

**Analyse der Effekte unterschiedlicher Abstände und
Orientierungen von bakteriellen Transkriptionsfaktoren auf die
Funktion ribosomaler RNA-Promotoren**

Inaugural-Dissertation

zur

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

vorgelegt von

Bianca Lux

aus Moers

Düsseldorf 2005

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

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

Referent: Prof. Dr. R. Wagner

Koreferent: Prof. Dr. J. Ernst

Tag der mündlichen Prüfung: 8.11.2005

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Rolf Wagner für die wissenschaftliche Betreuung sowie stete Ansprechbarkeit und Diskussionsbereitschaft während dieser Arbeit.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Wagner danke ich für die sehr gute Arbeitsatmosphäre im Labor.

Unserer technischen Assistentin Reinhild Wurm danke ich für die Präparation der in dieser Arbeit verwendeten Proteine H-NS, LRP und FIS.

Bei Marc Meißner möchte ich mich besonders für die stete Hilfsbereitschaft bei Computerproblemen bedanken.

Ganz besonders danken möchte ich auch Michael Lux, meiner Familie und meinen Freunden für die Unterstützung während dieser Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

	Zusammenfassung	1
1	Einleitung	
1.1	Die Genexpression	3
1.2	Die Komponenten und der Ablauf der bakteriellen Transkription	4
1.2.1	Die RNA-Polymerase	4
1.2.2	Strukturelemente von Promotoren	5
1.2.3	Die Transkription	7
1.3	Die Bedeutung der ribosomalen RNA Operons von <i>E. coli</i>	9
1.3.1	Der Aufbau der ribosomalen RNA Operons	9
1.3.2	Die Regulation der ribosomalen RNA Operons	11
1.3.2.1	Die Promotoren P1 und P2 der rRNA Operons	11
1.3.2.2	Die stringente Kontrolle und die Wachstumsratenkontrolle	12
1.3.2.3	Die faktorunabhängige upstream-Regulation	12
1.3.2.4	Die faktorabhängige upstream-Regulation	13
1.4	Die DNA-strukturierenden Proteine	15
1.4.1	„Factor for inversion stimulation“ (FIS)	15
1.4.2	“Histone-like nucleoid structuring protein” (H-NS)	17
1.4.3	“Leucine-responsive regulatory protein” (LRP)	21
1.5	Fragestellung und Konzeption der Arbeit	24
2	Ergebnisse	
2.1	Klonierung einer synthetischen H-NS Bindestelle in unterschiedlicher angularer Orientierung vor den ribosomalen Promotoren <i>rrnB</i> P1 und <i>rrnB</i> P2	25
2.2	2D-Gelelektrophorese von überexprimiertem H-NS	29
2.3	Retardierungsanalysen	30
2.3.1	Der Einfluß von Distamycin auf die DNA-Bindung von H-NS, LRP und FIS	31
2.3.2	Der Einfluß von Leucin auf die DNA-Bindung von LRP	33
2.3.3	Die gleichzeitige Bindung von H-NS und LRP	34
2.3.4	Die gleichzeitige Bindung von RNA-Polymerase und Transkriptionsfaktor	35
2.3.5	Die Bindung von H-NS und LRP an die unterschiedlich angular orientierten Bindestellen upstream des <i>rrnB</i> P2 und <i>rrnB</i> P1 Promotors	38
2.3.6	Die Bindung von FIS an die unterschiedlich angular orientierten Bindestellen upstream des <i>rrnB</i> P2 und <i>rrnB</i> P1 Promotors	43

2.4	<i>In vitro</i> Transkriptionsanalysen	45
2.4.1	Die Optimierung des <i>in vitro</i> Transkriptionssystems	45
2.4.2	Die Basalaktivität der P2- und P1-Promotorkonstrukte	50
2.4.3	Der Einfluß von H-NS und LRP auf die P2 Promotoraktivität	53
2.4.4	Der Einfluß von H-NS und LRP auf die P1 Promotoraktivität	58
2.5	DNase I-„footprint“-Analysen	63
2.5.1	Bestimmung der Kontaktregionen von H-NS und LRP mit dem P2-Konstrukt pBK1A/P2	64
2.5.2	Bestimmung der Kontaktregionen von H-NS und LRP mit dem P1-Konstrukt pBK1A/P1	66
2.5.3	Nachweis einer FIS-Bindung im P2 Promotorbereich	68
3	Diskussion	
3.1	Klonierung einer synthetischen H-NS Bindestelle mit unterschiedlichem „Phasing“ zu den Promotoren <i>rrnB</i> P2 und <i>rrnB</i> P1	71
3.2	Der direkte Einfluß der upstream-Regionen auf die Aktivität der Promotoren <i>rrnB</i> P2 und <i>rrnB</i> P1	75
3.3	Der Einfluß von H-NS auf die Aktivität der Promotoren <i>rrnB</i> P2 und <i>rrnB</i> P1	77
3.4	Der Einfluß von LRP auf die Aktivität der Promotoren <i>rrnB</i> P2 und <i>rrnB</i> P1	81
3.5	Der Einfluß von FIS auf die Aktivität der Promotoren <i>rrnB</i> P2 und <i>rrnB</i> P1	83
3.6	Das Zusammenspiel der Transkriptionsfaktoren H-NS, LRP und FIS bei der Regulation der ribosomalen Promotoren	85
4	Material	
4.1	Allgemeines	87
4.2	Bakterienstämme und Plasmide	87
4.2.1	<i>E. coli</i> Stamm	87
4.2.2	Plasmide	87
4.3	DNA-Fragmente	89
4.4	Nukleinsäuren, Desoxyoligonukleotide und Nukleotide	91
4.5	Proteine	93
4.5.1	Enzyme und Transkriptionsfaktoren	93
4.5.2	Restriktionsendonukleasen	93
4.5.3	Sonstige Proteine	94
4.6	Puffer und Medien	94
4.7	Feinchemikalien	95
4.8	Sonstige Materialien	96

5

Methoden

5.1	Allgemeine mikrobiologische Methoden	97
5.1.1	Sterilisation von Lösungen und Glasgeräten	97
5.1.2	Haltung und Sicherung von Zellstämmen	97
5.1.3	Anzucht von üN-Kulturen	97
5.1.4	Herstellung Hitzeschock-kompetenter Zellen	98
5.1.5	Transformation Hitzeschock-kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	98
5.2	Allgemeine molekularbiologische Methoden	99
5.2.1	UV/VIS-Spektroskopie	99
5.2.1.1	Spektralphotometrische Konzentrations- und Reinheits- Bestimmung von Nukleinsäuren und Nukleotiden	99
5.2.1.2	Streumessung von Bakterienkulturen	100
5.2.2	Radioaktivitätsmessung	100
5.2.3	Phenol/Chloroform-Extraktion	100
5.2.4	Ethanol-fällung von Nukleinsäuren	101
5.2.5	Mikrotropfendialyse	101
5.2.6	Enzymatische Reaktionen	101
5.2.6.1	Restriktionshydrolysen	101
5.2.6.2	Dephosphorylierung von 5'-DNA-Enden	102
5.2.6.3	Klenow-Reaktion zum Auffüllen von überhängenden 5'-DNA-Enden	102
5.2.6.4	Radioaktive 5'-Markierung doppelsträngiger DNA-Fragmente mittels Klenow-Reaktion	103
5.2.6.5	5'-Kinasierung doppelsträngiger DNA-Fragmente	103
5.2.6.6	Radioaktive 5'-Markierung einzelsträngiger DNA-Oligonukleotide	104
5.2.6.7	Mung-Bean-Nuklease-Reaktion zum Entfernen von über- hängenden Enden doppelsträngiger DNA-Fragmente	104
5.2.6.8	Ligation von DNA-Fragmenten	105
5.2.7	Isolierung von DANN	105
5.2.7.1	Isolierung analytischer Mengen Plasmid-DNA („Minipräp“)	105
5.2.7.2	Präparative Isolierung von Plasmid-DNA („Maxipräp“)	106
5.2.8	Gelelektrophorese	107
5.2.8.1	Agarosegelelektrophorese	107
5.2.8.2	Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) von Nukleinsäuren unter nativen Bedingungen	108
5.2.8.3	Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) von Nukleinsäuren unter denaturierenden Bedingungen	108
5.2.8.4	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	109
5.2.9	Nachweis von Nukleinsäuren und Proteinen in Polyacryl- Amidgelen	110
5.2.9.1	Ethidiumbromidfärbung von Nukleinsäuren	110
5.2.9.2	Silberfärbung von Nukleinsäuren	111
5.2.9.3	Autoradiographie	111

5.2.9.4	Densitometrie	112
5.2.9.5	Coomassie-Färbung von Proteinen	112
5.2.9.6	Silberfärbung von Proteinen	112
5.2.10	Präparative DNA-Gelelution	113
5.2.10.1	DNA-Gelelution aus Agarosegelen mittels Zentrifugation über silikonisierte Glaswolle	113
5.2.10.2	Passive DNA-Gelelution aus PAA-Gelen	114
5.3	Spezielle Methoden	114
5.3.1	Sequenzierung von Plasmid-DNA	114
5.3.2	Retardierungsgelelektrophorese	115
5.3.3	„Supershift“-Retardierungsanalysen	117
5.3.4	<i>In vitro</i> Transkription im „ <i>pseudo single round</i> “-Ansatz	118
5.3.5	Nicht-radioaktive „ <i>multiple round</i> “ <i>in vitro</i> Transkription und Primer-Extension-Analyse zur Transkriptionsstart- Bestimmung	119
5.3.5.1	Nicht-radioaktive „ <i>multiple round</i> “ <i>in vitro</i> Transkription	119
5.3.5.2	Primer-Extension-Analyse	120
5.3.6	DNase I-„ <i>footprint</i> “-Analysen von Nukleoproteinkomplexen	120
5.3.7	Primer-Extension-Analyse	121
5.3.8	2D-Gelelektrophorese	122
5.3.8.1	Isoelektrische Fokussierung mit immobilisierten pH-Gradienten (1. Dimension)	122
5.3.8.2	Äquilibrierung und SDS-Gelelektrophorese (2. Dimension)	123
6	Literaturverzeichnis	125
7	Abkürzungsverzeichnis	141

Zusammenfassung

Für viele bakterielle Promotoren ist bekannt, daß ihre Aktivität durch gekrümmte upstream-Sequenzen (faktorunabhängig) oder bindende Transkriptionsfaktoren (faktorabhängig) beeinflusst wird.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der faktorunabhängigen und faktorabhängigen Regulation von ribosomalen RNA-Promotoren bei Bakterien.

Ziel dieser Arbeit war, eine „Phasing“-Analyse mit einer upstream-Region durchzuführen, um den Einfluß der angularen Orientierung („Phasing“) und den des Abstandes auf die Aktivität der ribosomalen Promotoren *rrnB* P2 und *rrnB* P1 zu überprüfen. Dazu wurde eine intrinsisch gekrümmte upstream-Region in unterschiedlichen Abständen und somit in verschiedener angularer Orientierung stromaufwärts des *rrnB* P2 und *rrnB* P1 Promotors kloniert.

Folgende Ergebnisse lassen sich von der „Phasing“-Analyse zusammenfassen:

- Die Basalaktivität der Promotoren *rrnB* P2 und *rrnB* P1 ist bei Abstandsvariationen der upstream-Region von halben Helixwindungen höher als bei Abstandsvariationen von vollständigen Helixwindungen.
- Die Transkriptionsfaktoren H-NS, LRP und FIS bilden mit den Phasingkonstrukten spezifische Komplexe aus, wobei die angularer Orientierung der upstream-Region keinen Einfluß auf die Bindungsaffinität der Proteine hat. Bei allen Phasingkonstrukten kann eine gleichzeitige Bindung von H-NS und LRP beobachtet werden.
- Erstmals konnte mittels Retardierungsanalysen und DNase I-„footprints“ eine Bindung von LRP im *rrnB* P1 Promotorbereich und eine Bindung von FIS im *rrnB* P2 Promotor nachgewiesen werden.
- DNase I-„footprint“-Analysen von H-NS mit den Phasingkonstrukten zeigen eine vollständige Besetzung der DNA mit H-NS-Molekülen.
- H-NS und LRP wirken bei allen Phasingkonstrukten als Repressor.
- Die H-NS-vermittelte Inhibierung des *rrnB* P2 und *rrnB* P1 Promotors ist unabhängig von Abstand und angularer Orientierung des gebundenen H-NS.
- Bei der LRP-vermittelten Inhibierung des *rrnB* P1 Promotors ist nur eine geringe Abhängigkeit von der angularen Orientierung der upstream-Region sichtbar, da der „Phasing“-Effekt durch die LRP Bindestelle im P1 Promotor überdeckt wird.
- Die Inhibierung der P2 Promotoraktivität durch LRP ist von der angularen Orientierung der upstream-Region abhängig. Die stärkste Inhibierung durch LRP ist bei den P2-Konstrukten zu finden, bei denen das Zentrum der upstream-Region um vollständige Helixwindungen zum Transkriptionsstart +1 entfernt ist.
- Der in seiner natürlichen Umgebung UAS-, H-NS- und LRP-unabhängige *rrnB* P2 Promotor kann durch das Vorschalten gekrümmter upstream-Regionen faktorunabhängig (durch die UAS-Regionen) und faktorabhängig (durch H-NS und LRP) reguliert werden.

Weiterhin wurde die faktorabhängige Regulation des *rrnB* P1 Promotors im Zusammenhang mit seiner natürlichen upstream-Region untersucht.

Die erhaltenen Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Es konnte eine spezifische Bindung von LRP an die natürliche UAS-Region des *rrnB* P1 Promotors nachgewiesen werden, die durch die Zugabe des LRP-Effektormoleküls Leucin stark reduziert wird.
- LRP wirkt, wie H-NS, als starker Repressor auf die *rrnB* P1 Promotoraktivität.
- H-NS und LRP können gleichzeitig an die UAS-Region des ribosomalen Operons *rrnB* binden.
- H-NS, LRP und FIS können jeweils gleichzeitig mit der RNA-Polymerase an das *rrnB* Operon binden und alle drei Proteine sind in der Lage, die RNA-Polymerase konzentrationsabhängig vom P1 Promotor zu verdrängen.

1 Einleitung

1.1 Die Genexpression

Bei Prokaryonten und Eukaryonten wird die genetische Information von Generation zu Generation weitergegeben. Für die Speicherung, Weitergabe und Expression der genetischen Information sind zwei Klassen von Molekülen von zentraler Bedeutung: Nukleinsäuren und Proteine.

Bei den Nukleinsäuren werden wiederum zwei Haupttypen unterschieden: die Desoxyribonukleinsäuren (DNAs) und die Ribonukleinsäuren (RNAs). Die Funktion der DNA liegt in der Speicherung der genetischen Information, während die RNA hauptsächlich an der Expression der genetischen Information beteiligt ist.

Proteine spielen in nahezu allen biologischen Prozessen eine entscheidende Rolle, da sie vielfältige Funktionen erfüllen, wie z.B. die Katalyse von chemischen Reaktionen, den Transport und die Speicherung von Molekülen und Ionen oder die Regulation von Stoffwechselwegen.

Unter dem Begriff „Genexpression“ werden diejenigen Prozesse zusammengefaßt, die den Fluß der genetischen Information gewährleisten: die DNA-Synthese (Replikation), die RNA-Synthese (Transkription), die Protein-Synthese (Translation) und die posttranslationale Modifikation der synthetisierten Proteine.



Die Genexpression unterliegt auf allen Stufen einer komplexen Regulation. Jedoch können DNA und RNA wie die Proteine nach ihrer Synthese ebenfalls modifiziert und somit in ihrer Funktion oder Stabilität verändert werden. Eine vielfältige Regulation der Genexpression ist wichtig für den Ablauf von Entwicklung und Differenzierung. Zudem ist sie notwendig, damit sich Prokaryonten und Eukaryonten schnell an wechselnde Umweltbedingungen anpassen können und eine energieaufwendige Verschwendung zellulärer Ressourcen vermieden wird.

Eine Besonderheit bei Prokaryonten stellt die Kopplung der Genexpressionsprozesse dar, da alle Reaktionen in einem Kompartiment stattfinden und sich gegenseitig direkt beeinflussen. Die prokaryontische Transkription nimmt dabei als zentraler Schritt der Genexpression eine besondere Stellung ein.

Da die faktorunabhängige sowie die faktorabhängige Regulation der Transkription von bakteriellen Promotoren das Thema der vorliegenden Arbeit ist, erfolgt zunächst eine Darstellung der wichtigsten Komponenten des Transkriptionsprozesses. Anschließend wird auf die Regulation der Synthese ribosomaler RNAs eingegangen, da es sich bei den untersuchten Promotoren um ribosomale Promotoren handelt. Zuletzt werden die faktorunabhängige Regulation der ribosomalen Transkription durch upstream liegende Sequenzen und die

faktorabhängige Regulation durch Proteine vorgestellt, wobei die daran beteiligten Transkriptionsfaktoren FIS, H-NS und LRP ausführlicher beschrieben werden.

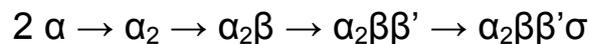
1.2 Die Komponenten und der Ablauf der bakteriellen Transkription

1.2.1 Die RNA-Polymerase

Während bei Eukaryonten drei Klassen von RNA-Polymerasen für die Transkription aller Gene verantwortlich sind, erfolgt die Transkription bei Prokaryonten durch eine einzige Klasse DNA-abhängiger RNA-Polymerasen. In einer *E. coli* Zelle befinden sich ungefähr 3000 RNA-Polymerase-Moleküle, jedoch wird die Konzentration an freier RNA-Polymerase auf 1% geschätzt.

Die bakterielle RNA-Polymerase ist ein komplexes Enzym, das aus 5 verschiedenen Untereinheiten in der Stöchiometrie $\alpha_2\beta\beta'\omega\sigma$ besteht und ein Molekulargewicht von etwa 460 kDa aufweist (Record *et al.*, 1996; Korzheva *et al.*, 2000). Dabei wird zwischen dem „Core“-Enzym (E) mit der Untereinheitenstruktur $\alpha_2\beta\beta'\omega$ und dem „Holo“-Enzym, welches zusätzlich die σ -Untereinheit enthält, unterschieden.

Die Assemblierung des „Holo“-Enzyms erfolgt in der Reihenfolge:



(Finn *et al.*, 2000).

Über die Funktion von ω ist relativ wenig bekannt. Die ω -Untereinheit bindet an die β' -Untereinheit und gehört zum „Core“-Enzym. Es ist gezeigt, dass ω zur Stabilisierung der RNA-Polymerase beiträgt (Mukherjee *et al.*, 1999). Den anderen Untereinheiten der RNA-Polymerase können verschiedene Funktionen zugeordnet werden.

Die α -Untereinheit mit der Masse von 36.5 kDa besteht aus zwei unabhängigen Domänen, die über eine flexible Linker-Region miteinander verbunden sind. Eine wichtige Funktion der zwei α -Untereinheiten ist die Initiation der „Core“-Assemblierung (Igarashi und Ishihama, 1991). Weiterhin ist die α -Untereinheit für die Wechselwirkung mit DNA-Sequenzen upstream von bestimmten Promotoren sowie mit Transkriptionsfaktoren verantwortlich.

Die β -Untereinheiten sind mit einem Molekulargewicht von 150 kDa (β) und 155 kDa (β') die größten Untereinheiten der RNA-Polymerase. Sie bilden zusammen das katalytische Zentrum der RNA-Polymerase und haben wichtige Funktionen bei der Substrat-Bindung und der Katalyse der Bildung von Phosphodiesterbindungen (β -Untereinheit) sowie bei der DNA-Bindung (β' -Untereinheit; Gross *et al.*, 1996).

Zwischen den β -Untereinheiten und den größten Untereinheiten von eukaryontischen RNA-Polymerasen ist eine große Homologie zu finden.

Die σ -Untereinheit ist für die spezifische Promotorerkennung sowie für die Transkriptionsinitiation verantwortlich und wird nach der Initiation freigesetzt. In *E. coli* sind sieben alternative σ -Faktoren bekannt, die spezifische Promotoren ablesen können (Maeda *et al.*, 2000) und eine differentielle Genexpression bei unterschiedlichen Umwelteinflüssen erlauben. So gibt es z.B. einen speziellen σ -Faktor, σ^{38} oder σ^S , der für die Expression von „Stationäre Phase“-spezifischen Genen zuständig ist.

Die meisten Promotoren von *E. coli* werden durch den σ^{70} -Faktor erkannt, der für die Transkription der sogenannten „Haushaltsgene“ verantwortlich ist, die während des exponentiellen Wachstums exprimiert werden.

1.2.2 Strukturelemente von Promotoren

Als Promotoren werden die spezifischen DNA-Bindestellen bezeichnet, an denen die Transkription durch die RNA-Polymerase initiiert wird. Im Folgenden werden ausschließlich die charakteristischen Strukturelemente von σ^{70} -abhängigen Promotoren erläutert, da sich die vorliegende Arbeit mit der Transkriptionsregulation von σ^{70} -abhängigen Promotoren befaßt. Für σ^{70} -abhängige Promotoren sind Konsensus-Merkmale aus dem Vergleich von mehr als 300 natürlichen Promotoren gefunden worden (Abb. 1.1). Der Kernpromotor für σ^{70} -abhängige Gene besitzt eine konservierte -10 und -35 Region. Diese Regionen bestehen aus zwei hexameren Sequenzen, deren Zentren sich jeweils 10 BP und 35 BP upstream des Transkriptionsstarts (+1) befinden. Jedes Hexamer ist durch eine konservierte Sequenz charakterisiert. Die -10 Region weist die abgeleitete Konsensussequenz TATAAT auf und die -35 Region die Sequenz TTGACA (Harley und Reynolds, 1987; Lissner und Margalit, 1993). Der als „Spacer“ bezeichnete Abstand dieser beiden Regionen stellt das dritte Strukturelement von Promotoren dar (Collado-Vides *et al.*, 1991). Die „Spacer“-Region besitzt meistens eine Länge von 17 ± 1 BP, wobei die Sequenz offensichtlich nicht konserviert ist. Ausgehend von einer B-DNA-Helix, bei der 10.5 BP einer Helixwindung entsprechen, sind die Zentren der beiden Hexamere um etwa 68° gegeneinander verdreht (Wang und Syvanen, 1992). Somit ist die Länge des „Spacers“ für die Positionierung der -10 und -35 Region in einer bestimmten angularen Orientierung besonders wichtig.

Ein natürlicher Promotor, der in seiner Struktur vollständig mit den Konsensuselementen übereinstimmt, wurde bislang nicht gefunden. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass eine hohe Übereinstimmung von Promotoren mit den Konsensussequenzen zu einer erhöhten Promotoraktivität führt (Hawley *et al.*, 1983; Harley und Reynolds, 1987). Jedoch ist die Promotoraktivität auch abhängig davon, welche Nicht-Konsensusbase an einer bestimmten Position vorhanden ist (Hawley *et al.*, 1983). Um eine Aussage über die Promotorstärke zu treffen, reicht daher die Betrachtung der Kernpromotorstruktur nicht aus, da auch stromaufwärts (upstream) und stromabwärts (downstream) liegende Sequenzen die

Promotoraktivität positiv oder negativ beeinflussen können (Ellinger *et al.*, 1994). So besitzen viele Promotoren upstream des Kernpromotors von Position -60 bis -40 relativ zum Transkriptionsstart eine AT-reiche Region, die als UP-Element bezeichnet wird (Ross *et al.*, 1993). Dieses Sequenzelement kann die Aktivität eines Promotors positiv beeinflussen, da es eine Wechselwirkung mit der C-terminalen Domäne der α -Untereinheit der RNA-Polymerase eingehen kann (Blatter *et al.*, 1994; Gaal *et al.*, 1996), wodurch die Bindekonstante der RNA-Polymerase zum Promotor deutlich erhöht wird (Rao *et al.*, 1994). Zusätzlich sind bei zahlreichen starken Promotoren upstream (von -150 bis -40) und downstream (von $+1$ bis $+20$) des Transkriptionsstarts Sequenzelemente zu finden, die ebenfalls zur Promotoraktivität beitragen. Diese Sequenzen werden als UAS (upstream activating sequences) bzw. DSR (downstream sequence regions) bezeichnet (Record *et al.*, 1996).

Bei einer großen Anzahl von Promotoren ist die Startposition ein ATP und die flankierenden Positionen werden von einem CTP (-1) und einem TTP ($+2$) eingenommen (Hawley und McClure, 1983). Die Transkriptionsreaktion wird jedoch nicht immer an einer einzelnen Position gestartet, sondern es können mehrere aufeinanderfolgende Nukleotide als Startposition dienen. Die Transkriptionsstartstelle befindet sich aber in den meisten Fällen zwischen 5 und 9 BP downstream des 3'-Nukleotids der -10 Region. Es kann somit nicht durch die Primärstruktur, d.h. die Promotorsequenz, auf die Startposition geschlossen werden. Vielmehr ist der gesamte Promotorkontext für die Startposition ausschlaggebend (Wagner, 2000). Der allgemeine Ablauf des Transkriptionsprozesses wird im nächsten Abschnitt näher beschrieben.

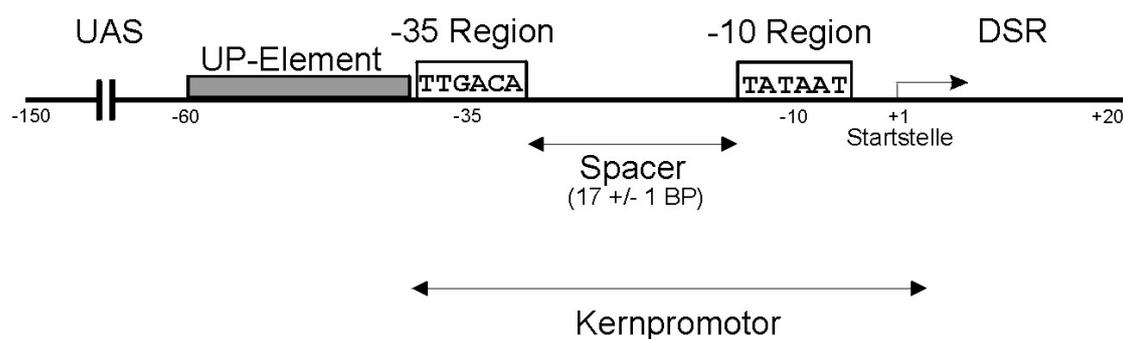


Abb. 1.1: Struktur eines σ^{70} -abhängigen *E. coli* Konsensus-Promotor.

Der Kernpromotor besteht aus der -35 und -10 Region, die durch eine Spacersequenz von 17 ± 1 Basenpaaren getrennt sind. Die Konsensussequenzen beider Erkennungsregionen sind angegeben. Weiterhin ist der Promotor durch flankierende Elemente im upstream- und downstream-Bereich charakterisiert (UAS: upstream activating sequences; DSR: downstream sequence regions). Die Zahlen stehen für die Positionen relativ zum Transkriptionsstart, der als Position $+1$ definiert wird (verändert nach Record *et al.*, 1996).

1.2.3 Die Transkription

Die gesamte Transkriptionsreaktion lässt sich in die drei Phasen Initiation, Elongation und Termination einteilen, wobei während jeder Phase eine komplexe Regulation stattfindet.

Bei der ersten Phase der Transkription, die Initiation, handelt es sich um einen Prozeß, der in 4 Hauptstufen unterteilt werden kann (Abb. 1.2).

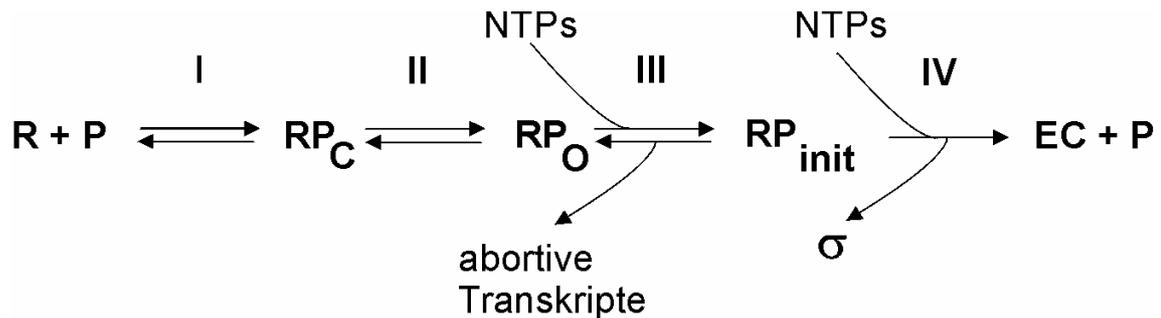


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der 4 Stufen (I-IV) der Transkriptionsinitiation bei Prokaryonten.

R: RNA-Polymerase; P: Promotor; RP_C: binärer geschlossener Komplex; RP_O: binärer offener Komplex; RP_{init}: ternärer Initiationskomplex; EC: Elongationskomplex; σ: Sigma-Faktor; NTPs: Ribonukleosidtriphosphate (verändert nach Record *et al.*, 1996).

In der ersten Stufe der Initiation erfolgt die Bildung eines binären, geschlossenen Komplexes (RP_C) durch Bindung der RNA-Polymerase (R) nach Erkennung der -10 und -35 Region an einen Promotor (P). In diesem Komplex ist der DNA-Doppelstrang noch nicht aufgeschmolzen und die RNA-Polymerase bedeckt einen Bereich von ca. 60 BP (von -55 bis +5; Mescas *et al.*, 1991). Nachfolgende Konformationsänderungen führen zu einem intermediären Promotorkomplex (RP_{C2}), wobei die RNA-Polymerase einen deutlich größeren Bereich von etwa 75 BP abdeckt (von -55 bis +20) (Spassky *et al.*, 1985; Record *et al.*, 1996).

In der zweiten Stufe der Initiation kommt es zur Bildung des binären, offenen Komplexes (RP_O). Dabei wird der DNA-Doppelstrang über eine Länge von 14 BP aufgeschmolzen (von -12 bis +2; Sasse-Dwight und Gralla, 1989). Der von der RNA-Polymerase abgedeckte Bereich ändert sich jedoch nicht.

Nach dem Einbau der ersten Ribonukleosidtriphosphate (NTPs) findet in der dritten Stufe die Bildung eines ternären Initiationskomplexes (RP_{init}) statt, welcher sich strukturell bis zum Einbau des dritten Nukleotids nicht von den binären Komplexen unterscheidet (Spassky, 1986; Newlands *et al.*, 1991). Ab dem Einbau des dritten Nukleotids kann allerdings eine downstream-Bewegung der RNA-Polymerase beobachtet werden.

Die letzte Stufe der Initiation führt nach der Freisetzung des σ -Faktors (σ) und Verlassen des Promotors („promotor clearance“) zu einem Elongationskomplex (EC). Bevor der Elongationskomplex gebildet wird, kann der Initiationskomplex wiederholt kurze Transkripte mit einer Länge von 2 bis 10 Nukleotiden (abortive Transkripte) synthetisieren, ohne dass die RNA-Polymerase den Promotor verläßt. Dieser Vorgang wird als abortive Initiation bezeichnet. Erst wenn ein Transkript mit einer Länge von über 10 Nukleotiden entsteht, geht die RNA-Polymerase nach Freisetzung des σ -Faktors und einer dadurch hervorgerufenen Konformationsänderung zur Bildung produktiver Transkripte über.

Während der Elongationsphase der Transkription katalysiert dann die „Core“-Polymerase den matrizenabhängigen Einbau der Ribonukleosidtriphosphate in die wachsende RNA-Kette. Dabei beträgt die Elongationsrate von bakteriellen RNA-Polymerasen etwa 50 Nukleotide/s *in vivo*. Für einige Gene, die nicht translatiert werden, wie z.B. die Gene der ribosomalen RNAs, wurden höhere Raten von bis zu 100 Nukleotiden/s *in vivo* gefunden (Vogel *et al.*, 1994). Die Elongation verläuft dabei nicht konstant, sondern ist aufgrund von unterschiedlich langen Pausen ein diskontinuierlicher Prozeß (Kassavetis und Chamberlin, 1981). Die Konformation des σ -freien Elongationskomplexes unterscheidet sich von der Konformation des Initiationskomplexes. Die elongierende RNA-Polymerase bedeckt einen Bereich von ca. 30 BP, wobei in der Transkriptionsblase etwa 18 BP des DNA-Doppelstranges aufgeschmolzen vorliegen. Dabei treten Wechselwirkungen der RNA-Polymerase mit den flankierenden DNA-Doppelstrangbereichen als auch mit transient einzelsträngigen DNA-Bereichen der Transkriptionsblase auf (Kainz und Roberts, 1992). Zudem ist der Templatestrang in der Transkriptionsblase mit dem 3'-Ende der naszierenden RNA-Kette hybridisiert. Die genaue Länge dieses DNA/RNA-Hybrids beträgt 8-12 Nukleotide (Polyakov *et al.*, 1995; Nudler *et al.*, 1998; Milan *et al.*, 1999; Korzheva *et al.*, 2000).

Bei der letzten Phase der Transkription, die Termination, dissoziiert die „Core“-Polymerase von der DNA und das fertige Transkript wird entlassen. Die Termination kann sich entweder faktorunabhängig ereignen oder durch ein spezielles Protein, den Terminationsfaktor Rho, hervorgerufen werden (Richardson, 1993). Bei der faktorunabhängigen Termination wird die elongierende RNA-Polymerase durch Ausbildung einer stabilen Haarnadelstruktur („hairpin“) des naszierenden RNA-Transkriptes gestoppt. Unmittelbar auf den „hairpin“ folgen 3-8 Uracil-Reste, die zu einer Destabilisierung des Elongationskomplexes führen (Brendel *et al.*, 1986).

Diese sogenannten intrinsischen Terminatoren vermitteln etwa 50% aller Terminationsereignisse bei *E. coli*. Dagegen besitzen faktorabhängige Terminatoren keine destabilisierenden Sequenzelemente. Bei dieser Art der Termination wird die Destabilisierung des Elongationskomplexes durch die Helikaseaktivität des Rho-Faktors verursacht (Walstrom *et al.*, 1997).

Der Rho-Faktor bindet als Hexamer an eine unstrukturierte C-reiche bzw. G-arme Region auf dem Transkript (Alifano *et al.*, 1991). Ausgehend von dieser Bindestelle bewegt sich der Rho-Faktor mittels seiner ATPase-Aktivität auf dem

Transkript in Richtung 3'-Ende entlang. Die Helikaseaktivität führt dann zur Trennung des RNA/DNA-Hybridstranges, was die Auflösung des Elongationskomplexes zur Folge hat (Jin *et al.*, 1992; Walstrom *et al.*, 1997).

Da im Rahmen dieser Arbeit die Regulation der ribosomalen Promotoren P1 und P2 des *rrnB* Operons untersucht wird, sollen im folgenden Teil der Aufbau der ribosomalen RNA-Operons und die verschiedenen Regulationsmechanismen der Synthese ribosomaler RNAs vorgestellt werden.

1.3 Die Bedeutung der ribosomalen RNA-Operons von *E. coli*

Das bakterielle Wachstum ist direkt mit der Kapazität der Zellen zur Proteinsynthese verbunden. Die dafür verantwortlichen Organellen, die Ribosomen, setzen sich aus drei verschiedenen RNA-Molekülen (rRNAs) und 52 verschiedenen Proteinen zusammen. Dabei bilden 31 ribosomale Proteine mit der 23S sowie 5S rRNA die große Ribosomenuntereinheit (50S) und 21 ribosomale Proteine mit der 16S rRNA die kleine Untereinheit (30S). Da die Translationsgeschwindigkeit eines Ribosoms maximal 15-20 Aminosäuren pro Sekunde beträgt (Engbaek *et al.*, 1973), kann schnelles bakterielles Wachstum nur durch die Erhöhung der Ribosomenzahl erfolgen. Die Rate der Ribosomenbildung wiederum wird durch die verfügbare Menge an rRNAs bestimmt. Daher nimmt die Synthese der ribosomalen RNAs eine Schlüsselrolle im bakteriellen Wachstum ein. Die Synthese der ribosomalen Proteine ist dagegen ein nachgeschalteter Prozeß und durch einen „Rückkopplungs-Inhibierungs-Mechanismus“ an die rRNA-Syntheserate angepaßt. Dieser Inhibierungsmechanismus verhindert eine überschüssige Bildung ribosomaler Proteine, indem freie, nicht an rRNAs assoziierte ribosomale Proteine an ihre eigene mRNA binden und die Proteinsynthese inhibieren.

1.3.1 Der Aufbau der ribosomalen RNA-Operons

E. coli besitzt sieben rRNA Operons (*rrnA*, *rrnB*, *rrnC*, *rrnD*, *rrnE*, *rrnG* und *rrnH*), die für drei verschiedene rRNAs und einige tRNAs kodieren. Die Anzahl der Operons ist bei Pro- sowie Eukaryonten von Organismus zu Organismus unterschiedlich. Durch die Organisation der 16S, 23S und 5S rRNA-Gene in polygene Operons kann die Bildung äquimolarer Mengen der drei rRNAs gewährleistet werden (Condon *et al.*, 1995). Die sieben ribosomalen Operons befinden sich auf dem *E.coli* Chromosom in unterschiedlichen Abständen zum bidirektionalen Replikationsursprung *oriC* (Ellwood und Nomura, 1982; Lindahl und Zengel, 1986). Dabei ist jedes Operon so orientiert, dass die Transkriptionsrichtung der Replikationsrichtung entspricht.

Der Aufbau der einzelnen Operons weist die gleiche Grundstruktur auf und variiert hauptsächlich in der Art und der Anzahl der enthaltenen tRNA-Gene. In der Abb.

1.3 ist der schematische Aufbau der rRNA-Operons am Beispiel des *rrnB* Operons dargestellt.

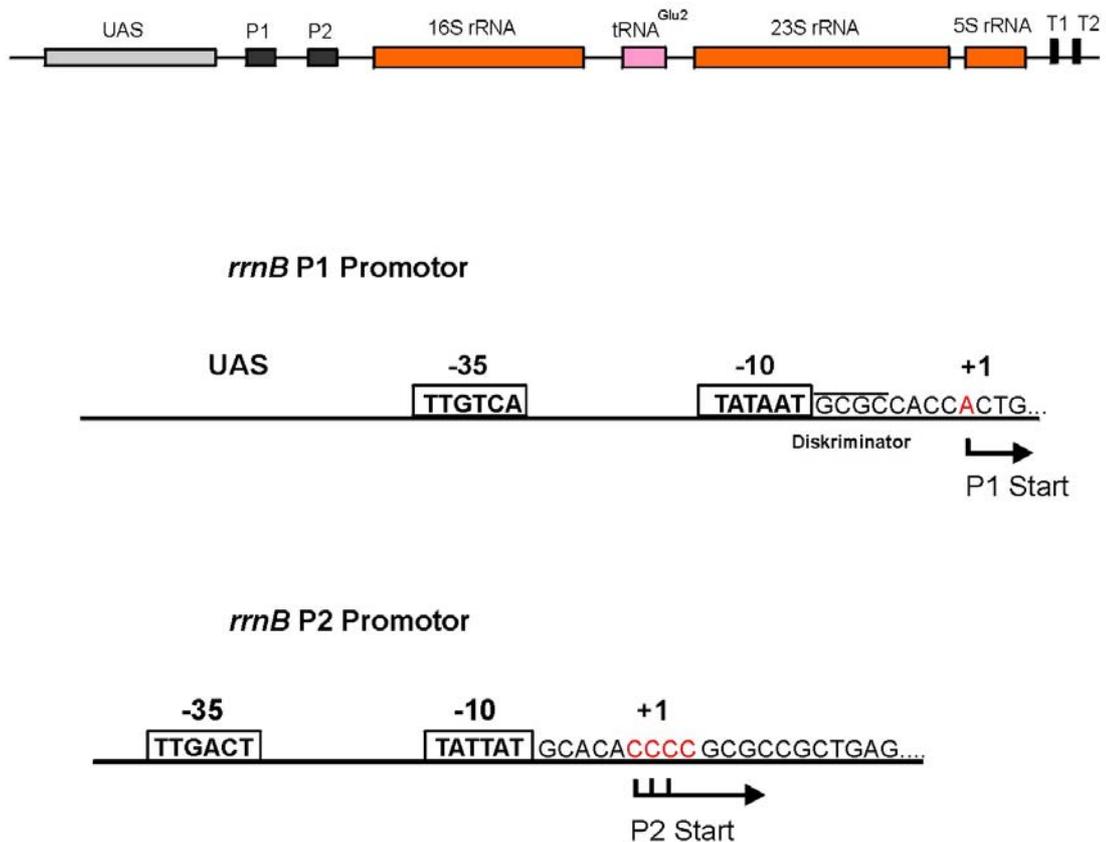


Abb. 1.3: Schematischer Aufbau des *rrnB* Operons aus *E. coli*.

Der obere Teil zeigt das vollständige Operon mit der UAS-Region, den Tandempromotoren P1 und P2, die Strukturgene für rRNA und tRNA sowie die zwei faktorunabhängigen Tandemterminatoren T1 und T2. Im unteren Teil sind die Promotorsequenzen des P1 und P2 Promotors mit ihren Erkennungsregionen und ihren Transkriptionsstartstellen dargestellt.

Bei jedem *rrn* Operon folgen auf eine regulatorische UAS-Region die tandemartig angeordneten Promotoren P1 und P2, von denen die Transkription einer regulatorisch wirkenden „Leader“-Region sowie der drei rRNA-Gene in der Reihenfolge 16S, 23S und 5S gestartet wird. Die rRNA-Gene sind durch „Spacer“-Regionen voneinander getrennt, die ihrerseits bei den einzelnen *rrn* Operons unterschiedliche tRNA-Gene enthalten. Die Termination der rRNA-Transkription erfolgt bei den meisten *rrn* Operons faktorunabhängig an den Tandemterminatoren T1 und T2. Eine Ausnahme unter den sieben *rrn* Operons stellt das *rrnD* Operon dar, da es zwei 5S rRNA-Strukturgene besitzt (Duester und Holmes, 1980). Der Bereich der Strukturgene ist bei allen Operons hoch

konserviert (Mori *et al.*, 1990). Es sind nur Abweichungen einzelner Basen, sogenannte Mikroheterogenitäten, innerhalb der Strukturgene zu finden. Jedoch unterscheiden sich die einzelnen Operons in den regulatorischen UAS-Regionen vor dem P1 Promotor. Diese AT-reichen, sequenzabhängig (intrinsisch) gekrümmten Regionen sind an der faktorunabhängigen sowie faktorabhängigen Regulation der rRNA-Transkription beteiligt, die nachfolgend neben weiteren Regulationsmechanismen erläutert werden.

1.3.2 Die Regulation der ribosomalen RNA Operons

Die Regulation der rRNA-Synthese erfolgt über eine Vielzahl aktivierender und reprimierender Mechanismen. Die wichtigsten Regulationsmechanismen werden im Folgenden vorgestellt.

1.3.2.1 Die Promotoren P1 und P2 der rRNA Operons

Die für alle ribosomalen Operons charakteristischen Tandempromotoren P1 und P2 gehören zu den stärksten Promotoren der Zelle, obwohl der Aufbau ihrer Erkennungsregionen deutlich von der optimalen Konsensusstruktur abweicht (Hawley und McClure, 1983). Neben einer nicht perfekten –35 Region besitzen sie einen suboptimalen „Spacer“ von 16 Basenpaaren. Im Gegensatz zu der hohen Aktivität *in vivo*, zeigen beide Promotoren *in vitro* eine vergleichsweise geringe Aktivität. Ein wesentlicher Grund dafür ist, dass die rRNA-Promotoraktivität stark von der Superhelikalität des Templates abhängig ist (Oostra *et al.*, 1981). Weiterhin ist die Stärke der ribosomalen Promotoren *in vivo* auch auf die upstream-Sequenzen zurückzuführen. Die Transkription der ribosomalen RNA-Gene kann von beiden Promotoren erfolgen. Früher wurde davon ausgegangen, daß der P1 Promotor hauptsächlich für die rRNA-Transkription verantwortlich ist (de Boer und Nomura, 1979) und einer vielfältigen Regulation unterliegt. Dem P2 Promotor wurde dagegen nur eine basale Transkriptionsrate und keine Regulation zugeschrieben (Sarmientos und Cashel, 1983). In neueren Untersuchungen konnte jedoch gezeigt werden, daß die Aktivität der beiden Promotoren *in vivo* vergleichbar ist und daß auch der P2 Promotor der stringenten Kontrolle unterliegt (Gafny *et al.*, 1994; Liebig und Wagner, 1995).

1.3.2.2 Die stringente Kontrolle und die Wachstumsratenkontrolle

Neben der upstream-Regulation sind die stringente Kontrolle und die Wachstumsratenkontrolle die wichtigsten Regulationsmechanismen der Synthese ribosomaler RNAs (Condon *et al.*, 1995). Schlüssel-molekül für beide Mechanismen ist das Effektor-nukleotid Guanosintetraphosphat (ppGpp), das sowohl durch die Ribosomen-assoziierte ppGpp-Synthetase I (RelA) als auch durch die cytosolische ppGpp-Synthetase II (SpoT) aus ATP und GTP gebildet wird (Pedersen und Kjeldgaard, 1977; Richter, 1979). Die bei Aminosäuremangel ausgelöste stringente Kontrolle führt zu einer Reduktion der rRNA-Transkription um etwa 90% (Sands und Roberts, 1952; Gallant, 1979). Dabei wird die ppGpp-Konzentration durch das RelA Protein um eine Größenordnung ($\mu\text{M} \rightarrow \text{mM}$) erhöht (Lund und Kjeldgaard, 1972).

Das SpoT Protein spielt im Gegensatz zu RelA keine wesentliche Rolle bei der Induktion der stringenten Kontrolle, sondern ist mit der Wachstumsratenkontrolle verbunden. Dabei ist die ppGpp-Konzentration in der Zelle umgekehrt proportional zur Wachstumsrate (Zacharias *et al.*, 1989). Die Wachstumsratenkontrolle führt ebenfalls durch ansteigende ppGpp-Konzentrationen bei langsamer Wachstumsrate zur Inhibierung der ribosomalen Promotoren. Zusätzlich ist SpoT hauptverantwortlich für den schnellen Abbau von ppGpp nach Überwindung eines Aminosäuremangels.

Für die ribosomalen P1 Promotoren wie für viele andere Promotoren, die negativ durch ppGpp reguliert werden, konnte ein notwendiges, aber nicht hinreichendes Sequenzelement im Bereich zwischen der -10 Region und dem Transkriptionsstart identifiziert werden: das sogenannte Diskriminator-motif GCGC (Zacharias *et al.*, 1989). Die weniger ppGpp-sensitiven ribosomalen P2 Promotoren besitzen dagegen eine von der Konsensussequenz leicht abweichende Diskriminatorsequenz (Liebig und Wagner, 1995; Heinemann und Wagner, 1997). Neben der negativen Regulation durch ppGpp gibt es ebenfalls positiv stringent kontrollierte Promotoren, z.B. von Aminosäurebiosynthese-Operons (Histidin, Tryptophan), denen ein AT-reiches Diskriminator-motif gemeinsam ist (Riggs *et al.*, 1986).

1.3.2.3 Die faktorunabhängige upstream-Regulation

Die UAS-Region (von Position -150 bis -40) ist sowohl für die faktorunabhängige als auch für die im nächsten Abschnitt beschriebene, faktorabhängige Regulation der rRNA-Synthese verantwortlich. Diese AT-reiche Region upstream der P1 Promotoren der ribosomalen Operons weist eine intrinsische Krümmung auf und verursacht eine starke Transkriptionsaktivierung (Gourse *et al.*, 1996). Solche intrinsisch gekrümmten Regionen sind bei einer Vielzahl von bakteriellen Promotoren upstream der -35 Region zu finden. Das Krümmungszentrum liegt

dabei oftmals zwischen der Position -50 und -100 . Die aktivierende Wirkung derartiger UAS-Regionen beruht offensichtlich auf einer Stabilisierung des binären RNA-Polymerase/Promotor-Komplexes aufgrund von erweiterten Kontakten, während die Isomerisierung vom geschlossenen zum offenen Komplex in den meisten Fällen unbeeinflusst bleibt (Zacharias *et al.*, 1991; Wagner, 1994; Perez-Martin *et al.*, 1994). Entscheidend für die Aktivierungsfunktion ist dabei die angulare Orientierung („Phasing“) der gekrümmten upstream-Sequenzen zum Promotor.

Neben der UAS-Region wird die faktorunabhängige upstream-Regulation noch durch das UP-Element (von Position -40 bis -60) vermittelt. Wie die UAS-Region ist auch das UP-Element AT-reich, besitzt im Gegensatz zur UAS-Region jedoch keine erkennbare intrinsische Krümmung. Das UP-Element trägt durch Wechselwirkung mit der C-terminalen Domäne der α -Untereinheit der RNA-Polymerase zur Stabilisierung des Transkriptionsinitiationskomplexes und somit zur Aktivierung der rRNA-Transkription durch Affinitätserhöhung bei (Ross *et al.*, 1993; Blatter *et al.*, 1994). Aufgrund der Wechselwirkung mit der RNA-Polymerase wird das UP-Element auch als drittes Promotor-Erkennungselement bezeichnet.

In den meisten Fällen üben diese intrinsisch gekrümmten upstream-Sequenzen ihre Funktion nicht direkt aus, sondern stellen Bindestellen für regulatorisch wirkende Proteine dar. Die Bindung von derartigen Proteinen kann zusätzlich eine DNA-Krümmung hervorrufen und wird als „bending“ bezeichnet. Solche Protein-induzierten Krümmungen können neben der RNA-Polymerase, die Architektur von Promotoren verändern und dadurch die Transkription positiv oder negativ beeinflussen (Perez-Martin, 1993; 1994). Diese Protein-vermittelte (faktorabhängige) Regulation der Transkription wird im nächsten Abschnitt näher erläutert.

1.3.2.4 Die faktorabhängige upstream-Regulation

Zusätzlich zur faktorunabhängigen Regulation der rRNA-Synthese wird auch eine faktorabhängige Regulation bei allen sieben *rrn* Operons durch die UAS-Region vermittelt. Durch beide Regulationsarten wird eine mehr als 300-fache Aktivierung der rRNA-Transkription erreicht (Gourse *et al.*, 1986).

Die faktorabhängige Regulation erfolgt dabei durch die Transkriptionsfaktoren FIS, H-NS und LRP. Als Transkriptionsfaktoren werden Proteine bezeichnet, die durch ihre Bindung die Transkription positiv oder negativ beeinflussen. Prokaryontische Transkriptionsfaktoren liegen meist als Multimere vor, die aus einer geraden Anzahl an Monomeren bestehen, und weisen eine Domänenstruktur auf. So besitzen Transkriptionsfaktoren Domänen, die jeweils für die DNA-Bindung, die Oligomerisierung, die Aktivierung oder Repression sowie für die Bindung von Cofaktoren zuständig sind. Die Domäne für die DNA-Bindung weist bei vielen Transkriptionsfaktoren als charakteristisches Merkmal ein DNA-Bindemotif, wie z.B. das Helix-Turn-Helix-, Leucin-Zipper-, Zinkfinger-, Helix-Loop-Helix- oder β -

Faltblatt-Motif auf (Wagner, 2000). Es gibt jedoch auch Transkriptionsfaktoren, wie H-NS, bei denen keines dieser klassischen DNA-Bindemotive gefunden werden konnte. Bei der Regulation der Transkription besitzen Transkriptionsfaktoren oftmals duale Funktionen. Sie können an einigen Promotoren als Repressor wirken und bei anderen wiederum als Aktivator. Die Eigenschaft als Repressor oder Aktivator zu wirken, hängt dabei größtenteils von der Position ihrer Bindestelle zum Promotor ab. Bevorzugte Bindestellen für Aktivatoren liegen zwischen Position -80 und -30 relativ zum Transkriptionsstart, während Repressoren häufig downstream der Position -30 binden (Gralla und Collado-Vides, 1996). Bei der Regulation der Transkription durch Transkriptionsfaktoren kann jeder Schritt der Initiationsphase betroffen sein. So können Transkriptionsfaktoren die Affinität der RNA-Polymerase für einen Promotor verändern, einen Einfluß auf die Isomerisierung haben oder auf die „promoter clearance“ wirken. Viele Aktivatoren können direkte Wechselwirkungen mit der RNA-Polymerase eingehen und dadurch den RNA-Polymerase/Promotor-Komplex stabilisieren. Die Aktivierung eines Promotors durch spezifische Wechselwirkungen zwischen der RNA-Polymerase und einem DNA-Bindeprotein wird auch als Aktivierung durch „recruitment“ bezeichnet (Ptashne und Gann, 1997). Weiterhin kann auch die DNA-Konformation bei der Regulation eine Rolle spielen. So kann ein von Transkriptionsfaktoren induziertes „bending“ der DNA die Architektur des Initiationskomplexes beeinflussen und damit beispielsweise den Aufschmelzvorgang (Isomerisierung) erleichtern. Einige Transkriptionsfaktoren besitzen neben Bindestellen proximal zum Promotor auch distal liegende Bindestellen. Durch die Bildung von „DNA-Loops“ können distal bindende Transkriptionsfaktoren in die Nähe eines Promotors gelangen und einen Effekt auf die Transkription ausüben. Der „DNA-Loop“ wird dabei häufig durch Protein-Protein-Wechselwirkungen stabilisiert. Dieses Phänomen wird auch als „action-at-a-distance“ bezeichnet (Adhya, 1989; Schleif, 1992; Rippe *et al.*, 1995). Die DNA-strukturierenden Proteine FIS, H-NS und LRP spielen bei der faktorabhängigen Regulation der rRNA-Synthese eine wichtige Rolle und werden nachfolgend detailliert beschrieben.

1.4 Die DNA-strukturierenden Proteine

Im Gegensatz zu Eukaryonten besitzen Prokaryonten keine Histone, die die chromosomale DNA kompaktieren. Jedoch wurden funktionell verwandte Proteine charakterisiert, die eine Rolle bei der Strukturierung und Kompaktierung der bakteriellen DNA spielen. Diese Proteine werden als histonähnliche oder DNA-strukturierende Proteine bezeichnet. Da ihre Aminosäuresequenzen nicht homolog zu eukaryontischen Histonproteinen sind und sie auch nicht alle, wie Histone, einen basischen Charakter besitzen, ist ihre Bezeichnung als DNA-strukturierende Proteine eher zutreffend. Mitglieder dieser Proteinfamilie sind z.B. HU (heat-unstable nucleoid protein), IHF (integration host factor), FIS (factor for inversion stimulation), H-NS (histone-like nucleoid structuring protein) und LRP (leucine-responsive regulatory protein) (Gualerzi und Pon, 1986). Die Proteinzusammensetzung des Nukleoids verändert sich in Abhängigkeit von der zellulären Konzentration der DNA-strukturierenden Proteine in den verschiedenen Wachstumsphasen (Azam und Ishihama, 1999). Inzwischen ist bekannt, daß diese Proteine neben der Kompaktierung und Veränderung der Superhelikalität der DNA, auch Funktionen als aktivierende oder reprimierende Transkriptionsfaktoren besitzen (Schmid, 1990; Williams und Rimsky, 1997). Dabei beeinflussen sich diese Nukleoid-assoziierten Proteine in unterschiedlichen Ausmaßen gegenseitig, wodurch sie zu vielseitigen Regulatorproteinen werden. Einige dieser Proteine binden spezifisch an definierte, meist degenerierte, Konsensussequenzen, während bei anderen eine spezifische Bindung nur an gekrümmte oder flexible DNA erfolgt.

1.4.1 „Factor for inversion stimulation“ (FIS)

FIS wurde ursprünglich als ein Protein entdeckt, das die DNA-Inversion von ortsspezifischen Rekombinasen stimuliert (Kahmann *et al.*, 1985; Nash *et al.*, 1996). Daher wurde es als „factor for inversion stimulation“ (FIS) bezeichnet. FIS ist ein 98 Aminosäuren langes, basisches Protein von 11.2 kDa, das in Lösung als Homodimer vorkommt. Die Synthese von FIS wird wachstumsphasenabhängig reguliert (Ninnemann *et al.*, 1992). In der exponentiellen Phase liegen etwa 50.000 FIS-Dimere/Zelle vor, während in der stationären Phase ihre Anzahl auf unter 100 Moleküle/Zelle sinkt.

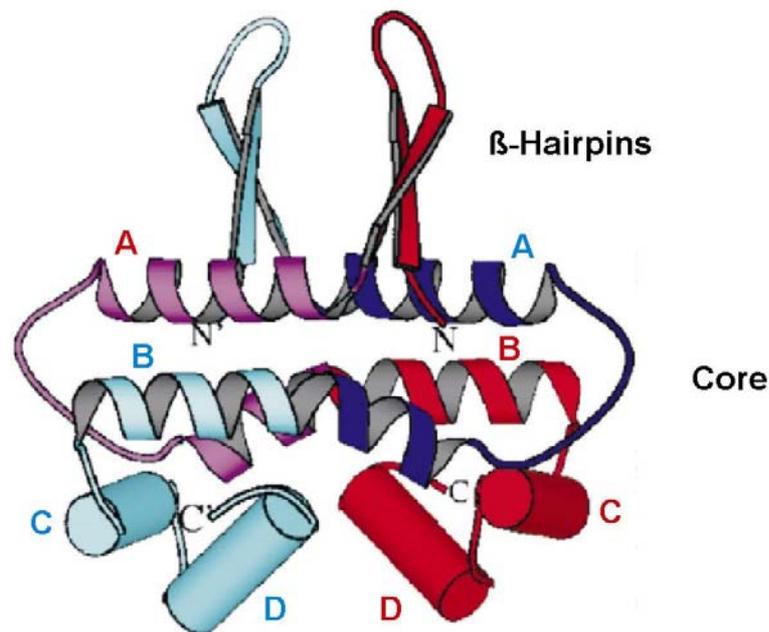


Abb. 1.4: Struktur eines FIS-Homodimers.

Das homodimere FIS Protein besteht aus einem „Core“ mit zwei mobilen „ β -Hairpins“. Das „Core“ jeder einzelnen Untereinheit ist aus 4 α -Helices (A-D) zusammengesetzt, wobei die zwei C-terminalen α -Helices C und D das Helix-Turn-Helix DNA-Bindemotif bilden und die N-terminalen α -Helices A und B die Dimerisierungsregion. (Abbildung aus Topping *et al.*, 2004)

Die spezifische DNA-Bindung erfolgt bei FIS über ein Helix-Turn-Helix-Motif an die große Furche der DNA (Kostrewa *et al.*, 1992; Yuan *et al.*, 1991; Osuna *et al.*, 1991; Koch *et al.*, 1991). Dabei bindet FIS spezifisch an eine stark degenerierte Konsensussequenz von 15 Nukleotiden ((G/T)NNYRNN(A/T)NNYRNN(C/A); N=beliebiges Nukleotid, Y=Pyrimidin, R=Purin; Hübner und Arber, 1989), die zusätzlich durch eine intrinsische DNA-Krümmung charakterisiert ist. Durch die FIS-Bindung wird eine DNA-Krümmung zwischen 40° und 90° hervorgerufen (Finkel und Johnson, 1992; Bailly *et al.*, 1995). Das FIS Protein wurde ebenfalls als Transkriptionsregulator erkannt. Bei den meisten Operons, die von FIS beeinflusst werden, wirkt FIS als ein Aktivator der Transkription. Aber es gibt auch wenige Systeme, wo FIS eine reprimierende Funktion ausübt. Dabei erfolgt sowohl die positive als auch die negative Regulation von Genen durch FIS häufig mit den antagonistisch wirkenden Transkriptionsfaktoren H-NS oder CAP (Tippner *et al.*, 1994; Falconi *et al.*, 1996; Afflerbach *et al.*, 1999). Das *fis*-Gen selbst unterliegt zudem der Autoregulation (Ball *et al.*, 1992).

Die wichtigste Funktion von FIS ist die Aktivierung der Transkription der rRNA-Operons. Alle UAS-Regionen der sieben ribosomalen Operons besitzen Bindestellen für das Aktivatorprotein FIS (Hillebrand, 2001). Die UAS-Region des *rnnB* Operons enthält drei FIS-Bindestellen, deren Zentren sich an den Positionen -70, -100 und -140 relativ zum P1-Start befinden (Zacharias *et al.*, 1991; 1992; Hirvonen *et al.*, 2001). Für die FIS-abhängige Aktivierung des *rnnB* Operons ist größtenteils die FIS-Bindestelle I, welche proximal zum P1 Promotor liegt, verantwortlich. Dabei ist für eine maximale Transkriptionsaktivierung durch FIS die Lage sowie die angulare Orientierung („Phasing“) dieser FIS-Bindestelle zum P1 Promotor von entscheidender Bedeutung. Eine Änderung der angularen Orientierung durch Insertion oder Deletion von Basenpaaren bewirkt eine deutliche Reduktion der FIS-Aktivierung (Wagner, 1994). Der Mechanismus der FIS-abhängigen Aktivierung läßt sich offensichtlich durch eine direkte Wechselwirkung zwischen FIS und RNA-Polymerase erklären, wodurch der RNA-Polymerase/Promotor-Komplex stabilisiert wird. Es gibt Hinweise auf eine Interaktion von FIS mit der α -Untereinheit (Bokal *et al.*, 1995) sowie mit der σ^{70} -Untereinheit (Muskhelishvili *et al.*, 1995) der RNA-Polymerase.

1.4.2 „Histone-like nucleoid structuring protein“ (H-NS)

H-NS wurde zuerst von Varshavsky *et al.* (1977) isoliert und als eine Hauptkomponente des bakteriellen Nucleoids identifiziert, wobei es damals noch als H1 bezeichnet wurde. Unter den Enterobakterien ist H-NS hochkonserviert. In eng verwandten Organismen sind mehr als 20 homologe Proteine mit ähnlichen regulatorischen Funktionen identifiziert worden (Bertin *et al.*, 1999). In *E. coli* ist H-NS ein 136 Aminosäuren großes Protein mit einem Molekulargewicht von 15.6 kDa. Im Gegensatz zu den anderen Nucleoid-assoziierten Proteinen von *E. coli* besitzt H-NS einen neutralen pI von etwa 7.5 (Lammi *et al.*, 1984). In der Zelle kommt H-NS in hohen Konzentrationen vor (20.000 Moleküle/Zelle; Williams und Rimsky, 1996), wobei die intrazelluläre H-NS-Konzentration in der stationären Phase ansteigt (Spassky *et al.*, 1984; Ueguchi *et al.*, 1993). FIS und das *E. coli* Kälteschockprotein CspA aktivieren die *hns*-Transkription (Falconi *et al.*, 1996; Brandi *et al.*, 1994), während H-NS die eigene Transkription negativ autoreguliert (Falconi *et al.*, 1993; Free und Dorman, 1995). Der Oligomerisierungszustand von H-NS in der Zelle sowie im Komplex mit DNA oder anderen Proteinen ist noch nicht geklärt. Die aktive Form des Proteins ist wahrscheinlich ein Homodimer, aber das Tetramer ist vermutlich die in freier Lösung vorherrschende Form von H-NS (Williams und Rimsky, 1997). Es wurden allerdings auch Trimere und höhere Aggregate von H-NS gefunden. Inzwischen ist klar, daß H-NS neben der Fähigkeit DNA zu kompaktieren, als Transkriptionsfaktor bei der Regulation von einer großen Anzahl von Genen eine Rolle spielt (Ussery *et al.*, 1994). Dabei wirkt H-NS hauptsächlich als Repressor. Für einige Gene konnte jedoch auch eine aktivierende Funktion von H-NS nachgewiesen werden, wie z.B. bei der

Transkriptionsregulation von Genen für die Flagellensynthese (Bertin *et al.*, 1994) oder von Genen des Maltose-Regulons (Johansson *et al.*, 1998). Das gemeinsame Merkmal von H-NS-regulierten Genen besteht darin, daß ihre Expression mit Streißbedingungen oder Umweltveränderungen verbunden ist. Der genaue Mechanismus, wie H-NS seine regulatorische Funktion ausübt, ist für alle Promotoren noch nicht genau geklärt und es ist anzunehmen, daß er für unterschiedliche Promotoren sehr verschieden sein kann.

Weiterhin ist bekannt, daß H-NS in drei verschiedenen Isoformen in der Zelle vorkommt, die sich in ihrem isoelektrischen Punkt unterscheiden (Spassky *et al.*, 1984; Ussery *et al.*, 1994). Die biologische Bedeutung der Existenz dieser Isoformen ist aber noch völlig unklar. Eine mögliche Ursache der Isoformen könnte eine posttranslationale Modifikation von H-NS sein. Die Art dieser Modifikation ist jedoch unbekannt. Eine Modifikation von H-NS durch Phosphorylierung konnte nicht nachgewiesen werden (Tippner *et al.*, 1994). Andererseits könnten die verschiedenen Isoformen auch auf die Bindung eines Cofaktors zurückzuführen sein. Es konnte eine Assoziation von H-NS mit Poly(3-hydroxybutyrat) (PHB) gezeigt werden (Huang und Reusch, 1996; Reusch *et al.*, 2002). Somit könnte PHB einen möglichen Cofaktor von H-NS darstellen.

H-NS bindet unspezifisch an jede doppelsträngige DNA sowie an einzelsträngige DNA und RNA. Eine spezifische Bindung von H-NS erfolgt nur an intrinsisch gekrümmte DNA oder an DNA, die eine hohe Flexibilität besitzt (Tippner und Wagner, 1995; Afflerbach *et al.*, 1999). Die Spezifität der Wechselwirkung von H-NS mit DNA beruht dabei nicht auf der Erkennung einer konservierten Nukleinsäuresequenz, sondern ist vielmehr konformationsabhängig (Yamada *et al.*, 1991; Owen-Hughes *et al.*, 1992; Ueguchi und Mizuno, 1993; Tupper *et al.*, 1994). Dabei ist die Geometrie der Krümmung wichtig und nicht nur die Krümmungsintensität (Hillebrand, 2001). Die Bindung von H-NS an DNA ist in den meisten Fällen ein kooperativer Vorgang. Ebenso wie FIS kann H-NS durch Bindung eine starke Krümmung der DNA hervorrufen. Generell sind die spezifischen Bindestellen von H-NS AT-reich.

H-NS besteht aus zwei Domänen mit unterschiedlichen Funktionen, die durch eine unstrukturierte Linker-Region getrennt sind (Renzoni *et al.*, 2001). Die N-terminale Domäne (1-64) ist für die Oligomerisierung von Bedeutung und die C-terminale Domäne (79-136) für die DNA-Bindung. Die Bindedomäne von H-NS enthält, wie bereits erwähnt, keines der klassischen DNA-Bindemotive. NMR-Untersuchungen mit einem 47 Aminosäuren langen C-terminalen Fragment von H-NS zufolge, besteht dieser Bereich aus einem β -Faltblatt, einer α -Helix und einer 3_{10} -Helix mit dazwischenliegenden Loop-Bereichen. Loop 2 ist wahrscheinlich für die DNA-Bindung verantwortlich (Abb. 1.5, Shindo *et al.*, 1995; 1999). Eine Beteiligung dieser Region an der DNA-Bindung konnte auch durch fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen gezeigt werden (Tippner und Wagner, 1995). Mit welcher der beiden DNA-Furchen H-NS eine Wechselwirkung eingeht, ist noch nicht geklärt. Durch *cross-link*-Experimente konnte bestätigt werden, das ein 64 Aminosäure langes N-terminales Fragment von H-NS die Domäne enthält, die

ausschlaggebend für die Oligomerisierung des Proteins ist (Williams *et al.*, 1996). Die von Schröder (1999) durchgeführten CD-Analysen weisen auf einen starken α -helikalen Charakter des N-terminalen Bereichs von H-NS hin. Spätere NMR-Untersuchungen zeigen, daß der N-Terminus von H-NS eine „coiled-coil“-Struktur ausbildet, die die Protein/Protein-Wechselwirkung vermittelt (Renzoni *et al.*, 2001; Esposito *et al.*, 2002; Bloch *et al.*, 2003).

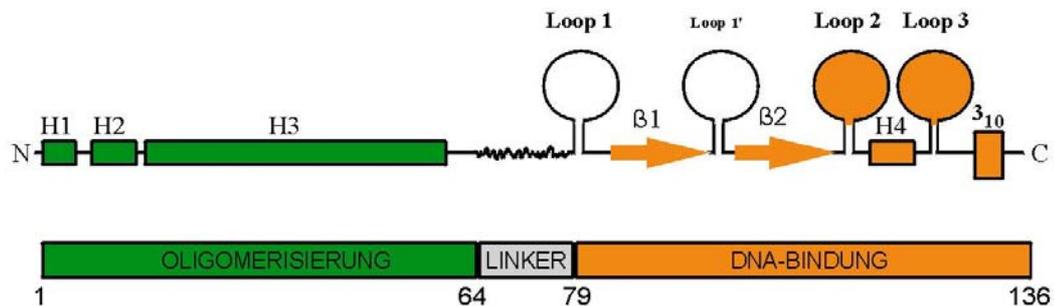


Abb. 1.5: Schematische Darstellung der Sekundärstruktur von H-NS.

Die N-terminale Oligomerisierungs-Domäne umfaßt die Aminosäuren 1-64 und besteht aus drei α -helikalen Regionen (H1, H2 und H3). Die flexible Linker-Region befindet sich zwischen den Positionen 64 und 79. Darauf folgt die DNA-Bindedomäne von Position 79 bis 136. Loop 1 der DNA-Bindedomäne bildet mit Loop 2 die DNA-Bindungsoberfläche, wobei Loop 2 den größten Teil des DNA-Bindemotifs enthält. Zwischen Loop 1 und 2 sind zwei kurze β -Stränge, $\beta 1$ und $\beta 2$, lokalisiert, die wiederum durch einen Loop (Loop 1') getrennt sind. Eine weitere α -helikale Region (H4) verbindet Loop 2 mit einem weiteren Loop (Loop 3), auf welchem eine 3_{10} -Helix-Struktur folgt (verändert nach Shindo *et al.*, 1995; 1999).

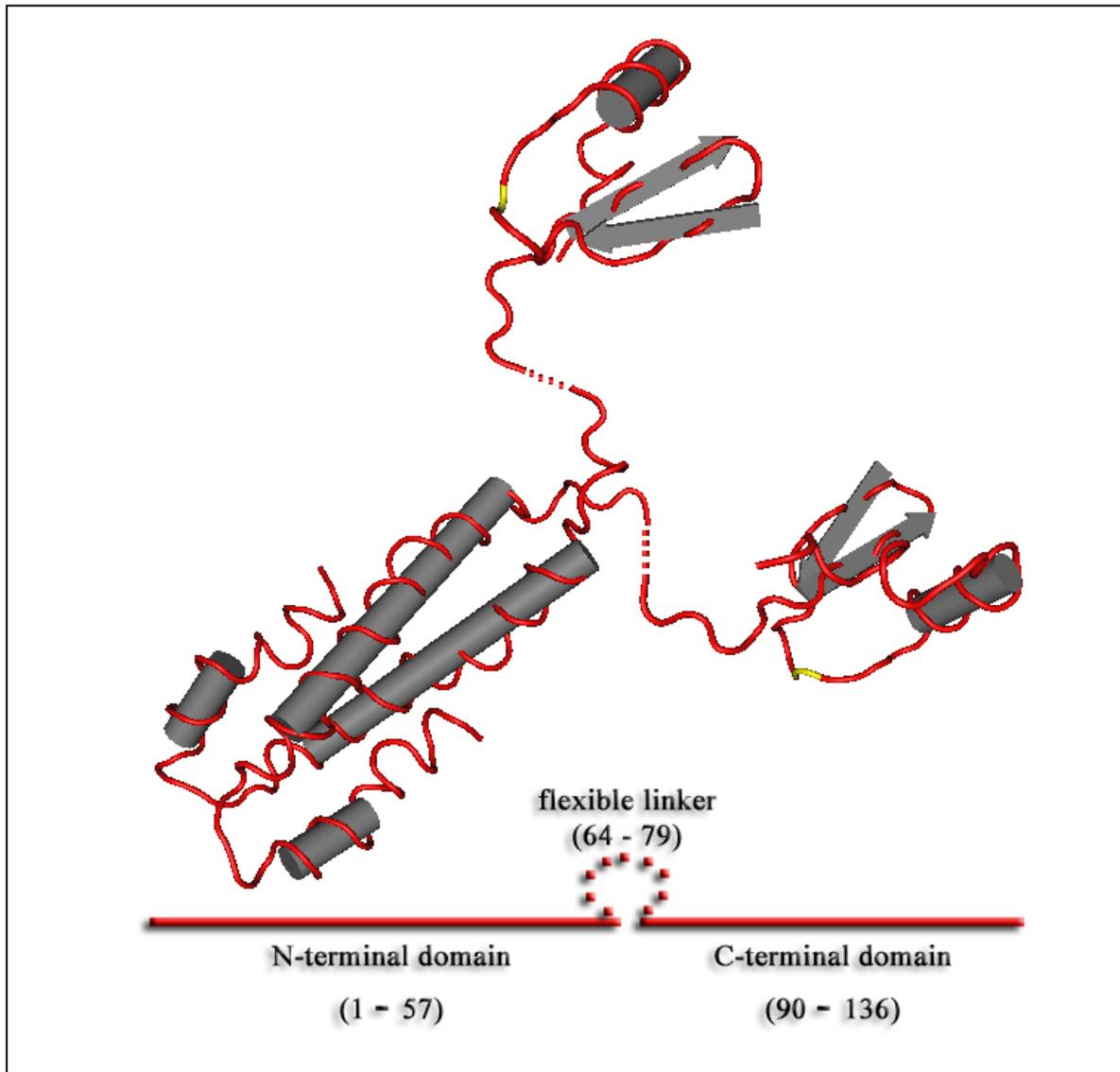


Abb. 1.6: Tertiärstrukturmodell eines H-NS Dimers arrangiert mit dem Programm Cn3D (nach Pul). Die N-terminalen Regionen zweier H-NS Monomere assoziieren durch eine „coiled-coil“-Wechselwirkung zu einem Dimer.

H-NS bindet wie FIS mit unterschiedlicher Affinität an alle UAS-Regionen der sieben ribosomalen Operons. FIS führt *in vivo* zu einer Aktivierung der Transkription aller sieben Operons und H-NS zu einer Repression (Hillebrand, 2001; Hirvonen *et al.*, 2001). Der Mechanismus der H-NS-abhängigen Repression des *rnnB* P1 Promotors konnte in den letzten Jahren weiter aufgeklärt werden. Es konnte gezeigt werden, daß H-NS nicht die Bindung der RNA-Polymerase am Promotor und die Bildung eines offenen Komplexes inhibiert, sondern vielmehr die RNA-Polymerase/Promotor-Komplexbildung stimuliert. Transkriptionsanalysen zeigten, daß H-NS offenbar den Initiationskomplex nach der Bildung eines 3 NT-langen Transkriptes arretiert, was durch das Festhalten („trapping“) der RNA-Polymerase am Promotor verursacht wird (Schröder und Wagner, 2000). Dieses

Modell konnte durch „Atomic Force Microscopy“ (AFM) belegt werden. Die AFM-Analysen (Abb. 1.7) zeigen, daß die DNA-Regionen upstream und downstream vom P1 Promotor durch H-NS zusammengehalten werden, wodurch die RNA-Polymerase am Promotor festgehalten wird (Dame *et al.*, 2002).

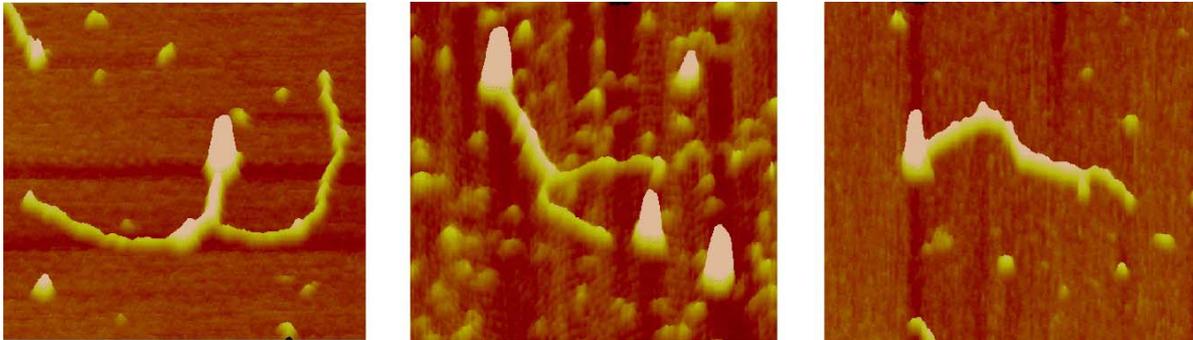


Abb. 1.7: *rrnB* P1 Promotorfragment mit RNA-Polymerase und H-NS.

Die RNA-Polymerase ist als weißer Hügel im AFM-Bild zu erkennen. Einzelne H-NS-Moleküle sind nicht sichtbar. Die Zugabe von H-NS zu vorgebildeten Initiationskomplexen führt zu einer durch H-NS hervorgerufenen, intramolekularen Verbindung der upstream und downstream vom P1 Promotor liegenden DNA-Bereiche, wodurch die RNA-Polymerase am Promotor festgehalten (getrappt) wird (aus Dame *et al.*, 2002).

1.4.3 „Leucine-responsive regulatory protein“ (LRP)

LRP ist ein kleines basisches, homodimeres DNA-Bindeprotein ($pI=9.2$) in *E. coli*. Jedes Monomer besteht aus 163 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 18.8 kDa. Es sind ca. 3000 Dimere in einer *E. coli* Zelle vorhanden (Willins *et al.*, 1991). Bei im nanomolaren Bereich vorliegenden Konzentrationen ist die aktive Form von LRP ein Dimer. Bei LRP-Konzentrationen im mikromolaren Bereich sind die aktiven Formen Hexadekamere und Leucin-gebundene Oktamere (Chen *et al.*, 2001). Das *lrp*-Gen wird negativ autoreguliert und unterliegt der inversen Wachstumsratenkontrolle. Dies bedeutet, daß die Transkription des *lrp*-Gens bei hohen Wachstumsraten inhibiert wird, wodurch der zelluläre LRP-Level invers zur Wachstumsrate ist. Somit korreliert die *lrp*-Expression direkt mit der zellulären ppGpp-Konzentration (Landgraf *et al.*, 1996).

Das LRP-Protein besteht aus drei funktionellen Domänen. Die N-terminale Domäne vermittelt die DNA-Bindung über ein Helix-Turn-Helix-Motif, während die C-terminale Domäne für die Oligomerisierung des Proteins und die Leucin-Bindung zuständig ist. Der zentralen Domäne wird eine Funktion bei der Aktivierung von Promotoren zugeschrieben.

Bislang konnte nur die Kristallstruktur von LrpA aus *Pyrococcus furiosus* bestimmt werden (Leonard *et al.*, 2001). Das LrpA Protein gehört, wie das LRP Protein, zur

Lrp/AsnC-Familie und besitzt eine Sequenzidentität von 28% zum *E. coli* LRP (Brinkmann *et al.*, 2000).

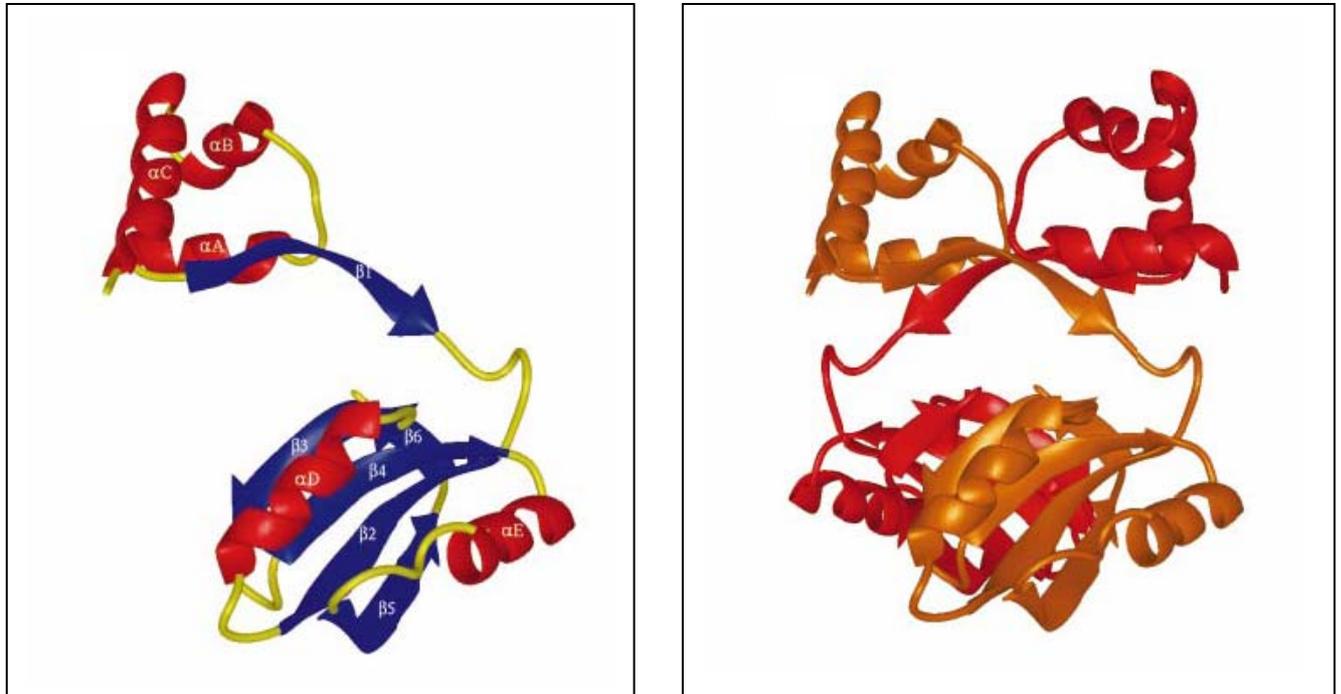


Abb. 1.8 (links) und Abb. 1.9 (rechts): Struktur eines LrpA-Monomers (Abb. 1.8) und eines LrpA-Homodimers (Abb. 1.9).

Links: Ein LrpA-Monomer besteht aus zwei Domänen, die durch einen β -Strang ($\beta 1$) miteinander verbunden sind. Die N-terminale Domäne wird aus drei α -Helices (αA - αC) gebildet. Die C-terminale Domäne umfaßt 5 β -Stränge ($\beta 2$ - $\beta 6$) und zwei α -Helices (αD - αE).

Rechts: Ein LrpA-Monomer ist in rot und das Zweite in orange dargestellt. Die DNA-Bindung erfolgt durch die beiden N-terminalen Erkennungshelices αC der beiden Monomere im LrpA-Dimer (Abbildungen aus Leonard *et al.*, 2001).

Die Bindung von LRP an DNA erfolgt über das in der N-terminalen Domäne lokalisierte Helix-Turn-Helix-Motif an die große Furche der DNA. Dabei bindet LRP an eine degenerierte Konsensussequenz (AGAATTTTATTCT; Wang *et al.*, 1993) und nur an doppelsträngige DNA. Für eine spezifische Bindung ist zusätzlich eine Krümmung der DNA erforderlich (Cui *et al.*, 1995). Bei nanomolaren LRP-Konzentrationen bindet *in vitro* ein LRP-Dimer an eine Bindestelle (Cui *et al.*, 1996). Weiterhin kann die Bindung von LRP die DNA-Krümmung verstärken. So induziert die Bindung von LRP an eine Bindestelle eine Biegung von ca. 52° und die LRP-Bindung an zwei benachbarte Bindestellen eine Biegung von wenigstens 135° (Wang und Calvo, 1993). Allgemein haben LRP-abhängige Promotoren multiple LRP-Bindestellen, an denen die Bindung von LRP hochkooperativ erfolgt (Calvo und Matthews, 1994).

Mehr als 70 Gene werden von LRP kontrolliert. In der Regel werden anabolische Prozesse durch LRP stimuliert, wohingegen katabolische Prozesse reprimiert werden (Cui *et al.*, 1996). Zu den von LRP positiv regulierten Operons zählen unter anderem Aminosäure-Biosynthese-Operons (*ilvH*, *serA*), Pili-Biosynthese-Operons (*pap*, *fan*, *fim*) und Ammonium-Assimilations-Operons (*glnA*, *gltBD*). Neben dem LRP-Gen sind weitere durch LRP negativ regulierte Operons z.B. Aminosäure-Abbau-Operons (*sdaA*, *tdh*) und Peptid-Transport-Operons (*opp*). Somit kann LRP als Transkriptionsaktivator oder Repressor wirken. L-Leucin wurde als ein wichtiges Effektormolekül von LRP identifiziert. Dabei kann L-Leucin die LRP-vermittelte Aktivierung bei manchen Promotoren verstärken, bei anderen Promotoren keinen Effekt haben und bei wiederum anderen Promotoren antagonistisch auf die LRP-vermittelte Regulation wirken (Calvo und Matthews, 1994). Zudem wurde festgestellt, dass L-Leucin einen Effekt auf die Oligomerisierung von LRP hat, da es die Dissoziation von Hexadekameren zu Leucin-gebundenen Oktameren fördert (Chen *et al.*, 2002).

Wie für H-NS, konnte auch für LRP eine Bindung an alle UAS-Regionen der sieben ribosomalen Operons festgestellt werden (Menzel, 2003). Art und Mechanismus der LRP-vermittelten Transkriptionsregulation bei den ribosomalen Operons sind jedoch noch unklar.

1.5 Fragestellung und Konzeption der Arbeit

Die Transkriptionsfaktoren FIS und H-NS spielen bei der faktorabhängigen Regulation der Synthese ribosomaler RNA eine wichtige Rolle. Für FIS konnte eine Funktion als Transkriptionsaktivator und für H-NS die eines Repressors nachgewiesen werden. Welche Funktion LRP bei der Regulation der ribosomalen Operons ausübt, war jedoch bislang nicht untersucht worden. Daher lag ein Ziel der Arbeit in der Analyse des LRP-Effektes auf die P1 Promotoraktivität des ribosomalen Operons *rrnB*.

Es war bereits bekannt, daß Abstand und angulare Orientierung („Phasing“) der FIS Bindestellen über das Ausmaß der FIS-abhängigen Regulation entscheiden. Jedoch fehlte eine analoge Untersuchung für H-NS und LRP. Daher war ein weiteres Ziel der Arbeit, eine „Phasing“-Analyse mit einer gekrümmten upstream-Region durchzuführen, um den Einfluß des Abstandes und der angularen Orientierung bei der H-NS- und LRP-abhängigen Transkriptionsregulation von Promotoren durch *in vitro* Transkriptionsanalysen zu überprüfen. Zusätzlich war beabsichtigt, die faktorunabhängige Wirkung der unterschiedlich orientierten upstream-Region auf die Promotoraktivität zu untersuchen. Zur Durchführung dieser „Phasing“-Analyse sollten Plasmide konstruiert werden, die eine synthetische upstream-Region jeweils in unterschiedlichen Abständen stromaufwärts von zwei Promotoren besitzen. Über die Abstandsvariationen sollten somit verschiedene angulare Orientierungen („Phasing“) dieser upstream-Region erzielt werden. Als Promotor wurde einerseits ein in seinem natürlichen Kontext UAS- und Faktor-unabhängiger Promotor (*rrnB* P2) gewählt und andererseits ein durch UAS und Transkriptionsfaktoren regulierter Promotor (*rrnB* P1). Durch die Wahl des *rrnB* P2 Promotors sollte zudem überprüft werden, ob dieser Promotor durch upstream-Regionen und Transkriptionsfaktoren in seiner Aktivität beeinflusst werden kann.

Mit Hilfe von Retardierungsanalysen sollte ein Vergleich durchgeführt werden, ob H-NS, LRP und FIS trotz der unterschiedlichen angularen Orientierungen der upstream-Region jeweils die gleiche Bindungsaffinität zu den „Phasing“-Konstrukten besitzen. DNase I-„footprints“ sollten die Bereiche der Wechselwirkungen von den DNA-bindenden Proteinen H-NS, LRP und FIS mit den „Phasing“-Konstrukten und mit dem natürlichen P1-Promotorfragment genauer charakterisieren und weitere Informationen für die einzelnen Regulationsmechanismen liefern.

Zusätzlich sollten Supershift-Retardierungen zeigen, ob die Transkriptionsfaktoren H-NS, LRP und FIS jeweils gleichzeitig mit der RNA-Polymerase an das P1-Promotorfragment binden können oder ob sie die Wechselwirkung von RNA-Polymerase und Promotor stören.

2 Ergebnisse

2.1 Klonierung einer synthetischen H-NS Bindestelle in unterschiedlicher angularer Orientierung vor den ribosomalen Promotoren *rrnB* P1 und *rrnB* P2

Der Transkriptionsfaktor H-NS interagiert, ähnlich wie FIS, spezifisch mit der UAS-Region des *rrnB* Operons. Für beide Proteine konnten drei spezifische Bindestellen, die sich teilweise überlappen, identifiziert werden (Tippner *et al.*, 1994). Zusammen vermitteln FIS und H-NS über einen funktionellen Antagonismus die faktorabhängige Regulation der ribosomalen RNA-Synthese (Afflerbach *et al.*, 1999).

Die Mechanismen der Transkriptionsaktivierung durch FIS und der Repression durch H-NS sind dabei größtenteils bekannt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Fragestellung genauer untersucht werden, inwieweit Abstand und angularer Orientierung des gebundenen H-NS relativ zu einem Promotor für die Transkriptionsregulation von Bedeutung sind.

Für viele Transkriptionsfaktoren, wie z.B. auch für FIS, ist bekannt, daß Abstand und angularer Orientierung („Phasing“) ihrer Bindestelle zum Promotor über das Ausmaß der Transkriptionsregulation sowie über die Art der Regulation, Aktivierung oder Repression, entscheiden.

Zur Überprüfung, ob dieser Sachverhalt ebenfalls für den Transkriptionsfaktor H-NS zutrifft, wurde eine „Phasing“-Analyse mit einer synthetischen H-NS Bindestelle durchgeführt, die in unterschiedlichen Abständen upstream des *rrnB* P1 sowie des *rrnB* P2 Promotors kloniert worden ist.

Die synthetische H-NS Bindestelle besteht aus 8 hintereinanderliegenden AT-Clustern, die jeweils durch GC-Basenpaare getrennt sind. Sie weist daher die für eine spezifische H-NS/DNA-Wechselwirkung benötigte, intrinsische Krümmung auf.

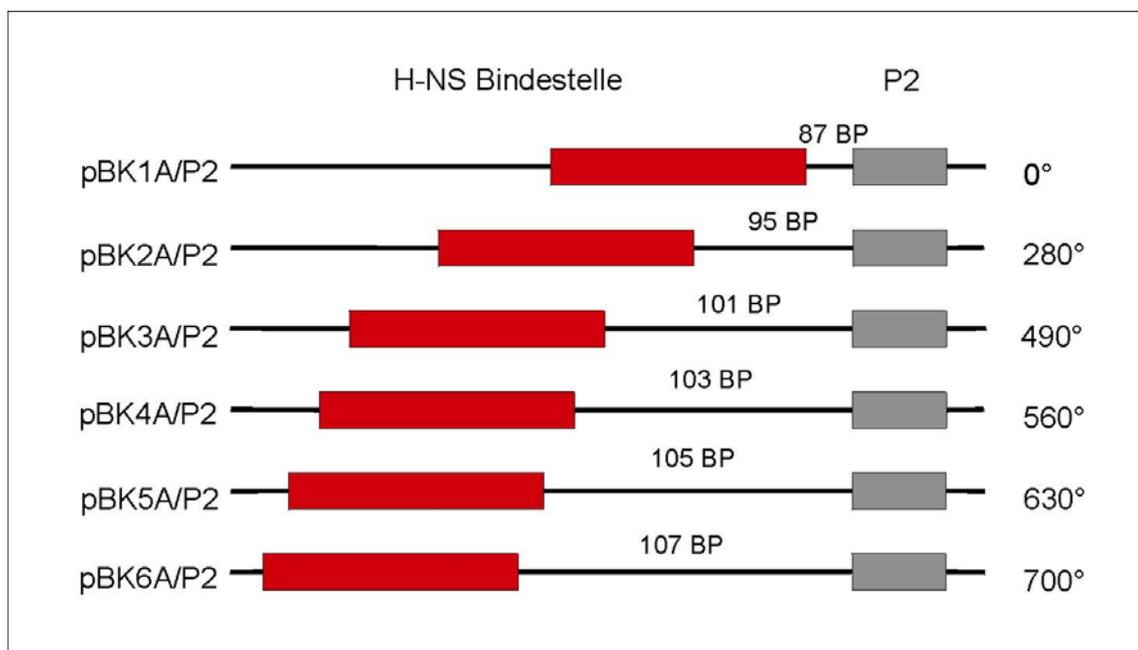


Abb. 2.1: Sequenz der synthetischen H-NS Bindestelle. Z gibt das Zentrum der H-NS Bindestelle an.

Mit dem *rrnB* P1 Promotor wurde ein H-NS-abhängiger Promotor in seiner natürlichen Umgebung ausgewählt. Durch die Wahl des H-NS-unabhängigen *rrnB* P2 Promotors sollte zudem überprüft werden, ob dieser Promotor durch das Vorschalten von H-NS Bindestellen, positiv oder negativ durch H-NS reguliert werden kann.

Die Klonierung der P2-Konstrukte pBK1A/P2 bis pBK6A/P2 wurde bereits ausführlich beschrieben (Bianca Komp, 2000). Für die P1-Konstrukte wurde die Klonierung analog mit dem *rrnB* P1 Promotor durchgeführt. Die erhaltenen P1-Konstrukte pBK1A/P1 bis pBK5A/P1 wurden sequenziert (5.3.1), um für jedes Plasmid den genauen Abstand zwischen dem Zentrum der synthetischen H-NS Bindestelle und dem Transkriptionsstart +1 des P1 Promotors zu bestimmen. In der Abb. 2.2 sind die Abstände bei den P2-Konstrukten sowie bei den P1-Konstrukten aufgeführt.

P2-Konstrukte:



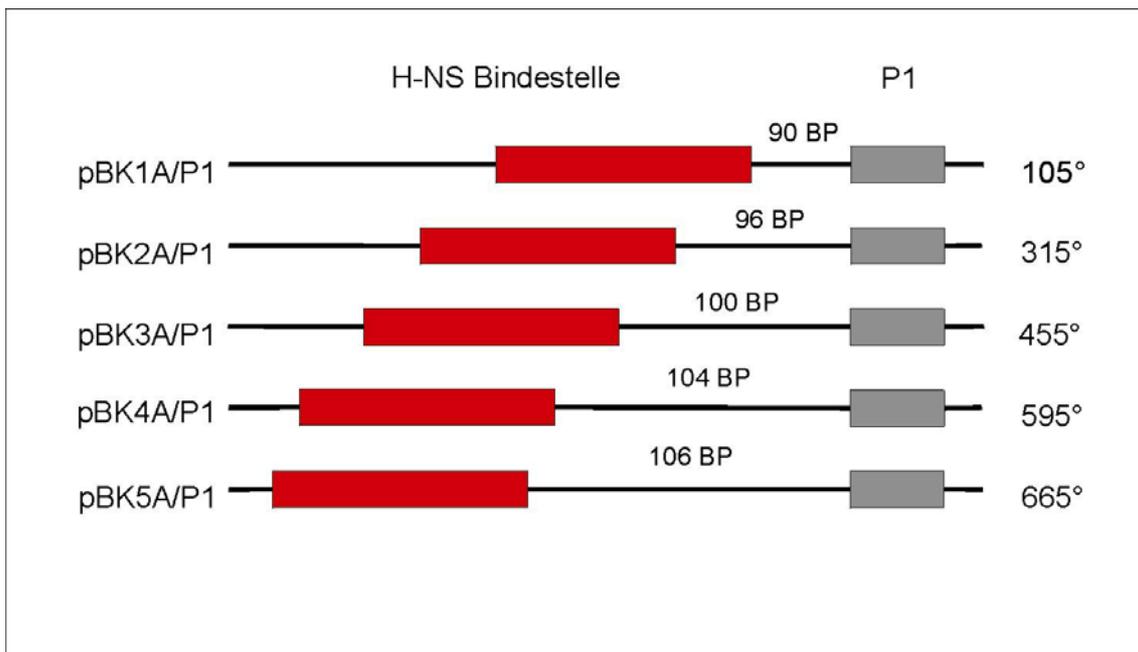
P1-Konstrukte:

Abb. 2.2: Abstandsvariationen des Zentrums der synthetischen H-NS Bindestelle zum Transkriptionsstart +1 des *rrnB* P2 Promotors bei den Plasmiden pBK1A/P2 bis pBK6A/P2 und zum Transkriptionsstart +1 des *rrnB* P1 Promotors bei den Plasmiden pBK1A/P1 bis pBK5A/P1. Rechts sind die berechneten Grad-Werte der angularen Orientierung angegeben.

Die angulare Orientierung des ersten P2-Konstruktes (pBK1A/P2) wurde gleich 0° gesetzt und die Orientierungen der weiteren P2- sowie P1-Konstrukte wurden entsprechend berechnet. Dabei wurde berücksichtigt, daß 10.5 BP einer Helixwindung (360°) entsprechen. Somit verändert ein zusätzliches Basenpaar die angulare Orientierung der Bindestelle um ungefähr 35°. Die nachfolgende Abb. 2.3 zeigt die sich aus der Berechnung ergebene angulare Orientierung der H-NS-Bindestelle relativ zum P2 bzw. P1 Promotor bei den einzelnen Plasmiden.

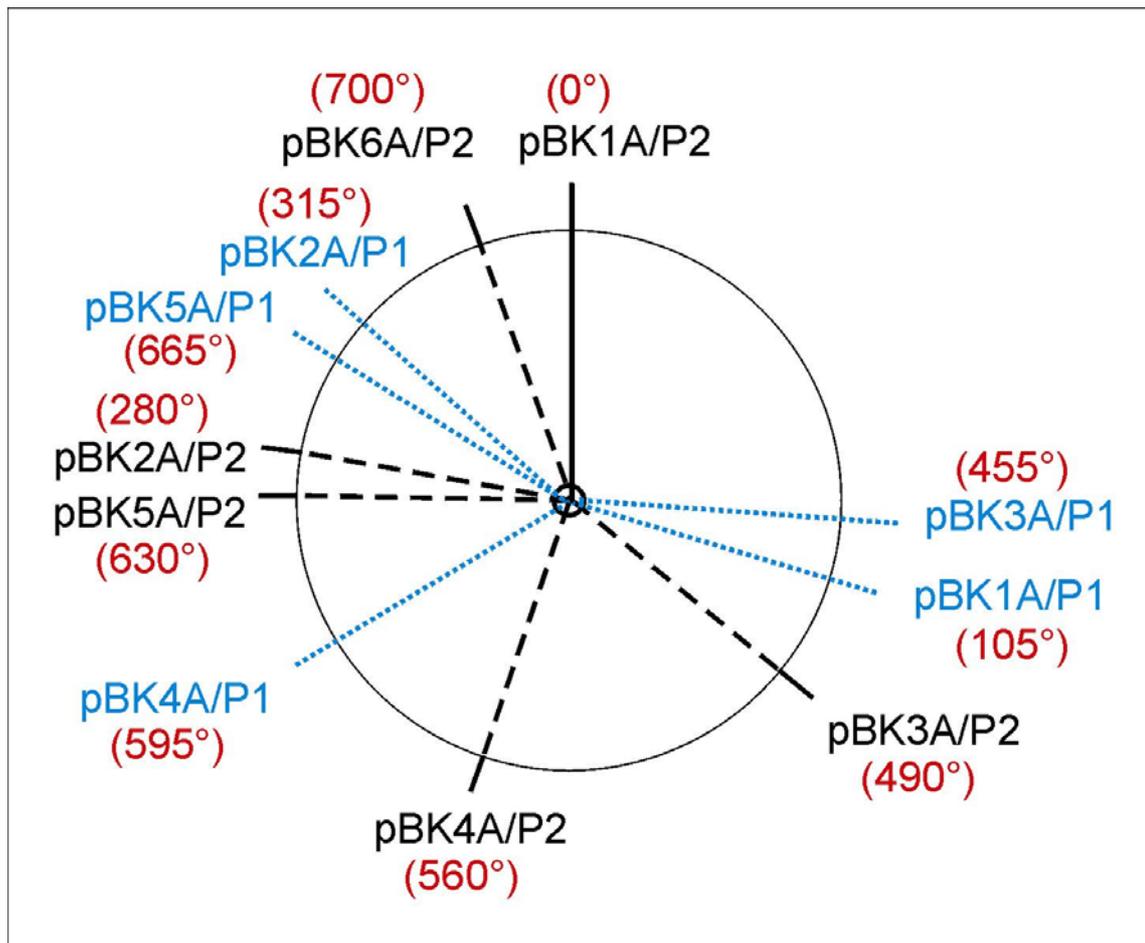


Abb. 2.3: Phasingvariationen des Zentrums der synthetischen H-NS Bindestelle relativ zum Transkriptionsstart +1 der Promotoren P2 und P1 (Betrachtung ausgehend vom Promotor entlang der Helixachse).

Mit den vorliegenden Plasmiden sollte überprüft werden, welche Rolle Abstand und angulare Orientierung der H-NS Bindestelle zum Promotor für die Spezifität und Regulatoreigenschaften von H-NS spielen. Aufgrund der Feststellung, daß LRP ebenfalls an die upstream-Regionen aller sieben ribosomalen Operons bindet, sollte die Phasingabhängigkeit auch für den Transkriptionsfaktor LRP analysiert werden. Weiterhin sollten die vorliegenden Konstrukte dafür genutzt werden, um zu bestimmen, ob die Basalaktivität der Promotoren P1 und P2 von der unterschiedlichen angularen Orientierung der synthetischen upstream-Region abhängig ist.

2.2 2D-Gelelektrophorese von überexprimiertem H-NS

Es ist seit längerer Zeit bekannt, daß H-NS in der Zelle in drei verschiedenen Isoformen vorkommt, die sich in ihrem isoelektrischen Punkt unterscheiden (Späßky *et al.*, 1984).

Um funktionelle Unterschiede aufgrund verschiedener Isoformen-Zusammensetzung auszuschließen war es zuvor notwendig, daß verwendete, überexprimierte H-NS auf das Auftreten von Isoformen zu untersuchen. Die folgende Abb. 2.4 zeigt die 2D-Gelanalyse (5.3.8) von überexprimiertem H-NS.

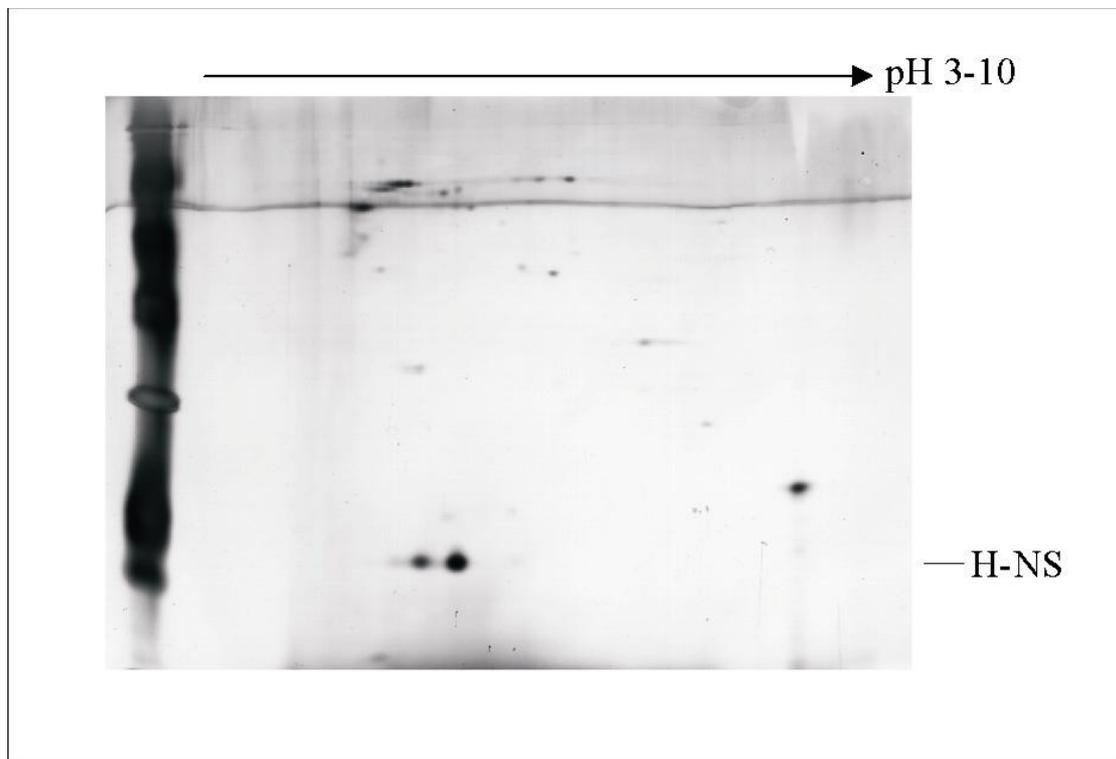


Abb. 2.4: 2D-Gelanalyse von überexprimiertem H-NS. Silbergefärbtes 15%iges SDS-Gel nach IEF.

Es ist erkennbar, daß das überexprimierte H-NS ebenfalls drei Isoformen aufweist. Die Hauptisoform von H-NS befindet sich von den drei Spots rechts und weist den höchsten pI von ungefähr 5,6 auf. Der mittlere Spot stellt die am zweithäufigsten auftretende Isoform von H-NS mit einem abgeleiteten pI-Wert von 5,4 dar. Die dritte Isoform mit dem niedrigsten pI-Wert von ungefähr 5,1 ist nur sehr gering in der Isoformen-Zusammensetzung von H-NS vertreten.

Da das in dieser Arbeit eingesetzte H-NS die gleichen Isoformen zeigt wie natürliches H-NS, konnte es unbedenklich für die nachfolgenden Analysen verwendet werden.

Die biologische Bedeutung und die Ursache für das Auftreten dieser verschiedenen Isoformen ist bisher unklar. Ursachen könnten eine posttranslationale Modifikation (wie z. B. Oxidation) oder die Bindung eines Cofaktors (z. B. PHB) sein (Ussery *et al.*, 1994; Reusch *et al.*, 2002). Jedoch besteht ebenfalls die Möglichkeit, daß es sich bei den Isoformen um Konformationsisomere handelt. Dafür spricht, daß die Isolierung und anschließende Auftrennung einer H-NS-Isoform wieder drei Proteinspots ergab (Pul, persönliche Mitteilung). Zwei existierende Konformationen wurden kürzlich für ein in verschiedenen Enterobakterien H-NS-homologes Nukleoid-assoziiertes Protein, genannt Hha, gefunden (Garcia *et al.*, 2005).

Das Vorliegen von H-NS-Konformationsisomeren könnte z. B. bei der H-NS-vermittelten Thermoregulation der Expression von Virulenzgenen (*virF*; Falconi *et al.*, 1998) eine Rolle spielen. Bisher wurde eine temperaturabhängige Konformationsänderung der *virF* Promotorregion als Mechanismus angenommen. Würden verschiedene H-NS-Konformationsisomere existieren, so könnte zusätzlich zur Veränderung der DNA-Konformation eine temperaturabhängige Konformationsänderung von H-NS stattfinden und für den Mechanismus der Thermoregulation von Bedeutung sein.

Neben H-NS wurden die Transkriptionsfaktoren LRP und FIS in Retardierungsanalysen, in *in vitro* Transkriptionen und „footprints“ eingesetzt.

2.3 Retardierungsanalysen

Die DNA-Bindungseigenschaften von H-NS, LRP und FIS können mit Hilfe der Verzögerungs- oder auch Retardierungsgelelektrophorese (5.3.2) nachgewiesen werden. Grundlegendes Prinzip dieser Methode ist die Verringerung der Laufgeschwindigkeit eines Nukleo-Proteinkomplexes in der Gelmatrix unter nicht-denaturierenden Bedingungen gegenüber der freien Nukleinsäure. Ursachen dieser Mobilitätsverzögerung sind das erhöhte Molekulargewicht des Komplexes gegenüber der freien DNA sowie eine Veränderung der Konformation der Nukleinsäure durch die Einführung von proteininduzierten Krümmungen.

2.3.1 Der Einfluß von Distamycin auf die DNA-Bindung von H-NS, LRP und FIS

Um die Rolle der DNA-Krümmung für die Bindung der Transkriptionsfaktoren H-NS, LRP und FIS zu überprüfen, wurde die Krümmung der UAS-Region des P1-Fragmentes durch Zugabe von Distamycin verringert (Abb. 2.5). Das Reagenz Distamycin bindet an AT-reiche Regionen der kleinen Furche der DNA und hebt dadurch die intrinsische Krümmung der DNA auf. Somit kann Distamycin die DNA-Bindung von Proteinen beeinflussen, deren Bindung von der DNA-Konformation abhängig ist.

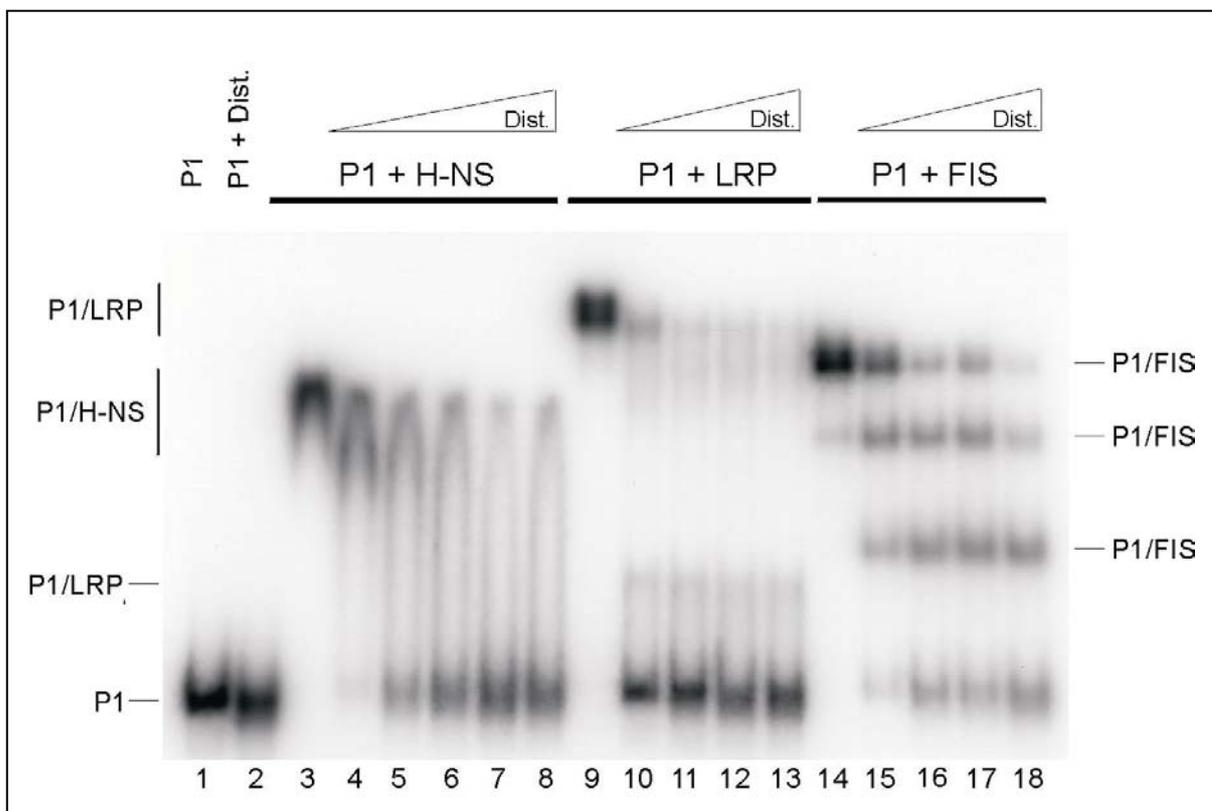


Abb. 2.5: Einfluß von Distamycin auf die Bindung von H-NS, LRP und FIS an die UAS-Region des P1-Fragmentes. Es wurden jeweils 2 nM radioaktiv markiertes P1-Fragment und 50 ng/ μ l Heparin in jedem Retardierungsansatz eingesetzt. In den Spuren 1 und 2 befinden sich die proteinfreien Kontrollen in Abwesenheit und in Gegenwart von 20 μ M Distamycin. In den Spuren 3 bis 8 ist die Retardierung des P1-Fragmentes mit 4 μ M H-NS bei steigenden Distamycin-Konzentrationen (1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M und 20 μ M Distamycin) dargestellt; Spur 9 bis 13: Retardierung des P1-Fragmentes mit 1 μ M LRP bei steigenden Distamycin-Konzentrationen; Spur 14 bis 18: Retardierung des P1-Fragmentes mit 0.5 μ M FIS bei steigenden Distamycin-Konzentrationen.

Die unterste Bande in allen Spuren der Abb. 2.5 repräsentiert das freie P1-Fragment. Die ansteigende Distamycin-Konzentration führt zu einer Aufhebung der intrinsischen Krümmung des DNA-Fragmentes, was sich in einer erhöhten

Mobilität des freien Fragmentes bei hohen Distamycin-Konzentrationen äußert. In Abwesenheit von Distamycin ergibt die Bindung von H-NS an das P1-Fragment einen Komplex, der im Gel weit nach oben shiftet (Spur 3). Das Fehlen von Zwischenprodukten deutet auf eine kooperative Besetzung der Bindestellen mit H-NS-Molekülen hin. Die stark verringerte Mobilität des Komplexes gegenüber dem freien Fragment kann nicht nur durch den Molekulargewichtszuwachs erklärt werden, sondern auch durch H-NS-bedingte Konformationsänderungen.

Zudem weisen H-NS-Komplexe eine geringe Stabilität in Acrylamidgelen auf, da die Banden dieser Komplexe unscharf sind und nach unten „schmieren“. Eine Schärfung der H-NS-Komplexbanden kann durch Kühlung während der Retardierungselektrophorese erreicht werden.

Wird Distamycin vor der Komplexbildung zugegeben, nimmt die Intensität der H-NS-Komplexbande ab und die des freien P1-Fragmentes zu (Spur 4 bis 7). Der Zeitpunkt der Distamycin-Zugabe ist nicht von entscheidender Bedeutung, da eine Zugabe von Distamycin nach der Komplexbildung (Spur 8) das gleiche Ergebnis liefert wie die Zugabe der gleichen Menge vor der Komplexbildung (Spur 7).

Bei der Komplexbildung von LRP mit dem P1-Fragment sind zwei dicht zusammenlaufende Komplexbanden sichtbar, deren Mobilitäten geringer sind als die des H-NS-Komplexes (Spur 9). Wie bei H-NS liegt auch im Fall von LRP eine kooperative DNA-Bindung mit nachfolgenden Konformationsänderungen vor.

Bei Distamycin-Zugabe verschwindet die oberste dieser zwei Komplexbanden bereits bei einer Distamycin-Konzentration von 1 μM (Spur 10). Die untere Komplexbande bleibt sichtbar, besitzt aber eine geringere Intensität. Neben der Zunahme des freien P1-Fragmentes bei Erhöhung der Distamycin-Konzentration tritt noch ein weiterer LRP-Komplex (P1/LRP_i) mit einer höheren Mobilität auf (Spur 10 bis 13). Bei dieser Bande (P1/LRP_i) handelt es sich wahrscheinlich um Komplexe, bestehend aus dem P1-Fragment mit einem gebundenen LRP-Dimer. Vermutlich sind bei den zwei Banden mit der geringeren Mobilität (P1/LRP) höhere Oligomere wie LRP-Oktamere oder LRP-Hexadecamere an der Komplexbildung beteiligt.

Obwohl LRP sequenz- und konformationsabhängig bindet, zeigt LRP eine größere Empfindlichkeit gegenüber einer Krümmungsaufhebung als das rein konformationsspezifisch bindende H-NS.

Die Komplexbildung von FIS mit dem P1-Fragment ergibt neben dem freien Fragment drei Komplexbanden. Von unten nach oben betrachtet, stellen diese Banden FIS-Komplexe dar, bei denen eine, zwei und alle drei FIS-Bindestellen der UAS-Region des P1-Fragmentes mit FIS-Dimeren besetzt sind. In Abwesenheit von Distamycin weist der FIS-Komplex mit den drei besetzten Bindestellen die höchste Intensität auf. Durch Zugabe von Distamycin nimmt dieser Besetzungszustand zugunsten der FIS-Komplexe mit zwei oder einer besetzten FIS-Bindestelle ab und das freie P1-Fragment nimmt ebenfalls zu.

Im Vergleich zu H-NS und LRP zeigt FIS die geringste Empfindlichkeit gegenüber einer Krümmungsaufhebung der DNA. Wie LRP bindet FIS nicht nur

konformationsabhängig, sondern im Falle des P1-Fragmentes auch sequenzabhängig an DNA.

Die stark unterschiedliche Abhängigkeit von der DNA-Krümmung bei den Proteinen LRP und FIS kann damit erklärt werden, daß FIS eine höhere Affinität zu seinen Bindestellen innerhalb des P1-Fragmentes besitzt als LRP.

2.3.2 Der Einfluß von Leucin auf die DNA-Bindung von LRP

Der Transkriptionsfaktor LRP besitzt eine Substratbindungstasche für das Effektormolekül L-Leucin. Es wurde bereits festgestellt, daß L-Leucin eine Bedeutung für den Oligomerisierungszustand von LRP hat, da es die Dissoziation von LRP-Hexadekameren zu Leucin-gebundenen Oktameren bewirkt (Chen *et al.*, 2001). Um den Einfluß der Oligomerenbildung auf die Bindung an das P1-Fragment zu bestimmen, wurde in diesem Abschnitt der Effekt von Leucin auf die Bindung von LRP an das P1-Fragment untersucht (Abb. 2.6).

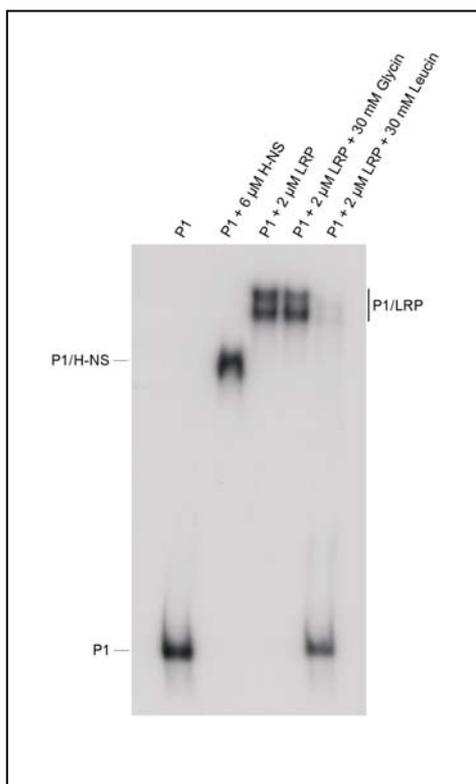


Abb. 2.6: Einfluß von Leucin auf die DNA-Bindung von LRP. Es wurden jeweils 2 nM radioaktiv markiertes P1-Fragment und 50 ng/ μ l Heparin in jedem Reaktionsansatz eingesetzt. Spur 1 zeigt die Kontrolle ohne Protein; Spur 2: 6 μ M H-NS; Spur 3: 2 μ M LRP; Spur 4: 2 μ M LRP + 30 nM Glycin; Spur 5: 2 μ M LRP + 30 nM Leucin.

Die Abb. 2.6 zeigt, daß Glycin keinen Einfluß auf die DNA-Bindungseigenschaften von LRP hat (Spur 4). Die Anwesenheit von L-Leucin ruft ein fast vollständiges Verschwinden der zwei LRP-Komplexbanden hervor (Spur 5). Vermutlich sind bei den beiden LRP-Komplexen LRP-Hexadekamere an der Komplexbildung beteiligt und keine Oktamere, die bei der Zugabe von L-Leucin gebildet werden.

2.3.3 Die gleichzeitige Bindung von H-NS und LRP

Die UAS-Regionen der sieben *rrn* Operons besitzen Erkennungssequenzen für die Bindung des Transkriptionsaktivators FIS und es konnte auch eine spezifische Bindung von H-NS an jede UAS-Region nachgewiesen werden (Hillebrand, 2001). Weiterhin ist bekannt, daß H-NS und FIS trotz überlappender Bindestellen gleichzeitig an die UAS-Region des *rrnB* Operons binden können, da ihre Bindung an gegenüberliegenden Seiten der Doppelhelix erfolgt (Tippner *et al.*, 1994; Afflerbach *et al.*, 1999).

Da auch für den Transkriptionsfaktor LRP eine Bindung an alle UAS-Regionen der sieben ribosomalen Operons festgestellt werden konnte (Menzel, 2003), sollte in der vorliegenden Arbeit überprüft werden, ob LRP ebenfalls gleichzeitig mit H-NS an die UAS-Region des *rrnB* Operons binden kann. Dazu wurde eine Retardierungsanalyse mit dem P1-Fragment durchgeführt, wobei die Konzentration eines Transkriptionsfaktors konstant gehalten und die des Zweiten variiert wurde (Abb. 2.7).

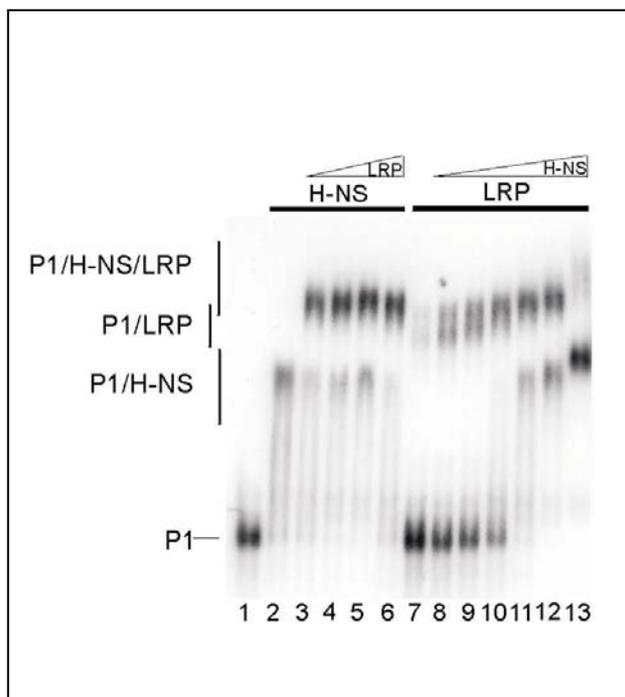


Abb. 2.7: DNA-Bindeassay von H-NS und LRP. Es wurden jeweils 2 nM radioaktiv markiertes P1-Fragment und 50 ng/μl Heparin in jedem Retardierungsansatz eingesetzt. Spur 1 zeigt die Kontrolle ohne Protein. In den Spuren 2 bis 6 ist die Retardierung des P1-Fragmentes bei konstanter H-NS-Konzentration (2 μM) und steigender LRP-Konzentration (0 μM, 0.35 μM, 0.7 μM, 1 μM und 1.35 μM LRP) dargestellt; Spur 7 bis 13: Retardierung des P1-Fragmentes bei konstanter LRP-Konzentration (0.35 μM) und steigender H-NS-Konzentration (0 μM, 0.4 μM, 0.8 μM, 1.2 μM, 2 μM, 2.8 μM und 4 μM H-NS).

Die Abb. 2.7 bestätigt, daß die Transkriptionsfaktoren H-NS und LRP ebenfalls gleichzeitig an das P1-Fragment binden können, da ein zusätzlicher Komplex mit einer geringeren Mobilität gebildet wird („Supershift“). Weiterhin kann beobachtet werden, daß bei einer Erhöhung der H-NS-Konzentration LRP-Moleküle durch H-NS-Moleküle verdrängt werden, da reine H-NS-Komplexe vermehrt auftreten (siehe Spur 11 bis 13). Die Bildung von H-NS/LRP-Komplexen mit zusätzlich gebundenen H-NS-Molekülen findet nur in einem geringen Ausmaß statt (siehe

schwache Bande in Spur 13). Wird jedoch die LRP-Konzentration erhöht, so kann keine drastische Verdrängung von H-NS durch LRP festgestellt werden (siehe Spur 6).

Somit kann der Transkriptionsfaktor H-NS, neben FIS, auch LRP von seinen Bindestellen am P1-Fragment verdrängen. Vermutlich binden FIS und LRP auf der gleichen Seite der Doppelhelix, da eine gleichzeitige Bindung von FIS und LRP an das P1-Fragment nicht nachgewiesen werden konnte (kein „Supershift“). Es entstehen nur LRP-Komplexe, da gebundene FIS-Moleküle von LRP verdrängt werden (Pul, 2004). Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, daß sich LRP/FIS-Heteromere bilden, die mit dem P1-Fragment einen Komplex ergeben, der die gleiche Mobilität besitzt wie ein Komplex aus P1-Fragment mit homomeren LRP-Molekülen.

2.3.4 Die gleichzeitige Bindung von RNA-Polymerase und Transkriptionsfaktor

Um den Einfluß der Proteine H-NS, LRP und FIS auf die Transkriptionsregulation des *rnnB* P1 Promotors zu untersuchen, wurde zunächst überprüft, ob jeder einzelne Transkriptionsfaktor gleichzeitig mit der RNA-Polymerase an das P1-Fragment binden kann. Würde eine Verdrängung der RNA-Polymerase vom Promotor stattfinden, so könnten Rückschlüsse auf den Mechanismus der faktorabhängigen Regulation der ribosomalen RNA-Synthese gezogen werden.

Zur Untersuchung der Effekte von H-NS, LRP und FIS auf die Bindung der RNA-Polymerase am *rnnB* P1 Promotor wurden stabile Initiationskomplexe vorgebildet und anschließend unterschiedliche Konzentrationen von den drei Transkriptionsfaktoren zugegeben (5.3.3). Unspezifische Bindungen wurden durch Zufügen von Heparin (50 ng/ μ l) verhindert. Die Abb. 2.8 zeigt den Einfluß von H-NS und LRP auf die Initiationskomplexbildung und die Abb. 2.9 die Wirkung von FIS.

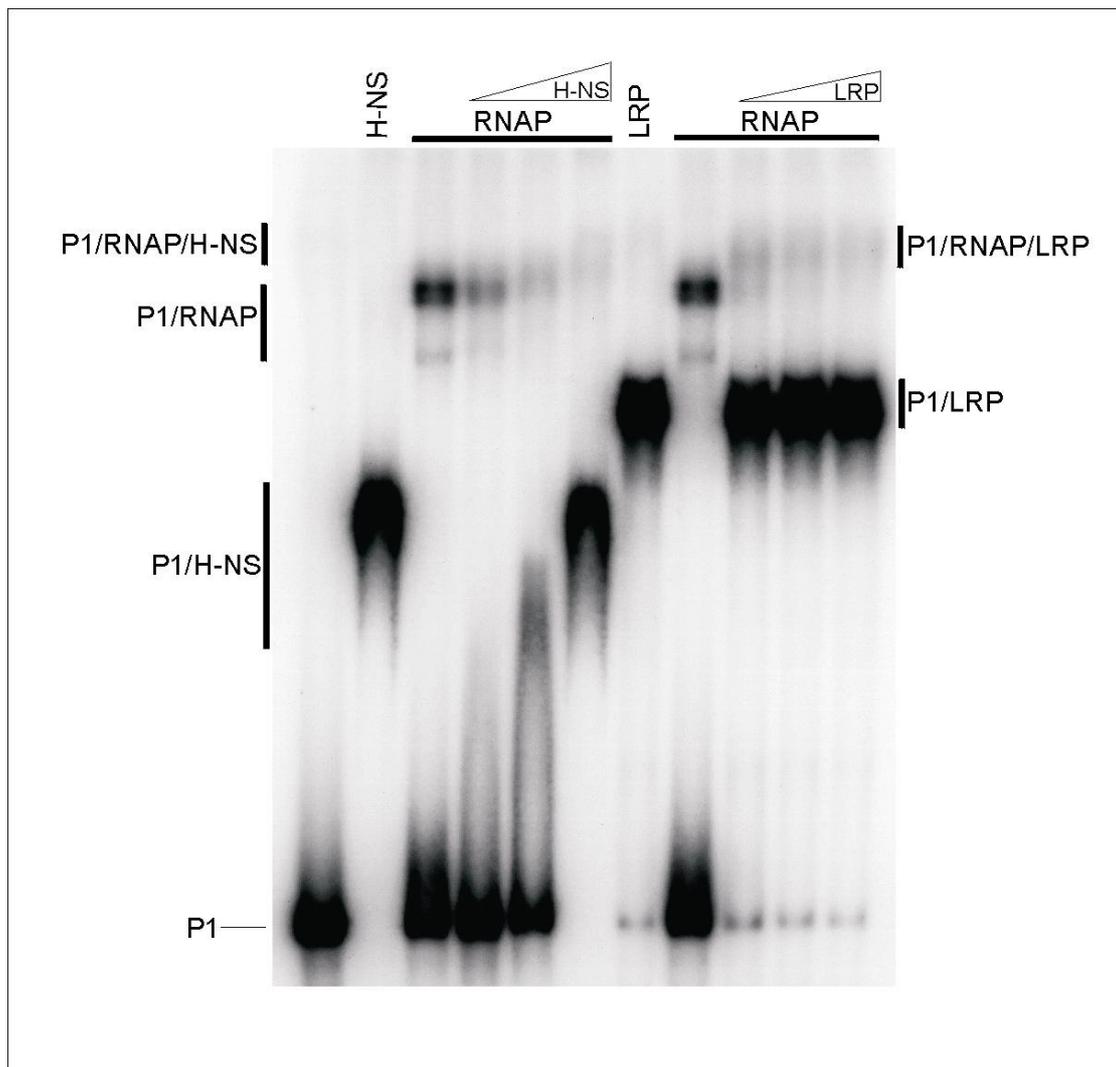


Abb. 2.8: DNA-Bindeassay der RNA-Polymerase und den Transkriptionsfaktoren H-NS und LRP. Es wurden jeweils 2 nM radioaktiv markiertes P1-Fragment eingesetzt. Für die Initiationskomplexbildung wurden 10 nM aktive RNA-Polymerase (σ^{70} -gesättigt) mit den Startnukleotiden ATP (500 μ M) und CTP (50 μ M) vorinkubiert. H-NS und LRP wurden in folgenden Konzentrationen zugegeben: Spur 1: proteinfreie Kontrolle; Spur 2: 4 μ M H-NS; Spur 3: 10 nM aktive RNA-Polymerase; Spur 4 bis 6: je 10 nM aktive RNA-Polymerase und 1.2 μ M, 2 μ M bzw. 4 μ M H-NS; Spur 7: 1 μ M LRP; Spur 8: 10 nM aktive RNA-Polymerase; Spur 9 bis 11: je 10 nM aktive RNA-Polymerase und 0.35 μ M, 0.7 μ M bzw. 1 μ M LRP.

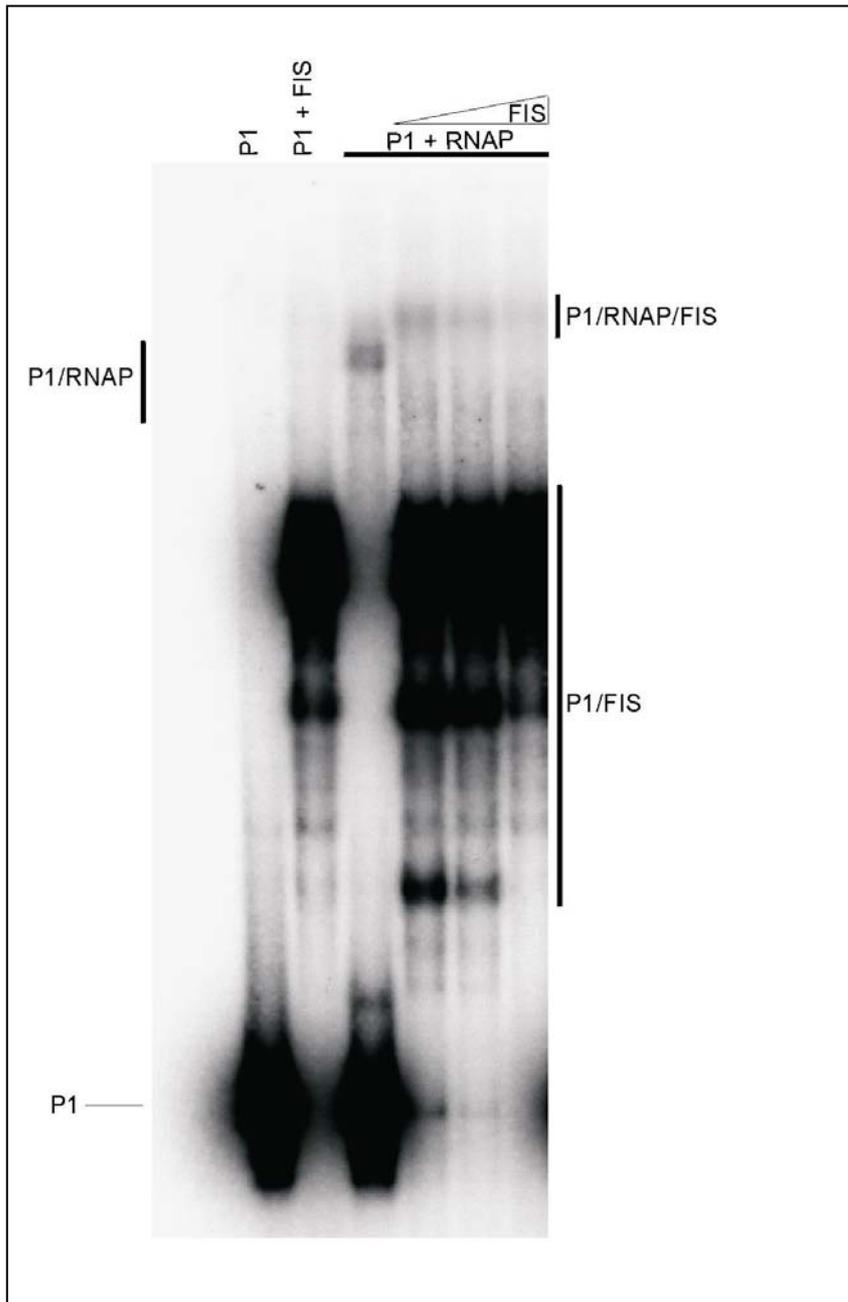


Abb. 2.9: DNA-Bindeassay der RNA-Polymerase und dem Transkriptionsfaktor FIS. Es wurden jeweils 2 nM radioaktiv markiertes P1-Fragment eingesetzt. Für die Initiationskomplexbildung wurden 10 nM aktive RNA-Polymerase (σ^{70} -gesättigt) mit den Startnucleotiden ATP (500 μ M) und CTP (50 μ M) vorinkubiert. FIS wurde in folgenden Konzentrationen zugegeben: Spur 1: proteinfreie Kontrolle; Spur 2: 400 nM FIS; Spur 3: 10 nM aktive RNA-Polymerase; Spur 4 bis 6: je 10 nM aktive RNA-Polymerase und 100 nM, 200 nM bzw. 400 nM FIS.

Es ist zu erkennen, daß alle drei Transkriptionsfaktoren jeweils gleichzeitig mit der RNA-Polymerase an das P1-Fragment binden können, was sich in dem Auftreten eines neuen Komplexes mit einer geringeren Mobilität als des reinen RNA-

Polymerase/Promotor-Komplexes, äußert. Eine Erhöhung der Proteinkonzentration bewirkt bei allen drei Transkriptionsfaktoren eine verschlechterte Promotor-Bindung der RNA-Polymerase, da die Intensität der neuen Komplexbande in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration abnimmt. Somit sind alle drei Transkriptionsfaktoren in der Lage, die am Promotor gebundene RNA-Polymerase zu verdrängen und dadurch eine reprimierende Wirkung auf die Transkription des *rrnB* P1 Promotors auszuüben.

Im Fall des Transkriptionsfaktors FIS wäre jedoch eine verbesserte Bindung der RNA-Polymerase zu erwarten gewesen, da bereits gezeigt werden konnte, daß FIS den RNA-Polymerase/P1-Promotor-Komplex stabilisiert. Dieser Effekt konnte nur bei schwachen RNA-Polymerase/P1-Promotor-Komplexen, die nicht durch Startnukleotide stabilisiert waren, beobachtet werden. Daher kann aus diesem Ergebnis geschlossen werden, daß FIS bereits stabile Initiationskomplexe nicht weiter stabilisieren kann. Vielmehr kommt es zu einer Abschwächung der RNA-Polymerase-Bindung am Promotor.

Ebenfalls konnte für den Transkriptionsfaktor H-NS eine Stimulierung der RNA-Polymerase-Bindung am *rrnB* P1 Promotor festgestellt werden (Schröder, 1999). Jedoch wurde bei diesem Experiment der Kompetitor Heparin in einer dreifach höheren Endkonzentration eingesetzt. Diese gegensätzlichen Ergebnisse schließen sich nicht gegenseitig aus, sondern spiegeln wahrscheinlich verschiedene Stufen des sogenannten Trapping-Mechanismus (Schröder und Wagner, 2000) wider. Bei der höheren Kompetitorkonzentration verursachen H-NS-Moleküle das Festhalten (Trapping) der RNA-Polymerase am Promotor, wodurch die Intensität der RNA-Polymerase/Promotor-Komplexbande zunimmt. Die niedrigere Kompetitorkonzentration repräsentiert dann die darauffolgende Stufe des Trapping-Mechanismus, wobei die RNA-Polymerase durch die zunehmende Bindung von H-NS-Molekülen und dadurch bedingte Konformationsänderungen verdrängt wird.

2.3.5 Die Bindung von H-NS und LRP an die unterschiedlich angular orientierten Bindestellen upstream des *rrnB* P2 und *rrnB* P1 Promotors

Durch Klonierung der synthetischen H-NS Bindestelle in verschiedenen Abständen vor den ribosomalen Promotoren P1 und P2 wurden für diese Promotoren synthetische upstream-Regionen konstruiert, die sich in ihrer angularen Orientierung zum Promotor unterscheiden. Mit Hilfe der Retardierungsgelelektrophorese (5.3.2) sollte nun überprüft werden, ob die Transkriptionsfaktoren H-NS und LRP eine differentielle Affinität zu den Konstrukten zeigen. Dazu wurden aus den Plasmiden pBK1A/P2 bis pBK6A/P2 und pBK1A/P1 bis pBK5A/P1 durch *PvuII/XmaI*-Restriktion Fragmente isoliert, die aus der synthetischen Bindestelle, dem P2 bzw. P1 Promotor und 100 BP downstream des Promotors bestehen. In der Tab. 2.1 sind die Bezeichnungen und

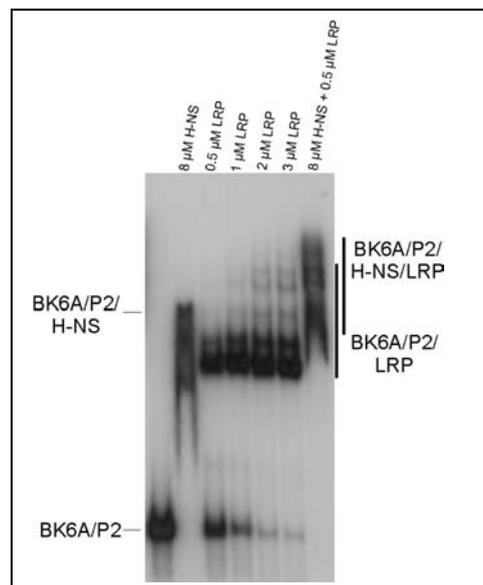
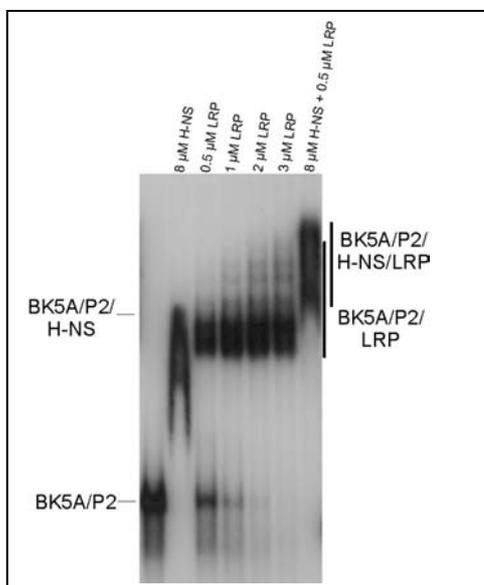
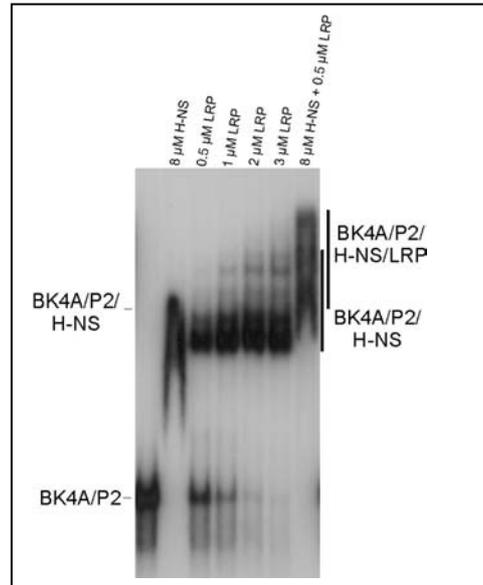
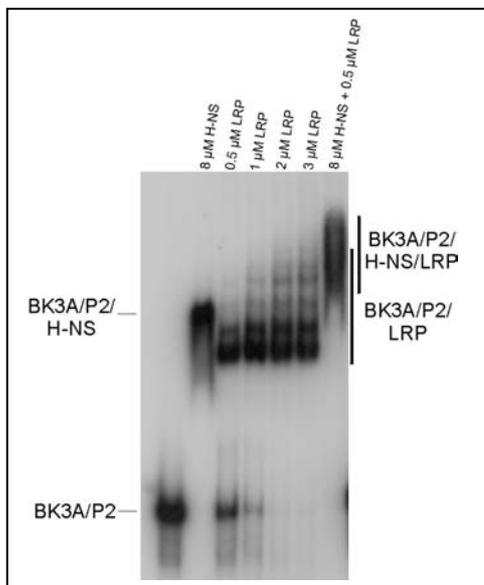
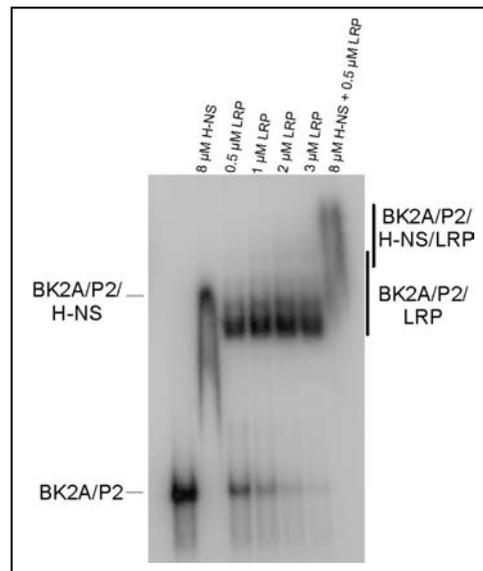
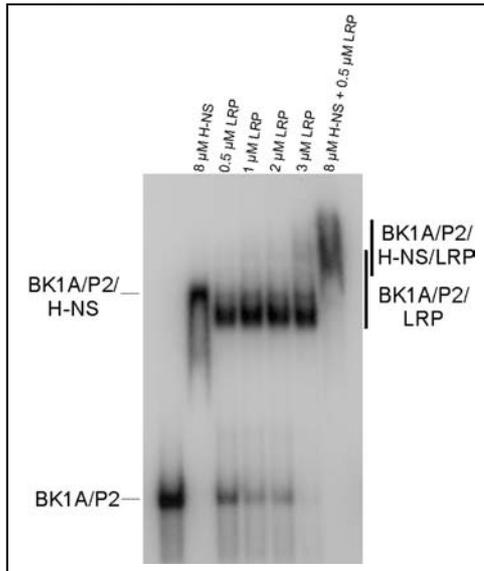
die angularen Orientierungen der H-NS-Bindestelle bei den Fragmenten aufgelistet.

PLASMID	RETARDIERUNGS- FRAGMENT	ANGULARE ORIENTIERUNG [°]
pBK1A/P2	BK1A-R/P2	0
pBK2A/P2	BK2A-R/P2	280
pBK3A/P2	BK3A-R/P2	490
pBK4A/P2	BK4A-R/P2	560
pBK5A/P2	BK5A-R/P2	630
pBK6A/P2	BK6A-R/P2	700
pBK1A/P1	BK1A-R/P1	105
pBK2A/P1	BK2A-R/P1	315
pBK3A/P1	BK3A-R/P1	455
pBK4A/P1	BK4A-R/P1	595
pBK5A/P1	BK5A-R/P1	665

Tab. 2.1: Restriktionsfragmente für die Retardierungsanalysen. Da diese Fragmente in Retardierungen eingesetzt wurden, erfolgte eine Kennzeichnung mit dem Buchstaben „R“.

Jedes Retardierungsfragment wurde mit dem Transkriptionsfaktor H-NS, LRP sowie mit einer Mischung aus beiden Proteinen inkubiert (Abb. 2.10). Durch Zugabe des Kompetitors Heparin zu den Retardierungsansätzen konnte eine spezifische Bindung von H-NS und LRP an die Fragmente sichergestellt werden.

P2-Konstrukte:



P1-Konstrukte:

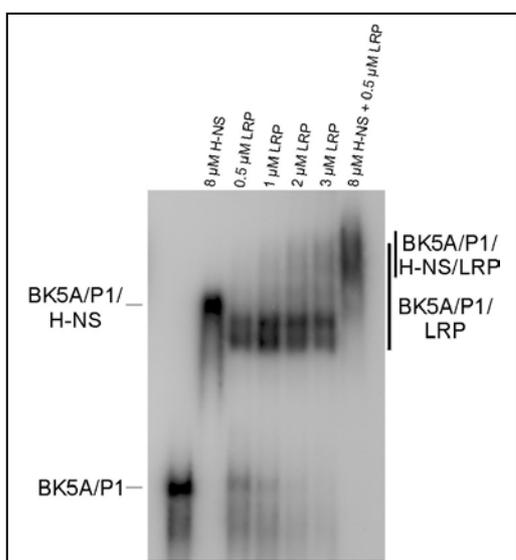
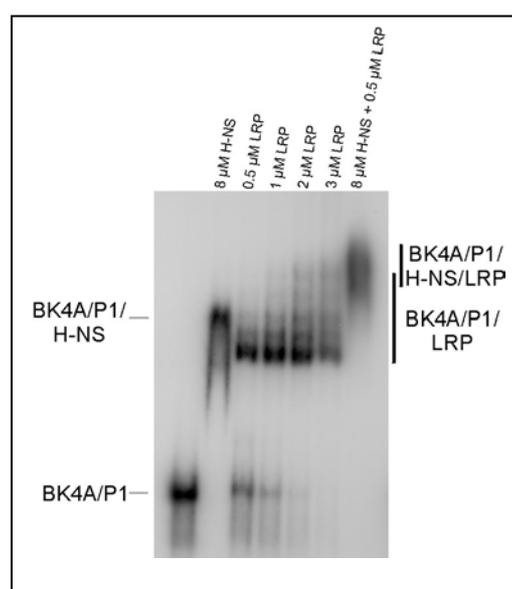
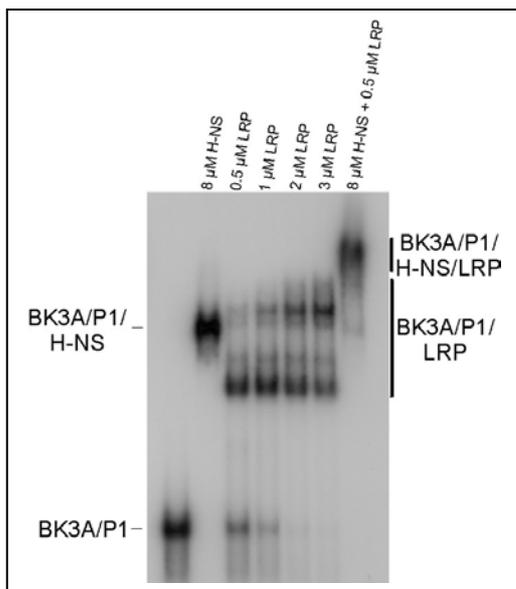
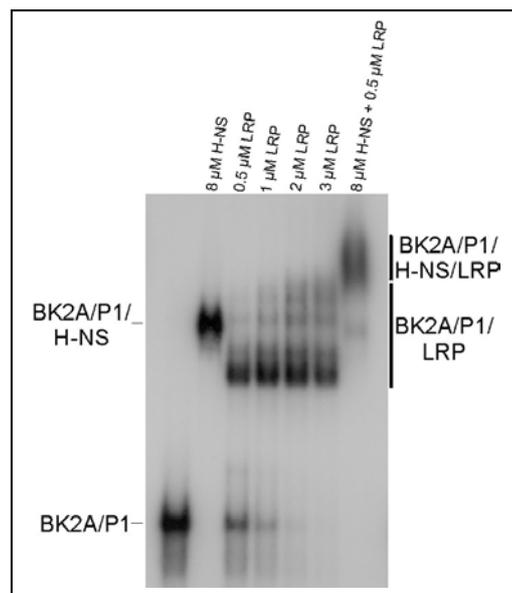
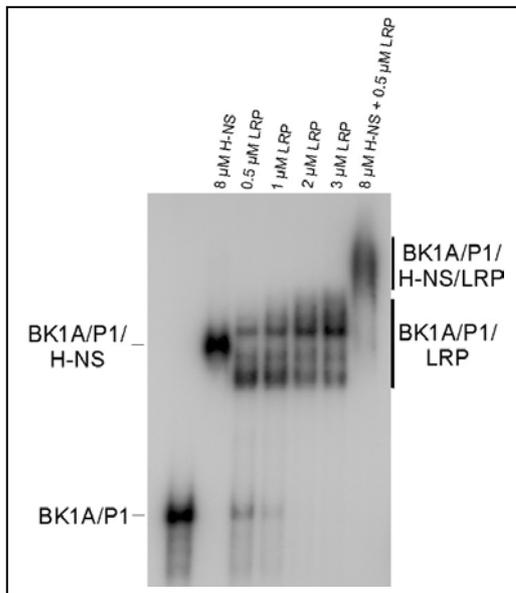


Abb. 2.10: Retardierung der BK-Fragmente mit H-NS, LRP sowie H-NS + LRP. Es wurden jeweils 2 nM radioaktiv markiertes BK-Fragment und 50 ng/ μl Heparin in jedem Retardierungsansatz eingesetzt. In Spur 1 befindet sich für jedes BK-Fragment die proteinfreie Kontrolle; Spur 2: BK-Fragment und 8 μM H-NS; Spur 3 bis 6: BK-Fragment und 0.5 μM , 1 μM , 2 μM bzw. 3 μM LRP; Spur 7: BK-Fragment und 8 μM H-NS + 0.5 μM LRP.

Bei allen Konstrukten findet eine spezifische Komplexbildung mit H-NS statt, die sich in dem Auftreten einer stark verzögerten Bande äußert (siehe Spur 2). Das Fehlen von Zwischenprodukten spiegelt eine kooperative Besetzung der Bindestellen innerhalb der synthetischen upstream-Region durch H-NS-Moleküle wider. Die verringerte Mobilität kann auch hier durch den Molekulargewichtszuwachs und durch H-NS-bedingte Konformationsänderungen der Fragmente erklärt werden. Die Position des H-NS-Komplexes variiert leicht bei den einzelnen Konstrukten mit den unterschiedlich orientierten Bindestellen. Weiterhin fällt auf, daß die gelelektrophoretische Stabilität der H-NS-Komplexe nicht bei allen Konstrukten gleich ist, da die Komplexbande bei den Fragmenten BK4A-R/P1, BK2A-R/P2, BK4A-R/P2, BK5A-R/P2 und BK6A-R/P2 nach unten hin „schmiert“. Somit könnte die Orientierung der Bindestelle ausschlaggebend für die Komplexstabilität sein. Im Vergleich zu LRP ist zudem die Affinität von H-NS zu den einzelnen Konstrukten geringer, da H-NS eine deutlich höhere Bindekonstante besitzt als LRP. Die Bindekonstante gibt die Proteinkonzentration an, bei der 50% der DNA in einem Komplex mit dem Protein vorliegt. Aus konzentrationsabhängigen Messungen geht hervor, daß die Bindekonstante für H-NS im Bereich von 4 μM liegt (Daten nicht gezeigt). Für LRP läßt sich dagegen eine Bindekonstante unter 0.5 μM aus der Abb. 2.10 ableiten, da bei allen Konstrukten ab 0.5 μM LRP über 50% der DNA in einem Komplex mit LRP zu sehen ist (siehe jeweils Spur 3).

Bei der maximalen LRP-Konzentration (3 μM) können fünf Komplexbanden (Spur 6) bei allen Konstrukten gefunden werden. Jedoch ist die Anzahl und die Position der auftretenden LRP-Komplexe bei den niedrigeren LRP-Konzentrationen für die einzelnen Konstrukte unterschiedlich. Bei der LRP-Bindung kann keine Kooperativität, wie bei H-NS, beobachtet werden.

Sowohl für H-NS als auch für LRP liegen die Größenordnungen der Bindekonstanten bei allen Konstrukten im gleichen Bereich (um 4 μM für H-NS; unter 0.5 μM für LRP). Somit hat das „Phasing“ der synthetischen upstream-Region keinen Einfluß auf die Bindekonstanten der beiden Proteine, wodurch eine ähnliche Affinität von H-NS und LRP zu den verschiedenen „Phasing“-Konstrukten zugrundegelegt werden kann.

Werden H-NS und LRP zusammen zugegeben (Spur 7), so kann für jedes P2- sowie P1-Konstrukt eine gleichzeitige Bindung beider Transkriptionsfaktoren festgestellt werden, da eine neue Bande mit einer geringeren Mobilität als die Einzelkomplexe im Gel sichtbar wird („Supershift“). Vergleicht man die Spuren 3 und 7 miteinander, so ist ein Synergismus von H-NS und LRP zu sehen, da LRP in Anwesenheit von H-NS besser bindet. Dies ist daran erkennbar, daß in Spur 3 noch freies Fragment bei einer LRP-Konzentration von 0.5 μM vorhanden ist und in Spur 7 mit der gleichen LRP-Menge nicht.

2.3.6 Die Bindung von FIS an die unterschiedlich angular orientierten Bindestellen upstream des *rrnB* P2 und *rrnB* P1 Promotors

Für den Transkriptionsfaktor FIS wurden ebenfalls Retardierungsanalysen (5.3.2) mit den synthetischen upstream-Regionen durchgeführt. Dazu wurden die gleichen Fragmente verwendet wie im Abschnitt 2.3.5 (siehe Tab. 2.1). Jedes Fragment wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen von FIS in Anwesenheit des Kompetitors Heparin inkubiert. Die nachfolgende Abb. 2.11 stellt die Ergebnisse mit den P2-Konstrukten und die Abb. 2.12 diejenigen mit den P1-Konstrukten dar.

Zusätzlich zu den in der Tabelle 2.1 aufgelisteten Fragmenten wurde die FIS-Retardierung mit zwei weiteren Fragmenten durchgeführt, die keine synthetische H-NS- Bindestelle besitzen, sondern nur den P2 bzw. den P1 Promotor des *rrnB* Operons aus *E. coli*. Diese zwei Fragmente wurden entsprechend als BK-P2R (180 BP) und BK-P1R (178 BP) bezeichnet. Anhand dieser Kontrollfragmente sollte überprüft werden, ob FIS im P2 bzw. P1 Promotorbereich binden kann.

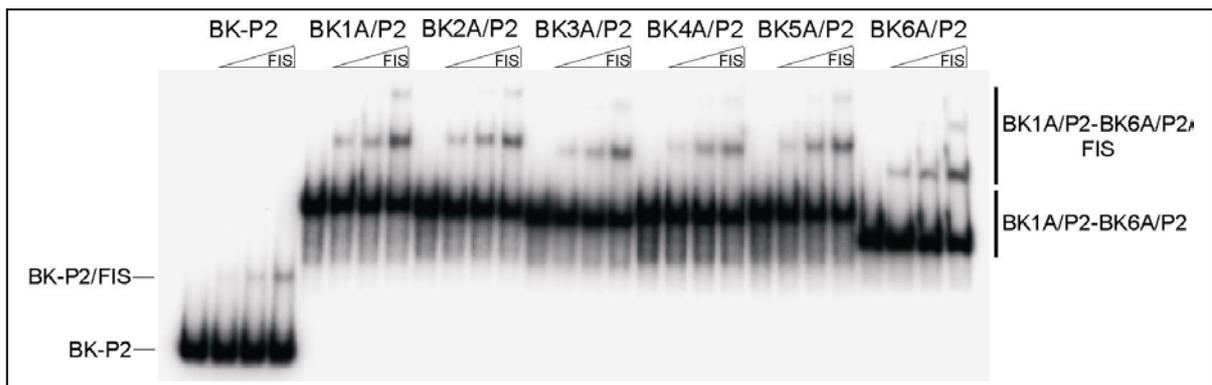


Abb. 2.11: Retardierung der BK-P2-Fragmente mit FIS. Es wurden 2 nM radioaktiv markiertes BK-P2-Fragment und 50 ng/μl Heparin in jedem Retardierungsansatz eingesetzt. In Spur 1 befindet sich bei jedem Fragment die proteinfreie Kontrolle; Spur 2 bis 4: BK-P2-Fragment und 100 nM, 200 nM bzw. 400 nM FIS.

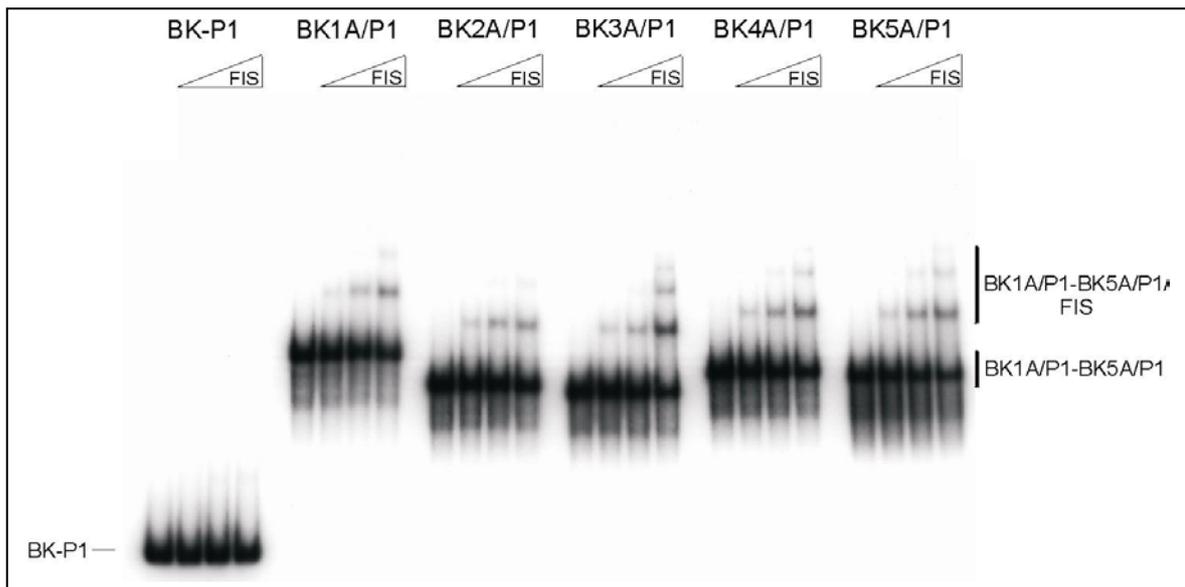


Abb. 2.12: Retardierung der BK-P1-Fragmente mit FIS. Es wurden 2 nM radioaktiv markiertes BK-P1-Fragment und 50 ng/μl Heparin in jedem Retardierungsansatz eingesetzt. In Spur 1 befindet sich bei jedem Fragment die proteinfreie Kontrolle; Spur 2 bis 4: BK-P1-Fragment und 100 nM, 200 nM bzw. 400 nM FIS.

Bei der maximal eingesetzten FIS-Konzentration werden zwei bis drei Komplexbanden bei allen Fragmenten, mit Ausnahme der zwei Kontrollfragmente, sichtbar. Die Bindung von FIS verläuft nicht-kooperativ, da die Besetzung der einzelnen Bindestellen proportional zur Proteinkonzentration erfolgt. Die Affinität von FIS zu den unterschiedlich angular orientierten upstream-Regionen ist allgemein sehr ähnlich, da vorrangig der Komplex mit der höchsten Mobilität auftritt. Würden höhere FIS-Konzentrationen eingesetzt, wäre eine Zunahme der Bandenintensität von Komplexen mit geringerer Mobilität zu erwarten.

Im Gegensatz zum P1-Kontrollfragment ist bei dem analogen Fragment mit dem P2 Promotor eine Komplexbande zu sehen. Da sich die Fragmente nur im Promotorbereich unterscheiden, liegt hier erstmals ein Indiz für eine FIS-Bindung im P2 Promotor vor. FIS könnte eine reprimierende Wirkung auf den *rrnB* P2 Promotor in seiner natürlichen Umgebung ausüben, indem FIS die Bindung der RNA-Polymerase am Promotor sterisch blockiert. Somit hätte der Transkriptionsfaktor FIS eine aktivierende Wirkung auf den *rrnB* P1 Promotor, jedoch einen reprimierenden Effekt auf den *rrnB* P2 Promotor.

2.4 *In vitro* Transkriptionsanalysen

Um zu analysieren, ob die Aktivität der Promotoren *rrnB* P1 und *rrnB* P2 abhängig von den gekrümmten upstream-Regionen ist, wurden „pseudo single round“ *in vitro* Transkriptionen (5.3.4) unter spezifischen Bindungsbedingungen durchgeführt. Bei der gewählten Reaktion kann zwar jede Transkriptionseinheit mehrmals von der *E. coli* RNA-Polymerase abgelesen werden, jedoch sind bei der anschließenden Analyse nur die Produkte zu erkennen, die im vorinkubierten Initiationskomplex die zur Verfügung stehenden radioaktiven Nukleotide inkorporiert haben (Hsu, 1996). Durch eine solche „pseudo single round“ Analyse wird nur ein Initiationsereignis angeschaut und die Effekte durch Neuinitiationen werden ausgeblendet.

2.4.1 Die Optimierung des *in vitro* Transkriptionssystems

Bevor eine Analyse der *rrnB* P2 und *rrnB* P1 Promotoraktivität bei den Phasingkonstrukten in Abwesenheit und in Gegenwart der Transkriptionsfaktoren H-NS und LRP durchgeführt werden konnte, mußten die Konzentrationen der einzelnen Komponenten eingestellt sowie die optimale Reihenfolge ihrer Zugabe bestimmt werden.

Zur Einstellung des Systems wurde das P1-Fragment als Template eingesetzt, welches aus dem *rrnB* P1 Promotor und der vor dem Promotor liegenden natürlichen UAS-Region besteht. In früheren Analysen konnte bereits gezeigt werden, daß H-NS *in vitro* und *in vivo* eine reprimierende Wirkung auf den *rrnB* P1 Promotor ausübt (Schröder, 1999; Afflerbach *et al.*, 1998). Aufgrund der nachgewiesenen H-NS-Abhängigkeit des P1 Promotors, ist das P1-Fragment daher für die Optimierung des *in vitro* Transkriptionssystems geeignet.

Als optimales Template/RNA-Polymerase-Verhältnis stellte sich ein molares Verhältnis von 3 nM Template zu 9 nM RNA-Polymerase heraus (Daten nicht gezeigt). Da Heparin zur Vermeidung unspezifischer Effekte zugefügt werden mußte, war ein dreifach molarer RNA-Polymerase-Überschuß notwendig, um eine deutliche Transkriptbildung zu erhalten. Mit 50 ng/µl Heparin wurde eine Kompetitorkonzentration gewählt, die sowohl eine auswertbare Menge an spezifischen Transkriptionsprodukten garantiert, als auch spezifische Bindungsbedingungen für Transkriptionsfaktoren gewährleistet (Daten nicht gezeigt). Ebenfalls stellt die Reihenfolge der Proteinzugabe einen entscheidenden Parameter für die resultierende Transkriptionsaktivität dar. Wurde die RNA-Polymerase vor den Transkriptionsfaktoren H-NS oder LRP zum DNA-Template zugegeben, kam es nur zu einer geringfügigen Inhibierung der P1 Promotoraktivität im Gegensatz zur umgekehrten Reihenfolge der Zugabe. Um eine optimale Inhibierung der Promotoraktivität zu erzielen, mußte daher der jeweilige Transkriptionsfaktor unmittelbar vor der RNA-Polymerase dem Reaktionsansatz zugefügt werden (Daten nicht gezeigt). In Abb. 2.13 ist die *in*

in vitro Transkriptionsanalyse des P1-Fragmentes bei steigenden H-NS- und LRP-Konzentrationen unter den ermittelten Bedingungen dargestellt.

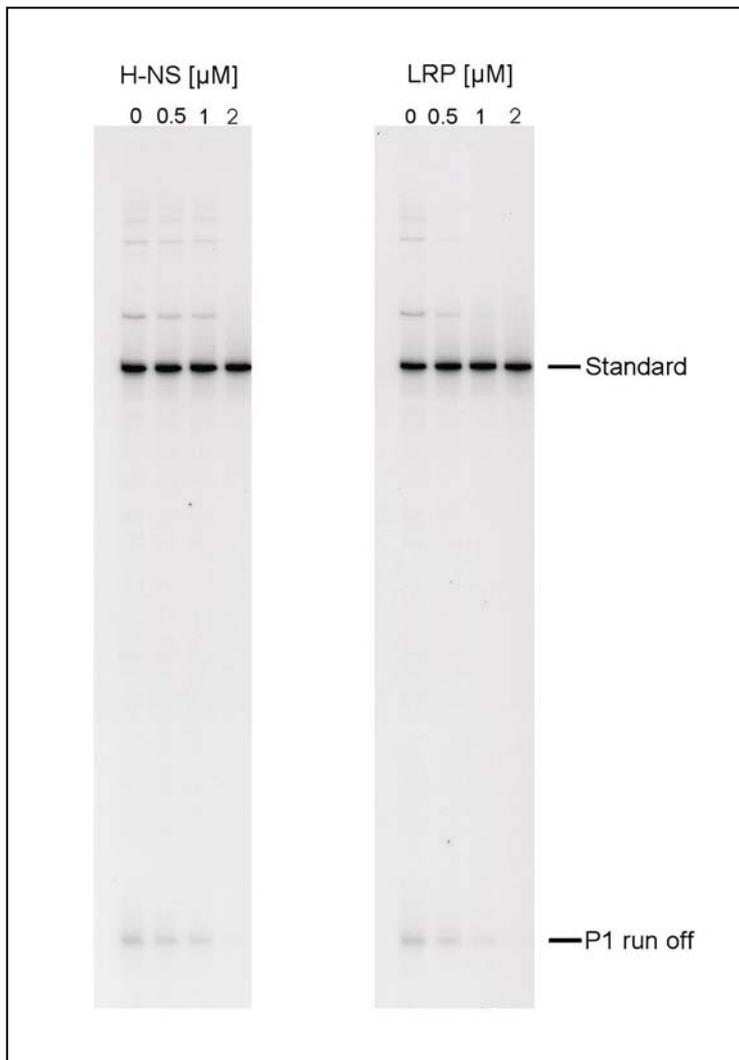


Abb. 2.13: „Pseudo single round“ *in vitro* Transkriptionsanalyse des P1-Fragmentes bei steigenden H-NS- und LRP-Konzentrationen. Zur *in vitro* Transkription wurde 3 nM P1-Fragment mit 9 nM aktiver RNA-Polymerase in Abwesenheit sowie in Gegenwart der Transkriptionsfaktoren H-NS bzw. LRP in „pseudo single round“ Ansätzen inkubiert. Spur 1 zeigt jeweils die Transkriptbildung ohne H-NS bzw. ohne LRP. In den folgenden Spuren wurde H-NS bzw. LRP in den Konzentrationen 0.5 µM, 1 µM und 2 µM zugegeben. Das vom P1 Promotor gestartete, 57 Nukleotide lange „run off“ Transkript und das in allen Ansätzen als Auftragsstandard eingesetzte DNA-Fragment (256 BP) sind gekennzeichnet.

Es ist erkennbar, daß eine Erhöhung der H-NS- sowie der LRP-Konzentration zu einer deutlichen Reduktion des P1-Transkriptionsproduktes führt. Die Quantifizierung des Transkriptionsproduktes erfolgte nach einer Normierung gegen den Auftragsstandard. Abb. 2.14 zeigt die densitometrische Auswertung der relativen Inhibierung der P1-Transkriptbildung in Abhängigkeit von der H-NS- bzw. LRP-Konzentration.

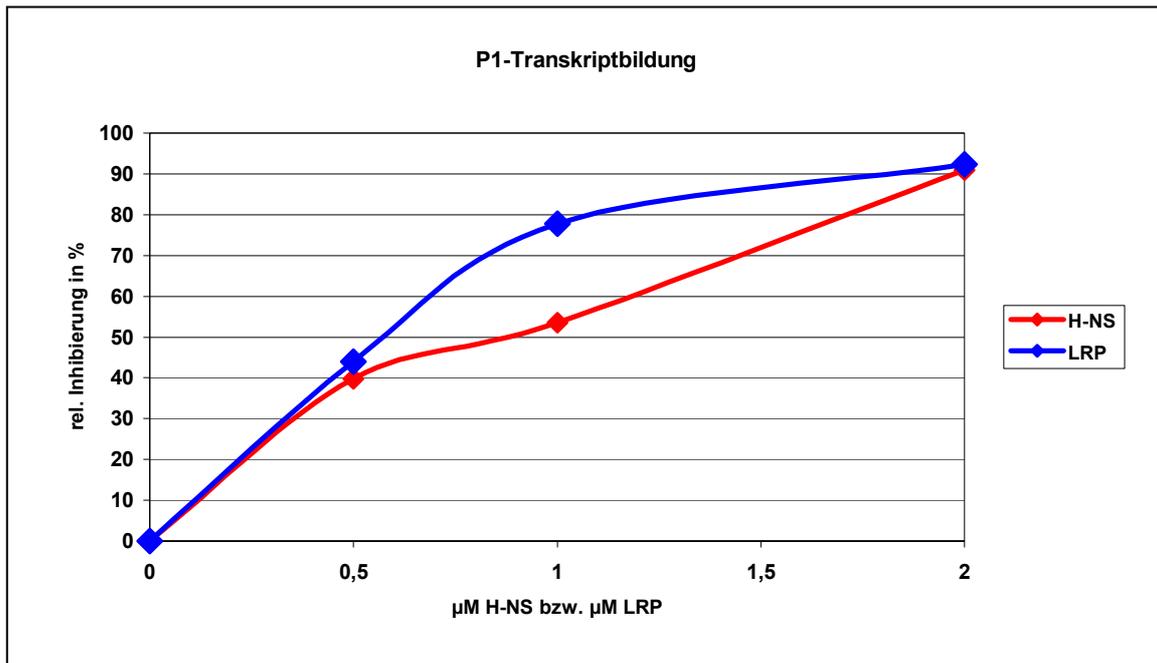


Abb. 2.14: Analyse der relativen Inhibierung der P1-Transkriptbildung bei steigenden H-NS- bzw. LRP-Konzentrationen.

Aus der Abb. 2.14 ist ersichtlich, daß die relative Inhibierung der P1 Promotoraktivität schon bei einer geringen H-NS- und LRP-Konzentration etwa 40% beträgt. Bei höheren H-NS- und LRP-Konzentrationen (2 µM) liegt die relative Inhibierung des Promotors bei beiden Faktoren um 90%. Jedoch ist für LRP ab 2 µM bereits eine Sättigung erreicht, für H-NS jedoch noch nicht (siehe Kurvenverlauf in Abb. 2.14). Somit könnte mit einer höheren H-NS-Konzentration eine stärkere Inhibierung als 90% erzielt werden.

Ebenfalls konnte bei einer Transkriptionsanalyse mit FIS eine Inhibierung des P1 Promotors gefunden werden (Daten nicht gezeigt), obwohl für FIS eine aktivierende Funktion auf den *rnmB* P1 Promotor beschrieben worden ist (Zacharias *et al.*, 1991). Dieses widersprüchliche Ergebnis kann jedoch dadurch erklärt werden, daß bei dem hier vorliegenden Experiment der RNA-Polymerase/Promotor-Komplex durch anwesende Startnukleotide bereits stabilisiert war, so daß eine zusätzliche Bindung von FIS-Molekülen vermutlich die Promotorfreisetzung verhindert hat.

Neben dem P1-Fragment als Positivkontrolle wurden zwei weitere Fragmente in die *in vitro* Transkriptionsanalyse eingesetzt, die nur den *rnmB* P1 bzw. *rnmB* P2 Promotor und keine gekrümmte upstream-Region besitzen. Diese Fragmente wurden entsprechend als BK-P2T-Fragment (178 BP) und BK-P1T-Fragment (176 BP) bezeichnet. Sie unterscheiden sich von den analogen Retardierungsfragmenten in dem Punkt, daß sie glatte Enden anstelle von Überhängenden haben. Anhand dieser Kontrollfragmente sollte überprüft werden, inwieweit die beiden Promotoren *rnmB* P1 und *rnmB* P2 durch H-NS bzw. LRP reguliert werden

können, wenn keine Bindestellen im upstream-Bereich vorliegen. In der Abb. 2.15 sind die Transkriptionsanalysen mit den beiden Kontrollfragmenten zu sehen. Die Quantifizierung der Transkripte erfolgte nach Normierung gegen den Auftragungsstandard. In den Abb. 2.16 und 2.17 sind die densitometrischen Auswertungen dargestellt.

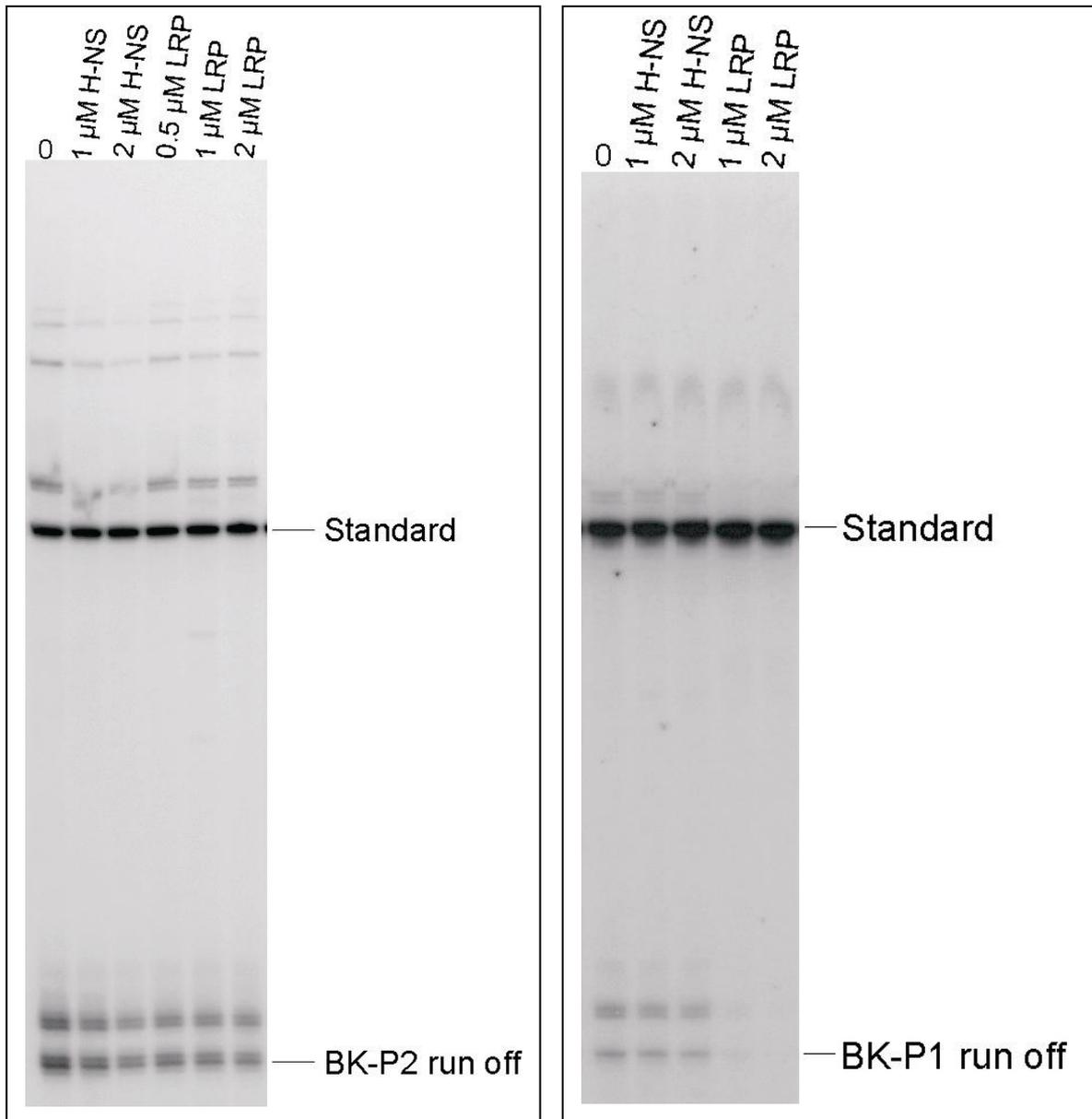


Abb. 2.15: „Pseudo single round“ *in vitro* Transkriptionsanalyse des BK-P2- und BK-P1-Fragmentes bei steigenden H-NS- und LRP-Konzentrationen. Zur *in vitro* Transkription wurde 3 nM Fragment mit 9 nM aktiver RNA-Polymerase in Abwesenheit sowie in Gegenwart der Transkriptionsfaktoren H-NS bzw. LRP in „pseudo single round“ Ansätzen inkubiert. Spur 1 zeigt jeweils die Transkriptbildung ohne H-NS bzw. ohne LRP. In den folgenden Spuren wurde H-NS in den Konzentrationen 1 μM und 2 μM zugegeben bzw. LRP in den Konzentrationen 0.5 μM , 1 μM und 2 μM . Die vom P2 und P1 Promotor gestarteten „run off“ Transkripte und das in allen Ansätzen als Auftragsstandard eingesetzte DNA-Fragment (256 BP) sind gekennzeichnet.

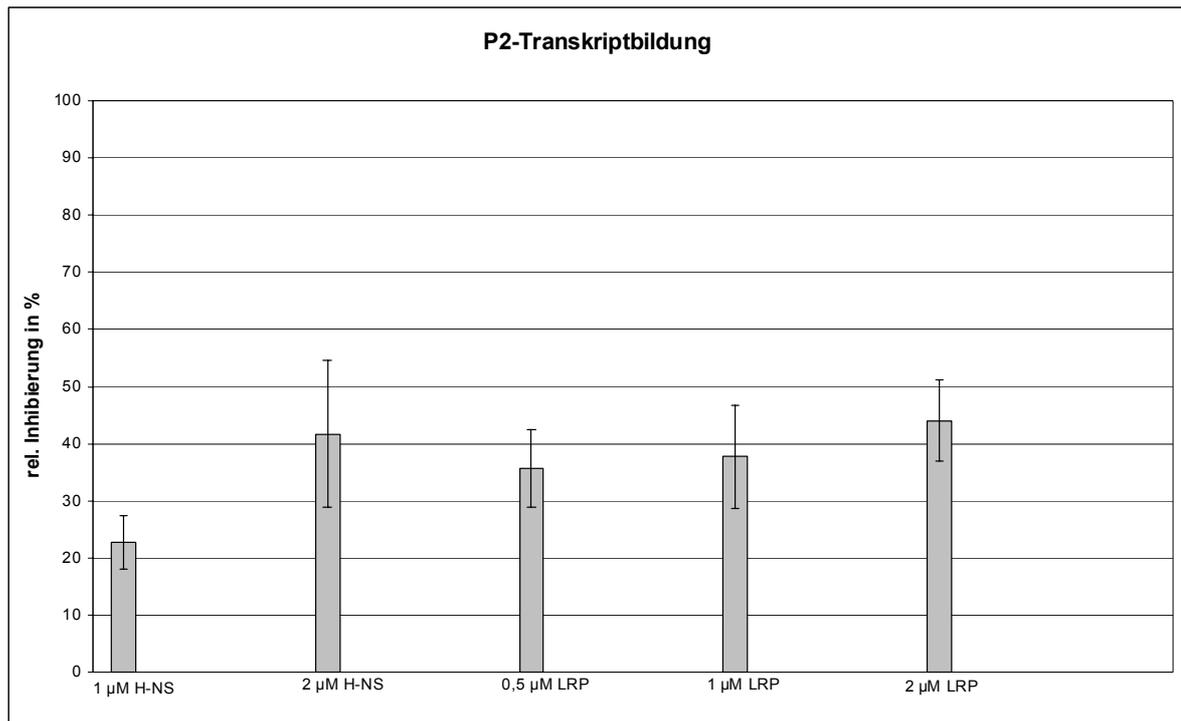


Abb. 2.16: Analyse der relativen Inhibierung der P2-Transkriptbildung bei steigenden H-NS- bzw. LRP-Konzentrationen.

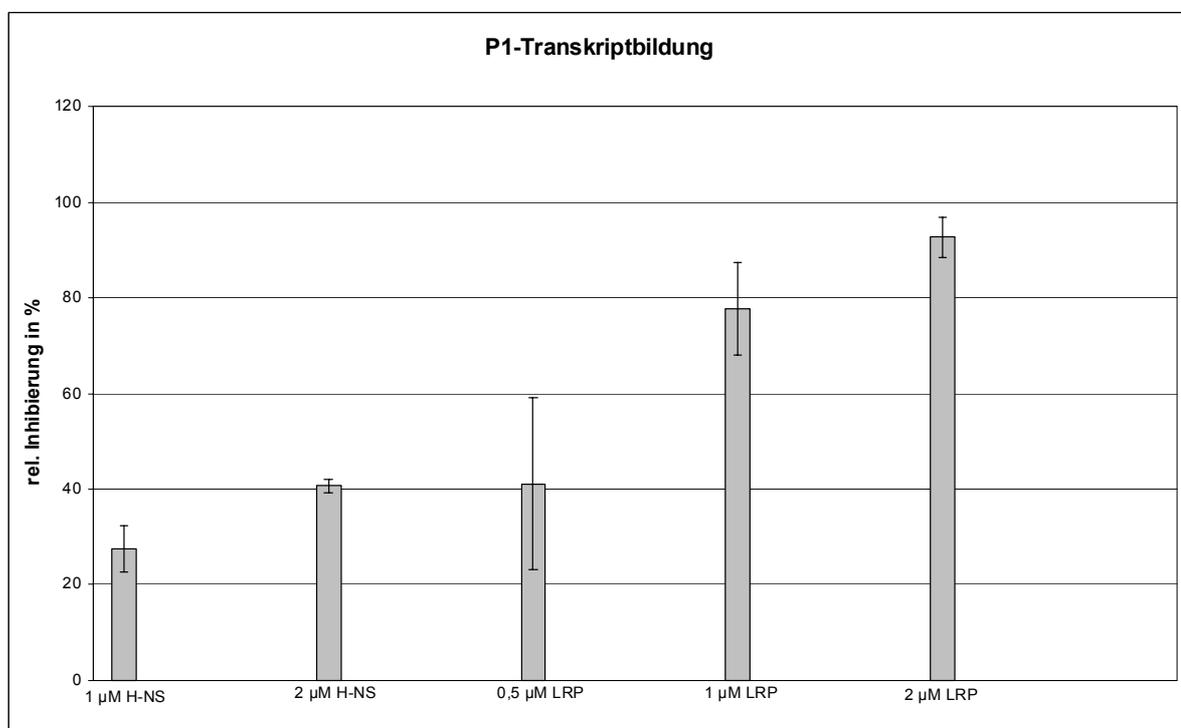


Abb. 2.17: Analyse der relativen Inhibierung der P1-Transkriptbildung bei steigenden H-NS- bzw. LRP-Konzentrationen.

Wie in der Abb. 2.15 zu sehen ist, befindet sich in geringem Abstand oberhalb des „run off“ Transkriptes von beiden Promotoren ein weiteres Transkriptionsprodukt. Ob es sich bei diesem zweiten Produkt um ein Durchlesetranskript mit der gleichen Startstelle handelt, wurde mit Hilfe einer nicht-radioaktiven „multiple round“ *in vitro* Transkription und anschließender Primer Extension-Analyse zur Transkriptionsstart-Bestimmung der Transkripte untersucht (siehe 5.3.5). Es konnte gezeigt werden, daß die Entstehung dieser zwei Produkte auf eine unterschiedliche Terminationsstelle zurückzuführen ist, da die gleichen Transkriptionsstartstellen gefunden wurden (Daten nicht gezeigt). Somit handelt es sich bei dem oberen Transkript wahrscheinlich um ein Durchleseprodukt, welches gebildet wird, weil die RNA-Polymerase nicht vom Template abfällt. Eine andere Möglichkeit wäre, daß ein „Auflaufprodukt“ entsteht, wenn zwei RNA-Polymerasen gestartet sind.

Die Auswertung der Transkriptionsanalyse mit dem P2-Kontrollfragment zeigt, daß H-NS und LRP die Transkriptbildung um 40% inhibieren, obwohl keine Bindestellen im upstream-Bereich vorliegen.

Beim P1-Kontrollfragment liegt die Repression durch H-NS im gleichen Bereich. Jedoch kommt es im Fall von LRP zu einer deutlich stärkeren Reduktion der P1-Transkriptbildung von ungefähr 90%. Eine derartige starke Inhibierung kann nicht mehr auf unspezifische Effekte zurückgeführt werden. Sie stellt vielmehr ein Indiz für eine LRP-Bindung im P1-Promotorbereich dar, da sich beide Fragmente nur in diesem Bereich unterscheiden.

2.4.2 Die Basalaktivität der P2- und P1-Promotorkonstrukte

Zunächst sollte überprüft werden, ob die gekrümmten, unterschiedlich angular orientierten upstream-Regionen eine differentielle Basalaktivität der Promotoren *rrnB* P2 und *rrnB* P1 bewirken. Dazu wurden aus den Plasmiden pBK1A/P2 bis pBK6A/P2 und pBK1A/P1 bis pBK5A/P1 durch *PvuII*/*SmaI*-Restriktion Fragmente isoliert. Ebenso wie die BK-Retardierungsfragmente bestehen die BK-Transkriptionsfragmente aus der synthetischen H-NS Bindestelle, dem P2 bzw. P1 Promotor und 100 BP downstream-Bereich. Der einzige Unterschied liegt darin, daß die Transkriptionsfragmente glatte Enden anstelle von überhängenden Enden besitzen. Glatte Enden sind wichtig, da die *E. coli* RNA-Polymerase neben der Promotorstartstelle auch an überhängenden Enden die Transkription starten kann. Dies würde zu unerwünschten Nebenprodukten führen. In der Tab. 2.2 sind die Bezeichnungen und die angularen Orientierungen der H-NS Bindestelle bei den Fragmenten aufgelistet.

PLASMID	RETARDIERUNGS- FRAGMENT	ANGULARE ORIENTIERUNG [°]
pBK1A/P2	BK1A-T/P2	0
pBK2A/P2	BK2A-T/P2	280
pBK3A/P2	BK3A-T/P2	490
pBK4A/P2	BK4A-T/P2	560
pBK5A/P2	BK5A-T/P2	630
pBK6A/P2	BK6A-T/P2	700
pBK1A/P1	BK1A-T/P1	105
pBK2A/P1	BK2A-T/P1	315
pBK3A/P1	BK3A-T/P1	455
pBK4A/P1	BK4A-T/P1	595
pBK5A/P1	BK5A-T/P1	665

Tab. 2.2: Restriktionsfragmente für die *in vitro* Transkriptionsanalysen. Da diese Fragmente in Transkriptionen eingesetzt wurden, erfolgte eine Kennzeichnung mit dem Buchstaben „T“.

Bei den BK-P2-Konstrukten besteht das „run off“ Transkript aus drei Banden, da die *E. coli* RNA-Polymerase am *rnnB* P2 Promotor an drei hintereinanderliegenden C's eines C-Clusters die Transkription startet.

Ein Vergleich der relativen Basalaktivität der P2- und P1-Konstrukte untereinander zeigt, daß die Orientierung der gekrümmten upstream-Region einen entscheidenden Einfluß auf die Aktivität der Promotoren P2 wie auch P1 ausübt (siehe Abb. 2.18 und Abb. 2.19).

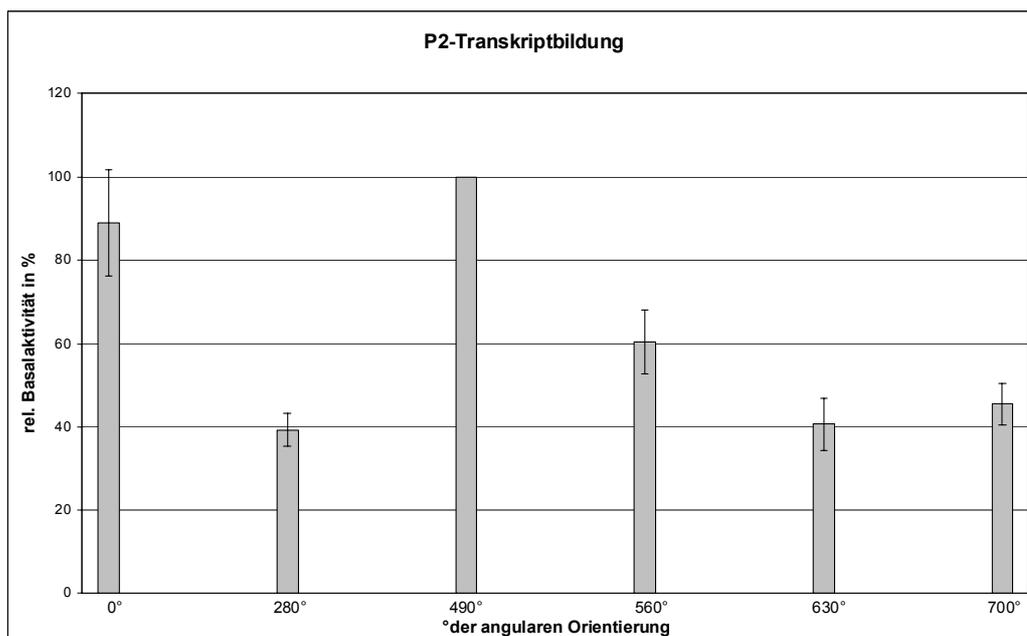


Abb. 2.18: Analyse der P2-Transkriptbildung in Abhängigkeit von der angularen Orientierung der gekrümmten upstream-Region.

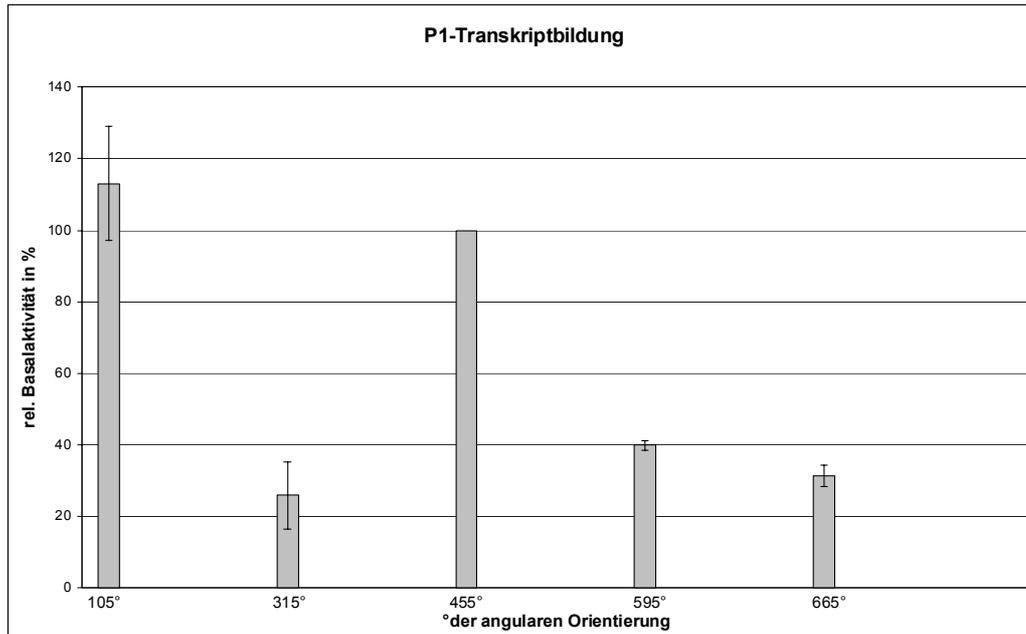


Abb. 2.19: Analyse der P1-Transkriptbildung in Abhängigkeit von der angularen Orientierung der gekrümmten upstream-Region.

Für die vergleichende Analyse der Basalaktivität der verschiedenen Promotorkonstrukte wurde die Aktivität eines P2- bzw. eines P1-Konstruktes (BK3A/P2 bzw. BK3A/P1) willkürlich gleich 100% gesetzt und die Aktivitäten der anderen Promotorkonstrukte darauf bezogen. Während die relative Basalaktivität der P2-Konstrukte BK1A/P2 und BK3A/P2 sowie die der P1-Konstrukte BK1A/P1 und BK3A/P1 um 100% liegt, weisen die anderen Konstrukte eine vergleichsweise geringe Aktivität zwischen 25 und 60% auf.

Es läßt sich nachfolgende Reihung hinsichtlich der Basalaktivität bei den P2- und P1-Konstrukten aufstellen:

P2-Konstrukte:

BK3A/P2 > BK1A/P2 > BK4A/P2 > BK6A/P2 > BK5A/P2 > BK2A/P2

P1-Konstrukte:

BK1A/P1 > BK3A/P1 > BK4A/P1 > BK5A/P1 > BK2A/P1

Somit zeigen die P2- und P1-Konstrukte eine differentielle Promotoraktivität, die abhängig von der angularen Orientierung der gekrümmten upstream-Region zu den Promotoren *rrnB* P2 und *rrnB* P1 ist.

2.4.3 Der Einfluß von H-NS und LRP auf die P2 Promotoraktivität

Nach der Regulation der Promotoren P2 und P1 durch die unterschiedlich angular orientierten upstream-Regionen in Abwesenheit von Transkriptionsfaktoren, sollte nun die faktorabhängige Regulation bei den verschiedenen Phasing-Konstrukten analysiert werden. Dazu wurde zunächst die *rnnB* P2 Promotoraktivität der BK-P2-Fragmente in An- und Abwesenheit von H-NS bzw. LRP mittels „pseudo single round“ *in vitro* Transkriptionen unter den ermittelten Bedingungen untersucht (siehe Abb. 2.20 und Abb. 2.21). Die H-NS-Konzentration wurde mit maximal 2 μM deutlich geringer gewählt als bei den Retardierungsanalysen (8 μM), um die unspezifischen H-NS-Effekte auf die Promotoraktivität so gering wie möglich zu halten.

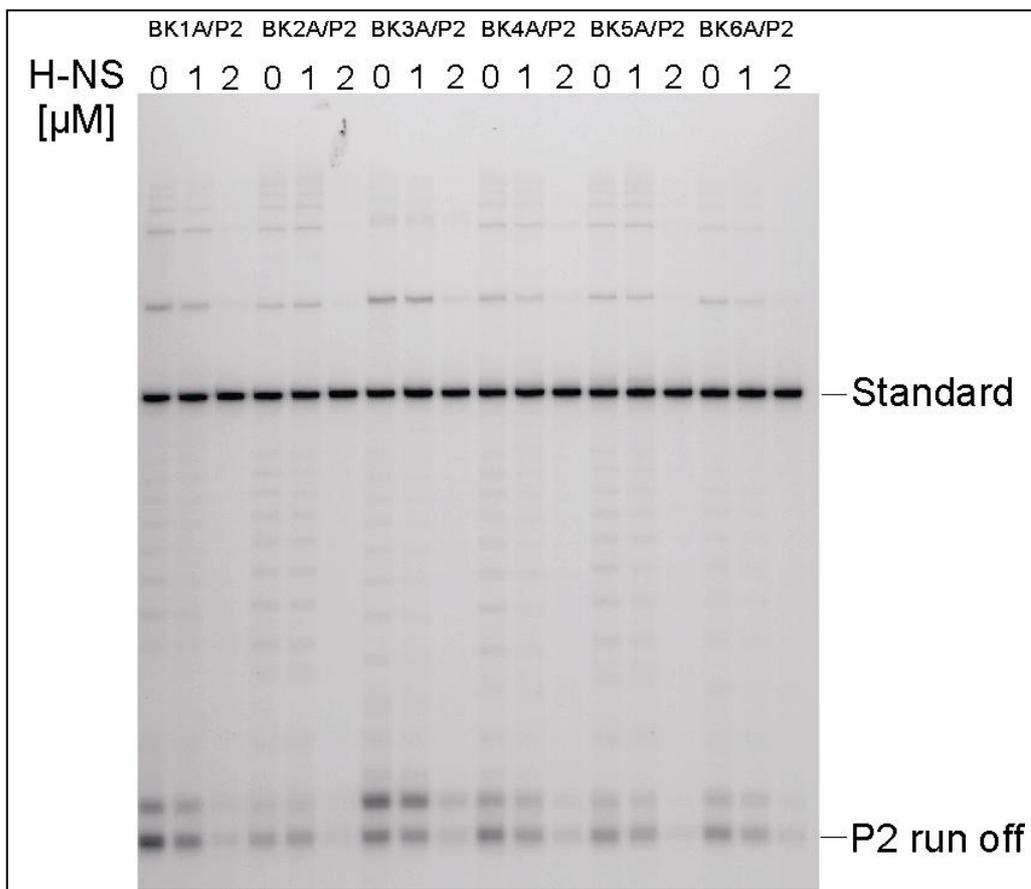


Abb. 2.20: „Pseudo single round“ *in vitro* Transkriptionsanalyse der BK-P2-Fragmente bei steigenden H-NS-Konzentrationen. Zur *in vitro* Transkription wurde jeweils 3 nM jedes BK-P2-Fragmentes mit 9 nM aktiver RNA-Polymerase in Ab- und in Anwesenheit von H-NS in „pseudo single round“ Ansätzen inkubiert. In Spur 1 bis 3 ist die Transkriptbildung bei dem Template BK1A/P2 unter steigenden H-NS-Konzentrationen (0 μM , 1 μM und 2 μM) dargestellt. Die folgenden Spuren zeigen die Transkriptbildung bei den Templates BK2A/P2 (Spur 4 bis 6), BK3A/P2 (Spur 7 bis 9), BK4A/P2 (Spur 10 bis 12), BK5A/P2 (Spur 13 bis 15), BK6A/P2 (Spur 16 bis 18) bei steigenden H-NS-Konzentrationen. Die „run off“-Transkripte und das in allen Ansätzen als Auftragsstandard zugesetzte 256 Nukleotide lange DNA-Fragment sind gekennzeichnet.

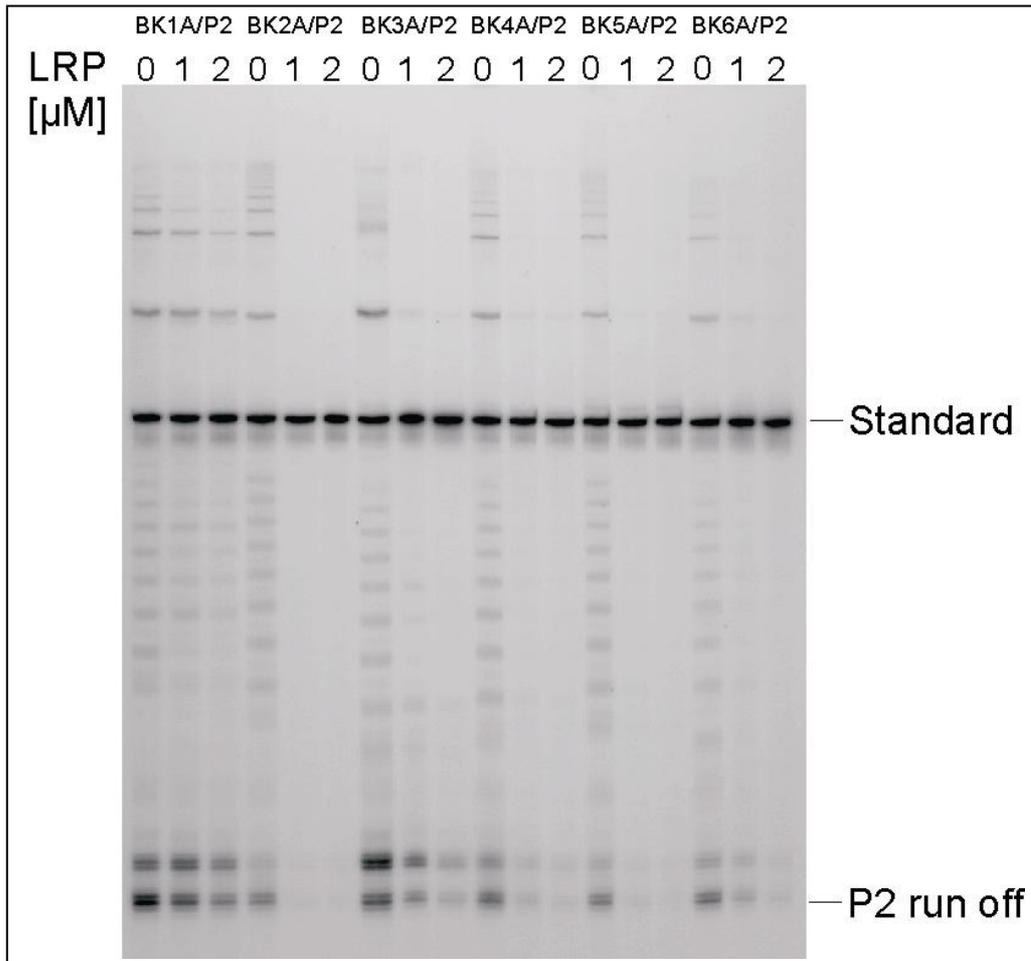
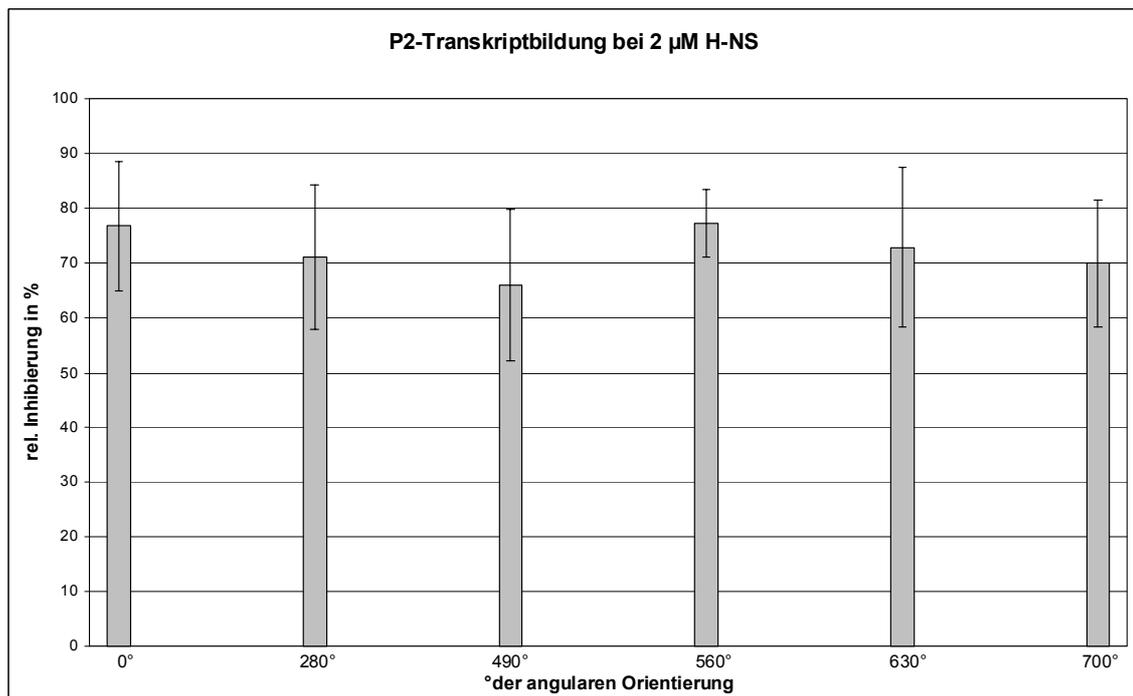
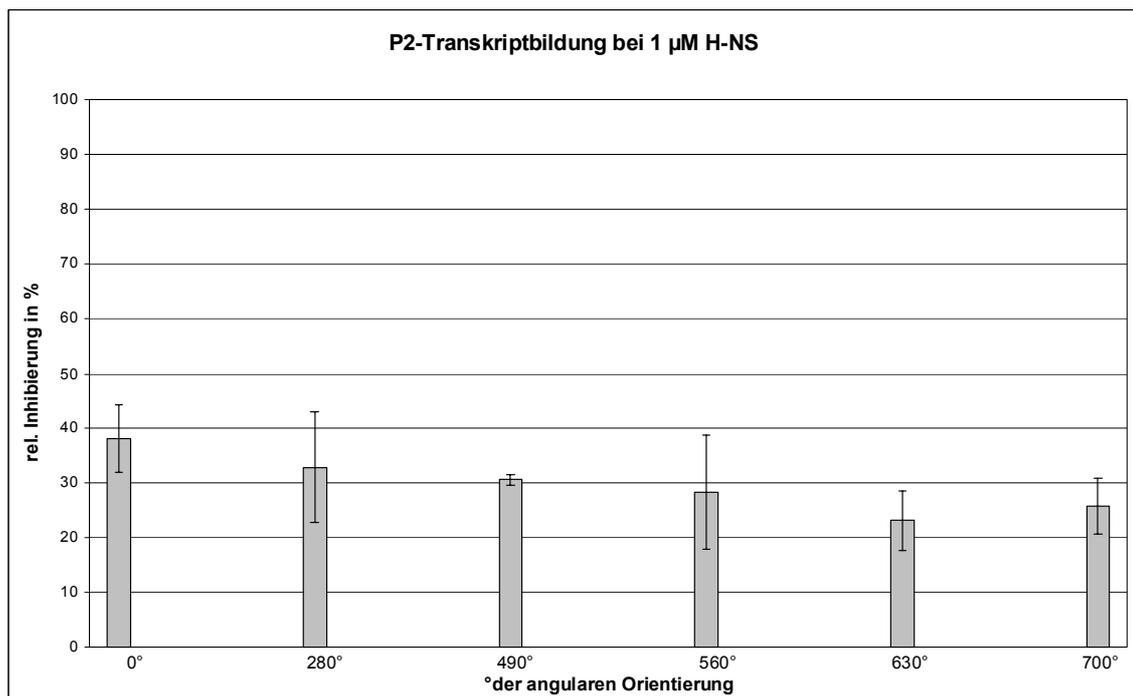


Abb. 2.21: „Pseudo single round“ *in vitro* Transkriptionsanalyse der BK-P2-Fragmente bei steigenden LRP-Konzentrationen. Zur *in vitro* Transkription wurde jeweils 3 nM jedes BK-P2-Fragmentes mit 9 nM aktiver RNA-Polymerase in Ab- und in Anwesenheit von LRP in „pseudo single round“ Ansätzen inkubiert. In Spur 1 bis 3 ist die Transkriptbildung bei dem Template BK1A/P2 unter steigenden LRP-Konzentrationen (0 μM, 1 μM und 2 μM) dargestellt. Die folgenden Spuren zeigen die Transkriptbildung bei den Templates BK2A/P2 (Spur 4 bis 6), BK3A/P2 (Spur 7 bis 9), BK4A/P2 (Spur 10 bis 12), BK5A/P2 (Spur 13 bis 15), BK6A/P2 (Spur 16 bis 18) bei steigenden LRP-Konzentrationen. Die „run off“-Transkripte und das in allen Ansätzen als Auftragungsstandard zugesetzte 256 Nukleotide lange DNA-Fragment sind gekennzeichnet.

Die Quantifizierung der Transkriptionsprodukte (siehe 4.2.9.4) von mindestens drei unabhängigen *in vitro* Transkriptionsassays (Abb. 2.20 und Abb. 2.21 zeigen exemplarisch die Autoradiographie eines Assays) erfolgte nach Normierung gegen den Auftragungsstandard. Um den Einfluß von H-NS und LRP auf die Transkriptionsaktivität der P2-Konstrukte, trotz der unterschiedlichen Basalaktivitäten, miteinander vergleichen zu können, wurde die Promotoraktivität jedes P2-Konstruktes in Abwesenheit von H-NS gleich 100% gesetzt. In der Abb. 2.22 ist die relative Inhibierung der Transkriptbildung bei den P2-Phasing-Konstrukten in Abhängigkeit von der H-NS- und LRP-Konzentration dargestellt.

P2-Transkriptbildung in Anwesenheit von H-NS:

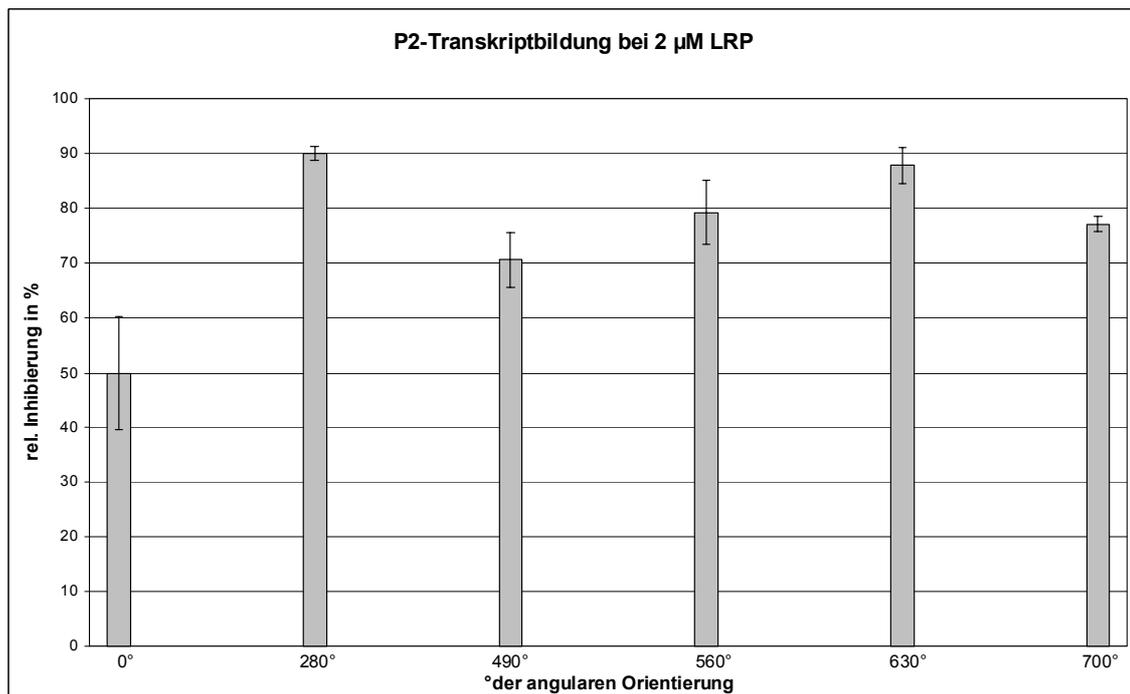
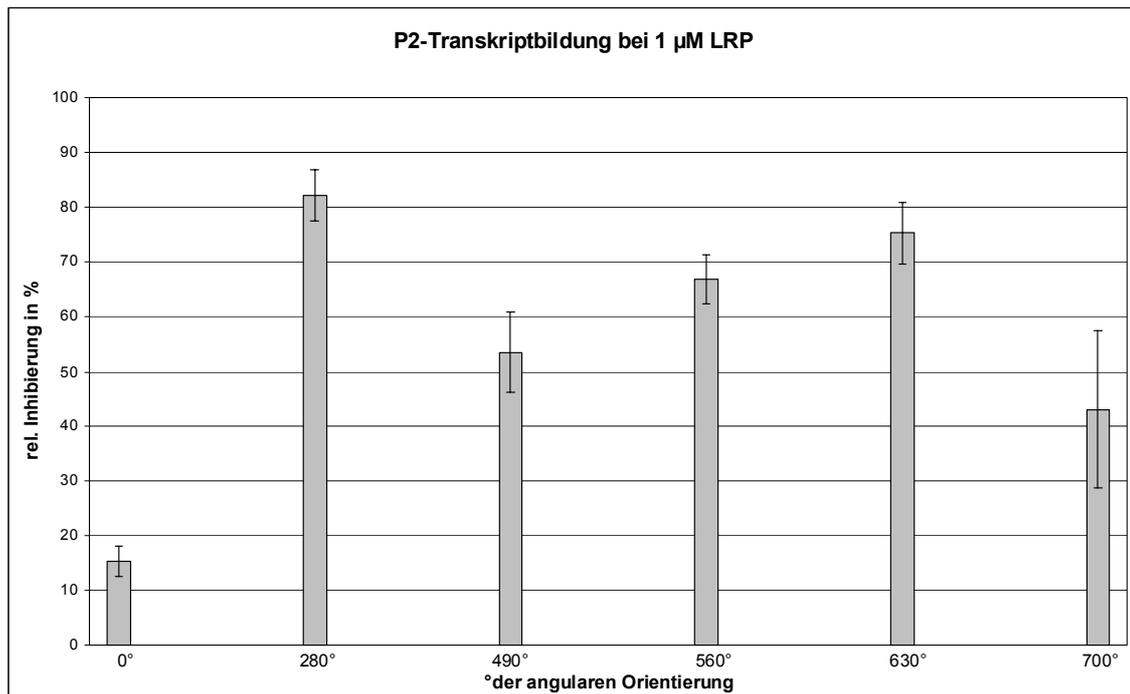
P2-Transkriptbildung in Anwesenheit von LRP:

Abb. 2.22: Analyse der P2-Transkriptbildung abhängig vom Grad der angularen Orientierung in Gegenwart von 1 μM bzw. 2 μM H-NS sowie 1 μM bzw. 2 μM LRP.

Aus der Abb. 2.22 ist ersichtlich, daß H-NS die P2-Transkriptbildung bei allen P2-Konstrukten ungefähr gleich stark inhibiert und auch deutlich stärker als beim

UAS-freien P2-System (Abb. 2.16). In Gegenwart von 1 μM H-NS liegt die relative Inhibierung um 30% und bei 2 μM H-NS beträgt sie im Durchschnitt ungefähr 70%. Somit ist im Fall des Transkriptionsfaktors H-NS kein Phasing-Effekt zu beobachten. Das heißt, daß die Inhibierung der P2 Transkriptionsaktivität unabhängig von Abstand und Orientierung des gebundenen H-NS ist. Zudem ist auffallend, daß die Art der Regulation (Repression) bei allen Konstrukten gleich ist. Jedoch wird durch das Vorschalten einer gekrümmten upstream-Region der normalerweise H-NS-unabhängige *rrnB* P2 Promotor zu einem durch H-NS regulierbaren Promotor.

Mit Ausnahme des Konstruktes BK1A/P2 inhibiert auch LRP die Transkriptbildung der P2-Konstrukte stärker als im Falle des UAS-freien P2-Systems.

Die relative Inhibierung der P2-Transkriptbildung in Gegenwart des Transkriptionsfaktors LRP zeigt eine Abhängigkeit von der Orientierung der upstream-Region. Dabei ist die differentielle Inhibierung bei der geringeren LRP-Konzentration (1 μM) stärker ausgeprägt als bei der höheren Konzentration (2 μM). Während die relative Inhibierung bei den P2-Konstrukten BK2A/P2 und BK5A/P2 mit etwa 80% am höchsten ist, weisen die anderen Konstrukte einen deutlich geringeren Inhibierungseffekt auf. Bei dem Konstrukt BK1A/P2 liegt die relative Inhibierung im Vergleich um etwa 15 %.

Es läßt sich folgende Reihung nach Höhe der relativen Inhibierung der P2-Transkriptbildung durch LRP aufstellen:

1 μM LRP:

BK2A/P2 > BK5A/P2 > BK4A/P2 > BK3A/P2 > BK6A/P2 > BK1A/P2

2 μM LRP:

BK2A/P2 > BK5A/P2 > BK4A/P2 > BK6A/P2 > BK3A/P2 > BK1A/P2

Diese Reihung läßt die Schlußfolgerung zu, daß die Inhibierung der P2-Transkriptionsaktivität abhängig von der Orientierung des gebundenen LRPs ist. Durch eine Erhöhung der LRP-Konzentration wird der unterschiedliche LRP-Effekt zwar verringert, jedoch bleibt die Reihung fast identisch. Zusätzlich zu der Regulierbarkeit durch H-NS kann der *rrnB* P2 Promotor durch den Transkriptionsfaktor LRP reguliert werden, wenn Bindestellen im upstream-Bereich vorliegen.

2.4.4 Der Einfluß von H-NS und LRP auf die P1 Promotoraktivität

Nach den P2-Konstrukten wurden ebenfalls die verschiedenen P1-Konstrukte in „pseudo single round“ *in vitro* Transkriptionen in Ab- und Anwesenheit von H-NS bzw. LRP eingesetzt (siehe Abb. 2.23 und Abb. 2.24). Dadurch konnte der Einfluß der beiden Transkriptionsfaktoren auf die Aktivität eines durch H-NS und LRP regulierbaren Promotors in Abhängigkeit von der Orientierung ihrer Bindestellen untersucht werden.

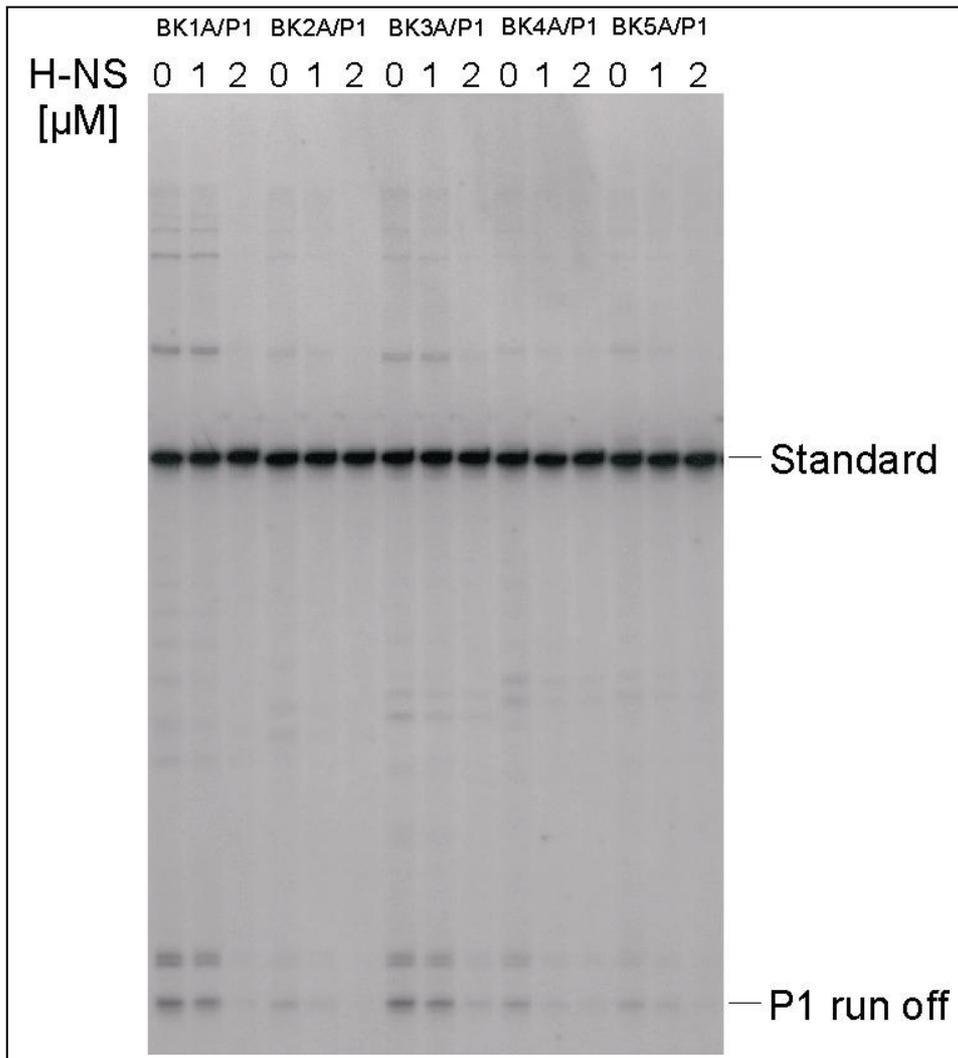


Abb. 2.23: „Pseudo single round“ *in vitro* Transkriptionsanalyse der BK-P1-Fragmente bei steigenden H-NS-Konzentrationen. Zur *in vitro* Transkription wurde jeweils 3 nM jedes BK-P1-Fragmentes mit 9 nM aktiver RNA-Polymerase in Ab- und Anwesenheit von H-NS in „pseudo single round“ Ansätzen inkubiert. In Spur 1 bis 3 ist die Transkriptbildung bei dem Template BK1A/P1 unter steigenden H-NS-Konzentrationen (0 μM, 1 μM und 2 μM) dargestellt. Die folgenden Spuren zeigen die Transkriptbildung bei den Templates BK2A/P1 (Spur 4 bis 6), BK3A/P1 (Spur 7 bis 9), BK4A/P1 (Spur 10 bis 12), BK5A/P1 (Spur 13 bis 15) bei steigenden H-NS-Konzentrationen. Die „run off“-Transkripte und das in allen Ansätzen als Auftragungsstandard zugesetzte 256 Nukleotide lange DNA-Fragment sind gekennzeichnet.

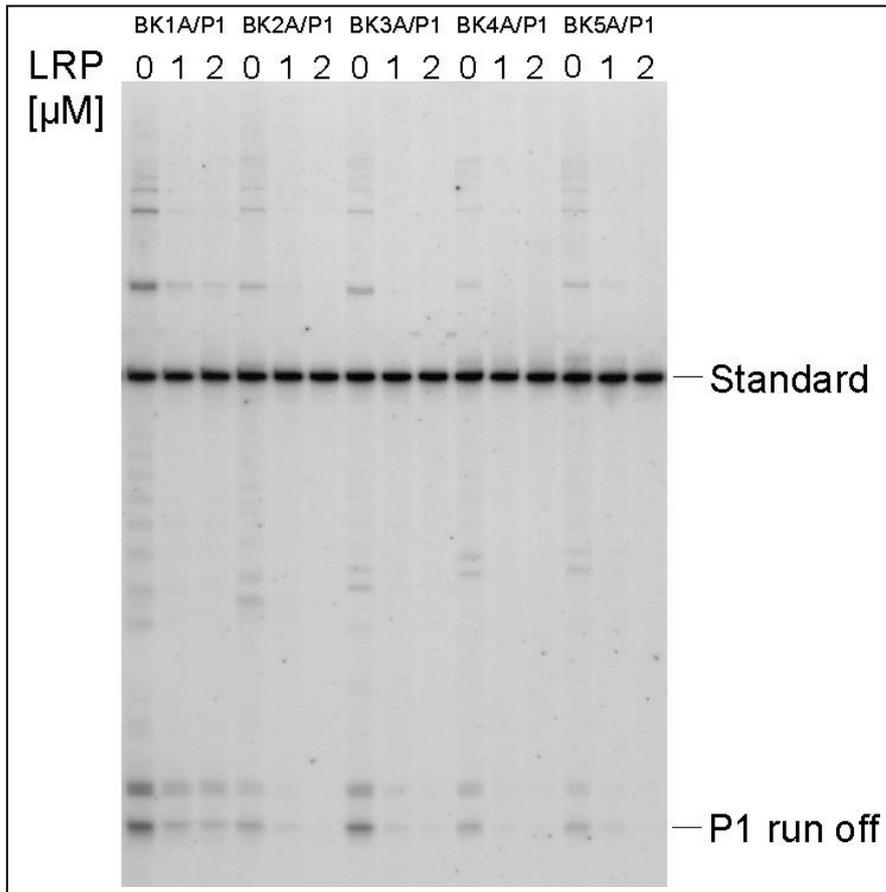
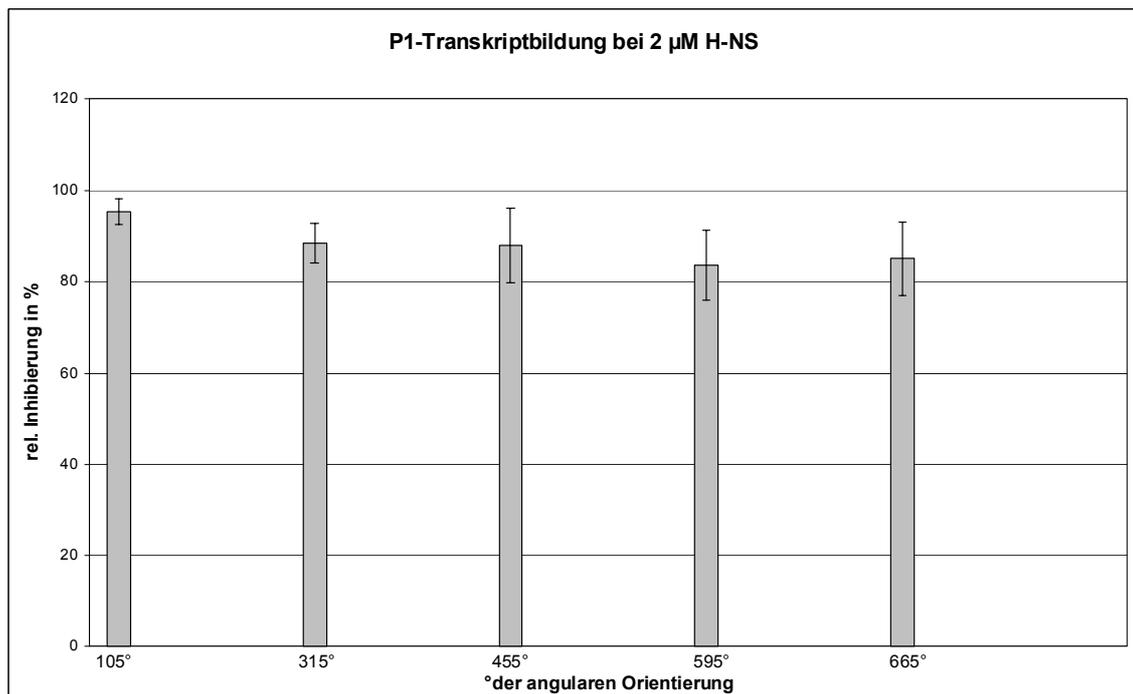
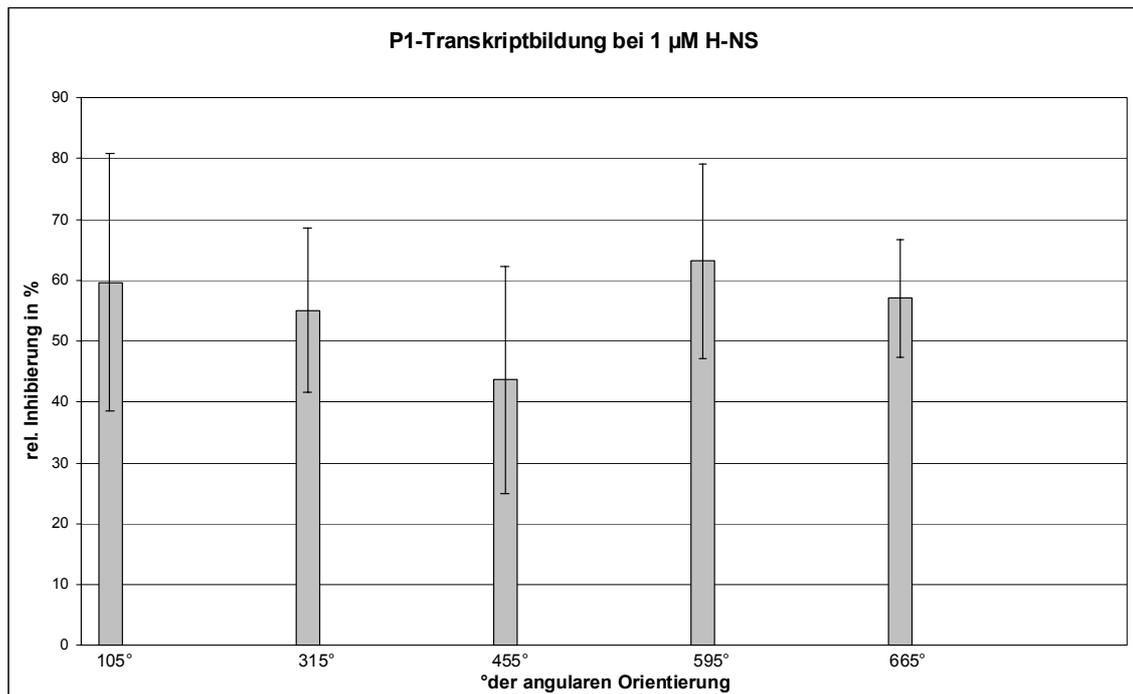


Abb. 2.24: „Pseudo single round“ *in vitro* Transkriptionsanalyse der BK-P1-Fragmente bei steigenden LRP-Konzentrationen. Zur *in vitro* Transkription wurde jeweils 3 nM jedes BK-P1-Fragmentes mit 9 nM aktiver RNA-Polymerase in Ab- und Anwesenheit von LRP in „pseudo single round“ Ansätzen inkubiert. In Spur 1 bis 3 ist die Transkriptbildung bei dem Template BK1A/P1 unter steigenden LRP-Konzentrationen (0 µM, 1 µM und 2 µM) dargestellt. Die folgenden Spuren zeigen die Transkriptbildung bei den Templates BK2A/P1 (Spur 4 bis 6), BK3A/P1 (Spur 7 bis 9), BK4A/P1 (Spur 10 bis 12), BK5A/P1 (Spur 13 bis 15) bei steigenden LRP-Konzentrationen. Die „run off“-Transkripte und das in allen Ansätzen als Auftragungsstandard zugesetzte 256 Nukleotide lange DNA-Fragment sind gekennzeichnet.

Die Quantifizierung der Transkriptionsprodukte von mindestens drei unabhängigen Assays (Abb. 2.23 und Abb. 2.24 zeigen exemplarisch die Autoradiographie eines Assays) erfolgte nach Normierung gegen den Auftragungsstandard der jeweiligen Spur. Zum Vergleich des Einflusses von H-NS und LRP auf die P1 Promotoraktivität der Konstrukte wurde die Aktivität jedes P1-Konstruktes in Abwesenheit der Transkriptionsfaktoren gleich 100% gesetzt und die Restaktivität in Gegenwart von H-NS bzw. LRP zur Berechnung der relativen Inhibierung ermittelt. Die Abb. 2.25 zeigt die relative Inhibierung der Transkriptbildung bei den P1-Phasing-Konstrukten in Abhängigkeit von der H-NS- und LRP-Konzentration.

P1-Transkriptbildung in Anwesenheit von H-NS:

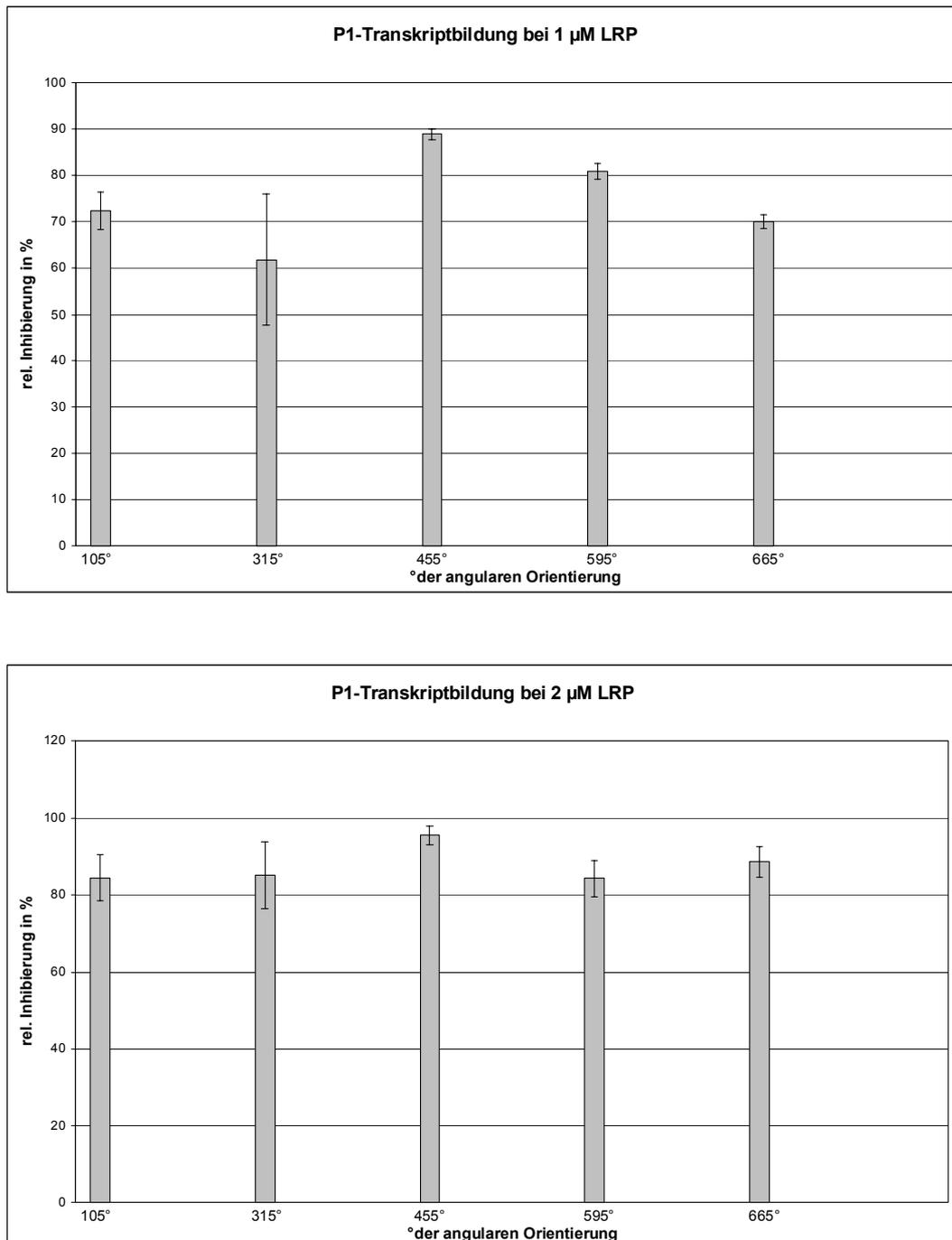
P1-Transkriptbildung in Anwesenheit von LRP:

Abb. 2.25: Analyse der P1-Transkriptbildung abhängig vom Grad der angularen Orientierung in Gegenwart von 1 µM bzw. 2 µM H-NS sowie 1 µM bzw. 2 µM LRP.

Wie zu erkennen ist, inhibiert H-NS die P1-Promotoraktivität bei allen Konstrukten ungefähr gleich stark und auch deutlich stärker als im UAS-freien P1-System (Abb. 2.17). Die relative Inhibition liegt im Fall von 1 µM H-NS im Mittel zwischen 40 und 60%. Die Schwankungen um die Mittelwerte sind jedoch sehr groß. Werden 2 µM H-NS eingesetzt, sind die Standardabweichungen geringer und es

ergibt sich eine relative Inhibierung des P1 Promotors bei den verschiedenen Konstrukten um 90%. Somit kann auch beim P1 Promotor mit H-NS kein Phasing-Effekt beobachtet werden. Dies bedeutet, daß die Inhibierung des P1 Promotors ebenfalls von Abstand und Orientierung des gebundenen H-NS unabhängig ist.

In Gegenwart des Transkriptionsfaktors LRP ist im Vergleich zum P2 Promotor nur eine geringfügige Phasing-Abhängigkeit beim P1 Promotor sichtbar. Der Effekt der unterschiedlich angular orientierten upstream-Regionen auf die relative Inhibierung des P1 Promotors durch LRP ist bei der geringeren LRP-Konzentration (1 μM) deutlicher ausgeprägt als bei der höheren Konzentration (2 μM). Die stärkste relative Inhibierung tritt beim Konstrukt BK3A/P1 auf und liegt bei 90%.

Für die LRP-abhängige Inhibierung der P1-Konstrukte kann folgende Reihung aufgestellt werden:

1 μM LRP:

BK3A/P1 > BK4A/P1 > BK1A/P1 > BK5A/P1 > BK2A/P2

2 μM LRP:

BK3A/P1 > BK5A/P1 > BK2A/P1 > BK4A/P1 = BK1A/P2

Es muss jedoch berücksichtigt werden, daß LRP schon im UAS-freien P1-System eine starke Inhibierung von 80% (1 μM LRP) bzw. 90% (2 μM LRP) hervorruft. Dies läßt eine Bindung von LRP im P1 Promotorbereich vermuten, wodurch der „Phasing“-Effekt bei den P1-Konstrukten überdeckt wird.

Beide Transkriptionsfaktoren zeigen, wie beim P2 Promotor, nur eine reprimierende Wirkung auf die Promotoraktivität. Eine Aktivierung konnte bei keinem Konstrukt gefunden werden.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß bei den P2- sowie den P1-Konstrukten nur ein Effekt des Phasings der upstream-Region in Gegenwart von LRP zu beobachten ist. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, daß H-NS oftmals ausgehend von seiner Bindestelle entlang der DNA bis in den Promotorbereich polymerisiert und dadurch zu einer starken Repression der Promotoraktivität führt. Die Orientierung der Ausgangsbindestelle scheint dabei anscheinend keine große Rolle zu spielen.

Um die genauen Bindestellen der Transkriptionsfaktoren H-NS, LRP und FIS an den P2- bzw. P1-Konstrukten herauszufinden, wurden die im folgenden Abschnitt beschriebenen „footprint“-Analysen durchgeführt.

2.5 DNase I- „footprint“-Analysen

Die Kontaktregionen in Nukleoproteinkomplexen können mit Hilfe der „footprint“-Analyse lokalisiert werden. Das Prinzip dieser Methode beruht auf einem Vergleich der Zugänglichkeit von Nukleotidpositionen der DNA im Komplex mit Positionen in der freien Nukleinsäure. Dabei muß die Konzentration des „footprint“-Reagenzes so gewählt werden, daß jedes Nukleinsäuremolekül statistisch nur einmal gespalten wird („single-hit“-Bedingungen).

In dieser Arbeit wurden durch enzymatische „footprint“-Analysen mit der Endonuklease DNase I (5.3.6) die Kontaktregionen von den Transkriptionsfaktoren H-NS, LRP und FIS mit einem P1-Konstrukt (pBK1A/P1) und einem P2-Konstrukt (pBK1A/P2) untersucht.

Die DNase I ist ein 31 kDa großes Enzym, daß kaum basen- oder sequenzspezifisch schneidet (Tullius, 1989; Drew, 1984).

Vor Zugabe der DNase I wurden 300 ng Plasmid-DNA (pBK1A/P1 bzw. pBK1A/P2) mit den zu analysierenden Proteinen (H-NS, LRP, H-NS + LRP oder FIS) in Anwesenheit des Kompetitors Heparin für die Ausbildung spezifischer Nukleoproteinkomplexe inkubiert. Die Modifikation wurde dann durch Zufügen von DNase I gestartet. Da die Nukleoproteinkomplexe vor der DNase I-Behandlung nicht im Gel aufgetrennt wurden, spiegelt der „footprint“ nicht die einzelnen Komplexe wider, sondern einen „Über-Alles-Komplex“ mit dem jeweiligen Protein. Erst nach der Spaltung der DNA mit DNase I (5.3.6) und anschließender Primer-Extension-Reaktion (5.3.7) wurden die entstandenen DNA-Fragmente gelelektrophoretisch aufgetrennt. Als Negativkontrolle diente jeweils unkomplexierte DNA, die ebenfalls mit DNase I versetzt worden ist.

Durch die Gelaufftrennung entsteht ein charakteristisches Muster („footprint“), das mit dem Spaltungsmuster der parallel aufgetrennten freien DNA verglichen werden kann und damit Aussagen über Positionen der Proteinbindung auf der DNA erlaubt. So sind Positionen auf der DNA mit engem Proteinkontakt durch eine Verringerung ihrer Zugänglichkeit gegenüber dem „footprint“-Reagenz (DNase I) charakterisiert. Aufgrund der Protektion durch das Protein kommt es zu einer starken Reduktion oder zum Fehlen der entsprechenden Fragmentbande im Gel. Zudem kann die Zugänglichkeit bestimmter DNA-Positionen durch Proteinbindung im Vergleich zur freien Nukleinsäure auch verstärkt werden (hypersensitive Positionen). Dieses Phänomen ist auf Protein-induzierte Konformationsänderungen zurückzuführen, wobei DNA-Positionen besonders exponiert werden. Um die in den „footprint“-Analysen identifizierten Positionen der Sequenz zuordnen zu können, werden parallel Sequenzierungen des verwendeten Plasmids auf das Gel aufgetragen.

2.5.1 Bestimmung der Kontaktregionen von H-NS und LRP mit dem P2-Konstrukt pBK1A/P2

Um die Kontaktregionen der Proteine H-NS und LRP auf beiden DNA-Strängen des P2-Konstruktes pBK1A/P2 identifizieren zu können, wurden für die nach der DNase I-Modifikation durchgeführte Primer-Extension-Analyse zwei Oligos gewählt. Das Oligo pBK/5F (4.4) bindet am Matrizenstrang stromabwärts der H-NS Bindestelle, wodurch DNA/Protein-Wechselwirkungen auf dem Nicht-Matrizenstrang lokalisiert werden können. Mit dem Oligo pBK/3 (4.4), welches stromaufwärts des P2 Promotors bindet, können Wechselwirkungen mit dem Matrizenstrang nachgewiesen werden.

Das Plasmid pBK1A/P2 wurde mit H-NS, LRP sowie mit einer Mischung aus beiden Proteinen unter den gleichen spezifischen Bindungsbedingungen wie bei den Retardierungsansätzen inkubiert. Die Abb. 2.26 und 2.27 zeigen die DNase I-„footprints“ des P2-Konstruktes mit H-NS und LRP für den Nicht-Matrizenstrang und den Matrizenstrang.

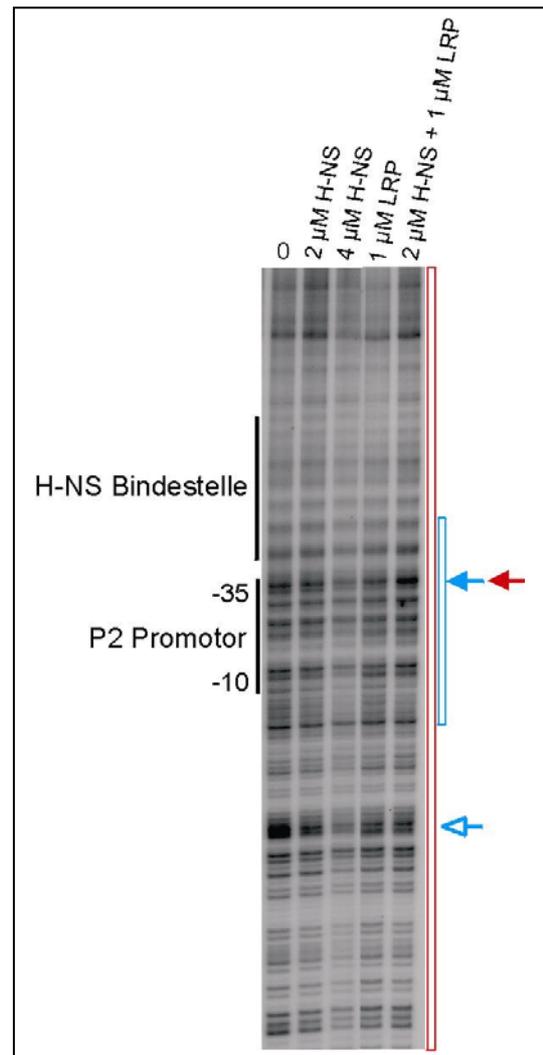
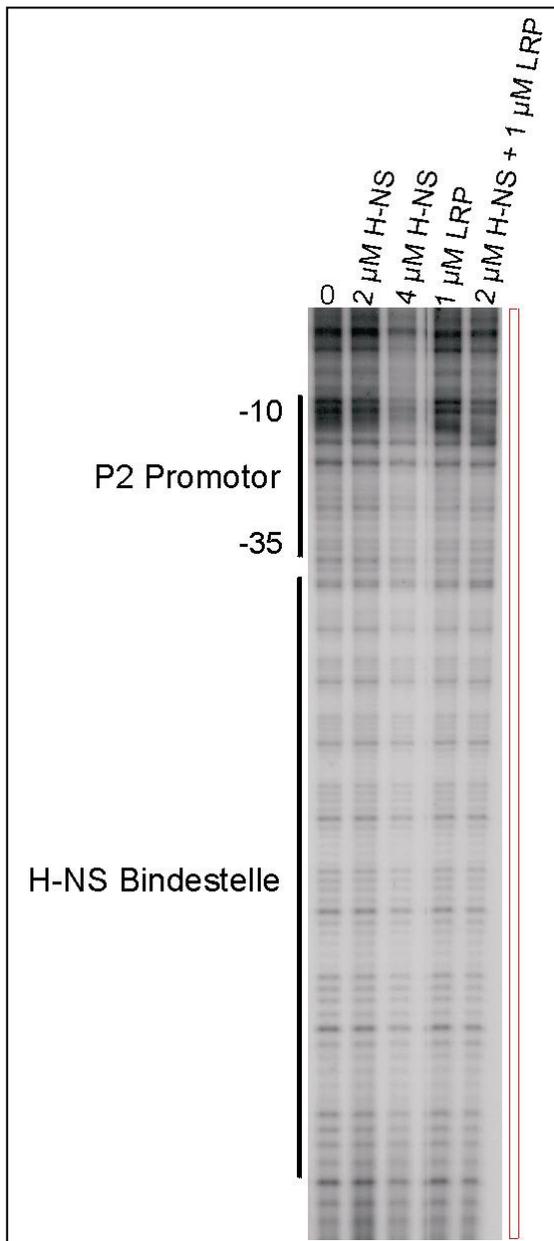


Abb. 2.26 (links) und Abb. 2.27 (rechts): DNase I-„footprint“ des Nicht-Matrizenstranges (2.26) und des Matrizenstranges (2.27) von pBK1A/P2 mit H-NS, LRP bzw. H-NS+LRP.

Links und rechts: Spur 1 zeigt die proteinfreie Kontrolle; Spur 2: 2 μM H-NS; Spur 3: 4 μM H-NS; Spur 4: 1 μM LRP; Spur 5: 2 μM H-NS+1 μM LRP. Die Bereiche des P2 Promotors und der H-NS Bindestelle sind angegeben. Geschützte und verstärkte Positionen sind wie folgt gekennzeichnet: Roter offener Pfeil/Balken: Protektion durch H-NS; roter geschlossener Pfeil/Balken: Hypersensitivität durch H-NS; blauer offener Pfeil/Balken: Protektion durch LRP; blauer geschlossener Pfeil/Balken: Hypersensitivität durch LRP.

Aufgrund der starken intrinsischen Krümmung der H-NS Bindestelle und den dadurch hervorgerufenen, strukturbedingten Abbrüchen bei der Sequenzierungsreaktion, können die veränderten Positionen nicht genau einem Nukleotid

zugeordnet werden. Es ist jedoch möglich, den P2 Promotorbereich und den Bereich der H-NS Bindestelle einzugrenzen.

Für H-NS ist erst bei einer Konzentration von 4 μM eine drastische Veränderung im Bandenmuster zu beobachten. Vergleicht man die Spur 3 (4 μM H-NS) für beide Stränge mit der proteinfreien Kontrollspur (Spur 1), so ist eine durchgängige Reduktion der Bandenintensität zu erkennen. Dies deutet auf eine vollständige Besetzung der H-NS Bindestelle, der P2 Promotorregion sowie des downstream vom P2 liegenden Bereiches durch H-NS Moleküle hin.

Im Fall von LRP ist ebenfalls ein von der proteinfreien Kontrolle verändertes Bandenmuster feststellbar. Es treten geschützte Positionen innerhalb des P2 Promotors sowie am Anfang der H-NS Bindestelle (vom Promotor aus gesehen) und im downstream Bereich auf. Dies weist auf eine mögliche Bindung von LRP im P2 Promotor sowie im angrenzenden upstream und downstream Bereich hin.

Werden H-NS und LRP zusammen zugegeben, so ist eine Mischung aus beiden einzelnen Mustern zu sehen, da sowohl H-NS- als auch LRP-bedingte Veränderungen im Bandenmuster erkennbar sind. Dies ist ein weiterer Beweis dafür, daß H-NS und LRP gleichzeitig an die P2-Konstrukte binden können. Zusätzlich ist eine starke hypersensitive Position in der -35 Region des P2 Promotors zu finden, die in den Spuren mit den einzelnen Proteinen nicht zu sehen ist. Da derartige Verstärkungen durch Protein-induzierte Konformationsänderungen zustande kommen, könnte das veränderte Bandenmuster in Spur 5 den „Supershift“-Komplex mit beiden Proteinen widerspiegeln.

2.5.2 Bestimmung der Kontaktregionen von H-NS und LRP mit dem P1-Konstrukt pBK1A/P1

Zur Bestimmung der Kontaktregionen von H-NS und LRP mit dem P1-Konstrukt wurden die gleichen Oligonukleotide gewählt wie unter 2.5.1. Das Plasmid pBK1A/P1 wurde mit verschiedenen Konzentrationen der Proteine H-NS und LRP sowie mit einer Mischung aus beiden Proteinen unter spezifischen Bindungsbedingungen inkubiert. In den Abb. 2.28 und 2.29 sind die DNase I-„footprint“-Analysen für den Nicht-Matrizenstrang und den Matrizenstrang dargestellt.

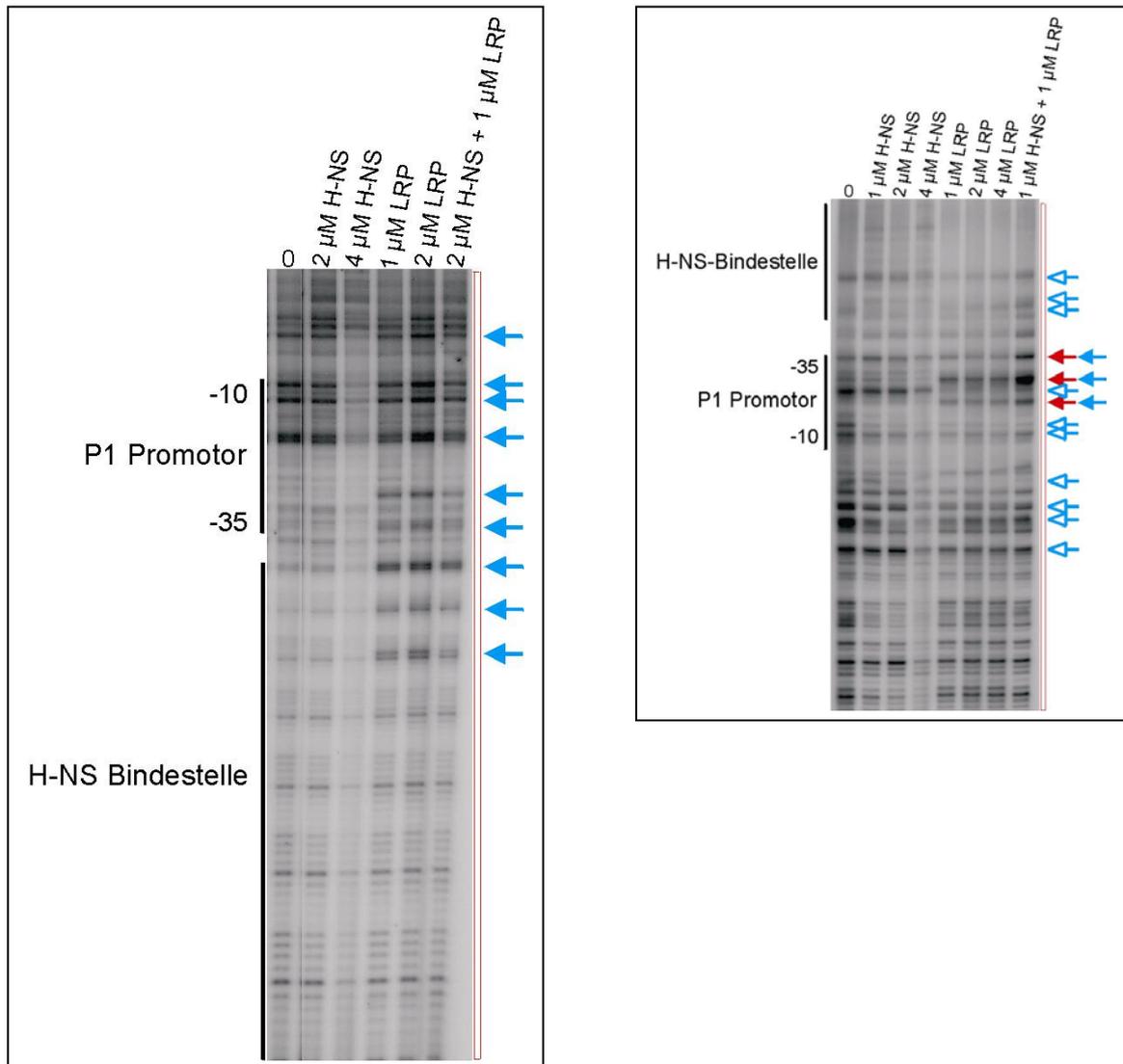


Abb. 2.28 (links) und Abb. 2.29 (rechts): DNase I-„footprint“ des Nicht-Matrizenstranges (2.28) und des Matrizenstranges (2.29) von pBK1A/P1 mit H-NS, LRP bzw. H-NS+LRP.

Links: Spur 1 zeigt die proteinfreie Kontrolle; Spur 2: 2 μM H-NS; Spur 3: 4 μM H-NS; Spur 4: 1 μM LRP; Spur 5: 2 μM LRP; Spur 6: 2 μM H-NS + 1 μM LRP.

Rechts: Spur 1: proteinfreie Kontrolle; Spur 2: 1 μM H-NS; Spur 3: 2 μM H-NS; Spur 4: 4 μM H-NS; Spur 5: 1 μM LRP; Spur 6: 2 μM LRP; Spur 7: 4 μM LRP; Spur 8: 1 μM H-NS + 1 μM LRP.

Die Bereiche des P1 Promotors und der H-NS Bindestelle sind angegeben. Geschützte und verstärkte Positionen sind wie folgt gekennzeichnet:

Roter offener Pfeil/Balken: Protektion durch H-NS; roter geschlossener Pfeil/Balken: Hypersensitivität durch H-NS; blauer offener Pfeil/Balken: Protektion durch LRP; blauer geschlossener Pfeil/Balken: Hypersensitivität durch LRP.

Bei dem P1-Konstrukt traten die gleichen strukturbedingten Schwierigkeiten einer genauen Nukleotid-Zuordnung auf wie im Fall des P2-Konstruktes. Daher können nur Bereiche der auftretenden Bandenmusteränderungen angegeben werden.

Für H-NS kann auch hier eine durchgängige Protektion beider Stränge ab einer Konzentration von 4 μM beobachtet werden. Von H-NS allein verursachte hypersensitive Positionen sind nicht zu finden.

In Anwesenheit von LRP kommt es zu einer starken Veränderung des Bandenmusters. Beim Nicht-Matrizenstrang treten einige hypersensitive Positionen im P1 Promotor als auch im Übergangsbereich zwischen H-NS Bindestelle und Promotor auf. Ein deutlich verändertes Muster zeigt ebenfalls der Matrizenstrang mit LRP. Besonders auffällig sind geschützte und hypersensitive Positionen im P1 Promotorbereich. Zudem sind viele geschützte Positionen im downstream Bereich sowie im Anfangsbereich der H-NS Bindestelle (vom P1 aus gesehen) zu finden. Somit kann durch die auftretenden Veränderungen im Promotorbereich die bereits in den Transkriptionsanalysen vermutete LRP-Bindung im P1 Promotor bestätigt werden und die starke LRP-abhängige Inhibierung im UAS-freien P1-System erklärt werden.

Werden beide Proteine zusammen zugegeben, so lassen sich neue hypersensitive Positionen im P1 Promotor nachweisen, die überwiegend im Bereich der -35 Region lokalisiert sind. Die gleichzeitige Bindung von H-NS und LRP scheint eine deutliche Konformationsänderung der DNA hervorzurufen, wodurch der P1 Promotorbereich eine erhöhte Exposition gegenüber der DNase I erfährt. Diese Konformationsänderung zeigte sich auch beim P1-Konstrukt in einem auftretenden „Supershift“ bei den Retardierungsanalysen.

2.5.3 Nachweis einer FIS-Bindung im P2 Promotorbereich

Bei der Retardierungsanalyse des Transkriptionsfaktors FIS mit dem P2-Kontrollfragment (nur P2 Promotor, keine H-NS-Bindestelle) wurde festgestellt, daß FIS einen verzögerten Komplex mit diesem Fragment bildet. Jedoch konnte kein Komplex mit dem analogen P1-Kontrollfragment nachgewiesen werden. Diese Tatsache führte zu der Vermutung, daß FIS im Bereich des P2 Promotors binden könnte. Zum Nachweis der Kontaktregionen von FIS im P2 Promotor wurde ein DNase I-„footprint“ des Plasmids pBK1A/P2 mit dem Transkriptionsfaktor FIS unter spezifischen Bindungsbedingungen durchgeführt. In der Abb. 2.30 ist der DNase I-„footprint“ für den Matrizenstrang gezeigt.

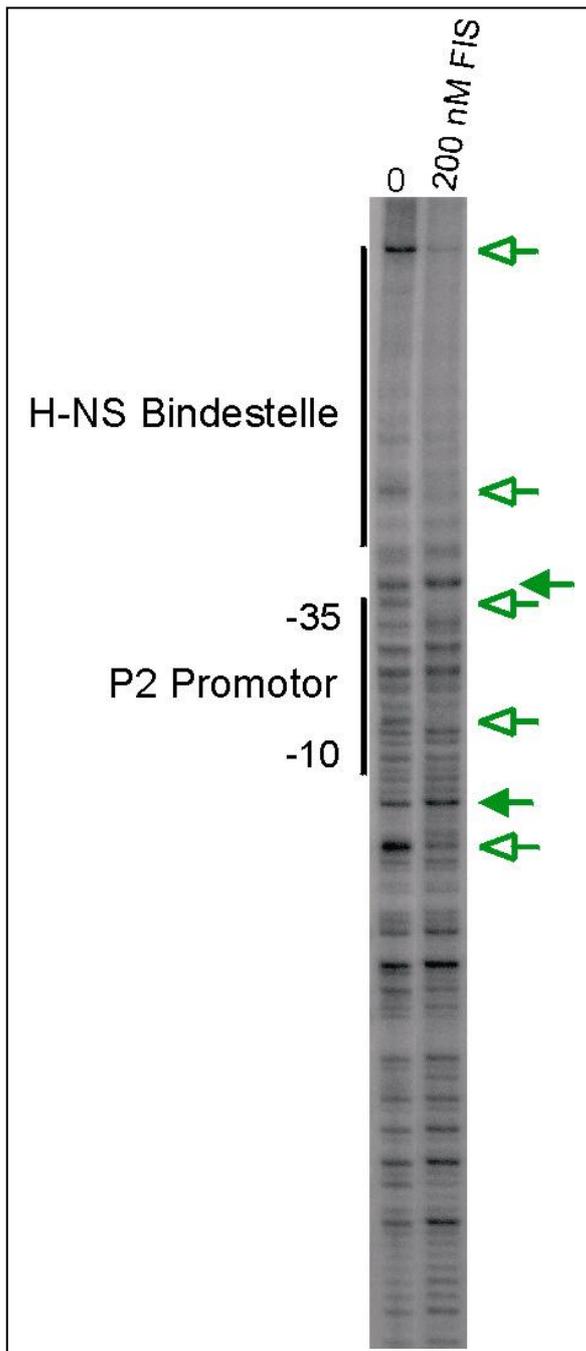


Abb. 2.30: DNase I-„footprint“ des Matrizenstranges von pBK1A/P2 mit FIS.

Spur 1 enthält die proteinfreie Kontrolle; Spur 2: 200 nM FIS. Die Bereiche der H-NS Bindestelle und des P2 Promotors sind angegeben. Geschützte und verstärkte Positionen sind wie folgt gekennzeichnet: grüner offener Pfeil: Protektion durch FIS; grüner geschlossener Pfeil: Hypersensitivität durch FIS.

Im P2 Promotorbereich sind zwei deutlich geschützte Positionen in Anwesenheit von FIS (Spur 2) zu erkennen. Die Protektion äußert sich in dem Fehlen dieser zwei Banden im Vergleich zur proteinfreien Kontrollspur (Spur 1). An beiden Rändern des P2 Promotors ist jeweils eine deutliche hypersensitive Position sichtbar. Das veränderte Bandenmuster im P2 Promotorbereich läßt somit auf eine Bindung von FIS im *rrnB* P2 Promotor schließen. Diese FIS-Bindung konnte hier erstmals gezeigt werden. Für den Mechanismus der P2 Promotorregulation würde dies eine Repression durch FIS bedeuten, da RNA-Polymerase- und FIS-Bindung sich aufgrund gleicher Bindestellen ausschließen. Somit würde der

Transkriptionsfaktor FIS auf den rrnB P1 Promotor die bereits bekannte aktivierende Funktion ausüben, jedoch auf den P2 Promotor eine reprimierende Wirkung haben.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Bindung von H-NS beim P1- und P2-Konstrukt nicht eingegrenzt werden kann, da sie sich über den ganzen sichtbaren Bereich (H-NS Bindestelle, P2- bzw. P1-Promotor, downstream-Bereich) erstreckt.

Die LRP-Bindung ist beim P1-Konstrukt deutlicher ausgeprägt als beim P2-Konstrukt, da LRP im P1 Promotorbereich stärkere Veränderungen im Bandenmuster hervorruft. Bei beiden Konstrukten scheint LRP neben dem Promotor im promotornahen upstream und downstream Bereich zu binden.

Für den Transkriptionsfaktor FIS konnte die Bindung im P2 Promotorbereich nachgewiesen werden.

3 Diskussion

Für viele bakterielle Promotoren konnte gezeigt werden, daß ihre Stärke durch gekrümmte upstream-Sequenzen beeinflusst wird. Die Effekte auf die Promotoraktivität können dabei direkt sein oder durch Änderungen in der Affinität für regulatorische Transkriptionsfaktoren vermittelt werden (Bracco *et al.*, 1989; Plaskon und Wartel, 1987). Beide Mechanismen können individuell oder synergistisch ablaufen.

Ziel dieser Arbeit war, die faktorunabhängige sowie faktorabhängige Regulation der ribosomalen Promotoren *rrnB* P2 und *rrnB* P1 zu untersuchen. Dazu wurde eine intrinsisch gekrümmte upstream-Region (synthetische H-NS Bindestelle) in unterschiedlichen Abständen und somit in verschiedener angularer Orientierung stromaufwärts des *rrnB* P2 und *rrnB* P1 Promotors kloniert. Weitere verwendete Promotorkonstrukte waren der *rrnB* P1 Promotor mit seiner natürlichen upstream-Region sowie die UAS-freien *rrnB* P2 und P1 Promotoren. Ein Vergleich der Promotoraktivität bei den P2- und P1-Phasingkonstrukten in Abwesenheit von Transkriptionsfaktoren ergab eine von der Orientierung der upstream-Region abhängige Aktivität für beide ribosomale Promotoren. Retardierungsanalysen zeigten, daß die Transkriptionsfaktoren H-NS, LRP und FIS mit den P2- und P1-Phasingkonstrukten spezifische Komplexe ausbilden. Zudem konnte eine Bindung von LRP im P1 Promotorbereich und eine Wechselwirkung von FIS mit dem P2 Promotor anhand von „footprint“-Analysen nachgewiesen werden. *In vitro* Transkriptionsanalysen zeigten, daß Abstand und „Phasing“ der gekrümmten upstream-Region für die H-NS-vermittelte Regulation eine untergeordnete Rolle spielen. Für den Transkriptionsfaktor LRP konnte jedoch eine Abhängigkeit von der Orientierung seiner Bindestelle für die Stärke der Promotorregulation gefunden werden.

3.1 Klonierung einer synthetischen H-NS Bindestelle mit unterschiedlichem „Phasing“ zu den Promotoren *rrnB* P2 und *rrnB* P1

Um ein unterschiedliches „Phasing“ der H-NS Bindestelle zu erzielen, wurde die synthetische upstream-Region mit verschiedenen Abständen vor den ribosomalen Promotoren *rrnB* P2 und *rrnB* P1 kloniert. Bei der Klonierung der Phasingkonstrukte mußte darauf geachtet werden, daß sich vor dem *rrnB* P2 und *rrnB* P1 Promotor kein künstlich erzeugtes UP-Element befindet, um bei späteren Transkriptionsanalysen ausschließlich UAS-abhängige Effekte zu sehen. UP-Elemente können die Promotoraktivität, je nach ihrer Übereinstimmung mit der ermittelten Konsensussequenz (Estrem *et al.*, 1998), unterschiedlich stark erhöhen und würden dadurch die Ergebnisse verfälschen.

Die Bestimmung der angularen Orientierung der H-NS Bindestelle zu den Promotoren P2 und P1 erfolgte, wie bereits unter 2.1 erwähnt, durch die

Annahme, daß 10.5 Basenpaare einer Helixwindung (360°) entsprechen. Zur Überprüfung des „Phasings“ der synthetischen upstream-Regionen wurden die Strukturen der eingesetzten Transkriptionsfragmente mit „DIAMOD“ unter Verwendung des Trinukleotidmodells berechnet (Dlakic und Harrington, 1998). Das Programm „DIAMOD“ erlaubt eine Strukturvorhersage von DNA-Molekülen und eine Visualisierung der berechneten Strukturen. Die Abb. 3.1 und 3.2 zeigen die vorhergesagten Strukturen für die in dieser Arbeit verwendeten P2- und P1-Phasingkonstrukte. Die räumliche Orientierung wurde so gewählt, daß der downstream-Bereich bei allen Konstrukten in der Ebene liegt, in der er die größte Krümmung aufweist. Aus den Abb. 3.1 und 3.2 ist deutlich die stark gekrümmte Konformation der upstream-Region sowie ihre unterschiedliche angulare Orientierung zum P2 bzw. P1 Promotor bei den einzelnen Fragmenten erkennbar. Mit Hilfe der Grad-Angaben kann das „Phasing“ der upstream-Region bei den Fragmenten verfolgt werden. Wie erwartet, ist bei den P2-Konstrukten BK2A/P2 und BK5A/P2 eine fast identische angulare Orientierung der upstream-Region zum Promotor zu sehen, da sie sich um annähernd eine volle Drehung (360°) unterscheiden. Das ist ebenso der Fall für die P1-Konstrukte BK2A/P1 und BK5A/P1 sowie BK1A/P1 und BK3A/P1. Dies spricht dafür, daß die berechneten Strukturmodelle mit den tatsächlichen Konformationen dieser Fragmente gut übereinstimmen. Somit konnten für die Promotoren *rrnB* P2 und *rrnB* P1 synthetische upstream-Regionen konstruiert werden, die in unterschiedlichen angularen Orientierungen sowie Abständen zum Promotor liegen. Es wurden jedoch auch Konstrukte erzeugt, die sich lediglich im Abstand der upstream-Region zum Promotor unterscheiden. Dies ist besonders interessant, um den alleinigen Einfluß des Abstandes auf die faktorunabhängige und faktorabhängige Promotorregulation zu analysieren.

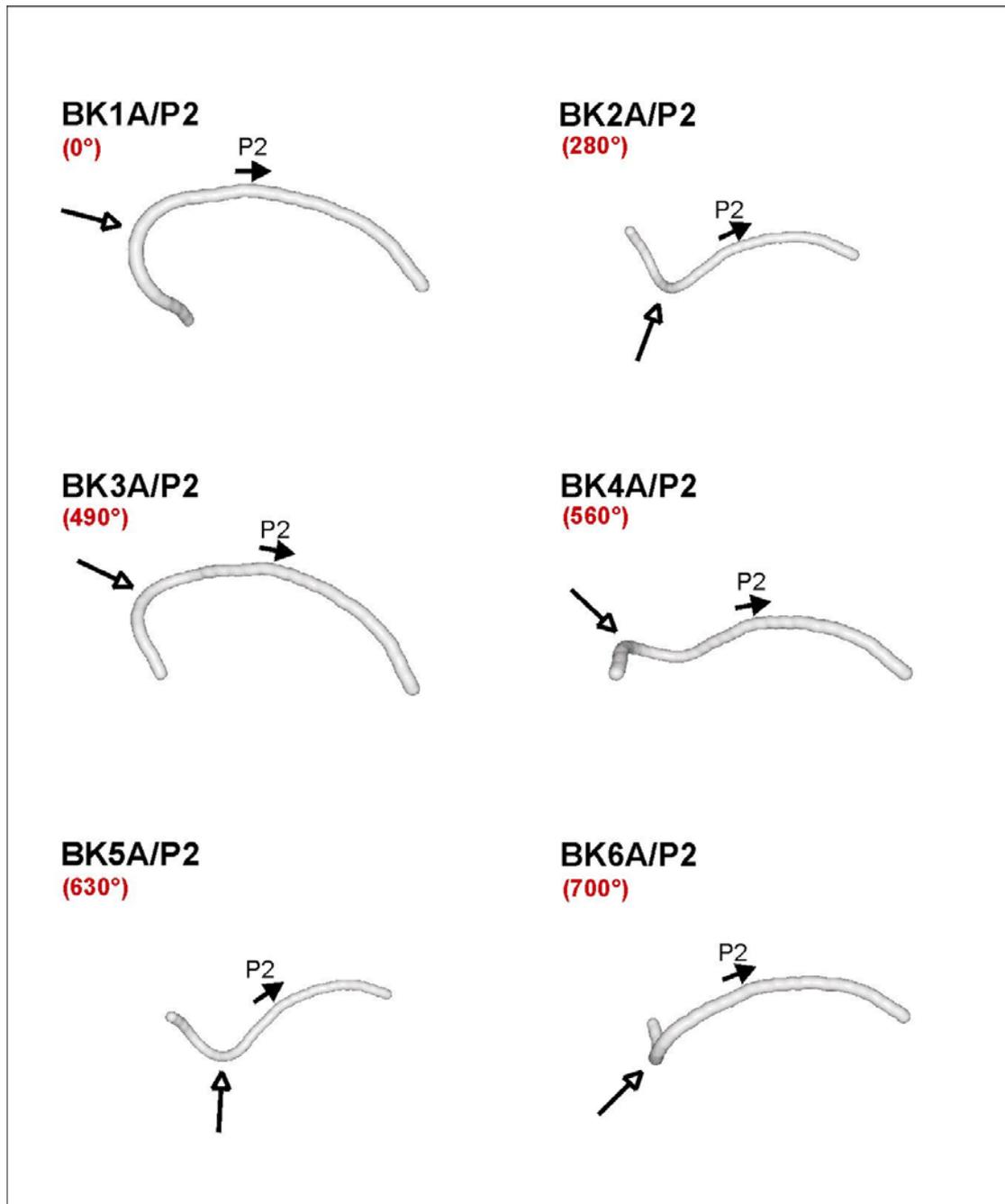


Abb. 3.1: Strukturmodelle der P2-Phasing-Fragmente.

Die Fragmente sind mit Hilfe des Programms „DIAMOD“ als wurmförmige Strukturen dargestellt (Dlatic und Harrington, 1998). Die upstream-Region befindet sich jeweils auf der linken Seite und der P2 Promotorbereich in der Mitte der Fragmente. Das Zentrum der upstream-Region ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Alle Strukturen wurden so gedreht, daß der rechte Bereich (Transkriptionsrichtung, downstream vom Promotor) in der Ebene liegt, in der er die größte Krümmung aufweist. Die jeweilige angulare Orientierung ist bei den Fragmentbezeichnungen mit angegeben.

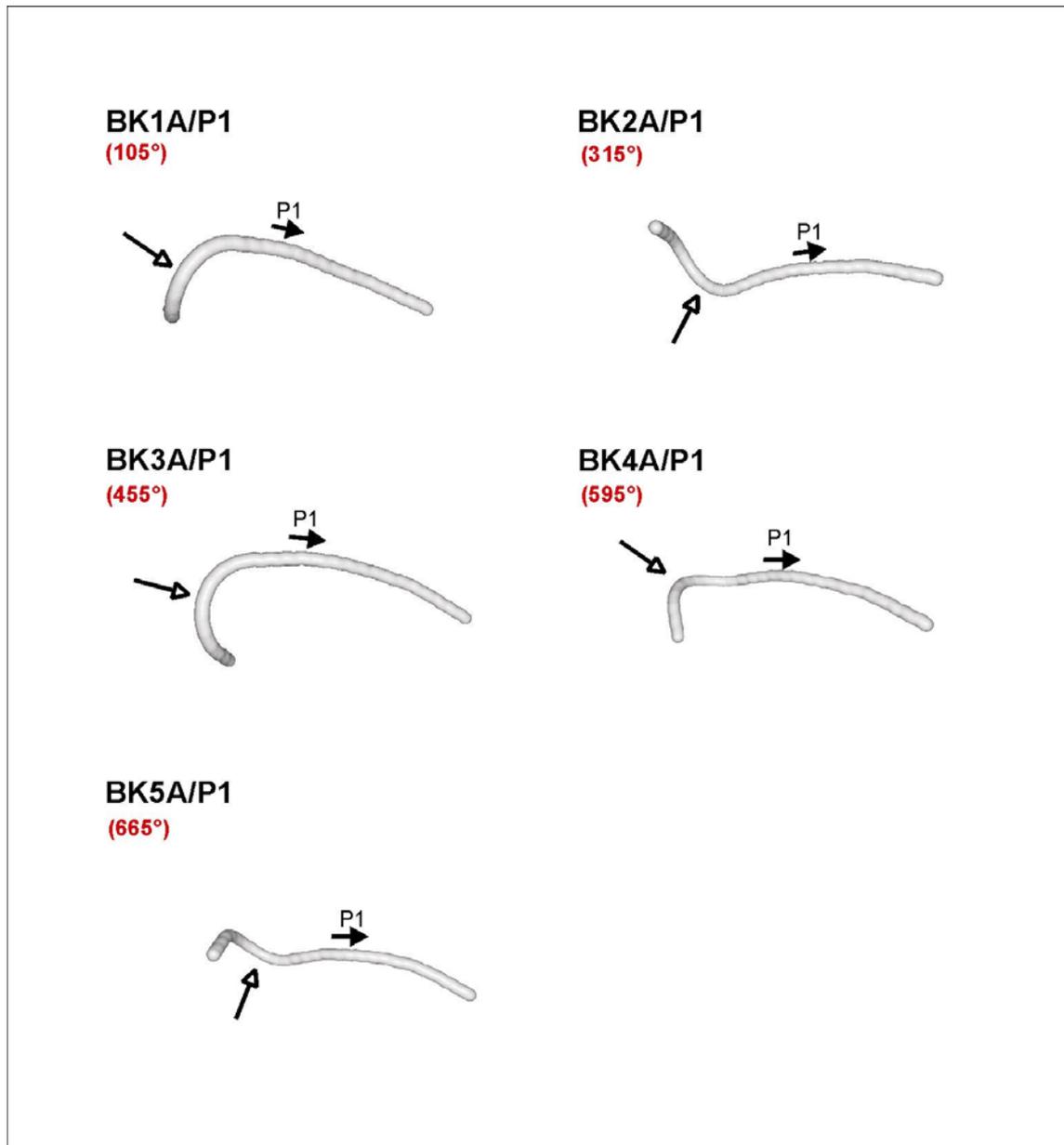


Abb. 3.2: Strukturmodelle der P1-Phasing-Fragmente.

Die Fragmente sind mit Hilfe des Programms „DIAMOD“ als wurmförmige Strukturen dargestellt (Dlatic und Harrington, 1998). Die upstream-Region befindet sich jeweils auf der linken Seite und der P1 Promotorbereich in der Mitte der Fragmente. Das Zentrum der upstream-Region ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Alle Strukturen wurden so gedreht, daß der rechte Bereich (Transkriptionsrichtung, downstream vom Promotor) in der Ebene liegt, in der er die größte Krümmung aufweist. Die jeweilige angulare Orientierung ist bei den Fragmentbezeichnungen mit angegeben.

3.2 Der direkte Einfluß der upstream-Regionen auf die Aktivität der Promotoren *rrnB* P2 und *rrnB* P1

Sequenzabhängige (intrinsische) Krümmungen werden stark durch Veränderungen der Umweltbedingungen beeinflusst. Es wurde gezeigt, daß nicht nur die Krümmungsstärke, sondern ebenfalls die Lokalisierung des Krümmungszentrums durch physiologische Temperaturänderungen verändert werden kann (Argawal *et al.*, 1997). So nimmt die DNA-Krümmung bei niedrigen Temperaturen zu (Rimsky *et al.*, 2004). Daher kann die DNA-Krümmung auf Temperaturänderungen „antworten“ und somit eine bedeutende Rolle bei der Transkriptionsregulation spielen. Solche intrinsisch gerümmten Regionen sind bei einer Vielzahl von bakteriellen Promotoren upstream der -35 Region zu finden. Die aktivierende Wirkung derartiger upstream-Regionen kann durch eine Stabilisierung des binären RNA-Polymerase/Promotor-Komplexes aufgrund von erweiterten Kontakten (Bracco *et al.*, 1989) und/oder durch eine Beschleunigung der Isomerisierung des geschlossenen zum offenen Komplex erklärt werden. Gekrümmte upstream-Sequenzen können aber auch die Promotorfreisetzung positiv oder negativ beeinflussen.

Der ribosomale Promotor *rrnB* P1 besitzt in seiner natürlichen Umgebung eine UAS-Region, die eine starke Transkriptionsaktivierung hervorruft (Gourse *et al.*, 1986). Jedoch fehlt eine analoge upstream-Region beim *rrnB* P2 Promotor. Durch die Konstruktion von synthetischen upstream-Regionen vor den Promotoren *rrnB* P2 und *rrnB* P1 konnte nun überprüft werden, ob unterschiedliche angulare Orientierungen und Abstände für Art und Stärke der Regulation entscheidend sind. Mit der Wahl des *rrnB* P2 Promotors war zudem die Feststellung möglich, ob ein unter natürlichen Bedingungen UAS-freier Promotor mit dem Vorschalten von upstream-Regionen durch diese positiv oder negativ reguliert werden kann.

Der Vergleich der P2-Phasingkonstrukte sowie der P1-Phasingkonstrukte ergab deutliche Unterschiede in der Basalaktivität der Promotoren, abhängig von der angularen Orientierung der gekrümmten upstream-Region.

Um einen besseren Überblick zu haben, wurden für die Konstrukte die Helixwindungen berechnet, die zwischen dem Zentrum der H-NS Bindestelle und dem Transkriptionsstart +1 liegen (siehe Tab. 3.1 und 3.2).

P2-Konstrukte:

PLASMID	ABSTAND	ORIENTIERUNG	HELIXWINDUNGEN	BASALAKTIVITÄT
pBK1A/P2	87 BP	0°	8.3	89%
pBK2A/P2	95 BP	280°	9	39%
pBK3A/P2	101 BP	490°	9.6	100%
pBK4A/P2	103 BP	560°	9.8	60%
pBK5A/P2	105 BP	630°	10	41%
pBK6A/P2	107 BP	700°	10.2	46%

Tab. 3.1: Abstand, Orientierung sowie die Anzahl der Helixwindungen zwischen dem Zentrum der H-NS Bindestelle und dem Transkriptionsstart +1 bei den P2-Konstrukten und die ermittelte Basalaktivität, normiert auf das Konstrukt pBK3A/P2 = 100%.

P1-Konstrukte:

PLASMID	ABSTAND	ORIENTIERUNG	HELIXWINDUNGEN	BASALAKTIVITÄT
pBK1A/P1	0 BP	105°	8.6	113%
pBK2A/P1	96 BP	315°	9.1	26%
pBK3A/P1	100 BP	455°	9.5	100%
pBK4A/P1	104 BP	595°	9.9	40%
pBK5A/P1	106 BP	665°	10.1	32%

Tab. 3.2: Abstand, Orientierung sowie die Anzahl der Helixwindungen zwischen dem Zentrum der H-NS Bindestelle und dem Transkriptionsstart +1 bei den P1-Konstrukten und die ermittelte Basalaktivität, normiert auf das Konstrukt pBK3A/P1 = 100%.

Die Tab. 3.1 zeigt, daß die P2-Konstrukte, bei denen das Zentrum der synthetischen UAS-Region um ungefähr vollständige Helixwindungen zum Transkriptionsstart +1 entfernt ist (Konstrukte 2, 4, 5 und 6), eine um 30-50% geringere Aktivität aufweisen als die Konstrukte mit einer Abstandsvariation von einer fast halben Helixwindung (Konstrukte 1 und 3). Bei den P2-Konstrukten 2 und 5, die sich lediglich in dem Abstand ihrer upstream-Region um eine Helixwindung unterscheiden, ist eine vergleichbare Basalaktivität des P2 Promotors zu finden. Somit ist nur die Orientierung und nicht der Abstand der gekrümmten upstream-Region für eine hohe P2 Promotoraktivität von Bedeutung. Das gleiche Ergebnis ist auch für die P1-Konstrukte aus der Tab. 3.2 ableitbar. Während die P1-Konstrukte mit einer Abstandsvariation von fast vollständigen Helixwindungen eine geringe Basalaktivität zwischen 25-40% zeigen (Konstrukte 2, 4 und 5), ist bei den Konstrukten mit einer Abstandsvariation von ungefähr halben Helixwindungen (Konstrukte 1 und 3) eine deutlich höhere P1 Promotoraktivität (um 100%) zu sehen. Ein Vergleich der Promotoraktivität bestätigt, daß P1-Konstrukte mit fast identischer angularer Orientierung

(Konstrukte 1 und 3 sowie 2 und 5) eine ähnliche Basalaktivität zeigen, obwohl der Abstand ihrer upstream-Region zum Promotor unterschiedlich ist.

Damit UAS-Regionen eine aktivierende Funktion auf Promotoren ausüben können, müssen sie in einer bestimmten angularen Orientierung zum Promotor liegen. Abstandsvariationen von ungeraden Helixwindungen zum Transkriptionsstart +1 führen zu einer höheren Promotoraktivität als Abstandsvariationen von geradzahigen Helixwindungen. Der Abstand des Krümmungszentrums zum Transkriptionsstart scheint von geringerer Bedeutung zu sein. Somit ist die faktorunabhängige Aktivierung von Promotoren durch gekrümmte upstream-Sequenzen „phase of the helix“ abhängig. Eine Erklärung für die unterschiedliche Promotoraktivität könnte sein, daß durch Biegung in eine bevorzugte Orientierung die UAS-Region das linkshändige „wrapping“ der DNA um die RNA-Polymerase besser fördern kann (Travers und Muskhelishvili, 2005).

Auch für das UP-Element, das die Transkription vom *rrnB* P1 Promotor stimuliert, konnte gezeigt werden, daß die Position entscheidend für die Aktivierungsfunktion ist. Diese Ergebnisse bestätigen, daß die Aktivierung des P1 Promotors durch upstream-Sequenzen eine „phase of the helix“-Abhängigkeit besitzt (Meng *et al.*, 2001).

Zudem wurde gezeigt, daß ein UAS-freier Promotor durch das Vorschalten von gekrümmten upstream-Regionen in seiner Promotoraktivität beeinflusst werden kann.

3.3 Der Einfluß von H-NS auf die Aktivität der Promotoren *rrnB* P2 und *rrnB* P1

Es ist bekannt, daß H-NS auf spezifische und unspezifische Weise mit DNA interagieren kann. Dies wurde durch Fluoreszenzanalysen über einen internen singulären Tryptophanrest im H-NS Protein ermittelt (Tippner und Wagner, 1995). H-NS bindet ohne Sequenzspezifität an jede doppelsträngige DNA und auch an einzelsträngige DNA oder RNA (Friedrich *et al.*, 1988), wenn seine Konzentration hoch genug ist. Diese Bindung ist unspezifisch und fast vollständig elektrostatischer Natur. Für eine spezifische H-NS Bindung an DNA mit höherer Affinität ist intrinsisch gekrümmte DNA erforderlich, jedoch keine bestimmte Sequenz (Bracco *et al.*, 1989; Yamada, 1990; Owen-Hughes *et al.*, 1992; Tupper *et al.*, 1994). Bei einer spezifischen DNA-Bindung von H-NS sind hydrophobe Wechselwirkungen und sehr wahrscheinlich auch Wasserstoffbrücken-Bindungen beteiligt. Im Unterschied zur unspezifischen Bindung ist für eine spezifische H-NS-Bindung eine geringere Protein-Konzentration ausreichend und sie erfolgt auch in Gegenwart des Kompetitors Heparin.

Die Affinität von H-NS für gekrümmte Sequenzen korreliert jedoch nicht immer mit der Krümmungsstärke. So bindet H-NS beispielsweise mit einer höheren Affinität an die UAS-Region des *rrnE* Operons als an die des *rrnH* Operons, obwohl die UAS-Region des zuletzt genannten Operons eine deutlich stärkere Krümmung

aufweist (Hillebrand *et al.*, 2005). Daher sind auch die Flexibilität der DNA sowie die angulare Orientierung der Krümmung für eine hohe Affinität von H-NS von Bedeutung.

Mit synthetischen Promotorkonstrukten konnte gezeigt werden, daß H-NS eine höhere Affinität für eine planare DNA-Krümmung besitzt als für eine nicht-planare Krümmung (Rimsky *et al.*, 2001). Somit sind für eine hohe DNA-Affinität von H-NS AT-Cluster erforderlich, deren „Phasing“ der Periodizität der DNA-Doppelhelix entspricht, um eine planare DNA-Krümmung zu erzielen (Yamada *et al.*, 1990; Rimsky *et al.*, 2001). Da die intrinsische Krümmung der synthetischen H-NS Bindestelle durch eine Konformationsanalyse bestimmt werden konnte (Gastens, 1999) und sie aufgrund von 5 Basenpaaren Abstand zwischen den einzelnen AT-Clustern eine planare Krümmung aufweist, ist die Voraussetzung für eine spezifische H-NS-Bindung gegeben.

Retardierungsanalysen zeigten, daß bei einer Konzentration von 8 μM HNS alle P2- und P1-Konstrukte vollständig in einem Komplex mit H-NS vorliegen und das sich die Bindekonstante im gleichen Bereich (4 μM) befindet. Es handelt sich hierbei um spezifische Komplexe, da die Komplexbildung in Anwesenheit des Kompetitors Heparin erfolgte und weil unter den gleichen Bedingungen mit den UAS-freien Kontrollfragmenten keine Komplexbildung erkennbar war (Daten nicht gezeigt). Die spezifischen H-NS-Komplexe weisen eine deutliche Verzögerung gegenüber den freien Fragmenten auf. Aufgrund der fehlenden Zwischenstufen erfolgt die Bindung von H-NS an die P2- und P1-Konstrukte offensichtlich kooperativ.

Welche Proteinzusammensetzung die H-NS/DNA-Komplexe besitzen, ist jedoch noch weitestgehend unklar. Es wird angenommen, daß H-NS als Dimer an DNA bindet (Friedrich *et al.*, 1988) und das die Protein-Oligomerisierung sowie die kooperative Besetzung von benachbarten Bindestellen eine Rolle spielen (Spurio *et al.*, 1997). Aber aufgrund der hohen kooperativen Besetzung der DNA ist der genaue Oligomerisierungszustand von H-NS nicht bekannt.

Es ist sehr schwierig, die Sequenzabschnitte von H-NS Bindestellen genau zu bestimmen. Berechnete Werte für die Stöchiometrie der H-NS-Bindung an DNA variieren von 1 Dimer pro 12 BP bis 1 Dimer pro 160 BP (Ussery *et al.*, 1994). Die Charakterisierung von H-NS Bindestellen mittels „footprint“-Analysen ist aus verschiedenen Gründen erschwert. Zum einen ist bekannt, daß H-NS die Krümmung der Ziel-DNA verändern und auch Krümmungen in nicht-gekrümmte DNA induzieren kann (Spurio *et al.*, 1997; Afflerbach *et al.*, 1999). Zum anderen kommt es in vielen Fällen zu einer vollständigen Besetzung der DNA, da die Bindung von H-NS an gekrümmte DNA-Regionen als Initiationschritt für eine Polymerisation entlang der DNA dienen kann. Dabei sind vermutlich auch unspezifische H-NS/DNA-Wechselwirkungen beteiligt. DNase I-„footprint“-Analysen von H-NS mit einem P2- sowie P1-Phasingkonstrukt ergaben auch hier keine eindeutig eingrenzenden Bindestellen, sondern Proteinkonzentrationsabhängig eine vollständige Besetzung der DNA mit H-NS-Molekülen.

Esposito *et al.* (2002) schlagen ein Modell für die Oligomerisierung von H-NS vor, die zu einer solchen Polymerisation von H-NS entlang der DNA führen könnte. Nach diesem Modell bildet H-NS höhere Oligomere durch eine "head-to-tail"-Verknüpfung von H-NS-Dimeren (Abb. 3.3).

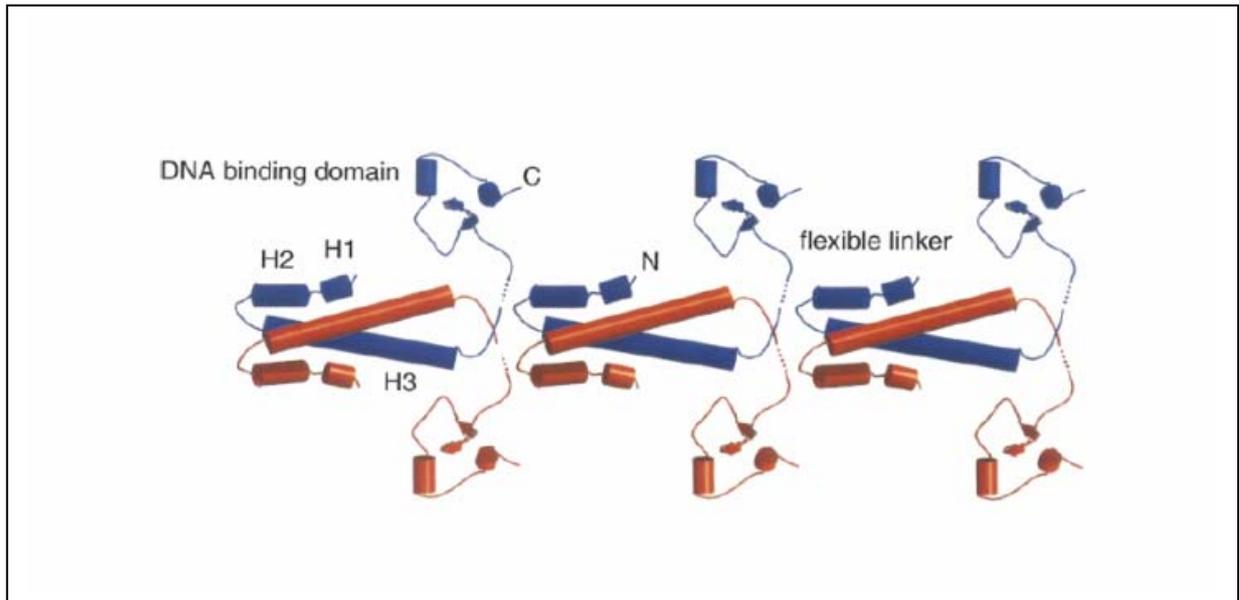


Abb. 3.3: Modell der H-NS-Oligomerisierung. Die N-terminalen Regionen zweier H-NS-Monomere assoziieren durch eine „coiled-coil“-Wechselwirkung zu einem Dimer. Die C-terminalen Reste dieser dimeren Oligomerisierungsdomäne gehen Wechselwirkungen mit N-terminalen Resten einer zweiten dimeren Oligomerisierungsdomäne ein und bilden dadurch ein Proteinfilament.

Die beiden C-terminalen DNA-Bindungsdomänen eines H-NS-Dimers liegen bei dieser Anordnung auf gegenüberliegenden Seiten des Proteinfilamentes und können eine Wechselwirkung mit DNA eingehen. Durch dieses Modell kann einerseits die Polymerisation von H-NS entlang eines DNA-Stranges und andererseits auch das von Dame *et al.* (2002) in AFM-Analysen beobachtete Verbinden zweier DNA-Stränge durch H-NS-Moleküle erklärt werden.

Die reprimierende Wirkung von H-NS auf die Transkription konnte bereits an mehreren Systemen verfolgt werden (*proU*, *hns*, *rrnB* P1; Owen-Hughes, 1992; Ueguchi *et al.*, 1993; Tippner *et al.*, 1994). Jedoch weist H-NS bei einigen Operons auch aktivierende Regulatoreigenschaften auf (Yamada *et al.*, 1991; Bertin *et al.*, 1994). Es gibt jedoch keinen eindeutigen Beweis, daß H-NS direkt als ein Transkriptionsaktivator wirken kann wie andere Nukleoid-assoziierte Proteine, z.B. FIS (Dorman *et al.*, 2004).

Für die Funktion von H-NS als Transkriptionsrepressor wurden verschiedene Mechanismen vorgeschlagen. Ein Vorschlag ist die Regulation von Promotoren durch eine H-NS-vermittelte Veränderung der Superhelikalität, die dann wiederum

die Transkription von Superhelikalität-abhängigen Promotoren beeinflusst (Mojica und Higgins, 1997). Eine weitere Alternative ist die Promotorregulation durch spezifische Bindung an eine gekrümmte DNA-Region, gefolgt von der Polymerisation entlang der DNA durch unspezifische DNA-Bindung und Protein-Oligomerisierung (Williams *et al.*, 1996). Weitere Studien zeigen, daß H-NS auch einen Effekt auf die Transkription ausüben kann, indem es die Bildung eines offenen RNA-Polymerase/Promotor-Komplexes inhibiert (Spassky *et al.*, 1984) oder die Freisetzung der RNA-Polymerase vom Promotor verhindert (Schröder *et al.*, 2000). Einen weiteren Mechanismus stellt die Veränderung der DNA-Konformation durch H-NS-Bindung dar (Tippner *et al.*, 1994; Afflerbach *et al.*, 1999).

H-NS kann auch als „Sensor“ der DNA-Konformation fungieren, welche wiederum von verschiedenen externen Parametern, wie z. B. Temperatur oder Osmolarität, abhängig ist. Somit kann eine H-NS-vermittelte Repression nicht nur durch einen antagonistisch wirkenden Transkriptionsfaktor aufgelöst werden, sondern auch durch Änderungen der Temperatur oder Osmolarität. Eine Erhöhung der Temperatur oder Osmolarität bewirkt eine Reduktion der DNA-Krümmung, was zu einer verschlechterten H-NS-Bindung führt (Dorman *et al.*, 2004). Somit besitzt H-NS die besondere Fähigkeit die Expression von Genen in Abhängigkeit von der Temperatur und anderen Umwelteinflüssen zu regulieren. Viele Beispiele für eine H-NS-vermittelte Thermoregulation sind bekannt, wie z. B. bei der Expression von Virulenzgenen (Porter und Dorman, 1994; Falconi *et al.*, 1998; Prosseda *et al.*, 2004).

Daher gibt es keinen universellen Mechanismus für eine H-NS-vermittelte Regulation von Promotoren, sondern H-NS kann seine Funktion als Transkriptionsregulator auf verschiedene Weisen ausüben. In allen Fällen ist bei der Regulation eine H-NS-vermittelte DNA-Strukturänderung beteiligt.

Der in seinem natürlichen Kontext H-NS-unabhängige *rrnB* P2 Promotor wird durch die Klonierung synthetischer H-NS Bindestellen zu einem durch H-NS regulierbaren Promotor. Abstand und Orientierung der H-NS Bindestelle haben keinen großen Einfluß, da der P2 Promotor bei allen Phasingkonstrukten annähernd gleich stark durch H-NS reprimiert wird. Ebenso ist die Inhibierung des P1 Promotors bei den P1-Phasingkonstrukten von Abstand und Orientierung des gebundenen H-NS unabhängig.

Der zugrundeliegende Mechanismus der Repression beider Promotoren bei den Phasingkonstrukten beruht wahrscheinlich auf einer Verdrängung der RNA-Polymerase durch H-NS-Polymerisation von der gekrümmten upstream-Region in den Promotorbereich hinein, da die „footprint“-Analysen eine vollständige Besetzung der DNA zeigten. Für diesen Mechanismus der H-NS-Repression scheinen angulare Orientierung und Abstand der Ausgangsbindestelle unwichtig zu sein. Rimsky *et al.* (2004) zeigten mit modifiziertem H-NS, daß bei dem vorliegenden Mechanismus die Fähigkeit von H-NS zur Oligomerisierung notwendig ist.

Andererseits ist eine vollständige Besetzung der DNA auch beim „trapping“-Mechanismus im Fall des natürlichen *rrnB* P1 Promotors zu finden. H-NS verhindert dabei nicht die Bindung der RNA-Polymerase und auch nicht die Bildung eines offenen RNA-Polymerase/Promotor-Komplexes. Vielmehr wird die RNA-Polymerase durch das Verbinden der DNA-Regionen upstream und downstream des P1 Promotors über H-NS-Moleküle festgehalten. Ein derartiges „trapping“ der RNA-Polymerase könnte daher auch im Fall der *rrnB* P2 und *rrnB* P1 Promotoren bei den Phasingkonstrukten zur H-NS-vermittelten Repression führen.

3.4 Der Einfluß von LRP auf die Aktivität der Promotoren *rrnB* P2 und *rrnB* P1

Für den Transkriptionsfaktor LRP konnte mittels Retardierungsanalysen eine spezifische Bindung an die natürliche UAS-Region des *rrnB* P1 Promotors festgestellt werden. Ob LRP als Dimer, Oktamer oder Hexadekamer im Komplex mit dem P1-Fragment vorliegt, ist unklar. Frühere Untersuchungen zeigen, daß LRP bei mikromolaren Konzentrationen als Dimer in Lösung existiert (Cui *et al.*, 1996). Heute wird jedoch angenommen, daß LRP bei mikromolaren Konzentrationen als Hexadekamer und Oktamer vorliegt und nur im nanomolaren Konzentrationsbereich als Dimer (Chen *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2005).

Abhängig von dem kontrollierten Operon kann die Aktivität des Transkriptionsfaktors LRP Effektor-unabhängig erfolgen oder aber durch die Bindung der Aminosäure L-Leucin positiv oder negativ moduliert werden. *In vitro* kann Leucin zwei Effekte auf die DNA-Bindung von LRP haben. Zum einen reduziert Leucin die Affinität von LRP für eine spezifische DNA-Bindestelle und zum anderen erhöht es die Kooperativität der LRP-Bindung zu mehreren Bindestellen. Zusätzlich fördert Leucin die Dissoziation von LRP-Hexadekameren zu Leucin-gebundenen Oktameren. Leucin-Titrations zeigten, daß ein Leucin pro Oktamer gebunden ist (Chen *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2005). Die hier durchgeführten Retardierungsanalysen mit LRP und dem P1-Fragment präsentieren ebenfalls eine stark reduzierte DNA-Bindung von LRP in Gegenwart von Leucin. Der große Einfluß von Leucin auf die LRP-Bindung könnte in diesem Fall dadurch erklärt werden, daß LRP nur eine geringe Affinität zu seinen Bindestellen im P1-Fragment besitzt, wie es von Ernsting *et al.* (1993) allgemein vorgeschlagen wird. Diese Annahme wird zusätzlich durch den Distamycin-Versuch gestützt, da in Gegenwart von geringen Distamycin-Konzentrationen die LRP-Bindung an das P1-Fragment stark reduziert wird. Leucin könnte aber auch die Konformation von LRP verändern, wodurch zwei verschiedene LRP-Formen vorliegen würden. So könnten Leucin-unempfindliche Promotoren von beiden LRP-Formen gebunden werden, wohingegen Leucin-empfindliche Promotoren zwischen beiden LRP-Formen unterscheiden würden (Newman und Lin, 1995).

Der *rrnB* P1 Promotor wäre demnach ein Leucin-empfindlicher Promotor, der nur mit einer LRP-Form eine Wechselwirkung eingehen kann.

In vitro Transkriptionsanalysen ergaben, daß LRP als Repressor auf die Transkription des *rrnB* P1 Promotors wirkt. Wenn LRP in Abwesenheit von Leucin als Repressor wirkt, so bleibt LRP auch ein Repressor in Gegenwart von Leucin. Dies konnte auch für den *rrnB* P1 Promotor bestätigt werden (Pul, 2004). Jedoch konnte durch Leucin-Zugabe der inhibitorische Effekt von LRP auf die P1-Transkription verringert werden, was auf eine verschlechterte LRP-Bindung an das P1-Fragment zurückzuführen ist. Ebenso wirkt Leucin der Repression des *sdaA* Operons durch LRP entgegen (Lin *et al.*, 1990). Jedoch gibt es auch Operons, wie z. B. das *livJ* Operon, bei denen Leucin für die LRP-vermittelte Inhibierung essentiell ist (Haney *et al.*, 1992).

Eine wichtige Funktion von LRP ist, daß es eine starke Biegung der DNA induzieren kann. Wahrscheinlich ruft LRP ein „looping“ der DNA oder ein „wrapping“ der DNA um LRP-Moleküle hervor. Dies liegt offenbar auch im Fall des P1-Phasingkonstruktes pBK1A/P1 vor, da hypersensitive Positionen beim DNase-„footprint“ im Promotorbereich auftreten. Durch eine LRP-induzierte Biegung der DNA erfährt die Helix-Seite, die der LRP Bindestelle gegenüberliegt, eine erhöhte Exposition gegenüber der DNase I. Die Veränderungen im Spaltungsmuster mit und ohne LRP im P1 Promotorbereich (hauptsächlich in der -35 Region) lassen auf eine Überlappung der LRP Bindestelle mit dem Kernpromotor schließen. Dieses Ergebnis wurde mit DNase I-„footprints“ des P1-Fragmentes und LRP bestätigt (Wurm, persönliche Mitteilung).

Aufgrund der Tatsache, daß LRP direkt im P1 Promotorbereich bindet, läßt sich eine Transkriptionsinhibierung durch eine direkte Wechselwirkung von LRP mit der RNA-Polymerase vermuten. Dieser Repressionsmechanismus wird ebenfalls für das *dadAX* und das *pap* Operon angenommen, da bei beiden Operons die LRP Bindestellen mit dem Promotorbereich überlappen (Zhi *et al.*, 1999).

Supershift-Retardierungsanalysen des P1-Fragmentes mit RNA-Polymerase und LRP bestätigen den inhibierenden Effekt von LRP, da LRP die RNA-Polymerase konzentrationsabhängig vom P1 Promotor verdrängt. Der Supershift ist aber auch ein Beleg für eine gleichzeitige Bindung von LRP und RNA-Polymerase. Daher könnte ein komplexerer Mechanismus vorliegen als eine konzentrationsabhängige Verdrängung aufgrund einer Konkurrenz um die gleiche Bindestelle.

Ein weiterer Mechanismus der LRP-vermittelten Repression oder auch Aktivierung stellt die Loop-Bildung dar (Zhi *et al.*, 1999), wodurch Wechselwirkungen von upstream liegenden LRP-Molekülen mit der RNA-Polymerase ermöglicht werden.

Die genauen Mechanismen, wie LRP die Genexpression kontrolliert, sind bislang nicht geklärt und sie können für verschiedene Operons unterschiedlich sein.

Durch eine Phasinganalyse einer synthetischen upstream-Region wurde überprüft, ob angulare Orientierung und Abstand für eine LRP-vermittelte Regulation der Promotoren *rrnB* P1 und *rrnB* P2 von entscheidender Bedeutung sind. *In vitro* Transkriptionen mit den P1-Phasingkonstrukten ergaben eine ähnlich hohe

Inhibierung des P1 Promotors durch LRP wie beim UAS-freien P1-System. Dies ist auf die bereits erwähnte LRP-Bindung im P1 Promotorbereich zurückzuführen, wodurch ein möglicher „Phasing“-Effekt überdeckt wird. Jedoch zeigte sich bei den P2-Phasingkonstrukten, daß die Inhibierung der P2 Promotoraktivität von der angularen Orientierung des gebundenen LRPs abhängig ist. Die Konstrukte, bei denen das Zentrum der synthetischen upstream-Region um vollständige Helixwindungen zum Transkriptionsstart +1 entfernt liegt (Konstrukte 2 und 5), zeigen die stärkste Inhibierung durch LRP. Da diese beiden P2-Konstrukte die gekrümmte upstream-Region in der gleichen Orientierung um eine Helixwindung verschoben besitzen, scheint der Abstand gegenüber der Orientierung weniger bedeutend zu sein. LRP hat einen stärkeren inhibitorischen Effekt, wenn die upstream-Region um geradzahlige Helixwindungen zum Transkriptionsstart verschoben ist. Somit ist die faktorabhängige Inhibierung des *rrnB* P2 Promotors durch LRP „phase of the helix“ abhängig. Diese Phasing-Abhängigkeit ist ein Hinweis für eine LRP-Repression durch eine direkte Wechselwirkung von LRP und RNA-Polymerase mittels Loop-Bildung. Bei diesem Mechanismus ist die Orientierung der gebundenen LRP-Moleküle entscheidend für die Ausbildung einer stabilen Loop-Struktur.

Eine Abhängigkeit von der angularen Orientierung konnte ebenfalls für die LRP-vermittelte Aktivierung des *gltBDF* Operons nachgewiesen werden. Für eine effiziente Aktivierung müssen auch hier die LRP Bindestellen mit dem Transkriptionsstart in Phase sein.

Aus diesen Ergebnissen läßt sich ableiten, daß der in seinem natürlichen Kontext LRP-unabhängige *rrnB* P2 Promotor durch die Klonierung einer upstream-liegenden LRP Bindestelle durch LRP negativ reguliert werden kann. Die Stärke der Regulation ist dabei von der Orientierung der LRP Bindestelle abhängig.

3.5 Der Einfluß von FIS auf die Aktivität der Promotoren *rrnB* P2 und *rrnB* P1

Alle *E. coli* rRNA Operons werden *in vivo* wachstumsratenabhängig durch FIS aktiviert. Die ribosomalen P1 Promotoren sind während der exponentiellen Wachstumsphase die stärkeren Promotoren, da FIS die Transkription der P1 Promotoren 3-8 fach aktiviert, indem es die Bindung der RNA-Polymerase am Promotor fördert und die offene Komplexbildung beschleunigt (Zacharias *et al.*, 1991, 1992; Hirvonen *et al.*, 2002; Paul *et al.*, 2004). Vorgeschlagen wurde auch, daß FIS durch Bindung einen linkshändigen superhelikalen „Loop“ verursacht, das wiederum das linkshändige „wrapping“ der UAS-Region um den RNA-Polymerase/Promotor-Komplex und die Bildung eines offenen Komplexes fördert. Somit wirkt FIS wie negative Superhelikalität aktivierend auf Promotoren, indem es das Aufschmelzen der DNA beschleunigt (Travers und Muskhelishvili, 2005).

Unter den in dieser Arbeit vorliegenden *in vitro* Transkriptionsbedingungen konnte jedoch keine aktivierende Funktion von FIS auf die *rrnB* P1 Promotoraktivität

nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Vielmehr wurde eine inhibierende Wirkung von FIS gefunden. Dieser Widerspruch kann dadurch erklärt werden, daß FIS die Wechselwirkung der RNA-Polymerase mit dem *rrnB* P1 Promotor nur in Abwesenheit von Startnukleotiden stabilisieren und somit zu einer Transkriptionsaktivierung führen kann (Zhi *et al.*, 2003). Bei den hier durchgeführten Transkriptionsanalysen wurden die offenen Komplexe bereits vor FIS-Zugabe durch Startnukleotide stabilisiert. Es wurde ebenfalls beschrieben, daß FIS die Transkription des *rrnB* P1 Promotors bei hohen Salzkonzentrationen (> 100 mM NaCl) aktiviert, aber keinen Effekt auf die Promotoraktivität bei niedrigen Salzkonzentrationen ausübt. Dies ist auf eine instabilere RNA-Polymerase-Interaktion mit dem P1 Promotor bei hohen Salzkonzentrationen zurückzuführen (Ross *et al.*, 1990). Somit kann FIS in diesem Fall wahrscheinlich nur aktivierend wirken, wenn die RNA-Polymerase/Promotor-Komplexe nicht sehr stabil sind. Eine weitere Möglichkeit, warum FIS keine Aktivierung des *rrnB* P1 Promotors hervorruft, könnte die Verwendung von linearen Fragmenten als Templates sein. Demnach würde FIS zirkuläre DNA benötigen, um durch eine Veränderung der Superhelikalität einen aktivierenden Effekt auf die P1-Transkription zu haben. Dagegen spricht jedoch, daß FIS in der Lage sein soll „microloops“ zu erzeugen. Supershift-Retardierungsanalysen des P1-Fragmentes mit RNA-Polymerase und FIS bestätigen die in den Transkriptionsanalysen gefundene Inhibierung durch FIS, da FIS die RNA-Polymerase *in vitro* konzentrationsabhängig vom P1 Promotor verdrängt. Auch hier waren die RNA-Polymerase/Promotor-Komplexe bereits vor FIS-Zugabe durch Startnukleotide stabilisiert.

Die ribosomalen P2 Promotoren sind unter Nährstoffmangel oder bei niedrigen Wachstumsraten fast vollständig für die rRNA-Synthese verantwortlich, da sie weniger stark als die P1 Promotoren inhibiert werden (Liebig und Wagner, 1995; Paul *et al.*, 2004). Daher sind die ribosomalen P1 Promotoren für die großen Mengen rRNA während des schnellen Wachstums verantwortlich, während die P2 Promotoren hauptsächlich für die rRNA Expression bei niedrigen Wachstumsraten zuständig sind (Murray *et al.*, 2003). *In vivo* Analysen mit einer FIS-defizienten Stamm zeigten, daß die *rrnB* P2 Promotoraktivität in der Mutante ansteigt (Murray *et al.*, 2003). Bisher wurde angenommen, daß kein Proteinfaktor für die direkte negative Kontrolle des *rrnB* P2 Promotors verantwortlich ist, sondern daß ein indirekter Effekt vorliegt, da die FIS-vermittelte Aktivierung des *rrnB* P1 Promotors fehlt. Mittels Retardierungs- und „footprint“-Analysen konnte jedoch in dieser Arbeit nachgewiesen werden, daß FIS einen direkten Einfluß auf die P2 Promotoraktivität ausübt, indem es direkt im P2 Kernpromotor bindet und diesen dadurch für die RNA-Polymerase unzugänglich macht.

Somit führt eine Veränderung der FIS-Konzentration zu einem unterschiedlichen Beitrag der beiden ribosomalen Promotoren zur rRNA-Synthese. In der exponentiellen Wachstumsphase, wo hohe FIS-Konzentrationen vorliegen, vermittelt FIS durch Aktivierung des *rrnB* P1 Promotors und gleichzeitige Repression des *rrnB* P2 Promotors hohe rRNA-Syntheseraten durch den P1 Promotor. In der stationären Wachstumsphase sinkt die FIS-Konzentration und die

H-NS-Konzentration erreicht ihr Maximum. Die FIS-vermittelte Repression des *rrnB* P2 Promotors wird daher aufgehoben und es kommt zu einer basalen rRNA-Synthese durch den P2 Promotor. Der P1 Promotor hingegen wird durch H-NS reprimiert.

Jedoch könnte die Bindung von FIS im P2 Promotor die durch FIS aktivierte rRNA-Transkription des P1 Promotors stören, da die vom P1 gestartete RNA-Polymerase durch FIS-Moleküle am P2 Promotor blockiert werden würde. Vielleicht hat die FIS-Bindung am P2 aber auch keinen nachteiligen Effekt auf die P1-Transkription. Es besteht die Möglichkeit, daß es zu einer Loop-Bildung kommt, indem am P2 gebundene FIS-Moleküle eine direkte Wechselwirkung mit FIS-Molekülen eingehen, die in der upstream-Region des P1 Promotors gebunden sind.

3.6 Das Zusammenspiel der Transkriptionsfaktoren H-NS, LRP und FIS bei der Regulation der ribosomalen Promotoren

Bislang ist unbekannt, warum es diese hochkonservierten Tandempromotoren P1 und P2 bei den ribosomalen Operons gibt. Die ribosomalen Promotoren P1 und P2 des *rrnB* Operons werden unterschiedlich von den Transkriptionsfaktoren H-NS, LRP sowie FIS in ihrer Aktivität beeinflußt.

H-NS und LRP üben in der stationären Wachstumsphase eine inhibierende Wirkung auf den *rrnB* P1 Promotor aus, während der *rrnB* P2 Promotor in seiner natürlichen Umgebung aufgrund fehlender Bindestellen unabhängig bleibt. Werden jedoch Bindestellen für beide Faktoren upstream des *rrnB* P2 Promotors kloniert, so wird auch dieser negativ durch H-NS und LRP reguliert. FIS übt wahrscheinlich einen gegensätzlichen Effekt auf beide Promotoren aus. Es aktiviert die Transkription vom P1 Promotor in der exponentiellen Wachstumsphase durch Bindung an upstream liegenden Bindestellen und reprimiert diejenige vom P2 Promotor durch Verdrängung der RNA-Polymerase, aufgrund überlappender Bindestellen. Jedoch bleibt die Frage offen, welche Bedeutung die FIS-Bindestelle im P2 Promotor hat. Es wäre unlogisch, wenn bei gleicher FIS-Konzentration der eine Promotor aktiviert und der andere reprimiert werden würde.

Es ist bekannt, daß viele Transkriptionsfaktoren Heteromere mit anderen regulatorischen Proteinen bilden können. Das Problem bei Retardierungsanalysen von DNA-Fragmenten mit zwei oder mehreren Proteinen ist, daß die Zusammensetzung der Komplexe nicht einfach abgeleitet werden kann. Es können sowohl Komplexe vorliegen, bei denen zwei Proteine als Homodimer an DNA gebunden sind, als auch Komplexe mit gebundenen Heterodimeren aus beiden Proteinen. Hier konnte gezeigt werden, daß H-NS und LRP gleichzeitig an das P1-Fragment binden können, da ein Komplex entsteht, der weiter nach oben shiftet, als die Komplexe mit nur einem dieser beiden Proteinfaktoren. Bei diesem Supershift-Komplex können beide Proteine als Homomere vorliegen oder aber

auch Heteromere gebildet haben. In unserer Arbeitsgruppe konnten kürzlich deutliche Belege für eine H-NS/LRP-Heteromerenbildung gefunden werden (Pul und Wurm, persönliche Mitteilung).

Für H-NS wurden bereits direkte Wechselwirkungen mit einigen regulatorischen Proteinen nachgewiesen, z. B. mit Hfq und StpA. Sie besteht wahrscheinlich auch mit der RNA-Polymerase und FIS (Liu und Richardson, 1993; Muffler *et al.*, 1996; Williams *et al.*, 1996; Noguiera und Springer, 2000; Johansson *et al.*, 2001). Neuere Untersuchungen zeigen, daß H-NS mit Proteinen aus der Hha/YmoA Familie Wechselwirkungen eingehen kann. Ein Hha/H-NS-Komplex scheint für die Modulation der Expression des Toxins α -Haemolysin verantwortlich zu sein (Paytubi *et al.*, 2004).

Auch bei der Regulation der ribosomalen Operons kann es zur Bildung von heteromeren Proteinkomplexen kommen. Heterodimere könnten eine andere Funktion ausüben und mit andern Ziel-Sequenzen interagieren als die jeweiligen homodimeren Proteine. Die vorübergehende Bildung heteromerer Proteinkomplexe könnte ebenfalls den Übergang zwischen Aktivierung und Repression fördern, wie es für die Regulation des *rrnB* Operons durch die antagonistisch wirkenden Transkriptionsfaktoren FIS und H-NS angenommen wird (Afflerbach *et al.*, 1999).

Eine weitere Möglichkeit ist, daß eine durch Homodimerisierung oder Heterodimerisierung verursachte Änderung des „Bendings“ die Wechselwirkungen für die Genregulation vergrößern könnte. So wird z. B. bei den eukaryotischen Transkriptionsfaktoren FOS und JUN in Abhängigkeit von der Untereinheiten-Zusammensetzung nicht nur die Stärke des „DNA-Bendings“ verändert, sondern auch die Orientierung. Denn durch die Bindung von JUN-JUN-Homodimeren wird die DNA in eine andere Richtung gebogen als durch FOS-JUN-Heterodimere (Kerppola und Curran, 1991).

Da sich die Zusammensetzung des „Pools“ von Nukleoid-assoziierten Proteinen in Abhängigkeit von der Wachstumsphase ändert, könnte ein Wechsel von homo- und heteromeren Transkriptionsfaktoren einen Mechanismus für eine funktionelle Modulation repräsentieren und die Vielfalt an Regulationsmöglichkeiten erhöhen.

4 Material

4.1 Allgemeines

Alle verwendeten Chemikalien besaßen, soweit nicht anders vermerkt, den Reinheitsgrad „pro analysis“. Zum Ansetzen der Lösungen wurde hochreines Milli-Q-Wasser (Hausanlage mit nachgeschaltetem „water purification system EPA Est. 41237-MA-1“, Millipore GmbH, Neu Isenburg) verwendet, nachfolgend als „*Aqua dest.*“ bezeichnet, welches in regelmäßigen Abständen bezüglich pH-Wert und Konduktivität überprüft wurde.

Das während der Arbeit verwendete TE-gesättigte Phenol (Roth, Karlsruhe) wurde vor der Benutzung auf 0.1% 8-Hydroxychinolin eingestellt (Maniatis *et al.*, 1982).

4.2 Bakterienstämme und Plasmide

4.2.1 *E. coli* Stamm

Stamm	Genotyp	Referenz
HB 101	F ⁻ , <i>pro</i> A2, <i>rec</i> A13, <i>ara</i> -14, <i>lac</i> Y1, <i>gal</i> K2, <i>xyl</i> -5, <i>mtl</i> -1, <i>rps</i> L20 (Str ^r), <i>sup</i> E44, <i>hsd</i> S20 (r ⁻ _{BM} ⁻ _B), λ ⁻	Boyer & Roulland-Dussoix (1969)

4.2.2 Plasmide

pUC18	<i>E. coli</i> Klonierungsvektor mit <i>ori</i> und Ampicillin-Resistenzgen aus pBR322 (Vieira und Messing, 1982; Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985)
pBK-P2	Derivat des Plasmides pUC18, trägt P2-Promotor des <i>rrnB</i> Operons in der aufgefüllten <i>Hind</i> III Schnittstelle der MCS des pUC18 (Diplomarbeit Bianca Komp)
pBK1A/P2	Derivat des Plasmides pBK-P2, trägt synthetische tetramere H-NS-Bindedomäne in der mit einer Nuklease verdauten <i>Sph</i> I Schnittstelle der MCS des pUC18 (Diplomarbeit Bianca Komp)
pBK2A/P2	Derivat des Plasmides pBK-P2, trägt synthetische tetramere H-NS-Bindedomäne in der mit einer Nuklease verdauten <i>Pst</i> I Schnittstelle der MCS des pUC18 in identischer Orientierung wie pBK1A/P2 (Diplomarbeit Bianca Komp)

pBK3A/P2	Derivat des Plasmides pBK-P2, trägt synthetische tetramere H-NS-Bindedomäne in der mit einer Nuklease verdauten <i>SaII</i> Schnittstelle der MCS des pUC18 in identischer Orientierung wie pBK1A/P2 (Diplomarbeit Bianca Komp)
pBK4A/P2	Derivat des Plasmides pBK-P2, trägt synthetische tetramere H-NS-Bindedomäne in der <i>HincII</i> Schnittstelle der MCS des pUC18 in identischer Orientierung wie pBK1A/P2 (Diplomarbeit Bianca Komp)
pBK5A/P2	Derivat des Plasmides pBK-P2, trägt synthetische tetramere H-NS-Bindedomäne in der aufgefüllten <i>SaII</i> Schnittstelle der MCS des pUC18 in identischer Orientierung wie pBK1A/P2 (Diplomarbeit Bianca Komp)
pBK6A/P2	Derivat des Plasmides pBK-P2, trägt synthetische tetramere H-NS-Bindedomäne in der mit einer Nuklease verdauten <i>XbaI</i> Schnittstelle der MCS des pUC18 in identischer Orientierung wie pBK1A/P2 (Diplomarbeit Bianca Komp)
pBK-P1	Derivat des Plasmides pUC18, trägt P1-Promotor des <i>rrnB</i> Operons in der aufgefüllten <i>HindIII</i> Schnittstelle der MCS des pUC18 (diese Arbeit)
pBK1A/P1	Derivat des Plasmides pBK-P1, trägt synthetische tetramere H-NS-Bindedomäne in der mit einer Nuklease verdauten <i>SphI</i> Schnittstelle der MCS des pUC18 (diese Arbeit)
pBK2A/P1	Derivat des Plasmides pBK-P1, trägt synthetische tetramere H-NS-Bindedomäne in der mit einer Nuklease verdauten <i>PstI</i> Schnittstelle der MCS des pUC18 in identischer Orientierung wie pBK1A/P1 (diese Arbeit)
pBK3A/P1	Derivat des Plasmides pBK-P1, trägt synthetische tetramere H-NS-Bindedomäne in der mit einer Nuklease verdauten <i>SaII</i> Schnittstelle der MCS des pUC18 in identischer Orientierung wie pBK1A/P1 (diese Arbeit)
pBK4A/P1	Derivat des Plasmides pBK-P1, trägt synthetische tetramere H-NS-Bindedomäne in der <i>HincII</i> Schnittstelle der MCS des pUC18 in identischer Orientierung wie pBK1A/P1 (diese Arbeit)

pBK5A/P1	Derivat des Plasmides pBK-P1, trägt synthetische tetramere H-NS-Bindedomäne in der aufgefüllten <i>Sa</i> I Schnittstelle der MCS des pUC18 in identischer Orientierung wie pBK1A/P1 (diese Arbeit)
pUC18-1	Derivat des Plasmides pUC18, trägt das P1-Fragment des <i>rrnB</i> Operons aus pKK3535 (<i>Ssp</i> I/ <i>Dde</i> I, 235 BP) in der <i>Sma</i> I Schnittstelle des pUC18 (Zacharias <i>et al.</i> , 1992)

4.3 DNA-Fragmente

P1-Promotor	hergestellt durch Hybridisierung der Desoxyoligonukleotide P1-1 und P1-2, Länge 44 BP
MG4A-A	hergestellt durch <i>Sma</i> I/ <i>Eco</i> RI Restriktion des Plasmides pMG4A, Länge 141 BP, trägt synthetische tetramere H-NS-Bindedomäne (Tetramer), freundliche Gabe von M. Gastens
Tetramer	hergestellt durch <i>Hin</i> fI Restriktion von MG4A-A und anschließender Behandlung mit Mung-Bean-Nuklease, Länge 92 BP
BK-P2R	hergestellt durch <i>Pvu</i> II/ <i>Xma</i> I Restriktion von pBK-P2, Länge 180 BP (Kontrollfragment für Retardierungsanalysen)
BK1A-R/P2	hergestellt durch <i>Pvu</i> II/ <i>Xma</i> I Restriktion von pBK1A/P2, Länge 264 BP
BK2A-R/P2	hergestellt durch <i>Pvu</i> II/ <i>Xma</i> I Restriktion von pBK2A/P2, Länge 266 BP
BK3A-R/P2	hergestellt durch <i>Pvu</i> II/ <i>Xma</i> I Restriktion von pBK3A/P2, Länge 266 BP
BK4A-R/P2	hergestellt durch <i>Pvu</i> II/ <i>Xma</i> I Restriktion von pBK4A/P2, Länge 270 BP
BK5A-R/P2	hergestellt durch <i>Pvu</i> II/ <i>Xma</i> I Restriktion von pBK5A/P2, Länge 274 BP
BK6A-R/P2	hergestellt durch <i>Pvu</i> II/ <i>Xma</i> I Restriktion von pBK6A/P2, Länge 266 BP

BK-P2T	hergestellt durch <i>PvuII/SmaI</i> Restriktion von pBK-P2, Länge 178 BP (Kontrollfragment für <i>in vitro</i> Transkriptionsanalysen)
BK1A-T/P2	hergestellt durch <i>PvuII/SmaI</i> Restriktion von pBK1A/P2, Länge 262 BP
BK2A-T/P2	hergestellt durch <i>PvuII/SmaI</i> Restriktion von pBK2A/P2, Länge 264 BP
BK3A-T/P2	hergestellt durch <i>PvuII/SmaI</i> Restriktion von pBK3A/P2, Länge 264 BP
BK4A-T/P2	hergestellt durch <i>PvuII/SmaI</i> Restriktion von pBK4A/P2, Länge 268 BP
BK5A-T/P2	hergestellt durch <i>PvuII/SmaI</i> Restriktion von pBK5A/P2, Länge 272 BP
BK6A-T/P2	hergestellt durch <i>PvuII/SmaI</i> Restriktion von pBK6A/P2, Länge 264 BP
BK-P1R	hergestellt durch <i>PvuII/XmaI</i> Restriktion von pBK-P1, Länge 178 BP (Kontrollfragment für Retardierungsanalysen)
BK1A-R/P1	hergestellt durch <i>PvuII/XmaI</i> Restriktion von pBK1A/P1, Länge 266 BP
BK2A-R/P1	hergestellt durch <i>PvuII/XmaI</i> Restriktion von pBK2A/P1, Länge 266 BP
BK3A-R/P1	hergestellt durch <i>PvuII/XmaI</i> Restriktion von pBK3A/P1, Länge 266 BP
BK4A-R/P1	hergestellt durch <i>PvuII/XmaI</i> Restriktion von pBK4A/P1, Länge 270 BP
BK5A-R/P1	hergestellt durch <i>PvuII/XmaI</i> Restriktion von pBK5A/P1, Länge 274 BP
BK-P1T	hergestellt durch <i>PvuII/SmaI</i> Restriktion von pBK-P1, Länge 176 BP (Kontrollfragment für <i>in vitro</i> Transkriptionsanalysen)

BK1A-T/P1	hergestellt durch <i>PvuII/SmaI</i> Restriktion von pBK1A/P1, Länge 264 BP
BK2A-T/P1	hergestellt durch <i>PvuII/SmaI</i> Restriktion von pBK2A/P1, Länge 264 BP
BK3A-T/P1	hergestellt durch <i>PvuII/SmaI</i> Restriktion von pBK3A/P1, Länge 264 BP
BK4A-T/P1	hergestellt durch <i>PvuII/SmaI</i> Restriktion von pBK4A/P1, Länge 268 BP
BK5A-T/P1	hergestellt durch <i>PvuII/SmaI</i> Restriktion von pBK5A/P1, Länge 272 BP
P1-T-Fragment	hergestellt durch <i>HincII/Ecl136II</i> Restriktion von pUC18-1, Länge 256 BP (Referenz-Template für <i>in vitro</i> Transkriptionsanalysen)
P1-R-Fragment	hergestellt durch <i>EcoRI/BamHI</i> Restriktion von pUC18-1, Länge 256 BP (Fragment für Retardierungsanalysen)

4.4 Nukleinsäuren, Desoxyoligonukleotide und Nukleotide

Nukleinsäuren:

kB-Leiter	Gibco BRL, Eggenstein
Smart Ladder	EUROGENTEC, Belgien
Poly (dl-dC)	Boehringer, Mannheim

Desoxyoligonukleotide:

P1-1	5'-CTTGTCAGGCCGGAATAACTCCCTATAATGCGCCACCAC TGACA-3' komplementär zu P1-2 von Nukleotid 1 bis 44 einschließlich, INTERACTIVA Biotechnologie GmbH, Ulm
P1-2	5'-TGTCAGTGGTGGCGCATTATAGGGAGTTATTCCGGCCT GACAAG-3' komplementär zu P1-1 von Nukleotid 1 bis 44 einschließlich, INTERACTIVA Biotechnologie GmbH, Ulm

USB-Oligo	5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3' komplementär von +40 bis +56 relativ zum P2-Start zum Nicht-Matrizenstrang des Vektors pBK-P2 und seinen Derivaten sowie komplementär von +34 bis +50 relativ zum P1-Start zum Nicht-Matrizenstrang des Vektors pBK-P1 und seinen Derivaten, USB, Cleveland, USA
Oligo pBK/5F	5'-CCTCTAGAGTCGACCTGC-3' komplementär zum Matrizenstrang stromabwärts des P2-Starts des Vektors pBK1A/P2 sowie komplementär zum Matrizenstrang stromabwärts des P1-Starts des Vektors pBK1A/P1, Thermo Electron GmbH, Ulm
Oligo pBK/3	5'-GCCTCTTCGCTATTACGC-3' komplementär zum Nicht-Matrizenstrang stromaufwärts des P2-Starts des Vektors pBK1A/P2 sowie komplementär zum Nicht-Matrizenstrang stromaufwärts des P1-Starts des Vektors pBK1A/P1, Thermo Electron GmbH, Ulm

Nukleotide:

Adenosin-5'-[$\alpha^{32}\text{P}$]-triphosphat	Hartmann, Braunschweig
Adenosin-5'-[$\gamma^{32}\text{P}$]-triphosphat	Hartmann, Braunschweig
Adenosin-5'-triphosphat	Boehringer, Mannheim
2'-Desoxyadenosin-5'-[$\alpha^{32}\text{P}$]-triphosphat	Hartmann, Braunschweig
2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat	Boehringer, Mannheim
Cytidin-5'-triphosphat	Boehringer, Mannheim
2'-Desoxycytidin-5'-[$\alpha^{32}\text{P}$]-triphosphat	Hartmann, Braunschweig
2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat	Boehringer, Mannheim
Guanosin-5'-triphosphat	Boehringer, Mannheim
2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat	Boehringer, Mannheim
2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat	Boehringer, Mannheim
Uridin-5'-[$\alpha^{32}\text{P}$]-triphosphat	Hartmann, Braunschweig
2',3'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat	USB, Cleveland, USA
2',3'-Desoxycytidin-5'-triphosphat	USB, Cleveland, USA
2',3'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat	USB, Cleveland, USA
2',3'-Desoxythymidin-5'-triphosphat	USB, Cleveland, USA

4.5 Proteine

4.5.1 Enzyme und Transkriptionsfaktoren

AMV Reverse Transkriptase	Promega, Madison, USA
DNase I, RNase-frei	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
<i>E. coli</i> RNA-Polymerase	präpariert nach Burgress und Jendrisak (1975), freundliche Gabe von R. Wurm
FIS	freundliche Gabe von R. Wurm
H-NS	freundliche Gabe von R. Wurm
Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I	Promega, Madison, USA
LRP	freundliche Gabe von R. Wurm
Lysozym	Sigma, St. Louis, USA
Mung-Bean-Nuklease	BRL, Eggenstein
Phosphatase, alkalisch (CIP)	Boehringer, Mannheim
Proteinase K	Merck, Darmstadt
Ribonuklease A	Sigma, St. Louis, USA
σ^{70}	freundliche Gabe von M. Heinemann
T4-DNA-Ligase	Boehringer, Mannheim
T7 DNA-Polymerase (Sequenase 2.0)	USB, Cleveland, USA
T4 Polynukleotidkinase	Boehringer, Mannheim

4.5.2 Restriktionsendonukleasen

<i>Bam</i> HI	MBI Fermentas, Vilnius, Litauen
<i>Eco</i> RI	MBI Fermentas, Vilnius, Litauen
<i>Hinc</i> II	NEB, Beverly, USA
<i>Hind</i> III	MBI Fermentas, Vilnius, Litauen
<i>Hinf</i> I	NEB, Beverly, USA
<i>Pst</i> I	NEB, Beverly, USA
<i>Pvu</i> II	MBI Fermentas, Vilnius, Litauen
<i>Rsa</i> I	MBI Fermentas, Vilnius, Litauen
<i>Sal</i> I	NEB, Beverly, USA
<i>Sma</i> I	MBI Fermentas, Vilnius, Litauen
<i>Sph</i> I	NEB, Beverly, USA
<i>Xba</i> I	MBI Fermentas, Vilnius, Litauen
<i>Xma</i> I	NEB, Beverly, USA

4.5.3 Sonstige Proteine

Rinderserumalbumin (BSA) PeqGOLD Protein-Marker	NEB, Beverly, USA peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
--	--

4.6 Puffer und Medien

1x TAE-Puffer:	40 mM Tris-Acetat, pH 7.5 2.5 mM EDTA
1x TBE-Puffer:	89 mM Tris-Borat, pH 8.3 2.5 mM EDTA
TE-Puffer:	10 mM Tris-HCl, pH 8.0 1 mM EDTA
5x TAE-Probenpuffer:	0.05% (w/v) Bromphenolblau 0.05% (w/v) Xylencyanol 50% Glycerin in 5x TAE-Puffer
2x TBE-Probenpuffer:	0.05% (w/v) Bromphenolblau 0.05% (w/v) Xylencyanol 50% Glycerin in 2x TBE-Puffer
Formamid-Probenpuffer:	0.05% (w/v) Bromphenolblau 0.05% (w/v) Xylencyanol 95% (v/v) deionisiertes Formamid 20 mM EDTA, pH 8.0
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

4.7 Feinchemikalien

Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agar	Sigma, St. Louis, USA
Agarose	Biozym, Hameln
Agarose (ultrapur)	Seakem, Hamburg
Amberlite MB-1 (Ionenaustauscher)	ICN Biomedicals, Ohio, USA
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Sigma, St. Louis, USA
Brij 35	Aldrich, Steinheim
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blue R250	Serva, Heidelberg
(3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]- 1-propansulfonat) CHAPS	Sigma, St. Louis, USA
Dichlordimethylsilan	Janssen Chimica, Brüggen
Dithiothreitol (DTT)	Janssen, Beerse, Belgien
Ethidiumbromid	Boehringer, Mannheim
Ethylenbis(oxyethylennitrilo)tetraacetat (EGTA)	Boehringer, Mannheim
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck, Darmstadt
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Formamid	J.T. Baker, Groß-Gerau
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	ICN Biochemicals, Cleveland, USA
Glucose	Merck, Darmstadt
Glykogen	Boehringer, Mannheim
Harnstoff	Sigma, St. Louis, USA
Hefeextrakt	Gibco BRL, Eggenstein
Heparin	Sigma, St. Louis, USA
8-Hydroxychinolin	Janssen, Beerse, Belgien
L-Leucin	Serva, Heidelberg
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
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Merck, Darmstadt
Phenol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Merck, Darmstadt
Polyethylenglykol (PEG ₆₀₀₀)	Sigma, St. Louis, USA
Saccharose	Merck, Darmstadt
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Merck, Darmstadt
Trypton	Difco, Detroit, USA
Xylencyanol	Serva, Heidelberg

4.8 Sonstige Materialien

Chromatographiepapier 3MM	Whatman, England
DE52-Papier	Whatman, England
Dialysemembran VS 0.025 µm	Millipore, Neu Isenburg
MN Faltenfilter	Machery-Nagel, Düren
Phosphoimager Screens	Fuji Photo Film Co. Ltd., Japan
Röntgenfilme RX	Fuji Photo Film Co. Ltd., Japan
Röntgenfilme, X-Omat R	Kodak, New Haven, USA
Röntgen-Rapid-Entwickler, Tetenal	Tetenal Photowerk, Norderstedt
Roentogen liquid	
Röntgenfixierer, Tetenal	Tetenal Photowerk, Norderstedt
Roentogen Superfix	
Sterilfilter FB 030/3 (0.2 µm)	Schleicher & Schüll, Dassel

5 Methoden

5.1 Allgemeine mikrobiologische Methoden

Beim Umgang mit den Bakterienstämmen wurde unter sterilen Bedingungen gearbeitet. Dabei wurde die Vorschrift für das Arbeiten mit GVO's (S1) eingehalten. Der mikrobiologische Abfall wurde vor der Entsorgung rückautoklaviert.

5.1.1 Sterilisation von Lösungen und Glasgeräten

Alle verwendeten temperaturstabilen Lösungen, Puffer und Medien wurden durch Dampfdrucksterilisation (20 min, 120°C, 2-3 bar) autoklaviert. Temperaturinstabile Lösungen wurden mittels einer 0.2 µm Membran (FB 030/3) sterilfiltriert. Glasgeräte wurden für 4 h bei 210°C hitzesterilisiert.

5.1.2 Haltung und Sicherung von Zellstämmen

Alle verwendeten Bakterienstämme wurden aus tiefgefrorenen Glycerinkulturen auf YT-Platten (4.6), die gegebenenfalls mit dem entsprechend selektiven Antibiotikum supplementiert waren, mit einer sterilen Impföse ausgestrichen und bei 37°C bis zum sichtbaren Wachstum von Einzelkolonien inkubiert. Die kurzfristige Sicherung neuer Stämme erfolgte durch Haltung auf YT-Platten (mit dem entsprechenden Antibiotikum) bei 4°C. Zur langfristigen Sicherung von Bakterienstämmen wurden Glycerinkulturen angelegt. Dazu wurde 1 ml einer üN-Kultur (5.1.3) des gewünschten Stammes in einem sterilen Stockgläschen mit 200 µl 87% (v/v) Glycerin (autoklaviert) versetzt, 30 min bei RT inkubiert und während dieser Zeit mehrmals invertiert. Anschließend wurden die Bakterienzellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

5.1.3 Anzucht von üN-Kulturen

Zur Anzucht von üN-Kulturen wurden Einzelkolonien entweder mit einer sterilen Impföse oder mit einem sterilen Zahnstocher von einer YT-Platte (4.6) in 3 ml YT-Medium (4.6), dem gegebenenfalls das entsprechende Antibiotikum vorher zugegeben wurde, überimpft und auf einem Rundschüttler (New Brunswick Scientific Gio Gyrotory, ca. 220 rpm) bei 37°C über Nacht inkubiert.

5.1.4 Herstellung Hitzeschock-kompetenter Zellen

Die Herstellung Hitzeschock-kompetenter *E. coli* Zellen erfolgte nach der von Dagert und Ehrlich (1979) publizierten Methode. Dazu wurden 100 ml YT-Medium (4.6) mit 1 ml einer üN-Kultur (5.1.3) des entsprechenden *E. coli* Stammes angeimpft und die Zellen auf einem Rundschüttler (New Brunswick Scientific Gio Gyrotory) bei 37°C bis zu einer optischen Dichte (OD_{600}) von 0.5 – 0.6 angezogen. Die Kulturen wurden dann in sterile 50 ml Corex Zentrifugengläser umgefüllt und 20 min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden die Zellen durch eine Zentrifugation für 5 min bei 4.500 rpm und 4°C (Heraeus Kühlzentrifuge, Megafuge 1.0R) pelletiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Zellpellet in 25 ml eiskaltem 0.1 M $CaCl_2$ resuspendiert und 60 min auf Eis inkubiert. Die Resuspension wurde erneut, wie oben beschrieben, zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Zellpellet im Kühlraum bei 4°C in 2 ml eiskaltem $CaCl_2$ mit 15% Glycerin vorsichtig aufgenommen. Nach Aliquotieren der kompetenten Zellen zu je 200 µl in sterile Eppendorfgefäße wurden sie für 1 h im Kühlraum bei 4°C inkubiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –70°C gelagert.

5.1.5 Transformation Hitzeschock-kompetenter *E. coli* Zellen

Die Transformation Hitzeschock-kompetenter Zellen erfolgte nach der Methode von Hanahan (1985). Dazu wurden 200 µl transformationskompetente *E. coli* Zellen (5.1.4) langsam auf Eis aufgetaut und mit 10 ng Plasmid-DNA vorsichtig vermischt. Bei der Transformation von Ligationsansätzen wurde jeweils der gesamte Ansatz eingesetzt. Nach einer Inkubation für 60 min auf Eis folgte ein dreiminütiger Hitzeschock bei 42°C und anschließend eine Zugabe von 800 µl vorgewärmten YT-Medium (37°C). Der Transformationsansatz wurde dann 60 min bei 37°C inkubiert und 200 µl davon auf selektive YT-Platten (4.6) ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert und durch Auszählen der Kolonien pro Platte wurde die Transformationsrate bestimmt. Die ermittelte Transformationsrate lag bei dem Kontrollplasmid pUC18 bei 6×10^5 bis 7×10^5 Transformanden/µg Plasmid-DNA.

5.2 Allgemeine molekularbiologische Methoden

5.2.1 UV/VIS-Spektroskopie

5.2.1.1 Spektralphotometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren und Nukleotiden

Die Konzentrationsbestimmung reiner Nukleinsäurelösungen wurde in einem Beckmann Spektralphotometer (Modell 64) mit einer Quarzküvette bei einer Wellenlänge von 260 nm durchgeführt. Um im linearen Meßbereich zu arbeiten, wurden die zu messenden Proben so verdünnt, daß ihre Absorption maximal einen Wert von 1.0 annahm. Die Kalibrierung erfolgte jeweils gegen das entsprechende Lösungsmittel (TE-Puffer oder *Aqua dest.*). Zur Berechnung der Konzentration wurden, unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors, folgende Beziehungen verwendet:

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

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

Zur Überprüfung der Reinheit von Nukleinsäurelösungen wurden Absorptionsspektren in einem Wellenlängenbereich von 220 nm bis 320 nm aufgenommen. Das Verhältnis der Absorptionswerte bei 260 nm und 280 nm (A_{260}/A_{280}) gibt Auskunft über mögliche Verunreinigungen der Nukleinsäurelösung. Für reine Präparationen sollte der A_{260}/A_{280} -Wert zwischen 1.8 und 2.0 liegen. Kontaminationen durch Proteine und Phenol führen zu deutlich geringeren Quotienten.

Nach dem Ansetzen von Nukleotidlösungen wurden diese spektralphotometrisch auf ihre Konzentration überprüft. Die Konzentration einer absorbierenden Substanz läßt sich nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz mit Hilfe des substanzspezifischen Extinktionskoeffizienten berechnen.

Nach Lambert-Beer gilt:

$$E_{\lambda} = \epsilon_{\lambda} \times c \times d$$

- mit: E_{λ} : gemessene Extinktion bei Wellenlänge λ
 λ : angegebene Wellenlänge [nm]
 ϵ_{λ} : substanzspezifischer molarer Extinktionskoeffizient bei Wellenlänge λ [$M^{-1}cm^{-1}$]
 c : molare Konzentration der absorbierenden Lösung [M]
 d : Länge des Lichtweges durch die Küvette [cm]

Für die Konzentration gilt somit:

$$c = E_{\lambda} \times \varepsilon_{\lambda}^{-1} \times d^{-1}$$

5.2.1.2 Streumessung von Bakterienkulturen

Das Bakterienwachstum wurde in einem Spektralphotometer (Beckmann Modell 64) durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm (Streumessung) verfolgt. Um im linearen Bereich messen zu können, wurden die Suspensionen bei Bedarf mit sterilem YT-Medium (4.6) verdünnt, so daß die OD-Werte maximal 1.0 erreichten. Die Kalibrierung des Photometers erfolgte gegen steriles YT-Medium (4.6).

5.2.2 Radioaktivitätsmessung

Die Messung der Radioaktivität von [³²P]-markierten Proben erfolgte im Tritiumkanal eines Beckmann LS 5000 TD Szintillationszählers ohne Szintillationsflüssigkeit über die Messung der Cerenkov-Strahlung.

5.2.3 Phenol/Chloroform-Extraktion

Zur Entfernung von Proteinen aus wässrigen Nukleinsäurelösungen wurden Phenol/Chloroform-Extraktionen durchgeführt. Dazu wurde die zu reinigende Nukleinsäurelösung mit 1 Volumen Phenol/Chloroform (1:1, Phenol wie unter 4.1 beschrieben) versetzt und mindestens 1 min sorgfältig auf dem Vortex gemischt. Phenolextraktionen kleiner Volumina (bis ca. 600 µl) wurden in Eppendorfgefäßen durchgeführt und zur schnelleren Phasentrennung in einer Tischzentrifuge (Heraeus Biofuge 1.5) 3 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Größere Volumina wurden in 12 ml Greinerröhrchen phenolextrahiert und zur Phasentrennung in einer großen Tischzentrifuge (Heraeus Megafuge 1.0R) 5 min bei 6.000 rpm zentrifugiert. Im Anschluß an die Zentrifugation wurde der wässrige Überstand ohne die proteinhaltige Interphase vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Extraktion wurde solange wiederholt, bis keine Interphase mehr vorhanden war. Zur Entfernung organischer Rückstände wurden kleine und größere Volumina mit Chloroform extrahiert. Dabei wurde der Lösung 1 Volumen Chloroform zugefügt, gut gemischt und zur schnelleren Phasentrennung zentrifugiert (Heraeus Biofuge 1.5 bzw. Megafuge 1.0R). Anschließend wurde der wässrige Überstand in ein neues Eppendorfgefäß bzw. Greinerröhrchen überführt.

5.2.4 Ethanolfällung von Nukleinsäuren

Zur Präzipitation von Nukleinsäuren wurden die Lösungen, sofern es die Salzkonzentrationen erforderten, mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5.0) versetzt und auf dem Vortex gemischt. Anschließend wurden 2-3 Volumen absoluter Ethanol (-20°C) zugegeben. Die Fällung erfolgte entweder durch zweimaliges Einfrieren und Auftauen in flüssigem Stickstoff oder durch Inkubation für 30 min bei -20°C. Längere Fällungszeiten wurden wegen des hohen Anteils ausfallenden Salzes vermieden. Nach der Fällung wurden die Nukleinsäuren sofort 30 min bei 13.000 rpm und 4°C (Heraeus Kühlzentrifuge, Megafuge 1.0R) abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 80% Ethanol (-20°C) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für 10 min bei 13.000 rpm und 4°C (Heraeus Kühlzentrifuge, Megafuge 1.0R) wurde das Pellet lyophilisiert (Heto VR-1 Speedvac Concentrator) oder an der Luft getrocknet. Die präzipitierten Nukleinsäuren wurden in einem geeigneten Volumen TE-Puffer (4.6) oder *Aqua dest.* aufgenommen. In bestimmten Fällen wurde Glykogen (1 µg/ml) als Fällungshilfe der Nukleinsäurelösung zugegeben.

5.2.5 Mikrotropfendialyse

Zur Entfernung von Phenolresten oder zur Entsalzung von Nukleinsäurelösungen wurde bei kleinen Volumina eine Mikrotropfendialyse durchgeführt. Hierzu wurde eine sterile Petrischale mit 20-30 ml des jeweiligen Dialysepuffers gefüllt und ein VS Millipore Membranfilter (Porengröße 0.025 µm) mit der glänzenden Seite nach oben gerichtet auf die Flüssigkeitsoberfläche aufgesetzt. Anschließend wurde die Probe auf den Membranfilter aufpipettiert und bis zu 60 min bei RT dialysiert. Nach der Dialyse wurde die Probe mit einer Pipette abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

5.2.6 Enzymatische Reaktionen

5.2.6.1 Restriktionshydrolysen

Bei den in dieser Arbeit eingesetzten Restriktionsenzymen handelt es sich um Endonukleasen des Typs II (Zabeau und Roberts, 1979), bei welchen die Erkennungs- sowie Spaltungssequenzen jeweils identisch sind. Die hydrolytische Spaltung doppelsträngiger DNA führte, abhängig von dem verwendeten Restriktionsenzym, entweder zu glatten oder zu 3'- bzw. 5'-überhängenden Enden an den entstandenen dsDNA-Fragmenten. Die Restriktionshydrolysen wurden nach den Herstellerangaben durchgeführt. Zum Stoppen der Reaktion wurden die Restriktionsansätze jeweils mit 1 Volumen Phenol/Chloroform extrahiert (5.2.3).

Die entstandenen Restriktionsfragmente wurden anschließend in Agarosegelen oder Polyacrylamidgelen analysiert.

5.2.6.2 Dephosphorylierung von 5'-DNA-Enden

Die 5'-Enden linearisierter Klonierungsvektoren wurden zur Vermeidung von Religationen vor einer Ligationsreaktion (5.2.6.7) durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase (CIP) dephosphoryliert. Hierzu wurden 100 pmol überhängende 5'-Enden bzw. 2 pmol glatte Enden mit 1 U alkalischer Phosphatase (CIP) in einem 1x CIP-Puffer (Maniatis *et al.*, 1982) für 60 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde mittels zweimaliger Phenol/Chloroform-Extraktion (5.2.3) gestoppt, die dephosphorylierte DNA gefällt (5.2.4) und anschließend in TE-Puffer oder *Aqua dest.* aufgenommen.

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

5.2.6.3 Klenow-Reaktion zum Auffüllen von überhängenden 5'-DNA-Enden

Mit Hilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase I können 5'-überhängende Enden doppelsträngiger DNA-Fragmente mit den entsprechend komplementären Nukleotiden aufgefüllt werden. Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

x µl DNA (max. 2 µg)
2.5 µl 10x Klenow-Puffer
je 1 µl 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP
1 µl Klenow-Enzym (5 U/µl)
ad 25 µl <i>Aqua dest.</i>

10x Klenow-Puffer:	500 mM Tris/HCl, pH 7.2
	100 mM MgSO ₄
	1 mM DTT

Nach einer Inkubation für 30 min bei RT wurde der Reaktionsansatz mit TE-Puffer auf 50 µl Gesamtvolumen aufgefüllt, einmal mit Phenol/Chloroform extrahiert (5.2.3) und die DNA mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat und 2 Volumen abs. Ethanol 10 min auf Eis gefällt. Das Pellet wurde lyophilisiert und in einem geeigneten Volumen TE-Puffer (4.6) gelöst.

5.2.6.4 Radioaktive 5'-Markierung doppelsträngiger DNA-Fragmente mittels Klenow-Reaktion

Mit Hilfe der Klenow-Reaktion können überhängende 5'-Enden doppelsträngiger DNA-Fragmente durch den Einbau von [$\alpha^{32}\text{P}$]dNTPs radioaktiv markiert werden. Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

x μl DNA (500 ng bis 1 μg)
2.5 μl 10x Klenow-Puffer
je 1 μl 10 mM dATP, dGTP, dTTP
1 μl [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$; 3000 Ci/mmol)
1 μl Klenow-Enzym (5 U/ μl)
ad 25 μl *Aqua dest.*

Da die eingesetzten DNA-Fragmente ein 5'-überhängendes Ende mit dGTP-Nukleotiden besitzen, wurde für die radioaktive Markierung [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP verwendet (nur im Fall des P1-R-Fragmentes [$\alpha^{32}\text{P}$]dATP). Nach Inkubation des Reaktionsansatzes für 30 min bei RT erfolgte eine Aufarbeitung wie bei der unter 5.2.6.3 beschriebenen nicht-radioaktiven Klenow-Reaktion.

Nach der Klenow-Reaktion wurden die radioaktiv markierten DNA-Fragmente in 1x KGlu80-Puffer 3 min bei 96°C denaturiert und anschließend zur Renaturierung langsam im Heizblock auf RT abgekühlt. Durch diese anschließende Denaturierung und Renaturierung der Fragmente konnte der bei der Klenow-Reaktion entstehende Anteil an einzelsträngigem Fragment in doppelsträngiges Fragment überführt werden.

5.2.6.5 5'-Kinasierung doppelsträngiger DNA-Fragmente

Doppelsträngige DNA-Fragmente wurden in einer direkten Phosphorylierungsreaktion kinasiert. Hierzu wurden 10 pmol (500 pmol) DNA in einem Reaktionsansatz von insgesamt 20 μl (100 μl) mit 2 μl (10 μl) 10 mM ATP und 10 U (15 U) T4 Polynukleotidkinase für 45 min bei 37°C in 1x Kinasepuffer inkubiert. Nach der Reaktion wurde die T4 Polynukleotidkinase durch Inkubation für 10 min bei 68°C inaktiviert, die kinasierten DNA-Fragmente durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5.0) und 2 Volumen abs. Ethanol (-20°C) in flüssigem Stickstoff gefällt und anschließend die DNA für 30 min bei 13.000 rpm und 4°C (Heraeus Kühlzentrifuge, Megafuge 1.0R) pelletiert. Nach zweimaligem Waschen des Pellets mit 80% Ethanol und Lyophilisation (Heto VR-1 Speedvac Concentrator) wurde die DNA in TE-Puffer aufgenommen.

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

5.2.6.6 Radioktive 5'-Markierung einzelsträngiger DNA-Oligonukleotide

Synthetisierte ssDNA-Oligonukleotide wurden in einer direkten Phosphorylierungsreaktion radioaktiv endmarkiert. Hierzu wurden 10 pmol Oligonukleotid in einem Reaktionsansatz von insgesamt 20 µl mit 5 µl 2 µM [³²P]-ATP (50 µCi) und 1 U T4 Polynukleotidkinase für 45 min in 1x Kinasepuffer bei 37°C inkubiert. Nach der Umsetzung wurde die Reaktion durch Inkubation für 10 min bei 68°C gestoppt, die markierten Oligonukleotide durch Zugabe von 1/10 Volumen 7.5 M Ammoniumacetat (pH 5.0), 1/20 Volumen Glykogen (20 µg/ml) und 5 Volumen abs. Ethanol in flüssigem Stickstoff gefällt und anschließend 30 min bei 12.000 rpm (Heraeus Biofuge A) pelletiert. Nach Waschen des Pellets mit 80% Ethanol und Lyophilisation (Savant, Speedvac Concentrator) wurden die Proben in 20 µl TE-Puffer aufgenommen. Zur Bestimmung der Reaktionseffizienz wurde 1 µl dieser Lösung im Szintillationszähler gemessen (5.2.2).

5.2.6.7 Mung-Bean-Nuklease-Reaktion zum Entfernen von überhängenden Enden doppelsträngiger DNA-Fragmente

Mit Hilfe der Mung-Bean-Nuklease können 5'- und 3'-überhängende Enden doppelsträngiger DNA-Fragmente entfernt werden. Die Reaktion wurde in folgendem Reaktionsansatz durchgeführt:

x µl DNA (350 ng)
 3 µl 10x Mung-Bean-Nuklease-Puffer
 6 µl Mung-Bean-Nuklease (0.55 U/µl)
 ad 30 µl *Aqua dest.*

10x Mung-Bean-Nuklease-Puffer: (Maniatis <i>et al.</i> , 1982)	300 mM Natriumacetat (pH 4.5)
	500 mM NaCl
	10 mM ZnCl ₂
	50% Glycerin

Der Reaktionsansatz wurde für 15 min bei 30°C inkubiert, anschließend einmal mit 1 Volumen Phenol/Chloroform extrahiert (5.2.3) und dann mit 2 Volumen abs.

Ethanol gefällt (5.2.4). Das lyophilisierte Pellet wurde in TE-Puffer (4.6) oder *Aqua dest.* aufgenommen.

5.2.6.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von doppelsträngigen „blunt end“-DNA-Fragmenten mit linearisierten Vektoren wurde in einem 1x Ligasepuffer mit 1 U T4-DNA-Ligase über Nacht bei 20°C durchgeführt. Das Insert/Vektor-Verhältnis lag bei 50:1. Am nächsten Tag wurde erneut 1 U T4-DNA-Ligase dem Reaktionsansatz zugegeben und dieser dann für 2 h bei 40°C inkubiert, um einen Ringschluß der Vektoren trotz der starken Krümmung des Tetramerinserts zu ermöglichen. Nach der Ligation wurde der gesamte Reaktionsansatz sofort in die Transformation (5.1.5) eingesetzt.

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

5.2.7 Isolierung von DNA

5.2.7.1 Isolierung analytischer Mengen Plasmid-DNA („Minipräp“)

Zur schnellen analytischen Präparation von Plasmid-DNA aus üN-Kulturen (5.1.3) wurde nach der von Ish-Horowitz und Burk (1981) beschriebenen Methode vorgegangen. Dazu wurden 3 ml üN-Kultur in zwei Schritten in einem Eppendorfgefäß zentrifugiert (3 min, 13.000 rpm, Beckmann Microspin), das Zellpellet in 100 µl Lyselösung I resuspendiert und 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl frisch angesetzter denaturierender Lyselösung II und Mischen folgten 5 min Inkubation auf Eis. Anschließend wurden nach dem Zusatz von 150 µl 3 M Kaliumacetat (pH 4.8) chromosomale DNA und Zelltrümmer 5 min auf Eis ausgefällt und durch Zentrifugation (5 min, 13.000 rpm, Beckmann Microspin) sedimentiert. Die renaturierte Plasmid-DNA befindet sich nach der Zentrifugation im Überstand. Dieser wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt, einmal mit Phenol/Chloroform extrahiert (5.2.3) und dann die Plasmid-DNA durch Zugabe von 2 Volumen abs. Ethanol gefällt (5.2.4). Die pelletierte Plasmid-DNA wurde an der Luft getrocknet und in 25 µl TE-Puffer (4.6) gelöst.

Bei Restriktionsanalysen wurden 5 µl der isolierten Plasmid-DNA eingesetzt und jedem Ansatz 20 µg/ml RNase A zugefügt.

Lyselösung I:	25 mM Tris-HCl, pH 8.0 50 mM Glucose 10 mM EDTA, pH 8.0 4 mg/ml Lysozym
Lyselösung II:	200 mM NaOH 1% (v/v) SDS

5.2.7.2 Präparative Isolierung von Plasmid-DNA („Maxipräp“)

Die präparative Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte nach der von Hillen *et al.* (1981) beschriebenen Methode. Hierzu wurde mit einer Einzelkolonie eine üN-Kultur (3 ml) angesetzt und am nächsten Tag damit eine Vorkultur (25 ml) 1:100 angeimpft. Die Vorkultur wurde bei 37°C mehrere Stunden geschüttelt (New Brunswick Gio Gyrotory). Am Abend wurden mit dieser Kultur zwei Hauptkulturen (jeweils 800 ml in einem 2.000 ml-Erlenmeyerkolben) angesetzt (1:100 verdünnt) und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Alle Kulturen wurden in YT-Medium (4.6) mit dem entsprechenden Antibiotikum kultiviert. Die Kultur wurde am folgenden Morgen durch 5 minütige Zentrifugation (8.000 rpm, 4°C, Beckmann Zentrifuge J2-21, JA-10-Rotor) sedimentiert, das Zellpellet in 8 ml Saccharosepuffer sorgfältig resuspendiert und in ein Ti 55.2-Polycarbonatröhrchen (Beckmann) überführt. Nach Zugabe von 3 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0) und 3 ml Lysozymlösung wurde die Suspension durch Invertieren durchmischt und für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 2 ml Brij-Doc-Lösung hinzugegeben und weitere 10 min auf Eis inkubiert. Während dieser 10 min wurden die Zentrifugenröhrchen austariert und dann 30 min bei 44.000 rpm bei 4°C zentrifugiert (Beckmann L8-55 Ultrazentrifuge, Rotor Ti 55.2). Der klare Überstand wurde in einen Meßzylinder dekantiert und 30 min bei 37°C mit 50 µg RNase A/ml Überstand inkubiert. Nach Zugabe von 50 µg Proteinase K/ml Überstand wurde nochmals 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Plasmid-DNA durch Zugabe von 0.5 Volumen PEG-Lösung 30 min bei -20°C gefällt und für 30 min bei 10.000 rpm und 4°C pelletiert (Beckmann Zentrifuge J2-21, Rotor JA-14). Das erhaltene Pellet wurde in 3 ml TE-Puffer (4.6) aufgenommen, auf Eis gelöst, einmal mit 3 ml Phenol/TE gesättigt, zweimal mit 3 ml Phenol/Chloroform und einmal mit 3 ml Chloroform extrahiert. Es folgte eine Ethanolpräzipitation wie unter 5.2.4 beschrieben. Das getrocknete Pellet wurde in 500 µl TE-Puffer aufgenommen und gelöst. Die Konzentration und Reinheit wurde spektroskopisch untersucht (5.2.1.1) und auf einem Agarosegel (5.2.8.1) überprüft.

Saccharose-Puffer:	25% Saccharose (w/v) 50 mM Tris/HCl, pH 8.0
--------------------	--

Lysozym-Lösung:	20 mg/ml Lysozymchlorid 50 mM Tris/HCl, pH 8.0 immer frisch angesetzt
Brij-Doc-Lösung:	2 Volumenteile 10% (w/v) Brij 35 1 Volumenteil 10% (w/v) Na-Deoxycholat in <i>Aqua dest.</i> , pH 8.0 mit NaOH eingestellt, (Lösung erfolgt nach NaOH-Zugabe)
RNase A:	200 µg/ml RNase A in 10 mM Tris/HCl, pH 8.0 (die RNase wurde vor der Benutzung nach Maniatis <i>et al.</i> (1982) von DNase-Aktivität befreit)
Proteinase K:	20 mg/ml in <i>Aqua dest.</i>
PEG-Lösung:	30% (w/v) PEG ₆₀₀₀ in 1.5 M NaCl

5.2.8 Gelelektrophorese

5.2.8.1 Agarosegelelektrophorese

Zur analytischen und präparativen Auftrennung doppelsträngiger DNA (Plasmid-DNA und Restriktionsfragmente) wurden horizontale Agarosegele mit 0.8 - 2.5% (w/v) Agarose verwendet (Maniatis *et al.*, 1982). Das aufgekochte Gel (0.8 - 2.5 g Agarose in 100 ml 1x TAE-Puffer) wurde nach Abkühlung auf ca. 60°C mit 0.5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und als Flachbettgel (14 x 11 cm) gegossen. Als Laufpuffer diente 1x TAE-Puffer (4.6), der mit 0.5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt worden ist. Bei der Herstellung von präparativen Agarosegelen wurde eine hochreine Agarose (ultrapur) verwendet und kein Ethidiumbromid zum aufgekochten Gel zugegeben. Vor dem Auftragen wurden die DNA-Proben mit 1/5 Volumen 5x TAE-Probenpuffer versetzt. Die Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 100 V. Nach der Elektrophorese wurde die DNA im Gel über die Fluoreszenz der in den Doppelstrang interkalierten Ethidiumbromidmoleküle bei Bestrahlung mit langwelligem UV-Licht (302 nm) auf einem UV-Transilluminator (Herolab UVT 2035) sichtbar gemacht. Zur Dokumentation wurden die Gele über eine SW-Kamera (Sanyo B/W CCD Kamera, Modell VC 25-12) mit entsprechendem Filter aufgenommen und mit Hilfe eines Videoprinters ausgedruckt.

5.2.8.2 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) von Nukleinsäuren unter nativen Bedingungen

Zur Auftrennung kurzer DNA-Fragmente wurden Polyacrylamidgelelektrophoresen unter nativen Bedingungen durchgeführt.

Wässrige Lösungen von Acrylamid und Methylenbisacrylamid als bifunktionelles Vernetzungsreagenz bilden nach Zugabe von geeigneten Katalysatoren stabile hydrophile Gele. Hier diente als Polymerisationskatalysator N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) und als Polymerisationsstarter Ammoniumperoxodisulfat (APS), welches in wässriger Lösung freie SO_4^- - Radikale bildet. Die verwendeten Glasplatten wurden vor jedem Gebrauch mit Detergenz, *Aqua dest.* und Ethanol gereinigt.

Es wurde eine 40% Acrylamid-Stammlösung eingesetzt, bei der Acrylamid und Methylenbisacrylamid im Verhältnis 30:1 vernetzt waren. Die Stammlösung wurde zur Entfernung von Fremdionen mit einem Ionenaustauscher (Amberlite MB-1) 3–5 Stunden gerührt, anschließend durch einen Faltenfilter filtriert und lichtdicht bei 4°C aufbewahrt. Je nach benötigtem Auftrennungsbereich wurden aus dieser Stammlösung Gele verschiedener Prozentigkeiten auf 1x TBE-Basis hergestellt (Maniatis *et al.*, 1982). Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 0.1% TEMED und 1% einer 10% (w/v) APS-Lösung gestartet. Die Dimension der Gele betrug 180 x 165 x 1 mm. Als Elektrophoresepuffer wurde 1x TBE-Puffer verwendet. Die DNA-Proben wurden mit 1/5 Volumen 5x TBE-Probenpuffer versetzt und bei einer konstanten Spannung von 200 V 2 h elektrophoretisch aufgetrennt.

Der Nachweis der Nukleinsäuren erfolgte entweder mittels Silberfärbung oder durch Ethidiumbromidfärbung. Zur Dokumentation wurden die silbergefärbten Gele eingescannt (Hewlett Packard, Scan Jet 4c/T) und mit einem Laserdrucker ausgedruckt. Die mit Ethidiumbromid gefärbten Gele wurden über eine SW-Kamera (Sanyo B/W CCD Kamera, Modell VC 25-12) mit entsprechendem Filter aufgenommen und mit Hilfe eines Videoprinters ausgedruckt.

5.2.8.3 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) von Nukleinsäuren unter denaturierenden Bedingungen

Bei Plasmidsequenzierungen, Primer Extension-Reaktionen und zur Produktanalyse von *in vitro* Transkriptionen wurden denaturierende Polyacrylamidgele verwendet. Hierbei wurde der Gellösung als denaturierendes Agens 7 M Harnstoff zugesetzt. Die Glasplatten wurden vor jeder Benutzung mit Detergenz, *Aqua dest.* und Ethanol gereinigt. Vor dem ersten Gebrauch und dann nach jeder dritten Verwendung wurden die Glasplatten mit 2% Repelcote (2% (v/v) Dichlordimethylsilan in Trichlormethan (Chloroform)) silikonisiert. Für diese Gele wurde eine Acrylamid-Bisacrylamid-Stammlösung mit einem Vernetzungsgrad von 20:1 eingesetzt. Die Polymerisation wurde durch die Zugabe von APS und TEMED gestartet. Vor dem Zufügen der Polymerisationsstarter wurde die Gellösung für 3

min mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe entgast. Die Dimension der Gele betrug 390 x 335 x 0.4 mm. Als Elektrophoresepuffer diente 1x TBE-Puffer (4.6). Unmittelbar vor dem Auftrag wurden die aufzutrennenden Nukleinsäureproben mit Formamid-Probenpuffer (4.6) versetzt, 3 min bei 96°C denaturiert und sofort auf Eis abgekühlt. Die Gele wurden vor dem Probenauftrag in drei Schritten von jeweils 10 min auf eine konstante Leistung von 75 W gebracht. Die Elektrophoresedauer betrug je nach Länge der zu analysierenden Fragmente 1 h bis 4 h. Zur Dokumentation wurden die Gele autoradiographiert (5.2.9.3).

Gellösung (10% PAA-Gel):

- 42 g Harnstoff
- 10 ml 10x TBE-Puffer (4.6)
- 25 ml 40% Acrylamid-Stammlösung (20:1)
- ad 100 ml *Aqua dest.*
- 50 µl TEMED
- 500 µl 10% APS

5.2.8.4 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Trennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen wurde ein diskontinuierliches Polyacrylamidsystem nach Laemmli (1970) verwendet. Hierbei wird als denaturierendes Agens Natriumdodecylsulfat (SDS) eingesetzt, welches als amphiphiles Detergens die native Proteinstruktur auffaltet. Aufgrund der Anlagerung von SDS (1.4 g SDS pro g Protein) ist die Eigenladung der Proteine vernachlässigbar und die Auftrennung im elektrischen Feld erfolgt ausschließlich nach dem Molekulargewicht der Proteine. Die Proteine werden bei dieser Methode zunächst in einem Sammelgel fokussiert und dann in einem Trenngel aufgetrennt.

Die Proteinproben (10 µl) wurden mit 5 µl β-Mercaptoethanol und 10 µl SDS-Probenpuffer vermischt und ca. 5 min aufgeköcht. Die Elektrophorese erfolgte zu Beginn bei einer Spannung von 60 V, bis der Bromphenolblau-Marker die Grenzschicht zwischen Sammel- und Trenngel erreicht hatte. Danach wurde die Spannung bis zum Ende der Elektrophorese (5-6 h) auf 120 V erhöht. Bei Elektrophoresen über Nacht wurde eine konstante Spannung von 60 V angelegt.

Lösung A (30% Acrylamidlösung):

- 300 g/l Acrylamid
- 8 g/l Bisacrylamid

Lösung B: 1.5 M Tris/HCl, pH 8.8

Lösung C: 10% (w/v) SDS

Lösung D: 500 mM Tris/HCl, pH 6.8

SDS-Laufpuffer:	28.8 g/l Glycin 6 g/l Tris 1 g/l SDS mit HCl auf pH 8.8 einstellen
SDS-Probenpuffer:	2.5 ml Lösung D 2 ml Lösung C 2 ml Glycerin 0.1 ml 0.1% (w/v) Bromphenolblau 3.4 ml <i>Aqua dest.</i>

Für ein 15% SDS-Gel wurden folgende Lösungen gemischt:

15% Trenngellösung:	50 ml Lösung A 25 ml Lösung B 1 ml Lösung C ad 100 ml <i>Aqua dest.</i> 50 µl TEMED 500 µl 10% APS
---------------------	---

6% Sammelgellösung:	2 ml Lösung A 0.1 ml Lösung C 2.5 ml Lösung D 5.4 ml <i>Aqua dest.</i> 10 µl TEMED 100 µl 10% APS
---------------------	--

Die Detektion der Banden erfolgte mittels Coomassie-Färbung (5.2.9.5) oder der empfindlicheren Silberfärbung (5.2.9.6).

5.2.9 Nachweis von Nukleinsäuren und Proteinen in Polyacrylamidgelen

5.2.9.1 Ethidiumbromidfärbung von Nukleinsäuren

Nach Elektrophorese wurden die Nukleinsäuren im PAA-Gel mit einer Ethidiumbromidfärbelösung 10–15 min unter leichtem Schütteln (Gerhardt Schüttelmaschine LS 10) gefärbt. Anschließend wurde das Gel kurz in *Aqua dest.* gewaschen. Die DNA wurde über die Fluoreszenz der interkalierten Ethidiumbromidmoleküle durch Bestrahlung mit langwelligem UV-Licht (302 nm) auf einem UV-Transilluminator (Herolab UVT 2035) sichtbar gemacht. Zur Dokumentation wurden die Gele über eine SW-Kamera (Sanyo B/W CCD Kamera,

Modell VC 25-12) mit entsprechendem Filter aufgenommen und mittels eines Videoprinters ausgedruckt.

Ethidiumbromidfärbelösung: 2 µg/ml Ethidiumbromid
in 1x TBE (4.6)

5.2.9.2 Silberfärbung von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren, die in nativen PAA-Gelen aufgetrennt wurden, konnten mit der von Beidler *et al.* (1982) beschriebenen Methode mit Silber angefärbt werden. Diese Methode erlaubt den Nachweis von Nukleinsäuren im ng-Bereich. Hierzu wurden die Gele nach der Elektrophorese in Fixierer I unter leichtem Schütteln (Gerhardt Schüttelmaschine LS 10) mindestens 10 min fixiert und anschließend in der Färbelösung 20 min gefärbt. Danach wurden die Gele dreimal für jeweils 20–60 sec in *Aqua dest.* gewaschen. Es folgte ein Entwicklungsbad für 5–20 min, bis die Banden gut sichtbar wurden. Nach Fixierung für 10 min in Fixierer II wurde das Gel in Folie eingeschweißt und zur Dokumentation gescannt (Hewlett Packard, Scan Jet 4c/T).

Fixierer I: 10% Ethanol
0.5% Essigsäure

Färbelösung: 0.19% (w/v) Silbernitrat

Entwickler: 15 g/l NaOH
0.08 g/l Natriumborhydrid (NaBH₄)
0.148% (v/v) Formaldehyd (CH₂O)
immer frisch angesetzt

Fixierer II: 0.75% (w/v) Natriumcarbonat (Na₂CO₃)

5.2.9.3 Autoradiographie

Der Nachweis radioaktiv markierter Proben nach Polyacrylamidgelelektrophorese erfolgte über die Belichtung von Röntgenfilmen. Dazu wurden die Gele nach der Elektrophorese auf alte Röntgenfilme aufgezogen, mit Polyethylenfolie abgedeckt und in einer Expositionskassette (Siemens) mit einem Röntgenfilm bedeckt. Die Exposition erfolgte je nach Strahlungsintensität der Proben für ein bis mehrere Tage bei -20°C. Die Filme wurden in einem Entwicklerbad für 2–4 min entwickelt. Der Entwicklungsprozeß wurde in 3% (v/v) Essigsäure gestoppt und die Filme anschließend in einem Fixierbad für 3 min fixiert. Zuletzt wurden die Filme mit *Aqua dest.* abgespült und dann bei 37°C getrocknet.

5.2.9.4 Densitometrie

Zur quantitativen Auswertung von *in vitro* Transkriptionsanalysen wurden Phosphoimager-Screens verwendet. Dazu wurden die Screens (Abmessungen: 41 x 23,5 cm) mit der weißen Seite zum Gel auf das Gel in einer Expositionskassette (Siemens) aufgelegt. Die Exposition erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur. Am nächsten Tag wurden die Screens mit einem Phosphoimager (Biolumager FAS 3000) gescannt und die Bilder mit den Programmen Image Reader Fla. V.18 E und Image Gauge V3.0 quantitativ ausgewertet. Die Phosphoimager-Screens wurden nach jeder Benutzung durch intensive Belichtung gelöscht und in speziellen Kassetten (BAS 2340) aufbewahrt, um sie vor Tageslicht-Exposition zu schützen.

5.2.9.5 Coomassie-Färbung von Proteinen

Die Coomassie-Färbung von Proteinen nach SDS-PAGE (5.2.8.4) erfolgte über den Farbstoff „Coomassie Brilliant Blue R250“. Dazu wurde das Gel nach der Elektrophorese 1-2 h in einer Coomassie-Färbelösung unter leichtem Schütteln auf einem Horizontalschüttler gefärbt. Anschließend wurde das Gel in der Entfärbelösung entfärbt, bis die dunkelblau gefärbten Proteinbanden auf dem hellblauen Hintergrund zu erkennen waren. Mit dieser Methode können Proteine ab einer Menge von 300 ng nachgewiesen werden. Im Gegensatz zur Silberfärbung (5.2.9.6) erlaubt die Coomassiefärbung eine quantitative Zuordnung der Proteinbanden.

Coomassie-Färbelösung: 50% (v/v) Methanol
 10% (v/v) Essigsäure
 0.1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250

Entfärbelösung: 10% (v/v) Methanol
 10% (v/v) Essigsäure

5.2.9.6 Silberfärbung von Proteinen

Der Nachweis von Proteinen in Polyacrylamidgelen durch Silberfärbung nach der von Blum *et al.* (1987) beschriebenen Methode ermöglicht eine empfindlichere Detektion von Proteinbanden als die oben beschriebene Coomassie-Färbung. Hierzu wurde das Gel nach abgeschlossener Elektrophorese für 2 h in Fixierlösung I unter leichtem Schütteln fixiert. Danach wurde das Gel zweimal für 10 min in 50% Methanol und einmal für 10 min in 30% Ethanol gewaschen. Anschließend folgte zur Verstärkung 1 min Inkubation in einer Natriumthio-sulfatlösung (0.2 g/l). Nach dreimaligem Wässern für jeweils 20 sec in *Aqua dest.*

erfolgte die Färbung für 30 min in der Färbelösung. Die Entwicklung wurde in einer Entwicklerlösung bis zur gewünschten Intensität durchgeführt. Zum Stoppen des Entwicklungsvorganges wurde das Gel ca. 10 min in Fixierlösung II geschwenkt. Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt bei bis zu 2-5 ng Protein.

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

5.2.10 Präparative DNA-Gelelution

5.2.10.1 DNA-Gelelution aus Agarosegelen mittels Zentrifugation über silikonisierte Glaswolle

Die Elution von dsDNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte durch Zentrifugation über silikonisierte Glaswolle. Nach der Elektrophorese wurde die DNA im Agarosegel durch Bestrahlung mit langwelligem UV-Licht (302 nm) auf einem UV-Transilluminator (Herolab UVT 2035) kurz sichtbar gemacht, die gewünschten DNA-Fragmente mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und in ein mit Glaswolle präpariertes PCR-Gefäß überführt. In den Boden dieses PCR-Gefäßes wurde zuvor mit einer heißen Kanüle ein kleines Loch gestochen. Anschließend wurde mit Hilfe einer sterilen Pinzette silikonisierte Glaswolle in das PCR-Gefäß gefüllt. Die Glaswolle wurde dicht gepackt, so daß sie etwa ein Viertel des Gefäßes einnahm. Das PCR-Gefäß wurde in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß gestellt und die DNA durch mehrfaches Zentrifugieren über die Glaswolle eluiert (Heraeus Biofuge 1.5, 12.000 rpm, 5 min). Im Anschluß wurde die eluierte DNA mit Phenol/Chloroform extrahiert (5.2.3) und mit 1/10 Volumen 3 M NaOAc (pH 5.5) und 2 Volumen abs. Ethanol präzipitiert (5.2.4). Das Pellet wurde mit 80% Ethanol gewaschen, lyophilisiert und in TE-Puffer (4.6) aufgenommen. Die Ausbeuten lagen bei 20–50%.

5.2.10.2 Passive DNA-Gelelution aus PAA-Gelen

Die Präparation von dsDNA-Fragmenten aus nativen PAA-Gelen erfolgte durch passive Gelelution der Nukleinsäuren in den Elutionspuffer. Nach der Elektrophorese wurde die DNA im PAA-Gel mittels Ethidiumbromidlösung gefärbt (5.2.9.1) und durch Bestrahlung mit langwelligem UV-Licht (302 nm) auf einem UV-Transilluminator (Herolab UVT 2035) sichtbar gemacht. Die Gelstücke mit den gewünschten DNA-Fragmenten wurden mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und in ein Eppendorfgefäß überführt. Danach wurden die Gelstücke mit 500 µl Gelelutionspuffer versetzt und die DNA über Nacht unter starkem Schütteln aus dem Gel eluiert. Die eluierten DNA-Fragmente wurden einmal mit Phenol/Chloroform extrahiert (5.2.3), mit abs. Ethanol (ohne eine weitere Zugabe von Salz) präzipitiert (5.2.4), gewaschen und lyophilisiert. Die Pellets wurden in TE-Puffer (4.6) aufgenommen. Die Ausbeuten lagen bei 40-60%.

Gelelutionspuffer: 0.3 M NaOAc, pH 7.0
 1 mM EDTA, pH 8.0

5.3 Spezielle Methoden

5.3.1 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA erfolgte mit einem „Sequenase Kit Version 2.0“ der Firma USB nach der beigefügten Vorschrift. Die im Kit enthaltene Sequenase 2.0 ist eine T7 Polymerase ohne 3'→5'-Exonukleaseaktivität. Es wurden für jede Sequenzierung 5 µg Plasmid-DNA eingesetzt.

Zuerst wurde die Plasmid-DNA denaturiert. Für den Denaturierungsschritt wurden 5 µg Plasmid-DNA in einem Volumen von 10 µl mit 40 µl einer 0.25 M NaOH/0.25 mM EDTA-Lösung 40 min bei 37°C inkubiert, ethanolpräzipitiert (5.2.4), lyophilisiert und in 7 µl *Aqua dest.* aufgenommen. Für die anschließende Hybridisierung wurde der denaturierten Plasmid-DNA 2 µl Sequenase-Reaction-Buffer und 1 µl des jeweiligen ssDNA-Primernukleotides (0.1–0.5 pmol/µl) zugefügt, der Ansatz für 2 min bei 65°C inkubiert und dann langsam (ca. 1°C/min) im Heizblock auf RT abgekühlt.

Der gesamte Hybridisierungsansatz wurde zu einem auf Eis vorgelegten Markierungsansatz gegeben und 3 min bei RT inkubiert. Nach 2 min dieser Inkubationszeit wurden jeweils 2.5 µl A-, C-, G- und T- Lösung für 1 min ebenfalls bei 37°C vorinkubiert, bevor jeweils 3.5 µl des Markierungs-/Hybridisierungsansatzes mit je 2.5 µl der A-, C-, G- und T- Lösung vermischt und für weitere 5 min bei 37°C inkubiert wurden. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 4 µl Stop-Solution beendet, die Proben 3 min bei 96°C denaturiert und sofort auf Eis abgekühlt. Die Auftrennung der Sequenzierungsprodukte erfolgte auf denaturierenden 10% Polyacrylamidgelen (5.2.8.3).

Sequenase-Reaction-Buffer:	200 mM Tris/HCl, pH 7.5 100 mM MgCl ₂ 250 mM NaCl
Markierungsansatz:	1 µl 0.1 M DTT 2 µl dG-Labeling Mix, 1:5 verdünnt in <i>Aqua dest.</i> 2 µl Sequenase 2.0, 1:8 verdünnt in Enzyme Dilution Buffer 0.5 µl [$\alpha^{32}\text{P}$] dATP (5 µCi, 3000 Ci/mmol)
dG-Labeling Mix:	7.5 µM dCTP 7.5 µM dGTP 7.5 µM dTTP
Enzyme Dilution Buffer:	10 mM Tris/HCl, pH 7.5 5 mM DTT 0.5 mg/ml BSA
A-, C-, G-, T- Lösung:	50 mM NaCl je 80 µM dATP, dCTP, dGTP, dTTP zusätzlich je 8 µM das ihrer Bezeichnung entsprechende ddNTP
Stop-Solution:	95% Formamid 20 mM EDTA 0.05% Bromphenolblau 0.05% Xylencyanol
Sequenase Version 2.0:	13 U/µl in 20 mM KPO ₄ , pH 7.4 1 mM DTT 0.1 M EDTA 5% Glycerol

5.3.2 Retardierungsgelelektrophorese

Die DNA-Bindungseigenschaften von H-NS, LRP und FIS wurden mit Hilfe der Verzögerungs- oder auch Retardierungsgelelektrophorese nachgewiesen. Grundlegendes Prinzip dieser Methode ist die Verringerung der Laufgeschwindigkeit einer Nukleinsäure in der Gelmatrix unter nicht-denaturierenden Bedingungen, wenn es zur Ausbildung von Nukleo-Proteinkomplexen kommt. Ursachen dieser Mobilitätsverzögerung sind das erhöhte Molekulargewicht des Komplexes gegenüber der freien DNA sowie eine

Veränderung der Konformation der Nukleinsäure durch die Einführung von proteininduzierten Krümmungen.

Die Retardierungsanalyse ermöglichte die vergleichende Untersuchung des Bindungsverhaltens der eingesetzten Proteine H-NS, LRP und FIS an die unterschiedlich orientierten, synthetischen H-NS Bindestellen.

Bei der hier beschriebenen Standardversuchsordnung wurden die Bedingungen so gewählt, wie sie zunächst von Garner und Revzin (1981) sowie modifiziert von Bradaczek (1991) und Tippner (1992) beschrieben worden sind. Anstelle von Poly(dI-dC) wurde jedoch Heparin als Kompetitor eingesetzt. Der Standard-Retardierungsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

	x μ l 32 P-markiertes DNA-Fragment (2nM)
	3.8 μ l Heparin (200 ng/ μ l)
	1.5 μ l 10x Bindungspuffer
	0–8.4 μ l Proteinlösung
	8.4–0 μ l Puffer (TGE-P. bei H-NS u. LRP; B50-P. bei FIS)
	ad 15 μ l mit <i>Aqua dest.</i>
10x Bindungspuffer:	500 mM Tris/HCl, pH 7.4 700 mM KCl 150 mM NaCl 10 mM EDTA, pH 8.0 100 mM β -Mercaptoethanol
TGE-Puffer:	20 mM Tris/HCl, pH 7.5 10% Glycerin 1 mM EDTA
B50-Puffer (1000 ml):	25 ml 1 M Tris/HCl, pH 7.5 2 ml 0.5 M EDTA, pH 8.0 2 ml 1 M DTT 2.92 g NaCl 100 ml Glycerin 97.5 mg PMSF

Für die Komplexbildung wurde der Retardierungsansatz 10 min bei RT inkubiert, dann mit 5 μ l 2x TBE-Probenpuffer versetzt und auf ein natives 5% Polyacrylamidgel (Abmessungen 305 mm x 228 mm x 1 mm) aufgetragen. Als Elektrophoresepuffer wurde 0.5x TBE-Puffer verwendet. Es wurde eine 40% Acrylamid-Stammlösung eingesetzt, bei der Acrylamid und Methylenbisacrylamid im Verhältnis 46:1 vernetzt waren.

40% Acrylamid-Stammlösung: (Acrylamid/Bisacrylamid 46+1)	391.2 g Acrylamid 8.6 g Bisacrylamid ad 1.000 ml <i>Aqua dest.</i> , dann 1 h mit Mixed Bed Resin TMD-8 vorsichtig gerührt und durch einen Faltenfilter filtriert
5% Gellösung:	12.5 ml 40% Acrylamid-Stammlösung 5 ml 10x TBE (900 mM) ad 100 ml mit <i>Aqua dest.</i> 100 µl TEMED 1 ml 10% (w/v) APS

Die Elektrophorese erfolgte für 3-4 h bei einem konstanten Stromfluß von 30 mA. Höhere Stromstärken wurden vermieden, um eine Aufheizung des Gels zu verhindern. Nach der Elektrophorese wurden die aufgetrennten Proben autoradiographiert (5.2.9.3).

5.3.3 „Supershift“-Retardierungsanalysen

Die gleichzeitige Bindung von *E. coli* RNA-Polymerase und den Transkriptionsfaktoren H-NS, LRP und FIS an das *rrnB* P1-Fragment wurde ebenfalls mit der Methode der Retardierungsgelelektrophorese analysiert. Um einen stabilen RNA-Polymerase/Promotorkomplex zu erhalten, müssen die ersten beiden Startnukleotide dem Reaktionsansatz zugegeben werden. Ein Standardansatz sah wie folgt aus:

x µl ³²P-markiertes P1-Fragment (2 nM)
3.8 µl Heparin (200 ng/µl)
1.5 µl 10x KGlu80-Puffer (3.3.4)
0.8 µl 10 mM ATP (Endkonz.: 500 µM)
0.8 µl 1 mM CTP (Endkonz.: 50 µM)
1.5 µl akt. RNA-Polymerase (10 nM; 1:1 σ⁷⁰ ges.)
x µl H-NS-, LRP- oder FIS-Lösung
ad 15 µl mit *Aqua dest.*

Für die Komplexbildung wurden zunächst 2 nM P1-Fragment mit 10 nM aktiver RNA-Polymerase (1:1 σ⁷⁰ gesättigt) mit 500 µM ATP und 50 µM CTP in 1x KGlu80-Puffer (3.3.4) 10 min bei 30°C vorinkubiert. Anschließend erfolgte eine Zugabe von verschiedenen Mengen H-NS, LRP oder FIS und eine weitere Inkubation für 10 min bei 30°C. Unspezifische Proteinbindungen wurden durch Zugabe von Heparin mit einer Endkonzentration von 50 ng/µl verhindert. Nach der Heparinzugabe wurden die Ansätze auf Eis gehalten, 1 µl 70% Glycerin zu jedem Ansatz zugegeben und jeweils die gesamten Ansätze (16 µl) auf ein natives 5%

Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte wie unter 5.3.2 beschrieben.

5.3.4 *In vitro* Transkription im “*pseudo single round*”-Ansatz

Der folgende Reaktionsansatz beschreibt eine „*pseudo single round*“ *in vitro* Transkription, bei der jede Transkriptionseinheit zwar mehrmals von der *E.coli* RNA-Polymerase abgelesen werden kann, aber bei der anschließenden Analyse nur die Produkte zu erkennen sind, die im vorinkubierten Initiationskomplex die zur Verfügung stehenden radioaktiven Nukleotide inkorporiert haben (Hsu, 1996).

Als DNA-Matrizen dienten die BK-Fragmente mit dem *rrnB* P1 Promotor sowie mit dem *rrnB* P2 Promotor. Als weitere Templates wurden die Kontrollfragmente BK-P1 und BK-P2 sowie das P1-T-Fragment (enthält *rrnB* P1 Promotor mit natürlicher upstream-Region) eingesetzt. Durch die Verwendung von DNA-Fragmenten ist das Transkriptende festgelegt, ohne daß es einer Terminatorstruktur bedarf („run-off“-Templates).

In einem Gesamtvolumen von 50 µl wurden 3 nM Template mit 9 nM aktiver RNA-Polymerase in 1x KGlu80-Puffer 10 min bei 30°C in Anwesenheit von H-NS, LRP oder FIS sowie der Startnukleotide (bei P1 Promotor-Templates: 500 µM ATP, 50 µM CTP und 20 µCi [$\alpha^{32}\text{P}$]-UTP (3000 Ci/mmol); bei P2 Promotor-Templates: 500 µM CTP, 50 µM GTP und 10 µCi [$\alpha^{32}\text{P}$]-ATP (3000 Ci/mmol) zur Initiationskomplexbildung vorinkubiert. Nach Zugabe von 50 ng/µl Heparin und weiterer Inkubation bei 30°C für 5 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 3.25 µl 4NTP-Lösung bei 30°C gestartet. Nach 5 min wurde der Ansatz mit 7.6 µl „chase“-Lösung versetzt. Nach einer folgenden Inkubation für 5 min bei 30°C wurden 5 µl des Ansatzes entnommen und auf Eis mit 5 µl Formamid-Probenpuffer (enthält zusätzlich radioaktiv markiertes P1-R-Fragment als Auftragsstandard) vermischt. Nach Denaturierung für 3 min bei 96°C wurden die Transkripte dann auf einem denaturierenden 10% Polyacrylamidgel (5.2.8.3) aufgetrennt.

AB-Diluent: 10 mM Tris-HCl, pH 8.0
 10 mM MgCl₂
 10 mM β-Mercaptoethanol
 50 mM NaCl
 100 µg/ml BSA, acetyliert
 0.1 mM EDTA, pH 8.0
 5% (v/v) Glycerin

4NTP-Lösung: je 10 mM ATP, CTP, GTP, UTP

1x KGlu80-Puffer:	50 mM Tris-Acetat, pH 8.0 10 mM Mg-Acetat 0.5 mM DTT 0.1 mM EDTA 100 µg/ml BSA, acetyliert 80 mM Kaliumglutamat
„chase“-Lösung:	je 2 mM ATP, CTP, GTP, UTP 2 mg/ml Heparin 1 mM Tris-HCl, pH 7.0

5.3.5 Nicht-radioaktive „multiple round“ *in vitro* Transkription und Primer-Extension-Analyse zur Transkriptionsstart-Bestimmung

5.3.5.1 Nicht-radioaktive „multiple round“ *in vitro* Transkription

Mittels nicht-radioaktiver *in vitro* Transkription und anschließender Primer-Extension-Analyse der entstandenen Transkripte kann das 5'-Ende der mRNA bestimmt werden. Als DNA-Matrizen dienten die Fragmente BK-P2 und BK2A/P2, um den Transkriptionsstart des *rrnB* P2 Promotors festzustellen.

Dazu wurden in einem Gesamtvolumen von 50 µl 1 nM Template mit 10 nM aktiver *E. coli* RNA-Polymerase in 1x KGlu80-Puffer 10 min bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde dann durch Zufügen von 3.25 µl NTP-Mix gestartet und erneut 15 min bei 30°C inkubiert. Um neue Initiationen zu verhindern und eine Beendigung aller angefangenen Transkripte zu erzielen, wurde der Ansatz mit 7.6 µl „chase“-Lösung versetzt und die Reaktion nach 6 min bei 30°C durch Zugabe von 11 µl Stop-Lösung gestoppt. Nach einer Fällung mit 200 µl abs. Ethanol für 45-60 min bei -20°C wurde die RNA mit 80% Ethanol gewaschen, lyophilisiert (Heto VR-1 Speedvac Concentrator) und in 4 µl TE-Puffer (4.6) gelöst. Die Probe wurde anschließend direkt in die Primer-Extension-Reaktion eingesetzt oder bei -20°C aufbewahrt.

NTP-Mix:	je 1 mM ATP, CTP, GTP, UTP
Stop-Lösung :	1.5 M NaOAc, pH 5.0 50 mM EDTA, pH 8.0

5.3.5.2 Primer-Extension-Analyse

Über eine nachfolgende Primer-Extension-Analyse wurden die Startpositionen des *rrnB* P2 Promotors bestimmt. Die hier durchgeführte Analyse erfolgte in Anlehnung an die von Sigmund *et al.* (1988) beschriebene Methode. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Verlängerung eines an mRNA hybridisierten endmarkierten Primers (5.2.6.6) durch das Enzym AMV Reverse Transkriptase (AMV-RT). Der Abbruch der Synthese einer cDNA erfolgt dabei am 5'-Ende des RNA-Transkriptes. Der Ansatz sah folgendermaßen aus:

In einem Gesamtvolumen von 7.5 µl wurden 4 µl mRNA (aus der „*multiple-round*“ IVT; 5.3.5.1) in 1x Hybridisierungspuffer mit 2 µl radioaktiv markiertem Primer (ca. 1×10^6 cpm) 1 min bei 90°C inkubiert und dann im Heizblock langsam auf RT abgekühlt. Jeweils 1 µl des Hybridisierungsansatzes wurde in 1x Primer-Extension-Puffer und mit allen vier dNTPs (Endkonz. je 200 µM) mit 1 U AMV-RT in einem Gesamtvolumen von 5 µl 30 min bei 42°C inkubiert. Durch Zugabe von 5 µl Formamid-Probenpuffer und 3 min Inkubation bei 96°C wurde die Reaktion gestoppt. Die Proben wurden dann auf einem denaturierenden 10% Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt (5.2.8.3).

5x Hybridisierungspuffer: 500 mM KCl
 250 mM Tris/HCl, pH 8.5

5x Primer-Extension-Puffer: 250 mM Tris/HCl, pH 8.3
 250 mM KCl
 50 mM MgCl₂
 50 mM DTT
 2.5 mM Spermidin

5.3.6 DNase I-„*footprint*“-Analysen von Nukleoproteinkomplexen

Die Kontaktregionen in Nukleoproteinkomplexen können mit Hilfe der „*footprint*“-Analyse lokalisiert werden. Das Prinzip dieser Methode beruht auf einen Vergleich der Zugänglichkeit von Nukleotidpositionen der DNA im Komplex mit Positionen in der freien Nukleinsäure. In dieser Arbeit wurden mittels enzymatischer „*footprint*“-Analysen mit der Endonuklease DNase I die Bindestellen von H-NS, LRP und FIS auf den P1- und P2-Konstrukten mit synthetischer H-NS-Bindestelle untersucht.

In Standardansätzen von 10 µl wurden dafür 300 ng Plasmid-DNA (pBK1A/P1 bzw. pBK1A/P2) mit den zu analysierenden Proteinen (H-NS, LRP, H-NS+LRP oder FIS) in 1x KGlu80-Puffer und in Anwesenheit von 50 ng/µl Heparin 10 min bei RT inkubiert.

Die Modifikation wurde dann durch Zugabe von 3 µl DNase I (1:200 mit DNase-Diluent verdünnt) gestartet und nach 30 sec Inkubation bei RT durch Zugabe von 100 µl Stop-Puffer beendet und der Ansatz auf Eis überführt. Anschließend wurde der Ansatz sofort mit 100 µl Phenol/Chloroform und danach mit 100 µl Chloroform extrahiert und die modifizierte DNA durch Zugabe von 300 µl abs. Ethanol in flüssigem Stickstoff gefällt. Das Pellet wurde mit 500 µl 80% Ethanol gewaschen, lyophilisiert (Heto VR-1 Speedvac Concentrator) und bis zur Primer-Extension-Analyse (5.3.7) bei -20°C aufbewahrt.

DNase-Diluent:	20 mM MgCl ₂ 10 mM CaCl ₂ 20 mM Tris/HCl, pH 7.8
Stop-Puffer :	330 mM NaOAc 5 mM EDTA, pH 8.0 1 µg/100 µl Glykogen (immer frisch angesetzt)

5.3.7 Primer-Extension-Analyse

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

Die modifizierte DNA eines DNase I-„*footprint*“-Ansatzes wurde in 70 µl *Aqua dest.* gelöst und auf zwei Primer-Extension-Ansätze (ein Ansatz mit dem Oligo pBK/5F und ein Ansatz mit dem Oligo pBK/3) zu jeweils 35 µl aufgeteilt.

Zu 35 µl modifizierter DNA (ca. 300 ng Plasmid-DNA) wurden 1 µl endmarkiertes ssDNA-Oligonukleotid (ca. 0.5-0.8x 10⁶ cpm/µl) und 4 µl 10 mM NaOH gegeben und vermischt. Die Proben wurden danach zur Denaturierung der Template-DNA für 2 min bei 80°C erhitzt, anschließend sofort auf Eis überführt und dort weitere 5 min inkubiert. Nach Zugabe von 5 µl 10x TMD-Puffer wurde dann die Hybridisierung des Oligonukleotid-Primers an das modifizierte DNA-Template durchgeführt. Hierzu wurde die Probe 3 min bei dem für das entsprechende Oligonukleotid berechneten T_m-Wert inkubiert und anschließend wiederum sofort auf Eis überführt. Zur Berechnung der jeweiligen Hybridisierungstemperatur (T_m-Wert) wurde nach der von Maniatis *et al.* (1982) beschriebenen Formel vorgegangen:

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

Dabei gibt L die Länge des Primers in Nukleotiden und (G+C)% den prozentualen G/C-Gehalt an.

Im Anschluß an die Hybridisierung wurden dem Reaktionsansatz auf Eis 5 µl 4x dNTP-Lösung und 0.7 µl Klenow-Fragment (5 U/µl) zugegeben, gemischt und dann exakt 10 min bei 50°C inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurde 1/3 Volumen PE-Quench-Lösung zugesetzt, die Probe auf Eis überführt und mit 3 Volumen abs. Ethanol in flüssigem Stickstoff gefällt. Das lyophilisierte Pellet (Savant, Speedvac Concentrator) wurde in 5 µl Formamid-Probenpuffer gelöst und gelelektrophoretisch unter denaturierenden Bedingungen analysiert (5.2.8.3).

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

5.3.8 2D-Gelelektrophorese

5.3.8.1 Isoelektrische Fokussierung mit immobilisierten pH-Gradienten (1. Dimension)

Die IEF (isoelektrische Fokussierung) mit immobilisierten pH-Gradienten (IPG) wurde von Bjellqvist *et al.* (1982) eingeführt. Es handelt sich dabei um ein elektrophoretisches Verfahren, bei dem ein Protein unter Einfluß eines elektrischen Feldes bis zu der Position im pH-Gradienten wandert, an der seine Nettoladung null ist. Der pH-Wert, bei dem die Nettoladung eines Proteins null ist, entspricht seinem isoelektrischen Punkt (pI). Neben der Aminosäurenzusammensetzung eines Proteins bestimmen auch Proteinmodifikationen wie z. B. Phosphorylierung oder Glykosylierung den Ladungszustand.

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels 2D-Gelelektrophorese untersucht, ob das verwendete überexprimierte H-NS ebenfalls wie nicht-überexprimiertes H-NS drei verschiedene Isoformen aufweist. Die Fokussierung erfolgte mit der Multiphor II Elektrophoreseeinheit (Multiphor II Electrophoresis unit, Amersham).

Die IPG-Streifen (13 cm) wurden vor der IEF im Rehydratationspuffer über Nacht rehydriert. Gleichzeitig wurde die Proteinprobe in die pH-Streifen eingequellert. Dazu wurden 250 µl Rehydratationspuffer mit DTT (Endkonz. 1%; 10 mg/ml Stammlösung) und 10 µl IPG-Puffer (pH 3-10, nicht-linearer Gradient; Endkonz. 2%) auf 20 µl Proteinprobe (2 µg Protein) gegeben und vorsichtig gemischt. Dann wurde der Rehydratationspuffer mit der Proteinprobe in eine Rehydratationsschale

pipettiert und der IPG-Streifen mit der Gelseite nach unten luftblasenfrei auf die Lösung gelegt. Um eine Austrocknung zu verhindern, wurde der Streifen mit Mineralöl überschichtet.

Am folgenden Tag wurde der IPG-Streifen kurz mit *Aqua dest.* abgespült und das überschüssige Wasser auf Whatman-Papier abgetupft. Danach wurde der IPG-Streifen auf den Multiphor II aufgelegt und mit Mineralöl beschichtet. Quer zu den Streifen wurden zwei mit *Aqua dest.* befeuchtete Elektrodenpapiere angeordnet, so daß sie die Enden des Gels auf dem Streifen bedeckten. Auf den Elektrodenpapieren wurden dann die Elektroden angebracht, wobei die Anode an dem sauren Ende und die Kathode an dem basischen Ende der Streifen lag. Anschließend wurde die Fokussierung mit 50 μ A/IPG-Streifen gestartet.

Bis zur Durchführung der 2. Dimension wurden die IPG-Streifen in Folie eingeschweißt und bei -70°C gelagert.

Rehydratationspuffer:

- 8.48 g Harnstoff (7M)
- 3.05 g Thioharnstoff (2M)
- 0.8 g CHAPS (4%)
- 100 μ l Triton-X 100 (0.5%)
- Spatelspitze Bromphenolblau
- ad 20 ml mit *Aqua dest.*
- in 1 ml Aliquots bei -20°C lagern

5.3.8.2 Äquilibration und SDS-Gelelektrophorese (2. Dimension)

Die Äquilibration sättigt die IPG-Streifen mit dem SDS-Puffersystem und erfolgt in zwei Schritten. Die erste Äquilibrationlösung enthält DTT als Reduktionsmittel und die zweite Lösung Iodacetamid. Durch diese beiden Reduktionsmittel werden die Disulfidbrücken von Proteinen gespalten und anschließend die entstehenden SH-Gruppen alkyliert, wodurch eine Neubildung von Disulfidbrücken verhindert wird.

Für die Äquilibration wurden die IPG-Streifen nach der IEF aufgetaut und in ein Glasröhrchen mit 10 ml der DTT-haltigen Äquilibrationlösung gegeben. Nach 15-minütigem Schütteln auf einem Horizontalschüttler wurde der IPG-Streifen in ein Glasröhrchen mit 10 ml der Iodacetamid-haltigen Äquilibrationlösung überführt. Nach erneutem 15-minütigem Schütteln wurde der IPG-Streifen vorsichtig mit einer Pinzette entnommen und auf Whatman-Papier mit der Gelseite nach oben abgetupft. Dann wurde der IPG-Streifen vorsichtig mit einer Pinzette mit der Gelseite nach vorne zwischen die Glasplatten eines SDS-Geles (5.2.8.4) direkt auf das Sammelgel gelegt. Der Proteinmarker wurde auf ein kleines Stück Whatman-Papier pipettiert und ebenfalls zwischen die Glasplatten auf das Sammelgel gebracht. Zuletzt wurde zur Abdichtung erhitzte SDS-haltige Agaroselösung auf den IPG-Streifen pipettiert. Die Gelelektrophorese erfolgte bei

6 Literaturverzeichnis

- Adhya, S. (1989). Multipartite genetic control elements: communication by DNA loop.
Annual Reviews of Genetics **23**: 227-50
- Afflerbach, H., Schröder, O. und Wagner, R. (1998). Effects of the *Escherichia coli* DNA-binding protein H-NS on rRNA synthesis *in vivo*.
Mol. Microbiol. **28**: 641-653
- Afflerbach, H., Schröder, O. und Wagner, R. (1999). Conformational changes of the upstream DNA mediated by H-NS and FIS regulate *E. coli* *rrnB* P1 promoter activity.
J. Mol. Biol. **286**: 339-353
- Alifano, P., Rivellini, F., Limauro, D., Bruni, C. B. und Carlomagno, M. S. (1991). A consensus motif common to all rho-dependent prokaryotic transcription terminators.
Cell **64**: 553-563
- Argawal, G. K., Asayama, M. und Shirai, M. (1997). A novel bend of DNA *CIT*: changeable bending-center sites of an intrinsic curvature under temperature conditions.
FEMS Microbiol. **147**: 139-145
- Azam, T. A. und Ishihama, A. (1999). Twelve species of the nucleoid-associated protein from *Escherichia coli*.
J. Biol. Chem. **274**: 33105-33113
- Bailly, C., Waring, M. J., Travers, A. A. (1995). Effects of base substitutions on the binding of a DNA-bending protein.
J. Mol. Biol. **253**: 1-7
- Ball, C. A., Osuna, R., Ferguson, K. C. und Johnson, R. C. (1992). Dramatic changes in FIS levels upon nutrient upshift in *Escherichia coli*.
J. Bacteriol. **174**: 8043-8056
- Beidler, J. L., Hilliard, P. R. und Rill, R. L. (1982). Ultrasensitive staining of nucleic acids with silver.
Anal. Biochem. **126**: 374-380
- Bertin, P., Terao, E., Lee, E. H., Lejeune, P., Colson, C., Danchin, A. und Collatz, E. (1994). The H-NS protein is involved in the biogenesis of flagella in *Escherichia coli*.
J. Bacteriol. **176**: 5537-5540
- Bertin, P., Benhabiles, N., Krin, E., Laurent-Winter, C. *et al.* (1999). The structural and functional organization of H-NS-like proteins is evolutionarily conserved in gram-negative bacteria.
Mol. Microbiol. **31**: 319-329
- Bjellqvist, B., Ek, K., Righetti, P. G., Gianazza, E., Görg, A., Westermeier, R. und Postel, W. (1982). Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology, and some applications.
J. Biochem. Biophys. Methods **6**: 317-339

- Blatter, E. E., Ross, W., Tang, H., Gourse, R.L. and Ebright, R. H. (1994). Domain organization of RNA polymerase alpha subunit: C-terminal 85 amino acids constitute a domain capable of dimerization and DNA binding.
Cell **78**: 889-896
- Bloch, V., Yang, Y. *et al.* (2003). The H-NS dimerization domain defines a new fold contributing to DNA recognition.
Nat. Struct. Biol. **10**: 212-218
- Blum, H, Beier, H. und Gross, H. J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamid gels.
Electrophoresis **8**: 93-99
- Bokal IV, A. J., Ross, W. und Gourse, R. L. (1995). The transcriptional activator protein FIS: DNA interactions and cooperative interactions with RNA polymerase at the *Escherichia coli* *rrnB* P1 Promoter.
J. Mol. Biol. **245**: 197-207
- Boyer, H. W. und Roulland-Dussoix, D. (1969). A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*.
J. Mol. Biol. **41**: 459
- Bracco, L., Kotlarz, D., Kolb, A., Diekmann, S. und Buc, H. (1989). Synthetic curved DNA sequences can act as transcriptional activators in *Escherichia coli*.
EMBO J. **8**: 4289-4296
- Bradaczek, C. (1991). Untersuchungen nahe am Promotor P1 des *rrnB*-Operons bindender Proteine aus *E. coli*.
Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Brandi, A., Pon, C. L. und Gualerzi, C. O. (1994). Interaction of the main cold shock protein CS7.4 (CspA) of *Escherichia coli* with the promoter region of *hns*.
Biochimie **76**: 1090-1098
- Brendel, V., Hamm, G. H., Trifonov, E. N. (1986). Terminators of transcription with RNA polymerase from *Escherichia coli*: what they look like and how to find them.
J. Biomol. Struct. Dyn. **3**: 705-723
- Brinkmann, A. B., Dahlke, I., Tuininga, J. E., Lammers, T., Dumay, V., de Heus, E. *et al.* (2000). An Lrp-like transcriptional regulator from the archaeon *Pyrococcus furiosus* is negatively autoregulated.
J. Biol. Chem. **275**: 38160-38169
- Burgess. R. R. und Jendrisak, J. J. (1975). A procedure for the rapid, large scale purification of *E. coli* DNA-dependent RNA polymerase involving polymin P precipitation and DNA cellulose chromatography.
Biochemistry **14**: 4636-4638
- Calvo, J. M. und Matthews, R. G. (1994). The leucine-responsive regulatory protein, a global regulator of metabolism in *Escherichia coli*.
Microbiol. Rev. **58**: 466-490

- Chen, S., Hao, Z., Bieniek, E. und Calvo, J. M. (2001). Modulation of Lrp action in *Escherichia coli* by leucine: effects on non-specific binding of Lrp to DNA. *J. Mol. Biol.* **314**: 1067-1075
- Chen, S., Rosner, M. H. und Calvo, J. M. (2001). Leucine-regulated self association of leucine-responsive regulatory protein (Lrp) from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **312**: 625-635
- Chen, S., Jannolo, M. und Calvo, J. M. (2005). Cooperative binding of the Leucine-responsive regulatory protein (Lrp) to DNA. *J. Mol. Biol.* **345**: 251-264
- Collado-Vides, J., Magasanik, B. und Gralla, J. D. (1991). Control site location and transcriptional regulation in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* **55**: 371-394
- Condon, C., Squires, C. und Squires, C. L. (1995). Control of rRNA transcription in *Escherichia coli*. *Microbiological Reviews* p. 623-645
- Cui, Y., Wang, Q., Stormo, G. D. und Calvo, J. M. (1995). A consensus sequence for binding of Lrp to DNA. *J. Bacteriol.* **177**: 4872-4880
- Cui, Y., Midkiff, M. A., Wang, Q. und Calvo, J. M. (1996). The leucine-responsive regulatory protein (Lrp) from *Escherichia coli*: stoichiometry and minimal requirements for binding to DNA. *J. Biol. Chem.* **271**: 6611-6617
- Dagert, M. und Ehrlich, S. D. (1979). Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene* **6**: 23-26.
- Dame, R. T., Wyman, C., Wurm, R., Wagner, R. und 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**: 2146-2150
- de Boer, H. und Nomura, M. (1979). *In vivo* transcription of rRNA operons in *Escherichia coli* initiates with purine nucleoside triphosphates at the first promoter and with CTP at the second promoter. *J. Biol. Chem.* **254**: 5609-5612
- Dlakic, M. und Harrington, R. E. (1998). DIAMOD: display and modeling of DNA bending. *Bioinformatics* **14**: 326-331.
- Dorman, C. J. (2004). H-NS: a universal regulator for a dynamic genome. *Nature Reviews* **2**: 391-400
- Drew, H. R. (1984). Structural specificities of five commonly used DNA nucleases. *J. Mol. Biol.* **76**: 535-557
- Duester, G. L. und Holmes, W. M. (1980). The distal end of the ribosomal RNA operon *rrnD* of *Escherichia coli* contains a tRNA 1^{thr} gene, two 5s rRNA genes and a transcription terminator. *Nucl. Acids Res.* **8**: 3793-3807

- Ellinger, T., Behnke, D., Bujard, H. und Gralla, J. D. (1994). Stalling of *Escherichia coli* RNA polymerase in the +6 to +12 region *in vivo* is associated with tight binding to consensus promoter elements.
J. Mol. Biol. **239**: 455-465
- Ellwood, M. und Nomura, M. (1982). Chromosomal locations of the genes for rRNA in *Escherichia coli* K-12.
J. Bacteriol. **149**: 458-468
- Engbaek, F., Kjeldgaard, N. O. und Maaloe, O. (1973). Chain growth rate of β -galactosidase during exponential growth and amino acid starvation.
J. Mol. Biol. **75**: 109-118
- Ernsting, B. R., Denninger, J. W., Blumenthal, R. M. und Matthews, R. G. (1993). Regulation of the *gltBDF* operon of *Escherichia coli*: how is a leucine-insensitive operon regulated by the leucine-responsive regulatory protein?
J. Bacteriol. **175**: 7160-7169
- Esposito, D., Petrovic, A., Harris, R., Ono, S., Eccleston, J. F., Mbabaali, A., Haq, I., Higgins, C. F., Hinton, J. C. D., Driscoll, P. C. und Ladbury, J. E. (2002). H-NS oligomerization domain structure reveals the mechanism for high order self-association of the intact protein.
J. Mol. Biol. **324**: 841-850
- Estrem, S.T., Gaal, T., Ross, W. und Gourse, R. L. (1998). Identification of an UP element consensus sequence for bacterial promoters.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95**: 9761-9766
- Falconi, M., Brandi, A., La Teana, A., Gualerzi, C. O. und Pon, C. L. (1996). Antagonistic involvement of FIS and H-NS proteins in the transcriptional control of *hns* expression.
Mol. Microbiol. **19**: 965-975
- Falconi, M., Colonna, B., Prosseda, G., Micheli, G. und Gualerzi, C. O. (1998). Thermoregulation of *Shigella* and *Escherichia coli* EIEC pathogenicity. A temperature-dependent structural transition of DNA modulates accessibility of *virF* promoter to transcriptional repressor H-NS.
EMBO J. **17**: 7033-7043
- Falconi, M., Higgins, N., Spurio, R., Pon, C. L. und Gualerzi, C. O. (1993). Expression of the gene encoding the major bacterial nucleoid protein H-NS is subject to growth-phase control and autoregulation.
Mol. Microbiol. **10**: 273-282
- Finkel, S. E. und Johnson, R. C. (1992). The FIS protein: it's not just for DNA inversion anymore.
Mol. Microbiol. **6**: 3257-3265
- Finn, R. D., Orlova, E. V., Gowen, B., Buck, M., van Heel, M. (2000). *Escherichia coli* RNA polymerase core and holoenzyme structures.
EMBO J. **19**: 6833-6844
- Free, A. und Dorman, C. (1995). Coupling of *Escherichia coli hns* mRNA levels to DNA synthesis by autoregulation: implications for growth phase control.
Mol. Microbiol. **18**: 101-113

- Friedrich, K., Gualerzi, C. O., Lammi, M., Losso, M. A. und Pon, C. L. (1988). Proteins from the prokaryotic nucleoid. Interaction of nucleic acids with the 15 kDa *Escherichia coli* histone-like protein H-NS.
FEBS Lett. **229**: 197-202
- Gaal, T., Ross, W., Blatter, E. E., Tang, H., Jia, X., Krishnan, V. V., Assa-Munt, N., Ebright, R. H. und Gourse, R. L. (1996). DNA-binding determinants of the α subunit of RNA polymerase: novel DNA-binding domain architecture.
Genes and Dev. **10**: 16-26
- Gafny, R., Cohen, S., Nachaliel, N. und Glaser, G. (1994). Isolated P2 rRNA promoters of *Escherichia coli* are strong promoters that are subject to stringent control.
J. Mol. Biol. **243**: 152-156
- Gallant, J. A. (1979). Stringent control in *E. coli*.
Annu. Rev. Genet. **13**: 393-415
- Garcia, J., Cordeiro, T. N., Nieto, J. M., Pons, I., Juarez, A. und Pons, M. (2005). Interaction between the bacterial nucleoid associated proteins Hha and H-NS involves a conformational change of Hha.
Biochemical J. **388**: 755-762
- Garner, M.M. und Revzin, A. (1981). A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the *E. coli* lactose operon regulatory system.
Nucleic Acids Res. **9**: 3047-3060
- Gastens, M. (1999). Konstruktion und Analyse einer synthetischen Transkriptionsfaktorbindungsdomäne.
Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Gourse, R. L., de Boer, H. A. und Nomura, M. (1986). DNA determinants of rRNA synthesis in *E. coli*: growth rate dependent regulation, feedback inhibition, up-stream activation, antitermination.
Cell **44**: 197-205
- Gourse, R. L. Gaal, T., Bartlett, M. S., Appleman, J.A. und Ross, W. (1996). rRNA transcription and growth rate-dependent regulation of ribosome synthesis in *Escherichia coli*.
Annu. Rev. Microbiol. **50**: 64-67
- Gralla, J. D. und Collado-Vides, J. (1996). Organization and function of transcription regulatory elements. In: Neidhard, F. C. Curtiss III, R., Ingraham, J. L. *et al.* (eds).
Escherichia coli and *Salmonella* Cellular and Molecular Biology, Vol. **1**
Washington DC: ASM Press, pp. 1232-45
- Gross, C. A., Chan, C. L. und Lonetto, M. A. (1996). A structure/function analysis of *Escherichia coli* RNA polymerase.
Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Science **351**: 475-482
- Gualerzi, C. O. und Pon C. L. (1986). Bacterial Chromatin. Springer Verlag, Heidelberg

- Hanahan, D. (1985). Techniques for transformation of *E. coli*.
DNA cloning, D. M. Glover (ed.), Vol. I, 121-124
- Haney, S. A., Platko, J. V., Oxender, D. L. und Calvo, J. M. (1992). Lrp, a leucine-responsive protein, regulates branched-chain amino acid transport genes in *Escherichia coli*.
J. Bacteriol. **174**: 108-115
- Harley, C. B. und Reynolds, R. P. (1987). Analysis of *E. coli* promoter sequences.
Nuc. Acids Res. **15**: 2343-2361
- Hawley, D. K. und McClure, W. R. (1983). Compilation and analysis of *Escherichia coli* promoter DNA sequences.
Nucl. Acids Res. **11**: 2237-2255
- Heinemann, M. und Wagner, R. (1997). Guanosine 3', 5'-bis (diphosphate) (ppGpp)-dependent inhibition of transcription from stringently controlled *Escherichia coli* promoters can be explained by an altered initiation pathway that traps RNA polymerase.
Eur. J. Biochem. **247**: 990-999
- Hillebrand, A. (2001). Transkriptionsfaktor- und wachstumsabhängige Regulation der sieben verschiedenen ribosomalen RNA-Operons in *Escherichia coli*.
Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Hillebrand, A., Wurm, R., Menzel, A. und Wagner, R. (2005). The seven *E. coli* ribosomal RNA operon upstream regulatory regions differ in structure and transcription factor binding efficiencies.
Biol. Chem. **386**: in press
- Hillen, W., Klein, R. D. und Wells, R. D. (1981). Preparation of milligram amounts of 21 DNA restriction fragments.
Biochem. **29**: 3748-3756
- Hirvonen, C. A., Ross, W. *et al.* (2001). Contributions of UP elements and the transcription factor FIS to expression from the seven *rrn* P1 promoters in *Escherichia coli*.
J. Bacteriol. **183**: 6305-6314
- Hsu, L. M. (1996). Quantitative parameters for promoter clearance.
Meth. Enzymol. **273**: 59-71
- Huang, R. und Reusch, R. N. (1996). Poly(3-hydroxybutyrate) is associated with specific proteins in the cytoplasm and membranes of *Escherichia coli*.
J. Biol. Chem. **271**: 22196-22202
- Hübner, P. und Arber, W. (1989). Mutational analysis of a prokaryotic recombinational enhancer element with two functions.
EMBO J., **8**: 577-585
- Igarashi, K., Fujita, N., Ishihama, A. (1991). Identification of a subunit assembly domain in the alpha subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase.
J. Mol. Biol. **218**: 1-6
- Ish-Horowitz, D. und Burke, J. F. (1981). Rapid and efficient cosmid cloning.
Nucleic Acids Res. **9**: 2989

- Jin, D. J., Burgess, R. R., Richardson, J. P., Gross, C. A. (1992). Termination efficiency at rho-dependent terminators depends on kinetic coupling between RNA polymerase and rho.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **89**: 1453-1457
- Johansson, J., Dagberg, B., Richet, E. und Uhlin, B. E. (1998). H-NS and StpA proteins stimulate expression of the maltose regulon in *Escherichia coli*.
J. Bacteriol. **180**: 6117-6125
- Johansson, J., Eriksson, S., Sonden, B., Wai, S. N. und Uhlin, B. E. (2001). Heteromeric interactions among nucleoid-associated bacterial proteins: localization of StpA-stabilizing regions in H-NS of *Escherichia coli*.
J. Bacteriol. **183**: 2343-2347
- Kahmann, R., Rudt, F., Koch, C. und Mertens, G. (1985). Inversion in bacteriophage Mu DNA is stimulated by a site within the invertase gene and a host factor.
Cell **41**:771-780
- Kainz, M. und Roberts, J. (1992). Structure of transcription elongation complexes *in vivo*.
Science **255**: 838-841
- Kassavetis, G. A. und Chamberlin, M. J. (1981). Pausing and termination of transcription within the early region of bacteriophage T7 DNA *in vitro*.
J. Biol. Chem. **256**: 2777-2786
- Kerppola, T. K. und Curran, T. (1991). Fos-Jun heterodimers and Jun homodimers bend DNA in opposite orientations: implications for transcription factor cooperativity.
Cell **66**: 317-326
- Koch, C., Ninnemann, O., Fuss, H. und Kahmann, R. (1991). The N-terminal part of the *E. coli* binding protein FIS is essential for stimulating site-specific DNA inversion but is not required for specific DNA binding.
Nucleic Acids Res. **19**: 5915-5922
- Komp, B. (2000). Einfluß synthetischer "upstream"-Regionen auf die Aktivität des *E. coli rrnB* P2 Promotors in Gegenwart von H-NS.
Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Korzheva, N., Mustaev, A. *et al.* (2000). A structural model of transcription elongation.
Science **289**: 619-625
- Kostrewa, D., Granzin, J., J., Stock, D., Choe, H-W., Labahn, J. und Saenger W., (1992). Crystal structure of the Factor for Inversion Stimulation FIS at 2.0 Å resolution.
J. Mol. Biol. **226**: 209-226
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature **227**: 680-685

- Lammi, M., Paci, M., Pon, C. L., Losso, M. A., Miano, Pawlik, R. T., Gianfranceschi, G. L. und Gualerzi, C. O. (1984). Proteins from the prokaryotic nucleoid: biochemical and ¹H-NMR studies on three bacterial histone-like proteins. *Adv. Exp. Med. Biol.* **179**: 467-477
- Landgraf, J. R., Wu, J. Calvo, J. M. (1996). Effects of nutrition and growth rate on Lrp levels in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **178**: 6930-6936
- Leonard, P. M., Smits, S. H. J., Brinkman, A. B., de Vos, W. M., Van der Oost, J., Rice, D. W. und Rafferty, J. B. (2001). Crystal structure of the Lrp-like transcriptional regulator from the archaeon *Pyrococcus furiosus*. *EMBO J.* **20**: 990-997
- Liebig, B. und Wagner, R. (1995). Effects of different growth conditions on the *in vivo* activity of the tandem *Escherichia coli* ribosomal RNA promoters P1 und P2. *Mol. Gen. Genet.* **249**: 328-335
- Lin, R. T., D'Ari, R. und Newman, E. B. (1990). The leucine regulon of *Escherichia coli* K-12: a mutation in *rbIA* alters expression of L-Leucine-dependent metabolic operons. *J. Bacteriol.* **172**: 4529-4535
- Lindahl, L. und Zengel, J. M. (1986). Ribosomal genes in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Genet.* **20**: 297-326
- Lisser, S. und Margalit, H. (1993). Compilation of *E. coli* mRNA promoter sequences. *Nucl. Acids Res.* **21**: 1507-1516
- Liu, Q. und Richardson, C. C. (1993). Gene 5.5 protein of bacteriophage T7 inhibits the nucleoid protein H-NS of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 1761-1765
- Lund, E. und Kjeldgaard, N. O. (1972). Metabolism of guanosine tetraphosphate in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **28**: 316-326
- Maeda, H., Fujita, N. und Ishihama, A. (2000). Competition among seven *Escherichia coli* σ subunits: relative binding affinities to the core RNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* **28**: 3497-3503
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. und Sambrook, J. (1982). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Meng, W., Belyaeva, T., Savery, N. J., Busby, S. J. W., Ross, W., Gaal, T., Gourse, R. L. und Thomas, M. S. (2001). UP element-dependent transcription at the *Escherichia coli* *rrnB* P1 promoter: positional requirements and role of the RNA polymerase α subunit linker. *Nucleic Acids Research* **29**: 4166-4178

- Menzel, A. (2003). Interaktion bakterieller Transkriptionsfaktoren mit den regulatorischen Regionen der sieben verschiedenen *E. coli* rRNA-Operons.
Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Mescas, J., Coring, D. W. und Gross, C. A. (1991). Development of RNA polymerase-promoter contacts during open complex formation.
J. Mol. Biol. **220**: 585-597
- Milan, S., D'Ari, L. und Chamberlin, M. J. (1999). Structural analysis of ternary complexes of *Escherichia coli* RNA polymerase: ribonuclease footprinting of the nascent RNA in complexes.
Biochemistry **38**: 218-225
- Mojica, F. J. und Higgins, C. F. (1997). *In vivo* supercoiling of plasmid and chromosomal DNA in an *Escherichia coli hns* mutant.
J. Bacteriol. **179**: 3528-3533
- Mori, H., Dammel, C., Becker, E., Triman, K. und Noller, H. F. (1990). Single base alterations upstream of the *E. coli* 16S coding region result in temperature sensitive 16S rRNA expression.
Biochim. et Biophys. Acta **1050**: 323-327
- Muffler, A., Fischer, D. und Hengge-Aronis, R. (1996). The RNA-binding protein HF-I, known as a host factor for phage Q β RNA replication is essential for *rpoS* translation in *Escherichia coli*.
Genet. Dev. **10**: 1143-1151
- Mukherjee, K., Nagai, H., Shimamoto, N., Chatterji, D. (1999). GroEL is involved in activation of *Escherichia coli* RNA polymerase devoid of the ω subunit *in vivo*.
Eur. J. Biochem. **266**: 228-235
- Murray, H. D., Appleman, J. A., Gourse, R. L. (2003). Regulation of the *Escherichia coli rrnB* P2 promoter.
J. Bacteriol. **185**: 28-34
- Muskhelishvili, G., Travers, A. A., Heumann, H. und Kahmann, R. (1995). FIS and RNA polymerase holoenzyme form a specific nucleoprotein complex at a stable RNA promoter.
EMBO J. **14**: 1446-1452
- Nash, H. A. In Neidhardt, F. C., Ingraham, J. L., Low, K. B., Magasanik, B., Schaechter, M. und Umberger, H. E. (1996). (eds). *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and Molecular Biology, 2nd Edn.
- Newlands, J. T., Ross, W., Gosink, K. K. und Gourse, R. L. (1991). Factor-independent activation of *Escherichia coli* rRNA transcription: II. Characterization of complexes of *rrnB* P1 promoters containing or lacking the upstream activator region with *Escherichia coli* RNA polymerase.
J. Mol. Biol. **220**: 569-583
- Newman, E. B. und Lin, R. (1995). Leucine-responsive regulatory protein: a global regulator of gene expression in *E. coli*.
Ann. Rev. Microbiol. **49**: 747-775

- Ninnemann, O., Koch, C., Kahmann, R. (1992). The *E. coli fis* promotor is subject to stringent control and autoregulation.
EMBO J. **11**: 1075-1083
- Nogueira, T. und Springer, M. (2000). Post-transcriptional control by global regulators of gene expression in bacteria.
Curr. Opin. Microbiol. **3**: 154-158
- Nudler, E., Gusarov, I., Avetissova, E., Kozlov, M. und Goldfarb, A. (1998). Spatial organization of transcription elongation complex in *Escherichia coli*.
Science **281**: 424-428
- Oostra, B. A., van Vliet, A. J., Ab, G. und Gruber, M. (1981). Enhancement of ribosomal ribonucleic acid synthesis by deoxyribonucleic acid gyrase activity in *Escherichia coli*.
J. Bacteriol. **148**: 782-787
- Osuna, R., Finkel, S. E. und Johnson, R. C. (1991). Identification of two functional regions in FIS: the N-terminus ist required to promote Hin-mediated DNA inversion but not λ excision.
EMBO **10**: 1593-1603
- Owen-Hughes, T. A., Pavitt, G. D., Santos, D. S., Sidebotham, J. M., Hulton, C. S., Hinton, J. C. und Higgins, C. F. (1992). The chromatin-associated protein H-NS interacts with curved DNA to influences DNA topology and gene expression.
Cell **71**: 255-265
- Paul, B. J., Ross, W., Gaal, T. und Gourse, R. L. (2004). rRNA transcription in *Escherichia coli*.
Annu. Rev. Genet. **38**: 749-770
- Paytubi, S., Madrid, C., Forns, N. Nieto, J. M., Balsalobre, C., Uhlin, B. E. und Juarez, A. (2004). YdgT, the Hha paralogue in *Escherichia coli*, forms heteromeric complexes with H-NS and StpA.
Mol. Microbiol. **54**: 251-263
- Pedersen, F. S., und Kjeldgaard, N. O. (1977). Analysis of the *relA* gene produkt of *Escherichia coli*.
Eur. J. Biochem. **76**: 91-97
- Perez-Martin, J., Rojo, F. und de Lorenzo, V. (1994). Promoters responsive to DNA bending: a common theme in prokaryotic gene expression.
Microbiol. Rev. **58**: 268-290
- Perez-Martin, J. und Espinosa, M. (1993). Protein-induced bending as a transcriptional switch.
Science **260**: 805-807
- Plaskon, R. R. und Wartel, R. M. (1987). Sequence distributions associated with DNA-curvature are found upstream of strong *E. coli* promoters.
Nucleic Acids Research **15**: 785-796

- Polyakov A., Severinova, E. und Darst, S. A. (1995). Three-dimensional structure of *E. coli* core RNA polymerase: promoter binding and elongation conformations of the enzyme.
Cell **83**: 365-373
- Porter, M. E. und Dorman, C. J. (1994). A role for H-NS in the thermo-osmotic regulation of virulence gene expression in *Shigella flexneri*.
J. Bacteriol. **176**: 4187-4191
- Prosseda, G., Falconi, M., Giangrossi, M., Gualerzi, C. O., Micheli, G. und Colonna, B. (2004). The *virF* promoter in *Shigella*: more than just a curved DNA stretch.
Mol Microbiol. **51**: 523-537
- Ptashne, M. und Gann, A. (1997). Transcriptional activation by recruitment.
Nature **386**: 569-577
- Pul (2004). Charakterisierung der DNA-Wechselwirkung chromatinassoziierter Proteine mit regulatorischen Regionen bakterieller Promotoren.
Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Rao, L., Ross, W., Appleman, J. A., Gaal, T., Leirimo, S., Schlax, J. P. und Gourse, R. L. (1994). Factor-independent activation of *rnnB* P1: an „extended“ promoter with an upstream element that dramatically increases promoter strength.
J. Mol. Biol. **235**: 1421-1435
- Record, M. T., Reznikoff, W. S., Craig, M. L., McQuade, K. L. und Schlax, J. P. (1996). *Escherichia coli* RNA polymerase ($E\sigma^{70}$), promoters, and the kinetics of the steps of transcription initiation. In: F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. R. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology, 2nd ed., ASM Press, Washington, D. C., p. 792-820
- Renzoni, D., Esposito, D., Pfuhl, M., Hinton, J. C. D., Higgins, C. F., Driscoll, P. C. und Ladbury, J. E. (2001). Structural characterization of the N-terminal oligomerization domain of the bacterial chromatin-structuring protein, H-NS.
J. Mol. Biol. **306**: 1127-1137
- Reusch, R., Shabalin, O. et al. (2002). Posttranslational modification of *E. coli* histone-like protein H-NS and bovine histones by short-chain poly-(R)-3-hydroxybutyrate (cPHB).
FEBS Lett. **527**:319-322
- Richardson, J. P. (1993). Transcription termination.
Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. **28**: 1-30
- Richter, D. (1979). *In vitro* synthesis and decay of guanosine-3',5'-bis-diphosphate (ppGpp). In Chambliss, D., Graven, G. R., Davies, J., Davies, K., Kahan, M. and Nomura, M. (ed), *Ribosomes: structure, function and genetics*. University Park Press Baltimore, 743-765
- Riggs, D. L., Mueller, R. D., Kwan, H. S., Artz, S. W. (1986) Promoter domain mediates guanosine tetraphosphate activation of the histidine operon.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**: 9333-9337

- Rimsky, S., Zuber, F., Buckle, M. und Buc, H. (2001). A molecular mechanism for the repression of transcription by the H-NS protein.
Mol. Microbiol. **42**: 1311-1323
- Rimsky, S. (2004). Structure of the histone-like protein H-NS and its role in regulation and genome superstructure.
Curr. Opin. Microbiol. **7**: 109-114
- Rippe, K., von Hippel, P. und Langowski, J. (1995). Action at a distance: DNA-looping and initiation of transcription.
Trends in Biochemical Sciences **20**: 500-6
- Ross W. Thomson, J. F., Newlands, J. T. und Gourse, R. L. (1990). *E. coli* FIS protein activates ribosomal RNA transcription *in vitro* and *in vivo*.
EMBO J. **9**: 3733-3742
- Ross, W., Gosink, K. K., Salomon, J., Igarashi, K., Zou, C., Ishihama, A., Severinov, K. und Gourse, R. L. (1993). A third recognition element in bacterial promoters: DNA binding by the α -subunit of RNA polymerase.
Science **262**: 1407-1413
- Sands, M. K. und Roberts, R. B. (1952). The effects of a tryptophan-histidine deficiency in a mutant of *Escherichia coli*.
J. Bacteriol. **63**: 505-511
- Sarmientos, P. und Cashel, M. (1983). Carbon starvation and growth rate-dependent regulation of the *Escherichia coli* ribosomal RNA promoters: differential control of dual promoters.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **80**: 7010-7013
- Sasse-Dwight, S. und Gralla, J. D. (1989). KMnO_4 as a probe for *lac* promoter DNA melting and mechanism *in vivo*.
J. Biol. Chem. **264**: 8074-8081
- Schleif, R. (1992). DNA looping.
Annual Reviews of Genetics **61**: 199-223
- Schmid, M. (1990). More than just „histone-like“ proteins.
Cell **63**: 451-3
- Schröder, O. (1999). Funktionelle und strukturelle Charakterisierung des bakteriellen Transkriptionsfaktors H-NS.
Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Schröder, O. und 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**: 737-748
- Shindo, H., Iwaki, T., Ieda, R., Kurumizaka, H., Ueguchi, C., Mizuno, T., Morikawa, S., Nakamura, H., Kuboniwa, H. (1995). Solution structure of the DNA binding domain of a nucleoid-associated protein, H-NS, from *Escherichia coli*.
FEBS Lett. **360**: 125-131

- Shindo, H., Ohnuki, A., Ginba, H., Katoh, E., Ueguchi, C., Mizuno, T., Yamazaki, T. (1999). Identification of the DNA binding surface of H-NS protein from *Escherichia coli* by heteronuclear NMR spectroscopy.
FEBS Lett. **455**: 63-69
- Sigmund, C. D., Hayebi, M., Borden, A. und Morgan, E. (1988). Antibiotic resistance mutations in ribosomal RNA genes of *Escherichia coli*.
Methods Enzymol. **164**: 673-690
- Spassky, A., Rimsky, S., Garreau, H. und Buc, H. (1984). H1a, an *E. coli* DNA-binding protein which accumulates in stationary phase, strongly compacts DNA *in vitro*.
Nucl. Acids Res. **12**: 5321-5340
- Spassky, A., Kirkegaard, K. und Buc, H. (1985). Changes in the DNA structure of the *lac* UV5 promoter during formation of an open complex with *Escherichia coli* RNA polymerase.
Biochemistry **24**: 2723-2731
- Spassky, A. (1986). Visualization of the movement of the *Escherichia coli* RNA polymerase along the *lac* UV5 promoter during the initiation of the transcription.
J. Mol. Biol. **188**: 99-103
- Spurio, R., Falconi, M., Brandi, A., Pon, C. L. und Gualerzi, C. O. (1997). The oligomeric structure of nucleoid protein H-NS is necessary for recognition of intrinsically curved DNA and for DNA bending.
EMBO J. **16**: 1795-1805
- Tippner, D. (1992). Charakterisierung einer Proteinfraction aus *E. coli* mit spezifischen Bindungseigenschaften an einem ribosomalen RNA Promotor. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Tippner, D., Afflerbach, H., Bradaczek, C. und Wagner, R. (1994). Evidence for a regulatory function of the histone-like *Escherichia coli* protein H-NS in ribosomal RNA synthesis.
Mol. Microbiol. **11**: 589-604
- Tippner, D. und 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**: 22243- 22247
- Topping, T.B., Hoch, D. A., Gloss, L. M. (2004). Folding mechanism of FIS, the intertwined, dimeric factor for inversion stimulation.
J. Mol. Biol. **335**: 1065-1081
- Travers, A. und Muskhelishvili, G. (2005). DNA supercoiling – a global transcriptional regulator for enterobacterial growth?
Nature Reviews **3**: 157-169
- Tullius, D. (1989). Physical studies of protein-DNA complexes by footprinting.
Annu. Rev. Biophys. Biophys. Biochem. **18**: 213-237

- Tupper, A. E., Owen-Hughes, T. A., Ussery, D. W., Santos, D. S., Ferguson, D. J. P., Sidebotham, J. M., Hinton, J. C. D. und Higgins, C. F. (1994). The chromatin-associated protein H-NS alters DNA topology *in vitro*.
EMBO **13**: 258-268
- Ueguchi, C., Kakeda, M. und 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**: 171-178
- Ueguchi, C. und Mizuno, T. (1993). The *Escherichia coli* nucleoid protein H-NS functions directly as a transcriptional repressor.
EMBO **12**: 1039-1046
- Ussery, D. W., Hinton, J. D. C., Jordi, B. J. A. M., Granum, P. E., Seirafi, A., Stephen, R. J., Tupper, A. E., Berridge, G., Sidebotham, J. M. und Higgins, C. (1994). The chromatin-associated protein H-NS.
Biochimie **76**: 968-980
- Varshavsky, A. J., Nedospasov, S. A., Bakajeva, V. V. und Gergiev, G. P. (1977). Histone-like proteins in the purified *Escherichia coli* desoxyribonucleoprotein.
Nucl. Acids Res. **4**: 2725-2745
- Vieira, J. und Messing, J. (1982). The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers.
Gene **19**: 259-268
- Vogel, U. und Jensen, K. F. (1994). The RNA chain elongation rate in *Escherichia coli* depends on the growth rate.
J. Bacteriol. **176**: 2807-2813
- Wagner, R. (1994). The regulation of ribosomal RNA synthesis and bacterial cell growth.
Arch. Microbiol. **161**: 100-109
- Wagner, R. (2000). Transcription Regulation in Prokaryotes.
Oxford University Press
- Walstrom, K. M., Dozono, J. M., Robic, S., von Hippel, P. H. (1997). Kinetics of the RNA-DNA helicase activity of *Escherichia coli* transcription termination factor rho. 1. Characterization and analysis of the reaction.
Biochemistry **36**: 7980-7992
- Wang, J. Y. und Syvanen, M. (1992). DNA twist as a transcriptional sensor for environmental changes.
Mol. Microbiol. **6**: 1861-1866
- Wang, Q. und Calvo, J. M. (1993). Lrp, a global regulatory protein of *Escherichia coli*, binds cooperatively to multiple sites and activates transcription of *ilvIH*.
J. Mol. Biol. **229**: 306-318
- Wang, Q., Sacco, M., Ricca, E., Lago, C. T., De Felice, M. und Calvo, J. M. (1993). Organization of binding sites upstream of *ilvIH* in *Salmonella typhimurium*.
Mol. Microbiol. **7**: 883-891

- Williams, R. M. und Rimsky, S. und Buc, H. (1996). Probing the structure, function, and interactions of the *Escherichia coli* H-NS and StpA proteins by using dominant negative derivatives.
J. Bacteriol. **178**: 4335-4343
- Williams, R. M. und Rimsky, S. (1997). Molecular aspects of the *E. coli* nucleoid protein, H-NS: a central controller of gene regulatory networks.
FEMS Microbiol. Letters **156**: 175-185
- Williams, D. A., Ryan, C. W., Platko, J. V. und Calvo, J.M. (1991). Characterization of Lrp, an *Escherichia coli* regulatory protein that mediates a global response to leucine.
J. Biol. Chem. **256**: 10768-10774
- Yamada, H., Muramatsu, S. und Mizuno, T. (1990). An *Escherichia coli* protein that preferentially binds to sharply curved DNA.
J. Biochem. **108**: 420-425
- Yamada, H., Yoshida, T., Tanaka, K., Sasaki, C., Mizuno, T. (1991). Molecular analysis of the *Escherichia coli* *hns* gene encoding a DNA-binding protein, which preferentially recognizes curved DNA sequences.
Mol. Gen. Genet. **230**: 332-336
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. und Messing, J. (1985). Improved M 13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors.
Gene **33**: 103
- Yuan, H. S., Finkel, S. E., Feng, J. A., Kaczor-Grzeskowiak, M., Johnson, R. C. und Dickerson, R. E. (1991). The molecular structure of wild-type and a mutant FIS protein: relationship between mutational changes and recombinational enhancer function or DNA binding.
Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A. **88**: 9558-9562
- Zabeau, M. und Roberts, R. (1979). The role of restriction endonucleases in molecular genetics. In: Taylor, J. H. (ed.), Molecular genetics. Academic Press, New York, Part III, 1-63
- Zacharias, M., Göringer, H. U., Wagner, R. (1989). Influence of the GCGC discriminator motif introduced into the ribosomal RNA P2- and tac promoter on growth rate control and stringent sensitivity.
EMBO J. **11**: 3357-3363
- Zacharias, M., Theissen, G., Bradaczek, C. und Wagner, R. (1991). Analysis of sequence elements important for the synthesis and control of ribosomal RNA in *E. coli*.
Biochimie **73**: 699-712
- Zacharias, M., Göringer, H. U., Wagner, R. (1992). Analysis of the FIS-dependent and FIS-independent transcription activation mechanism of the *Escherichia coli* ribosomal RNA P1 promoter.
Biochem. **31**: 2621-2628

- Zhi, J., Mathew, E. und Freundlich, M. (1999). Lrp binds to two regions in the *dadAX* promoter region of *Escherichia coli* to repress and activate transcription directly.
Mol. Microbiol. **32**: 29-40
- Zhi, H., Wang, X., Cabrera, J. E., Johnson, R. C. und Jin, D. J. (2003). Fis stabilizes the interaction between RNA polymerase and the ribosomal promoter *rrnB* P1, leading to transcriptional activation.
J. Biol. Chem. **278**: 47340-47349

7 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
A260, 280	Absorption bei 260 oder 280 nm
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
Amp	Ampicillin
AMV-RT	<i>Avian myeloblastosis virus</i> - Reverse Transkriptase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Bis	Bisacrylamid
BP	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytidin
°C	Grad Celsius
Ci	Curie (2.22×10^{12})
CIP	Kälberdarmphosphatase
cm	Zentimeter
cpm	Zerfälle/min (counts per minute)
CRP	„Catabolite regulator protein“
CTP	Cytidintriphosphat
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddATP	Didesoxyadenosintriphosphat
ddCTP	Didesoxycytidintriphosphat
ddGTP	Didesoxyguanosintriphosphat
ddTTP	Didesoxythymidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMS	Dimethylsulfat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DSR	„Downstream Sequence Regions“
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenbis(oxyethylenitrilo)tetraacetat
FIS	„Factor for inversion stimulation“
g	Gramm
G	Guanosin

GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H-NS	„Histone-like nucleoid structuring protein“
k	kilo (10^3)
kB	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KGlu	Kaliumglutamat
l	Liter
λ	lambda = Wellenlänge
LRP	“Leucine-responsive regulatory protein”
m	milli (10^{-3})
M	mol/l
mA	Milliampere
MCS	multiple Klonierungsstelle
mg	Milligramm
min	Minute
mm	Millimeter
mM	millimolar
μ	mikro (10^{-6})
μ g	Mikrogramm
μ M	Mikromolar
n	nano (10^{-9})
NS	Nukleinsäure
NT	Nukleotide
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD	optische Dichte
p	pico (10^{-12})
[32 P]	Phosphorisotop (Massenzahl 32)
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PE	Primer Extension
PEG	Polyethylenglykol
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
Poly (dl-dC)	Poly-Desoxyinosyl-Desoxycytidyl-Säure
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
<i>rrn</i>	ribosomale Transkriptionseinheit
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
ss	einzelsträngig
T	Thymidin

Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit, Aktivitätseinheit
UAS	„Upstream Activating Sequences“
üN	über Nacht
UV	ultraviolett
V	Volt
VIS	sichtbares Licht
v/v	Volumenprozent
W	Watt
w/v	Gewichtsprozent
z. B.	zum Beispiel

Eidesstattliche Erklärung

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

Düsseldorf, 21. Juni 2005

Bianca Lux