Für die Klonierung wurde der Vektor pET100-His6-TEV-Cas1 verwendet. Zuvor musste der Vektor mittels PCR mit 15 bp überhängenden Enden, die identisch zu den 15 bp überhängenden Enden das PCR-Produktes sind, amplifiziert werden (pET100 reverse und pET100 Tev site (Material 4.2.2)). Mit Hilfe des In-Fusion® HD Cloning Kit des Herstellers Clontech wurde dann das lineare Gen-PCR Fragment in das Plasmid pET100-His6-TEV kloniert

(5.2.9.3). Die Plasmidkarte des so neu entstandenen Plasmids ist im Anhang unter Abb. 7.6 zu finden. Nach der Klonierung wurde das Plasmid in den Stamm BL21(DE3) transformiert und mittels selektiven Antibiotika Agarplatten kontrolliert. Die Sequenz des klonierten Gens der einzelnen Klone wurde verifiziert. Mit dem mutationsfreien Klon ohne Deletionen oder Basenaustausch konnte anschließend weiter gearbeitet werden.

Zu Beginn wurde der neue Stamm (BL21(DE3)/pET100-His6-TEV-PGK) als Glycerinstock gesichert und in YT-Flüssigkulturen bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 angezogen und die Proteinüberexpression mit 0,2 mM IPTG induziert. Vor und nach der Induktion wurden Proben (10 ml) aus den Kulturen entnommen und nach einem Zellaufschluss auf ein denaturierendes SDS-Gel aufgetragen. Daher konnte die Überexpression von PGK erfolgreich auf einem 12 %igen SDS-Gel nachgewiesen werden. Anschließend folgte die Aufreinigung des Proteins über das C-Terminale Ende des pgk-Gens an dem ein His6-Tag kloniert wurde (5.2.9.3). Daher wurde eine Ni-NTA-Agarose Säule verwendet (5.2.5). In Abbildung 2.23 sind Proben des Aufschlusses, des Pellets und des Überstands nach dem Zentrifugen und der einzelnen Fraktionen der Ni-NTA-Agarose Säulenaufreinigung auf ein 12 %iges SDS-Gel (5.2.7.5) aufgetragen und anschließend Coomassie gefärbt (5.2.8.3). Es ist deutlich zu erkennen, dass das überexpremierte Protein in hohen Konzentrationen im Aufschluss und im Überstand nach der Zentrifugation zu finden ist. Nur eine ganz schwache Bande des PGK Proteins ist im Pellet und gering stärker die Bande des gProtein Durchflusses nach der Säulenaufreinigung zu sehen. Das Protein wurde bei den Fraktionen 3 bis 7 mit 50 mM Imidazol eluiert und von der Säule gewaschen. Ab Fraktion 8 bis 13 wurde 100 mM Imidazol und von Fraktion 14 bis 20 wurde 300 mM Imidazol verwendet. Um die Reinheit des Proteins zu gewährleisten wurden die Fraktionen mit den höchsten Konzentrationen (Fraktionen 3 bis 8) vereinigt und über eine Gelfiltrationssäule erneut aufgereinigt. Die Proteinlösung wurde Dialysiert und die Konzentration mittels Bradford-Assay (5.3.2.3) bestimmt.



Die Abbildung zeigt ein 12 %iges SDS-Gel welches anschließend Coomassie gefärbt wurde. Es sind jeweils Proben nach dem Aufschluss, nach dem Zentrifugieren, vom Durchfluss und einigen Fraktionen aufgetragen. Das Protein wurde mit Imidazol von der Ni-NTA-Agarose Säule eluiert (Fraktionen 3-7, 50 mM Imigazol, Fraktionen 8-12, 80 mM Imidazol und Fraktionen 13-18, 300 mM Imidazol). Rechts flankierend ist der Proteinmarker als Standard aufgetragen.

Als weiteres Kontrollexperiment wurde der *in vitro pull down* Versuch mit dem aufgereinigtem PGK durchgeführt, dies diente als weitere Kontrolle für die native Aktivität des isolierten Proteins. In Abbildung 2.24 ist das 12% ige SDS-Gel welches anschließend Silber gefärbt (5.2.8.2) wurde gezeigt. Im Durchfluss befindet sich die höchste Konzentration des Proteins (Spur 2) da in dem Experiment das Protein als Überschussreagenz eingesetzt wurde. Bei den weiteren Waschfraktionen W1 bis W6 nimmt die Proteinbande deutlich ab, bis in Spur 7 und 8 keine Bande mehr zu erkennen ist. In der Spur 9 ist das Eluat aufgetragen und es kann eine schwache Bande detektiert werden. Die Bande ist in der gleichen Höhe, wie auch die Proteinbanden des Überstands und der Waschschritte. Das Verhältnis von RNA zu Protein war 1:3,2. Das Ergebnis des Kontrollversuchs zeigt eine Bindung zwischen 6S RNA und PGK.


Die Abbildung zeigt ein 12 %iges SDS-Gel mit Silberfärbung. Der prestained Protein Marker wurde mit M markiert, der Durchfluss mit D, die einzelnen Waschschritte mit W1 bis W6 und das Eluat mit E. Die Proben wurden TCA gefällt und auf das Gel aufgetragen. Für den Versuch wurden 500 pmol 6S RNA und 100 µg PGK eingesetzt.

2.3.2 Interaktionen von PGK an RNAs

Um die Komplexbildung genau zu spezifizieren und zu charakterisieren wurden verschiedene EMSA-Analysen (electrophoretic mobility shift assay) durchgeführt (5.3.7). Für den Versuchs-Ansatz wurden 15 nM radioaktiv markierte 6S RNA mit einer ansteigenden Menge an PGK und 1 mM MgCl₂ für 10 min bei 30 °C inkubiert und anschließend 20 ng/µl Heparin als Kompetitor hinzugegeben, um unspezifische Bindungen zu vermeiden und weitere 5 min bei 30 °C inkubiert. Eine Bindung von PGK an 6S RNA konnte so reproduzierbar nachgewiesen werden. In Abbildung 2.25 A ist die Komplexbande von 6S RNA und PGK deutlich zu sehen. In der Spur 4 ist bereits eine sehr schwache Bande zu erkennen und mit ansteigender Proteinkonzentration wurden auch die Komplexbanden Spur 5 und 6 stärker. Da das Protein auch eine Bindestelle für ATP/ADP aufweist wurden anschließend Kompetitionsversuche durchgeführt. Für die Retardierungsanalyse wurde zuerst ATP (1 mM ATP Endkonzentration) mit dem Protein vorinkubiert, daraufhin die markierte 6S RNA hinzu gegeben und für weitere 10 min inkubiert. Die Proben wurden auf ein 5 %igen PAA Gel aufgetragen und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Der rechte Block in Abbildung 2.25 A bildet den Kompetitionsversuch mit ATP ab, hier sind keine Komplexbanden in den Spuren 7 bis 12 zu erkennen. Deutlich zu sehen ist die freie 6S RNA. Anhand der Ergebnisse kann gesagt werden, dass in dem Verhältnis in dem die Komponenten vorlagen die Affinität zu ATP höher war als zur 6SRNA. In Abbildung 2.25 B ist die Retardierung mit der pRNA gezeigt. Aufgrund komplementärer Basenstruktur zur 6S RNA wurde die pRNA als weitere RNA für die Retardierungsanalysen ausgewählt. Sie ist ein 20 Nt kurzes Transkript der 6S RNA und formt eine instabile hairpin-loop Struktur aus, die bei Raumtemperatur einzelsträngig vorliegt. Auf dem Autoradiogramm ist deutlich zu erkennen, dass die pRNA stärker bindet als die 6S RNA, jedoch ist die pRNA Konzentration in dem Versuch mehr als doppelt so hoch. Bei der 6S RNA ist eine schwache Bande erst bei Spur 4 bei 5 µM PGK zu sehen. Bei der Komplexbildung mit der pRNA ist schon in Spur 2 bei 1 µM PGK eine schwache Bande zu detektieren. Im Vergleich sind in Spur 6 Abb. A und Spur 4 Abb. B jeweils 10 µM PGK eingesetzt worden. Bei der Komplexierungsbande von pRNA:PGK (Spur 4) zeigt die Bandenintensität eine deutlich stärkere Schwärzung als bei 6S RNA:PGK (Spur 6). Für die Retardierung wurden 40 nM pRNA, 1 mM MgCl₂ und von 0 bis 10 µM PGK verwendet. In Abbildung C ist die Bindung an tRNA gezeigt. Die tRNA ist auch ein sehr stark strukturiertes Molekül mit vielen Doppelstrang und *loop* Bereichen. Das Autoradiogramm in Abb. 2.25 C zeigt eine schwache Bindung von PGK an tRNA. In Spur 4 erkennt man die erste sehr schwache Komplexbande die an Intensität zunimmt je höher die PGK Konzentration ansteigt. Dennoch ist die Bindungsaffinität nicht so hoch, wie bei der pRNA. In die Retardierungsansätze wurden 40 nM tRNA, 1 mM MgCl₂ und von 0 bis 10 µM PGK eingesetzt.

Die Autoradiogramme lassen darauf schließen, dass die Bindung an das Protein nicht sequenzspezifisch ist, sondern die Sekundärstruktur von Bedeutung ist. Da sowohl die pRNA ein Transkript der 6S RNA, als auch die tRNA und 6S RNA an die Phosphoglycerat Kinase binden. Anhand dieser drei Abbildungen (2.25) kann darauf geschlossen werden, dass das PGK Protein an RNAs bindet jedoch mit einer höheren Affinität an nicht stark strukturierte, einzelsträngige RNAs. Die 6S RNA ist überwiegend doppelsträngig und auch die tRNA zeigt doppelsträngige Bereiche sowie starke Strukturierungen wodurch sich die geringe Bindungsaffinität erklären lässt. Zudem binden anscheinend alle RNA Moleküle an die ATP-Bindestelle.



Alle drei Abbildungen zeigen EMSA Analysen mit dem gleich Protein und unterschiedlichen RNAs als Bindepartnern. Die freie RNA mit dem Protein wurden jeweils 10 min bei 30 °C inkubiert anschließend wurden 20 ng/µl Heparin als Kompetitor hinzugegeben und weitere 5 min inkubiert. Die Proben wurden auf ein 5 %iges PAA-Gel aufgetragen und autoradiographiert. Abbildung A zeigt die freie 6S RNA (15 nM) mit PGK in den Konzentrationen 0, 1, 3, 5, 7 und 10 µM, mit 1 mM MgCl₂ und dem Puffer D. Rechtsseitig mit jeweils 1 mM ATP vorinkubiert. In Abbildung B ist eine Retardierungsanalyse mit pRNA (40 nM) mit 0, 1, 5 und 10 µM PKG gezeigt. Die Pufferbedingungen sind wie oben Beschrieben. Auf dem Autoradiogramm in C ist die tRNA (40 nM) mit 0, 1, 3, 5, 7 und 10 µM PGK abgebildet.

Anhand der bisherigen Ergebnisse wurde ein weiterer Kompetitionsversuch durchgeführt. Hier sollte getestet werden, ob die Affinität zu 6S RNA oder zu tRNA höher ist da in den vorherigen Analysen unterschiedliche RNA Konzentrationen verwendet wurden. In Abb. 2.25 sind jeweils einzelne Retardierungen mit 6S RNA, tRNA oder pRNA gezeigt. In Abb. 2.26 A ist das Autoradiogramm des Kompetitionsversuches mit tRNA und 6S RNA abgebildet. Zuerst wurde PGK mit radioaktiv markierter tRNA (40 nM) für 10 min vorinkubiert und anschließend 6S RNA

in ansteigender Konzentration hinzu gegeben und weitere 10 min inkubiert. Spur 1 zeigt die Bindung ohne 6S RNA hier ist eine schwache Bande zu erkennen. In den folgenden Spuren nimmt die Bandenintensität weiter ab bis zur Spur 5. In der Spur 6 ist keine Bande mehr zu sehen. Dies deutet auf eine vollkommene Kompetition der 6S RNA hin bei einem 2,5 Fachen Überschuss an 6S RNA zu tRNA. Die Ergebnisse zeigen, dass das *E. coli* PGK mit einer gering höheren Affinität an die 6S RNA bindet als an die tRNA.

Als nächstes wurde getestet, ob PGK auch an doppelsträngige und/oder einzelsträngige DNA binden kann. Da die 6S RNA und die tRNA offene Komplexe und einzelsträngige Bereiche aufweisen, wo die Komplexierung stattfinden könnte, dient dieser Versuch einer weiteren wichtigen Charakterisierung der Bindungsanalysen. In Abbildung 2.26 B konnte keine Bindung an doppelsträngige DNA gezeigt werden. Zudem konnte auch keine Bindung an einzelsträngiger DNA gezeigt werden (Abbildung 7.7 im Anhang). Anhand dieser Retardierungsanalysen konnte keine Komplexierung an DNA festgestellt werden. Somit hat das PGK Protein eine spezifische Bindestelle nur für RNAs und Nukleotiden wie ATP und ADP. Eine Beteiligung an der Bindung durch die 2'-OH Ribose wäre möglich, da keine Bindung an DNA gezeigt werden konnte.



Abbildung 2.26: Retardierungsanalysen einmal mit DNA und im Kompetitionsversuch mit 6S RNA und tRNA

Die Abbildung zeigt zwei Autoradiogramme, die Reaktionsansätze wurden auf ein 5 %iges PAA-Gel aufgetragen und gelelektrophoretisch getrennt. Abbildung A zeigt den Kompetitionsversuch mit 6S RNA und tRNA. Zuerst wurde die Komplexierung von tRNA (40 nM) und PGK (10 μ M) durchgeführt und anschließend wurden ansteigende Konzentrationen (0, 15, 30, 50, 60 und 100 nM) 6S RNA hinzu gegeben. Abbildung B zeigt den Bindeversuch mit DNA. Es findet keine Komplexbildung statt. Für die Retardierungsanalysen wurden jeweils 1 μ l markierte DNA mit 0, 5 und 10 μ M PGK, 1 mM MgCl₂ und PufferD zusammen gegeben.

2.3.2.1 Heterologe Bindungen von PGK

Neben *Escherichia coli* konnte auch in dem Prokaryoten *Corynebacterium glutamicum* eine Bindung einer regulatorischen RNA (6C RNA) an die Phosphoglycerat Kinase gezeigt werden. *Corynebacterium glutamaticum* ist ein kleines, längliches, nicht pathogenes, gram positives Bakterium und für die Biotechnologie von großer Bedeutung, weil es als Produzent von Aminosäuren und Vitaminen eingesetzt werden kann. Die 6C RNA aus *Corynebacterium glutamaticum* ist 102 Nukleotide lang und in einer großen Blase mit zwei verlängerten *loops* strukturiert (Pahlke 2014). Daher stellte sich die Frage, ob auch die 6C RNA aus *Corynebacterium glutamaticum* an das *E. coli* PGK bindet und umgekehrt. Zunächst sollten Retardierungsanalysen die Komplexbildung von (C)PGK und 6S RNA bestätigen. Anhand der Autoradiogramme konnte keine Bindung zwischen (C)PGK und 6S RNA gezeigt werden. Auch konnte keine Komplexbildung zwischen 6C RNA und (C)PGK bei radioaktiven Retardierungsanalysen nachgewiesen werden, weil eine radioaktive Markierung der 6C RNA nur schwer möglich war. Daher wurde ein weiterer Kompetitionsversuch mit nicht markierter 6C RNA und radioaktiv markierter 6S RNA durchgeführt. Dieser ergab, dass die 6C RNA an die PGK aus E. coli ((E)PGK) bindet. Bei diesem Experiment wurde radioaktiv markierte 6S RNA (15 nM) mit (E)PGK (10 µM) in konstanter Konzentration komplexiert und anschließen mit ansteigender Menge 6C RNA (von 0 bis 0,75 pmol) hinzu titriert. Mit zunehmender Menge an 6C RNA nahm die Bindung von PGK zu 6S RNA ab. Das Ergebnis deutet darauf hin, dass wenn die 6C RNA im Überschuss vorlag die 6S RNA von der (E)PGK verdrängt wird. Dieser Versuch wurde auch mit C. glutamaticum (C)PGK durchgeführt, es konnte aber keine Bindung verifiziert werden. Da bei den Retardierungsanalysen keine Bindungen von 6C RNA nachgewiesen werden konnten lag wahrscheinlich an der deutlich schlechteren Markierbarkeit der 6C RNA. Durch die sehr schwache Markierung der 6C RNA kann eine geringe Bindung an das (C)PGK nicht detektiert werden und somit konnten nur die in vitro pull down Analysen eine Bindung zeigen. Bei diesen Versuchen konnte auch eine Bindung von 6S RNA an (C)PGK gezeigt werden.

Bedingt durch die Struktur von PGK, könnte das Protein auch in Dimer- oder Multimerform vorliegen und nur in dieser Konformation die RNA binden. Deswegen wurden verschiedene Proben von PGK auf ein nicht denaturierendes 5 %iges natives PAA-Gel aufgetragen und Coomassie gefärbt (5.2.8.3), wie in Abbildung 2.27 darstellt. In Spur 1 wurde PGK alleine, in Spur 2 PGK gebunden an 6S RNA und in Spur 3 PGK mit SDS-Probenpuffer und β-Mercaptoethanol aufgekocht und aufgetragen. Die ersten beiden Proben wurden bei 30 °C, 10 min inkubiert und die dritte Probe für 5 min bei 100 °C denaturiert um als Vergleich die Monomerform des Proteins darstellen zu können. Der Proteinmarker wurde zusätzlich aufgetragen verhält sich aber in einem nichtdenaturierendem PAA-Gel anders, als seiner Größe entsprechend. In der Abbildung 2.27 ist zu erkennen, dass die denaturierte Probe (Spur 3), also das Monomer des Proteins weiter gelaufen ist als die beiden anderen Proben. Das legt nahe, dass es sich bei der RNA Bindung um eine Dimerform des PGK Proteins handelt.



Abbildung 2.27: Bestimmung der Tertiärstruktur

Die Abbildung zeigt ein 5 % iges natices Retardierungsgel, welches Coomassie gefärbt wurde. In Spur 1 wurde 5 μ g PGK, in Spur 2, 5 μ g PGK gebunden mit 6S RNA und in Spur 3, 5 μ g mit SDS-Probenpuffer für 5 min bei 100 °C denaturiert, aufgetragen. Der Proteinmarker ist in Spur 4 gezeigt. Das Gelbild zeigt in Spur 1 und 2 die wahrscheinliche Dimerform und in Spur 3 die Monomerform des Proteins.

2.3.2.1 Strukturanalysen des 6S RNA:PGK Komplexes

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine Bindung zwischen 6S RNA und PGK nachgewiesen werden (s. Abb. 2.25 A). Darüber hinaus konnten noch Bindungen von pRNA und tRNA an das Protein gezeigt werden (s. Abb. 2.25 B/C). Weitere Kompetitionsversuche mit ATP haben gezeigt, dass die Affinität zu ATP höher ist als zur 6S RNA und die RNAs höchst wahrscheinlich an der ATP-Bindestelle komplexieren (s. Abb. 2.24 A). Zudem konnte auch nachgewiesen werden, dass die Phosphoglycerat Kinase sehr wahrscheinlich in ihrer Dimerform die RNA bindet (s. Abb. 2.27).

Um die genauen Sequenzbereiche auf der 6S RNA zu definieren die eine Bindung mit dem PGK eingehen wurden hydroxylradikale Footprint Analysen durchgeführt (5.3.11). Für die Bestimmung der Binderegion wurden 15 nM 3'-End oder 5'-End radioaktiv markierte 6S RNA (5.3.2 / 5.3.3) mit 1 mM MgCl₂ und PGK (0, 5 und 10 μ M) zusammen inkubiert. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden wurde anschließend Heparin (Endkonzentration 20 ng/ μ l) hinzugegeben und weitere 5 min inkubiert. Nach der Komplexbildung, die anfangs durch ein Retardierungsgel bestätigt wurde, konnte die Hydroxylradikal Fenton-Reaktion durchgeführt werden. Bei einer Fenton-Reaktion entstehen durch Wasserstoffperoxid und Eisen, Hydroxylradikale die ein starkes Oxidationsmittel sind. Die entstehenden Hydroxylradikale

reagieren direkt mit benachbarten RNA-Molekülen. Anschließend wurden die Reaktionen mit 1 mM Harnstoff gestoppt, die Proben wurden auf ein 10 %iges PAA-Gel aufgetragen und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Da die Reaktion nicht die komplette RNA hydrolysiert sind die deutlichsten Banden im oberen Teil des Autoradiogramms jeweils die 3'-End und 5'-End markierte unversehrte 6S RNA. Somit kann die RNA von beiden Enden gut aufgetrennt und analysiert werden. Mit Hilfe der Alkalileiter (5.3.9) und der in der Abbildung nicht gezeigten Bandenmuster nach T1 Hydrolyse können die Positionen auf der 6S RNA genau bestimmt werden.

In der nachfolgenden Abbildung 2.28 sind die Autoradiogramme der Footprint Analysen gezeigt. Das Autoradiogramm der 3'-End markierten 6S RNA zeigt deutliche Unterschiede in den Bandenspuren in An- und Abwesenheit von PGK. Im oberen Drittel der Abbildung in der Region des Nukleotids G 97 nimmt die Bandenintensität bei der höchsten Konzentration von PGK ab, dieser Bereich entspricht dem terminal loop. Auch gering unterhalb der Region des Nukleotids G 136 nehmen die Bandenintensitäten im Bereich der zentral bubble in Anwesenheit von PGK sichtbar zu. Etwa 19 Nukleotide unterhalb des G 136 bei Nukleotid 155 nehmen die Bandenintensitäten wieder zu. Die densitometrische Auswertung zeigt die auffälligsten Unterschiede im Bereich der zentral bubble. Bei der densitometrischen Auswertung werden die Intensitäten der einzelnen Banden einer Spur von ihrem Hintergrund subtrahiert und graphisch dargestellt. Die Darstellungen lassen sich nicht direkt auf die Autoradiogramme übertragen, weil die Banden im Gel sich mit exponentiell verlaufenden Abständen auftrennen. Daher sind neben dem Autoradiogramm die wichtigen Bereiche der 6S RNA beschrieben. Um dieses Ergebnis genau zu verifizieren, wurde eine Footprint Analyse der 5'-End markierten 6S RNA durchgeführt, welche rechts in der Abbildung 2.28 zu sehen ist (Tabelle der Daten im Anhang 7.8). Das Autoradiogramm zeigt deutlich, dass in Anwesenheit von PGK im oberen Drittel der Abbildung die Bandenintensitäten merklich nachlassen. Bei der höchsten Konzentration 10 µM PGK sind einige Banden kaum noch zu detektieren. Diese Bereiche können der zentral bubble und dem terminal loop zugewiesen werden. Die densitometrische Auswertung zeigt schwache Unterschiede im Bereich des closing stem bis hin zum zentral bubble. Anhand der beiden Autoradiogramme und den graphischen Auswertungen kann darauf geschlossen werden, dass das PGK Protein an der zentral bubble der 6S RNA bindet. Dies bestätigt auch die Ergebnisse der Retardierungsanalysen die gezeigt haben das PGK bevorzugt an einzelsträngige RNA bindet.



Abbildung 2.28: Hydroxylradikal Footprint Analysen mit densitometrischer Auswertung des 6S RNA:PGK Komplexes

In der Abbildung A ist die 3'-End markierte 6S RNA und in B die 5'-End markierte RNA verwendet worden. Für die Reaktion wurden 15 nM 6S RNA mit und ohne PGK (blau 0 μ M, rot 5 μ M und grün 10 μ M PGK) eingesetzt. Nach der Komplexierung wurde eine Hydroxylradikal Fenton-Reaktion durchgeführt und anschließend die Proben auf ein 10 %iges PAA-Gel aufgetragen. Unter den Autoradiogrammen sind jeweils die densitometrische Auswertung der Footprint Analysen dargestellt. Diese wurden mit dem Programm Image Lab/ChemiDocTM durchgeführt.

Nachdem die Bindeposition auf der 6S RNA identifiziert werden konnte, wurde versucht eine PGK Deletionsmutante nach der Methode von Datsenko and Wanner 2000 herzustellen, um weitere phänotypische Analysen durchzuführen. In der Literatur konnte bisher keine Escherichia coli PGK Deletionsmutanten beschrieben werden dennoch wurden in anderen Organismen schon Deletionsmutanten gezeigt, wie z. B. im Corynebacterium glutamaticum. Bei der Datsenko and Wanner Methode handelt es sich um einen Austausch von chromosomalen Genen durch eine Antibotikakassette mittels homologer Rekombination und den dazu passenden FRT-Sequenzen. Die FRT-Sequenzen dienen für die Erkennung und Bindung der Flippase durch die, die Hydrolyse stattfindet. Die Inaktivierung des chromosomalen Gens sollte über einen Austausch mittels Helferplasmid (pKD46) erfolgen. Auf dem Plasmid befindet sich die α -Red-Rekombinase aus dem a Phagen. Hierzu wurden Primer (delta PGK P2 und delta PGK P1) verwendet, die flankierend zum Zielgen sind und die FRT-Sequenzen beinhalten. Das PCR Fragment mit einer Länge von 1094 Nt sollte mittels Hitzeschock-Transformation oder Elektroporation in die Zellen MG1655/pKD46 eingebracht werden. Bei beiden Methoden konnten keine Transformanden hergestellt werden. Die fehlenden Transformanden lassen darauf schließen, dass das PGK für die E. coli Zelle essentiell ist.

2.3.2.2 Beeinflusst die 6S RNA die Enzymaktivität von PGK?

Da PKG ein Enzym der Glykolyse ist stellte sich die frage, ob durch die Bindung von 6S RNA an das PGK Protein auch seine Enzymaktivität beeinflusst werden kann? Da die 6S RNA an die ATP Bindestelle bindet. In der Glykolyse wird Glukose zu Pyruvat durch eine Reihe von Reaktionen verstoffwechselt. In den zehn Einzelschritten entstehen dabei zwei Moleküle Pyruvat, 2 ATP und 2 NADH. Die Phosphoglycerat Kinase dephosphoryliert 1,3-Bisphosphoglycerat zu 3-Phosphoglycerat durch die Gewinnung von ATP. Der vorgeschaltete Reaktionsschritt ist die Katalyse von Glycerinaldehyd-3-phosphat durch GAPDH zu 1,3-Bisphosphoglycerat, wodurch NAD⁺ zu NADH + H⁺ wird. Die Abbildung 2.29 zeigt die Rückreaktion der beiden Teilschritte der Glykolyse die für den Enzymtest verwendet wurden. Wie fast alle Enzyme katalysiert auch PGK die Reaktion in beide Richtungen. Die Reagenzien wurden wie im Methodenteil 5.3.16

Umwandlung von NADH zu NAD⁺ kann anschließend gemessen werden. Die photometrische Messung erfolgte bei 340 nm jeweils 3 min bei 30 °C.



Die Abbildung 2.30 zeigt die graphische Auswertung der Enzymtests. Sie wurden jeweils dreimal unabhängig voneinander durchgeführt und die Mittelwerte berechnet. Die Messungen erfolgten im Sekundentackt und wurden jeweils über drei Minuten gemessen. Die blaue Kurve zeigt die Enzymreaktion von PGK bei der grünen und roten Kurve wurde jeweils in unterschiedlichen Konzentrationen (rot = 0,6 μ g und grün = 1,2 μ g) 6S RNA hinzu gegeben. Die rote Kurve mit der geringeren Konzentration an 6S RNA ist der blauen Kurve ohne Zugabe von 6S RNA sehr ähnlich, bei der grünen Kurve mit 1,2 μ g 6S RNA ist die Enzymreaktion nach ca. 90 sek verringert. Jedoch ist der Startpunkt der grünen Kurve auch bei 0,1 anstatt bei 0,05 ohne 6S RNA und die letzte Messung bei -0,216 und ohne 6S RNA bei -0,323. Anhand der Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Konzentration an 6S RNA bei diesen *in vitro* Enzymreaktionen eine gering veränderte Enzymaktivität zeigt. Jedoch ist der regulatorische Effekt von 6S RNA auf die PGK Enzymaktivität nicht ganz klar erkennbar.



Abbildung 2.30: Graphische Darstellung der Enzymtests

Die Abbildung zeigt die Mittelwerte von drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen. Die Versuche wurden durch die Zugabe des Enzyms (PGK) gestartet und jeweils 3 min bei 30 °C im Sekundentackt spektralphotometrisch bei 340 nm gemessen. Die Absorption ist gegen die Zeit aufgetragen wurden. Die Steigung der roten Kurve mit 0,6 μ g 6S RNA beträgt -0,003, der grünen Kurve mit 1,2 μ g 6S RNA -0,0017 und der blauen Kurve ohne 6S RNA -0,0021.

2.4 Binden Ribosomen an die 6S RNA?

Wie schon in 2.3 Beschrieben wurden in den LC-MS Analysen des gProtein Eluats diverse ribosomale Proteine gefunden (s. Tab. 2.1). Davon waren einige aus der 30S ribosomalen Untereinheit (S6, S15 und S20) und mehrere aus der 50S ribosomalen Untereinheit (L18, L3, L1, L7/L12 und L21). Die LC-MS Analysen wurden 4x unabhängig voneinander durchgeführt und jedes Mal wurden ribosomale Proteine detektiert. Somit stand der Verdacht nahe, dass die 6S RNA auch einzelne ribosomale Proteine der kleinen oder großen Untereinheit oder an ein komplexes Ribosom bindet.

Um eine mögliche Bindung von 6S RNA an die Ribosomen zu überprüfen wurde die Generierung der Ribosomen wie folgt durchgeführt. Die Aufreinigung erfolgte mit den Zellpellets MRE 600 Zellen (5.2.6). Es wurden 50 g Zellen und 100 g Alluminiumoxid

verwendet um die Zellen in einem Mörser mit Pistile aufzureiben. Nach einem DNase I Dau und weiteren Zentrifugationsschritten wurde die ribosomenhaltige Lösung auf eine hochmolare Zuckerlösung, die als Sedimentationsfilter dient, gegeben um diese für weitere 24 h zentrifugiert. Die 70S Ribosomen wandern durch die Zuckerlösung und pelletieren. Anschließend wurden die ribosomalen Proteine auf einem SDS-Gel (5.2.7.5) und die ribosomalen rRNAs auf einem Agarosegel (5.2.7.1) kontrolliert. Das Proteingel ist im Anhang Abbildung 7.9 gezeigt. Nach den ersten Gelanalysen zeigten die Ribosomen keine Degradation daher wurde ein weiterer Kontrollversuch durchgeführt um zu zeigen, dass die Generierung der Ribosomen sauber war und keine RNasen in der Ribosomenlösung vorhanden sind. Dazu wurde 8 pmol 3'-End markierte 6S RNA mit 25 pmol 70S Ribosomen bei 37 °C in unterschiedlichen Zeitabständen (0, 5, 10, 15, 20 und 30 min) inkubiert. Die Proben wurden auf ein 10 %iges PAA-Gel aufgetragen und autoradiographiert. Im Autoradiogramm ist kein Abbau der 6S RNA über die Zeit zu erkennen somit ist die Ribosomenlösung frei von RNasen und die Bindungsanalysen konnten durchgeführt werden.

Zu Beginn wurde mit der ITC-Methode (*isothermal titration calorimetry*) versucht eine eventuelle Bindung von 6S RNA an die Ribosomen zu verifizieren. Da für diese Methode große Mengen an RNA (4 μ M auf 300 μ l) und Protein zur Verfügung stehen müssen wurde es schwierig die Versuche zu reproduzieren. Da die RNA mit der *in vitro* RiboMAX Methode (5.3.4) selbst hergestellt werden musste. Die ersten Ergebnisse der ITC-Methode zeigten fragliche Bindungen und mussten mit weitaus mehr Material erneut durchgeführt werden. Daher wurden die weiteren Versuche verschoben um mit anderen Methoden eine klarere Aussage über die Bindung zwischen 6S RNA und dem Ribosom zu gewinnen.

Im weiteren Verlauf wurden Filterbindungsanalyse (5.3.12) mit zuvor radioaktiv markierter 6S RNA (5.3.2) durchgeführt. Die RNA wurde mit den Ribosomen inkubiert und anschließend auf einen Filter gegeben. Nach dem Waschen des Filters um unspezifisch gebundene RNAs zu entfernen wurde dieser unter Rotlicht getrocknet und die Radioaktivität im Szintillationszähler gemessen. Es sollten nur RNA Moleküle am Filter verbleiben die Ribosomen gebunden haben. Zu Beginn wurde nur die markierte 6S RNA alleine auf den Filter gegeben und gewaschen. Da hier die Hintergrund Strahlung also Bindung von 6S RNA an dem Filter schon sehr hoch war und mit ansteigender Menge an 6S RNA diese auch weiter anstieg, musste bei den Bindungsversuchen eine Konstante Menge an 6S RNA verwendet werden. Sonst könnte ein eventueller Anstieg der gemessenen Strahlung nicht auf eine Bindung sondern auf eine erhöhte

Konzentration an 6S RNA die am Filter hängen bleibt zurück zu führen sein und ein falsch positives Ergebnis erzeugen. Für die positive Kontrolle wurde die tRNA verwendet. In der folgenden Abbildung sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Filterbindungsversuchen mit tRNA und 6S RNA gezeigt. Zum Vergleich wurden einmal die RNAs und einmal die Ribosomen in unterschiedlichen Konzentrationen zum Reaktionsansatz titriert. Die Ribosomen wurden zu den RNAs mit 5 x Bindepuffer gegeben und für 10 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf die Filter gegeben und mit 2 bis 3 ml Waschpuffer nachgespült. In Abbildung 2.29 A wurde die tRNA von 0 bis 10 pmol zu konstant 16 pmol Ribosomen titriert. Im Graphen war ein deutlicher Anstieg der gemessenen Strahlung zu sehen. Dieser könnte aber auch an der ansteigenden Konzentration von radioaktiv markierter tRNA die hinzugegeben wurde liegen. Anhand der Abbildung 2.29 B ist zu sehen, dass die Steigung sichtbar schwächer ist als in Abb. A. Hier wurden zu gleichbleibend 6,7 pmol tRNA, Ribosomen von 0 bis 100 pmol hinzugegeben. Bei diesem Versuch konnte nur noch ein weitaus geringerer Anstieg der gemessenen Strahlung nachgewiesen werden und der Verdacht lag nahe je mehr Ribosomen hinzu gegeben wurden, desto wahrscheinlicher verstopfen sie den Filter und die markierte tRNA bleibt unspezifisch an den Filterporen hängen. So konnte mit der positiven Kontrolle nicht anschaulich eine Bindung zwischen Ribosomen und tRNA aufgezeigt werden. Die Abbildung 2.29 C zeigt den Graphen der Filterbindungsversuche mit konstanter Menge an Ribosomen (20 pmol) und 6S RNA von 0 bis 5 pmol titriert. Auch in diesem Graphen ist wieder eine klare Steigung zu erkennen, aber dies könnte auch mit der ansteigenden Menge an markierter 6S RNA zusammenhängen. Deshalb wurde der Versuch auch mit konstanter Menge an 6S RNA (2 pmol) und zunehmender Konzentration an Ribosomen von 0 bis 50 pmol in Abb. 2.29 D dargestellt. An diesem Graphen kann anschaulich gezeigt werden, dass keine Steigung sichtbar ist. Im Gegensatz zu Abb. 2.29 B wo noch ein geringerer Anstieg der gemessenen Strahlung im Graphen zu deuten ist. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass keine Bindung zwischen 6S RNA und Ribosomen besteht dennoch sind die Ergebnisse schwammig. Denn in weiteren Versuchen mit Menge gleichbleibender an 6S RNA und ansteigender Ribosomenkonzentration (0/20/50/100/200/400 und 600 pmol) konnten klare Bindungen nachgewiesen werden. Doch je mehr Ribosomen hinzugegeben worden desto stärker wurde auch die gemessene Strahlung daher konnte darauf geschlossen werden, dass die Ribosomen die Filterporen verstopfen und die RNAs an den verstopften Filterporen hängen bleiben und nicht rausgewaschen werden konnten. Somit würden falsch positive Ergebnisse erzeugt werden. Anhand der Filterbindungsversuche kann nicht anschaulich dargestellt werden, ob eine Bindung zwischen 6S RNA und Ribosomen besteht.



Abbildung 2.29: Filterbindungsanalysen zwischen 6S RNA / tRNA und Ribosomen

Die Graphen zeigen jeweils die Mittelwerte von drei unabhängig voneinander durchgeführten Filterbindungsversuchen. In Abb. A und B wurde jeweils die tRNA und in Abb. C und D die 6S RNA verwendet. Für den Graph A wurde die tRNA in den Schritten 0/2/4/6/10 pmol zu 16 pmol Ribosomen hinzu titriert und für B wurden zu 6,7 pmol tRNA zu 0/6/20/60/100 pmol Ribosomen titriert. Bei der 6S RNA (Abb. C) wurden zu 20 pmol Ribosomen, 0/1/3/5 pmol 6S RNA dazu gegeben und umgekehrt wurden zu 2 pmol 6S RNA, 0/2/5/15/50 pmol Ribosomen in die Ansätze gegeben. Für jeden Versuch wurde 1 x Bindepuffer in die Reaktionsansätze pipettiert. Die Konzentration der titrierten Reagenzien wurde gegen die auf dem getrockneten Filter gemessenen CPM (Counts per Minute) in den Graphen eingetragen.

Im weiteren Verlauf wurde versucht eine evtl. bestehende Bindung der Ribosomen an die 6S RNA mittels EMSA zu zeigen. Da die Ribosomen mit 2,5 MDa zu groß sind um Retardierungsanalysen im herkömmlichen Sinne durchzuführen mussten andere Versuchswege gefunden werden um eine Bindung zu bestätigen. Eine weitere Herausforderung war die große Vielzahl an einzelnen ribosomalen Proteinen und ribosomalen RNAs aus denen ein Ribosom besteht. Zudem kann ein Ribosom auch in seine 2 Untereinheiten zerfallen, die große 50S Untereinheit und die kleine 30S Untereinheit. Da das Ribosom leicht zerfallen kann mussten die MgCl₂ Konzentration bei 2 mM gehalten werden. Dies wiederum behindert den Stromfluss bei gelelektrophoretischen Auftrennungen. Durch andere Gelzusammensetzungen wie z. B. ein kombiniertes Gel aus Agarose und Polyakrylamid oder ein gering %ige Agarosegele die anschließend getrocknet wurden zeigten keine Erfolge. Da die Ribosomen bei den Mischgelen nicht in das Gel eingelaufen sind und bei den getrockneten Agarosegelen die evtl. vorhandenen Banden durch die Trocknung des Agarosegels seitlich aus dem Gel gesaugt wurden.

Um noch eine klare Aussage über die Bindung der Ribosomen an die 6S RNA zu treffen wurden dünne 0,5 %ige Agarosegele die nicht für die autoradiographische Auswertung getrocknet werden müssen für Bindungsanalysen (5.2.7.2) hergestellt. Damit der Ribosomenkomplex nicht zerfällt, wurde sowohl im Gel als auch im Laufpuffer 2 mM MgCl₂ hinzugegeben und die Proben im Agarosegel bei 4 °C über 6 h bei 40 V gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Gele wurden nicht getrocknet sondern direkt Autoradiographiert. Um zu beweisen, dass die Ribosomen nicht in ihre Bestandteile zerfallen sind, wurden die Agarosegele anschließend EtBr (Ethidiumbromid) gefärbt. EtBr interkaliert in Nukleinsäuren und färbt diese unter UV-Licht. Wenn die Ribosomen zerfallen sind müssten 3 Spuren der 3 ribosomalen RNAs zu sehen sein. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass nur eine Bande detektiert wurde also liegen die Ribosomen im Komplex vor. Für den Versuch wurden 4 pmol radioaktiv markierte 6S RNA oder tRNA mit Bindepuffer, sowie für die verbesserte tRNA Bindung in An- und Abwesenheit von Poly (U) jeweils 8 pmol verwendet. Die Proben wurden bei 30 °C für 10 min Inkubiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. In Abbildung 2.30 ist im oberen Bild ein 0,5 % iges Agarosegel sowohl mit 6S RNA als auch mit tRNA mit und ohne Ribosomen gezeigt. Durch die Komplexierung der RNA an die Ribosomen verändert sich das Molekulargewicht und die Laufgeschwindigkeit im Gel wird langsamer. Die beiden unteren Bilder zeigen die EMSA Analysen auf zwei einzelnen Agarosegelen. Deutlich ist zu erkennen, dass bei der 6S RNA keine Bandenverschiebung zu erkennen ist. Die erste Bande zeigt die 6S RNA ohne Ribosomen und die darauf folgenden Banden einmal mit 50 und 100 pmol (obere Abb.) und einmal mit 50, 100 und 200 pmol Ribosomen (untere Abb.). Die Banden sind klar sichtbar und zeigen keinen Unterschied in Bezug auf An- und Abwesenheit der Ribosomen. Bei der tRNA wurde in der gleichen Reihenfolge, wie bei der 6S RNA aufgetragen und es sind auf beiden Autoradiogrammen deutliche Bandenverschiebungen zu erkennen. Schon bei 50 pmol Ribosomen liegen fast alle tRNA Moleküle in gebundener Form vor, wobei die Bindung mit Poly (U) dominanter ist als ohne.



Abbildung 2.30: Retardierungsanalysen der 6S RNA Ribosomen Bindung

Die Autoradiogramme zeigen 5 %ige Agarosegele, die bei 40 V 5 bis 6 h gelelektrophoretisch aufgetrennt wurden. Es wurden jeweils 4 pmol radioaktiv markierter 6S RNA oder tRNA in die Reaktion eingesetzt und bei 30 °C für 10 min inkubiert. Im oberen Autoradiogramm wurde zu den RNA Molekülen jeweils 50 oder 100 pmol Ribosomen hinzu gegeben und bei den unteren Autogradiogrammen 50, 100 oder 200 pmol. Für die tRNA:Ribosomen Bindung wurden die Versuche immer mit und ohne 8 pmol Poly (U) durchgeführt.

Dieses abschließende Experiment zeigt klar, dass keine Bindung zwischen der 6S RNA und dem Ribosomenkomplex besteht. Anhand der Filterbindungsmethode konnte schon eine wage Aussage darüber getroffen werden, dass keine Bindung zwischen den beiden Molekülen existieren und mit den Retardierungsanalysen konnte diese nochmal bestätigt werden. Dennoch müssen die LC-MS-Analysen nicht falsch sein, da die 6S RNA auch an einzelne ribosomale Proteine binden kann oder an den Untereinheiten jedoch nicht an dem Ribosomenkomplex. Um dies zu zeigen müssten EMSA Analysen mit den einzelnen ribosomalen Proteinen durchgeführt werden die in den LC-MS-Analysen mehrmals gefunden worden sind.

3. Diskussion

Diese Arbeit war in zwei Hauptbereiche unterteilt. Zum einen in die Analyse des 6S RNA Regulationsnetzwerkes in Bezug auf das RNA-Chaperon Hfq sowie auf den globalen Stress-Regulator ppGpp und zum andern auf die Identifizierung und Charakterisierung bisher nicht bekannter Interaktionspartner der 6S RNA. Im ersten Teil wurde der regulatorische Zusammenhang von Hfq und 6S RNA untersucht. Dabei wurden die Auswirkungen auf die Expression und Lebensdauer der 6S RNA durch das Fehlen von Hfq in der Zelle analysiert. Diese Untersuchungen wurden mit Hilfe einer Δhfq -Mutante durchgeführt. Da bereits zuvor ein Zusammenhang zwischen dem globalen Regulator ppGpp und der 6S RNA gezeigt werden konnte (Neußer et al., 2009), wurde in dieser Arbeit das basale Level des Effektormoleküls ppGpp unter verschiedenen Bedingungen, in An- und Abwesenheit von Hfq und einem GMP-Synthetase Hemmer, analysiert.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden zelluläre Interaktionspartner der 6S RNA gesucht und charakterisiert. Dabei konnte erstmalig das Protein PGK (Phoshoglycerat Kinase) als Bindepartner identifiziert und anschließend die Bindung dieses Proteins an die 6S RNA durch Footprint Analysen und Enzymtests genauer charakterisiert werden. Bei weiteren Studien wurden auch ribosomale Proteine als Bindepartner gefunden und die Signifikanz dieser potentiellen Wechselwirkung durch weitere Bindestudien untersucht. Die Bedeutungen der gewonnenen Ergebnisse werden im Folgenden genauer diskutiert.

3.1 Der Zusammenhang zwischen 6S RNA und Hfq

Um die regulatorische Verbindung zwischen der 6S RNA und dem RNA-Chaperon Hfq zu bestimmen, wurden verschiedene Analysen mit einer Δhfq -Mutante durchgeführt. Bisher konnte gezeigt werden, dass das Protein an die 6S RNA bindet, doch die genaue Bedeutung und Funktion dieser Wechselwirkung konnte noch nicht geklärt werden (Windbichler et al., 2008). Da die 6S RNA in der Zelle über die Zeit akkumuliert, liegt sie in der stationären Phase überwiegend an die σ^{70} -assoziierte RNA Polymerase gebunden vor und inhibiert so indirekt die σ^{70} - abhängigen Promotoren (Wasserman and Saecker, 2006; Gildehaus et al., 2007). Die 6S RNA gilt daher auch als Regulator der Transkription in der stationären Phase (Cavanagh et al. 2008). Zudem konnten Transkriptomanalysen zeigen, dass in Abwesenheit von 6S RNA die Gene des Translationsapparates in der stationären Phase reduziert sind und der basale ppGpp-Level erhöht ist (Neußer et al., 2009). Hfq ist nicht nur ein RNA-Chaperon sondern auch als Translationsaktivator / Inhibitor durch die Interaktion mit den meisten regulatorischen RNAs bekannt. Sowohl Strukturumlagerungen, Bindungen an Ziel-mRNAs als auch die Stabilität der RNAs werden durch Hfq beeinflusst.

Für die folgenden Untersuchungen wurde eine Δhfq -Mutante verwendet, um potentielle Auswirkungen durch das Fehlen von Hfq auf die 6S RNA zu beobachten. Schon die phänotypischen Vergleiche der Zellmorphologie und Wachstumseigenschaften zeigten einen deutlichen Unterschied zwischen dem Wildtyp und der $\Delta h f q$ -Mutante. Bei den Wachstumsanalysen konnte gezeigt werden, dass das Wachstum der Mutante erniedrigt war. Besonders in der Übergangsphase von der logarithmischen- zur stationären Phase erreicht die Mutante nicht die gleiche Zelldichte wie der Wildtyp (siehe Abb. 2.1). Auch die fluoreszenz mikroskopischen Aufnahmen zeigen eine deutlich veränderte Zellmorphologie. Die Zellen ohne das Hfg-Protein sind erheblich länger, als die wildtyp Zellen und weisen offenbar Probleme bei der Zellteilung auf, da sie sehr lang sind und einige chromosomale DNAs in einer Zelle aufweisen. In Abbildung 2.2 EI/FI und 2.3 EI/FI kann sowohl in der logarithmischen- als auch in der stationären Phase gezeigt werden, dass das Abschnüren in der Zellteilung nur bedingt durchgeführt werden kann. Mit einiger Wahrscheinlichkeit ist das Protein FtsZ an diesem Phänomen beteiligt. Das Protein FtsZ bildet ein Komplex mit dem Protein ZapA und initiiert die Septenbildung, indem es an die Zellwand bindet. Es konnte schon gezeigt werden, dass in Abwesenheit von Hfq das Zellteilungsprotein FtsZ in der stationären Phase erhöht ist (Takada et al. 1999). Da die Zellteilung in der frühen logarithmischen Phase initiiert wird, könnte hier das Protein FtsZ verringert vorkommen oder die ftsZ mRNA hat eine geringere Stabilität/ Lebensdauer, wodurch eine verminderte Zellteilung stattfindet. Wenn Hfg die ftsZ mRNA in der logarithmischen Phase schützt und positiv auf die Translation einwirkt, könnte so die fehlerhafte Zellteilung erklärt werden. Da in der stationären Phase weniger Transkription und Translation stattfindet, könnte die ftsZ mRNA nur noch schwach abgelesen werden. Da Hfq wachstumsratenabhängig exprimiert wird und in der stationären Phase in geringeren Konzentrationen in der Zelle vorkommt, kann Hfg nur noch schwach auf die Regulation von FtsZ einwirken.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde die 6S RNA Konzentration in An- und Abwesenheit von Hfq bestimmt. Da noch nicht bekannt ist, welche regulatorische Funktion die Bindung zwischen Hfq und der 6S RNA hat, wurde zuerst das Wegfangen der 6S RNA in der Zelle durch Hfg vermutet. Dadurch würden die σ^{70} -assoziierten RNA Polymerasen frei und σ^{70} -abhängige Promotoren könnten neu besetzt werden. Dies wiederum würde zu einer Verminderung der regulatorischen Funktion der 6S RNA führen. Die Ergebnisse der Primer Extension Analysen in Abbildung 2.4 und die graphische Auswertungen mehrerer unabhängiger Experimente in Abbildung 2.5 zeigen jedoch einen überraschenden Konzentrationsanstieg der 6S RNA in der logarithmischen Phase der Mutante. In der Mutante konnte ein ca. 1,5 fach höherer 6S RNA Level gemessen werden als im Wildtyp. Demnach ist die Konzentration der 6S RNA in Abwesenheit von Hfq verstärkt. Jedoch nähern sich die Werte in der stationären Phase wieder an, dies könnte sein, weil die 6S RNA in der Zelle über die Zeit akkumuliert und wahrscheinlich kleinere Unterschiede so nicht mehr deutlich detektiert werden können. Das Ergebnis könnte darauf hindeuten, dass evtl. die 6S RNA Synthese von Hfg reprimiert oder die reife RNA durch eine Bindung von Hfq markiert wird und sie so schneller von einem Degradasom oder einer spezifischen RNase erkannt und abgebaut wird. Die unterschiedlichen Konzentrationsniveaus der 6S RNA könnten aber auch eine indirekte Folge durch das Fehlen von Hfg sein, da die Deletion des hfq-Gens die Synthese von mehr als 50 % aller zellulären Proteine aktiviert oder inhibiert.

Um auszuschließen das Hfq die Syntheseaktivität des *ssrS*-Gens reprimiert, wurden Promotoraktivitätsstudien durchgeführt. Das *ssrS*-Gen wird von zwei tandem Promotoren dem P1 und dem P2 Promotor reguliert, wobei der proximale P1 Promotor über 70 % der 6S RNA Expression alleine trägt. Daher wurde jeweils einzeln das Plasmid, welches einen der Promotoren vor einem *cat*-Fusionstranskript trägt, in den Wildtyp und die Δhfq -Mutante transformiert. Anschließend wurde die Menge der *cat*-Fusionstranskripte per Primer Extension bestimmt, um Rückschlüsse auf die Syntheseaktivität der einzelnen Promotoren in beiden Stämmen zu ziehen (siehe Abb. 2.7 und 2.8). Überraschend ist das Ergebnis einer verminderten Syntheseaktivität in der logarithmischen Phase, für den P1 Promotor, in der Δhfq -Mutante. Im Wildtyp konnte eine deutlich stärkere Syntheseaktivität nachgewiesen werden. In der stationären Phase gleichen sich die Werte an und in der Δhfq -Mutante konnte nur noch eine gering niedrigere Syntheseaktivität verzeichnet werden. Interessanterweise ist es der P1 Promotor, der den Hauptanteil der 6S RNA Expression trägt, dennoch konnte genau hier in der Mutante eine verminderte Aktivität gezeigt werden. Im Vergleich dazu ist die 6S RNA Transkriptmenge in der Δhfq -Mutante erhöht. Als erste Erklärungsmöglichkeit dieses kontroversen Befundes wurde eine unerwartete Beeinflussung der Versuchsergebnisse oder der Bestimmung der Promotoraktivität durch das Hfq Protein selbst in Erwägung gezogen. Hier kam der Verdacht auf, dass das Hfq Protein im Wildtyp an das cat-Fusionstranskript bindet und so die Halbwertszeit der cat-mRNA verlängert, wodurch die Ergebnisse nicht miteinander verglichen werden könnten. Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurde eine Rifampizin-Kinetik der cat-Fusionstranskripte in beiden Stämmen durchgeführt und die Halbwertszeit der cat-mRNA bestimmt (siehe Abb. 2.9). Rifampizin verhindert die Transkriptionsinitiation, weshalb nach Zugabe des Antibiotikums keine neuen Transkripte mehr entstehen und so die Lebensdauer der cat-Fusionstranskripte bestimmt werden kann. Die gemessene Halbwertszeit der Mutante beträgt 60 sek und des Wildtyps 70 sek (siehe Abb. 2.10). An Hand der geringen Unterschiede in der Bestimmung der Halbwertszeit kann darauf geschlossen werden, dass das Hfq Protein im Wildtyp nicht an das cat-Fusionstranskript bindet und somit die Ergebnisse vergleichbar macht. Jedoch ist die Syntheseaktivität des ssrS-Promotors invers zur 6S RNA-Transkriptmenge in den Δhfq -Zellen. Daher ist eine indirekte Regulation der 6S RNA-Menge bei einer Deletion des hfq-Gens am wahrscheinlichsten. Die Syntheseaktivität des ssrS-Gens könnte durch einen anderen Regulationsmechanismus beeinflusst werden, als die 6S RNA-Menge in der Zelle. Da die Synthese von mehr als 50 % aller Proteine verändert ist, wenn das hfg-Gen deletiert wurde, sind viele einzelne regulatorische Netzwerke in der Zelle betroffen und miteinander verstrickt. Ohne weiterführende Analysen ist es nicht möglich eine definierte Beziehung zwischen Hfq und der 6S RNA auf der Basis der bisherigen Untersuchungen zu zeigen.

3.1.1 Identifizierung der Bindedomänen von Hfq an der 6S RNA

Zur Erforschung der Bedeutung der Interaktion zwischen Hfq und der 6S RNA sollte eine genaue Bestimmung der Binderegion von Hfq an der 6S RNA vorgenommen werden. Zuvor wurde das Protein aufgereinigt und die Fähigkeit zur Bindung an die 6S RNA überprüft (siehe Abb. 2.11). Für die Identifizierung der Bindedomänen wurden enzymatische Footprint Analysen mit RNase T1 und RNase V1 und Hydroxylradikal Footprint Analysen durchgeführt (siehe Abb. 2.12 und 2.13). Wie eine Zusammenfassung der Footprint Analysen an der Sekundärstruktur der 6S RNA zeigt (siehe Abb. 2.14), konnte die Bindung von Hfq an die 6S RNA einmal in der *central bubble* und einmal im *terminalen loop* verifiziert werden. Da potentiell zwei Hfq-Moleküle mit der 6S RNA interagieren können und die einzelnen Bindekonstanten nicht bekannt sind, kann zunächst nicht geschlussfolgert werden, an welcher Domäne das Hfg Hexamer zuerst bindet oder ob durch die erste Bindung eine Strukturumlagerung stattfindet und dadurch erst die zweite Bindung ermöglicht wird. Es könnte auch sein, dass das Protein mit gleicher Affinität sowohl an der einen, als auch an der anderen Bindedomäne bindet und in den Footprint Analysen ein Gemisch aus beiden Komplexen vorhanden ist. Die Ergebnisse der Analysen deuten auf ein Gemisch aus beiden Komplexen hin, wodurch die Identifizierung der Bindedomänen erschwert wurde. In den Proben mit erhöhter Hfg Konzentration könnten demnach drei verschiedene Komplexe vorhanden sein: erstens ein Hfq gebunden; zweitens ein Hfq an der anderen Bindestelle gebunden und drittens zwei Hfq-Hexamere gebunden. Um diese Fragen zu lösen, wurden Crosslink Versuche mit anschließender Primer Extension-Abbruch Reaktion durchgeführt. Bei den Quervernetzungsanalysen ergaben sich jedoch experimentelle Schwierigkeiten, da sich Hfq nicht reproduzierbar in nachweisbarer Form mit der 6S RNA vernetzen lies. Dies kann auf verschiedene Ursachen zurück zu führen sein, wie z. B. eine heterogene Bindung und eine sehr geringe Nachweisbarkeit der vernetzten Komplexe. Die geringen Mengen an Proteinen, die an die 6S RNA gebunden wurden, konnten kaum nachgewiesen werden und somit konnten aus zeitlichen Gründen auch keine weiteren Versuche durchgeführt werden.

3.2 Hfq, ppGpp und 6S RNA – ein gemeinsames Regulationsnetzwerk

Im nächsten Teil dieser Arbeit wurde sich mit dem Netzwerk zwischen den Regulatoren 6S RNA, dem Effektormolekül ppGpp, sowie dem RNA-Chaperon Hfq befasst. Die Verbindung zwischen der 6S RNA und ppGpp konnte schon in früheren Arbeiten gezeigt werden, jedoch ist der regulatorische Mechanismus dahinter noch nicht bekannt (Neußer et al., 2009; Geissen et al., 2010; Schneider 2011). Da in Abwesenheit von 6S RNA der basale ppGpp-Spiegel ansteigt, könnte ein Zusammenhang zwischen der 6S RNA und dem Protein SpoT, welches für die basale ppGpp-Konzentration in der Zelle verantwortlich ist, bestehen, aber auch eine Verbindung zwischen der 6S RNA und der GMP-Synthetase die XMP in GMP umwandelt, wodurch wiederum GDP entsteht. Es konnte auch ein Zusammenhang zwischen der 6S RNA und Hfq festgestellt werden, da die 6S RNA Konzentration in der Zelle erhöht ist, wenn Hfq deletiert ist (siehe Abb. 2.4 / 2.5). Daher stellte sich auch die Frage nach einem veränderten basalen ppGpp-

Spiegel in Abwesenheit von Hfq. Da die Δhfq -Mutante ein verzögertes Wachstum in der stationären Phase besitzt und die ppGpp-Konzentration im umgekehrt proportionalem Verhältnis zur Wachstumsrate steht, wurde ein erhöhter ppGpp-Spiegel erwartet. Dahingegen ist in der Mutante die 6S RNA Konzentration erhöht. Es konnte schon gezeigt werden, dass bei Überexpression der 6S RNA der ppGpp-Spiegel reduziert ist. Die Ergebnisse (siehe Abb. 2.14) der Bestimmung der ppGpp-Konzentration durch Dünnschichtchromatographie zeigten einen erniedrigten ppGpp-Level in der Δhfq -Mutante im Gegensatz zum Wildtyp. Sowohl in der logarithmischen- als auch in der stationären Phase ist der basale ppGpp-Spiegel erniedrigt. Das Ergebnis passt zu dem erhöhten 6S RNA Level, wodurch sich als Folge der ppGpp-Spiegel erniedrigt. Somit hat Hfq auch eine indirekte Wirkung auf den ppGpp-Spiegel in der Zelle. Die Frage bleibt jedoch offen, welche Verbindung genau zwischen der 6S RNA und dem Effektormolekül besteht. Diese könnte direkter oder indirekter Natur sein.

Sicher ist, dass das Netzwerk der drei Regulatoren 6S RNA, ppGpp und Hfq in der Zelle von E. coli sehr komplex miteinander verknüpft ist, und viele der Verbindungen untereinander sind indirekter Natur, um in der Zelle eine Feinregulation mit vielen back up Mechanismen zu ermöglichen. Um eine dieser zentralen Verbindungen zu klären, wurde ein weiterer Versuch durchgeführt, der einen möglichen Zusammenhang zwischen der 6S RNA und ppGpp aufdecken sollte. Dazu wurde mit dem Antibiotikum Decoyinine gearbeitet. Dies inhibiert die GMP-Synthetase, wie in Abbildung 2.15 bei Bacillus subtilis dargestellt. Die durchgeführten ppGpp-Konzentrationsbestimmungen wurden mittels Dünnschichtchromatographie in An- und Abwesenheit von 6S RNA in Abbildung 2.18 dargestellt. Während in Bacillus subtilis gezeigt werden konnte, dass durch die Zugabe von Decoyinine die ppGpp-Konzentration völlig einbricht und nach kurzer Zeit kein ppGpp mehr nachgewiesen werden konnte und auch die Sporulation früher beginnen lässt (Sugae et al., 1981; Shigeo et al., 2013). Die hier mit E. coli durchgeführten Ergebnisse zeigten jedoch keine starken Unterschiede zwischen dem 6S RNA defizienten Stamm und dem isogenen Wildtyp, mit und ohne Zugabe von Decovinine. Der ppGpp-Level nimmt nach Zugabe von Decoyinine in beiden Stämmen leicht ab und nach 40 bis 50 min wieder zu. Es konnte keine absolute Abnahme des Effektormoleküls verzeichnet werden und auch in der 6S RNA Deletionsmutante war nur eine schwache Abnahme des ppGpp-Levels zu erkennen. Das Ergebnis könnte damit erklärt werden, dass E. coli ein gramnegatives Bakterium ist und Bacillus subtilis ein grampositives. Grampositive Bakterien haben zwar eine sehr dicke Murein Schicht als Zellwand, aber die Zellwand von gramnegativen Bakterien ist mit zwei Lipidmembranen und

einem erweiterten periplasmatischen Raum viel strukturierter. Das Decoyinine kann möglicherweise nur langsam oder gar nicht durch die Zellmembran diffundieren. Darüber hinaus ist bekannt, dass das Netzwerk der Stringenten Kontrolle mittels ppGpp in *B. subtilis* über einem anderen Mechanismus gesteuert wird, als in *E. coli*. In *B. subtilis* fungiert letztlich die zelluläre GTP-Konzentration als regulierende Komponente und nicht den ppGpp-RNA-Polymerase Komplex, wie in *E. coli* (Krasny and Gourse, 2004). Das bedeutet, dass die Rolle der GMP-Synthetase, die der Zielpunkt von Decoyinine ist, in *E. coli* nicht die gleiche regulatorische Bedeutung besitzt, wie in *B. subtilis*. So können die Ergebnisse mit den Auswirkungen durch das Decoyinine bei *B. subtilis* nicht uneingeschränkt verglichen werden und auch nicht ausgeschlossen werden, dass die GMP-Synthetase eine weitere Verbindung in dem 6S RNA Regulationsnetzwerk darstellt. Aufgrund dieser Komplexität lassen sich mit den bisherigen Ergebnissen noch keine vollständigen Aussagen über den regulatorischen Zusammenhang von 6S RNA und ppGpp treffen. Hier müssten weitere Versuche geplant werden, die die möglichen Verbindungen genauer Aufschlüsseln könnten.

3.3 Suche nach Interaktionspartner der 6S RNA

Durch die schon sehr lange bekannte Verbindung zwischen der 6S RNA und der RNA-Polymerase und der Komplexierung mit Hfq, stellte sich die Frage nach weiteren möglichen Interaktionspartnern der 6S RNA. Besonders die noch unbekannte regulatorische Interaktion zwischen dem Effektormolekül ppGpp und der 6S RNA wirft die Frage nach einer direkten oder indirekten Kommunikation zwischen SpoT, dem Protein für die basale zelluläre ppGpp-Konzentration, und der 6S RNA auf. Zur Lösung dieser Fragestellung wurde die *in vitro pull down* Methode mit den *Adipic acid dihydrazide-Agarose beads* etabliert. Zu Beginn wurden positive Kontrollen mit den Proteinen RNAP (DNA-abhängige RNA-Polymerase), Hfq und eine negative Kontrollen mit BSA durchgeführt, die erfolgreich verliefen (siehe Abb. 2.21). Nachdem die Kontrollen erfolgreich waren, konnte die Methode mit gebundener 6S RNA an die Agarose *beads* und gProtein aus 6S RNA defizienten Zellen (KS1) durchgeführt werden. Nach dem ersten Versuchsdurchlauf konnten drei deutliche Banden im SDS-Gel beobachtet werden (siehe Abb. 2.22). Diese wurden anschließend durch die MALDI-TOF-Analyse identifiziert. Für die erste Bande, etwas unterhalb von 45 kDa, wurde Übereinstimmung mit dem Protein DinG (ATP- dependent DNA helicase) erzielt. Die gemessenen Werte waren jedoch nicht eindeutig und es kann daher nicht mit Sicherheit eruiert werden, dass das Protein DinG in der Bande zu finden war. Da DinG normalerweise auch eine Größe von 82 kDa besitzt und somit viel weiter oberhalb im Gel laufen sollte, wurde das Protein als falsch positiv gewertet und konnte auch nicht erneut identifiziert werden. Das zweite Protein wurde etwas oberhalb von 45 kDa detektiert und nach den MALDI-TOF-Analysen als TnaA (tryptophanase/L-cysteine desulfhydrase) identifiziert. Sowohl die Größe des Proteins mit 53 kDa, als auch die MALDI-TOF-Werte weisen auf ein positives Ergebnis hin. Das *tnaA*-Gen wird von der σ^{70} -assoziierten RNAP hauptsachlich in der logarithmischen Wachstumsphase transkribiert und Tryptophan schützt vor frühzeitiger Termination der Transkription. Das reife Protein benötigt den Kofaktor PLP (pyridoxal 5'phosphat) um Tryptophan zu Indol zu katalysieren. Die Indol Produktion durch TnaA ist direkt abhängig von der Tryptophanmenge. Es konnte auch gezeigt werden, dass das Enzym Tryptophanase regulatorisch auf die kleine RNA Rcd einwirkt (Chant and Summers; 2007).



Abbildung 3.1: Mögliches Regulationsdiagramm von TnaA Die Abbildung zeigt die mögliche Regulation des TnaA Proteins. Zyklisches-AMP, Crp und TorR-P wirken aktivierend auf die Transkription und auch Tryptophan wirkt schützend vor frühzeitiger Termination der Transkription. Nach der Translation benötigt das reife Protein für seine Enzymaktivität PLP (pyridoxal 5'-phosphat) als Kofaktor (aus EcoCyc/biocyc.org).

An Hand der Ergebnisse bindet das Signalmolekül TnaA an die 6S RNA. Da Tryptophanase in erster Linie Tryptophan katalysiert, stellt sich die Frage, warum bindet dieses Enzym an die 6S RNA? Möglicherweise hat das Protein noch weitere unbekannte Funktionen, die in Bezug auf das Regulationsnetzwerkes der 6S RNA stehen. Da in Abwesenheit von 6S RNA der ppGpp-Spiegel erhöht ist, und über die RNAP möglicherweise Crp beeinflusst, welches wiederum die Transkription von TnaA aktiviert, könnte ein Zusammenhang zwischen 6S RNA und TnaA bestehen. Möglicherweise könnte auch TnaA durch die Bindung an 6S RNA inaktiviert werden damit keine erhöhte Indol Konzentration in der Zelle vorkommt, da das intrazelluläre Signalmolekül die Zellteilung begünstigt.



Abbildung 3.2: Mögliches Regulationsschema von TnaA

Die Abbildung zeigt das *tnaA-, tnaB-* und *tnaC-*Gen in den lila farbigen Kästchen auf. Proteine oder Effektormoleküle werden in Kreisen dargestellt, die mit grünen Pfeilen wirken aktivierend, die braunen Pfeile weisen eine mögliche Interaktion und Regulation auf. Das mittlere Kästchen zeigt Regulatoren, die indirekt auf die Gene einwirken, da sie z.B. an die RNAP binden (aus Ecocyc/biocyc.org).

Das dritte Protein, welches durch die MALDI-TOF-Analysen identifiziert wurde, ist das BetB (betaine aldehyde dehydrogenase (BADH), NAD-*dependent*). Die Bande wurde bei ca. 50 kDa detektiert und passt genau zu der Größe des Proteins mit 53 kDa, auch die MALTI-TOF-Werte weisen auf ein positives Ergebnis hin. BADH katalysiert in der Biosynthese den zweiten Schritt von Cholin zu Glycin-Betaine. Das Oxidationsprodukt ist ein Aminosäure-Derivat und für eine hohe Salztoleranz in verschiedenen Mikroorganismen verantwortlich.



Abbildung 3.3: Mögliches Regulationsdiagramm von BetB

Die Abbildung zeigt die BetB Regulation von der Transkription zur Translation. In die Transkription können Cra aktivierend und P-ArcA und BetI inhibierend einwirken. Cra ist ein DNA-bindender Transkriptionsregulator, der die Transkriptionsinitiation aktiviert. ArcA ist auch ein DNA-bindender Transkriptionsregulator, der die Transkriptionsinitiation inhibiert und BetI ist ein weiterer DNA-bindender Transkriptionsrepressor, der die Initiation inhibiert (aus Ecocyc/biocyc.org).

Eine Verbindung zwischen 6S RNA und dem BADH Protein, ist nicht besonders offensichtlich. Das *bet* Operon wird z. B. durch Osmostress und durch eine veränderte Temperatur reguliert. Dies könnte vielleicht eine mögliche Verbindung zur 6S RNA sein. Möglicherweise ist die Bindung an die 6S RNA ein *back up* Mechanismus, da auch schon die Bindung an ein weiteres katalytisch aktives Protein gezeigt werden konnte. So könnte die regulatorische Funktion der Bindung nur unter speziellen Situationen, wie z.B. Osmostress oder Temperaturunterschiede erfolgen.

3.3.1 Identifizierung der Bindedomäne von PGK an der 6S RNA

Im weiteren Verlauf der in vitro pull down Versuche konnte reproduzierbar ein weiteres Protein identifiziert werden nämlich das PGK Protein (Phosphoglycerat Kinase). Die Phosphoglycerat Kinase katalysiert einen Schritt in der Glykolyse, durch Dephosphorylierung des 1,3-Bisphosphoglycerat zu 3-Phosphoglycerat und Gewinnung eines Moleküls ATPs. Da das PGK Protein mehrfach bei den Analysen detektiert wurde, lag die Entscheidung nahe, dieses Protein aufzureinigen und weitere Charakterisierungsstudien zur Bindung an die 6S RNA und deren potentiellem Regulationsnetzwerk durchzuführen. Daher wurde nach der Aufreinigung des Proteins die direkte Interaktion von PGK an 6S RNA, gebunden an Agarose beads nachgewiesen (siehe Abb. 2.24). Anschließend wurde die Komplexierung von PGK an die 6S RNA genau untersucht. Da das PGK Protein eine ADP/ATP Bindestelle besitzt und auch in anderen Organismen schon eine Bindung an RNAs gezeigt werden konnte, ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass auch PGK aus E. coli eine RNA Bindestelle aufweist und darüber hinaus andere RNAs binden kann. Zu Beginn wurden Retardierungsanalysen mit 6S RNA durchgeführt und anschließend Kompetitionsexperimente mit ATP. Aufgrund dieser Analysen konnte eine Bindung an 6S RNA verifiziert werden, jedoch nimmt die Bindung vollständig ab, wenn ein Überschuss an ATP hinzu gegeben wurde (siehe Abb. 2.25 A). Somit bindet die 6S RNA sehr wahrscheinlich an die ATP Bindestelle. Um die Spezifität der Bindung an die 6S RNA zu zeigen, wurden weitere Retardierungsanalysen mit tRNA und pRNA durchgeführt. Die tRNA ist kleiner als die 6S RNA, dennoch stark strukturiert mit vielen kleinen Doppelstrang- und Einzelstrangbereichen. Die pRNA besitzt eine komplementäre Basenstruktur zur 6S RNA, ist jedoch nur 20 Nukleotide groß und deutlich weniger strukturiert, als die 6S RNA und liegt im Experiment einzelsträngig vor. Bei den Bindungsversuchen konnte sowohl eine Interaktion mit der tRNA als auch mit der pRNA gezeigt werden (siehe Abb. 2.25 B/C). Dennoch belegen die Analysen eine deutlich bessere Komplexbildung der pRNA mit PGK, als die Komplexbildung zwischen tRNA und PGK. Eine Bindung an DNA sowohl einzelsträngig als auch doppelsträngig konnte nicht nachgewiesen werden. An Hand der Ergebnisse kann eine generelle Bindung von PGK an RNAs bestätigt werden, die nicht sequenzspezifisch ist. Wobei die Affinität der Bindung an einzelsträngige RNAs oder Bereich höher ist als an doppelsträngige Bereiche, dies Belegt die

deutlichere Komplexierung an die pRNA. Die Bindung ist höchst wahrscheinlich RNA spezifisch durch die OH-Gruppe am C2-Atom der Ribose, welche die DNA nicht aufweiset. Ob die Bindung an 6S RNA Bedeutung für das Regulationsnetzwerk hat, kann noch nicht gesagt werden.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde die Binderegion des PGK Proteins an die 6S RNA durch Hydroxylradikal Footprint Analysen identifiziert (siehe Abb. 2.28). Die Footprint Analysen weisen auf eine Bindung an der zentralen Blase der 6S RNA hin. Dort ist die 6S RNA einzelsträngig und schon bei den Retardierungsanalysen konnte eine deutlichere Bindung an einzelsträngige RNAs gezeigt werden. Zudem konnte in Abb. 2.27 nachgewiesen werden, dass das PGK Protein womöglich in einer Dimerform an die RNA bindet. Da auch eine spezifische Bindung einer kleinen RNA an das PGK Protein aus Corynebacterium glutamaticum nachgewiesen werden konnte, stellte sich die Frage, ob die RNA-Bindungsstelle evolutionär konserviert ist und daher möglicherweise wichtige regulatorische Funktion besitzt. Da gezeigt werden konnte, dass nicht nur 6S RNA sondern auch andere RNAs an das PGK Protein binden, ist die Bindung an die 6S RNA wahrscheinlich nicht spezifisch für diese eine RNA sondern kann generell mit kleinen regulatorischen RNAs erfolgen. Daher wurden Enzymtests durchgeführt, um der Frage einer möglichen regulatorischen Funktion durch die 6S RNA Bindung aufzuklären. Dabei zeigte sich eine gering veränderte Enzymaktivität durch Zugabe von 6S RNA (siehe Abb. 2.30). Das Ergebnis weist auf eine mögliche regulatorische Funktion dieser Komplexierung hin. Um diese Frage abschließend zu beantworten müssten weitere Enzymtests mit variierenden Bedingungen durchgeführt werden. Dennoch konnten 3 Proteine als mögliche Interaktionspartner der 6S RNA identifiziert werden. Daher ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass die 6S RNA mehr ist als der Regulator für die Anpassung von logarithmischen- zur stationären Phase.

3.3.2 Ribosomen binden nicht an die 6S RNA

Bei weiteren Analysen der *in vitro pull down* Eluate durch das LC-MS Verfahren, wurden einige ribosomale Proteine gefunden (siehe Tabelle 2.1). Daher wurden 70S Ribosomen isoliert und erneut Bindestudien durchgeführt. Da Ribosomen aus vielen verschiedene Proteinen und den drei ribosomalen RNAs bestehen, war es nicht ganz einfach, eine Methode zu finden, in der die Ribosomen nicht in ihre Bestandteile dissoziieren. Zu Beginn wurde die ITC-Methode (*isothermal titration calorimetry*) versucht, da aber für diese Methode sehr viel Material

eingesetzt werden musste, und die Herstellung von 6S RNA zu viel Zeit in Anspruch nahm, war die Methode nicht weiter geeignet. Als nächstes wurden Filterbindungsanalysen durchgeführt (siehe Abb. 2.29). Die Versuche zeigten schon einen leichten Trent, waren aber nicht exakt und reproduzierbar, um eine klare Aussage zu treffen. Daher wurden Retardierungsanalysen mit 0,5 %igen Agarosegelen bei 4 °C durchgeführt. Hiermit konnte eine deutliche Bindung bei tRNA und den Ribosomen gezeigt werden, jedoch keine Bindung bei 6S RNA und den Ribosomen (siehe Abb. 2.30). Diese Ergebnisse zeigen jedoch nur, dass keine Bindung zwischen den 70S Ribosomen und der 6S RNA besteht, es könnten aber auch Bindungen zwischen einzelnen ribosomalen Proteinen und der 6S RNA bestehen oder aus einem Zusammenschluss einiger ribosomaler Proteine und der 6S RNA. Da bei den LC-MS-Analysen mehrere ribosomale Proteine gefunden wurden, könnte es sich natürlich auch um unspezifische Bindungen handeln, da die ribosomalen Proteine selbst auch RNA-Bindestellen aufweisen und daher wahrscheinlich leichter RNAs binden. Zur Beantwortung dieser Fragen müssen weitere an Retardierungsanalysen mit den identifizierten, einzelnen ribosomalen Proteinen durchgeführt werden.

3.4 Ausblick

Im ersten Teil der Arbeit wurde der regulatorische Zusammenhang zwischen der 6S RNA und dem RNA-Chaperon Hfq durch eine Δhfq -Mutante analysiert. Es konnte an Hand von Primer Extension Analysen gezeigt werden, dass die 6S RNA Konzentration durch die Abwesenheit von Hfq erhöht und die *ssrS*-Syntheseaktivität erniedrigt ist. Zur endgültigen Klärung dieses Phänomens sollten noch weitere Untersuchungen vorgenommen werden, die das Netzwerk zwischen der 6S RNA und dem Hfq Protein weiter aufschlüsseln. Dies wäre z. B. mit einer 6S RNA/Hfq Doppelmutante möglich, um phänotypische Veränderungen zu identifizieren und diese in Verbindung mit dem Regulationsnetzwerks zu bringen. Die Bindung zwischen Hfq und der 6S RNA wurde in dieser Arbeit zwar charakterisiert, aber die Bindungsaffinitäten sowie die Reihenfolge der Besetzung der unterschiedlichen Bindestellen durch Hfq konnten noch nicht Aufgeklärt werden. Hier könnten die entstandenen Komplexe aus dem Retardierungsgel ausgeschnitten und weiter analysiert werden, wie z. B. durch cross-link Versuche oder durch Footprint Analysen.

Das Effektormolekül für die Stringente Kontrolle ppGpp spielt in dem 6S RNA Regulationsnetzwerk eine bedeutende Rolle. So konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die ppGpp-Konzentration in Abwesenheit von Hfq erniedrigt ist. Durch welchen regulatorischen Mechanismus der erniedrigte basale ppGpp-Level bedingt wird, ist noch nicht bekannt. Sowohl eine veränderte Aktivität von SpoT als auch der GMP-Synthetase könnte möglich sein. Um weitere Verbindungen zwischen dem Effektormolekül ppGpp, der 6S RNA und dem RNA-Chaperon Hfq zu identifizieren, könnten exakte Nukleotid Quantifizierungen durch Dünnschichtchromatographie in An- und Abwesenheit von SpoT und der GMP-Synthestase durchgeführt werden. Aufschluss könnten auch Mikroarray Analysen unter diesen Bedingungen liefern. Diese könnten zudem in Gegenwart und Abwesenheit von 6S RNA analysiert werden.

Im letzten Teil dieser Arbeit bei der Suche nach möglichen Interaktionspartner der 6S RNA konnten TnaA und BetB erstmalig identifiziert werden. Die beiden Proteine müssten Aufgereinigt und die Spezifität der Bindung durch Retardierungsanalysen bestätigt werden, anschließend könnte eine mögliche regulatorische Funktion der Interaktion dieser Proteine mit der 6S RNA näher charakterisiert werden. Ein weiteres identifiziertes 6S RNA bindendes Protein ist die Phosphoglycerat Kinase (PGK). Bei PGK konnten durch Retardierungsanalysen und Footprint Analysen die Bindung und die Sequenzbereiche auf der 6S RNA kartiert werden. Die

PGK-Enzymtests zeigten eine gering veränderte Enzymaktivität in Anwesenheit von 6S RNA. Eine eventuell regulatorische Wirkung durch die Bindung von PGK an die 6S RNA ist noch weitestgehend unverstanden und hier müssten neben *in vivo* Untersuchungen mit entsprechenden Mutanten noch weitere Enzymtests unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt werden.

Bei den LC-MS Analysen der *in vitro pull down* Versuche konnten auch eine Reihe von ribosomalen Proteinen (S6, S15, S20, L18, L3, L1, L7/L12 und L21) als potentiell 6S RNAbindend nachgewiesen werden. Im weiteren Verlauf konnte jedoch eine Bindung von 6S RNA an komplette 70S Ribosomen nicht bestätigt werden. Eine mögliche Bindung der isolierten einzelnen ribosomalen Proteine zu der 6S RNA durch Retardierungsanalysen müssten allerdings noch kontrolliert werden. Diese Möglichkeit kann nicht ausgeschlossen werden, da für einzelne ribosomale Proteine auch andere Funktionen in der Zelle gezeigt werden konnten und sie meist eine hohe Bindeaffinität zu RNAs besitzen.

4. Material

4.1 Allgemeines

Alle Chemikalien die für diese Dissertation verwendet wurden, besitzen den Reinheitsgrad *pro Analysis,* wenn nicht anders vermerkt wurde. Das *Aqua dest.* zum Ansetzen von Lösungen und Puffern ist hochreines Milli-Q-Wasser (Hausanlage mit nachgeschaltetem water purification system EPA Est. 41237-MA-1 Millipore GmbH, Neu Isenburg) und wurde ausschließlich verwendet.

4.2 Bakterienstämme und Vektoren

4.2.1 Escherichia coli Stämme

Tabelle 4.1: Verwendete Bakterienstämme aus Escherichia coliDie Tabelle zeigt diejeweiligen Genotypen und Referenzen der Stämme die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Stamm	Genotyp	Referenz
BL21(DE3)	(F ⁻ , r ⁻ B m ⁻ B), <i>rif</i> S, α-lysogen mit	
	T7 Gen1 (Polymerase) durch Met-	(Wood, 1966)
	Transduktion des Stammes B834	
BL21(DE3)/pEH10	Überexpressionsstamm für Hfq	Freundliche Gabe von Udo
	Aufreinigung	Bläsi, Wien
BL21(DE3)/pET-	Überexpressionsstamm für PGK	In dieser Arbeit hergestellt
52b(+)PGK	Aufreinigung	
BW 25113 (WT)	Δ (araD-araB) 567, Δ lacZ4787	
	(::rrnB-3), α lambda ⁻ rph-1, Δ (rhaD-	(Datsenko and Wanner 2000)
	rhaB)568, hsdR514 Parent strain for	
	Keio Collection	

JW 4130 Hfq-	BW 25113 Derivat Δhfq -722 ::kan	
	aus der Keio collection for single	(Baba et al., 2006)
	knockauts	
KS1	E. coli K12 Derivat mit ssrS-	Diplomarbeit Kalpana
	Deletion, isogen zu MG1655 (WT)	Shamnugarajah
MG1655	E. coli K12 Wildtyp	(Blattner et al., 1997)
MRE 600	RNase 1 ⁻	(Cammack and Wade 1965)
BL21(DE3)/pET100-	Überexpressionsstamm für PGK	(Wood, 1966)
His6-TEV-PGK	Aufreinigung	In dieser Arbeit hergestellt

4.2.2 Plasmide

pUC18-T7-6S	pUC18-T7 Derivat, trägt das <i>ssrS</i> -Gen unter der Kontrolle des T7 Φ 10 Promoters (Gildehaus 2001).
pCAT-6S-P1	Derivat von pKK232-8 bei dem der <i>ssrS</i> P1 Promoter vor das <i>cat</i> -Gen geschaltet wurde (Neußer 2008).
pCAT-6S-P2	Derivat von pKK232-8 bei dem der <i>ssrS</i> P2 Promoter vor das <i>cat</i> -Gen geschaltet wurde (Neußer 2008).
pUC18	pBR322/M13mp18-Derivat mit <i>"multi cloning site"</i> (MCS) Polylinker (Yanisch-Peron <i>et al.</i> , 1985).
pET-52b(+)	Novagen Vector mit T7 Promoter, Strep-Tag, His-Tag, T7 Terminator, MCS und einer Ampicillin Resistenz. Vektor für die Protein- überexpression (Novagen, Germany).
pET-52b(+)PGK	Novagen Vektor, wo zwischen die BamHI und EcoICR I Schnittstelle das PGK Gen als PCR-Produkt ligiert wurde (Diese Arbeit).

- pET-100-His6-TEV-Cas-1 Der Vektor trägt den T7 Promotor, ein His-Tag mit vorgeschalteter TEV-Site und dem Cas1 Gen. Dient zur Überexpression von Proteinen mit His-Tag.
- pET-100-His6-TEV-PGK Derivat vom pET-100-His6-TEV mit dem PGK Gen. Dient zur Proteinüberexpression des PGK Gens mit His-Tag.
- pKD3 Template-Plasmid zum Amplifizieren der FRT-flankierten cat-Kassette, *pir* abhängiges *ori*R*y*, Amp^r, Cm^r (Datsenko and Wanner 2000).
- pKD46 Hilfsplasmid mit λ -Red Rekombinationssystem, temperatursensitives R101-*ori* (bei 30 °C), Promotor Arabinoseinduzierbar, (P_{araB}- γ - β -exo), Amp^r (Datsenko and Wanner 2000).
- pCP20 Hilfsplasmid mit FLP-Rekombinase, Promotor temperaturinduzierbar, temperatursensitives *ori*, Amp^r, Cm^r (Datsenko and Wanner 2000).

4.3 Nukleinsäuren und Nukleotide

4.3.1 RNA- und DNA-Fragmente

PGK-FragmentDurch PCR gewonnen aus genomischer DNA mittels PCR und zwei
passenden Primern6S RNADurch *in vitro* Transkription (RiboMAX) gewonnenPolyuridylic acidSigma, St. Louis, USAtRNASigma, St. Louis, USA

4.3.2 Oligonukleotide

Alle designten Primer wurden bei der Firmer Thermo Scientific gekauft.

# ADN1	5' – GTC CCC TGA GCC GAT A -3'
	Hybridisiert gegen die pRNA und wurde zur Hybridisierung von Northern
	Blot Analysen verwendet.
# 6S-Oligo-1	5' – GTG GTA TGA AAT ATG GGC – 3'
	Bindet an die Nukleotidpositionen 56 bis 38 der reifen 6S RNA und ergibt
	ein cDNA-Produkt der Längen 54, 55 und 56 Basen je nach Prozessierung
	der reifen 6S RNA.
# c6S-Oligo	5'-TTG CGA ACA TCT CAG AGA-3'
	Bindet an die Nukleotidpositionen 4 bis 21 der reifen 6S RNA.
# art Oliga	
# cat-Oligo	5 - CCT ACT CAA GCT TGG CTG - 5
	Rompiemental von +15 bis +50 zum (+)-strang (<i>upstream</i> der
	Ar Position +24 bis ± 41 relativ zum ssrS P1 Start im Plasmid nCAT 6S
	P1.
# RNAI-Oligo	5' – TCA GCA GAG CGC AGA TAC CA – 3'
	Bindet an die RNAI von Position +28 bis +9 und ergibt ein cDNA-Produkt
	von 28 Nukleotiden in der Primer Extension Reaktion.
# Oligo6S-4-sa	5' – CCT GGA ATC TCC GAG ATG CCG C – 3'
	Bindet an die Nukleotidpositionen der 6S RNA von 89 bis 68 und ergibt
	ein cDNA-Produkt von der Länge ca. 89 Basen je nach Prozessierung der
	6S RNA.
# 6S-OligoB-sa	5' – GCA TGC TCA CCA ACC GCG GGA GC – 3'
	bindet an die Nukleotidposition der 6S RNA von 184 bis 165 und wird für
	die Primer Extension Verlängerung verwendet.

de novo RNA	5' - AUG GGC UCA GGG GAC UGG CC – 3'
	Ist das Syntheseprodukt der 6S RNA und beginnt an Position U44.
PGK Tev Site	5' – <u>CTTTATTTTCAGGGC</u> ATGTCTGTAATTAAGATGACC – 3' Bindet am 5'-Ende des PGK-Gens und hat 15 nt langes überhängende Enden (unterstrichen) die für die anschließende Klonierung (5.?.?) essentiell sind.
PGK Rev+15Nt	5' - GTT GAG CTC GCC CTT TTA CTT CTT AGC GCG C - 3' Bindet am 3'-Ende des PGK Gens und hat 15 nt überhängende Enden (unterstrichen) die für die anschließende Klonierung (5.?.?) essentiell sind.
pET 100 reverse	5' – AAG GGC GAG CTC AAC GAT – 3'
pET 100 TEV site	5' – GCCCTGAAAATAAAGATTCTCAT – 3'
	Dienen zur Amplifikation mittels PCR des pET100-His6-TEV Vektors.
	Erwartet wird ein PCR-Produkt von 5707 bp.
pET100-T7-rv	5' – TAG TTA TTG CTC AGC GGT GG – 3'
	Testprimer dienen zum Nachweiß des PGK Gens für die Sequenzierung.
T7II-fw	5' – TAA TAC GAC TCA CTA TAG G – 3'
	Testprimer dienen zum Nachweiß des PGK Gens für die Sequenzierung.
delta PGK P2	5' – GAAACAAGGGCAGGTTTCCCTGCCCTGTGATTTT
	CATATGAATATCCTCCTTAG-3'
delta PGK P1	5' - CTGCAAAACTTTTAGAATCAACGAGAGGATTCACC
	<u>GTGTAGGCTGGAGCTCTTC</u> -3'
	Oligonukleotidpaar für die Amplifikation der cat-Resistenzgenkassette
	durch PCR (5.2.9.2). Die P1 und P2 Sequenzen sind unterstrichen, H1 und
	H2 sind die flankierenden Sequenzen für das pgk-Gen, unter Verwendung
	von pKD3 als template-Plasmid ergeben sich PCR-Fragmente (cat-
	Kassette) von 1094 bp nach Datsenko and Wanner 2000.
PGK Screen H1 5'- TTATGTAAGCTCCTGGGGGATT – 3'
PGK Screen H2 5'- CGTTAGCTATGGCTACTGTT – 3'
H1 bindet 104 Nukleotide *upstream* und H2 bindet 61 Nukleotide
downstream des *pgk*-Gens, diese ergeben 1329 bp vor und 804 bp nach
Genaustausch, bei Deletion des Gens entsteht ein PCR-Produkt von 165 bp.

4.3.3 Verschiedene Nukleinsäuren

Kb-Leiter	Invitrogen, Kalifornien, USA
1000 bp DNA Leiter	New England Biolabs, USA
RiboRuler TM High Range RNA Ladder	Fermentas/Thermo Scientific
RiboRuler TM Low Range RNA Ladder	Fermentas/Thermo Scientific
Peq Gold Protein Marker	peqLab Biotechnologie GmbH

4.3.4 Nukleotide

Adenosin-5´-triphosphat	Roche, Mannheim
Adenosin-5- $[\gamma^{-32}P]$ -triphosphat	Hartmann, Braunschweig
Cytidin-5'-triphosphat	Roche, Mannheim
[5'- ³² P]pCp (cytidine-3',5'-bis-phosphate)	Hartman, Braunschweig
Guanosin-5'-triphosphat	Roche, Mannheim
Uridin-5'-triphosphat	Roche, Mannheim
2'-Desoxyadenosin-5-triphosphat	Roche, Mannheim
2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat	Roche, Mannheim
2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat	Roche, Mannheim
2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat	Roche, Mannheim
[P ³²] -ortho-Phosphorsäure	Hartmann, Braunschweig

4.4 Enzyme und sonstige Proteine

4.4.1 Enzyme und Proteine

AMV Reverse Transkriptase DNaseI, RNase-free Lysozymchlorid Proteinkinase K Rinderserumalbumin (BSA) RNA Polymerase (Holoenzym)

Phusion High-Fidelity DNA Polymerase RNase Inhibitor RNasin Hfq Ribosomen (70S) Streptavidin Trypsin T4 RNA Ligase T7 –RNA-Polymerase Polynukleotidkinase Pyrophosphatase InFusion Polymerase Promega, Madison USA Roche, Mannheim Sigma, St. Louis, USA Sigma, St. Louis, USA New England Biolabs, USA nach Burgess and Jendrisak 1975, verändert nach Gonzales et al. 1977, charakterisiert nach Chamberlin et al. 1979; Freundliche Gabe von R. Wurm New England Biolabs, USA ThermoScientific, Rockford USA MBI Fermentas, St. Leon-Rot in dieser Arbeit in dieser Arbeit Sigma, St. Louis, USA Boehringer, Mannheim ThermoScientific, Rockford USA Promega, Madison, USA New England Biolabs, USA Sigma, St. Louis, USA New England Biolabs, USA

4.4.2 Restriktionsendonukleasen

BamHI	New England Biolabs, USA
EcoICR I	Fermentas/Thermo Scientific

HincII StuI HindIII Thermo Scientific, Rockford USA New England Biolabs, USA New England Biolabs, USA

4.5 Allgemeine Puffer und Medien

30% Acrylamid/Bis- acrylamidlösung (30:1)	290 g/l Acrylamid 10 g/l Bisacrylamid ad 1 l mit <i>Aqua dest</i> . mit Amberlite über Nacht deionisiert und filtriert
40% Acrylamid/Bis-	380 g/l Acrylamid
acrylamidlösung (19/1)	20 g/l Bisacrylamid
	ad 1 l mit Aqua dest.
	mit Amberlite deionisiert und filtriert
40% Acrylamid/Bis-	391,5 g/l Acrylamid
acrylamidlösung (46/1)	8,5 g/l Bisacrylamid
	ad 1 l mit Aqua dest. mit
	Amberlite deionisiert und filtriert
Formamid-Probenpuffer	0,1% (w/v) Bromphenolblau
-	0,1% (w/v) Xylencyanol
	95% (v/v) deionisiertes Formamid
	25 mM EDTA, pH 8.0
TE-Puffer	10 mM Tris/HCL, pH 8.0
	1mM EDTA
10x TBE-Puffer	900 mM Tris-Borat, pH 8.3
	2,5 mM EDTA, pH 8.0

2x TBE-Probenpuffer	in 2x TBE 30 % (v/v) Glycerin 0,025 % (w/v) Bromphenolblau 0,025 % (w/v) Xylencyanol
50x TAE-Puffer	2 M Tris-Acetat, pH 7,5 50 mM EDTA, pH 8,0
5x TAE-Probenpuffer	in 5x TAE-Puffer 0,025% (w/v) Bromphenolblau 0,025% (w/v) Xylencyanol 30% Glycerin
10x TMK-Puffer	250 mM Tris/HCL pH 7,5 60 mM KCL 20 mM MgCl ₂
5x TMK-Probenpuffer	in 5x TMK-Puffer 0,025% (w/v) Bromphenolblau 0,025% (w/v) Xylencyanol 30% Glycerin
4x SDS-Probenpuffer	0,5 M Tris-HCl, pH 6.8 8% SDS 80% Glycerin 0,04% (w/v) Bromphenolblau
5x SDS-Laufpuffer	150 g Tris 720 g Glycin 25 g SDS ad 5 l mit <i>Aqua dest</i> .

10x KGlu 80 Puffer	0,5 M Tris-Acetat, pH 8,0
	0,1 M Mg-Acetat
	0,8 M Kaliumglutamat
	10 mM Dithiothreitol (DTT)
	1 mM EDTA, pH 8.0
	10 µg/ml acetyliertes BSA
1x PBS-Puffer	0,8 g NaCl
	0,02g KCl
	0,01 ml 1 M Na ₂ HPO ₄
	in 100 ml Aqua dest., pH 7,4 mit HCL
YT-Medium	8 g/l Trypton
	5 g/l Hefeextrakt
	5 g/l NaCl
	in Aqua dest., pH 7.4 mit NaOH
SOB-Medium:	20 g/l Trypton
	5 g/l Hefe-Extrakt
	0,5 g/l NaCl
	1,25 ml 2M KCl
	in Aqua dest., pH 7,0 einstellen nach dem
	Autoklavieren 10 ml 1M MgCl ₂
	hinzufügen
SOC-Medium:	SOB-Medium mit 19,8 ml 20 % Glukose
	hinzufügen

4.6 Feinchemikalien

Acrylamid Agar Agarose Agarose, ,ultra pure' SeaKem Amberlite MB-1 (Ionentauscher) Ameisensäure Ammoniumchlorid (NH₄Cl) Ammoniumperoxodisulfat (APS) Ampicillin Borsäure Bradford-Reagenz Bromphenolblau Calciumchlorid Chloramphenicol Chloroform Coomassie Brillant Blue R250 di-Natriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄) Diethyl-Pyrocarbonat (DEPC) Dithiothreitol (DTT) Essigsäure Ethidiumbromid (EtBr) Ethylendiamintetraacetat (EDTA) $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$ Formaldehyd Formamid Glycerin Glycin Harnstoff Hefe-Extrakt Heparin HEPES H_2O_2

Serva, Heidelberg Difco, Detroit USA Sigma, St. Louis, USA Cambrex Bio Science, USA Roth, Karlsruhe Riedel-de Häen, Seelze VWR, Prolabo Merck, Darmstadt Sigma, St. Louis USA Grüssing, Filsum Roth, Karlsruhe Merck, Darmstadt Acros Organics, Geel, Belgien Boehringer, Mannheim Roth, Karlsruhe Serva, Heidelberg VWR, Prolabo Alfa Aesar Novagen, Merck Chemicals Roth, Karlsruhe Roth, Karlsruhe Merek, Darmstadt Fluka Chemika, Schweiz Grüssing GmbH, Filsum Roth, Karlsruhe Roth, Karlsruhe Roth, Karlsruhe Roth, Karlsruhe Difco Laboraties, USA Sigma, St. Louis, USA Roth, Karlsruhe AppliChem

Roche, Mannheim Isopropyl-*B*-thiogalactosid (IPTG) Kaliumglutamat Aldrich Chemie GmbH Steinheim Leupeptin Calbiochem, Nottingham, UK Magnesiumchlorid Merck, Darmstadt Magnesiumsulfat Chimica, Geel Belgien β-Mercaptoethanol Roth, Karlsruhe Natriumacetat Riedel-de-Haan, Seelze Natriumascortat ICN Biomedicals Inc., USA Natriumchlorid VWR International, Leuven Natriumdodecylsulfat (SDS) Serva, Heidelberg Natriumhydroxid (NaOH) Merck, Darmstadt Pepstatin A Calbiochem, Nottingham, UK Phenol Roth, Karlsruhe Phenylmethylsulfonylflourif (PMSF) Serva, Heidelberg N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin (TEMED) Merck, Darmstadt Saccharose Merck, Darmstadt Salzsäure (HCl) Roth, Karlsruhe Silbernitrat Roch, Karlsruhe Thiourea Sigma, St. Louis, USA Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan (Tris) Difco, Detroit, USA Trypton Difco, Detroit, USA Xylencyanol Serva, Heidelberg

4.7 Verschiedenes

Amberlite Mischbettionentauscher	Roth, Karlsruhe
Chromatographiepapier 3MM	Whatman, England
Dialysemembran, V 0,025 μ m, Ø 2,5 cm	Milipore, Schwalbach
Expositionskassetten	Siemens
E1000 Entwickler	Christiansen GmbH, München
F1000 Fixierer	Christiansen GmbH, München

MN Faltenfilter Gel-Fix® for PAG Glaswolle, silanisiert Pierce[®] RNA-3' End Biotinylation Kit Röntgenfilm Sterilfilter Chromafil CA-20/25 S µMacsTM Streptavidin Kit Mascherey-Nagel, Düren Serva, Heidelberg ICN Biochemicals, USA Thermo Scientific, USA Fuji Photo Film, Japan Schleicher und Schuell, Dassel Miltenyi Biotec GmbH

5. Methoden

5.1. Mikrobiologische Methoden

Bei dem Arbeiten im Labor mit Bakterienstämmen wurde unter sterilen Bedingungen oder am Bunsenbrenner gearbeitet. Die Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen GvO's (S1) wurden nach den Vorschriften des Gentechnikgesetzes eingehalten und anfallender mikrobiologischer Abfall wurde vor der Entsorgung autoklaviert.

5.1.1 Sterilisation von Glasgeräten und Lösungen

Lösungen, Puffer und Medien die Temperaturstabil sind, wurden durch Dampfdrucksterilisation (50 min., 120 °C, 2-3 Bar) autoklaviert. Temperatursensitive Lösungen wurden mit Hilfe von Filtern verschiedener Porengröße (Schleicher und Schuell) steril filtriert. Glaspipetten und Zentrifugen Röhrchen wurden für 4 h bei 210 °C hitzesterilisiert.

5.1.2 Anzucht auf Agarplatten oder Flüssigkulturen

Die Anzucht von Bakterienstämmen erfolgte aus einem Sicherheitsstock der bei -70 °C gelagert wurde. Mit einer sterilen Impföse wurden die Stämme auf YT-Platten (4.5) ausgestrichen, die gegebenenfalls mit einem selektiven Antibiotikum versehen waren. Die YT-Platten wurden bei 37 °C gelagert bis Einzelkolonien zu sehen waren. Eine kurzfristige Lagerung bei 4 °C war möglich, um Einzelkolonien auf eine neue Platte (Masterplatte) oder in Flüssigkulturen zu übernehmen.

Um Flüssigkulturen anzuziehen, wurde eine einzelne Kolonie von einer YT-Platte mit einem sterilen Zahnstocher in ein 3 ml Flüssigmedium gegeben. Die Kultur wurde gegebenenfalls mit einem selektiven Antibiotikum versehen. Aus der üN-Kultur wurden dann im Verhältnis 1:100 sterile Medien angeimpft und in einem Rundschüttler (New Brunswick Scientific Gio Gyrotory) bei 37 °C inkubiert.

5.1.3 Anzucht von üN-Kulturen

Um üN-Kulturen anzuziehen, wurde abends eine Kolonie einer auf Agarplatten angezogener Stamm in 3 bzw. 25 ml YT-Medium (4.5) mit einem sterilen Zahnstocher überführt. Die Anzucht erfolgte bei 37 °C in einem Rundschüttler (New Brunswick Scientific Gio Gyrotory, ca. 200 rpm). Je nach weiterer Vorgehensweise wurde noch ein selektives Antibiotikum dazu gegeben.

5.1.4 Haltung und Sicherung von Zellstämmen

Zur langfristigen Aufbewahrung und Wiederverwendung von Bakterienstämmen wurden 800 µl einer stationär gewachsenen Übernachtkultur mit 200 µl 100 % (v/v) Glycerin versetzt. Diese wurden für 30 Minuten auf einem Horizontalschüttler (Gerhardt, LS 10) bei Raumtemperatur geschüttelt und anschließend mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

5.1.5 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen für die Transformation durch Hitzeschock

Es wurden aus einer üN-Kultur im Verhältnis 1/100 100 ml YT-Medium angeimpft und bis zu einer Optischen Dichte von 0,6 angezogen. Jeweils 50 ml der Kultur wurden in sterile Felkons überführt und 5 min. bei 4500 rpm (4 °C; Heraeus Megafuge 1.0R) zentrifugiert. Das Zellpellet wurde vorsichtig in 20 ml eiskalter 0,1 M CaCl₂ Lösung resuspendiert und eine Stunde auf Eis inkubiert. Anschließend folgte eine weitere Zentrifugation bei 4500 rpm; 5 min. (4 °C; Heraeus Megafuge 1.0R) und das Pellet wurde erneut vorsichtig in 2 ml eiskalter 85 mM CaCl₂ Lösung mit 15% Glycerin gelöst. Es wurden 200 µl Aliquotes hergestellt und in N₂ schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -70 °C.

5.1.6 Transformation kompetenter Zellen durch Hitzeschock

Die Transformation erfolgte nach einer Methode von Hanahan (Hanahan 1985). Bei jedem Transformationsexperiment wurden 200 μ l kompetente Zellen langsam auf Eis aufgetaut und mit 20 ng Plasmid-DNA versetzt. Nach einer einstündigen Inkubation auf Eis folgte ein dreiminütiger Hitzeschock bei 42 °C. Anschließend wurde das Aliquot mit 800 μ l vorgewärmtem YT-Medium (4.5) versetzt und bei 37 °C schüttelnd inkubiert. 100 – 200 μ l der Kultur wurden auf selektiv ausgewählte und vorgewärmte YT-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Transformationsrate konnte durch Auszählen der Kolonien und unter Berücksichtigung der eingesetzten Menge an DNA ermittelt werden.

5.1.7 Bestimmung von Zelldichte in Flüssigkeiten

Um die Zelldichte einer Flüssigkeit zu bestimmen, wurde im Spektralphotometer (Beckman, Typ DU 64) bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600} , Streumessung) die Optische Dichte gemessen. Die Kalibrierung erfolgte mit dem jeweiligen Medium in welchem die Bakterien wuchsen. Um eine Messung im linearen Bereich zu gewährleisten wurde die Kultur mit sterilem Medium so verdünnt, dass die Messwerte zwischen 0,1 und 1 OD_{600} lagen.

5.1.8 Erstellung von Wachstumskurven und Berechnung von Wachstumsraten

Zur Erstellung einer Wachstumskurve wurden nach Animpfen des gewünschten Stamms in einer 100 ml Flüssigkultur alle 20 bis 30 min. das Wachstum mittels Streumessung (5.1.7) dokumentiert. Bei einer Wellenlänge von 600 nm wurde die Wachstumsrate μ (Verdopplung pro h) aus der Geradengleichung der linearisierten Steigung errechnet. Die Werte wurden dann logarithmisch gegen die Zeit aufgetragen.

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

 $M_1 = OD_{600}$ zu Beginn des exponentiellen Wachstums $M_2 = OD_{600}$ zum Ende des exponentiellen Wachstums $t_1 = Zeitpunkt$ zu M_1 $t_2 = Zeitpunkt$ zu M_2

5.2 Allgemeine molekularbiologische Arbeiten

5.2.1 Isolation von Nukleinsäuren

5.2.1.1 Plasmidisolation nach dem Quiagen Plasmid Mini Kit

Die Plasmidisolation wurde nach Anleitung des Hersteller (Quiagen) durchgeführt.

5.2.1.2 Plasmidisolation nach dem Quiagen Plasmid Midi Kit

Die Plasmidisolation wurde nach Anleitung des Herstellers (Quiagen) durchgeführt.

5. Methoden

5.2.1.3 Plasmidisolation im präparativen Maßstab

Die präparative Isolation von Plasmid-DNA erfolgte nach der von Hillen & Wells (1981) beschriebenen Methode. Mit einer 8 ml üT-Kultur wurden 800 ml YT-Medium (4.5) mit dem entsprechenden Antibiotikum angeimpft und üN schüttelnd (New Brunswick Scientific, Model G25) bei 37 °C inkubiert. Die Zellkultur wurde pelletiert (8.000 rpm, 10 min, 4 °C; Beckman Coulter, Rotor SX4750A) und der Überstand verworfen. Das Pellet in 16 ml Saccharose-Lösung resuspendiert und in Ti55.2-Polycarbonatröhrchen überführt. Es wurden noch jeweils 6 ml EDTA (0,5 M, pH 8.0) und frisch angesetzte Lysozymlösung zugegeben und 15 – 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend noch 4 ml Brij-Doc-Lösung zugegeben und wieder 10 min auf Eis inkubiert. Die Lösung wurde 45 Minuten bei 44.000 rpm und 4 °C zentrifugiert (Beckman L8-55 Ultrazentrifuge, Rotor Ti55.2). Der klare Überstand wurde mit 5 µl RNase A (10 mg/ml) pro ml bei 37 °C für 15 min inkubiert. Pro ml Überstand wurden anschließend 2,5 µl Proteinkinase K (20 mg/ml) hinzu gegeben und weitere 15 min inkubiert. Die Lösung wurde in Zentrifugenröhrchen überführt und mit 1/2 Volumen PEG-Lösung für 30 min auf Eis gefällt. Durch die folgende Zentrifugation (4.000 rpm, 45 min, 4 °C; Beckman Zentrifuge J2 21, JS-7.5 Ausschwingrotor) wurde die Plasmid-DNA pelletiert, das Pellet kurz an der Luft getrocknet und in 3 ml TE-Puffer (4.5) aufgenommen.

Saccharose-Lösung:	25% (w/v) Saccharose 50 mM Tris-HCl, pH 8,0
Lysozym-Lösung:	20 mg/ml Lysozymchlorid 50 mM Tris-HCl, pH 8,0
Brij-Doc-Lösung:	2 Volumen 10% (w/v) Brij 35 1 Volumen 10% (w/v)Na-Deoxycholat in <i>Aqua dest</i> . pH 8,0
RNase A:	20 mg/ml in 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 (nach Maniatis <i>et al.</i> , 1982) von DNase-Aktivität befreit
Proteinkinase K:	20 mg/ml in Aqua dest.
PEG-Lösung:	30% (w/v) PEG6000 in 1,5 M NaCl

5.2.1.4 Isolation von Gesamt-RNA

Die Isolation von Gesamt-RNA aus E. coli. wurde in Anlehnung an eine von Liebig beschriebene Methode (Liebig and Wagner 1995) durchgeführt. Dabei wurden 6 ml in der stationären Phase und 10 ml in der logarithmischen Phase einer Flüssigkultur in einem Greinerröhrchen überführt und zentrifugiert (6.000 rpm, 10 min, 4 °C; Heraeus Megafuge 1.0R). Die pelletierten Zellen wurden mit 0,5 ml Puffer I resuspendiert und in ein Eppendorfgefäß überführt und schnell mit 0,5 ml 60 °C heißem Phenol (20 mM Natriumacetat pH 5,3 gesättigt) versetzt und gevortext. Das Zellgemisch wurde bei 60 °C für 5 min inkubiert und anschließend zur erleichterten Phasentrennung zentrifugiert (13.000 rpm, 10 min; Hettich Zentrifuge Mikro 200R). Die wässrige Phase wurde abgenommen und mit Chloroform gesättigtem Phenol gereinigt bis keine Interphase mehr vorhanden war. Es folgte eine Extraktion mit Chloroform und ein erneuter Zentrifugationsschritt. Für den DNase Dau wurde die wässrige Phase mit 40 µl 0,1 M MgCl₂, 13 µl 3M NaOAc pH 5,3 und 2,5 µl DNase I (10 Units/µl) für zwei Stunden bei RT inkubiert. Es folgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion (5.2.2.1). Die Fällung der RNA erfolgte mit 3 Volumen eiskaltem absolut Ethanol für 30 - 60 min. bei -20 °C. Die anschließende Zentrifugation pelletiert die Gesamt-RNA (13.000 rpm, 30 min; Hettich Zentrifuge Mikro 200R). Das Pellet wurde 2 x mit 80 % Ethanol gewaschen und an der Luft getrocknet. Die RNA wurde in 40 – 50 µl TE-Puffer (4.5) gelöst und für 15 – 20 min. bei 37 °C geschüttelt (HLC HTM130).

Puffer I:

20 mM NaOAc, pH 5,3 1 mM EDTA, pH 8,0 0,5% (w/v) SDS

5.2.1.5 Präparation von chromosomaler DNA aus E. coli Zellen

Die Präparation von chromosomaler DNA erfolgte nach der von Liebig beschriebenen Methode (Liebig, 1996). Es wurde zuerst aus einer üN-Kultur 25 ml YT-Medium (4.5) angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ 0,8 – 0,9 herangezogen. Bei erreichen der gewünschten OD wurden 2 ml Kultur für 3min. bei 13.000 rpm (Hettich Zentrifuge Mikro 200R) pelletiert. Das Pellet wurde in 200 μ l Lösung I mit 22 μ l Proteinkinase K (20 mg/ml) aufgenommen und bei RT 10 min. inkubiert. Zu der Zelllösung wurde weiteren 200 μ l Lösung II hinzugegeben und wieder bei RT 10 min. inkubiert. Nach der Inkubation wurde Die Zelllösung viermal mit Phenol/Chloroform (5.2.2.1) aufgereinigt und einer Ethanolfällung (5.2.2.2) unterzogen. Das Pellet wurde in 50 μ l TE-Puffer gelöst und mit RNase (200 μ g/ μ l) 1h bei 37 °C inkubiert. Es folgte eine weitere

Phenol/Chloroform Extraktion (5.2.2.1) und Ethanolfällung (5.2.2.2). Das entstandene chromosomale DNA-Pellet wurde in 30 µl TE-Puffer gelöst.

Lösung I: 50 mM Glukose 25 mM Tris-HCL pH 8.0 10 mM EDTA

Lösung II: 1 % SDS

5.2.2 Reinigung und Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

5.2.2.1 Phenol/Chloroform Extraktion

Um Proteine aus einer wässrigen Nukleinsäurelösung zu entfernen, wurde eine Phenol/Chloroform-Extraktion durchgeführt. Bei dieser Methode wurde die Nukleinsäurelösung mit einem Volumen Phenol/Chloroform (1:1) versetzt und gründlich eine Minute gevortext. Zur besseren Phasentrennung wurden die Lösungen 10 min. zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die organische, untere Phase sowie die Interphase wurden verworfen. Dieser Schritt wurde so oft wiederholt bis keine Interphase mehr vorhanden war. Um anschließend die Phenolreste aus der wässrigen Phase zu entfernen, wurde eine Extraktion mit einem Volumen Chloroform durchgeführt, für eine Minute gevortext und erneut für 10 min. zentrifugiert. Der dann protein- und phenolfreie Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zur Aufkonzentrierung Ethanolgefällt (5.2.2.2).

5.2.2.2 Ethanolfällung von Nukleinsäuren

Bei der Fällung von Nukleinsäuren wurde die nukleinsäurehaltige Lösung mit 1/10 Volumen 3M Natriumacetat (pH 5,5) zur Fällungshilfe versetzt. Zusätzlich wurde die Lösung mit 2-3 Volumen absolut Ethanol (-20 °C) supplementiert und durch mehrmaliges Invertieren gut gemischt. Die so gefällten Nukleinsäuren wurden für 30 – 45 min. oder auch über Nacht bei -20 °C inkubiert und anschließend zentrifugiert. Dabei wurden kleinere Volumina 30 min. bei 13.000 rpm und 4 °C (Hettich Zentrifuge Mikro 200R) und große Volumina bei 6.000 rpm und 4 °C (Heraeus Megafuge 1.0R) pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit 80 % Ethanol erneut für

10 min. zentrifugiert um die restlichen Salze von den Nukleinsäuren zu entfernen. Das Pellet wurde an der Luft getrocknet oder im Vakuumkonzentrator (Heto VR-1 Speedvac Concentrator) lyophylisiert. Die Nukleinsäure-Pellets wurden in *Aqua dest*. oder TE-Puffer (4.5) aufgenommen und gelöst.

5.2.2.3 Dialyse von Nukleinsäuren

Um störende Salze in Nukleinsäureproben zu entfernen, die bei späteren Experimenten die Probe verunreinigen oder stören könnten wurde mit Hilfe der Mikrotropfendialyse die Probe entsalzt. Diese Methode eignete sich für Nukleinsäure-Lösungen die kleiner waren als 100 μ l. In eine sterile Petrischale wurden ca. 30 – 40 ml TE-Puffer (4.5) gefüllt und ein VS Millipore Membranfilter (Durchmesser 2,5 cm, Porengröße 0,025 μ m) mit der glänzenden Seite nach oben auf die Oberfläche des Puffers gelegt. Dabei musste darauf geachtet werden, dass keine Flüssigkeit auf den Filter gelangte. Anschließend wurde die Nukleinsäure-Probe auf die Membran gegeben und für 2 Stunden bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Probe vorsichtig von der Membran abgenommen und mit etwa 10 μ l TE-Puffer (4.5) nach gespült, damit verbliebene Nukleinsäure-Reste aufgenommen werden konnten.

5.2.2.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Um die Konzentration von Nukleinsäuren zu bestimmen wurde ein UV/VIS-Spektralphotometer der Firma Beckman (Typ DU 64) verwendet. Durch eine Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 260 nm. Zuvor wurde das Spektralphotometer mit *Aqua dest*. kalibriert und dann unter der Berücksichtigung des linearen Bereiches (OD260 = 0,1 - 0,9) die Nukleinsäure-Probe gemessen. Diese musste meist zuvor mit *Aqua dest*. verdünnt werden. Die Konzentration der Probe berechnet sich aus dem Verdünnungsfaktor sowie der Absorption bei 260 nm und der folgenden vereinfachten Annahme:

> $1A_{260} = 50 \ \mu g/ml$ doppelsträngige Nukleinsäure (dsDNA) $1A_{260} = 37 \ \mu g/ml$ einzelsträngige Nukleinsäure (RNA, ssDNA und Desoxyoligonukleotide)

Der Reinheitsgrad der Probe konnte zusätzlich mit einem UV-Spektrum von 220 bis 320 nm überprüft werden. An Hand des Quotienten A_{260}/A_{280} konnte die Reinheit der Nukleinsäure-Probe abgeschätzt werden. Bei einer reinen Probe sollte der Wert zwischen 1,8 und 2 liegen, war dem nicht der Fall, war die Probe durch Proteine oder Phenolreste verunreinigt.

Die angesetzten Konzentration von Desoxynukleotidlösungen und Desoxyoligonukleotidlösungen wurden ebenfalls bestimmt. Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz unter Berücksichtigung substratspezifischen ließen des Extinktionskoeffizienten 3 sich Konzentrationen von absorbierenden Substanzen berechnen.

Nach Lambert-Beer gilt:

$$E = \varepsilon * c * d$$

E = gemessene Extinktion bei angegebener Wellenlänge λ

 ε = substratspezifischer, molarer Extinktionskoeffizient bei angegebener Wellenlänge λ

c = molare Konzentration der absorbierenden Substanz

d = Schichtdicke der Küvette (hier 1 cm)

Für die Konzentration gilt danach:

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

5.2.2.5 Präparative Elution von Nukleinsäuren aus Agarosegelen

Bei der Isolierung von DNA- oder RNA-Fragmenten bestimmter Größe, wurden die Proben zu erst durch ein präparatives Agarosegel (5.2.7.1) elektrophoretisch getrennt. Die Banden wurden unter UV-Bestrahlung sichtbar gemacht und mit einem sterilen Skalpell heraus geschnitten. Zuvor wurden 500 µl PCR-Reaktionsgefäße mit einer über dem Bunsenbrenner erhitzten Kanüle am Boden durchbohrt. Der untere Teil des Gefäßes wurde mit Hilfe einer sterilen Pinzette mit silikonisierter Glaswolle gestopft. Das Agarosegelstück mit dem zu eluierenden Nukleinsäure-Fragment wurde auf die Glaswolle gelegt und das PCR-Reaktionsgefäß in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefaß gesteckt. Durch mehrmaliges Zentrifugieren (12.000 rpm, 5 min; Hettich Zentrifuge Mikro 200R) eluiert die Nukleinsäure in das Eppendorf-Reaktionsgefäß. Das Eluat wurde Phenol/Chloroform (5.2.2.1) extrahiert und mit Ethanol gefällt (5.2.2.2). Anschließend wurde das Pellet lyophilisiert und in TE-Puffer (4.5) gelöst. Die Konzentration konnte mittels Spektralphotometer (5.1.7) bestimmt werden.

5.2.3 Allgemeine Proteinmethoden

5.2.3.1 Gesamtproteinextraktion und Zellaufschluss

Um Gesamtprotein zu extrahieren musste zuerst eine üN Kultur angeimpft und anschließend in eine üT Kultur übergeimpft werden. Die neben bei angefertigte Wachstumskurve zeigt in welchem Stadium die Kultur war und wann die Zellen geerntet werden konnten. War die Kultur in der exponentiellen-, transitions- oder stationären Phase wurden 12 ml Zelllösung in ein steriles Greinergefäß überführt und zentrifugiert (4 °C, 10 min. bei 6.000 rpm Heraeus Megafuge 1.0 R). Nachdem die Zellen pelletiert wurden, wurde der Überstand verworfen, das Pellet mit 1 ml PBS (4.5) gewaschen und erneut zentrifugiert (4 °C, 10 min. bei 6.000 rpm Heraeus Megafuge 1.0 R). Der Überstand wurde wieder verworfen und das Pellet in 500 µl Tris/HCl mit 0,2 mM PMSF gelöst. Das gelöste Zellpellet wurde in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt und auf Eis gelagert.

Der Zellaufschluss erfolgte in vier Zyklen mit jeweils 30 sek. Ultraschall und 30 sek. Inkubation auf Eis.

Sonde:	Nadelsonde 40T
Leistung:	40 W
Repeating Duty Cycle:	0,9
Power Range Switch:	low

Nach dem Ultraschall Zellaufschluss wurde die Zelllösung bei 10 min und 13.000 rpm zentrifugiert (Hettich Zentrifuge Mikro 200R) um die Zelltrümmer zu pelletieren. Der proteinhaltige Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und konnte bei -20 °C gelagert werden.

5.2.3.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentration von Proteinproben wurde mittels "Bradford-Assay" ermittelt. Zuerst wurden 5 – 20 μ l Proteinlösung mit jeweils 780 – 795 μ l *Aqua dest.* in die Küvetten gegeben und anschließend mit 200 μ l Bradford-Reagenz (4.6) aufgefüllt. Das Gemisch inkubierte 10 Minuten bei Raumtemperatur und wurde bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Die Absorption der Probe wurde in einem Beckman Spektralphotometer (Typ DU 64) gemessen und mittels bekannten Proteinkonzentrationen (1 – 15 μ g BSA) eine Eichgerade erstellt. Die Konzentration der Protein-Probe konnte anhand der Geraden abgelesen werden.

5. Methoden

5.2.3.3 Proteinfällung mit Aceton

Bei der Proteinfällung mit Aceton wurden die Proteinproben mit einem vierfachen Volumen an Aceton vermengt und für zwei Stunden bei -20 °C gefällt. Nach der Fällung der Proteine wurden diese mittels Zentrifugation pelletiert (30 min., bei 14,000 rpm; Hettich Zentrifuge Mikro 200R) um anschließend den Überstand zu verwerfen und das Pellet zu trocknen. Das getrocknete Pellet wurde in 40 µl SDS-Probenpuffer (4.5) gelöst und auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen.

5.2.3.4 Proteinfällung mit Trichloressigsäure (TCA)

Bei der Proteinfällung mit TCA wurden die Proteinproben mit einem 1/10 Volumen 10% ige Trichloressigsäure versetzt und für mindestens 15 min. auf Eis bis üN bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die gefällten Proteine mittels Zentrifugation pelletiert (30 min, bei 14,000 rpm; Hettich Zentrifuge Mikro 200R). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 200 μ l eiskaltem Aceton gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde der Überstand wieder verworfen und das Proteinpellet kurz an der Luft getrocknet. Das Pellet wurde in 20 μ l Tris-HCL gelöst und mit 5 μ l 4 x SDS-Probenpuffer (4.5) versetzt.

5.2.4 Aufreinigung von Hfq mittels FPLC

Die FPLC (Fast Protein Liquid Chromatographie) ermöglicht eine maschinelle Proteinisolierung im größeren Maßstab. Durch ein Pumpsystem können zwei verschiedene Puffer angeschlossen werden und das Protein mit einem Imidazolgradienten von der Säule waschen. Hinter der Säule ist eine UV-Messzelle geschaltet, die die Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm mist. Die Flüssigkeit (eluiertes Protein) wird in einem Fraktionssammler gesammelt.

Für die Aufreinigung von Hfq wurde von dem Stamm BL21(DE3)/pEH10 eine 100 ml üN Kulturangeimpft und im Verhältnis 1:100 in zwei 800 ml Kolben mit YT-Medium (4.5) übergeimpft. Die Zellkultur wurde bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ 0,6 auf einen Rundschüttler (New Brunswick Scientific Model G25) angezogen. Nach erreichen der optischen Dichte wurde mit 0,5 mM IPTG induziert und weitere drei Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen, 15 min. bei 6000 rpm pelletiert (Beckmann J2-21, JA-10 Rotor) und pro 4 g Zellen in 20 ml kaltem Lysepuffer resuspendiert. Die Zellen wurden per Ultraschall aufgeschlossen.

Ultraschallaufschluss der Zellen:

Konische Sonde 50 T

Sonde :

5. Methoden

Leistung : 150 W Repeating Duty Cycle: 0,9 Power Range Switch: high

15 Sekunden Ultraschall 1 Minute auf Eis 10 Zyklen

Nach dem Ultraschallaufschluss wurden die Zellen für 20 min bei 14.000 rpm pelletiert (Beckman L8-55 Ultrazentrifuge, Rotor Ti55.2) und der proteinhaltige Überstand für 20 min bei 85 °C inkubiert. Nach der Hitzeinkubation erfolgte eine weitere Zentrifugation (40min; 18.000 rpm; 4 °C; Beckman L8-55 Ultrazentrifuge, Rotor Ti55.2) um die denaturierten Proteine vom Hfq zu trennen. Der Überstand wurde dann auf eine FPLC gegeben. Für die FPLC wurde eine Ni-NTA-Säule verwendet, da das Hfg einen natürlichen His-Tag besitzt kann das Histidin-Ende mit dem Metallion Ni²⁺ komplexieren. Zuerst wurde die Äkta prime plus mit Aqua dest. gespült und anschließend mit Waschpuffer äquilibriert. Der Hfq-haltige Überstand wurde dann mit einer Durchflussrate von 0,3 ml/min. auf die Säule gegeben, hier betrug die Fraktionsgröße 3 ml. Nach dem Überstand wurde die Säule wieder mit Waschpuffer nachgespült, solange bis der Proteinpeak wieder auf der Nulllinie angelangt ist. Nun sollten alle nichtgebundenen Proteine von der Säule gewaschen sein. Um den Harnstoff von der Säule zu lösen, wurde vom Waschpuffer zum GP-Puffer gewechselt. Hier betrug die Durchflussrate 0,4 ml/min.. Die Elution erfolgte mittels Imidazol-Gradienten von 0 bis 500 mM im GF-Puffer. Bei 58 % Imidazol eluierte das Protein von der Säule, bei einer Durchflussrate von 0,3 ml/min. und einer Fraktionsgröße von 1 ml. Von den Fraktionen 46 bis 50 wurden Bradford-Analysen durchgeführt und auf einem weiteren SDS-Gel kontrolliert.



Abb. 5.1 Profil der Hfq Aufreinigung der Äkta prime plus

Auf der X-Achse sind die einzelnen Fraktionen beschrieben. Bei den Fraktionen 4 bis 20 wurde die aufgeschlossene Zelllösung aufgegeben und gewaschen. Erst nachdem die Basislinie (33-45) wieder erreicht war konnte Eluiert werden. Die Elution des Hfqs erfolgte bei den Fraktionen 45 bis 50.

Lysispuffer:	50 mM Tris-HCL pH 8 1,5 M NaCl 250 mM MgCl ₂ 0,2 mM DTT 1 mM PMSF
Waschpuffer:	50 mM Tris-HCL pH 8 200 mM NaCl 3M Harnstoff
GF-Puffer:	50 mM Tris-HCL pH 8 200 mM NaCl

5.2.4.1 Dialyse von Hfq

Zur Entsalzung und um das Imidazol in der Proteinlösung zu entfernen sollte eine Dialyse mittels Dialyseschlauch (SpectraPor Porengröße 6000-8000 \emptyset 20,4 mm) durchgeführt. Die Dialyseschläuche wurden vor Gebrauch 30 min in Na₂CO₃-Lösung gekocht und anschließend mit *Aqua dest.* gespült und erneut für 15 min gekocht. Bis zur Verwendung wurden die Schläuche bei 4 °C, in 50 % Ethanol gelagert. Vor der Verwendung wurden die Schläuche mit *Aqua dest.* gespült.

Bei der Dialyse von Hfq wurden die Schläuche mit der Proteinlösung gefüllt und 2x gegen 500 ml GF-Puffer für je drei Stunden dialysiert.

5.2.5 Aufreinigung von PGK

Für die Aufreinigung von PGK wurde der Stamm BL21(DE3)/pET100-His6-TEV-PGK in 100 ml üN Kulturen angeimpft und im Verhältnis 1/100 in vier 800 ml Kolben mit YT-Medium (4.5) übergeimpft. Die Zellen wurden bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ 0,6 auf einen Rundschüttler (New Brunswick Scientific Model G25) angezogen. Nach erreichen der gewünschten OD₆₀₀ von 0,6 wurde die PGK Überexpression mit 0,2 mM IPTG induziert. Die Zellen wurden nach drei Stunden inkubation, pelletiert (15 min, 5000 rpm, 4 °C, Beckman Zentrifuge J2-21, JA-10 Rotor). Die Zellpellets wurden in 60 ml Aufschlusspuffer resuspendiert und vereinigt. Die

gelösten Zellpellets wurden per Ultraschall (Labsonic U, Braun Biotech Int.) aufgeschlossen.

Ultraschallaufschluss der Zellen:

Sonde :Konische Sonde 50 TLeistung :150 WRepeating Duty Cycle:0,9Power Range Switch:high

15 Sekunden Ultraschall 1 Minute auf Eis 10 Zyklen

Nach dem Zellaufschluss wurden die Zellen erneut pelletiert (30 min, 11000 rpm, 4 °C, Beckman L8-55 Ultrazentrifuge, Rotor Ti55.2) um die Zelltrümmer von den Proteinen zu trennen. Der proteinhaltige Überstand wurde auf die vorher äquilibrierte Säule gegeben. Durch den His-Tag und der zwischen Protein und His-Tag geschalteten Tev-Stelle kann auch hier wieder eine Ni-NTA-Agarose Säule verwendet werden. Die Säule hat einen Durchmesser von 1 cm mit einer Höhe von 12 cm. Es wurde so lange gewaschen, bis der Peak wieder abgeflacht war. Anschließend wurde das Protein mit 50 mM Imidazol im Waschpuffer eluiert.

Bei einem Teil des eluierten Proteins wurde Tev-Protease (50 ng/µl) zugegeben und über Nacht inkubiert, um den His-Tag abzuspalten. Diese Proteinlösung wurde erneut auf eine Ni-NTA-Agarose Säule gegeben, da die Tev-Protease nun den His-Tag trägt und auf der Säule hängenbleiben sollte und das Protein ohne His-Tag im Durchfluss sein sollte.

Die Dialyse von PGK, sowohl mit also auch ohne His-Tag, wurden über Nacht mit dem Dialyse-Puffer inkubiert. Anschließend wurde das Protein nochmals auf einem SDS-Gel auf seine Reinheit kontrolliert und in kleinen Alliquots bei -80 °C gelagert.

Aufschlusspuffer:	50 mM Tris-HCL pH 8 200 mM NaCl 2 mM β-Mercaptoethanol 0,2 mM PMSF
Waschpuffer:	50 mM Tris-HCL pH 8 200 mM NaCl
Imidazol-Puffer:	50 mM Tris-HCL pH 8 200 mM NaCl 1 M Imidazol pH auf 8,5 einstellen

Dialysepuffer:

50 mM Tris-HCL pH 8 150 mM NaCl 20 % Glycerin 0,1 mM DTT

5.2.6 Generierung von Ribosomen

Um Ribosomen zu generieren wurden 50 g MRE 600 Zellen bei 4 °C auf Eis in einer Pistille (aus Porzellan) aufgetaut und mit 100 g Alluminiumoxid (Al₂O₃) versetzt. Die Zellen wurden mit einem Mörser aufgerieben bis die Zellen und das Alluminiumoxid eine flüssige Lösung ergeben. Vor einer 20 minütigen Inkubation auf Eis wurden 100 ml Puffer I und 500 µg DNaseI zu den Zellen gegeben. Anschließend folgte eine Zentrifugation (10 min; 4 °C; 6000 rpm Beckman Zentrifuge J2-21, JA-10 Rotor) zur Abtrennung des Alluminiumoxids. Der Überstand wurde 26 ml Polycarbonatröhrchen überführt und es folgte eine weitere Zentrifugation (30 min; 4 °C; 20000 rpm; Beckman L8-55 Ultrazentrifuge, Rotor Ti55.2). Im Pellet befinden sich die Zelltrümmer und der klar gelbliche ribosomenhaltige Überstand wurde auf ein Zuckerkissen in frische Polycarbonatröhrchen gegeben. Das Zuckerkissen (Puffer II) sollte so ca. 11 ml betragen und die Ribosomenlösung kann bis zu 14 ml betragen. Die zwei geschichteten Lösungen wurden dann für 24 Stunden zentrifugiert (4 °C; 40000 rpm; Rotor TI55,2 Beckman L8-55 Ultrazentrifuge). In dieser Zeit wandern die Ribosomen langsam durch das Zuckerkissen und pelletieren. Das honigartige Pellet wurde einmal kurz mit 3 – 5 ml Aqua bidest gewaschen. Pro Röhrchen wurde das Pellet in 1 ml Puffer II schüttelnd bei 0 °C über mehrere Stunden gelöst. Die Proben wurden gepoolt und erneut zentrifugiert (15 min; 4 °C; 20000 rpm; Beckman L8-55 Ultrazentrifuge, Rotor Ti55.2). Der Überstand ist die verwendete Ribosomenlösung, die sowohl auf einem SDS-Gel (5.2.7.4), als auch nach Phenol/Chloroform Extraktion (5.2.2.1) auf einem Agarosegel (5.2.7.1) kontrolliert wurde.

Bei der Eingesetzten Zellmenge geht man davon aus, dass die Ribosomenlösung eine Konzentration von 0,48 OD_{600} hat, dies entspricht 10 pmol in 1 µl.

Puffer I:	20 mM Tris-HCL, pH 7,5 100 mM NH ₄ Cl 10 mM MgCl ₂ 10 mM β-Mercaptoethanol
Puffer II:	20 mM Tris-HCL, pH 7,5

500 mM NH₄Cl 10 mM MgCl₂ 10 mM β-Mercaptoethanol

1,1 M Saccharose

5.2.7 Gelelektrophoresen

5.2.7.1 Agarosegelelektrophorese

Zur analytischen und präparativen Auftrennung von RNA, Plasmid-DNA, DNA-Fragmenten und chromosomaler DNA wurden 0,5 bis 1,0 % (w/v) Agarosegele verwendet (Maniatis et al., 1982). Dazu wurden 100 ml 1 x TAE-Probenpuffer (4.5) mit der entsprechenden Menge Agarose aufgekocht, bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte. Nachdem die Lösung auf unter 60 °C abgekühlt war, wurde sie mit 0,5 μ g/ml Ethidiumbromid versetzt und auf einen Flachbettgelschlitten (14 x 11 cm) gegossen. Sobald die Gelmatrix vollständig ausgehärtet war, wurde der Gelschlitten mit dem Agarosegel in eine Elektrophoresekammer gelegt und mit 1 x TAE-Laufpuffer (4.5), überschichtet.

Die Nukleinsäure-Proben wurden mit einem Volumen 2 x TAE-Probenpuffer versetzt und bei 120 Volt für 0,5-1 Stunden aufgetrennt. Durch die Fluoreszenz des Ethidiumbromids, welches sich in die DNA einlagert, konnten die Nukleinsäuren auf einem Transilluminator (Herolab UVT 2035) bei 302 nm visualisiert werden. Für präparative Gele wurde ultrapure Agarose verwendet und kein EtBr. Die Visualisierung der Nukleinsäuren erfolgte bei 320 nm. Die Auftrennung von RNA-Proben erfolgte nur in RNase freien Elektrophoresekammern, die zuvor mit DEPC (4.7) behandelt wurden.

5.2.7.2 Natives 0,5% iges Retardierungs-Agarosegel

Um eine Bindung zwischen RNA und Ribosomen sichtbar zu machen wurden 0,5 % ige Agarosegele mit TMK-Puffer (4.5) verwendet. Für den Puffer wurde anstelle von EDTA Magnesium verwendet, um dass zerfallen der Ribosomen zu verhindern. Die RNA wurde radioaktiv Markiert (5.3.2/5.3.3). Durch das Magnesium im Puffer, im Gel und auch im Probenpuffer verlangsamt sich der Stromfluss. Zudem wurde das Agarosegel bei 4 °C und 40V laufen gelassen. Nach fünf Stunden wurde das Agarosegel in Folie eingeschweißt und autoradiographiert.

5.2.7.3 Native Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Polyacrylamidgele bestehen aus Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid und sind Polymerisationsprodukte. N,N'-Methylenbisacrylamid dient als Quervernetzer für die zweidimensionale Kettenbildung aus Acrylamid. Die Porengröße und damit der Auftrennungsbereich des Polyacrylamidgels werden durch die Acrylamidkonzentration und den Vernetzungsgrad bestimmt. Die Polymerisation ist eine Radikalkettenreaktion, die durch Zugabe N,N,N`,N`-Tetramethyl-ethylendiamin katalysiert von (TEMED) und durch Ammoniumperoxodisulfat (APS) gestartet wird.

Die native PAGE wurde zur Kontrolle für *in vitro* transkribierte 6S RNA (5.2.10.4) verwendet. Es wurden 10 % Gellösungen mit einer Vernetzung von 19:1 (Acrylamid:Bisacrylamid) angesetzt und die Polymerisation wurde durch Zugabe von 25 µl TEMED und 250 µl APS gestartet. Anschließend wurde die Gellösung zwischen zwei gereinigte Glasplatten gegossen. Das auspolymerisierte Gel wurde in die Elektrophoresekammer eingespannt und als Laufpuffer wurde 1 x TBE-Puffer (4.5) verwendet. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit dem entsprechenden Volumen Formamid-Probenpuffer (4.5) vermengt und zur Denaturierung für einige Minuten auf 96 °C erhitzt. Die Elektrophorese erfolgte bei 50 Watt.

5.2.7.4 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (dPAGE)

Die denaturierende PAGE wurde verwendet, um cDNA's ihrer Größe entsprechend aufzutrennen, wie zum Beispiel bei den Primer-Extension Reaktionen (5.2.10.5). Es wurde dem Gel Harnstoff zugesetzt um Nukleinsäuren als einzelsträngige und frei von Sekundärstrukturen im Gel zu zeigen.

Es wurden 15 %ige Polyacrylamidgele mit einer Vernetzung von 19:1 (Acrylamid :Bisacrylamid) hergestellt, die 7 M Harnstoff und 1 x TBE-Puffer (4.5) enthielten. Nachdem sich der Harnstoff gelöst hatte wurde die Lösung für einige Minuten entgast, um spätere Blasenbildung im Gel zu verhindern. Anschließend erfolgte die Zugabe von TEMED und APS. Die Gellösung wurde in die vorbereiteten und gereinigten Glasplatten gegossen. Das Gel wurde in drei Watt-abhängigen Stufen vorgeheizt (10 min. 25 W, 10 min. 50 W, 10 min. 75 W). Als Laufpuffer wurde 1 x TBE (4.5) verwendet. Die zu analysierenden Nukleinsäureproben wurden mit Formamid-Probenpuffer (4.5) versetzt, für 3 min. bei 96 °C denaturiert und zentrifugiert. Die

Proben wurden auf das vorbereitete Gel aufgetragen und bei 90 Watt aufgetrennt. Um eine radioaktive Kontamination des Puffers gering zu halten, wurde die Anodenseite der Glasplatten zuvor mit DE-81 Ionenaustauschpapier umwickelt.

5.2.7.5 Gelelektrophorese von Proteinen

Die Auftrennung der Proteine erfolgte über ihr Molekulargewicht. Bei dieser Methode wird ein engporiges Trenngel (15 % PAA, 375 mM Tris-HCL, pH 8,8, 0,1 % SDS) mit einem weitporigem Sammelgel (6 % PAA, 125 mM Tris-HCL, pH 6,8, 0,1 % SDS) kombiniert. Die Trennung der Proteine wurde durch die verschiedenen pH-Werte der Sammel- und Trenngele verstärkt. Natriumdodecylsulfat (SDS) befand sich als denaturierendes Agens sowohl im Gel als auch in den Proben. SDS zerstört fast alle kovalenten Wechselwirkungen im Protein, weiterhin lagern sich die hydrophoben Reste der SDS-Anionen an die Proteinketten. Dadurch wird die Einlagerung der Proteine überdeckt und die Proteine werden ihrem Molekulargewicht entsprechend aufgetrennt.

Vor dem Auftragen der Proben auf das Gel wurden diese mit 1/4 Volumen 4 x SDS-Probenpuffer und 3 μ l β -Mercaptoethanol versetzt. Die Proben wurden für 5 min. bei 96 °C denaturiert und zentrifugiert. Die Trennung der Proben erfolgte bei 120 Volt über Nacht. Als Laufpuffer wurde 1x SDS-Puffer (4.5) verwendet.

Lösung A:	30 % Acrylamid/ Bisacrylamid-Lösung (29:1)
Lösung B:	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
Lösung C:	10 % (w/v) SDS
Lösung D:	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
Klebegel:	1 % Agarose
Großes SDS-Gel: 70 ml Trenngel:	B x H x T 310 mm x 180 mm x 1 mm
20 ml Sammelgel:	310 mm x 50 mm x 1 mm
Kleines SDS-Gel: 40 ml Trenngel:	B x H x T 180 mm x 120 mm x 1 mm
č	

10 ml Sammelgel:

Anschließend wurde das Gel Coomassie (5.2.8.3) oder Silber (5.2.8.2) gefärbt.

5.2.8 Nachweis von Nukleinsäuren und Proteinen

5.2.8.1 Silberfärbung von Nukleinsäuren

Die Methode der Silberfärbung von Nukleinsäuren erfolgte nach (Beidler et al., 1982). Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel für 5 min in Fixierlösung I geschwenkt. Danach wurde für 10 min eine Silbernitratlösung auf das Gel gegeben und anschließend dreimal für je eine Minute in *Aqua dest.* gewaschen. Das Gel wurde in frisch angesetzter Entwicklerlösung geschwenkt bis Banden zu erkennen waren. Um die Entwicklung zu stoppen wurde das Gel 10 min in Fixierlösung II geschwenkt.

Fixierlösung I:	10 % (v/v) Ethanol 0,5 % (v/v) Essigsäure
Silberlösung:	2 g AgNO ₃ /l in Aqua dest.
Entwicklerlösung:	15 g NaOH 0,08 g Na ₂ BH ₄ 4 ml Formaldehyd (37%ig) ad 11 mit <i>Aqua dest</i> .
Fixierlösung II:	0,75 % (v/v) Na ₂ CO ₃

5.2.8.2 Silberfärbung von Proteinen

Die Silberfärbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen ist sensitiver als die Coomassie-Färbung. Die Proteine können schon ab 2-5 ng pro Bande detektiert werden. Die Methode erfolgte nach der Beschreibung von Blum & Gross (1987). Allerdings ist mit der Silberfärbung eine quantitative Analyse von Proteinen in PAA-Gelen nicht möglich. Für die Färbung wurde zunächst das Gel über Nacht in Fixierlösung I geschüttelt (Gerhardt, Schüttelmaschine LS10). Danach wurde das Gel zweimal für 10 min in 50 % Methanol geschwenkt und zum Schluss einmal in 30 % Ethanol. Anschließend wurde das Gel dreimal für jeweils 30 sek in *Aqua dest*. gewaschen und dann für 20 min in die Silbernitratlösung gegeben. Daraufhin wurde das Gel so lange in der Entwicklerlösung geschwenkt, bis Banden deutlich zuerkennen waren. Durch schwenken in der Fixierlösung II wurde die Reaktion gestoppt.

Fixierlösung I:	50 % (v/v) Methanol 12 % (v/v) Essigsäure 0,0185 % (v/v) Formaldehyd
Färbelösung:	2 g/l Silbernitrat 0,028 % (v/v) Formaldehyd
Entwickler:	60 g/l Natriumcarbonat 0,04 g/l Natriumthiosulfat 0,0185 % (v/v) Formaldehyd
Fixierlösung II:	25 % (v/v) Methanol 6 % (v/v) Essigsäure

5.2.8.3 Coomassie-Färbung

Für den quantitativen Nachweis von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen wurde die Coomassie-Färbung angewendet. Die Methode ist jedoch, weit aus weniger sensitiv, als die Silberfärbung, da hier nur Proteine ab 50 ng pro Bande zu erkennen sind.

Das Gel wurde für eine Stunde in der Färbelösung horizontal geschüttelt und anschließend in Entfärbelösung geschwenkt bis die Bande gut zu erkennen und der Hintergrund fast entfärbt war.

Färbelösung:	50 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure 0,1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250
Entfärbelösung:	10 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure

5. Methoden

5.2.8.4 Autoradiographie

Der Nachweis radioaktiv markierter Nukleinsäuren in Polyacrylamidgelen erfolgte durch die Exposition von Röntgenfilmen. Nach der Elektrophorese wurden die Gele auf einen gebrauchten Röntgenfilm aufgezogen, mit Polyethylenfolie bedeckt und in eine Expositionskassette (Siemens) gelegt. In der Dunkelkammer wurde bei Rotlicht ein Röntgenfilm (Kodak X-Omat AR oder FUJI RX) auf das Gel gelegt und für 1 bis 7 Tage bei - 70 °C exponiert. Bei besonders schwacher radioaktivität im Gel konnte noch eine Verstärkerfolie aufgelegt werden, die die exposition um das ca. 7 fache verstärkt. Für die Entwicklung der Röntgenfilme wurde die Entwicklermaschine AGFA Curix 60 verwendet.

5.2.9 Enzymatische Reaktionen

5.2.9.1 Restriktionahydrolyse

Für die Restriktionshydrolyse wurden Restriktionsenzyme der Klasse II verwendet. Diese schneiden innerhalb ihrer Erkennungssequenz. Je nach Enzym entstehen glatte Enden (blunt ends) oder 3' bzw. 5' Überhängende Enden (sticky ends). Die Restriktion wurde nach Herstellerangaben durchgeführt und auf einem Agarosegel (5.2.7.1) kontrolliert.

5.2.9.2 Polymerase chain reaction (PCR)

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) lassen sich Nukleinsäurefragmente *in vitro* amplifizieren. Die dabei ausgewählten Oligonukleotide sind sequenzspezifisch und flankieren die Ziel-DNA. Diese hybridisieren (*annealing*) dann an die DNA und werden durch die thermostabile DNA-Polymerase und den Eingebauten dNTPs verlängert. Der Einbau der dNTPs erfolgt komplementär zur Ziel DNA (*extension*). Anschließend erfolgt eine kurze Denaturierung und die gebildeten Doppelstränge werden getrennt. Das Hybridisieren der Oligonukleotiden, deren Verlängerung und Denaturierung wiederholt werden und es kommt zu einer exponentiellen Amplifikation des PCR-Produktes.

Für die PCRs wurde die Phusion high-fidelity DNA-Polymerase verwendet, da sie eine 3'- 5'-Exonukleaseaktivität (*proofreading*) besitzt, wodurch die Fehlerrate beim Nukleotideinbau reduziert wird (4,4 x 10^{-7} , Finnzymes). Die Reaktion erfolgte mit 1x HF Puffer, 10 mM dNTPs, 5-10 ng Plasmid oder 500 ng genomischer DNA, 10 μ M Primer und 0,4 U Phusion high-fidelity DNA-Polymerase in einem 20 μ l Ansatz. Je nach Länge und Art der PCR wurden 20 bis 35 Zyklen im Mastercycler epigradient S (Eppendorf) durchgeführt. Da die Annealingtemperatur von der Schmelztemperatur der Oligonukleotide abhängt, musste diese zuerst nach folgender Formel ermittelt werden.

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

L = Länge des Primers (bp)

Um die Temperatur mit der höchsten Ausbeute zu ermitteln, wurden Temperatur-Gradienten-PCRs mit zehn verschiedenen Temperaturen durchgeführt.

Die Aufreinigung des PCR-Produktes erfolgte durch das Qiaquick PCR Purifications Kit.

PCR für das	s PGK-Insert:	PCR für den	Vektor:
98 °C	30 sek	98 °C	30 sek
98 °C	10 sek	98 °C	10 sek
50 – 58 °C	20 sek	60 – 66 °C	15 sek
72 °C	30 sek	72 °C	2,30 min
72 °C	5 – 10 min	72 °C	5 min
4 °C	hold	4 °C	hold
25 Z	Zyklen	25 Zy	klen

PCR für die cat-Kassette:

98 °C 30 sek 98 °C 10 sek 50 – 60 °C 30 sek 72 °C 25 sek 72 °C 10 min 4 °C hold 25 Zyklen

5.2.9.3 HD Klonierungs Kit

Die Klonierung wurde mit dem Kit In-Fusion® HD Cloning, wie von Hersteller (Clontech) Beschrieben durchgeführt.

5.3 Spezielle molekularbiologische Methoden

5.3.1 5' Phosphorylierung zur radioaktiven Markierung von DNA-Oligonukleotiden Synthetisch hergestellte Desoxyoligonukleotide sind am 5' Ende unphosphoryliert und konnten so radioaktiv markiert werden. So wurde die γ -Phosphatgruppe des ATP's durch eine Kinasierungsreaktion mit der freien 5' OH-Gruppe des Desoyoligonukleotids kovalent verknüpft. Die radioaktive Markierung wurde mit dem Enzym T4-Polynukleotidkinase (PNK) und dem radioaktiven [γ^{32} -P] -ATP durchgeführt. Zu Beginn wurden 20 pmol des gewünschten Oligonukleotids mit 1 Unit PNK, 10 x PNK-Puffer und 30 μ Ci [γ^{32} -P] -ATP in ein Reaktionsvolumen von 21 μ l gebracht und für 45 min. bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym für 10 min. bei 68 °C inaktiviert und das Oligonukleotid durch Zugabe von 1/20 Volumen Glykogen (20 μ g/ml), 1/10 Volumen 7,5 M Ammoniumacetat (NH₄OAc) und 100 μ l absolut Ethanol gefällt (5.2.2.2). Durch eine Zentrifugation (45 min., 12.000 rpm, 4 °C, Hettich Zentrifuge Mikro 200R) wurde das markierte Oligonukleotid pelletiert. Das Pellet wurde noch mal mit 80 % Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und in 40 μ l TE-Puffer (4.5) gelöst. Für die anschließende Primer-Extension Reaktion wurden jeweils 1 μ l des markierten Oligonukleotids eingesetzt.

5.3.2 3'- Endmarkierung von RNA mit 5`-³²(P)pCp

Zur radioaktiven 3'- Endmarkierung wurde ein radioaktiv markiertes Cystidin mittels T4-RNA Ligase an das 3'- Ende der RNA gebunden. Hierzu wurden 1 μ g RNA mit 10 % DMSO, 20 U T4-RNA Ligase, 1 x Ligasepuffer und 10 μ Ci 5'-³²(P)pCp in einem Reaktionsansatz von 20 μ l über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Reaktionsansatz Ethanolgefällt (5.2.2.2), wobei hier zusätzlich 1 μ l Glykogen und 2 μ l 3M NaOAc pH 5,3 zugegeben wurden sind. Anschließend wurde das Pellet in 100 μ l TE-Puffer (4.5) gelöst.

5.3.3 5' OH Markierung der 6S RNA

Um das 5'-Ende einer RNA zu markieren muss diese zuerst am 5'-Ende eine OH-Gruppe tragen. Dafür wurde eine *in vitro* Transkiption mit 200 mM Guanosin, in DMSO gelöst pro Ansatz, durchgeführt. Die so generierte 6S RNA (1 μ g) wurde in einem 20 μ l Ansatz mit 1 x PNK-Puffer, 20 μ Ci [γ^{32} -P] -ATP und 1 U PNK 45 min bei 37 °C inkubiert und anschließend um die Kinasierungsreaktion zu stoppen 20 min bei 68 °C inkubiert. Es folgte eine Ethanolfällung (5.2.2.2) mit 1 μ l Glykogen (20 μ g/ μ l) und 2 μ l 7,5 M NH₄OAc und eine direkte Zentrifugation (4 °C; 13.000 rpm; 45 min; Hettich Zentrifuge Mikro 200R). Die Radioaktivität sollte mindestens zu Hälfte im Pellet sein. Das Pellet wurde noch gewaschen, getrocknet und in 70 μ l TE-Puffer (4.5) gelöst.

5.3.4 In vitro Transkription zur präparativen Gewinnung von RNA (RiboMAX)

Durch das RiboMAX-System von Promega konnte im präparativen Maßstab durch eine *in vitro* Synthese RNA hergestellt werden. Die dafür verwendete Phagenspezifische T7-RNA-Polymerase benötigt für die Transkriptionsinitiation einen T7-Promoter. Dieser befindet sich auf dem Plasmid pUC18-T7 und kodiert für das *downstream* gelegene, klonierte *ssrS* Gen. Durch Linearisierung der Vektoren mit dem Restriktionsenzym Stul *downstream* des *ssrS* Gens, kann die RNA-Polymerase von dem *template*-Plasmid abfallen und eine neue Transkription initiieren. Diese Art der *in vitro* Transkription nennt man *"multiple-round run-off"* Transkription.

Für die Transkription wurden jeweils 20 Ansätze mit je 30 μ l Reaktionsvolumen angesetzt. In jeden Ansatz wurden 4 pmol linearisiertes Plasmid, 3 mM 4 NTP-Mix, 1,5 μ l Pyrophosphatase (0,1U/ μ l), 15 U RNasin und 288 U T7-RNA-Polymerase in 1 x RiboMax-Puffer sowie 6 mM DTT pipettiert. Die Ansätze wurden bei 37 °C für eine Stunde inkubiert und anschließend auf einem analytischen Agarosegel (5.2.7.1) kontrolliert. War die Transkription erfolgreich wurden die Proben vereinigt und auf einem präparativen Agarosegel aufgetrennt und eluiert (5.2.2.5). Das Eluat wurde Phenol/Chloroform (5.2.2.1) extrahiert und Ethalolgefällt (5.2.2.2).

5x RiboMAX-Puffer:

400 mM Hepes-KOH, pH 7,5 60 mM MgCl₂ 10 mM Spermidin 200 mM DTT

5.3.5 Primer Extension Reaktion

Bei der Primer Extension Reaktion wurde eine von (Stern et al., 1988) beschriebene Methode durchgeführt. Die zu analysierende RNA wurde als Template benutzt und mittels viraler reverser Transkriptase (AMV) in eine copy-DNA (cDNA) umgeschrieben.

Zu Beginn wurde ein 5'- γ -³²P-markiertes DNA-Oligonukleotid (5.2.10.1) zu einer bestimmten Menge an RNA sowie 5 x Hybridisierungspuffer gegeben und für kurze Zeit auf 70 °C erhitzt. Dadurch schmolzen die DNA-Oligonukleotide auf und bei der Abkühlung auf RT konnten sich

5. Methoden

die radioaktiv markierten Oligos an die RNA anlagern. Nach der Hybridisierung wurde der PE-Prämix zugegeben. Mittels der Reversen Transkriptase konnte die cDNA-Synthese unter Einbau von dNTPs erfolgen. Die Ansätze wurden bei 42 °C, 30 min. inkubiert und anschließend wurde die Reaktion mit 5 μ l Formamid-Probenpuffer (4.5) gestoppt. Die Proben wurden durch eine Inkubation von 4 min. bei 100 °C denaturiert. Es wurden jeweils 10 - 14 μ l der Probe auf ein 10 -15 %ige dPAGE (5.2.7.3) aufgetragen und aufgetrennt.

PE-Prämix:	5 x AMV Puffer Tris/HCl 100 mM pH 7,5 4 dNTP-Mix 10 mM AMV RT (10 U/µl)	2 μl 3,58 μl 0,2 μl 0,22 μl
5 x Hybridisierungspuffer :	500 mM KCL 250 mM Tris/HCL pH 8	

5.3.6 Gesamt NTP Bestimmung

Dieser Methode liegt zu Grunde, dass radioaktiv markiertes Phosphat in den Phosphat-Methabolismus noch wachsender Zellen eingebaut wird. Dies konnte später sichtbar gemacht werden, indem die NTPs nach ihrer Ladung und den physikalisch-chemischen Eigenschaften aufgetrennt wurden. Das Lösungsmittel (0,85 M KH₂PO₄) wandert durch die Kapillarkräfte die Trennplatte (Polygram® CEL 300 PEI/UV₂₅₄) aufwärts und die NTPs wandern ihrer Ladung entsprechen mit.

Zu Beginn musste die Phosphorsäure (${}^{23}PH_3PO_4$) neutralisiert werden. Dazu wurden 3,7 µl Stammaktivität (200 µCi von Hartmann) mit 33,3 µl 151 mM NaOH versetzt, so dass in 3,7 µl nur noch 20 µCi vorhanden waren.

Zur gesamt NTP-Bestimmung mussten zuerst aus einer üN Kultur 100 ml Flüssigmedium angeimpft werden. Dann wurden in der gewünschten Phase (exponentielle/ logarithmische, transitions- oder stationäre Phase) 100 µl Zellen in ein 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt und mit 3,7 µl neutralisierter Phosphorsäure gemischt. Dies wurde für eine Stunde bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Nach der Inkubation wurden 100 µl 1 M Ameisensäure zu den Proben gegeben und dreimal eine Tau/Frier-Lyse durchgeführt. Anschließend wurde das Gemisch bei 4 °C für 15 min., 13.000 rpm zentrifugiert (Hettich Zentrifuge Mikro 200R). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Die Dünnschicht-Chromatographie Platten wurde zuvor leer in 2N Ameisensäure (pH 2,2 mit Pyridin) laufen gelassen und gut an der Luft getrocknet. Vor Gebrauch wurden die Platten noch zu recht geschnitten und aufskizziert, wo die Proben aufgetragen werden sollten.

Die Proben wurden jeweils in 2 μ l Schritten auf die Platte aufgetragen und 2 x mit 10 % Zitronensäure und *Aqua dest.* für 10 min. gewaschen. Darauf hin wurde die Platte getrocknet und senkrecht in 50 ml 0,85 M KH₂PO₄ laufen gelassen.

Die Platte wurde mit einem Röntgenfilm zusammen in eine Expositionskassette gelegt und bei - 20 °C inkubiert.

Für die zweite Dimension (2D) wurde die Platte wieder an der Luft getrocknet und um 90° senkrecht gedreht. Für die zweite Dimension wurde die Platte in 1 M LiCl mit 10 % H₃Bo₃ laufen gelassen.

5.3.7 Retardierungsanalyse

Die Retardierung dient der Analyse von Bindungen zwischen Proteinen und Nukleinsäuren. Durch ein verzögertes Laufverhalten des RNA-Protein-Komplexesauf Grund des Größengewichts im Gel kann sowohl die freie RNA als auch der Komplex dedektiert werden. In die 15 bis 20 μ l Ansätze wurde die 6S RNA, ein beliebiges Protein sowie KGlu80-Puffer (4.5) oder Puffer D (5.2.11.1) zugegeben. In einigen Fällen kann auch MgCl₂ hinzugefügt werden. Die 6S RNA hat eine Konzentration von 15 nMol und die Proteine wurden im Überschuss zugegeben. Nach einer 10 min. Inkubation bei 30 °C wurden 0,75 μ l Heparin (f.c. 100 ng/ μ l) eingesetzt um eine unspezifische Komplexbildung zu verhindern. Anschließend wurde noch einmal bei 30 °C für 5 min. inkubiert und 5 μ l 2 x TBE-Probenpuffer (4.5) zugegeben. Die Reaktionsansätze wurden auf einem 5 %igen Polyacrylamidgel (5.2.7.2) aufgetragen und bei 30 mA laufen gelassen.

5.3.8 Northern Blot Analyse

Für die Northern Blot Analyse wurden 5 bis 10 µg RNA auf eine 10 %ige dPAGE (5.2.7.2) aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel auf Höhe der Produkte, auf die entsprechende Größe zurechtgeschnitten und auf eine Nylon-Membran (GE, Amersham HybondTM-N⁺) übertragen. Zunächst wurde in die Elektroblot-Apparatur (Owi, PantherTM Semidry Electroblotter, Model HEP-1) drei, mit 1 x TBE-Puffer (4.5) angefeuchtete Whatmann 3MM Papiere gelegt und anschließend die Membran mit dem Gel zu Seite der Kathode. Auf die Membran wurden drei weiter feuchte Whatmann 3MM Papiere gelegt und für eine Stunde bei

600 mA geblottet. Anschließend erfolgte die UV-Quervernetzung (Stratagen, UV StratalinkerTM 1800, Autocrosslink, entspricht 120 mJ), wodurch die RNA kovalent an die Membran gebunden wurde.

Um die RNA-Moleküle zu detektieren, wurde die Membran, mit der gebundenen RNA nach innen, in ein Hybridisierungsröhrchen gelegt. Die Prähybridisierung erfolgte für 2 h mit 20 ml Hybridisierungspuffer bei der gewünschten Temperatur (5-10 °C unterhalb der Schmelztemperatur des Oligonukleotids). Anschließend wurde die Lösung verworfen und mit weiteren 20 ml Hybridisierungspuffer mit 6 μ l Oligonukleotid üN Hybridisiert. Am nächsten Tag wurde die Membran 3 x für 30 min mit 50 ml Waschpuffer gewaschen und autoradiographiert (5.2.8.4).

Hybridisierungslösung:	5 x SSC-Puffer 7,5 % SDS 50 μg/ml Heringssperm-DNA 5-10 pmol ³² P markiertes Oligonukleotid
Waschpuffer:	5 x SSC-Puffer 0,1 % SDS
20x SSC-Puffer:	300 mM Natriumcitrat 3M NaCl pH 7,0

5.3.9 Alkalische Hydrolyse von RNA

Bei einem alkalischem pH-Wert führt die limitierende Hydrolyse radioaktiv markierter RNA zu einer Vielzahl von verschieden langen RNA-Fragmenten. Diese können elektrophoretisch aufgetrennt werden und als "Leiter" (OH-Leiter) dienen.

Es wurden jeweils 2 µl radioaktiv markierte RNA mit 10 µg tRNA als *Carrier* in 16 µl Alkli-Puffer gelöstund 3, 5, 7 min bei 83 °C erhitzt. Die Proben wurden auf 100 µl mit *Aqua dest.* aufgefüllt und Ethanolgefällt (5.2.2.2). Die unterschiedlichen Präzipitate wurden gemischt und jeweils 100 cps auf eine dPAGE aufgetragen.

> Alkali-Puffer: 50 mM Natriumcarbonat 50 mM Natriumhydrogencarbonat pH 9,5

5.3.10 Enzymatischer Footprint mit RNase

Mit der *Footprint*-Methode können spezifische Bindestellen der Proteine auf Nukleinsäuren nachgewiesen werden. Für den enzymatischen *Footprint* wurde sowohl 3' also auch 5' markierte 6S RNA (5.2.10.2 / 5.2.10.3) über eine 5 % dPAGE aufgereinigt und in TE-Puffer (4.5) gelöst. Es wurden die RNasen T1 und V1 verwendet. Die RNase T1 schneidet hinter einem einzelsträngigen G und die RNase V1 schneidet unspezifisch doppelstrang RNA. Zuerst komplexierte bei 30 °C das Protein (Hfq oder PGK) an die RNA (5.2.10.7 EMSA). Nach der Komplexbildung wurde 20 bis 100 ng/µl Heparin als Kompetitor zugefügt und anschließend ein RNase T1 (3 U) oder V1 (20 mU) Restriktionsdau durchgeführt. Die Proben wurden jeweils mit der RNase versetzt und 15 min bei 30 °C inkubiert. Nach dem RNase-Dau wurden die Ansätze auf 100 µl mit *Aqua dest*. aufgefüllt und Phenol/Chloroform extrahiert und EtOH gefällt. Das Pellet wurde in 10 µl TE-Puffer (4.5) und Formamid-Probenpuffer (4.5) gelöst und 10 µl vom Ansatz auf eine 10 % ige dPAGE aufgetragen und für ca. 1 $\frac{1}{2}$ h laufen gelassen, bis der BromphenolBlau Farbmarker aus dem Gel gelaufen ist. Anschließend wurden die restlichen 10 µl der Probe aufgetragen und Autoradiographiert (5.2.8.4).

5.3.11 Hydroxylradikal Footprint Analyse von 6S RNA

Mit dieser Methode können strukturelle Informationen über die Bindung eines Proteins an die RNA aufgedeckt werden. Die Hydroxylradikal-Footrpint Methode wurde in Anlehnung an die von Hüttenhofer und Noller (1992) und Schickor und Heumann (1994) beschrieben durchgeführt. Bei der Dekompensation von Wasserstoffperoxid mit der Beteiligung von Metallionen (hier Eisen) als Katalysatoren entstehen Hydroxylradikale (starkes Oxidationsmittel). Durch die Oxidation von Eisen (II) zu Eisen (III) entstehen Hydroxyradikale die ein H-Atom abstrahieren und sich bevorzugt an Doppelbindungen anlagern.

Fenton-Reaktion:

$$.O_{2-} + Fe^{3+} \rightarrow O_2 + Fe^{2+}$$
$$H_2O_2 + Fe^{2+} + H^+ \rightarrow .OH + Fe^{3+} + H_2O$$

Die entstehenden Hydroxylradikale sind so reaktiv, dass sie direkt mit benachbarten RNA-Molekülen reagieren. Für die 6S RNA Hydroxylradikal-Footprints wurde die 3' oder auch 5' radioaktiv markierte RNA zuerst mit dem Protein komplexiert. In dieser Arbeit wurde in verschiedenen Konzentrationen PGK und Hfq als Bindeprotein verwendet. Nach der KomplexBildung, erfolgte ein kurze Inkubation mit Heparin als Kompetitor und anschließend wurde jeweils 1 μ l von den Hydroxylradikal-*Footprint*-Reagenzien an die Eppendorfwand pipettiert. Die vier Reagenzien wurden vermischt und kurz zu der Probe auf dem Eppendorfgefäßboden zentrifugiert. Nach einer Inkubation von 10 min bei 4 °C auf Eis wurde die Reaktion mit 0,1 M Urea gestoppt, dann folgte eine Phenol/Chloroform Extraktion (5.2.2.1) und Ethanolfällung (5.2.2.2). Das Pellet wurde in 10 μ l *Aqua dest*. und 10 μ l Formamidprobenpuffer (4.5) aufgenommen. Die so behandelten Proben wurden dann auf einem 10 %igen dPAGE (5.2.7.3) aufgetrennt und anschließend autoradiographiert (5.2.8.4).

Hydroxylradikal-Footprint-Reagenzien:	50 mM Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂
	2,5 % H ₂ O ₂
	100 mM EDTA, pH 8,0
	250 mM Na-Ascorbat

5.3.12 Filterbindung von Ribosomen an 6S RNA

Um eine Interaktion von 6S RNA an Ribosomen zu untersuchen wurde die Filterbindungsanalyse durchgeführt. Da Ribosomen aus vielen Proteinen und RNAs bestehen und damit auch ein sehr hohes Molekulargewicht besitzen laufen sie nicht in ein uns übliches Gel ein. Bei der Filterbindung bleiben Ribosomen mit/ohne gebundener 6S RNA an der Filterstruktur hängen und die nicht gebundene ³²P gelabelte 6S RNA wurde anschließend durch den Filter gewaschen. Die Filter, die die Ribosomen mit gebundener 6S RNA haben, zeigen im Szintilationszähler eine höhere Radioaktivität als ohne gebundener 6S RNA.

Die Filter (Membranfilter; 25mm Durchmesser; 0,45 µm) wurden vor gebrauch in Waschpuffer eingelegt und dann in die Vorrichtung (Filtertrichter; 3Piece Filter Funnel Compete Unit; 25 mm) geklemmt und unter Vakuum angesaugt. Die Bindung der 6S RNA und der Ribosomen erfolgte für 10 min bei 37 °C und anschließend wurde die Probe auf den Filter gegeben und mit eiskaltem Waschpuffer nachgespült. Um die Bindung zu begünstigen wurde zu der Probe Bindepuffer gegeben. Die Filter wurden unter Rotlicht getrocknet und im Szintilationszähler (Beckman LS 5000 TD) ausgewertet.

Waschpuffer:	50 mM NH ₄ Cl ₂
-	10 mM Magnesiumacetat
	10 mM Tris-HCL, pH 7,2
2x Bindepuffer:	40 mM Tris-HCL, pH 7,5
-	200 mM NH ₄ Cl ₂
20 mM MgCl₂ 20 mM β-Mercaptoethanol

5.3.13 Untersuchung von RNA – Protein Wechselwirkung mit den Adipic acid dihydrazide-Agarose Beads

5.3.13.1 In vitro RNA pull down

Bei dieser Methode sollte die RNA an eine stationäre Phase (Agarose Beads) gebunden werden, diese binden kovalent und fixieren die RNA. Die Proteine werden auf die ligandenbestückte Matrix gegeben und die gebundenen Proteine können so fixiert werden. Nach den Waschschritten wurden die gebundenen Proteine von der RNA gelöst.

Für den in vitro RNA pull down Versuch musste zuerst die RNA am 3'Ende mit Periodate (NaIO₄) oxidiert werden. Durch die Oxidation wurde der Zuckerring am 3'Ende der RNA irreversiebel aufgeschmolzen. Die Reaktion läuft im Dunkeln für 1 h bei RT ab und hat ein Endvolumen von 200 µl. Es wurden 500 pmol 6S RNA und 5 mM Periodate gelöst in 0,1 M NaOAc pH 5,0 zusammen pipettiert. Anschließend erfolgte eine RNA prezipitation mit EtOH (5.2.2.2). Das Pellet wurde in 100 µl 0,1 M NaOAc pH 5,0 gelöst. Um nun die dihydrazide-Agarose Beads an die oxidierte RNA zu koppeln, wurden die Beads zuvor 4 x mit 0,1 M NaOAc pH 5,0 gewaschen. Es wurden jeweils 1 ml zu den Beads (200 µl) gegeben, für 1 min bei 3000 rpm zentrifugiert (Hettich Zentrifuge Mikro 200R), anschließend 5-10 min. die Beads sinken lassen und daraufhin den Überstand verworfen und wiederholt. Nach dem Waschen wurden die Beads mit der RNA gemischt und über Nacht bei 4 °C im dunklen schüttelnd inkubiert. Am nächsten Tag wurde die RNA mit den gekoppelten Beads erneut gewaschen, dieses Mal jedoch immer bei 4 °C, 3 x mit 2M KCL und anschließend 3 x mit Puffer D. Die Beads mit der gebundenen RNA wurde mit 500 bis 750 µg Protein Rohextrakt (KS1), 1,5 mM MgCl₂ und RNasin (RNase inhibitor) in einem finalen Volumen von 500 µl 30 min bei RT rotierend inkubiert. Anschließend wurden die Beads mit der gebundenen 6S RNA und dem Protein 6x gewaschen. Jeweils 4x mit 400 µl Puffer D mit 1,5 mM MgCl₂ und 2x mit H₂O. Die Überstände nach den jeweiligen Waschschritten wurden auch gefällt und auf einem SDS-Gel kontrolliert.

Die Elution erfolgte über einen hochmolaren Salzpuffer. Es wurden 100 µl Elutions-Puffer zu der Probe gegeben und für 5 min inkubiert. Anschließend die Beads wieder zentrifugiert und den proteinhaltigen Überstand abgenommen und gefällt. Ja nach Wunsch mit TCA oder mit Aceton.

Puffer D:	20 mM Tris/HCL pH 7, 6 % (v/v) Glycerin 0,1 M KCL 0,2 mM EDTA 0,5 mM DTT	
Elutions-Puffer:	10 mM Hepes, pH 7 50 mM KCL 10 % Glycerin 1 mM EDTA 10 mM MgCl ₂ 1 mM DTT 1 M NaCl	

Sowohl der Durchfluss, als auch die Waschschritte und die Elution wurden auf einem SDS-Gel (5.2.7.4) bildlich dargestellt. Die gebundenen Proteine, in der Elutionsspur wurden aus dem Gel geschnitten und für die MALDI-TOF-MS Analyse vorbereitet.

5.3.13.2 Geleluation und Niedrigsalz-Probenvorbereitung von Proteinen

Bei dieser Gelelution von Proteinbanden aus SDS-Gelen wurden die Proben gleichzeitig für die folgende MALDI-TOF-MS Analyse vorbereitet. Zu Beginn wurden die Banden mit einem sterilen Skalpell scharf ausgeschnitten, in ein 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt und mit 750 μ l 30 % Acetonitril in 0,1 M Ammoniumhydrogencarbonat überschichtet. Dieses wurde bei RT 10 min. leicht geschüttelt und die Lösung abgehoben und den Schritt wiederholen. Das Gelstück wurde 20 min in einer Lyophylle getrocknet und mit 6 μ l 3 mM Tris-HCl (pH 8,8) + Trypsin (10 ng/ μ l Endkonzentration) rehydratisiert. Die Lösung wurde mit den Gelstückchen bei RT 30 min inkubiert und erneut 6 μ l 3 mM Tris-HCL (pH 8,8) zugegeben. Die Proben wurden über Nacht bei RT inkubiert. Anschließend wurden 10 μ l *Aqua dest.* zugegeben und erneut für 15 min. bei RT inkubiert. Es folgte noch eine Zugabe von 10 μ l 30 % Acetonitril (v/v) mit 0,2 % (v/v) Trifluressigsäure und eine weitere Inkubation für 10 min. bei RT. Die Proben konnten bei - 20 °C gelagert wurden.

5.3.14 Inaktivierung chromosomaler Gene nach Datsenko und Wanner

Bei dieser Methode (Datsenko and Wanner 2000) können chromosomale Gene inaktiviert werden, durch den Austausch mit einer Antibiotika-Kassette mittels eines Helferplasmids. Für die Inaktivierung wurde das Helferplasmid pKD46 verwendet, welches das ∂-Red-

Rekombinasesystem (*gam*, β und exo) aus dem ∂ Phagen trägt. Damit findet der Austausch mittels homologer Rekombination über FRT-Sequenzen statt und zusätzlich wird der Abbau von linearer DNA durch die Exonuklease der Zelle verhindert.

Zu Beginn wurden kompetente Zellen (5.2.12.2) des gewünschten Stammes, hier MG1655 hergestellt. Diese wurden mit dem Helferplasmid pKD46 transformiert und in flüssigem YT-Medium (4.5) angezogen und Glycerin-Stocks (5.1.4) angelegt.

5.3.14.1 Generierung der cat-Kassette mittels PCR

Zur Generierung der Chloramphenicol-Kassette wurden zunächst Primer so konstruiert, dass diese die FRT-Sequenzen, sowie die H1 und H2 Seqenzen beinhalten und flankierende Sequenzen des *pgk*-Gens. Durch das ∂ -Red-Rekombinasesystem kann durch homologe Recombination das PCR-Fragment, welche die angrenzenden Sequenzen des Zielgens beinhaltet ausgetauscht werden. Die PCR verläuft wie in 5.2.9.2 beschrieben.

5.3.14.2 Herstellung elektrochemisch kompertenter Zellen

Da das Helferplasmid pKD46 temperatursensitiv ist, kann keine Transformation mittels Hitzeschock bei 42 °C durchgeführt werden. Für diese Arbeiten wurde die Elektro-transformation verwendet. Hierbei wurden üN-Kulturen angelegt und am nächsten Tag 1:50 in 50 ml SOB-Medium (4.5) übergeimpft. Die Zellen wurden bei 30 °C, wegen des temperatursensitiven Plasmid (mit 10 mM L-Arabinose zur Aktivierung des ∂ -Red-Rekombinasesystem), bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 schüttelnd, wachsen lassen (Rundschüttler, New Brunswick Scientific Gio Gyrotory, ca. 200 rpm). Die Zelllösung wurde 15 min bei 4500 rpm und 4 °C (Heraeus Megafuge 1.0R) zentrifugiert und das Pellet vorsichtig in 50 ml eiskaltem 10 % Glycerin resuspendiert. Die gelösten Zellen wieder wie oben beschrieben zentrifugiert und in 12,5 ml Glycerin gelöst. Anschließend folgte eine weitere Zentrifugation und das Pellet wurde in 2 ml Glycerin geschwenkt und in 40 µl aliquotiert. Die Aliquots wurden in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -70 °C gelagert.

5.3.14.3 Transformation mittels Elektroporation

Die kompetenten Zellen wurden schnell aufgetaut und auf Eis gelagert, sowie die Elektrotransformations-Küvetten und Küvettenhalter. Die Zellen wurden mit 1-2 μ l (ca. 7,5 ng)

5. Methoden

DNA gemischt und für 1-2 min auf Eis gestellt. Die Zelllösung wurde in die Elektrotransformations-Küvette gegeben und das Programm (siehe unten) auf dem "Elektro Cell Manipulator 600" eingestellt. Nach Durchführung der Elektroporation wurde sofort 1 ml SOC-Medium (4.5) auf die Zellen gegeben und resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in ein steriles Eppendorfgefäß überführt und 1 Stunde bei 30 – 35 °C schüttelnd, inkubiert. Es wurden jeweils 200 μ l der Zellsuspension auf selektiven Agarplatten ausplattiert, hier bei dem Helferplasmid Ampicillin-Platten.

Choose mode:	Т	2,5 kV/Resistance High Voltage (HV)
Set Capacitance:	С	Not used in High Voltange Mode
Set Resistance:	R	R5 (129 ohms)
Chamber Gap:		BTX Disposable Cuvette p/N 620
Set charging Voltage:	S	2,5 kV
Desired Field Strength:		12,5 kV/cm
Desired Pulse Length:	t	5,1 msec

Einstellungen am Elektro Cell Manipulator 600:

5.3.15 Zellfärbung

Zu Beginn wurden die Stämme in YT-Medium (4.5) angezogen bis zur gewünschten Wachstumsphase, hier die logarithmische und stationäre Phase. Das Zellwachstum wurde spektralphotometrisch überwacht und bei der gewünschten Phase wurden 5 ml Kultur pelletiert (6000 rpm; 4°C; 10 min; Beckmann Coulture). Die Zellpellets wurden in der logarithmischen Phase in 500 µl PBS-Puffer (4.5) und in der stationären Phase in 2,5 ml PBS-Puffer gelöst. 0,5 ml DAPI (1 µg/ ml in 50 % Glycerin) und 3 µl Nilrot (0,5 mg/ml in DMSO) wurden in 2,5 ml PBS-Puffer resuspendiert und jeweils 100 µl zu 50 µl Zelllösung gegeben. Die Reaktionsgefäße mit den Zellen und der Färbelösung wurden für 10 min im Dunkeln inkubiert. In der Zwischenzeit wurde flüssige Agarose auf Objektträger getropft und ein zweiter Objektträger aufgelegt. Nachdem die Agarose ausgehärtet war, wurde der zweite Objektträger wieder entfernt und es konnten jeweils 4 µl der Zelllösung auf die feste Agarose pipettiert werden. Auf das Präparat wurde vorsichtig ein Deckglas gelegt. Die Zellen wurden mit dem Zeiss Mikroskop Axio Imager M2 visualisiert.

Der Farbstoff DAPI (4', 6 – Diamidin-2-phenylindol) lagert sich in die kleine Furche der DNA an und färbt diese so. Nilrot markiert die Zellwand, weil es sich an die lipophilen Proteine anlagert, die besonders in der Zellwand zu finden sind.

5.3.16 Enzymtest mit PGK

Die Enzymaktivität wurde spektralphotometrisch bei 340 nm, im Sekundentackt für 3 min bei 30 °C gemessen. In die Reaktion wurden 100 mM TEA-Puffer pH 7,4 (500 μ l / 200 mM), 1 mM EDTA pH 8,3 (10 μ l / 100 mM), 2 mM MgSO₄ (10 μ l / 200 mM), 1 mM ATP (40 μ l / 25 mM), 10 mM 3-PGA (40 μ l / 250 mM), 0,2 mM NADH (40 μ l / 5 mM), 10 U/ml GAPDH und 60 ng/ml PGK eingesetzt. Wobei das PGK in dem TEA-Puffer verdünnt wurde. Der Reaktionsansatz wurde auf 1 ml mit *Aqua dest*. aufgefüllt und die Reaktion mit der Zugabe von PGK gestartet. Die übrigen Reagenzien wurden bei 30 °C zusammen vorinkubiert für ca. 3-4 min. Die 6S RNA wurde in verschiedenen Konzentrationen hinzugegeben. Die gemessenen Werte wurden gegen die Zeit im Graphen aufgetragen.

6. Abkürzungsverzeichnis

GvO	gentechnisch veränderter Organismus
i. d. R.	in der Regel
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
λ	lambda (Wellenlänge)
mA	Milliampere
min	Minute
μ	Wachstumsreate
μg	Mikrogramm
μΜ	Mikromolar
mM	Millimolar
mol	Stoffmenge: 1 mol = 6 x 10^{23} Teilchen
mRNA	messenger RNA
gRNA	gesamt RNA
gProtein	gesamt Protein
PGK	Phosphoglycerakt Kinase
(E)PGK	Escherichia coli Phosphoglycerat Kinase
(C)PGK	Corynebacterium glutamaticum Phosphoglycerat Kinase
MW	Molekulargewichtsmarker
ng	Nanogramm
nM	Nanomolar
NaOAc	Natriumacetat
NS	Nukleinsäure
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
ori	Startpunkt
[³² P]	radioaktives Phosphorisotop
Р	Promoter
PAA	Polyacrylamid

140

PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PPi	Pyrophosphat
ppGpp	Guanosin-3',5' bispyrophosphat
pН	pH-Wert
RNA	Ribonukleinsäure
RNAP	RNA-Polymerase
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RP _C	geschlossener RNAP-Promoter-Komplex
RPo	offener RNAP-Promoter-Komplex
RP _{init}	ternärer Promoter I
rrn	ribosomale Transkriptionseinheit
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
S	Svedberg (Sedimentationskoeffizient)
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
ssNS	einzelsträngige Nukleinsäure
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N`,N`-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer-RNA
U	Unit(s) (Enzymeinheit)
UE	Untereinheit
üN	über Nacht
UV	ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche
/	
V/V	"volume per volume" (Volumenprozent)
V/V W	"volume per volume" (Volumenprozent) Watt
V/V W WT	"volume per volume" (Volumenprozent) Watt Wildtyp
V/V W WT w/v	"volume per volume" (Volumenprozent) Watt Wildtyp "weight per volume" (Gewichtsprozent)

7. Anhang

7.1 Tabellen für die Charakterisierung der Wechselwirkung von 6S RNA und Hfq

Tabelle 7.1: Wachstumskurve der Stämme BW25113 (Wildtyp) und JW4130 (Δhfq -Mutante)

Das Wachstum der Stämme wurde in YT-Medium mittels Streumessung bei einer Wellenlänge von 600 nm verflgt und in Abhängigkeit der Zeit aufgetragen (Abbildung 2.1). Es wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt und die Mittelwerte angegeben. Die hellblau unterlegten Bereiche zeigen die Phasen an, an denen Zellen geerntet wurden.

Zeit (min)	BW25113	JW4130
0	0,051	0,033
30	0,107	0,048
60	0,293	0,125
90	0,563	0,258
120	0,995	0,432
150	1,938	0,578
180	2,621	0,672
210	3,275	0,822
240	3,611	0,989
270	3,896	1,454
300	4,646	1,797
330	4,983	1,837
1385	4,822	2,877

Die Wachstumsraten wurden berechnet:

BW25113: lg (0,58) -lg (0,1085)/lg 2 (1) =2,418

JW4130 : $\lg (0,291) - \lg (0,0565)/\lg 2 (1) = 2,364$

Tabelle 7.2: Quantitative Auswertungen der 6S RNA Konzentration durch Primer Extension Analysen Analysen

Gezeigt sind die densiometrischen Auswertungen der Primer Extension Reaktionen mit den Primern c6S- und 6S-1. Als interner Standard wurde die 5S RNA verwendet. Es wurden drei unabhängige Versuche mit dem c6S Primer durchgeführt und vier unabhängige Versuche mit dem 6S-1 Primer. Die mittelwerte und Standartabweichungen sind angegeben. Exemplarisch sind zwei Autoradiogramme in Abbildung 2.4 und graphisch in Abb. 2.5 dargestellt.

Stämme	c6S Primer	SD	6S-1 Primer	SD
log. Phase WT	0,075	0,02	0,148	0,037
log. Phase ∆Hfq	0,106	0,05	0,224	0,032
stat. Phase WT	0,148	0,04	0,346	0,057
stat. Phase ∆Hfq	0,157	0,06	0,355	0,047

Tabelle 7.3: Quantitative Auswertung der *ssrS*-Syntheseaktivität durch Primer Extension Analysen

Gezeigt sind die densiometrischen Auswertungen der Primer Extension Reaktion mit dem cat-Primer und dem RNAI Primer als internen Standard. Das Autoradiogramm ist in Abbildung 2.6 gezeigt und das Diagramm in 2.7 dargestellt.

	P1
Stämme	Promotoraktivität
log. Phase WT	11,72
log. Phase ∆Hfq	4,97
stat. Phase WT	8,3
stat. Phase ∆Hfq	5,57

	P2
Stämme	Promotoraktivität
log. Phase WT	0,29
log. Phase ∆Hfq	0,24
stat. Phase WT	0,11
stat. Phase ∆Hfq	0,12

Tabbelle 7.4: Quantitative Auswertung der Rifampizin Kinetik durch Primer Extension Analyse

Gezeigt ist die densiometrische Auswertung des Primer Extension Versuchs aus Abbildung 2.8 mit der graphischen Darstellung in 2.9. Es wurde der cat-Primer und als interner Standard der RNAI Primer verwendet.

	JW4130		BW25113
Zeit (sek.)	Schwärzung	Zeit (sek.)	Schwärzung
0	54726	0	71968
1	45284	1	90869
5	52405	5	50605
20	41312	20	52123
35	24961	35	52133
50	18180	50	29103
65	12575	120	15126
120	2293	180	155

Tabelle 7.5: Quantitative Auswertung der hydroxylradikal Footprint Analysen mit der 6S RNA in An- und Abwesenheit von Hfq

Gezeigt sind die densiometrischen Auswertungen der einzelnen Bandenintensitäten der in Abbildung 2.12 gezeigten Footprint Analysen.

3' – End markierte 6S RNA

0 nM Hfq	83 nM Hfq	416 nM Hfq	833 nM Hfq
244840	615200	888880	675280
13689800	12757680	12589120	9023880
769440	195960	407000	358560
384040	672600	2748520	836160
2299920	1721800	856400	2019000
416240	253880	306520	347080
411840	1476280	333880	1728040
2033000	502480	1873560	634880
0	0	1317760	0
0	0	365880	0
779000	689640	776120	736520
0	0	1726360	0
1006280	1317360	763480	1261160
1448960	1243200	1627240	1306320
1391520	558760	467640	547200
655200	378200	3693680	483440
723520	2371640	5102600	2096760
3912600	431160	566360	478080
367480	0	2404200	0
2100400	4863080	5978160	6520960
1265040	29430320	25608120	30663320
19775680	0	7323960	0
2060240	4765920	3327080	5056680
3787960	3875240	468680	3836480
576440	330160	1387680	307880
2755160	3092960	2737360	3264720
427240	1095160	1027200	1235560
634040	1767000	222080	2382840
2470080	2215680	735400	2414800
1415760	498400	1114920	708600

5' – End markierte 6S RNA

0 nM Hfq	83 nM Hfq	416 nM Hfq	833 nM Hfq
1641156	1415964	1036497	1161930
1279245	1100088	507606	1248060
1388013	1710555	0	1938618
1089891	896478	797115	1009602
793551	755535	564861	716067
654786	0	654588	594825
887073	670065	686565	850707
5940000	1035672	1341549	4676595
477147	1266507	595089	438537
0	431046	1297857	362241
466620	657591	1440120	2950266
3461271	4851066	948354	592119
554994	1105500	3155724	855459
925122	1037685	5438103	889548
1170246	0	1042998	1016664
1593570	2946405	1055736	623502
713790	955779	2056263	1312905
0	1274130	925056	1751772
2009634	2585187	1070685	0
1105830	1514865	1010988	0
1122990	1169586	1457280	1111407
1347159	1379400	0	1003365
1728111	1965414	1380984	1572912
2115432	2539086	0	1529187
1732104	1954689	1473516	1254495
1209945	1686729	1135596	933537
1134342	1416822	1138467	1048146
1270797	1396065	1011120	1074480
963006	1169949	815496	999768
1265022	1243308	873147	1151007
1087482	1082235	834273	894828
976965	1316436	1020624	917994
966108	1114509	824406	913671
921756	576543	381744	1217634
1485759	970563	1104048	867405
417879	384813	402006	1116423
497541	1363395	514833	918885
1481535	1189089	1163745	340725

7. Anhang

1420716	398409	175494	4133910
1324851	152856	502689	150744
5327388	3601785	4820310	1169685
201036	677226	792429	341583
359931	13033713	14452185	14872308
13647843	1266804	1829091	1497738
2095995	353793	382239	2354913
3079461	107712	2114772	115962
13299	4218522	508398	4067250
5284620	2430153	2939772	517143
580008	1713129	5023590	1698510
1971750	224796	251559	429924
205095	215259	183909	192093
143946	200739	497112	213807
177144	407022	272613	227403
179289	477114	2376165	169653
186219	890472	1150314	2035770
2799918	1000857	1372998	841797
841896	2028147	993828	457479
508761	203643	179190	317625
307923	389334	377124	268158
716661	922284	428703	1422135
432300	324621	308682	199716
233442	452892	1120878	979704
448569	251196	186054	295977
1115928	179190	144837	243804
233310	164835	423192	194997
527934			209286
		-	-

Tabelle 7.6: Quantitative Auswertung des basalen ppGpp-Levels in An- und Abwesenheit von Hfq

Die Tabelle zeigt die Mittelwerte und berechneten Standartabweichungen der vier unabhängig voneinander durchgeführten Dünnschichtchromatographien der beiden Stämme und Wachstumsphasen. Da die Autoradiographien unterschiedlich starke Schwärzungsgrade hatten wurden sie in zwei Tabellen dargestellt. Die obere ist im Ergebnissteil graphisch gezeigt.

Stämme	Probe 1	Probe2	Mittelwerte	SD
ppGpp log. WT	0,115	0,091	0,10	0,017
ppGpp log. ∆Hfq	0,023	0,045	0,03	0,016
ppGpp stat. WT	0,375	0,404	0,39	0,021
ppGpp stat. ∆Hfq	0,114	0,162	0,14	0,034

Stämme	Gruppe A	Gruppe B	Mittelwerte	SD
ppGpp log. WT	0,21	0,204	0,21	0,004
ppGpp log. ∆Hfq	0,196	0,184	0,19	0,008
ppGpp stat. WT	0,347	0,364	0,36	0,012
ppGpp stat. ∆Hfq	0,296	0,294	0,30	0,001

Tabelle 7.7: Wachstumskurve der Stämme KS1 (ΔssrS) und MG1655 (isogener Wildtyp) Das Wachstum der Stämme wurde in YT-Medium mittels Streumessung bei einer Wellenlänge von 600 nm verflgt und in Abhängigkeit der Zeit aufgetragen. Es wurden jeweils in der logarithmischen- und stationären Phase 5 ml Zellen geerntet und mit DAPI und Nilrot gefärbt.

Zeit (min)	KS1	MG1655
0	0,041	0,033
30	0,09	0,074
60	0,3	0,232
90	0,494	0,443
150	1,38	1,322
180	2,558	2,569
210	3,073	3,403
240	3,554	4,078
270	3,967	4,447
300	4,499	5,019
1065	5,057	5,627

7.2 MALDI-TOF-Analysen und Plasmidkarte

(MATRIX) Mascot Search Results

Protein View

Match to: gi 16128297 Score: 41 Expect: 0.35 b0312 betB, betaine aldehyde dehydrogenase, NAD-dependent [Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655]				
Nominal mass (M _x): 53163 ; Calculated pI value: 5.19 NCBI BLAST search of <u>gill6128207</u> against nr Unformatted <u>sequence string</u> for pasting into other applications				
Taxonomy: <u>Escherichia coli K12</u>				
Fixed modifications: Carbamidomethyl (C) Variable modifications: Oxidation (M) Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P Number of mass values aearched: 43 Number of mass values matched: 5 Sequence Coverage: 23 %				
Matched peptides shown in Bold Red				
1 MSRMAEQQLY IHGGYTSATS GRIFETINPA NGNVLATVQA AGREDVDRAV 51 KSAQQQCKIM ASMTAMERARI ILERAVDILE ENDELAKLE TLDTGRAYSE 101 TSTVUTGA DVLEYNGLI PALEGOSIPL RETSFYVTRE FELOVAGIG 151 AMNYFIQIAL MKSAFALAGO NAMIFKPSKV TELTALKIAE IYSEAGLEDG 101 VFNVLGVGA ETGQVIETER GIAKSKVANS ASASSLEKEVT 251 MELGCKSPLI VFDDADLDLA ADIAMANFY SEGQVCTNEY VFVFAKCKA 301 AFGULIARV ERIKAGOVED FOTNEGU'S FEMRANVLKI IAKKEREGAR 352 VLCGGVLKG DGFDMGAWAA FTVFTDCSDD MTIVREEIFG FVMSILITES 101 DEVINGAND DYGLAAGU TADLANGIN MTIVREEIFG FVMSILITES 102 DEVINGAND DYGLAAGU TADLANGIN INTMGESPAE 451 MFVGGYKHSG IGREMOWIT, QSTTQVKSIQ VEMAKFQGIF				
Sort Peptides By				
Start - End Observed Mr(expt) Mr(sale) ppm Miss Sequence 52 - 63 1922,909 1921,936 1201,936 1201,936 1201,936 1201,936 1201,936 1 1 R. RAVDILR.E 74 - 80 842.5402 841.5329 841.5134 23 1 R. RAVDILR.E 188 - 224 3812.8064 3811.7992 3913,9309 -55 0 K.LEYTSEACPORFWILEGVGAETGQYLTEHPGIAK.V 257 - 291 3794.7704 3793.7274 9 0 K.SPLIVEDOKIDULADIADIAMENTFSSQUCTINGTR.V 2 0xidation (M) 458 - 477 2221.1224 2202.1251 2220.0957 1 1 K. HSGIGREWGWTLGSTYGVK.S 0 xidation (M)				
No match to: 832.3116, 834.3132, 854.2782, 864.5159, 1456.7172, 1475.7562, 1567.8802, 1707.7749, 1794.8672, 1802.0051, 1838.9257, 1861.				
25 0 -25 1000 2000 3000 4000 1000 4000 1000 Has (0)				

Abbildung 7.1 A: MALDI-TOF-Analyse der Bande bei 50 kDa

Die Daten der ausgeschnittenen Bande deuten auf das Protein BetT hin.



Abbildung 7.1 B: MALDI-TOF-Analyse der Bande bei 50 kDa Die Daten der ausgeschnittenen Bande deuten auf das Protein BetT hin.

(Marrix) Mascot Search Results				
Protein View				
Match to: gi[16128767 Score: 49 Expect: 0.049 b0799 dinG, ATP-dependent DNA helicase [Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655]				
Nominal mass (M _e): 82016 ; Calculated pI value: 7.62 NCBI BLAST search of <u>nil6128767</u> against nr Unformatted <u>sequence atring</u> for pasting into other applications				
Taxonomy: <u>Escherichia coli Kl2</u>				
Fixed modifications: Carbanidomethyl. (C) Variable modifications: Oxidation (M) Cleavage by Tryppin: cuts C-term side of KR unless next residue is P Number of mass values searched: 15 Number of mass values matched: 13 Sequence Coverage: 27%				
Matched peptides shown in Bold Red				
 MALTAALIKAD IAANTYKALGE GITPETERAF ORGALIADVAK TLAGEGGNIL ALEAFRYGVET ISVIJEGAI SAREGUTLEV ISTANALGE GITVEKEGUTLU SAREGUTUPE SAREGUTLU VISTANALGE GITVEKEGUTLU SAREGUTUPE SAREGUTUPE SAREGUTUP				
Start - End Observed Mr (calc) pm Miss Sequence 1 = B34.37 B33.384 B33.834 B33.834 B34.4860 -150 0 1 + = B34.37 B33.384 B33.4860 -150 0 NATTAALKA Oxidation (M) 1 - + B32.3245 B31.3172 B31.4086 100 0 K.TLAGEEOR.H 192 - 211 266.337 264.337 264.31726 60 2 K.ASCLMINCYYRECPFYAR.R 198 - 211 266.437 233.338.4263 465.1726 60 2 K.ASCLMINCYYRECPFYAR.R 198 - 211 2164.0435 1943.8447 42 1 R.NCYYNECPFYAR.R 198 - 211 1948.9435 1943.8342 265.1726 60 2 K.ASCLMINCYYRECPFYAR.R 198 - 211 1948.9435 1943.8342 265. FANCELPFYAR.R 1 R.NCYYNECPFYAR.R 198 - 211 1943.8447 42 1 R.NCYYNECPFYAR.R 1 R.NCYNECPFYAR.R 198 - - - R.MCHARCHTWCOTTREN.Y ROBERTYNECPFYAR.R 1 R.NCYNECPFYAR.R				

Abbildung 7.2 A: MALDI-TOF-Analyse der Bande etwas unterhalb von 45 kDa Die Daten der ausgeschnittenen Bande deuten auf das Protein DinG hin.



Abbildung 7.2 B: MALDI-TOF-Analyse der Bande etwas unterhalb von 45 kDa Die Daten der ausgeschnittenen Bande deuten auf das Protein DinG hin.

(MATRIX) Mascot Search Results

Protein View
Match to: gi[90111643 Score: 50 Expect: 0.043 b3708 tnaA, tryptophanase/I-cysteine desulfhydrase, PLP-dependent [Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655]
Nominal mass (M ₂): 53139 ; Calculated pI value: 5.88 NCBI BLAST search of <u>gi 5011643</u> against nr Unformatted <u>geauence string</u> for pasting into other applications
Taxonomy: <u>Escherichia coli Kl2</u>
Fixed modifications: Carbamidomethyl (C) Variable modifications: Oxidation (M) Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P Number of mass values searched: 56 Number of mass values matched: 9 Sequence Coverage: 22
Matched peptides shown in Bold Red
IMENTKILLEEP FEIRVIEEVIK ATTEAAVREEA IIKSOMMEEL LOBEDVIIDL IDBORGADOI'I DIAKREBO DAAYSOSISY YALAESIVATI GOOTIFFH GOORGADOI'I DIAKREBO TANDINGAD CANDERADI DAAYSONITY YALAESIVATI GOORGADOI'I DIAKREBO DAAYSOSISY YALAESIVATI GOOTIFFH GOORGADOI'I DIAKREBO TANDINGAD CANDERADI DAAYSONITY GOORGADAF YA DAAYSONITY YALAESIY GOORGADAF YA DAAYSONITY YA TAAYSONITY YA TAAYSONITY GOORGADAF YA TAAYSONITY YA TAAYSONITY YA TAAYSONITY YA TAAYSONITY GOORGADAF YA TAAYSONITY YA TAAYSONI
Start - End Observed Mr(calc) ppm Miss Sequence 6 -12 895.5461 894.5388 894.4712 76 0 K.H.PEPFRI 89 -103 1794.9769 1733.9696 1733.849 47 0 K.H.IFGYQYITPTHQGR.G 169 -178 1149.6189 1148.616 1148.5462 57 0 K.GMPDLEGLER.G 242 -25 1781.9501 1780.9428 1780.8631 45 1 R.EXEXTMOTIEQITR.E 318 -334 1970.0388 1994.9767 28 0 R.LAVGLIYOGANLDMLATK.I Oxidation (M) 393 -403 1161.7238 1180.7165 1160.6554 53 0 R.AVEIGREMERT.H 425 -404 1915.5551 1914.9478 1914.9186 50 0 R.AVTGYTMOPTIERFK.H
44 - 457 175.2550 174.3477 174.3122 18 1 K.EMMAINMAITTIEFK.V
75 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5 5

Abbildung 7.3 A: MALDI-TOF-Analyse der Bande etwas oberhalb von 45 kDa Die Daten der ausgeschnittenen Bande deuten auf das Protein TnaA hin.

(MATRIX) SCIENCE/ Mascot Search Results User Email Search title Database Timestamp Top Score : : Ecoli_Kl2_inHouse (4149 sequences; 1313480 residues) : 31 Aug 2012 at 16:17:40 GMT : 50 for gi/90111643, b3708 tnaA, tryptophanase/L-cysteine desulfhydrase, PLP-dependent (Escherichia coli str. K-12 sub: Probability Based Mowse Score Protein score is -10*Log(P), where P is the probability that the observed match is a random event. Protein scores greater than 49 are significant (p<0.05). 40 Probability Based Mouse **Concise Protein Summary Report** Format As Concise Protein Summary -Help Significance threshold p< 0.05 Max. number of hits 20 Re-Search All Search Unmatched gil9011643 Mass: 53139 Score: 50 Expect: 0.043 Queries matched: 9 b3708 tnaA, tryptophanase/L-cysteine desulfhydrase, PLP-dependent [Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655] gil90111695 Mass: 19832 Score: 18 Expect: 74 Queries matched: 2 b3472 dcrB, periplasmic protein [Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655] gil16131004 Mass: 25234 Score: 16 Expect: 1e+002 Queries matched: 2 b4078 yjc0, conserved protein [Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655] 1. dil16128406 Mass: 32368 Score: 27 Expect: 8.1 Queries matched: 3 b0421 ispA, geranyltranstransferase (Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655] <u>dil16130776</u> Mass: 33164 Score: 16 Expect: 97 Queries matched: 2 b2874 yqeA, predicted amino acid kinase (Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655) 2. di49176235 Mass: 45232 Score: 26 Expect: 11 Queries matched: 5 b2530 isc5, cysteine desulfurase (tRNA sulfurtransferase), PLP-dependent [<u>gi16132174</u> Mass: 7838 Score: 20 Expect: 41 Queries matched: 2 b4533 yilX, conserved protein [Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655] з. [Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655]

Abbildung 7.3 B: MALDI-TOF-Analyse der Bande etwas oberhalb von 45 kDa Die Daten der ausgeschnittenen Bande deuten auf das Protein TnaA hin.

(SCIENCE) Mascot Search Results

User : Email : Search title : Database : Ecoli_K Timestamp : 2 Jul 2 Top Score : 140 for	112_inHouse (4149 sequences; 1313480 residues) 013 at 12:45:46 GWT :gi 16130827, b2926 pgk, phosphoglycerate kinase [Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655]
Probability Based Mowse	Score
Protein score is -10*Log(P), we Protein scores greater than 49 a	here P is the probability that the observed match is a random event. are significant ($p<0.05$).
stills	100 150 Probability Based Rowse Score
Concise Protein Summary	v Report
Format An	
Concise Protein	
Significance in	reshold pc 10.00 Max. number of hits 120
Re-Search All Searc	h Unmatched
 <u>sill6130827</u> Mass. b2926 pgk, phosphog <u>sill6120021</u> Mass. b1058 yce0, predict <u>sill45688297</u> Mas b2448 yff0, cPZ-55 <u>sil226524714</u> Mas b1449 yncB, predict <u>sill6130828</u> Mass. b2922 yggE, conser- <u>sill6130350</u> Mass. b2160 yeil, predict <u>sill6130350</u> Mass. b2425 cysP, thiosu <u>sill6133350</u> Mass. b3223 bgl6, transco b3723 bgl6, transco 	<pre>: 41264 Score: 140 Expect: 4.1e-011 Queries matched: 12 plycerate kinase [Escherichia coli str. K-12 substr. MGI655] s: 5893 Score: 29 Expect: 5.1 Queries matched: 2 ed protein [Escherichia coli str. K-12 substr. MGI655] ss: 13981 Score: 26 Expect: 12 Queries matched: 2 prophage; predicted protein [Escherichia coli str. K-12 substr. MGI655] ss: 33781 Score: 20 Expect: 43 Queries matched: 2 ed oxidoreductase, Zn-dependent and NAD(P)-binding [Escherichia coli str. K-12 substr. MGI655] ss: 26619 Score: 20 Expect: 43 Queries matched: 2 ed protein [Escherichia coli str. K-12 substr. MGI655] ss: 40027 Score: 19 Expect: 56 Queries matched: 2 ed fortein [Escherichia coli str. K-12 substr. MGI655] ss: 37591 Score: 16 Expect: 9 Queries matched: 2 ifate transporter subunit [Escherichia coli str. K-12 substr. MGI655] ss: 36675 Score: 16 Expect: 1e+002 Queries matched: 2 ss: 36675 Score: 15 Expect: 1e+002 Queries matched: 2 ss: 3264 Score: 15 Expect: 1.2e+002 Queries matched: 2 ss: 3284 Score: 15 Expect: 1.2e+002 Queries matched: 2 ss: 3284 Score: 15 Expect: 1.2e+002 Queries matched: 2 ss: 3284 Score: 15 Expect: 1.2e+002 Queries matched: 2 ss: 3284 Score: 15 Expect: 1.2e+002 Queries matched: 2 ss: 3284 Score: 15 Expect: 1.2e+002 Queries matched: 2 ss: 3284 Score: 15 Expect: 1.2e+002 Queries matched: 2 ss: 3284 Score: 15 Expect: 1.2e+002 Queries matched: 2 ss: 3284 Score: 15 Score: 15 Expect: 1.2e+002 Queries matched: 2 ss: 3284 Score: 15 Sc</pre>

Abbildung 7.4 A: MALDI-TOF-Analyse der Bande etwas oberhalb von 45 kDa Die Daten der ausgeschnittenen Bande deuten auf das Protein PGK hin.



Abbildung 7.4 B: MALDI-TOF-Analyse der Bande etwas oberhalb von 45 kDa Die Daten der ausgeschnittenen Bande deuten auf das Protein PGK hin.



Abbildung 7.4 C: MALDI-TOF-Spectra Report der Bande etwas oberhalb von 45 kDa Die Daten der ausgeschnittenen Bande deuten auf das Protein PGK hin.

User					
Email					
Search title					
MS data file	: 130618_TinoPolen_100µ1_RT_5bis40min.tmp				
Database	Ecoli_K12_inHouse (4149 sequences; 1313480 residues)				
Timestamp	28 Jun 2013 at 10:21:37 GMT				
Protein hits	gi 16131218 b3339 tufA, protein chain elongation factor EF-Tu (duplicate of tufB) [Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655]				
	<u>g1 161280088</u> b0014 dnak, chaperone Hsp70, co-chaperone with DnaJ [Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655]				
	g loizsibe boles yaek, conserved protein [Escnerichia coli str. K-12 substr. Noi655]				
	gi loisoozi bzyzo pyk, prosphojiyerate kinase [Escherichia coli str. k-12 substr. Moloos]				
	GAT 16120009 DU015 dnaJ, Chaperone HSP4U, CO-Chaperone With Dhak [Escherichia Coll Str. K-12 Substr. MG1655]				
	gi 161344 h 3984 rpla 505 ribosomal submit protein Li (Pecharichia coli etr. K-12 substr. MG1655)				
	di 16124850 h0882 clna. ATPase and specificity subunit of Clna-ClnP ATP-dependent series protease, chaperone activity [Escherichia coli str.				
	di 16131770 b3932 hsly, peptidase component of the Hsluy protesse [Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655]				
	gi 16131220 b3341 rpsG, 30S ribosomal subunit protein S7 [Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655]				
	gi 16131182 b3303 rpsE, 30S ribosomal subunit protein S5 [Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655]				
	gi 16131830 b4000 hupA, HU, DNA-binding transcriptional regulator, alpha subunit [Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655]				
	gi 16128178 b0185 accA, acetyl-CoA carboxylase, carboxytransferase, alpha subunit [Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655]				
	gi 90111643 b3708 tnaA, tryptophanase/L-cysteine desulfhydrase, PLP-dependent [Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655]				
	gi 16128017 b0023 rpsT, 30S ribosomal subunit protein S20 [Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655]				
	gi 16131813 b3983 rplK, 50S ribosomal subunit protein L11 [Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655]				
	gi l6128421 b0436 tig, peptidyl-prolyl cis/trans isomerase (trigger factor) [Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655]				
	gi 16131183 b3304 rplR, 505 ribosomal subunit protein L18 [Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655]				
	g 16128162 b01/0 tsr, protein chain elongation factor EF-18 [Escherichia coli str. k-12 substr. MG1655]				
	G [16131566 b4143 group, Conot chaperonin Group, Large Suburit of Groups [Escherichia coli Str. K-12 Substr. MG1655]				
	g_1 10120102 b0/27 sucb, diligatori populations declinate (associated out and the relation of the relation				
	gi 16131282 bid5 om B DNA-binding remainder in two-component regulatory system with FuZ (Fecherichia coli art K-12 substr MG16)				
	ai 16131057 b3165 rps0, 308 ribsomal submit protein S15 [Escherichi coli coli coli coli Milli milli milli milli coli coli coli coli coli coli coli				
	gi 16131769 b3931 hslu, molecular chaperone and ATPase component of Hsluv protease (Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655)				
	gi 16129138 b1175 minD, membrane ATPase of the MinC-MinD-MinE system [Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655]				
	gi 16131199 b3320 rplC, 50S ribosomal subunit protein L3 [Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655]				
	gi 90111384 b2096 gatY, D-tagatose 1,6-bisphosphate aldolase 2, catalytic subunit [Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655]				
	gi 221800783 b4200 rpsF, 30S ribosomal subunit protein S6 [Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655]				
	gi 16130091 b2153 folE, GTP cyclohydrolase I [Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655]				
	gi 16131494 b3623 waaU, lipopolysaccharide core biosynthesis [Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655]				
	gi 16128425 b0440 hupB, HU, DNA-binding transcriptional regulator, beta subunit [Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655]				
	gi 16130343 b241/ crr, glucose-specific enzyme IIA component of PTS [Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655]				
	116130331 D2010 III, Signal Recognition ratione (orr) component with 4.55 KRA (IIS) [ESCHERICHA COll Str. K-12 SUBST. MG1055]				
	$\frac{1}{1}$ 161037 bills mill coll division tonological engificient factor (Ferharishis coll str. K-12 substr. Mc1655)				
	di 16131812 b3982 nuss, terascription termination factor [Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655]				
	ai 16128606 b0623 cspE, DNA-binding transcriptional repressor (Escherichia coli str. K-12 substr. W61655)				
	gi 16131076 b3186 rplU, 508 ribosomal subunit protein L21 (Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655)				
	gi 16128091 b0098 secA, preprotein translocase subunit, ATPase [Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655]				

(MATRIX) Mascot Search Results

Abbildung 7.5: LC-MS-Analyse der in vitro pull down Eluate

Die Analyse weist eine Ansammlung von möglichen Proteinen auf, die peptidweise in dem Eluat gefunden wurden.



Abbildung 7.6: Gezeigt ist die Karte des konstruierten Plasmids

Aus dem Plasmid pHis6-TEV-cas1 wurde die *cas1* Genregion herausgeschnitten und durch die *pgk* Gensequenz als PCR-Produkt eingefügt. Das Plasmid trägt eine *Ampicillinresistenz*-Gen (bla) und den lacI Promotor.





Die Abbildung zeigt eine Retardierungsanalyse mit ansteigender Menge an PGK und gleichbleibender Menge an ssDNA. Es ist keine Komplexbande zu erkennen.

Tabelle 7.8: Quantitative Auswertung der Hydroxylradikal Footprint Analysen mit der 6SRNA in An- und Abwesenheit von PGK

Gezeigt sind die Image Reporte der einzelnen Bandenintensitäten der in Abbildung 2.28 gezeigten Footprint Analysen.

10 µM PGK	5 μM PGK	0 μM PGK
312156	987156	420948
860616	1368072	268236
0	1464804	885528
223920	1876032	569988
1387116	589104	398160
0	0	1665252
908568	2591388	266832
0	455508	501732
0	4503060	2278764
0	0	1119492
399024	2322108	966852
0	320688	962964
944784	1337688	617688
663120	821304	379188
5545404	429084	1413036
1252224	685116	879624
771120	224820	872460
2603412	4438980	2125656
2364660	444384	422064
2139372	2309868	727524
1934964	3603204	784908
693864	32957784	23694444
31507164	3702420	1426752
1559772	2764008	2570832
1008648	468684	579060
538200	1795968	1530000
1670256	2093904	1463400
187056	401004	175212
396864	3102768	801036
1462716	841536	1773036
306504	1039176	792180

3' – End markierte 6S RNA

5' – End markierte 6S RNA

0 μM PGK	5 μM PGK	10 µM PGK
1022528	591104	1677792
2017056	0	0
1241440	1410080	548544
727456	454016	692160
1388384	769600	660736
854976	831456	541472
1146944	416544	0
1192832	918144	0
931776	826752	670944
1544768	874304	282144
1117824	2139520	743520
5008992	1204512	317376
1480480	0	0
3209952	1107616	0
1220320	3764032	0
1756896	861280	0
1586464	1071136	0
1498560	0	0
2105440	0	0
3099328	828928	0
2089888	826560	0
3270880	1213440	0
1532704	1698688	0
1341184	1215232	404896
2150304	2352128	567488
1269504	673184	711040
1516640	1578176	558432
1228704	655616	1128416
1271776	1043648	1853728
628192	819904	1236096
791040	617024	1058080
377440	654688	580736
390528	490752	1852256
4139136	892320	903520
118336	220704	1330080
1337088	2796704	665952
1396512	545472	903776
2319840	1026880	373664

7. Anhang

I		
4802400	462784	921248
839328	9511136	852096
1682496	179584	300096
4478432	1067072	2398912
3191648	3384640	354240
1616800	2025568	8492512
683136	1110176	1314272
470624	987680	770176
2118912	704832	2774944
965696	651744	969760
825824	642880	892096
1390848	256480	542528
580160	402944	1621248
1099424	317568	612160
185888	778752	2704000
1001760	291648	1412448
272256	132832	627872
205248	762304	1724544
109248	69696	275552
231168	119616	970752
311936	272640	279488
141184	79808	494400

7. Anhang



Abbildung 7.8 SDS Gel der Ribosomenaufreinigung

Das Gelbild zeigt die aufgereinigten Ribosomen in zwei unterschiedlichen Konzentrationen. Links ist ein Protein Molekularmarker aufgetragen.

8. Literaturverzeichnis

Ali Azam, T., Iwata, A., Nishimura, A., Ueda, S. and Ishihama, A. (1999). "Growth phasedependent variation in protein composition of the Escherichia coli nucleoid." J Bacteriol. **181**(20):6361-70.

Arluison, V., Hohng, S., Roy, R., Pellegrini, O., Regnier, P. and Ha, T. (2007). "Spectroscopic observation of RNA chaperon activities of Hfq in post-transcriptional regulation by a small non-coding RNA." Nucleic Acids Res. **35**(3):999-1006.

Artsimovitch, I., Patlan, V., Sekine, S., Vassylyeva, M. N., Hosaka, T., Ochi, K., Yokoyama, S. and Vassylyev, D. G. (2004). "Structural Basis for Transkription Regulation by Alarmone ppGpp." Cell **177**(3): 299-310.

Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, KA., Tomita, M., Wanner, BL. and Mori, H. (2006). "Construction of Escherichia coli K-12 in-frame, single-gene knochout mutants: the Keio collection." Mol Syst Biol. **2006**(2):2006-0008.

Baker, NA., Sept, D., Joseph, S., Holst, MJ. and McCammon, JA. (2001). " Elektrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome." Proc Natl Acad Sci USA **98**(18):10037-41.

Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, PB. and Steitz, TA. (2000). "The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 A resolution." Science. **289**(5481):905-20.

Baracchini, E. and Bremer, H. (1988). "Stringent and growth control of rRNA synthesis in *Escherichia coli* are both mediated by ppGpp." J Biol Chem. **263**: 2597-2602

Barrick, JE., Sudarsan, N., Weinberg, Z., Ruzzo, WL. And Breaker, RR. (2005). "6S RNA is a widespread regulator of eubacterial RNA polymerase that resembles an open promoter." RNA. **11**(5):774-84.

Barrnett, RJ. And Palade, GE. (1958). "Application of histochemistry to electron microscopy." J Histochem Cytochem. **6**(1):1-12.

Beckmann, BM., Grünweller, A., Weber, MH. And Hartmann, RK. (2010). "Northern blot detection of endegenous small RNAs (approximately14 nt) in bacterial total RNA extracts." Nucleic Acids Res. **38**(14):e147.

Beidler, J. L., P. R. Hillard and R. l. Rill (1982). "Ultrasensitive staining of nucleic acids with silver." Analytical. Biochem. **126**: 374-380.

Blattner, F. R., G. Plunkett III, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J.ColladoVides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau and Y. Shao (1997). "The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12." Science **277**: 1453-1462.

Boelens, R. and Gualerzi, CO. (2002). "Structure and function of bacterial initiation factors." Curr Protein Pept Sci. 3(1):107-19.

Bohn, C., Rigoulay, C., Chabelskaya, S., Sharma, CM., Marchais, A., Skorski, P., Borezee-Durant, E., Barbet, R., Jacquet, E., Jacq, A., Gautheret, D., Felden, B., Vogel, J. and Bouloc, P., (2010). "Experimental discovery of small RNAs in Staphylococcus aureus reveals a riboregulator of central metabolism." Nucleic Acids Res. **38**(19):6620-6636.

Brescia, CC., Mikulecky, PJ., Feig, AL. And Sledjeski, DD., (2003). "Identification of the Hfqbinding site on DsrA RNA: Hfq binds without altering DsrA secondary structure." RNA. **9**(1):33-43.

Brown, J. W. and J. C. Ellis (2005). Comparative analysis of RNA secondary structures: 6S RNA. Weinheim, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.

Brownlee, G. G. (1971). "Sequence of 6S RNA of *E. coli*." Nat New Biol 229(5): 147-9.

Cammack, KA. and Wade, HE. (1965). "The sedimentation behaviour of ribonuclease-active and –inactive ribosomes from bacteria." Biochem. **96**(3):671-80.

Cashel, M. and K. E. Rudd (1987). "The stringent response." in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology. F. C. (Neidhardt, Ingraham, J. L., Low, K. B., Magasanik, B., Schaechter, M. and Umbarger, H. e. eds.) Washington, DC, ASM Press: 1410-1438.

Cashel, M. and Gentry, DR., (1996). "Mutational analysis of the Escherichia coli spoT gene identifies distinct but overlapping regions involved in ppGpp synthesis and degradation" Mol Microbiol **19**(6):1373-84.

Cavanagh, AT., Sperger, JM. and Wasserman, KM. (2012). "Regulation of 6S RNA by pRNA synthesis is required for efficient recovery from stationary phase in E. coli and B. subtilis." Nucleic Acids Res. **40**(5):2234-46.

Chae, H., Han, K., Kim, KS., Park, H., Lee, J. and Lee, Y. (2011). "Rho-dependent termination of ssrS (6S RNA) transcription in Escherichia coli: implication for 3'processing of 6S RNA and expression of downstram ygfA (putative 5-formyl-tetrahydrofolate cyclo-ligase)." J Biol Chem. **286**(1):114-22.

Chant, EL and Summers, DK. (2007). "Indole signalling contributes to the stable maintenance of Escherichia coli multicopy plasmids." Mol Microbiol. **63**(1):35-43.

Chen, SF., Huang, YP., Chen, LH., Hsu, YH. and Tsai, CH. (2013). "Chloroplast Phosphoglycerat Kinase is involved in the targeting of Bomboo mosaic virus to chloroplasts in Nicotiana benthamiana plants." Plant Physiology. **8**(6):e68393.

Datsenko, KA. and Wanner, BL. (2000). "One-Step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products." Proc Natl Acad Sci USA. **97**(12):6640-6645.

Edwards, K. and Kössel, H. (1981). "The rRNA operon from zea mays chloroplasts: nucleotide sequence of 23S rDNA ans its homology with E. coli 23S rDNA." Nucleic Acids Res. 9(12):2853-69.

Espinoza, CA., Allen, TA., Hieb, AR., Kugel, JF. and Goodrich, JA. (2004). "B2 RNA binds directly to RNA polymerase II to repress transcript synthesis." Nat Struct Mol Biol. **11**(9):822-829.

Estrem, S. T., T. Gaal, W. Ross and R. L. Gourse (1998). "Identification of an UP element consensus sequence for bacterial promoters." Proc Natl Acad Sci USA. **95**(17): 9761-6.

Faucher, SP., Friedlander, G., Livny, J., Margalit, H. and Shuman, HA. (2010). "Legionella pneumophila 6S RNA optimizes intracellular multiplication." Proc Natl Acad Sci USA. **107**(16):7533-8.

Fellner, P. and Sanger, F. (1968). "Sequence analysis of specufic areas oft he 16S and 23S ribosomal RNAs." Nature. **219**(5151):236-8.

Franez de Fernandez, MT., Eoyang, L. and August, JT. (1968). "Factor fraction required fort the synthesis of bacteriophage Qbeta-RNA." Nature. **219**(5154):588-90.

Geißen, R. (2011). "Analyse der physiologischen Rolle der 6S RNA aus *Escherichis coli* und Vergleich der molekularen Mechanismen zwischen 6S RNAs aus *E. coli* und *Cyanobakterien.*" Dissertation, Physikalische Biologie, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.

Gildehaus, N. (2001). "Strukturelle und funktionelle Charakterisierung der 6S RNA aus E. coli und ihre Beteiligung an der Ausbildung eines Transkriptionskomplexes." Diplomarbeit, Physikalische Biologie, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.

Gildehaus, N., T. Neusser, R. Wurm and R. Wagner (2007). "Studies on the function of the riboregulator 6S RNA from E. coli: RNA polymerase binding, inhibition of in vitro transcription and synthesis of RNA-directed de novo transcripts." Nucleic Acids Res. **35**(6): 1885-96.

Griffin, BE. and Baillie, DL. (1973). "Precursors of stable RNA accumulated in a mutant of E. coli." FEBS Lett. **34**(2):273-9.

Hanahan, D. (1985). Techniques for transformation of *Escherichia coli*. Oxford, Washington DC, IRL Press.

Hillen, W., R. D. Klein and R. D. Wells (1981). "Preparation of milligram amounts of 21 deoxyribonucleic acid restriction fragments." Biochemistry. **20**(13): 3748-56.

Hindley, J. (1967). "Fractionation of 32P-labelled ribonucleic acids on polyacrylamide gels and their characterization by fingerprinting." J Mol Biol. **30**(1): 125-36.

Ho, MY., Tang, SJ., Wailap, VN., Yang, W., Leu, SJJ., Lin, YC., Feng, CK., Suung, JS and Sun, KH. (2010). "Nucleotide-binding domain of phosphoglycerat kinase 1 reduces tumor growth by suppressing COX-2 expression." Cancer Science. **101**(11):2411-2416.

Hüttenhofer, A. and Noller HF., (1992). "Hydroxylradical cleavage of tRNA in the ribosomal P site." Proc Natl Acad Sci USA. **89**(17):7851-5.

Ikehara, K., Okamoto, M. and Sugae, K. (1981). "Induction of Bacillus subtilis sporulation by Decoyinine and the concomitant Disappearance of ppGpp in vegetative cells." J. Biochem. **91**(3):1089-1092.

Ishihama, A. (1999). "Modulation of the nucleoid, the transcription apparatus, and the translation machinery in bacteria for stationary phase survival." Genes Cells. **4**(3): 135-43.

Jeanguenin, I., Lara-Nunez, A., Pribat, A. and Mageroy, MH. (2010) "Moonlighting glutamate formiminotransferases can functionally replace 5-formyltetrahydrofolate cycloligase" J Biol Chem. **285**(53):41557-66

Kràsny, L. and Gourse, RL. (2004). "An alternative strategy for bacterial ribosome synthesis: Bacillus subtilis rRNA transcription regulation." EMBO. **23**(22):4473-83.

Krämer, R. and Jung, K., (2010). "Bacterial Signaling" WILEY-VCH Verlag Wagner, R., "ppGpp Signaling" 395-414

Kim, K. S. and Y. Lee (2004). "Regulation of 6S RNA biogenesis by switching utilization of both sigma factors and endoribonucleases." Nucleic Acids Res. **32**(20): 6057-68.

Komine, Y., Kitabatake, M., Yokogawa, T., Nishikawa, K., Inokuchi, H. (1994). "A tRNA-like structure is present in 10Sa RNA, a small stable RNA from Escherichia coli." Proc Natl Acad Sci USA. **91**(20): 9223-7.

Korzheva, N., A. Mustaev, M. Kozlov, A. Malhotra, V. Nikiforov, A. Goldfarb and S. A. Darst (2000). "A structural model of transcription elongation." Science. **289**(5479): 619-625.

Kugel, J. F. and J. A. Goodrich (2007). "An RNA transcriptional regulator templates its own regulatory RNA." Nat Chem Biol. **3**(2): 89-90.

Lalaouna, D., Simoneau-Roy, M., Lafontaine, D. and Massè E (2013). "Regulatory RNAs ans target mRNA decay in prokaryotes." Biochim Biophys Acta. **1829**(6-7):742-7.

Lee, S. Y., S. C. Bailey and D. Apirion (1978). "Small stable RNAs from *Escherichia coli*: evidence for the existence of new molecules and for a new ribonucleoprotein particle containing 6S RNA." J Bacteriol. **133**(2): 1015-23.

Li, Z., S. Pandit and M. P. Deutscher (1998). "3' exoribonucleolytic trimming is a common feature of the maturation of small, stable RNAs in *Escherichia coli*." Proc Natl Acad Sci USA **95**(6): 2856-61.

Liebig, B. and R. Wagner (1995). "Effects of different growth conditions on the *in vivo* activity of the tandem *Escherichia coli* ribosomal RNA promoters P1 and P2." Mol. Gen. Genet. **249**(3): 328-335.

Loh, E., Dussurget, O., Gripenland, J., Vaitkevicius, K., Tiensuu, T., Mandin, P., Repoila, F., Buchrieser, C., Cossart, P. and Johansson, J. (2009). "A trans-acting riboswitch controls expression of the virulence regulator PrfA in Listeria monocytogenes." Cell. **139**(4):770-9.

Lund, E. and No. Kjeldgaard (1972). "Metabolism of guanosine tetraphosphate in *Escherichia coli*" J Biochem. **28**(3)316-26.

Maniatis, T., E. F. Fritsch and J. Sambrook (1982). Molecular cloning: A laboratory manual. New York, Cold Spring Harbor.

Mariner, PD., Walters, RD., Espinoza, CA., Drullinger, LF., Wagner, SD., Kugel, JF. and Goodrich, JA. (2008). "Human Alu RNA is a modular transacting repressor of mRNA transcription during heat shock." Mol Cell. **29**(4):499-509.

McCullen, Ca., Benhammou, JN., Majdalani, N. and Gottesman, S. (2010). "Mechanism of positive regulation by DsrA and RprA small noncoding RNAs: pairing increases translation and protects rpoS mRNA from degradation." J. Bacteriol. **192**(21):5559-71.

Mikulecky, PJ., Kaw, MK., Brescia, CC., Takach, JC., Sledjeski, DD. And Feig, AL. (2004). "Escherichia coli Hfq has distinct interaction surfaces for DsrA, rpoS and Poly(A) RNAs." Nat Struct Mol Biol. **11**(12):1206-14.

Moll, I. and Bläsi, U. (2002). "Differential inhibition of 30S and 70S translation initiation complexes on leaderless mRNA by kasugamycin." Biochem Biophys Res Commun. **297**(4):1021-1026.

Moll. I., Leitsch, D., Steinhauser, T. and Bläsi, U. (2003). "RNA chaperone activity of the Smlike Hfq protein." EMBO. 4(3):284-9.

Nellemann, LJ., Holm, F., Atlung, T. and Hansen, FG. (1988). "Cloning and characterization of the Escherichia coli phosphoglycerat kinase (pgk) gene." Gene. **77**(1989):185-191.

Neußer, T. (2008). "Untersuchung zur Expression, Stabilität und Funktion der regulatorischen 6S RNA von E. coli." Dissertation, Physikalische Biologie, Heinrich-Heine-Universität , Düsseldorf.

Neußer, T., N. Gildehaus, R. Wurm and R. Wagner (2008). "Studies on the expression of 6S RNA from E. coli: involvement of regulators important for stress and growth adaptation." Biol Chem **389**(3): 285-97.

Neußer, T., T. Polen, R. Geißen and R. Wagner (2010). "Depletion of the non-coding regulatory 6S RNA in E. coli causes a surprising reduction in the expression of the translation machinery." BMC Genomics. **11**(11):165.

Nielsen, JS., Boggild, A., Andersen, CB., Nielsen, G., Boysen, A., Brodersen, DE. and Valentin-Hansen, P., (2007). "An Hfq-like protein in archaea: crystal structure and functional characterization of the Sm protein from Methanococcus jannaschii." RNA **13**(12):2213-23.

Nissen, P., Thirup, S., Kjeldgaard, M. and Nyborf, J. (1999). "The cristal structure of Cys-tRNACys-EF-Tu-GDPNP reveals general and specific features in the ternary complex and in tRNA." Structure. 7(2):143-56.

Nudler, E., I. Gusarov, E. Avetissova, M. Kozlov and A. Goldfarb (1998). "Spatial organization of transcription elongation complex in *Escherichia coli*." Science. **281**(5375): 424-428.

Nudler, E. and A. S. Mironov (2004). "The riboswitch control of bacterial metabolism." Trends Biochem Sci. **29**(1): 11-7.

Olsen, AS., Moller-Jensen, J., Brennan, RG. and Valentin-Hansen, P. (2010). " C-terminally truncated derivatives of Escherichia coli Hfq are proficient in riboregulation." J Mol Biol. **404**(2):173-82.

Pahlke, Jennifer, (2014). Dissertation im IBG-1 des Forschungszentrum Jülich.

Pappenfort, K., Bouvier, M., Mika, F., Sharma, CM. And Vogel, J. (2010). "Evidence for an autonomous 5'target recognition domain in an Hfq-associated small RNA." Proc Natl Acad Sci USA. **107**(47):20435-40.

Platt, T. (1994). "Rho and RNA: models for recognition and response." Molecular Microbiology. **11**(6): 983-990.

Ramakrishnan, V. (2002). "Ribosome structure and the mechanism of translation." Cell. **108**(4):557-572.

Record, MT., Reznikoff, WS., Craig, LM., McQuade, KL. and Schlax, PJ. (1996). *Escherichia coli* RNA polymerase ($E\sigma^{70}$), promoters, and the kinetics of the steps of transcription initiation. Washington, D. C., ASM Press.

Rediger, A., Geissen, R., Steuten, B., Heilmann, B., Wagner, R. and Axmann, IM. (2012). "6S RNA – an old issue became blue-green." Microbiology. **158**(10):2480-91.

Richardson, J. P. (1993). "Transcription termination." Critical Reviews in Biochemistry and - Molecular Biology **28**(1):1-30.

Richter, D., (1980). "Uncharged tRNA Inhibits Guanosin 3',5'-Bis (Diphosphate) 3'Pyrophosphohydrolase (ppGppase), the *spoT* Gene Product, from *Escherichia coli*." Molec. Gen. Genet. **178**(2): 325-327

Roberts, C. W. and J. W. Roberts (1996). "Base-specific Recognition of the nontemplate strand of promoter DNA by the *E. coli* RNA polymerase." Cell. **86**(3): 495-501.

Robinson, KE., Orans, J., Kovach, AR., Link, TM. and Brennan, RG. (2014). "Mapping Hfq-RNA interaction surfaces using tryptophan fluorescence quenching." Nucleic Acids Res. **42**(4):2736-49.

Ryals, J., Little, R. and Bremer, H. (1982). "Control of RNA synthesis in Escherichia coli after a shift to higher temperature." J Bacteriol. **151**(3): 1425-32.

Schickor, P. and Heumann, H., (1994). "Hydroxyl radical footprinting." Methods Mol Biol. **30**:21-32.

Schuppli, D., Miranda, G., Tsui, HC., Winkler, ME., Sogo, JM. And Weber, H., (1997). "Altered 3'-terminal RNA structure in phage Qbeta adapted to host factor-less Escherichia coli." Proc Natl Acad Sci USA. **94**(19):10239-42.

Sharma, CM., Hoffmann, S., Darfeuille, F., Reignier, J., Fndeiß, S., Sittka, A., Chabas, S., Reiche, K., Hackermüller, J. and other authors. (2010). "The primary transcriptome of the major human pathogen Heliobacter pylori". Nature. **464**(7286):250-255.

Shanmugarajah, Kalpana (2012) "Konstruktion und funktionelle Charakterisierung von *rsd* und *ssrS* Mutationen in *E. coli*" Diplomarbeit, Physikalische Biologie, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.

Shetty, S., Muniyappa, H., Halady, PK. and Idell, S. (2004). "Regulation of urokinase receptor expression by phosphoglycerat kinase." Am J Respir Cell Mol Biol. 31(1):100-6.

Shichijo, S., Azuma, K., Komatsu, N., Ito, M., Maeda, Y., Ishihara, Y. and Itoh, K. (2004). "Two proliferation-related proteins, TYMS and PGK1, could be new cytotoxic T lymphocyte-directed tumor-associated antigens of HLA-A2+ colon cancer." Clin Cancer Res. **10**(17):5828-36.

Shigeo, T., Kazutake, H. and Yasutaro F. (2013). "Expression of *kinA* and *kinB* of *Bacillus subtilis,* necessary for Sporulation Initiation, is under Positive stringent transcription control." J Bacteriol. **195**(8):1656-65.

Sobrero, P. and Valverda, C. (2012). "The bacterial protein Hfq: much more than a mere RNAbindung factor." Crit Rev Microbiol. **38**(4):276-99.

Spira, B., Hu, X. and Ferenci, T. (2008). "Strain variation in ppGpp concentration and RpoS levels in laboratory strains of *Escherichis coli* K-12." Microbiology. **154** (Pt 9):2887-95.

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

Steuten, B., Setny, P., Zacharias, M. and Wagner, R., (2013). "Mapping the spatial neighborhood of the regulatory 6S RNA bound to Escherichia coli RNA polymerase holoenzyme." J Mol Biol. **425**(19):3649-61.

Steuten, B. and Wagner, R., (2012). "A conformational switch is responsible fort he reversal oft he 6S RNA-dependent RNA polymerase inhibition in Escherichia coli." Biol Chem. **393**(12):1513-22.

Storz, G. (2002). "An expanding universe of noncoding RNAs." Science. 296: 1260-1263.

Storz, G., J. A. Opdyke and A. Zhang (2004). "Controlling mRNA stability and translation with small, noncoding RNAs." Curr Opin Microbiol 7(2): 140-4.

Sun, X. and Wartell, RM. (2006). "Escherichia coli Hfq binds A18 and DsrA domain II with similar 2:1 Hfq6/RNA stoichiometry using different surface sites." Biochemistry. **45**(15):4875-87.

Takada, A., Wachi, M. and Nagai, K. (1999). "Negative regulatory role of the Escherichia coli hfq gene in cell division." Biochem Biophys Res Commun. **266**(2):579-83.

Takada, A., Kazuo, Nagai. and Wachi, M. (2005). "A decreased level of FtsZ is responsible for inviability of RNase E-deficient cells." Genes Cells. 10(7):733-41.

Trotochaud, A. E. and K. M. Wassarman (2004). "6S RNA function enhances long-term cell survival." J Bacteriol. **186**(15): 4978-85.

Tsui, HC., Leung, HC. and Winkler, ME. (1994). "Characterization of broadly pleiotropic phenotypes caused by an hfq insertion mutation in Escherichia coli K-12." Mol Microbiol. 13(1):35-49.

Vecerek, B., Rajkowitsch, L., Sonnleitner, E., Schroeder, R. and Bläsi, U. (2008). "The C-terminal domain of Escherichia coli Hfq is required for regulation." Nucleic Acids Res. **36**(1):133-43.

Villa, E., Sengupta, J., Trabuco, LG., LeBarron, J., Baxter, WT., Shaikh, TR., Grassucci, RA., Nissen, P., Ehrenberg, M., Schulten, K. and Frank, J. (2008). "Ribosome-induced changes in elongation factor Tu conformation control GTP hydrolysis." Proc Natl Acad Sci USA. **116**(4):1063-1068.

Vogel, DW., Hartmann, RK., Struck, JC., Ulbrich, N. and Erdmann, VA. (1987). "The sequence of the 6S RNA gene of Pseudomonas aeruginosa." Nucleic Acids Res. **15**(11):4583-91.

Vogel, J., Pedersen, S. and Jensen, KF. (1991). "An Unusual Correlation between ppGpp Pool Size and Rate of Ribosomen Synthesis during Partial Pyrimidine Starvation of *Escherichia coli*" J Bacteriol. **173**(3): 11684.

Vrentas, C. E., T. Gaal, W. Ross, R. H. Ebright and R. L. Gourse (2005). "Response of RNA polymerase to ppGpp: requirement for the w subunit and relief of this requirement by DksA." Genes & Development **19**(19): 2378-2387.

Wagner, R. (2000). "Transcription Regulation in Prokaryotes." Oxford, Oxford University Press.

Wagner, SD., Yakovchuk, P., Gilman, B., Ponicsan, SL., Drullinger, LF., Kugel, JF. and Goodrich, JA. (2013). "RNA Polymerase II acts as an RNA-dependent RNA polymerase to extend and destabilize a non-coding RNA." The EMBO journal. **32**(6):781-790.

Wassarman, K. M. (2007). "6S RNA: a small RNA regulator of transcription." Curr Opin Microbiol **10**: 164-168.

Wassarman, K. M. and R. M. Saecker (2006). "Synthesis-mediated release of a small RNA inhibitor of RNA polymerase." Science **314**(5805): 1601-3.

Wassarman, K. M. and G. Storz (2000). "6S RNA regulates *E. coli* RNA polymerase activity." Cell **101**: 613-623.

Wassarman, K. M., A. Zhang and G. Storz (1999). "Small RNAs in *Escherichia coli*." Trends Microbiol. 7: 37-45.

Wasserman, SM., Mehraban, F., Komuves, LG:, Yang, RB., Tomlison, JE., Zhang, Y., Spriggs, F. and Topper, JN. (2002). "Gene expression profile of human endothelial cells exposed to sustained fluid shear stress." Physiol Genomica. **12**(1):13-23.

Wimberly, BT., Brodersen, DE., Clemons, WM., Morgan-Warren, RJ., Carter, AP., Vonrhein, C., Hartsch, T. and Ramakrishan, V. (2000). "Structure oft he 30S ribosomal subunit." Nature. **407**(6802):327-39.

Windbichler, N., F. von Pelchrzim, O. Mayer, E. Csaszar and R. Schroeder (2008). "Isolation of small RNA-binding proteins from E. coli: evidence for frequent interaction of RNAs with RNA polymerase." RNA Biol **5**(1): 30-40.

Withey, J. H. and D. I. Friedman (2002). "The biological roles of trans-translation." Curr Opin Microbiol **5**(2): 154-9.

Wood, WB. (1966). "Host specificity of DANN produced by Escherichia coli: bacterial mutants affecting the restriction and modification of DNA." J Mol Biol. **16**(1):118-33.

Wurm, R., T. Neußer and R. Wagner (2009). "6S RNA-dependent inhibition of RNA polymerase is released by RNA-dependent synthesis of small de novo products." Biol. Chem., guanosin 3',5'-bispyrophosphate synthetic activity of relA null mutants can be eliminated by spoT null mutations." J Biol Chem. **266**(9): 5980-90.

Yakovchuk, P., Goodrich, JA. and Kugel, JF. (2009). "B2 RNA and Alu RNA repress transcription by disruption contacts between RNA polymerase II and promoter DNA within assembled complexes." Proc Natl Acad Sci USA. **106**(14):5569-74.

Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. (1985). "Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors." Gene. **33**(1):103-19.

Young, TA., Skordalakes, E. and Marqusee, S. (2007). "Comparison of proteolytic susceptibility in phosphoglycerat kinases from yeast and E. coli: modulation of conformational ensembles without altering structure or stability." J Mol Biol. **368**(5):1438-47.

Zhang, A., Altuvia, S., Tiwari, A., Argaman, L., Hengge-Aronis, R. and Storz, G. (1998). "The OxyS regulatory RNA represses rpoS translation and binds the Hfq (HF-I) protein." EMBO. **17**(20):6061-8.

Xiao, H., Kalman, M., Ikehara, K., Zemel, S., Glaser, G. and Cashel, M. (1991). "Residual guanosine 3',5'-bispyrophosphate synthetic activity of relA null mutants can be eliminated by spoT null mutations." J Biol Chem. **266**(9):5980-90.

Zhang W1, Wei YQ, Chen LJ, Liu JY, Wu Y, Ding ZY, Wen YJ, Yang JL, Fan LY, Li J, Kan B. and Deng HX. (2006). "Investigation of role in antitumor immune of mouse recombinant alpha-fetoprotein conjugated with mannan" Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban. **37**(6):830-4.

Xu, Z., Wie, W., Gagneur, J., Perocci, F., Clauder-Münster, S., Camblong, J., Guffanti, E., Stutz, F. and Huber, W. (2009). " Bidirectional promoters generate pervasive transcription in yeast." Nature. **457**(7232):1033-7.

9. Veröffentlichungen

Steuten, B., Schneider, S. and Wagner, R. (2014). "6S RNA: recent answers—future questions." Mol Microbiol. **91**(4):641-8.

Steuten, B., Hoch, PG., Damm, K., Schneider, S., Köhler, K., Wagner, R. and Hartmann, RK. (2014). "Regulation of transcriptionby 6S RNAs:Insights from the Eshcerichia coli and Bacillus subtilis model systems." RNA Biol. **11**(5)

10. Eidesstattliche Erklärung

Angefertigt im

Institut für Physikalische Biologie Arbeitsgruppe Molekularbiologie der Prokaryoten Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Tag der Einreichung

12. Mai 2014

Erster Gutachter Zweiter Gutachter Univ.-Prof. Dr. Rolf Wagner Univ.-Prof. Dr. Joachim Ernst

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

(Ort, Datum, Unterschrift

Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Rolf Wagner für die wissenschaftliche und nicht-wissenschaftlichen Hilfen und stetige Ansprechbarkeit und Diskussionen währen meiner Doktorarbeit danken. Ich habe nicht nur viele biologische Sachen gelernt sondern auch meinen Charakter weiter ausgebildet.

Als nächstes möchte ich Herrn Prof. Dr. J. Ernst für die Übernahme meiner Koreferenz danken.

Einen großen Dank an alle Labor-Mäuse, die immer für einen da waren: Vero, Lena, Lili, Ben, Rene, Zihni, Ümit, Tommy, Melina, Mariam, Julian, Anna und Toby. Es war eine unvergessliche Zeit mit euch und mit vielen wichtigen Gesprächen im Isolab. Ich werde euch und den Montagskuchen vermissen.

Reini danke ich für die direkte und schnelle Hilfe bei methodischen Fragen und dem Aufreinigen des PGK Proteins ;) (Es war immer nett zu uns). Barbara danke für die Hilfe im Labor.

Danken möchte ich auch meinem guten Freund Jan, der auch in einer Disko mit mir über EMSA Analysen und neuen Klonierungsstrategien diskutiert.

Für die Motivation und aufmunternden Worte möchte ich meinen Freunden und Stallkollegen danken.

Abschließend danke ich meinen Eltern für die Unterstützung während des Studiums und der Promotion, ohne euch wäre das alles nicht möglich gewesen, DANKE!

Auch wenn du nur einen kleinen Teil dieser Zeit miterleben durftest, danke mein SCHATZ ;)