

Analysen zur Funktion und Interaktion
der phasenabhängig exprimierten
E. coli 6S RNA

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von
Nina Gildehaus
aus Dortmund

August 2005

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

Referent: Prof Dr. R. Wagner
Koreferent: Prof. Dr. U. Rüter

Tag der mündlichen Prüfung: 17. November 2005

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Physikalische Biologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf in der Zeit von Februar 2002 bis April 2005 unter der Anleitung von Prof. Dr. Rolf Wagner.

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

Düsseldorf, im August 2005

*Die Zukunft hat viele Namen.
Für die Schwachen ist sie das Unerreichbare.
Für die Furchtsamen ist das Unbekannte.
Für die Tapferen ist sie die Chance.*

(Victor Hugo)

Zusammenfassung

Die 184 Nukleotide lange 6S RNA aus *Escherichia coli* beeinflusst die Transkription beim Übergang der Zellen von der exponentiellen in die stationäre Phase des Wachstums. Es konnte gezeigt werden, dass die 6S RNA *in vivo* an das σ^{70} -spezifische RNA-Polymerase Holoenzym bindet. Hierbei wurde aufgrund der berechneten Sekundärstruktur der 6S RNA eine Bindung der regulatorischen RNA analog der eines DNA-Promotors postuliert.

Die 6S RNA wird von zwei putativen Promotoren *ssrS* P1 und -P2 exprimiert. Erste Analysen der *ssrS*-Transkriptionseinheit deuteten auf eine Autoregulation der Transkription durch ihr eigenes Produkt, die 6S RNA hin.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden der Einfluss und die Bindung der regulatorischen 6S RNA aus *E. coli* auf die RNA-Polymerase untersucht. In Retardierungsanalysen konnte gezeigt werden, dass die 6S RNA *in vitro* an alle Formen der bakteriellen RNA-Polymerase bindet, wobei das bevorzugte Ziel das σ^{70} -spezifische Holoenzym ist. UV-Quervernetzungsanalysen ergaben, dass die Bindung an die RNA-Polymerase auf Proteinebene von der β/β' -Untereinheit und vom σ^{70} -Faktor vermittelt wird. Innerhalb der 6S RNA vermittelt ein hoch konservierter Loop im terminalen Bereich der Sekundärstruktur die Bindung an σ^{70} . Die Bindung an die β/β' -Untereinheit erfolgt hingegen im Zentrum des Moleküls, zu beiden Seiten des einzelsträngigen zentralen Loops. Eine Bindung der 6S RNA an die RNA-Polymerase analog der eines offenen Promotors ist daher sehr wahrscheinlich. Diese Ergebnisse konnten durch 'Footprints' mit Hydroxylradikalen sowie in UV-Quervernetzungsanalysen bestätigt werden.

Die durchgeführten Hydroxylradikal-'Footprints' zeigten weiterhin, dass eine Modifikation der Sekundärstruktur das Bindeverhalten der 6S RNA beeinflusst. Hieraus konnte geschlossen werden, dass die Sekundärstruktur die Funktion der 6S RNA vermittelt.

Die 6S RNA inhibiert *in vitro* die Transkription und die Initiationskomplexbildung sowohl von stationären als auch von exponentielle Phase-spezifischen Promotoren. Durch *in vitro* Transkriptionen und Retardierungsanalysen konnte gezeigt werden, dass die Inhibition auf einer Kompetition der 6S RNA mit dem Promotor um die freien RNA-Polymerase Moleküle beruht. Durch *in vitro* Transkriptionen konnte zudem ein 6S RNA-abhängiges Transkript identifiziert werden, welches auch ohne die Zugabe eines DNA-Templates synthetisiert wird. Eine Charakterisierung dieses 'de novo'-Transkriptes ergab, dass es sich hierbei um ein RNA-Transkript handelt, welches jedoch keine durchgehende *antisense*-Sequenz der 6S RNA repräsentiert.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Einfluss der 6S RNA auf ihre eigene Synthese untersucht. Die Analyse der für die 6S RNA kodierende Transkriptionseinheit '*ssrS*' durch *in vitro* Transkriptionen ergab, dass die 6S RNA ihre eigene Synthese beeinflusst. Eine explizit wachstumsphasen-spezifische Regulation von *ssrS* durch die 6S RNA konnte jedoch nicht gezeigt werden.

Wie durch *in vitro* Transkriptionen veranschaulicht werden konnte, beeinflussen auch Transkriptionsfaktoren und das Effektor nukleotid ppGpp die Expression von *ssrS*. Retardierungsanalysen zeigten eine Bindung der Transkriptionsfaktoren FIS, StpA, H-NS und LRP an verschiedene Bereiche der Transkriptionseinheit.

Inhaltsverzeichnis

1	Allgemeine Einleitung	9
1.1	RNA-eine Welt für sich	9
1.2	Nichtcodierende RNAs in Eukaryoten	9
1.3	RNA-Struktur	11
1.4	Regulatorische RNAs in Prokaryoten	12
1.5	Die 6S RNA aus <i>Escherichia coli</i>	15
1.6	RNA-Synthese: Transkription	18
1.6.1	Struktur und Funktion der bakteriellen RNA-Polymerase	18
1.6.2	Struktur und Funktion von Promotoren	23
1.6.3	Der Ablauf der Transkription	24
1.6.4	Die Transkription in verschiedenen Wachstumsphasen	26
1.6.5	Weitere Faktoren, die die Transkription beeinflussen: Transkriptionsfaktoren	28
1.7	Fragestellung und Konzeption der Arbeit	29
2	Ergebnisse	31
2.1	Charakterisierung der Bindung der 6S RNA an die RNA-Polymerase	31
2.1.1	Retardierungsanalysen zur Untersuchung der 6S RNA/RNA-Polymerase-Bindung	31
2.2	Charakterisierung der bindeaktiven Regionen der 6S RNA	33
2.2.1	UV-Quervernetzung von 6S RNA/RNA-Polymerase-Komplexen	33
2.2.2	Charakterisierung der Proteinbindungsregionen innerhalb der 6S RNA	34
2.2.2.1	Analyse von Proteinbinderegionen durch Hydroxylradikal-‘Footprints’	34
2.2.2.2	UV-Quervernetzungsanalysen von 6S RNA/RNA-Polymerase Komplexen	40
2.3	Der Einfluss der 6S RNA auf die Funktion der RNA-Polymerase	43
2.3.1	Problemstellung und experimenteller Ansatz	43
2.3.2	Auswahl und Präparation von Komponenten	44
2.3.2.1	Der <i>rrnB</i> P1-Promotor	44
2.3.2.2	Der <i>bolA</i> -Promotor	44
2.3.2.3	DNA-abhängige RNA-Polymerasen	45
2.3.3	Die Wirkung der 6S RNA auf die Komplexbildung an wachstumsphasenspezifischen Promotoren	45
2.3.3.1	Die Spezifität der wachstumsphasen-abhängigen Promotoren <i>rrnB</i> P1 und <i>bolA</i>	45

2.3.4	Der Einfluss der 6S RNA auf die Promotorbindung	48
2.3.4.1	Die Wirkung der 6S RNA auf die Komplexbildung	48
2.3.4.2	Der Einfluss des 6S RNA Zugabe-Zeitpunktes auf die Inhibierung von RNA-Polymerase/Promotor-Komplexen	51
2.3.5	<i>In vitro</i> Transkriptionen unter dem Einfluss der 6S RNA	51
2.3.5.1	Die generelle Promotorspezifität von <i>bolA</i> und <i>rrnB</i> P1	51
2.3.5.2	Regulation durch 6S RNA an linearen DNA-Templates <i>in vitro</i>	52
2.3.5.3	<i>In vitro</i> Transkriptionen unter superhelikalen Bedingungen	54
2.3.5.4	Auswirkung des Zeitpunktes der Zugabe von 6S RNA auf die Transkription an superhelikalen Templates	54
2.3.5.5	Bestimmung der maximalen und minimalen Wirkkonzentration der 6S RNA auf das exponentielle- und stationäre Phase-spezifische Transkriptionssystem	57
2.3.5.6	Einfluss der Salzkonzentration auf die <i>in vitro</i> Transkription mit 6S RNA	58
2.3.5.7	<i>In vitro</i> Transkriptionen unter dem Einfluss anderer RNAs	60
2.3.6	Analyse des ' <i>de novo</i> '-Transkripts	64
2.3.6.1	Bestimmung der Spezifität des ' <i>de novo</i> '-Transkriptes	64
2.3.6.2	2D-'Fingerprint'-Analysen des ' <i>de novo</i> '-Transkriptes	65
2.3.6.3	Sequenz und Charakterisierung des ' <i>de novo</i> '-Transkriptes	66
2.4	Regulation der <i>ssrS</i> -Expression	70
2.4.1	Problemstellung und experimenteller Ansatz	70
2.4.2	Bindungsanalysen der Transkriptionsfaktoren H-NS, FIS, LRP und StpA mit <i>ssrS</i> -Promotorfragmenten	71
2.4.3	Analyse der <i>ssrS</i> -Expression durch <i>in vitro</i> -Transkriptionen	73
2.4.3.1	Generation eines Expressionssystems für die <i>in vitro</i> -Analyse von <i>ssrS</i>	73
2.4.3.2	Bestimmung der Transkriptionsstartpunkte	74
2.4.3.3	Optimierung der RNA-Polymerase- und Templatemenngen	75
2.4.4	Der Effekt der 6S RNA auf die Transkription des <i>ssrS</i> -Gens	75
2.4.4.1	Der Einfluss der 6S RNA auf die Regulation der <i>ssrS</i> -Promotoren	75
2.4.4.2	Der Einfluss von verschiedenen Regulatorproteinen auf die <i>ssrS</i> -Transkription	77
3	Diskussion	81
3.1	Die 6S RNA reguliert die bakterielle RNA-Polymerase	81
3.2	Die Bindung der 6S RNA an die bakterielle RNA-Polymerase	82
3.2.1	Die native <i>E. coli</i> 6S RNA bindet an alle Formen der bakteriellen RNA-Polymerase	82
3.2.2	Die Bindung der 6S RNA an die RNA-Polymerase erfolgt an spezifischen Positionen	83
3.2.3	Das Core-Enzym und der σ^{70} -Faktor haben unterschiedliche Bindungspositionen an der 6S RNA	84
3.2.4	Die Rolle von σ^{70} und dem terminalen Loop bei der Bindung von 6S RNA und RNA-Polymerase	86

3.2.5	Die <i>in vitro</i> Spezifität der Interaktion von 6S RNA und RNA-Polymerase wird durch die Struktur der 6S RNA vermittelt.	86
3.3	Die 6S RNA moduliert die Aktivität der RNA-Polymerase	87
3.3.1	Die 6S RNA inhibiert die Initiationskomplexbildung und die Transkription an beiden Holoenzymen <i>in vitro</i>	87
3.3.2	Die 6S RNA bindet an die gleichen Bereiche der RNA-Polymerase wie ein DNA-Promotor und kompetiert mit dem Promotor um die Bindung an das Enzym.	89
3.3.3	Die Rolle des ‘ <i>de novo</i> ’-Transkripts	89
3.4	Die Rolle der 6S RNA als Regulator: mögliche Wirkmechanismen	92
3.5	Die Regulation der <i>ssrS</i> -Expression	94
3.5.1	Verschiedene Transkriptionsfaktoren binden an das <i>ssrS</i> -Gen und beeinflussen seine Transkription.	94
3.5.2	Die 6S RNA beeinflusst ihre eigene Synthese	98
3.6	Ausblick	99
4	Material	101
4.1	Allgemeines	101
4.2	Verwendete Bakterienstämme und Plasmide	101
4.2.1	<i>E. coli</i> Stämme	101
4.2.2	Plasmide	102
4.3	Oligonukleotide, Nukleinsäuren und Nukleotide	103
4.3.1	Oligonukleotide	103
4.3.2	DNA-Fragmente	104
4.3.3	Nukleinsäuren	104
4.3.4	Nukleotide	105
4.3.5	Molekulargewichtsmarker	105
4.4	Proteine	105
4.4.1	Enzyme	105
4.4.2	Restriktionsendonukleasen	106
4.4.2.1	Proteine	106
4.5	Puffer und Medien	107
4.5.1	Standardpuffer	107
4.5.2	Medien	107
4.6	Chemikalien	108
4.6.1	Feinchemikalien	108
4.6.2	Sonstige Chemikalien	108
4.7	Verschiedenes	109
5	Methoden	111
5.1	Mikrobiologische Methoden	111
5.1.1	Arbeitsbedingungen beim Umgang mit Bakterien	111
5.1.1.1	Sterilisation von Lösungen, Glasgeräten und sonstigen Arbeitsmaterialien	111
5.1.2	Kultivierung von Bakterienstämmen	111
5.1.2.1	Anlegen von Glycerinkulturen (Glycerinstocks)	111
5.1.2.2	Anzucht auf Agarplatten	111

5.1.2.3	Anzucht von über Nacht-Kulturen (üN-Kultur)	111
5.1.2.4	Anzucht von über Tag-Kulturen (üT-Kultur)	112
5.1.3	Herstellung kompetenter Zellen nach Dagert und Ehrlich (1979) . . .	112
5.1.4	Transformation kompetenter Zellen mit Vektor-DNA nach Hanahan (1985)	112
5.2	Molekularbiologische Methoden	112
5.2.1	Konzentrationsbestimmungen	112
5.2.1.1	Streuungsmessung zur Bestimmung von Zelldichten in Flüssig- keiten	112
5.2.1.2	Spektralphotometrische Konzentrationsmessung von Nukle- insäuren	113
5.2.1.3	Radioaktivitätsmessung	114
5.2.1.4	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	114
5.2.1.5	Densitometrie	114
5.2.1.6	Quantifizierungen	114
5.2.2	Isolation von Nukleinsäuren	114
5.2.2.1	Plasmidisolation im kleinen Maßstab (Minipräp) nach Birn- boim und Doly (1979)	114
5.2.2.2	Isolation von superspiralierter Plasmid-DNA im großen Maßstab (Maxipräp) nach Hillen <i>et al.</i> (1981)	115
5.2.3	Reinigung von Nukleinsäuren	116
5.2.3.1	Phenol/Chloroform-Extraktion zur Reinigung von Nukle- insäuren	116
5.2.3.2	Ethanol-fällung zur Konzentration von Nukleinsäuren	116
5.2.3.3	Dialyse von DNA und RNA	117
5.2.4	Gelelektrophoresen	117
5.2.4.1	Agarose-Gelelektrophorese	117
5.2.4.2	Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	117
5.2.4.3	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (dPAGE)	118
5.2.4.4	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (dPAGE) zur präparativen Aufreinigung von T7- <i>in vitro</i> Transkripten	118
5.2.4.5	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese . .	118
5.2.4.6	Temperaturgradienten-Gelelektrophorese (TGGE) nach Rosenbaum und Riesner (1987)	119
5.2.5	Elution von Nukleinsäuren aus einer Gelmatrix	120
5.2.5.1	DNA-Elution aus Agarosegelen über Glaswolle-Extraktion .	120
5.2.5.2	Passive Elution von RNA aus Polyacrylamidgelen	120
5.2.6	Detektion von Nukleinsäuren und Proteinen	120
5.2.6.1	Silberfärbung nach Beidler <i>et al.</i> (1982)	120
5.2.6.2	Toluidinblau-Färbung	120
5.2.6.3	UV-Shadowing	121
5.2.6.4	Autoradiographie	121
5.2.6.5	Coomassie-Färbung von Proteinen	121
5.2.7	Enzymatische Reaktionen	121
5.2.7.1	Restriktionshydrolysen von DNA	121
5.2.7.2	Phosphorylierung von DNA Oligonukleotiden	122
5.2.7.3	3'-Endmarkierung von RNA mit 5'- ³² [P]pCp	122

5.2.7.4	Ligationen von DNA-Fragmenten mit T4-Ligase	122
5.2.7.5	Klenow-Reaktion zur radioaktiven Markierung von DNA-Fragmenten mit 5'-überhängenden Enden	123
5.2.8	Spezielle Methoden	123
5.2.8.1	'Multiple round-run off' <i>in vitro</i> Transkription mit T7-RNA-Polymerase (RiboMAX, Promega)	123
5.2.8.2	Alkalische Hydrolyse von RNA	124
5.2.8.3	Primer-Extension-Analyse von RNA	124
5.2.8.4	Primer-Extension-Sequenzierung	125
5.2.8.5	UV-Quervernetzungsexperimente	125
5.2.8.6	Northern-Blot-Analysen	125
5.2.8.7	<i>In vitro</i> Transkription mit <i>E. coli</i> RNA-Polymerase	126
5.2.8.8	Rekonstitution von σ^{70} - und σ^{38} -Holoenzymen	128
5.2.8.9	Bestimmung von Transkriptionsstartstellen	128
5.2.8.10	Retardierungsanalysen (Gelshift-Analysen)	129
5.2.8.11	Hydroxylradikal-'Footprints' von RNA	130
5.2.8.12	2D-'Fingerprint'-Analysen von RNA	131
5.2.8.13	Sequenzierung von RNA	132
6	Literaturverzeichnis	133
	Anhang	149
	Abkürzungsverzeichnis	153
	Veröffentlichungen	155

Abbildungsverzeichnis

1.1	RNA-Sekundärstrukturen	12
1.2	Darstellung der <i>ssrS</i> -Promotorregion	15
1.3	Sekundärstruktur der 6S RNA	17
1.4	TGGE der 6S RNA	18
1.5	Röntgenstruktur der RNA-Polymerase aus <i>T. thermophilus</i>	19
1.6	Schematische Darstellung der Struktur der RNA-Polymerase und des σ - Faktors	20
1.7	σ -Faktoren von <i>E. coli</i>	21
1.8	Röntgenkristallstruktur des σ^{70} -Faktors von <i>E. coli</i>	22
1.9	Schematischer Vergleich der Sigmafaktoren σ^{70} und σ^{38}	23
1.10	Schematische Darstellung der Transkriptionsinitiation	25
1.11	3D-Struktur des Elongationskomplexes	26
2.1	Retardierungsanalyse der 6S RNA mit verschiedenen RNA-Polymerasen . .	32
2.2	UV-Quervernetzungsanalyse von 6S RNA/RNA-Polymerase-Komplexen . .	33
2.3	Komplexbildung von modifizierter 6S RNA mit der RNA-Polymerase	35
2.4	Auftrennung von Komplexen aus modifizierter 6S RNA und RNA-Polymerase	35
2.5	Densitometrische Auswertung der Hydroxylradikal-‘Footprints’	36
2.6	Differenzspektren der einzelnen Komplexe und der 6S RNA	38
2.7	Zusammenfassung der RNAP-Bindung an die 6S RNA im $\cdot\text{OH}$ -‘Footprint’ .	39
2.8	Durch die RNA-Polymerase beeinflusste Nukleotide in der 6S RNA Sekun- därstruktur	40
2.9	Primer-Extension nach UV-Quervernetzung von 6S RNA und RNA-Polymerase	41
2.10	Positionen der Quervernetzungen innerhalb der 6S RNA Sekundärstruktur .	42
2.11	Komplexbildung des <i>rrnB</i> P1-Promotors	46
2.12	Retardierungsanalyse des <i>bolA</i> -Promotors	47
2.13	Wirkung der 6S RNA auf die Komplexbildung am <i>rrnB</i> P1-Promotor	49
2.14	Wirkung der 6S RNA auf die Komplexbildung am <i>bolA</i> Promotor	50
2.15	Vergleich der Komplexbildung von <i>bolA</i> und <i>rrnB</i> P1	51
2.16	<i>In vitro</i> Transkription mit linearen Templates	53
2.17	‘ <i>De novo</i> ’- Transkripte bei linearen IVTs	54
2.18	<i>In vitro</i> Transkriptionen mit unterschiedlicher Reihenfolge der Zugabe von Transkriptionskomponenten	55
2.19	Quantitative Auswertung der Transkripte von superhelikalen Templates . .	56
2.20	<i>In vitro</i> Transkriptionen mit hohen Salzkonzentrationen	59
2.21	<i>In vitro</i> Transkription mit 5S RNA als Inhibitor	61
2.22	Eine mögliche Sekundärstruktur der 5S RNA aus <i>E. coli</i>	61

2.23	<i>In vitro</i> Transkription mit tRNA als Inhibitor	62
2.24	<i>In vitro</i> Transkription mit PSTVd als Inhibitor	63
2.25	<i>In vitro</i> Transkription der 6S RNA mit der RNA-Polymerase	64
2.26	(2D)-‘Fingerprint’-Analysen des ‘ <i>de novo</i> ’-Transkripts	66
2.27	Verlängerung des ‘ <i>de novo</i> ’-Transkripts	68
2.28	TGGE des ‘ <i>de novo</i> ’-Transkripts	69
2.29	Schematische Anordnung der <i>ssrS</i> -Promotoren	71
2.30	Retardierungsanalysen der <i>ssrS</i> -Fragmente mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren	72
2.31	TGGE des <i>ssrS</i> -Fragment2 mit StpA	73
2.32	Primer-Extension-Reaktion zur Startstellenbestimmung	74
2.33	<i>In vitro</i> Transkription von p6S-T mit Zugabe von 6S RNA	76
2.34	Auswertung der <i>in vitro</i> Transkriptionen mit 6S RNA Zugabe	77
2.35	<i>In vitro</i> Transkription von p6S-T mit Transkriptionsfaktoren und ppGpp	78
3.1	Mögliche Startpunkte des ‘ <i>de novo</i> ’-Transkripts	91
3.2	Mögliche Bindestellen von FIS und LRP im <i>ssrS</i> -Gen	95
3.3	Darstellung der Krümmung des <i>ssrS</i> -Gens (<i>ssrS</i> -Fragment2).	96

1 Allgemeine Einleitung

1.1 RNA-eine Welt für sich

Seit der Entdeckung der DNA durch Watson und Crick im Jahr 1953 und der Entschlüsselung des genetischen Codes (Matthei und Nirenberg, 1961; Nirenberg, 2004) galt in der Biologie die These : DNA > RNA > Protein. Diese fast schon dogmatische These musste jedoch bald darauf komplett neu überdacht werden, als in den siebziger Jahren die ersten RNA- und Retroviren und Viroide isoliert werden konnten. Diese nutzen RNA als Informationsspeicher und kommen oftmals komplett ohne DNA aus. Crick und Orgel stellten durch erste Untersuchungen am Ribosom schon 1968 die Hypothese auf, dass RNA wesentlich früher als DNA und Proteine in der Evolution aufgetreten ist und hierbei eine entscheidende Rolle gespielt hat (Orgel, 1968; Crick 1968; Orgel, 2000). Walter Gilbert spricht später sogar von einer ‘RNA-Welt’ (Gilbert, 1986). Nach seiner Theorie steuert RNA zunächst die eigene Replikation, dann enzymatische Reaktionen und später auch die Proteinbiosynthese durch autokatalytische Vorgänge. Nach dieser Theorie entstand DNA erst später durch reverse Transkription aus RNA und wurde dann das bevorzugte Speichermolekül der genetischen Informationen, begründet durch die höhere Stabilität der doppelsträngigen DNA. RNA Moleküle behielten aber weiterhin die Funktionen der Proteinbiosynthese als messenger (mRNA)-, transfer (tRNA)- und ribosomale (rRNA) RNAs bei. Heute ist bekannt, dass die Aufgaben und Funktionen von RNA weit über das Maß der Weiterleitung und Konservierung genetischer Informationen hinausgehen. Katalytische RNAs, so genannte ‘Ribozyme’ führen selbst vermittelt enzymatische Reaktionen aus. In den letzten Jahren konnten zudem unzählige kleine RNAs mit teilweise auffälligen Sekundärstrukturen in allen Reichen isoliert werden. Diese in der Gruppe der nicht-kodierenden (‘non-coding’, nc) RNAs (Storz, 2002; Eddy, 1999) zusammengefassten RNA-Moleküle ‘assistieren’ bei komplizierten Syntheseschritten oder haben selbst regulatorische Funktion. Zu ihnen gehören die small nuclear (sn), small nucleolar (sno) und die small interfering (si) RNAs in höheren Eukaryoten, ebenso wie die guide (g) RNAs in Trypanosomen. Auch in Prokaryoten kennt man heute eine Vielzahl regulatorischer RNA-Moleküle.

1.2 Nichtcodierende RNAs in Eukaryoten

Eine häufig vorkommende Klasse von stabilen *trans*-wirkenden RNAs sind die snoRNAs (small nucleolar RNA) im eukaryotischen Nukleolus. SnoRNAs kommen in fast allen Klassen der Eukaryoten vor und scheinen ubiquitär zu sein (Maxwell und Fournier, 1995). Die Gruppe umfasst dabei alleine bei Vertebraten mehr als 150 verschiedene Moleküle (Kiss, 2001). Die Funktion der snoRNAs umfasst die Reifung der prä-rRNA, wie Faltung und Modifizierung, sowie die Modifikation der RNAs des Spliceosoms. Bei Archaeobakterien sind snoRNAs sogar an der Methylierung von tRNAs beteiligt (Dennis, 2001). Die Gruppe der

snoRNAs kann hierbei in drei große Gruppen unterteilt werden, die sich in Aufbau und Funktion unterscheiden (Tollervey und Kiss, 1997).

Im Kern selbst werden Modifikation und Faltung der ribosomalen RNA durch eine weitere Gruppe kleiner RNAs durchgeführt: hier spleißen mit Proteinen assoziierte small nuclear (sn) RNAs als ‘small nuclear ribonucleinparticle’ (snRNPs) die prä-rRNA. Solche ‘Ribonukleoproteinkomplexe’, welche sowohl katalytische Protein- als auch RNA-Komponenten enthalten können, sind auch für andere Funktionen essentiell und nicht nur in Eukaryoten sondern auch in Prokaryoten zu finden. Beispiel sind hier das ‘Signal Recognition Particle’ (SRP) oder die Ribosomen.

Eine weitere Gruppe der eukaryotischen ‘non-coding’ RNAs findet man in den Mitochondrien von Protozoen wie *Trypanosoma* oder *Leishmania*, sowie in einigen Pflanzen und in cytoplasmatischer RNA von Tierzellen. Guide (g) RNAs katalysieren hier das so genannte RNA editieren. Bei den guide RNAs selbst handelt es sich um kurze, zur mitochondrialen RNA komplementäre RNA-Stränge. Beim Editieren werden im Primärtranskript fehlende Uracil-Bausteine nachträglich eingefügt oder- jedoch seltener- entfernt (Benne, 1996).

Eine Besonderheit in der Gruppe katalytisch wirkender RNAs stellen Ribozyme dar. Diese RNA-Moleküle, ca. 40-400 Nukleotide groß, wurden 1981 von Thomas Cech am Beispiel des Ciliaten *Tetrahymena thermophila* zum ersten Mal beschrieben (Cech *et al.*, 1981). Für seine Arbeiten wurde Cech 1989 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet. Natürliche Ribozyme werden aufgrund ihrer Sequenz und Tertiärstruktur in fünf Gruppen unterteilt: Gruppe I Introns (im Nucleus von Protozoen, Mitochondrien von Pilzen, Algenchloroplasten sowie in Bakterien und Phagen zu finden) werden aufgrund ihrer gemeinsamen ‘Kern’-Sekundärstruktur, bestehend aus einer Anordnung von neun spezifisch gepaarten Elementen (P1-P9) zusammengefasst. Hierbei Spleißen sie die prä-rRNA via eines Metall-Ionen katalysierten nukleophilen Angriffs (Cech, 1986). Gruppe II Introns katalysieren in Bakterien und Organellen von Eukaryoten präzise das Spleißen und die folgende Religation der flankierenden RNA Sequenzen zum reifen Transkript über einen Lariat-Mechanismus (Cech, 2002). Das kleinste natürliche Ribozym ist mit circa 40 Nukleotiden das so genannte ‘Hammerhead’-Ribozym der Pflanzen-Viroide. Pathogene Viroide vermehren sich, indem sie über einen ‘rolling-circle’-Mechanismus Concatemere bilden, in welchen mehrere Genome aufeinander folgen. Diese Concatemere werden über einen dem Selbstspleißen ähnlichen Mechanismus getrennt. Hierbei lagert sich die Viroid-RNA unter Ausbildung einer hochkonservierten spezifischen Sekundärstruktur, die einem Hammerkopf ähnelt, aneinander, so dass spezifische Spaltstellen entstehen (Flores *et al.*, 2004; Doherty und Doudna, 2000). Die gleiche chemische Reaktion nutzen auch das Hepatitis Delta Virus (HDV)- und das Hairpin-Ribozym (Ke *et al.*, 2004). Die Ribonuklease P, als letztes Molekül in der Gruppe der Ribozyme, kommt in allen Zellen vor. Sie katalysiert die ‘site’-spezifische Hydrolyse von Vorläufer-RNA Molekülen, darunter tRNA, 5S rRNA und die RNA Komponente des SRPs. Bei der RNase P handelt es sich um einen RNA-Protein-Komplex, wobei sich die katalytische Funktion in der RNA Komponente befindet (Morl, 2001; Westhof und Altman, 1994).

Eine neue Variante der Regulation durch RNA wurde ebenfalls erst vor wenigen Jahren entdeckt. Das ‘silencing’, also Stilllegen von Genen ist ein ursprünglicher Mechanismus, welcher in allen eukaryotischen Reichen konserviert ist. Bei Tieren wird dieser Mechanismus als ‘RNA interference’ (RNAi) bezeichnet (Fire *et al.*, 1998), bei Pflanzen als PTGS, ‘post transcriptional gene silencing’, bei Pilzen und Algen spricht man vom ‘quelling’ (Plasterk, 2002). Bei allen Typen handelt es sich um eine konservierte biologische Antwort auf

zelleigene oder fremde doppelsträngige RNA. Dieses Phänomen wurde 1998 zuerst beim Nematoden *Caenorhabditis elegans* gefunden (Fire *et al.*, 1998). Doppelsträngige RNAs werden, wenn sie ins Cytoplasma gelangen, zunächst durch das Enzym ‘Dicer’ zu kurzen siRNA-Intermediaten prozessiert. Der Enzymkomplex RISC (‘RNA Induced Silencing Complex’), trennt die Doppelstränge, der *sense*-Strang wird degradiert, während der *antisense*-Strang das Stilllegen des Zielgens vermittelt (Novina und Sharp, 2004). Die Funktionen des PTGS und der RNA Interferenz sind noch nicht vollständig geklärt, sicher ist aber die Rolle des PTGS in der Resistenz gegen Pathogene sowie eine Rolle der RNAi vermittelten Genregulation zum Beispiel in der Entwicklung (Hannon und Glover, 2002).

Kleine RNAs in Eukaryoten (und Prokaryoten) wirken meist über RNA-RNA oder RNA-Protein Interaktion. Hierbei beeinflussen die sRNAs größtenteils Prozesse, die sich vor der Translation abspielen. Die einzig bekannte kleine RNA eines Eukaryoten, die auf die Translation wirkt, ist die 22 Nukleotide lange Lin4-RNA von *C. elegans*. Diese greift in die Entwicklung während des frühen Larvenstadiums ein, indem sie an die 3′-untranslatierten Bereiche ihrer Ziel-mRNAs (*lin14* und *lin28*) bindet und deren Translation inhibiert.

1.3 RNA-Struktur

RNA liegt vorwiegend einzelsträngig vor. Im Vergleich zu der doppelsträngigen DNA ist das Molekül hierdurch instabiler, hat aber die Möglichkeit, über eine Vielzahl von Wechselwirkungen verschiedene Sekundärstrukturen auszubilden. Neben den Standard-Watson-Crick Basenpaarungen (AU und GC) können in solchen zweidimensionalen Sekundärstrukturen auch ungewöhnliche Watson-Crick-Paare wie G-U oder G-A ausgebildet werden (Moore, 1999; Westhof, 2000). Sekundärstrukturen, die ein RNA Molekül annehmen kann, sind Haarnadelschleifen (‘hairpin loops’), Helixstämme, interne Ausloopungen (‘internal loops’), mehrfach verzweigte Schleifen (‘multibranched loops’) und Schleifen innerhalb von Helixstämmen (‘bulge-loops’). Daneben gibt es noch eine besondere Form der Haarnadelschleife mit vier stark konservierten Basen im offenen Bereich, so genannte Tetraloops. Tetraloops werden stabilisiert durch zusätzliche Wechselwirkungen, wie *syn*-Stellungen von Basen, Änderung der Zuckerkonformation, ungewöhnliche Wasserstoffbrücken-Bindungen und Stapelwechselwirkungen. Solche Wechselwirkungen erhöhen den Schmelzpunkt dieser Strukturen um etwa 20°C im Vergleich zu üblichen Haarnadelschleifen. Anhand der Basen im Loop werden drei verschiedene Arten von Tetraloops definiert: UNCG, GNRA und CUYG-Tetraloops¹ (Moore, 1999). Sekundärstrukturen sind der Ausgang für höher geordnete RNA-Strukturen. Durch Wechselwirkung der freien Basen eines Loops mit einem benachbarten, ungepaarten Bereich der RNA bilden sich über zusätzliche Schleifen- und Helixregionen Tertiärstrukturen in der RNA aus. Ein so entstandener ‘Pseudoknoten’ befindet sich zum Beispiel in der ribosomalen 16S rRNA von *Escherichia coli*, wo er die drei Hauptdomänen der 16S rRNA anordnet (Pleij *et al.*, 1985). Typische RNA Sekundär- und Tertiärstrukturen sind in der Abbildung 1.1 gezeigt.

Heute kennt man darüber hinaus eine Vielzahl dreidimensionaler RNA-Motive, welche definiert werden über bestimmte, genau ausgerichtete Non-Watson-Crick Basenpaare, deren Anordnung sich auf die Konformation des Phosphodiester-Rückgrats der interagierenden RNA-Stränge auswirkt. RNA-Motive vermitteln die spezifischen Interaktionen, welche die Faltung komplexer RNAs ermöglichen. Zudem stellen sie spezifische Protein- oder

¹N = beliebiges Nukleotid; R = A, G; Y = C, U

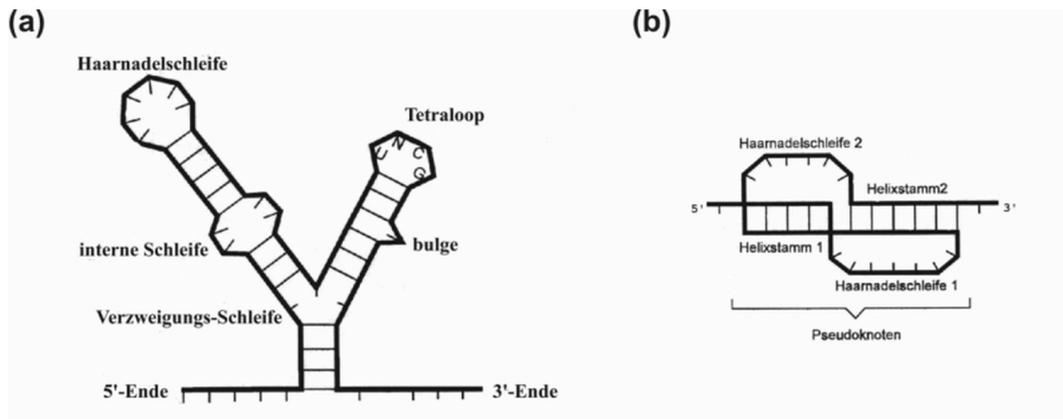


Abbildung 1.1: RNA-Sekundärstrukturen (a) Schematische Übersicht über verschiedene RNA-Sekundärstruktur motive. (b) Schematische Darstellung eines Pseudoknotens.

Liganden-Bindestellen dar. Ein bestimmtes Motiv ist hierbei charakterisiert durch alle Sequenzen, welche in ein identisches dreidimensionales Muster mit derselben Anordnung isosterischer Non-Watson-Crick Basenpaare falten (Leontis und Westhof, 2003). Wechselwirkungen der Basen untereinander und die resultierende Änderung der Konformationen über Sekundär- zu Tertiärstrukturen bedeuten einen Energiegewinn für das Molekül. Hierbei ist die Zahl der möglichen Tertiärstrukturen enorm hoch, da eine starke Rotationsfreiheit für jedes einzelne Nukleotid innerhalb des Phosphatrückgrats gegeben ist. Für RNA-Moleküle können sieben verschiedene Torsionswinkel des Zucker-Phosphatrückgrats und fünf Torsionswinkel im Ribosering definiert werden. Durch diese große Zahl an Parametern wird die experimentelle Bestimmung von Tertiärstrukturen stark erschwert. Bei Faltungsstudien (*in vitro*) wird deshalb davon ausgegangen, dass ein Molekül innerhalb der möglichen Tertiärstrukturen unter Standardbedingungen und ohne äußere Einflüsse eine einheitliche, thermodynamisch stabile Konformation annimmt, aus welcher ein Energiegewinn resultiert. Um die Struktur von RNA-Molekülen zu identifizieren, können heute eine Vielzahl spektroskopischer- und molekularbiologischer Methoden sowie die Bioinformatik genutzt werden.

1.4 Regulatorische RNAs in Prokaryoten

Neuere Studien haben eine Vielzahl von regulatorischen, nicht-kodierenden RNAs in Prokaryoten identifiziert. Zur Zeit sind alleine in *E. coli* mehr als 50 verschiedene regulatorische RNAs bekannt (Argaman *et al.*, 2001). Von diesen ist jedoch nur eine geringe Anzahl charakterisiert. Aufgrund ihrer Größe von 40-400 Nukleotiden werden diese RNAs auch als small (s)RNAs bezeichnet. Sie agieren über drei generelle Mechanismen: einige, wie die 4.5S RNA oder die RNase P sind Teil eines RNA-Protein-Partikels. Eine weitere Gruppe bildet die Struktur anderer Nukleinsäuren nach ('molekulare Mimikry'). Zu dieser Gruppe gehören die CsrB und CsrC RNA und die 6S RNA (siehe Kapitel 1.5). In der Dritten, am besten charakterisierten Gruppe, erfolgt die Wechselwirkung zwischen regulatorischer und Ziel-RNA durch Basenpaarung (Storz, 2002). Regulatorische RNAs in Bakterien wir-

ken meist als Repressor der Translation oder bei der Degradation von mRNAs (Storz, 2002).

Die erste chromosomal codierte sRNA, die identifiziert werden konnte, war die MicF RNA (Inouye und Delihias, 1984). Diese 93 Nukleotide lange RNA reprimiert durch Basenpaarung mit der 5'-UTR der *ompF* mRNA die Translation dieses für die Osmoregulation wichtigen Proteins.

Zwei andere regulatorische RNAs, welche ebenso wie die MicF RNA in *trans* zu ihren Ziel-mRNAs auf dem Chromosom codiert sind, sind OxyS und DsrA RNA (Wassarman *et al.*, 1999). Die OxyS RNA wird durch oxidativen Stress induziert und agiert als globaler Regulator, wobei sie mehr als 40 Gene aktiviert oder reprimiert, unter anderem *fhlA* und *rpoS* (Altuvia *et al.*, 1997). *FhlA* codiert für einen Aktivator der Transkription, bei *rpoS* handelt es sich um den stationäre Phase spezifischen Sigmafaktor der bakteriellen RNA-Polymerase. OxyS reprimiert *fhlA* durch Basenpaarung mit einer kurzen Sequenz innerhalb der Ribosomen-Eintrittsstelle auf der *fhlA* mRNA. Hierdurch wird die Bindung von Ribosomen und somit die Translation der *fhlA* mRNA verhindert (Altuvia *et al.*, 1998). *RpoS* wird ebenfalls post-transkriptionell inhibiert, wobei die Wirkung indirekt durch eine Modulation des Regulatorproteins Hfq erfolgt (Zhang *et al.*, 1998). Bei der Wechselwirkung mit den jeweiligen Ziel-mRNAs sind zwei verschiedene Regionen der 109 Nukleotide langen OxyS RNA involviert.

Ebenfalls in die Regulation von *rpoS* greift eine andere RNA aus der Gruppe der regulatorischen RNAs ein: die DsrA RNA aus *E. coli* erhöht über sequenzspezifische RNA-RNA Interaktion die Translation und Stabilität der *rpoS* mRNA (Lease und Belfort, 2000). Hierzu bindet DsrA an die 5'-untranslatierte Region der *rpoS* mRNA. Durch DsrA Bindung wird ein *cis*-ständiger Stemloop, welcher als translationeller Operator die Shine-Dalgarno Sequenz unzugänglich macht, geöffnet und erlaubt so die Bindung von Ribosomen an die *rpoS* mRNA (Majdalani *et al.*, 1998). DsrA scheint weiterhin auch eine Rolle als RNA-Thermometer für *rpoS* während des Zellwachstums zu spielen (Repoila und Gottesmann, 2001; Sledjeski *et al.*, 1996). Eine reprimierende Wirkung hat DsrA RNA auf den globalen Transkriptionsregulator H-NS (Kapitel 1.6.5). DsrA blockiert die Synthese von H-NS durch einen verstärkten Abbau der *hns* mRNA durch RNA-RNA-Interaktion. Vermutlich wird durch die DsrA-Bindung eine RNase-sensitive Region auf der *hns* mRNA gebildet oder freigelegt, wodurch der Abbau der mRNA verstärkt wird (Lease und Belfort, 2000). Es werden noch weitere Funktionen für die DsrA RNA vermutet, unter anderem eine Rolle in der Vermittlung von Resistenz gegen Säuren (Lease *et al.*, 2004). Ebenso wie bei der OxyS RNA spielt auch bei der DsrA vermittelter Regulation das Protein Hfq eine wichtige Rolle (Lease *et al.*, 2004; Brescia *et al.*, 2003; Sledjeski *et al.*, 2001).

Alle hier bisher beschriebenen RNAs werden unter Stress-Bedingungen induziert. Dies gilt auch für erst kürzlich identifizierte regulatorische RNAs wie die RyhB RNA. Diese kleine RNA wird nur unter Eisen-Mangel Bedingungen exprimiert. Unter solchen Bedingungen vermittelt sie unter anderem die Degradation der *sodB* mRNA, die für eine Eisen-Dismutase codiert. RyhB selbst steht wiederum unter der Kontrolle des Fur-Repressors, welcher bei hohen Eisen-Konzentrationen die RyhB Expression unterdrückt (Massé, 2003; 2002). Eine ganz andere Funktion hat die tmRNA, auch bekannt als SsrA RNA oder 10Sa RNA. Diese kleine RNA ist in einen Prozess involviert, der als *trans*-translation bezeichnet wird (Keiler *et al.*, 1996; Karzai *et al.*, 2000). Wenn ein Ribosom auf einer defekten mRNA blockiert, bindet die mit einem Alanin beladene tmRNA zusammen mit dem assoziierten

Protein SmpB in der A-Site des Ribosoms. Der Alanin-Rest wird von der tmRNA, welche hier als tRNA wirkt, auf die wachsende Polypeptidkette übertragen. Das Ribosom wechselt dann von der mRNA auf eine kurze Sequenz, codiert auf der tmRNA. Die Translation läuft auf dieser Sequenz normal weiter und wird bei einem ebenfalls auf der tmRNA codierten Stopcodon terminiert. Das finale Translationsprodukt ist ein hybrides Polypeptid, welches ein spezifisches Signal aus elf Aminosäuren ('AANDENYALAA') am C-terminalen Ende trägt. Diese Signal-Sequenz markiert das defekte Protein für die Degradation durch ATP-abhängige Proteasen (Keiler *et al.*, 1996; Gottesman *et al.*, 1998).

Viele der genannten regulatorischen RNAs benötigen *in vivo* als zusätzlichen Faktor das Regulatorprotein Hfq. Hfq wurde ursprünglich als ein *E. coli* Wirts-Faktor für die Replikation des Phagen Q β beschrieben (Franze DeFernandez *et al.*, 1968). Neuere Studien haben gezeigt, dass Hfq ein Homolog der Sm und Sm-ähnlichen Proteine ist (Møller *et al.*, 2002). Diese Proteine formen das katalytische Core der Spleißosomen und Degradationskomplexe bei Eukaryoten und Archaeobakterien (He und Parker, 2000). Ebenso wie diese bindet Hfq bevorzugt an A/U reiche Sequenzen und formt homohexa- oder homoheptamere Ringe ähnlicher Größe (Møller *et al.*, 2002). Neben der Homologie der pro- und eukaryotischen bzw. archealen Sm-Protein/Hfq-Sequenzen zeigen auch die Kristall-Strukturen von Hfq aus *E. coli* und *S. aureus* eindeutige Übereinstimmung, was die Verwandtschaft der Proteine ebenfalls bestätigt (Schumacher *et al.*, 2002; Sauter *et al.*, 2003). Die Auswirkung der Bindung von Hfq an sRNAs ist sehr variabel. Hfq verändert die Struktur einiger sRNAs: OxyS und auch Spot42 RNA zeigen mit und ohne Hfq unterschiedliche Muster nach einem Verdau mit RNasen (Møller *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2002). Hingegen verursacht die Bindung von Hfq an DsrA RNA keine Änderungen in der Struktur der RNA (Brescia *et al.*, 2003). Weiterhin vereinfacht die Interaktion mit Hfq die Bindung von OxyS RNA und Spot42 RNA an ihre Ziel-mRNA (Møller *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2002). Diese Wirkung von Hfq als RNA-Chaperon scheint ubiquitär für alle Hfq-bindenden RNAs und ihre Ziel-mRNAs zu sein (Moll *et al.*, 2003). Die Mechanismen, über welche Hfq wirkt, sowie der Einfluss anderer Faktoren auf die Wirkung sind jedoch zur Zeit noch nicht vollständig geklärt.

Eine erst vor kurzem ins Interesse der RNA Biochemie gerückte RNA Funktion sind die so genannten 'Riboswitches'. Riboswitches sind Strukturen in der mRNA, welche regulatorische Funktionen haben. Anders als an andere regulatorische RNA-Strukturen können kleine Liganden wie zum Beispiel Flavinmononukleotide (FMN), Coenzyme (B12) oder Purine direkt an sie binden. Die Genregulation erfolgt durch die Bildung alternativer Sekundärstrukturen, welche in ihrer reprimierenden Konformation eine frühzeitige Termination der Transkription verursachen oder die Translationsinitiation verhindern. Riboswitches regulieren mehrere Stoffwechselwege, unter anderem die Vitamin-Biosynthese (z. B. Riboflavin, Thiamin) und den Metabolismus von Methionin, Lysin und Purinen (Nudler und Mironov, 2004). Auch in Archaeen und Eukaryoten wurden mRNA-Kandidaten für Riboswitches gefunden. Die taxonomische Diversität der Genome, welche Riboswitches beinhalten, sowie die Tatsache, dass Riboswitches direkt ihre Liganden binden können und zur Regulation keine weiteren Faktoren benötigen, deutet darauf hin, dass dieses eines der ältesten regulatorischen Systeme darstellt (Vitreschak *et al.*, 2004).

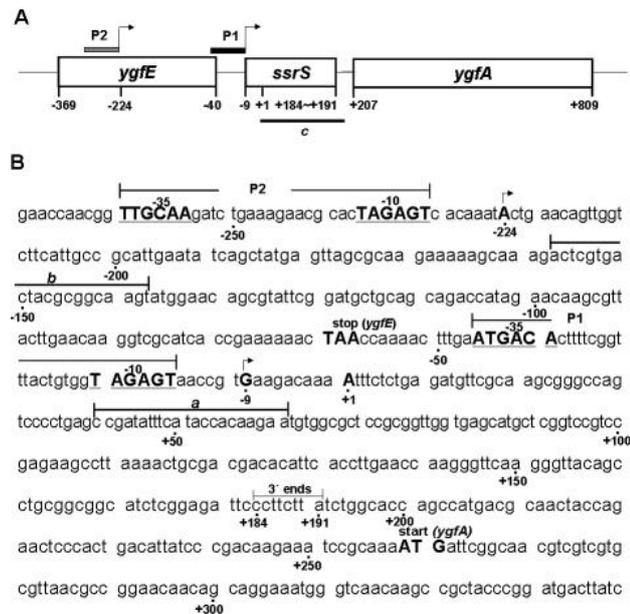


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der *ssrS*-Promotorregion. A: Position der Promotoren *ssrS* P1 und P2 auf der Transkriptionseinheit. B: Sequenz der *ssrS*-Transkriptionseinheit. Die Promotoren P1 und P2 sowie die Promotorkonsensussequenzen und die Transkriptionsstarts sind markiert. Ebenfalls eingetragen ist der Beginn des *ygfA*-ORFs (Kim und Lee, 2004).

1.5 Die 6S RNA aus *Escherichia coli*

Diese regulatorische RNA wurde bereits 1967 auf Polyacrylamidgelen von *in vivo* markierter Gesamt-RNA aus *E. coli* gefunden (Hindley, 1967) und war die erste kleine RNA, die sequenziert werden konnte (Brownlee, 1967). Das Gen *ssrS*, welches für die 6S RNA codiert, ist Teil eines dicistronischen Leserasters. Der 'downstream' von der 6S RNA liegende ORF codiert für das Protein YgfA, dessen Funktion noch ungeklärt ist. Die Aminosäuresequenz dieses putativen Proteins zeigt jedoch einige Übereinstimmungen mit eukaryotischen 5,10-Methenyltetrahydrofolat-Synthetasen. Neue Arbeiten zeigen, dass sowohl YgfA als auch 6S RNA Homologe in allen evolutionären Zweigen der Eubakterien existieren (Barrick *et al.*, 2005; Willkomm *et al.*, 2005), was eine universelle Funktion der 6S RNA vermuten lässt.

Eigenschaften der 6S RNA Es konnte gezeigt werden, dass die 6S RNA von zwei Tandempromotoren (P1 und P2) transkribiert wird, welche sich proximal (P1) und distal (P2) zur 6S RNA Sequenz befinden (Kim und Lee, 2004). Bei P1 handelt es sich um einen σ^{70} -abhängigen Promotor, P2 ist sowohl σ^{70} - als auch σ^{38} -spezifisch (eine schematische Übersicht über die Anordnung der Promotoren ist in der Abbildung 1.2 (A) gezeigt).

Aufgrund dieser Promotorstrukturen vermuten die Autoren eine wachstumsphasenabhängige Regulation der 6S RNA Synthese. Wie schon früher gezeigt werden konnte, entsteht bei der Transkription vom proximalen P1-Promotor ein Transkript, welches neun Nukleotide länger als die reife Form der 6S RNA ist (siehe Abbildung 1.2 (B), Gildehaus, 2001; Hsu *et al.*, 1985). Die reife 6S RNA (184 Nukleotide) wird aus diesem Vorläufer-Transkript

durch die Endonukleasen RNase E und RNase G prozessiert (Kim und Lee, 2004). Hierbei treten nicht nur Formen mit 184 Nukleotiden, sondern auch um ein oder zwei Nukleotide verkürzte RNAs auf (Gildehaus, 2001; Kim und Lee, 2004). Die Transkription vom P2 generiert ein Transkript mit einer Länge von 413 bis 415 Nukleotiden, beginnend an Position -224. Dieses Vorläufertranskript wird ausschließlich von der RNase E prozessiert. Ebenso wie das 5'-Ende wird auch das 3'-Ende der 6S RNA prozessiert, die involvierten Enzyme konnten jedoch noch nicht identifiziert werden. Wahrscheinlich handelt es sich hierbei um Exoribonucleasen (Li *et al.*, 1998). Über die Regulation der *ssrS* Genexpression durch Effektoren wie ppGpp oder Transkriptionsfaktoren ist zurzeit noch nichts bekannt. Eine Regulation des Gens durch Transkriptionsfaktoren ist jedoch wahrscheinlich, zumal Konsensussequenzen für den Transkriptionsfaktor FIS ('Factor for Inversion Stimulation') im 'upstream'-Bereich identifiziert werden konnten (Gildehaus, 2001). Ein weiterer Hinweis auf eine mögliche Beeinflussung der *ssrS*-Regulation durch (Transkriptions-) Faktoren ist die Veränderung des *ssrS*-Levels in Stämmen, die für einen oder mehrere dieser Faktoren defizient sind (Neusser, unpubliziert).

'Upstream' von der 6S RNA konnten noch keine Strukturen identifiziert werden, die die typischen Merkmale von Terminatoren aufweisen (siehe 1.6.3). Zwar kann ein kleiner Bereich von acht Nukleotiden nach dem Ende der RNA einen komplementären Helixstamm von sechs Nukleotiden Länge und einem vier Nukleotide großen Loop bilden, es fehlt jedoch der für faktorunabhängige Terminatoren typische Bereich aus Uracil-Bausteinen hinter dem Helixstamm. Ebenso ist dieser Bereich nicht übermäßig reich an Cytidin und arm an Guanin, womit eine 'Rho'-abhängige Termination unwahrscheinlich ist.

Die Funktion der 6S RNA Die 6S RNA liegt in einer Menge von etwa 1000 Kopien/Zelle vor und migriert als Ribonukleoproteinpartikel mit einem Sedimentationskoeffizienten von 11S (Lee, 1978). 2000 konnte gezeigt werden, dass es sich bei diesem Protein um die bakterielle RNA-Polymerase handelt (Wassarman und Storz, 2000). Die Bindung der 6S RNA an die RNA-Polymerase (E70) ist hierbei effizient, fast alle Moleküle sind an das Enzym gebunden. Nach Wassarman und Storz beeinflusst die 6S RNA die Aktivität der RNA-Polymerase und die Nutzung von σ^{70} - und σ^{38} -abhängigen Promotoren, zumal die Menge der 6S RNA Moleküle zu Beginn der stationären Phase um den Faktor zehn von 1000 auf 10000 Moleküle pro Zelle steigt. Auffällig ist, dass sowohl ein Fehlen des *ssrS*-Gens als auch eine Überexpression keine sofort erkennbare Auswirkung auf die Zelle haben (Hsu *et al.*, 1985). Neuere Studien mit 6S RNA defizienten Zellen lassen jedoch eine Rolle der 6S RNA beim Überleben der Zellen während langer Hungerperioden vermuten. Hierbei konnte *in vivo* die Aktivierung einiger stationäre Phase-spezifischer Promotoren gezeigt werden, welche jedoch umstritten ist (Kim *et al.*, 2004). Ebenso konnte eine etwa dreifache Inhibierung einiger σ^{70} -spezifischer Promotoren *in vivo* gezeigt werden. Die von 6S RNA inhibierten σ^{70} -spezifischen Promotoren beinhalten eine verlängerte ('extended') -10 Region, wie sie eigentlich für σ^{38} -abhängige Promotoren üblich ist (siehe 1.6.2) (Trotochaud und Wassarman, 2004).

Die Wirkweise und Funktion der 6S RNA ist noch nicht geklärt, aufgrund der Struktur wird jedoch ein 'Mimikry' eines offenen Promotors postuliert (Wassarman und Storz, 2000; Barrick *et al.*, 2005). Genaue Interaktionspositionen zwischen RNA-Polymerase und 6S RNA konnten aber bislang noch nicht gezeigt werden. Es ist anzunehmen, dass die 6S RNA weitere reichende regulatorische Funktionen hat. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass ein *ssrS*-defizienter Stamm Unterschiede im Proteinexpressionsmuster zeigt

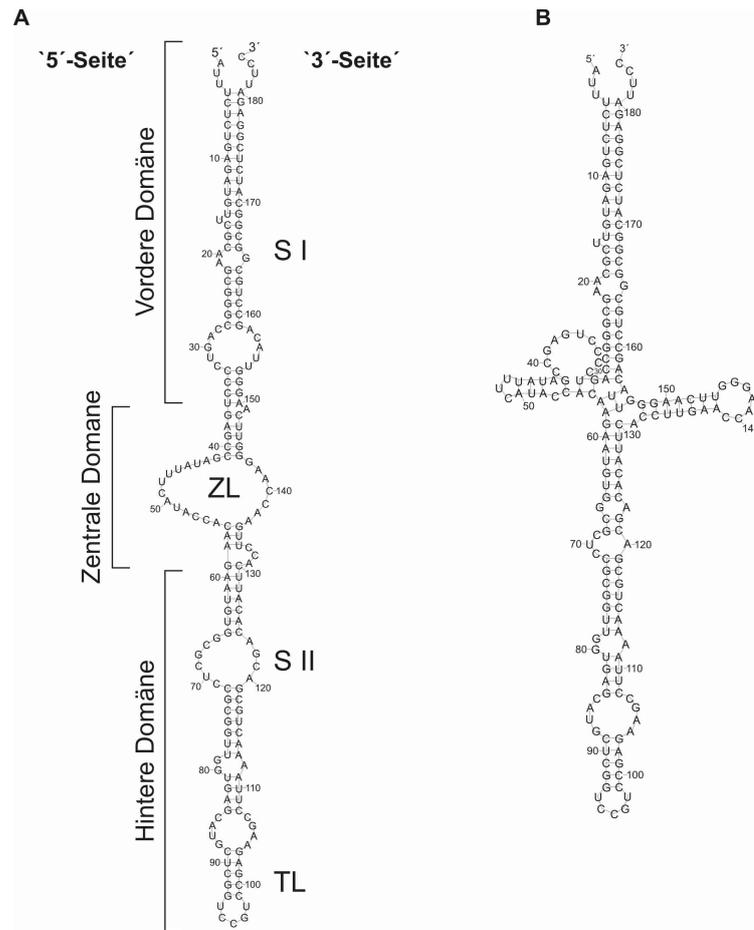


Abbildung 1.3: Sekundärstruktur der 6S RNA. A: Gerechnete Sekundärstruktur der 6S RNA mit dem zentralen Loop, der von zwei helikalen Bereichen eingerahmt wird. S I= Stem I, S II= Stem II. TL= terminaler Loop, ZL= zentraler Loop. B: Sekundärstruktur der 6S RNA unter der Berücksichtigung von chemischen und enzymatischen Mappingdaten: Der zentrale Loop (ZL) ist hoch dynamisch (Gildehaus, 2001).

und Komponenten des *deo*-Operons beeinflusst, welches unter anderem an der Nukleotidsynthese beteiligt ist (Neusser, unpubliziert).

Struktur der 6S RNA Die berechnete Sekundärstruktur der 6S RNA stellt ein stark doppelsträngiges Molekül mit einem großen zentralen und mehreren kleineren internen Loops dar (Vogel *et al.*, 1987). Enzymatische und chemische Analysen der Sekundärstruktur zeigen eine große Variabilität der Strukturen besonders im zentralen Bereich der Struktur, was auf eine hohe Dynamik in diesem Bereich des Moleküls schließen lässt (Gildehaus, 2001). Die Abbildung 1.3 zeigt die gerechnete Sekundärstruktur der 6S RNA (A) und eine Struktur, bei welcher durch Mappinganalysen experimentell bestimmte Strukturparameter berücksichtigt wurden (B).

In Temperaturgradienten-Gelelektrophoresen (TGGE) konnte zusätzlich gezeigt werden, dass ein Auseinanderbrechen dieser zentralen Domäne in der nativen Struktur irreversibel

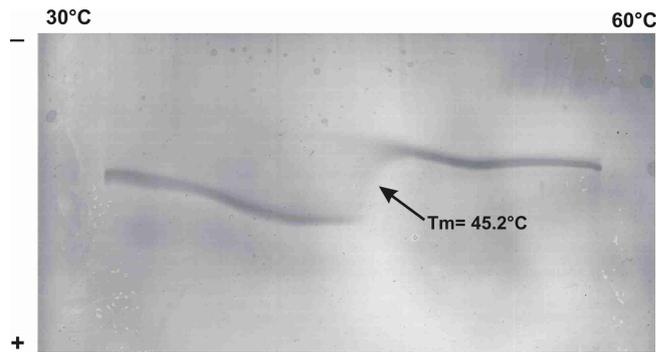


Abbildung 1.4: Temperaturgradienten-Gelelektrophorese (TGGE) der 6S RNA. Gezeigt ist ein Temperaturgradient von 30-60°C. Bei einer Temperatur von etwa 46°C schmilzt die 6S RNA irreversibel auf (Gildehaus, 2001).

ist (Gildehaus, 2001; Abbildung 1.4).

Durch phylogentische Analysen und Strukturuntersuchungen von 6S RNA Sequenzen verschiedener Eubakterien konnten zudem konservierte Regionen identifiziert werden, welche scheinbar für die Ausbildung der Sekundärstruktur als auch für die Funktion essentiell sind (Barrick *et al.*, 2005).

1.6 RNA-Synthese: Transkription

Prokaryoten zeichnen sich durch eine rasche und effektive Adaption an ihre Umgebung aus. Eine effiziente Regulation aller Schritte der Genexpression (Replikation, Transkription und Translation) sowie der Maturierung der jeweiligen Produkte ist hierfür unabdingbar. Die Transkription fungiert nicht nur als reiner Prozess der RNA-Synthese, sondern ihre Regulation ist gleichzeitig die wichtigste Schaltstelle bei der Anpassung an veränderliche Lebensbedingungen.

1.6.1 Struktur und Funktion der bakteriellen RNA-Polymerase

Während man bei Eukaryoten verschiedene DNA-abhängige RNA-Polymerasen findet, werden alle RNAs in Prokaryoten von nur einer DNA-abhängigen RNA-Polymerase (RNAP) transkribiert. Das minimale 'Core'-Enzym der RNA-Polymerase aus *E. coli* setzt sich aus den Untereinheiten $\alpha(x2)$, β , β' sowie dem additiven ω -Faktor zusammen, welcher mit dem Enzym assoziiert ist und der Stabilisierung dient (Minakhin *et al.*, 2001). Zusätzlich benötigt das Enzym zur DNA-Erkennung noch einen spezifischen Sigma (σ)-Faktor. Das so gebildete 'Holo'-Enzym hat ein Molekulargewicht von etwa 460 kDa und eine Abmessung von 90 x 90 x 160 Å. Bis heute konnte noch keine hoch aufgelöste dreidimensionale Struktur der *E. coli* RNA-Polymerase gezeigt werden. Vassylyev *et al.* konnten jedoch 2002 die Struktur des RNA-Polymerase Holoenzym von *Thermus thermophilus* in einer Resolution von 2.6 Å aufklären (Vassylyev *et al.*, 2002; siehe Abbildung 1.5). Aufgrund der Homologie beider Enzyme können aus dieser Struktur jedoch Rückschlüsse auf das *E. coli* Holoenzym gezogen werden.

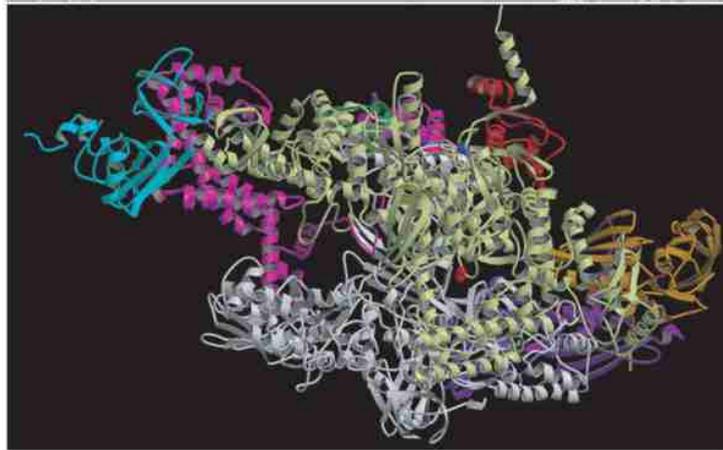


Abbildung 1.5: Röntgenkristallstruktur der RNA-Polymerase aus *T. thermophilus*. β : beige. β' : weiß (β' 163-452: cyan; β' Zn^{2+} -Finger: grün). α I: blau, α II: hellorange; σ : magenta, ω : rot. Zwei katalytische Mg^{2+} (rot) und zwei Pb^{2+} (blau) sind als Kugeln eingezeichnet (Vassylyev *et al.*, 2002).

Die α -Untereinheit Die α -Untereinheiten der RNA-Polymerase bestehen bei *E. coli* aus je 329 Aminosäuren (*rpoA*, 36.5 kDa). Diese Untereinheiten bilden ein Dimer (α_2), welches als Plattform für die Bindung der β und β' -Untereinheiten dient und eine Rolle in der Aktivierung der Transkription spielt (Zhang und Darst, 1998). Diese Funktionen werden von zwei verschiedenen Domänen des Proteins übernommen, die durch einen flexiblen Linker (14 AS) miteinander verbunden sind (Negishi *et al.*, 1995; Jeon *et al.*, 1997). Der N-terminale Bereich (α -NTD, AS 1-235) vermittelt die Dimerisierung der α -Untereinheit und somit die initiale Assemblierung des Core-Enzyms (Igarashi *et al.*, 1991). Die α -CTD (AS 245-329) hingegen wechselwirkt mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren und bindet an das regulatorische UP-Element im 'upstream' Bereich der Promotorsequenz und verstärkt so die Transkription (Igarashi *et al.*, 1991; Ebright *et al.*, 1995).

Die β - und β' -Untereinheiten Die β -(*rpoB*, 1342 AS) und β' -(*rpoC*, 1407 AS) Untereinheiten stellen mit 150- bzw. 155 kDa die zwei größten Untereinheiten der RNA-Polymerase dar und bilden das katalytischen Core des Enzyms. Bakterielle β - und β' -Untereinheiten zeigen eine starke Ähnlichkeit zu den entsprechenden eukaryotischen Homologen, was auf eine hohe Konservierung der prinzipiellen Funktionen dieser Untereinheiten zwischen den verschiedenen Spezies hindeutet. Regionen mit hoher Sequenzkonservierung sind in Clustern (Domänen A-I) über das gesamte Molekül verteilt. Im C-terminalen Bereich von β konnten konservierte Elemente identifiziert werden, die den Kontakt zu β' - und α -Untereinheit vermitteln. Ebenso scheint die β -Untereinheit bei Pausen und der Termination der Transkription eine Rolle zu spielen. Für die β' -Untereinheit konnten mehrere Funktionen gezeigt werden, die eine Beteiligung bei der Termination, Antitermination und Elongation sowie bei der Bindung von DNA und Sigmafaktor beinhalten (Wagner, 2000). Die β - und β' -Untereinheit geben der RNA-Polymerase ihre als 'crab-claw' (Krabbenscheere) bezeichnete Struktur, die man auch in eukaryotischen RNA-Polymerasen findet. Hierbei wird ein Arm der Schere von der β -, der andere von der β' -Untereinheit gebildet. Das ak-

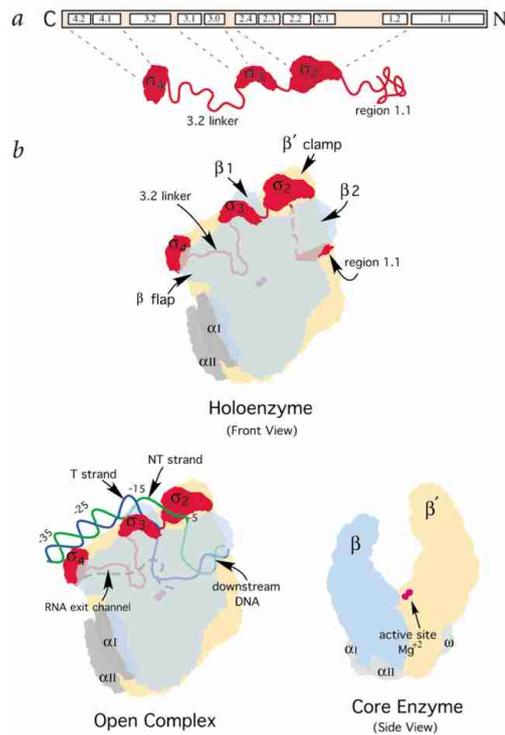


Abbildung 1.6: Schematische Darstellung der Struktur der RNA-Polymerase und des σ -Faktors. (a) Darstellung der konservierten Regionen 1.1 bis 4.2 des σ -Faktors und Übersicht über die globulären Domänen (σ_{2-4}). (b): Schematische Darstellung von drei RNAP Konformationen (Holoenzym, offener Komplex ('open complex') und Core-Enzym. Verschiedene β und β' -Domänen sind markiert. Farbkodierung: β' = beige; β : blau; α und ω : grau; σ = rot. Mg^{2+} (im aktiven Zentrum): rot; 'template' Strang (T) = dunkelblau, 'non-template'-Strang (NT) = grün (Hsu, 2002).

tive Zentrum des Enzyms befindet sich am Schnittpunkt zwischen β - und β' -Untereinheit. Hier koordinieren drei hochkonservierte Aspartat-Reste ein Mg -Ion (Vassylyev *et al.*, 2002). Der zwischen den Scheren liegende Kanal wird durch die von der β' -Untereinheit gebildete 'bridging-helix' geteilt. Im größeren Hauptkanal liegt das RNA-DNA-Hybrid aus geöffnetem DNA-Template und entstehendem Transkript. Der kleinere sekundäre Kanal ('secondary channel') ist die Eintrittsstelle für Nukleotide, sowie kleine Transkriptionseffektoren zum aktiven Zentrum des Enzyms. Die Abbildung 1.6 zeigt zur Veranschaulichung die RNA-Polymerase in verschiedenen Konformationen.

Die σ -Untereinheit Um als Holoenzym an DNA binden zu können, benötigt das Core Enzym einen Spezifitätsfaktor. In *Escherichia coli* gibt es mindestens sieben dieser so genannten Sigmafaktoren (σ), welche die Spezifität der RNAP-Promotor-Erkennung vermitteln. Der für die Transkription der 'housekeeping'-Gene während der exponentiellen Phase verantwortliche Sigmafaktor σ^{70} ist mit einem Molekulargewicht von 70 kDa der größte Sigmafaktor. Neben σ^{70} werden in *E. coli* alternative Sigmafaktoren exprimiert, die für die Transkription der stationären Phase-spezifischen Gene (σ^{38}), der Hitzeschock-Gene

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

Abbildung 1.7: Schematische Übersicht über die σ-Faktoren von *E. coli*. Gezeigt sind die zur Zeit bekannten σ-Faktoren von *E. coli*, ihre Größe (AS) und die ungefähre Anzahl ihrer spezifischen Gene ((Reckendrees, 2004), verändert nach: Ishihama, 2000.)

(σ²⁴ und σ³²), der Gene für die Flagellensynthese (σ²⁸), des Eisenstoffwechsels (σ¹⁹) und der Stickstoffassimilation (σ⁵⁴) essentiell sind (siehe Abbildung 1.7). Bis auf σ⁵⁴ sind alle Sigmafaktoren in ihrem Aufbau homolog und der σ⁷⁰-Familie zuzuordnen. Die Funktion der Sigmafaktoren umfasst die Erkennung des spezifischen Promotors und die Isomerisierung der DNA zum offenen Promotor-Komplex (siehe Kapitel 'Initiation' (1.6.3)), sowie die Wechselwirkung mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren (Borukhov, 2002).

Der Sigmafaktor σ⁷⁰ ist der Sigmafaktor für die Transkription der Gene, die unter exponentiellen Wachstumsbedingungen exprimiert werden ('housekeeping genes'). Das entsprechende Gen *rpoD* exprimiert ein Produkt mit einer Länge von 613 Aminosäuren (70.2 kDa). Neben σ⁷⁰ sind sechs weitere Sigmafaktoren in *E. coli* bekannt (siehe Abbildung 1.7), von denen fünf zur σ⁷⁰-Familie gerechnet werden. Mitglieder dieser Familie haben vier Regionen mit einer hohen Sequenzkonservierung (σ²-σ⁴ und die 'linker'-Region, siehe Abbildung 1.2). Diese vier Regionen werden weiter in Unterregionen unterteilt, deren Funktionen gut charakterisiert sind. Hierüber hinaus ist seit einiger Zeit die Röntgenstruktur des σ⁷⁰-Faktors von *E. coli* in einer Auflösung von 2.6Å bekannt (Ausnahme: Region 1.1, 73 AS am NTD, Abbildung 1.8). Die Bindung an das Core-Enzym erfolgt über Protein-Protein Wechselwirkungen zwischen der β- und β'-Untereinheit und den Regionen 2.1, 2.2 und 3.2 des Sigmafaktors. Die Region 2.4 ist verantwortlich für die Erkennung der -10 Region. Die Erkennung erfolgt hierbei basenspezifisch durch eine direkte Interaktion dreier Aminosäuren des Sigmafaktors (Q437, T440 und R441) mit den Positionen -12 und -13 des 'non-template' Strangs. Weiterhin spielt σ⁷⁰ noch eine wichtige Rolle bei der Isomerisierung vom geschlossenem zum offenen Promotor-Komplex (σ⁷⁰ Region 2.3), sowie bei der Erkennung von weiteren Promotorelementen wie der -35 Region (Region 4.1

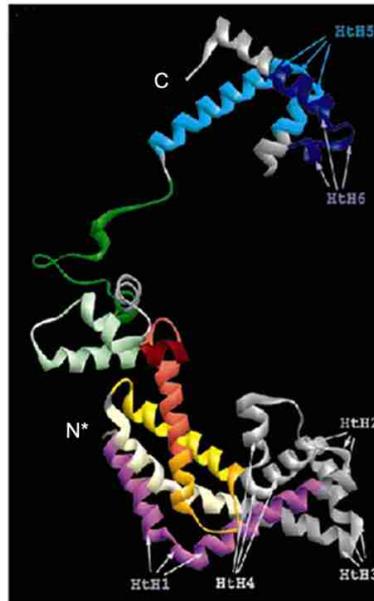


Abbildung 1.8: Röntgenkristallstruktur des σ^{70} -Faktors von *E. coli*. 3D-Struktur des σ^{70} -Faktors (AS 73-613). Farbkodierung: Region 1.1= weiss, 1.2= grau. Region 2.2= gelb, Region 2.3= orange, Region 2.4/2.5= rot. Region 3.1= hellgrün, Region 3.2 ('Linker')= dunkelgrün. Region 4.1 und 4.2= türkis und dunkelblau. Weniger konservierte Bereiche sind in grau dargestellt. Der CTD (C) und der NTD (N) der α -Fragments (N*) sind gekennzeichnet. (verändert nach Vassylyev *et al.*, 2002).

und 4.2) und regulatorischen Elementen. Hierbei sollen die Wechselwirkungen zwischen Protein und DNA auf Interaktionen mit dem Phosphatrückgrat beruhen (Campbell *et al.*, 2002). Der σ^{70} -Faktor besitzt seine Funktionalität jedoch ausschließlich im Verbund mit dem Core-Enzym. Die saure Region 1.1 verhindert vermutlich durch Maskierung der für die DNA-Bindung verantwortlichen Regionen die Bindung des freien Proteins an die DNA ('Autoinhibition', Dombroski *et al.*, 1993, Camarero *et al.*, 2002). Erst durch Bindung des Faktors an das Core-Enzym und die damit einhergehende Konformationsänderung wird die Wechselwirkung zwischen DNA und σ^{70} möglich.

Der Sigmafaktor σ^{38} gehört zur Familie der σ^{70} -Faktoren und ist der spezifische Faktor für die Transkription von Genen während der stationäre Phase, sowie unter bestimmten Stresssituationen wie z. B. Hunger und hohe oder niedrige Osmolarität des Mediums (Hengge-Aronis, 1996). σ^{38} (330 AS, 37.8 kDa) wird codiert vom Gen *rpoS* und hat unter allen alternativen Sigmafaktoren die größte Homologie zu σ^{70} . Die Synthese und Regulation von σ^{38} durch das so genannte 'RpoS-Regulon' ist hoch komplex und soll an dieser Stelle nicht näher beschrieben werden. Während der exponentiellen Wachstumsphase ist σ^{38} in der Zelle kaum nachweisbar, erst unter Stationären- oder Stressbedingungen wird die *rpoS* Expression um das 20-30fache gesteigert (Hengge-Aronis, 2003). Die Konzentration von σ^{38} erreicht jedoch dennoch nur maximal 30% der von σ^{70} (Ishiyama, 2000). Weiterhin ist auch die Affinität von σ^{38} zum Core-Enzym im Vergleich zu σ^{70} etwa fünffach geringer (Colland *et al.*, 2002). Genaue Strukturdaten von σ^{38} sind zurzeit noch nicht verfügbar. σ^{38} kann

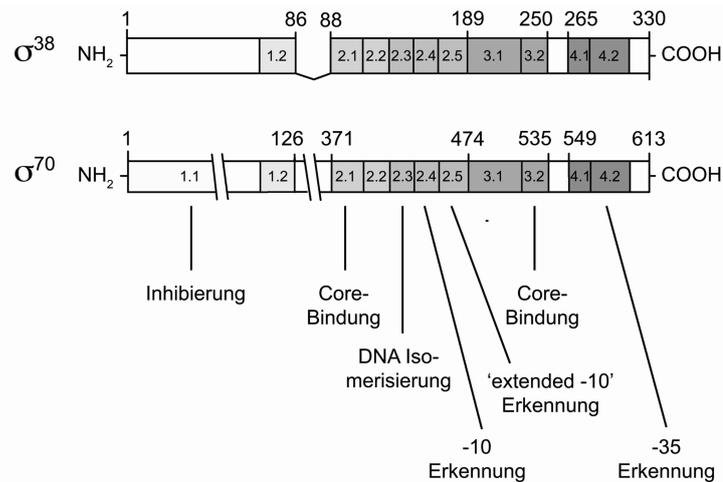


Abbildung 1.9: Schematischer Vergleich der funktionellen Domänen der Sigmafaktoren σ^{70} und σ^{38} . Die Positionen der konservierten Bereiche sind anhand der Aminosäuren gekennzeichnet. Zusätzlich sind die einzelnen Funktionen der konservierten Regionen 1-4 hervorgehoben (Reckendrees, 2004, verändert nach Checroun *et al.*, 2004).

jedoch ebenfalls in vier konservierte Regionen unterteilt werden, wobei die Regionen der DNA-Erkennung (4.2 und 2.3 bis 2.5 mit bis zu 70% Homologie bei beiden Sigmafaktoren) stark konserviert sind. σ^{38} besitzt jedoch eine kürzere Region 1.1, die wenig Homologie zur entsprechenden Region in σ^{70} zeigt und hat keinen ‘Spacer’ zwischen der Region 1.2 und 2.1 (Dombroski, 1993; Wilson und Dombroski, 1997). ‘Footprint’-Analysen der verschiedenen Holoenzyme (E70 und E38) zeigen neben übereinstimmenden Signalen auch eine Vielzahl von Differenzen, was auf eine unterschiedliche Konformationen der Holoenzyme hinweist. So deuten abweichende Signale auf eine unterschiedliche Interaktion mit der β - und β' -Untereinheit des Core-Enzyms (Region 2.2 bis 2.4), sowie der -35 Region (Region 4.1 und 4.2) hin (Colland *et al.*, 2002). Die Erkennung der -10 bzw. der ‘extended’ -10 Region erfolgt, wie auch für σ^{70} beschrieben, mit den konservierten Regionen 2.4 und 2.5 bzw. 3.0. Die Erkennung der wichtigen Position -13(C) im Promotor erfolgt über eine Interaktion mit den Aminosäuren Q152, E155 und K173 (Checroun *et al.*, 2004). Die Aminosäuren Q152 und E155 entsprechen den korrespondierenden Positionen Q437 und T440 von σ^{70} , über welche eine Interaktion mit der DNA an Position -12 im σ^{70} -spezifischen Promotor erfolgt. Die Sigmafaktoren σ^{38} und σ^{70} sind in der Abbildung 1.9 noch einmal vergleichend dargestellt.

1.6.2 Struktur und Funktion von Promotoren

Die Startstellen der Transkription bezeichnet man als Promotoren. Diese konservierten Abschnitte der DNA vor Genen erlauben die Erkennung des Transkriptionsstarts und das Binden der DNA-abhängigen RNA-Polymerase an die DNA. Promotoren erlauben durch Variationen ihrer konservierten Elemente eine Diskriminierung zwischen verschiedenen Holoenzymen. Hierbei zeigen einige Holoenzyme, bedingt durch den jeweiligen gebundenen Sigmafaktor eine strikte Promotorspezifität, wohingegen das mit σ^{70} oder σ^{38} (siehe 1.6.4)

assoziierte Holoenzym eine überlappende *in vitro* und (zum Teil) *in vivo* Promotorspezifität zeigt.

Der σ^{70} -spezifische 'Konsensus'-Promotor Ein minimaler σ^{70} -abhängiger Promotor ('Core'-Promotor) besteht aus drei Strukturelementen, die aus Strukturvergleichen von mehr als 300 Promotoren abgeleitet wurden (Lisser und Margalit, 1993): Einer hoch konservierten Sequenz mit der Nukleotidfolge 5'-TATAAT-3' ('non-template'-Strang). Aufgrund der Entfernung von zehn Nukleotiden upstream vom Transkriptionsstart wird diese Region als '-10 Region' bezeichnet. Eine weitere gebräuchliche Bezeichnung ist 'Pribnow-Box'. Etwa 35 Nukleotide stromaufwärts vom Transkriptionsstart liegt eine zweite Erkennungssequenz, die -35 Region mit der Nukleotidfolge 5'-TTGACA-3' (Nichtmatrizenstrang). Zwischen diesen beiden Elementen liegt eine nicht konservierte Region. Diese 'Spacer'-Region umfasst 17 +/- 1 Basenpaare und stellt das dritte Erkennungselement dar. Im 'Spacer' spielt weniger die Basenfolge als vielmehr die Länge der Spacerregion eine Rolle im Hinblick auf die Stärke eines Promotors (Beutel und Record, 1990). Neben den oben beschriebenen Core-Elementen haben die meisten Promotoren weitere regulatorische Elemente stromaufwärts ('upstream') der -35 Region. Die UAS (upstream activating sequence) enthält Bindestellen für Transkriptionsfaktoren. Das UP-Element ist eine AT-reiche Region, welche die Polymerase-Promotor-Interaktion direkt stabilisiert. Der Startpunkt der Transkription wird als +1 bezeichnet und liegt etwa fünf bis neun Basenpaare hinter der -10 Region (Hawley und McClure, 1983). Ebenfalls beeinflusst werden kann der Promotor durch stromabwärts flankierende Elemente (DRS, 'downstream sequence region').

Der σ^{38} -spezifische Promotor Im Gegensatz zum σ^{70} -abhängigen Promotor konnte bis heute kein Konsensus-Promotor für σ^{38} -spezifische Gene identifiziert werden. Beschrieben sind lediglich einige typische Sequenzmerkmale, die zur Selektivität des σ^{38} -Holoenzym beitragen: σ^{38} spezifische Promotoren weisen im 'upstream' Bereich eine verlängerte 'extended' -10 Region (Position -14 bis -7) mit der Konsensussequenz KCTATACT (K= T oder G). Eine besondere Rolle spielt hierbei die Position -13. An dieser Stelle befindet sich bei 85% der σ^{38} -abhängigen Promotoren ein C (Becker und Hengge-Aronis, 2001). Ein weiteres, häufig vorkommendes Merkmal ist eine degenerierte -35 Region (Gaal *et al.*, 2001). Weitere, nicht bei jedem σ^{38} -Promotor zu findende Sequenzelemente sind AT-reiche Regionen zwischen -10 Region und Transkriptionsstart (Ojengu *et al.*, 2000) sowie ein rudimentäres 'halbes' UP-Element um Position -50 (Germer *et al.*, 2001).

1.6.3 Der Ablauf der Transkription

Die Transkription kann in drei Phasen unterteilt werden: Initiation, Elongation und Termination (Von Hippel, 1996). Im Folgenden werden diese Phasen näher erläutert.

Die Initiation Die Initiation umfasst die Erkennung und Bindung der RNA-Polymerase an den Promotor, die Synthese der ersten Phosphodiesterbindungen und das Verlassen des Promotors beim Übergang in die Elongationsphase. Der Initiationsprozess kann in vier Stufen unterteilt werden, die schematisch in der Abbildung (1.10) dargestellt sind: Die erste Stufe der Initiation (I) ist die Bildung eines spezifischen, aber reversiblen Initiationskomplexes der RNA-Polymerase mit der doppelsträngigen Promotor DNA. Dieser

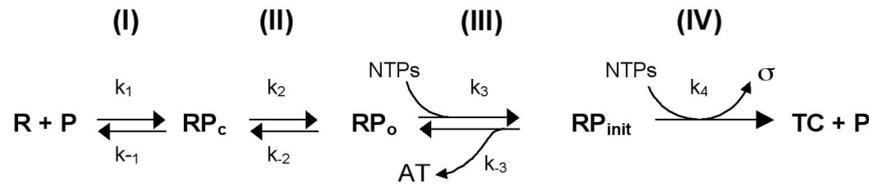


Abbildung 1.10: Schematische Darstellung der Transkriptionsinitiation. Die Abbildung zeigt die Phasen I-IV der Initiation. (I): Bindung der RNAP (R) an den Promotor (P) und Bildung des binären geschlossenen Komplexes (RP_c). (II): Isomerisierung zum offenen Komplex (RP_o). (III): Bildung des ternären Initiationskomplexes (RP_{init}). (IV): Entlassen des σ -Faktors und Übergang zum Elongationskomplex (TC). AT= abortive Transkripte (Record *et al.*, 1996).

erste Komplex (RP_c1) ist ein ‘geschlossener’ Komplex, die DNA liegt in diesem noch ungeöffnet vor. In diesem Komplex bedeckt die RNA-Polymerase einen Bereich von etwa 60 Basenpaaren (Position -55 bis +5; Meccas, 1991). Im nächsten Schritt (II) wird der initiale RP_c1 in einen weiteren geschlossenen Zustand überführt (RP_c2). In diesem Zustand interagiert die RNA-Polymerase mit der Promotor DNA ‘up’- und ‘downstream’ des Transkriptionsstarts. Der intermediäre Komplex RP_c2 (Position -55 bis +20) stellt den Übergang zum binären offenen Komplex dar (RP_o). Hier erfolgt eine reversible Öffnung der DNA über einen Bereich von zehn bis fünfzehn Basenpaaren, beginnend ‘upstream’ vom Transkriptionsstart. Bei einigen Promotoren unterscheidet man zwei offene binäre Komplexe (RP_o1 und RP_o2), die in ihrer Größe variieren. Mit der Konversion vom RP_o1 zum finalen RP_o2 geht eine Öffnung der DNA über den Transkriptionstart bis Position +2 einher, was den Einbau von Nukleotiden möglich macht. Für alle (außer $\sigma^{N(54)}$ -abhängige) Promotoren ist keine externe Energiezufuhr für die Isomerisierung zum offenen Komplex notwendig, die Reaktion wird alleine durch die freie Energie der RNA-Polymerase Bindung in Vorwärtsrichtung getrieben. Die Bindung der ersten Nukleotide stellt den dritten Schritt (III) der Initiation dar. Hiermit geht der Komplex in einen ternären offenen Komplex (RP_{init}), bestehend aus RNA-Polymerase, Promotor und Nukleotiden über. An dieser Stelle kann eine Vorwärtsbewegung der RNA-Polymerase (Promotor ‘clearance’) erfolgen, oder auch die Rückreaktion zum RP_o2 , indem die naszierende RNA-Kette als abortives Produkt aus dem Komplex entlassen wird. Erreicht die RNA-Kette eine Länge von sieben bis zwölf Nukleotiden, verlässt die RNA-Polymerase unter Abspaltung des Sigmafaktors den Promotor (Promotor ‘escape’, Schritt IV). Hiermit ist die Initiation abgeschlossen und die prozessive Elongation durch das Core-Enzym beginnt (Record *et al.*, 1996).

Die Elongation In der Elongationsphase bewegt sich die RNA-Polymerase über die DNA, entwindet diese und synthetisiert mit einer durchschnittlichen Rate von etwa 40-50 Nukleotiden pro Sekunde die RNA-Kette. Im Elongationskomplex deckt das Enzym etwa 30-40 Basenpaare der DNA ab, wobei der offene Bereich der Transkriptionsblase 14 bis 18 Nukleotide beträgt (Uptain, 1997). Die naszierende RNA ist an ihrem 3’-Ende als DNA-RNA-Hybrid über etwa 8-9 Basenpaarungen mit der DNA verbunden (Nudler *et al.*, 1998; 1997). Pausen sind während der Elongation häufig und spielen eine wichtige Rolle in der

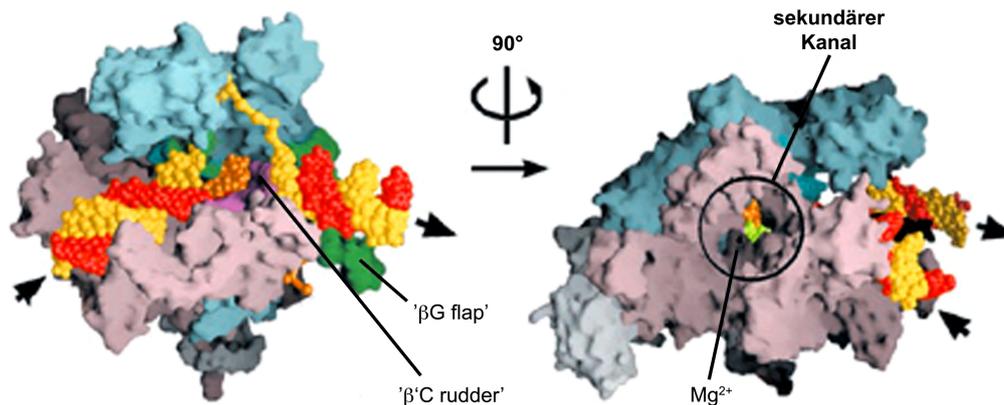


Abbildung 1.11: Dreidimensionales Struktur des Elongationskomplexes in zwei Ansichten (*T. aquaticus*). Die Untereinheiten des Core-Enzyms sind farbcodiert: β = grün-blau; β' = violett; α und ω = grau-weiß. Der 'template'-Strang ist rot, der 'non-template'-Strang ist gelb markiert. Orange: RNA-Transkript. Die Ein- und Austrittsstelle der DNA ist mit einem Pfeil gekennzeichnet (verändert nach Korzheva *et al.*, 2000).

Transkriptionsregulation (Krohn und Wagner, 1996; 1992; Artsimovich, 2000). Die Abbildung 1.11 zeigt die Struktur eines solchen Elongationskomplexes und die Lage der DNA im Enzym.

Die Termination Die Termination kann in *E. coli* durch zwei unterschiedliche Mechanismen - faktorabhängig oder faktorunabhängig - erfolgen. Bei der faktorunabhängigen oder intrinsischen Termination bildet sich strukturebedingt am 3'-Ende des entstehenden Transkripts ein GC-reicher Hairpin mit einer nachfolgenden Sequenz aus 3-8 Uracil-Resten aus. Diese Uracil-Reste destabilisieren das DNA-RNA-Hybrid, wobei die Terminationseffizienz mit der Stabilität des Hairpins korreliert (Martin und Tinoco, 1980). Etwa die Hälfte aller Transkripte wird an solchen intrinsischen Terminatoren beendet.

Die faktorabhängige Termination wird durch das Protein 'Rho' vermittelt. Rho bindet als Hexamer (46 kDa/Monomer) an Regionen im Transkript, die Cytidin-reich und gleichzeitig Guanin-arm sind. Diese Regionen werden als 'rut-sites' (*Rho utilisation sites*) bezeichnet. Unter ATP-Hydrolyse bewegt sich Rho auf dem Transkript in Richtung der RNA-Polymerase. Beim Erreichen des Transkriptionskomplexes (z. B. durch Pausen) entwindet Rho als Helikase ebenfalls unter ATP-Hydrolyse das DNA-RNA-Hybrid (Platt, 1994), wodurch das Transkript aus dem Komplex entlassen wird.

1.6.4 Die Transkription in verschiedenen Wachstumsphasen

Gram-negative Bakterien, zu denen auch *E. coli* gehört, gehen bei einer Limitierung von Nährstoffen in die stationäre Wachstumsphase über. Beim Übergang in die stationäre Phase verändern sich die Zellen morphologisch und physiologisch, um längere Zeiten des Hungers und vermehrten umgebungsbedingten Stress zu Überleben. Systeme, die vom Wechsel betroffen sind, umfassen den Nucleoid, die Translation und im besonderem Maße die Transkription, wobei die entsprechenden Regulationsmechanismen noch nicht vollständig

verstanden sind. Der für die Expression der stationären Phase-Gene primär bedeutende Faktor ist der alternative, stationäre Phase-spezifische Sigmafaktor σ^{38} (Kapitel 1.6.1). Im Folgenden sollen die Eigenschaften der für diese Arbeit wichtigen Promotoren, sowie die stationäre Phase-Regulation näher erläutert werden.

Regulation der σ^{38} -spezifischen Transkription Die Interaktion der verschiedenen Sigmafaktoren σ^{70} und σ^{38} mit ihren spezifischen Promotoren erfolgt nicht exklusiv. *In vitro* konnte für viele σ^{38} - und σ^{70} -spezifische Promotoren eine Kreuzerkennung nachgewiesen werden. Aus diesem Grund geht man heute davon aus, dass *in vivo* die Promotorspezifität durch ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Transkriptionseffektoren erreicht wird. Zu diesen Effektoren gehören die Salzkonzentration (Nguyen und Burgess, 1997), die superhelikale Dichte des DNA-Templates (Kusano *et al.*, 1996), das Effektornukleotid ppGpp (Kvint *et al.*, 2000), sowie Transkriptionsfaktoren wie CRP, H-NS oder LRP (Barth, 1995; Colland *et al.*, 2000). Da σ^{38} in der Zelle nur limitiert vorliegt und darüber hinaus im Vergleich zu σ^{70} eine fünffach geringere Affinität zum ebenfalls limitierten Core-Enzym hat (Farewell, 1998) wird auch hier eine Beteiligung von weiteren Faktoren diskutiert. Der Anti-Sigma-Faktor Rsd scheint hierbei eine entscheidende Rolle zu spielen. Rsd wird in der stationären Phase exprimiert und interagiert mit dem exponentiellen σ^{70} -Faktor, wodurch er dessen Bindung an das Core-Enzym verhindert (Ilag, 2004). Als ein weiterer Faktor wird die 6S RNA diskutiert, welche ebenfalls in der stationären Phase stärker exprimiert wird und an das σ^{70} -Holoenzym binden kann (siehe Kapitel 1.5). *In vitro* und *in vivo* Analysen zeigen, dass die 6S RNA die Nutzung von σ^{70} und σ^{38} -abhängigen Promotoren beeinflusst (Wassarman und Storz, 2000 und diese Arbeit).

Der σ^{38} -abhängige *bolA*-Promotor Der in dieser Arbeit verwendete *bolA*-Promotor soll eine wichtige Funktion bei der Kontrolle der Zellteilung und bei der Änderung der Zellmorphologie spielen. In der stationären Phase oder auch infolge von Stresssituationen wie Änderungen der Osmolarität des Mediums verändern sich *E. coli* Zellen morphologisch: sie werden kleiner und runder. So resultiert auch die Überexpression von *bolA* in einer runden Zellform (Aldea, 1988). Das *bolA* Genprodukt ist ein kleines Protein, welches für die Expression des Penicillin-Bindeproteins PBP6 benötigt wird. PBP6 ist eine Carboxypeptidase, die an der Septumbildung beteiligt ist (Lange und Henнге-Aronis, 1991). Für *bolA* konnte eine sieben- bis zehnfache Zunahme der Expression in der stationären Phase gezeigt werden. Die Expression wird jedoch auch in der exponentiellen Phase unter bestimmte Stressbedingungen induziert (Santos *et al.*, 1999). Die Transkription des *bolA*-Promotors erfolgt von zwei Promotoren P1 und P2. Hierbei ist der weiter downstream liegende Hauptpromotor P1 σ^{38} -abhängig, der upstream liegende Promotor P2 soll hingegen σ^{70} -abhängig sein sowie konstitutiv und schwach exprimiert werden. Der P1 wird invers zur Wachstumsrate reguliert und hat die typischen Merkmale eines 'gearbox'-Promotors. Zudem besitzt er eine große Homologie zu der beschriebenen Konsensus-Sequenz σ^{38} -abhängiger Promotoren (1.6.2, Lange und Henнге-Aronis, 1991). Der *bolA*-Promotor zeigt in *in vitro* Transkriptionen eine Kreuzerkennung mit dem σ^{70} -Holoenzym der RNA-Polymerase. Zudem weisen diese Analysen auf eine Empfindlichkeit bezüglich der Kaliumglutamat-Konzentration hin (Nguyen und Burgess, 1997). Darüber hinaus zeigt das Effektornukleotid ppGpp einen aktivierenden Effekt auf die *bolA*-Transkription (Reckendrees, 2004).

Der σ^{70} -abhängige *rrnB* P1-Promotor Bei diesem Promotor handelt es sich um den P1-Promotor des dual regulierten ribosomalen Operons B. Der *rrnB* P1-Promotor ist *in vivo* einer der stärksten Promotoren der Zelle, mit etwa einer Initiation/Sekunde bei hohen Wachstumsraten. Darüber hinaus ist der *rrnB* P1-Promotor, im Gegensatz zu seinem eher schwach reguliertem Tandem-Promotor P2, stark durch die Wachstumsphasen- und stringente Kontrolle reguliert (Glaser, 1983). *In vitro* reagiert der P1-Promotor sensitiv auf die Veränderung der Superhelikalität des Templates, sowie auf eine Erhöhung der Salzkonzentrationen. Zudem sind Initiationskomplexe aus RNA-Polymerase und *rrnB* P1-Promotor ohne vorhandene Startnukleotide sehr instabil.

1.6.5 Weitere Faktoren, die die Transkription beeinflussen: Transkriptionsfaktoren

Transkriptionsfaktoren wurden in den vorangegangenen Kapiteln schon mehrfach erwähnt. Diese Proteine spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation der Transkription, besonders beim Übergang der Zellen von der logarithmischen in die stationäre Phase des Wachstums. An dieser Stelle soll in kurzer Form eine Übersicht über die Proteine FIS, H-NS, StpA und LRP gegeben werden, welche die Transkription während der verschiedenen Wachstumsphasen und beim Übergang von einer Wachstumsphase in die nächste maßgeblich beeinflussen.

FIS Bei FIS, dem ‘Factor for Inversion Stimulation’ handelt es sich um ein kleines, basisches Protein von 11.2 kDa, das in Lösung als Homodimer vorliegt. FIS bindet hauptsächlich an gekrümmte DNA, wobei eine Bindung die Krümmung weiter verstärkt und eine Krümmung von 40-90° verursachen kann. Für eine spezifische Bindung von FIS benötigt das Protein eine Konsensussequenz der Folge (G/T)NNYRNN(A/T)NNYRNN(C/A)². Die molekulare Struktur von FIS ist mit 2Å aufgelöst und zeigt einen Core von vier α -Helices und ein ungeordnetes N-terminales Ende (20 AS). Hier liegen sowohl die Dimerisierungs- als auch die Aktivierungsdomäne. Die DNA-Bindung der großen Furche wird durch ein HTH-Motiv vermittelt, das sich in der CTD des Proteins befindet. Für die meisten Gene ist FIS ein Aktivator, es sind aber auch einige Systeme bekannt, auf welche FIS reprimierend wirkt. Die wichtigste Funktion für FIS ist die Aktivierung der Operons der stabilen RNAs (*rrn*). Hierbei ist die Wirkung von FIS stark an die Wachstumsphase gekoppelt: in der stationären Phase sind weniger als 100 Kopien in der Zelle vorhanden. Beim logarithmischen Wachstum hingegen befinden sich mehr als 50000 Dimere in der Zelle, was einem 500fachen Abfall der Proteinkonzentration beim Übergang von der logarithmischen in die stationäre Phase des Wachstums entspricht (Wagner, 2000).

H-NS Das ‘Histone-like Nucleoid Structuring Protein’ (15.6 kDa, 137AS) hat einen neutralen pK und liegt in etwa 20000 Kopien pro Zelle vor. Zunächst nur als strukturelle Komponente des bakteriellen Genoms angesehen, ist H-NS heute als globales Regulationsprotein in der bakteriellen Genexpression bekannt. Die Gene, die durch H-NS (meist negativ) reguliert werden, sind oft an die Stringente- oder Wachstumsratenkontrolle gekoppelt (unter anderem *bolA*, *rpoS* und die *rrn*-Operons). Welche die aktive Form des Proteins ist, wird bislang noch kontrovers diskutiert, es könnten Homodimere, aber auch Oligomere sein. Die Struktur von H-NS kann in drei Bereiche aufgeteilt werden: der C-terminale

²N= jedes Nukleotid, Y= Pyrimidin (T oder C), R= Purin (A oder G)

Bereich enthält die DNA-bindende Domäne. Zur Zeit ist noch nicht bekannt, ob H-NS in der kleinen oder der großen Furche der DNA bindet. Die NTD formt eine amphipathische α -Helix, welche bei der Repression der Transkription und der Protein-Protein-Interaktion eine Rolle spielt. Die zentrale Region ist wichtig für die Dimerisierung des Proteins. Diese Domäne ist innerhalb der H-NS-ähnlichen Proteinfamilie hoch konserviert, wodurch Hetero(di)mere mit H-NS verwandten Proteinen wie StpA möglich sind. H-NS bindet an jede Form von doppelsträngiger DNA sowie, jedoch mit geringerer Affinität, an einzelsträngige DNA und RNA. Bislang konnte keine Konsensussequenz für eine H-NS Bindestelle identifiziert werden. Eine starke und spezifische Bindung findet statt an intrinsisch gekrümmten DNA-Regionen oder an DNA, in welcher eine Krümmung induziert werden kann. Für die Regulation durch H-NS gibt es mehrere Modelle, die hier nicht näher diskutiert werden sollen. Am Beispiel der *rrn*-Operons konnte jedoch mit AMF-Mikroskopie gezeigt werden, dass H-NS Moleküle ‘up’- und ‘downstream’ des Promotors auf der DNA binden und wie ein Reißverschluss durch intermolekulare Wechselwirkung die RNA-Polymerase auf dem Promotor ‘gefangen’ halten (Dame *et al.*, 2002; Wagner, 2000).

StpA StpA wurde ursprünglich als ‘Supressor beim Spleißen des T4-Phagen Introns td’ charakterisiert. Das Protein hat eine Größe von 136 Aminosäuren und ist zu 58% identisch mit H-NS. Die Identität beschränkt sich hierbei nicht nur auf die Sequenz: beide Proteine können sich in vielen Funktionen gegenseitig ersetzen. StpA bindet ebenfalls an gekrümmte DNA und wirkt inhibierend auf die Transkription. Im Gegensatz zu H-NS wirkt StpA jedoch auch als RNA-Chaperon (Grossberger *et al.*, 2005). Beide Proteine regulieren sich in einer Feedback-Schleife gegenseitig und inhibieren ihre eigene und die Synthese des jeweils anderen Proteins. Die Expression von StpA ist weiterhin abhängig von dem Transkriptionsregulator LRP, der Temperatur sowie der Wachstumsphase. Wie bereits erwähnt, können H-NS und StpA Heterodimere formen. Die biologische Relevanz solcher Dimere ist jedoch bislang nicht bekannt.

LRP Das ‘Leucine-responsive Regulatory Protein’ ist ein globaler Regulator in *E. coli*, welches die Expression vieler Gene beeinflusst. LRP und LRP-ähnliche Regulatoren haben eine Größe von etwa 15 kDa und sind typische DNA-Bindeproteine. Eine 2002 veröffentlichte DNA-Microarray-Analyse hat gezeigt, dass LRP die Transkription von etwa 10% aller Gene in *E. coli* beeinflusst, wobei der Großteil dieser Gene zu Beginn der stationären Phase exprimiert wird (Tani *et al.*, 2002). Unter den von LRP regulierten Operons befinden sich Gene für den Kata- und Anabolismus der Aminosäuren sowie Gene der Pili-Synthese. LRP- und LRP-ähnliche Regulatoren bestehen aus einer DNA-Binde- und einer Effektor-domäne. (Brinkman *et al.*, 2003). Der LRP-Ligand Leucin spielt eine differentielle Rolle bei der durch LRP vermittelten Regulation. Hierbei hat Leucin keine ‘an’ oder ‘aus’-Wirkung, sondern moduliert die Funktion von LRP abhängig vom jeweiligen Promotor (Wagner, 2000).

1.7 Fragestellung und Konzeption der Arbeit

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der kleinen regulatorischen 6S RNA aus *E. coli*. Da bislang hauptsächlich Untersuchungen zur Funktion der *E. coli* 6S RNA *in vivo* durchgeführt worden waren, ist in dieser Arbeit die *in vitro* Regulation durch die 6S RNA von besonderem Interesse. Hierbei sollen vor allen Dingen folgende Fragen beantwortet werden:

- Kann eine direkte Bindung der 6S RNA an die RNA-Polymerase nachgewiesen werden und bindet die 6S RNA tatsächlich nur an die exponentielle Phase-spezifische (σ^{70}) RNA-Polymerase?
- Welche Sequenzen und Nukleotide der 6S RNA vermitteln die Bindung und die Wirkung der 6S RNA an und auf die RNA-Polymerase?
- Kann eine Regulation der Aktivität der verschiedenen RNA-Polymerase Holoenzyme und des Core-Enzyms durch die 6S RNA gezeigt werden und wenn ja, handelt es sich bei der Regulation um einen differentiellen Mechanismus?
- Wie hängt die Regulation durch die 6S RNA mit der Expression der 6S RNA selber zusammen?

Die Arbeit ist in zwei Teile gegliedert. Im ersten Teil soll die Interaktion der 6S RNA mit der bakteriellen RNA-Polymerase *in vitro* untersucht werden. Hierzu sollen neben der generellen Spezifität der Bindung von 6S RNA und RNA-Polymerase *in vitro* die genauen Kontaktstellen der RNA-Polymerase auf der 6S RNA identifiziert werden. Die Identifizierung soll methodisch durch Retardierungsexperimente, Hydroxylradikal-‘Footprints’ und UV-Quervernetzungsanalysen erfolgen.

Weiterhin soll in Retardierungsanalysen und *in vitro* Transkriptionen die Wirkung der 6S RNA auf die Initiationskomplexbildung und die Transkription bei wachstumsphasenspezifischen Promotoren untersucht werden. Hierdurch soll ermittelt werden, ob die 6S RNA tatsächlich eine differentielle Regulation der σ^{70} und σ^{38} -spezifischen Holoenzyme verursacht. Diese Analysen sollen den größten Teil der Arbeit stellen.

Im zweiten Teil der Arbeit soll bestimmt werden, ob die Transkriptionsfaktoren FIS, H-NS, LRP und StpA an die 6S RNA Transkriptionseinheit *ssrS* binden und hierdurch die Transkription der 6S RNA beeinflussen. Auch dieses soll durch Retardierungen und *in vitro* Transkriptionen untersucht werden. Ebenfalls durch *in vitro* Transkriptionen soll der Einfluss der 6S RNA auf die Expression ihres eigenen Gens getestet werden. Die Experimente sollen einen Einblick in die vermutete phasenabhängige Regulation der 6S RNA-Expression ermöglichen.

2 Ergebnisse

2.1 Charakterisierung der Bindung der 6S RNA an die RNA-Polymerase

In Zellextrakten aus *E. coli* migriert die 6S RNA bei einem Koeffizienten von etwa 11S. Aufgereinigte 6S RNA hingegen findet man bei einem Koeffizienten von 6S (Lee *et al.*, 1978), was auf eine Co-migration mit anderen Zellkomponenten hindeutet. 2000 konnte durch Coimmunoprecipitation gezeigt werden, dass es sich bei dieser Komponente um die bakterielle RNA-Polymerase handelt (Wassarman und Storz, 2000). In der gleichen Arbeit konnten darüber hinaus die β/β' -Untereinheit der RNA-Polymerase sowie σ^{70} als potentielle Bindepartner der 6S RNA identifiziert werden. Alle durchgeführten Analysen wurden jedoch in Zellextrakten und mit der 6S RNA aus *Haemophilus influenza* durchgeführt. An dieser Stelle wurde darum zunächst die Bindung der nativen *E. coli* 6S RNA an das bakterielle Holoenzym überprüft. Weiterhin wurden die genauen Kontaktpunkte zwischen 6S RNA und RNA-Polymerase analysiert.

2.1.1 Retardierungsanalysen zur Untersuchung der 6S RNA/RNA-Polymerase-Bindung

Um die direkte Bindung der nativen 6S RNA aus *E. coli* an die bakterielle RNA-Polymerase nachzuweisen, wurden Retardierungsanalysen mit radioaktiv markierter 6S RNA durchgeführt. Hierzu wurde mit ^{32}P -pCp markierte 6S RNA (5.2.8.10) mit dem exponentiellen und dem stationäre Phase-spezifischen Holoenzym, sowie mit Core-Enzym komplexiert. Die Bindung an die Sigmafaktoren σ^{70} und σ^{38} alleine wurde ebenfalls getestet. Für die Komplexbildung wurden 9 nM radioaktiv markierte 6S RNA mit 3 nM aktivem, rekonstituiertem Holoenzym (Kapitel 5.2.8.8) oder Core-Enzym 20 Minuten bei 30°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden dem Komplex unterschiedliche Mengen Heparin zugefügt, um unspezifische Bindungen abzufangen und die Stabilität der Komplexe zu überprüfen. Ebenso wurde bei der Komplexbildung mit den Sigmafaktoren vorgegangen, hier wurden 60 nM des jeweiligen Faktors eingesetzt. Alle Reaktionen wurden in 1x 80 mM Kaliumglutamat-Puffer (KGlu80, 5.2.7.8) durchgeführt, sowie mit und ohne Startnukleotide (ATP und CTP). Die Abbildung 2.1 zeigt exemplarisch eine solche Retardierungsanalyse.

Wie zu erkennen, bindet die *E. coli* 6S RNA an die bakterielle RNA-Polymerase. Gebunden werden beide Holoenzyme (E70 und E38) sowie das Core-Enzym. Die 6S RNA bildet mit den Holoenzymen drei Komplexe, von denen nur die Komplexe E70/E38 II und III Heparinstabil sind. Bei dem Komplex E70/E38/E I handelt es sich somit um einen unspezifischen Komplex zwischen RNA-Polymerase und 6S RNA oder um doppelt besetzte Komplexe, die nicht spezifisch sind. Der Komplex II, welcher mit E70 und E38 gebildet

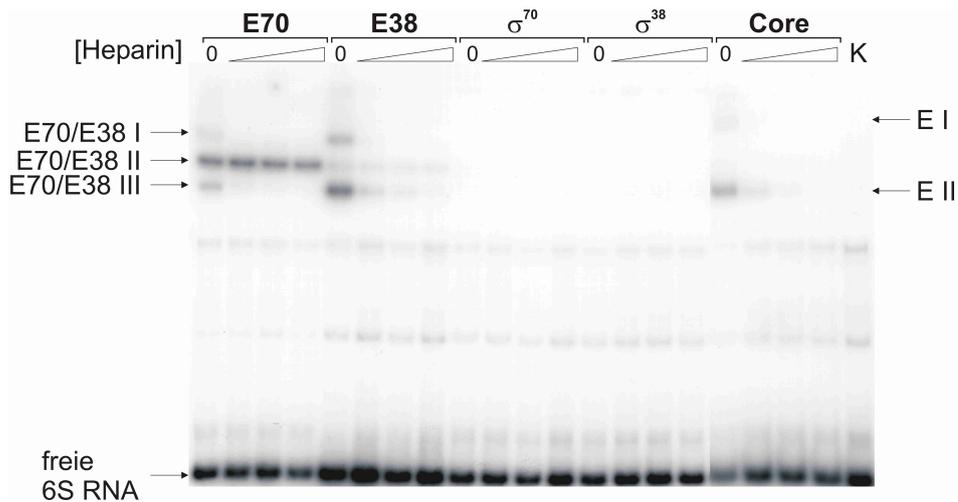


Abbildung 2.1: Retardierungsanalyse der 6S RNA mit verschiedenen RNA-Polymerasen. Die Autoradiographie zeigt die Komplexbildung zwischen 6S RNA und E70, E38 sowie dem Core-Enzym. Eine Bindung an die σ -Faktoren alleine konnte nicht nachgewiesen werden. 6S RNA 9 nM, RNAP 3 nM (Rekonstitution mit 45 nM σ^{70} bzw. 540 nM σ^{38}) in 1x KGlu80 (ohne NTPs). Heparin: 0, 50, 100, 200 ng/ μ l. K= 6S RNA ohne Protein. Die Komplexe sowie die freie 6S RNA sind durch Pfeile gekennzeichnet.

wird, repräsentiert die Holoenzym-Bindung. Bei dem Komplex III (E70/E38) beziehungsweise II (E), handelt es sich um einen Komplex aus Core-Enzym und 6S RNA. Dass dieser Komplex auch bei der Reaktion mit Holoenzymen gebildet wird ist nicht ungewöhnlich und liegt an einer nicht vollständigen Rekonstitution der Holoenzyme. Hier wird deutlich, dass die Rekonstitution von E70 effektiver ist als die von E38, da bei den E70-spezifischen Komplexen kaum Bindung der 6S RNA an freies Core-Enzym beobachtet werden kann. Die Bindung der 6S RNA ist mit dem exponentielle Phase-spezifischen Holoenzym (E70) am effektivstem. Die schlechten Rekonstitutionseigenschaften des stationäre Phase-spezifischen Enzyms könnten ein Grund dafür sein, dass die Komplexbande E38 II im Vergleich zu E70 II eher schwach ist. Wegen der schlechten Rekonstitution von Core-Enzym und Sigmafaktor steht der 6S RNA hier nicht so viel Holoenzym zur Bindung zur Verfügung. Die Bindung (und somit auch die Radioaktivität) teilt sich in diesem Fall auf Holoenzym- und Core-Komplex auf und verursacht die geringere Schwärzung. Ebenso kann aber auch eine generell unterschiedlich gute Bindung der 6S RNA an die (Holo-) Enzyme der Grund für die Varianz der Komplexe II und III von E70 und E38 sein. Ein Hinweis hierauf ist auch die höhere Sensitivität der Komplexe aus E38 und 6S RNA gegenüber dem Kompetitor Heparin. Die 6S RNA bindet auch an das freie Core-Enzym. Die Bindung ist ebenfalls nicht sehr stabil, zu erkennen an der größeren Sensitivität gegenüber dem Kompetitor Heparin. Die Sigmafaktoren alleine werden von der *E. coli* 6S RNA nicht gebunden.

Zusätzliche Versuche haben ergeben, dass die hier beobachteten Komplexe aus 6S RNA und RNA-Polymerase (E70) bei 30°C mindestens 90 Minuten stabil sind, auch bei der Zugabe von Heparin (200 ng/ μ l) als Kompetitor. Die An- oder Abwesenheit von Nukleotiden beeinflusst die Komplexbildung der 6S RNA mit den bakteriellen Enzymen nicht. Bei der

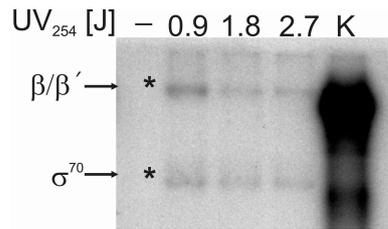


Abbildung 2.2: UV-Quervernetzungsanalyse von 6S RNA/RNA-Polymerase-Komplexen Die Abbildung zeigt exemplarisch die Autoradiographie eines SDS-Gels. Zu erkennen sind die kovalent mit der RNA verbundenen Proteinbanden, gekennzeichnet durch (*). Die obere Bande entspricht β/β' , die untere σ^{70} (durch Pfeile gekennzeichnet). Alle Spuren (außer K) enthalten RNA-Polymerase (E70) und RNase A. UV-Bestrahlung (J) wie angegeben. Alle Proben enthalten 5'-endmarkierte 6S RNA (1×10^6 cpm). K= 6S RNA.

Bindung der 6S RNA an die bakterielle RNA-Polymerase handelt es sich darüber hinaus um eine spezifischen Reaktion: eine Komplexbildung der 6S RNA mit der T7-RNA-Polymerase konnte nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

2.2 Charakterisierung der bindeaktiven Regionen der 6S RNA

In früheren UV-Quervernetzungsanalysen konnte eine Bindung der 6S RNA an die β/β' -Untereinheit sowie an den σ^{70} -Faktor gezeigt werden (Wassarman und Storz, 2000). Es ist jedoch nicht bekannt, welche Nukleotide oder Bereiche der 6S RNA an der Bindung beteiligt sind. Durch UV-Quervernetzungsanalysen sowie durch die Behandlung mit Hydroxylradikalen ($\cdot\text{OH}$) der Komplexe aus 6S RNA und RNA-Polymerase können die Positionen der 6S RNA identifiziert werden, die eine Bindung mit der RNA-Polymerase eingehen. Diese Methoden liefern ein sehr genaues Bindemuster, da nahezu jedes Nukleotid einzeln betrachtet werden kann.

2.2.1 UV-Quervernetzung von 6S RNA/RNA-Polymerase-Komplexen

Vor der nukleotidgenauen Analyse der Komplexe aus 6S RNA und RNA-Polymerase sollte zunächst überprüft werden, ob die *E. coli* 6S RNA tatsächlich an die in der Literatur angegebenen Untereinheiten der bakteriellen RNA-Polymerase (E70) bindet. Diese Überprüfung war notwendig, da eine UV-Quervernetzung bislang nur mit der 6S RNA aus *H. influenza* gezeigt werden konnte, die in ihrer Länge und Sekundärstruktur von der *E. coli* 6S RNA abweicht.

Hierzu wurden UV-Quervernetzungsanalysen mit radioaktiv (^{32}P) markierter 6S RNA durchgeführt. 3'- oder 5'-endmarkierte 6S RNA wurde mit σ^{70} -spezifischem Holoenzym wie beschrieben (siehe 5.2.8.10) komplexiert und mit UV-Strahlung (254 nm) behandelt. Hiernach wurden die Komplexe mit RNase A verdaut. Die Proben wurden nach der Hydrolyse über ein SDS-Gel mit anschließender Autoradiographie analysiert. Eine so durchgeführte UV-Quervernetzungsanalyse ist in der Abbildung 2.2 zu sehen.

Die Abbildung zeigt das Autoradiogramm einer UV-Quervernetzungsanalyse von *E. coli*

6S RNA und RNA-Polymerase (E70). Durch Coomassiefärbung des SDS-Gels konnten die sichtbaren Banden den Untereinheiten β und β' , sowie dem Sigmafaktor σ^{70} zugeordnet werden (markiert mit '*'). Ohne UV-Bestrahlung (1. Spur, '-') ist keine Vernetzung zu erkennen, was bestätigt, dass es sich bei den erhaltenen Banden tatsächlich um Kontaktpunkte der 6S RNA mit der RNA-Polymerase handelt. Die Quervernetzung von endmarkierter RNA hat die Limitierung, dass durch eine Abspaltung der extremen (markierten) Enden eine Vernetzung nicht detektiert werden kann, was bei der 3'-endmarkierten 6S RNA der Fall war. Eine interne Markierung der 6S RNA wäre hier sinnvoller gewesen. Die Markierung der 6S RNA mit γ - ^{32}P ATP ergibt neben der Markierung am 5'-Ende jedoch auch eine Markierung an einem intrinsischen 'nick', etwa 10-20 Nukleotide weiter in Richtung des 3'-Endes der RNA. Durch diese interne Markierung konnte die 6S RNA in den UV-Quervernetzungsanalysen sichtbar gemacht werden. Aus dieser Beobachtung kann, neben der Proteinbindung, noch ein weiterer Schluss gezogen werden: die extremen Enden der 6S RNA sind nicht in Kontakt mit der RNA-Polymerase. Die fehlende Protektion durch das Enzym ermöglicht den Abbau der markierten Enden der RNA durch die RNase A.

2.2.2 Charakterisierung der Proteinbindungsregionen innerhalb der 6S RNA

2.2.2.1 Analyse von Proteinbinderegionen durch Hydroxylradikal-'Footprints'

Um die Bindungsregionen für die RNA-Polymerase Holoenzyme sowie Core innerhalb der 6S RNA eingrenzen zu können, wurden Hydroxylradikale eingesetzt. Hydroxylradikale sind beschrieben als Analysemittel zur Untersuchung makromolekularer Wechselwirkung von DNA und RNA (Tullius und Dombrowski, 1985; Hüttenhofer und Noller, 1992). Ein großer Vorteil der Hydroxylradikale besteht in ihrer Unempfindlichkeit gegenüber RNA-Sekundärstrukturausbildung, da sie nicht die Basen selbst, sondern die exponierten C1'- und C4'-Atome der Ribose angreifen. Da die Radikale außerdem eine geringe Größe haben, können alle Ribosen im Zucker-Phosphatrückgrat der RNA-Moleküle erfasst werden.

Eine Einschränkung der Methode besteht darin, dass Hydroxylradikale sensitiv gegenüber Glycerin reagieren, welches die Radikale abfängt. Da die RNA-Polymerase jedoch in 10% Glycerin gelagert wird, müsste vor der Reaktion das Glycerin durch eine Dialyse entfernt werden. Dieser problematische Schritt kann umgangen werden, indem ein so genannter 'Damage-Selection-Footprint' der RNA genutzt wird. In einer solchen 'Damage Selection'-Reaktion bindet die RNA-Polymerase selektiv an bestimmte, noch bindeaktive Bereiche der modifizierten 6S RNA, welche dann durch Autoradiographie sichtbar gemacht werden können. Hierzu wurde 3'-endmarkierte 6S RNA zunächst mit Hydroxylradikal-Reagentien wie beschrieben (siehe Kapitel 5.2.8.11) behandelt. Die modifizierte und aufgereinigte 6S RNA wurde dann mit den verschiedenen RNA-Polymerasen (E70, E38 und Core) wie bereits beschrieben (2.1.1) komplexiert. Die Komplexe wurden nach Zugabe von Heparin (200 ng/ μl) über ein natives Retardierungsgel (5% PAA) getrennt. Anschließend wurden die einzelnen Komplexe aus dem Gel eluiert und über ein denaturierendes Polyacrylamid-Gel erneut aufgetrennt. Die Abbildung 2.3 zeigt die nach Komplexbildung von modifizierter 6S RNA und RNA-Polymerase erhaltenen Komplexe.

In der Abbildung 2.4 ist exemplarisch ein Hydroxylradikal-'Footprint' der 6S RNA mit den verschiedenen RNA-Polymerase Holoenzymen sowie dem Core-Enzym dargestellt. Einige charakteristische Nukleotidpositionen sind durch Pfeile markiert.

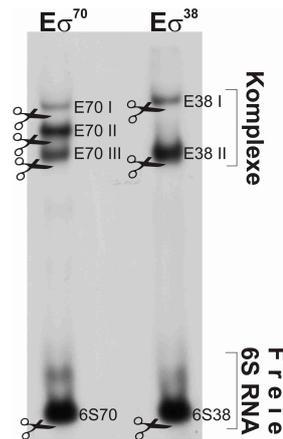


Abbildung 2.3: Komplexbildung von modifizierter 6S RNA mit der RNA-Polymerase. Gezeigt sind die Komplexe von mit Hydroxylradikalen modifizierter 6S RNA mit den σ^{70} - und σ^{38} -spezifischen Holoenzymen. Die Core-Enzym spezifischen Komplexe sind hier nicht gezeigt, entsprechen aber denen mit E38.

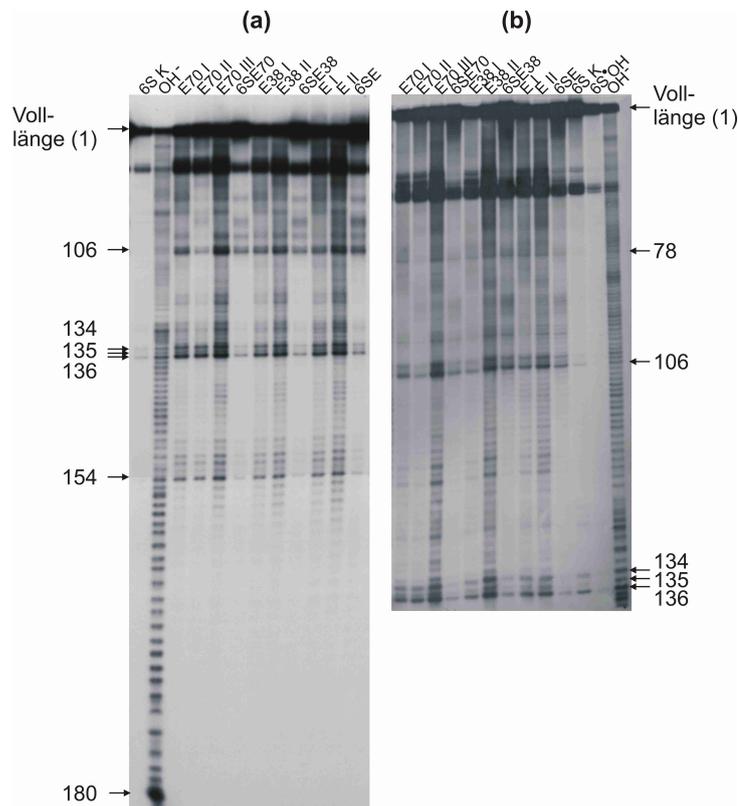


Abbildung 2.4: Auftrennung von Komplexen aus modifizierter 6S RNA und RNA-Polymerase. (a) kurzer Lauf, Auftrennung der 6S RNA von Position 180-1. (b) langer Lauf (136-1). E70 I-III: Komplexe aus modifizierter 6S RNA mit E70. E38 I-II: Komplexe aus modifizierter 6S RNA mit E38. E I-II: Komplexe aus modifizierter 6S RNA und Core-Enzym. 6S E70, 6S E38, 6S E: jeweilige freie 6S RNA. 6S K: unmodifizierte 6S RNA. ·OH: modifizierte 6S RNA, -OH: Alkalileiter der 6S RNA. Die Pfeile zeigen charakteristische Nukleotidpositionen.

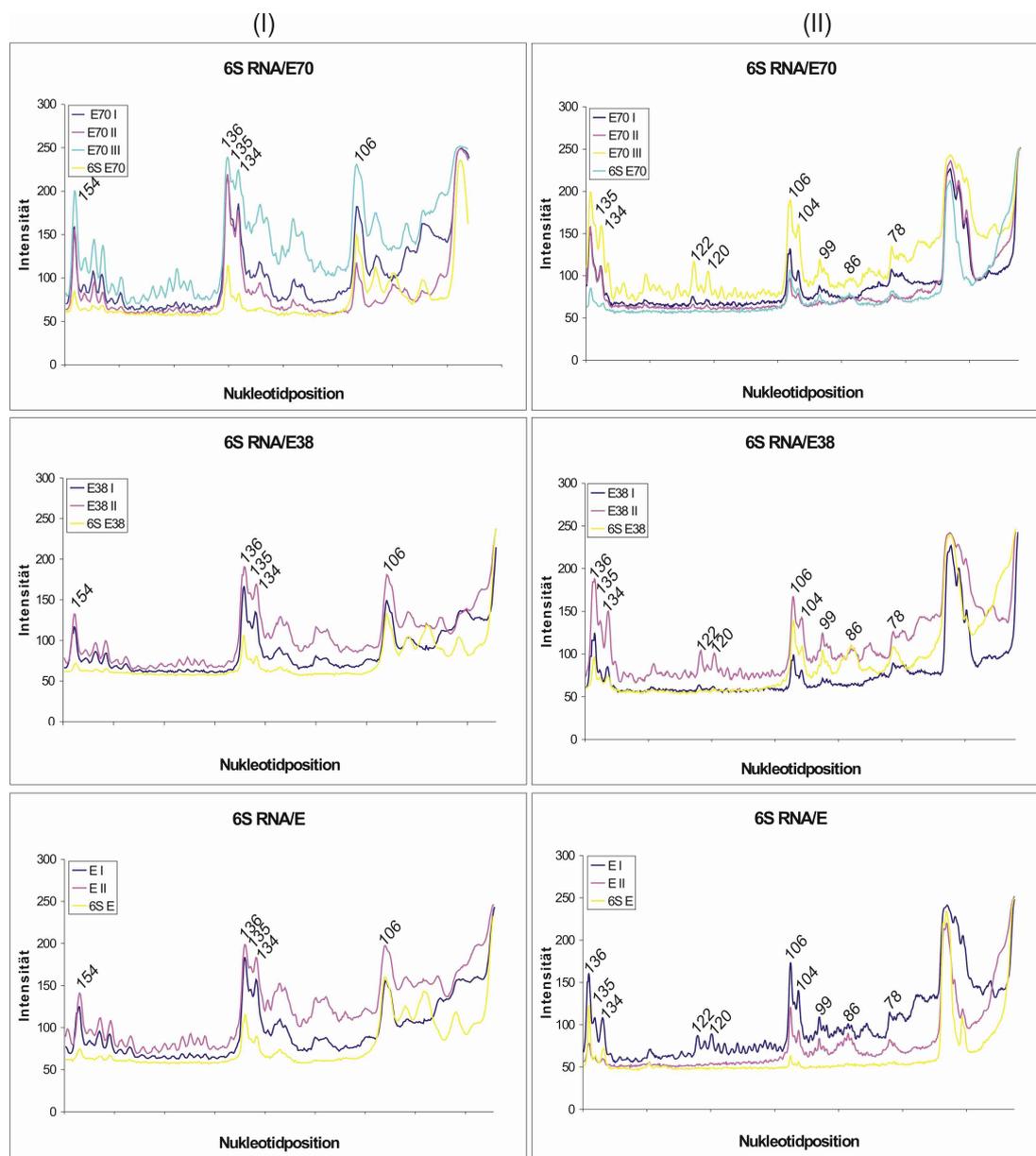


Abbildung 2.5: Densitometrische Auswertung der Hydroxylradikal-‘Footprints’. Gezeigt sind die densitometrischen Scans der einzelnen Spuren der Autoradiographien in 2.4 bis Position 154 der 6S RNA (I, 2.4(a)) sowie bis zur Position 136 (II, 2.4 (b)).

Vergleicht man die einzelnen Spuren miteinander, können bereits mit dem Auge Unterschiede im Bandenmuster sowohl zwischen den einzelnen Komplexen, als auch zwischen den Komplexen und der freien 6S RNA festgestellt werden. Weil eine genaue Aussage zu möglichen Kontaktstellen von RNA-Polymerase und 6S RNA alleine anhand der Autoradiographie nur schwer zu treffen ist, wurde eine densitometrische Auswertung der einzelnen Spuren mit ‘*ScionImage*’ durchgeführt. Einzelne Positionen lassen sich hierbei durch die Alkalileiter sehr gut zuordnen. Die Auswertungen sind in den Abbildungen 2.5, 2.6 und 2.7 gezeigt.

Die Hydroxylradikal-‘Footprints’ zeigen deutliche Unterschiede zwischen der freien 6S RNA und den Komplexen aus 6S RNA und RNA-Polymerase. Es fällt auf, dass die Komplexe, die im Retardierungsgel (siehe Abbildung 2.3) auf einer Höhe laufen, ein einheitliches Modifikationsmuster zeigen (Abbildungen 2.4 und 2.7). Bei den Komplexen E70 I, E38 I und E I handelt es sich somit um analoge Komplexe, ebenso wie bei den Komplexen E70 III, E38 II und E II. Da diese Komplexe in allen drei RNA-Polymerasen-Formen vertreten sind, muss es sich hierbei um eine Bindung an das Core-Enzym, bzw. an eine Untereinheit des Core-Enzyms handeln. Da in den UV-Crosslinks eine Vernetzung an die β/β' -Untereinheit gezeigt werden konnte (siehe 2.2.1 und Wassarman und Storz, 2000), ist es wahrscheinlich, dass es sich hierbei um die Bindung an diese Untereinheiten handelt. Beide beobachteten Core-Enzym spezifischen Komplexe (I und II bzw. E70 III) zeigen darüber hinaus ein sehr ähnliches Modifikationsmuster. Eine geringe Abweichung besteht darin, dass die Komplexe E70 I, E38 I und E I eine verringerte Bindung im Bereich der Nukleotide 83-88 aufweisen. Einen weiteren Unterschied zu den Komplexen II (bzw. E70 III) findet man auch an den Positionen 133-137: diese werden von der RNA-Polymerase bevorzugt gebunden (Abbildung 2.6 und 2.7). Innerhalb der analogen Komplexe gibt es weiterhin einige sehr geringere Unterschiede zwischen den verschiedenen RNA-Polymerase-Spezies, welche jedoch auf Unterschiede bei der Auftragung, den Radioaktivitätsmengen oder auf Ähnliches zurückzuführen sind und nicht gesondert beachtet werden sollen (vergleiche z. B. E70 III mit E38 II und E II, Abbildung 2.6).

Große Abweichungen vom Modifikationsmuster der bereits beschriebenen Komplexe zeigt der Komplex E70 II. In diesem Komplex ist die Bindung der RNA-Polymerase an bestimmte Bereiche der 6S RNA stark reduziert (siehe Abbildung 2.6 und 2.7), und zwar an die Nukleotide 76-79, sowie im Bereich von Nukleotid 83-106. Die Nukleotide, die zwischen diesen Positionen liegen (80-82) zeigen eine leicht verstärkte Bindung der RNA-Polymerase. Da dieser Komplex bei einer Reaktion von Core-Enzym und der 6S RNA nicht gebildet wird, muss es sich hierbei um die Bindung an den Sigmafaktor, genauer um σ^{70} , handeln. Diese Vermutung wird gestützt durch UV-Quervernetzungsexperimente, in denen ebenfalls eine Bindung an σ^{70} gezeigt werden konnte (siehe 2.2.1). Warum in den Hydroxylradikal-‘Footprints’ keine Komplexe mit σ^{38} beobachtet werden konnten ist unklar, da in Retardierungsanalysen eine Komplexbildung beobachtet werden konnte (2.1.1). Der E38 Holoenzym-Komplex hatte sich im Vergleich zu E70 bereits in den Retardierungsanalysen als weniger stabil gegenüber dem Kompetitor Heparin erwiesen. Ein Fehlen des Komplexes aus 6S RNA und dem Sigmafaktor σ^{38} deutet darum auf eine differentielle Bindung der 6S RNA an die verschiedenen Holoenzyme hin.

Eine besonders wichtige Rolle bei der 6S RNA/RNA-Polymerase-Bindung scheinen die Nukleotide 149-154 sowie 132-137 zu spielen: bei allen Komplexen kann an diesen Positionen eine verstärkte Bindung der RNA-Polymerase beobachtet werden.

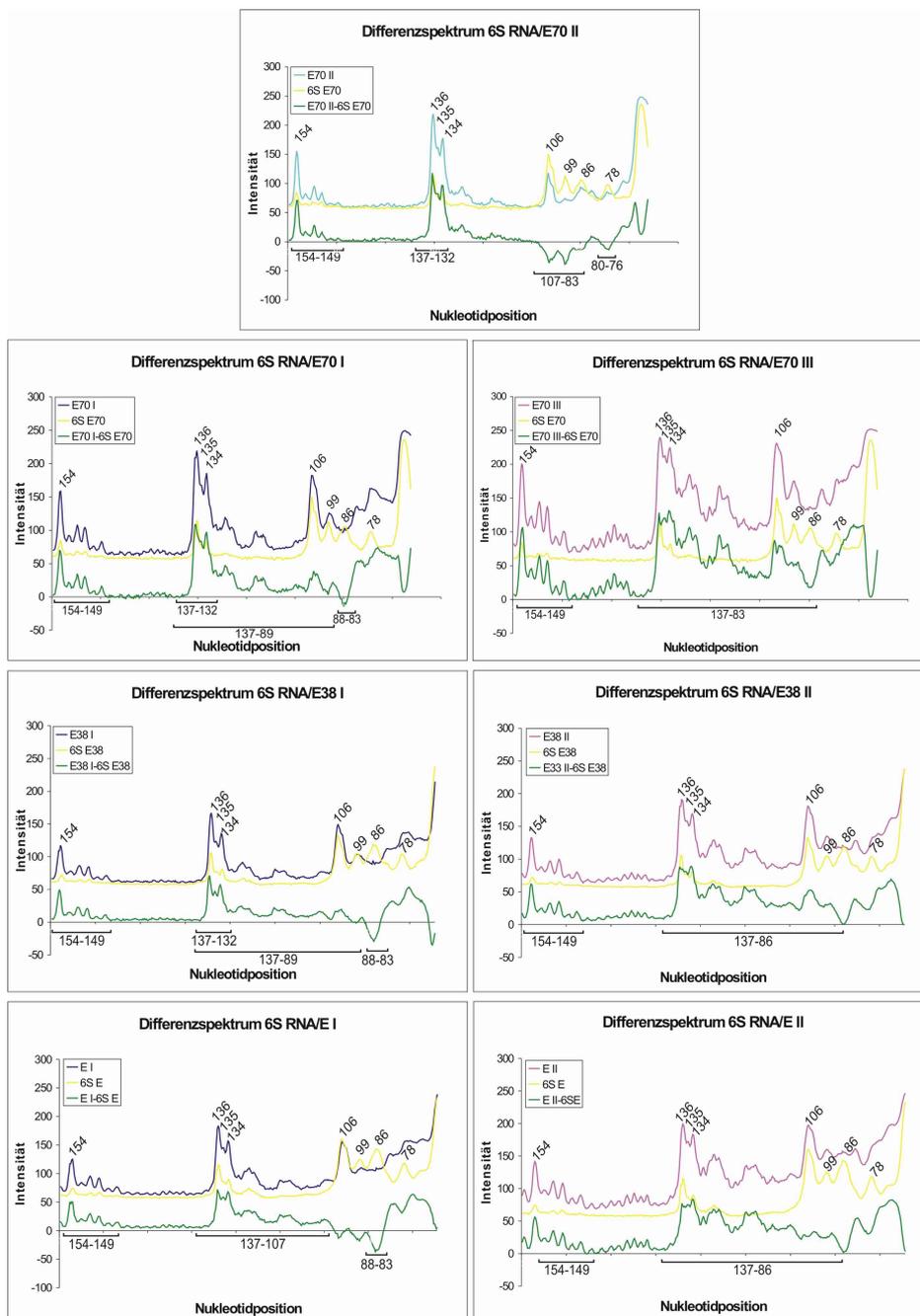


Abbildung 2.6: Differenzspektren der einzelnen Komplexe und der 6S RNA. Gezeigt sind die Differenzspektren über die gesamte auswertbare Länge der 6S RNA (etwa Nt. 70-154). Die freie 6S RNA zeigt die (statistische) Verteilung der Zugänglichkeiten und dient als Referenz für die Bindung der RNA-Polymerase. Bei einer Komplexbildung werden von der RNA-Polymerase selektiv 6S RNA-Moleküle gebunden, die besonders- oder noch bindeaktiv sind. Innerhalb dieser Komplexe kommt es aufgrund der Modifikationen zu Abweichungen im Bindeverhalten. Zur Identifizierung dieser Regionen wurde jeder (einem bestimmten Nukleotid zugeordnete) Wert der 6S RNA von dem korrespondierenden Wert des entsprechenden Komplexes subtrahiert (Komplex - 6S RNA). Hierdurch ergibt sich, dass Werte > 0 eine verstärkte Bindung der RNAP an das jeweilige Nukleotid oder den Bereich repräsentieren, Werte < 0 zeigen die Bereiche der 6S RNA, die im Komplex unterrepräsentiert sind. Die Abbildung 2.7 zeigt die von einer Bindung betroffenen Bereiche der 6S RNA in der Sequenz.

2.2 Charakterisierung der bindeaktiven Regionen der 6S RNA



Abbildung 2.7: Zusammenfassung der RNA-Polymerase-Bindung an die 6S RNA im OH-‘Footprint’. Grüne Bereiche: Überrepräsentierte Bindung an die 6S RNA, rote Bereiche: Unterrepräsentierte Bindung, jeweils im Vergleich zu der freien 6S RNA. Für einige Bereiche der 6S RNA besteht eine sichtbare, aber nur mäßig erhöhte Bindeaffinität (hellgrün).

Überträgt man die beschriebenen Veränderungen in die berechnete Sekundärstruktur der *E. coli* 6S RNA (Abbildung 2.8), fällt auf, dass besonders der Stem II und der terminale Loop¹, sowie Bereiche des zentralen Loops oder Bereiche in dessen Nähe betroffen sind. Da Hydroxylradikale nicht strukturbedingt modifizieren, muss davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei um Effekte handelt, die durch die Bindung der RNA-Polymerase entstehen. Über mögliche Bindepitionen und Eigenschaften der RNA-Polymerase in den Bereichen von Position 1 bis etwa 50 und ab Position 154 kann an dieser Stelle keine Aussage gemacht werden. Wie in der Abbildung 2.4 zu sehen, ist nach der Position 154 kaum noch Radioaktivität im Gel vorhanden.

¹Für die Nomenklatur der 6S RNA siehe Kapitel 1.5

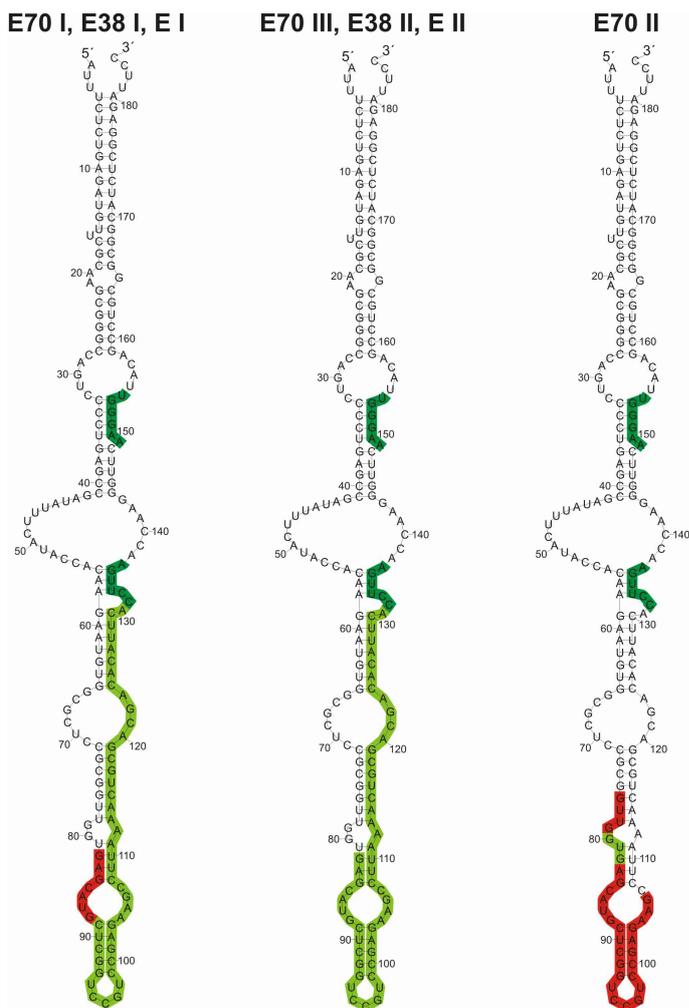


Abbildung 2.8: Lage der durch die RNA-Polymerase beeinflussten Nukleotide in der Sekundärstruktur. Grün: verstärkte Bindung. Rot: verminderte Bindung. Hellgrün: leicht verstärkte Bindung.

Weiterhin ist die Trennung der Banden im Gel nach etwa Position 70 so schlecht, dass keine Aussagen über eine Bindung der RNA-Polymerasen an diese Regionen der 6S RNA gemacht werden können. Eine Bindung in diesem Bereich findet jedoch statt, wenn auch nicht im gleichen Maße wie an die terminalen Bereiche (siehe 2.2.2.2).

2.2.2.2 UV-Quervernetzungsanalysen von 6S RNA/RNA-Polymerase Komplexen

Um die in den Hydroxylradikal-‘Footprints’ beobachteten Kontaktstellen zu verifizieren und die RNA-Protein-Bindung nukleotidgenau zu bestimmen, wurden weitere UV-Quervernetzungsexperimente durchgeführt. Hierzu wurden zunächst Komplexe aus 6S RNA und RNA-Polymerase gebildet und mit UV-Licht (254 nm, siehe Kapitel 5.2.8.5) behandelt. Die Komplexe wurden anschließend mit Proteinase K verdaut, um nicht kovalent gebundenes Enzym von der RNA zu entfernen. Nach der Aufreinigung wurden die quervernetzten

Komplexe mit den radioaktiv markierten Sonden 'Oligo6S-B' (Bindet Nt. 165 - Nt. 184 der 6S RNA) und '6S-Oligo4' (Bindet Nt. 68 - Nt. 89 der 6S RNA) hybridisiert und in eine Primer-Extension-Reaktion (siehe Kapitel 5.2.8.3) eingesetzt. Die Proben wurden nach der Reaktion mittels 10% dPAGE aufgetrennt. Die Abbildung 2.9 zeigt exemplarisch die Autoradiographie einer solchen Primer-Extension nach UV-Quervernetzung.

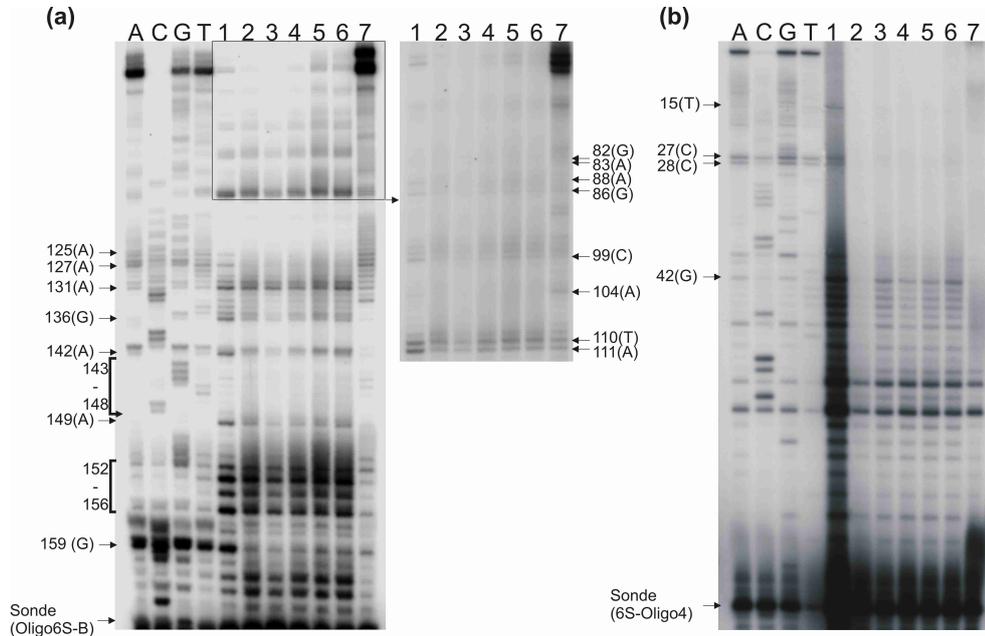


Abbildung 2.9: Primer-Extension-Reaktion nach UV-Quervernetzung von 6S RNA und RNA-Polymerase. (a) PE mit Sonde Oligo6S-B, (b) PE mit Sonde 6S-Oligo4. 1: 6S RNA+E70, 2: 6S RNA+E38, 3: 6S RNA+E, 4: 6S RNA+ σ^{70} , 5: 6S RNA+ σ^{38} , 6: 6S RNA+UV, 7: 6S-UV. A, C, G, T: Sequenzierung der 6S RNA mit der jeweiligen Sonde. UV-Quervernetzung durch 254 nm, 2700 mJ.

Die Abbildung 2.9 (a) zeigt die Primer-Extension-Reaktion mit einer Sonde, die am extremen 3'-Ende der 6S RNA hybridisiert. In der Spur 1 ist deutliche die Abweichung des Bandenmusters im Vergleich zu den anderen Spuren zu erkennen. Die Abbruchbanden der Primer-Extension repräsentieren die Quervernetzung zwischen der 6S RNA und dem σ^{70} -spezifischen Holoenzym. Die Spuren 2-5 zeigen im Vergleich zur Kontrolle (6S RNA ohne UV, Spur 7) ebenfalls Quervernetzungen. Bei diesen handelt es sich um interne Vernetzungen, wie die Kontrolle der mit UV-Strahlung behandelten 6S RNA (Spur 6) zeigt. Die Primer-Extension-Reaktion mit einer Sonde, die weiter in Richtung des 5'-Endes der 6S RNA bindet (6S-Oligo4), zeigt ein ähnliches Bild (b). Auch hier findet man ein abweichendes Bandenmuster, wurden Komplexe aus 6S RNA und der σ^{70} -spezifischen RNA-Polymerase (E70) quervernetzt.

Diese Ergebnisse ließen sich in mehreren unabhängigen Reaktionen bestätigen. Wie die Retardierungsanalysen der 6S RNA mit den verschiedenen RNA-Polymerase Holoenzymen und dem Core-Enzym gezeigt haben, bindet die 6S RNA stabil an beide Holoenzyme, sowie an das Core-Enzym (siehe Abbildung 2.1). Die Bindung an das stationäre Phase-spezifische Holoenzym und das Core-Enzym ist jedoch im Vergleich zu der Komplexbildung mit dem

σ^{70} -spezifischen Holoenzym schwächer und weniger stabil gegenüber Heparin. Diese geringe Bindung an E38 und Core kann einer der Gründe dafür sein, dass in der Primer-Extension keine komplexbedingten Crosslink-Banden sichtbar sind. Ein weiterer Faktor für eine fehlende Quervernetzung zwischen 6S RNA und E38 kann zudem die schlechte Rekonstitution des σ^{38} -Holoenzym sein. Interessanter Weise wurde jedoch schon bei den Komplexbildungen im Hydroxylradikal-‘Footprint’ kein σ^{38} -spezifischer Komplex detektiert. Dieses deutet ebenfalls auf eine unterschiedliche Stabilität der verschiedenen Komplexe sowie auf eine unterschiedliche Bindung der RNA-Polymerase-Spezies an die 6S RNA hin.

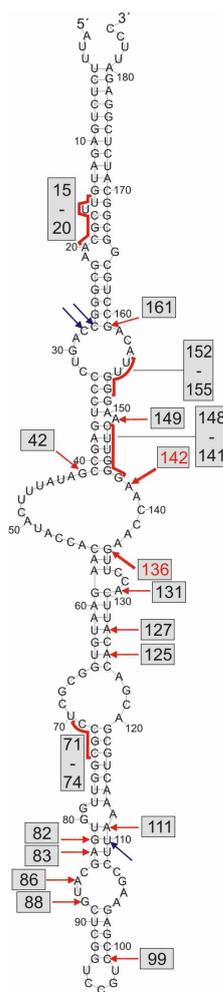


Abbildung 2.10: Positionen der Quervernetzungen innerhalb der 6S RNA Sekundärstruktur. Dargestellt sind die erhaltenen UV-Quervernetzungen zwischen der 6S RNA und der σ^{70} -spezifischen RNA-Polymerase (E70). Vernetzte Nucleotide sind durch rote Pfeile markiert, ‘sensible’ Regionen durch rote Balken. Die stärkeren Pfeile markieren besonders reaktive Positionen. Blaue Pfeile zeigen Banden, die durch die Sekundärstruktur bedingt sind.

In der Abbildung 2.10 sind die anhand der Sequenzierungen zugeordneten quervernetzten Positionen innerhalb der 6S RNA-Sekundärstruktur zusammengefasst. An den markierten Positionen findet ein direkter Kontakt von 6S RNA und RNA-Polymerase statt. Die breiteren roten Pfeile entsprechen besonders starken Signalen in der Primer-Extension. Auffällig ist, dass die betroffenen Nukleotide innerhalb oder am Rand von einzelsträngigen Bereichen liegen. Eine leichtere Zugänglichkeit könnte an diesen Nukleotiden die Wechselwirkungen zwischen RNA und Protein stark vereinfachen. Weitere in der Quervernetzung erfasste Positionen befinden sich im mittleren Bereich der 6S RNA, mit einer Konzentrierung um den zentralen Loop (siehe Abbildung 2.10). Eine zweite Anhäufung von Kontakten findet sich im Stem II und am terminalen Loop des RNA-Moleküls und umfasst die Nukleotide 82, 83, 86, 88, 99 sowie 111 und den Bereich von Nukleotid 71-74.

Die hier gezeigten Daten stimmen somit mit den in den Hydroxylradikal-‘Footprints’ gemachten Beobachtungen überein und zeigen ebenfalls eine Bindung der RNA-Polymerase an die zentrale Domäne sowie den terminalen Bereich (Stem II und terminaler Loop) der 6S RNA.

2.3 Der Einfluss der 6S RNA auf die Funktion der RNA-Polymerase

2.3.1 Problemstellung und experimenteller Ansatz

In vorangegangenen Versuchen konnte die Bindung der 6S RNA an verschiedene Formen der RNA-Polymerase nachgewiesen werden. Weiterhin konnte eine Inhibierung des σ^{70} -spezifischen *rsd*-Promotors durch die 6S RNA gezeigt werden (Wassarman und Storz, 2000). Bei dem *rsd*-Promotor handelt es sich um den Tandem-Promotor des Gens für den Anti-Sigmafaktor Rsd, der aus einem σ^{38} - und einem σ^{70} -spezifischen Promotor besteht.

Die Inhibierung σ^{70} -abhängiger Promotoren durch die 6S RNA ist jedoch nicht ubiquitär, vermutet wird eine Inhibierung nur solcher Promotoren, die eine verlängerte -10 (‘extended -10’) Region aufweisen. Eine *in vivo* Aktivierung bestimmter stationärer Phase-spezifischer Promotoren, wie sie von Trotochaud und Wassarman (2004) postuliert wurde, wird hingegen kontrovers diskutiert. Kim *et al.* konnten zeigen, dass die Überexpression von 6S RNA *in vivo* zu einer Inhibierung verschiedener σ^{38} -abhängiger Promotoren führt. Im Falle des auch in dieser Arbeit untersuchten *bolA* Promotors führt zudem das Fehlen der 6S RNA (*ssrS*) zu einer Aktivierung der Promotoraktivität (Kim *et al.*, 2004).

Um den Einfluss der 6S RNA auf wachstumsphasen-spezifische Promotoren zu untersuchen, wurden *in vitro* Transkriptionsanalysen durchgeführt. Hierzu wurden der σ^{70} -abhängige *rrnB* P1-Promotor sowie der σ^{38} -spezifische *bolA* Promotor in verschiedenen Transkriptionssystemen analysiert. Neben dem Einfluss auf die Transkription wurde auch die Wirkung der 6S RNA auf die Komplexbildung der σ^{70} - und σ^{38} -spezifischen Promotoren mit den entsprechenden Holoenzymen durch Retardierungs- (‘Gelshift’) Analysen untersucht.

2.3.2 Auswahl und Präparation von Komponenten

2.3.2.1 Der *rrnB* P1-Promotor

Für Retardierungsanalysen und *in vitro* Transkriptionen mit linearen Templates lag der *rrnB* P1-Promotor als DNA-Fragment vor. Dieses nachfolgend als ‘*rrnB* P1’ bezeichnete Fragment mit einer Länge von 260 Basenpaaren enthält die regulatorische UAS-Region sowie das UP-Element des nativen Promotors. Für beide Analysen wurde das Promotorfragment aus dem Vektor pUC18-1 isoliert (siehe Kapitel 4.3.2). Für *in vitro* Transkriptionsanalysen wurden hierzu Restriktionsenzyme gewählt, die glatte Enden produzieren. Dieses ist notwendig, um eine unspezifische Endbindung der Polymerase, wie sie besonders an überhängenden Enden beschrieben ist (Kadisch und Chamberlin, 1982), zu verhindern. Für Retardierungsanalysen wurde hingegen mit Enzymen geschnitten, welche 5´-überhängende Enden produzieren. Diese konnten so mittels Klenow-Polymerase aufgefüllt und radioaktiv markiert werden (siehe 5.2.7.5). Für Analysen mit superhelikalen Templates lag der *rrnB* P1-Promotor mit den starken, downstream liegenden Terminatoren T1 und T2 des *rrnB*-Operons von *E. coli* auf dem Plasmid pRT3HΔP2 vor (siehe 4.2.2).

Die Tabelle 2.1 gibt zusammenfassend eine Übersicht über die verwendeten *rrnB* P1-Promotoren.

Tabelle 2.1: Übersicht über die *rrnB* P1-Promotoren. Angegeben ist die Position relativ zum *rrnB* P1-Transkriptionsstart.

EXPERIMENT	VEKTOR	ENZYME	POSITION	LÄNGE	TRANSKRIPT
IVT (linear)	pUC18-1	<i>Ecl136II/HincII</i>	-183 bis +63	256 Bp	63/65 Nt
IVT (‘ccc’)	pRT3HΔP2	—	-103 bis +48	5632 Bp	320 Nt
Retardierungen	pUC18-1	<i>BamHI/EcoRI</i>	-183 bis +63	256 Bp	—

2.3.2.2 Der *bolA*-Promotor

Der in dieser Arbeit verwendete *bolA*-Promotor enthält neben dem σ^{38} -abhängigen P1-Promotor einen upstream liegenden, benachbarten σ^{70} -abhängigen Promotor P2 (Position -73 relativ zum P1 Start, Santos *et al.*, 1999). Dieses ermöglichte eine gleichzeitige Analyse des postulierten P2-Promotors, sowie der ebenfalls upstream liegenden regulatorischen Elemente. Für *in vitro* Transkriptionen mit linearen Templates und Retardierungsanalysen konnten verschiedene Fragmente aus dem Plasmid pUC18-*bolA* (Reckendrees, 2004) durch Restriktionsanalysen gewonnen werden.

Durch Restriktion mit dem Enzym *HincII* konnte ein Fragment mit glatten Enden für *in vitro* Transkriptionen generiert werden. Für Retardierungsanalysen wurde das Fragment durch Restriktionsanalyse aus pUC18-*bolA* so isoliert, dass 5´-überhängende Enden vorhanden waren. Für Transkriptionen mit superhelikalen Promotoren wurde das Plasmid p*bolAT1T2* (Reckendrees, 2004) genutzt, welches den *bolA*-Promotor inklusive seiner ‘upstream’ Region vor den Terminatoren T1 und T2 des ribosomalen *rrnB*-Operons trägt. Die Tabelle 2.2 zeigt eine Übersicht über die verwendeten *bolA*-Fragmente und -Vektoren.

Tabelle 2.2: Übersicht über die *bolA*-Promotoren. Angegeben ist die Position relativ zum *bolA* Transkriptionsstart.

EXPERIMENT	VEKTOR	ENZYME	POSITION	LÄNGE	TRANSKRIPT
IVT (linear)	pUC18- <i>bolA</i>	<i>HincII</i>	-160 bis +124	284 Bp	124 Nt
IVT ('ccc')	pbolAT1T2	—	-160 bis +124	5632 Bp	124 Nt
Retardierungen	pUC18- <i>bolA</i>	<i>XbaI/HincII</i>	-160 bis +116	276 Bp	—

2.3.2.3 DNA-abhängige RNA-Polymerasen

Die in den nachfolgend beschriebenen Experimenten benutzten DNA-abhängigen RNA-Polymerasen wurden vor der Reaktion durch Assemblierung des Core-Enzyms mit dem jeweiligen Sigmafaktor erhalten ('Rekonstitution', siehe 5.2.8.8). Die jeweiligen Untereinheiten wurden in Anlehnung an die im Kapitel 4 genannten Methoden präpariert und lagen jeweils in hoher Reinheit vor. Die Aktivität der rekonstituierten E70-Holoenzyme wurde nach Chamberlin *et al.* (1979) bestimmt. Die Aktivitätsmessung der rekonstituierten E38 Holoenzyme wurde über eine vergleichende 'multiple-round' *in vitro* Transkriptions-Analyse durchgeführt. Hierbei wurde eine effiziente Transkription an dem *bolA*-verwandten Promotor '*bolA1*' ab einem molaren Core-Enzym zu σ^{38} -Faktor Verhältnis von 1:100 detektiert. Die Aktivität konnte noch bis zu einem molaren Verhältnis von 1:1000 (Core : σ^{38}) erhöht werden (Reckendrees, 2004). Das rekonstituierte exponentielle Phase-spezifische Holoenzym (E70) erreichte seine maximale Aktivität bereits bei einem Core : σ^{70} -Verhältnis von 1:30. Diese Unterschiede in der Aktivität lassen sich durch die 5fach geringere Bindeaffinität des σ^{38} -Faktors zum Core-Enzym der RNA-Polymerase, sowie durch die unterschiedlichen Promotorstärken erklären. Für alle Analysen wurden darum folgende Verhältnisse von Core-Enzyme zu Sigmafaktor eingesetzt:

$$\begin{aligned} \text{Core} : \sigma^{70} &= 1:15 \\ \text{Core} : \sigma^{38} &= 1:180 \text{ oder } 1:500. \end{aligned}$$

2.3.3 Die Wirkung der 6S RNA auf die Komplexbildung an wachstumsphasen-spezifischen Promotoren

2.3.3.1 Die Spezifität der wachstumsphasen-abhängigen Promotoren *rrnB* P1 und *bolA*

Um im Folgenden eine eventuelle Inhibierung der Komplexbildung von *rrnB* P1 und *bolA* und der RNA-Polymerase durch die 6S RNA bestimmen zu können, wurden die Bindeeigenschaften der Promotoren ohne den Einfluss der 6S RNA untersucht. Hierzu wurden Gelretardierungs-('Gelshift') Analysen mit beiden Promotoren im homologen (σ^{70} -abhängiger Promotor/E70 bzw. σ^{38} -abhängiger Promotor/E38) und heterologen (σ^{70} -abhängiger Promotor/E38 und umgekehrt) System durchgeführt. Für die Analysen wurde 1.5 nM radioaktiv markiertes Promotorfragment (5.2.7.5) mit 3 nM aktivem Holoenzym und 65 μM Startnukleotiden in 1x K_{Glu80}-Puffer wie beschrieben (siehe 5.2.8.7) inkubiert. Unspezifische Bindungen wurden nach der Reaktion durch die Zugabe von Heparin abgefangen.

Zusätzlich zu einer Analyse der Holoenzym-Komplexe wurde am *bolA*-Promotor auch die Bindung an das Core-Enzym sowie an die Sigmafaktoren σ^{70} und σ^{38} alleine unter-

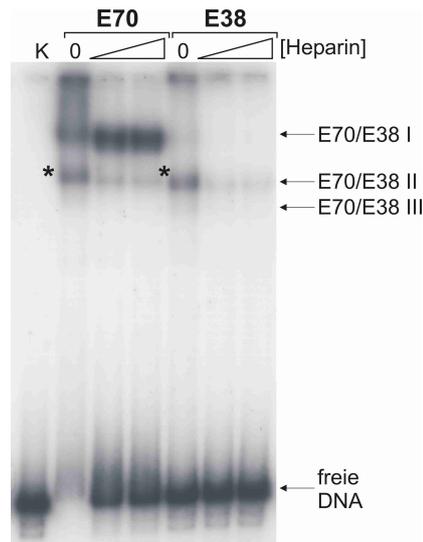


Abbildung 2.11: Komplexbildung des *rrnB* P1-Promotors im homo- und heterologen System. Die Pfeile markieren die beobachteten Komplexe sowie die freie DNA. Der Core-Enzym spezifische Komplex ist mit einem ‘*’ markiert. K= DNA ohne Protein. Heparin: 0, 100, 200 ng/ μ l.

sucht. Für den *rrnB* P1-Promotor wurden diese Analysen nicht durchgeführt, da dessen Eigenschaften aus früheren Analysen hinlänglich bekannt sind (Jöres, 2001). Ebenso bekannt sind die Bindeeigenschaften des *rrnB* P1 an das σ^{38} - und σ^{70} -Holoenzym, diese sind hier zur besseren Vergleichbarkeit der Komplexe von E70 und E38 mit den entsprechenden Promotoren dennoch gezeigt.

Der *rrnB* P1-Promotor bildet mit dem σ^{70} -assoziierten Holoenzym wie bereits beschrieben zwei Komplexe (E70 I und E70 II, Abbildung 2.11). Beide Komplexe sind heparinstabil, wobei in Abwesenheit von Heparin auch mehrfach besetzte Zustände möglich sind. Für die Stabilität der Komplexe gegenüber Heparin ist die Zugabe der ersten beiden Startnukleotide zwingend erforderlich. (Ohlsen und Gralla, 1992; Gourse, 1988). Bei dem stark retardierten Komplex E70 I handelt es sich um einen Initiationskomplex (RP_{init} , siehe Kapitel 1.6.4). Der zweite Komplex, welcher ohne die Zugabe von Heparin von dem sensitiven Core-Komplex überlagert wird, ist ein initialer Elongationskomplex (Jöres, 2001). An der Überlagerung wird deutlich, dass sich trotz einer sehr guten Bindung von σ^{70} an die RNA-Polymerase noch freies Core-Enzym im Rekonstitutionsansatz befindet. Das E38-Holoenzym bildet mit dem *rrnB* P1-Promotor neben den schon beschriebenen heparinstabilen Komplexen (E70/E38 I und E70/E38 II) einen weiteren Komplex (E38 III), der schneller migriert. Eventuell handelt es sich hierbei um Komplexe, die kurze, reiterative Transkripte beinhalten.

Für die Bindung von *bolA* an sein homologes Holoenzym können, wie in der Abbildung 2.12 gezeigt, drei Komplexe beobachtet werden. Die signifikanten Komplexe E38 II und E38 III sind heparinstabil, wobei E38 III bevorzugt gebildet wird. Zusätzlich ist noch ein weiterer, sehr schwacher und stark retardierter Komplex (E38 I) erkennbar, welcher im

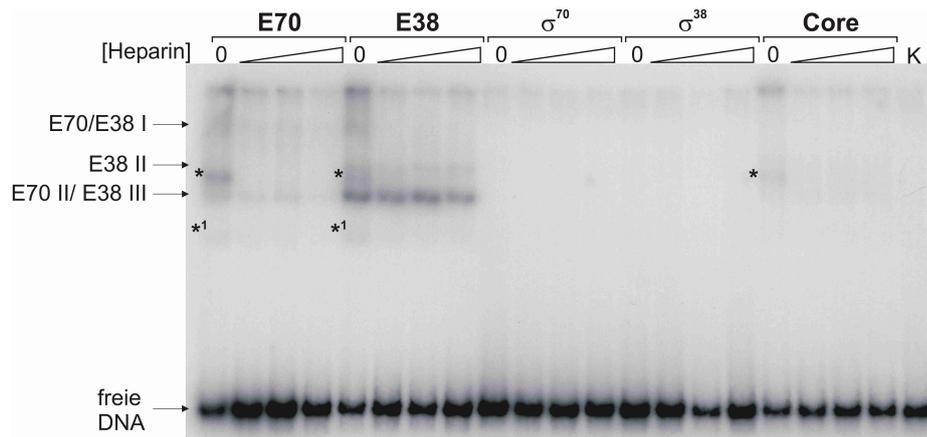


Abbildung 2.12: Retardierungsanalyse des *bolA*-Promotors mit verschiedenen RNA-Polymerase-Formen sowie den Sigmafaktoren σ^{70} und σ^{38} . Die gebildeten Komplexe und die freie 6S RNA sind mit Pfeilen markiert. Der Core-Enzym spezifische Komplex ist mit (*) markiert, *1 zeigt kurze, reiterative Komplexe. K= DNA ohne Protein. Heparin: 0, 50, 100, 200 ng/μl.

Komplex mit E38 nicht stabil gegenüber Heparin ist. Bei diesem Komplex handelt es sich eventuell um eine Bindung an den postulierten, σ^{70} -abhängigen P2. Die geringere Mobilität im Gel könnte durch eine starke, proteininduzierte Krümmung sowie durch eine gleichzeitige Bindung an beide Promotoren erklärt werden (Reckendrees, 2004). Bei dem Komplex E38 II handelt es sich wahrscheinlich um den Initiationskomplex (RP_{init}, vergleichbar mit *rrnB* P1 E70 I). Der Komplex E38 III repräsentiert einen ternären Initiationskomplex (siehe Kapitel 1.6.4), der nur bei Zugabe von Nukleotiden auftritt (siehe auch: Reckendrees, 2004). Der *bolA*-Promotor bildet zudem mit seinem homologen Enzym transkriptionsaktive Komplexe aus, die kurze, reiterative Transkripte gebunden haben (*1). Gegenüber dem σ^{70} -Holoenzym zeigt der *bolA*-Promotor nur eine sehr geringe Bindeaffinität. Hierbei wird vor allen Dingen der heparinstabile ternäre Komplex (E70 III) gebildet. Eine Bindung des *bolA*-Promotors an das Core-Enzym erfolgt nur ohne die Anwesenheit von Heparin. Eine Bindung von *bolA* an die Sigmafaktoren alleine konnte nicht beobachtet werden.

Die Abbildungen 2.11 und 2.12 zeigen, dass nur in einem Fall (*rrnB* P1/E70 ohne Heparin) eine vollständige Komplexbildung der Promotor-Fragmente erfolgte, obwohl die RNA-Polymerase im Überschuss vorlag. Weiterhin zeigte sich, dass nicht alles Core-Enzym in der Rekonstitution umgesetzt wird. Die Rekonstitution ist mit dem σ^{38} -spezifischen Holoenzym wesentlich schlechter als bei der σ^{70} -spezifischen RNA-Polymerase. Eine Kreuzerkennung der Transkriptionssysteme ist möglich, die Bindung erfolgt jedoch im homologen System wesentlich effizienter als im heterologen. Darüber hinaus konnte in vorangegangenen Versuchen gezeigt werden, dass die Promotor/RNA-Polymerase-Komplexe ausschließlich in Anwesenheit von Startnukleotiden gegen Heparin stabil sind (Reckendrees 2004, Jöres 2001).

2.3.4 Der Einfluss der 6S RNA auf die Promotorbindung

Im ersten Schritt sollte der Einfluss der 6S RNA auf die Komplexbildung in den verschiedenen RNA-Polymerase/Promotor-Systemen getestet werden. Die 6S RNA bindet nicht nur an das E70-Holoenzym, sondern auch an das stationäre Phase-spezifische Holoenzym (E38, siehe Abbildung 2.1). Die Bindung ist jedoch nicht so stabil wie an E70. Da die 6S RNA zudem die Transkription *in vivo* beeinflusst (Kim *et al.*, 2004), sollte auch die Komplexbildung an beiden Promotoren durch eine Zugabe von 6S RNA verändert werden. Aufgrund der direkten Bindung der 6S RNA an die RNA-Polymerase sollte zudem je nach Zeitpunkt der 6S RNA-Zugabe eine unterschiedlich starke Inhibierung der Komplexbildung auftreten.

2.3.4.1 Die Wirkung der 6S RNA auf die Komplexbildung

In einem ersten Versuchsansatz wurden zunächst 1.5 nM Promotor-Fragment mit den entsprechenden Startnukleotiden und unterschiedlichen Mengen 6S RNA nach Vorschrift (5.2.8.10) vorinkubiert. Nach der Inkubation wurden 3 nM RNA-Polymerase-Holoenzym (E70 oder E38) zu der Reaktion gegeben und 20 Minuten bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit Heparin (200 ng/ μ) versetzt, um unspezifische Bindungen abzufangen. Vorangegangene Analysen hatten gezeigt, dass die Komplexbildung nicht so empfindlich auf die Zugabe von 6S RNA reagiert wie z. B. Transkriptionssysteme (Daten nicht gezeigt). Es wurden daher 6S RNA-Mengen von 5-1000 nM in verschiedenen Schritten gewählt, um einen möglichst großen Wirkungsbereich erfassen zu können.

Wie in der Abbildung 2.13 zu erkennen, inhibiert die 6S RNA die Komplexbildung von *rrnB* P1-Promotor und RNA-Polymerase. Hierbei wurden weiterhin die bereits beschriebenen Komplexe gebildet (siehe 2.3.3). Die Abbildung 2.13 unten zeigt die quantitative Auswertung zweier unabhängiger Experimente, wobei die Komplexe zusammen quantifiziert wurden. Der Komplexanteil ohne 6S RNA Zugabe wurde hierbei gleich 100% gesetzt, alle anderen Banden wurden hierauf bezogen und die Restaktivität ermittelt. In der Tabelle A² sind die gemessenen Werte dargestellt.

Durch die Zugabe von 6S RNA wird die Komplexbildung zunächst um 7% aktiviert. Bei dieser Aktivierung handelt es sich jedoch wahrscheinlich um ein Artefakt, welches durch eine zu geringe Komplexbildung ohne 6S RNA, eventuell durch Auftragungsfehler, entstand. Die Zugabe von 6S RNA zeigt erst ab einer Konzentration von 10 nM eine inhibierende Wirkung auf die Komplexbildung. Die vorhandene Restaktivität nimmt bei der Zugabe größerer Mengen 6S RNA regelmäßig ab, wobei auch bei sehr hohen 6S RNA Konzentrationen (1000 nM) keine komplette Inhibierung erreicht wurde.

Auch für den stationäre Phase-spezifischen *bolA*-Promotor ist eine Inhibierung der Komplexbildung durch die 6S RNA zu erkennen, wie in der Abbildung 2.14 gezeigt. Die Inhibierung ist hierbei generell stärker als am *rrnB* P1-Promotor und erreicht bei hohen 6S RNA Konzentrationen fast 100% (0% Restaktivität). Die Inhibierung verläuft hierbei sehr regelmäßig und nimmt bei steigender 6S RNA Konzentration kontinuierlich zu. Die absoluten Werte sind in der Tabelle B im Anhang aufgeführt.

²Die Tabellen, auf welche hier verwiesen wird, befinden sich im Anhang

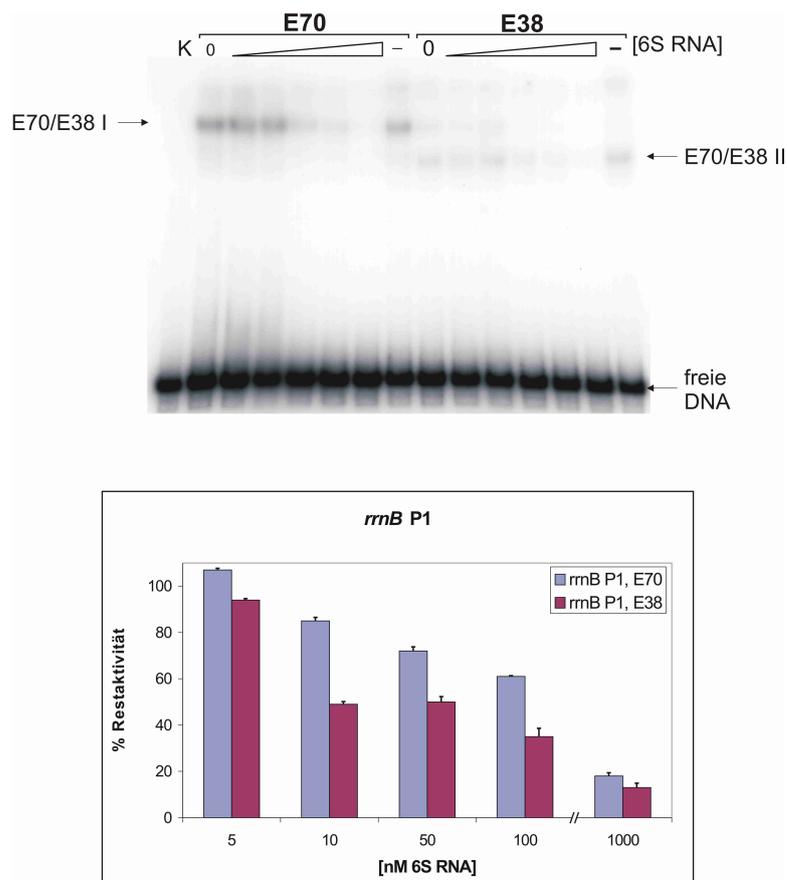


Abbildung 2.13: Wirkung der 6S RNA auf die Transkriptions-Komplexbildung am *rrnB* P1-Promotor. Zu erkennen ist die Inhibierung der Komplexbildung mit dem σ^{70} -Holoenzym. Die Komplexe sowie die freie 6S RNA sind mit Pfeilen markiert. 6S RNA-Konzentrationen: 0, 5, 10, 50, 100, 1000 nM. '-' = ohne Heparin, 50 nM 6S RNA (oben). Unten: Graphische Auftragung der Quantifizierung der Retardierung von *rrnB* P1 und RNA-Polymerase. Aufgetragen ist die eingesetzte 6S RNA Menge gegen die bestimmte Restaktivität (Mittelwert aus zwei unabhängigen Versuchen).

Vergleicht man die Restaktivität beider Promotoren miteinander (Abbildung 2.15) fällt auf, dass die Inhibierung am *bolA*-Promotor stärker ist. Der *rrnB* P1-Promotor zeigt bei allen 6S RNA Konzentrationen eine höhere Restaktivität als der *bolA*-Promotor. Dieses resultiert wahrscheinlich aus der im Vergleich zu E70 und *rrnB* P1 instabileren Bindung zwischen *bolA* und E38. Eine instabilere Bindung könnte einen Vorteil für die 6S RNA bei der Konkurrenz mit dem Promotor um die RNA-Polymerase bedeuten. Eine Zunahme des freien Fragments, welche bei abnehmender Restaktivität zu sehen sein sollte, ist nur in geringem Maße zu beobachten. Eine Quantifizierung führte zu keinem Ergebnis, da das Promotorfragment nicht vollständig von der RNA-Polymerase gebunden wird.

Zusätzlich zu den hier beschriebenen homologen Retardierungssystemen wurden auch die heterologen Retardierungssysteme untersucht (nicht gezeigt).

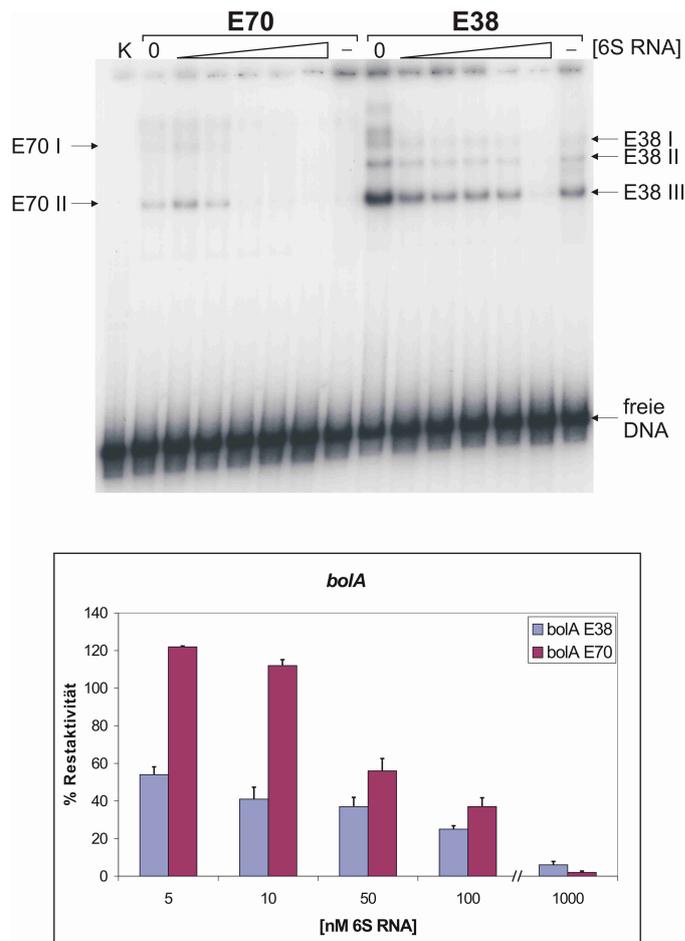


Abbildung 2.14: Wirkung der 6S RNA auf die Komplexbildung am *bolA* Promotor. Zu erkennen ist die Inhibierung der Komplexbildung mit dem σ^{70} - und dem σ^{38} -Holoenzym. Die Komplexe sowie die freie 6S RNA sind mit Pfeilen markiert. 6S RNA-Konzentrationen: 0, 5, 10, 50, 100, 1000 nM. '-' = ohne Heparin, 50 nM 6S RNA (oben). Unten: Graphische Auswertung der Quantifizierung der Retardierung von *bolA* und RNA-Polymerase. Aufgetragen ist die eingesetzte 6S RNA Menge gegen die gemessene Restaktivität (Mittelwert aus zwei unabhängigen Versuchen, siehe Tabelle B).

Diese zeigen im Allgemeinen den gleichen Gang wie die homologen Systeme. Hierbei ist, wie zu erwarten, die Inhibierung aufgrund der unspezifischen Promotor/RNA-Polymerase-Komplexe stets höher als im entsprechenden homologen System. Eine Ausnahme bildet lediglich die Komplexbildung von *bolA* mit der σ^{70} -spezifischen RNA-Polymerase. Hier ist zunächst eine Aktivierung der Komplexbildung bei niedrigen 6S RNA Konzentrationen zu beobachten, wobei die Aktivierung bei der niedrigsten 6S RNA Konzentration am stärksten ist. Der Grund für diese Aktivierung ist unklar. Es könnte sich zum Beispiel um eine vorübergehende Stabilisierung des RNA-Polymerase/Promotor-Komplexes durch ein gleichzeitiges Anlagern der 6S RNA handeln. Auch hier ist jedoch eine zu geringe Komplexmenge bei der Probe ohne 6S RNA möglich. Bei höheren 6S RNA Konzentrationen nimmt die Restaktivität der Komplexbildung wieder ab, wobei sie bei 100 nM 6S RNA nahezu ähnliche Werte erreicht wie bei den homologen Komplexen. In der Tabelle C im Angang sind die absoluten Werte (*bolA*) zusammengefasst dargestellt.

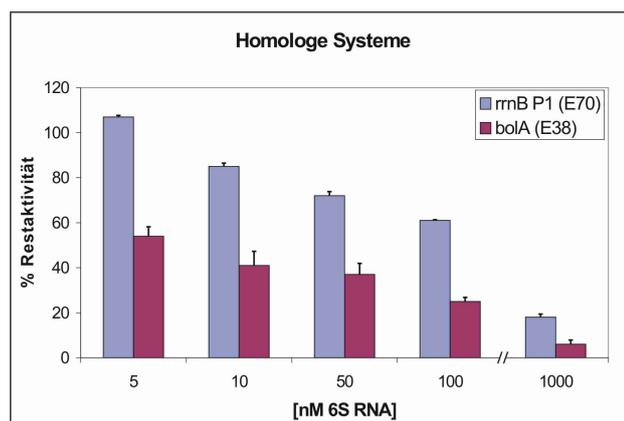


Abbildung 2.15: Vergleich der Komplexbildung von *bolA* und *rrnB* P1 mit ihren homologen RNA-Polymerasen unter dem Einfluss von 6S RNA. Aufgetragen ist die eingesetzte 6S RNA Menge gegen die gemessene Restaktivität. Der *bolA* Promotor zeigt eine geringere Restaktivität als der *rrnB* P1-Promotor (je zwei unabhängige Versuche).

2.3.4.2 Der Einfluss des 6S RNA Zugabe-Zeitpunktes auf die Inhibierung von RNA-Polymerase/Promotor-Komplexen

In den vorangegangenen Experimenten wurden 6S RNA und DNA-Template vor der Zugabe der RNA-Polymerase vorinkubiert. Wenn es sich bei der Inhibierung der RNA-Polymerase/Promotor-Bindung durch die 6S RNA um eine Kompetition (eventuell sogar um dieselben Bindestellen der RNA-Polymerase) handelt, sollte der Zeitpunkt der 6S RNA Zugabe die Inhibierung beeinflussen. Aus diesem Grund wurden Retardierungen durchgeführt, bei welchen die 6S RNA entweder direkt zu der Rekonstitution der Holoenzyme gegeben wurde oder zu den bereits rekonstituierten RNA-Polymerasen. In beiden Fällen war die Komplexmenge deutlich geringer als bei einer Vorinkubation von 6S RNA und Template. In beiden Versuchsanordnungen war zudem eine zusätzliche Inhibierung bei steigenden 6S RNA Konzentrationen zu beobachten. Die homologen Komplexe zeigten bei 6S RNA Mengen von 100 nM noch einen Komplex, bei 500 nM 6S RNA erfolgte jedoch eine vollständige Inhibierung beider Promotoren. Bei den heterologen Systemen waren aufgrund ihrer geringen Stabilität bereits ab einer Menge von 50 nM 6S RNA keine Komplexe mehr zu erkennen (Daten nicht gezeigt). Die hier beschriebenen Auswirkungen der (zeitlich unterschiedlichen) 6S RNA Zugabe sind ein Beweis für eine direkte Wirkung der 6S RNA auf die RNA-Polymerase und für eine wahrscheinliche Kompetition der 6S RNA mit dem Promotor um die RNA-Polymerase. Zudem scheint die 6S RNA dieselben Bindestellen wie das DNA-Promotorfragment zu nutzen.

2.3.5 *In vitro* Transkriptionen unter dem Einfluss der 6S RNA

2.3.5.1 Die generelle Promotorspezifität von *bolA* und *rrnB* P1

In vivo wird die Spezifität der σ -Faktor-abhängigen Transkription durch ein komplexes Zusammenspiel mehrerer Transkriptionseffektoren erzielt. *In vitro* konnte eine Kreuzer-

kennung der exponentiellen und stationäre-Phase spezifischen Promotoren für den *rrnB* P1 und den *bolA*-Promotor, sowie für den σ^{70} -spezifischen RNA1-Promotor bereits gezeigt werden (Reckendrees, 2004). Hierbei findet mit beiden Holoenzymen und allen Promotoren eine funktionelle und produktive Kreuzerkennung statt. Die Spezifität und Effizienz ist im homologen Transkriptionssystem jedoch bedeutend größer als die im heterologen System. Besonders im Fall des heterologen *bolA*-Promotors ist die Transkription sehr schwach. Aus diesem Grund wurden die Inhibierungsstudien mit 6S RNA hauptsächlich im homologen Transkriptionssystem durchgeführt.

2.3.5.2 Regulation durch 6S RNA an linearen DNA-Templates *in vitro*

Die *in vitro* Transkriptionen wurden, wie auch die Retardierungsanalysen, mit rekonstituierten Holoenzymen durchgeführt. Für Transkriptionen mit linearen DNA-Templates wurden 3 nM rekonstituierte Holoenzyme (E70 und E38, Core : Sigmafaktor-Verhältnis wie unter 2.3.2.3 beschrieben) mit 1 nM spezifischem Template (*rrnB* P1 oder *bolA*) und 65 μ M ATP, CTP und GTP sowie 5 μ M UTP in 1x KGlu80 wie beschrieben inkubiert (siehe 5.2.8.7). Die radioaktive Markierung der Transkripte erfolgte durch den Einbau von α - 32 [P]-UTP.

Die Abbildung 2.16 zeigt exemplarisch eine *in vitro* Transkription mit linearen Templates unter dem Einfluss von 6S RNA. Gezeigt ist die Transkription im homologen und im heterologen System. Beide Promotoren zeigen die erwarteten Transkripte von etwa 64 (*rrnB* P1) und 124 (*bolA*) Nukleotiden. Der *bolA*-Promotor generiert zusätzlich zu seinem Vollängen-Produkt noch ein weiteres Transkript, das etwa 10 Nukleotide länger ist und dem beschriebenen Start an der Position -10 entspricht (Nguyen und Burgess, 1996).

Wie in der Abbildung 2.16 (links) zu erkennen, ist die Transkriptaubeute sehr schwach. Dieses gilt im homologen System vor allen Dingen für das Transkript des *rrnB* P1-Promotors. Das Transkript ist mit einer Länge von etwa 64 Nukleotiden nur halb so lang wie das des *bolA*-Promotors (124 Nt). Mit der geringeren Länge des Transkriptes geht ein geringerer radioaktiver Einbau einher, der dazu führt, dass das *rrnB* P1-Transkript nicht exakt quantifizierbar ist. Für die *rrnB* P1-Transkripte kann deshalb nur eine Tendenz gegeben werden. Gut zu erkennen ist die wesentlich schwächere Transkription im heterologen System. Für den *rrnB* P1-Promotor ist deshalb unter den gewählten Bedingungen keine Transkription mit dem stationären Phase-spezifischen Holoenzym zu erkennen, zusätzlich kommt es bei der geringen Länge des *rrnB* P1-Transkriptes wie bereits beschrieben nur zu einem schwachen Einbau von α - 32 [P]-UTP. Der *bolA*-Promotor zeigt wie erwartet eine geringere Transkriptionsaktivität mit dem σ^{70} -spezifischen Holoenzym. Eine quantitative Auswertung war aus den oben beschriebenen Gründen lediglich für den *bolA*-Promotor (homologes System) möglich und ist in der Abbildung 2.16 rechts gezeigt.

Die Aktivität des *bolA*-Promotors nimmt mit steigender 6S RNA Menge deutlich ab und ist bereits bei der Zugabe von 250 nM 6S RNA nicht mehr feststellbar. Die Aktivität wird bereits bei der Zugabe nur geringer Mengen 6S RNA signifikant beeinflusst: schon bei der Anwesenheit von 10 nM 6S RNA im Transkriptionsansatz ist im Mittel nur noch eine Restaktivität von etwa 60% vorhanden. Eine Messung des heterologen *bolA*-Systems wurde aufgrund der nur geringen Transkriptionseffizienz nicht durchgeführt. Für die Inhibierung des *rrnB* P1-Promotors konnte nur eine Reaktion ausgewertet werden. In diesem

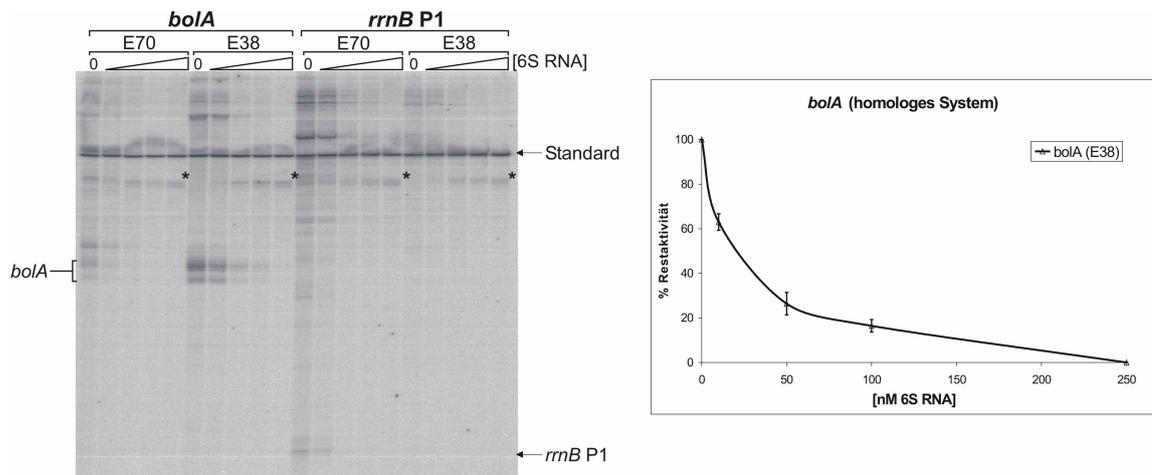


Abbildung 2.16: *In vitro* Transkription mit linearen Templates. Die Transkriptionen wurden hier im homologen und im heterologen System durchgeführt. Die Transkripte des *bolA*- und des *rrnB P1*-Promotors sowie der 'Standard' sind mit Pfeilen markiert. 6S RNA: 0, 10, 50, 100, 250 nM. Bei dem 'Standard' handelt es sich um das aufgefüllte *rrnB P1*-Fragment (260 Nt.). Die '*' Kennzeichen das 6S RNA-spezifische 'de novo'-Transkript (links). Rechts: Quantitative Auswertung der Transkripte vom linearen *bolA*-Promotor. Aufgetragen wurden die Mittelwerte von drei unabhängigen Versuchen. Die aufgetragenen Werte sind in der Tabelle D im Anhang zu finden.

Fall betrug die Restaktivität bei der Zugabe von 10 nM 6S RNA 82% (18% Inhibierung) im Vergleich zu der Transkription ohne 6S RNA. Weitere Banden waren nicht quantifizierbar. Dieses liegt jedoch wahrscheinlich nicht an einer starken Inhibierung der Transkription durch eine 6S RNA Zugabe, sondern an der geringen Markierungseffizienz. Hierauf deutet auch die im Vergleich zum *bolA*-Promotor (63%) höhere Restaktivität (82% für *rrnB P1*) bei der Zugabe von 10 nM 6S RNA hin. Des Weiteren deckt sich diese Beobachtung mit der stärkeren Inhibierung der Komplexbildung am *bolA*-Promotor (siehe 2.3.4).

Wie in den Abbildungen 2.16 (links) und 2.17 zu erkennen, nimmt mit steigender 6S RNA Menge eine Doppelbande ('de novo'-Transkript) von etwa 200/210 Nukleotiden kontinuierlich zu. Da diese Bande ohne die Zugabe von 6S RNA nicht auftritt, muss es sich um ein Transkript handeln, das für die 6S RNA spezifisch ist. Das Transkript wird sowohl bei homologen - als auch bei heterologen Transkriptionen gebildet. Weiterhin konnte in weiteren Versuchen festgestellt werden, dass dieses 'de novo'-Transkript auch ohne die Zugabe eines DNA-Templates gebildet wird (siehe 2.3.6).

Auf weiterführende Transkriptionsexperimente mit linearen Fragmenten wurde wegen der geringen Transkriptausbau und der hierdurch nur unzureichenden Aussagekraft verzichtet. Im Folgenden wurde auf Transkriptionen mit superspiralisierten DNA-Templates zurückgegriffen, welche eindeutigere Aussagen ermöglichen.

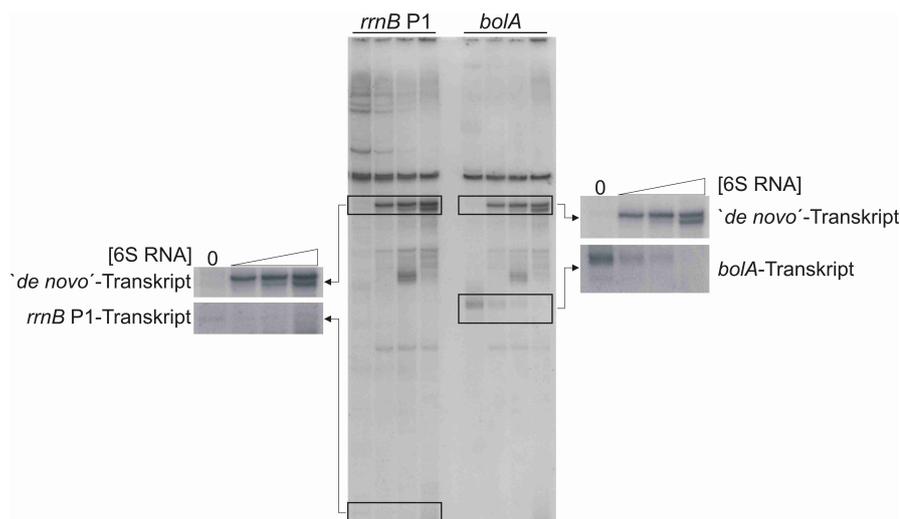


Abbildung 2.17: ‘*De novo*’- Transkripte bei linearen *in vitro* Transkriptionen Ohne 6S RNA wird das ‘*de novo*’-Transkript nicht gebildet. Mit zunehmender 6S RNA Menge wird die Transkription der spezifischen Promotoren inhibiert, die Menge des ‘*de novo*’-Transkripts nimmt hingegen zu. (In der Abbildung wurde zum Teil der Kontrast verstärkt, um die *rrnB* P1-Transkripte sichtbar zu machen).

2.3.5.3 *In vitro* Transkriptionen unter superhelikalen Bedingungen

Die *in vitro* Transkriptionen im ‘supercoiled’ System wurden ebenfalls mit rekonstituierten Holoenzymen durchgeführt. Frühere Analysen hatten ergeben, dass das vorhandene Core-Enzym eine geringe ‘nicking’-Aktivität besitzt. Da die Transkriptionseffizienz der genutzten Promotoren *bolA* und *rrnB* P1 jedoch stark von dem Grad der Superhelikalität des Templates abhängig ist, mussten Bedingungen gewählt werden, in welchen das superhelikale Template zu jeder Zeit im Überschuss vorhanden war. Hierzu wurde zum einen die Elongationszeit auf 8 Minuten reduziert. Weiterhin wurde das RNA-Polymerase zu Template Verhältnis mit einer Konzentration von 3 nM : 5 nM zugunsten des Templates eingesetzt. Dieses garantierte eine Templatekonzentration von mindestens 50% nach Ablauf der Zeit (Reckendrees, 2004). Die *in vitro* Transkriptionen wurden weiterhin durchgeführt mit 65 μ M ATP, CTP und GTP sowie 5 μ M UTP. Die Detektion der Transkripte erfolgte auch hier über den Einbau von radioaktivem UTP. Im Folgenden wurden lediglich Transkriptionen im homologen System durchgeführt, da die Transkription auch bei superspiralisierten Templates im heterologen System generell stark reduziert ist.

2.3.5.4 Auswirkung des Zeitpunkts der Zugabe von 6S RNA auf die Transkription an superhelikalen Templates

Zunächst sollte getestet werden, ob die Zugabereihenfolge der Komponenten einen Effekt auf die Inhibierung der Transkription hat. Hierzu wurden die Komponenten in unterschiedlichen Zusammensetzungen vorinkubiert und die Reaktion danach gestartet. Folgende Reihenfolgen wurden gewählt:

- A: Zugabe der 6S RNA direkt zu der Rekonstitution der RNA-Polymerasen (Start der Reaktion durch die Template-Zugabe).
- B: Zugabe der 6S RNA zu den bereits rekonstituierten Enzymen (Start durch Zugabe des Templates).
- C: Zugabe der 6S RNA zum Template (Start der Reaktion durch die Zugabe der RNA-Polymerase).

Die Abbildung 2.18 zeigt exemplarisch *in vitro* Transkriptionen mit zeitlich unterschiedlicher Zugabe der verschiedenen Komponenten.

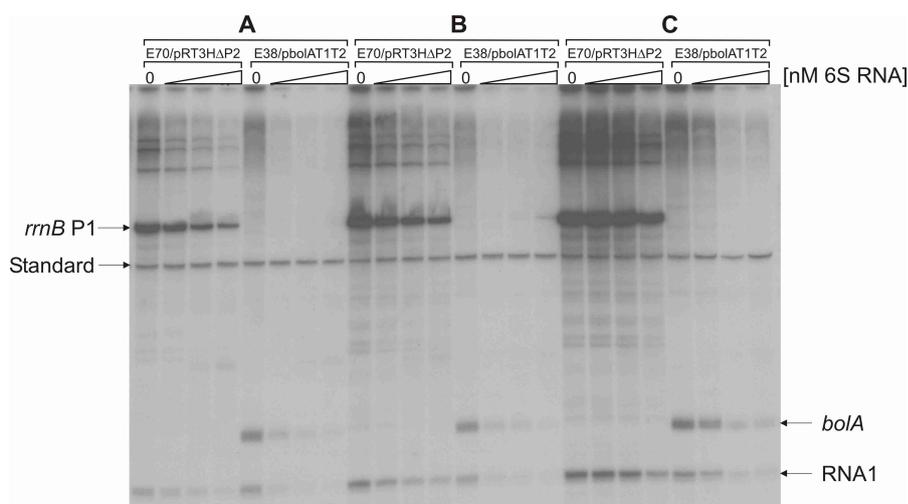


Abbildung 2.18: *In vitro* Transkriptionen mit superspiralisierten Templates. A: Zugabe der 6S RNA zu der Rekonstitution der Holoenzyme. B: Zugabe der 6S RNA zu der RNAP nach erfolgter Rekonstitution. C: Zugabe der 6S RNA zum DNA-Template. Transkription mit 3 nM rekonstituiertem Holoenzym (σ^{70} : 45 nM, σ^{38} : 540 nM) und 5 nM superhelikalem Template. Die spezifischen Transkripte von *rrnB* P1 (pRT3HΔP2) und *bolA* (pbolAT1T2) sowie der RNA1, die an dem intrinsischen Terminator T1 beendet wurden, sind mit Pfeilen gekennzeichnet. 6S RNA: 0, 50, 100, 250 nM. Standard= Auftragungsstandard 'P1', 260 Basenpaare.

Zur genauen Analyse der Transkripte erfolgte eine quantitative Auswertung von drei unabhängigen Experimenten (Abbildung 2.19). Die RNA1 kann hierbei als interner Transkriptionsstandard angesehen werden.

Wie die quantitative Auswertung der Transkriptionsprodukte in der Abbildung 2.19 zeigt, inhibiert die 6S RNA den *rrnB* P1-Promotor immer weniger stark als den *bolA*-Promotor. Eine Auswirkung zeigt sich nicht nur auf die Restaktivität bei der maximalen 6S RNA Menge, sondern auch im Verlauf der Inhibierungskurven: In allen Fällen mit Ausnahme von (A) sind die Inhibierungskurven des *bolA*-Promotors steiler, dieser wird bereits bei geringen Mengen von 6S RNA stark inhibiert und erreicht schon bei geringen 6S RNA Konzentrationen (50 nM) eine Inhibierung von über 70% (Restaktivität etwa 30-38%). Die Transkription des *rrnB* P1-Promotors erreicht hingegen bei 50 nM 6S RNA noch eine Restaktivität von rund 35-60%. Hier zeigt sich auch, dass die Reihenfolge der Zugabe eine Rolle bei der Reaktion spielt. Wird die 6S RNA direkt zu der Rekonstitution (A)

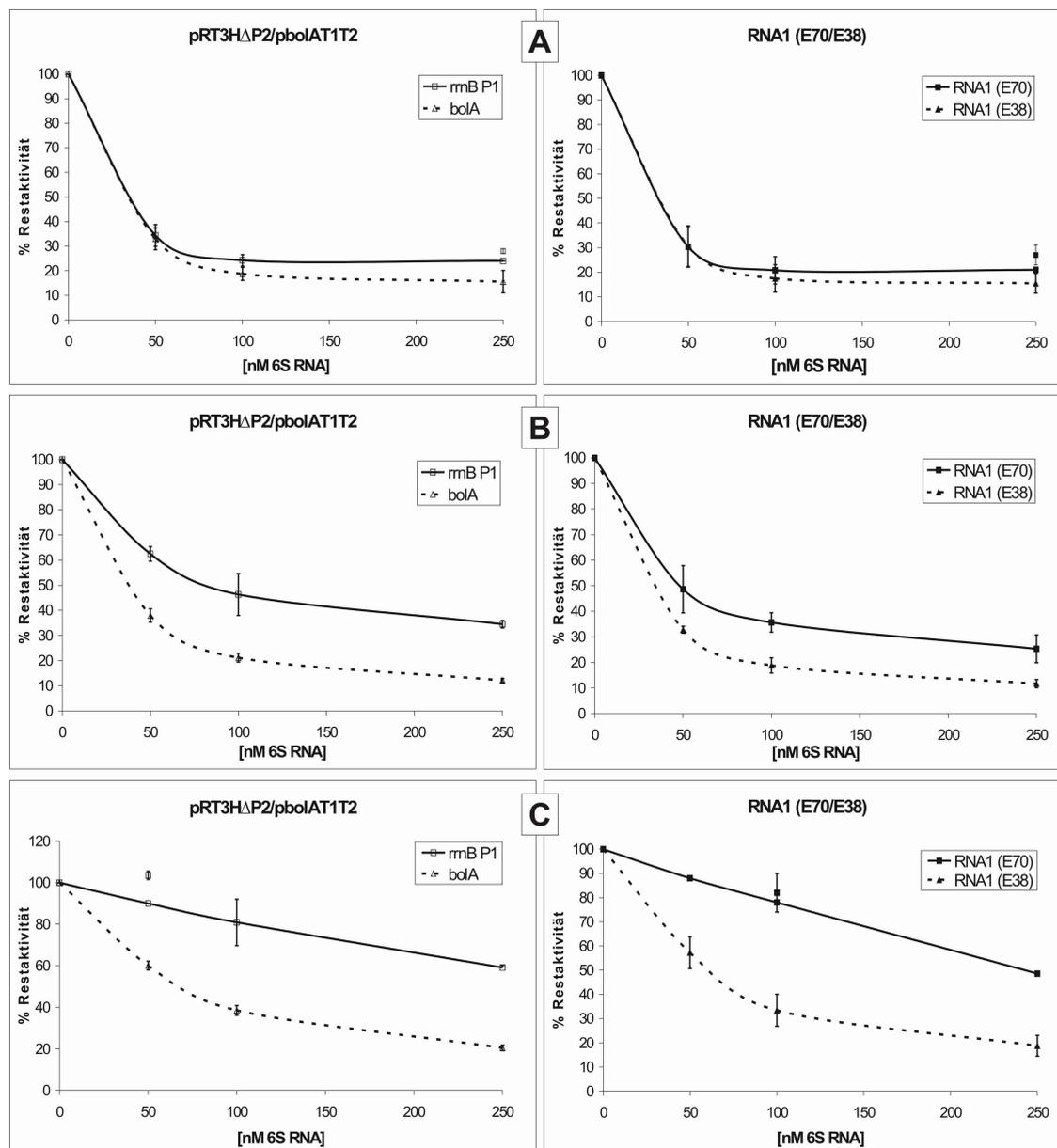


Abbildung 2.19: Quantitative Auswertung der Transkripte von superhelikalen Templates pRT3H Δ P2 und pbolAT1T2 im homologen System. Zur Berechnung wurden die Mittelwerte von drei unabhängigen Versuchen gebildet. Die berechneten Werte sind in der Tabelle E im Anhang aufgeführt.

der Holoenzyme gegeben, verläuft die Inhibierung der beiden Promotoren sehr ähnlich, wobei der *bolA*-Promotor auch hier die höchste 'End'-Inhibierung erfährt. Wird die 6S RNA erst nach der Rekonstitution zum Holoenzym gegeben, verläuft die Inhibierungskurve der *rrnB* P1 wieder flacher und zeigt mehr Restaktivität bei 250 nM 6S RNA (34%). Der *bolA*-Promotor zeigt im den gleichen Gang: Auch hier verläuft bei der Zugabe der 6S RNA direkt zur Rekonstitution (A) die Inhibierungskurve steiler als unter (B). Anders als der *rrnB* P1-Promotor unterscheidet sich die Restaktivität bei Zugabe von 250 nM 6S RNA jedoch nur gering zwischen A (16%) und B (12%). Wie die Abbildung 2.19 zeigt, hat die An- oder Abwesenheit des Templates zu Beginn der Reaktion einen großen Einfluss auf die Transkription. Die verbleibende Restaktivität (*rrnB* P1: 59%, *bolA*: 20%), ist das Template bei Zugabe der 6S RNA bereits im Reaktionsansatz vorhanden (C), ist im Vergleich zu den vorherigen Transkriptionen (A und B) deutlich höher, besonders für den *rrnB* P1-Promotor. Gleichzeitig nimmt die Restaktivität im Verlauf der Zugabe wesentlich langsamer ab als unter (A) und (B) beobachtet. Da der Referenzpromotor RNA1 unter allen Bedingungen immer den gleichen Gang zeigte wie der jeweilige spezifische Promotor, muss davon ausgegangen werden, dass es sich bei den hier beschriebenen Effekten um solche handelt, die durch eine Bindung der 6S RNA an die RNA-Polymerase verursacht werden. Zusammengefasst bestätigen die hier gezeigten Ergebnisse, dass das Ziel der durch die 6S RNA vermittelten Regulation die bakterielle RNA-Polymerase ist. Die Stabilität der Polymerase/Promotor-Komplexe scheint hierbei den größten Einfluss auf das Ausmaß der Regulation durch die 6S RNA zu haben. Weiterhin spielt eine bereits erfolgte Bindung des spezifischen Promotors an die RNA-Polymerase eine Rolle bei der Wirkung durch die 6S RNA. Es muss deshalb in Betracht gezogen werden, dass 6S RNA und Promotor um die gleichen Bindestellen auf dem Enzym konkurrieren.

In den hier gezeigten Versuchen wurden maximal 250 nM 6S RNA eingesetzt. Bei dieser Konzentration erreicht die Inhibierung, besonders am *rrnB* P1-Promotor jedoch nicht ihr Maximum. Aus diesem Grund wurden weitere *in vitro* Transkriptionen mit höheren 6S RNA Mengen durchgeführt.

2.3.5.5 Bestimmung der maximalen und minimalen Wirkkonzentration der 6S RNA auf das exponentielle- und stationäre Phase-spezifische Transkriptionssystem

Die physiologisch wirksame Konzentration der 6S RNA für superhelikale Transkriptionen liegt zwischen 10 und 150 nM 6S RNA. Bei diesen Mengen beträgt die durch die 6S RNA vermittelte Inhibierung etwa 50%. Um zu ermitteln, bei welcher 6S RNA Konzentration die maximale Inhibierung der verschiedenen Transkriptionssysteme erreicht wird, wurden *in vitro* Transkriptionen mit großen 6S RNA Mengen durchgeführt. Ebenfalls wurden sehr geringe Mengen 6S RNA eingesetzt, um die minimale Wirkkonzentration der 6S RNA auf die Transkription zu testen. Die 6S RNA wurde hierzu nach der Rekonstitution zu der RNA-Polymerase gegeben und die Reaktion wurde durch Zugabe des Templates gestartet. Die 6S RNA wurde für diese Titrations in Konzentrationen von 0.1 nM bis 1500 nM eingesetzt. 1500 nM 6S RNA entsprechen einer Menge von 930 ng (10 μ l Ansatz). Die Menge der 6S RNA ist somit um das 500fache höher als die der RNA-Polymerase. Zum Vergleich: unter physiologischen Bedingungen sollen in der stationären Phase 10000 6S RNA Moleküle vorhanden sein. Bei etwa 3000 vorhandenen RNA-Polymerase entspricht dies einem etwa 3fachen Überschuss. Für den *bolA*-Promotor war bereits bei der Zugabe von 500 nM 6S RNA nur noch eine Restaktivität von 3% feststellbar. Bei der maximal eingesetzten Kon-

zentration von 1500 nM betrug die Restaktivität 1%. Unter Berücksichtigung eventueller Messfehler kann daher von einer vollständigen Inhibierung des *bolA*-Promotors ab einer Zugabe von etwa 500 nM 6S RNA in dem gemessenen System ausgegangen werden. Die Transkription vom *rrnB* P1-Promotor zeigte zu keiner Zeit eine vollständige Inhibierung. Die maximale Inhibierung erreichte ihr Plateau bei 1000 nM 6S RNA (14% Restaktivität). Die Restaktivität blieb danach konstant. Auch bei der Zugabe von 2000 nM 6S RNA veränderte sich die Restaktivität der Transkription vom *rrnB* P1 nicht. Bereits die Zugabe von 0.1 nM 6S RNA zeigte eine Wirkung auf die Transkription von *rrnB* P1 und *bolA* (Daten nicht gezeigt).

Aus diesen Transkriptionsanalysen können folgende Schlüsse gezogen werden: die 6S RNA beeinflusst sowohl die Transkription des exponentielle Phase- als auch des stationäre Phase-Systems bereits in sehr geringen Konzentrationen. Die Frage, ob eine 'Mindestkonzentration' 6S RNA notwendig ist, um eine differenzielle Regulation von *rrnB* P1 und *bolA* zu erreichen, kann an dieser Stelle nicht beantwortet werden. Weiterhin zeigen die Ergebnisse, dass die 6S RNA auch in hohen Konzentrationen die Transkription beeinflusst. Eine differenzierte Wirkung zeigt sich dabei sowohl auf den Verlauf der Inhibierung, als auch auf die maximale gesamte Inhibierung der verschiedenen Transkriptionssysteme. Beachtet werden muss hierbei jedoch, dass die hier eingesetzten hohen 6S RNA Konzentrationen in der Zelle nicht auftreten.

2.3.5.6 Einfluss der Salzkonzentration auf die *in vitro* Transkription mit 6S RNA

Salzkonzentration, Superhelikalität und verschiedene andere Faktoren wie z. B. Trehalose sollen die σ^{38} -spezifische Transkription beeinflussen (Ding, 1995; Kusano *et al.*, 1996). Hierbei zeigt das σ^{38} -spezifische Holoenzym generell eine höhere Salztoleranz als die σ^{70} -spezifische RNA-Polymerase. Frühere *in vitro* Transkriptionen mit superhelikalen Templates hatten gezeigt, dass die Salzempfindlichkeiten der Holoenzyme promotor-spezifisch sind bzw. von der Stabilität der Holoenzym/Promotor-Komplexe abhängen. Die Transkription am *bolA*-Promotor wird bei höheren Salzkonzentrationen durch eine Stabilisierung der Initiationskomplexe positiv beeinflusst. Bei dem *rrnB* P1-Promotor erfolgt eine Destabilisierung durch höhere Salzkonzentrationen (Reckendrees, 2004). Die Transkription des *bolA*-Promotors sollte unter den eingesetzten Bedingungen (160 mM Kaliumglutamat) aufgrund seiner höheren Salztoleranz durch die 6S RNA weniger stark als bisher beeinflusst werden. Für den *rrnB* P1-Promotor wird hingegen eine stärkere Inhibierung erwartet. Für die *in vitro* Transkriptionen mit superhelikalen Templates bei hohen Salzkonzentration wurde der bereits beschriebene Ansatz verwendet, als Puffer wurde jedoch 1x KGlu160 eingesetzt. Dieser Puffer enthält mit 160 mM Kaliumglutamat die doppelte Salzkonzentration wie der KGlu80.

Vergleicht man die Transkriptmengen der analogen *in vitro* Transkripten mit 80 (siehe auch 2.3.5.4) und 160 mM Kaliumglutamat miteinander, zeigt sich, dass die Erhöhung der Salzkonzentration den erwarteten Effekt hat. Die Transkription des *rrnB* P1-Promotors wird bei 160 mM Kaliumglutamat stärker durch die 6S RNA inhibiert. Die Restaktivitäten sind hierbei für alle gemessenen 6S RNA Konzentrationen geringer als mit 80 mM Kaliumglutamat. So ist die Restaktivität bei der Zugabe von 100 nM 6S RNA im KGlu160-Puffer um mehr als die Hälfte niedriger als bei der gleichen Menge 6S RNA mit 80 nM

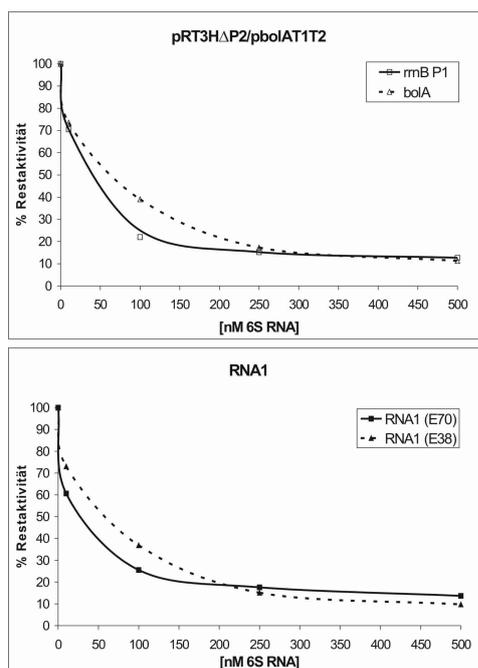


Abbildung 2.20: *In vitro* Transkriptionen mit hohen Salzkonzentrationen Quantitative Auswertung von vier unabhängigen *in vitro* Transkriptionen mit hohen Salzkonzentrationen (K₂Glu160) und 6S RNA. Die Tabelle F zeigt die zugehörigen Mittelwerte und Standardabweichungen.

Kaliumglutamat (22% RA mit K₂Glu160 zu 46% RA mit K₂Glu80). Gleichzeitig erreicht die Transkription am *rrnB* P1-Promotor mit höheren Salzkonzentrationen schneller die maximale Inhibition. Während bei Transkriptionen mit K₂Glu80-Puffer 1000 nM 6S RNA für eine maximale Inhibition des Systems zugegeben werden müssen, ist diese bei 160 mM Kaliumglutamat bereits bei der Zugabe von 250 nM 6S RNA erreicht. Auch hier wird, zumindest für die gemessenen Werte, keine komplette Inhibition des *rrnB* P1-Promotors erreicht. Auch die RNA1 als σ^{70} -spezifischer Promotor reagiert bei hohen Salzkonzentrationen empfindlicher auf die 6S RNA. Die Transkription am *bolA*-Promotor zeigt ebenfalls die erwartete Reaktion. Die erhöhte Salzkonzentration scheint den Komplex aus Polymerase und Promotor zu stabilisieren, was zu einer weniger starken Inhibition durch die 6S RNA führt. Vergleicht man die Transkriptmenge bei der Zugabe von 100 nM 6S RNA zu der Reaktion, ergibt sich eine um 18% höhere Restaktivität bei hohen Salzkonzentrationen. Die Transkription mit 160 mM Kaliumglutamat nimmt bei weiterer 6S RNA Zugabe zwar weiterhin ab, erreicht aber die mit K₂Glu80 gemessene maximale Inhibition bei 250-500 nM 6S RNA nicht. Bei diesen Konzentrationen beträgt die Restaktivität der *bolA*-Transkription noch 17 bzw. 11%. Zum Vergleich: wird K₂Glu80 als Puffer benutzt, beträgt die Restaktivität bei der Zugabe von 250 nM 6S RNA noch rund 12%, bei 500 nM 6S RNA nur noch 3%. Die RNA1 verhält sich bei der Transkription mit dem σ^{38} -spezifischen Holoenzym analog zur Transkription am *bolA*-Promotor. Auch hier hat die Erhöhung der Salzkonzentration einen stabilisierenden Effekt.

Hier zeigt sich, dass die 6S RNA, wie bereits vermutet, auf die RNA-Polymerase wirkt und eventuell mit dem Promotor um die Bindung an das RNAP-(Holo)Enzym kompetiert. Dieses lässt sich aus der erhöhten (*rrnB* P1) bzw. der erniedrigten (*bolA*) Inhibierung bei höheren Salzkonzentrationen (KGlu160) schließen. Eine Destabilisierung des Initiations-Komplexes, wie sie durch die erhöhte Salzkonzentration am *rrnB* P1 stattfindet, führt an diesem zu einer erleichterten Inhibierung durch die 6S RNA. Umgekehrt führt die Stabilisierung der RNAP/Promotor-Komplexe, wie am *bolA*, zu einer verminderten Inhibierung der Transkription durch die 6S RNA. Die differentielle Regulation bei erhöhten Salzkonzentrationen könnte weiterhin auf eine spezielle Wirkung der 6S RNA in der stationären Phase hindeuten. Die hier gemachten Beobachtungen schließen ebenfalls nicht aus, dass es sich bei der Regulation durch 6S RNA nicht um einen ubiquitären Regulationsfaktor handelt, sondern um einen Mechanismus, der nur in besonderen Situationen (z. B. osmotischem Stress) zum Tragen kommt.

2.3.5.7 *In vitro* Transkriptionen unter dem Einfluss anderer RNAs

Um eine spezifische Regulation durch die 6S RNA zu zeigen, wurden *in vitro* Transkriptionen auch mit anderen RNAs durchgeführt. Als RNAs wurden aufgrund ihrer Größe und ihrer Stabilität die 5S RNA und ein tRNA-Gemisch aus *E. coli* gewählt. Die 5S RNA bildet zudem eine Sekundärstruktur aus, die wie die der 6S RNA über stabile Helixbereiche verfügt, die durch Loopstrukturen unterbrochen sind. Ebenfalls getestet wurde die Auswirkung von PSTVd auf die *in vitro* Transkription. Bei PSTVd, dem ‘Potato Spindle Tuber Viroid’, handelt es sich um eine pathogene RNA, deren Replikation durch einen ‘rolling-circle’-Mechanismus erfolgt, katalysiert von der DNA-abhängigen RNA-Polymerase II des Wirts (Branch und Robertson, 1984). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass ein naher Verwandter dieses Viroids, das ‘Peach Latent Mosaic Viroid’ (PLMVd) als Matrize für die *E. coli* RNA-Polymerase dienen kann (Pelchat *et al.*, 2002). Die *in vitro* Transkriptionen wurden durchgeführt wie bereits beschrieben. Dabei wurde die jeweilige RNA (5S, tRNA oder PSTVd) mit der RNA-Polymerase nach der erfolgten Rekonstitution der Holoenzyme vorinkubiert und die Reaktion durch Zugabe des Templates gestartet. Die Abbildungen 2.21 und 2.23 zeigen *in vitro* Transkriptionen mit den exponentielle- und stationäre Phasespezifischen RNA-Polymerase Holoenzymen und Promotoren. Als Kontroll-RNA wurden hier zunächst 5S RNA und tRNA verwendet.

Die Autoradiogramme und Quantifizierungen zeigen, dass sowohl 5S RNA (Abbildung 2.21) als auch tRNA (Abbildung 2.23) die Transkription inhibieren. Die Inhibierung ist hierbei besonders bei der Zugabe von 5S RNA sehr stark. Die Transkription von beiden Promotoren wird bereits bei der Zugabe von 50 nM 5S RNA stark inhibiert (35% RA) und erreicht im Mittel nur noch 3% der Aktivität ohne 5S RNA. Die starke Inhibierung wird vermutlich durch verschiedene Faktoren bedingt. Zum einen spielt die Präparation der 5S RNA eine Rolle. Die 5S RNA wurde aus Ribosomen extrahiert und aufgereinigt. Es kann darum nicht ganz ausgeschlossen werden, dass sich geringe Anteile von 6S RNA in der Präparation befinden. Beide Fraktionen liegen aufgrund ihrer Sedimentationskonstanten sehr nah beisammen. Außerdem kann ein hoher Salzgehalt in der Präparation nicht ausgeschlossen werden. Ein anderer Grund für die starke Inhibierung kann eine direkte Wirkung der 5S RNA selber sein. Die Sekundärstruktur der 5S RNA (siehe Abbildung 2.22) könnte eine Bindung der RNA-Polymerase an die RNA ermöglichen. In der Tat konnte

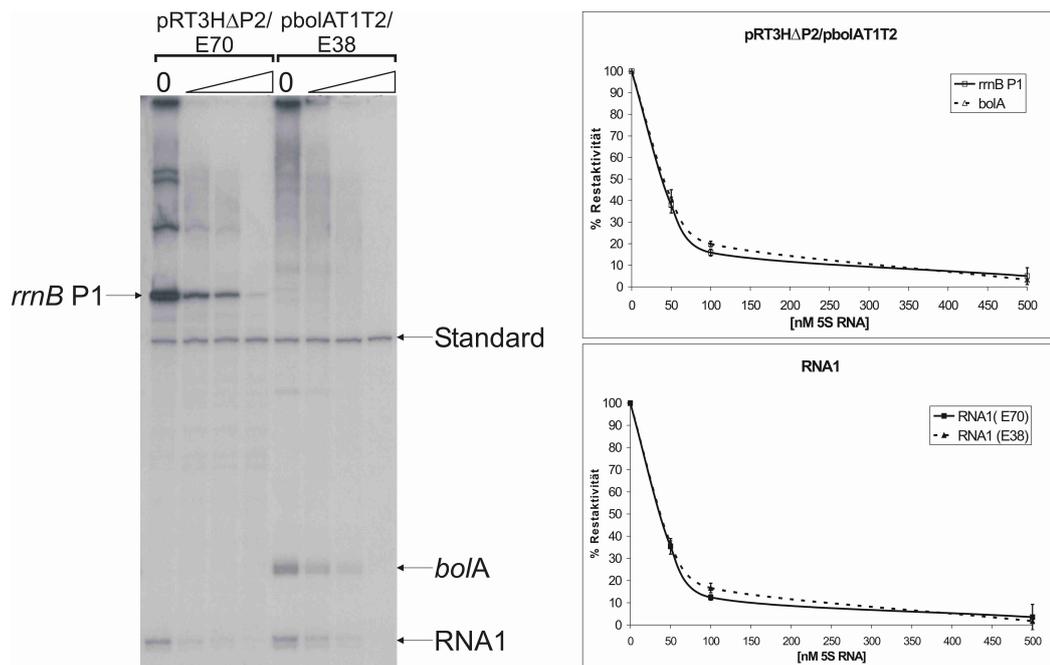


Abbildung 2.21: *In vitro* Transkription mit 5S RNA als Inhibitor. Die Transkripte und der Standard sind mit Pfeilen markiert. 5S RNA: 0, 50, 100, 500 nM. In der Quantifizierung sind die Mittelwerte und die Standardabweichung aus zwei unabhängigen Ansätzen angegeben. Die zugehörige Tabelle G befindet sich im Anhang.

in Retardierungsgelen ein schwacher, aber heparinstabiler Komplex der 5S RNA mit der RNA-Polymerase nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Dieser Komplex entstand mit beiden Holoenzymen, sowie in sehr geringer Menge mit dem Core-Enzym. Der Komplex lief schneller im Retardierungsgel als die Komplexe aus RNA-Polymerase und 6S RNA, so dass angenommen werden muss, dass es sich bei dem beobachteten Komplex tatsächlich um eine Bindung der 5S RNA an die RNA-Polymerase handelt (und nicht etwa um eine Retardierung von 6S RNA und RNA-Polymerase durch eventuelle 6S RNA-Verunreinigungen).

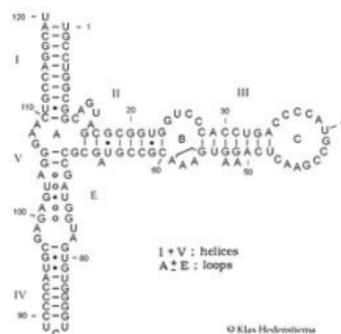


Abbildung 2.22: Eine mögliche Sekundärstruktur der 5S RNA aus *E. coli*. I-V= Helices, A-E= Loops.

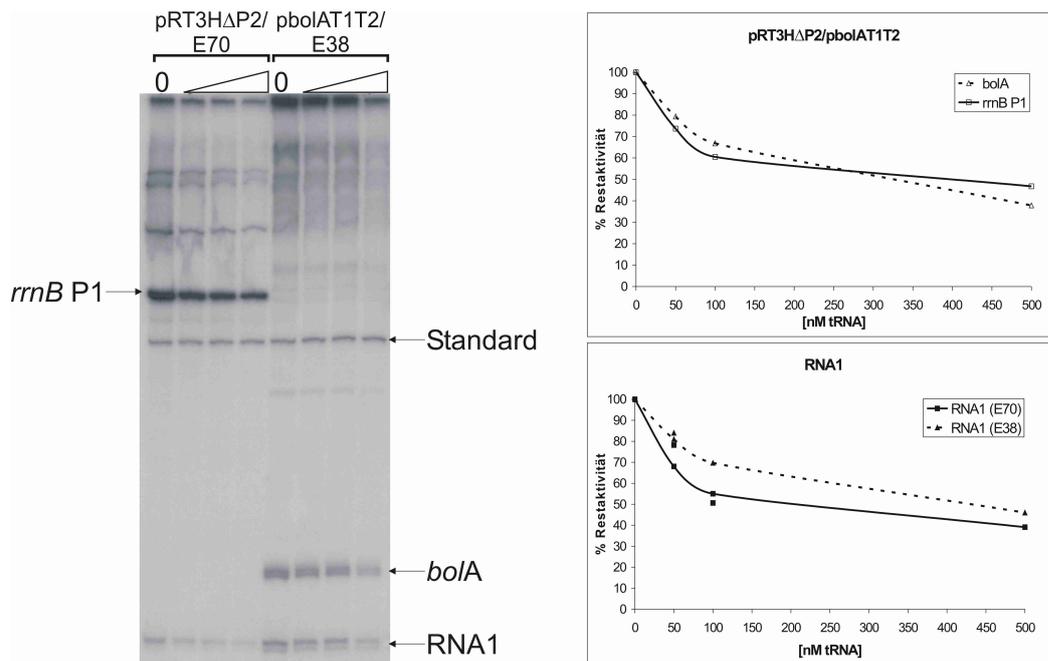


Abbildung 2.23: In vitro Transkription mit tRNA als Inhibitor. Die Transkripte und der Standard sind mit Pfeilen markiert. 5S RNA: 0, 50, 100, 500 nM. In der Quantifizierung sind die Mittelwerte und die Standardabweichung aus zwei unabhängigen Ansätzen angegeben. Die zugehörige Tabelle G befindet sich im Anhang.

Auch die Zugabe der tRNA inhibiert die Transkription von beiden Promotoren im homologen System (siehe Abbildung 2.23). Das Ausmaß der Inhibierung ist hier jedoch nicht so stark wie bei der Zugabe von 5S RNA. Beide Promotoren erreichen bei der Zugabe von 500 nM tRNA noch eine Restaktivität von etwa 40-50%. Diese Inhibierung kann ebenfalls durch Salzeffekte verursacht werden. Aufgrund der hohen Verdünnung der tRNA ist dieses aber unwahrscheinlich. Wahrscheinlicher ist, dass die Inhibierung durch eine präparationsbedingte Verunreinigung der tRNA herbeigeführt wird. Retardierungsanalysen mit 3'-endmarkierter tRNA zeigten die gleiche Komplexbande, die auch bei den Retardierungen mit 5S RNA auftrat (nicht gezeigt). Eine Verunreinigung durch 5S RNA-Anteile ist somit anzunehmen. Trotz der gezeigten Inhibierung durch 5S- und tRNA wird deutlich, dass es sich bei der Inhibierung durch die 6S RNA um einen spezifischen Effekt handelt. Anders als die 6S RNA verursachen beide Kontroll-RNAs eine Inhibierung, die nicht spezifisch für die unterschiedlichen Holoenzyme ist, sondern beide Systeme in gleichem Maße beeinflusst. Die Synthese eines 'de novo'-Transkripts ohne DNA-Template konnte, anders als bei der 6S RNA, nicht beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Ähnliches kann auch bei der Inhibierung durch PSTVd beobachtet werden. PSTVd inhibiert, wie in der Abbildung 2.24 zu sehen, die Transkription von beiden Promotoren stark. Schon bei der Zugabe von 50 nM PSTVd ist kaum noch Restaktivität zu erkennen. Bei einer weiteren Erhöhung der PSTVd-Konzentration wird die Transkription vollständig inhibiert. Die Inhibierung durch PSTVd kann nicht nur auf Salzeffekte zurückzuführen sein. Die Vermutung liegt nahe, dass es sich hierbei um eine direkte Inhibierung der RNA-

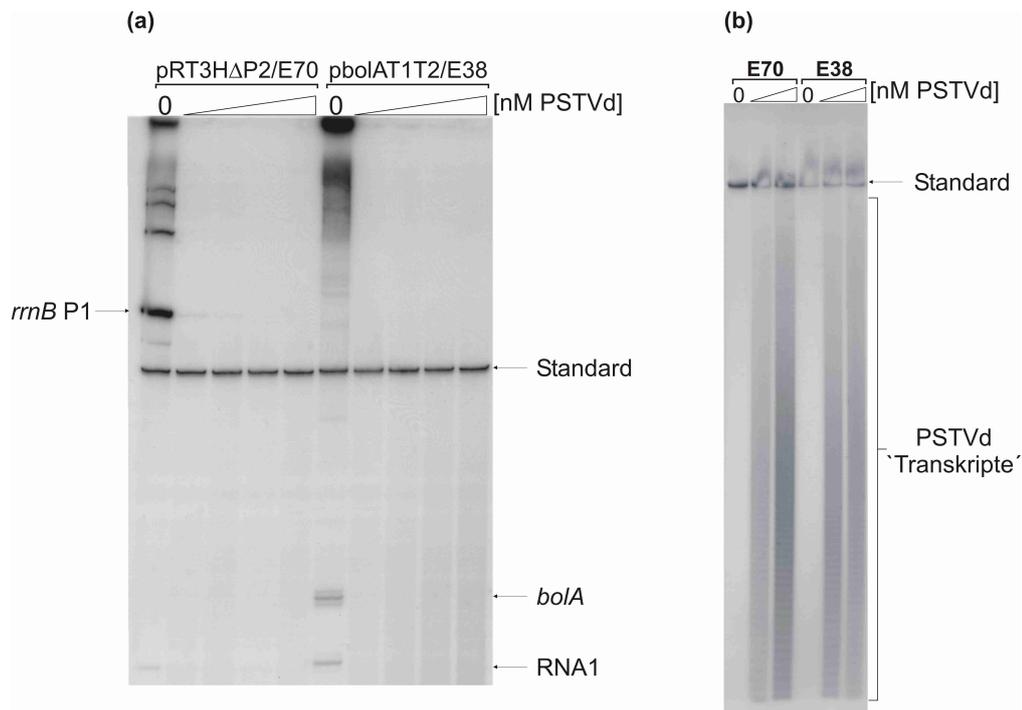


Abbildung 2.24: *In vitro* Transkription mit PSTVd als Inhibitor. (a) *In vitro* Transkription mit pRT3HΔP2 und pbolAT1T2. Die Transkripte und der Standard sind mit Pfeilen gekennzeichnet. PSTVd 0, 10, 50, 250, 500 nM. (b) *In vitro* Transkription mit PSTVd ohne DNA-Template. Der Standard und die abortiven Transkripte sind markiert. PSTVd 0, 50, 500 nM.

Polymerase handelt, besonders da die PSTVd-Zugabe, auch ohne DNA-Template, zu einer Transkription durch die RNA-Polymerase führt. Bei dieser Transkription werden jedoch keine Transkripte mit einer spezifischen Länge gebildet, sondern es kommt zu einem 'cycling', das unspezifische Transkripte verschiedener Länge generiert. Die Transkripte werden mit beiden Holoenzymen gebildet. Diese Beobachtung war nicht erwartet, ist aber aufgrund der bereits oben beschriebenen Eigenschaften nicht ungewöhnlich. PSTVd hat zudem eine der 6S RNA ähnliche Sekundärstruktur aus helikalen Bereichen, die durch verschiedenen große Loops unterbrochen sind. In Gelshift-Analysen konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von PSTVd zu RNA-Polymerase/Promotor-Komplexen die Komplexbildung inhibiert (Daten nicht gezeigt). Die Inhibierung zeigte jedoch kein so großes Ausmaß wie die Inhibierung der Transkription durch PSTVd oder die Inhibierung der Komplexbildung durch die 6S RNA. Da die Viroid-RNA im Fall der Retardierungsanalyse nach erfolgter Komplexbildung von DNA-Promotor und RNA-Polymerase zu dem Ansatz gegeben wurde, ist PSTVd, im Gegensatz zur 6S RNA, kein natürliches Substrat für eine Bindung an die bakterielle RNA-Polymerase.

2.3.6 Analyse des 'de novo'-Transkripts

Wie bereits beschrieben, fallen bei *in vitro* Transkriptionen mit linearen Template-Fragmenten bei der Zugabe der 6S RNA Menge zwei distinkte Banden auf. Diese Banden entstehen nicht, wenn sich keine 6S RNA im Ansatz befindet. Zusätzlich werden die Banden intensiver, wenn die Menge der zugegebenen 6S RNA erhöht wird (siehe Abbildung 2.25). Die Länge der Transkripte liegt nach Abschätzung etwa bei 200-210 Nukleotiden. Die Banden werden im Folgenden als 'de novo'-Transkript zusammengefasst.

2.3.6.1 Bestimmung der Spezifität des 'de novo'-Transkriptes

Um zu testen, ob das 'de novo'-Transkript tatsächlich spezifisch bei der Zugabe der 6S RNA auftritt, bzw. ob es sich um eine Reaktion der 6S RNA mit der bakteriellen RNA-Polymerase handelt, wurden *in vitro* Transkriptionen mit den verschiedenen Holoenzymen sowie dem Core-Enzym durchgeführt. Anders als in den bisherigen Transkriptionen wurde jedoch auf ein DNA-Template verzichtet. Die Abbildung 2.25 zeigt eine *in vitro* Transkription mit 6S RNA und dem E70/E38-Holoenzym sowie dem Core-Enzym. Wie zu erkennen ist, entsteht das 'de novo'-Transkript auch ohne die Zugabe von DNA-Template. Dabei wird die obere Bande der Doppelbande im Vergleich vermehrt gebildet. Ein Sigmafaktor ist für die Bildung des Transkriptes scheinbar nicht nötig: auch mit dem Core-Enzym entsteht 'de novo'-Transkript, wenn auch nicht in so großen Mengen wie mit den Holoenzymen. Eine Transkription nur mit dem Core-Enzym ist nicht verwunderlich, da in Retardierungsgelen eine (schwache) Bindung der 6S RNA an das Core-Enzym gezeigt werden konnte.

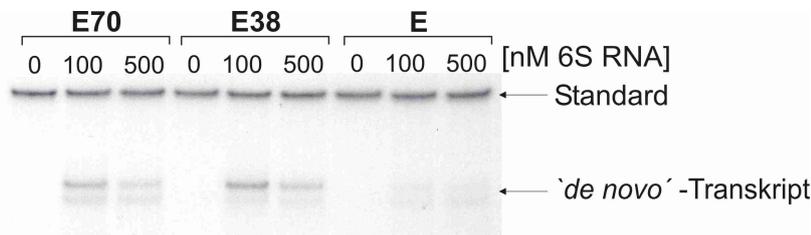


Abbildung 2.25: *In vitro* Transkription der 6S RNA mit der RNA-Polymerase. Die IVT zeigt, dass das 'de novo'-Transkript auch ohne DNA-Template in Anwesenheit aller vier Nukleotide gebildet wird.

Um auszuschließen, dass es sich bei dem 'de novo'-Transkript um ein Transkript handelt, das aus einer möglichen Verunreinigung der 6S RNA durch ein DNA-Template entsteht, wurde die präparierte 6S RNA mit RNase-freier DNase I behandelt. Die 6S RNA wurde vor der *in vitro* Reaktion 1 Stunde bei 37°C mit der DNase I inkubiert und aufgereinigt. Die anschließende *in vitro* Transkription mit den verschiedenen RNA-Polymerasen wurde durch diesen Schritt nicht beeinflusst. Auch die Zugabe von RNase-freier DNase I direkt in den Reaktionsansatz hatte keinen Einfluss auf die 'de novo'-Produkte (Daten nicht gezeigt). Es handelt sich bei dem 'de novo'-Transkript somit um ein 6S RNA spezifisches Produkt, das selbst eine Ribonukleinsäure ist.

2.3.6.2 2D-‘Fingerprint’-Analysen des ‘*de novo*’-Transkripts

Der 2D-‘Fingerprint’ ist eine Methode, mit welcher Unterschiede in der Sequenz zweier RNAs bestimmt werden können. Hierzu wurden mit $\alpha^{32}\text{P}$ -GTP markierte 6S RNA (‘Ribomax’, siehe 5.2.8.1) sowie ‘*de novo*’-Transkript (durch IVT mit *E. coli* RNA-Polymerase) hergestellt und so aufgereinigt, dass sich keine freien Nukleotide mehr im Ansatz befanden (siehe 5.2.8.8). Die RNAs wurden anschließend mit RNase T1 komplett hydrolysiert. Nach der Hydrolyse wurde ein Teil der Probe auf ein denaturierendes PAA-Gel aufgetragen. Der andere Teil der jeweiligen Probe wurde einer 2-dimensionalen Dünnschichtchromatographie unterzogen. Anhand der Stärke und Laufweite der Banden im Gel können Rückschlüsse auf die Menge und die Länge der gebildeten Oligonukleotide gezogen werden. Die Oligonukleotide entstehen bei der Hydrolyse der RNA mit RNase T1. RNase T1 schneidet spezifisch nur hinter Guanosin. Jedes erhaltene Oligonukleotid hat somit 3´-seitig ein -pG-OH, wobei das kleinste erhaltene Fragment ein Guanosin-Monophosphat darstellt. Aufgrund der bekannten Sequenz der 6S RNA ist aus dem erhaltenen Muster ersichtlich, ob es sich bei dem ‘*de novo*’-Transkript um die gleiche, eine *antisense*- oder eine alternative Sequenz handelt. Die 2-dimensionale Auftrennung der Oligonukleotide erlaubt darüber hinaus die Kontrolle der Nukleotidzusammensetzung, da die Auftrennung der Oligonukleotide über die Nettoladung der 3´-Nucleosidphosphate in Abhängigkeit des pH-Wertes erfolgt. Die Reihenfolge der Wanderungsgeschwindigkeit ergibt sich danach zu: Up > Gp > Ap > Cp (Sanger und Brownlee, 1967).

Die sequenzunabhängige Auftrennung des RNase T1-Verdaus (Abbildung 2.26 (a)) bestätigt die ermittelte Oligonukleotid-Zusammensetzung der 6S RNA (Vergleiche 2.3.6.3, linkes Panel mit Abbildung 2.26 (a)). Gleichzeitig zeigt sie aber auch, dass es sich bei dem ‘*de novo*’-Transkript nicht um ein 100%iges *antisense*-Transkript der 6S RNA handelt (siehe Abbildung 2.26 (a) und Tabelle 2.3, rechtes Panel). Einige erwartete Oligonukleotide, die entstehen müssten, würde es sich um ein *antisense*-Transkript der 6S RNA handeln, sind nicht vorhanden. Bei der RNase T1-Hydrolyse des ‘*de novo*’-Transkripts entstehen Fragmente mit mehr als 11 Nukleotiden, die nicht auftreten dürften, würde es sich um eine Antisense-RNA handeln. Interessanter Weise sind in dem ‘*de novo*’-Transkript auch kaum 3er- oder 4er-Oligonukleotide vorhanden (siehe Abbildung 2.26 (a)), was sehr ungewöhnlich ist. Ein Grund hierfür ist nicht ersichtlich. Durch diese Methode kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass es sich in Teilen um eine 6S RNA *antisense*-Sequenz handelt. Die RNA-Polymerase könnte zum Beispiel im zentralen Loop der 6S RNA starten und von dort aus transkribieren. Ein Transkript größer als 200 Nukleotide würde dann durch ein ‘umklappen’ der RNA-Polymerase am 3´-Ende der 6S RNA entstehen. Solche ‘Durchleseprodukte’ sind auch bei der Transkription mit Promotor-Fragmenten nicht ungewöhnlich. Da aber der Startpunkt der RNA-Polymerase nicht bekannt ist, kann die genaue Zusammensetzung solcher Oligonukleotide nur schwer vorhergesagt werden.

Auch bei der 6S RNA gibt es bezüglich der Oligonukleotid-Zusammensetzung Auffälligkeiten. Die 6S RNA hat lange Sequenzabschnitte (14 und 17 Nukleotide) ohne interne Guanosine, was sehr ungewöhnlich ist. Ob dieses eine biologische Relevanz hat oder Zufall ist, konnte nicht geklärt werden.

Die 2D-Dünnschichtchromatographie der Oligonukleotide ist aufgrund der starken Konzentrierung der größeren Oligonukleotide am Auftragungspunkt nur schwer zuzuordnen.

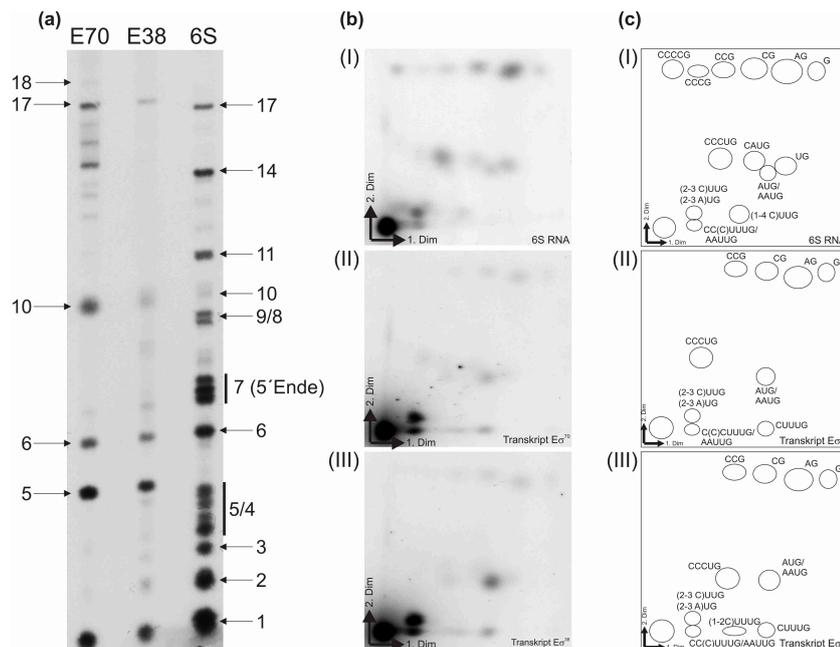


Abbildung 2.26: (2D)-'Fingerprint'-Analysen des '*de novo*'-Transkripts (a) zeigt die Auftragung auf ein denaturierendes Sequenzgel (20%). Die Längen der durch die RNase T1-Hydrolyse erhaltenen Oligonukleotide sind mit Pfeilen markiert. (b) 2-dimensionale Dünnschichtchromatographie der Oligonukleotide. (c) Darstellung der detektierten Spots und Zuordnung der wahrscheinlichen Oligonukleotidzusammensetzung (siehe auch Tabelle 2.3).

Aber auch hier zeigt sich der Unterschied der Oligonukleotid-Zusammensetzung zwischen 6S RNA und '*de novo*'-Transkript. Deutlich wird dies sowohl an dem Fehlen bestimmter Oligonukleotide sowie an zusätzlichen Spots, vergleicht man 6S RNA ((b) I) und die '*de novo*'-Transkripte ((b) II und III). Die durchgeführte Bestimmung der Oligonukleotid-Zusammensetzung ist unzureichend für eine Aussage bezüglich der Sequenz von 6S RNA und '*de novo*'-Transkript. Zum einen enthalten beide RNAs sehr große Fragmente, die in der Chromatographie nicht vollständig aufgetrennt werden. Zum anderen ist die Zuordnung der Sequenzen schwierig und nicht immer mit dem 'Standard' (siehe Sanger, 1967) vergleichbar.

2.3.6.3 Sequenz und Charakterisierung des '*de novo*'-Transkripts

Um die Sequenz des '*de novo*'-Transkripts zu entschlüsseln, wurden sowohl direkte als auch indirekte Sequenzierungsmethoden angewandt. Zur direkten Sequenzierung diente der Einbau von 3'-Deoxy-Nukleotiden (3'-dNTPs) in die naszierende RNA bei der Transkription mit der *E. coli* RNA-Polymerase, analog der DNA-Sequenzierung. Obwohl diese Methode bei der Sequenzierung des *rrnB* P1-Promotor Transkripts hervorragende Ergebnisse lieferte, konnte für das '*de novo*'-Transkript keine Sequenz bestimmt werden. Ebenso führte die Sequenzierung von intern markiertem '*de novo*'-Transkript zu keinem Ergebnis.

Tabelle 2.3: Oligonukleotide und *antisense*-Oligonukleotide, die bei einem Verdau der 6S RNA mit RNase T1 entstehen. Dargestellt sind die Länge und Sequenz der Oligonukleotide.

6S RNA Oligonukleotide		6S RNA <i>antisense</i> -Oligonukleotide	
GRÖSSE[NT]	SEQUENZ	GRÖSSE[NT]	SEQUENZ
1	G (x 16), -ppp, -OH	1	G (x 9)
2	AG (x 5) CG (x 5) UG(x 2)	2	AG (x 4) CG (x 3) UG (x 3)
3	AUG CCG UUG AAG ACG	3	AUG CCG (x 2) CAG CUG UCG (x 2) CAG ACG
4	UUCG CAAG CCAG AAUG CAUG CUCG UCCG (x 2) CCUG	4	CCUG (-ppp) AAUG CAUG UAUG CCCG CUUG ACCG
5	CUCCG	5	CUCAG
6	UUCAAG UUACAG	6	AAAUCC (-OH) UUCAAG
7	UCCCCUG AACCAAG CAUCUCG AUUCCAG	7	UUUUAAG CUUCUCG
		8	AAUCUCCG AAAUAUCG AACCCUUG
9	AUUUCUCUG	9	UAACCCUUG
		10	AACAUCUCAG
11	CCUUAACUG	11	CCACAUUCUUG CUCACCAACCG
14	ACACAUUCACCUUG		
17	AUAUUUCAUACCACAAG		

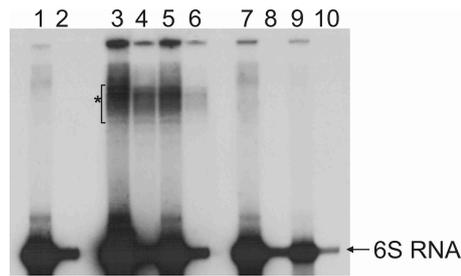


Abbildung 2.27: Verlängerung des ‘de novo’-Transkripts. 5′- und 3′-markierte 6S RNA wurde mit radioaktivem Nucleotiden (3-6) und NTPs (7-10) in *in vitro* Transkriptionen eingesetzt. Würde es sich bei dem ‘de novo’-Transkript um eine verlängerte 6S RNA handeln, würde auch bei der Zugabe von nicht radioaktiven Nucleotiden eine ‘de novo’-Transkriptbande (‘*’) auftreten. 1 und 2: Kontrolle ohne Nucleotid-Zugabe. (1, 3, 5, 7, 9: 5′-markierte 6S RNA. 2, 4, 6, 8, 10: 3′-markierte 6S RNA. 3, 4, 7, 9: 15 min Elongation, 1, 2, 5, 6, 9, 10: 30 min Elongation).

Auch die versuchte indirekte Sequenzierung über Primer-Extension-Analysen mit Random-Primern (Hexamere) zeigte lediglich die Sequenz der 6S RNA. Verschiedene an die 6S RNA bindende- sowie 6S RNA *antisense*-Sonden konnten ebenfalls nicht an das ‘de novo’-Transkript hybridisiert werden (Daten nicht gezeigt). Auch weitere Eigenschaften des ‘de novo’-Transkriptes sind bislang ungeklärt. Es ist möglich, ‘de novo’-Transkript in größeren Mengen *in vitro* herzustellen. Das Transkript ist jedoch nicht auf denaturierenden Polyacrylamid-Gelen anfärbbar, was ein Problem bei der Aufreinigung darstellte. Auf nativen Gelen war es jedoch mit allen angewandten Färbemethoden nachweisbar. Ebenso wenig ist eine Endmarkierung des Transkriptes am 3′- oder am 5′-Ende möglich. Bei dem ‘de novo’-Transkript handelt es sich nicht um eine Verlängerung der 6S RNA. Wie die Abbildung 2.27 zeigt, führt die *in vitro* Transkription mit zuvor radioaktiv markierter 6S RNA als Template nicht zu einem Shift der Bande im Gel, was jedoch bei einer Verlängerung passieren sollte.

Die Vermutung, dass es sich bei dem ‘de novo’-Transkript um ein zirkuläres Molekül handeln könnte, wurde durch Temperaturgradienten-Gelelektrophorese (TGGE) überprüft (Abbildung 2.28). Hierzu wurde aufgereinigtes ‘de novo’-Transkript auf eine TGGE aufgetragen und bei einem Gradienten von 25-65°C elektrophoretisiert. Als Kontrolle wurde zirkuläres PSTVd in die kleinen Taschen am Rand des Gels aufgetragen. Die unsaubere Aufreinigung des ‘de novo’-Transkriptes stellte auch bei der TGGE ein Problem dar: Aufgrund von Anteilen kürzerer (Abbruch-) Transkripte in der Präparation ist die Zuordnung der Banden problematisch.

Ein Teil der Moleküle zeigen in der TGGE ein ähnliches Verhalten wie die 6S RNA (siehe Kapitel 1.5, Abbildung 1.4). Der Schmelzpunkt (T_m) liegt dabei mit etwa 47°C nur wenig höher als der der 6S RNA (45°C). Der Verlauf der Bande (1) mit einer Unterbrechung im Schmelzpunkt (gekennzeichnet durch die Pfeilspitze) weist auf ein Molekül mit stabilen helikalen Bereichen, unterbrochen von einem oder mehreren Loops hin, die bei einer bestimmten Temperatur irreversibel denaturieren (siehe auch: Gildehaus, 2001). Obwohl das Transkript vor dem Auftragen auf das Gel einem Denaturierungs/-Renaturierungsschritt unterzogen wurde, um es in eine einheitliche Struktur zu überführen, bildet es neben der Struktur (1) noch eine weitere Struktur (2) aus. Bei dieser Struktur könnte es sich, nach

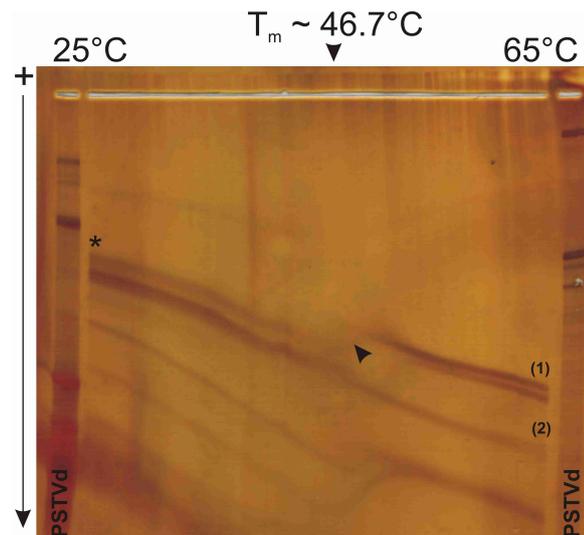


Abbildung 2.28: TGGE des ‘*de novo*’-Transkripts. Die Pfeilspitze zeigt den Schmelzpunkt der Doppelbande (etwa 47°C).

dem Verlauf im Gel zu urteilen, um eine rein helikale Sekundärstruktur handeln.

Eine solche stabile Struktur würde erst bei höheren Temperaturen denaturieren. Bei den zwei im ‘*de novo*’-Transkript beobachteten Banden könnte es sich somit um zwei strukturell (und funktionell) verschiedene Moleküle handeln. Interessanter Weise ähnelt eine Bande (1) im Laufverhalten und im Schmelzpunkt der 6S RNA, was auf eine der 6S RNA ähnliche Sequenz hindeutet. Der ‘Sprung’ des ‘*de novo*’-Transkripts zeigt jedoch eine geringere Verzögerung als die 6S RNA (siehe Kapitel 1.5, Abb. 1.5), was auf eine in sich geschlossenere Struktur hindeutet. In Northern Blot-Analysen konnten jedoch weder radioaktiv markierte 6S RNA noch 6S RNA spezifische Oligonukleotide gegen das ‘*de novo*’-Transkript hybridisiert werden. Im Gel sind noch weitere kürzere und eine längere Bande zu erkennen. Ob es sich hierbei um verkürzte Transkripte handelt, die in der Transkription selbst generiert werden, oder um einen präparationsbedingten Abbau der RNA, kann nicht geklärt werden. Die Herkunft des längeren Transkriptes (*) ist ebenfalls unbekannt, eventuell handelt es sich hierbei um eine strukturbedingte Verzögerung im Gel. Die TGGE lässt nicht erkennen, ob es sich bei dem ‘*de novo*’-Transkript um ein zirkuläres Molekül handelt. Bei hohen Temperaturen ist bei einem zirkulären Molekül eine größere Verzögerung im Gel zu erwarten, wie PSTVd sie zeigt. Die Denaturierung der helikalen Struktur von PSTVd zum Zirkel erfolgt jedoch wegen der vielen internen Loops des Viroids relativ einfach. Eine extrem stabile, rein helikale Struktur könnte eventuell mit den hier untersuchten Temperaturen noch nicht zu öffnen sein.

Das ‘*de novo*’-Transkript wurde bislang nur *in vitro* beobachtet. Um zu untersuchen, ob es auch *in vivo* produziert wird, wurden Northern Blot-Analysen mit Gesamt-RNA durchgeführt. Als Sonde wurde intern radioaktiv markiertes ‘*de novo*’-Transkript gewählt. Das ‘*de novo*’-Transkript ließ sich jedoch in den Northern Blots nicht nachweisen. Trotzdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass das ‘*de novo*’-Transkript *in vivo* gebildet wird, und es sich lediglich aufgrund einer zu niedrigen Nachweisgrenze mit dieser Methode nicht

detektieren ließ (Daten nicht gezeigt). Auch ist es unklar, ob intern markiertes ‘*de novo*’-Transkript generell als Sonde genutzt werden kann. Zusammenfassend lässt sich über das ‘*de novo*’-Transkript somit aussagen:

- Bei dem ‘*de novo*’-Transkript handelt es sich um ein RNA-Transkript, das von der bakteriellen RNA-Polymerase synthetisiert wird. Als Template dient die 6S RNA. Generiert werden zwei distinkte Produkte mit einer Länge von etwa 200 und 210 Nukleotiden.
- Das ‘*de novo*’-Transkript lässt sich weder am 3′- noch am 5′-Ende radioaktiv markieren, was auf eine sehr stabile Struktur schließen lässt. Ebenso wenig ist es möglich, das Transkript in denaturierenden Polyacrylamid-Gelen anzufärben. Auch dieses deutet auf eine sehr stabile Sekundär- und/oder Tertiärstruktur hin. Ob es sich bei dieser Struktur um einen Zirkel handelt, konnte nicht bestimmt werden.
- Bei dem ‘*de novo*’-Transkript handelt es sich nicht um eine (100%ige) *antisense*-6S RNA. Ebenso entsteht es wahrscheinlich nicht durch eine Verlängerung der 6S RNA.
- Es handelt sich bei dem Transkript nicht nur um ein Poly-A, -C, -G oder -U-Molekül, sondern alle Nukleotide sind vertreten. Dieses lässt sich daraus ableiten, dass sich das ‘*de novo*’-Transkript mit allen vier α -Nukleotiden radioaktiv markieren lässt (nicht gezeigt). Es ist jedoch möglich, dass bestimmte Bereiche des Transkriptes identisch sind und unterschiedlich oft wiederholt werden.
- Ob das ‘*de novo*’-Transkript auch *in vivo* auftritt, kann weder bejaht noch ausgeschlossen werden.
- Bei dem ‘*de novo*’-Transkript handelt es sich um ein in *E. coli* bislang noch nicht beschriebenes Phänomen. Obwohl es *in vitro* hergestellt werden konnte, ist es nicht gelungen, die Sequenz zu bestimmen. Probleme bei der Sequenzierung liegen in der wahrscheinlich sehr stabilen, eventuell zirkulären Struktur des Moleküls begründet.

2.4 Regulation der *ssrS*-Expression

2.4.1 Problemstellung und experimenteller Ansatz

In dem folgenden Teil dieser Arbeit sollte die Regulation des für die 6S RNA kodierenden Gens (*ssrS*) untersucht werden. Die *E. coli* 6S RNA wird als Teil eines dicistronischen Leseraster exprimiert, zusammen mit dem 5′-liegenden Gen *ygfA*, dessen Funktion zur Zeit noch nicht bekannt ist. Die 6S RNA wird von zwei verschiedenen Vorläufer-Molekülen prozessiert. Diese Vorläufer werden von zwei verschiedenen Promotoren transkribiert: dem distalen P2- und proximalen P1-Promotor (Lee und Kim, 2004). Der distale Promotor ist σ^{38} abhängig, kann jedoch auch vom σ^{70} -spezifischen Holoenzym transkribiert werden. Der proximale Promotor, der schon 1985 zum ersten Mal beschrieben wurde (Hsu, 1985), wird nach Kim und Lee *in vivo* sowie *in vitro* nur vom σ^{70} -Holoenzym der RNA-Polymerase transkribiert (siehe auch Abbildung 2.29).

Die Menge der 6S RNA akkumuliert während des Wachstumszyklus und ist in der stationären Wachstumsphase am höchsten. Zudem inhibiert die 6S RNA die Nutzung σ^{70} -abhängiger Promotoren in der stationären Phase durch Interaktion mit E70. Eine wichtige



Abbildung 2.29: Schematische Anordnung der *ssrS*-Promotoren P1 und P2. Das Schema zeigt die Lokalisation der Promotoren *ssrS* P1 und *ssrS* P2 auf der *ssrS*-Transkriptionseinheit (verändert nach Kim und Lee, 2004).

Frage ist deshalb, wie die *ssrS*-Transkription während des Wachstumszyklus reguliert wird. Kim und Lee haben die Hypothese aufgestellt, dass die σ^{70} -spezifische RNA-Polymerase in der exponentiellen Phase 6S RNA von beiden Promotoren P1 und P2 transkribiert. Diese Transkription wird gestoppt, wenn die Zellen in die stationäre Phase übergehen. E38 übernimmt dann die Transkription des *ssrS*-Gens vom P2-Promotor. Nach Wassarman und Storz inhibiert die 6S RNA die Transkription besonders von solchen σ^{70} -Promotoren, die eine 'extended' -10 Region haben. Der P1-Promotor des *ssrS*-Gens weist eine solche extended -10 Region auf, P2 jedoch nicht. Die Transkription von P1 aus könnte also durch die Akkumulierung von 6S RNA über ein bestimmtes Level hinaus in der stationären Phase gestoppt werden. Wenn dieses der Fall wäre, würde das eine Feedback-Inhibierung der Genexpression bedeuten (Kim und Lee, 2004). Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde ein *in vitro* Transkriptionssystem generiert, welches die Analyse beider Promotoren in einem System, und somit die Untersuchung der kompletten *ssrS*-Transkriptionseinheit erlaubt. Mit diesem System konnte weiterhin der Einfluss der 6S RNA und von Transkriptionsfaktoren auf die Transkription des *ssrS*-Gens untersucht werden. Verschiedene Regulatorproteine beeinflussen die Transkription der 6S RNA. In *in vivo* Analysen konnte gezeigt werden, dass ein Fehlen der Transkriptionsfaktoren FIS, H-NS, LRP und StpA die Menge der 6S RNA beeinflusst (Neusser, unpubliziert). Um den Einfluss dieser Transkriptionsfaktoren auf die Regulation des *ssrS*-Gens zu analysieren, wurden *in vitro*-Bindestudien mit verschiedenen Promotor-Fragmenten des *ssrS*-Gens durchgeführt.

2.4.2 Bindungsanalysen der Transkriptionsfaktoren H-NS, FIS, LRP und StpA mit *ssrS*-Promotorfragmenten

Zellen, die defizient für die Transkriptionsfaktoren H-NS, FIS, LRP und StpA sind, zeigen *in vivo* einen Einfluss auf die Menge der 6S RNA (Neusser, unpubliziert). Um die *in vitro*-Bindung der verschiedenen Transkriptionsfaktoren an das *ssrS*-Gen zu untersuchen, wurden Retardierungsanalysen mit verschiedenen Promotorfragmenten durchgeführt. Hierzu wurden zwei verschiedene Promotorfragmente des *ssrS*-Gens aus pUC18-6S generiert. Das Fragment '*ssrS*-Fragment1' enthält 254 Basenpaare des *ssrS*-'upstream'-Bereichs, den vollständigen 6S RNA Kodierungsbereich sowie 3'-seitig sieben Basenpaare des Vektors. Mit diesem Fragment lässt sich somit die Bindung an den postulierten P1-Promotor nachweisen. Die Sequenz des P2 ist auf diesem Fragment nicht enthalten. Die eventuelle Bindung von Transkriptionsfaktoren an den P2-Promotor kann jedoch mit dem '*ssrS*-Fragment2' überprüft werden. Dieses umfasst den Bereich von Position -410 bis +84 relativ zum Transkriptionsstart der 6S RNA. Beide Fragmente sind so konstruiert, dass sie an ihrem 3'-Ende radioaktiv markiert werden können (5.2.7.5). Für die Bindestudien wurden 2 nM des jeweiligen Fragments mit verschiedenen Protein-Konzentrationen wie beschrieben inkubiert

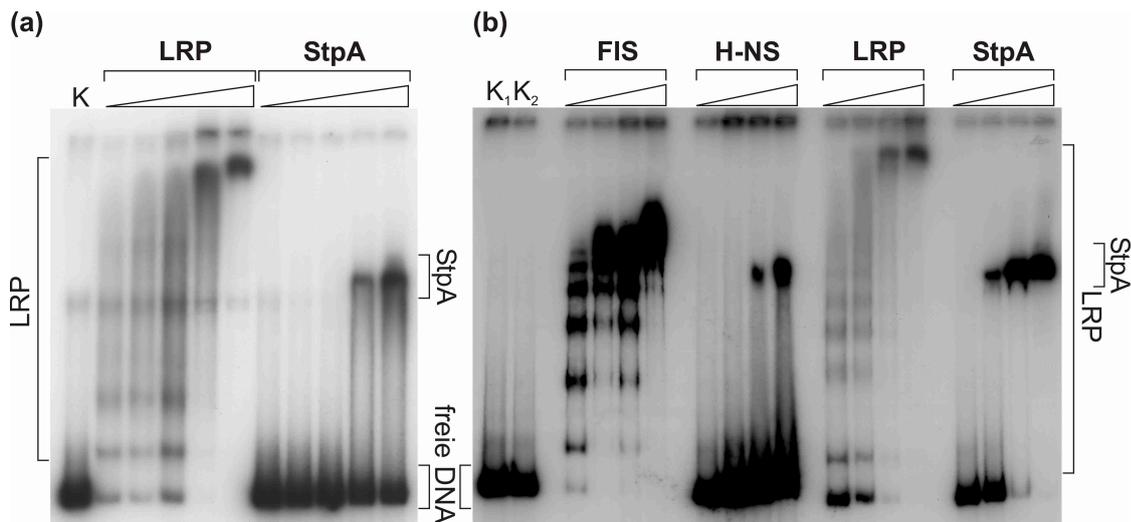


Abbildung 2.30: Retardierungsanalysen der *ssrS*-Fragmente mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren. Die Klammern markieren die mit dem jeweiligen Fragment gebildeten Protein-DNA-Komplexe. (a) *ssrS*-Fragment1 mit LRP: 0.1, 1, 2, 4, 6 μM , StpA: 0.5, 1, 2, 4, 6 μM . K = *ssrS*-Fragment1 mit 300 mM TGED (ohne Protein). (b) *ssrS*-Fragment2 mit LRP: 0.1, 1, 2, 4 μM , StpA: 0.5, 1, 2, 4 μM . K₁ = *ssrS*-Fragment mit 100 mM TGED (ohne Protein), K₂ wie K₁ mit 300 mM TGED (FIS: 0.5, 1, 2, 3 μM , H-NS: 0.5, 1, 2, 3 μM). Heparin: 50 ng/ μl Ansatz.

(siehe 5.2.8.10). Als Kompetitor zum Abfangen unspezifischer Bindungen wurde Heparin (50 ng/ μl) verwendet. In den folgenden Abbildungen sind teilweise die Retardierungsanalysen aller untersuchten Proteine gezeigt. Näher eingegangen werden soll hier jedoch nur auf die Proteine StpA und LRP.

Die Retardierungsanalysen (Abbildung 2.30) zeigen, dass alle untersuchten Transkriptionsfaktoren an die *ssrS*-Fragmente binden. Während FIS und LRP multiple Komplexe formen, binden H-NS und StpA mit hoher Kooperativität und formen so einen einzigen Komplex mit hohem Molekulargewicht. Die Bindung von StpA (und H-NS) an das kürzere Fragment, das nur den P1 enthält, zeigt hierbei keinen Unterschied zu der Bindung an das Fragment, das beide Promotoren enthält (Vergleiche (a) und (b)). Dieses deutet darauf hin, dass es zu einer Bindung an den Bereich des *ssrS*-Gens kommt, der auf beiden Fragmenten enthalten ist. Die Kooperativität von StpA ist bei dem *ssrS*-Fragment2 noch höher als bei dem kürzeren *ssrS*-Fragment1, daran zu erkennen, dass die freie DNA bei *ssrS*-2 komplett komplexiert wird. Eine Involvierung des *ssrS* P2-Promotors oder von weiter 5' vom P1-Promotor entfernt liegenden Sequenzabschnitten ist darum wahrscheinlich. Ähnliches lässt sich auch für LRP (und FIS) sagen: diese Proteine binden selektiv an bestimmte Bereich des *ssrS*-Gens (für FIS konnten sieben Bindestellen identifiziert werden, siehe Abbildung 3.2). Bindestellen für LRP liegen sowohl im Bereich des *ssrS* P1, des *ssrS* P2 und des 6S RNA-Kodierungsbereiches. Die Abbildung 2.30 zeigt, dass sich im Bereich des *ssrS* P2 mindestens zwei zusätzliche Bindestellen befinden (zusätzlich zu denen am P1). Der Transkriptionsfaktor FIS verhält sich ähnlich (Neusser, unpubliziert). Die Affinität der verschiedenen Proteine zu der DNA ist sehr unterschiedlich. Während LRP und FIS schon im mikromolaren Bereich eine Bindung zeigen, sind für StpA und H-NS wesentlich höhere

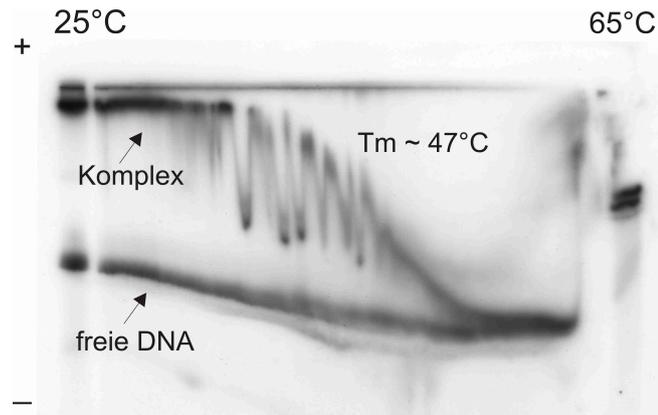


Abbildung 2.31: TGGE des *ssrS*-Fragment2 mit StpA. Der Komplex und die freie DNA sind mit Pfeilen markiert. Der Komplex dissoziiert bei etwa 47°C.

Konzentrationen nötig, um eine Bindung zu erzielen.

In TGGE Analysen zeigt das freie *ssrS*-Fragment2 kaum temperaturabhängige Veränderungen, konsistent mit dem sehr niedrigen Krümmungs- (k) Faktor (siehe Abbildung 3.3). Bei einer Temperatur von über 65°C schmilzt der Doppelstrang jedoch in seine Einzelstränge auf. Die einzelnen Proteinkomplexe verhalten sich in der TGGE sehr unterschiedlich. Während der H-NS Komplex bereits bei 20°C zerfällt (Neusser, unpubliziert), ist der Komplex mit StpA bis zu einer Temperatur von etwa 47°C stabil (siehe Abbildung 2.31). Die Komplexe aus FIS- und LRP sind hingegen stabil und zeigen keine Dissoziation (Neusser, unpubliziert).

2.4.3 Analyse der *ssrS*-Expression durch *in vitro*-Transkriptionen

2.4.3.1 Generation eines Expressionssystems für die *in vitro*-Analyse von *ssrS*

Bislang wurden der P1- und P2-Promotor des *ssrS*-Gens nur unabhängig voneinander untersucht. Um die native Transkriptionseinheit im *in vitro*-System analysieren zu können, wurde ein superhelikales Template konstruiert, welches beide Promotoren sowie den 6S RNA Kodierungsbereich enthält. Für die Klonierung wurde ein Fragment ('6SInsertLong', durch *EcoRI*/*HincII* Restriktion aus pUC18-6S gewählt, welches neben dem kompletten 6S RNA-Leseraster noch 405 Basenpaare 'upstream' vom Transkriptionsstart der 6S RNA enthält. Zusätzlich enthielt das Fragment zur gerichteten Klonierung plasmidär kodiert noch 78 Basenpaare 5'-seitig vom *ssrS*-Genbereich sowie 20 Basenpaare 3'- vom 6S RNA-Kodierungsbereich. Das aufgereinigte Insert wurde in die *EcoRI*/*Ecl136II*- Schnittstelle der MCS des Vektors pCP1 eingefügt. pCP1 trägt den starken Doppelterminator T1T2 des ribosomalen *rrnB* P1-Promotors sowie das komplette RNA1-Gen, dessen Transkript als interner Standard genutzt werden kann. Der generierte Vektor wird im Folgenden als 'p6S-T' bezeichnet. Bei der Präparation des Vektors war darauf zu achten, dass das Template in superspiralierter Form vorlag. Der Anteil an superhelikalem Plasmid wurde über Agarose-Gelelektrophorese bestimmt und lag bei etwa 90%.

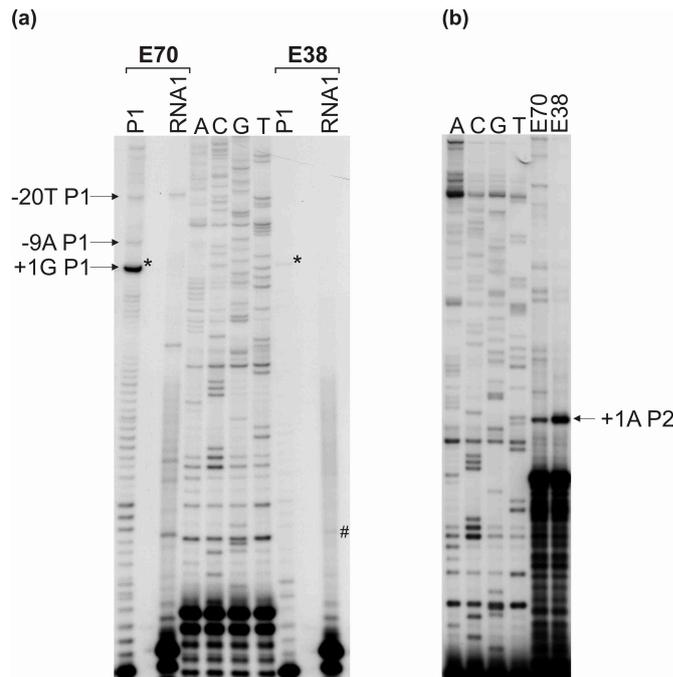


Abbildung 2.32: Primer-Extension-Reaktion zur Startstellenbestimmung am *ssrS* P1- und P2-Promotor. (a): Primer-Extension-Analyse zur Startstellenbestimmung für P1 (*) und RNA1(#) mit den Holoenzymen E70 und E38. Als Primer für die P1-Produkte diene das Oligonukleotid '6S-Oligo1', für RNA1-Produkte das Oligonukleotid '#RNA1'. Zur Längenzuordnung wurde eine Primer-Extension-Sequenzierung der 6S RNA mit dem Oligonukleotid 'Oligo6S-B' durchgeführt. Transkriptionsstarts sind mit Pfeilen gekennzeichnet. (b): Primer-Extension-Analyse zur Startstellenbestimmung für P2 mit den Holoenzymen E70 und E38. Als Sonde diene das Oligonukleotid '6S-Oligo5'. Zur Längenzuordnung diene eine Primer-Extension-Sequenzierung der 6S RNA mit dem Oligonukleotid 'Oligo6S-B'. Der Transkriptionsstart ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

2.4.3.2 Bestimmung der Transkriptionsstartpunkte

Zur Bestimmung der Transkriptionsstartstellen von P1 und P2 sowie der RNA1 wurden Primer-Extension-Analysen (siehe 5.2.8.3) der Transkriptionsprodukte von p6S-T durchgeführt. Eine genaue Bestimmung der Startstellen von *ssrS* P1 und P2 ist wichtig, um festzustellen, ob die Transkription auch im *in vitro*-System an den beschriebenen Positionen startet. Mit der Startstellenbestimmung kann weiterhin bereits überprüft werden, ob eine Transkription auch im heterologen Transkriptionssystem erfolgt. Für die Startstellenbestimmung wurden zunächst *in vitro*-Transkriptionen mit superhelikalem Template und verschiedenen RNA-Polymerase Holoenzymen im großen Maßstab wie unter (5.2.8.9) beschrieben durchgeführt. Die aufgereinigten Transkripte wurden anschließend mit spezifischen Oligonukleotiden hybridisiert und über Primer-Extension analysiert.

Die Abbildung 2.32 zeigt die Startstellenbestimmung für die Promotoren P1 und P2 des *ssrS*-Gens sowie die RNA1. Alle Promotoren starten an den erwarteten Positionen, wobei für den *ssrS* P1-Promotor zwei weitere schwache Starts an den Positionen -9 und -20 erkennbar sind. Diesen Startstellen konnte jedoch in den *in vitro* Transkriptionsanalysen

kein Transkript zugeordnet werden. Da diese Banden im Vergleich zu dem Start an Position +1 sehr schwach sind, wurden sie im weiteren nicht berücksichtigt. Das Hauptprodukt des P1 hat eine Länge von 291 Nukleotiden. Auch für den P2 Promotor konnten neben dem Haupttranskript (507 Nt) weitere Nebenprodukte in der Primer-Extension identifiziert werden. Da jedoch auch hier keine weiteren Produkte in den Transkriptionsanalysen auftraten, wurden auch diese nicht weiter berücksichtigt.

Bereits in den Primer-Extension-Analysen zeigt sich, dass die Transkription auch mit dem jeweils heterologen System stattfindet, wenn auch nicht in einem so großen Ausmaß wie bei der homologen Reaktion. Anders als von Kim und Lee (2004) beschrieben, ist somit der P1 Promotor (*in vitro*) nicht exklusiv σ^{70} -abhängig, sondern kann auch vom σ^{38} -Holoenzym transkribiert werden.

2.4.3.3 Optimierung der RNA-Polymerase- und Templatemengen

Um eine optimale Produktausbeute zu erhalten, wurde im Vergleich zu den bisher beschriebenen *in vitro* Transkriptionsexperimenten die Menge des Sigmafaktors σ^{38} auf ein Verhältnis von 1:500 angehoben. Das Verhältnis von Core-Enzym zu σ^{70} wurde mit 1:15 beibehalten. Reaktionsablauf, Inkubationszeiten und Konzentrationen der Komponenten wurden von den unter 2.3.5.4 beschriebenen *in vitro* Transkriptionen übernommen. Generell ist die Produktausbeute des P2-Promotors geringer als die des P1-Promotors. In *in vitro* Transkriptionen ohne Zugabe von 6S RNA war deutlich die Spezifität der Promotoren *ssrS* P1 und *ssrS* P2 zu erkennen (siehe z. B. Abbildung 2.33). Der *ssrS* P1 zeigt seine Hauptaktivität bei der Transkription mit E70, wohingegen P2 hauptsächlich von E38-transkribiert wird. Beide Promotoren zeigen eine Kreuzerkennung, die jedoch in beiden Fällen nur etwa 1/10 der Aktivität des Hauptproduktes erreichte (Daten nicht gezeigt).

2.4.4 Der Effekt der 6S RNA auf die Transkription des *ssrS*-Gens

Lee und Kim haben die These aufgestellt, dass die Transkription vom *ssrS*-P1 Promotor zu Beginn der stationären Phase durch eine Akkumulierung von 6S RNA inhibiert wird und die Transkription auf den σ^{38} -abhängigen P2 umgelenkt wird. Somit stellt sich nicht nur die Frage, wie die 6S RNA die Transkription der einzelnen Promotoren im homologen und heterologen System beeinflusst, sondern auch, ob eine differentielle Regulation der Promotoren stattfindet.

2.4.4.1 Der Einfluss der 6S RNA auf die Regulation der *ssrS*-Promotoren

Um den Einfluss der 6S RNA auf die Regulation zu untersuchen, wurden *in vitro* Transkriptionen mit dem jeweiligem Holoenzym durchgeführt. Hierbei wurden die oben angegebenen Bedingungen gewählt. 6S RNA wurde in Konzentrationen von 50-500 nM zu der Reaktion gegeben. Die 6S RNA wurde zu den rekonstituierten Holoenzymen gegeben, wobei nach der Zugabe RNA-Polymerase und 6S RNA zunächst 5 min bei 30°C vor Zugabe des Templates vorinkubiert wurden. Die Reaktion wurde 8 min bei 30 °C inkubiert. Um angefangene Transkripte zu beenden und gleichzeitig eine Neuintiationen der RNA-Polymerase zu verhindern, wurde die Reaktion anschließend mit einem 'Chase' für weitere 10 Minuten inkubiert. Nach einem vollständigen Stopp der Reaktion durch die Zugabe von Formamid-Puffer wurden die Ansätze auf eine 10% dPAGE aufgetragen. Zur genaueren Analyse der

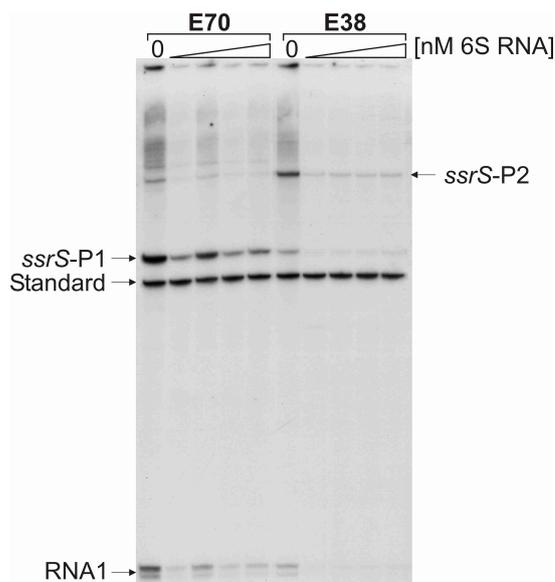


Abbildung 2.33: *In vitro* Transkription von p6S-T mit Zugabe von 6S RNA. Gezeigt ist exemplarisch die *in vitro* Transkription mit E70 und E38 Holoenzym. Die Reaktion wurde durchgeführt mit 5 nM superhelikalem Template (p6S-T) und 3 nM aktiver RNAP in 1x K_{Glu80} bei steigender 6S RNA Konzentration. 6S RNA: 0, 50, 100, 250 und 500 nM. Die homologen Transkripte, das RNA1-Transkript sowie der Auftragungsstandard sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

Spezifitätsmodulation erfolgte die quantitative Auswertung von vier unabhängigen Experimenten mit dem RNA1-Transkript als internem Standard. In der Abbildung 2.33 ist exemplarisch eine *in vitro* Transkription von p6S-T mit 6S RNA-Zugabe gezeigt.

Der *ssrS* P1-Promotor (mit E70) zeigt eine deutliche Transkriptbande auch mit hohen 6S RNA Konzentrationen. Vergleicht man die Transkriptbanden, zu denen 6S RNA zugegeben wurde miteinander, fällt auf, dass die Transkription nach einer Inhibierung bei 50 nM 6S RNA im nächsten Schritt (100 nM 6S RNA) wieder mehr Restaktivität zeigt. Bei der Zugabe größerer Mengen 6S RNA wird die Transkription danach wieder inhibiert. Die Auftragung der Restaktivität gegen die 6S RNA Menge bestätigt den beschriebenen Lauf der Transkriptbanden (siehe Abbildung 2.34). Die Transkription wird jedoch generell bei der Zugabe der 6S RNA inhibiert- die Restaktivität steigt in keinem Fall über 100%. Der *ssrS* P2-Promotor zeigt im Gegensatz zum P1 im homologen System (E38) eine sehr regelmäßige Inhibierung. Die RNA1 als interner Standard folgt, je nach Polymerase, dem Gang des jeweiligen homologen Promotors. Vergleicht man die Restaktivitäten der heterologen Transkriptionssysteme (*ssrS* P1/E38 und *ssrS* P2/E70) fällt auf, dass in diesem Fall die Transkripte beider Promotoren eine geringere Inhibierung bei 50 nM 6S RNA zeigen. Auch kehrt sich hier die Inhibierung um: anders als bisher (homologe Systeme und RNA1) zeigt nun der *ssrS* P2 eine höhere Restaktivität als der *ssrS* P1-Promotor.

Die Ergebnisse zeigen, dass die 6S RNA einen Einfluss auch auf ihre eigene Transkription hat. Hierbei erstreckt sich der Einfluss nicht nur auf die RNA-Polymerase, sondern

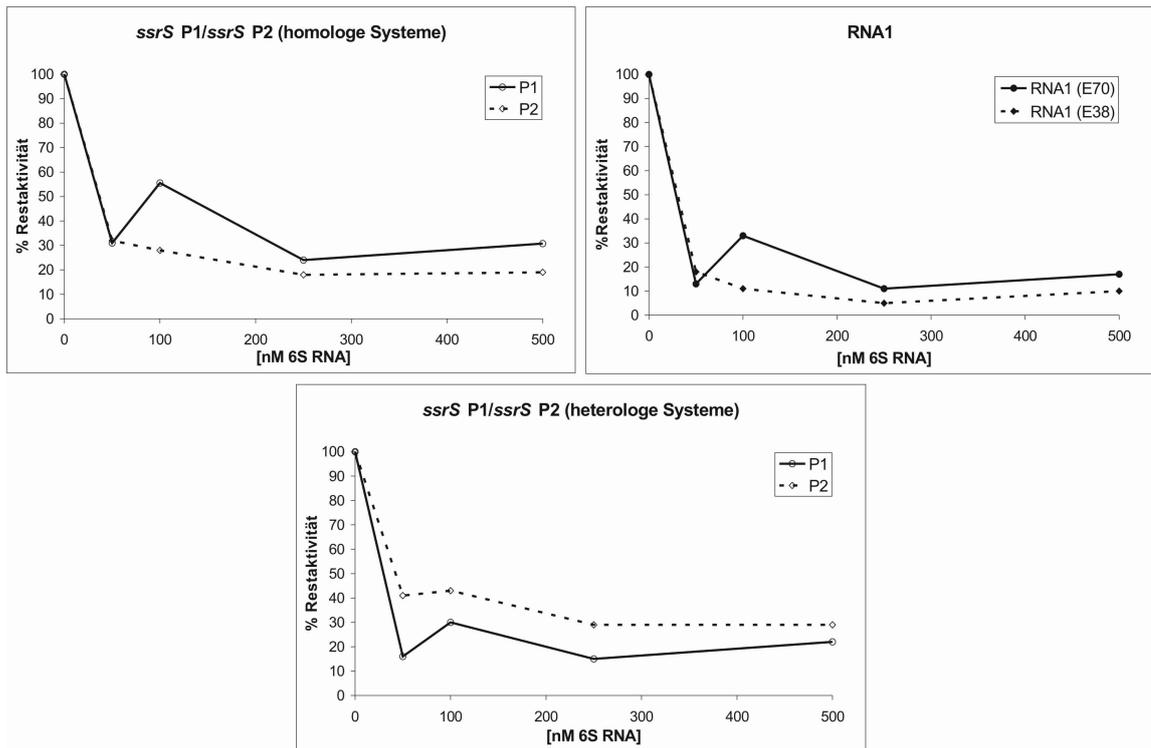


Abbildung 2.34: Auswertung der *in vitro* Transkriptionen mit 6S RNA Zugabe. Quantifizierung der in Abbildung 2.33 gezeigten *in vitro* Transkription von p6S-T mit Zugabe von 6S RNA. Aufgetragen sind die Mittelwerte aus vier unabhängigen Experimenten (siehe auch Tabelle H im Anhang)

indirekt auch auf oder durch den Promotor selbst. Die hauptsächliche Wirkung der 6S RNA scheint jedoch durch eine Regulation der RNA-Polymerase selbst zu erfolgen, wie die Transkriptionen im heterologen System zeigen (Abbildung 2.34): Unter dem Einfluss des σ^{70} -spezifischen Holoenzym zeigt auch der *ssrS* P2-Promotor eine erhöhte Restaktivität bei der Zugabe von 50 nM 6S RNA. Da der Effekt hier aber wesentlich geringer ausfällt als am P1-Promotor, muss auch der Promotor (indirekt) seine Transkription beeinflussen. Dies wird auch deutlich in der erhöhten Restaktivität bei der Transkription von *ssrS* P1 mit E38. Die bei der heterologen Transkription beobachtete 'Umkehrung' der Inhibierung von P1 und P2 ist hingegen wahrscheinlich lediglich ein Artefakt, das durch die allgemein weniger effiziente Transkription des σ^{38} -spezifischen Holoenzym auftritt. Die hier gezeigten Ergebnisse deuten somit neben der bereits in bei anderen Promotoren beobachtete Wirkung der 6S RNA auf die RNA-Polymerase auch auf eine Autoregulation des *ssrS*-Gens bzw. des *ssrS* P1-Promotors durch sein eigenes Produkt hin.

2.4.4.2 Der Einfluss von verschiedenen Regulatorproteinen auf die *ssrS*-Transkription

Da die Transkriptionsfaktoren FIS, H-NS, LRP und StpA eine Bindung an die Promotoren P1 und P2 des *ssrS*-Gens zeigen (siehe Abbildung 2.30), sollte darüber hinaus getestet werden, ob die Proteine auch die Transkription beeinflussen. Neben den Transkriptionsfaktoren wurde auch die Wirkung des Effektornukleotids ppGpp untersucht.

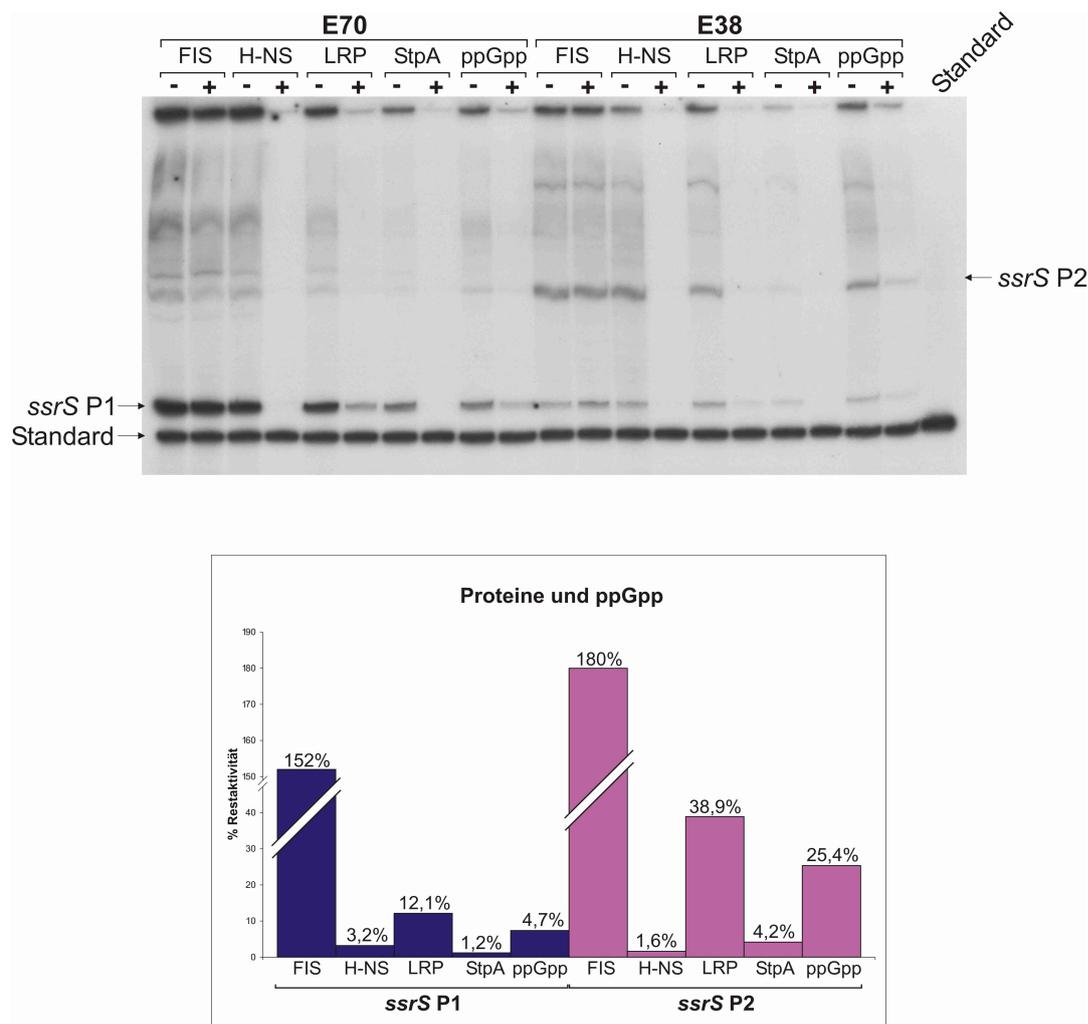


Abbildung 2.35: *In vitro* Transkription von p6S-T mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren und ppGpp. '-' = ohne Proteine/ppGpp, '+' = mit Protein/ppGpp. Die Transkripte von P1 und P2 sowie der Standard sind mit Pfeilen markiert. FIS: 2 μ M, H-NS 6 μ M, LRP 4 μ M, StpA 6 μ M und ppGpp 300 μ M. Die RNA1 ist nicht gezeigt, da ihre Transkription nicht von den eingesetzten Transkriptionsfaktoren reguliert wird. Unten: Quantifizierung der *in vitro* Transkription von p6S-T mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren und ppGpp. Aufgetragen sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchen (FIS: drei unabhängige Versuche).

Hierzu wurden das jeweilige Protein mit dem Template (5 nM) im Transkriptionspuffer 10 Minuten bei 30°C vorinkubiert. Die Reaktion wurde danach durch Zugabe der RNA-Polymerase gestartet und für 8 Minuten bei 30°C inkubiert und nach 'Chase' und Zugabe von Formamidprobenpuffer über eine 10%ige dPAGE aufgetrennt. Die Abbildung 2.35 zeigt exemplarisch die *in vitro* Transkription von p6S-T mit den σ^{70} - und σ^{38} -spezifischen Holoenzymen.

Wie auch in Retardierungsanalysen gezeigt werden konnte (Abbildung 2.30), findet eine Regulation des *ssrS*-Gens durch Transkriptionsfaktoren (und ppGpp) statt. Die Beeinflussung der Transkription wird weiterhin durch *in vivo* Analysen bestätigt, die bereits im Vorfeld eine differentielle Regulation der *ssrS*-Transkription durch diese Faktoren und ppGpp gezeigt hatten (Neusser, unpubliziert). Über die Regulation des *ssrS*-Gens lassen sich somit folgende Aussagen treffen:

- Die Transkription der 6S RNA erfolgt von beiden Promotoren aus, wobei der P1-Promotor σ^{70} -, der P2-Promotor σ^{38} -abhängig ist. Beide Promotoren zeigen *in vitro* jedoch eine effektive Kreuzerkennung für die jeweils heterologe RNA-Polymerase.
- Die 6S RNA beeinflusst die Transkription ihres eigenen Gens. Die Regulation durch die 6S RNA scheint differentiell zu sein: während der P2 mit seiner homologen Polymerase eine regelmäßige Inhibierung erfährt, zeigt sich am P1-Promotor ein Anstieg der Restaktivität bei der Zugabe von 100 nM 6 RNA. Dieses kann ein Hinweis auf eine autoregulatorische Wirkung der 6S RNA auf ihre eigene Transkription sein. Beachtet werden muss jedoch, dass auch die RNA-Polymerase einen Einfluss auf hier beschriebenen Effekte der 6S RNA hat. Weiterhin zeigt sich hier auch, dass die 6S RNA für die inhibierende Wirkung auf die Transkription zwingend prozessiert werden muss.
- Neben der 6S RNA beeinflussen auch verschiedene Transkriptionsfaktoren die Expression des *ssrS*-Gens. Dabei wirken H-NS, StpA und LRP reprimierend auf die Transkription. Das Effektornukleotid ppGpp zeigt ebenfalls einen negativen Einfluss. Im Gegensatz dazu zeigt das Protein FIS als einziger Faktor eine aktivierende Wirkung auf *ssrS*.

3 Diskussion

3.1 Die 6S RNA reguliert die bakterielle RNA-Polymerase

Die kleine regulatorische 6S RNA bindet an die bakterielle RNA Polymerase. Eine Bindung konnte hierbei bislang exklusiv an das exponentielle Phase-spezifische Holoenzym gezeigt werden, wobei die Bindung an die β/β' und die σ^{70} -Untereinheit erfolgt. Eine Bindung an das exponentielle Phase (σ^{38})-spezifische Enzym sowie an die Core-Polymerase wurde jedoch bislang *in vivo* und *in vitro* ausgeschlossen (Wassarman und Storz, 2000; Trotochaud und Wassarman, 2005). Nach Wassarman und Storz hat die Bindung an das σ^{70} -spezifische Holoenzym eine selektive Nutzung von σ^{70} - und σ^{38} -abhängigen Promotoren zu Beginn der stationären Phase zur Folge. Dieses Modell wurde weiterhin durch einen beobachteten Anstieg der 6S RNA Menge zu Beginn der stationären Phase gestützt. *In vivo* konnte bislang eine etwa dreifache Inhibierung einiger σ^{70} -spezifischer Promotoren gezeigt werden. Die durch 6S RNA inhibierten σ^{70} -spezifischen Promotoren zeigten als besonders Merkmal eine verlängerte ('extended') -10 Region, wie sie für stationäre Promotoren spezifisch ist. Die postulierte Aktivierung einiger stationärer Phase Promotoren *in vivo* (Trotochaud 2004) konnte durch weiterführenden Analysen nicht bestätigt werden. Diese Untersuchungen zeigten im Gegenteil eine *in vivo* Inhibierung aller untersuchten σ^{38} -abhängiger Promotoren (Kim *et al.*, 2004).

Ein Phänotyp durch eine Über- oder Unterexpression der 6S RNA kann nicht beobachtet werden, es gibt jedoch Hinweise auf eine verminderte Fitness der Zellen bei langen Hungerperioden, wenn die 6S RNA deletiert ist (Trotochaud und Wassarman, 2004).

Wahrscheinlich ist die Funktion der 6S RNA stark mit ihrer Sekundärstruktur gekoppelt. Bislang wird ein Mechanismus vermutet, bei welchem die 6S RNA wie ein offener Promotor an die RNA Polymerase bindet. Diese These wird gestützt dadurch, dass die berechnete Sekundärstruktur einen relativ großen einzelsträngigen Bereich im Zentrum der Struktur aufweist, der von zwei langen helikalen Bereichen eingerahmt wird. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass die Struktur der 6S RNA, besonders die der zentralen Domäne, hoch dynamisch ist (Gildehaus, 2001). Strukturuntersuchungen haben gezeigt, dass die native 6S RNA in diesem Bereich alternative Strukturen einnimmt (Gildehaus, 2001). Durch phylogentische Analysen und Strukturuntersuchungen von 6S RNA Sequenzen verschiedener Eubakterien konnten weiterhin konservierte Regionen identifiziert werden, welche scheinbar für die Ausbildung der Sekundärstruktur sowie für die Funktion essentiell sind (Barrick, 2005). Welche Nukleotide der 6S RNA in die Bindung an die RNA-Polymerase involviert sind, konnte bislang noch nicht gezeigt werden.

Da bislang hauptsächlich Untersuchungen zur Funktion der *E. coli* 6S RNA *in vivo* vorlagen, war in dieser Arbeit die *in vitro* Regulation durch die 6S RNA von besonderem Interesse. Beantwortet werden sollte dabei die Frage, ob eine direkte Bindung der 6S RNA an die bakterielle RNA-Polymerase stattfindet, und ob diese Bindung spezifisch nur an das σ^{70} -spezifische Holoenzym erfolgt. Weiterhin sollte festgestellt werden, ob die Aktivität

der verschiedenen Holoenzyme und des Core-Enzyms von der 6S RNA moduliert wird, und ob es sich bei dieser Modulation um einen differentiellen Mechanismus handelt. Eine weitere zu beantwortende Frage war, welche Nukleotide und Bereiche der 6S RNA die regulatorische Wirkung der RNA auf die RNA-Polymerase vermitteln. Untersucht werden sollte ebenfalls, wie die Regulation durch die 6S RNA mit der Expression des Gens *ssrS*, welches für die 6S RNA kodiert, zusammenhängt.

3.2 Die Bindung der 6S RNA an die bakterielle RNA-Polymerase

3.2.1 Die native *E. coli* 6S RNA bindet an alle Formen der bakteriellen RNA-Polymerase

Wie in den durchgeführten Retardierungsanalysen gezeigt werden konnte, bindet die 6S RNA stabil an alle Formen der bakteriellen RNA Polymerase. Die beste und stabilste Bindung erfolgt mit dem σ^{70} -spezifischen Holoenzym (Abbildung 2.1). Die Bindung an das σ^{38} -spezifische Holoenzym und an das Core-Enzym erfolgt in geringerem Maße und weniger spezifisch. Vergleicht man die aus 6S RNA und RNA-Polymerase gebildeten Komplexe, ist zu erkennen, dass es sich sowohl bei dem am langsamsten (E70/E38/E I) als auch bei dem am schnellsten im Gel migrierenden Komplex (E70/E38 III/E II) um Bindungen der 6S RNA an das Core-Enzym handelt. Der obere Komplex ist jedoch unter den im Retardierungsgel gegebenen Bedingungen nicht heparinstabil. Ob es sich bei diesem Komplex um Doppelbesetzungen oder um eine alternative Bindung der 6S RNA an die RNA-Polymerase handelt, konnte nicht bestimmt werden. Auffällig ist jedoch, dass der Komplex nach einer Behandlung mit Hydroxylradikalen heparinstabil ist (siehe 2.2.2.1, Abbildung 2.3). In den Komplexen E70 II und E38 II repräsentiert die zusätzlich auftretenden Komplexbande die Bindung an das Holoenzym. Vergleicht man die Komplexe, die die unterschiedlichen Holoenzyme mit der 6S RNA eingehen, fällt auf, dass die Anteile der einzelnen Komplexbanden stark unterschiedlich sind. Bei der Bindung an das exponentielle, σ^{70} -spezifische Holoenzym ist der Holoenzym-Komplex der am stärksten vertretene Komplex. Bei der Bindung an die stationäre Phase-spezifische RNA-Polymerase überwiegt hingegen der untere Core-Komplex. Dies kann zwei Gründe haben. Zum einen ist, wie bereits mehrfach beschrieben, die Rekonstitution des Holoenzym aus Core und dem σ^{38} -Faktor eher schlecht. Das starke Auftreten von Core-spezifischen Komplexbanden wäre somit in dem hohen Core- und geringem Holoenzym Anteil begründet. Ein anderer Grund für die geringe Bildung von Holoenzym-Komplexen könnte eine weniger effiziente Bindung der 6S RNA an das σ^{38} -Holoenzym sein. Beide Argumente schließen sich zudem gegenseitig nicht aus. Obwohl auch die schlechte Rekonstitution zu der unterschiedlichen Bindung beiträgt, ist jedoch anzunehmen, dass die Bindung an das σ^{38} -spezifische Holoenzym weniger effizient ist, was auch durch die weiteren Binstudien deutlich wird. Vergleicht man weiterhin die Laufweite der Komplexe in der Abbildung 2.3, ist zu erkennen, dass die korrespondierenden Komplexe auf einer Höhe laufen. Das ist im Falle der Bindung an das Core-Enzym verständlich, für die Holoenzym-Komplexe wäre jedoch aufgrund der unterschiedlichen Molekulargewichte der Sigmafaktoren eine unterschiedliche Laufweite der Komplexe im Gel zu erwarten. Eine gleiche (oder sehr ähnliche) Laufweite könnte durch eine unterschiedliche Bindung der Sigmafaktoren an die 6S RNA erklärt werden. In diesem Fall wäre die Bindung von σ^{70}

an die 6S RNA sterisch anders als die von σ^{38} und würde somit aufgrund einer stärkeren Kompaktierung des σ^{70} auf/mit der RNA zu einem schnelleren Laufverhalten führen. Auch diese Beobachtung ist ein Hinweis auf eine eventuell verschiedene Bindung der 6S RNA an die verschiedenen Holoenzyme. Anders als die RNA Polymerase Core- und Holoenzyme binden die Sigmafaktoren alleine nicht an die 6S RNA. Dieses war aufgrund der physiologischen Eigenschaften der Sigmafaktoren und im Hinblick auf die chemische Ähnlichkeit von DNA und RNA auch nicht zu erwarten.

Anders als in der Literatur bislang beschrieben, ist somit eine Bindung der 6S RNA auch an das stationäre Phase-spezifische Holoenzym sowie an das Core-Enzym *in vitro* möglich, auch wenn diese Bindung weniger spezifisch und effektiv erfolgt als die an das exponentielle Phase-spezifische Holoenzym E70.

3.2.2 Die Bindung der 6S RNA an die RNA-Polymerase erfolgt an spezifischen Positionen

Auf Ebene der RNA-Polymerase konnten bereits in früheren indirekten Analysen die Untereinheiten β und β' sowie der σ^{70} -Faktor als Bindepartner identifiziert werden (Wassarman und Storz, 2000). Dieses konnte im Rahmen dieser Arbeit durch direkte Analysen bestätigt werden. Die durchgeführten UV-Quervernetzungsanalysen und Hydroxylradikal-‘Footprints’ ermöglichten es, die Bindung von 6S RNA und RNA-Polymerase auf Ebene der RNA darzustellen. Hier zeigte sich, dass die RNA-Polymerase und die 6S RNA eine direkte Bindung eingehen, die durch bestimmte Nukleotide innerhalb der 6S RNA vermittelt wird (siehe Abbildungen 2.8 und 2.10). Auffällig ist, dass diese Nukleotide verstärkt am Rand von Loopregionen oder in Loops selbst zu finden sind. Zum einen erleichtern hier die vorhandenen Einzelstränge wahrscheinlich eine Wechselwirkung mit dem Protein. Weiterhin handelt es sich bei den Loops um konservierte Elemente, die wahrscheinlich für die Funktion des Moleküls wichtig sind. Hierbei sind jedoch interessanter Weise nicht die Sequenzen innerhalb der Loops wichtig, sondern ihre Anordnung, sowie bestimmte Positionen innerhalb der doppelhelikalen Bereiche (Barrick *et al.*, 2005). Modifiziert man die 6S RNA mit Hydroxylradikalen, wird die Bindung der RNA-Polymerase an die 6S RNA verbessert. Anders als bei den Retardierungsanalysen ist es möglich, so behandelte 6S RNA komplett mit der RNA-Polymerase zu komplexieren. Eine Veränderung der Primärstruktur (und somit auch der Sekundärstruktur) durch einen ‘nick’ oder einen Strangbruch führt zu einer vereinfachten Bindung der RNA-Polymerase an die 6S RNA. Dieses spricht ebenfalls dafür, dass Struktur und Funktion eng miteinander gekoppelt sind.

Als Bindestellen identifiziert werden konnten die Positionen 141-154 und 131-137. Innerhalb dieser Bereiche liegen mit den Nukleotiden 136 und 141 zwei Positionen, die für einen Kontakt mit der RNA-Polymerase von besonderer Bedeutung sind. Ebenfalls in die Bindung involviert sind Bereiche des terminalen Teils der 6S RNA, hier spielen die Positionen 82-88 sowie 99 und 111 eine wichtige Rolle für die Bindung. Darüber hinaus gibt es noch einige weitere Kontaktpunkte zu der RNA-Polymerase entlang der 6S RNA, diese Bereiche scheinen aber im Vergleich zu den bereits aufgeführten eine eher sekundäre Rolle bei der Bindung zu spielen.

Auffällig ist, dass in beiden Analysemethoden keine Bindung oder Quervernetzung des σ^{38} -spezifischen Holoenzym mit der 6S RNA gezeigt werden konnte. Eine Bindung des Core-Enzyms konnte hingegen für die Hydroxylradikal-‘Footprints’ gezeigt werden, in UV-

Quervernetzungen ist jedoch kein Kontakt von 6S RNA und Core-Enzym zu erkennen. Dieses ist ein weiterer Hinweis auf eine differentielle Bindung der 6S RNA an die verschiedenen Holoenzyme und an das Core-Enzym.

3.2.3 Das Core-Enzym und der σ^{70} -Faktor haben unterschiedliche Bindepositionen an der 6S RNA

In den Hydroxylradikal-‘Footprints’ konnte die Bindung der einzelnen Untereinheiten nachgewiesen werden. Core bindet mit den β/β' -Untereinheiten an die Bereiche 149-154 und 132-137 (dunkelgrün markiert in der 6S RNA-Struktur und -Sequenz, siehe Abbildungen 2.7 und 2.8). Die Bindung des Core-Enzyms wird somit durch den zentralen Loop und seine flankierenden Sequenzen vermittelt, wobei die Bereiche 132-137 sowie 149-154 direkte Bindestellen repräsentieren könnten. Bei DNA-Templates erfolgt die Bindung der RNA-Polymerase über einen Kontakt des σ -Faktors mit der -35 und der -10 Regionen des Promotors. Promotor-unspezifische DNA-Templates mit einem zentralen einzelsträngigen Bereich (so genannte ‘bubble’-Templates) sind jedoch in der Lage, mit dem Core-Enzym die Transkription zu initiieren, ohne dass ein Sigmafaktor anwesend ist (Fenton und DeHaese, 1999). Eine Bindung auch des Core-Enzyms alleine an die beschriebenen Positionen wäre somit wahrscheinlich, analog zu den ‘bubble’-Templates.

Die unspezifische Bindung der RNA-Polymerase an ein DNA-Template wird hauptsächlich durch elektrostatische Wechselwirkungen mit dem Zucker-Phosphat-Rückgrad vermittelt. Bei einem direkten Kontakt der RNA-Polymerase mit einem Promotor entstehen jedoch spezifische Interaktionen z. B. durch H-Brücken (von Hippel *et al.*, 1996). ‘Nicks’ oder Strangbrüche innerhalb der doppelsträngigen Bereiche könnten somit eine spezifische Wechselwirkung vereinfachen oder überhaupt erst ermöglichen. Durch die Destabilisierung der doppelsträngigen Bereiche ist auch die in Retardierungsanalysen und Hydroxylradikal-‘Footprints’ beobachtete unterschiedliche Stabilität der Komplexe gegenüber Heparin zu erklären. Während Komplexe aus nativer 6S RNA und dem Core-Enzym bei hohen Heparinkonzentrationen auseinander brechen (siehe Abbildung 2.1), sind die analogen Komplexe, die mit modifizierter 6S RNA gebildet wurden, auch bei hohen Konzentrationen des Kompetitors (Heparin, 200 ng/ μ l, siehe Abbildung 2.3) noch stabil.

Die RNA-Polymerase öffnet im Initiationskomplex etwa 15 Basenpaare der DNA. Die Strangöffnung erfolgt hierbei von den Position -11 bis +4 relativ zum Transkriptionsstart (Uptain *et al.*, 1996; Korzheva *et al.*, 2000). Übertragen auf die 6S RNA würde dieser Bereich von dem zentralen Loop repräsentiert werden, welcher etwa 9-15 Nukleotide umfasst. Beachtet werden muss hierbei jedoch auch die große Dynamik der zentralen Domäne (Gildehaus, 2001), welche ebenfalls eine Rolle bei der Vermittlung der Bindung spielen kann. Eine Bindung des Core-Enzyms (β/β' -Untereinheiten) zu beiden Seiten des zentralen Loops wird weiterhin gestützt durch frühere Analysen: In Studien, in welchen der zentrale Loop und seine flankierenden Stamm-Regionen mutiert oder deletiert wurde, stellte sich heraus, dass nicht nur der Loop selbst, sondern besonders die ihn flankierenden doppelsträngigen Bereiche wichtig für die Bindefähigkeit der 6S RNA sind. Dabei war nicht nur die Doppelsträngigkeit selbst wichtig für eine Bindung an die RNA-Polymerase, sondern auch die Sequenz (Trotochaud und Wassarman, 2005). Die aufgestellte These, dass auch diese Bereiche und bestimmte Nukleotide innerhalb dieser Bereiche einen Teil der Funktionalität der 6S RNA ausmachen, konnte durch die hier gefundenen Bindestellen, die höchstwahrscheinlich direkte Kontakte zwischen der 6S RNA und der RNA-Polymerase vermitteln, bewiesen werden.

Weitere mögliche Kontaktregionen der Core-Polymerase am Stem II und dem terminalen Loop, die jedoch nicht so stark auffallen wie die oben beschriebenen Bereiche, sind in den Abbildungen 2.7 und 2.8 hellgrün markiert. Diese Bereiche zeigen ebenfalls nur in Komplexen mit dem Core-Enzym eine verstärkte Bindung. Es kann deshalb davon angegangen werden, dass es sich auch hierbei um eine Wechselwirkung durch z. B. elektrostatische Interaktionen handelt. Diese Wechselwirkungen könnten jedoch eventuell nur durch die Modifikation der 6S RNA durch die Hydroxylradikale und die hiermit einhergehende bessere Bindung verursacht werden und in der nativen 6S RNA nicht unbedingt zur Bindung an die β/β' -Untereinheit beitragen. Ein Unterschied zwischen den Core-spezifischen Komplexen I und II (bzw. III bei E70) besteht lediglich in einer verminderten Bindung des Komplexes I an die Nukleotide 83-88 (rot, Abbildungen 2.7 und 2.8). Ob diese verminderte Bindung eine Relevanz hat, war nicht genau zu bestimmen. Der Komplex I ist unter den Bedingungen der Retardierungsanalysen (siehe 2.1.1, Abbildung 2.1) extrem instabil und wird auch bei modifizierter 6S RNA im Vergleich zu den anderen Komplexen kaum gebildet (siehe 2.2.2.1, Abbildung 2.3). Es ist deshalb davon auszugehen, dass es sich hierbei um einen Komplex handelt, der nur Aufgrund der verbesserten Bindefähigkeit der 6S RNA durch die Modifikationen gebildet werden kann, nativ jedoch sehr instabil und wahrscheinlich unspezifisch ist.

Der σ^{70} -spezifische Holoenzym-Komplex zeigt hingegen ein völlig anderes Modifikationsmuster. Auch hier zeigen die Positionen 133-137 und 149-154 eine verstärkte Bindung im Komplex. Es ist deshalb davon auszugehen, dass es sich auch hier um die bereits beschriebenen Kontaktpunkte des Core-Enzyms bzw. der β/β' -Untereinheit mit der 6S RNA handelt. Der Komplex E70 II zeigt hingegen eine deutlich reduzierte Bindung an den terminalen Loop der 6S RNA (Position 77-106, rot markiert in den Abbildungen 2.7 und 2.8). Diese Nukleotide und Bereiche vermitteln somit die spezifische Bindung an σ^{70} . Eine Modifikation dieser Region wirkt sich dabei negativ auf die Bindung an den Sigmafaktor aus und setzt diese herab. Der terminale Bereich der 6S RNA, bestehend aus dem terminalen Loop und den an ihn grenzenden Bereich des Stem II, ist phylogenetisch hoch konserviert. Die Konservierung erstreckt sich dabei bei γ -Proteobakterien und *B. subtilis* besonders auf den terminalen Loop (Barrick, *et al.*, 2005). Zudem weist der terminale Loop eine weitere Besonderheit auf: Er besteht aus einem stabilen Pentaloop, der die Nukleotide eines typischen UUCG-Tetraloops enthält, plus einem zusätzlichen Uridin. In früheren Analysen war es nicht möglich, eine Sonde gegen diesen Loop zu hybridisieren (Gildehaus, 2001), was die Rolle dieses Bereiches für die Struktur und Funktion der 6S RNA untermauert. Innerhalb des terminalen Teils der 6S RNA scheinen die Nukleotide 82 und 83 sowie 86 und 88 eine besondere Rolle bei der Bindung zu spielen. An diesen Nukleotiden findet wahrscheinlich ein direkter Kontakt zwischen der 6S RNA und σ^{70} statt. Hier fallen besonders die nah beieinander liegenden Positionen 82 und 83 sowie 86 und 88 auf, die Erkennung des Promotors erfolgt basenspezifisch durch die Region 2.4 des σ -Faktors und die direkte Interaktion mit den Positionen -12 (Q437, T440) und -13 (R441) der DNA. Weitere direkte Kontakte geht der Sigmafaktor darüber hinaus mit den Positionen -10 und -11 ein (Campbell *et al.*, 2002). Die Positionen 82 und 83 sowie 86 und 88 der 6S RNA könnten eine analoge Rolle bei der Bindung spielen.

3.2.4 Die Rolle von σ^{70} und dem terminalen Loop bei der Bindung von 6S RNA und RNA-Polymerase

Geht man davon aus, dass die 6S RNA einen offenen Promotor nachbildet ('Mimikry'), würde man eine Bindung des Sigmafaktors an einen der beiden, den zentralen Loop flankierenden doppelhelikalen Bereich erwarten. Hierbei ist eine Bindung der RNA-Polymerase in beide 'Richtungen' möglich. Die hier gefundenen Kontakte des Core-Enzyms mit den Positionen 132-137 und 149-154 der 6S RNA widersprechen dabei nicht einer möglichen Orientierung des Enzyms in beide 'Richtungen' auf der 6S RNA. Aus den hier gefundenen Kontakten mit dem Sigmafaktor σ^{70} ergibt sich eine Bindung der RNA-Polymerase auf der 6S RNA in Richtung des offenen Endes der 6S RNA. Eine mögliche Transkription auf der 6S RNA (siehe 'de novo'-Transkript, Kapitel 2.3.6 und Abbildung 3.1) würde somit mit der '5'-Seite' der 6S RNA als Template stattfinden. Die gezeigten Kontakte des Core-Enzyms schließen auch eine (Transkriptions-)Richtung der RNA-Polymerase zum geschlossenen Ende der 6S RNA nicht aus. In diesem Fall würden die Positionen 132-137 und 149-154 Kontakte zur '3'-Seite' der 6S RNA (sozusagen zum 'non-template'-Strang) ausbilden. Solche Kontakte zum 'non-template'-Strang sind auch an DNA-Promotoren vorhanden. Unter diesen Umständen wäre jedoch eine Bindung von σ^{70} an den Stem I zu erwarten gewesen, wie von Barrick *et al.* vermutet. In UV-Quervernetzungen konnten jedoch nur für die Nukleotide 15-20 schwache Signale detektiert werden. In den Hydroxylradikal-'Footprints' sind Unterschiede im Bandenmuster für die Nukleotide nach der Position 70 der 6S RNA zu erkennen, diese konnten jedoch nicht aufgelöst werden. Da die Modifikationen im terminalen Bereich der 6S RNA klar dem Holoenzym-Komplex zugeordnet werden konnten, ist es wahrscheinlich, dass dieser Bereich der 6S RNA zur Bindung an den Sigmafaktor beiträgt. Ob es sich dabei um eine Bindung des Sigmafaktors an den terminalen Bereich der 6S RNA, ähnlich der Bindung an einen DNA-Promotor, oder um die Ausbildung einer Tertiärstruktur durch z. B. ein Umklappen der Struktur zurück auf die 6S RNA oder die RNA-Polymerase handelt, kann hier nicht bestimmt werden. Die Struktur des terminalen Bereichs hat jedoch wahrscheinlich einen maßgeblichen Einfluss auf die Interaktion der 6S RNA mit dem Holoenzym und vermittelt eventuell auch die *in vivo* Spezifität der 6S RNA für E70.

3.2.5 Die *in vitro* Spezifität der Interaktion von 6S RNA und RNA-Polymerase wird durch die Struktur der 6S RNA vermittelt.

Die durchgeführten Experimente zur Bestimmung der Interaktion von 6S RNA und RNA-Polymerase bestätigen im Grunde die vermutete Spezifität der 6S RNA für das σ^{70} -Holoenzym (E70) (Wassarman und Storz, 2004). Allerdings ist, zumindest *in vitro*, die Bindung der 6S RNA auch an das σ^{38} -spezifische Holoenzym sowie an Core möglich. Die Bindung erfolgt hierbei jedoch nicht so spezifisch wie an das σ^{70} -Holoenzym. Dieses lässt sich zum einen aus der geringeren Menge der Komplexe schließen, die mit E38 und Core gebildet werden. Zum anderen sind die Komplexe der 6S RNA mit Core sowie mit E38 weniger stabil gegen den Kompetitor Heparin, wie unter 2.1.1 in der Abbildung 2.1 zu sehen. Die Spezifität der 6S RNA wird wahrscheinlich durch die Sekundärstruktur des Moleküls vermittelt. Wie in den Hydroxylradikal-'Footprints' deutlich wird, führt eine Destabilisierung der doppelhelikalen Bereiche der 6S RNA Struktur zu einer erhöhten Toleranz der (Core)-Komplexe gegenüber Heparin und erleichtert die Bindung der Polymerase an die

6S RNA. Die Spezifität für die verschiedenen Holoenzyme wird, wie oben bereits erwähnt, wahrscheinlich durch den terminalen Loop vermittelt. Es ist vorstellbar, dass eine spezifische Bindung des σ^{70} -Holoenzym (oder des σ^{70} -Faktors alleine) durch Kontakte von σ^{70} mit dieser Region der 6S RNA zustande kommt. Die beobachtete verringerte Bindung von 6S RNA und σ^{70} -Holoenzym bei einer Modifikation der Struktur zeigt die Relevanz einer intakten Struktur für die Komplexbildung von 6S RNA und der σ^{70} -spezifischen RNA-Polymerase.

Auch in UV-Quervernetzungsanalysen konnten keine direkten Kontakte von 6S RNA und dem σ^{38} -spezifischen Holoenzym oder Core detektiert werden. Ein Grund hierfür könnte eine zu geringe Komplexbildung der 6S RNA mit diesen Formen der RNA-Polymerase sein. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass es hier aufgrund fehlender geeigneter Wechselwirkungen nicht zu Quervernetzungen kommt. Die Struktur von RNA-Polymerase/Promotor-Komplexen ist für beide σ -Faktoren unterschiedlich (Colland *et al.*, 2002). Unterschiede in der Bindung der verschiedenen σ -Faktoren müssten auf der Protein-Ebene durch die Region 1.1 oder den Linker vermittelt werden. Bei der Region 1.1 handelt es sich um eine Domäne, die aufgrund ihrer hohen negativen Ladung durch Autoinhibition einen Kontakt zwischen DNA und dem freien σ^{70} -Faktor verhindert (Dombrowski *et al.*, 1993; Camarero *et al.*, 2002). Dieser Bereich ist bei σ^{38} stark verkürzt und nicht sehr homolog. Ein weiterer Unterschied zwischen σ^{70} und σ^{38} besteht in der Linker-Region, welche sich bei σ^{70} zwischen den Regionen 1.2 und 2.1 befindet und deren Funktion noch nicht geklärt ist. Bei σ^{38} ist diese Region nicht vorhanden. Da die σ -Faktoren ansonsten sehr homolog sind, sollte eine durch den Sigmafaktor selbst verursachte differentielle Bindung durch diese Bereiche vermittelt werden. Unterschiede in der Struktur der σ^{70} - und σ^{38} -spezifischen Komplexe könnten somit auch ein Unterscheidungsmerkmal für die Komplexbildung sein. Die differentielle Bindung der 6S RNA an die verschiedenen Holoenzyme gibt jedoch weiterhin Fragen auf, da auch in Transkriptionsanalysen *in vitro* und *in vivo* eine negative Beeinflussung beider Holoenzyme durch die 6S RNA nachweisbar ist (siehe Kapitel 2.3 sowie Kim *et al.*, 2004).

Dieses lässt vermuten, dass die Bindung der 6S RNA an die RNA-Polymerase, besonders *in vivo*, nicht nur von dem Molekül selber abhängig ist, sondern dass hier weitere externe Faktoren eine Rolle spielen, die noch nicht bekannt sind.

3.3 Die 6S RNA moduliert die Aktivität der RNA-Polymerase

3.3.1 Die 6S RNA inhibiert die Initiationskomplexbildung und die Transkription an beiden Holoenzymen *in vitro*

Wie in Retardierungsanalysen und *in vitro* Transkriptionen zu erkennen ist (siehe 2.3.3 und 2.3.5), inhibiert die 6S RNA die Komplexbildung und Transkription von RNA-Polymerase und DNA-Promotor *in vitro*. Beeinflusst werden hierbei sowohl der exponentielle *rrnB* P1- als auch der stationäre Phase-spezifische *bolA*-Promotor. Somit wirkt die 6S RNA *in vitro* nicht nur auf σ^{70} -spezifische, sondern auch auf σ^{38} -spezifische Transkriptionssysteme. Die vermutete differentielle Inhibierung nur σ^{70} -spezifischer Promotoren und Holoenzyme durch die 6S RNA (Wassarman und Storz, 2000; Trotochaud und Wassarman, 2004) kann darum *in vitro* nicht bestätigt werden. Die Inhibierungsrate ist am *bolA*-Promotor zudem höher als die am *rrnB* P1, was die Annahme einer nur σ^{70} -spezifischen, selektiven Regu-

lation durch die 6S RNA weiter einschränkt. Beachtet werden muss hierbei jedoch, dass die höhere Inhibierung der Komplexbildung und der Transkription im stationäre Phase-spezifischen *bolA*-System wahrscheinlich zum Teil auch durch die weniger stabilen Initiationskomplexe aus DNA-Template und RNA-Polymerase bedingt wird.

Das die Inhibierung durch die 6S RNA durch die Stabilität der (Initiations-)Komplexe beeinflusst wird, konnte durch die Erhöhung der Salzkonzentration in den *in vitro*-Transkriptionen gezeigt werden. Erhöhte Salzkonzentrationen zeigten einen stabilisierenden Effekt auf die σ^{38} -spezifische Transkription. Umgekehrt zeigt sich ein inhibierender Effekt auf die Transkription von σ^{70} -abhängigen Promotoren (Ding *et al.*, 1995, Rajukumari *et al.*, 1996). Dieses ist auch hier zu beobachten (2.3.5.6, Abbildung 2.20). Die salzabhängige Stabilisierung der Initiationskomplexe führt am *bolA*-Promotor zu einer weniger starken Inhibierung der Transkription. Umgekehrt kommt es jedoch am *rrnB* P1-Promotor zu einer stärkeren Inhibierung, bedingt durch die Destabilisierung der Initiationskomplexe. Eine 6S RNA vermittelte Inhibierung der Transkription muss somit nicht zwingend σ -Faktor spezifisch sein, sondern kann auch von der Stabilität der gebildeten Initiationskomplexe aus Promotor und RNA-Polymerase abhängen. Neben der Stabilität der jeweiligen Initiationskomplexe müssen auch weitere Faktoren berücksichtigt werden, die die Transkription beeinflussen können, wie zum Beispiel die Promotor-‘clearance’. Weiterhin ist es möglich, dass der in den Analysen verwendete *rrnB* P1-Promotor eventuell kein ideales Ziel für eine Untersuchung der 6S RNA Funktion darstellt. Ribosomale Promotoren unterliegen aufgrund ihrer Relevanz für die Zelle einer mannigfaltigen Regulation durch verschiedene Transkriptionsfaktoren und -Effektoren. Zudem könnte der Promotor aufgrund seiner Stärke nicht den Grad der Inhibierung aufweisen, den andere σ^{70} -abhängige Promotoren zeigen könnten.

In vitro konnte in keinem Fall eine Aktivierung der Komplexbildung oder Transkription, wie sie von Wassarman und Trotochaud (2004) postuliert wurde, gezeigt werden. Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse werden zudem gestützt durch *in vivo*-Analysen, in denen gezeigt werden konnte, dass verschiedene stationäre Phase-Promotoren, unter anderem auch *bolA*, durch eine Überexpression der 6S RNA inhibiert werden (Kim *et al.*, 2004). Die *in vitro* Inhibierung sowohl der Komplexbildung als auch der Transkription durch die 6S RNA ist sehr effektiv und erreicht bei hohen 6S RNA Konzentrationen für beide Promotoren nahezu 90-100%. Eine Wirkung der 6S RNA zeigt sich *in vitro* schon bei sehr geringen Konzentrationen der RNA. Die in den *in vitro* Transkriptionen ermittelte Konzentration, bei welcher noch 50% Restaktivität vorhanden ist, beträgt 10-100 nM 6S RNA. Ob die hier benötigten Konzentrationen auch *in vivo* für eine Wirkung der 6S RNA nötig sind, kann nicht bestimmt werden. Die Menge der 6S RNA wird zu Beginn der stationären Phase von 1000 um das 10fache auf 10000 Moleküle erhöht (Wassarman und Storz, 2000). Bei einer Menge von etwa 3000 RNA-Polymerase-Molekülen (gesamt) entspricht dieses einem etwa 3fachen Überschuss an 6S RNA.

In vitro Transkriptionen und Retardierungen mit anderen externen RNAs (5S RNA, tRNA und PSTVd, Kapitel 2.3.5.7) zeigen eine Inhibierung der Transkription auch durch diese RNAs. Anders als bei der Inhibierung durch die 6S RNA zeigt sich in diesen Analysen jedoch keine differentielle Regulation von σ^{70} - und σ^{38} -spezifischen RNA-Polymerasen und -Promotoren (Abbildungen 2.21, 2.23 und 2.24). Die Inhibierung durch diese RNAs ist somit nicht spezifisch. Der Grund für eine - besonders im Fall der 5S RNA sehr starke - Inhibierung ist unbekannt und beruht eventuell auf der Dissoziation des σ -Faktors vom Core-Enzym, wie es für die Zugabe von tRNA, ssDNA zu σ^{70} -spezifischen Holoenzymen

gezeigt werden konnte (Spassky *et al*, 1979). Zudem muss beachtet werden, dass in der Zelle keine oder kaum freie 5S RNA vorhanden ist. Für PSTVd war eine Inhibierung der Transkription erwartet, da die Bindung von Viroiden auch an die bakterielle RNA-Polymerase bekannt ist (Pelchat, 2002).

Der Zeitpunkt der Inhibierung der Transkription durch die 6S RNA kann hier nicht genau bestimmt werden, da es sich bei den durchgeführten Transkriptionsanalysen um 'multiple round'-Transkriptionen handelt, die ein über-alles-Bild der Transkription widerspiegeln. Eine Beeinflussung der Initiation ist jedoch sehr wahrscheinlich, da in Retardierungsanalysen nur Initiationskomplexe untersucht wurden, und sich hier der gleiche Effekt wie in den *in vitro* Transkriptionen zeigte.

3.3.2 Die 6S RNA bindet an die gleichen Bereiche der RNA-Polymerase wie ein DNA-Promotor und kompetiert mit dem Promotor um die Bindung an das Enzym.

Der Grad der Inhibierung der Komplexbildung und der Transkription durch die 6S RNA ist abhängig vom Zeitpunkt der RNA Zugabe. In der Abbildung 2.18 ist zu erkennen, dass die Zugabe der 6S RNA direkt zu der Rekonstitution (ohne Template) die stärkste Inhibierung verursachte. Die Inhibierung war am geringsten, wurde die 6S RNA nach der bereits erfolgten Komplexbildung aus dem Promotor und der RNA-Polymerase zu der Reaktion gegeben. Dieses lässt vermuten, dass die 6S RNA die gleichen Bindestellen der RNA-Polymerase nutzt wie ein DNA-Template.

Somit ist ein 'Kompetitionsmodell' für die Wechselwirkung der 6S RNA mit der RNA-Polymerase denkbar. Die 6S RNA fängt durch Bindung an die RNA-Polymerase einen Teil der Moleküle ab und zieht diesen aus dem Pool der freien Enzyme. Die Bindung der 6S RNA an die RNA-Polymerase wird dabei erleichtert, wenn sich kein DNA-Template im Reaktionsansatz befindet. Zudem kann die 6S RNA, besonders bei hohen Konzentrationen, den Promotor von seiner Bindestelle auf der RNA-Polymerase verdrängen. Ob eine solche Verdrängung des Promotors auch *in vivo* erfolgen würde ist fraglich, da die 6S RNA Konzentrationen hier nicht die Konzentrationen erreichen, die *in vitro* eingesetzt wurden. Die Beobachtung, dass der Zeitpunkt der 6S RNA Zugabe eine Rolle bei der Inhibierung der Transkription und der Komplexbildung spielt zeigt, dass die Bindung der 6S RNA an das Enzym wahrscheinlich der Geschwindigkeit bestimmende Schritt der Reaktion ist.

3.3.3 Die Rolle des 'de novo'-Transkripts

Wie im Kapitel 2.3.6 beschrieben, wurde bei *in vitro* Transkriptionen mit 6S RNA und der RNA-Polymerase ohne die Anwesenheit eines DNA-Promotors ein Transkript gebildet. Dieses 'de novo'-Transkript' besteht aus einer Doppelbande mit einer Länge von etwa 200-210 Nukleotiden. Das Transkript zeigte einige, so nicht erwartete Besonderheiten. Eine Markierung des Transkripts am 5'- sowie am 3'-Ende war nicht möglich. Ebenfalls konnte das Transkript in denaturierenden Gelen nicht angefärbt werden und zeigte keine Hybridisierung auch an Random-Hexamer-Sonden. Eine Sequenzierung des Transkriptes war nicht möglich. Das 'de novo'-Transkript wurde mit allen Formen der RNA-Polymerase (E70, E38 und E) gebildet, wobei die Ausbeute bei Core am geringsten war (siehe Abbildung 2.25).

Es konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem Transkript nicht um eine *antisense*-Sequenz der 6S RNA oder um eine Verlängerung dieser handelt.

Aufgrund dieser Beobachtungen und anhand der durchgeführten Temperaturgradienten-Gelelektrophorese (TGGE, Abbildung 2.28) kann die These aufgestellt werden, dass das gebildete ‘*de novo*’-Transkript eine extrem stabile, eventuell zirkuläre Sekundärstruktur ausbildet. Gleichzeitig bestätigt das Auftreten des ‘*de novo*’-Transkripts die These, dass die 6S RNA Promotor-ähnliche Eigenschaften hat und als solcher (*in vitro*) fungieren kann.

Die Bildung eines solchen spezifischen RNA-abhängigen RNA-Transkriptes durch die bakterielle RNA-Polymerase konnte für *E. coli* bislang noch nicht beschrieben werden. Es ist jedoch bekannt, dass es RNA-Spezies gibt, welche mit der *E. coli* RNA-Polymerase replizieren. Ein Beispiel hierfür ist das bereits erwähnte ‘Peach Latent Mosaik Viroid’ (PLMVd). Pelchat *et al.* konnten zeigen, dass ein bestimmter Hairpin-Loop von PLMVd die Transkription effektiv initiieren kann. Loops, die zu einer Initiation fähig sind, müssen am Ende eines doppelsträngigen Bereiches liegen, einen ungepaarten Bereich von mindestens sechs Nukleotiden aufweisen und darüber hinaus am Ende des Loops ein AU-Basenpaar haben, an welchem die Transkription beginnt (Pelchat *et al.*, 2002). Weiterhin ist die bakterielle RNA-Polymerase in der Lage, aus einem Pool von zufälligen RNA-Sequenzen autokatalytisch eine Replikation bestimmter Sequenzen über unbekannte Intermediate zu katalysieren (Wettich und Biebricher, 2001). Die TGGE solcher Transkripte zeigt einen sehr ähnlichen Verlauf und eine ähnliche Schmelztemperatur wie die TGGE des 6S RNA-abhängigen ‘*de novo*’-Transkripts. Auch diese Random-Transkripte bilden somit eine sehr stabile Sekundärstruktur aus, zeigen jedoch keine doppelsträngigen Bereiche oder Bereiche, die irreversibel denaturieren (Wettich und Biebricher, 2001). Die TGGE des ‘*de novo*’-Transkripts zeigte hingegen Unterbrechungen in der Bande, ein Indiz dafür, dass hier helikale Bereiche existieren, die bei einer bestimmten Temperatur denaturieren. Interessant ist auch die Ähnlichkeit des Bandenverlaufs des ‘*de novo*’-Transkripts in der TGGE verglichen mit dem der 6S RNA (siehe Abbildung 1.4). Ob es sich hierbei lediglich um einen Zufall handelt, oder ob das ‘*de novo*’-Transkript eine Struktur (oder Strukturen) ausbildet, die der Struktur der 6S RNA ähnlich ist/sind, konnte hier nicht geklärt werden.

Die TGGE zeigt jedoch, dass das ‘*de novo*’-Transkript eine spezifische Struktur ausbildet, welche der Schlüssel sowohl zu der Funktion als auch zu der Sequenz des Transkriptes sein könnte.

Da es sich bei dem ‘*de novo*’-Transkript um ein 6S RNA spezifisches Transkript handelt, stellt sich die Frage, wo auf der 6S RNA die Transkription initiiert wird. Geht man von der gerechneten 6S RNA Struktur aus, fällt als möglicher Bereich die zentrale Domäne ins Auge, besonders, da es auch mit dem Core-Enzym zu einer Synthese des ‘*de novo*’-Transkripts kommt. Ausgehend von einer Nutzung dieses Bereiches analog zu einem offenen Promotor könnte die Synthese des ‘*de novo*’-Transkripts am 5’-seitigen Ende dieses Loops initiiert werden (Abbildung 3.1 (a)). Hier befinden sich nach einem GC-Basenpaar zudem zwei AU-Basenpaare hintereinander, nach Pelchat *et al.* eine zwingende Voraussetzung für die Transkription der RNA-Polymerase mit PLMVd. Barrick *et al.* postulieren zudem eine 6S RNA Struktur mit einem größeren einzelsträngigen Bereich als bislang angegeben (Barrick *et al.*, 2005). Auch dieser Bereich wird flankiert durch zwei konsekutive AU-Basenpaare (siehe Abbildung 3.1 (b)). Die in den Hydroxylradikal-‘Footprints’ identifizierten Nukleotide 132-137 könnten hier den Kontakt des aktiven Zentrums der RNA-

Polymerase mit dem ‘non-Template’-Strang repräsentieren. Eine Transkription beginnend an diesen Nukleotiden würde ein weiteres Aufschmelzen der Struktur nach den Positionen 57 oder 60 erfordern. Tatsächlich ist der betroffene helikale Bereich durch relativ viele AU-Basenpaare nicht besonders stabil und wird zudem gefolgt von einem größeren Loop. Nach diesem folgt dann jedoch der hoch konservierte terminale Bereich, der einen hohen GC-Anteil enthält. Eine Transkription über diesen Bereich hinweg ist somit sehr unwahrscheinlich. Das entstehende ‘de novo’-Transkript würde sich somit aus vielen reiterativen, gleichen Transkripten zusammensetzen. Eine Transkriptionsinitiation wäre darüber hinaus auch innerhalb des zentralen Loops möglich (Abbildung 3.1 (c)), da das aktive Zentrum der Polymerase über eine gewisse Flexibilität verfügt. Auch hier wäre jedoch aufgrund der Stabilität der folgenden doppelhelikalen Bereiche eine reiterative Transkription zu erwarten. Diese hier angeführten Modelle gehen alle davon aus, dass der mittlere Bereich der 6S RNA eine Art ‘offenen Promotor’ simuliert. Dieses muss natürlich nicht der Fall sein, die RNA-Polymerase könnte ebenso an einem anderen Bereich der 6S RNA initiieren. Ebenso ist auch eine Transkription über helikale Bereiche hinweg durchaus denkbar. Wäre dieses der Fall, würde jedoch eine *antisense*-6S RNA entstehen, welche mit spezifischen Sonden hybridisiert werden könnte. Das keine 100%ige *antisense*-RNA entsteht, konnte durch die RNase T1-Hydrolyse gezeigt werden. Denkbar wäre jedoch ein Transkript aus Teilen einer *antisense*-RNA, das jedoch durch reiterativ entstandene Sequenzen unterbrochen ist. Eine solche Sequenz würde in einer Hydrolyse mit RNase T1 sowohl Oligonukleotide ergeben, die in der *antisense*-Sequenz enthalten sind, sowie einige Spots überrepräsentierter Oligonukleotide. Eine solche ‘gemischte’ Sequenz würde sowohl das erhaltene Muster der Oligonukleotide nach RNase T1-Verdau (siehe Abbildung 2.26), sowie die nicht erfolgreiche Hybridisierung von spezifischen Sonden erklären.

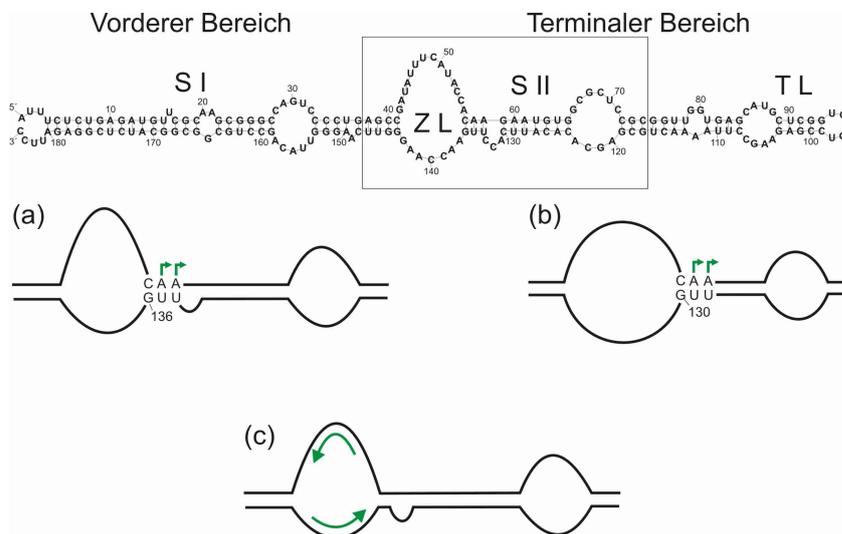


Abbildung 3.1: Mögliche Startpunkte des ‘de novo’-Transkripts. Gezeigt sind mögliche Transkriptionsstartpunkte in der berechneten 6S RNA Struktur nach Vogel *et al.* (1987) (a), Barrick *et al.* (2005) (b), sowie aus dem einzelsträngigen Bereich (c). Auch für (a) und (b) ist eine Transkription in die andere Richtung (wie in (c) gezeigt) möglich. SI= Stem I, SII= Stem II, ZL= zentraler Loop, TL= terminaler Loop.

Auf die Frage, welche Rolle das ‘*de novo*’-Transkript in der Zelle spielt, kann zur Zeit noch keine Antwort gegeben werden. Unter der Annahme, das es auch *in vivo* gebildet wird, ist eine Funktion des ‘*de novo*’-Transkripts bei der durch die 6S RNA vermittelten Regulation der RNA-Polymerase denkbar. Eine mögliche Funktion hierbei könnte zum Beispiel die Vermittlung der *in vivo*-Spezifität der 6S RNA für das σ^{70} -spezifische Holoenzym sein. Ebenso wahrscheinlich wäre auch eine Funktion des ‘*de novo*’-Transkripts als Feedback-Regulator der 6S RNA Transkription. Bei sehr hohen 6S RNA Konzentrationen würde in diesem Fall die Synthese des ‘*de novo*’-Transkripts durch die RNA-Polymerase erfolgen. Das Transkript könnte dann direkt oder indirekt auf die 6S RNA oder ihre Transkriptionseinheit wirken. Dass keine Bindung der 6S RNA an das ‘*de novo*’-Transkript gezeigt werden konnte, schließt eine direkte Bindung nach wie vor nicht aus, da eventuell die Nachweisgrenze unterschritten wurde. Für eine Regulation durch eine Feedback-Regulierung spricht auch die Tatsache, dass es in *in vitro* Transkriptionen aufgrund der hohen Transkriptionsraten mit superhelikalen Templates nicht zur Bildung von ‘*de novo*’-Transkripten kommt. Diese Argument könnte jedoch auch gegen eine Funktion und *in vivo*-Spezifität des ‘*de novo*’-Transkripts sprechen. Es ist nicht auszuschließen, dass es nur unter den gewählten Bedingungen, in welchen kein spezifisches Template zur Verfügung steht, zu einer Synthese des Transkripts kommt. Somit würde es sich bei dem ‘*de novo*’-Transkript um ein *in vitro* Phänomen handeln.

Auch unter diesen Voraussetzungen handelt es sich jedoch um eine in dieser Form bislang noch nicht beschriebene Spezifität der bakteriellen RNA-Polymerase für eine kleine regulatorische RNA. Eine Klärung der Struktur und der Synthese des ‘*de novo*’-Transkripts wären daher für das Verständnis des Transkriptionsmechanismus der bakteriellen RNA-Polymerase von großer Bedeutung.

3.4 Die Rolle der 6S RNA als Regulator: mögliche Wirkmechanismen

Der bislang vermutete Wirkmechanismus der 6S RNA, bei dem diese selektiv an die σ^{70} -spezifische RNA-Polymerase bindet und somit das Gleichgewicht zugunsten von Core und σ^{38} verschiebt (Wassarman und Storz, 2000), kann aufgrund der beobachteten Bindung der 6S RNA auch an σ^{38} und an das Core-Enzym nicht uneingeschränkt bestätigt werden. Die *in vivo* (Kim *et al.*, 2004) und *in vitro* (diese Arbeit) gezeigte Inhibierung der Transkription beider RNA-Polymerasen lässt ebenfalls an diesem Modell zweifeln. Besonders die gemessene *in vivo* Inhibierung verschiedener σ^{38} -spezifischer Promotoren ist hervorzuheben, da es *in vitro* Versuchen durch die Begrenzung der Systeme zu ungewollten unphysiologischen Effekten kommen kann. Aufgrund der auch von Kim *et al.* *in vivo* gemachten Beobachtungen bezüglich der Inhibierung σ^{38} -spezifischer Promotoren können die hier untersuchten *in vitro* Systeme jedoch als spezifisch angesehen werden. Ebenso wie die Inhibierung der Transkription erfolgte auch die Synthese des ‘*de novo*’-Transkriptes mit allen Formen der RNA-Polymerase, wenn auch mit dem Core-Enzym nur in geringem Ausmaß, was ebenfalls für eine mögliche Wirkung der 6S RNA auch auf diese Polymerase-Formen zeigt.

Eine Promotor-ähnliche Bindung der 6S RNA an die RNA-Polymerase ist aufgrund der in dieser Arbeit erhaltenen Bindepositionen der RNA-Polymerase auf der 6S RNA durchaus wahrscheinlich. Hierbei erfolgt ein Kontakt des Core-Enzyms (der β/β' -Untereinheit) in

direkter Nähe zum zentralen Loop. Die Bindung des Sigmafaktors wird durch den terminalen Loop der 6S RNA vermittelt, wobei nicht klar ist, ob dieses die einzigen Kontaktstellen des Sigmafaktors mit der 6S RNA sind, oder ob sich noch weitere Kontaktpositionen im vorderen Bereich des Moleküls befinden. In diesem Bereich könnten sich auch zusätzliche Kontakte zum Core-Enzym befinden. Zudem kann davon ausgegangen werden, dass die 6S RNA mit dem DNA-Template um die Bindung an die RNA-Polymerase kompetiert. Die Inhibierung der Komplexbildung sowie der Transkription beruhen somit auf einer Erniedrigung der Konzentration freier RNA-Polymerase Holoenzyme (E70 und E38) im Reaktionsansatz.

Die Expression der 6S RNA wird zu Beginn der stationären Phase um das 10fache hochreguliert (Wassarman und Storz, 2000). Eine Beteiligung dieser regulatorischen RNA an dem bis heute unverstandenen Mechanismus der veränderten RNA-Polymerase-Nutzung beim Übergang der Zellen von der exponentiellen zur stationären Wachstumsphase ist somit wahrscheinlich. Ebenso wie die Erhöhung der helikalen Dichte des Nucleoids, einer Zunahme der Salzkonzentration und weiteren Faktoren wie Trehalose oder ppGpp könnte die 6S RNA einen Teil dieser Regulation vermitteln. Wie in Binde- und Inhibierungsstudien gezeigt, besitzt die 6S RNA durchaus eine differentielle Affinität für die verschiedenen RNA-Polymerasen. Eine ‘alles-oder-nichts’-Regulation durch die 6S RNA ist jedoch aufgrund der hier gezeigten Ergebnisse eher unwahrscheinlich. Eine Regulation nur solcher σ^{70} -abhängiger Promotoren, die eine ‘extended -10’ Region aufweisen, kann *in vitro* ebenfalls nicht bestätigt werden, da weder der *rrnB* P1 noch der RNA1-Promotor eine solche ‘extended -10’ Region besitzen. Die spezifische Wirkung der 6S RNA könnte zudem von weiteren Faktoren abhängen, die noch nicht identifiziert werden konnten. Das von der 6S RNA stammende ‘*de novo*’-Transkript könnte ein solcher Faktor sein. Auch Proteine wie z. B. Hfq oder der Anti-Sigma-Faktor Rsd könnten zusätzlich benötigte Spezifitätsfaktoren für eine durch die 6S RNA vermittelten Regulation sein.

Eine weitere mögliche Funktion der 6S RNA könnte auch eine Regulation der RNA-Polymerase unter extremen Stressbedingungen sein. Mit der B2 RNA der Maus, welche im Fall eines Heat-Shocks die Transkription der RNA-Polymerase II inhibiert, ist eine solche ‘Stress-spezifische’ regulatorische RNA bereits bekannt (Espinoza *et al.*, 2004 und Allen *et al.*, 2004).

Die hier gezeigten Ergebnisse schließen auch einen ganz anderen Wirkmechanismus nicht aus. Die 6S RNA könnte, analog des von Wada *et al.* beschriebenen ‘Ribosome Modulation Factor’ (RMF), die RNA-Polymerase reversibel inaktivieren. Der RMF ist ein Protein, welches bei schlechten Umgebungsbedingungen oder in der stationären Phase einen Pool inaktiver 100S Ribosomen formt. Bei einer Verbesserung der Lebensbedingungen sind diese Ribosomen so schnell wieder verfügbar (Wada *et al.*, 1990 und 1995). Eine solche Konservierung von RNA-Polymerasen zu Beginn der stationären Phase oder in Stress-Situationen könnte durchaus möglich sein. Wie bei den Ribosomen würde auch hier die Konservierung des komplexen Enzyms, dessen Synthese einige Minuten benötigt, dieses bei einer Verbesserung der Wachstumsbedingungen schnell wieder verfügbar machen. Eine Verfügbarkeit der RNA-Polymerase, die einen der wichtigsten Syntheseapparate der Zelle darstellt, ohne dass eine vorangehende Neusynthese notwendig ist, würde einen immensen Vorteil für die Anpassung der Zellen an ihre wechselnde Umgebung bedeuten.

3.5 Die Regulation der *ssrS*-Expression

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit sollte die Regulation des Gens *ssrS*, welches die 6S RNA exprimiert, untersucht werden. Der Promotorbereich der 6S RNA umfasst zwei hintereinander liegende Promotoren P1 und P2, von denen zwei unterschiedliche 6S RNA Vorläufer transkribiert werden, die nach der Transkription zur reifen Form prozessiert werden (Kim und Lee, 2004). Der proximale Promotor P2 ist σ^{38} -abhängig, kann jedoch vom σ^{70} - und σ^{38} -spezifischen Holoenzym transkribiert werden, während der distale, σ^{70} -abhängige P1 nur von E70 transkribiert werden kann. Da die 6S RNA in die Regulation der RNA-Polymerase-Nutzung zu Beginn der stationären Phase eingreift, ist das Verständnis der *ssrS*-Genregulation während der unterschiedlichen Wachstumsphasen von großer Bedeutung. Kim und Lee haben die Hypothese aufgestellt, dass die Transkription der 6S RNA in der exponentiellen Phase von beiden Promotoren P1 und P2 durch das E70-Holoenzym erfolgt. In der stationären Phase wird die Transkription des P1 durch die 6S RNA abgeschaltet, und das σ^{38} -spezifische Holoenzym übernimmt die Transkription vom P2 (Kim und Lee, 2004). Dieses würde eine Autoregulation ihres eigenen Gens durch die 6S RNA bedeuten.

Unbekannt ist, in wie fern Transkriptionsfaktoren in die Expression des *ssrS*-Gens eingreifen. *In vivo* konnte gezeigt werden, dass ein Fehlen der Transkriptionsfaktoren FIS, H-NS, LRP und StpA die Menge der 6S RNA beeinflusst (Neusser, unpubliziert). Bei FIS, H-NS, LRP und StpA handelt es sich um Proteine, die regulierend in die Transkription während der Wachstumsphasen und besonders beim Übergang von einer Wachstumsphase in eine andere eingreifen. Alle diese Transkriptionsfaktoren binden an gekrümmte DNA oder induzieren durch ihre Bindung eine Krümmung der DNA.

3.5.1 Verschiedene Transkriptionsfaktoren binden an das *ssrS*-Gen und beeinflussen seine Transkription.

Die Transkriptionsfaktoren H-NS, FIS, LRP und StpA binden an das 6S RNA-spezifische *ssrS*-Gen (siehe Abbildung 2.30). Die Bindung erfolgt hierbei differentiell am *ssrS* P1-Promotors und am *ssrS* P2 und umfasst die komplette Transkriptionseinheit. H-NS und StpA binden mit hoher Kooperativität an Bereiche am *ssrS* P2 und am *ssrS* P1. StpA bindet zudem wahrscheinlich innerhalb der 6S RNA-Transkriptionseinheit, zu erkennen an der kompletten Komplexierung der freien DNA in der Retardierung mit dem Fragment *ssrS*-2. Lrp und FIS binden selektiv an Bereiche innerhalb des *ssrS*-Gens, FIS zeigt mindestens sechs Bindestellen, von denen vier 100% der Konsensussequenz entsprechen und in der Abbildung 3.2 gezeigt sind.

LRP zeigt eine hohe Kooperativität seiner Bindung, wobei auch hier mindestens zwei Bindestellen innerhalb des 6S RNA-Transkriptionsbereichs liegen. Die Identifizierung dieser Bindestellen ist aufgrund einer sehr ungenauen und stark degenerierten Konsensusstruktur (Calvo und Matthews, 1994) schwierig. Eine mögliche Bindestelle konnte jedoch identifiziert werden und befindet sich an der Position 543-554 der in der Abbildung 3.2 gezeigten Transkriptionseinheit. Die in den Retardierungen auffällige Kooperativität der LRP-Bindung bestätigt jedoch die Spezifität des Regulators für das *ssrS*-Gen, da gezeigt werden konnte, dass die Kooperativität der Bindung von LRP an multiple suboptimale Positionen letztendlich zu einer Bindung mit hoher Affinität führt (Cui *et al.*, 1995).

Die Bestimmung der Bindestellen der Proteine H-NS und StpA ist ebenfalls schwierig.

```

1  CCATGGGTCT AAAGACGAAG GCAGCGCAGT CAATCAGCAG GAAGGTGGCA
   GGTACCCAGA TTTCTGCTTC CGTCGGTCA GTTAGTCGTC CTTCCACCGT

51  TGTCTGCACA ACCCGTCGAT ATCCAAATTT TTGGCCGTTC ACTGCGTGTG
   ACAGACGTGT TGGGCAGCTA TAGGTTTAAA AACCGGCAAG TGACGCACAC

101 AACTGCCC GC CTGACCAAAG GGATGCGTTG AATCAGGCAG CGGACGATCT
    TTGACGGGCG GACTGGTTTC CCTACGCAAC TTAGTCCGTC GCCTGCTAGA
        ssrS P2

151 GAACCAACGG TTGCAAGATC TGAAAGAACG CACTAGAGTC ACAAATACTG
    CTTGGTTGCC AACGTTCTAG ACTTTCTTGC GTGATCTCAG TGTTTATGAC
        -35 -10

201 AACAGTTGGT CTTCAATTGCC GCATTGAATA TCAGCTATGA GTTAGCGCAA
    TTGTCAACCA GAAGTAACGG CGTAACTTAT AGTCGATACT CAATCGCGTT

251 GAAAAAGCAA AGACTCGTGA CTACGCGGCA AGTATGGAAC AGCGTATTTCG
    CTTTTTCGTT TCTGAGCACT GATGCGCCGT TCATACCTTG TCGCATAAGC
        *****

301 GATGCTGCAG CAGACCATAG AACAAGCGTT ACTTGAACAA GGTCGCATCA
    CTACGACGTC GTCTGGTATC TTGTTGCGCAA TGAAC TTGTT CCAGCGTAGT
        ssrS P1

351 CCGAAAAAAC TAACCAAAC TTTGAATGAC ACTTTTCGGT TTA CTGTTGGT
    GGCTTTTTTG ATTGGTTTTG AAAC TACTG TGAAAAGCCA AATGACACCA
        ***** +1 -35

401 AGAGTAACCG TGAAGACAAA A TTTCTCTGA GATGTTGCGA AGCGGGCCAG
    TCTCATTTGGC ACTTCTGTTT TAAAGAGACT CTACAAGCGT TCGCCCGGTC
        -10 *****

451 TCCCTGAGC CGATATTTC TACCACAAGA ATGTGGCGCT CCGCGGTTGG
    AGGGGACTCG GCTATAAAGT ATGGTGTCT TACACCGCA GCGCCCAACC

501 TGAGCATGCT CGGTCCGTCC GAGAAGCCTT AAAACTGCGA CGACACATTC
    ACTCGTACGA GCCAGGCAGG CTCTTCGGAA TTTTGACGCT GTTGTGTAAG

551 ACCTTGAACC AAGGGTTCAA GGGTTACAGC CTGCGGCGGC ATCTCGGAGA
    TGGAACTTGG TTCCAAGTT CCCAATGTCG GACGCGCGC TAGAGCCTCT

601 TTCC
    AAGG

```

Abbildung 3.2: Mögliche Bindestellen von FIS und LRP im *ssrS*-Gen. Gezeigt sind mögliche Bindestellen von FIS auf der *ssrS*-Transkriptionseinheit, die keine oder eine Abweichung von der Konsensussequenz ((G/T)NNYRNN(A/T)NNYRNN(C/A)) haben (gelb unterlegt). Ebenfalls markiert ist eine, aufgrund der Konsensussequenz, mögliche Bindestelle von LRP (blau unterlegt). Im 'upstream'-Bereich der Transkriptionseinheit befinden sich zudem einige AT-reiche Sequenzabschnitte (***) . Die Promotoren P1 und P2 sowie die Transkriptionstarts und der +1 der prozessierten 6S RNA sind markiert.

Für H-NS ist bislang keine Konsensussequenzen für eine DNA-Bindung bekannt. Die spezifische Bindung von H-NS basiert auf der Präferenz des Proteins für gekrümmte DNA (Tippner und Wagner, 1995). Regionen für eine H-NS Bindung zeichnen sich deshalb oft durch AT-Cluster in helikaler Phase aus, welche man oft in intrinsisch gekrümmter DNA findet. Bei hohen Konzentrationen des Proteins kann eine Bindung jedoch auch unspezifisch an zufälligen DNA-Sequenzen erfolgen. Da durch den Kompetitor Heparin (50 ng/ μ l) die Bindung von H-NS an die *ssrS*-DNA nicht inhibiert werden konnte, kann hier von einer spezifischen Interaktion ausgegangen werden, obwohl das *ssrS*-Gen trotz eines hohen AT-Anteils in der nicht-codierenden Region keine intrinsische Krümmung zeigt (Abbildung 3.3).

StpA bindet ebenfalls mit hoher Kooperativität an das *ssrS*-Gen. Dieses war zu erwarten, da StpA mit einer 58%igen Identität zu H-NS starke strukturelle und funktionelle Homologie zeigt (Zhang und Belford, 1992, Dorman *et al.*, 1999). StpA zeigt im Vergleich zu H-NS

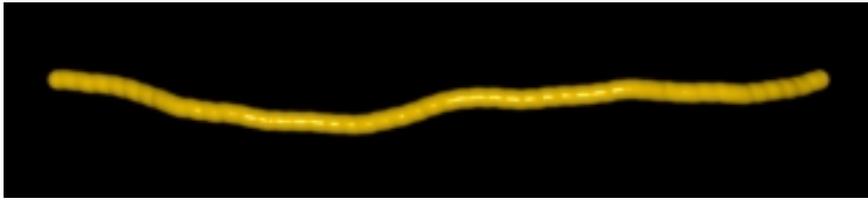


Abbildung 3.3: Darstellung der Krümmung des *ssrS*-Gens (*ssrS*-Fragment2). Gezeigt ist die mit dem Programm ‘DIAMOD’ (Dlakic und Harrington, 1998) berechnete Krümmungsanalyse. Der berechnete End-zu-End-Abstand beträgt gekrümmt 155.54 nm, ohne Krümmung beträgt er 161.93 nm. Hieraus ergibt sich ein sehr geringer k-Faktor von 1.04.

eine vierfach höhere Affinität zu (gekrümmter) DNA, was die stärkere Komplexierung im Gel (Abbildung 2.30) erklärt. Im Vergleich zu FIS und LRP (Neusser, unpubliziert) ist der Komplex von *ssrS* und StpA jedoch nicht thermostabil und zerfällt bei einer Temperatur von 47 °C (siehe Abbildung 2.31). Gleiches gilt auch für H-NS, dieser Komplex ist jedoch noch instabiler und dissoziiert bereits bei einer Temperatur von 25°C (Neusser, unpubliziert). Diese Ergebnisse bestätigen die Abhängigkeit der H-NS und StpA-Bindung von der Struktur der DNA.

Die beobachtete Bindung der hier untersuchten Transkriptionsfaktoren an *ssrS* deutet auf eine Regulation der 6S RNA Transkription durch diese Proteine hin. Durch *in vitro* Transkriptionen mit dem superhelikalen Plasmid p6S-T (gezeigt in der Abbildung 2.35 oben) konnte gezeigt werden, dass alle Proteine bis auf FIS die Transkription des *ssrS*-Gen inhibieren. Die Inhibierung erfolgt hierbei Promotor-unabhängig, sowohl *ssrS* P1 als auch *ssrS* P2 werden beeinflusst, wobei die Reaktion am *ssrS* P2 in jedem Fall stärker ausfällt als die am P1. Dieses muss jedoch nicht unbedingt eine differentielle Regulation bedeuten, sondern kann zum Teil durch eine eventuell geringere Stabilität der E38-Promotor-Komplexe bedingt sein.

Die negative Regulation durch H-NS war durchaus erwartet. Zum einen wirkt H-NS bei den meisten durch dieses Protein regulierten Genen als Repressor, nur einige wenige Ausnahmen sind bekannt. Die durch H-NS regulierten Gene sind zudem meistens an der Stress- oder Wachstumsphasen spezifischen Regulation beteiligt (Schröder und Wagner, 2002). Eine Inhibierung der Wachstumsphasen spezifischen 6S RNA Transkription ist somit zu erwarten. Interessanter Weise spricht jedoch die beobachtete Inhibierung beider Promotoren durch H-NS (und sein Analogon StpA) gegen eine verstärkte Expression des *ssrS*-Gens zu Beginn der stationären Phase, besonders hier sollte die Transkription der 6S RNA aktiviert werden. Es konnte gezeigt werden, dass H-NS einen Einfluss auch auf die Expression von *rpoS*, dem Gen für den σ^{38} -Faktor, sowie auf die Sigmafaktor-Kompetition hat. In einigen Fällen wird die Initiation der Transkription von σ^{70} -spezifischen RNA-Polymerasen durch H-NS inhibiert, während Komplexe mit E38 nicht beeinflusst werden (Arnquist *et al.*, 1994, Marschall *et al.*, 1998). Eine solche Funktion von H-NS könnte auch am *ssrS*-Gen möglich sein und wäre in den hier durchgeführten ‘multiple-round’ *in vitro* Transkriptionen aufgrund des erhaltenen ‘über-alles’-Bildes nicht erkennbar.

Eine Funktion von StpA auf die Expression von *ssrS* sollte analog zu der von H-NS sein. Tatsächlich ist auch hier eine starke Inhibierung der Transkription von beiden Promotoren zu beobachten (siehe Abbildung 2.35). Die beobachtete RNA-Chaperon-Aktivität von StpA

(Grossberger *et al.*, 2005) spielt bei der Regulation des *ssrS*-Gen wahrscheinlich keine Rolle.

LRP wirkt ebenfalls reprimierend auf die *ssrS*-Transkription. Für den *osmY*-Promotor konnte eine Selektivität der Lrp-Regulation für die σ^{70} -spezifische RNA-Polymerase gezeigt werden (Colland *et al.*, 2000). Auch für das *ssrS*-Gen ist eine solche Regulation denkbar. Hier zeigt sich ebenfalls eine höhere Inhibierung der Transkription am σ^{70} -spezifischen P1-Promotor (siehe Abbildung 2.35), ein Hinweis darauf, dass LRP die Transkription von *ssrS* differentiell reguliert.

Reprimierend auf die *ssrS*-Transkription wirkt auch ppGpp. Dieses Effektormolekül ist ein wichtiger globaler Regulator der Genexpression. Hierbei wirkt ppGpp nicht direkt auf den Promotor, sondern bindet an die β/β' -Untereinheit der RNA-Polymerase. Der Effektor ppGpp wirkt negativ auf die Transkription besonders der ribosomalen RNAs in der stationären Phase (Schröder und Wagner, 2000). Eine Aktivierung durch ppGpp konnte jedoch unter anderem für den stationäre Phase-spezifischen Promotor *bolA* gezeigt werden (Reckendrees, 2004). Eine Inhibierung durch ppGpp konnte für beide *ssrS*-Promotoren gezeigt werden (siehe Abbildung 2.35). Die Inhibierung ist jedoch mit E70 am σ^{70} -spezifischen P1 stärker als am σ^{38} -spezifischen *ssrS* P2-Promotor. Somit könnte auch hier eine differentielle Regulation der Promotoren durch ppGpp erfolgen: Zu Beginn der stationären Phase würde der P1 negativ durch ppGpp beeinflusst. Im Gegensatz dazu könnte jedoch die Transkription des σ^{38} -spezifischen P2-Promotors durch ppGpp weniger stark betroffen sein.

FIS hat auf die meisten durch dieses Protein beeinflussten Gene und Operons eine aktivierende Wirkung. So zeigt FIS als einziges der in dieser Arbeit untersuchten Proteine auch hier eine Aktivierung der Transkription. FIS und H-NS wirken in der Zelle antagonistisch. Obwohl die Aktivierung durch FIS somit in gutem Einklang zu der mit H-NS und StpA beobachteten Inhibierung der Transkription und der generellen Spezifität des Proteins ist, war eine Aktivierung der *ssrS*-Transkription ebenso unerwartet wie die beobachtete Inhibierung der Transkription durch H-NS. Die Inhibierung durch H-NS kann jedoch noch durch die beschriebene Wirkung von H-NS auf *rpoS* sowie die Sigmafaktor-Kompetition erklärt werden. Eine Erklärung für die Aktivierung durch FIS kann hier nicht gegeben werden. Eventuell handelt es sich hierbei um einen Effekt, der nur *in vitro* entsteht. *In vivo* könnte FIS jedoch eventuell eine Funktion haben bei der Aufrechterhaltung eines basalen 6S RNA Levels auch in der exponentiellen Phase des Wachstums.

Abschließend muss festgehalten werden, dass die Regulation durch die hier untersuchten Transkriptionsfaktoren und ppGpp hoch komplex ist, zumal sich die einzelnen Faktoren gegenseitig beeinflussen. Eine wichtige Rolle bei der Regulation des *ssrS*-Gens könnte auch eine Autoregulation (-repression) durch die 6S RNA in unterschiedlichen Wachstumsphasen spielen. Die Zelle benötigt wahrscheinlich in jeder Wachstumsphase 6S RNA- hierfür spricht die relativ hohe Zahl von 6S RNA Molekülen auch in der exponentiellen Phase. Gleichzeitig darf jedoch die Menge der 6S RNA Moleküle einen maximalen Wert in der stationären Phase nicht überschreiten, um eine fein abgestimmte spezifische Regulation zu ermöglichen. Eine Autorepression durch die 6S RNA könnte, eventuell konzertiert mit einer Regulation durch die Transkriptionsfaktoren, zu hohe (aber auch zu niedrige) Expressionsraten einschränken. Eine Autoregulation konnte bereits für mehrere wichtige Komponenten der Zelle, so z. B. auch für H-NS, dass bei zu hohen Konzentration seine eigene Synthese inhibiert, gezeigt werden (Ueguchi *et al.*, 1993). Aus der Existenz eines basalen 6S RNA Levels auch in der exponentiellen Phase des Wachstums ist auf mehr als nur eine Funktion

der 6S RNA in der Zelle zu schließen. Dieses konnte bereits gezeigt werden durch eine Veränderung der Expression des *deo*-Operons in *ssrS*-defizienten Stämmen (Neusser, unpubliziert). Eine exakt balancierte Konzentration der 6S RNA muss somit für die Zelle sehr wichtig sein. Ebenfalls wichtig für eine Regulation (durch Proteine) ist die Lebensdauer ($t_{1/2}$) der 6S RNA. Da es sich bei der 6S RNA um eine stabile RNA handelt, sind weitere regulative Mechanismen nötig, damit es nicht zu einer Akkumulation der RNA-Moleküle in der Zelle kommt.

3.5.2 Die 6S RNA beeinflusst ihre eigene Synthese

In *in vitro* Transkriptionen konnte gezeigt werden, dass die 6S RNA auch die Transkription ihres eigenen Gens beeinflusst. Hierbei werden beide Promotoren P1 und P2 inhibiert. Die durchgeführten *in vitro* Transkriptionen zeigen, dass die Promotoren eine Spezifität für das jeweilige homologe Holoenzym haben, jedoch eine effiziente Kreuzerkennung für beide Promotoren *in vitro* möglich ist. Die Inhibierung ist dabei für beide Promotoren mit den jeweils homologen Enzymen in etwa gleich. Die nötige 6S RNA Konzentration, um eine Inhibierung von 50% zu erreichen, liegt unter 50 nM 6S RNA. Für beide Promotoren ist die maximale Inhibierung bei einer Menge von 250 nM 6S RNA erreicht, bei höheren Konzentrationen steigt die Restaktivität sogar wieder leicht an (siehe 2.4.4, Abbildung 2.33 und 2.34). Die Inhibierung des E38-abhängigen P2-Promotors verläuft regelmäßig mit zunehmender 6S RNA Menge. Der *ssrS* P1-Promotor wird ebenfalls durch die Zugabe von 6S RNA stets inhibiert, zeigt jedoch im Vergleich zu 50 nM 6S RNA eine Zunahme der Restaktivität bei der Zugabe der doppelten Menge 6S RNA (Abbildung 2.33 und 2.34). Dieses Verhalten des P1-Promotor könnte auf eine Autoregulation des *ssrS*-Gens durch sein eigenes Produkt hinweisen. Dabei könnte ein bestimmter Schwellenwert der 6S RNA die Transkription des P1 positiv oder negativ beeinflussen. Kim und Lee haben die Hypothese aufgestellt, dass die 6S RNA zu Beginn der stationären Phase die Transkription des σ^{70} -abhängigen P1-Promotors durch eine Interaktion mit der σ^{70} -spezifischen RNA-Polymerase abschaltet. In diesem Modell wird dann die Transkription der 6S RNA in der stationären Phase alleine vom σ^{38} -abhängigen P2-Promotor aus gesteuert. Die *in vitro* Ergebnisse stützen diese These nicht, da hier die Transkription von beiden Promotoren mit steigender 6S RNA Konzentration inhibiert wird. Die hier gewonnenen Ergebnisse deuten eher auf eine 6S RNA-gesteuerte Regulation der σ^{70} -spezifischen *ssrS*-Transkription während der exponentiellen Phase hin, eventuell, um einen basalen Level der 6S RNA aufrecht zu halten. Die Transkription vom P1-Promotor könnte bis zu einem gewissen Schwellenwert durch die 6S RNA nicht beeinflusst oder sogar aktiviert werden. Wird der Schwellenwert innerhalb der exponentiellen Phase durch eine zu hohe 6S RNA Konzentration überschritten, wird die Transkription hingegen wieder inhibiert. Eine solche Regulation würde durch eine konzertierte Beeinflussung der σ^{70} -spezifischen RNA-Polymerase und dem Promotor erfolgen. Die RNA1-Kontrolle mit E70 zeigt ebenfalls eine höhere Restaktivität bei 100 nM 6S RNA, was auf eine Regulation der oder durch die RNA-Polymerase hindeutet. In den heterologen Systemen zeigen sowohl der P2 als auch der P1-Promotor eine Aktivierung, die jedoch beim *ssrS* P2 nur sehr gering ist. Dieses zeigt, dass die hier von der 6S RNA vermittelte Regulation nicht nur von der RNA-Polymerase, sondern auch von bestimmten Parametern des Promotors abhängig ist. Die von Kim und Lee vermutete Transkription der 6S RNA in der stationären Phase nur vom P2 mag für die Aufrechterhaltung eines konstanten Levels unter diesen Bedingungen richtig sein, der beobachtete Anstieg der 6S

RNA beim Eintritt der Zellen in die exponentielle Phase lässt sich jedoch mit einer Transkription nur vom P2-Promotor nicht erklären. Hier könnte eine konzertierte Aktivierung beider Promotoren den beobachteten ‘upshift’ bedingen.

Die vollständige Regulation des *ssrS*-Gens durch die 6S RNA lässt sich jedoch anhand der hier gezeigten Versuche nicht erklären. Vorangegangene Transkriptionsexperimente mit Regulatorproteinen haben gezeigt, dass noch weitere Faktoren an der Regulation beteiligt sind. Nicht berücksichtigt wurde hier zudem eine konzertierte Regulation der 6S RNA durch die Transkriptionfaktoren, welche in Kombination miteinander andere regulatorische Mechanismen als einzeln besitzen können. Weiterhin muss beachtet werden, dass es sich auch bei den hier durchgeführten Transkriptionen um *in vitro*-Analysen handelt, in denen bestimmte Gegebenheiten der Zelle nicht abgebildet werden können.

3.6 Ausblick

Die hier gezeigten Ergebnissen erlauben einen Einblick in die durch die regulatorische 6S RNA aus *E. coli* vermittelte wachstumsphasen-spezifische Regulation.

Wie auch frühere Arbeiten zeigt die vorliegende Dissertation, dass die Regulation der und durch die 6S RNA hoch komplex und noch nicht vollständig verstanden ist. Bisherige Analyse konnten nur Teilbereiche erfassen, zumal die 6S RNA in die essentielle und somit durch viele Faktoren beeinflusste Regulation der Wachstumsphasen eingreift.

Für das Verständnis der Regulation durch die 6S RNA ist die Identifizierung des ‘*de novo*’-Transkripts von großer Wichtigkeit. Das Wissen um die Funktion dieses Moleküls könnte entscheidende Fortschritte bei der Klärung der durch die 6S RNA vermittelten Regulation der RNA-Polymerase bedeuten. Zudem würde eine Aufklärung der Struktur und Entstehungsweise des ‘*de novo*’-Transkripts von großer Bedeutung für das Verständnis des Transkriptionsmechanismus der bakteriellen RNA-Polymerase selbst sein.

Ebenfalls von Interesse ist eine eventuelle Wirkung der 6S RNA nicht nur als ubiquitärer, sondern auch als spezifischer Regulator in besonderen Stresssituationen wie Hitze- oder osmotischem Schock.

Im Hinblick auf die Expression des *ssrS*-Gens wäre eine genaue Analyse der Rolle der Transkriptionsfaktoren, besonders ihre konzertierte Wirkung, von Bedeutung. Bedacht werden muss in diesem Zusammenhang auch eine eventuelle autoregulatorische Wirkung der 6S RNA auf ihre eigene Transkription. Auch die Halbwertszeit der 6S RNA, sowie ihre Maturierung und ihr Abbau spielen möglicherweise eine große Rolle bei der Regulation der Expression des *ssrS*-Gens während des Wachstums. Das Verständnis der Expression des *ssrS*-Gens, die Prozessierung und der ‘turn-over’ seines Produktes, sowie das Wissen um die Rolle des 3´ vom 6S RNA-Kodierungsbereich gelegenen *ygfA*-Gens könnten hierbei entscheidend zu einer Klärung der Regulation durch die 6S RNA während verschiedener Wachstumsphasen beitragen.

4 Material

4.1 Allgemeines

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien besaßen, sofern nicht anders vermerkt den Reinheitsgrad *pro analysis*. Zum Ansetzen von Puffern und Lösungen wurde ausschließlich hochreines Milli-Q-Wasser (Hausanlage mit nachgeschaltetem *water purification system* EPA Est. 41237-MA-1 Millipore GmbH, Neu Isenburg) verwendet. Dieses Wasser wird nachfolgend als *Aqua dest.* bezeichnet. Die Qualität des Wasser wurde in regelmäßigen Abständen bezüglich pH-Wert und Konduktivität überprüft.

4.2 Verwendete Bakterienstämme und Plasmide

4.2.1 *E. coli* Stämme

STAMM	GENOTYP	REFERENZ/HERKUNFT
JM110	F ⁻ , <i>traD36</i> , <i>lacI^q</i> , <i>lacZΔM15</i> , <i>proAB/ rpsL</i> (Str ^r), <i>thr</i> , <i>leu</i> , <i>thi</i> , <i>lacY</i> , <i>galK</i> , <i>galT</i> , <i>ara</i> , <i>fhuA</i> , <i>tsx</i> , <i>dam</i> , <i>dcm</i> , <i>supE44</i> , $\Delta(lac-proAB)$	Yanish-Perron <i>et al.</i> (1985)
XL-1 Blue	<i>recA1</i> , <i>lac⁻</i> , <i>endA1,thi</i> , <i>gyrA96</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , F' <i>proAB</i> , <i>lacI^q</i> , <i>lacZΔM15</i> , Tn10	Stratagene

4.2.2 Plasmide

PLASMID	BESCHREIBUNG	REFERENZ/HERKUNFT
pCP1	pUC18-Derivat (Vieira und Messing, 1982, Yanish-Perron <i>et al.</i> , 1985); trägt die Terminatoren T1T2 des <i>rrnB</i> -Operons aus pKK232-8 in der <i>KpnI</i> -Site des pUC18; Freundliche Gabe von C. Pohl	Pohl, 2005
pUC18T76S	pUC18T7-Derivat (Pardon, 1994) mit dem <i>E. coli ssrS</i> -Gen in der <i>StuI</i> -Schnittstelle nach dem $\Phi 10$ T7-Promotor	Gildehaus, 2001
pUC186S	pUC18-Derivat mit dem <i>E. coli ssrS</i> -Gen inkl. der 'upstream'-Sequenzen in der <i>SmaI</i> -Schnittstelle der MCS (auch: pUC186S-2)	Gildehaus, 2001
p6S-T	pCP1-Derivat, trägt das <i>E. coli ssrS</i> -Gen inkl. 'upstream'-Bereich und Promotoren aus pUC186S (<i>EcoRI/HincII</i>) in der <i>EcoRI/ Ecl136II</i> -Schnittstelle von pCP1	diese Arbeit
pUC18-bolA	pUC18-Derivat, trägt den <i>E. coli bolA</i> -Promotor mit 'upstream'-Region in der <i>Ecl136II</i> -Schnittstelle des pUC18; Freundliche Gabe von B. Reckendrees	Reckendrees, 2004
pUC18-1	Derivat des pUC18, trägt das P1-Fragment des <i>rrnB</i> -Operons aus pKK3535 (<i>SspI/DdeI</i> , 235 bp) in der <i>SmaI</i> -Schnittstelle des pUC18; Freundliche Gabe von R. Wurm	Zacharias <i>et al.</i> , 1990
pbolAT1T2	pCP1-Derivat mit dem <i>E. coli bolA</i> -Promotor inkl. der 'upstream'-Sequenzen aus pUC18-bolA (<i>EcoRI/BsaI</i> , 209 bp) zwischen <i>EcoRI</i> und <i>Ecl136II</i> -Schnittstelle des pCP1	Reckendrees, 2004
pRT3H Δ P2	pBR322-Derivat, trägt den <i>rrnB</i> P1-Promotor, einen Teil des 16S- und 5S RNA-Gens vor den Terminatoren T1T2 des <i>rrnB</i> -Operons (auch: pRT4)	Tippner, 1994

4.3 Oligonukleotide, Nukleinsäuren und Nukleotide

4.3.1 Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide (Primer) wurden bezogen von Thermo Hybaid, INTERACTIVA Division, Ulm oder Metabion, Martinsried

NAME	SEQUENZ 5'→3'	BESCHREIBUNG
Oligo6S-B	CCT GGA ATC TCC GAG ATG CCG C	Bindet Nt 165 bis Nt 184 der <i>E. coli</i> 6S RNA. Primer für PE-Analysen.
6S-Oligo1	GTG GTA TGA AAT ATC GGC	Bindet Nt 38 bis Nt 56 der <i>E. coli</i> 6S RNA. Primer für PE-Analysen und Bestimmung von Transkriptionsstartstellen
6S-Oligo4	GCA TGC TCA CCA ACC GCG GAG C	Bindet Nt 68 bis Nt 89 der <i>E. coli</i> 6S RNA. Primer für PE-Analysen und Bestimmung von Transkriptionsstartstellen
6S-Oligo5	CGT AAG TTA TAG TGC ATA CTC	Komplementär von -200 bis -220 zum 'non template' Strang des <i>ssrS</i> -Gens. Primer für Bestimmung von Transkriptionsstartstellen
#RNA1	TCA GCAA GAG CGC AGA TAC CA	Komplementär von +28 bis +9 zum 'non template' Strang des RNA1-Promotors. Primer für Bestimmung von Transkriptionsstartstellen
RH	Hexamer mit 3'-Wobble	Statistisches Random Hexamer zur RNA-Sequenzierung

4.3.2 DNA-Fragmente

rrnB P1-Fragment

- für *in vitro* Transkriptionen: Hergestellt durch *HincII*/*Ecl136II* Restriktion von pUC18-1, Länge 256 Bp, *rrnB*-P1-Sequenz von -193 bis +63 relativ zum P1-Start
- für Retardierungsanalysen: Hergestellt durch *EcoRI*/*BamHI* Restriktion von pUC18-1 Länge 260 Bp, *rrnB*-P1-Sequenz von -160 bis +59 relativ zum P1-Start. Auch genutzt als 'Standard'

bolA-Fragment

- für *in vitro* Transkriptionen: Hergestellt durch *HincII* Restriktion von pUC18*bolA*, Länge 284 Bp, *bolA*-Sequenz von -160 bis +124 relativ zum *bolA*-Start
- für Retardierungsanalysen: Hergestellt durch *XbaI*/*HincII* Restriktion von pUC18*bolA*, Länge 274 Bp, *bolA*-Sequenz von -160 bis +116 relativ zum *bolA*-Start

ssrS-Fragment1

Hergestellt durch *BglII*/*BamHI* Restriktion von pUC186S, Länge 445 Bp, *ssrS*-Sequenz von -246 bis +199 relativ zum 6S-Start

ssrS-Fragment2

Hergestellt durch *BtgI* Restriktion von pUC186S, Länge 494 Bp, *ssrS*-Sequenz von -410 bis +84 relativ zum 6S-Start

6SInsLong

Hergestellt durch *EcoRI*/*HincII* Restriktion von pUC186S, Länge 699 Bp, Insert für die Klonierung von p6S-T

4.3.3 Nukleinsäuren

PSTVd-RNA

freundliche Gabe von B. Esters
(nach Hecker, 1989)

5S RNA aus *E. coli*

freundliche Gabe von Ü. Pul
(nach Göhringer *et al.*, 1984)

tRNA-Gemisch aus *E. coli*

Boehringer, Mannheim

4.3.4 Nukleotide

Adenosin-5'-triphosphat	Boehringer, Mannheim
Cytidin-5'-triphosphat	Boehringer, Mannheim
Guanosin-5'-triphosphat	Boehringer, Mannheim
Uridin 5'-triphosphat	Boehringer, Mannheim
Adenosin-5'-triphosphat (FPLC Ultra Pure)	Pharmacia, München
Cytidin-5'-triphosphat (FPLC Ultra Pure)	Pharmacia, München
Guanosin-5'-triphosphat (FPLC Ultra Pure)	Pharmacia, München
Uridin 5'-triphosphat (FPLC Ultra Pure)	Pharmacia, München
2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat	Boehringer, Mannheim
2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat	Boehringer, Mannheim
2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat	Boehringer, Mannheim
2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat	Boehringer, Mannheim
2'-Desoxyadenosin-5'- α [³² P]triphosphat	Hartmann, Braunschweig
2',3'-Dideoxyadenosin-5'-triphosphat	Boehringer, Mannheim
2',3'-Dideoxycytidin-5'-triphosphat	Boehringer, Mannheim
2',3'-Dideoxyguanosin-5'-triphosphat	Boehringer, Mannheim
2',3'-Dideoxythymidin-5'-triphosphat	Boehringer, Mannheim
3'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat	TriLink, San Diego, USA
3'-Desoxycytidin-5'-triphosphat	TriLink, San Diego, USA
3'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat	TriLink, San Diego, USA
3'-Desoxyuridin-5'-triphosphat	TriLink, San Diego, USA
Adenosin-5'- γ [³² P]triphosphat	Hartmann, Braunschweig
Adenosin-5'- α [³² P]triphosphat	Hartmann, Braunschweig
Cytidin-5'- α [³² P]triphosphat	Hartmann, Braunschweig
Guanosin-5'- α [³² P]triphosphat	Hartmann, Braunschweig
Uridin-5'- α [³² P]triphosphat	Hartmann, Braunschweig
Guanosin-3',5'-bis(di)phosphat (ppGpp)	freundliche Gabe von B. Reckendrees (nach Krohn und Wagner, 1995)

4.3.5 Molekulargewichtsmarker

1 kB-Leiter	GibcoBRL, Eggenstein
PeqGOLDProtein-Marker	peqlab-Biotechnologie, Erlangen

4.4 Proteine

4.4.1 Enzyme

AMV Reverse Transkriptase	Promega, Madison, USA
Lysozymchlorid	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Phosphatase, alkalisch (CIP)	Boehringer, Mannheim
Proteinase K	Merck, Darmstadt
Pyrophosphatase (PPase)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA

RNase-Inhibitor (RNasin)	Promega, USA
Ribonuklease A	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Ribonuklease T1	Boehringer, Mannheim
T4 DNA-Ligase	Boehringer, Mannheim
T4 Polynukleotidkinase (PNK)	Boehringer, Mannheim
T4 RNA-Ligase	New England Biolabs, USA
<i>E. coli</i> RNA-Polymerase	
Core- und Holo-Enzym	freundliche Gabe von R. Wurm (nach Burgess und Jendrisak, 1975) verändert nach Gonzales <i>et al.</i> , 1977
T7 RNA-Polymerase	freundliche Gabe von B. Esters (nach Hecker, 1989)

4.4.2 Restriktionsendonukleasen

<i>Bam</i> HI	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Bgl</i> II	Boehringer, Mannheim
<i>Btg</i> I	New England Biolabs, USA
<i>Ecl</i> 136II	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Eco</i> RI	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Hinc</i> II	New England Biolabs, USA
<i>Stu</i> I	New England Biolabs, USA
<i>Xba</i> I	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

4.4.2.1 Proteine

σ^{70} -Untereinheit der RNA-Polymerase	freundliche Gabe von R. Wurm (nach Igarashi, 1991, verändert nach Boruhkov und Goldfarb, 1993)
σ^{38} -Untereinheit der RNA-Polymerase	freundliche Gabe von R. Wurm (nach Tanaka <i>et al.</i> , 1993)
FIS	freundliche Gabe von R. Wurm (nach Koch und Kahmann, 1986))
H-NS	freundliche Gabe von R. Wurm (nach Tippner <i>et al.</i> , 1994)
LRP	freundliche Gabe von R. Wurm (verändert nach Zhang, 1995)
StpA	freundliche Gabe von R. Wurm (verändert nach Roesch und Blomfield, 1998)
Rinderserumalbumin (BSA)	New England Biolabs, USA
Rinderserumalbumin (BSA), acetyliert	Serva, Heidelberg

4.5 Puffer und Medien

4.5.1 Standardpuffer

50x TAE-Puffer	2 M Tris-Acetat, pH 7.5 50 mM EDTA
10x TBE-Puffer	0.89 M Tris-Borat, pH 8.3 25 mM EDTA
1x TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 8.0 1 mM EDTA
5x TAE-Probenpuffer	0.025% (w/v) Bromphenolblau 0.025% (w/v) Xylencyanol 50% Glycerin in 5x TAE-Puffer
1x/2x TBE-Probenpuffer	0.025% (w/v) Bromphenolblau 0.025% (w/v) Xylencyanol 50% Glycerin in 1x/ 2x TBE-Puffer
Formamid-Probenpuffer	0.025% (w/v) Bromphenolblau 0.025% (w/v) Xylencyanol 95% (v/v) deionisiertes Formamid 50 mM Tris-Borat, pH 8.3 20 mM EDTA, pH 8.0
Harnstoff-Probenpuffer	0.025% (w/v) Bromphenolblau 0.025% (w/v) Xylencyanol 7 M Harnstoff in 1x oder 2x TBE-Puffer

4.5.2 Medien

YT-Medium	8 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 5 g/l NaCl in <i>Aqua dest.</i> , pH 7.4 mit NaOH
YT-Agar	YT-Medium mit 20 g/l Agar

4.6 Chemikalien

4.6.1 Feinchemikalien

Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agar (BactoAgar)	DIFCO, Detroit, USA
Agarose	Biozym, Hameln
Agarose (Ultra Pure)	Seakem, Hamburg
Amberlite MB-1 (Ionenaustauscher)	ICN Biomedicals, Ohio, USA
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Brij 35	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Dichlordimethylsilan	Janssen Chimica, Brüggen
Dithiothreitol (DTT)	Janssen, Beerse, Belgien
Ethidiumbromid	Boehringer, Mannheim
Ethylendiamintetraacetat(EDTA)	Merck, Darmstadt
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Formamid	J. T. Baker, Deventer, NL
Glucose	Merck, Darmstadt
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glykogen	Boehringer, Mannheim
Harnstoff	J. T. Baker, Deventer, NL
Hefeextrakt	Gibco BRL, Eggenstein
Heparin	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
HEPES	Calbiochem, La Jolla, USA
Kaliumperglutamat	Aldrich Chemie, Steinheim
β -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
N,N'-Methylenbisacrylamid	Serva, Heidelberg
Natriumacetat	Riedel-de Haën, Seelze
Natriumcacodylat	DuPont, Bad Homburg
Natriumdeoxycholat	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Merck, Darmstadt
Polyethylenglykol (PEG6000)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Saccharose	Merck, Darmstadt
Silbernitrat	Roth, Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Merck, Darmstadt
Trypton	DIFCO, Detroit, USA
Xylencyanol	Serva, Heidelberg

4.6.2 Sonstige Chemikalien

Tetenal Roentogen Liquid (Entwickler)	Tetenal Photowerk, Norderstedt
Tetenal Roentogen Superfix (Fixierer)	Tetenal Photowerk, Norderstedt

4.7 Verschiedenes

Bradford-Reagenz	BioRad, Richmond, USA
DE52-Chromatographie-Papier 3MM	Whatman, England
DE81-Papier	Whatman, England
DC-Folie	Machery-Nagel, Düren
MN Faltenfilter	Machery-Nagel, Düren
Röntgenfilme RX	Fuji Photo Film Co. Ltd., Japan
Röntgenfilme, X-OMAT AR	Kodak, New Haven, USA
Verstärkerfolie DuPont Cronex	DuPont, Bad Homburg
Gelbondfolie	PAGfilm FMC, Rockland/Maine, USA
QIAquick Nucleotide Removal Kit	QIAGEN, Hilden
Sterilfilter FB 030/3(0.2 μm)	Schleicher & Schüll, Dassel
Dialyseschläuche, SpectraPor	Spectrum Medical Industries, USA
VS Filtermembranen (0.025 μm)	Millipore GmbH, Neu Isenburg
Plasmid-Sequenzierungen	SeqLab, Göttingen

5 Methoden

5.1 Mikrobiologische Methoden

5.1.1 Arbeitsbedingungen beim Umgang mit Bakterien

Beim Umgang mit Bakterienkulturen wurde stets unter sterilen Bedingungen gearbeitet. Mikrobiologischer Abfall und Arbeitsgerät wurde vor der Entsorgung autoklaviert. Der Umgang mit rekombinanter DNA erfolgte unter Berücksichtigung der gesetzlichen Vorschriften zum Umgang mit gentechnisch veränderten Organismen (GVO).

5.1.1.1 Sterilisation von Lösungen, Glasgeräten und sonstigen Arbeitsmaterialien

Glasgeräte, Lösungen, Medien und andere autoklavierbare Materialien wurden durch Dampfdrucksterilisation (20 min, 134°C, 2-3 bar oder 40 min, 120°C, 1 bar) keimfrei gemacht. Nicht autoklavierbare Lösungen wurden mittels eines 0.2 μm Membranfilters (Schleicher und Schuell) sterilfiltriert.

5.1.2 Kultivierung von Bakterienstämmen

5.1.2.1 Anlegen von Glycerinkulturen (Glycerinstocks)

1 ml einer *E. coli* über Nacht-Kultur wurde in ein Stockgläschen mit 200 μl Glycerin gefüllt und bei mehrfacher Invertierung 30-60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Eine so behandelte Kultur konnte anschließend bei -70°C gelagert werden.

5.1.2.2 Anzucht auf Agarplatten

Bakterienstämme wurden aus Glycerinstocks mit Hilfe einer Impföse auf gegebenenfalls mit entsprechendem Antibiotikum behandelte Agarplatten aufgestrichen und bis zum wachsen von Einzelkolonien bei 37°C inkubiert. Die Agarplatten konnten anschließend bei 4°C über längere Zeiträume (2-8 Wochen) gelagert werden.

5.1.2.3 Anzucht von über Nacht-Kulturen (üN-Kultur)

3 ml YT-Medium wurde mit dem entsprechendem Antibiotikum versetzt und mit einer Einzelkolonie von einer Agarplatte angeimpft. Die Kultur wurde bei 37°C auf einem Schüttler (New Brunswick Scientific Gio Gyrotory) über Nacht inkubiert.

5.1.2.4 Anzucht von über Tag-Kulturen (üT-Kultur)

25 ml YT-Medium wurde mit dem entsprechendem Antibiotikum versetzt und mit 250 μ l aus einer 3 ml *E. coli* üN-Kultur versetzt. Die Kultur wurde dann bei 37°C über Tag geschüttelt (New Brunswick Scientific Gio Gyrotory).

5.1.3 Herstellung kompetenter Zellen nach Dagert und Ehrlich (1979)

Hierzu wurden 100 ml YT-Medium mit 1/100 Volumen aus einer *E. coli* üN-Vorkultur angeimpft und bis zum Erreichen einer optischen Dichte von OD₆₀₀ 0.5 bis 0.6 bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Je 40 ml der Kultur wurden in vorgekühlte Zentrifugenröhrchen gegeben und 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 5 min bei 4500 rpm und 4°C pelletiert (Heareus Megafuge 1.5R). Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen vorsichtig in 20 ml 0.1 M CaCl₂-Lösung bei 0°C resuspendiert und 60 min bei 0°C inkubiert. Im Anschluss folgte eine erneute Pelletierung der Zellen für 5 min bei 4500 rpm und 4°C. Das Zellpellet wurde dann in 2 ml 85 mM CaCl₂, 15% Glycerin erneut aufgenommen, zu je 200 μ l aliquotiert und bis zum Erreichen der höchsten Kompetenz mindestens eine, maximal 24 Stunden bei 4°C inkubiert. Kompetente Zellen, die nicht direkt für Transformationsexperimente benötigt wurden, konnten nach der Inkubation mit flüssigem Stickstoff gefroren und bei -70°C gelagert werden. Die Kompetenz der Zellen nimmt jedoch bei einer Lagerung ab.

5.1.4 Transformation kompetenter Zellen mit Vektor-DNA nach Hanahan (1985)

Für jedes Tranfomationsexperiment wurden 200 μ l kompetente *E. coli* Zellen eingesetzt. Hierzu wurden die Zellen langsam auf Eis aufgetaut und vorsichtig mit 5-20 ng DNA aus einem Ligationsansatz (5.2.7.4) in 10-20 μ l Volumen gemischt. Die Zellen wurden anschließend bei 0°C 60 min inkubiert. Nach dem Hitzeschock (3 min, 42°C) wurde der Ansatz mit 800 μ l vorgewärmten YT-Medium versetzt und weitere 60 min bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert. Danach wurden Aliquots des Transformationsansatzes auf vorgewärmte Agarplatten ausgestrichen und bis zum Anwachsen von Einzelkolonien bei 37°C inkubiert. Die Transformationsrate der kompetenten Zellen pro μ g DNA wurde durch Auszählen der Kolonien unter Berücksichtigung der eingesetzten DNA-Menge und des ausplattierten Volumens (meist 100 oder 200 μ l) bestimmt. Die Transformationsrate ist abhängig von Stamm und Plasmid und liegt im Mittel bei 5×10^4 bis 5×10^5 Transformanden pro μ g DNA.

5.2 Molekularbiologische Methoden

5.2.1 Konzentrationsbestimmungen

5.2.1.1 Streumessung zur Bestimmung von Zelldichten in Flüssigkeiten

Messungen zur Feststellung des Zellwachstums von *E. coli* Kulturen wurden im Beckman Spektralphotometer Modell DU64 durchgeführt. Hierzu wurde ein Aliquot der Zellkultur entnommen und bei einer OD von 600 nm (VIS-Wellenlängenbereich) per Streumessung

vermessen. Die Verdünnung des Aliquots wurde so gewählt, dass die Werte der optischen Dichte im linearen Bereich (OD_{600} zwischen 0.1 und 1.0) lagen.

5.2.1.2 Spektralphotometrische Konzentrationsmessung von Nukleinsäuren

Alle spektralphotometrischen Messungen wurden im Beckman Spektralphotometer Modell DU64 durchgeführt. Die Messung von Nukleinsäuren erfolgte hierbei durch Absorptionsmessung in einer Suprasil-Quarzküvette bei einer Wellenlänge von 260 nm (UV-Wellenlängenbereich). Um eine ideale Messung der Absorptionswerte im linearen Bereich zu erreichen, ist eine optische Dichte der zu messenden Nukleinsäurelösung von A_{260} 0.5 bis 0.8 ideal, Lösungen wurden entsprechend dieser Vorgabe verdünnt. Für die Berechnung der in einer Lösung enthaltenen Menge an reinen Nukleinsäuren gilt die Beziehung:

$$\begin{aligned} 1 A_{260} &= 37 \mu\text{g einzelsträngige NS/ml} \\ 1 A_{260} &= 50 \mu\text{g doppelsträngige NS/ml} \end{aligned}$$

unter der Berücksichtigung des eingesetzten Verdünnungsfaktors.

Weiterhin kann mit einer spektralphotometrischer Messung auch die Reinheit von Nukleinsäuren ermittelt werden. Hierzu wurde ein Spektrum über einen Wellenlängenbereich von 220 bis 330 nm aufgenommen. Der Quotient der Absorptionswerte bei 260 und 280 nm (A_{260}/A_{280}) lässt Rückschlüsse auf die Reinheit der Lösung zu und sollte einen Wert von 1.8 für DNA- und 2.0 für RNA-Lösungen haben. Verunreinigungen durch zum Beispiel Phenol oder Proteine führen zu geringeren Quotienten. Für alle spektralphotometrischen Messungen gilt hierbei: Die Extinktion E oder Absorption A ergibt sich aus:

$$A = E = \log (1/T) = \log (I_0/I)$$

mit:

I = absorbierte Lichtintensität,

I_0 = eingestrahelte Lichtintensität und

T = Transmission = I_0/I

Den Zusammenhang zwischen Extinktion und Konzentration gibt das Lambert-Beersche Gesetz wieder:

$$E = \varepsilon \times c \times d$$

mit:

ε = molarer Extinktionskoeffizient ($10^3 \text{ cm}^2 \times \text{mol}^{-1}$)

c = molare Konzentration ($\text{mol} \times \text{L}^{-1}$) der Lösung

d = Länge des Lichtweges in der absorbierenden Lösung (cm).

Der molare Extinktionskoeffizient ist eine Stoffkonstante und gibt die Absorption einer 1 molaren Lösung einer reinen Verbindung unter Standardbedingungen des Lösungsmittels, der Temperatur und der Wellenlänge wieder.

5.2.1.3 Radioaktivitätsmessung

Bei Proben, welche mit radioaktivem Phosphor (Isotop ^{32}P) markiert wurden, konnte im Tritiumkanal eines Szintillationszählers (Beckman LS 5000 TD) durch Messung der Cerenkow-Strahlung die Menge der enthaltenen Aktivität bestimmt werden.

5.2.1.4 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

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

5.2.1.5 Densitometrie

Zur quantitativen Auswertung der Bandenintensitäten von radioaktiven Proben wurden diese mit einem PhosphoImager-Screen inkubiert und mit einem PhosphoImager (BioImager FAS 3000) gescannt. Die Auswertung und Quantifizierung erfolgte mittels der Programme 'Image Reader Fla V.18E' und 'Image Gauge' der Firma Fuji. Alternativ wurden Autoradiogramme (Röntgenfilme) mittels eines handelsüblichen Durchlicht-Scanners aufgenommen und die digitalisierte Aufnahme über das Programm 'ScionImage' (Release Beta 3b, Scion Corporation) quantifiziert und ausgewertet.

5.2.1.6 Quantifizierungen

Zur Quantifizierungen von Transkriptmengen wurden die entsprechenden Banden von jedem Experiment mittels 'ImageGauge' oder 'ScionImage' gemessen. Die erhaltenen Werte wurden addiert und es wurden Mittelwert und Standardabweichung ermittelt. Zur Bestimmung der Restaktivität wurde der Wert der Banden ohne 6S RNA Zugabe gleich 100% gesetzt. Alle anderen erhaltenen Werte wurden hierauf bezogen.

5.2.2 Isolation von Nukleinsäuren

5.2.2.1 Plasmidisolation im kleinen Maßstab (Minipräp) nach Birnboim und Doly (1979)

E. coli Einzelkolonien von einer Agarplatte wurden in mit dem entsprechendem Antibiotikum versehenen 3 ml YT-Medien über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. 1.5 ml Zellsuspension aus der üN-Kultur wurde durch 3-minütige Zentrifugation bei 12000 rpm im Eppendorfgefäß pelletiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 100 µl Lyselösung I aufgenommen, gevortext und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach

dieser Zeit wurden 200 μl frisch angesetzte Lyselösung II zugefügt, gemischt und weitere 5 min bei 0°C inkubiert. Anschließend wurden 150 μl 3 mM KOAc, pH 4.8 bei 0°C zugegeben und gemischt. Wiederum folgte eine Inkubation für 5 min bei 0°C. Die Suspension wurde für 5 min bei 12000 rpm zentrifugiert (Hettich Mikro22), der Überstand in ein neues Eppendorfggefäß überführt und Phenol/ Chloroform extrahiert (5.2.3.1). Nach Ethanol-fällung (5.2.3.2) und trocknen (3 min, Heto SpeedVac) wurde das Pellet in 15 bis 20 μl *Aqua dest.* aufgenommen. Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde mittels Abschätzung über Agarosegelelektrophorese (5.4.2.1) oder Messung im Spektralphotometer (5.2.1.2) bestimmt und eventuell in Restriktionsanalysen (5.2.7.1) eingesetzt.

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

Lyselösung II: 200 mM NaOH
 1% SDS

5.2.2.2 Isolation von superspiralisierter Plasmid-DNA im großen Maßstab (Maxipräp) nach Hillen *et al.* (1981)

Für die Isolation superspiralisierter plasmidärer DNA im präparativen Ansatz wurde zunächst eine mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzte 25 ml YT-Kultur mit einer *E. coli* Einzelkolonie angeimpft und bei 37°C über Nacht schüttelnd inkubiert. Aus dieser Vorkultur wurde am nächsten Morgen eine ebenfalls mit Antibiotika versetzte 100 ml YT-Kultur 1/100 angeimpft und über Tag bei 37°C geschüttelt. Diese Kultur diente wiederum zum Animpfen einer 800 ml YT-Kultur (mit entsprechendem Antibiotikum), welche ebenfalls bei 37°C auf einem Schüttler über Nacht inkubiert wurde. 400 ml aus der 800 ml μN Kultur wurden in JA10-Becher überführt und 5 min bei 8000 rpm und 4°C zentrifugiert (Beckman Zentrifuge J2-21, JA10-Rotor). Der Überstand wurde verworfen und die Zellpellets wurden in 8 ml Saccharoselösung bei 4°C resuspendiert. Zum Zellaufschluss dienten im folgenden Schritt 3 ml 0.5 M EDTA, pH 8.0 und 3 ml Lysozymlösung. Nach 30-minütiger Inkubation bei 0°C wurden 2 ml Brij-Doc-Lösung hinzugegeben und der Ansatz weitere 10 min bei 0°C inkubiert, gefolgt von 30-minütiger Zentrifugation bei 44000 rpm (Beckman L8-55 Ultrazentrifuge, Rotor Ti55.2, Polycarbonatröhrchen Ti55.2). Der nach der Zentrifugation abgehobene Überstand wurde mit entsprechender Menge RNase A versetzt (Endkonzentration 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 30 min bei 37°C inkubiert, anschließend mit Proteinase K versetzt (Endkonzentration 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und weitere 15 min bei 37°C inkubiert. Die Fällung der Plasmid-DNA erfolgte mit 1/2 Volumen PEG-Lösung für 30 min bei 0°C und nachfolgender Zentrifugation für weitere 30 min bei 10000 rpm und 4°C (Beckman Zentrifuge J2-21; JA17-Rotor und -Becher). Der Überstand wurde abgenommen und zunächst einmal mit TE-gesättigtem Phenol und anschließend wie unter (5.2.3.1) beschrieben mit Phenol/Chloroform extrahiert und mit Ethanol präzipitiert (5.2.3.2). Im Anschluss wurde das getrocknete Pellet in 100-200 μl TE-Puffer aufgenommen und Konzentration und Qualität der Präparation mittels Messung im Spektralphotometer (5.2.1.2) und über Agarosegelelektrophorese (5.4.2.1) bestimmt.

Saccharose-Lösung:	25% Saccharose 50 mM Tris-HCl, pH 8.0
Lysozym-Lösung:	20 mg/ml Lysozymchlorid 50 mM Tris-HCl, pH 8.0
Brij-Doc-Lösung:	2 Volumen 10% Brij 35 1 Volumen 10% Na-Deoxycholat, pH 8.0
RNase A:	20 mg/ml in 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, von DNase-Aktivität befreit (Maniatis <i>et al.</i> 1982)
Proteinase K:	20 mg/ml in <i>Aqua dest.</i>

5.2.3 Reinigung von Nukleinsäuren

5.2.3.1 Phenol/Chloroform-Extraktion zur Reinigung von Nukleinsäuren

1 Volumen TE-gesättigtes Phenol/Chloroform (Verhältnis 1:1) wurde auf die zu extrahierende Lösung gegeben und eine Minute auf dem Vortex vermischt. Die Mischung wurde zur besseren Trennung der Phasen für 5 min bei höchst möglicher Umdrehungszahl zentrifugiert. Nach diesem Schritt enthält die obere, wässrige Phase die Nukleinsäuren und Reste des Phenols. Die untere, phenolische Phase beinhaltet, je nach Ausgangslösung, Proteine und Zellbestandteile. Der wässrige Überstand wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur vollständigen Entfernung des Phenols wurde der wässrige Überstand dann mit einem Volumen Chloroform versetzt, eine Minute auf dem Vortex vermischt und wiederum 5 min zentrifugiert. Der jetzt phenolfreie wässrige Überstand wurde nochmals abgenommen, in ein neues Gefäß überführt und einer ethanolischen Fällung unterzogen.

5.2.3.2 Ethanolfällung zur Konzentration von Nukleinsäuren

Zur Präzipitation von Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen und Überständen wurden diese mit 1/10 Volumen 3 M NaOAc (pH 4.8-5.5) und 2.5-3fachem Volumen absolutem Ethanol (EtOH *abs.*) versetzt (bei 0.3 M Salzkonzentration besitzen Nukleinsäuren das niedrigste Löslichkeitsprodukt). Bei geringen Nukleinsäurekonzentrationen (< 50 ng) wurden zusätzlich noch 1/20 Volumen Glycogen als Fällhilfe verwendet. Die Fällung erfolgte durch Durchfrieren der Lösung in flüssigem Stickstoff oder durch 30-minütige Inkubation bei -20 oder 0°C. Nach der Fällung wurde die Probe ca. 30 min bei höchster Drehzahl zentrifugiert. Der Überstand über dem so erhaltenen Pellet wurde entfernt und das Pellet mit 80% Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde der ethanolische Überstand wiederum abgenommen und das Pellet wurde durch Rotation im Vakuumverdampfer (Heto SpeedVac) getrocknet.

5.2.3.3 Dialyse von DNA und RNA

Dialysen von Nukleinsäuren wurden stets bei 4°C durchgeführt. Dabei wurden kleine Volumina bis 100 μ l mittels eines Membranfilters dialysiert. Der Filter wurde mit der glänzenden Seite nach oben auf den Dialysepuffer gelegt und für einige Minuten vorinkubiert. Anschließend wurde die zu dialysierende Nukleinsäurelösung auf die Mitte des Filters aufgebracht. Nach 1-2 h wurde die Lösung abpipettiert und der Filter wurde mit einem geringen Volumen Puffer gespült.

Große Volumen Nukleinsäurelösungen wurden im Dialyseschlauch (MWCO:6-8000) über Nacht gegen 1 Liter Dialysepuffer (TE) dialysiert. Zur Vorbereitung der Schläuche wurden diese für 10 min in *Aqua dest.* gewaschen, 10 min in 1 mM EDTA gekocht und anschließend in absolutem Ethanol bei 4°C aufbewahrt (Maniatis *et al.*, 1982). Vor der Dialyse wurde der Schlauch für einige Minuten in dem entsprechenden Dialysepuffer gewaschen und äquilibriert.

5.2.4 Gelelektrophoresen

5.2.4.1 Agarose-Gelelektrophorese

Zur analytischen wie präparativen Auftrennung von DNA und RNA wurden 0.5-2%ige Agarosegele verwendet (Maniatis *et al.*, 1982). Die Gellösung (1x TAE-Puffer Endkonzentration) wurde nach dem Aufkochen auf ca. 60°C abgekühlt, mit 0.5 μ g/ml Ethidiumbromid (EtBr) versetzt und als Flachbettgel (14 x 11 cm) gegossen. Kammern, Schlitten und Kämmen für RNA-Proben wurden zuvor für mehrere Stunden mit 0.1% DEPC behandelt, um eventuell vorhandene Nukleasen zu inaktivieren. Die aufzutrennenden Proben wurden mit TAE-Probenpuffer (1x Endkonzentration) versetzt und je nach Größe der zu trennenden Fragmente 1-2.5 h bei 100-120 Volt elektrophoretisiert. Nach der Auftrennung konnten die Nukleinsäuren durch Interkalation des Ethidiumbromids in die doppelsträngigen Bereiche auf einem Transilluminator (Herolab UVT 2035) sichtbar gemacht werden. Zur Dokumentation wurden die Gele über eine CCD-Videokamera (Sanyo) mit UV-Filter aufgenommen und über einen Videoprinter ausgedruckt. Für präparative Agarosegele wurde ausschließlich hochreine Agarose verwendet. Die gewünschten Banden wurden dann aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA über Glaswolle-Extraktion (5.2.5.1) von der Agarose getrennt.

5.2.4.2 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Die native PAGE wurde zur Analyse von DNA und RNA verwendet. Hierzu wurden Gele mit einer Dimension von 200 x 210 x 0.5 mm mit Konzentrationen von 5-10% Gellösung (40% Stammlösung, 46:1 oder 19:1 Acrylamid : Bisacrylamid) verwendet (Maniatis *et al.*, 1982). Zur Polymerisation der Lösung wurden 1/20 Volumen 10% APS und 1/200 Volumen TEMED zugegeben. Die Proben wurden vor dem Auftragen im entsprechenden Volumen TBE-Probenpuffer aufgenommen und mit 0.5 oder 1x TBE-Laufpuffer bei 150-250 Volt aufgetrennt. Für leichtere Handhabung wurde die Gellösung teilweise auf die hydrophile Seite einer Gelbondfolie polymerisiert. Die Banden wurden über Silberfärbung (5.2.6.1) oder Toluidinblaufärbung (5.2.6.2) des Gels sichtbar gemacht.

5.2.4.3 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (dPAGE)

Die denaturierende PAGE wurde genutzt, um Proben Strukturunabhängig zu analysieren. Zur Denaturierung der Proben wurde der Gellösung 7 M Harnstoff zugegeben. Als Standardgellösung diente hierbei eine 10%ige Lösung mit einer Vernetzung von 19 : 1 (Acrylamid : Bisacrylamid). Als Gel- und Elektrophoresepuffer wurde 1x TBE verwendet. Die Lösung wurde nach dem Lösen des Harnstoffs entgast, mit TEMED und APS versetzt und zwischen Glasplatten (400 x 300 x 0.5 mm) gegossen. Die in Formamid- oder Harnstoffprobenpuffer denaturierten Proben wurden bei 75-90 Watt aufgetrennt. Um bei radioaktiven Proben eine Kontamination des Anodenpuffers möglichst gering zu halten, wurde die Anodenseite der Platten vor der Elektrophorese mit DE-81 Ionenaustauscherpapier (Whatman) umwickelt. Banden wurden durch Autoradiographie (5.2.6.4) sichtbar gemacht.

5.2.4.4 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (dPAGE) zur präparativen Aufreinigung von T7-*in vitro* Transkripten

Zur Auftrennung präparativer *in vitro* Transkripte aus RiboMAX-Ansätzen wurde ebenfalls eine denaturierende PAGE (in den Dimensionen 400 x 300 x 0.5 mm) verwendet. Hierfür wurde eine 5%ige Gellösung der Vernetzung 46:1 (Acrylamid : Bisacrylamid) verwendet, wobei zusätzlich 7 M Harnstoff als denaturierendes Agenz zugegeben wurde. Die Proben wurden in 0.5x TBE-Lauf und -Probenpuffer (Endkonzentration) bei 90 W getrennt. RNA-Banden wurden über UV-Shadowing (5.2.6.3) detektiert, aus dem Gel ausgeschnitten und passiv aus dem Gel eluiert.

5.2.4.5 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Um Proteine unter denaturierenden Bedingungen in Abhängigkeit ihres Molekulargewichtes zu trennen, wurde ein diskontinuierliches Gelsystem nach Laemmli (1970) verwendet. Dieses besteht aus einem Sammelgel, das die Proteine zunächst fokussiert, und einem Trenngel, in dem die eigentliche Auftrennung erfolgt. Natriumdodecylsulfat (SDS) führt als denaturierendes Agenz durch hydrophobe Wechselwirkungen des aliphatischen Restes mit entsprechenden Proteinbereichen zur Auffaltung der Proteine. Dieses hat ein festes Verhältnis von Proteinmasse zu Ladung zur Folge, so dass die Auftrennung im elektrischen Feld ausschließlich nach dem Molekulargewicht erfolgt.

Die Proteinproben (etwa 50 ng bis 5 µg in einem Volumen von 10-20 µl) wurden nach Zugabe von 5 µl β-Mercaptoethanol und 10 µl SDS-Probenpuffer für 5 min bei 100 °C denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Spannung (100-120 V) über Nacht. Die anschließende Detektion der Banden erfolgte durch Färbung mit 'Coomassie Brilliant Blue R250'(5.2.6.5).

Trenngellösung: 15% (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)
 125 mM Tris-HCl, pH 6.8
 0.1% (w/v) SDS

Sammelgellösung: 6% (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)
 375 mM Tris-HCl, pH 8.8
 0.1% (w/v) SDS

SDS-Probenpuffer: 128 mM Tris-HCl, pH 6.8
 20.4% (v/v) Glycerin
 2% (w/v) SDS
 0.01% (w/v) Bromphenolblau

Laemmli-Laufpuffer: 50 mM Tris-HCl, pH 8.8
 0.1% (w/v) SDS
 380 mM Glycerin

5.2.4.6 Temperaturgradienten-Gelelektrophorese (TGGE) nach Rosenbaum und Riesner (1987)

Die TGGE ermöglicht eine Strukturanalyse eines RNA oder DNA-Moleküls, indem quer zur Laufrichtung des Gels ein linearer Temperaturgradient angelegt wird. Während der Elektrophorese ist jedes Molekül einer konstanten Temperatur ausgesetzt, bei der es eine für diese Temperatur entsprechende Sekundärstruktur einnimmt. Diese Sekundärstruktur verursacht, je nach ihrem Zustand, eine mehr oder weniger starke Retardierung im Gel. Für die Elektrophorese wurde wie bei der nativen PAGE verfahren, wobei eine Gellösung von 7.5% mit einer 29:1 (Acrylamid:Bisacrylamid) Vernetzung verwendet wurde. Um eine bessere Handhabung des Gels zu ermöglichen, wurde es auf eine Gelbondfolie polymerisiert. Als Gel- und Elektrophoresepuffer wurde 0.5x TBE verwendet. Die RNA-Proben wurden im gleichen Volumen 1x TBE Probenpuffer aufgenommen. Die TGGE wurde in zwei Schritten durchgeführt. Zunächst wurde das auf eine Gelbondfolie polymerisierte Gel auf die bei der niedrigeren Temperatur vortemperierte horizontale Platte gelegt. Für die bessere Wärmeleitung zwischen Platte und Gel diente eine dünne Schicht 30%ige Glycerinlösung. Die RNA-Probe wurde in 1x uRHM-Puffer bei 65°C denaturiert und dann langsam (1°C/min) renaturiert. Hiernach wurde die RNA in Probenpuffer aufgenommen, in die Tasche (1 x 130 x 1.5 mm) gegeben und für 10 min bei 500 V elektrophoretisiert. Im zweiten Schritt wurde nach dem Einlaufen der Probe in das Gel der Temperaturgradient mit zwei Wasserbädern (Haake F3/C Thermostat) angelegt und der lineare Temperaturgradient über einen Zeitraum von 10 bis 15 min eingestellt. Anschließend wurde die Elektrophorese für weitere 2.5 h bei 300 V fortgesetzt. Zur Sichtbarmachung der Probe wurde das Gel silbergefärbt (5.2.6.1), bei radioaktiven Proben autoradiographiert (5.2.6.4). Bei TGGE-Analysen mit Proteinen wurde der auch in den Retardierungsgel-Analysen (5.2.8.10) verwendete Ansatz sechsfach aufskaliert. Die Proben wurden ebenso wie unter (5.2.8.10) beschrieben behandelt und auf die TGGE aufgetragen.

1x uRHM-Puffer: 50 mM Na-Cacodylat, pH 7.2
 100 mM NaCl
 1 mM DTT
 0.5 mM EDTA
 evtl. 5 mM MgCl₂

5.2.5 Elution von Nukleinsäuren aus einer Gelmatrix

5.2.5.1 DNA-Elution aus Agarosegelen über Glaswolle-Extraktion

Für die Glaswolle-Extraktion wurden 0.5 ml Eppendorfgefäße mit einem Loch im Boden im unteren Bereich dicht mit silikonisierter Glaswolle gefüllt. Die aus dem Agarosegel ausgeschnittene Bande wurde in die Gefäße verteilt, die in 1.5 ml Eppendorfgefäße als Auffanggefäße gestellt wurden. Die Proben wurden mehrmals bei 12000 rpm (Hettich Mikro22) kurz zentrifugiert, bis keine Flüssigkeit mehr aus der Probe austrat. Der wässrige Auslauf wurde vereinigt, Phenol/Chloroform extrahiert (5.2.3.1), mit Ethanol präzipitiert (5.2.3.2) und die Konzentration und Reinheit der Präparation wurden über Agarosegelelektrophorese (5.2.4.1) und spektralphotometrische Messung (5.2.2.1) bestimmt.

5.2.5.2 Passive Elution von RNA aus Polyacrylamidgelen

Für die passive Elution wurden nach dem Ausschneiden der Bande aus dem Gel einzelne Gelstücke 2x über Nacht bei 4°C in 800-1000 µl RNA-Elutionspuffer inkubiert. Anschließend wurde der Puffer vorsichtig abgehoben und die aus dem Gel diffundierten Nukleinsäuren aus der Lösung durch Ethanol-fällung (5.2.3.2) isoliert.

RNA-Elutionspuffer: 1x TE mit 300 mM NaOAc, pH 5.0
und 0.1 mM EDTA, pH 8.0

5.2.6 Detektion von Nukleinsäuren und Proteinen

5.2.6.1 Silberfärbung nach Beidler *et al.* (1982)

Durch die Silberfärbung nach Beidler *et al.* können Nukleinsäuremengen ab 5 ng in Polyacrylamidgelen detektiert werden. Nach der Elektrophorese wurde das Gel zunächst 5 min in Fixierlösung I geschwenkt und dann 10 min in Silbernitratlösung inkubiert. Es folgten drei Waschschrte mit *Aqua dest.* für je 1 min. Anschliessend wurde das Gel so lange in frisch angesetzter Entwicklerlösung geschwenkt, bis die Banden die gewünschte Intensität erreicht hatten. Der Entwicklungsprozess wurde durch 5-10-minütiges Schwenken in Fixierlösung II gestoppt.

Fixierlösung I: 10% Ethanol
0.5% Essigsäure

Entwicklerlösung: 15 g NaOH
0.08 g Na₂BH₄
4 ml Formaldehyd
ad 1 l *Aqua dest.*

Fixierlösung II: 0.75% Na₂CO₃

5.2.6.2 Toluidinblau-Färbung

Durch die Toluidinblaufärbung können Nukleinsäuren in einer Gelmatrix nachgewiesen werden. Dazu wurde das Gel eine Stunde in einer 0.1%igen (w/v) Toluidinblau-Lösung

mit 7.5% Essigsäure geschüttelt und anschließend über Nacht in 1% Essigsäure so lange entfärbt, bis der Hintergrund fast vollständig entfärbt war.

5.2.6.3 UV-Shadowing

Zur Detektion präparativer Mengen Nukleinsäure in Polyacrylamidgelen wurden diese nach der Elektrophorese auf eine mit Fluoreszenzindikator beschichtete Dünnschichtchromatographie-Platte (DC-Alufolie Kieselgel 60 F254, Merck) gelegt und von oben mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm bestrahlt. Durch Absorption des UV-Lichtes durch die Nukleinsäure wurde der darunter liegende Fluoreszenzindikator nicht angeregt und die Bande erschien dunkel vor dem übrigen, hell fluoreszierenden Hintergrund.

5.2.6.4 Autoradiographie

Zum Nachweis von radioaktiv markierten Proben wurden Röntgenfilme verwendet, die je nach Expositionsdauer eine Detektion von Banden unterschiedlicher Intensität ermöglichen. Um eine Diffusion der Proben während der Exposition (1-5 Tage) zu vermeiden, wurden die Expositionskassetten (Siemens) bei -20°C gelagert. Bei Verwendung von Verstärkerfolien erfolgte die Exposition bei -70°C. Zur Entwicklung wurde der Film für 1-5 min in Tetenal Röntgenentwickler inkubiert, die Reaktion wurde 30 s in 3%iger Essigsäure gestoppt und der Film wurde für 2-5 min im Tetenal Röntgenfixierbad fixiert.

5.2.6.5 Coomassie-Färbung von Proteinen

Für den Nachweis von Proteinen im SDS-Gel wurde 'Coomassie Brilliant Blue R250' verwendet. Dazu wurde das Gel für 1 Stunde in einer Färbelösung aus 50% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure und 0.1% (w/v) 'Coomassie Brilliant Blue R250' geschüttelt. Anschließend wurde das Gel so lange in einer Entfärbelösung aus 10% (v/v) Methanol und 10% (v/v) Essigsäure geschüttelt, bis der Hintergrund nahezu entfärbt war.

5.2.7 Enzymatische Reaktionen

5.2.7.1 Restriktionshydrolysen von DNA

Mit Hilfe spezifischer Enzyme ist es möglich, DNA an bestimmten Stellen zu schneiden. Diese enzymatischen Restriktionshydrolysen spielen eine wichtige Rolle bei der Analyse von DNA-Fragmenten oder Plasmiden, sind aber ebenso wichtig für die Herstellung und Identifizierung von Klonierungsvektoren. Zur Hydrolyse von plasmidärer DNA wurden ausschließlich Restriktionsenzyme der Typ II Endonukleasen eingesetzt. Solche Enzyme erkennen spezifische, meist palindromische DNA-Sequenzen, binden an diese und hydrolysieren die DNA direkt an diesen Erkennungsstellen (Zabeau und Roberts, 1979). Je nach Restriktionsendonuklease entstehen hierbei DNA-Stränge mit 3'-oder 5'-überhängenden ('sticky') oder glatten ('blunt') Enden. Bei allen Hydrolysen wurde bezüglich Temperatur und Pufferbedingungen gemäß den Vorgaben des Herstellers vorgegangen. Hierbei wurden für analytische Ansätze in der Regel 1-2 µg Plasmid-DNA mit 1 U Enzym/µg DNA in 10-20 µl Gesamtvolumen (mit 1x Endkonzentration des spezifischen Puffers) 1-2 Stunden inkubiert. Für präparative Hydrolysen wurde das Gesamtvolumen so gewählt, dass die DNA-Konzentration von 1 µg/µl Ansatz nicht überschritten wurde. Zur Restriktion

wurde 0.5 U Enzym/ μg DNA eingesetzt und der Ansatz wurde über Nacht inkubiert. Zur Kontrolle der Restriktion wurde nach der Inkubation ein Aliquot des Ansatzes in einer PAGE (5.2.4.2) oder einer Agarosegelelektrophorese (5.2.4.1) aufgetrennt. Bei unvollständiger Hydrolyse wurde das Reaktionsvolumen erhöht, frisches Enzym zugegeben und für weitere 3-4 Stunden inkubiert.

5.2.7.2 Phosphorylierung von DNA Oligonukleotiden

Synthetisch gefertigte Oligonukleotide (Primer) besitzen durch die Herstellung an Festphasen-Membranen kein 5'-Phosphat. Mit der T4-Polynukleotidkinase (PNK) lassen sich Phosphatreste an solche 5'-endständige Hydroxylgruppen anhängen. Nutzt man als Substrat α - ^{32}P ATP, ist es möglich, die Oligonukleotide radioaktiv zu markieren. Hierzu wurden in einem Reaktionsvolumen von 20 μl 10 pmol des zu markierenden Oligonukleotids mit 1 U T4-Polynukleotidkinase und 50 μCi α - ^{32}P ATP in 1x Kinase-Puffer 45 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz zur Inaktivierung des Enzyms bei 68°C für weitere 10 min inkubiert. Nach diesem Schritt folgte die Fällung des markierten Oligonukleotids durch Zugabe von 0.1 Volumen 7.5 M NH_4OAc , pH 5.0, 0.05 Volumen Glykogen (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und 3 Volumen EtOH *abs.* mit flüssigem Stickstoff. Der Ansatz wurde anschließend 30 min bei 12000 rpm (Heraeus) zentrifugiert, das Pellet mit 80%igem Ethanol gewaschen und im Vakuumkondensator getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 20 μl *Aqua dest.* aufgenommen und einige Stunden auf einem Schüttler (Eppendorf) vollständig gelöst. Zur Bestimmung der Markierungs-Effizienz wurde ein 1 μl Aliquot des markierten Oligonukleotids im Szintillationszähler (Beckman LS 5000 TD) vermessen.

1x Kinase-Puffer: 50mM Tris-HCl, pH 7.6
 5 mM DTT
 10 mM MgCl_2
 0.1 mM EDTA, pH 8.0

5.2.7.3 3'-Endmarkierung von RNA mit 5'- ^{32}P pCp

Zur radioaktiven Endmarkierung von RNA nach Bruce und Uhlenbeck (1978) wurde mittels der T4-RNA-Ligase ein radioaktiv markiertes Cytidin an das 3'-Ende der RNA gebunden. Hierzu wurden 0.5 bis 1 μg spezifische RNA mit 4 U T4-RNA-Ligase, 10%DMSO und 20 μCi 5'- ^{32}P pCp in 1x T4-RNA-Ligase Puffer in einem Endvolumen von 20 μl über Nacht bei 4°C umgesetzt. Der Reaktionsansatz wurde nach der Inkubation entweder wie beschrieben mit Ethanol präzipitiert oder mit dem 'QIAquick Nucleotide Removal Kit' (QIAGEN) aufgereinigt. Die Effizienz der Markierung wurde durch Messung der eingebauten Radioaktivität im Szintillationszähler (Beckman LS 5000 TD)(5.2.1.3) bestimmt.

5.2.7.4 Ligationen von DNA-Fragmenten mit T4-Ligase

Für die 'blunt'-Ligation zweier DNA-Fragmente wurden bis zu 200 ng DNA in verschiedenen Verhältnissen von Vektor- zu Insertfragment (1:1 bis 1:500 Verhältnis Vektor:Insert) in einem Reaktionsvolumen von 20 μl mit 10 U T4-Ligase in 1x Ligase-Puffer über Nacht bei 16°C inkubiert. Die Ansätze wurden anschließend in Transformationsexperimente eingesetzt.

1x Ligase-Puffer: 66 mM Tris-HCl, pH 7.5
 1 mM DTT
 5 mM MgCl₂
 1 mM ATP

5.2.7.5 Klenow-Reaktion zur radioaktiven Markierung von DNA-Fragmenten mit 5'-überhängenden Enden

Mit Hilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase I können aufgrund der fehlenden 5'-3'-Exonukleaseaktivität doppelsträngige DNA-Fragmente mit 5'-überhängenden Enden mit den komplementären Nukleotiden aufgefüllt werden. Ebenso ist auch eine radioaktive Markierung durch ein entsprechendes Nukleotid möglich. Zur radioaktiven Markierung wurden im Reaktionsansatz 0.5-1 µg DNA-Fragment mit je 10 mM dCTP, dGTP und dTTP, 2 µCi α-³²[P]dATP) und 5 U Klenow-Polymerase in einem Gesamtvolumen von 25 µl mit 1x Klenow-Puffer für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Erhöhen des Reaktionsvolumens auf 50 µl wurde der Ansatz Phenol/Chloroform extrahiert (5.2.3.1) und gefällt (5.2.3.2). Das getrocknete Pellet wurde in TE-Puffer aufgenommen.

10x Klenow-Puffer : 500 mM Tris-HCl, pH 7.2
 1 mM DTT
 100 mM MgSO₄
 500 µg/mlBSA

5.2.8 Spezielle Methoden

5.2.8.1 'Multiple round-run off' *in vitro* Transkription mit T7-RNA-Polymerase (RiboMAX, Promega)

Das von Promega vertriebene RiboMAX- System erlaubt es, mit der aus dem Phagen T7 gewonnenen RNA-Polymerase *in vitro* große Mengen RNA zu synthetisieren. Als Template für die Polymerase dient hierbei ein spezifisches DNA-Fragment, meist aus einem Vektor, das vor der zu transkribierenden Sequenz den spezifischen Promotor der T7-RNA-Polymerase trägt. Die Polymerase synthetisiert von diesem Promotor aus sequenzspezifisch RNA, bis sie das Ende des Fragments erreicht. Hier 'fällt' sie vom Template ab und kann erneut am Promotor initiieren. Diese Art der Transkription wird deshalb auch als 'multiple round-run off' *in vitro* Transkription bezeichnet. Für die Transkription wurden in einem Gesamtvolumen von 30 µl 3 pmol Template mit 10 mM 4NTP-Mix, 0.1 U/µl PPase, 0.5 U/µl RNasin und 1.1 µl T7 RNA-Polymerase (288 U/µl) in 1x RiboMAX-Puffer für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden nochmals 1.1 µl Polymerase hinzugegeben und für weitere 2 h inkubiert, um die Produkt-Ausbeute zu erhöhen. Für Ansätze im präparativen Maßstab wurden die Komponenten entsprechend acht- oder zehnfach aufskaliert. Die Aufreinigung und Analyse der Transkripte erfolgte mittels dPAGE (5.2.4.3). Zur Herstellung radioaktiv markierter Transkripte wurden zusätzlich zu oben angegebenen Nukleotiden noch 50 µCi Uridin-, Adenin, Guanin oder Cytidin-5'-³²[P]-Triphosphat zum Ansatz gegeben.

5x RiboMAX-Puffer: 400mM HEPES-KOH, pH 7.5
60 mM MgCl₂
10 mM Spermidin
200 mM DTT

5.2.8.2 Alkalische Hydrolyse von RNA

Die limitierte Hydrolyse radioaktiv markierter RNA bei alkalischem pH-Wert führt zu der Bildung einer Vielzahl verschiedener RNA-Fragmente. Die elektrophoretische Trennung eines solchen Gemisches auf einem denatrierenden Gel erzeugt eine 'Leiter', die als Längenstandard für die Interpretation von RNA-Modifikationshydrolysen verwendet werden kann. Radioaktiv endmarkierte 6S RNA (je 0.5 μg) wurden zusammen mit je 5 μg tRNA 'Carrier' in 0.02 ml Alkalipuffer gelöst und 5, 7.5 und 10 Minuten bei 95°C erhitzt. Die Probe wurde sofort auf 0°C abgekühlt und mit Ethanol gefällt (5.2.3.2). Die verschiedenen Präzipitate wurden in Formamidprobenpuffer aufgenommen und gemischt.

Alkali-Puffer: 50mM NaHCO₃/Na₂CO₃, pH 9.5

5.2.8.3 Primer-Extension-Analyse von RNA

Primer-Extension Reaktionen wurden ähnlich der von Stern *et al.* (1988) beschriebenen Methode durchgeführt. Sie dienen zur Analyse von Reaktionen, welche nicht direkt mit 3'-markierter RNA durchgeführt wurden. Bei der Primer-Extension wird die zu analysierende RNA als Template genutzt, von welchem eine virale Reverse Transkriptase (AMV) *in vitro* eine sequenzspezifische 'copy DNA' (cDNA) synthetisiert. Diese cDNA-Fragmente geben indirekt die Fragmentlängen der RNA wieder und können über dPAGE aufgetrennt werden. Für die Primer-Extension wurde zunächst mit α -³²[P]ATP markiertes spezifisches Oligonukleotid an die zu untersuchende RNA hybridisiert. Hierzu wurden 50-300 ng RNA mit 1 μl spezifischem Oligonukleotid (2x 10⁵ - 5x 10⁵ cpm) in 100 mM KCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 in einem Volumen von 7.5 μl bei 65°C für 2 min inkubiert und dann langsam (1°C/min) auf Raumtemperatur ($\leq 28^\circ\text{C}$) abgekühlt. 2 μl dieses Hybridisierungsansatzes wurden anschließend mit 2 μl einer 4dNTP-Lösung und 1 Unit AMV in 1x AMV-Puffer in einem Reaktionsvolumen von 5 μl 30 min bei 42°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 μl Formamid- oder Harnstoff-Probenpuffer gestoppt. Vor dem Auftragen auf eine 10% dPAGE wurden die Proben 3 min bei 96°C denaturiert.

5x AMV-RT-Puffer: 125 mM Tris-HCl
125 mM KCl
125 mM DTT
125 mM MgCl₂

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

5.2.8.4 Primer-Extension-Sequenzierung

Die Primer-Extension-Sequenzierung erfolgte analog zur Primer-Extension-Reaktion (siehe 5.2.8.3), wobei das Volumen der Hybridisierung 8.5 μl betrug. Für die Sequenzierungsreaktion wurden in einem Gesamtvolumen von 6 μl 2 μl des Hybridisierungsansatzes mit 2 μl des jeweiligen d(d)NTP-Mixes und einer Unit AMV-RT in 1x AMV-RT-Puffer 30 min bei 42°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 6 μl Harnstoff-Probenpuffer gestoppt, denaturiert und über dPAGE analysiert.

d(d)NTP-Mix: je 250 μM dATP, dCTP, dGTP, dTTP,

zusätzlich dazu im: A-Mix: 50 μM ddTTP
 C-Mix: 50 μM ddGTP
 G-Mix: 50 μM ddCTP
 T-Mix: 50 μM ddTTP,
 alle in 10 mM Tris-HCl, pH 7.5

5.2.8.5 UV-Quervernetzungsexperimente

UV-Quervernetzungen wurden entweder mit 3'-endmarkierter 6S RNA oder mittels Primer-Extension-Analysen durchgeführt.

UV-Quervernetzungen mit 3'-endmarkierter 6S RNA 1x 10⁶ cpm 3'-endmarkierte 6S RNA pro Ansatz wurden mit etwa 3000 ng RNA Polymerase Holoenzym (σ^{70} in 1x KGlu80 für 30 min bei 30°C inkubiert. Nach der Komplexbildung wurde 200 ng/ μl Heparin als Kompetitor zugefügt. Die Ansätze wurden auf Eis mit 0.9 bis 2.7 J UV-Licht bestrahlt (254 nm Wellenlänge, Stratalinker, Stratagene). Die Ansätze wurden anschließend mit 1 μg RNase A versetzt und 45 min bei 37°C inkubiert. Die Proben wurden auf 1x SDS-Probenpuffer eingestellt und auf ein 15% Laemmli-Gel (5.2.4.5) aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 100 V über Nacht. Die Gele wurden anschließend Coomassie gefärbt und autoradiographiert (5.2.6.4).

UV-Quervernetzungen mit anschließender Primer-Extension-Analyse 100 ng 6S RNA wurden mit etwa 3000 ng RNA Polymerase (Rekonstituierte Holoenzyme (5.2.8.8) oder Core-Enzym) oder mit Sigmafaktoren in 1x KGlu80 für 30 min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde 200 ng/ μl Heparin als Kompetitor dem Ansatz hinzugefügt. Die Proben wurden dann auf Eis mit 1.8- 2.4 J UV-Licht der Wellenlänge 254 nm bestrahlt (Stratalinker, Stratagene). Danach wurden die Proben mit 500 ng Proteinase K versetzt und 1 h bei 37°C inkubiert. Es folgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion (5.2.3.1) mit anschließender Fällung (5.2.3.2). Die gewaschenen und getrockneten Pellets wurden direkt in die Primer-Extension-Reaktion (5.2.8.3) eingesetzt.

5.2.8.6 Northern-Blot-Analysen

Für die Northern-Analyse wurde die Methode nach (Maniatis *et al.* 1989) verwendet. Dazu wurden spezifische RNA oder Transkriptionsansätze über eine native oder denaturierenden Gelelektrophorese getrennt. Das Gel wurde unmittelbar nach der Elektrophorese in

Gegenwart von 5x SSC-Puffer auf eine Nylonmembran übertragen (Hybond N, Amersham). Der Transfer erfolgte passiv über 14-16 Stunden durch Kapillartransfer. Nach dem Transfer wurde die RNA durch Bestrahlung mit UV-Licht (1200 mJ, 254 nm, Stratalinker, Stratagene) kovalent auf der Nylonmembran fixiert. Anschließend konnte die Membran für die Hybridisierung mit ^{32}P -markierten Sonden eingesetzt werden. Dazu wurde sie mit der RNA-haltigen Seite nach innen in eine Glasflasche eingebracht. Nach Zugabe von 20 ml Hybridisierungslösung erfolgte eine Vorinkubation im Hybridisierungssofen (Biometra) für 2 Stunden bei der entsprechenden Hybridisierungstemperatur. Für die Hybridisierung wurden $1\text{-}5 \times 10^6$ cpm ^{32}P -markierte Sonde zu der Membran gegeben und diese 14-16 Stunden bei der entsprechenden Temperatur inkubiert. Danach wurde die Hybridisierungslösung verworfen und die Membran wurde zum entfernen unspezifisch gebundener Sonden 3×30 Minuten mit je 50 ml Waschlösung bei der Hybridisierungstemperatur gewaschen. Die Hybridisierungstemperatur ergab sich aus dem ermittelten T_m -Wert minus 8°C . Um nacheinander verschiedene Sonden gegen die gleich RNA hybridisieren zu können, wurde die Sonde durch dreimaliges einstündiges Waschen mit 50 ml *Aqua dest.* bei 80°C entfernt. Anschließend konnte wie beschrieben eine weitere Sonde eingesetzt werden.

Hybridisierungslösung: 5x SSC-Puffer
7.5% (w/v) SDS
50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Heringssperm-DNA

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

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

5.2.8.7 *In vitro* Transkription mit *E. coli* RNA-Polymerase

Bei der *in vitro* Transkription mit *E. coli* RNA Polymerase handelt es sich um eine ‘multiple round’ *in vitro* Transkription, bei der jede Transkriptionseinheit mehrfach von der *E. coli* RNA-Polymerase abgelesen werden kann. Bei der Verwendung von DNA-Fragmenten ist das Transkriptende festgelegt, ohne dass es einer Terminatorstruktur bedarf (so genannte ‘run off’-Templates). Für die Transkription mit superspiralisierten (‘ccc’) Plasmiden, welche eher die natürlichen Gegebenheiten in der Zelle widerspiegeln, sind jedoch Terminatoren am Ende des gewünschten Transkriptionsbereiches notwendig. An diesen Strukturen stoppt die RNA Polymerase die Transkription und verlässt das Template, um am Promotor neu zu initiieren.

***In vitro* Transkriptionen mit DNA-Fragmenten** In einem Gesamtvolumen von 10 μl wurden 1 nM Template mit 3 nM aktiver RNA-Polymerase (rekonstituierte Enzyme (5.2.8.8), verdünnt in AB-Diluent) mit oder ohne 6S RNA in 1x KGlu80-Premix je nach Versuchsanordnung (siehe Ergebnisse) bei 30°C inkubiert. Um nach Ende der Inkubationszeit neue Initiationen zu verhindern und eine Beendigung aller angefangenen Transkripte zu erzielen, wurde der Ansatz mit 1.5 μl ‘Chase’-Lösung versetzt. Die Reaktion wurde nach weiteren 10 Minuten bei 30°C durch Zugabe von 10 μl Formamid-Probenpuffer inklusive 1000 cpm

radioaktiver Standard-DNA/Ansatz beendet. Ansätze wurden vor der Auftrennung über eine 10% dPAGE (5.2.4.3) 3 Minuten bei 96°C denaturiert und auf Eis abgekühlt.

***In vitro* Transkriptionen mit superspiralisierten Plasmiden** In einem Gesamtvolumen von 10 μ l wurden 5 nM 'ccc'-Template mit 3 nM aktiver RNA-Polymerase (rekonstituierte Enzyme (5.2.8.8)), verdünnt in AB-Diluent) je nach Versuchsanordnung (siehe Ergebnisteil) mit oder ohne 6S RNA in 1x KGlu80 oder KGlu160-Premix 8 min bei 30°C inkubiert. Um nach der Inkubationszeit Neuintiationen zu unterdrücken und begonnene Transkripte zu beenden, wurden 1.5 μ l 'Chase'-Lösung zugegeben und die Ansätze weitere 10 Minuten bei 30°C inkubiert. Hiernach wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 μ l Formamid-Probenpuffer (inklusive 1000 cpm Standard-DNA/Ansatz) beendet. Die Ansätze wurden bei 96°C denaturiert und mittels dPAGE (10%) aufgetrennt.

***In vitro* Transkriptionen mit superspiralisierten Plasmiden und Transkriptionsfaktoren** *In vitro* Transkriptionen mit den Transkriptionsfaktoren FIS, H-NS, LRP und StpA wurden analog zu den oben beschriebenen *in vitro* Transkriptionen durchgeführt. Die Transkriptionsfaktoren wurden hierzu in TGED-Puffer (5.2.8.10) verdünnt und 10 Minuten mit dem Promotor in 1x KGlu80-Premix bei RT vorinkubiert. Anschließend wurde das entsprechende Holoenzym zugegeben und die Reaktion wurde wie beschrieben durchgeführt.

***In vitro* Transkriptionen zur Herstellung größerer Mengen des 'de novo'-Transkripts** Zur Herstellung größerer Mengen des 'de novo'-Transkripts wurden 2.5 μ g 6S RNA mit 20 μ g RNA-Polymerase (supplementiertes σ^{70} -Holoenzym oder rekonstituierte Core-Enzyme) mit je 400 μ M jedes NTPs in 1x KGlu80-Puffer für 30 Minuten bei 30°C inkubiert (insgesamt 1 ml in 10x 100 μ l-Ansätzen). Nach der Inkubation wurden zu jedem Ansatz 10 μ l 'Chase'-Lösung pipettiert und für weitere 20 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Proben mittels nativer PAGE (5%, 46:1) aufgetrennt und die entsprechenden Banden wurden wie unter (5.2.5.2) beschrieben aus dem Gel eluiert. Zur Herstellung radioaktiver Transkripte wurde der Ansatz analog zu der '*in vitro* Transkription mit DNA-Fragmenten' durchgeführt, wobei jedoch anstelle des DNA-Templates 6S RNA angeboten wurde, sowie 20 nM RNA-Polymerase (supplementiertes σ^{70} -Holoenzym oder rekonstituierte Core-Enzyme). Hierfür wurde der oben beschriebene Ansatz auf das 10fache angehoben. Nach der Reaktion wurde der Ansatz mit 1 U DNase I (RNase frei) versetzt, 1 Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend mittels des 'QIAquick Nucleotide Removal Kit' (QIAGEN) aufgereinigt.

AB-Diluent:	10 mM Tris-HCl, pH 8.0 10 mM MgCl ₂ 10 mM β -Mercaptoethanol 50 mM NaCl 100 μ g/ml BSA, acetyliert 0.1 mM EDTA, pH 8.0 5% (v/v) Glycerin
KGlu80-Premix:	je 65 μ M ATP, CTP, GTP 5 μ M UTP 5 μ Ci (133nM) α - ³² [P]UTP

	x nM spezifisches DNA-Template in 10x KGlu80
KGlu160-Premix:	wie KGlu80-Premix, jedoch in 10x KGlu160
1x KGlu80-Puffer:	50 mM Tris-Acetat, pH 8.0 10 mM Mg-Acetat 0.5 mM DTT 0.1 mM EDTA 100 μ g/ml BSA, acetyliert 80 mM Kaliumglutamat
1x KGlu160-Puffer:	wie 1x KGlu80-Puffer, jedoch mit 160 mM Kaliumglutamat
‘Chase’-Lösung:	je 2 mM ATP, CTP, GTP, UTP 2 mg/ml Heparin 1 mM Tris-HCl, pH 7.0
FA-Probenpuffer:	95 % Formamid (deionisiert) 20 mM EDTA pH 8.0
Standard-DNA:	Als Standard wurde ein DNA-Fragment mit einer Länge von 260 Bp verwendet (pUC18-1 <i>Bam</i> HI/ <i>Eco</i> RI)

5.2.8.8 Rekonstitution von σ^{70} - und σ^{38} -Holoenzymen

Die in dieser Arbeit verwendeten DNA-abhängigen RNA-Polymerasen wurden durch Reassemblierung des Core-Enzyms mit den entsprechenden σ -Faktoren selbst hergestellt. Das Core-Enzym wie auch die σ -Untereinheiten lagen in hoher Reinheit vor. Zur Rekonstitution von Holoenzymen mit den spezifischen Sigmafaktoren für exponentielles (σ^{70}) und stationäres (σ^{38}) Wachstum wurde die gewünschte Menge aktiver Core-Enzyme vorgelegt, wenn nötig mit AB-Diluent verdünnt und mit entsprechender Menge Sigmafaktor gemischt und 1 Stunde auf Eis inkubiert. Die σ -Faktoren wurden wenn nötig ebenfalls in AB-Diluent verdünnt. Die zur Rekonstitution benötigten molaren Verhältnisse von Core-Enzym zu σ -Faktoren wurden experimentell bestimmt (Reckendrees, 2004) und betragen für:

$$\begin{aligned}\text{Core} : \sigma^{70} &= 1:15 \\ \text{Core} : \sigma^{38} &= 1:180 \text{ oder } 1:500\end{aligned}$$

5.2.8.9 Bestimmung von Transkriptionsstartstellen

Die nukleotidgenaue Bestimmung der Transkriptionsstartstellen von Promotoren erfolgte durch indirekte Betrachtung von *in vitro* Transkripten über die Synthese einer cDNA per Primer-Extension (5.2.8.3). Die *in vitro* Synthese der mRNA von den plasmidär codierten Promotoren P1 und P2 des *ssrS*-Gens und der RNA1 erfolgte in Anlehnung an die Transkriptionsbedingungen mit superhelikalen Templates. Da die Elongationszeit

nicht die Qualität der Transkriptionsprodukte beeinflusst, wurde zu Erhöhung der mRNA-Ausbeuten die Inkubationszeit verlängert. In einem Reaktionsvolumen von 200 μl wurden 10 nM superspiralisiertes Template mit 6 nM aktivem σ^{70} - oder σ^{38} -Holoenzym und 65 μM ATP, CTP, GTP und UTP in 1x KGlu80-Puffer 30 Minuten bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden der Ansatz mit 30 μl 'Chase'-Lösung versetzt und für weitere 20 Minuten bei 30°C inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend zur Inhibierung der RNA-Polymerase für 3 Minuten auf 68°C erhitzt. Danach wurden 10 U DNase I (RNase frei) zugegeben und der Ansatz wurde eine Stunde bei 37°C inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend mit Phenol/Chloroform extrahiert und mit Ethanol gefällt. Das getrocknete Pellet wurde direkt in Primer-Extension-Analysen (5.2.8.3) eingesetzt.

5.2.8.10 Retardierungsanalysen (Gelshift-Analysen)

Gelshift-Analysen zur Bestimmung von Polymerase-DNA- oder Polymerase-RNA Komplexen RNA-Polymerase-Komplexe mit Promotorfragmenten oder (6S)RNA wurden mit Hilfe von Retardierungsgelen analysiert. Unter nativen Bedingungen wurden die Komplexe auf Polyacrylamidgelen aufgetrennt, wobei die Komplexe im Vergleich zu der freien DNA oder RNA deutlich verzögert laufen. Retardierungsanalysen ermöglichen die Untersuchung des Bindeverhaltens der RNA-Polymerase unter verschiedenen Bedingungen. Die Bedingungen wurden modifiziert nach Garner und Revzin (1981) und Nachaliel *et al.* (1989). Zur Identifikation der Komplexe an radioaktiv markierten Promotorfragmenten (5.2.7.4) oder radioaktiv markierter RNA (5.2.7.3) wurde folgende Standardansatz genutzt:

3 nM	aktive RNA-Polymerase (rekonstituierte Enzyme (x))
1 nM	radioaktiv markiertes Promotorfragment oder
9 nM	radioaktiv markierte (6S) RNA
	(500 μM erstes und zweites Startnukleotid)
	in 1x KGlu80 ad 10 μl mit <i>Aqua dest.</i>

Der Ansatz wurden 10 Minuten bei 30°C zur Komplexbildung inkubiert. Neuintiationen wurden durch Zugabe von Heparin 50-200 ng/ μl Ansatz verhindert. Anschließend wurde die Probe auf 5% Glycerin (v/v) eingestellt und auf einem 5%igen PAA-Gel (46:1 Acrylamid:Bisacrylamid) bei 30 mA 2-3 Stunden. Um ein Aufheizen des Gels zu verhindern, wurde ein Ventilator vor die Gelapparatur gestellt.

Gelshift-Analysen mit DNA-Promotorfragmenten und Transkriptionsfaktoren Mit der Methode der Gelshift-Analyse kann das Bindeverhalten von Transkriptionsfaktoren an einen spezifischen Promotor untersucht werden. Proteine, die spezifisch an ein DNA-Promotorfragment gebunden sind, laufen im nativen Gel im Vergleich zur freien DNA verzögert. Für die Analysen mit radioaktiv markierter DNA wurde folgender Standardansatz gewählt:

2 nM	radioaktiv markiertes Promotorfragment
x μM	Transkriptionsfaktor, verdünnt in <i>TGED</i> ₃₀₀
	in 1x Bindepuffer ad 15 μl mit <i>Aqua dest.</i>

Der Ansatz wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Unspezifische Bindungen wurden durch Zugabe von 50 ng Heparin/ μl Ansatz verhindert. Die Probe wurde mit 5

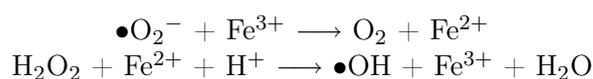
μ l Auftragungspuffer (0.02% Xylencyanolblau, 0.02% Bromphenolblau, 5% Glycerin (v/v) in 2x TBE) versetzt und auf ein 5%iges natives PAA-Gel (46:1 Acryamid : Bisacrylamid) aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 30 mA 2-4 Stunden. Um ein Aufheizen des Gels zu verhindern, wurde ein Ventilator vor die Apparatur gestellt.

1x TGED-Puffer: 10 mM Tris-HCl, pH 8.0
 5% Glycerin
 0.1 mM EDTA, pH 8.0
 0.1 mM DTT
 100 mM (TGED₁₀₀) oder 300 mM (TGED₃₀₀) NaCl

1x Bindepuffer: 500 mM Tris/HCl, pH 7.4
 700 mM KCl
 NaCl 150 mM
 10 mM EDTA, pH 8.0
 100 mM β -Mercaptoethanol

5.2.8.11 Hydroxylradikal-‘Footprints’ von RNA

Hydroxylradikal-‘Footprints’ von RNA wurden in Anlehnung an die von (Hüttenhofer und Noller (1992) und Schickor und Heumann (1994)) beschriebenen Methoden durchgeführt. Mit dieser Methode können spezifische Kontakte, die z.B. ein Protein mit einer RNA eingehen, gemappt werden. Hydroxylradikale (starkes Oxidationsmittel) entstehen bei der Dekompensation von Wasserstoffperoxid unter der Beteiligung von Metallionen als Katalysator. Mit Eisen als Katalysator lässt sich der Mechanismus in der klassischen ‘Fenton-Reaktion’ beschreiben (Kappus, 1981).



Die entstehenden Hydroxylradikale sind so reaktiv, dass sie direkt mit benachbarten Molekülen reagieren. Hydroxylradikal-‘Footprints’ mit 6S RNA und RNA-Polymerase (E70 und E38) wurden im ‘Damage-Selection’-System mit 3’-endmarkierter 6S RNA durchgeführt. Hierbei wurde zunächst die RNA mit Hydroxylradikalen statistisch modifiziert. Bei einer anschließenden Komplexbildung bindet die RNA-Polymerase nur an die Bereiche, die für eine Bindung noch ausreichend sind.

3’-³²[P]pCp-markierte 6S RNA (1-4x 10⁶ cpm) wurde wie folgt mit Hydroxylradikal-‘Footprint’-Reagenzien behandelt: je 1 μ l H₂O₂ und Ascorbinsäure wurden auf die eine Seite des Deckels des Eppendorfgefäßes gegeben, Fe(NH₄)₂(SO₄)₂ und EDTA auf die andere. Die Reaktanden wurden im Deckel gemischt, durch kurzes Zentrifugieren in die Probe gebracht und bei 0°C für 10 min inkubiert. Hiernach wurden die Proben mit Phenol/Chloroform extrahiert (5.2.3.1), gefällt, gewaschen und getrocknet. Die getrockneten

Pellets wurden in TE-Puffer aufgenommen. Die so behandelte 6S RNA wurde dann zur Komplexbildung mit 20 nM RNA-Polymerase (rekonstituierte Enzyme) in 1x KGlu80-Puffer (5.2.8.7) 30 Minuten bei 30°C inkubiert und anschließend mit 200 ng Heparin/ μ l Ansatz versehen. Die Komplexe wurden dann über ein natives 5%iges PAA-Gel (46:1) 3 h bei 30 mA und Ventilator aufgetrennt. Die Komplexbanden und die freie 6S RNA wurden aus dem Gel ausgeschnitten und zwei mal über Nacht passiv aus dem Gel eluiert (Elutionspuffer: 300 mM NaOAc, pH 5.0; 0.1 mM EDTA, pH 8.0 in TE-Puffer). Der Überstand wurde mit Ethanol gefällt, die Pellets in 5 μ l Formamidprobenpuffer resuspendiert und über eine 10%ige dPAGE aufgetrennt und anschließend autoradiographiert.

Hydroxylradikal-‘Footprint’-

Reagentien: 50 mM Fe(NH₄)₂(SO₄)₂
 2.5% H₂O₂
 100 mM EDTA, pH 8.0
 250 mM Na-Ascorbat

5.2.8.12 2D-‘Fingerprint’-Analysen von RNA

Die 2D-‘Fingerprint’-Analyse ermöglicht die Auftrennung verschiedener radioaktiv markierter RNA-Oligonukleotide nach einer enzymatischen Spaltung der RNA.

Hierzu wurde zunächst mit α -³²[P]GTP radioaktiv markierte 6S RNA und ‘de novo’-Transkript über *in vitro* Transkription mit T7- oder *E. coli* RNA-Polymerase wie beschrieben (5.2.8.1 und 5.2.8.7) hergestellt. Nach der Transkription wurden die Proben über das ‘QIAquick Nucleotide Removal Kit’ (QIAGEN) aufgereinigt, um restliche Nukleotide und die Enzyme zu entfernen. Um einen vollständigen Verdau mit RNase T1 zu erreichen, wurden die Proben mit 5 U RNase T1 für 45 min bei 37°C in einem Gesamtvolumen von 10 μ l inkubiert. 5 μ l aus diesem Ansatz wurden direkt in das gleiche Volumen Formamidprobenpuffer gegeben und über eine 20%ige dPAGE aufgetrennt. Der Rest des Ansatzes wurde über eine 2-Dimensionale Dünnschichtchromatographie analysiert.

Die Trennung wird durch zwei chromatographische Schritte in unterschiedlichen Fließmitteln durchgeführt. Mit Polyethylenimin imprägnierte Dünnschichtplatten (20 x 20 cm) wurden vor der Chromatographie in 2 M Ameisensäure/ Pyridin (pH 2.2) und anschließend in *A. dest.* gewaschen und getrocknet. Die Probe wurde auf die Dünnschichtplatte gegeben und nach dem Antrocknen zunächst in *A. dest.* bis 1 cm über den Auftragungspunkt chromatographiert. Nach diesem Vorlauf erfolgte die Trennung in der 1. Dimension bis 1 cm unter den Rand der Chromatographieplatte. Nach der Trennung in der 1. Dimension wurden die Platten mit 70% Ethanol gewaschen und im Abzug getrocknet. Anschließend erfolgte nach einem erneuten Vorlauf mit *A. dest.* (1 cm) die Trennung in der 2. Dimension. Hierfür wurden die Platten um 90° gedreht. Die Platten wurden nach dem Lauf erneut mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und anschließend autoradiographiert.

Fließmittel 1. Dimension: 7.4 M Ameisensäure (28%)
 5 M Harnstoff

Fließmittel 2. Dimension: 1 M Ameisensäure
 4 M Harnstoff, mit Pyridin auf pH 4.3 eingestellt.

5.2.8.13 Sequenzierung von RNA

Die Sequenzierung des ‘*de novo*’-Transkriptes der 6S RNA erfolgte nach dem Kettenabbruchverfahren (Axelrod *et al.*, 1978). Hierbei wurden bei der Elongationsreaktion einer *in vitro* Transkription mit *E. coli* RNA-Polymerase und 6S RNA 3′-Deoxynukleotide (3′-dNTPs) als Substrate angeboten. 500-1000 nM 6S RNA wurden mit 20 nM rekonstituierter RNA-Polymerase (E70 und E38, siehe 5.2.8.8) in Gegenwart von 100 μ M spezifischem Nukleotid (ATP, CTP, GTP), 100 μ M UTP 400, μ M der übrigen Nukleotide, 5 μ Ci α -³²[P]UTP und 100 μ M (3′-dCTP: 500 μ M) des 3′-dNTPs in 1x KGlu80 Puffer bei 30°C 20 Minuten inkubiert. Nach Zugabe der ‘Chase’-Lösung wurden die Proben weitere 10 Minuten bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend auf die Hälfte ihres Volumens einrotiert, mit Formamid-Probenpuffer versetzt, auf eine 10%ige dPAGE aufgetragen und anschließend autoradiographiert. Die Tabelle 5.1 zeigt die Zusammensetzung der Nukleotide in den einzelnen Sequenzierungsreaktionen.

Tabelle 5.1: Nukleotidzusammensetzung der einzelnen Sequenzierungsreaktionen.

A	C	G	U
ATP (100 μ M)	CTP (100 μ M)	GTP (100 μ M)	—
GTP,CTP (400 μ M)	GTP,ATP (400 μ M)	ATP,CTP (400 μ M)	ATP,CTP,GTP (400 μ M)
UTP (5 μ M)			
α - ³² [P]UTP (5 μ M)			
3′-dATP (100 μ M)	3′-dCTP (100 μ M)	3′-dGTP (100 μ M)	3′-dUTP (100 μ M)

6 Literaturverzeichnis

Aldea, M., Hernandez-Chico, C., de la Campa, A. G., Kushner, S. R. and Vicente, M. (1988). Identification, cloning, and expression of *bolA*, an *ftsZ*-dependent morphogene of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **170** (11): 5169-5176

Allen, T. A., Von Kaenel, S., Goodrich, J. A. and Kugel, J. F. (2004). The SINE-encoded mouse B2 RNA represses mRNA transcription in response to heat shock. *Nat Struct Mol Biol.* **11**(9): 816-821

Altuvia, S., Weinstein-Fischer, D., Zhang, A., Postow, L. and Storz, G. (1997). A small, stable RNA induced by oxidative stress: role as a pleiotropic regulator and antimutator. *Cell.* **90** (1): 43-53

Altuvia, S., Zhang, A., Argaman, L., Tiwari, A. and Storz, G. (1998). The *Escherichia coli* OxyS regulatory RNA represses *fhfA* translation by blocking ribosome binding. *EMBO J.* **17** (20): 6069-6075

Argaman, L., Hershberg, R., Vogel, J., Bejerano, G., Wagner, E. G., Margalit, H. and Altuvia, S. (2001). Novel small RNA-encoding genes in the intergenic regions of *Escherichia coli*. *Curr Biol.* **11** (12): 941-950

Arnqvist, A., Olsen, A. and Normark, S. (1994). Sigma S-dependent growth-phase induction of the *csgBA* promoter in *Escherichia coli* can be achieved *in vivo* by $\sigma 70$ in the absence of the nucleoid-associated protein H-NS. *Mol Microbiol.* **13** (6): 1021-1032

Artsimovitch, I. and Landick, R. (2000). Pausing by bacterial RNA polymerase is mediated by mechanistically distinct classes of signals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97** (13): 7090-7095

Axelrod, V. D., Vartikyan, R. M., Aivazashvili, V. A. and Beabealashvili, R. S. (1978). Specific termination of RNA polymerase synthesis as a method of RNA and DNA sequencing. *Nucleic Acids Res.* **5** (10): 3549-3563

Barrick, J. E., Sudarsan, N., Weinberg, Z., Ruzzo, W. L. and Breaker, R. R. (2005). 6S RNA is a widespread regulator of eubacterial RNA polymerase that resembles an open promoter. *RNA* **11**(5):774-84

Barth, M., Marschall, C., Muffler, A., Fischer, D. and Hengge-Aronis, R. (1995). Role for the histone-like protein H-NS in growth phase-dependent and osmotic regulation of sigma S and many sigma S-dependent genes in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **177** (12): 3455-3464

- Becker, G. and Hengge-Aronis, R. (2001). What makes an *Escherichia coli* promoter sigma(S) dependent? Role of the -13/-14 nucleotide promoter positions and region 2.5 of sigma(S). *Mol Microbiol.* **39** (5): 1153-1165
- Beidler, J. L., Hilliard, P. R. and Rill, R. L. (1982). Ultrasensitive staining of nucleic acids with silver. *Anal Biochem.* **126** (2): 374-380
- Benne, R. (1996). RNA editing. The long and the short of it. *Nature.* **380** (6573): 391-392
- Benne, R. (1996). RNA editing: how a message is changed. *Curr Opin Genet Dev.* **6** (2): 221-231
- Beutel, B. A. and Record, M. T., Jr. (1990). *E. coli* promoter spacer regions contain non-random sequences which correlate to spacer length. *Nucleic Acids Res.* **18** (12): 3597-3603
- Birnboim, H. C. and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7** (6): 1513-1523
- Borukhov, S. and Goldfarb, A. (1993). Recombinant *Escherichia coli* RNA polymerase: purification of individually overexpressed subunits and *in vitro* assembly. *Protein Expr Purif.* **4** (6): 503-511
- Borukhov, S. and Severinov, K. (2002). Role of the RNA polymerase sigma subunit in transcription initiation. *Res Microbiol.* **153** (9): 557-562
- Branch, A. D. and Robertson, H. D. (1984). A replication cycle for viroids and other small infectious RNA's. *Science.* **223** (4635): 450-455
- Brescia, C. C., Mikulecky, P. J., Feig, A. L. and Sledjeski, D. D. (2003). Identification of the Hfq-binding site on DsrA RNA: Hfq binds without altering DsrA secondary structure. *RNA.* **9** (1): 33-43
- Brinkman, A. B., Ettema, T. J., de Vos, W. M. and van der Oost, J. (2003). The Lrp family of transcriptional regulators. *Mol Microbiol.* **48** (2): 287-294
- Brownlee, G. G. (1971). Sequence of 6S RNA of *E. coli*. *Nat New Biol.* **229** (5): 147-149
- Brownlee, G. G., Sanger, F. and Barrell, B. G. (1967). Nucleotide sequence of 5S-ribosomal RNA from *Escherichia coli*. *Nature.* **215** (102): 735-736
- Bruce, A. G. and Uhlenbeck, O. C. (1978). Reactions at the termini of tRNA with T4 RNA ligase. *Nucleic Acids Res.* **5** (10): 3665-3677
- Calvo, J. M. and Matthews, R. G. (1994). The leucine-responsive regulatory protein, a global regulator of metabolism in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev.* **58** (3): 466-490

-
- Camarero, J. A., Shekhtman, A., Campbell, E. A., Chlenov, M., Gruber, T. M., Bryant, D. A., Darst, S. A., Cowburn, D. and Muir, T. W. (2002). Autoregulation of a bacterial sigma factor explored by using segmental isotopic labeling and NMR. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99** (13): 8536-8541
- Campbell, E. A., Muzzin, O., Chlenov, M., Sun, J. L., Olson, C. A., Weinman, O., Trester-Zedlitz, M. L. and Darst, S. A. (2002). Structure of the bacterial RNA polymerase promoter specificity sigma subunit. *Mol Cell.* **9** (3): 527-539
- Cech, T. R. (1986). Biologic catalysis by RNA. *Harvey Lect.* **82** 123-144
- Cech, T. R. (2002). Ribozymes, the first 20 years. *Biochem Soc Trans.* **30** (Pt 6): 1162-1166
- Cech, T. R., Zaug, A. J. and Grabowski, P. J. (1981). *In vitro* splicing of the ribosomal RNA precursor of *Tetrahymena*: involvement of a guanosine nucleotide in the excision of the intervening sequence. *Cell.* **27** (3 Pt 2): 487-496
- Chamberlin, M. J., Nierman, W. C., Wiggs, J. and Neff, N. (1979). A quantitative assay for bacterial RNA polymerases. *J Biol Chem.* **254** (20): 10061-10069
- Checroun, C., Bordes, P., Leroy, O., Kolb, A. and Gutierrez, C. (2004). Interactions between the 2.4 and 4.2 regions of sigmaS, the stress-specific sigma factor of *Escherichia coli*, and the -10 and -35 promoter elements. *Nucleic Acids Res.* **32** (1): 45-53
- Colland, F., Barth, M., Hengge-Aronis, R. and Kolb, A. (2000). Sigma factor selectivity of *Escherichia coli* RNA polymerase: role for CRP, IHF and LRP transcription factors. *EMBO J.* **19** (12): 3028-3037
- Colland, F., Fujita, N., Ishihama, A. and Kolb, A. (2002). The interaction between sigmaS, the stationary phase sigma factor, and the core enzyme of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Genes Cells.* **7** (3): 233-247
- Crick, F. H. (1968). The origin of the genetic code. *J Mol Biol.* **38** (3): 367-379
- Cui, Y., Wang, Q., Stormo, G. D. and Calvo, J. M. (1995). A consensus sequence for binding of Lrp to DNA. *J Bacteriol.* **177** (17): 4872-4880
- Dagert, M. and Ehrlich, S. D. (1979). Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene.* **6** (1): 23-28
- Dame, R. T., Wyman, C., Wurm, R., Wagner, R. and Goosen, N. (2002). Structural basis for H-NS-mediated trapping of RNA polymerase in the open initiation complex at the *rrnB* P1. *J Biol Chem.* **277** (3): 2146-2150
- Darst, S. A., Polyakov, A., Richter, C. and Zhang, G. (1998). Structural studies of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* **63** 269-276

- Delihias, N. (1995). Regulation of gene expression by *trans*-encoded antisense RNAs. *Mol Microbiol.* **15** (3): 411-414
- Dennis, C. (2002). Small RNAs: the genome's guiding hand? *Nature.* **420** (6917): 732
- Dennis, C. (2002). The brave new world of RNA. *Nature.* **418** (6894): 122-124
- Dennis, P. P., Ehrenberg, M. and Bremer, H. (2004). Control of rRNA synthesis in *Escherichia coli*: a systems biology approach. *Microbiol Mol Biol Rev.* **68** (4): 639-668
- Dennis, P. P., Omer, A. and Lowe, T. (2001). A guided tour: small RNA function in *Archaea*. *Mol Microbiol.* **40** (3): 509-519
- Ding, Q., Kusano, S., Villarejo, M. and Ishihama, A. (1995). Promoter selectivity control of *Escherichia coli* RNA polymerase by ionic strength: differential recognition of osmoregulated promoters by E σ D and E σ S holoenzymes. *Mol Microbiol.* **16** (4): 649-656
- Doherty, E. A. and Doudna, J. A. (2000). Ribozyme structures and mechanisms. *Annu Rev Biochem.* **69** 597-615
- Doherty, E. A. and Doudna, J. A. (2001). Ribozyme structures and mechanisms. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* **30** 457-475
- Dombroski, A. J., Walter, W. A. and Gross, C. A. (1993). Amino-terminal amino acids modulate sigma-factor DNA-binding activity. *Genes Dev.* **7** (12A): 2446-2455
- Dorman, C. J., Hinton, J. C. and Free, A. (1999). Domain organization and oligomerization among H-NS-like nucleoid-associated proteins in bacteria. *Trends Microbiol.* **7** (3): 124-128
- Ebright, R. H. and Busby, S. (1995). The *Escherichia coli* RNA polymerase alpha subunit: structure and function. *Curr Opin Genet Dev.* **5** (2): 197-203
- Eddy, S. R. (1999). Noncoding RNA genes. *Curr Opin Genet Dev.* **9** (6): 695-699
- Espinoza, C. A., Allen, T. A., Hieb, A. R., Kugel, J. F. and Goodrich, J. A. (2004). B2 RNA binds directly to RNA polymerase II to repress transcript synthesis. *Nat Struct Mol Biol.* **11** (9): 822-829
- Farewell, A., Kvint, K. and Nystrom, T. (1998). Negative regulation by RpoS: a case of sigma factor competition. *Mol Microbiol.* **29** (4): 1039-1051
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. and Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* **391** (6669): 806-811

-
- Flores, R., Delgado, S., Gas, M. E., Carbonell, A., Molina, D., Gago, S. and De la Pena, M. (2004). Viroids: the minimal non-coding RNAs with autonomous replication. *FEBS Lett.* **567** (1): 42-48
- Franze de Fernandez, M. T., Eoyang, L. and August, J. T. (1968). Factor fraction required for the synthesis of bacteriophage Q β -RNA. *Nature.* **219** (154): 588-590
- Gaal, T., Ross, W., Estrem, S. T., Nguyen, L. H., Burgess, R. R. and Gourse, R. L. (2001). Promoter recognition and discrimination by E σ S RNA polymerase. *Mol Microbiol.* **42** (4): 939-954
- Garner, M. M. and Revzin, A. (1981). A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the *Escherichia coli* lactose operon regulatory system. *Nucleic Acids Res.* **9** (13): 3047-3060
- Germer, J., Becker, G., Metzner, M. and Hengge-Aronis, R. (2001). Role of activator site position and a distal UP-element half-site for sigma factor selectivity at a CRP/H-NS-activated sigma(s)-dependent promoter in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* **41** (3): 705-716
- Gilbert, W. (1986). The RNA World. *Nature.* **319**: 618
- Gildehaus, N. (2001) Strukturelle und funktionelle Charakterisierung der 6S RNA aus *E. coli* und ihre Beteiligung an der Ausbildung eines Transkriptionskomplexes. Diplomarbeit, Institut für Physikalische Biologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Düsseldorf
- Glaser, G., Sarmientos, P. and Cashel, M. (1983). Functional interrelationship between two tandem *E. coli* ribosomal RNA promoters. *Nature.* **302** (5903): 74-76
- Gonzalez, N., Wiggs, J. and Chamberlin, M. J. (1977). A simple procedure for resolution of *Escherichia coli* RNA polymerase holoenzyme from core polymerase. *Arch Biochem Biophys.* **182** (2): 404-408
- Göringer, H. U., Szymkowiak, C. and Wagner, R. (1984). *Escherichia coli* 5S RNA A and B conformers. Characterisation by enzymatic and chemical methods. *Eur J Biochem.* **144** (1): 25-34
- Gottesman, S., Roche, E., Zhou, Y. and Sauer, R. T. (1998). The ClpXP and ClpAP proteases degrade proteins with carboxy-terminal peptide tails added by the SsrA-tagging system. *Genes Dev.* **12** (9): 1338-1347
- Gourse, R. L. (1988). Visualization and quantitative analysis of complex formation between *E. coli* RNA polymerase and an rRNA promoter *in vitro*. *Nucleic Acids Res.* **16** (20): 9789-9809

- Grossberger, R., Mayer, O., Waldsich, C., Semrad, K., Urschitz, S. and Schroeder, R. (2005). Influence of RNA structural stability on the RNA chaperone activity of the *Escherichia coli* protein StpA. *Nucleic Acids Res.* **33** (7): 2280-2289
- Hanahan, D. Techniques for transformation of *E. coli* (1985).
- Hannon, G. J. and Glover, D. M. (2002). RNA interference. *Nature.* **418** (6894): 244-251
- Hawley, D. K. and McClure, W. R. (1983). Compilation and analysis of *Escherichia coli* promoter DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* **11** (8): 2237-2255
- He, W. and Parker, R. (2000). Functions of Lsm proteins in mRNA degradation and splicing. *Curr Opin Cell Biol.* **12** (3): 346-350
- Hecker, R. (1989) Die Struktur der intermediären Ribonukleinsäuren bei der Replikation von Viroiden. Institut für Physikalische Biologie, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
- Hecker, R., Wang, Z. M., Steger, G. and Riesner, D. (1988). Analysis of RNA structures by temperature-gradient gel electrophoresis: viroid replication and processing. *Gene.* **72** (1-2): 59-74
- Hengge-Aronis, R. (1996). Back to log phase: sigma S as a global regulator in the osmotic control of gene expression in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* **21** (5): 887-893
- Hengge-Aronis, R. (2002). Stationary phase gene regulation: what makes an *Escherichia coli* promoter sigmaS-selective? *Curr Opin Microbiol.* **5** (6): 591-595
- Hillen, W., Klein, R. D. and Wells, R. D. (1981). Preparation of milligram amounts of 21 deoxyribonucleic acid restriction fragments. *Biochemistry.* **20** (13): 3748-3756
- Hindley, J. (1967). Fractionation of ³²P-labelled ribonucleic acids on polyacrylamide gels and their characterization by fingerprinting. *J Mol Biol.* **30** (1): 125-136
- Hsu, L. M., Zagorski, J., Wang, Z. and Fournier, M. J. (1985). *Escherichia coli* 6S RNA gene is part of a dual-function transcription unit. *J Bacteriol.* **161** (3): 1162-1170
- Hüttenhofer, A. and Noller, H. F. (1992). Hydroxyl radical cleavage of tRNA in the ribosomal P site. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **89** (17): 7851-7855
- Igarashi, K., Hanamura, A., Makino, K., Aiba, H., Mizuno, T., Nakata, A. and Ishihama, A. (1991). Functional map of the alpha subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase: two modes of transcription activation by positive factors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **88** (20): 8958-8962
- Ilag, L. L., Westblade, L. F., Deshayes, C., Kolb, A., Busby, S. J. and Robinson, C. V. (2004). Mass spectrometry of *Escherichia coli* RNA polymerase: interactions of the core enzyme with sigma70 and Rsd protein. *Structure (Camb).* **12** (2): 269-275

-
- Inouye, M. and Delihias, N. (1988). Small RNAs in the prokaryotes: a growing list of diverse roles. *Cell*. **53** (1): 5-7
- Ishihama, A. (2000). Functional modulation of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Annu Rev Microbiol*. **54** 499-518
- Jendrisak, J. J. and Burgess, R. R. (1975). A new method for the large-scale purification of wheat germ DNA-dependent RNA polymerase II. *Biochemistry*. **14** (21): 4639-4645
- Jöres, L. (2001) Einfluss von Guanosintetraphosphat auf die Transkriptionsinitiation ribosomaler RNA P1-Promotoren von *Escherichia coli*. Insitut für Physikalische Biologie, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
- Kadesch, T. R. and Chamberlin, M. J. (1982). Studies of *in vitro* transcription by calf thymus RNA polymerase II using a novel duplex DNA template. *J Biol Chem*. **257** (9): 5286-5295
- Kappus, H., Kieczka, H., Muliawan, H., Schulze, R. M. and Ottenwalder, H. (1981). Influence of ferrous ions on CCl₄-induced lipid peroxidation. *Adv Exp Med Biol*. **136** Pt A 779-791
- Karzai, A. W. and Sauer, R. T. (2001). Protein factors associated with the SsrA. SmpB tagging and ribosome rescue complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **98** (6): 3040-3044
- Ke, A., Zhou, K., Ding, F., Cate, J. H. and Doudna, J. A. (2004). A conformational switch controls hepatitis delta virus ribozyme catalysis. *Nature*. **429** (6988): 201-205
- Keiler, K. C., Waller, P. R. and Sauer, R. T. (1996). Role of a peptide tagging system in degradation of proteins synthesized from damaged messenger RNA. *Science*. **271** (5251): 990-993
- Kim, E. Y., Shin, M. S., Rhee, J. H. and Choy, H. E. (2004). Factors influencing preferential utilization of RNA polymerase containing sigma-38 in stationary-phase gene expression in *Escherichia coli*. *J Microbiol*. **42** (2): 103-110
- Kim, K. S. and Lee, Y. (2004). Regulation of 6S RNA biogenesis by switching utilization of both sigma factors and endoribonucleases. *Nucleic Acids Res*. **32** (20): 6057-6068
- Kiss, T. (2001). Small nucleolar RNA-guided post-transcriptional modification of cellular RNAs. *EMBO J*. **20** (14): 3617-3622
- Koch, C. and Kahmann, R. (1986). Purification and properties of the *Escherichia coli* host factor required for inversion of the G segment in bacteriophage Mu. *J Biol Chem*. **261** (33): 15673-15678

- Korzheva, N., Mustaev, A., Kozlov, M., Malhotra, A., Nikiforov, V., Goldfarb, A. and Darst, S. A. (2000). A structural model of transcription elongation. *Science*. **289** (5479): 619-625
- Krohn, M., Pardon, B. and Wagner, R. (1992). Effects of template topology on RNA polymerase pausing during *in vitro* transcription of the *Escherichia coli* *rrnB* leader region. *Mol Microbiol.* **6** (5): 581-589
- Krohn, M. and Wagner, R. (1996). Transcriptional pausing of RNA polymerase in the presence of guanosine tetraphosphate depends on the promoter and gene sequence. *J Biol Chem.* **271** (39): 23884-23894
- Kusano, S., Ding, Q., Fujita, N. and Ishihama, A. (1996). Promoter selectivity of *Escherichia coli* RNA polymerase E σ 70 and E σ 38 holoenzymes. Effect of DNA supercoiling. *J Biol Chem.* **271** (4): 1998-2004
- Kvint, K., Farewell, A. and Nystrom, T. (2000). RpoS-dependent promoters require guanosine tetraphosphate for induction even in the presence of high levels of sigma(σ). *J Biol Chem.* **275** (20): 14795-14798
- Lange, R. and Hengge-Aronis, R. (1991). Growth phase-regulated expression of *bolA* and morphology of stationary-phase *Escherichia coli* cells are controlled by the novel sigma factor sigma S. *J Bacteriol.* **173** (14): 4474-4481
- Lease, R. A. and Belfort, M. (2000). A trans-acting RNA as a control switch in *Escherichia coli*: DsrA modulates function by forming alternative structures. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97** (18): 9919-9924
- Lease, R. A. and Belfort, M. (2000). Riboregulation by DsrA RNA: *trans*-actions for global economy. *Mol Microbiol.* **38** (4): 667-672
- Lease, R. A., Smith, D., McDonough, K. and Belfort, M. (2004). The small noncoding DsrA RNA is an acid resistance regulator in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **186** (18): 6179-6185
- Lease, R. A. and Woodson, S. A. (2004). Cycling of the Sm-like protein Hfq on the DsrA small regulatory RNA. *J Mol Biol.* **344** (5): 1211-1223
- Lee, C. A., Fournier, M. J. and Beckwith, J. (1985). *Escherichia coli* 6S RNA is not essential for growth or protein secretion. *J Bacteriol.* **161** (3): 1156-1161
- Lee, S. Y., Bailey, S. C. and Apirion, D. (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): 1015-1023
- Leontis, N. B. and Westhof, E. (2003). Analysis of RNA motifs. *Curr Opin Struct Biol.* **13** (3): 300-308
- Li, Z., Pandit, S. and Deutscher, M. P. (1998). 3' exoribonucleolytic trimming is a common

feature of the maturation of small, stable RNAs in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **95** (6): 2856-2861

Lisser, S. and Margalit, H. (1993). Compilation of *E. coli* mRNA promoter sequences. *Nucleic Acids Res.* **21** (7): 1507-1516

Majdalani, N., Cuning, C., Sledjeski, D., Elliott, T. and Gottesman, S. (1998). DsrA RNA regulates translation of RpoS message by an anti-antisense mechanism, independent of its action as an antisilencer of transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **95** (21): 12462-12467

Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. *Molecular cloning: A laboratory manual* (1982).

Marschall, C., Labrousse, V., Kreimer, M., Weichart, D., Kolb, A. and Hengge-Aronis, R. (1998). Molecular analysis of the regulation of *csiD*, a carbon starvation-inducible gene in *Escherichia coli* that is exclusively dependent on sigma S and requires activation by cAMP-CRP. *J Mol Biol.* **276** (2): 339-353

Martin, F. H. and Tinoco, I., Jr. (1980). DNA-RNA hybrid duplexes containing oligo(dA:rU) sequences are exceptionally unstable and may facilitate termination of transcription. *Nucleic Acids Res.* **8** (10): 2295-2299

Masse, E., Escorcía, F. E. and Gottesman, S. (2003). Coupled degradation of a small regulatory RNA and its mRNA targets in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* **17** (19): 2374-2383

Masse, E. and Gottesman, S. (2002). A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **99** (7): 4620-4625

Maxwell, E. S. and Fournier, M. J. (1995). The small nucleolar RNAs. *Annu Rev Biochem.* **64** 897-934

Mayer, O., Waldsich, C., Grossberger, R. and Schroeder, R. (2002). Folding of the td pre-RNA with the help of the RNA chaperone StpA. *Biochem Soc Trans.* **30** (Pt 6): 1175-1180

Mecsas, J., Cowing, D. W. and Gross, C. A. (1991). Development of RNA polymerase-promoter contacts during open complex formation. *J Mol Biol.* **220** (3): 585-597

Mello, C. C. and Conte, D., Jr. (2004). Revealing the world of RNA interference. *Nature*. **431** (7006): 338-342

Minakhin, L., Bhagat, S., Brunning, A., Campbell, E. A., Darst, S. A., Ebright, R. H. and Severinov, K. (2001). Bacterial RNA polymerase subunit omega and eukaryotic RNA polymerase subunit RPB6 are sequence, structural, and functional homologs and promote RNA polymerase assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **98** (3): 892-897

- Mizuno, T., Chou, M. Y. and Inouye, M. (1984). A unique mechanism regulating gene expression: translational inhibition by a complementary RNA transcript (micRNA). *Proc Natl Acad Sci U S A.* **81** (7): 1966-1970
- Moll, I., Leitsch, D., Steinhauser, T. and Blasi, U. (2003). RNA chaperone activity of the Sm-like Hfq protein. *EMBO Rep.* **4** (3): 284-289
- Moller, T., Franch, T., Hojrup, P., Keene, D. R., Bachinger, H. P., Brennan, R. G. and Valentin-Hansen, P. (2002). Hfq: a bacterial Sm-like protein that mediates RNA-RNA interaction. *Mol Cell.* **9** (1): 23-30
- Moore, P. B. (1999). Structural Motifs in RNA. *Annu Rev Biochem.* **68** 287-300
- Morl, M. and Marchfelder, A. (2001). The final cut. The importance of tRNA 3'-processing. *EMBO Rep.* **2** (1): 17-20
- Nachaliel, N., Melnick, J., Gafny, R. and Glaser, G. (1989). Ribosome associated protein(s) specifically bind(s) to the upstream activator sequence of the *E. coli rrnA* P1 promoter. *Nucleic Acids Res.* **17** (23): 9811-9822
- Negishi, T., Fujita, N. and Ishihama, A. (1995). Structural map of the alpha subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase: structural domains identified by proteolytic cleavage. *J Mol Biol.* **248** (4): 723-728
- Nguyen, L. H. and Burgess, R. R. (1997). Comparative analysis of the interactions of *Escherichia coli* sigma σ and sigma σ 70 RNA polymerase holoenzyme with the stationary-phase-specific *bolAp1* promoter. *Biochemistry.* **36** (7): 1748-1754
- Nirenberg, M. (2004). Historical review: Deciphering the genetic code-a personal account. *Trends Biochem Sci.* **29** (1): 46-54
- Nirenberg, M. W. and Matthaei, J. H. (1961). The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **47**: 1588-1602
- Novina, C. D. and Sharp, P. A. (2004). The RNAi revolution. *Nature.* **430** (6996): 161-164
- Nudler, E., Gusarov, I., Avetissova, E., Kozlov, M. and Goldfarb, A. (1998). Spatial organization of transcription elongation complex in *Escherichia coli*. *Science.* **281** (5375): 424-428
- Nudler, E. and Mironov, A. S. (2004). The riboswitch control of bacterial metabolism. *Trends Biochem Sci.* **29** (1): 11-17
- Nudler, E., Mustaev, A., Lukhtanov, E. and Goldfarb, A. (1997). The RNA-DNA hybrid maintains the register of transcription by preventing backtracking of RNA polymerase.

Cell. **89** (1): 33-41

Ohlsen, K. L. and Gralla, J. D. (1992). DNA melting within stable closed complexes at the *Escherichia coli* *rrnB* P1 promoter. *J Biol Chem.* **267** (28): 19813-19818

Ojangu, E. L., Tover, A., Teras, R. and Kivisaar, M. (2000). Effects of combination of different -10 hexamers and downstream sequences on stationary-phase-specific sigma factor sigma(σ)-dependent transcription in *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol.* **182** (23): 6707-6713

Omer, A. D., Ziesche, S., Decatur, W. A., Fournier, M. J. and Dennis, P. P. (2003). RNA-modifying machines in *Archaea*. *Mol Microbiol.* **48** (3): 617-629

Orgel, L. (2000). Origin of life. A simpler nucleic acid. *Science.* **290** (5495): 1306-1307

Orgel, L. E. (1968). Evolution of the genetic apparatus. *J Mol Biol.* **38** (3): 381-393

Pelchat, M., Grenier, C. and Perreault, J. P. (2002). Characterization of a viroid-derived RNA promoter for the DNA-dependent RNA polymerase from *Escherichia coli*. *Biochemistry.* **41** (20): 6561-6571

Plasterk, R. H. (2002). RNA silencing: the genome's immune system. *Science.* **296** (5571): 1263-1265

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

Pleij, C. W., Rietveld, K. and Bosch, L. (1985). A new principle of RNA folding based on pseudoknotting. *Nucleic Acids Res.* **13** (5): 1717-1731

Pohl, C. (2005) Haben die unterschiedlichen upstream gelegenen DNA-Sequenzen der sieben rRNA-Operons von *E. coli* einen differentiellen Einfluss auf die Stringente Kontrolle? Institut für Physikalische Biologie, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

Rajkumari, K., Kusano, S., Ishihama, A., Mizuno, T. and Gowrishankar, J. (1996). Effects of H-NS and potassium glutamate on sigmaS- and sigma70-directed transcription in vitro from osmotically regulated P1 and P2 promoters of *proU* in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **178** (14): 4176-4181

Reckendrees, B. (2004) *In vitro* Analysen prokaryotischer Transkriptionsmechanismen während der exponentiellen und stationären Phase der Genexpression. Institut für Physikalische Biologie, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

Record, M. T., Jr., Reznikoff, W. S., Craig, M. L., McQuade, K. L. and Schlx, P. J. *Escherichia coli* RNA Polymerase (Es70), Promoters and the Kinetics of the Steps of Transcription Initiation. (1996). Neidhardt, F. C., Curtis III, R., Ingraham, J. L., Lin, E. C. C., Low, K. B., Magasanik, B., Reznikoff, W. S., Riley, M., Schaechter, M. and Umbar-

ger, H. E. Washington, D.C.

Repoila, F. and Gottesman, S. (2001). Signal transduction cascade for regulation of RpoS: temperature regulation of DsrA. *J Bacteriol.* **183** (13): 4012-4023

Roesch, P. L. and Blomfield, I. C. (1998). Leucine alters the interaction of the leucine-responsive regulatory protein (Lrp) with the *fim* switch to stimulate site-specific recombination in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* **24** (4): 751-765

Rosenbaum, V. and Riesner, D. (1987). Temperature-gradient gel electrophoresis. Thermodynamic analysis of nucleic acids and proteins in purified form and in cellular extracts. *Biophys Chem.* **26** (2-3): 235-246

Santos, J. M., Freire, P., Vicente, M. and Arraiano, C. M. (1999). The stationary-phase morphogene *bolA* from *Escherichia coli* is induced by stress during early stages of growth. *Mol Microbiol.* **32** (4): 789-798

Sauter, C., Basquin, J. and Suck, D. (2003). Sm-like proteins in Eubacteria: the crystal structure of the Hfq protein from *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* **31** (14): 4091-4098

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

Schröder, O. and Wagner, R. (2000). The bacterial DNA-binding protein H-NS represses ribosomal RNA transcription by trapping RNA polymerase in the initiation complex. *J Mol Biol.* **298** (5): 737-748

Schröder, O. and Wagner, R. (2002). The bacterial regulatory protein H-NS-a versatile modulator of nucleic acid structures. *Biol Chem.* **383** (6): 945-960

Schumacher, M. A., Pearson, R. F., Moller, T., Valentin-Hansen, P. and Brennan, R. G. (2002). Structures of the pleiotropic translational regulator Hfq and an Hfq-RNA complex: a bacterial Sm-like protein. *EMBO J.* **21** (13): 3546-3556

Sledjeski, D. D., Gupta, A. and Gottesman, S. (1996). The small RNA, DsrA, is essential for the low temperature expression of RpoS during exponential growth in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **15** (15): 3993-4000

Sledjeski, D. D., Whitman, C. and Zhang, A. (2001). Hfq is necessary for regulation by the untranslated RNA DsrA. *J Bacteriol.* **183** (6): 1997-2005

Spassky, A. (1986). Visualization of the movement of the *Escherichia coli* RNA polymerase along the *lacUV5* promoter during the initiation of the transcription. *J Mol Biol.* **188** (1): 99-103

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

-
- Storz, G. (2002). An expanding universe of noncoding RNAs. *Science*. **296** (5571): 1260-1263
- Storz, G., Opdyke, J. A. and Zhang, A. (2004). Controlling mRNA stability and translation with small, noncoding RNAs. *Curr Opin Microbiol.* **7** (2): 140-144
- Tanaka, K., Takayanagi, Y., Fujita, N., Ishihama, A. and Takahashi, H. (1993). Heterogeneity of the principal sigma factor in *Escherichia coli*: the rpoS gene product, sigma 38, is a second principal sigma factor of RNA polymerase in stationary-phase *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90** (17): 8303
- Tani, T. H., Khodursky, A., Blumenthal, R. M., Brown, P. O. and Matthews, R. G. (2002). Adaptation to famine: a family of stationary-phase genes revealed by microarray analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99** (21): 13471-13476
- Tippner, D., Afflerbach, H., Bradaczek, C. and Wagner, R. (1994). Evidence for a regulatory function of the histone-like *Escherichia coli* protein H-NS in ribosomal RNA synthesis. *Mol Microbiol.* **11** (3): 589-604
- Tippner, D. and Wagner, R. (1995). Fluorescence analysis of the *Escherichia coli* transcription regulator H-NS reveals two distinguishable complexes dependent on binding to specific or nonspecific DNA sites. *J Biol Chem.* **270** (38): 22243-22247
- Tollervey, D. and Kiss, T. (1997). Function and synthesis of small nucleolar RNAs. *Curr Opin Cell Biol.* **9** (3): 337-342
- Trotochaud, A. E. and Wassarman, K. M. (2004). 6S RNA function enhances long-term cell survival. *J Bacteriol.* **186** (15): 4978-4985
- Trotochaud, A. E. and Wassarman, K. M. (2005). A highly conserved 6S RNA structure is required for regulation of transcription. *Nat Struct Mol Biol.* **12** (4): 313-319
- Tullius, T. D. and Dombroski, B. A. (1985). Iron(II) EDTA used to measure the helical twist along any DNA molecule. *Science.* **230** (4726): 679-681
- Ueguchi, C., Kakeda, M. and Mizuno, T. (1993). Autoregulatory expression of the *Escherichia coli* hns gene encoding a nucleoid protein: H-NS functions as a repressor of its own transcription. *Mol Gen Genet.* **236** (2-3): 171-178
- Uptain, S. M., Kane, C. M. and Chamberlin, M. J. (1997). Basic mechanisms of transcript elongation and its regulation. *Annu Rev Biochem.* **66**:117-172
- Vassilyev, D. G., Sekine, S., Laptenko, O., Lee, J., Vassilyeva, M. N., Borukhov, S. and Yokoyama, S. (2002). Crystal structure of a bacterial RNA polymerase holoenzyme at 2.6 Å resolution. *Nature.* **417** (6890): 712-719
- Vitreschak, A. G., Rodionov, D. A., Mironov, A. A. and Gelfand, M. S. (2004). Riboswitches: the oldest mechanism for the regulation of gene expression? *Trends Genet.* **20** (1): 44-50

- Vogel, D. W., Hartmann, R. K., Struck, J. C., Ulbrich, N. and Erdmann, V. A. (1987). The sequence of the 6S RNA gene of *Pseudomonas aeruginosa*. *Nucleic Acids Res.* **15** (11): 4583-4591
- von Hippel, P. H., Rees, W. A., Rippe, K. and Wilson, K. S. (1996). Specificity mechanisms in the control of transcription. *Biophys Chem.* **59** (3): 231-246
- Wada, A., Igarashi, K., Yoshimura, S., Aimoto, S. and Ishihama, A. (1995). Ribosome modulation factor: stationary growth phase-specific inhibitor of ribosome functions from *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun.* **214** (2): 410-417
- Wada, A., Yamazaki, Y., Fujita, N. and Ishihama, A. (1990). Structure and probable genetic location of a 'ribosome modulation factor' associated with 100S ribosomes in stationary-phase *Escherichia coli* cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **87** (7): 2657-2661
- Wagner, R. Transcription Regulation in Prokaryotes. Oxford University Press (2000)
- Wassarman, K. M. and Storz, G. (2000). 6S RNA regulates *E. coli* RNA polymerase activity. *Cell.* **101** (6): 613-623
- Wassarman, K. M., Zhang, A. and Storz, G. (1999). Small RNAs in *Escherichia coli*. *Trends Microbiol.* **7** (1): 37-45
- Westhof, E. and Altman, S. (1994). Three-dimensional working model of M1 RNA, the catalytic RNA subunit of ribonuclease P from **Escherichia coli**. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **91** (11): 5133-5137
- Westhof, E. and Fritsch, V. (2000). RNA folding: beyond Watson-Crick pairs. *Structure Fold Des.* **8** (3): R55-65
- Wettich, A. and Biebricher, C. K. (2001). RNA species that replicate with DNA-dependent RNA polymerase from *Escherichia coli*. *Biochemistry.* **40** (11): 3308-3315
- Willkomm, D. K., Minnerup, J., Hüttenhofer, A. and Hartmann, R. K. (2005). Experimental RNomics in *Aquifex aeolicus*: identification of small non-coding RNAs and the putative 6S RNA homolog. *Nucleic Acids Res.* **33** (6): 1949-1960
- Wilson, C. and Dombroski, A. J. (1997). Region 1 of sigma70 is required for efficient isomerization and initiation of transcription by *Escherichia coli* RNA polymerase. *J Mol Biol.* **267** (1): 60-74
- 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): 103-119
- Zabeau, M. a. R., R. The role of restriction endonucleases in molecular genetics (1979). Taylor, J. H. Part III New York

Zacharias, M., Göringer, H. U. and Wagner, R. (1990). The signal for growth rate control and stringent sensitivity in *E. coli* is not restricted to a particular sequence motif within the promoter region. *Nucleic Acids Res.* **18** (21): 6271-6275

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 J.* **17** (20): 6061-6068

Zhang, A., Derbyshire, V. Salvo, J. L. Belfort, M. (1995). *Escherichia coli* protein StpA stimulates self-splicing by promoting RNA assembly *in vitro*. *RNA* **1** (8): 783-793

Zhang, A. and Belfort, M. (1992). Nucleotide sequence of a newly-identified *Escherichia coli* gene, *stpA*, encoding an H-NS-like protein. *Nucleic Acids Res.* **20** (24): 6735

Zhang, A., Wassarman, K. M., Ortega, J., Steven, A. C. and Storz, G. (2002). The Sm-like Hfq protein increases OxyS RNA interaction with target mRNAs. *Mol Cell.* **9** (1): 11-22

Anhang

Tabelle A: Quantifizierung der Komplexinhibierung des *rrnB* P1-Promotors und E70 bei 6S RNA Zugabe. Angegeben sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von zwei angegebenen Experimenten.

6S RNA [nM]	% Restaktivität (Mittelwert)	Standardabweichung
5	107	1
10	85	2
50	72	2
100	61	0
1000	18	1

Tabelle B: Quantifizierung der Komplexinhibierung des *bolA*-Promotors und E38 bei 6S RNA Zugabe. Angegeben sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von zwei unabhängigen Experimenten.

6S RNA [nM]	% Restaktivität (Mittelwert)	Standardabweichung
5	54	4
10	41	6
50	37	5
100	25	2
1000	6	2

Tabelle C: Quantifizierung der Komplexinhibierung des *bolA*-Promotors und E70 bei 6S RNA Zugabe. Angegeben sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von zwei unabhängigen Experimenten.

6S RNA [nM]	% Restaktivität (Mittelwert)	Standardabweichung
5	122	0
10	112	3
50	56	7
100	37	5
1000	2	1

Tabelle D: Quantitative Auswertung der *bolA*-Transkripte bei *in vitro* Transkriptionen mit linearen Templates. Die Mittelwerte und Standardabweichungen ergeben sich aus drei unabhängigen Versuchen.

6S RNA [nM]	% Restaktivität (Mittelwert)	Standardabweichung
0	100	-
10	63	4
50	26	5
100	16	3
250	0	-

Tabelle E: Quantitative Auswertung der *in vitro* Transkriptionen mit superhelikalen Templates. Angegeben sind die Mittelwerte der Restaktivitäten in % und die jeweilige Standardabweichung (s) von drei unabhängigen Versuchen.

6S RNA [nM]	<i>rrnB</i> P1	s	RNA1(E70)	s	<i>bolA</i>	s	RNA1(E38)	s
A: Zugabe der 6S RNA zur Rekonstitution								
50	34	4	30	8	33	4	31	3
100	24	2	21	6	19	3	17	1
250	28	1	27	4	16	5	16	2
B: Zugabe der 6S RNA zur RNA-Polymerase (nach Rekonstitution)								
50	62	3	49	9	38	3	33	1
100	46	8	36	4	21	2	19	3
250	34	1	25	5	12	1	12	2
C: Zugabe der 6S RNA zum Template								
50	90	0	88	1	60	2	57	7
100	81	11	78	0	38	2	33	7
250	60	1	49	0	20	1	19	4

Tabelle F: Quantifizierungen der *in vitro* Transkription mit 6S RNA bei hohen Salzkonzentrationen. Gezeigt sind die Mittelwerte (% Restaktivität) von zwei unabhängigen Experimenten. s= Standardabweichung. Die teilweise hohe Standardabweichung ist auf eine zum Teil stark unterschiedliche Schwärzung der Autoradiogramme zurückzuführen. Alle Experimente zeigten jedoch den gleichen Gang und wurden daher als Signifikant betrachtet.

6S RNA [nM]	<i>rrnB</i> P1	s	RNA1(E70)	s	<i>bolA</i>	s	RNA1(E38)	s
10	71	11	61	7	74	17	73	8
100	22	4	26	4	39	16	37	15
250	15	1	18	1	17	2	15	1
500	13	4	14	4	11	1	10	0

Tabelle G: Quantifizierungen der *in vitro* Transkription mit 5S- und tRNA. Angegeben sind die Mittelwerte (für 5S RNA) (% Restaktivität) von zwei unabhängigen Experimenten. s= Standardabweichung. Für die tRNA ist keine Standardabweichung angegeben, da hier nur ein Experiment durchgeführt wurde.

RNA [nM]	<i>rrnB</i> P1	s	RNA1(E70)	s	<i>bolA</i>	s	RNA1(E38)	s
5S RNA								
50	37	4	35	4	41	4	37	1
100	15	2	12	1	20	1	17	2
500	4	4	4	6	3	0	2	1
tRNA								
50	74	-	78	-	79	-	84	-
100	61	-	50	-	67	-	70	-
500	47	-	40	-	38	-	46	-

Tabelle H: Quantitative Auswertung der *in vitro* Transkriptionen von p6S-T mit Zugabe von 6S RNA. Angegeben sind die Mittelwerte der Restaktivitäten in % und die jeweilige Standardabweichung (s) von vier unabhängigen Versuchen. Die teilweise hohe Standardabweichung resultiert aus der unterschiedlich starken Schwärzung der Autoradiogramme, alle Transkriptionen zeigten aber den gleichen Gang.

6S RNA [nM]	<i>ssrS</i> P1	s	RNA1(E70)	s	<i>ssrS</i> P2	s	RNA1(E38)	s
Homologe Promotoren								
50	31	6	13	5	32	15	18	8
100	56	15	33	14	28	9	11	12
250	24	14	11	9	18	9	5	8
500	31	9	17	6	19	10	10	12
Heterologe Promotoren								
50	16	6	—	-	41	6	—	-
100	30	11	—	-	43	8	—	-
250	15	8	—	-	29	6	—	-
500	22	8	—	-	29	5	—	-

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
A ₂₆₀	Absorption bei 260 nm
A ₂₈₀	Absorption bei 280 nm
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AMV	<i>Avian myeloblastosis virus</i>
ATP	Adenosintriphosphat
bzw.	beziehungsweise
C	Cytidin
cDNA	copyDNA
Ci	Curie (2.22 x 10 ¹² cpm)
cpm	'counts per minute'
cps	'counts per second'
CTP	Cytidintriphosphat
°C	Grad Celsius
ddNTP	Didesoxyribonukleinsäure
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiotheritol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
FIS	'factor of inversion stimulation'
G	Guanosin
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
kb	Kilobasenpaare
l	Liter
LRP	'Leucine-responsive regulatory Protein'
m	milli (10 ⁻³)
mm	Millimeter
M	Mol pro Liter
min	Minute
mg	Milligramm
mM	Millimolar

μ	mikro (10^{-6})
μM	Mikromolar
n	nano (10^{-9})
ng	Nanogramm
NS	Nukleinsäure
Nt	Nukleotid
OD	optische Dichte
P	Promotor
PAA	Polyacrylamid
PCR	Polymerasekettenreaktion
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PE	Primer-Extension
PEG	Polyethylenglycol
RNA	Ribonukleinsäure
RNAP	RNA-Polymerase
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
rrn	ribosomale Transkriptionseinheit
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
S	Svedberg
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
ss	einzelsträngig
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
UE	Untereinheit
ün	über Nacht
üt	über Tag
UTP	Uraciltriphosphat
UV	ultraviolett
V	Volt
VIS	visible
v/V	Volumenprozent
W	Watt
w/v	'weight per volume' (Gewichtsprozent)
μ	Mikro

Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit sind zur Veröffentlichung eingereicht oder in Vorbereitung:

Neusser, T., Gildehaus, N. and Wagner, R. (2005). Studies on the regulation of *E. coli* 6S RNA transcription. Zur Veröffentlichung eingereicht.

Gildehaus, N., Neusser, T. and Wagner R. (2006). Physiological Role of *E. coli* 6S RNA. Manuskript in Vorbereitung.

Ein kleines 'Dankeschön' an alle, die ihren ganz persönlichen Teil zu dieser Arbeit beigetragen haben...

... Rolf, dafür dass er immer Zeit hatte, egal wie ungelegen es eigentlich gerade war. Vielen Dank für Unterstützung, Streit, 'Esel-Geschichten' und das Ertragen meiner verrückten Ideen, Rusty inklusive.

... Herrn Rüter für die Übernahme der (schon zweiten) Co-Referenz.

... den aktuellen und ehemaligen 'Labor-Hanseln' Tom, Ümit, Cori, Britta, Bibi, Marc, Jan, Lars, Martina, Tim, Jochen und Calles für ein tolles Arbeitsklima, königliche Frühstücksrunden und schier endlose Arbeitsbesprechungen.

... Reini für die 'Nichtraucher'-Rauchpausen (und natürlich für die Präparation sämtlicher Proteine, Polymerasen und P1-Fragmente).

... Britta und Marc fürs Korrekturlesen.

... den Zingerlings und Maziuls, besonders Maren, Mirko und Ina, für ihre einzigartige Freundschaft.

... Caro und Gerlind für die wunderbaren 'Tratsch'-Abende, bei denen man allen Stress vergisst.

... Mascha für Shopping-Touren, Kaffeetrinken und Weihnachtsmarktbesuche.

... Heinz für einfach alles.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, besonders meinen Eltern. Danke für Eure Liebe, Euer Verständnis und Eure Unterstützung.