Charakterisierung des Einflusses der zellulären Effektoren ppGpp und DksA auf das Initiationsverhalten von *E. coli* RNA-Polymerasen an stringent und nicht stringent regulierten Promotoren

Inaugural-Dissertation

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

Vorgelegt von

Tommy Agyenim

Aus Duisburg

Düsseldorf 2014

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

Abgabedatum: 16.06.2014
Tag der mündlichen Prüfung: 08.07.2014

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

Referent: Prof. Dr. Rolf Wagner
Korreferent: Prof. Dr. Dieter Willbold

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich diese Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie Zitate kenntlich gemacht habe.

Düsseldorf, den

(Tommy Agyenim)

Zusammenfassung

Unter natürlichen Bedingungen befinden sich Bakterien unentwegt unter Anpassungsdruck an die Umwelt. Die Anpassung auf Aminosäurenmangel geschieht über ein komplexes regulatorisches Netzwerk, welches Stringente Kontrolle genannt wird. Die auffälligsten Reaktionen dieser globalen Antwort sind die abrupte Inhibierung der Synthese stabiler rRNAs und tRNAs, sowie die Induktion der Aminosäurenbiosynthese inklusive des Aminosäurentransports. In *Escherichia coli* sind die Schlüsseleffektoren dieser Stringenten Kontrolle das Alarmon Guanosin-3′, 5′ -bispyrophosphat (ppGpp) sowie das Protein DksA. Letzteres wurde erst einige Jahre nach der Entdeckung von ppGpp und seiner Bedeutung für die Stringente Kontrolle anhand divergierender Ergebnisse aus *in vivo* Analysen und DksA-freien *in vitro* Ansätzen als Modulator der Stringenten Kontrolle identifiziert.

Die vorliegende Arbeit befasst sich in den ersten beiden Teilen mit grundlegenden Mechanismen der Regulation stringenter Promotoren. Hierbei lag das Augenmerk zum einen auf der Bedeutung der Startnukleotide für die ppGpp-Sensitivität ribosomaler rRNA P1-Promotoren und zum anderen auf der Bedeutung der RNA-Polymerase Untereinheit ω für die Regulation stringenter Promotoren. In *in vitro* Transkriptionsanalysen konnte gezeigt werden, dass die rRNA P1-Sensitivität auf ppGpp unter bestimmten Nukleotid-Bedingungen stark von der Startnukleotidsequenz der jeweiligen Promotoren abhängt. In diversen Analysen konnte bestätigt werden, dass die ω-Untereinheit der *Escherichia coli* RNA-Polymerase eine prominente Rolle in der ppGpp-vermittelten Regulation ribosomaler P1-Promotoren einnimmt. Dieses konnte durch DksA kompensiert werden. Die Regulation des *hisG*- und des *tac*-Promotors war, wie erwartet, in keiner der getesteten Bedingungen durch ω beeinflusst. Auch gelang es nicht, im Rahmen der durchgeführten Analysen der ω-Untereinheit eine Beteiligung an der Bildung des offenen binären Transkriptionskomplexes nachzuweisen, wie sie beispielsweise für die σ-Untereinheit der RNA-Polymerase bekannt ist.

Der dritte Teil umspannt vergleichende Proteomanalysen, in denen mittels 2D-Elektrophoresen der Einfluss von DksA unter stringenten Bedingungen auf

Proteinebene analysiert wurde. Hierzu wurde nach Auslösen der Stringenten Kontrolle Gesamtproteinextrakt, sowohl aus einem *Escherichia coli* ΔdksA- als auch aus einem WT-Stamm, isoliert. Bei der Auswertung der differentiell exprimierten Proteine wurde sich auf die Proteine konzentriert, deren veränderte Synthese aus dem Fehlen des DksA-Proteins während der Stringenten Kontrolle herrührt. MALDI-TOF-Analysen ergaben, dass dieses vorwiegend auf Proteine der Proteinbiosynthese zutraf. Weiterhin konnten Proteine des Kohlenhydratstoffwechsels, des Purin/Pyrimidinstoffwechsels, des DNA-Reparaturmecha-nismus und der Fettsäuren- bzw. Zellwandsynthese identifiziert werden, die ebenfalls obige Anforderungen erfüllten.

Summary

Under natural circumstances bacteria are permanently exposed to environmental stress. Aminoacid starvation leads to an activation of a complex regulatory network named stringent response to compensate this limitations. One of the hallmarks of the stringent response is the rapid inhibition of stable RNA synthesis and the induction of aminoacid biosynthesis as well as aminoacid transportmechanism. In *Escherichia coli* this is mainly initiated by the function of the alarmone guanosine 3', 5'-bispyrophosphate (ppGpp) and the protein DksA. Many years after the discovery of ppGpp and its involvement in the stringent regulation, DksA was shown to be a modulator of stringent control due to discrepancies of *in vivo* analysis and DksA free *in vitro* studies.

The first two parts of this study has been done to analyze the basic mechanism behind the regulation of stringent promoters. It has been focused on the involvement of the start nucleotides in the ppGpp dependent regulation of rRNA-P1 promoters as well as on the involvement of the ω subunit of the RNA-polymerase in the regulation of stringent controlled promoters. It has been shown by *in vitro* transcription analysis that the sensitivity of rRNA P1 to ppGpp under certain nucleotide conditions strongly depends on the start nucleotide sequence of the particular promoter. In different analysis of this study it has been confirmed that the ω-subunit in *Escherichia coli* RNA-polymerase is an important factor in regulation of ribosomal P1 promoters by ppGpp. This dependence of omega is compensated by the activity of DksA. As expected there was no impact of ω on the regulation of the *hisG* promoter and the *tac* promoter. It is important to say that this study fails to identify a participation of ω in the composition of the open binary complex as it is known for the σ-subunit of the RNA-polymerase for example.

The third part of this study deals with comparative proteome analysis done by 2D-elektrophoresis to analyze the impact of DksA under situation of stringent control on protein level. After induction of the stringent control total protein extract of the wt and ΔdksA strains was isolated. Evaluation of the differential synthesized proteins was concentrated on those proteins whose synthesis was changed in situations of stringent control due to the deletion of DksA. MALDI-TOF analysis shows that these proteins mainly belong to proteins of the protein biosynthesis. Additionally, proteins of the

carbonhydrate metabolism, the purine/pyrimidine metabolism, the DNA repair mechanism as well as the fatty acid metabolism and the cell wall synthesis were shown to be part of these DksA dependent proteins.

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS **I**

ABBILDUNGSVERZEICHNIS **VI**

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS **VIII**

1 EINLEITUNG **1**

1.1 Anpassung von Bakterien an veränderte Umweltbedingungen **2**

1.2 Aufbau und Funktion der *E. coli* RNAP in der Anpassung der Genexpression **3**

1.2.1 Multisubunitstruktur und Zusammensetzung der *E. coli* RNAP 3

1.2.2 Eigenschaften der *E. coli* RNAP-α-Untereinheit 4

1.2.3 Charakterisierung der β- und β`-RNAP-Untereinheiten in *E. coli* 5

1.2.4 Die funktionelle Bedeutung der ω-Untereinheit der *E. coli* RNAP 6

1.2.5 Die Bedeutung der *E. coli* σ-RNAP-Untereinheit 7

1.2.6 Struktur der *E. coli* RNAP 8

1.3 Ablauf der Transkription in *Escherichia coli* **10**

1.3.1 Die Transkriptioninitiation in *E. coli* 10

1.3.2 Charakterisierung der Elongationsreaktion während der Gentranskription in *E. coli* 12

1.3.3 Grundlegende Prinzipien der Transkriptionstermination in *E. coli* 13

1.4 Transkriptionsstartregulierung in *Escherichia coli* **14**

1.4.1 Charakterisierung der Strukturen und Funktionen von Promotoren 14

1.4.2 Unterschiede in den Promotoraktivitäten in *E. coli* 16

1.5 Grundlegende Mechanismen in der Regulation ribosomaler RNA in *Escherichia coli* **17**

1.5.1 Redundanz ribosomaler Promotoren in *E. coli* 18

1.5.2 Charakteristische Strukturmotive ribosomaler *E. coli* Promotoren 18

1.6 Die Stringente Kontrolle **20**

1.6.1 (p)ppGpp als Vermittler der Stringenten Kontrolle 21

1.6.2 DksA als Transkriptionsfaktor in *E. coli* 24

1.7 Der *E. coli tac*-Promotor **27**

1.7.1 Strukturelemente des *tac* -Promotors 27

1.8 Der *hisG*-Promotor in *E. coli* 28

1.8.1 Strukturelemente positiv stringent regulierter Promotoren am Beispiel des *E. coli* *hisG*-Promotors 28

1.9 Fragestellung und Konzeption der vorgelegten Arbeit 29

2 MATERIAL 30

2.1 Allgemeines 30

2.2 Eingesetzte Bakterienstämme 30

2.3 Verwendete Plasmide 31

2.4 Relevante Nukleinsäuren und Nukleotide 32

2.4.1 Relevante DNA-Fragmente 32

2.4.2 Oligonukleotide 33

2.4.3 Nukleotide 34

2.5 Verwendete Proteine 35

2.5.1 Enzyme und sonstige Proteine (alphabetisch) 35

2.5.2 Restriktionsendonukleasen (alphabetisch) 36

2.5.3 Polymerasen (alphabetisch) 36

2.6 Transkriptionsfaktoren 37

2.7 Eingesetzte allgemeine Puffer und Medien 37

2.8 Verwendete Feinchemikalien 39

2.9 Verschiedenes 41

2.10 Verwendete Einheiten (alphabetisch) 41

3 METHODEN 43

3.1 Mikrobiologische Methoden 43

3.1.1 Sterilisation von Lösungen und Glasgeräten 43

3.1.2 Anzucht auf Agarplatten 43

3.1.3 Übernachtkultivierung von Zellen 44

3.1.4 Haltung und Sicherung von *Escherichia coli* Stämmen 44

3.1.5 Calciumchlorid-basierte Herstellung kompetenter Zellen für die Tansformation durch Hitzeschock 44
3.1.6 Hitzeschock-vermittelte Transformation kompetenter Zellen 45
3.1.7 Blau-Weiß-Selektion 45

3.2 Molekularbiologische Methoden 46
3.2.1 Konzentrationsbestimmungen 46
3.2.1.1 Bestimmung der Konzentrationen von Nukleinsäuren 47
3.2.1.2 Bestimmung der Zelldichte von Flüssigkulturen 48
3.2.1.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen 48
3.2.1.3.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels „Bradford-Methode“ 48
3.2.1.3.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels „NanoDrop“ 49
3.2.2 Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren 49
3.2.2.1 Phenol/Chloroform-Extraktion 49
3.2.2.2 Ethanol-vermittelte Präzipitation von Nukleinsäuren 49
3.2.2.3 Dialyse von Nukleinsäuren 50
3.2.3 Isolation von Plasmid-DNA 50
3.2.3.1 Präparative Isolation nach Hillen und Wells 51
3.2.3.2 Plasmidisolation im analytischen Maßstab verändert nach Birnboim & Doyle, 1979 52
3.2.4 Enzymatische Reaktionen 53
3.2.4.1 In der Arbeit angewandte Restriktionshydrolysen 53
3.2.4.2 Polymerase Chain Reaction (PCR) 54
3.2.4.3 Ligation 55
3.2.4.4 Auffüllen von 5´-überhängenden DNA-Enden mittels Klenow-Reaktion 55
3.2.5 Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren 56
3.2.5.1 Agarosegelelektrophorese 56
3.2.5.2 Native Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) 57
3.2.5.3 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese 57
3.2.6 Nachweis von Nukleinsäuren 58
3.2.6.1 Autoradiographie 58
3.2.6.2 Densitometrie 58
3.2.7 Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen 59
3.2.8 Dialyse von Proteinen 59
3.2.9 Nachweis von Proteinen in Polyacrylamidgelen mittels Coomassie-Färbung 59

3.3 Spezielle Methoden 60
3.3.1 Klonierung des *hisG*-Promotors 60
3.3.1.1 Gewinnung der *hisG*-Promotor-DNA und Blau-Weiß-Selektion in pUC18 60
3.3.1.2 Klonierung des p*hisG*-T1T2 Plasmids 62

3.3.2 Synthese und Präparation des Alarmons ppGpp 63
3.3.2.1 Isolierung von Ribosomen 64
3.3.2.2 Synthese von ppGpp 65
3.3.2.3 Dünnschichtchromatographie zum analytischen Nachweis der ppGpp-Synthese 65
3.3.2.4 Anionenaustauschchromatographie 66
3.3.2.5 Gelfiltrationslauf der in 3.3.2.4 eluierten ppGpp-haltigen Probe 68
3.3.2.6 Reverse-Phase (Umkerhphasen)-HPLC zur Identifizierung von ppGpp 69
3.3.3 Verzögerungsgelelektrophorese 71
3.3.4 *In vitro* Transkriptionen 71
3.3.4.1 „multiple-round“ *in vitro* Transkription 72
3.3.4.2 „(pseudo-)single-round“ *in vitro* Transkription 73
3.3.5 BiaCore-Analysen 74
3.3.5.1 Immobilisierung der Promotorfragmente 74
3.3.5.2 Durchführung der BiaCore-Messungen 75
3.3.6 -Proteomanalysen, 2D-Gelelektrophoresen 76
3.3.6.1 Auslösung der Stringenten Kontrolle 76
3.3.6.2 Gesamtproteinextraktion aus *E. coli* Zellen 77
3.3.6.3 Acetonfällung von Proteinen 78
3.3.6.4 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) 78
3.3.6.5 Isoelektrische Fokussierung 79
3.3.6.6 Äquilibrierung und SDS-PAGE (2. Dimension) 80

4 ERGEBNISSE 82

4.1 Analyse stringent regulierter ribosomaler RNA-Promotoren aus *Escherichia coli*: Einfluss von DksA, ppGpp und dem Initiations-nukleotid auf die *in vitro* Promotoraktivität 82
4.1.1 *In vitro* Transkriptionsanalyse stringent regulierter ribosomaler Promotoren 82
4.1.2 Effekte limitierter GTP-Konzentrationen auf stringent regulierte Promotoren in Abhängigkeit ihres Transkriptionsstartnukleotids und in Gegenwart von ppGpp bzw. DksA 86
4.1.3 Analyse des Einflusses von ppGpp und DksA auf die *in vitro* Transkription ribosomaler Promotoren in Abhängigkeit auf ihre Startnukleotide und in Gegenwart erhöhter GTP-Konzentrationen 90
4.1.4 Auswirkung erhöhter ATP-Konzentrationen auf die stringente Regulierung ribosomaler P1-Promotoren mit GTP bzw. ATP als Transkriptionsstart 93

4.2 Charakterisierung der ppGpp-Sensitivität der *E. coli* RNAP: Bedeutung der ω-Untereinheit für die Stringente Regulation ribosomaler Promotoren 96
4.2.1 Retardierungsanalysen zur Bestimmung der Bedeutung der *E. coli* ω-Untereinheit für das Initiationsverhalten der RNAP an ausgesuchten Promotoren 96

4.2.2 Analyse und Charakterisierung der in 4.2.1.3 dargestellten, vermindert stringent regulierten RNA-Polymerase-*rrnB* P1-Promotorkomplexe 105
4.2.3 KD-Wert-Analysen des Einflusses der stringenten Effektoren auf die Bildung der RNAP-Promotorkomplexe: Quantitative Bestimmung der *hisG-*, *rrnB* P1- bzw. *tac*-Promotoren in Abhängigkeit zur ω-Untereinheit mittels Oberflächen-Plasmonen-Resonanz (SPR) 108
4.2.4 Einfluss der *E. coli* ω-Untereinheit auf die *in vitro* transkriptorische Aktivität der *E.coli* RNAP: Transkriptionsanalysen von linearisierten und stringent regulierten bzw. nicht stringent regulierten Promotorfragmenten. 110
4.2.5 Charakterisierungen zur Bedeutung der *E.coli* RNAP-ω-Untereinheit für die Isomerisierung zum binären offenen *rrnB* P1-Komplex 113

4.3 *In vivo* Analysen zur Bedeutung des Effektorproteins DksA für das stringente Verhalten von *Escherichia coli* 118
4.3.1 Einfluss von DksA auf das Populationswachstum von *E. coli* Zellen in Abhängigkeit bzw. Unabhängigkeit zur stringenten Kontrolle 118
4.3.2 2D-PAGE-Analysen zu dem Einfluss von DksA auf Proteom in *E. coli* vor und nach dem Auslösen der Stringenten Kontrolle. 120

5 DISKUSSION 127

5.1 Einfluss der Startnukleotide auf die stringente Regulation ribosomaler Promotoren 127

5.2 Bedeutung der ω-Untereinheit für die Stringente Kontrolle in *E. coli* 133

5.3 DksA als globaler Regulator der Stringenten Kontrolle 143

6 AUSBLICK 148

7 DANKSAGUNG 149

8 LITERATURVERZEICHNIS 151

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.2.1.1 Schematische Assemblierung der RNAP 4
Abb. 1.2.6.1 3D-Struktur der *E. coli* RNAP 10
Abb. 1.3.1.1 Isomerisierung der Promotor-RNAP-Komplexe während der Transkriptionsinitiation in *E. coli* 12
Abb. 1.4.1.1 *E. coli* σ^{70}- Konsensus-Promotorstruktur 16
Abb. 1.5.2.1 Sequenzalignment der sieben *E. coli* rRNA P1-Kernpromotoren mit einer bzw. zwei Punktmutationen in der Transkriptionsstartsequenz 20
Abb. 1.6.1.1 ppGpp-Synthese und ihre Auswirkung auf stringente Promotoren in *E. coli* 23
Abb. 1.6.2.1 Ribbon-Struktur des DksA-Proteins 26
Abb. 3.3.1.1 Klonierung des pUC18-*hisG*-Vektors 61
Abb. 3.3.1.2 Klonierung des p*hisG*-T1T2-Vektors 63
Abb.3.3.2.3 Analytischer ppGpp-Nachweis mittels Dünnschichtchromatographie 66
Abb. 3.3.2.4 Schreiberprofil einer Anionenaustauschchromatographie 67
Abb. 3.3.2.5 G10-Gelfiltrationschromatographie der über Anionenaustausch gewonnen ppGpp-Probe 68
Abb. 3.3.2.6 ppGpp-Verifizierung mittels Umkehrphasen-HPLC 70
Abb. 4.1.1 Einfluss von ppGpp und DksA auf die ribosomalen Promotoren *rrnB* P1, *rrnH* P1, *rrnE* P1 und *rrnD* P1, sowie der *rrnD* P1-Mutanten *rrnD* P1 +1A, *rrnD* P1 +1A+3c 85
Abb. 4.1.2 Regulierung stringenter Promotoren durch ppGpp und DksA unter GTP-limitierenden Bedingungen 89
Abb. 4.1.3 Auswirkung erhöhter GTP-Konzentrationen auf stringent kontrollierte Promotoren 92
Abb. 4.1.4 Einfluss erhöhter ATP-Konzentrationen auf stringent kontrollierte Promotoren 95
Abb. 4.2.1.1 Einfluss von ppGpp und/oder DksA auf die *tac*-Promotorbindung wildtypischer bzw. ω-deletierter RNAP 98

Abb. 4.2.1.2 Bindung des hisG-Promotorfragments durch wildtypische und ω-deletierter RNAP in Anwesenheit und Abwesenheit der Effektoren ppGpp (300 µM) und DksA (2 µM) 100

Abb. 4.2.1.3 Analyser der *rrnB* P1-Promotor Bindesensitivität wildtypischer und ω-deletierter RNAP unter dem Einfluss der Effektoren ppGpp (300 µM) und DksA (2 µM) 104

Abb. 4.2.2 Identifizierung und Charakterisierung verschiedener *rrnB* P1-Promotor-RNAP-Komplexe anhand ihrer ppGpp- und DksA-Sensitivität, sowie ihrer Abhängigkeit zu den +1 und den +2 Startnukleotiden 107

Abb. 4.2.3 Beteiligung der ω-Untereinheit an der Bildung offener Komplexe mit *hisG*- bzw. *rrnB* P1-Promotoren unter dem Einfluss von ppGpp und/oder DksA 109

Abb. 4.2.4.1 *in vitro* Transkription der PCR-generierten und biotinylierten Promotorfragmente *tac*, *hisG* bzw. *rrnB* P1 durch wildtyp- bzw. ω-deletierter RNAP 112

Abb. 4.2.5.1 Auswirkung der ω-Deletion auf die temperaturabhängige RNAP-Initiationskompetenz bei der *rrnB* P1-Transkription 115

Abb. 4.2.5.2 Analysen zur Beteiligung der *E. coli* RNAP- ω-Untereinheit auf die stringent regulierte offene Komplexbildung des *rrnB* P1-Promotors unter temperaturabhängigen Aspekten 117

Abb. 4.3.1.1 Phänotypisierung der *E. coli* Stämme MG1655 und CF9239 basierend auf Wachstumsverhalten in stringent bzw. nicht stringenten Bedingungen 119

Abb. 4.3.2.1 MG1655 2D-PAGE-Proteomanalysen im Rahmen der Stringenten Kontrolle 122

Abb. 4.3.2.2 CF9239 2D- PAGE-Proteomanalysen im Rahmen der Stringenten Kontrolle 123

Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption
Alcoa	Aluminiumoxid
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
ca.	Circa
CTD	C-Terminale Domaine
CTP	Cytosintriphosphat
dATP	Desoxy-Adenosintriphosphat
DC-Platte	Dünnschichtchromatographieplatten
dCTP	Desoxy-Cytosintriphosphat
dGTP	Desoxy-Guanosintriphosphat
DksA	DnaK Suppressor A
dPAA	denaturierendes Polyacrylamidgel
dUTP	Desoxy-Uraciltriphosphat
E	Extinktion
E σ	E. coli Holoenzyme mit dem jeweiligen Sigmafaktor komplementiert
E. coli	Escherichia coli
EMSA	electrophoretic mobility shift assay
f.c.	Final concentration
GTP	Guanosintriphosphat
GvOs	Gentechnisch veränderte Organismen
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IEF	isoelektrische Fokussierung
iNTP	Initiations NTP
iP	Isoelektrischer Punkt
IPG	pH-Gradienten IPG

Nr.	Nummer
nt	Nukleotide
NTD	N-Terminale Domaine
NTP	Nukleosid 5´Triphosphate
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
ppGpp	Guanosintetraphosphat
pppGpp	Guanosinpentaphosphat
RNAP	DNA-abhängige RNA-Polymerase
RPC	Reversed-Phase Chromatography
rRNA	ribosomale RNAs
*rrn*P1	ribosomale RNA P1
RSH	Rel/Spo homolog
RT	Raumtemperatur
SAS	small alarmone synthetase
SHX	Serinhydroxamat
sog.	Sogenannt
SPR	surface plasmon resonance
T. thermophilus	*Thermus thermophilus*
TBAB	Tetrabutylammoniumbromid
Tm	Schmelzpunkt
üN	über Nacht
UTP	Uraciltriphosphat
WT	Wildtyp
Δω	Delta omega
λ	Lambda
ε	Extinktionskoeffizient

1 Einleitung

Obwohl aufgrund ihrer Größe oft unterschätzt, stellen Bakterien die größte phylogenetische Domäne aller Lebewesen dar. Sie gelten als höchst anpassungsfähig und es gibt auf Erden kaum eine natürliche Umgebung, in der sie nicht aufzufinden sind. So konnten intakte Bakterien sowohl in den Tiefen der Ozeane (Deming 1986) als auch in den trockensten Wüsten (Robinson et al. 2013) beobachtet werden. Selbst in Lufthöhen bis hin zur Mesosphäre (80 km) konnte bakterielles Leben detektiert werden (Imshenetsky et al. 1978). Aufgrund der Vielzahl und Vielfalt potentieller mikrobieller Habitate ist es schwer, absolute Aussagen über die Anzahl und die totale Biomasse aller Prokaryoten auf der Erde treffen zu können. Studien von Whitman et al. bezifferten jedoch 1998 die totale Zellzahl aller Prokaryoten weltweit auf 4-6 x 10^{30} Zellen und errechneten daraus eine Masse an zellulär gespeichertem Kohlenstoff von 350 bis 550 x 10^{15} g (Whitman et al. 1998).

Ebenso wie die phylogenetische Domäne der Archaeen, wird die Domäne der Bakterien aus der Gruppe der Prokaryoten gebildet. Eines der bestuntersuchten Bakterien ist das stäbchenförmige gramnegative Enterobakterium *Escherichia coli* (*E. coli*). Seit vielen Jahren schon dient es der Molekularbiologie als Modellmechanismus, anhand dessen grundlegende Mechanismen erstmalig aufgeklärt werden konnten. Auch in dieser Arbeit diente der *E. coli* Stamm K-12, dessen komplette Genomsequenz 1997 von Blattner et al. publiziert wurde (Blattner et al. 1997). Im Gegensatz zu den sogenannten EHEC-Stämmen (enterohämorrhagische *E. coli*), fehlen den K-12-Stämmen wichtige Gene zur Virulenz, so dass sie als nicht virulent gelten (Groisman and Ochman 1994).

Auch *E. coli* unterliegt in seinen natürlichen Habitaten dem Einfluss ständig variierender Stresssituationen. So kann beispielsweise der Wechsel des *E. coli*-Lebenszyklus von außerhalb zu innerhalb des Wirtes begleitet sein von drastischen Veränderungen des osmotischen Charakters der Umgebung und/oder von einem Anstieg bzw. Abfall des pH-Wertes. Weiterhin bedingt solch ein Wechsel oft auch

eine Veränderung des zur Verfügung stehenden Nährstoffangebotes, welches eine Reprogrammierung des Zellmetabolismus zur Folge haben kann.
E. coli ist durch seine regulatorischen Netzwerke der Genexpression hervorragend an solch veränderte Wachstumsbedingungen adaptiert.

1.1 Anpassung von Bakterien an veränderte Umweltbedingungen

Wie oben einleitend erwähnt, besiedeln Bakterien die unterschiedlichsten Biosphären, in denen sie den unterschiedlichsten Umwelteinflüssen ausgesetzt sind. Eine schnelle und effiziente Anpassung auf die veränderten Bedingungen ist daher überlebenswichtig. Diese wird in Bakterien auf der Ebene der Genexpression vollzogen, welche sich grob in die drei zentrale Ebenen Replikation, Transkription und Translation inklusive Protein-Modifikation unterteilen lässt. Das Zusammenspiel dieser drei Ebenen bezeichnet den sogenannten Fluss der genetischen Information von der Nukleinsäure zum funktionellen Protein und ist damit verantwortlich für die Synthese aller Biomoleküle eines lebenden Organismus. Hierbei findet die Regulation der Genexpression potentiell auf allen drei dieser Ebenen statt, um unter ökonomischen Standpunkten eine potentielle Fehlinvestition zellulärer Ressourcen zu vermeiden. Primäre Regulationsebene innerhalb des Flusses der genetischen Information in Prokaryoten ist jedoch die Transkription (siehe 1.3) (Burgess 1969b).

Die Transkription beschreibt die Mg^{2+}-abhängige Umwandlung der in der DNA chemisch gespeicherten Information in die Sequenz einer RNA. Diese wird von der DNA-abhängigen *E. coli* RNA-Polymerase (RNAP) synthetisiert (siehe 1.2). RNA-Polymerasen existieren in einer Vielzahl von Variationen unterschiedlicher Komplexität in allen lebenden Zellen. Einige von ihnen sind vergleichsweise einfach organisiert und bestehend aus einer einzigen Untereinheit. Andere hingegen fungieren als sogenannte „Multisubunitkomplexe“ mit einem modularen Aufbau, der beispielsweise in Eukaryoten eine Anzahl im zweistelligen Bereich umfassen kann (Mathew and Chatterji 2006).

1.2 Aufbau und Funktion der *E. coli* RNAP in der Anpassung der Genexpression

1.2.1 Multisubunitstruktur und Zusammensetzung der *E. coli* RNAP

Als zentrales Enzym in der Anpassung prokaryotischen Überlebens war die DNA-abhängige RNA-Polymerase zentrales Element dieser Arbeit und soll daher ausführlich beschrieben werden. Die *E. coli* RNAP lässt sich basierend auf Zusammenstellung und Funktion in zwei unterschiedliche Multisubunitenzyme differenzieren. Das erste ist das Core-Polymeraseenzym, bestehend aus zwei sogenannten α, einer ω, einer β und einer β´ Untereinheit (siehe 1.2.2 bis 1.2.4) (Burgess 1969b). Diese Anordnung besitzt die katalytische Kompetenz der bakteriellen RNA-Polymerasen und ist somit ausreichend für die eigentliche Transkriptionsreaktion. Als zweite Struktur unterscheidet man die Komplementierung des Core-Enzyms zum RNAP-Holo-Enzym durch einen sogenannten σ-Faktor. Die σ-Untereinheit ist für die Erkennung und Bindung der Promotoren verantwortlich und verleiht dem Holo-Enzym somit die Promotorspezifizität (1.2.5). In Studien konnte gezeigt werden, dass die N-terminale Domäne der α-Untereinheit direkte Bindeinteraktionen sowohl mit der β- als auch mit der β´-Untereinheit ausbildet, jedoch nicht mit σ direkt interagiert (Heyduk et al. 1996, Greiner et al. 1996). Im Gegensatz dazu konnten für die Untereinheiten β und β` neben den Bindestellen untereinander (Brodolin et al. 1993), zusätzlich auch direkte Bindedomänen für σ identifiziert werden (Brodolin et al. 1993, Greiner et al. 1996). Es konnte gezeigt werden, dass die Assemblierung der RNAP zu dem Core- bzw. dem Holo-Enzym einer strikten Hierarchie untergeordnet ist. Der erste Schritt ist eine Homodimerisierung der beiden α-Untereinheiten, gefolgt von der Assoziation der β-Untereinheit an den α-Komplex. Anschließend wird der Core-Enzyme-Komplex durch die Bindung der mit ω assoziierten β´-Untereinheit vervollständigt. Wie oben erwähnt, kann erst nach Bildung des Core-Enzyms optional die Bindung der α-Untereinheit erfolgen und somit das RNAP-Holo-Enzym entstehen. Der oben beschriebene, strukturierte Ablauf der RNAP-Assemblierung ist exemplarisch in der Abbildung 1.2.1.1 dargestellt.

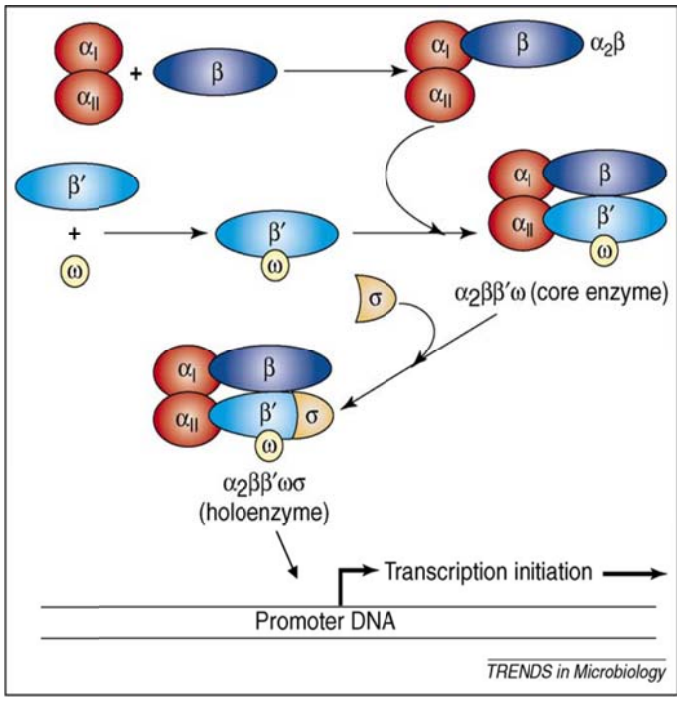


Abb.. 1.2.1.1 Schematische Assem-blierung der RNAP. Schematisch gezeigt ist der Ablauf des RNAP-Aufbaus ausgehend von den einzelnen Untereinheiten. Der Aufbau startet mit dem Assoziieren zweier α-Untereinheiten (α_I und α_{II}) zu einem Homodimer. Dieses bindet β, gefolgt von der Assoziation von β′. In diesem Beispiel ist die ω-Untereinheit bereits an β′ gebunden und vervollständigt somit gemeinsam mit β′ die Core-Polymerase. Durch die Bindung eines Sigmafaktors bildet sich das Holo-Enzym, welches die Initiation der Transkription an der Promotor-DNA ermöglicht (Mathew and Chatterji 2006).

1.2.2 Eigenschaften der *E. coli* RNAP-α-Untereinheit

Die α-Untereinheit wird von dem *rpoA*-Gen codiert und bildet nach ω mit 36,5 kDa (329 Aminosäuren (AS)) die zweitkleinste Untereinheit der *E. coli* Core-RNAP. Das Protein setzt sich aus zwei unterscheidbaren Domänen, verbunden durch einen flexiblen Linker, zusammen (Negishi et al. 1995). Es konnte gezeigt werden, dass die α-Beteiligung an der Core-Assemblierung ausschließlich von der N-terminalen Domäne (NTD) der Untereinheit abhängt (Kimura and Ishihama 1995, Igarashi and Ishihama 1991, Kimura and Ishihama 1996). Das bedeutet, dass alle Kontaktstellen für die Dimerisierung und Wechselwirkung von α mit β und β` (siehe 1.2.3) in der αNTD kodiert sind (Heyduk et al. 1996, Kimura and Ishihama 1996, Murakami et al. 1996).

Die C-terminale Domäne der α-Untereinheit bildet einerseits eine Kontaktstelle für zahlreiche Transriptionsaktivatoren (Igarashi et al. 1991) und spielt andererseits bei der Erkennung und Regulation einiger Promotoren über die Bindung des sogenannten UP-Elements (siehe 1.4) eine wichtige Rolle (Gaal et al. 1996). Desweiteren konnte gezeigt werden, dass die αCTD in direkter Interaktion mit den Oberflächen-

exponierten AS-Resten der Region 4.2 der in 1.2.5 beschriebenen σ^{70}-Faktor-Familie steht (Ross et al. 2003, Chen et al. 2003). Unter diesem Aspekt kommt demnach auch der αCTD eine Funktion in der RNAP-Assemblierung, zumindest bezüglich des Core-Enzyms, zuteil. Sequenzanalysen aller α-Untereinheiten ergaben Homologien in allen drei phylogenetischen Domänen (siehe Tabelle 1.2.1), welches auf eine hohe Bedeutung dieser Untereinheit in sämtlichen Organismen deuten lässt.

Obwohl die Assemblierung der RNAP zwei identische α-Untereinheiten beinhaltet, kommen den beiden Proteinen im Aufbau des Enzyms unterschiedliche Rollen zuteil. So ist nur eine der beiden α-Untereinheiten für die Bindung der β-Untereinheit verantwortlich, während die zweite mit β` interagiert. Das differentielle Verhalten dieser zwei identischen Untereinheiten ist mit ihrer unterschiedlichen Orientierung innerhalb des modularen Transkriptionsenzyms begründet (Kimura and Ishihama 1996, Heyduk et al. 1996). Murakami et al. konnte 1997 zeigen, dass beide Untereinheiten asymmetrisch in Tandem-Orientierung angeordnet sind (Murakami et al. 1997).

1.2.3 Charakterisierung der β- und β`-RNAP-Untereinheiten in *E. coli*

Die *E. coli* β-Untereinheit wird als Genprodukt des *rpoB*-Gens, gemeinsam mit dem *rpoC*-Genprodukt β´ auf einer Transkriptionseinheit kodiert. Mit einer Größe von 150,6 kDa (1.342 AS) für β bzw. 155,2 kDa (1.407 AS) für β´ stellen diese beiden Untereinheiten, die mit Abstand größten Module der *E. coli* RNAP dar (Wagner 2000). Beide Untereinheiten bilden gemeinsam das katalytische Zentrum der RNAP und nehmen daher eine zentrale Stellung im Aufbau des Transkriptionsenzyms und bei der Synthese der RNA-Moleküle ein.
Sie sind sowohl für die katalytische NTP-Bindung als auch für die Bindung der DNA essentiell und sind stark an den Prozessen der Elongation und der Termination beteiligt (Gross et al. 1996). Das aktive Zentrum der *E. coli* RNAP ist im Gegensatz zu den sogenannten, aus nur einer Untereinheit bestehenden „single-unit“-Polymerasen modular aufgebaut. Es beinhaltet mindestens sechs Proteindomänen beider Untereinheiten (Mustaev et al. 1997). Alignmentanalysen zwischen den Untereinheiten

der *E. coli* RNAP und denen eukaryotischer DNA-abhängiger RNA-Polymerasen zeigten ausgedehnte Sequenzhomologien, sowohl zwischen der größten (β) bzw. zweitgrößten (β´) *E. coli* RNAP-Untereinheit und der größten bzw. zweitgrößten Untereinheit eukaryotischer RNAP (Gross et al. 1996), als auch in den Untereinheiten der RNA-Polymerasen der Archaeen (siehe Tabelle 1.2.1).

1.2.4 Die funktionelle Bedeutung der ω-Untereinheit der *E. coli* RNAP

Das *rpoZ*-Genprodukt Omega (ω) ist die kleinste (10,1 kDa; 91 AS) und die bis heute schlechtuntersuchteste aller *E. coli* RNAP-Untereinheiten. Obwohl sie gleichzeitig mit den anderen Untereinheiten 1969 erstmalig beschrieben wurde (Burgess 1969b), blieb die Aufgabe des Proteins im Multiunit-RNAP-Komplex jahrzehntelang ungeklärt. Lange Zeit gelang es nicht, einen auf ω beruhenden Phänotyp zu beschreiben. *In vivo* hatte das Fehlen der ω-Untereinheit aus dem *E. coli* RNAP-Komplex keinerlei Auswirkung auf das Zellverhalten. Omega scheint die einzige der RNAP-Untereinheiten zu sein, deren Abwesenheit *in vivo* nicht letal verläuft. Beobachtungen wie diese hatten zur Folge, dass das *rpoZ*-Produkt lange Zeit als RNA-Polymeraseuntereinheit nicht einheitlich anerkannt wurde (Burgess 1971). Durch die Beobachtungen von Gentry und Burgess (Gentry and Burgess 1993) und von Hochschild und Dove (Hochschild and Dove 1998) konnte 24 Jahre nach Erstbeschreibung die Untereinheit ω als spezifische Untereinheit der DNA-abhängigen RNA-Polymerase identifiziert werden. Die erstgenannte Forschergruppe konnte in ihrer Arbeit eine ω-spezifische Bindestelle in dem Polymerasekomplex an der β´-Untereinheit in *Thermus thermophilus* zeigen, während letztere einen synthetischen Transkriptionskomplex beschrieben, für dessen Aktivität ω unabdingbar war. In den folgenden Jahren wurden die ω-Analysen weiter intensiviert und man konnte zeigen, dass das *rpoZ*-Gen, obwohl *in vivo* nicht essentiell, in vielen Organismen aller drei phylogenetischer Domänen hochkonserviert war (Mathew et al. 2005) (siehe Tabelle 1.2.1). So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die ω-Untereinheit eine wichtige Rolle im Rahmen der stringenten Regulation einiger Promotoren einnimmt (Vrentas et al. 2005, Chatterji et al. 2007). Diese Korrelation zwischen Stringenter Kontrolle und ω-Untereinheit war ebenfalls zentraler Bestandteil dieser Arbeit.

Tabelle 1.2.1.: **Homologien der RNAP-Untereinheiten** [a, b] (Verändert nach (Mathew et al. 2005))

Bacterial	Archaeal	Eukaryotic		
		RNAPI	RNAPII	RNAPIII
β′	RpoA′, RpoA″	RPA1, RPB1, RPC1	RPA1, RPB1, RPC1	RPA1, RPB1, RPC1
β	RpoB (RpoB′/RpoB″)	RPA2, RPB2, RPC2	RPA2, RPB2, RPC2	RPA2, RPB2, RPC2
α_I and α_{II}	RpoD, RpoL	RPC5 and RPC9	RPB3 and RPB11	RPC5 and RPC9
ω	RpoK	RPB6	RPB6	RPB6

[a] Alle Untereinheiten der bakteriellen RNAP, einschließlich der ω-Untereinheit, zeigen korrespondierende Homologien mit den Transkriptionsmaschinerien der Archaeen und der Eukaryoten.
[b] Daten von (Nouraini et al. 1996).

1.2.5 Die Bedeutung der *E. coli* σ-RNAP-Untereinheit

Wie in 1.2.1 erwähnt, komplementiert die sogenannte σ-Untereinheit der *E. coli* RNAP das katalytische Core-Enzym zum sogenannten Holo-Enzym. Nur dieses besitzt die Kompetenz zur promotorspezifischen DNA-Bindung und somit zur spezifischen Transkriptionsinitiation der spezifischen Gene (Burgess 1969b). In *E. coli* finden sich sieben dieser Sigmafaktoren kodiert. Diese binden in Abhängigkeit unterschiedlicher äußerer Umstände und Signale wie z.B Aminosäuremangel, Hitze, Kälte, exoplasmatischen Stress etc. das Core-Enzym und unterscheiden sich aufgrund ihrer Struktur und/oder Sequenz in der Erkennung der spezifischen Promotorerkennungsmotive (siehe 1.4). Durch Supplementierung des Core-Enzyms mit einem dieser Sigmafaktoren wird das Holo-Enzym zum jeweiligen Set der Zielgene dirigiert (Gross 1992). Die variable σ-Konstitution des Holo-Enzyms in Relation zu den äußeren Umständen, ermöglicht demnach der *E. coli* Zelle das jeweilige Transkriptionsprofil der Situation entsprechend spezifisch anzupassen.

Einer der bestuntersuchten Sigmafaktoren ist der „house-keeping"-Sigmafaktor σ^{70}. Dieser ist für die Transkriptionsinitiation aller für das exponentielle Wachstum benötigten Gene von essentieller Bedeutung. Die anderen σ-Faktoren koordinieren die Transkription von Genen der stationären Phase (σ^S), der Hitzeschockantwort (σ^E, σ^H), der Flagellensynthese (σ^F), der Stickstoffassimilierung (σ^N) und des zitratabhängigen Eisentransports (σ^{19}) (Wagner 2000).

Bis auf σ^N, der zur Gruppe der σ^N-Faktoren gehört, sind alle anderen der aufgeführten Sigmafaktoren homolog und daher in der Gruppe der σ^{70}-Faktor-Typen zusammengefasst. Alle bekannten Sigmafaktoren aller bekannter Prokaryoten lassen sich anhand dieser beiden Gruppen typisieren. Die letztere der beiden Gruppen ist zusätzlich in primäre (z.B. σ^{70}) und alternative (z.B. σ^H und σ^F) σ-Faktoren klassifiziert, wobei den primären Sigmafaktoren vier konservierte Bereiche gemein sind (Gross et al. 1996). Wie oben beschrieben, ist der σ-Faktor nicht nur essentiell für die Erkennung der jeweiligen Transkriptionsstartpunkte, sondern auch für die Initiation der Transkription an den jeweiligen Startpunkten. Dies beinhaltet demnach, neben der Verlinkung des Core-Enzyms an die Promotor-DNA, die Erkennung der -35- und -10-Promotorelemente (siehe 1.4), das Aufschmelzen der Promotor-DNA und somit die Isomerisierung zum offenen Promotorkomplex (siehe 1.4), sowie die Kontaktierung einiger Transkriptionsaktivatoren.

1.2.6 Struktur der *E. coli* RNAP

Wie in 1.2.1 bis 1.2.5 erläutert, ist die RNAP in sämtlichen Organismen unabhängig ihrer phylogenetischen Herkunft hochkonserviert. Dennoch konnte gezeigt werden, dass sie in ihrem Aufbau in den unterschiedlichen Domänen variiert. Von den RNA-Polymerasen der Phagen abgesehen, zeigt das Enzym einen modularen Aufbau bestehend aus einer variierenden Anzahl an konservierten Untereinheiten, welche mit der Komplexität der jeweiligen Organismen an Anzahl zunehmen. Obwohl schon 1960 in *E. coli* entdeckt und beschrieben (Hurwitz 2005), gelang es jahrzehntelang nicht, die 3D-Struktur der *E. coli* RNAP aufzuklären. Daher beriefen sich bis vor kurzem noch sämtliche Analysen auf die strukturellen Erkenntnisse der RNAP aus *Thermus thermophilus* (*T. thermophilus*) (Zhang et al. 1999), welche aufgrund der hohen Sequenzhomologie aller RNA-Polymerasen ein probates Modell zu sein schien. Allerdings konnte früh gezeigt werden, dass die Transkription der *T. thermophilus* RNAP, trotz hoher Sequenzhomologie, nicht in allen Belangen als charakteristisch für das Transkriptionsverhalten der *E. coli* RNAP anzusehen ist. Dieses wurde besonders unter Bedingungen der Stringenten Kontrolle deutlich (Kasai et al. 2006, Vrentas et al.

2008). Erst durch die 2013 veröffentlichte Arbeit von Murakami, in der erstmals die 3D-Struktur der *E. coli* RNAP aufgeklärt werden konnte, kann dieser Diskrepanz in den RNAP der beiden Spezies Rechnung getragen werden (Murakami 2013).

Mukarami konnte in seiner Arbeit zeigen, dass die Struktur des *E. coli* Holo-Enzyms in der Tat eine hohe Übereinstimmung mit dem von *T. thermophilus* aufweist. Beide ähneln in ihrer Struktur der Schere einer Krabbe bestehend aus zwei Zangen. Diese bilden die DNA-Bindespalte und das aktive Zentrum des Enzyms. Während die β`-Untereinheit die sogenannte „clamp" der Schere bildet, bildet β den anderen Teil der Klaue. Es konnte gezeigt werden, dass in beiden Spezies die β- und β´-Untereinheiten eine gewisse Flexibilität zueinander aufweisen, welche den Enzymen den Wechsel zwischen geöffneter und geschlossener Konformation der Klaue ermöglichen (Chakraborty et al. 2012). Verglichen mit allen bekannten Strukturen der RNAP von *T. thermophilus* scheint die *E. coli* RNAP in einer stärker geschlossenen Konformation vorzuliegen.

Für die ω-Untereinheit in *T. thermophilus* konnte ein Aufbau aus drei α-Helices gezeigt werden, während ω in *E. coli* fünf dieser Helices umfasst. Die ersten drei dieser Helices verlaufen sequenzhomolog zu denen in *T. thermophilus*. Ein weiterer fundamentaler, auf Omega beruhender Unterschied zwischen den beiden Polymerasen ist die Interaktion zwischen ω und β`. In *E. coli* scheint die in 1.2.4 beschriebene Bindung der ω-Untereinheit an der C-terminalen Position des β´-Proteins nicht stattzufinden (Murakami 2013). Die Abbildung 1.2.6.1 gibt die von Murakami geschilderten, oben beschriebenen Strukturen wieder.

Abb.. 1.2.6.1 3D-Struktur der *E. coli* RNAP.
Dargestellt ist die kürzlich veröffentlichte Kristallstruktur des *E. coli* RNA-Polymerase-Holo-Enzyms. Die unterschiedlichen Untereinheiten sind farblich hervorgehoben. Die zwei α-Untereinheiten (α_I und α_{II}) sind als blaue bzw. magentafarbene Domänen dargestellt. Bei der braun abgebildeten Domäne handelt es sich um die β-Untereinheit, welche direkt an der β´-Untereinheit (grün) gebunden ist. Grau dargestellt ist die ω-Untereinheit. Als Sigmafaktor dargestellt ist das σ^{70}-Protein (orange), welches direkt an β und β´ gebunden vorliegt (Zuo et al. 2013, Murakami 2013).

.

1.3 Ablauf der Transkription in *Escherichia coli*

Die Transkription aller Organismen lässt sich in die drei Prozesse der Initiation, Elongation und Termination unterteilen. Jede dieser drei Ebenen ist Ziel von diversen Regulationsmecha-nismen, mit denen das Transkriptionsmuster der Zellen auf die jeweiligen Zellumstände eingestellt wird. Im Folgenden sollen diese drei Ebenen an dem Beispiel der *E. coli* RNAP näher charakterisiert werden.

1.3.1 Die Transkriptioninitiation in *E. coli*

Die Initiation ist der erste Schritt des komplexen Mechanismus der Transkription und umschreibt die teils reversible Entstehung vier aufeinander folgender Transkriptionskomplexe. Sie beginnt mit der Bindung des RNAP-Holo-Enzyms (R) (siehe 1.2.1) an der Promotor-DNA (P). Dieser Komplex aus Promotor und doppelsträngiger DNA wird als binärer geschlossener Komplex (Rc) bezeichnet. Dieser kann beispielsweise bei den $E\sigma^{70}$ Komplexe sowohl wieder in R und P zerfallen, als auch aufgrund der durch die Bindung der Polymerase frei werdenden

Energie in den sogenannten binären offenen Komplex (Ro) isomerisieren. Hierbei werden die Stränge der DNA-Doppelhelix an distinkten Stellen der Promotorstruktur aufgeschmolzen, so dass auf Höhe der -10-Region (siehe 1.4.1) im aktiven Zentrum der RNAP die sogenannte Transkriptionsblase entsteht. Diese umspannt einen Bereich von 10 bis 14 Nukleotiden. Der aus R und einzelsträngiger DNA bestehende binäre offene Komplex kann ebenfalls wieder in den geschlossenen Komplex zerfallen oder in den sogenannten ternären Initiationskomplex (RP_{init}) übergehen. Dieser setzt sich aus RP_O und den ersten eingebauten Substrat-NTPs zusammen, die im aktiven Zentrum der RNAP durch Phosphodiesterbindung verbunden werden (Newlands et al. 1991). Obwohl die RNAP samt σ-Faktor nach wie vor am Promotor gebunden ist, kann das flexible Zentrum innerhalb des Enzyms bis zu 12 Nukleotide einbauen, so dass kurze RNA-Fragmente entstehen. Werden diese in Form von abortiven Transkriptprodukten aus dem Komplex entlassen, nimmt dieser wieder die Konformation des RP_O ein. Überschreitet das im RP_{init} wachsende Transkript durch Einbau weiterer Substrat-NTPs einen kritischen Wert von 10 bis 12 Nukleotiden, ändert das Holo-Enzym seine Konformation. Diese Konformationsänderung induziert die Bildung des Elongationskomplexes (EC) begleitet von der Abspaltung des Sigmafaktors. Der Elongationskomplex unterscheidet sich von den zuvor beschriebenen Komplexen unter anderem in zwei wichtigen Punkten. Zum einem wird hier die Transkription erstmals von der *E. coli* Core-Polymerase, also unabhängig von σ, getätigt. Zum anderen stellt der EC die einzige nicht reversible Konformation der Transktiptionsinitiation dar und kann somit nicht mehr auf ihre Vorgängerkonformation zurückfallen (Record 1996). Die oben beschriebene Isomerisierung vom geschlossenen zum Elongationskomplex ist in Abbildung 1.3.1.1 schematisch zusammengefasst.

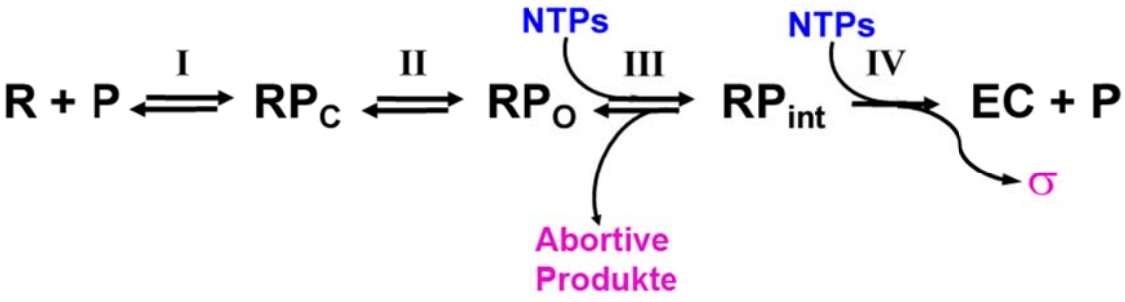


Abb. 1.3.1.1 Isomerisierung der Promotor-RNAP-Komplexe während der Transkriptionsinitiation in *E. coli.*
Graphisch dargestellt ist der Aufbau der *E. coli* Transkriptionsinitiation, gegliedert in vier Phasen (I-IV). (I): Assoziation und Dissoziation der RNA-Polymerase (R) an den Promotor (P) unter Bildung bzw. Zerfall des geschlossenen Komplexes (RP_C). (II): Isomerisierung zum offenen Komplex (RP_O) inklusive Rückreaktion. (III): Durch den Einbau der ersten NTPs wird der ternäre Komplex (RP_{init}) gebildet. Bei der Rückreaktion kommt es zur Freisetzung kurzer abortiver RNA-Produkte. (IV): Bildung des Elongationskomplexes unter Freisetzung des Sigmafaktors (σ) inklusive der Dissoziation des EC von der Promotorstruktur (P) (Record 1996).

1.3.2 Charakterisierung der Elongationsreaktion während der Gentranskription in *E. coli*

Mit der Abspaltung des σ-Faktors und der Bildung des Elongationskomplexes geht die Transkription von der Initiation in die Elongation über. Hierbei transloziert das Core-Enzym entlang des abzulesenden DNA-Strangs, wobei es einen Bereich von 25 bis 50 Basenpaare abdeckt. Die Transkriptionsblase (siehe 1.3.1) vergrößert sich dabei auf 14 bis 18 Nukleotide (Uptain et al. 1997). Es konnte gezeigt werden, dass innerhalb der Transkriptionsblase im aktiven Zentrum des Core-Enzyms die wachsende RNA in 3´-Richtung durch komplementäre NTP-Anlagerung entlang des DNA-Matrizenstrangs verlängert wird. Die frisch eingebauten NTPs am 3´-Ende der RNA, sind dabei über einen Bereich von acht bis neun Nukleotiden als RNA:DNA-Hybrid fest mit dem Matrizen-DNA-Strang basengepaart (Polyakov et al. 1995, Nudler et al. 1997). Das 5´-Ende der gebildeten RNA-Kette verlässt das Core-Enzym durch einen Exit-Kanal und bildet sogleich Sekundärstrukturen aus. An bestimmten Signalen in der RNA können diese Strukturen autonom oder in Kombination mit Proteinen (sog. Terminationsfaktoren) Pausen- und darausfolgend Terminationsmotive ausbilden, die die Termination der Transkription erzwingen (Krohn and Wagner 1996, Artsimovitch and Landick 2000).

1.3.3 Grundlegende Prinzipien der Transkriptionstermination in *E. coli*

Wie in 1.4 beschrieben, ist die Transkriptionsinitiation der RNAP nur an charakteristisch strukturierten DNA-Sequenzen möglich. Ist diese einmal verlassen und der Sigmafaktor dissoziiert (siehe 1.3.1), ist im Falle eines frühzeitigen Transkriptionsabbruchs eine Reinitiation an dem unvollendeten Transkript nicht möglich. Um daher das Risiko vorzeitig abgebrochener Transkripte zu minimieren, zeichnet sich der Elongationskomplex durch besondere Stabilität aus (Wagner 2000). Im Umkehrschluss bedarf solch ein besonders stabiler Elongationskomplex auch eines effizienten Terminationsmechanismus.

Die Termination der Transkription beinhaltet sowohl die Fertigstellung bzw. Beendigung des gestarteten Transkripts als auch die Sezernierung des selbigen aus dem Transkriptions-komplex. Desweiteren ist diese Vollendung des Transkriptionsvorgangs mit der Dissoziation des Core-Enzyms von der abgelesenen DNA begleitet. Zwei grundlegende Mechanismen können der Termination zugrunde liegen. Man unterscheidet die faktorunabhängige oder auch intrinsisch genannte Termination von der faktorabhängigen Termination (Richardson 1993). Die faktorabhängige Termination unterliegt der Präsenz von Terminationsfaktoren, ohne die bei diesem Typ der Termination keine Beendigung der Transkription erfolgen kann. In *E. coli* ist das Protein Rho der Hauptterminationsfaktor der Transkription. Rho bindet als Homohexamer das 5´-Ende des frisch synthetisierten Transkripts und bewegt sich von dort aus in 3´-Richtung auf den Elongationskomplex zu. In allen Rho-vermittelten Terminationsprozessen erfolgt diese Rho-Bindung der RNA über eine charakteristische Erkennungssequenz, der sogenannten *rut*-site (Rho-utilisation-site). Erst bei Erreichen des Elongationskomplexes eines Elongationspausensignals verlangsamt sich die Elongationsrate, so dass Rho zum Komplex aufschließen kann. Ist der Komplex erreicht, entwindet Rho ATP-abhängig das RNA:DNA-Hybrid und leitet somit die Termination der Transkription ein (Platt 1994).

Im Gegensatz zur faktorabhängigen Termination, beruht die faktorunabhängige Termination alleine auf den intrinsischen Eigenschaften des gebildeten Transkripts und bedarf daher keinerlei akzessorischer Faktoren. Ausgiebige Sequenzanalysen faktorunabhängig terminierter Transkripte ergaben eine Reihe von spezifischen

Sequenezelementen, welche charakteristisch für intrinsische Terminationsstellen sind. So sind ihnen palindromische Motive, ca. 30 Basenpaare 5´ distal zum Terminationspunkt, gemein. Desweiteren neigen intrinsich terminierte Transkripte dazu, 3´-distal GC-reiche „stem-loop"-Strukturen auszubilden. Diesen angeschlossen befindet sich ein Bereich aus vier bis acht aufeinanderfolgenden Uracilresten. Während die Loop-Struktur die Elongationsrate des Transkriptionskomplexes herabsetzt, wird das RNA:DNA-Hybrid durch die Uracilkette destabilisiert, welches die Dissoziation des Transkripts und die damit einhergehende Termination der Transkription zur Folge hat (Wagner 2000).

1.4 Transkriptionsstartregulierung in *Escherichia coli*

Im Gegensatz zu DNA-Polymerasen, deren Aktivität auf die Elongation von bereits vorhandenen Nukleotidsequenzen (sog. Primer) beschränkt ist und welche daher nicht durch sich selbst einen Replikationsbereich initiieren können, können RNA-Polymerasen die Transkription der Gene *de novo* initiieren. Das bedeutet, dass sie nicht nur in der Lage sind RNA-Stränge zu verlängern, sondern die RNA-Synthese durch Einbau des ersten NTP dem sogenannten Start- bzw. Initiationsnukleotid (iNTP) auch starten zu können (Wagner 2000). Um eine zielgerichtete Initiation der Transkription zu gewährleisten und der wahllosen Vervielfältigung unspezifischer Genprodukte vorzubeugen, ist die Transkriptionsinitiation an distinkte Sequenzen bzw. Strukturen der abzulesenden DNA geknüpft. Diese doppelsträngigen Transkriptionsstartsequenzen befinden sich 5´ distal zu den jeweiligen Zielgenen und werden Promotoren genannt. Promotoren sind als zentrales, regulatives Element der Transkription von besonderer Bedeutung für diese Arbeit und sollen daher im Folgenden ausführlich beschrieben werden.

1.4.1 Charakterisierung der Strukturen und Funktionen von Promotoren

Promotoren zeichnen sich durch hochkonservierte Sequenzelemente, den sogenannten Kernpromotoren, aus. Diese können je nach Art der zu initiierenden Gene variieren und anhand dessen in Gruppen eingeteilt werden. Nahezu alle Kernpromotoren lassen

sich in drei Strukturen unterscheiden (Lisser and Margalit 1993, Harley and Reynolds 1987). Die erste ist eine hochkonservierte Sequenz des nicht kodierenden DNA-Stranges, bestehend aus sechs Nukleotiden (nt). Diese befindet sich 10 nt 5‘ distal vom Transkriptionsstart (+1) entfernt und wird daher auch als -10-Region oder Pribnoxbox bezeichnet. In den Promotoren σ^{70}-regulierter Gene hat diese -10-Region die Konsensussequenz 5´-TATAAT-3´. Das zweite Erkennungselement der Kernpromotoren umfasst eine ebenfalls aus einem Hexamer bestehende Sequenz, welche sich 35 nts 5´ distal des +1-Nukleotids auf dem nicht kodierenden DNA-Strang befindet und -35-Region genannt wird. Diese zeichnet sich in σ^{70}-regulierten Promotoren durch die Konsensussequenz 5´-TTGACA-3´aus. Zwischen der -10-Region und der -35-Region der Kernpromotoren befindet sich ein Bereich nicht konservierter Nukleotide. Charakteristisch für diesen Bereich ist jedoch eine festgelegte Sequenzlänge von idealerweise 17 nts ± 1 Basenpaare (bp), welche sich maßgeblich auf die Aktivität der jeweiligen Promotoren auswirkt (Beutel and Record 1990). Es ist zu erwähnen, dass bis heute noch kein natürlich vorkommender Promotor beschrieben werden konnte, der alle drei Konsensuselemente zu 100 % erfüllt. Die Bedeutung dieser Elemente wird jedoch deutlich, bedenkt man, dass besonders starke Promotoren in der Regel nicht mehr als drei Abweichungen von dem Konsensuspromotor beinhalten (Mulligan et al. 1984).

In Abbildung 1.4.1.1 ist der schematische Aufbau eines Promotors inklusive des Kernpromotors exemplarisch an einem Promotor der σ^{70}-Familie dargestellt. Ergänzend zur Kernpromotorstruktur konnten durch Analysen vieler Promotoren akzessorische strukturelle Motive identifiziert werden, welche sich ebenfalls modulierend auf die Aktivität diverser Promotoren auswirken. Diese lassen sich in 5´ distal („upstream activating sequences“ (UAS-Regionen) und 3´ distal („downstream sequence regions“ (DSR)) vom Transkriptiosstart befindliche Motive unterscheiden (Wagner 2000). UAS-Regionen umspannen einen Bereich von ca.-150 bp bis -65 bp in Relation zum Transkriptionsstart. Sie sind maßgeblich an der Interaktion mit Transkriptionsfaktoren beteiligt. Ebenfalls 5´distal vom Transkriptionsstart befindlich ist das UP-Element (-40 bis -65), welches eine direkte Bindung mit der CTD der *E. coli* α-Untereinheit (siehe 1.2.2) nachgewiesen werden konnte. Die 3´ distalen DSR-Sequenzen befinden sich je nach Promotor in Bereichen von ca. +2 bis +20 in Relation

zum Transkriptionsstart und können sich ebenfalls erheblich auf die Transkription des Promotors auswirken.

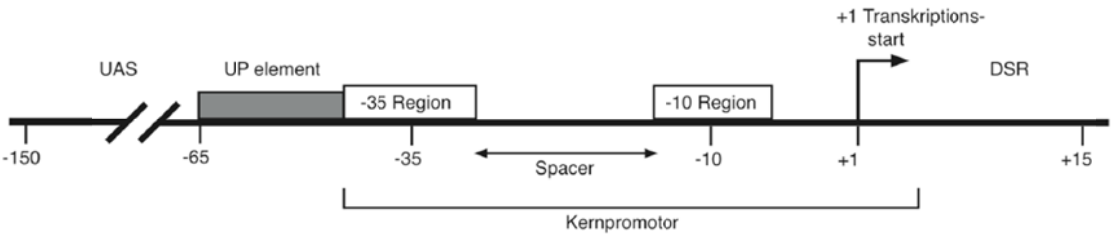


Abb. 1.4.1.1*: E. coli* σ^{70}-Konsensus-Promotorstruktur
Schematisch dargestellt ist die Promotorstruktur eines *E. coli* Promotors der σ^{70}-Familie samt typischer Kernpromotorstruktur. Sie beinhaltet sowohl die –35- als auch die –10-Region, beide getrennt durch eine Spacersequenz von 17±1 Basenpaaren. Darüber hinaus dargestellt sind die den Kernpromotor flankierenden UAS- und DRS-Regionen. Die Positionen der einzelnen Strukturelemente sind durch Zahlen indiziert, welche in Relation zu dem als +1 definierten Transkriptionsstart zu sehen sind (Darstellung entnommen aus Wagner 2000).

Wie in 1.2.5 beschrieben wird die Bindung der RNAP an den Promotoren über die unterschiedlichen σ-Untereinheiten der RNAP forciert. Diese erkennen typspezifisch die erwähnten Variationen innerhalb der Kernpromotoren. Dieses Zusammenspiel variabler spezifischer Sigmafaktoren und komplementierender genspezifischer Kernpromotorsequenzen ist grundlegend für die zielgerichtete Transkription nahezu aller Bakterien. Trotz der hohen Promotorspezifität ist ergänzend zu erwähnen, dass einige Promotoren auch überlappend von unterschiedlichen Sigmafaktoren erkannt werden können. Ein Beispiel dafür ist die überlappende Promotorspezifizität des σ^{70}- und σ^{38}-Holo-Enzyms (E σ^{70} und E σ^{38}) in *E. coli*.

1.4.2 Unterschiede in den Promotoraktivitäten in *E. coli*

In vivo konnten Promotorinitiationsraten in einem Bereich von vier Größenordnungen von einem Transkript bis 10^{-4} Transkripte pro Sekunde beobachtet werden (Record 1996, Deuschle et al. 1986). Als ausschlaggebend für diese drastischen Schwankungen

der Promotorstärken, beschrieben als die Rate mit der der Transkriptionselongationskomplex einen Promotor räumt und somit der Neuinitiation einer anderen RNAP zugänglich macht (Brunner and Bujard 1987), ist zum einen die jeweilige Kompetenz zur Bildung offener Promotorkomplexe (McClure 1985) zu nennen (siehe 1.3). Diese ist bei vielen Promotoren die ausschlaggebende und transkriptionsraten-limitierende Konstante. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass sich auch die RNA-Ketten-Initiationsrate limitierend auf die Aktivität diverser Promotoren auswirken kann (Hsu 1996, Stefano and Gralla 1979).

Ein weiterer großer Faktor in der Regulation von Promotorstärken ist die Regulation von Proteinfaktoren (sog. Transkriptionsfaktoren), welche die Transkription auf allen Ebenen (Initiation, Elongation, Termination, siehe 1.3) beeinflussen können (Wagner 2000).

1.5 Grundlegende Mechanismen in der Regulation ribosomaler RNA in *Escherichia coli*

In Prokaryoten wird die Kapazität der Proteinbiosynthese durch die Synthese ribosomaler RNA (rRNA) als Hauptbestandteil der Ribosomen limitiert. Die Proteinbiosyntheserate eines Ribosoms ist auf 15 bis 20 Aminosäuren (AS) pro Sekunde begrenzt. In Phasen optimalen Wachstums steigt der Bedarf an Proteinsynthese, welches einen Anstieg der Ribosomenanzahl pro Zelle von bis zu 70.000 bedingen kann (Gourse et al. 1996). Die Synthese von Ribosomen ist einer der energieaufwändigsten Prozesse innerhalb einer Zelle und wird direkt über die Menge der zur Verfügung stehenden rRNA reguliert (Edlin and Maaloe 1966, Gausing 1977). Ein Aufbau oder eine Aufrechterhaltung eines hohen Ribosomentiters in Situationen limitierten Wachstums, beispielsweise resultierend aus einer Nährstoffverarmung, würde aufgrund der hohen energetischen Kosten den Energiehaushalt einer Zelle stark gefährden. Dadurch kommt der rRNA-Synthese eine Schlüsselfunktion im bakteriellen Wachstum zu, wobei die koordinierte rRNA-Synthese einem komplexen regulatorischen Netzwerk aus faktorabhängiger und faktorunabhängiger Regulationen unterliegt.

1.5.1 Redundanz ribosomaler Promotoren in *E. coli*

Die Transkription ribosomaler RNA erfolgt in *E. coli* über sieben ribosomale Operons. Solch eine Redundanz an ribosomalen Transkriptionseinheiten ist kein *E. coli* spezifisches Phänomen, sondern ist sowohl bei anderen Prokaryoten als auch bei Eukaryoten zu beobachten. Hierbei ist die Anzahl der einzelnen Operons interspezifisch variabel, innerhalb des Organismus aber konserviert. Es konnte gezeigt werden, dass die Anzahl an rRNA Transkriptionseinheiten von 1 bis 15 variieren kann (Bott 1984, Hui and Dennis 1985, LaFauci et al. 1986, Schmidt 1997). Im Gegensatz dazu konnte in der Arbeit von Long und David ein Aufkommen von mehreren hundert rRNA-Transkriptionseinheiten in Eukaryoten beschrieben werden (Long and Dawid 1980). Durchforstet man verfügbare Datenbanken über die Heterogenitäten ribosomaler Operons bei Prokaryoten, so fällt auf, dass Genredundanz im prokaryotischen Genom eher ungewöhnlich ist (Klappenbach et al. 2001). Auch ist die Bedeutung einer Aufteilung der rRNA-Synthese in sieben Operons für *E. coli* noch nicht gänzlich geklärt. Die Arbeitsgruppe um Condon konnte zeigen, dass fünf der rRNA-Operons in *E. coli* für optimales Zellwachstum nötig sind, eine schnelle Adaption an Temperatur- und Nährstoffschwankungen jedoch nur in Gegenwart aller sieben Operons gewährleistet werden kann (Condon et al. 1995). Weiterhin ergaben Analysen unserer Arbeitsgruppe, dass einige dieser Operons, basierend auf einzelnen Basenheterogenitäten, unterschiedlich sensitiv stringent reguliert werden (Kolmsee et al. 2011). Es ist daher davon auszugehen, dass die Redundanz ribisomaler Promotoren in *E.coli* eine Strategie zur schnellen Anpassung an Umweltbedingungen über spezialisierte Ribosomen darstellt.

1.5.2 Charakteristische Strukturmotive ribosomaler *E. coli* Promotoren

Die Transkription ribosomaler Operons in *E. coli* erfolgt über zwei Promotoren (P1 und P2) in Tandemformation (Lindahl and Zengel 1986), wobei die stringente Regulation der rRNA zumindest hauptsächlich über die Aktivität des P1 vollzogen wird (Josaitis et al. 1995). Der ribosomale RNA P1(*rrn*P1)-Promotor gehört zu den σ^{70}-abhängigen Promotoren mit all ihren charakteristischen Motiven (s. 1.4.1). Obwohl seine Spacersequenz mit 16 nt anstelle der bevorzugten 17 nt um ein Nukleotid von der ermittelten Idealstruktur abweicht, gehört der *rrn*P1-Promotor *in vivo* zu den

stärksten Promotoren der Zelle. Mutationsanalysen mit dem Ziel die *rrn*P1-Spacerlänge auf 17 nt zu erhöhen, ergaben eine deutliche Steigerung der Promotoraktivität nach Mutation. Allerdings ging mit dieser gesteigerten Promotorproduktivität auch ein Verlust der Wachstumsratenregulation einher (Gaal et al. 1989, Dickson et al. 1989). Weitere Charakteristika ribosomaler RNA-Promotoren sind GC-reiche Sequenzen, die direkt 3´ distal an die -10-Region anschließen und als Diskriminatoren bezeichnet werden. Es konnte gezeigt werden, dass diese Sequenzen unmittelbar mit der positiven bzw. negativen Regulation stringenter Promotoren korrelieren. Promotoren, deren Transkription in Abhängigkeit zu ppGpp einbricht, zeichnen sich wie für die *rrn*-Promotoren beschrieben durch eine GC-reiche Diskriminatorsequenz aus. Positiv regulierte Promotoren, wie die der Aminosäurenbiosynthese, weisen einen AT-reichen Diskriminator auf (Travers 1984, Zacharias et al. 1989, Zacharias et al. 1990). Aufgrund der oben beschriebenen Merkmale ribosomaler Promotoren zeichnen sich die offenen Komplexe der Transkriptionsinitiation zwischen rRNA-Promotor und RNAP durch eine besondere Kurzlebigkeit aus. Diese kann erst durch Einbau der ersten beiden Startnukleotide kompensiert werden, woraus ein wichtiger Regulationsmechanismus ribosomaler Promotoren resultiert.

Die oben beschriebenen Charakteristika ribosomaler Promotoren sind in dem unten aufgeführten, als Abbildung 1.5.2.1 betitelten Sequenzalignment zusammenfassend dargestellt. Zusätzlich dargestellt sind die Sequenzen zweier *rrnD* P1-Varianten. Bei der einen (*rrnD* P1+1A) wurde das ursprüngliche Startnukleotid G an der Position +1 durch ein A ausgetauscht. Der zweiten Mutante (*rrnD* P1+1A+3C) wurde, zusätzlich zu dem G-zu-A-Austausch an der Position +1, an der Position +3 ein C für ein T eingesetzt. Dadurch entstand eine Sequenz, die im dargestellten Bereich von der Position -19 bis +3 identisch zu den Sequenzen der *rrnE* und *rnnH* P1-Promotoren ist.

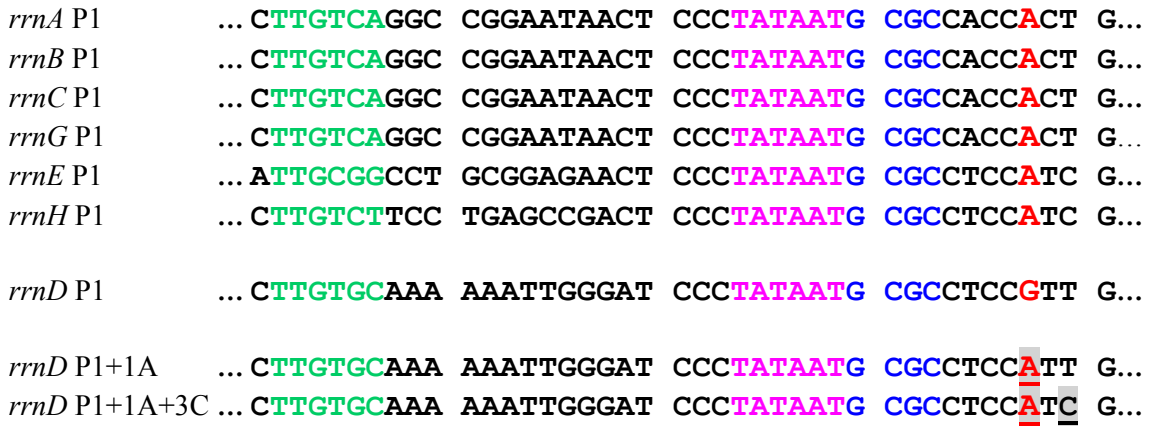


Abb. 1.5.2.1 Sequenzalignment der sieben *E. coli* rRNA P1-Kernpromotoren und zweier *rrnD*-Promotorvarianten mit einer bzw. zwei Punktmutationen in der Transkriptionsstartsequenz.
Gezeigt ist der nichtkodierende Strang der sieben rRNA P1-Promotoren und zweier Mutanten des *rrnD* P1-Promotors. Die Konsensussequenzen der strukturellen Charakteristika ribosomaler Promotoren wurden farblich hervorgehoben (grün: -35-Region; magenta: -10-Region; blau: Diskriminator). Weiterhin indiziert ist der Transkriptionsstart der jeweiligen Promotoren durch rote Buchstaben. In der Variante *rrnD* P1+1A wurde das ursprüngliche Startnukleotid G durch ein A ersetzt. Die Mutante *rrnD* P1+1A+3C verfügt, zusätzlich zu dem eben beschriebenen Austausch A auf Position 1, über ein C anstelle eines G auf Position +3. Die Punktmutationen sind in der Abbildung durch grau unterlegte und unterstrichene Buchstaben lokalisiert. Durch diese beiden Punktmutationen wurde die ehemalige Sequenz des *rrnD* P1 in dem dargestellten Bereich von Position -19 bis +4 den Sequenzen der *rrnE* und *rnnH* P1-Promotoren angeglichen (Kolmsee et al. 2011).

1.6 Die Stringente Kontrolle

Die Stringente Kontrolle ist eine zentrale Reaktion in Bakterien zur Anpassung an Nährstoffmangel und kann durch die eine Vielzahl von Mangel- und Stresssignalen ausgelöst werden (Boutte and Crosson 2013). Vermittelt wird sie maßgeblich über ein Effektormolekül (ppGpp), synthetisiert durch sogenannte RSH (Rel/Spo homolog)- und SAS („small-alarmone-synthetase“) -Proteine (siehe 1.6.1). Obwohl die Stringente

Kontrolle erstmals in *E. coli* beschrieben wurde, konnten bis auf wenige Ausnahmen (beispielsweise einige obligat intrazelluläre pathogene Bakterien) RSH-Proteine in allen bakteriellen Spezies beschrieben werden (Atkinson et al. 2011, Mittenhuber 2001). Dennoch gibt es zwischen den einzelnen Spezies deutliche Unterschiede bezüglich der Natur, der Reize und der daraus resultierenden Anpassungsmechanismen im Rahmen der Stringenten Kontrolle. Diese Unterschiede scheinen stark in Korrelation mit der von dem jeweiligen Organismus besetzten ökologischen Nische zu stehen (Boutte and Crosson 2013). Als Schlüsselereignis der Stringenten Kontrolle in *E. coli* gilt ein rapider Einbruch der stabilen RNA (rRNA/ tRNA)-Transkription, begleitet von der gesteigerten Transkription von Genen der Aminosäurenbiosynthese (Cashel 1996). Zusätzlich fördert ppGpp die Transkription alternativer Sigmafaktoren wie die des σ^S (siehe 1.2.5). Dieses hat zur Folge, dass die Transkription der Gene des exponentiellen Wachstums gedrosselt wird und Gene der Stressabwehr sowie der stationären Phase aktiviert werden.

1.6.1 (p)ppGpp als Vermittler der Stringenten Kontrolle

In allen getesteten stringent regulierten Organismen, geht die Stringente Kontrolle mit einer gesteigerten Synthese der Alarmone Guanosintetraphosphat (ppGpp) bzw. Guanosinpentaphosphat (pppGpp) einher. Diese gelten als Schlüsselmoleküle der Stringenten Kontrolle und sind für die Regulation von mehreren hundert Genen in *E. coli* verantwortlich (Durfee et al. 2008, Traxler et al. 2008). Im Folgenden sollen diese beiden Moleküle, sofern nicht ausdrücklich differenziert, als ppGpp zusammengefasst werden. Neben der zentralen Bedeutung auf Transkriptionsebene ist ppGpp unter anderem in den Prozessen der DNA-Replikation, der Translation und der Virulenz vieler Pathogene involviert (Milon et al. 2006, Srivatsan and Wang 2008, Kanjee et al. 2012, Kriel et al. 2012, Rymer et al. 2012, Denapoli et al. 2013, Dalebroux et al. 2010).

Wie in 1.6 beschrieben, wird ppGpp durch sogenannte RSH-Proteine synthetisiert. Diese sind in *E. coli* das RelA- und SpoT-Enzym. Während SpoT sowohl über eine ppGpp-Synthase als auch über eine Hydrolaseaktivität verfügt, liegt die

Hydrolasedomäne des RelA lediglich inaktiv vor. Daher ist die Aktivität dieses Enzymes auf die Synthese des ppGpps beschränkt. (Atkinson et al. 2011). Studien haben gezeigt, dass die RelA-abhängige und die SpoT-abhängige ppGpp-Synthese differentiell reguliert werden. Das RelA-Protein liegt in *E. coli* assoziiert an dem 70S-Ribosom vor (Ramagopal and Davis 1974). Unter AS-limitierten Bedingungen steigt der Gehalt an unbeladenen tRNAs in der Zelle. Diese binden die ribosomale „A-site", welches ein Stocken der Translation zur Folge hat. Dieses Signal veranlasst die Dissoziation des RelA-Proteins und die damit verbundene Aktivierung der ppGpp-Synthesedomänen (English et al. 2011, Haseltine and Block 1973). Dieser Mechanismus ermöglicht eine gezielte Reaktion von *E. coli* auf die Reduzierung einer einzelnen AS-Spezies.

Im Gegensatz zu RelA wird die vom zytosolischen SpoT-vermittelte ppGpp-Synthese nicht durch Deletion einer einzelnen AS-Spezies aktiviert, kann jedoch als Reaktion auf multiple AS-Reduzierungen beobachtet werden (Murray and Bremer 1996). Die bestuntersuchte SpoT-vermittelte ppGpp-Synthese resultiert aus der Reaktion auf Lipidmangel. Das „holo-acyl-carrier"-Protein, welches an der Biosynthese von Fettsäuren beteiligt ist, bindet direkt an SpoT und induziert auf diesem Wege die ppGpp-Synthese durch SpoT (Battesti and Bouveret 2006).

Es konnte gezeigt werden, dass der ppGpp-Gehalt in *E. coli* in Relation zum Zellzyklus streng reguliert wird und im Rahmen der Stringenten Kontrolle innerhalb weniger Minuten bis in den millimolaren Konzentrationsbereich ansteigen kann (Lund and Kjeldgaard 1972).

Die in 1.6.1 beschriebene Synthese von ppGpp in *E. coli* sowie ihre Auswirkung auf stringent regulierte Promotoren (siehe 1.6) wurde von Magnusson et al. (Magnusson et al. 2005) schematisch zusammengefasst und ist im Folgenden (Abbildung 1.6.1.1) dargestellt.

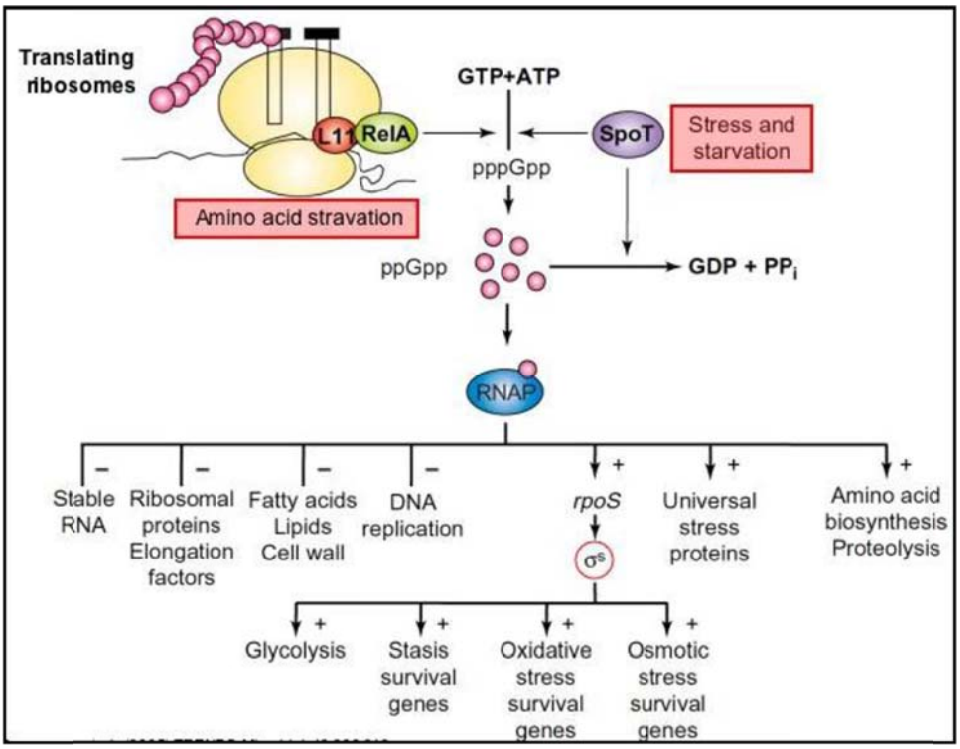


Abb. 1.6.1.1 ppGpp-Synthese und ihre Auswirkung auf stringente Promotoren in *E. coli*. Schematisch dargestellt ist die Stringente Kontrolle als globales Netzwerk in *Eschericha coli* ausgehend von der Synthese des ppGpp (Tetra- und Pentaphosphat). Durch Stress, Nährstoff- oder Aminosäuremangel wird aus ATP und GDP bzw. GTP ppGpp bzw. pppGpp gebildet. Beide können an die RNAP binden und dadurch die Aktivität des Enzyms modulieren, woraufhin Gene der stabilen RNA-Synthese, der Translation und Replikation inhibiert werden. Dahingegen werden Gene der AS-Synthese und der universalen Stressantwort sowie der alternative Sigmafaktor *rpoS* induziert. Unter anderem durch die Erhöhung des intrazellulären σ^S-Titers kommt es zu einem Wechsel des Holo-Enzyms von σ^{70} zu σ^S (siehe 1.2.5), welches die Transkription von Genen der Glykolyse, der oxidativen Stressabwehr etc. zur Folge hat (Magnusson et al. 2005).

Nach oben geschildertem Beispiel kann RelA auch zur *in vitro* ppGpp-Synthese benutzt werden (Krohn and Wagner 1995). Hierbei genügt es, ribosomenassoziertes RelA in einen Ansatz zusammen mit ATP und GTP zu geben. Eine zusätzliche Stimulation beispielsweise durch Simulieren eines Stresssignals (z.B. Nährstoffmangel) ist hierbei nicht von Nöten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde unter Anwendung dieser Synthesereaktion, wie im Material- und Methodenteil ausführlich beschrieben (siehe 3.3.2), ppGpp präparativ *in vitro* synthetisiert.

1.6.2 DksA als Transkriptionsfaktor in *E. coli*

Wie in 1.6.1 beschrieben, wirkt sich ppGpp gravierend auf die Transkription einer Vielzahl von Genen aus. In diesem Maße konnte dieses jedoch lange Zeit nur *in vivo* beobachtet werden. Der ppGpp-induzierte Einbruch der ribosomalen RNA verlief *in vitro* deutlich seichter und die Aktivierung der Aminsäurenbiosynthese blieb in Abwesenheit von Zellrohextrakt in Gänze aus. Diese Diskrepanz in den Resultaten beider Versuchsbedingungen ließ das Mitwirken eines Cofaktors vermuten, der in den *in vitro* Analysen bis dato nicht berücksichtigt zu sein schien. Untersuchungen haben ergeben, dass es sich bei diesem Vermittler stringenter Regulation um den 17,9 kDa (151 AS) großen DnaK Suppressor A (DksA) handeln musste (Paul et al. 2004). Das Protein ist nach seiner ursprünglichen Entdeckung als „multicopy"-Suppressor einer temperatursensitiven *dnaKJ E. coli*-Mutante benannt (Kang and Craig 1990) und gilt heute aufgrund seiner engen Beteiligung an einer Vielzahl ppGpp-regulatorischer Prozesse als der Cofaktor der Stringenten Kontrolle (Paul et al. 2004). Es konnte gezeigt werden, dass DksA, trotz der gravierenden Bedeutung für stringent regulierte Prozesse, intrazellulär konstant bei 3.000-10.000 Molekülen pro Zelle vorliegt. Im Gegensatz zu ppGpp ist der DksA-Metabolismus in *E. coli* demnach nicht an Wachstumsphase und Stressdetektion gekoppelt (Paul et al. 2004).

Wie in Abbildung 1.6.2.1 dargestellt, ist DksA unterteilbar in drei strukturelle Domänen. Die eine beschreibt eine lange (75 AS) „coiled-coil"-Struktur. Sie setzt sich zusammen aus zwei N- und C-terminalen α-Helices mit zwei Aspartatresten an ihrer Spitze. Eine weitere globuläre Domäne, bestehend aus N- und C-terminalen Regionen, beinhaltet ein Zinkfingermotiv, während die dritte von einer C-terminalen α-Helix gebildet wird (Perederina et al. 2004). Trotz mangelnder Sequenzhomologie, ist diese Struktur stark homolog zur Struktur der Transkriptionsfaktoren GreA und GreB. Daher lag die Vermutung nahe, dass sich DksA als Transkriptionsfaktor über die gleichen Mechanismen auf die Genexpression in *E. coli* auswirkt wie GreA und GreB (Laptenko et al. 2003, Opalka et al. 2003). Tatsächlich basiert die Transkriptionsregulierung über DksA nicht wie bei konventionellen Transkriptionsfaktoren auf einer Bindung von Nukleinsäuren, sondern wie für die beiden Gre-Faktoren beschrieben, über spezifische Bindung der RNAP. Hierbei drängt DksA über die „coiled-coil"-Domäne in den sekundären Kanal der RNAP, so dass die

beiden Aspartatreste in der Nähe des aktiven Zentrums positioniert sind. Es wird vermutet, dass über diese AS-Reste die Ausrichtung des Mg^{2+}-Ions im aktiven Zentrum neu koordiniert wird, wodurch die Interaktion zwischen RNAP und ppGpp potenziert wird (Perederina et al. 2004). In Studien konnte eine ppGpp-unabhängige Beeinflussung der offenen Komplexkinetiken (siehe 1.3.1) beschrieben werden. Hierbei reduziert DksA die Halbwertszeit der Komplexe und erhöht gleichzeitig ihre Sensitivität gegenüber Schwankungen in der iNTP- und ppGpp-Konzentration (Paul et al. 2004). Auf diesem Weg verstärkt DksA den Effekt von ppGpp sowohl auf negativ (z.B. rRNA-, tRNA-Promotoren) als auch auf positiv stringent regulierte (Aminosäurebiosynthese, Aminosäurentransport) Faktoren (Magnusson et al. 2005, Paul et al. 2004, Paul et al. 2005). Bei den oben beschriebenen Mechanismen handelte es sich durchweg um synergetische Mechanismen der beiden stringenten Faktoren ppGpp und DksA. Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass beide Faktoren zusätzlich in der Lage sind voneinander unabhängig oder gar antagonistisch zu wirken (Aberg et al. 2009, Magnusson et al. 2007). Dieses konnte z.B. für Gene der Flagellensynthese und Chemotaxis gezeigt werden, die in DksA-Deletionsstämmen induziert, in $ppGpp^0$-Stämmen jedoch reprimiert werden (Aberg et al. 2009).

Abb. 1.6.2.1 Ribbon-Struktur des DksA-Proteins
Dargestellt ist die Struktur des DksA-Proteins, in dem die oben beschriebenen Domänen farblich hervorgehoben wurden. Blau gezeigt ist die „coiled-coil"-Domäne bestehend aus zwei α-Helices. Diese sind durch einen α-„turn" (grün) voneinander getrennt und tragen Aspartatreste an ihrer Spitze (rot). Die globuläre Domäne ist in gelb dargestellt und verbindet die „coiled-coil"-Domäne mit der orange hervorgehobenen C-terminalen α-Helix (Perederina et al. 2004).

1.7 Der *E. coli tac*-Promotor

1.7.1 Strukturelemente des *tac* -Promotors

In einem Großteil der in dieser Arbeit dargestellten Studien wurden gemessene Promotoraktivitäten in Relation zu den 1983 durch De Boer beschriebenen *tac*-Promotor gesetzt (de Boer et al. 1983). Neben den in 4.1 getesteten von Tim Kolmsee erstellten *rrn*D P1+1A und *rrn*D P1+1A+3C Promotoren, ist dieser der einzige im Rahmen dieser Arbeit getestet Promotor, der in der Natur nicht vorkommend ist. Bei dem *tac*-Promotor handelt es sich um ein in *E. coli* aktives, synthetisch hergestelltes Promotorhybrid mit idealer σ^{70}-Konsensussequenz (siehe 1.4.1). Diese wurde durch die Kombination der -35-Region des *trp*-Promotors mit der -10-Region des *lacUV5*-Promotors erreicht. Der *lacUV5*- Promotor ist eine Variation des *E. coli lac*-Promotors mit zwei Punktmutationen zur Angleichung der -10-Region an die σ^{70}-Konsensussequenz (Pribnow 1975). Durch diese Kombination der Konsensussequenzen ist der *tac*-Promotor einer der stärksten in *E. coli* aktiven Promotoren, obwohl seine Spacersequenz mit 16 bp statt 17 bp um 1 nt von der idealen Spacerlänge abweicht. Weiterhin ist zu erwähnen, dass der *tac*-Promotor über keine Diskriminatorsequenz verfügt (Zacharias et al. 1989).

In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass der *tac*-Promotor in *E. coli* weder durch ppGpp noch DksA stringent kontrolliert wird (siehe 1.7). Dieses mag teilweise in dem in 1.7.1 beschriebenen Fehlen einer Diskriminatorsequenz begründet liegen. Allerdings konnte in der Arbeit von Zacharias et al. gezeigt werden, dass sich durch das Einsetzen eines GC-reichen Diskriminators, 3´ distal von der -10-Region keine stringente Regulierbarkeit des *tac*-Promotors in *E. coli* provozieren lässt. (Zacharias et al. 1989). Wahrscheinlich ist also, dass die nicht stringente Regulation zumindest teilweise mit der idealen Konsensussequenz korreliert. Vergleichbares konnte auch für ppGpp-inerte Mutanten ribosomaler Promotoren beschrieben werden (siehe 1.5.2).

1.8 Der *hisG*-Promotor in *E. coli*

Ein weiterer zentraler Promoter dieser Arbeit ist der *hisG*-Promotor des *E. coli* Histidin-Operons. Im Gegensatz zu den oben beschriebenen rRNA-Promotoren (siehe 1.5), zeichnet sich der *hisG*-Promotor durch eine gesteigerte Transkriptionsaktivität unter stringenten Bedingungen (siehe 1.6) aus. Studien haben gezeigt, dass sich diese positive stringente Regulierung auf distinkte, konservierte Motive in der Promotorsequenz zurückführen lassen (Riggs et al. 1986).

1.8.1 Strukturelemente positiv stringent regulierter Promotoren am Beispiel des *E. coli hisG*-Promotors

Ebenso wie die in 1.5 und 1.7 beschriebenen Promotoren, gehört der *hisG*-Promotor zu den σ^{70}-abhängig regulierten Promotoren. Wie alle σ^{70}-Promotoren verfügt der *hisG*-Promotor über die typischen -10- und -35-Regionen (siehe 1.4.1). Abweichend von der σ^{70}-Idealspacerlänger (17 nt) sind diese jedoch durch eine 18 nt umfassende Spacersequenz voneinander getrennt.

Ein weiteres konserviertes Strukturelement aller *hisG*-Promotoren ist die in 1.5.2 beschriebene Diskriminatorsequenz, welche sich bei diesem Promotor für Aminosäurebiosynthese-Gene durch einen hohen AT-Gehalt auszeichnet. Im Material und Methodenteil dieser Arbeit ist unter Kapitel 3.3 die Struktur des *hisG*-Promotors samt Core-Promotorsequenz dargestellt.

1.9 Fragestellung und Konzeption der vorgelegten Arbeit

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Stringenten Kontrolle in *E. coli* im Hinblick auf den regulatorischen Einfluss der zellulären Faktoren ppGpp und DksA auf Trankriptions- und Proteomebene.

Die Stringente Kontrolle ist ein komplexes Regulationssystem zur Abwehr vielzähliger Stressfaktoren. Auslöser der Stringenten Kontrolle ist das Alarmon Guanosintetraphosphat (ppGpp), welches insbesondere nach Aminosäuremangel rapide in der Zelle akkumuliert und zahlreiche Anpassungsmechanismen in der Zelle aktiviert. Erst einige Jahre nach der Entdeckung der Stringenten Kontrolle und von ppGpp, konnte anhand von *in vitro* Analysen gezeigt werden, dass ein Großteil der stringenten Mechanismen in *E. coli* der Anwesenheit des sekunkären Kanals des RNA-Polymerase bindenden Proteins DksA bedürfen.

In Bakterien erfolgt die Anpassung an Umweltbedingungen auf Transkriptions-, Tranlations- und posttranslationaler Ebene. Jedoch findet der Großteil der Anpassung durch Regulation der Transkription statt. Daher war die Analyse der Effekte von ppGpp und DksA auf das Trankriptionsverhalten der Zelle primäres Ziel dieser Arbeit. Hierzu wurde in diversen Analysen das Initiationsverhalten der *E. coli* RNA-Polymerase an stringenten und nicht stringenten Promotoren analysiert. Weiterhin wurde die Rolle von DksA in der Stringenten Kontrolle auf Proteomebene untersucht, um den Einfluss dieses stringenten Regulators auf das Gesamtergebnis der stringenten Transkription zu analysieren.

2 Material

2.1 Allgemeines

Sofern nicht anders vermerkt, besaßen alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien den Reinheitsgrad *pro analysis*. Verwendete Lösungen, Puffer und Medien wurden alle mit hoch reinem Milli-Q-Wasser angesetzt. Dieses entstammte der hauseigenen Anlage mit nachgeschaltetem „water-purification-system“ EPA Est. 41237-MA-1 der Millipore GmbH, Neu Isenburg und wird im Folgendem als *Aqua dest*. bezeichnet.

2.2 Eingesetzte Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten *E. coli* K-12-Stämme sind im Folgenden tabellarisch und in alphabetischer Reihenfolge zusammengefasst.

Tabelle 2.2.1: Verwendete *Escherichia coli* Stämme und ihre Genotypen

Stamm	Genotyp	Referenz
CF9239	MG1655 (F-); ΔdksA; ::kanr	Kang & Craig, 1990
HB 101	F-, proA2, recA13, ara-14, lacY1,galK2, xyl-5, mtl-1, rpsL20, Strr, supE44, hsdS20 (rB-, mB-), λ-	Boyer und Roulland-Dussoix, 1969
MG1655	F-, λ-, ilvG-, rfb-50, rph-1	Bachmann, 1987
XL -1	recA1, lac-, end A1 gyr A96, thi, hsd R17, sup E44, rel A1, [F-: pro AB, laciq, lacZ ΔM15, Tn 10]	Bullock, Stratagene

2.3 Verwendete Plasmide

Im Folgenden tabellarisch und alphabetisch zusammengefasst sind alle Plasmide, die für diese Arbeit relevant gewesen sind, samt Beschreibung.

Tabelle 2.3.1: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide

Plasmid	Eigenschaften	Refernez
pHD1-B	282 BP PCR Insert mit *rrnB* UAS (-264 bis +18) in SmaI Site von pKK 232-8	Hillebrand, 1998
pHD1-D	267 BP PCR Insert mit *rrnD* UAS (-252 bis +18) in SmaI	Hillebrand, 1998
pHD1-D +1A (pTK01)	Derivat des pHD1-D Plasmides mit einer Monosubstitution des G+1 Start-nukleotids durch A+1, 5361 bp	Kolmsee, 2005
pHD1-D +1A+3C (pTK02)	Derivat des pHD1-D Plasmids mit einer Disubstitution der G+1 und T+3 Startnukleotide durch A+1 und C+3, 5361 bp	Kolmsee, 2005
pHD1-E	290 BP PCR Insert mit *rrnE* UAS (-272 bis +18) in SmaI Site von pKK 232-8	Hillebrand, 1998
pHD1-H	252 BP PCR Insert mit *rrnH* UAS (-234 bis +18) in SmaI Site von pKK 232-8	Hillebrand, 1998
p*hisG*-T1T2	92 bp *hisG*-Promotorfragment vor T1-T2 Terminatoren in pCP1 kloniert, ca. 3100 BP	Diese Arbeit
p*tac*W	pKK232-8-Derivat des *tac* WT-Promotor	Zacharias et al. (1989) EMBO J. 11: 3357-3363
pUC18-1	Derivat des pUC18 Vektors, trägt das P1-Fragment des *rrnB* Operons aus pKK3535 in der SmaI-Schnittstelle des pUC18,2921 bp	Zacharias et al. (1992) Biochemistry 31: 2621-2628
pCP1	pKK232-8-Derivat mit *rrnB* Termina-toren T1 und T2	Dissertation Corinna Pohl Düsseldorf 2005

2.4 Relevante Nukleinsäuren und Nukleotide

Unten aufgeführt ist eine Auflistung der in dieser Arbeit relevanten Nukleinsäuren samt Charakterisierung. Diese wurden untereilt in DNA-Fragmente und Oligonukleotde.

2.4.1 Relevante DNA-Fragmente

hisG-Fragment Gewonnen durch *EcoRI* und *BstUI* Restriktion des in dieser Arbeit erstellten p*hisG*-T1T2 Plasmids. Länge des oberen Stranges 112 bp, *hisG*-P1-Sequenz von -49 bis + 10 relativ zum P1-Start. Das Fragment wurde für Retardierungen verwendet.

P1-Fragment Gewonnen durch *EcoRI* und *BamHI* Restriktion aus pUC18-1. Länge des oberen Stranges 256 bp, *rrnB*-P1-Sequenz von -179 bis + 49 relativ zum P1-Start. Das Fragment wurde für Retardierungen verwendet.

tac-Fragment Gewonnen durch *SmaI* und *SalI* Restriktion aus ptacW. Länge des oberen Stranges 387 bp, *tac*-P1-Sequenz von -224 bis + 154 relativ zum P1-Start. Das Fragment wurde für Retardierungen verwendet.

hisG-PCR-Fragment 5´-biotinyliertes PCR-Fragment der Oligonukleotide *hisG*-fw-B und *his*G-rw (siehe 2.4.2). Das gebildete Fragment hat eine Länge von 347 bp und wurde sowohl als Matrize in „run-off" *in vitro* Transkriptionen als auch immobilisiert in den BiaCore-Analysen verwendet.

P1-PCR-Fragment Das 349 bp große, 5´-biotinyliertes Fragment wurde mittels PCR gewonnen. Hierzu dienten die Oligonukleotide P1-fw-B und P1-rw (siehe 2.4.2). Das Fragment wurde sowohl in „run-off" *in*

vitro Transkriptionen und als sogenannter Ligand immobilisiert in den BiaCore-Studien eingesetzt.

tac-PCR-Fragment Durch PCR mit Hilfe der Oligonukleotide *tac*-fw-B und *tac*-rw (siehe 2.4.2) erstelltes Fragment mit einer Größe von 349 bp. Das Fragment ist 5´-biotinyliert und wurde als „run-off"-Matrize in *in vitro* Transkripti-onen bzw. als Ligand in den BiaCore-Analysen eingesetzt.

2.4.2 Oligonukleotide

hisG-up-EcoRI 5´-ATA ATA GAA TTC ATT AAA CAA ATC CAT TGC C-3´
Bindet die chromosomale DNA *E. coli* MG1655. Beinhaltet eine EcoRI Schnittstelle (unterstrichen) und wurde für Amplifizierung der *hisG*-Promotorsequenz verwendet.

hisG-rv 5´-GGC TTT TTT ATA TAT TTTA TGG CAA TGG-3´
Bindet die chromosomale DNA *E. coli* MG1655 und wurde zur Amplifizierung der *hisG*-Promotorsequenz verwendet.

hisG-fw-B 5´-CCA ATA CGC AAA CCG CC-3´
5`-biotinylierter Vorwärtsprimer zur Amplifizierung des *hisG*-Promotorfragments aus p*hisG*-T1T2. Im späteren Verlauf dieser Arbeit wurde dieses Fragment in den BiaCore-Analysen verwendet.

hisG-rw 5´-CTA CTC TCG CGG GTA CCG AGG-3´
Rückwärtsprimer zur Amplifizierung des *hisG*-Promotorfragments aus p*hisG*-T1T2. Dieses wurde im späteren Verlauf dieser Arbeit in den BiaCore-Analysen verwendet.

P1-fw-B 5´-CTC GGT ACC CAT TGC CTT TTG-3´
5`-biotinylierter Vorwärtsprimer zur Amplifizierung des P1-Promotorfragments aus pUC 18-1, welches in den BiaCore-Analysen verwendet wurde.

P1-rw 5´-GCT GCA AGG CGA TTA AGT TGG -3´
Rückwärtsprimer zur Amplifizierung des P1-Promotor-fragments aus pUC 18-1. Dieses wurde im Verlauf dieser Arbeit in den BiaCore-Analysen eingesetzt.

tac-fw-B 5´-GCC ATA AAC TGC CAG GAA TTC C-3´
5`-biotinylierter Vorwärtsprimer zur Amplifizierung des *tac*-Promotorfragments aus dem p*tac*W-Plasmid. Das Promotorfragment wurde anschließend in den durchgeführten BiaCore-Analysen verwendet.

tac-rw 5´-CGA TTA AGT TGG GTA ACG CCA G-3´
Rückwärtsprimer zur Amplifizierung des *tac*-Promotorfragments aus dem p*tac*W-Plasmid. In den durchgeführten BiaCore-Analysen wurde dieses Fragment verwendet.

2.4.3 Nukleotide

Adenosin-5'-triphosphat	Boehringer, Mannheim
Adenosin-5'-[α32P]triphosphat	Hartmann, Braunschweig
Adenosin-5'-[γ32P]triphosphat	Hartmann, Braunschweig
Adenosin-5'-triphosphat, "FPLC ultra pure"	Pharmacia, München
Cytidin-5'-[α32P]triphosphat	Hartmann, Braunschweig
Cytidin-5'-triphosphat	Boehringer, Mannheim
Cytidin-5'-triphosphat, "FPLC ultra pure"	Pharmacia, München
Guanosin-5'-triphosphat	Boehringer, Mannheim
Guanosin-5'-triphosphat, "FPLC ultra pure"	Pharmacia, München

Uridin-5'-triphosphat	Boehringer, Mannheim
Uridin-5'-triphosphat, "FPLC ultra pure"	Pharmacia, München
Uridin-5'-[α32P]triphosphate	Hartmann, Braunschweig
2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat	Boehringer, Mannheim
2'-Desoxyadenosin-5-[α32P]triphosphate	Hartmann, Braunschweig
2'-Desoxycytidin-5'-[α32P]triphosphat	Hartmann, Braunschweig
2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat	Boehringer, Mannheim
2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat	Boehringer, Mannheim
2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat	Boehringer, Mannheim
Guanosin-5'-diphosphat	Boehringer, Mannheim

2.5 Verwendete Proteine

Alle in dieser Arbeit verwendeten Proteine sind in 2.5.1 bis 2.5.3 samt Bemerkung zur Herkunft tabellarisch zusammengefasst.

2.5.1 Enzyme und sonstige Proteine (alphabetisch)

DNase I (RNase-frei)	Roche, Mannheim
Lysozymchlorid	Sigma, St. Louis, USA
Peq Gold Protein Marker PEQLAB	Biotechnologie GmbH, Erlangen
Proteinase	K Roche, Mannheim
Ribonuklease A (RNase A)	Roche, Mannheim
Rinderserumalbumin (BSA)	New England Biolabs, USA
Rinderserumalbumin (BSA), acetyliert	New England Biolabs, USA
T4 DNA-Ligase	Roche, Mannheim
T4 Polynukleotidkinase	New England Biolabs, USA

2.5.2 Restriktionsendonukleasen (alphabetisch)

ApoI	New England Biolabs, USA
AvaII	New England Biolabs, USA
BamHI	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
BanI	New England Biolabs, USA
BsaAI	New England Biolabs, USA
BssHII	New England Biolabs, USA
Ecl136II	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
EcoRI MBI	Fermentas, St. Leon-Rot
HpaII	New England Biolabs, USA
HincII	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
HindIII	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
KpnI	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
MboI	New England Biolabs, USA
MspI	New England Biolabs, USA
SacI MBI	Fermentas, St. Leon-Rot
SmaI	New England Biolabs, USA
XbaI	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

2.5.3 Polymerasen (alphabetisch)

AMV-Reverse Transkriptase	Promega, Madison, USA
Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I	Promega, Madison, USA
Phusion High Fidelity DNA-Polymerase	Finnzymes, Espoo, Finnland
Taq-DNA-Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

WT RNA-Polymerase aus *E. coli* (Holoenzym) nach Burgess & Jendrisak, 1975; verändert nach Gonzales et al., 1977; charkterisiertnach Chamberlin et al., 1979; freundliche Gabe von R. Wurm

Δω RNA-Polymerase aus *E. coli* (Holoenzym) nach Burgess & Jendrisak,

1975; verändert nach Gonzales et al., 1977; charkterisiertnach Chamberlin et al., 1979; freundliche Gabe von A. Platis

2.6 Transkriptionsfaktoren

Alle *in vitro* Transkriptionen erfolgten in An- bzw. Abwesenheit der beiden unten aufgeführten Transkriptionsfaktoren.

DksA	nach Delic, 2006; freundliche Gabe von D. Delic
Guanosin-3'-5'-bis (diphosphat) (ppGpp)	in dieser Arbeit synthetisiert nach Krohn & Wagner, 1995 (siehe Methoden)

2.7 Eingesetzte allgemeine Puffer und Medien

Unten tabellarisch zusammengefasst ist eine alphabetische Auflistung aller in dieser Arbeit relevanten Puffer und Medien.

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
30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamidlösung (30:1):	290 g/l Acrylamid 10 g/l Bisacrylamid ad 1 l mit Aqua dest., mit Amberlite über Nacht (üN) deionisiert und filtriert

40% Acrylamid/0,8% Bisacrylamidlösung (20:1):	380 g/l Acrylamid 20 g/l Bisacrylamid ad 1 l mit Aqua dest., mit Amberlite üN deionisiert und filtriert
40% Acrylamid/0,8% Bisacrylamidlösung (46:1):	391,31 g/l Acrylamid 8,69 g/l Bisacrylamid ad 1 l mit Aqua dest., mit Amberlite üN deionisiert und filtriert
Formamid-Probenpuffer:	0,1% (w/v) Bromphenolblau 0,1% (w/v) Xylencyanol 95% (v/v) deionisiertes Formamid 25 mM EDTA, pH 8,0
2 x Harnstoff-Probenpuffer:	7 M Harnstoff 50 mM Tris-Borat, pH 8,3 1 mM EDTA 0,025% (w/v) Bromphenolblau 0,025% (w/v) Xylencyanol
10 x KGlu80-Puffer:	0,5 M Tris-Acetat, pH 8,0 0,1 M Mg-Acetat 10 mM Dithiothreitol (DTT) 1 mM EDTA, pH 8,0 100 µg/ml BSA, acetyliert 0,8 M Kaliumglutamat
5 x SDS-Laufpuffer:	150 g Tris 720 g Glycin 25 g SDS ad 5 l mit Aqua dest.
2 x SDS-Probenpuffer:	125 mM Tris-HCl, pH 6,8 2% SDS (v/v) 20% Glycerin (v/v) 0,025% (w/v) Bromphenolblau
4 x SDS-Probenpuffer:	250 mM Tris-HCl, pH 6,84% SDS (v/v)35% Glycerin (v/v) 0,025% (w/v) Bromphenolblau
50 x TAE-Puffer:	2 M Tris-Acetat, pH 7,5 50 mM EDTA, pH 8,0
2 x TAE-Probenpuffer:	0,025% (w/v) Bromphenolblau 0,025% (w/v) Xylencyanol 30% (v/v) Glycerin in 2 x TAE-Puffer
10 x TBE-Puffer:	0,89 M Tris-Borat, pH 8,3 25 mM EDTA, pH 8,0

2 x TBE-Probenpuffer:	0,025% (w/v) Bromphenolblau 0,025% (w/v) Xylencyanol 30% (v/v) Glycerin in 2 x TBE
TE-Puffer:	10 mM Tris-HCl, pH 8,0 1 mM EDTA, pH 8,0
1 x TGED-Puffer:	10 mM Tris-HCl, pH 8,0 5% (v/v) Glycerin 0,1 mM EDTA, pH 8,0 0,1 mM DTT
Top-Agar:	10 g/l Trypton 8 g/l NaCl 6 g/l Agar in Aqua dest. auf pH 7,0 eingestellt und autoklaviert
YT-Medium:	8 g/l Trypton 5 g/l Hefe-Extrakt 5 g/l NaCl in Aqua dest. auf pH 7,4 eingestellt und autoklaviert

2.8 Verwendete Feinchemikalien

Alle für diese Arbeit relevanten Feinchemikalien sind tabellarisch und alphabetisch im Folgenden dargestellt worden.

Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agar	Difco, Detroit, USA
Agarose	Sigma, St. Louis, USA
Agarose, ‘ultra pure’	SeaKem Cambrex Bio Science, USA
Ameisensäure	Merck, Darmstadt
Ammoniumchlorid (NH_4Cl)	VWR International, Leuven
Ammoniumperoxidisulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Ammoniumsulfat	Grüssing, Filsum
Ampicillin	Sigma, St. Louis, USA

Biotin-NHSE	Sigma, St. Louis, USA
Borsäure	Grüssing, Filsum
Bradford-Reagenz	Bio-Rad
5-bromo-4-chloro-3-indolyl-ß-D-Galaktoside (X-Gal)	Boehringer, Mannheim
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Chloramphenicol	Boehringer, Mannheim
Chloroform	Fisher Scientific, UK
Coomassie Brillant Blue R250	Serva, Heidelberg
Diethyl-Pyrocarbonat (DEPC)	Sigma, St. Louis, USA
Dithiothreitol (DTT)	Jansen, Beerse, Belgien
DNA-Cellulose	Sigma, St. Louis, USA
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid (EtBr)	Boehringer, Mannheim
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	AppliChem, Darmstadt
Formaldehyd	Riedel-de-Haen, Seelze
Formamid	J. T. Baker, Groß-Gerau
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
Hefe-Extrakt	Difco, Detroit, USA
Heparin	Sigma, St. Louis, USA
HEPES	Roth, Karlsruhe
Isopropyl-β-thiogalactosid (IPTG)	Roche, Mannheim
Kaliumglutamat	Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Kaliumpermanganat ($KMnO_4$)	Merck, Darmstadt
Leupeptin, Hemisulfate	Calbiochem, Nottingham, UK
Magnesiumdichlorid ($MgCl_2$)	Merck, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
N,N'-Methylenbisacrylamid	Serva, Heidelberg
Tetrabutylammoniumbromid	Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

2.9 Verschiedenes

Obig nicht aufgeführte Materialien sind im Folgenden unter „Verschiedenes“ zusammen gefasst.

Amberlite Mischbettionenaustauscher	Roth, Karlsruhe
Chromatographiepapier 3MM	Whatman, England
Centriprep Centrifugal Filter	Millipore, Neu Isenburg
DE 52-Papier	Whatman, England
DEAE-Sephadex A25-Säule	Amersham Biosciences
Expositionskassetten	Siemens
Faltenfilter	Mascherey-Nagel, Düren
Floureszenzbeschichteten Polyrthyleniminplatten	Machery & Nagel
Glaswolle, silanisiert	ICN Biochemicals, USA
Series S Sensor Chip SA	GE Healthcare Europe
Sephadex-G 1O-Säule	Amersham Biosciences

2.10 Verwendete Einheiten (alphabetisch)

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µM	Mikromolar
Å	Ångström
AS	Aminosäuren
bp	Basenpaare
Ci	Curie
g	Gramm
kDa	Kilodalton
l	Liter
M	Molar
mA	Milliampère
mAU	Milli Absorption Unit

min	Minuten
ml	Milliliter
mS/cm	Millisiemens pro Zentimeter
ng	Nanogramm
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
rpm	"round per minute"
RU	Relative Units
sek	Sekunde
Std	Stunde
V	Volt

3 Methoden

3.1 Mikrobiologische Methoden

In Analysen, in denen oben genannte Bakterienstämme zum Einsatz kamen, wurde stets unter sterilen Bedingungen gearbeitet. Dabei wurden die Vorschriften des Gentechnikgesetzes für das Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen (GvO´s) der Sicherheitsstufe 1 (S1) eingehalten, einschließlich des Rückautoklavierens des anfallenden Mülls vor der Entsorgung.

3.1.1 Sterilisation von Lösungen und Glasgeräten

Verwendete Glasgeräte wurden vor der Nutzung hitzesterilisiert (4 Std., 210 °C), während Lösungen, Puffer und Medien mittels Dampfdruck (20 min, 120 °C, 2-3 bar) sterilisiert wurden. Temperatursensitive Lösungen wurden dagegen vor der Verwendung steril filtriert.

3.1.2 Anzucht auf Agarplatten

Die Lagerung aller Laborstämme erfolgte routinemäßig als Sicherheit- bzw. Arbeitsstocks in Glycerin bei -70 °C. Durch Ausstreichen auf YT-Agarplatten, welche gegebenfalls mit einem selektiven Antibiotikum versetzt wurden und üN-Kultivierung bei 37 °C, wurden die Kolonien aus den Glycerinstocks vereinzelt. Diese Einzelkolonien wurden anschließend zur Flüssigkultivierung überführt oder auf eine neue sogenannte Masterplatte umgesetzt.

3.1.3 Übernachtkultivierung von Zellen

Durch Überführen einer Einzelkolonie von einer Agarplatte mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers, wurden 3 ml bzw. 25 ml YT-Medium „angeimpft“. Anschließend folgte die Kultivierung dieser Einzelkolonie in dem Flüssigmedium bei 37 °C auf einem Rundschüttler
(New Brunswick Scientific Gio Gyrotory, ca. 200 rpm).

3.1.4 Haltung und Sicherung von *Escherichia coli* Stämmen

Bei der Sicherung von Zellen wurde in temporär und langfristig unterschieden. Erstere erfolgte über Lagerung der Zellen auf Antibiotikum versetzten Agarplatten bei 4 °C. Die längerfristige Lagerung und Sicherung der Zellen erfolgte in Glycerinkulturen bei -70 °C. Hierzu wurden 0,8 ml einer üN-Zellkultur des jeweiligen Stammes in einem sterilen Stockgläschen mit 0,2 g 100 % Glycerin versetzt und 30 min bei Raumtemperatur unter schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Stämme in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C gelagert.

3.1.5 Calciumchlorid-basierte Herstellung kompetenter Zellen für die Tansformation durch Hitzeschock

Die durchgeführte Herstellung Hitzeschock-kompetenter Zellen basierte auf dem von Dagert und Ehrlicher veröffentlichten Verfahren (Dagert and Ehrlich 1979). Der jeweiligen Zellkultur (siehe 3.1.3) wurden bei einer OD_{600} von 0,5 bis 0,6 (siehe 3.2.1.3.) je 25 ml Aliquot entnommen und dieses in ein Corex-Zentrifugenglas überführt. Nach Pelletieren der Probe (Heraeus Megafuge 1.0R, 5000 rpm, 4 °C, 5 min) wurde der Überstand verworfen, die Pellets in 12,5 ml 0,1 M $CaCl_2$-Lösung resuspendiert und nach 60-minütiger Inkubation auf Eis, wie oben beschrieben, erneut sedimentiert. Nach abermaligem Verwerfen des Zellüberstands wurde das Zellpellet vorsichtig aus dem Eis in je 1 ml 0,1 M $CaCl_2$-Lösung versetzt und mit 15 % (v/v) Glycerin vorsichtig resuspendiert. Zur Steigerung der Transformationskompetenz

wurden die Zellen in 200 µl Aliquots (Eppendorfreaktionsgefäße) üN bei 4 °C inkubiert und anschließend nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei -70 °C bis zur Verwendung gelagert.

3.1.6 Hitzeschock-vermittelte Transformation kompetenter Zellen

Die Transformation von kompetenten Zellen mit Plasmid-DNA erfolgte wie durch Hanahan 1985 beschrieben (Hanahan 1985) durch Hitzeschock. Dabei wurden 200 µl kompetenter Zellen vorsichtig auf Eis aufgetaut und mit 10 µl Ligationsansatz (3.2.4.3) oder 50 ng Plasmid-DNA versetzt. Nach 1-stündiger Inkubation des Transformationsansatzes auf Eis wurde die Transformation durch einen dreiminütigen Hitzeschock bei 42 °C induziert. Zur Steigerung der Transformationseffizienz wurde der Ansatz augenblicklich nach Hitzebehandlung für 2 min auf Eis gehalten und anschließend mit 800 µl 37 °C warmem YT-Medium 1 Std. bei 37 °C unter Schütteln (Haep Labor Consultant, HTM 130 L) inkubiert. Durch Ausstreichen von 100 bis 200 µl des 1 ml Transformationsansatzes auf selektiven Agarplatten und üN-Inkubation der Platten bei 37 °C, konnte die Transformation anhand der gebildeten Einzelkolonien analysiert werden.

3.1.7 Blau-Weiß-Selektion

Mittels Blau-Weiß-Selektion wurden nach der Transformation Klone, die ein gewünschtes Plasmid samt Insert aufgenommen hatten, von Klonen unterschieden, deren Plasmid ein Relegationsprodukt (ohne Insert) war. Die Methode beruht auf der sogenannten α-Komplementation (Maniatis 1982). Grundlegend ist die Zweiteilung des Gens der β-Galaktosidase. Der N-Terminale Teil des Gens (α-Fragment) liegt auf dem Plasmid kodiert vor, während der zweite Teil (ω-Fragment) chromosomal in dem Bakterium als *lac*ZΔM15 kodiert vorliegt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Vektor pUC18 und der *E. coli* Stamm XL-1 verwendet. Bei diesem Vektor steht das α-Fragment unter der Kontrolle des *lac*-Repressors, wodurch die Expression die Zugabe von ITPG erfordert. Eine gleichzeitige Expression beider Fragmente rekonstituiert im

obigen Versuchsaufbau die β-Galaktosidase, welches in einer Blaufärbung der Zellen resultiert. Diese Blaufärbung der Zellen gibt die gebildete Menge des blauen 5-Brom-4-Chlor-Indigo wieder. Dieses ist das Spaltprodukt des X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-indolyl-β-D-galaktosid), welches durch funktionelle β-Galaktosidase synthetisiert werden kann. Die erfolgreiche Klonierung der Insert-DNA in den pUC-18-Vektor unterbricht das Leseraster des Gens für das α-Fragment, wodurch die Rekonstitution der β-Galaktosidase verhindert wird. Dadurch können die farblosen, das Insert-beinhaltenden Klone von den blauen ohne Insert unterschieden werden.

Damit es zur Blau-Weiß-Selektion kommen konnte, wurden mit Ampicillin behandelte Agarplatten frisch mit einer Mixtur aus 100 µl YT-Medium, 8 µl X-Gal (100 mg/ml) und 4 µl IPTG (200 mg/ml) bestrichen und drei bis vier Std. bei 37 °C getrocknet. Die anschließend darauf ausgestrichenen Zellen wurden üN bei 37 °C inkubiert. Nach Erscheinen der Einzelkolonien wurden die Platten gegebenfalls zur Intensivierung der Blaufärbung vier bis acht Std. bei 4 °C gelagert. Weiße Kolonien wurden mit einem sterilen Zahnstocher in 3 ml Flüssigkulturen und auf eine „Masterplatte“ überführt und mittels Restriktionsanalyse (siehe 3.2.4.1) nach Plasmidisolation durch „Mini-Präp“ (siehe 3.2.3.2) analysiert.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Konzentrationsbestimmungen

Die Bestimmung von Konzentrationen diverser biologischer Moleküle war grundlegend für die meisten der in dieser Arbeit durchgeführten Methoden. Eine Auflistung dieser Konzentrationsbestimmungen und die darin enthaltenden physikalischen/biologischen Prinzipien der Messungen sind im Folgenden dargestellt

3.2.1.1 Bestimmung der Konzentrationen von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte durch Messungen in einem UV/VIS-Spektralphotometer (Beckman, Typ DU 64) bei der Wellenlänge λ 260 nm in einem Bereich von 0,1 bis 0,9. Hierzu wurden die Proben gegebenfalls mit *Aqua dest*. verdünnt. Die Ableitung der Konzentration aus der gemessenen Absorption (A) ergab sich nach folgendem vereinfachten Zusammenhang:

1A260 = 50 µg/ml doppelsträngige Nukleinsäure
1A260 = 37 µg/ml einzelsträngige Nukleinsäure

Durch Messen des UV-Spektrums von 220 nm bis 320 nm der Nukleinsäuren wurde zusätzlich der Reinheitsgrad der Probe überprüft, wobei der Quotient E_{260}/E_{280} die Reinheit der Probe indiziert. „E“ steht hierbei für Extinktion. Der ermittelte Quotient einer Nukleinsäure sollte sich in einem Bereich zwischen 1,8 und 2,0 befinden.

Die Konzentrationsbestimmungen angesetzter Nukleotidlösungen wurden ebenfalls spektralphotometrisch bestimmt. Allerdings geschah dieses unter Berücksichtigung des substanzspezifischen Extinktionskoeffizienten (ε) und des Lambert-Beerschen-Gesetzes. Hierbei gilt:

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

E = Extinktion bei angegebener Wellenlänge λ (nm)
ε = Substanzspezifischer molarer Extinktionskoeffizienz bei angegebener Wellenlänge λ
c = Konzentration der absorbierenden Substanz [M]
d = Schichtdicke der Küvette (hier 1 cm)

Die Extinktionskoeffizienten der verwendeten Nukleotide sind die folgenden:
Adenosin-5’-triphosphat (ATP) ε_{259} 15.400 [$M^{-1} \cdot cm^{-1}$]
Cytidin-5’-triphosphat (CTP) ε_{271} 9.000 [$M^{-1} \cdot cm^{-1}$]

Guanosin-5'-triphosphat (GTP)ε_{253} 13.700 [$M^{-1} \cdot cm^{-1}$]

Uridin-5'-triphosphat (UTP) ε_{262} 10.000 [$M^{-1} \cdot cm^{-1}$]

2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat (dATP) ε_{259} 15.200 [$M^{-1} \cdot cm^{-1}$]

2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat (dCTP) ε_{271} 9.300 [$M^{-1} \cdot cm^{-1}$]

2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat (dGTP) ε_{253} 13.700 [$M^{-1} \cdot cm^{-1}$]

2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat (dTTP) ε_{267} 9.600 [$M^{-1} \cdot cm^{-1}$]

3.2.1.2 Bestimmung der Zelldichte von Flüssigkulturen

Durch Streumessung bei einer Wellenlänge von 600 nm wurde das Wachstum von Bakterienkulturen mittels Spektralphotometers (Beckmann, Typ DU 64) analysiert. Hierzu wurden die Proben gegebenfalls bis in den linearen Messbereich (OD_{600} 0,1 bis 0,9) in YT-Medium herunter verdünnt.

3.2.1.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

3.2.1.3.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels „Bradford-Methode"

Zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurden 10 µl Proteinlösung mit 790 µl *Aqua dest.* und 200 µl Bradford-Reagenz (Bio Rad) versetzt und 15 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Die Quantifizierung erfolgte über Messung der Proben-Absorption. Diese wurden bei einer Wellenlänge von 595 nm in einem Beckmann Spektralphotometer (Typ DU 64) gemessen und in eine Regressionsgleichung einer vorher angesetzten Eichgerade bekannter BSA-Konzentrationen eingesetzt.

3.2.1.3.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels „NanoDrop“

Geringe Proteinmengen wurden spektralphotometrisch mit Hilfe des „NanoDrop“ gemessen. Hierzu wurde die Einstellung „Other Protein (E & MW)“ gewählt. Für „E“ ist hierbei der Extinktionskoeffizient der Proteins/1.000 eingesetzt und für „MW“ das Molekulargewicht des Proteins in kDa einzusetzen.

3.2.2 Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren

3.2.2.1 Phenol/Chloroform-Extraktion

Die Phenol/Chloroform-Extraktion ist eine proteindenaturierende Methode und diente der Entfernung von Proteinen aus einer wässrigen Nukleinsäurelösung. Hierzu wurde die Nukleinsäurenprobe mit einem Volumen Phenol/Chloroform (1:1) versetzt und gut gemischt. Durch Zentrifugation (5 min 12.000 rpm Hetich Mikro 22, bzw. 6.000 rpm Heraeus Megafuge 1.0R) wurden die Phasen wieder getrennt, so dass die obere wässrige in ein neues Gefäß überführt werden konnte. Die organische und die sogenannte Interphase wurden im dafür vorgesehenen Abfall entsorgt. Diese Vorgänge wurden so lange wiederholt, bis keine Interphase mehr vorzufinden war. Durch Vermischung und Trennung der Probe nach obigem Beispiel mit einem Volumen Chloroform wurden die letzten Phenolreste aus der wässrigen Probenlösung entfernt.

3.2.2.2 Ethanol-vermittelte Präzipitation von Nukleinsäuren

Zur Aufkonzentrierung von Nukleinsäuren und zur Entfernung kurzer Nukleinfragmente wurden die Nukleinsäuren der wässrigen Proben gefällt. Hierzu wurden die Proben mit 1/10 Volumen 3M Natriumacetat (pH 5,5) als Fällungshilfe versetzt. Die eigentliche Fällung geschah über Supplementierung der Proben mit zwei bis drei Volumina absoluten Ethanols (-20 °C) und Inkubation des Ethanolgemisches

für 60 min bei -20 °C. Das Präzipitat wurde bei 4 °C durch Zentrifugation (12.000 rpm Hettich Mikro 22 bzw. 6.000 rpm Heraeus Megafuge 1.0 R) pelletiert und der Überstand verworfen. Um mitgefällte Salzreste zu entfernen, wurde das Pellet mit einem Volumen 70 % bis 80 %igen Ethanols (-20 °C) vorsichtig überspült und erneut 30 min nach obigem Beispiel pelletiert. Anschließend wurde der Überstand sorgfältig abgenommen und das DNA-Pellet lyophylisiert (Heto VR-1 Speedvac Concentrator) oder luftgetrocknet. Abschließend wurde die getrocknete DNA in einem geeigneten Volumen TE-Puffer aufgenommen und resuspendiert.

3.2.2.3 Dialyse von Nukleinsäuren

Kleine Volumina an Nukleinsäuren- und Proteinlösungen in einem Volumen von bis zu 100 µl wurden durch Mikrotropfendialyse entsalzt. 30 ml der Lösung gegen die die Probe dialysiert werden soll, wurden in eine sterile Petrischale gegeben und der Dialysefilter (VS Millipore Membranfilter Durchmesser 2,5 cm, Porengröße 0,025 µm) mit der glänzenden Seite nach oben darauf zum Schwimmen gebracht. Die zu dialysierende Probe wurde vorsichtig auf den Membranfilter gegeben und für ein bis zwei Stunden je nach Sensitivität der Probe bei RT oder 4 °C dialysiert. Anschließend wurde die Probe vorsichtig abgenommen und der Filter mit einem geeigneten Volumen des jeweiligen Dialysepuffers gespült, so dass auf dem Filter verbleibende Probenreste mit aufgenommen wurden.

3.2.3 Isolation von Plasmid-DNA

Die in dieser Arbeit verwendeten Fragmente wurden zur Erstellung, Lagerung und (sofern nicht mittels PCR) auch zu Amplifizierung in Form von Plasmid-DNA in geeignete Zellstämme transformiert (siehe 3.1.5). Die unterschiedlichen in dieser Arbeit angewandten Methoden zur Rückgewinnung dieser Plasmide wurden im Folgenden zusammengefasst.

3.2.3.1 Präparative Isolation nach Hillen und Wells

Die Isolation von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab geschah in dieser Arbeit in Anlehnung an Hillen et al. (Hillen et al. 1981). Dazu wurden 800 ml YT-Medium mit selektivem Antibiotikum 1:10 aus einer Vorkultur „angeimpft“ und üN unter Schütteln bei 37 °C (New Brunswick Scientific, Model G25) inkubiert. Anschließend wurden die stationären Zellen bei 4 °C sedimentiert (10 Minuten bei 8000 rpm, 4 °C Beckman Zentrifuge J2-21, JA-10-Rotor). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in insgesamt 16 ml Saccharoselösung resuspendiert. 8 ml Aliquot dieser Suspension wurden in Ti55.2-Polycarbonröhrchen überführt und mit je 3 ml Lysozymlösung versetzt für 15 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 2 ml Brij-Doc-Lösung und 10-minütiger Inkubation auf Eis, wurden die Ansätze 60 min bei 44.000 rpm und 4 °C zentrifugiert (Beckman L8-55 Ultrazentrifuge, Rotor Ti55.2). Der klare Überstand wurde in ein frisches Greinerröhrchen überführt und für 15 min bei 37 °C mit RNase A (50 µg/ml „final concentration“ (f. c.)) gedaut. Dem folgte ein Proteinase K-Dau (50 µg/ml f. c.) von 15 min ebenfalls bei 37 °C. Durch Zugabe von 0,5 Volumen PEG-Lösung wurde die DNA 30 min auf Eis gefällt und 60 min bei 4.000 rpm pelletiert (4 °C, Beckman Zentrifuge J2 21; JS-7.5 Ausschwingrotor). Nachdem das daraus resultierende Pellet vom Überstand befreit wurde, wurde es in 3 ml TE-Puffer aufgenommen, Phenol/Chlorform-gereinigt (3.2.2.1), Ethanol-gefällt (3.2.2.2) und erneut in einem geeigneten Volumen TE-Puffer resuspendiert. Abschließend wurde die Konzentration der DNA-Lösung photometrisch bestimmt (3.2.1.1).

Die oben erwähnten Lösungen sind im Folgenden tabellarisch zusammengefasst worden.

Saccharose-Lösung:	25% (w/v) Saccharose 50 mM Tris-HCl, pH 8,0
Lysozym-Lösung:	20 mg/ml Lysozymchlorid 50 mM Tris-HCl, pH 8,0
Brij-Doc-Lösung:	2 Volumen 10% (w/v) Brij 35 1 Volumen 10% (w/v) Na-Deoxycholat in *Aqua dest*. pH 8,0

RNase A: 20 mg/ml in 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 (nach Maniatis *et al*., 1982) von DNase-Aktivität befreit

Proteinase K: 20 mg/ml in *Aqua dest*.

PEG-Lösung: 30% (w/v) PEG_{6000} in 1,5 M NaCl

3.2.3.2 Plasmidisolation im analytischen Maßstab verändert nach Birnboim & Doyle, 1979

Die sogenannte Mini-Präp-Plasmidisolation diente der Plasmidanalyse transformierter Klone. Hierbei wurde sich zunutze gemacht, dass im Gegensatz zur oben beschriebenen präparativen Plasmidisolation, die Plasmide in vergleichsweise geringer Zeit und geringem Aufwand isoliert werden können. Dadurch ist es möglich eine höhere Anzahl an Transformanten zu analysieren. Die Methode wurde verändert nach Bimboim (Bimboim 1979) durchgeführt. Dabei wurden je 3 ml üN-Kultur der zu analysierenden Kolonie in zwei Schritten in einem Eppendorfgefäß pelletiert (5 Minuten bei 12.000 rpm und RT, Hettich Mikro 22). Das Pellet wurde in 100 µl Lyselösung I resuspendiert, 5 min bei RT inkubiert und mit 200 µl Lyselösung II versetzt. Nach mehrfachem Inversion wurden die Proben 5 min auf Eis inkubiert und anschließend mit 150 µl 3 M Kaliumacetat (pH 4,8) versetzt. Nach erneuter Inkubation auf Eis (5 min) wurden die Zelltrümmer und die chromosomale DNA durch Zentrifugation (5 Minuten, 12.000 rpm, RT; Hettich Mikro 22) von dem plasmidhaltigen Überstand abgetrennt. Dieser Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, Phenol/Chloroform-extrahiert (3.2.2.1) und Ethanol-gefällt (3.2.2.2). Nach der Resuspensierung des getrockneten Pellets und Bestimmung der Konzentration (3.2.1.1), wurden die Plasmide mittels Restriktionsanalysen (3.2.4.1) auf korrekten Einbau des Inserts hin überprüft.

Unten aufgeführt ist die Zusammensetzung der beiden Lyselösungen (I & II)

Lyselösung I:	50 mM Glukose
	25 mM Tris-HCL, pH 8,0
	10 mM EDTA, pH 8,0
	0,4 mg/ml Lysozymchlorid; frisch zugegeben
Lyselösung II:	200 mM NaOH
	1% (v/v) SDS (nach dem Autoklavieren zugegeben)

3.2.4 Enzymatische Reaktionen

Ein Großteil der in dieser Arbeit vorkommenden DNA-Fragmente wurde mit Hilfe von Enzymen erstellt, modifiziert und/oder identifiziert. Im Folgenden wurden die dazu angewandten Verfahren zusammengefasst.

3.2.4.1 In der Arbeit angewandte Restriktionshydrolysen

Allen in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzymen ist gemein, dass sie innerhalb ihrer Erkennungssequenz auch schneiden (Typ II der Endonukleasen) (Mullis 1987). Die verwendeten Endonukleasen fanden in dieser Arbeit unter zwei unterschiedlichen Aspekten Verwendung. Die erste war die Erstellung von Fragmenten mit definierten Doppelstrangenden (Überhänge („sticky ends“) bzw. ohne Überhänge („blunt ends“)) zur Ligation und Klonierung. Bei der zweiten handelte es sich um die Identifizierung diverser DNA-Fragmente anhand charakteristischer Schnittstellen bzw. Fragmentlängen. Die Hydrolysen fanden nach denen vom Hersteller angegebenen Bedingungen statt und wurden mittels Gelelektrophorese überprüft.

3.2.4.2 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Mit Hilfe der in 2.4.2 aufgeführten Oligonukleotiden (Primer) wurden die Zielsequenzen mittels PCR (Mullis 1987) amplifiziert. Die PCR-Reaktionen wurden mit dem Mastercycler epgradient S (Eppendorf) in 30 Zyklen durchgeführt. Als Enzym diente die Phusion High Fidelity DNA-Polymerase, welche sich aufgrund ihrer 3'-5'-Exonukleaseaktivität (proof reading correction) durch ihre geringe Nukleotid-Fehlereinbaurate auszeichnet. Anhand der Primersequenz wurde die ideale Annealingtemperatur bestimmt, welche 10 °C unterhalb der Primerschmelztemperatur (Tm) liegen sollte. Dabei wurden die Tm-Werte der Primer anhand der „nearest neighbour"-Methode bestimmt (www.finnzymes.com). Der Aufbau der beiden in dieser Arbeit erstellten Amplifikationsstrukturen ist im Folgenden zusammengefasst.

A)		*his*G Chromosomal		B)	Biacore	
	1	98 °C	60 sek.		98 °C	60 sek.
	2	98 °C	10 sek.		98 °C	10 sek.
	3	40 °C	30 sek.		66 °C	30 sek.
	4	72 °C	30 sek.		72 °C	30 sek.
	5	72 °C	10 min		72 °C	10 min
	6	4 °C	∞.		4 °C	∞

A) PCR zur Amplifizierung des chromosomalen *hisG*-Fragments, B) PCR zu Amplifizierung der biotinylierten Fragmente (siehe 2.4.2) zur Chip-Immobilisierung, 1: Initiale Denaturierung; 2: Denaturierung; 3: Annealing; 4: Elongation; 5: Finale Elongation; 6: Wartemodus bis zur Probenentnahme. Die Schritte zwei bis vier umschreiben einen Zyklus, der 30 Mal durchlaufen wurde, bevor das Programm beendet wurde.

3.2.4.3 Ligation

Die T4 DNA-Ligase diente der kovalenten Verknüpfung von DNA-Enden in Rahmen der Klonierung. Es wurden 50 ng linearisierte Vektor-DNA mit unterschiedlichen Fragmentmengen (Verhältnis Vektor zu Insert 1:2 bis 1:50) ligiert. Dabei wurde das Fragment mit einem glatten und einem überhängendem Ende versehen, wodurch der Einbau des Fragments in das Plasmid in richtiger Orientierung gewährleistet werden sollte. Die Reaktion fand in 1x Ligationspuffer (siehe unten) mit 1U T4 DNA-Ligase für drei bis vier Std. bei 4 °C und anschließender üN-Inkubation bei RT statt. Abschließend wurde der Ligationsansatz 10 min bei 65 °C Hitze inaktiviert und in einen Transformationsansatz eingesetzt.

10x Ligationspuffer:	660 mM Tris-HCl, pH 7,5
	50 mM MgCl2
	50 mM DTT
	10 mM ATP

3.2.4.4 Auffüllen von 5´-überhängenden DNA-Enden mittels Klenow-Reaktion

Die radioaktiven Markierungen der mittels Restriktionshydrolyse gewonnenen Fragmente wurden durch Auffüllen der 5´-überhängenden Fragmentenden erreicht. Dieses geschah mit Hilfe des Klenow-Fragments. Hierbei wurde das erste dNTP, welches zum Auffüllen des überlappenden Stranges eingebaut wurde, durch 20 µCi des entsprechenden [α32P]-Nukleotids (3.000 Ci/mmol) ersetzt. Nach 30 min Inkubation bei RT wurde der Reaktionsansatz Phenol/Chloroform-extrahiert (3.2.2.1) und Ethanol-gefällt (3.2.2.2).
Unten zusammengefasst ist sowohl das Pipettierschema als auch die Zusammensetzung des Klenow Puffers.

Reaktionsansatz:	x µl DNA (max. 1µg)
	2,5 µl 10 x Klenow-Puffer
	je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP
	1 µl Klenow Enzym (8 U/µl)
	ad 25 µl mit Aqua dest.
10 x Klenow-Puffer:	500 mM Tris-HCl, pH 7,2
	100 mM MgSO4
	1 mM DTT
	500 µg/ml BSA, acetyliert

3.2.5 Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

Mit Ausnahme der BiaCore- und der Wachstumskurvenanalysen beinhalteten alle in dieser Arbeit beschriebenen Beobachtungen die Auswertung von Nukleinsäuren- bzw. Proteingelen. Im Folgenden wurden die Vorgehensweisen in diesen Gelelektrophoresen zusammengefasst.

3.2.5.1 Agarosegelelektrophorese

Die analytische und präparative Auftrennung von Nukleinsäuren erfolgte über 0,5 bis 2 %ige Agarosegele nach Maniatis et al. (Maniatis 1982). Die entsprechende Menge Agarose wurde hierzu in 100 ml TAE Puffer aufgekocht und in ein Flachbettgel gegossen. Vorher wurde jedoch dem aufgekochten Gelansatz nach Abkühlphase (bis unter 60 °C) 0,5 µg/ml Ethidiumbromid beigefügt. Die Phoresen fanden in ebenfalls mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzten 1x TAE-Laufpuffer bei 80 bis 120 V statt. Die Fluoreszenz des in der DNA interkalierten Ethidiumbromids wurde durch UV-Lichtbestrahlung (320 nm) induziert.

3.2.5.2 Native Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Polyacrylamidgele sind ein Polymerisationsprodukt bestehend aus Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid. Die Quervernetzung über die zweidimensionale Kettenbildung über Acrylamid wird vermittelt durch Bisacrylamid. Das Auftrennpotential des Polyacrylamidgels wird durch die Acrylamidkonzentration determiniert. Durch N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) als Polymerisationskatalysator und Ammonium-peroxidisulfat (APS) als Radikalbildner wird die Polymerisation in Form einer Radikalkettenreaktion induziert. Die native PAGE aus 5 %iger Gellösung mit einer Vernetzung von 46:1 (Acrylamid:Bisacrylamid) und 0,5x TBE wurde für die Verzögerungsgelelektrophorese verwendet. Die Elektrophoresen erfolgten in 0,5x TBE-Laufpuffer für 1,5 bis 3 Std. bei 40 mA und wurden über Autoradiographie visualisiert (siehe 3.2.6.1).

3.2.5.3 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese

Die denaturierende PAGE unterscheidet sich von der in 3.2.5.2 beschrieben nativen PAGE vor allem durch die Präsenz des denaturierenden Agens Harnstoff. Diese Gele wurden vor allem zur Trennung von Nukleinsäuren entsprechend ihrer Größe verwendet, bei denen durch den Harnstoff sichergestellt werden sollte, dass die Nukleotidfragmente einsträngig und ohne Sekundärstruktur vorliegen. Diese war z.B. in den *in vitro* Transkriptionen dieser Arbeit der Fall, in denen die Transkripte in 10 %ige oder 15 %ige Polyacrylamidgele mit einer Vernetzung von 20:1 (Acrylamid:Bisacrylamid), 7 M Harnstoff und 1x TBE-Puffer aufgetrennt wurden.

Die Elektrophorese wurde in 1x TBE-Laufpuffer bei 90 W in schrittweise vorgewärmten Gelen (10 min 25 W, 10 min 50 W) für zwei bis vier Std. durchgeführt. Die hohe Temperatur unterstützte die Denaturierung der Fragmente und die schrittweise Erhöhung diente der Vermeidung einer Beschädigung der Glasgelplatten durch zu hohe thermische Spannungen. Die Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel 5 min in 2x Formamid-Probenpuffer bei 96 °C denaturiert und zur Vermeidung

von Doppelstrangbildung augenblicklich auf Eis überführt. Die Visualisierung der Transkripte erfolgte anschließend mittels Autoradiographie (3.2.6.1).

3.2.6 Nachweis von Nukleinsäuren

Wie in 3.2.5 geschildert, nahm die elektrophretische Trennung von Proteinen und Nukleinsäuren eine zentrale Stellung in dieser Arbeit ein. Im folgenden Kapitel wurden die Methoden zur Detektierung und Quantifizierung der durch PAGE aufgetrennten Nukleotide zusammengefasst.

3.2.6.1 Autoradiographie

Zum Nachweis der radioaktiv markierten Nukleinsäuren in Polyacrylamidgelen wurden diese nach Gelektrophorese auf einen alten Röntgenfilm gezogen, mit Polyethylenfolie abgedeckt und in eine Expositionskassette (Siemens) gelegt. Unter Rotlicht wurde anschließend ein Röntgenfilm (Blaufilm CEA RP New) auf das Gel gelegt und für eine geeignete Dauer (üN bis 20 Tage) bei -70 °C exponiert. Die anschließende Entwicklung der Röntgenfilme wurde in der Entwicklermaschine AGFA Curix 60 vollzogen.

3.2.6.2 Densitometrie

Zur quantitativen Auswertung von radioaktiv markierten Nukleinsäuren wurden Phosphoimager Screens (BAS 2340, FUJI) anstelle des Röntgenfilms auf die Polyacrylamidgele gelegt und diese ein bis drei Std. bei RT exponiert. Mit Hilfe eines Phosphoimagers (BioImager FAS 3000) wurden die Screens ausgelesen und mittels geeigneter Computersoftware (Image Reader Fla. V.1.8 E und Image Gauge V3.0) ausgewertet.

3.2.7 Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Isolierung und Aufreinigung von PCR-Produkten oder DNA-Fragmenten aus Restriktionsanalysen wurden diese in präparativen Agarosegelen aufgetrennt. Diese wurden anschließend unter UV-Licht identifiziert, mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die eigentliche Isolation der DNA erfolgte mittels Zentrifugation über silikonisierter Glaswolle, welche vor dem Einfüllen der ausgeschnittenen Gelbande zu ca. 1/3 in das Reaktionsgefäß gefüllt wurde. Das Gefäß wurde mit einem Loch an der unteren Spitze versehen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß platziert.
Durch mehrfaches Zentrifugieren (6.000 bis 12.000 rpm, 5 minuten) konnte die DNA aus dem Gelstück über der Glaswolle eluiert werden und durch das Loch im Gefäßboden im 1,5 ml Gefäß gesammelt werden. Abschließend wurden die wässrigen Eluate vereinigt, Phenol/Chloroform-extrahiert (3.2.2.1), Ethanol-gefällt (3.2.2.2) und gegebenfalls dialysiert (3.2.2.3).

3.2.8 Dialyse von Proteinen

Die Dialyse von Proteinlösungen fand in dieser Arbeit bei den Proteinen für die BiaCore-Analysen Verwendung. Da diese frisch dialysiert und in kleinen Volumina eingesetzt wurden, fanden diese Dialysen nach den in 3.2.2.3 geschilderten Verfahren auf Dialyseschwimmfiltern statt.

3.2.9 Nachweis von Proteinen in Polyacrylamidgelen mittels Coomassie-Färbung

Die Einfärbung der Polyacrylamidgele mittels Coomassie-Farbstoffs ermöglicht einen quantitativen Nachweis der aufgetrennten Proteine im Gel. Hierzu wurden die Gele 30 bis 60 min auf einem Horizontalschüttler (Gerhardt, Schüttelmaschine LS10) bei RT in der Färbelösung geschwenkt. Anschließend wurden die Gele in Entfärberlösung geschüttelt, bis der Hintergrund hellblau und die Proteinbanden bzw. Spots deutlich zu

erkennen waren. Zur Dokumentation wurden die Gele luftdicht in Folie verschweißt, eingescannt und abschließend bei 4 °C gelagert.

3.3 Spezielle Methoden

3.3.1 Klonierung des *hisG*-Promotors

Zu Beginn dieser Arbeit war in der Arbeitsgruppe noch kein Plasmid vorhanden, an dem die stringente Induktion von Promotoraktivität durch ppGpp hätte untersucht werden können. Daher sollte in einem ersten Schritt das *hisG*-Gen aus der chromosomalen DNA des MG1655-Stammes mittels PCR amplifiziert werden und in den Vektor pUC18-1 kloniert werden. Dieser zeichnet sich unter anderem durch seine Blau-Weiß-Selektions-Kompetenz aus (siehe 3.1.7). Nach gelungener Klonierung sollte anschließend in einem zweiten Schritt das *hisG*-Gen aus pUC18 vor beiden Tandemterminatoren des pCP1 kloniert werden. Dieses ermöglichte die Verwendung des klonierten Gens in *in vitro* Transkriptionen, die im Gegensatz zu „run-off" Transkriptionen zusätzlich sowohl die Superhelikalität des Template als auch Regulationen auf Terminationsebene berücksichtigen könnten. In dieser Arbeit wurde das erstellte Plasmid größtenteils zur Gewinnung der *hisG*-Fragmente in den Retardierungsanalysen genutzt, es wurde jedoch in parallelen Studien unserer Arbeitsgruppe auch zur Erstellung eines Multipromotor-*in-vitro*-Systems genutzt (Philipp Schoengraf Düsseldorf, September 2008). Dieses ermöglichte in vielen Studien die globale Analyse der Stringenten Kontrolle unterschiedlicher Promotoren *in vitro*.

3.3.1.1 Gewinnung der *hisG*-Promotor-DNA und Blau-Weiß-Selektion in pUC18

Die chromosomale DNA des *hisG*-Promotors wurde durch die in 3.2.4.2 beschriebene mittels PCR mit den Primern hisG-up-EcoRI und hisG-rv (siehe 2.4.2) amplifiziert und in der durch den fw-Primer eingebrachten *EcoRI*-Schnittstelle mit dem

Restriktionsenzym *EcoRI* geschnitten. Dieses Enzym schneidet 5´-Strang-überhängend, so dass ein „sticky-blunt“-polarisiertes (strangüberhängend glatte Strangenden) Fragment entstand. Der pUC18-Vektor wurde durch *EcoRI-Ecl136II*-Restriktionsendolyse ebenfalls „sticky-blunt“ linearisiert und mit dem oben beschriebenen *hisG*-Fragment legiert. Dieser Ligationsansatz wurde anschließend in XL-1-kompetente Zellen mittels Hitzeschock transformiert (siehe 3.1.6). Der korrekte Einbau des *hisG*-Promotorfragments wurde sowohl durch Restriktionsanalysen als auch durch Sequenzierung (Star SEQ U-MIX; Starseq GmbH Mainz Germany) der analysierten weißen Kolonien verifiziert (siehe 3.1.7).

Die oben beschriebene Klonierungstrategie ist im Folgenden schematisch zusammengefasst.

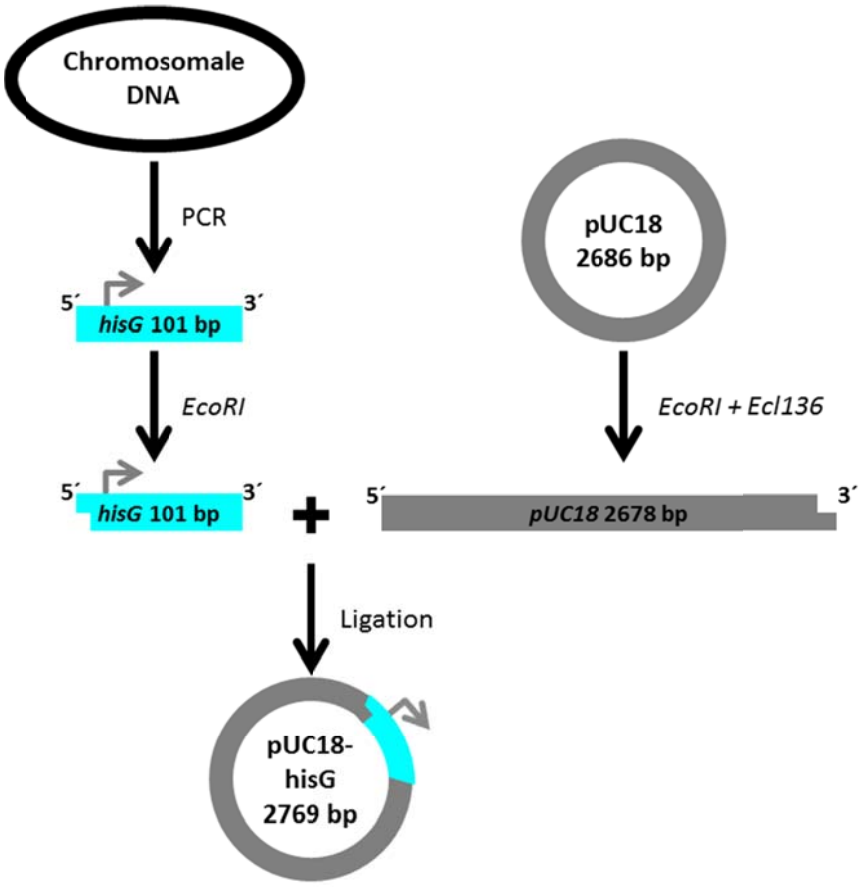


Abb. 3.3.1.1 Klonierung des pUC18-*hisG*-Vektors
Schematisch zusammengefasst ist die Klonierungsstrategie zur Erstellung des pUC18-*hisG*-Vektors. Die Länge der Nukleotidsequenzen (in bp) ist ebenso wie die 5´ zu 3´ Orientierung der Fragmente eingezeichnet. Restriktionsschnitte mit Überhang („sticky“) sind durch Einsparungen der Balken angedeutet, während „blunt“-Schnitte als glatte Balkenkanten dargestellt sind. Der graue, gewinkelte Pfeil zeigt die Traskriptionsrichtung des *hisG*-Promotors (türkis) an.

Chromosmale MG1655-DNA wurde mittels PCR amplifiziert. Der Forwätsprimer wurde so entworfen, dass er eine *EcoRI*-Schnittstelle am 5´-Ende aufweist, wodurch das amplifizierte Fragment ebenso wie das Plasmid *EoRI*-spezifisch geschnitten werden konnte. Die zusätzliche Restriktionshydrolyse des pUC18-Vektors durch *Ecl136* ermöglichte eine gerichtete „sticky-blunt“-Ligation des *hisG*-Fragments.

3.3.1.2 Klonierung des p*hisG*-T1T2 Plasmids

Hierzu wurde das pCP1 mittels *EcoRI-Ecl136*-Dau unmittelbar vor den T1T2-Terminatoren „sticky-blunt“ linearisiert und zur Vermeidung der Religation dephosphoryliert. Parallel wurde das in 3.3.1 klonierte *hisG*-Fragment ebenfalls durch *EcoRI* sowie mit *SmaI* „sticky-blunt“ aus dem pUC18-*hisG*-Vektor herausgeschnitten und mittels präparativer Agarosegelelektrophorese von der restlichen Vektor-DNA getrennt (3.2.7). Nach Geleluation und Aufreinigung wurde das Fragment über die differentiellen Schnittstellen in zielgerichteter Orientierung vor die pCP1-Terminatorsequenz kloniert und mittels Hitzeschock-Transformation in kompetente XL-1-Zellen eingebracht. Durch Retardierungsanalysen und Sequenzierung (Star SEQ U-MIX; Starseq GmbH Mainz Germany) wurde der korrekte Einbau des Inserts überprüft. In Abbildung 3.3.1.2 ist die oben beschriebene Klonierungsstrategie schematisch zusammengefasst.

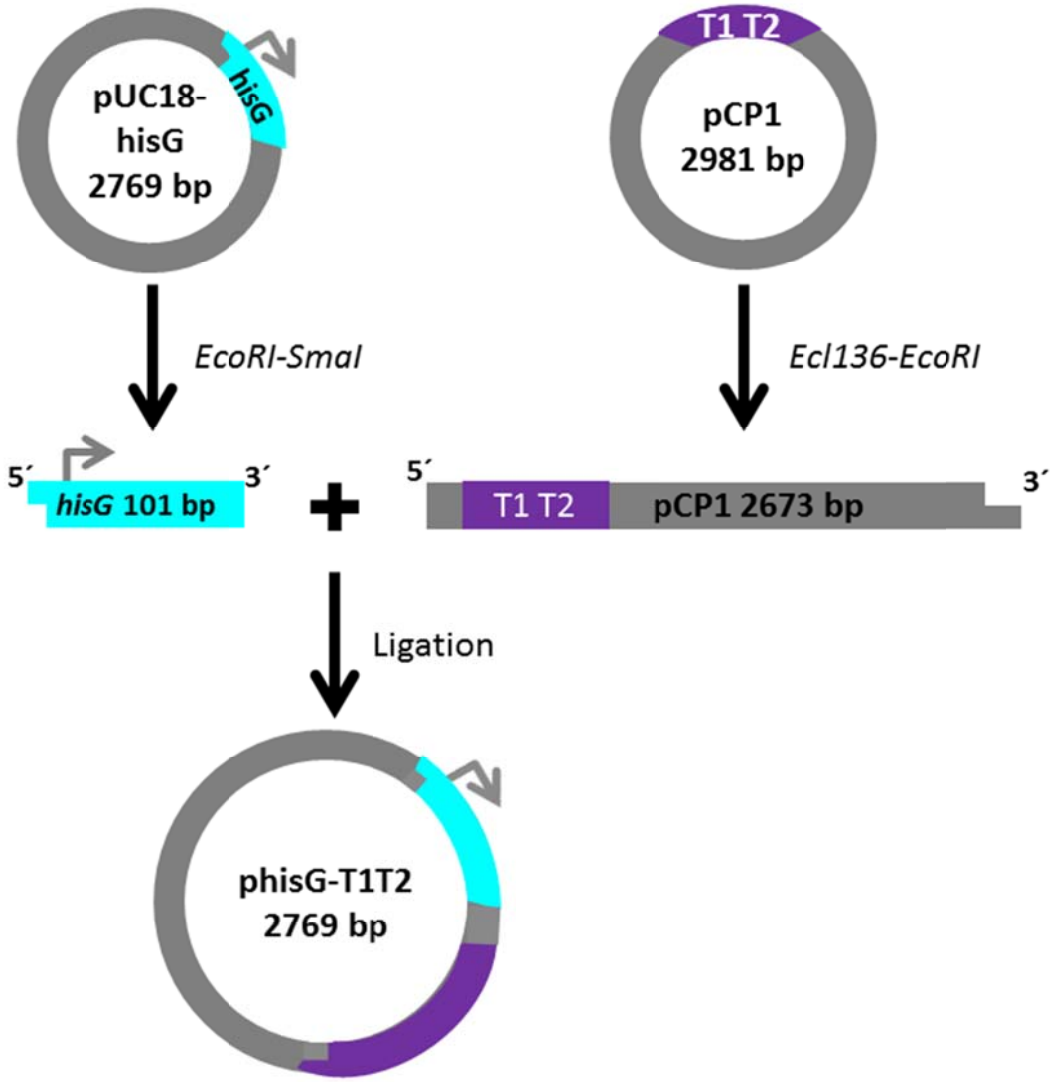


Abb. 3.3.1.2 Klonierung des p*hisG*-T1T2-Vektors
Der in Kapitel 3.3.1.2 beschriebene Aufbau der p*hisG*-T1T2-Klonierung wurde oben schematisch dargestellt. Sowohl das pUC18-*hisG*- als auch das pCP1-Plasmid wurden mit den oben genannten Restriktionsendonukleasen (*EcorRI-SmaI* bzw. *EcoRI-Ecl136*) „sticky-blunt“ geschnitten. Das isolierte *hisG*-Fragment (türkis) wurde vor den Tandem-Terminatoren (violett) des linearisierten pCP1-Vektors legiert. Die jeweiligen Längen der dargestellten Nukleotidsequenzen (bp) sowie die Transkriptionsrichtung des *hisG*-Promotors (abgewinkelter, grauer Pfeil) sind angegeben. Weiterhin angedeutet sind die Orientierungen der Fragmente (5´ bzw. 3´) und deren „sticky-blunt“-Enden.

3.3.2 Synthese und Präparation des Alarmons ppGpp

Wie in 1.6.1 schon angedeutet wurde, kann man sich die ppGpp-Synthese des RelA-Proteins auch *in vitro* zunutze machen. Das Ribosomen-assoziierte Protein kann durch Aufreinigung der Ribosomen nach Zellaufschluss als funktionelle Einheit mit

aufgereinigt und zur ppGpp-Synthese verwendet werden. Die dazu ausgewählte Isolierungsstrategie wurde im Folgenden zusammengefasst.

3.3.2.1 Isolierung von Ribosomen

Die Isolation der Ribosomen aus *E. coli* MRE600-Zellen geschah in Anlehnung an die von M. Cashel 1974 (Cashel 1974) beschriebene Methode. 25 g der als tiefgefrorene Pelletafeln gelagerten Zellen wurden angetaut, mit 50 g Aluminiumoxid (Alcoa) in einem Mörser homogenisiert und nach Zugabe von 50 ml Standardpuffer (siehe unten) zu einem gleichmäßigen flüssigen Brei verrieben. Durch Zentrifugation (15 min, 5.000 rpm; Beckmann JA-21 Hühlzentrifuge, JA 17 Rotor) wurden grobe Zelltrümmer und das Alcoa aus dem Homogenat entfernt. Die darauf folgende Zentrifugation (Beckman JA-21 Ktih1zentrifuge, JA-17 Rotor, 30 min, 4 °C, 15000 rpm) diente der Entfernung weiterer Zellfragmente. Mit der Zellsuspension wurde in einem Ti55.2-Röhrchen (Beckman) ein Saccharose-Gradient, bestehend aus 5 ml 1 M und 5ml 0,5 M Saccharoselösung (beides in 1x Standardpuffer), überschichtet und für vier Std. bei 40.000 rpm und 4 °C (Beckman L8-55 Ultrazentrifuge, Rotor Ti55.2) zentrifugiert. Anschließend wurde Überstand verworfen und das farblose Ribosomenpellet durch vorsichtiges Überschwenken mit 1 ml 1x Standardpuffer von einer aufliegenden bräunlichen Schicht befreit und in 2 ml zwei bis fünf Std. auf Eis auf einem Horizontalschüttler im Kühlraum resuspendiert. Die Suspension wurde mit Hilfe des Spektralphotometers (siehe 3.2.1.3) auf 500 OD_{260}/ml eingestellt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei - 70 °C gelagert.

1 xStandardpuffer: 50 mM Tris-Acetat, pH 8.0
15 mM Mg(OAc),
60mMKOAc
27 mMNH,OAc
I mMDIT
0.2 mM EDTA

3.3.2.2 Synthese von ppGpp

Die in dieser Arbeit durchgeführte Präparation und Isolation von ppGpp erfolgte nach der 1995 beschriebenen Methode von Krohn und Wager (Krohn and Wagner 1995). Ein Gesamtvolumen von 11 ml beinhaltend 4 mM ATP, 2mM 63 OD_{260} pro ml in 1x Standartpuffer (siehe oben) wurde auf zwei Reaktionsgefäße aufgeteilt und für 3 bis 12 Std. bei RT inkubiert. Durch stündliche Abnahme von 5 µl des Ansatzes und anschließender Dünnschichtchromatogrophie wurde die Synthese Verlaufs-analysiert. Die Reaktion wurde durch mindestens zweimalige Phenol/Chloroform-Extraktion beendet und die wässrige Phase in die Ionenaustauschchromatographie gegeben.

3.3.2.3 Dünnschichtchromatographie zum analytischen Nachweis der ppGpp-Synthese

Nukleotide können auf fluoreszenzbeschichteten Dünnschichtchromatographieplatten (DC-Platte) nach Anregung unter UV-Licht (256 nm) als dunkle Schattierungen detektiert werden (Mascherey und Nagel, Düren). Nach kurzem Spülen in *Aqua dest*. und Trocknung wurden 5 µl ppGpp-Syntheseansatz in 1 µl-Schritte auf eine markierte Stelle der DC-Platte aufgetragen. Anschließend wurde die Chromatographie durch Stellen der DC-Platte in das Laufmittel (1,5 M KH_2PO-Lösung pH 3,4) gestartet. Nach ca. einer Std wurde die Platte aus dem Laufmittel entfernt und an der Luft getrocknet. Durch Anregung unter UV-Licht (256 nm) wurden die Nukleotide als Verdunkelungen auf der fluoreszierenden Oberfläche detektiert (siehe Abb. 3.3.2.3)

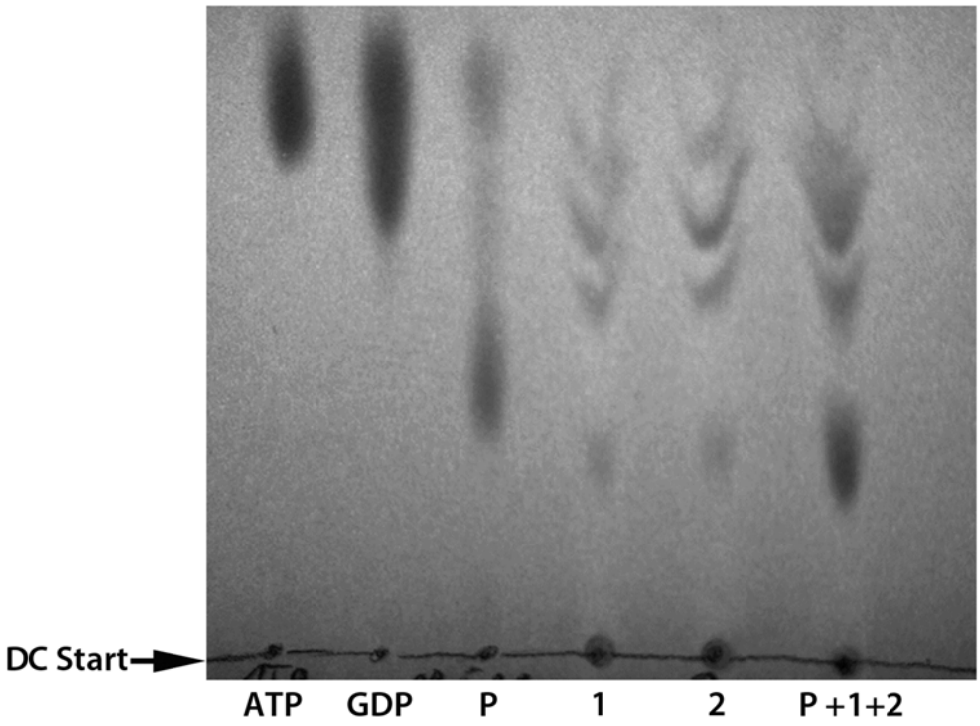


Abb. 3.3.2.3 Analytischer ppGpp-Nachweis mittels Dünnschichtchromatographie
Dargestellt ist das DC-Resultat zweier ppGpp-Syntheseansätze (1 und 2). ATP (4 mM) und GDP (2 mM) wurden zusammen mit Ribosomen-assoziierten RelA bei RT inkubiert. Nach fünf Std. wurden 10 µl des Syntheseansatzes in repetitiven 1 µl-Schritten auf der eingezeichneten Dünnschichtchromatographie-Startlinie (DC Start) aufgebraucht und eingetrocknet. Als Referenz wurden zusätzlich die Edukte ATP und GDP an den indizierten Stellen mit aufgetragen. Ebenfalls als Referenz diente sowohl ein Aliquot aus ppGpp als auch eine Mischung aus ppGpp und dem Syntheseansatz 1 und 2. Letztere diente der Veranschaulichung intrinsischer Effekte des Synthesepuffersystems auf das Laufverhalten von gereinigtem ppGpp.

3.3.2.4 Anionenaustauschchromatographie

Die Ionenaustauschchromatographie wurde mit dem ÄKTA prime plus system (GE Healthcare Life Science) durchgeführt. Eine 16 cm lange Säule (GE XK) mit einem Durchmesser von 2 cm wurde mit DEAE-Sephadex-A25 gefüllt, mit ca. 100 ml TL1-Puffer (siehe unten) gewaschen und mit mehreren Volumina TL01 (siehe unten) bei einer Flussrate von 0,7 ml/min äquilibriert. Die wässrige Phase des in 3.3.2.2 beschriebenen Ansatzes wurde auf die Säule gegeben und nach einigen Volumina TL0.1 durch einen linearen LiCl-Gradienten von TL 0,1 nach TL 0,5 (Gesamtvolumen 600 ml) eluiert. Die Säulendurchläufe wurden in 5 ml Fraktionen gesammelt und die

Nukleotide bei einer Wellenlänge von 254 nm detektiert. Wie in Abbildung 3.3.2.4 abgebildet, eluierte ppGpp bei einer LiCI-Konzentration von etwa 250 mM.

Anhand des Schreiberprofils wurden die ppGpp beinhaltenden Fraktionen identifiziert vereinigt und lyophilisiert. Die so aufkonzentrierten Proben wurden anschließend über eine G10-Gelfiltrationssäule aufgereinigt.

TLO.I·Puffer:	50 mM Tris·HCI, pH 7.4
	100mM LiCI
TLO.5·Puffer:	50 mM Tris·HCI, pH 7.4
	500mM LiCI
TLI-Puffer:	50 mM Tris·HCI, pH 7.4
	IMLiCI

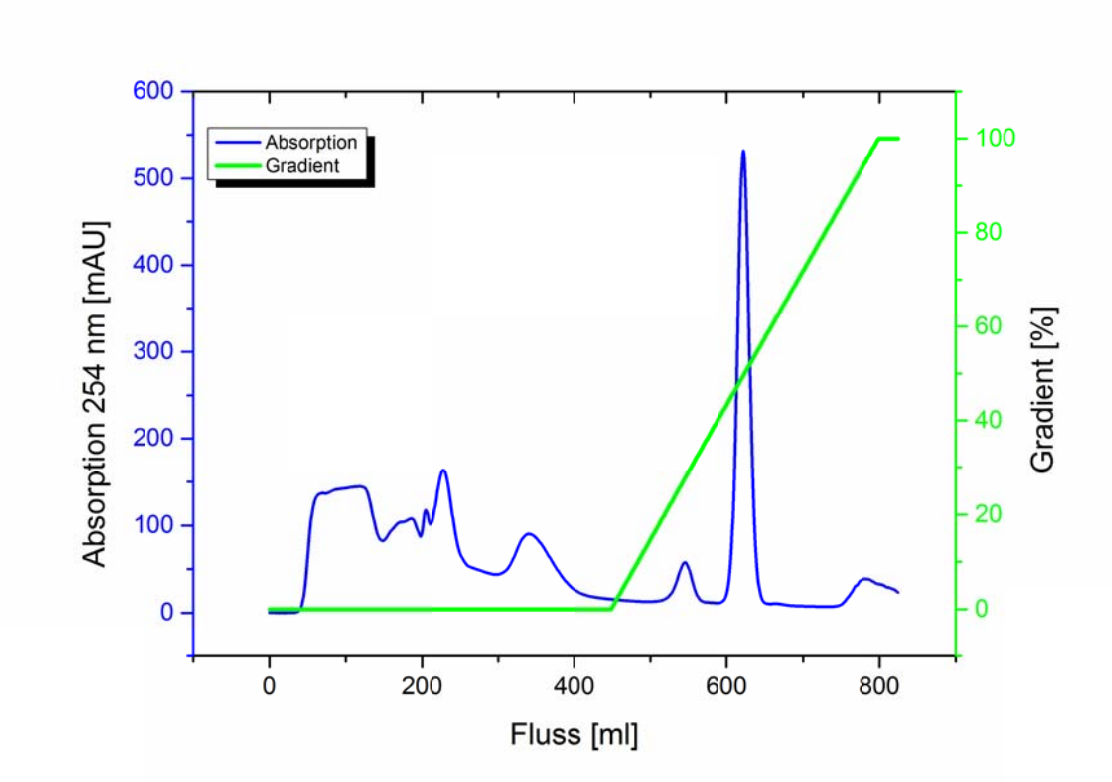


Abb. 3.3.2.4 Schreiberprofil einer Anionenaustauschchromatographie
Gezeigt ist das Schreiberprofil einer Anionenaustauchchromatographie über einen Bereich von 0 bis 825 ml, bestehend aus gemessener Absorption bei 254 nm in mAU(blau) und dem Eluationsgradient in % (grün). Bei einer Flussrate von 0,7 ml/min und 0,1 M LiCl wurde nach ca. 450 ml der LiCl-Gradient mit einer Endkonzentration von 0,5 M LiCl gestartet. Das aufzureinigende ppGpp eluierte bei einer LiCl-Konzentration von ca. 0,25 M.

3.3.2.5 Gelfiltrationslauf der in 3.3.2.4 eluierten ppGpp-haltigen Probe

Mit der in 3.3.2.4 beschriebenen Eluation geht eine hohe Konzentration an LiCl einher. Da sich LiCl-Konzentrationen über 100 mM (Krohn 1994) inhibierend auf die *E. coli* RNAP auswirken und somit die ppGpp-Transkriptionsanalysen verfälschen würden, wurde nach der Ionenaustauschchromotographie eine G10-Säulen-Gelfiltration zur Entsalzung der Probe angeschlossen. Hierzu wurden jeweils 0,5 ml der ppGpp-haltigen Lösung auf eine in *Aqua dest*. äquilibrierten Sephadex G10-Säule(70 cm lan, 1 cm Durchmesser) aufgetragen. Bei einer Flusrate von 0,6 ml/min wurde das Nukleotid in einem ÄKTA prime plus system (GE Healthcare Life Science) eluiert und in 1 ml Fraktionen gesammelt. Durch Verfolgen des Eluationsprofil bei einer Absorption von 254 nm wurden die ppGpp-haltigen Fraktionen identifiziert und lyophilisiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Fraktionen, die neben dem ppGpp-Peak auch den Salzpeak schneiden (siehe unten), nicht mit vereinigt wurden. Ergänzend zur obigen Erläuterung ist das Schreiberprofil in Abbildung 3.3.2.5 dargestellt.

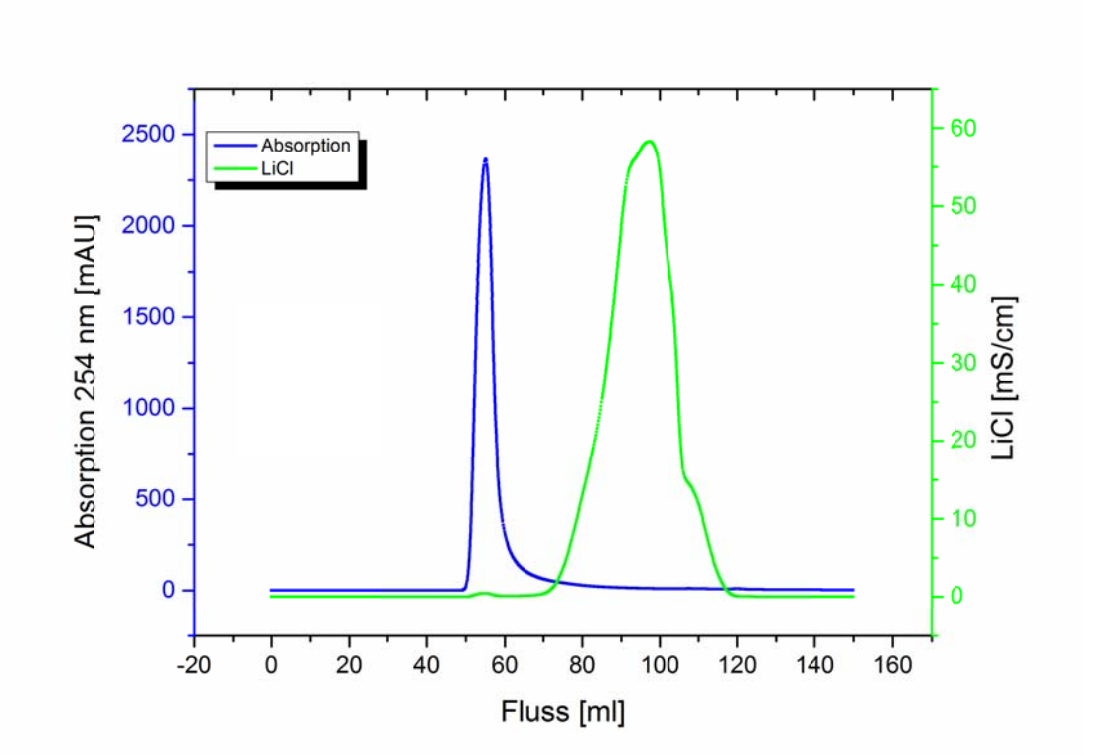


Abb. 3.3.2.5 G10 Gelfiltrationschromatographie der über Anionenaustausch gewonnenen ppGpp-Probe.
Oben dargestellt ist das Schreiberprofil eines G10-Säulenlaufes. Dieser gibt in blau den Absoptionsverlauf bei 254 nm (mAU) und in grün die gemessene Leitfähigkeit als Indikator

der LiCl-Konzentration (mS/cm) wieder. Die Dokumentation umfasst einen Bereich von 150 ml Durchfluss bei einer Rate von 0,6 ml/min. Die Darstellung verdeutlicht, dass ppGpp distinkt von dem LiCl eluiert werden konnte. Bei der Vereinigung der ppGpp-haltigen Fraktionen wurde sich auf den hier dargestellten Bereich von ca. 50 bis 70 ml beschränkt.

3.3.2.6 Reverse-Phase (Umkerhphasen)-HPLC zur Identifizierung von ppGpp

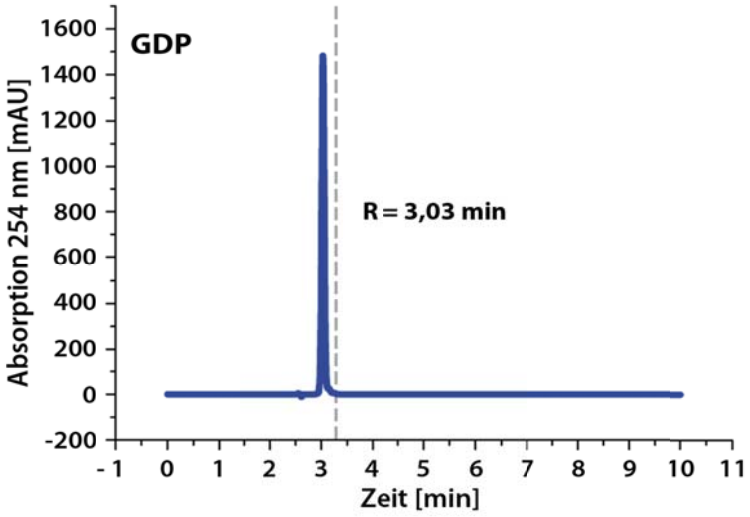
Durch Messen des Guanosinphosphat-spezifischen UV-Spektrums (siehe 3.2.1.1) wurde analysiert, ob es sich bei dem in 3.3.2.4 bis 3.3.2.5 gewonnenen Eluats tatsächlich um eine Guanosinphosphat-haltige Probe handelte. Da dies der Fall war, wurde mittels Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) untersucht, ob es sich bei den durch UV-Spektroskopie identifizierten Nukleotiden tatsächlich um ppGpp handelte und ob die Probe durch andere Guanosinphosphat-Derivate (z.B. GDP) kontaminiert war. Bei dieser Art der Chromatographie, im Folgenden RPC abgekürzt (Reversed-Phase Chromatography), ist im Gegensatz zur Normalphasenchromatograhpie, die mobile Phase polarer als die stationäre Phase. Durch Zugabe des hydrophoben Reagenz Tetrabutylammoniumbromid (TBAB) wurde die Hydrophobizität der Guanosinmoleküle der Proben in Abhängigkeit ihres Phosphatgehalts gesteigert. Der Reaktionsansatz wurde auf eine hydrophobe HPLC-Säule gegeben (250 mm Länge, 4,6 mm Durchmesser; Zorbax 300sb C18 Agilent Technologies) und mit einer Flussrate von 1 ml/min isokratisch durch 7,5 % Acetonitril eluiert. Dabei steht der Zeitpunkt der Elution (Retentionszeit) in unmittelbarer Relation zu der Hydrophobizität und damit zum Phosphatgehalt der Probe. Die Retentionszeit der Probe und zweier Referenzen (GDP und komerzielles ppGpp (TriLink Bio Technologies, USA)) wurde durch Detektion der Absorption [mAU] bei einer Wellenlänge von 254 nm analysiert und in Abb 3.3.2.6 dargestellt. Bei der verwendeten HPLC-Apparatur handelte es sich um das Model Agilent Technologies 1260 Infinity. Abschließend wurde die finale Ausbeute des aufgereinigten stringenten Effektors spektralphotometrisch bei 252 nm bestimmt (siehe 3.2.1.1) und seine Funktionalität *in vitro* überprüft.

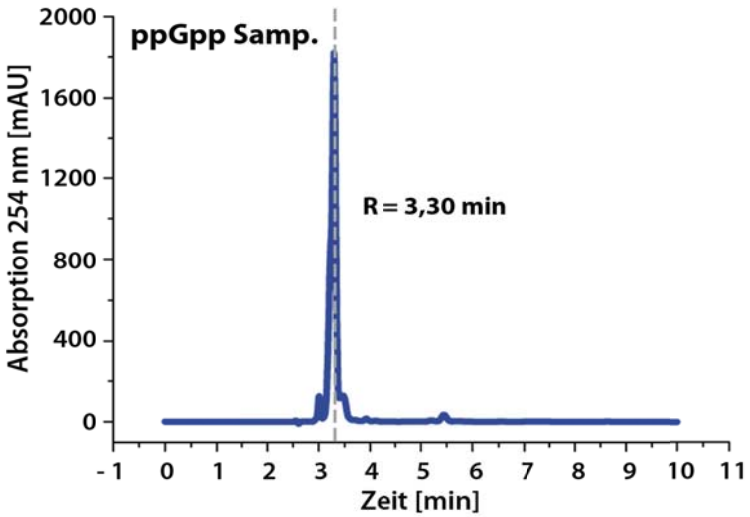
RPC-Puffer: 100 mM KH_2PO_4

10 mM Tetrabutylammoniumbromid

7,5 % Acetonitril

pH 6,5





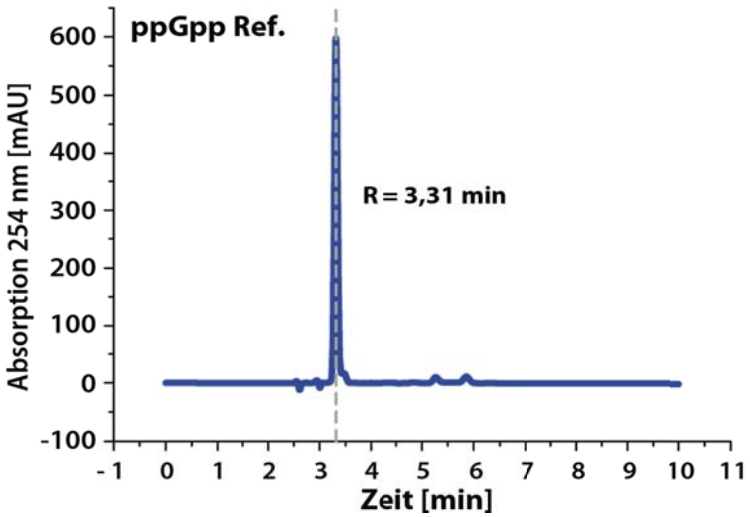


Abb. 3.3.2.6 ppGpp-Verifizierung mittels Umkehrphasen-HPLC
Oben dargestellt sind die Absorptionsverläufe bei 254 nm (mAU) dreier RPCs über einen Zeitraum von 11 min. Dabei verläuft die Zeitachse der einzelnen Messungen, zur besseren Vergleichbarkeit, in identischer Skalierung und parallel übereinander angeordnet. Die Abbildung zeigt die zu analysierende ppGpp-Probe (ppGpp Samp.) in Relation zu den Referenzen kommerzielles ppGpp (ppGpp Ref.) und GDP (GDP). Für jede Probe ist die individuelle Retentionszeit (R) in min angegeben, sowie ihre zeitliche Versetzung in Relation zur kommerziellen ppGpp-Probe (angedeutet durch die grau gestrichelte Linie).

3.3.3 Verzögerungsgelelektrophorese

Durch die Verzögerungsgelelektrophorese wurde in dieser Arbeit die Komplexbildung aus RNAP und Promotor-DNA analysiert. Die Bindung der DNA durch die RNAP verringert die Mobilität der radioaktiv markierten DNA in der Gelmatrix, welches einen „shift“ des detektierten radioaktiven Signals verursacht. In einem Volumen von 10 µl wurden 5 nM radioaktiv markierten DNA-Fragments (siehe 3.2.4.4) in 1x KGlu80-Puffer (siehe 2.7) und, sofern nicht anders beschrieben, in Gegenwart des ersten (500 µM) sowie des zweiten (50 µM) Startnukleotids inkubiert. Die Komplexe wurden durch σ^{70}-Holo-Enzym in An- bzw. Abwesenheit von ppGpp und/oder DksA analysiert. Dazu wurden die Ansätze für 10 min bei 30 °C inkubiert und anschließend zur Inhibierung von unspezifischen Komplexen mit Heparin (50 ng/µl) supplementiert. Nach weiteren 10 min bei 30 °C wurden die Proben mit 5 µl 2x TBE-Probenpuffer (siehe 2.7) versetzt und 15 µl des Gemisches auf ein natives PAA-Gel aufgetragen (siehe 3.2.5.2). Die elektrophoretische Trennung der Komplexe erfolgte für anderthalb bis drei Std. bei 30 mA.

3.3.4 *In vitro* Transkriptionen

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro* Transkriptionen wurde zwischen „multiple-round“ und „(pseudo-)single-round“ *in vitro* Transkriptionen unterschieden. Erstere wurde nach Beschaffenheit der verwendeten Transkrptionsmatrize zusätzlich in „run-off“ bzw. Transkription von superhelikalem Plasmid unterschieden. In diesem Kapitel werden diese drei Transkriptionstypen näher beschrieben.

3.3.4.1 „multiple-round“ *in vitro* Transkription

In dieser Arbeit wurden die „multiple-round“ *in vitro* Transkriptionen unabhängig davon, ob superspiralisierte Plasmide oder lineare DNA-Fragmente als Transkriptionsmatrizen durch σ^{70}-Holo-Enzym vollzogen. Die Transkription konnte dabei mehrfach hintereinander neu initiiert werden und endete an distinkten Tandempromotorbereichen bzw. am Fragmentende. 15 nM RNAP wurden mit 10 nM Plasmid bzw. 50 nM Fragment-DNA in KGlu80 (siehe 2.7) in An- bzw. Abwesenheit von ppGpp und/oder DksA transkribiert. Bei Abwesenheit der Effektoren wurde das fehlende Volumen durch den Puffer der jeweiligen Effektoren ersetzt und so für gleichbleibende Salzbedingungen im Reaktionsansatz gesorgt. Die Transkription wurde durch Zugabe des 10x-NTP-Mixes gestartet und fand, insofern nicht anders beschrieben, bei 30 °C statt. Nach 10 bis 30 min wurde die Neuinitiation der RNAP durch Zugabe von 1,5 µl Chaselösung inhibiert und die Fertigstellung der bereits initiierten Transkripte für weitere 10 min bei 30 °C ermöglicht. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von Formamid-Probenpuffer gestoppt und der Transkriptionsansatz nach kurzem Aufkochen (5 min, 96 °C) auf Eis überführt. Die Auftrennung erfolgte über 10 %ige bis 15 %ige denaturierende PAA-Gele (siehe 3.2.5.3).

Chaselösung:	je 2 mM ATP, CTP, GTP, UTP
	2 mg/ml Heparin
	1 mM Tris-HCl, pH 7,0

10x NTP-Mix:	650 µM ATP, GTP, UTP
	50 µM CTP
	1,33 µM [α-32P]-CTP (3000 Ci/mM)

3.3.4.2 „(pseudo-)single-round“ *in vitro* Transkription

Bei den *in vitro* Transkriptionen, in denen nur das erste gebildete Transkript beobachtet werden soll, unterscheidet man „single-round“ von „pseudo-single-round“ *in vitro* Transkriptionen. Bei den ersteren wird die Transkription unter Bedingungen durchgeführt, in der die RNAP nur einmal den Promotor binden kann, so dass nach Beendigung des Transkriptes eine Reinitiierung der Transkription ausgeschlossen ist. Dahingegen kann bei einer pseudo-single-round *in vitro* Transkription die Transkriptionseinheit mehrfach durch die RNA-Polymerase abgelesen werden, wobei in der anschließenden Autoradiographie (siehe 3.2.6.1) ausschließlich das Transkript des Initiationskomplexes detektiert wird. Hierzu werden in einer Vorinkubation maximal die ersten drei Startnukleotide zur Verfügung gestellt, von denen eines radioaktiv markiert ist. Durch anschließenden Start der Transkription durch die Zugabe eines Überschusses aller vier Nukleotide in nicht radioaktiver markierter Form wird die eigentliche Transkription gestartet, in der das radioaktive Nukleotid derart unterrepräsentiert vorliegt, dass ein erneuter Einbau, stochastisch gesehen, nicht mehr erfolgt.

In den in dieser Arbeit vorgelegten Studien wurde die Transkription des *rrnB* P1-Promotors durch eine Kombination aus „single-round“ und „pseudo-single-round“ *in vitro* Transkriptionen (daher „(pseudo-)single-round“) analysiert. Dabei wurde in Vorexperimenten eine Heparin-Konzentration ermittelt, bei der eine Reinitiation der RNAP nach Bildung des stabilen offenen Komplexes nicht mehr beobachtet werden konnte. Anschließend wurde die Transkription zusätzlich mit nicht markierten NTPs im Überschuss gestartet.

In den durchgeführten Analysen wurden 5 nM pUC18-1-Plasmid in 1x KGlu80 (siehe 2.7) durch 15 nM σ^{70}-Holo-Enzym transkribiert. Durch die Zugabe von 500 µM ATP, 50 µM CTP und 10 µCi α-32P-UTP wurde in 15-minütiger Inkubation die Bildung des Heparin-stabilen, binären, offenen *rrnB* P1-RNAP-Komplexes ermöglicht. Durch anschließender Zugabe von Heparin [2 µg/µl f.c.] und 5-minütiger Inkubation wurde eine erneute Bindung der RNAP an die DNA unterbunden. Anschließend wurde die Transkription durch Zugabe von je 6,5 mM ATP, CTP, GTP und TTP gestartet.

Aufgrund der hohen NTP- und Heparin-Konzentration wurde auf einen zusätzlichen Chase verzichtet. Daher wurde nach 5 min Transkriptionszeit die Reaktion durch Aufkochen der Ansätze in 15 µl Formamid (siehe 2.7) gestoppt. Abschließend wurden die Transkripte auf 10 %igen bis 15 %igen denaturierenden PAA-Gelen analysiert (siehe 3.2.5.3).

3.3.5 BiaCore-Analysen

BiaCore-Messungen beruhen auf dem physikalischen Prinzip der Oberflächenplasmon-resonanz. Dieses erlaubt die Messung der Bindung von Molekülen in einer Fließzelle an einen Bindepartner, der zuvor auf der Oberfläche eines Sensorchips immobilisiert wurde. Diese Bindung erzeugt ein Signal in Relation zur Masse des bindenden Moleküls, welches eine Beobachtung von Bindeinteraktionen in Echtzeit ermöglicht. Zur Messung von Oberflächenplasmonresonanzen wurde in dieser Arbeit ein BiaCore T200 (GE Helthcare) mit dazugehöriger Software (Biacore T200 Control Software, GE Helthcare) verwendet.

3.3.5.1 Immobilisierung der Promotorfragmente

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten BiaCore-Analysen wurde die Bindung von *E. coli* RNAP an den *tac*-, *hisG*- und den *rrnB P*1-Promotor analysiert. Hierzu wurde mittels PCR 5´-biotinylierte Promotor-DNA konstruiert (siehe 2.4.2) und an einen Streptavidin-überzogenen Sensorchip (Sieries S Sensor Chip SA, GE Healthcare) gebunden. Dabei wurde sich an die Anweisungen der dem Sensorchip beiliegenden Beschreibungen gehalten. Dieses beinhaltete die Konditionierung der Chipoberfläche durch Spülen mit 50 mM NaOH und das Ansetzen einer 10 pM Primerlösung in 0,5 M NaCl. Dieses geschah durch Einlegen des Chips in das BiaCore, durch das die vier Kammern des Chips selektiv und spezifisch angesteuert werden konnten. In repetitiven Schritten wurden die jeweiligen drei Promotorfragmente gezielt in je eine der vier Chipkammern injiziert und gebunden. Dieses geschah je Promotor und Chipkammer

so lange, bis die Differenz der gemessenen RU vor und nach der letzten Injektion 250 RU ergab. Die Promotorfragmente wurden wie folgt den Chipkammern zugeteilt:

Kammer Nr. 4	*tac*-Promotor
Kammer Nr. 3	*rrnB* P1-Promotor
Kammer Nr. 2	*hisG*-Promotor
Kammer Nr. 1	Referenz

Die Nummerierung ist gewählt nach der Flussrichtung der Probe, d. h. nach Injektion der Probe durchläuft diese als erstes die Referenz, gefolgt von dem *rrnB*, *tac* und dem *hisG*-P1-Promotors.

3.3.5.2 Durchführung der BiaCore-Messungen

Mit Hilfe der Biacore T200 Control Software (GE Healthcare) läßt sich die Bindung des sogenannten Liganden (auf der Chipoberfläche immobilisierter Bindepartner) und des Analyten (ungebundener Bindepartner) in zwei Modi analysieren. Der erste beschränkt sich auf die Ermittlung des KD-Wertes (sog. Affinitätsmodus), während der zweite zusätzlich Rückschlüsse auf die Dissoziation- und Assoziationskinetik (Kinetikmodus) schließen lässt. Aufgrund der intrinsischen Konformationsänderung der RNAP und der Promotorkomplexe (siehe 1.3.1.) waren die Messungen des letzteren Modus leider nicht möglich. Da sich die beiden unteschiedlichen Modi in ihren Anforderungen des Versuchsaufbaus leicht unterschieden, wurde sich im Folgenden auf die Vorgehensweise im Affinitätsmodus beschränkt.

Zur KD-Wert-Bestimmung wurden geeignete Mengen WT- bzw. Δω-RNAP für 45 min bei 4 °C auf einem Schwimmfilter gegen den Laufpuffer (KGlu80 ohne BSA (siehe 2.7)) dialysiert (siehe 3.2.2.3). Anschließend wurde die Konzentration des Dialysats, ausgehend von einem ε/1.000 von 298,42 und einem MW von 459,1 kDa (WT) bzw 459 kDa (Δω), mittels Nanodrop ermittelt (siehe 3.2.1.5). Die KD-Wert-Bestimmungen erfolgten über das Messen einer RNAP-Verdünnungsreihe von 2 nM

bis 32 nM. Jeder Ansatz beinhaltete neben der jeweiligen RNAP-Konzentration zusätzlich die *rrnB* P1-Startnukleotide (500 µM ATP; 50 µM CTP) und gegebenfalls die Effektoren ppGpp bzw. DksA. Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen wurde den Ansätzen zusätzlich 4,5 pg pro nM WT RNAP bzw. 2 pg pro Δω RNAP zugefügt. Analysen haben ergeben, dass Heparin in diesen Konzentrationen die Transkription in Relation zu den Heparin-freien Ansätzen um 30 % bis 50 % inhibiert. Abschließend wurden die Ansätze in das BiaCore gegeben und mit einer Flussrate von 10 µl/min über die Chipoberfläche gegeben (30 °C, 780 sek. Kontakt, 600 sek. Disoziation). Zwischen den einzelnen Messungen der jeweiligen RNAP-Konzentrationen wurde die Chipoberfläche durch Spülen mit 0,05 %igem SDS regeneriert.

3.3.6 -Proteomanalysen, 2D-Gelelektrophoresen

In einem Teil dieser Arbeit wurde *in vivo* die Auswirkung der DksA-Deletion im Rahmen der Stringenten Kontrolle auf Proteomebene untersucht. Die hierzu notwendigen Schritte wurden im folgenden Kapitel zusammengefasst.

3.3.6.1 Auslösung der Stringenten Kontrolle

1 ml üN kulitivierter MG1655 (WT)- bzw. CF9239 (Δω)-Zellen (siehe 3.1.3) wurden in je zwei 100 ml YT-Erlenmayerkolben mit Schikane überführt. Die vier Kolben wurden unter Schütteln bei 37 °C in einem Wasserbad kultiviert und die OD-Zunahme der Kultur erst stündlich, dann halbstündlich bei 600 nm dokumentiert. Bei einer OD von 0,6 wurde in je einem Kolben der beiden Zellstämme, durch die Zugabe von Serinhydroxamat (SHX) in einer Endkonzentration von 250 µg/ml, die Serin-spezifische Aminoacyltransferase vergiftet. Diese belädt die Serin-tRNA, so dass die Vergiftung eine Akkumulation von unbeladener tRNA zufolge hat. Das Binden dierser unbeladener tRNA an die Ribosomen signalisiert der Zelle Aminosäuremangel und aktiviert die Stringente Kontrolle. 30 min nach Auslösen der Stringenten Kontrolle

wurden aus allen vier Kolben OD 6 Zellen für die Proteomanalysen entnommen (siehe unten). Zur Phänotypisierung wurde die OD der vier Zelkulturen auch nach der Entnahme der Zellen zur Proteomanalyse weiterhin analysiert (siehe 3.2.1.3).

3.3.6.2 Gesamtproteinextraktion aus *E. coli* Zellen

Die in 3.3.6.1 entnommenen Zellen konnten als Zellpellet für einige Wochen bei -20°C gelagert oder direkt zur weiteren Vorbereitung in 3 ml resuspendiert und neu pelletiert werden. Dadurch wurden die Zellen von Resten des Mediums vor dem Zellauschluss befreit. Die vom Medium befreiten Pellets wurden in 500 µl 250 mM Tris-HCl mit 0,2 mM PMSF, 1µM Pepstatin sowie 1µM Leupeptin resuspendiert und in sterile 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Anschließend wurden die Zellen dieser Suspension mittels Ultraschall (Labsonic U, Braun Biotech Int.) nach folgenden Parametern lysiert.

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

30 sec Ultraschall
30 sec auf Eis
3 Zyklen

Nach Entfernen der Zelltrümmer durch Zentrifugation (10 min, 13.000 rpm, RT, Hettich Mikro 22) wurde der proteinhaltige Überstand in frische Reaktiosgefäße überführt und die Proteinkonzentration mittels Bradford-Test bestimmt (siehe 3.2.1.4). Eine Lagerung der Proteinlösungen war bei mindestens -20 °C für einige Wochen möglich.

3.3.6.3 Acetonfällung von Proteinen

Durch die Zugabe von 4 Volumen Aceton p.A. (Sigma Aldrich) wurden die obig aufgereinigten Proteine denaturierend für zwei Std. bei -20 °C gefällt. Das Präzipitat wurde nach Sedimentation (30 min, 14.000 rpm, Hettich Mikro 22) und Entfernen des Überstandes in Rehydrationspuffer aufgenommen (siehe 3.3.6.5). Anschließend wurde die Ausbeute mittels Bradford-Test ermittelt und die Proben wie in 3.3.6.4 bzw. 3.3.6.5 beschrieben weiter analysiert.

3.3.6.4 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Erhöhung der Vergleichbarkeit der 2D-Gelelektrophoresen (siehe unten) wurden die Konzentrationen der oben beschriebenen Proteine vor dem Einquellen und der isoelektrischen Fokussierung mittels Bardford-Methode miteinander angeglichen (siehe oben). Dieser Angleich wurde mittels SDS-PAGE nach Laemmli (Laemmli 1970) überprüft. Bei der SDS-PAGE erfolgt die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht in einem engporigen, denaturierenden Trenngel (15 % PAA, 375 mM Tris-HCl, pH 8,8, 0,1%iges SDS), kombinert mit einem weitporigen, denaturierenden Sammelgel (6 % PAA, 125 mM Tris-HCl, pH 6,8, 0,1%iges SDS). Zusätzlich erhöht der unterschiedliche pH-Wert von Trenn- und Sammelgel die Trennleistung dieser PAGE. Das denaturierende Agens Natriumdodecylsulfat (SDS) in Probe und Gel zerstört die kovalenten Wechselwirkungen im Protein, und die hydrophoben Reste der SDS-Anionen lagern sich an die Proteinketten an (1,4 g SDS/g Protein) (Lottspeich 1998). Diese überlagern dadurch die Eigenladung der Proteine, so dass diese bei der Auftrennung keine nenneswerte Rolle spielt.

Die Proben wurden mit ¼ Volumen 4x SDS-Probenpuffer versetzt und in Gegenwart von 3 µm β-Mercaptoethanol für mindestens 5 min bei 96 °C denaturiert. Anschließend wurden die Proben auf kleine SDS-Gele gegeben und bei 50 V üN in 1x SDS-Puffer aufgetrennt. Die Detektion der Proteinbanden geschah abschließend mittels Coomassiefärbung (siehe 3.2.9).

Lösung A: 30% Acrylamid-/Bisacrylamid-Lösung (30:1)
Lösung B: 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
Lösung C: 10% (w/v) SDS
Lösung D: 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
Klebegel: 1/3 (v/v) 30% PAA (30:1)2/3 (v/v) Aqua dest.

Kleines SDS-Gel: B x H x T
40 ml Trenngel: 180 mm x 120 mm x 1 mm
10 ml Sammelgel: 180 mm x 40 mm x 1 mm

3.3.6.5 Isoelektrische Fokussierung

Die isoelektrische Fokussierung (IEF) ist die erste Dimension der 2D-Gelelektrophorese. Sie ist ein gelelektrophoretisches Verfahren, bei dem über einen immobilisierten pH-Gradienten (IPG) Proteine nach ihrer Ladungszusammensetzung getrennt werden. In solch einem Gradienten wandern Proteine in einem elektrischen Feld ihrer Ladung entsprechend bis zu dem pH-Wert, an dem ihre Nettoladung Null beträgt (pI; isoelektrischer Punkt).

Das acetongefällte Gesamtprotein (siehe 3.3.6.3) wurde in Rehydrationspuffer resuspendiert und gelöst. 400 µg wurden in 340 µl Lösung aus Rehydrationspuffer, 2 %iger IPG-Puffer und 66 mM DTT üN in 18 cm Immobiline Dry Strips ph 3 bs 10 nichtlinear (NL) (GE Healthcare) eingequollen. Dazu wurden die Streifen in den Rehydrationskammern mit der klebrigen Seite nach unten auf die Proteinlösung gelegt und mit Mineralöl überschichtet.

Rehydratationspuffer: 7 M Harnstoff
2 M Thioharnstoff
4 % CHAPS
0,5 % Triton X 100
0,04 % (w/v) Bromphenolblau
(Lagerung bei -20 °C)

Am folgenden Tag wurden die Streifen in *Aqua dest.* getaucht und überschüssiges Wasser vorsichtig abgetupft. Die Streifen wurden mit der Gelseite nach oben auf die Keramikslides der 20 °C vortemperierten Elektrophorese-Apparatur (Ettan IGphor 3) mit dem sauren Ende zur Anode und dem basischen Ende zur Kathode hin positioniert. Die Streifen wurden mit *Aqua dest*.-befeuchteten Elektrodenpapieren an beiden Enden der Streifen versehen und zur Vermeidung eines Auskristallisierens des Harnstoffes mit Mineralöl erneut überschichtet. Nach dem Fixieren der Elektroden auf den Elektrodenpapieren am Ende der IEF-Streifen, wurde die isoelektrische Fokussierung mit folgenden Parametern gestartet:

		Spannung	Zeit [h]	kVh
Step 1	Step and Hold	500 V	1:00	0,5
Step 2	Gradient	1000 V	1:00	0,8
Step 3	Gradient	8000 V	3:00	13,5
Step 4	Step and Hold	8000 V	2:40	21,2
Gesamt			7:40	36,0

Nach der isoelektrischen Fokussierung konnten die Streifen in den Äquilibrierröhren bei -70 °C gelagert werden, sofern nicht sofort die 2. Dimension angeschlossen wurde.

3.3.6.6 Äquilibrierung und SDS-PAGE (2. Dimension)

Durch die Äquilibirierung wurden die Streifen mit dem SDS-Puffersystem gesättigt. Hierzu wurden die Streifen bei RT in 10 ml DTT-haltiger Äquilibrierlösung geschwenkt. Nach 15 min wurde die DDT-haltige Lösung durch 10 ml der Iodacetamid-haltigen Äquilibrierlösung ersetzt und die Streifen erneut für 15 min bei RT geschwenkt. Zur Gelauftrennung wurden die Streifen anschließend in *Aqua dest*. getaucht und vorsichtig mit Hilfe einer Pinzette mit der Gelseite nach vorne auf ein 15 %iges SDS-Polyacrylamid-Gel positioniert. Mit Hilfe der Gel-Caster Apparatur (GE Healthcare) wurden die vier Trenngele gleichzeitig gegossen. Weiterhin wurde auf ein Sammelgel verzichtet und in den ersten PAGE ein Molekulargewichtsmarker durch

Aufbringen auf ein Stück Whatman-Papier ca 1 cm^2 mitgeführt. Die Streifen samt Whatman-Papier wurden durch 1 %ige Agarose mit 0,1 %igem SDS fixiert und die Elektrophorese in der Ettan Dalt Six Gelelektrophoreseapparatur (GE Healthcare) mit folgenden Einstellungen durchgeführt.

	mA/Gel	Spannung [V]	W/Gel	Temperatur [°C]
üN	12	150	2	30
üT	40	500	13	25

Die Elektrophorese wurde am nächsten Tag eine Std. nach Auslaufen des Blaumarkers gestoppt.

Äquilibrierungspuffer:
6 M Harnstoff
16 ml Aqua dest.,
10 mM Tris-HCl, pH 8,5
20 ml 10 %SDS
30 ml Glycerin
0,4 % (w/v) Bromphenolblau
(Lagerung bei -20°C)

Äquilibrierungslösung mit DTT:
10 ml Äquilibrierungspuffer
100 mg DTT

Äquilibrierungslösung mit Iodacetamid:
10 ml Äquilibrierungspuffer
480 mg Iodacetamid

4 Ergebnisse

4.1 Analyse stringent regulierter ribosomaler RNA-Promotoren aus *Escherichia coli*: Einfluss von DksA, ppGpp und dem Initiationsnukleotid auf die *in vitro* Promotoraktivität

Die Synthese ribosomaler RNA wird in *E. coli* über die Aktivität von sieben ribosomalen Operons kontrolliert. In vorangegangenen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die Aktivitäten der individuellen Operons in Abhängigkeit zu den Wachstumsbedingungen untereinander deutlich variieren. Auch war aus der Literatur bekannt, dass sich die 3´ vom Promotor befindlichen regulatorischen Sequenzen der jeweiligen ribosomalen RNA P1-Promotoren unterscheiden. 3´ distal an den Promotor angrenzende regulatorische Sequenzen sind in der Regulation und Expression vieler prokaryotischer Gene stark involviert und dienen unter anderem als Bindestelle für regulatorische Faktoren (Hillebrand et al. 2005, Hirvonen et al. 2001, Pul et al. 2005). Wie die meisten bakteriellen Promotoren starten die ribosomalen Promotoren, mit Ausnahme des *rrnD P1*-Promotors, welcher mit einem GTP startet, mit einem ATP als Initiationssubstrat. Interessanterweise konnte von uns gezeigt werden, dass der *rrnD P1*-Promotor, dessen Transkript als einziges mit einem GTP anstelle eines ATP initiiert, *in vivo* deutlich weniger ppGpp-sensitiv reguliert wird als die anderen (Kolmsee et al. 2011).

4.1.1 *In vitro* Transkriptionsanalyse stringent regulierter ribosomaler Promotoren

In einem ersten Teil dieser Arbeit, wurde die in 3.1 beschriebene Korrelation zwischen Startnukleotid und ppGpp-Sensitivität weiterführend analysiert. Es wurde untersucht, ob den differentiellen Promotorreaktionen auf ppGpp und DksA die intrinsischen Eigenschaften der Promotorsequenzen zugrunde liegen oder diese durch andere, bisher

unbekannte, zelluläre Faktoren hervorgerufen werden. Zu diesem Zwecke wurden die *rrn* P1-Promotorsequenzen zusammen mit aufgereinigter *E. coli* σ^{70}-RNAP unter dem Einfluss der stringenten Effektoren ppGpp und DksA *in vitro* transkribiert (siehe 3.3.4.1)Die *rrnH*, *rrnD*, *rrnE* und *rrnB* P1-Promotoren (siehe Diplomarbeit Annette Hillebrand) wurden in Plasmide kloniert und als superhelikale Transkriptionsmatrizen eingesetzt. Des Weiteren wurden zwei *rrnD* P1-Variationen verwendet, von denen die eine das *rrnD* Operon-Transkriptionsstartnukleotid +1G durch ein Adenin ausgetauscht hat (*rrnD* P1 +1A) und die andere zusätzlich einen weiteren Nukleotidaustausch von Thymin nach Cystosin an der dritten Position des Transkriptes (*rrnD* P1 +1A +3C) aufwies (Kolmsee and Hengge 2011). Durch diesen zusätzlichen Basenaustausch wurde eine *rrnD* P1-Variante erstellt, welche im Bereich von 18 bp 3´ distal vom Transkriptionstart (-18) bis 5 Nukleotide nach Transkriptionsstart (+5) identisch zu den -18 bis +5 Sequenzen der *rrnH* und *rrnE* P1-Promotoren war (siehe Abb. 1.5.2.1). Die Transkription der Promotoren wurde, sowohl unter dem Einfluss von 300 µM ppGpp (violette Säulen) als auch ppGpp unabhängig (graue Säulen), jeweils ohne bzw. mit steigenden Konzentrationen an DksA (von dunkel nach hell: 0; 1; 2; 4 µM) getestet. Anschließend wurden die Transkripte auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel separiert, quantifiziert und, wie in Abbildung (4.1.1) dargestellt, ausgewertet.

Die in der Abbildung dargestellten Diagramme geben die gemessene Transkriptionsaktivität der *rrn*-Promotoren (obere Spalte Autoradiogrammausschnitt) normalisiert über die Aktivität der als stringent unreguliert geltenden RNA1-Transkription (untere Spalte Autoradiogrammausschnitt) und in Relation zu der ppGpp-DksA-freien Probe wieder. Es ist zu erkennen, dass in Abwesenheit von ppGpp DksA in den getesteten Konzentrationen bis zu 2 µM keinen klaren inhibitorischen Effekt (maximal gemessene Inhibition war 10 %) auf die gemessenen Promotoraktivitäten aller getesteten Promotoren hatte. Stellenweise wirkte sich DksA in steigenden Konzentrationen sogar aktivitätsfördernd auf die Promotoren aus. In diesen Fällen konnte im Vergleich zu der ppGpp-DksA-neutralen Probe eine Transkriptionssteigerung von ca. 10 % gemessen werden. Dieser aktivierende Effekt zeigte sich jedoch auch bei der (wie oben beschrieben als stringent unreguliert geltenden) RNA1-Transkription. Die Zugabe von 4 µM DksA in ppGpp-freiem Hintergrund (Spur 4) ergab nach Quantifizierung in einigen Fällen einen

Transkriptionseinbruch von ca. 30 %, welcher jedoch in den dazugehörigen abgebildeten Banden nicht widergespiegelt wurde. Stattdessen konnte in den betroffenen Proben in Relation zu den niedrig-DksA-behandelten Proben ein deutlicher Anstieg der RNA1-Transkription beobachtet werden. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass der oben beschriebene Einbruch im Säulendiagramm der gesteigerten RNA1-Promotoraktivität begründet ist (siehe Diskussion).
Die Zugabe von 300 µM ppGpp ohne DksA (Spur 5) verursachte in allen getesteten Promotoren unisono einen Einbruch der rRNA-Transkription von 30 % bis 60 %.
Dieser Einbruch ließ sich durch die Zugabe von DksA konzentrationsabhängig auf 60 % bis 80 % im Vergleich zur ursprünglichen Transkription der effektorfreien *rrn*-Promotoren steigern. Es ist daher festzuhalten, dass sich unter den getesteten Bedingungen und im Gegensatz zu den vorangestellten *in vivo* Resultaten, das Transkriptionsverhalten des *rrnD* P1-Promotors bezüglich seiner stringenten Regulation nicht von denen der anderen ribosomalen Promotoren unterscheiden ließ.

Ergänzend ist zu erwähnen, dass auch in den ppGpp-supplementierten Ansätzen die Zugabe von 4 µM DksA (Spur 8) einen Anstieg der RNA1-Transkription zur Folge hatte (siehe Diskussion 5.1).

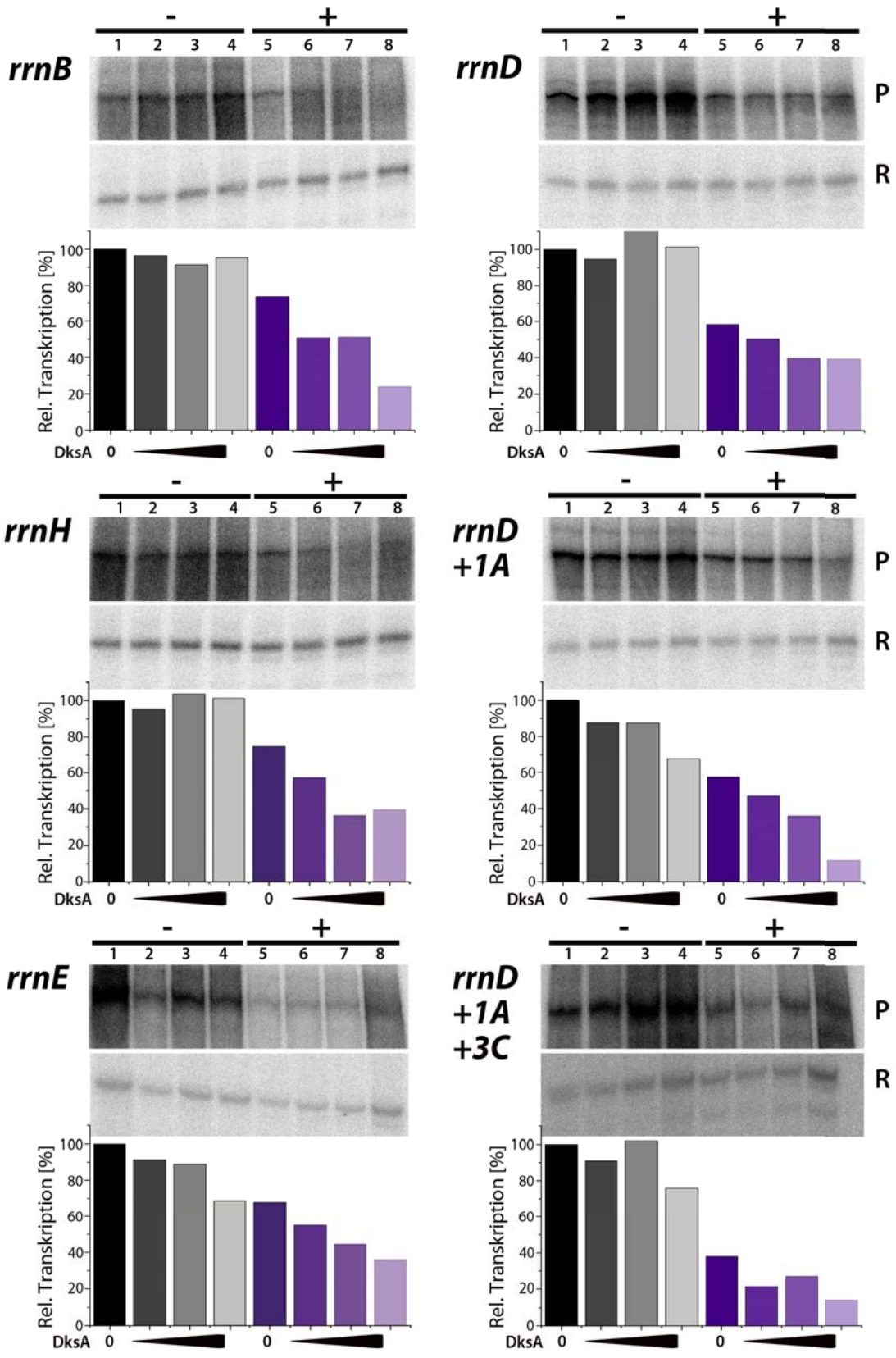

rrnB
rrnD
rrnH
rrnD +1A
rrnE
rrnD +1A +3C
P
R
-
+
1 2 3 4 5 6 7 8
Rel. Transkription [%]
0 20 40 60 80 100
DksA 0 0

Abb. 4.1.1 Einfluss von ppGpp und DksA auf die ribosomalen Promotoren *rrnB* P1, *rrnH* P1, *rrnE* P1 und *rrnD* P1, sowie der *rrnD* P1-Mutanten *rrnD* P1 *+1A* und *rrnD* P1 *+1A+3C*
Dargestellt sind Ausschnitte eines repräsentativen Autoradiogramms aus fünf unabhängig durchgeführten *in vitro* Transkriptionen zur Bestimmung der Aktivität ribosomaler Promotoren unter dem Einfluss von ppGpp und/oder DksA. Als Transkriptionstemplate diente superhelikale Plasmid-DNA. Jedes der eingesetzten Plasmide kodierte neben der jeweiligen Promotorsequenz (P) zusätzlich den RNA1-Promotor (R). Den Transkriptionsansätzen wurde in Gegenwart von 300 µM ppGpp (+; violette Säulen, Spuren 5 bis 8) bzw. in Abwesenheit von ppGpp (-; graue Säulen, Spuren 1 bis 4) 1 bis 4 µM DksA hinzutitriert. Zusätzlich wurde sowohl in den Ansätzen mit als auch in den Ansätzen ohne ppGpp eine Probe in Abwesenheit von DksA [0 µM] analysiert. Die jeweilige Konzentration an eingesetztem DksA wird von der Intensität der Säulenfärbung wiedergegeben (0, 1, 2 und 4 µM). Alle Transkripte der Promotoren wurden auf einem 10 %igem denaturierenden Polyacrylamidgel (dPAA-Gel) aufgetrennt. Anschließend wurden die Produkte der ribosomalen Promotoren mittels PhosphoImager quantifiziert, über die jeweilige RNA1-Transkriptmengen normalisiert und als Säulendiagramm in Relation zur DksA- und ppGpp- freien Probe graphisch dargestellt (Kolmsee et al. 2011).

4.1.2 Effekte limitierter GTP-Konzentrationen auf stringent regulierte Promotoren in Abhängigkeit ihres Transkriptionsstartnukleotids und in Gegenwart von ppGpp bzw. DksA

Für diverse Promotoren konnte eine Abhängigkeit der Transkriptionsaktivität zur Konzentration des jeweiligen Strartnukleotids gezeigt werden (Murray et al. 2003). Vorherige Studien unserer Arbeitsgruppe lassen vermuten, dass ribosomale Promotoren wie der *rrnD* P1 ebenfalls zu dieser Klasse der Promotoren gehören. Unterschiede in der Konzentration des jeweiligen iNTP scheinen hierbei die ppGpp-Sensitivität ribosomaler Promotoren deutlich zu beeinflussen. Im Gegensatz zur *in vivo* Situation, bei der der NTP-Titer über komplexe intrazelluläre Mechanismen ständig reguliert wird, wurden die NTP-Konzentrationen in den oben beschriebenen *in vitro* Transkriptionen standardmäßig bei fest eingesetzten 65 µM je Nukleotid durchgeführt. Es wurde daher vermutet, dass die beobachteten Diskrepanzen der *in vivo* und *in vitro* Resultate den variabel (*in vivo*) bzw. starr (*in vitro*) vorliegenden (i)NTP Titer verschuldet waren. Daher wurde in weiteren *in vitro* Transkriptionsansätzen versucht durch Variation der iNTP Konzentrationen, die *in vivo* Bedingungen nachzustellen. Wie im Vorherigen erwähnt, steigt in *E. coli* der intrazelluläre ppGpp-Gehalt im Rahmen der stringenten Kontrolle durch die gesteigerte Phosphorylierung von GDP bzw. GTP zu ppGpp bzw. pppGpp bis in den millimolaren Bereich (Lund and

Kjeldgaard 1972). Diese erhöhte GTP-Phosphorylierung lässt eine drastische Ausdünnung des für Transkription zur Verfügung stehenden NTP-Pools an GTPs vermuten. Ein ähnlicher Mechanismus konnte für die Regulation stringent regulierter Promotoren in *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) gezeigt werden. In *B. subtilis* erfolgt die Drosselung großteils mit GTP-startenden stringenten rRNA-Promotoren nicht wie in *E. coli* durch direkte Reprogrammierung der RNAP, sondern vielmehr über Limitierung des zur Verfügung stehenden GTP-Pools. Diese Drosselung rührt jedoch nicht von der hohen ppGpp-Synthese her, sonder ist Resultat einer aktiven Hemmung der GTP-Biosynthese durch ppGpp (Krasny and Gourse 2004). Aufgrund der oben beschriebenen Bedeutung des Startnukleotids, könnte sich diese Ausdünnung des GTP auch in *E. coli* auf den mit einem GTP-startenden *rrnD* P1-Promotor auswirken.

In Abbildung 4.1.2 konnte gezeigt werden, dass eine Reduzierung des GTP-Gehalts von 65 µM auf 1 µM keinen Einfluss auf die stringente Regulation aller drei getesteten Promotoren hat (obere Spalte Autoradiogrammausschnitt). Bezüglich ihrer ppGpp- und DksA-Sensitivität waren die gemessenen Aktivitäten der Promotoren vergleichbar mit den gemessenen Aktivitäten der *in vitro* Transkriptionen unter NTP-Standardbedingungen (siehe Abb. 4.1.1).
Die über die RNA1-Transkription (untere Spalte Autoradiogrammausschnitt) normalisierten Intensitäten der ribosomalen Transkripte zeigten unabhängig des Startnukleotids ihrer Promotoren in Abwesenheit von ppGpp (graue Säulen Spur 1 bis 4) keine Reaktion auf die getesteten DksA Konzentrationen (maximale gemessene Inhibition im Bereich von 15 %). 300 µM ppGpp (violette Säulen, Spur 5 bis 8) übte sich auf die Aktivität aller drei getesteten Promotoren vergleichbar inhibitorisch aus. In Abwesenheit von DksA erreicht die Transkription in den ppGpp-versetzten Proben, durchschnittlich 50 % bis 60 % der ursprünglichen Aktivität der effektorfreien Promotoren. Die Zugabe von DksA steigerte in allen drei *rrn*-Promotoren den ppGpp-Effekt. Nach der Zugabe von 1µM bis 2 µM DksA fiel die Promotoraktivität auf 40 % der ursprünglichen Aktivität herab. Die Zugabe von 4 µM DksA steigerte die oben beschriebenen Effekte, so dass die Promotoraktivität verglichen mit der des ppGpp-DksA-freien Transkriptionsansatzes um 80 % bis 90 % abnahm.

Neben dem ppGpp-unterstützenden Effekt von DksA auf ribosomale Promotoren wirkte sich DksA in hohen Konzentrationen (4 µM; Spur 4 und 8) auch aktivierend auf die Transkription der RNA1-Promotoren aus (siehe Diskussion 5.1).

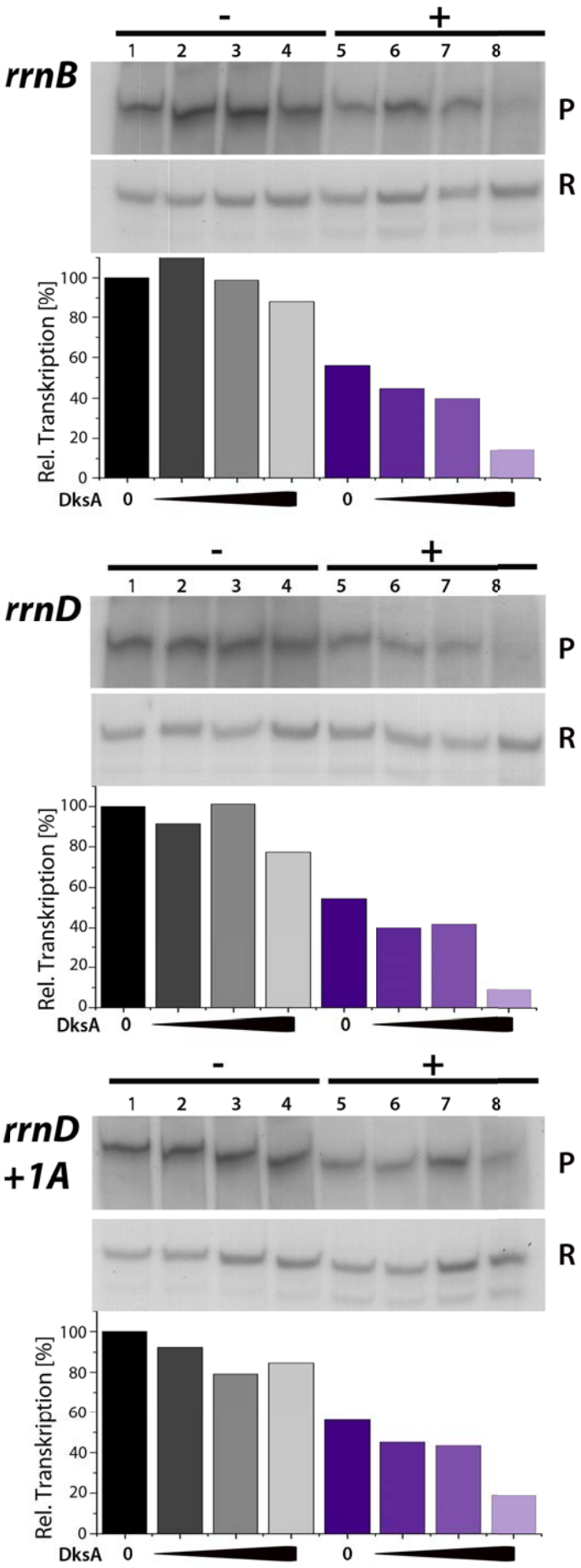


Abb. 4.1.2 Regulierung stringenter Promotoren durch ppGpp und DksA unter GTP-limitierenden Bedingungen Obig dargestellte Ausschnitte eines Autoradiogramms wurden aus einer von insgesamt drei unabhängig voneinander durchgeführten *in vitro* Transkriptionen entnommen und repräsentativ aufgeführt. Die jeweiligen *rrn* P1-Promotoren (P) wurden gemeinsam mit dem RNA1-Promotor (R) auf einem einzelnen Plasmid kodiert und dem Transkriptionsansatz mit limitiertem GTP-Titer [1 µM] beigefügt. Die Transkriptionen wurden, wie oben aufgeführt, in Gegenwart (+; violette Säulen, Spur 5 bis 8) bzw. Abwesenheit (-; graue Säulen, Spur 1 bis 4) von ppGpp [300 µM] und/oder DksA [0; 1; 2,4 µM] durchgeführt (Spot 1 bis 4 bzw. 5 bis 8) und die Produkte auf einem 10 %igen dPAA-Gel aufgetrennt. Die Intensität der Säulenfärbung von dunkel (Spur 1 und 5: 0 µM) nach hell (Spur 4 und 8: 4 µM) spiegelt die Menge des eingesetzten DksA wider. Zur Quantifizierung wurden die ribosomalen Transkriptmengen densitometrisch bestimmt, mit Hilfe der RNA1-Transkriptmengen normalisiert und in Relation zur pGpp-DksA-unbehandelten Probe dargestellt (Kolmsee et al. 2011).

4.1.3 Analyse des Einflusses von ppGpp und DksA auf die *in vitro* Transkription ribosomaler Promotoren in Abhängigkeit auf ihre Startnukleotide und in Gegenwart erhöhter GTP-Konzentrationen

Nachdem es durch Minimierung des GTP-Gehalts in den *in vitro* Transkriptionsanalysen (4.1.2) nicht gelang, die *in vivo* beschriebene differentielle stringente Regulation des *rrnD* P1-Promotor zu validieren, wurden *in vitro* Transkriptionen in Gegenwart erhöhter GTP-Konzentrationen durchgeführt. (Barker et al. 2001, Gourse 1988, Heinemann and Wagner 1997, Langert et al. 1991).

In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass die binären offenen Komplexe zwischen RNA-Polymerasen und stringent negativ regulierter Promotoren intrinsisch besonders instabil und kurzlebig sind. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass sich der Einbau der jeweiligen iNTPs stabilisierend auf die Halbwertszeit der binären offenen Komplexe solcher ppGpp- und DksA-sensitiven Promotoren auswirkt (Barker et al. 2001, Gourse 1988, Heinemann and Wagner 1997, Langert et al. 1991).

Durch die Supplementierung der *in vitro* Transkriptionsansätze mit 500 µM GTP anstelle der ursprünglichen 65 µM, bei gleichbleibender Konzentration der anderen beiden NTPs (65 µM UTP und GTP; CTP ist geringer konzentriert, da es das radioaktiv markierte ist (ca 10 µM)), konnte in Gegenwart von ppGpp und DksA eine differentielle Regulation der getesteten rRNA-Promotoren in Abhängigkeit ihrer iNTPs gezeigt werden (siehe Abbildung 4.1.3, (obere Spalte Autoradiogrammausschnitt)). Der mit einem GTP an Position +1 startende *rrnD* P1-Promotor entwickelte in Relation zu den anderen getesteten *rrn*-Promotoren einen deutlich geringer sensitiven Phänotyp auf ppGpp. Während DksA in Abwesenheit von ppGpp (graue Säulen, Spur 1 bis 4), wie erwartet, keinen deutlichen Effekt auf die *rrnD* P1-Aktivität hatte (Spur 1 bis 4), konnte auch die Zugabe von 300 µM ppGpp (dunkelviolette Säule, Spur 5) in Abwesenheit von DksA die *rrn* P1-Promotortranskription nicht reduzieren (siehe Diskussion). Selbst die Supplementierung der ppGpp-haltigen Proben durch 1 µM bzw. 2 µM DksA (Spur 6 und 7) konnte die in den vorherigen *in vitro* Transkriptionen gezeigte, stringente Regulierbarkeit des *rrnD* P1-Promotors nicht widerspiegeln. Erst nach der Zugabe von 4 µM DksA in der Gegenwart von 300 µM ppGpp (Spur 8) konnte die Transkription,

verglichen mit der ppGpp-DksA-freien Probe, um ca. 50 % bis 60 % reduziert werden. Die Erhöhung des GTP-Titers hatte im Gegensatz dazu keinen Effekt auf die stringente Regulation der mit einem ATP startenden Promotoren).

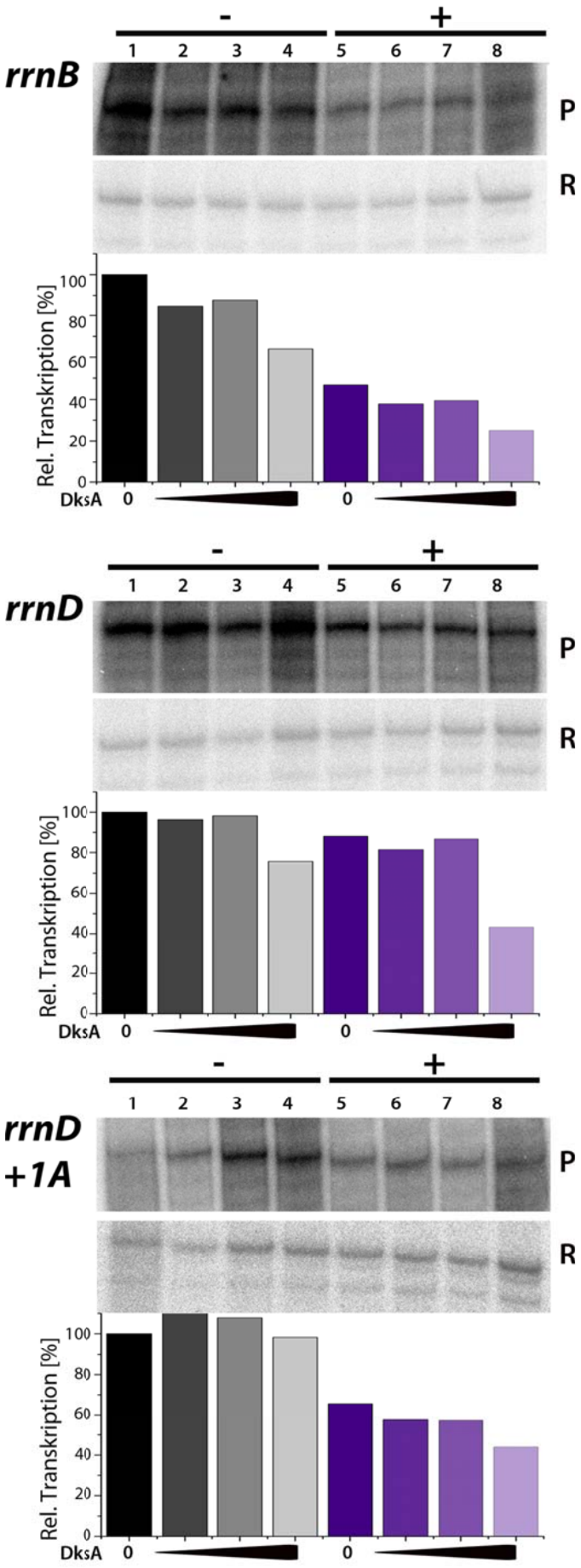


Abb. 4.1.3 Auswirkung erhöhter GTP-Konzentrationen auf stringent kontrollierte Promotoren
Gezeigt ist ein repräsentatives Autoradiogramm aus einer von drei durchgeführten *in vitro* Transkriptionen. Die aufgeführten *rrn*-Promotoren (P) wurden in Form von Plasmid-DNA als superhelikale Matrizen eingesetzt, welche zusätzlich den RNA1-Promotor aufwiesen (R). In Anwesenheit von 500 µM GTP wurden die jeweiligen Promotoraktivitäten in Abhängigkeit zu den Effektoren ppGpp und/oder DksA analysiert (+; violett bzw. -; grau: mit bzw. ohne ppGpp [300 µM], Konzentration DksA von dunkel nach hell (Spur 1 bis 4 bzw. 5 bis 8): 0 µM, 1 µM 2 µM und 4µM). Zur Analyse wurden die Transkripte gelelektrophoretisch aufgetrennt (10 %iges dPAA Gel) und densitometrisch detektiert. Die ermittelten Intensitäten der ribosomalen Transkripte wurden mit Hilfe der RNA1-Produkte normalisiert und in Relation zur effektorenunbehandelten Probe dargestellt (Kolmsee et al. 2011).

Transkriptionsverhalten der beiden getesteten *rrn* P1-Promotoren mit einem ATP als Transkriptionsstart. Wie in den vorherigen *in vitro* Transkriptionsanalysen (4.1.1 und 4.1.2) gezeigt, waren diese in Abwesenheit von ppGpp weitgehend nicht DksA-reguliert (graue Säulen). ppGpp hingegen wirkte sich auch in Abwesenheit von DksA weiterhin stark inhibitorisch auf die rRNA P1-Promotoraktivität aus. So konnte alleine durch die Zugabe von 300 µM ppGpp (dunkelviolette Säule, Spur 5) die Transkription des *rrnB* P1 bzw. des *rrnD +1A* P1-Promotors um ca. 40 % bis 50 % gesenkt werden. DksA konnte in den getesteten Konzentrationen diesen Effekt in Gegenwart von ppGpp noch steigern, so dass die Aktivität der Transkriptionen in diesen Fall auf ca. 20 % bis 50 % der ursprünglichen Aktivität abfiel. Die Quantifizierung der Transkripte erfolgte über Normalisierung der gemessenen Intensitäten der rRNA-Banden mit denen der RNA1-Promotorprodukte (untere Spalte Autoradiogrammausschnitt). Hierbei ist zu erwähnen, dass, wie oben beschrieben, DksA sich in hohen Konzentrationen (4 µM; Spur 4 bzw. 8) stellenweise aktivierend auf die Transkription des RNA1-Promotors wirkte.

4.1.4 Auswirkung erhöhter ATP-Konzentrationen auf die stringente Regulierung ribosomaler P1-Promotoren mit GTP bzw. ATP als Transkriptionsstart

Wie in 4.1.3 gezeigt werden konnte, kann die stringente Sensitivität des *rrnD* P1-Promotors durch Erhöhen des für die Transkription zur Verfügung stehenden GTP-Gehalts weitgehend aufgehoben werden. Die Sensitivität des *rrnB* P1- bzw. des *rrnD +1A* P1-Promotors auf ppGpp und DksA bleibt durch solch einen erhöhten GTP-Titer dahingegen völlig unbeeinflusst. Das Transkript dieser beiden Promotoren startet an der Position +1, im Gegensatz zu dem *rrnD* P1-Promotor, nicht mit einem GTP sondern mit einem ATP. Im Folgenden sollte daher sichergestellt werden, dass der durch Erhöhung der GTP-Konzentration hervorgerufene differentielle Effekt auf die getesteten Promotoren in der Verfügbarkeit des jeweiligen Transkriptstartnukleotids begründet ist. Hierzu wurde versucht durch Erhöhen der ATP-Konzentration (500 µM)

bei standardmäßiger GTP-Konzentration (65 µM) den oben beschriebenen Effekt umzukehren.

In den in Abbildung 4.1.4 dargestellten Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass die Umkehrung des ATP- zu GTP-Verhältnis aus 4.1.3 ebenfalls die Inversion des dort beschriebenen ppGpp-DksA-Effektes auf die ribosomale Transkription zur Folge hatte (obere Spalte Autoradiogrammausschnitt). Der in 4.1.3 als größtenteils stringent unreguliert charakterisierte *rrnD* P1-Promotor war unter diesen Bedingungen vergleichbar mit 4.1.1 reguliert. Wie unter *in vitro* Transkriptionstandardbedingungen hatte DksA ohne ppGpp kaum einen Effekt auf die gemessenen rRNA-Mengen (graue Säulen). Dahingegen wirkte sich die Zugabe von ppGpp, auch in Abwesenheit von DksA (Spur 5, dunkelviolette Säule), inhibierend auf die rRNA-Transkription aus (40 % geringer als die ppGpp-DksA-freie Probe). Die Zugabe von DksA wirkte sich in Gegenwart von ppGpp konzentrationsabhängig inhibierend auf die ribosomale Transkription des *rrnD* P1-Promotors aus (bis zu 80 % geringer aktiv).

Im Gegensatz dazu wurde die stringente Regulierung der beiden mit einem ATP startenden *rrn*-Promotoren durch die erhöhten ATP Konzentrationen nahezu aufgehoben. Weder durch Zugabe von DksA noch ppGpp konnte die Transkription des *rrnB* P1- bzw. des *rrnD +1A* P1-Promotors gedrosselt werden. Erst die Zugabe von 4 µM DksA in Anwesenheit von ppGpp, hatte eine Inhibierung der beiden Promotoren um ca. 60 % zur Folge.

Wie auch für die obigen *in vitro* Transkriptionen beschrieben, wirkte sich 4 µM DksA stellenweise aktivierend auf die Transkription des RNA1-Promotors aus (jeweils untere Spalte Autoradiogramm). Dieses Phänomen wird, wie oben erwähnt, im Diskusionsteil dieser Arbeit näher erörtert werden.

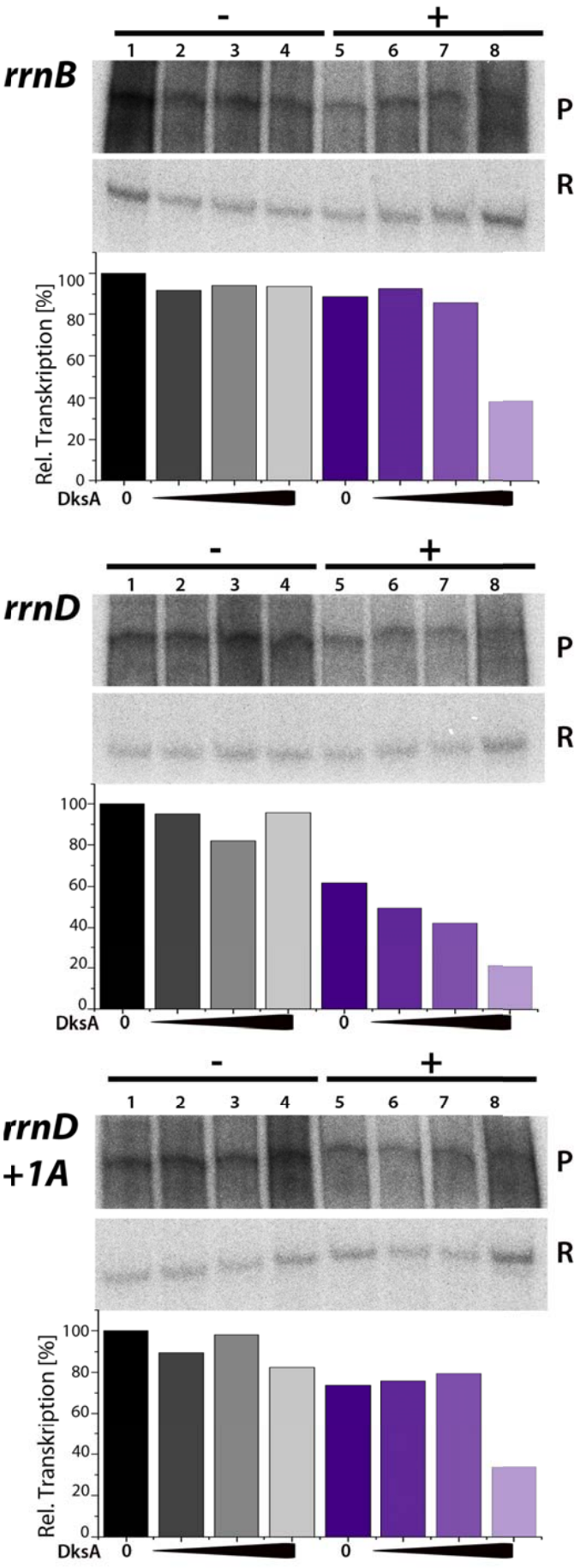


Abb. 4.1.4 Einfluss erhöhter ATP-Konzentrationen auf stringent kontrollierte Promotoren

Im Obigen abgebildet befindet sich repräsentativ das Ergebnis aus einer von drei durchgeführten *in vitro* Transkriptionen. Plasmid-DNA, welche neben dem Promotor für die RNA1(R) zusätzlich den *rrnB* P1-, den *rrnD* P1- oder den *rrnD* P1-Promotor mit einem Basenaustausch an der Stelle +1 A statt G trug (P), wurden in Gegenwart von 500 µM ATP als superhelikale Transkriptionsmatrize eingesetzt. Die Transkriptionen wurden in Gegenwart (+; violette Säulen, Spur 5 bis 8) oder in Abwesenheit (-; graue Säulen, Spur 1 bis 4) von ppGpp und/oder DksA durchgeführt. Während die gewählte ppGpp-Konzentration der betreffenden Proben konstant gehalten vorlag (300 µM), variierte der molare DksA-Gehalt der einzelnen Proben und ist durch einen Keil angedeutet (Spur 1 bis 4 bzw. 5 bis 8: 1; 2 und µM). Die Transkripte wurden auf einem 10 %igen dPAA-Gel aufgetrennt und mittels Autoradiogramm densitometrisch ausgewertet und quantifiziert. Die Produktintensitäten der ribosomalen Promotoren wurden gegen die Intensitäten der RNA1-Promotoren normalisiert und in Relation zur ppGpp- und DksA- unbehandelten Probe dargestellt.(Kolmsee et al. 2011)

4.2 Charakterisierung der ppGpp-Sensitivität der *E. coli* RNAP: Bedeutung der ω-Untereinheit für die Stringente Regulation ribosomaler Promotoren

Bei Prokaryoten findet die Regulation der Genexpression maßgeblich über Kontrollmechanismen auf Transkriptionsebene statt. Die Transkription von Genen in *E. coli* wird hierbei von einer aus sechs Untereinheiten bestehenden „multi-subunit"-RNA-Polymerase durchgeführt. Diese setzt sich aus zwei α- und je einer β-, β´-, σ- und einer ω-Untereinheit zusammen (Geszvain et al. 2004). Lange Zeit konnte trotz diverser Studien der ω-Untereinheit keine signifikante, funktionelle Rolle in der spezifischen RNAP-Aktivität zugeteilt werden. Die Deletion von ω aus *E.coli* RNAP hatte weder Einfluss auf die spezifische Aktivität noch auf die Interaktion der ω-deletierten RNAP mit Transkriptionsfaktoren. Daher wurde funktionale RNAP in vielen Studien standardmäßig durch *in vitro* Rekonstitutionen hergestellt, die die ω-Untereinheiten nicht berücksichtigten (Tang et al. 1995). Während die Arbeitsgruppe von Ishihama (Igarashi et al. 1989) zeigen konnte, dass RNA-Polymerasen nach Entfernen von ω *in vitro* an ppGpp-Sensitivität verliert, wurde zwei Jahre später von Gentry et al. Gegenteiliges berichtet. Die Arbeitsgruppe zeigte in ihrer Veröffentlichung von 1991, dass die rRNA-Transkription ω-defizienter Zellen nach Aminosäurenmangel unverändert stringent reguliert wird (Gentry et al. 1991). Vor einigen Jahren jedoch konnte der ω-Untereinheit eine direkte Beteiligung an der Stringenten Kontrolle ribosomaler Promotoren nachgewiesen werden (Ghosh et al. 2001, Mathew and Chatterji 2006, Chatterji et al. 2007). Darauf aufbauend konnte 2013 in *E. coli* eine ppGpp-RNAP-Bindestelle identifiziert werden, an der ω direkt beteiligt ist (Ross et al. 2013).

4.2.1 Retardierungsanalysen zur Bestimmung der Bedeutung der *E. coli* ω-Untereinheit für das Initiationsverhalten der RNAP an ausgesuchten Promotoren

Die in 4.2 beschriebenen Diskrepanzen der Bedeutung der *E. coli* ω-Untereinheit für die Transkription diverser Promotoren wurde in diesem Abschnitt mit Hilfe von

Retardierungsanalysen untersucht. Anhand dieser RNAP-Promotor-Bindestudien sollten Rückschlüsse auf die Bedeutung der ω-Untereinheit für das Initiationsverhalten der RNA-Polymerase an positiv bzw. negativ stringent regulierten, sowie nicht stringent regulierten Promotoren erzielt werden. Zur Analyse der Interaktionen an stringent positiv regulierten Promotoren wurde die Bindung der RNAP an dem *hisG*-Promotor gemessen. Als Beispiel für negativ regulierte Promotoren diente die RNAP-Bindung des *rrnB* P1-Promotors, während die Bindung des als nicht stringent reguliert geltenden *tac*-Promotors stellvertretend für stringent nichtregulierte Promotoren analysiert wurde.

Die Resultate der Analyse zur Beteiligung Omegas an der RNAP *tac*-Promotorbindung wurden in Abbildung 4.2.1.1 exemplarisch zusammengefasst. (A) zeigt das repräsentative Autoradiogramm aus einer von drei unabhängig voneinander durchgeführten Retardierungen. 100 nM wildtypische (WT) bzw. ω-deletierte (Δ ω) RNA-Polymerase (E), wurden jeweils in Abwesenheit (-) bzw. Anwesenheit (+) von 300 µM ppGpp (P) und/oder 2 µM DksA (D) zusammen mit ^{32}P-markierter *tac*-Promotor-DNA inkubiert und der Ansatz auf einem 5 %igem nativen PAA-Gel aufgetrennt. Die Intensitäten der autoradiographisch detektierten Gelbanden wurden quantifiziert und die Banden der *tac*-RNAP-Komplexe (grüner Pfeil Nr 1) in einem Diagramm prozentual zur gemessenen Gesamtintensität wiedergegeben (B). Als Gesamtintensität wurde hierbei lediglich die Summe aus der Intensität der ungebundenen *tac*-Fragmentbanden (dunkelblauer Pfeil) und der der *tac*-RNAP-Komplexbanden gewertet. Die Signale der mit dem grünen Pfeil Nr. 2 markierten Banden, welche sich in ihrem Verlauf als vergleichbar mit denen des grünen Pfeils Nr. 1 erwiesen, wurden demnach nicht in die Quantifizierung mit aufgenommen (siehe Diskussion). In allen drei durchgeführten Retardierungen verzeichneten die Effektoren ppGpp und DksA in den getesteten Konzentrationen und unabhängig davon, ob sie einzeln oder in Kombination mit dem Retardierungsansatz vorlagen, keinen deutlichen Effekt auf die *tac*-RNAP-Komplex Bildung. Weder bei der Wildtyp- noch bei der Δω-RNAP konnte ein deutlich verändertes, effektorabhängiges Bindeverhalten der beiden Polymerasen an dem *tac*-Promotor verzeichnet werden. Die Messungen der *tac*-RNAP-Bindungseffizienz ergaben nach Quantifizierungen innerhalb eines Experiments, durchschnittlich eine Streuung von ca. 10 %. Varianzen dieser Größenordnung innerhalb eines Experimentes waren in allen drei Retardierungen

unabhängig von ppGpp und DksA und verfolgten demnach keinen echten Trend. Allerdings ist zu erwähnen, dass lediglich in einer der drei durchgeführten *tac*-Bindeanalysen oben erwähnte Varianz in Anwesenheit von DksA zu einem Einbruch der Komplexbildung innerhalb der beschriebenen 10 % führte. In den anderen beiden Messungen hatte DksA, ω unabhängig, einen eher leicht aktivierenden Effekt auf die *tac*-Promotorbindung. Dieser Effekt war zu erwarten. Da aber in späteren Analysen der *tac*-Promotor als interner Standard dienen sollte, musste sichergestellt werden, dass er sich unter den verwendeten Bidungungen nicht abweichend verhält (siehe 4.1, RNA1-Promotor).

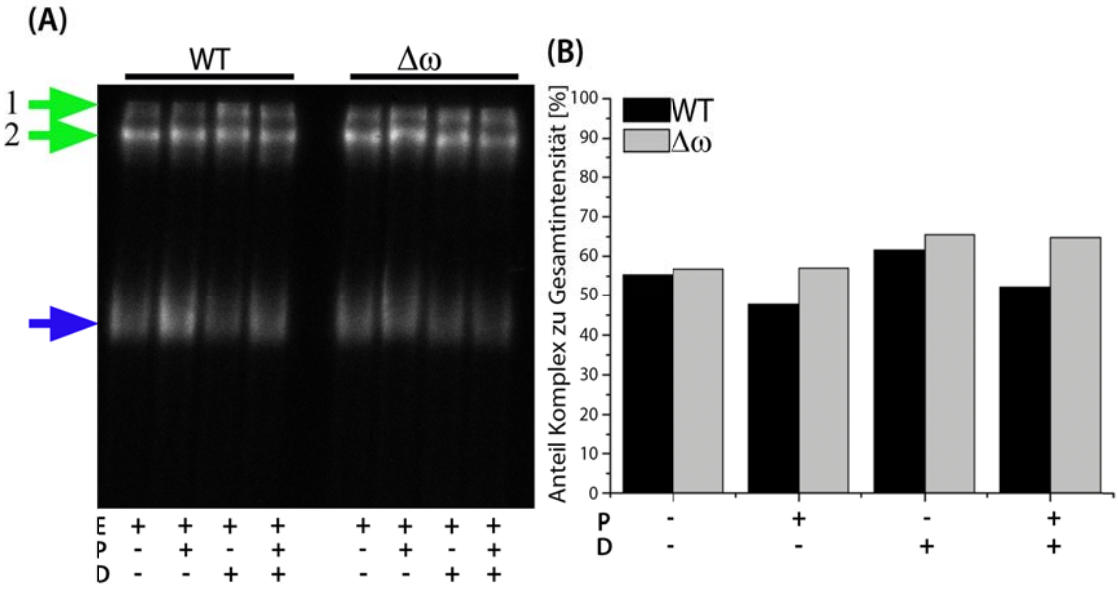


Abb. 4.2.1.1 Einfluss von ppGpp und/oder DksA auf die *tac*-Promotorbindung wildtypischer bzw. ω-deletierter RNAP
Gezeigt ist ein repräsentatives Autoradiogramm resultierend aus einer von drei unabhängig voneinander durchgeführten Gelretardierungen **(A)**. ^{32}P-markierte *tac*-Fragment-DNA (dunkelblauer Pfeil) wurde, wie in der Abbildung angegeben, entweder mit wildtypischer RNAP oder mit einer ω-deletierten RNAP (Enzyme E) zusammen inkubiert. Das Bindeverhalten der jeweilig getesteten RNAP mit dem eingesetzten Fragment wurde in Ab- bzw. Anwesenheit (-/+) von 300 µM ppGpp (P) und/oder 2 µM DksA (D) getestet. Die resultierenden Komplexe sind auf einem 5 %igen nativen PAA-Gel aufgetrennt worden und mit einem grünen Pfeilen (1 bzw. 2) gekennzeichnet. **(B)** Die Signalintensitäten der in (A) mit dem grünen Pfeil Nr.2 dokumentierten Komplexe wurden densitometrisch ausgewertet und als prozentualer Anteil der Gesamtintensität (Summe Intensität freie DNA und Komplex) graphisch dargestellt. Die Intensitäten der *tac*-Komplexe mit der wildtypischen RNAP wurden innerhalb des Diagramms als schwarze Säulen dargestellt. Die Säulen spiegeln die Intensitäten der gemessenen Banden der ω-deletierten RNAP Komplexe mit dem *tac*-Promotor wider.

Nachdem sich, wie oben gezeigt, die An- bzw. Abwesenheit der *E. coli* RNAP ω-Untereinheit weder unter stringenten noch unter nicht stringenten Bedingungen auf die Erkennung des *tac*-Promotors auswirkt, wurde in weiteren Untersuchungen, die Beteiligung von ω an der Bindung des stringent positiv regulierten *hisG*-Promotors analysiert. Ebenso, wie obig für die *tac*-Promotor-Bindeanalyse beschrieben, wurde hierbei der ω-Einfluss auf die Promotorbindung durch 100 nM WT- bzw. Δω-RNAP (E) in Abhängigkeit zu den stringenten Effektoren ppGpp (300 µM) und DksA (2 µM) gemessen. Die Bindeansätze wurden wie oben auf einem 5 %igen nativen PAA-Gel aufgetrennt, densitometrisch ausgewertet und, wie in der Abbildung 4.2.1.2. dargestellt, analysiert. Stellvertretend gezeigt ist das Ergebnis einer von drei unabhängig durchgeführten Retardierungen, welche alle den gleichen Trend verzeichneten. Die aufgetrennten Gelbanden wurden im Abbildungsteil (A) als Autoradiogramm dargestellt. Mit Hilfe des dunkelblauen Pfeils wurde die Position des nicht gebundenen ^{32}P-markierten *hisG*-Promotor-DNA-Fragments in der Abbildung indiziert, während die Laufhöhe der jeweiligen Promotor-RNAP-Komplexe durch einen grünen Pfeil angezeigt wurde. Mit Plus (+) bzw. Minus (-) wurde die Supplementierung der Ansätze z.B. durch ppGpp (P) und/oder DksA (D) bzw. die Abwesenheit der Effektore in den Ansätze angezeigt.

Zur quantitativen Auswertung der in (A) dargestellten Banden wurden die Intensitäten der jeweiligen Komplexbanden im Abbildungsteil (B) in Relation zur Summe der Intensitäten aus Komplexbande und der dazugehörigen Bande des nicht gebundenen *hisG*-Fragments gesetzt.

Vergleichbar mit den in den *tac*-Promotor-Bindeanalysen beschriebenen Ergebnissen, waren keine reproduzierbaren Unterschiede im Intensitätsverlauf der *hisG*-Komplexbanden in Abhängigkeit zur ω-Untereinheit zu verzeichnen. Jedoch war das Interaktionsverhalten der beiden RNAP-Spezies an dem *hisG*-Promotor im Gegensatz zur *tac*-Promotorsituation, stark durch DksA beeinflusst. Während ppGpp in der eingesetzten Konzentration in Abwesenheit von DksA kaum einen Einfluss auf die *hisG*-Promotorkomplexierung durch die RNA-Polymerasen hatte (hier eine Reduzierung der Komplexmenge um 11 % in der WT bzw. 10 % in der Δω-Situation), wirkte sich DksA deutlich komplexfördernd auf den *hisG*-Promotor aus. In Abwesenheit von ppGpp bedingte die Supplementierung durch 2 µM DksA einen 45 %igen Anstieg in der Komplexbildung mit der Wildtyp-RNA-Polymerase. Die Menge

an gebildeten Promotor-Δω-RNAP-Komplexen steigerte sich durch die eingesetzten Mengen an DksA um ca. 35 %. Der beschriebene DksA-Effekt, konnte durch 300 µM ppGpp auf Retardierungsebene nicht signifikant beeinflusst werden. Während ppGpp sich in diesem Fall bei der Bindung wildtypischer RNAP an dem *hisG*-Promotor schwach reprimierend auswirkte (Abnahme der DksA-induzierten Komplexe um 12 %), nahm die Komplexbildung in den obigen Δω-RNAP-Ansätzen in Gegenwart von DksA und ppGpp um 6 % zu.

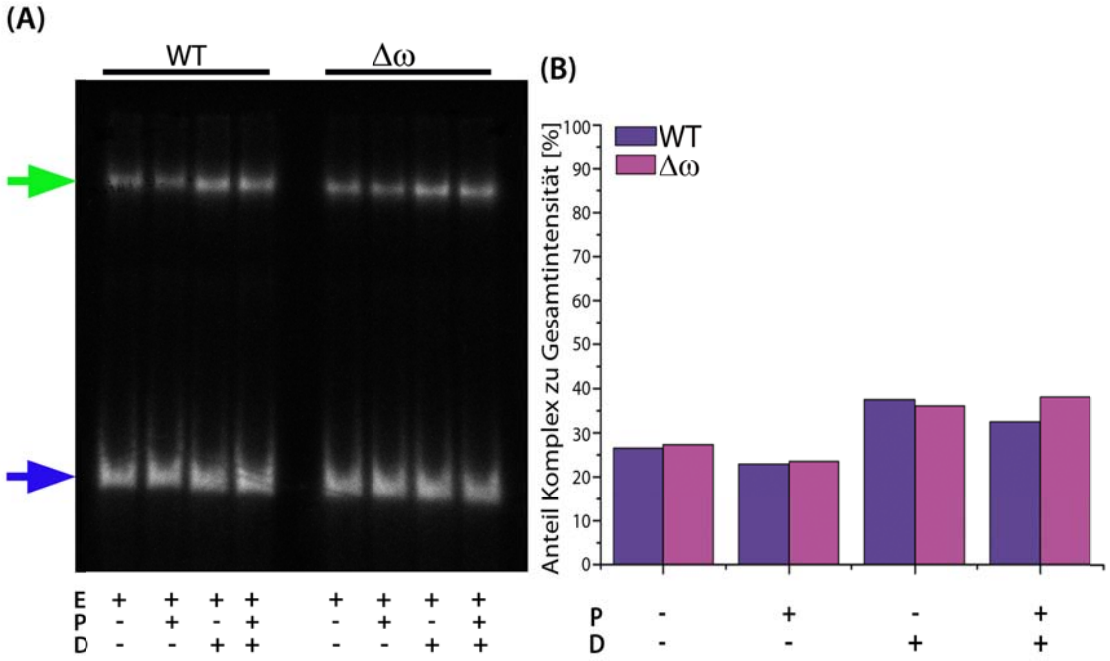


Abb. 4.2.1.2 Bindung des *hisG*-Promotorfragments durch wildtypische und ω-deletierte RNAP in Anwesenheit und Abwesenheit der Effektoren ppGpp [300 µM] und DksA [2 µM]

^{32}P-markierte DNA, welche die Promotorsequenz des *hisG*-Promotors beinhaltete (dunkelblauer Pfeil), wurde in drei unabhängig voneinander durchgeführten Ansätzen mit Wildtyp- bzw. einer ω-deletierten RNAP-Mutante (Enzyme E) inkubiert. Das Reaktionsprodukt wurde auf einem 5 %igen nativen PAA-Gel aufgetrennt und auf einem Autoradiogramm detektiert **(A)**.Die RNAP-*hisG*-Bindung wurde im Hinblick auf ihre ppGpp [300 µM](P)- und DksA [2 µM] (D)-Sensitivität untersucht. „-“ bzw. „+“ indizieren in der Abbildung die Ab- bzw. Anwesenheit der Effektoren. Die Menge der gebildeten Komplexe, gemessen an der Signalintensität der zugeordneten Banden (grüner Pfeil), wurde quantifiziert und in einem Diagramm dargestellt **(B).** Die Graphen zeigen die Menge des gebildeten Komplexes als prozentualen Anteil der Komplexsignalintensität (grüner Pfeil) über die gemessenen Gesamtintensitäten (Summe Signale freier DNA und Komplexe). Es wurden jeweils drei unabhängig voneinander durchgeführte Retardierungen durchgeführt, von denen eine repräsentativ dargestellt ist (violette Säulen: Komplexe der WT-RNAP; magentafarbene Säulen: Komplexe der Δω-RNAP).

Zur Analyse einer potentiellen Beteiligung der RNAP ω-Untereinheit an der Stringenten Kontrolle negativ stringent regulierter Promotoren wurde im nächsten Schritt exemplarisch und nach obigem Beispiel die Bindeaktivität der beiden analysierten RNAP-Spezies an dem *rrnB* P1-Promotor untersucht. Das Autoradiogramm einer aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Retardierungen mit vergleichbarem Verlauf wurde in Abbildung 4.2.1.3 (A) dargestellt. Die dargestellten Banden der freien ^{32}P-markierten P1-Promotor-DNA (dunkelblauer Pfeil) und der Komplexe aus Promotorfragment und 100 nM WT- bzw. Δω- RNAP (grüner Pfeil Nr. 3) wurden auf einem 5 %igen nativen PAA-Gel aufgetrennt. Zusätzlich wurden auf diesem Wege weitere Komplexe identifiziert (grüner Pfeil Nr. 1; 2; 4 und 5). In der Darstellung wurde darauf geachtet, dass Art und Farbgebung dieser Pfeile auf die Vergleichbarkeit der Reaktionen der betroffenen Bandenintensitäten unter dem Einfluss von ppGpp und DksA widerspiegeln (siehe unten und Diskussion). Durch „+“ bzw. „-“ wurde die An- bzw. Abwesenheit der Effektoren ppGpp (300 µM) und DksA (2 µM) beschrieben. Desweiteren wurden sie zur Indizierung der An- bzw. Abwesenheit des Polymerasenzyms (E) unabhängig ihres ω-Gehalts verwendet.

Bei denen mit einem grünen Pfeil im dargestellten Autoradiogramm markierten Banden 3 und 4 der wildtypischen RNAP-Ansätze konnte ein deutlicher Effekt von ppGpp und DksA auf die Bandenintensitäten verzeichnet werden. So erschienen diese Banden nach der Zugabe von 300 µM ppGpp im Vergleich zu der Effektorunbehandelten weniger intensiv. Während durch die alleinige Gegenwart von DksA in den getesteten Konzentrationen kein Einfluss auf die ursprüngliche Komplexbandenintesität verzeichnet werden konnte, konnte der für die ppGpp-beinhaltenden Proben beschriebene Effekt durch die Supplementierung des Ansatzes mit DksA in Gegenwart von ppGpp zusätzlich gesteigert werden. Die Analyse der Komplexe (grüner Pfeil Nr. 3 und 4) in den ω-deletierten RNAP-Ansätzen verfolgten einen ähnlichen Trend, der sich jedoch in einem Aspekt deutlich von den Banden der gleichbehandelten wildtypischen Ansätze unterschied. Während 2 µM DksA ohne ppGpp, vergleichbar mit der Wildtypsituation, keinen Einfluss auf die Intensität besagter Banden nehmen konnte, wirkten sich DksA zusammen mit ppGpp ebenfalls WT-vergleichbar, stark inhibierend auf diese Banden aus. Hervorzuheben ist jedoch, dass anders als bei der Wildtyp-RNAP die bloße Zugabe von 300 µM ppGpp vor

DksA-freiem Hintergrund keinerlei Effekt auf die Komplexbildung der Δω-RNAP mit dem *rrnB* P1-Promotor ausüben konnte.
Der oben beschriebene charakteristische Verlauf der mit grünen Pfeilen (Nr. 3 und 4) gekennzeichneten Banden, ließ sich stellenweise auch auf die Banden der Laufhöhe des Pfeils Nr 2 übertragen. Auch bei diesen Banden übte sich ppGpp in den Wildtypansätzen inhibierend auf die *rrnB* P1-Bindung aus, während die eingesetzten DksA-Mengen kaum einen Einfluss auf diese Bindung hatten. Ebenso zeigten sich die vergleichbaren Banden der ω-freien Bindeansätze auch hier in Abwesenheit von DksA nicht ppGpp-sensitiv und umgekehrt. Allerdings unterschieden sich die Banden des Pfeils Nr. 2 beider RNAP-Spezies deutlich in ihrer ppGpp- mit DksA-Sensitivität von den Komplexen (Nr. 3 und 4). Während diese, wie oben beschrieben, unabhängig von ω in Anwesenheit von ppGpp und DksA stark inhibiert wurden, ließ sich der Effekt von ppGpp in den markierten Komplexen Nr. 2 durch die Zugabe von DksA nicht steigern, so dass in den ω-deletierten Ansätzen keine Aussage darüber getroffen werden konnte, ob diese überhaupt einer stringenten Regulation folgten (siehe 4.2.2 und Diskussion).

Die Banden auf Laufhöhe von Komplex Nr. 1 erinnerten an die gleichfarbig markierten Banden der *tac*-Promotor-Bindeanalysen (siehe Abbildung 4.2.1.1 (A)) und spiegelten auch in dieser Analyse den Intensitätsverlauf der ppGpp-DksA-sensitiven Komplexbanden wider. Abschließend ist eine schwach auftretende Bande in den Ansätzen der Δω-RNAP-Proben zu erwähnen. Diese trat unregelmäßig in DksA-beinhaltenden Proben auf und wurde in der Abbildung durch den grünen Pfeil Nr. 5 hervorgehoben.

Aufgrund der Beobachtung, dass die mit Nr. 3 bezeichneten Komplexe in den WT-Ansätzen eine für negativ stringent regulierte Promotoren typische Reaktion auf ppGpp und DksA zeigten und aufbauend auf weiterführenden Analysen der oben beschriebenen Komplexe 1 bis 5 (siehe 4.2.2.), wurden die Komplexe Nr. 3 zur tiefergehenden Analyse densitometrisch ausgewertet. Die Komplexmengen sind in Abb. 4.2.1.3 (B) als prozentualer Anteil der Summe aus Intensität des Komplex (grüner Pfeil Nr. 3) und der Intensität der ungebundenen *rrnB* P1-Promotor-DNA (dunkelblauer Pfeil) graphisch dargestellt.

Die Quantifizierung der Komplexbanden spiegelt die oben beschriebenen Intensitätsverläufe deutlich wider. Die gebildete Komplexmenge aus WT-RNAP und *rrnB* P1-Promotor verzeichnete nach der Zugabe von 300 µM ppGpp in Abwesenheit von DksA einen Einbruch um ca. 40 % in Relation zur effektorunbehandelten Probe. Im Gegensatz dazu blieb die Menge der gebildeten Komplexe nach Zugabe von 2 µM DksA unverändert (Abnahme der gebildeten Komplexe um ca. 8 %). Durch die Zugabe beider Effektoren konnte die Bildung der oben genannten Wildtypkomplexe in Relation zur ursprünglichen Situation um ca. 60 % minimiert werden. Die Komplexe der ω-deletierten RNAP und dem *rrnB* P1-Promotor blieben in den Reaktionsansätzen mit isoliert voneinander zugegebenen Effektoren in Relation zum effektorfreien Ansatz nahezu unverändert (Zunahme der Komplexmenge nach ppGpp-Zugabe um ca. 11 % bzw. um 7 % nach DksA-Zugabe). Dahingegen führte die Sublimierung der Ansätze durch ppGpp und DksA in den getesteten Konzentrationen und in Relation zur effektorfreien Probe zu einer Abnahme der Bandenintensität um ca. 52 %.

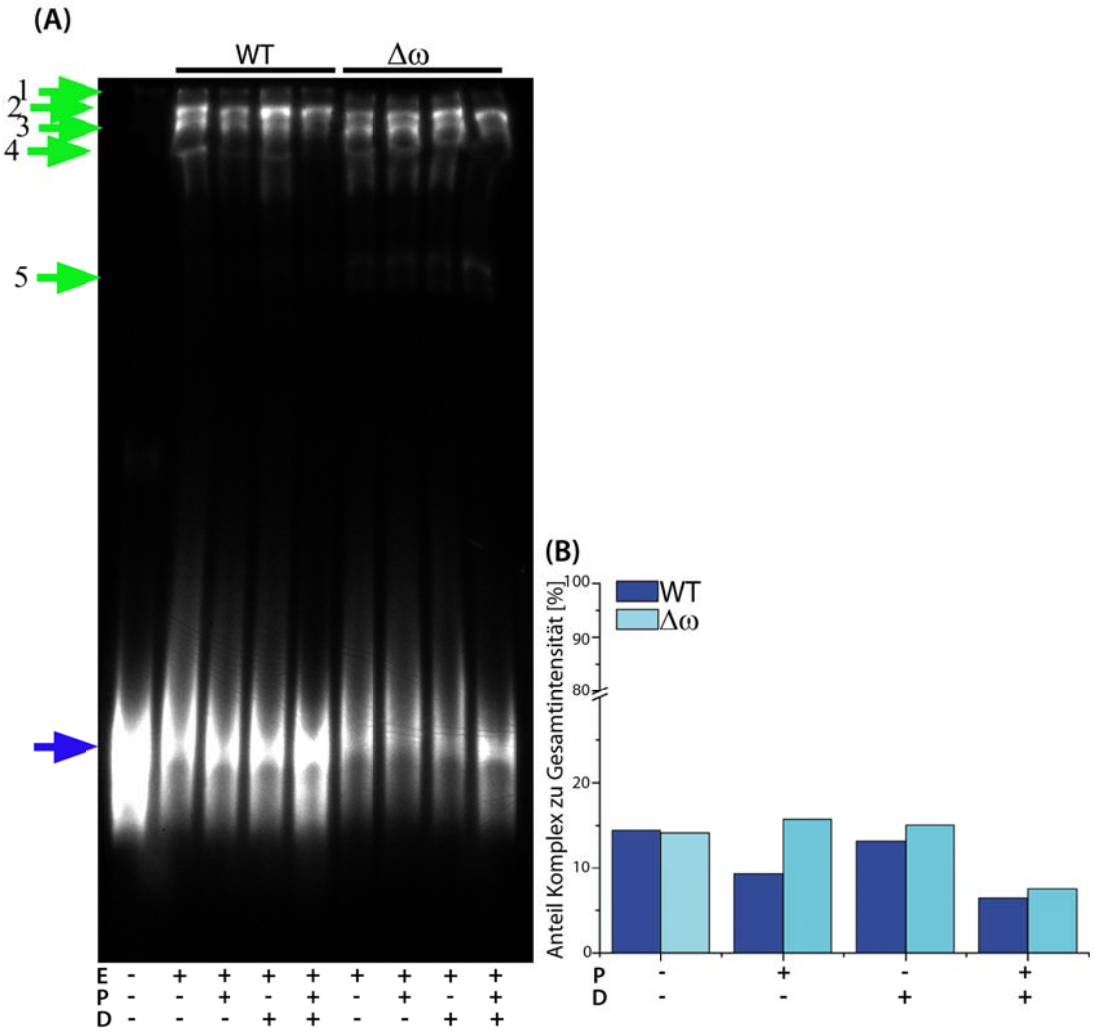


Abb. 4.2.1.3 Analyse der *rrnB* P1-Promotor Bindesensitivität wildtypischer und ω-deletierter RNAP unter dem Einfluss der Effektoren ppGpp [300 µM] und DksA [2 µM]
Obig zusammengefasst ist das repräsentative Ergebnis einer aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Retardierungen. **(A)** zeigt das Autoradiogramm eines 5 %igen nativen PAA-Gels. Die *rrnB* P1 enthaltende ^{32}P-markierte DNA (dunkelblauer Pfeil) wurde entweder mit wildtypischer oder ω-deletierter RNAP (Enzyme E) zusammen inkubiert. Die Fragment-Polymerase-Interaktionen wurden in Abwesenheit (-) bzw. in Anwesenheit (+) von 300 µM ppGpp (P) bzw. 2 µM DksA (D) analysiert. Anschließend wurden die resultierenden Komplexe (grüner Pfeil Nr 1 bis 5,) gelelektrophoretisch aufgetrennt, densitometrisch analysiert und wie in **(B)** dargestellt quantifiziert. Graphisch abgebildet ist die Intensität des Komplexes „grüner Pfeil Nr. 3“ als prozentualer Anteil der Gesamtintensität (Summe Intensität freie DNA und Komplexe). Die gemessenen Intensitäten wiedergegeben als dunkelblaue Balken entsprechen den Komplexbanden aus WT-RNAP und P1-Promotor, während die hellblauen die Komplexbildung der Deletionsmutante widerspiegeln.

4.2.2 Analyse und Charakterisierung der in 4.2.1.3 dargestellten, vermindert stringent regulierten RNA-Polymerase-*rrnB* P1-Promotorkomplexe

Wie in 4.2.1.3 beschrieben, ergaben Retardierungen mit den in dieser Arbeit erstellten und verwendeten *rrnB* P1-Fragmenten neben den ppGpp-DksA-sensitiven Komplexen, auch diverse, möglicherweise unspezifische RNAP-*rrnB* P1-Promotor-Komplexe, die sich in ihrer stringenten Regulierbarkeit von der Regulierbarkeit der spezifischen Komplexe unterscheiden ließen. Grundlegendes Prinzip einer Retardierungen ist die aus einer Komplexbildung resultierenden Absenkung der Mobilität. Die Bindung der RNAP an Promotor-DNA erfolgt hierbei über charakteristische Intermediate in festgelegter Reihenfolge. Diese beinhalten die ersten Schritte der Transkriptionsinitiation wie die Bindung der Polymerase an den Promotor, resultierend in dem sogenannten geschlossenen Komplex und das RNAP induzierte Aufschmelzen der DNA-Helix im Promotorbereich. *E. coli* Promotoren bilden im Allgemeinen sehr stabile offene Komplexe mit der RNAP aus. Diese zeichnen sich häufig in Relation zu den geschlossenen Promotorkomplexen durch eine deutlich erhöhte Komplexstabilität aus. Im Gegensatz zu dem geschlossenen Komplex sind offene Komplexe in der Regel salz- und heparinresistent. Eine Ausnahme bilden hierbei die binären offenen Komplexe der ribosomalen Promotoren in *E. coli*. Der *E. coli rrnB* P1-Promotor ist zum Beispiel sehr instabil und zerfällt unter Hochsalzbedingung oder in Gegenwart des polyanionischen Kompetitors Heparin. Durch Zugabe der ersten beiden Startnukleotide, entsprechend der Promotor-5´-Transkriptionssequenz (in diesem Fall: Position +1 ATP und +2 CTP), bildet der sonst instabile *rrnB* P1, heparin- und salzresistente binäre offene RNA-Polymerasekomplexe aus (Gourse 1988).

Um die in der Abbildung 4.2.1.3 mit dem grünen Pfeil Nr. 2 markierten, bedingt stringent regulierten Banden näher zu charakterisieren und, um die Banden der Laufhöhe grüner Pfeil Nr. 1 bzw. 2 als spezifische *rrnB* P1-RNAP-Komplexe zu identifizieren, wurden diesbezüglich weiterführende Retardierungsanalysen durchgeführt.

Hierzu wurde die Bindung von 100 nM WT-RNAP-Holo-Enzym (Holo) in An- bzw. Abwesenheit der beiden *rrnB* P1-Startnukleotide ATP und CTP unter dem Einfluss von 300 µM ppGpp und/oder 2 µM DksA in einem Retardierungsansatz untersucht.

Die Stabilität der gebildeten offenen Komplexe wurde durch Gegenwart von 1x bzw. 2x vorliegendem Heparin getestet.
Weiterhin sollte ausgeschlossen werden, dass die oben beschriebenen unspezifischen Banden auf eine unerwartete Promotorbindung von Core-Enzymen nach Sigmadissoziation zurückzuführen waren (siehe 1.2.1 und 1.2.5). Wie in der Einleitung geschildert, ist es der Core-RNAP nicht möglich, DNA in spezifischer Weise zu binden. Es wäre jedoch denkbar gewesen, dass die unspezifischen Banden, dem Reaktionsansatz verschuldet, aus einer artifiziellen Core-Bindung resultierten. Daher wurden in einem zusätzlichen Ansatz eine potentielle Promotor-RNAP Core-Enzym-Interaktion in Gegenwart beider Startnukleotide und unter dem Einfluss der stringenten Effektoren getestet. Die Retardierungsansätze wurden auf einem 5 %igen PAA-Gel aufgetrennt. Das Ergebnis der Analysen wurde in einem Autoradiogramm detektiert und in Abbildung 4.2.2. dargestellt. Die An- bzw. Abwesenheit der Effektoren ppGpp (P) und DksA (D), sowie die des Polymeraseenzyms (E) wurde durch „+“ bzw. „-“ indiziert.

Wie die Abbildung 4.2.2. verdeutlicht, konnte in den Ansätzen, in denen Holo-RNAP zusammen mit den ersten beiden Startnukleotiden vorlag, das in Abb. 4.2.1.3 gezeigte Komplexbandenbild validiert werden. Sowohl in Gegenwart von 1x als auch in den Ansätzen mit 2x vorliegendem Heparin, konnten in Anwesenheit von ATP und CTP vier Holo-RNAP- *rrnB* P1-Promotorkomplexen aufgetrennt werden. Die unteren beiden Komplexe (grüner Pfeil 1 & 2) zeigten sich, wie für 4.2.1.3 beschrieben, deutlich stringent reguliert. Ebenfalls im Einklang mit den Ergebnissen der vorherig beschriebenen *rrnB* P1-Retardierungen hatte die Zugabe der stringenten Effektoren kaum Einfluss auf die Intensität der beiden darüber liegenden Komplexbanden (Laufhöhe Pfeile Nr. 1 und 2). In den Ansätzen, in denen das Holo-Enzym Startnukleotid-limitiert vorlag (nur ATP bzw. weder ATP noch CTP), ließen sich lediglich die Banden der Laufhöhe der Pfeile Nr. 1 und 2 detektieren. Diese zeigten sich auch in Abwesenheit von CTP bzw. CTP und ATP als weiterhin nicht stringent reguliert. In den Retardierungsansätzen, in denen die *rrnB* P1-Bindung durch RNAP-Core-Enzym analysiert wurde, konnte keiner der vier vorherig beschriebenen Komplexe nachgewiesen werden. Stattdessen wurden in diesen Proben schwache, ppGpp-DksA-unabhängige Banden identifiziert, deren Laufhöhe sich nur mit den schwachen Banden aus der enzymfreien Probe (E-) vergleichen ließ (Komplex Pfeil

Nr. 5 und 6). Die Tatsache, dass die Komplexe 5 und 6 ausschließlich in den Core-RNAP und den RNAP-freien Ansätzen zu beobachten sind, ist ein klares Indiz dafür, dass eine Bindung durch das Core-Enzym nicht stattgefunden hat.

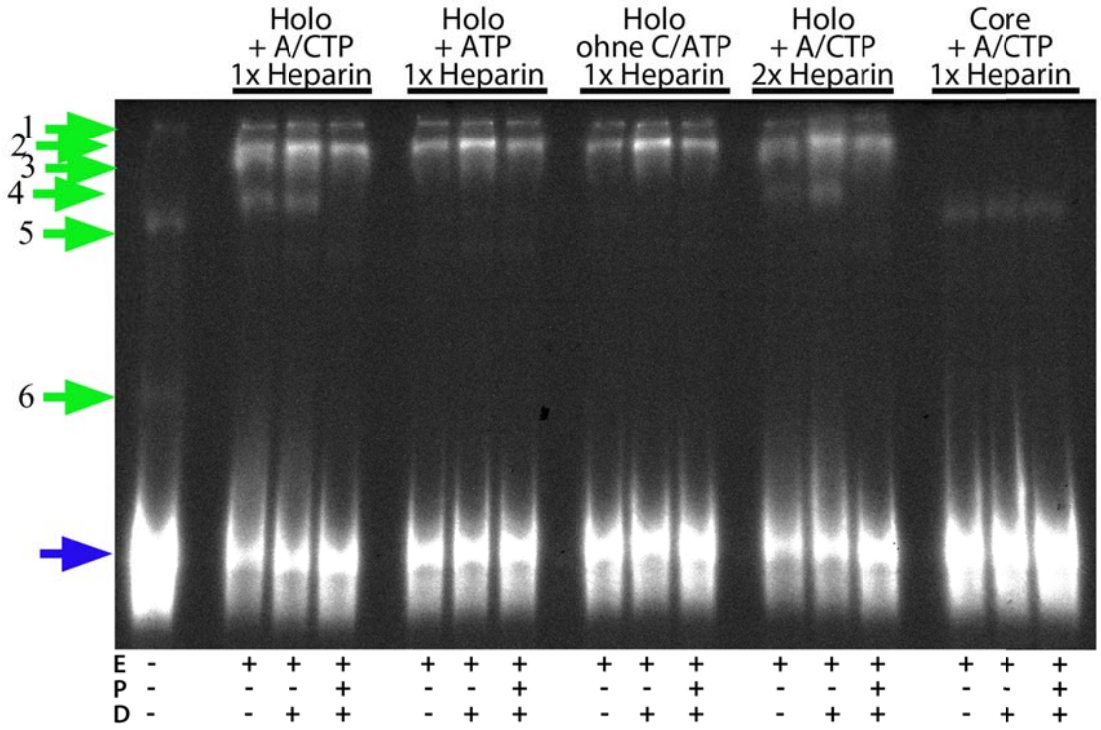


Abb. 4.2.2. Identifizierung und Charakterisierung verschiedener *rrnB* P1-Promotor-RNAP-Komplexe anhand ihrer ppGpp- und DksA-Sensitivität, sowie ihrer Abhängigkeit zu den +1 und +2 Startnukelotiden.
Dargestellt ist ein Autoradiogramm einer Retardierung zur Identifizierung und Charakterisierung der unterschiedlichen *rrnB* P1-RNAP-Komplexe. Wildtyp-Holo bzw Core-RNAP (E) wurde zusammen mit ^{32}P-markierter *rrnB* P1-Promotorfragment-DNA (dunkelblauer Pfeil) in An- bzw. Abwesenheit der +1A und +2C Startnukleotide inkubiert. Die resultierenden Komplexe wurden in auf ihrer Sensitivität gegenüber Heparin (50 bzw 100 ng/µl final concentration (f.c.)), DksA [2µM] und ihrer Sensitivität gegenüber 2µM DksA in Gegenwart von 300 µM ppGpp hin analysiert. Hierzu wurden die Komplexe auf einem 5 %igen nativen PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mit grünen Pfeilen von 1 bis 6 gekennzeichnet. „+“ bzw. „-“ Zeichen indizieren die An- bzw. Abwesenheit der bezüglichen Komponenten.

4.2.3 KD-Wert-Analysen des Einflusses der stringenten Effektoren auf die Bildung der RNAP-Promotorkomplexe: Quantitative Bestimmung der *hisG*-, *rrnB* P1- bzw. *tac*-Promotoren in Abhängigkeit zur ω-Untereinheit mittels Oberflächen-Plasmonen-Resonanz (SPR)

Wie in Kapitel 4.2.1 gezeigt werden konnte, wirkt sich die ω-Untereinheit der *E. coli* RNA-Polymerase unterschiedlich auf die RNAP-Bindung verschiedener Promotoren aus. Zur tiefergehenden Analyse sollte dieser Einfluss über die Bestimmung der KD-Werte mittels BiaCore-Analyse näher charakterisiert werden. Hierzu wurden 5´ biotinylierte, linearisierte PCR-Fragmente der drei oben analysierten Promotoren generiert und wie in 3.3.5.1 beschrieben auf einem Streptavidin-Chip (SA-Chip) immobilisiert. In jeweils drei unabhängigen Versuchsabläufen wurde WT- bzw. Δω-RNAP in Gegenwart bzw. Abwesenheit von 300 µM ppGpp und/oder 2 µM DksA über die immobilisierten Promotoren gegeben. Der genaue Ablauf sowie die in dieser Arbeit etablierten Versuchsbedingungen sind in 3.3.5.2 ausführlich geschildert.
Unter den getesteten Bedingungen konnte für die Bildung der offenen *tac*-Promotor-RNAP-Komplexe ein KD von 10^{-9} bis 10^{-10} M bestimmt werden. Diese Bindungskonstante zeigte sich weder durch Omega, noch durch die Zugabe der Effektoren ppGpp und DksA beeinflusst. In Abwesenheit von DksA lag der KD der *hisG*-Komplexe ppGpp-unabhängig zwischen 10^{-7} und 10^{-9} M, in der WT- bzw. zwischen 10^{-6} und 10^{-8} M in der Δω Situation. Durch die alleinige Zugabe von DksA konnte dieser KD, ppGpp unabhängig, auf 10^{-9} bis 10^{-10} M (WT) bzw. auf 10^{-8} bis 10^{-9} M (Δω) gesenkt werden. Die kombinierte Zugabe von DksA zusammen mit ppGpp, konnte den obig für DksA beschriebenen Effekt auf die *hisG*-Komplexbildung unabhängig von ω zusätzlich steigern (siehe Abb. 4.2.3). Während sich die offenen P1-RNAP-Komplexe in der Abwesenheit der beiden stringenten Effektoren, wildtypisch bzw. ω-deletiert bei einem KD zwischen 10^{-8} und 10^{-9} M bzw. 10^{-7} und 10^{-8} M bildeten, konnte der KD der in Anwesenheit von ω gebildeten Komplexe durch die Zugabe von ppGpp in Abwesenheit von DksA auf 10^{-4} bis 10^{-3} M gesteigert werden. In Abwesenheit der ω-Untereinheit konnte kein vergleichbarer Effekt auf die RNAP-P1-Komplexbildung beobachtet werden. Desweiteren konnten durch die Zugabe von DksA in Abwesenheit von ppGpp die KD-Werte der offenen P1-Komplexe unabhängig von der Präsenz der ω-Untereinheit nicht beeinflusst werden. Es sei betont, dass es unter den getesteten Bedingungen nicht möglich war, quantitative

Beobachtungen über die Auswirkung von ppGpp in Anwesenheit von DksA auf die P1-RNAP-Komplexbildung anzustellen. Unter diesen Bedingungen waren die gebildeten Komplexe laut BiaCore kaum stabiler als der Hintergrund.

In der unten aufgeführten Abbildung 4.2.3 finden sich die oben beschriebenen Verläufe der jeweiligen KD-Werte graphisch dargestellt. Y-koordiniert aufgetragen wurden hierbei nicht die quantifizierten absoluten KD-Werte, sondern die KD Werte der einzelnen Proben (RU= relative units) in Relation zu den KD-Werten der jeweilig gleich behandelten *tac*-Promotor-Komplexen. Bei den dargestellten Koordinaten handelt es sich um den Mittelwert samt Standardabweichung aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Es wurde deutlich, dass DksA ohne ppGpp den KD-Wert der *hisG*-Promotor-Komplexe im Gegensatz zu denen der *tac*-Promotor-Komplexe durchschnittlich um das ca. 3-fache (WT) bzw. 5-fache (Δω) senken konnte. ppGpp zusammen mit DksA verringerte den durchschnittlichen KD um das ca. 7,5-fache in Gegenwart bzw. 9-fache in Abwesenheit von ω. Die beschriebenen KD-Werte der offenen P1-Promotor-Komplexe zeigten sich in Gegenwart von ω, durch die Zugabe von ppGpp und nach Normalisierung über *tac* als 100-fach erhöht. Wie oben beschrieben, war dieser Effekt ω-abhängig und somit in den Komplexen der deletierten RNAP nicht zu beobachten. Beispiele der aus den Messungen resultierenden Kurvenverläufe sind in dieser Arbeit zusammengefasst.

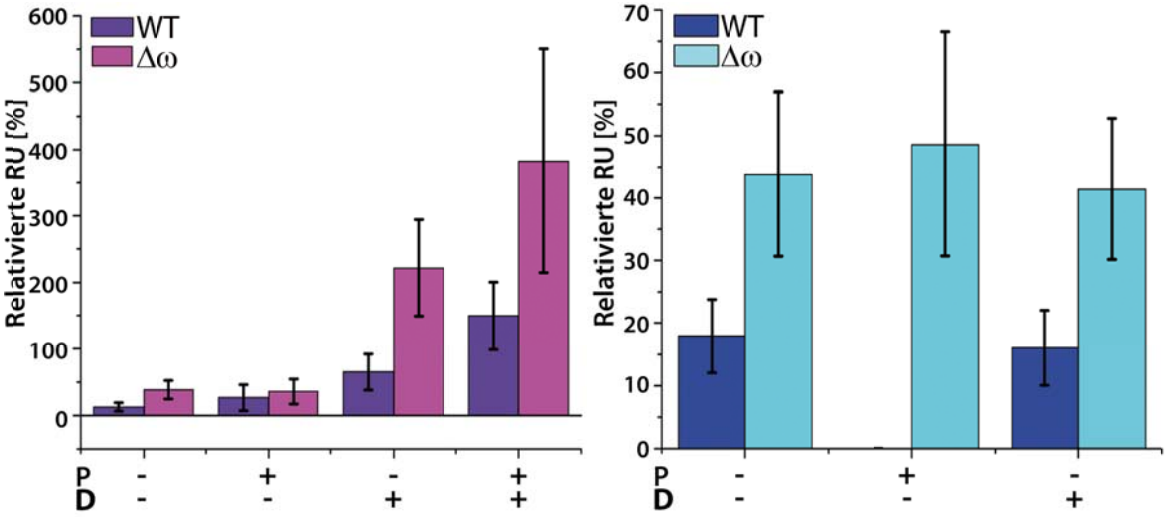


Abb. 4.2.3. Beteiligung der ω-Untereinheit an der Bildung offener Komplexe mit *hisG*- bzw. *rrnB* P1-Promotoren unter dem Einfluss von ppGpp und/oder DksA
Graphisch dargestellt ist die Quantifizierung der mittels SPR (BiaCore) ermittelten KD-Werten obig genannter Promotoren. Die aufgeführten Ergebnisse wurden aus drei unabhängig

voneinander durchgeführten Experimenten entnommen. Die KD-Werte der offenen *hisG*- bzw. P1- Komplexe aus den jeweiligen Proben wurden über die KD-Werte der gleichbehandelten *tac*-Promotor-RNAP-Komplexe normalisiert, gemittelt und samt Standardabweichung dargestellt. Die Komplexbildung der einzelnen Komplexe wurde in Gegenwart (+) bzw. Abwesenheit (-) der beiden stringenten Promotoren ppGpp (300 µM) und DksA (2 µM) analysiert. Desweiteren wurden in der Darstellung die Komplexbildungen durch wildtypische RNAP (WT; dunkelblau bzw. dunkelviolett) von der Bildung der Komplexe durch ω-deletierte (Δω) RNAP (hellbalu bzw. helles magenta) unterschieden.

4.2.4 Einfluss der *E. coli* ω-Untereinheit auf die *in vitro* transkriptorische Aktivität der *E.coli* RNAP: Transkriptionsanalysen von linearisierten und stringent regulierten bzw. nicht stringent regulierten Promotorfragmenten.

Aufbauend auf die in Kapitel 4.2.1 und 4.2.3 gezeigten Auswirkungen der *E. coli* RNAP-ω-Untereinheit auf die RNAP-Bindung verschiedener Promotoren, wurde in diesem Teil der Arbeit die Auswirkung von ω auf der transkriptorische Aktivität der beiden *E.coli* RNAP-Spezies *in vitro* analysiert. Hierzu dienten als Transkriptionsmatrize die in 4.2.3 beschriebenen biotinylierten PCR-Promotorfragmente.

Die Analysen umfassten je drei unabhängig voneinander durchgeführte Versuchsabläufe. In jedem wurden den jeweiligen „run-off"-Transkriptionsansätzen je 10 nM (*tac* oder P1) bzw. 100 nM (His) der jeweiligen linearen Promotor-DNA beigefügt. In An- (+) bzw. Abwesenheit (-) von 300 µM ppGpp (P) und/oder 2 µM DksA (D), wurden diese, wie in der Abbildung 4.2.4.1 (A) dargestellt, von 15 nM wildtypischer (WT)- bzw. ω-deletierter (Δω) RNAP unter Standardbedingungen (siehe 3.3.4) tanskribiert. Die Transkriptionsprodukte wurden auf einem 15 %igem denaturierenden PAA-Gel aufgetrennt und autoradiographisch detektiert. Die Ergebnisse dieser Analysen wurden in Abbildung 4.2.4.1 in Form eines repräsentativen Autoradiogrammes dargestellt. Die Laufhöhen der jeweiligen spezifischen Promotor-transkripte wurden in der Abbildung durch einen schwarzen (*tac*-Transkript), violetten (*hisG*-Transkript) bzw. blauen (P1-Transkript) Pfeil indiziert. Die Promotorproduktbanden der mit durch die Pfeile markierten Laufhöhen wurden im Abschnitt (B) der Abbildung, in Relation zu den Intensitäten der jeweiligen

effektorunbehandelten Proben, quantitativ zusammengefasst. Hierbei ist zu beachten, dass zur Quantifizierung der *hisG*-Promotoraktivität die Summe der Intensitäten aus den drei durch einen schwarzen Strich gruppierten Banden des weißen Pfeils aufgetragen wurde. Die Quantifizierung (B) gibt die Werte des Autoradiogrammes (A) repräsentativ für alle drei unabhängig voneinander durchgeführten Analysen wieder. Die verwendeten Farben der jeweiligen Pfeile und den dazugehörigen Graphen wurden identisch zu der Farbgebung aus den Retardierungsanalysen gewählt. Hierbei steht jeweils die dunkle Variante einer Farbe für Transkripte der WT-RNAP und die hellere Variante der gleichen Farbe für die Deletionsmutante.

Die in der Abbildung gezeigten Transkriptmengen der einzelnen Promotoren zeigten nach Auftrennung ein mit den Ergebnissen aus 4.2.1 vergleichbares Bandenmuster. Die Transkripte des *tac*-Promotors beider RNAP-Spezies zeigten sich in ihrer Bandenintensität durch ppGpp und DksA in den getesteten Konzentrationen nicht beeinflusst. Die gemessenen Schwankungen zwischen den vier Messpunkten einer Messung beliefen sich (hier dargestellt), durchschnittlich auf 4 % bis 10 % für die Wildtyp- bzw. 6 % bis 14 % für die ω-deletierten Polymeraseansätze. Ein augenscheinlicher Bezug zwischen der Anwesenheit der jeweiligen eingesetzten Effektoren und der spezifischen, gebildeten Transkriptmengen war nicht zu erkennen. Ebenfalls wie in den Retardierungsanalysen beschrieben, zeigten sich die *hisG*-Promotoren in beiden Polymeraseansätzen von ppGpp in Abwesenheit von DksA unbeeinflusst, während die Zugabe von ppGpp in Anwesenheit von DksA einen deutlichen Anstieg der Promotoraktivität zur Folge hatte. So stieg die Menge der gebildeten Transkripte in Relation zur effektorenfreien Probe in der Wildtypsituation um das ca. 10-fache bzw. um das ca. 3-fache in der Δω-Situation. Im Gegensatz zu den in 4.2.1 geschilderten Ergebnissen hatte DksA isoliert von ppGpp, in Abwesenheit der ω-Untereinheit, keinen und in Gegenwart von ω einen deutlich schwächeren Effekt auf die *hisG*-Transkriptinduzierung (hier dargestellt: Steigerung der Transkriptemenge um das 2-fache). Es ist jedoch zu erwähnen, dass diese Toleranz gegen DksA in zwei von den drei Fällen aufgetreten ist (siehe Diskussion). Die P1-Transkriptmengen der WT-RNAP brachen nach Zugabe von 300 µM ppGpp ohne DksA und in Relation zur Nullsituation um ca. 50 % ein. Während DksA in Abwesenheit von ppGpp keinen Einfluss auf die Anzahl der P1-Transkripte hatte (hier dargestellt ein Einbruch von ca. 15 %), reduzierte DksA, supplementiert mit ppGpp, die WT-RNAP vermittelte

Promotortranskription um ca. 85 %. Ohne ω zeigte sich die P1-Promotortranskription vergleichbar mit der WT-Situation ebenfalls unbeeinflusst durch DksA (hier dargestellt eine Zunahme um 6 %), zeigte jedoch aber auch keine Reaktion auf die DksA-freie Zugabe von ppGpp (hier dargestellter Anstieg: 5 %). Erst in Gegenwart beider Effektoren, konnte in Abwesenheit der ω-Untereinheit, die spezifische Transkription des P1-Promotors modifiziert werden. In diesem Fall konnte eine Reduzierung der transkriptorischen Promotor-RNAP-Aktivität um 80 % erzielt werden.

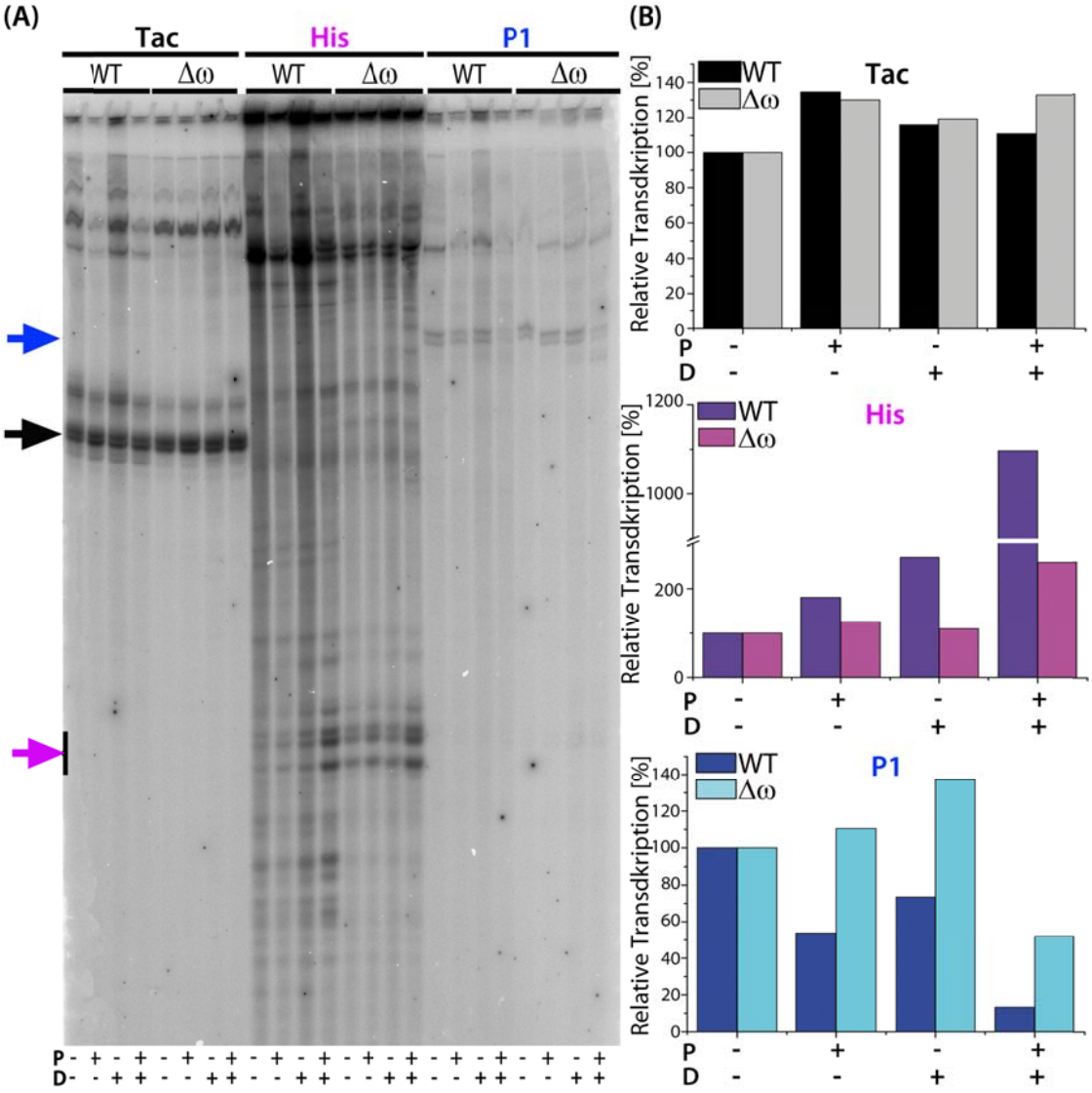


Abb. 4.2.4.1 *In vitro* Transkription der PCR generierten und biotinylierten Promotorfragmente *tac*, *hisG* bzw. *rrnB* P1 durch wildtyp- bzw. ω-deletierter RNAP
Repräsentativ dargestellt ist das Autoradiogramm einer von drei unabhängig voneinander durchgeführten „run off" *in vitro* Transkriptionen der Promotoren *tac*, *hisG* oder *rrnB*-P1 **(A)**. Als Transkriptionsmatrize dienten je 10 nM (*tac* & P1) bzw. 100 nM (His) lineares, promotorbehandelndes DNA-Fragment, welches durch PCR mittels 5´-biotinylierter

Oligonukleotide generiert wurde. Die aufgereinigten Fragmente (siehe 3.2.4.2) wurden anschließend in Gegenwart (+) bzw. Abwesenheit (-) von ppGpp [300 µM] und oder DksA [2 µM] durch wildtypischer bzw. ω-deletierter *E. coli* RNAP transkribiert. Abschließend wurden die RNA-Produkte der Transkription auf einem 15 %igen, denaturierenden PAA-Gel aufgetrennt und densitometrisch ausgewertet.
Die Intensitäten der *tac*- (schwarzer Pfeil), *hisG*- (violetter Pfeil) und *rrnB* P1- (blauer Pfeil) Transkripte wurden mittels PhosphoImager bestimmt und in einem Diagramm quantitativ in Relation zur effektorfreien Probe dargestellt **(B)**.

4.2.5 Charakterisierungen zur Bedeutung der *E.coli* RNAP-ω-Untereinheit für die Isomerisierung zum binären offenen *rrnB* P1-Komplex

Wie einleitend in Kapitel 4.2 erwähnt, kommt der Transkription in der prokaryotischen Regulation von Genen eine besonders prominente Rolle zuteil. Einer der ersten Schritte in der Transkriptionsinitiation ist die Isomerisierung der Promotor-DNA und der RNAP zum sogenannten binären offenen Komplex. Diese ist gekennzeichnet durch das Aufschmelzen der beiden DNA-Promotorstränge und der daraus resultierenden sogenannten Transkriptionsblase (siehe Abb. 1.3.1.1). Hervorzuheben ist, dass das Aufschmelzen dieser Promotor-DNA in der Regel bei Temperaturen unterhalb der für die jeweiligen Basenpaare errechneten Schmelztemperatur (Tm) beobachtet wird. Es konnte gezeigt werden, dass die aus der Bindung der RNAP resultierende freie Energie, die fehlende Energie zur DNA-Aufschmelzung bei Temperaturen unterhalb des errechneten Tm kompensiert. Hierbei spielen die einzelnen Untereinheiten der RNAP eine besondere Rolle (1.2.6), da nicht jede Untereinheit an der Entstehung des offenen Komplexes beteiligt ist. So konnte z.B. für die Region 1 der *E.coli* σ^{70}-Untereinheit eine direkte Beteiligung bei dem Übergang vom geschlossenen zum offenen Komplex nachgewiesen werden (Wilson and Dombroski 1997). Auch konnte gezeigt werden, das die Bildung des offenen Komplexes in direkter Abhängigkeit zu einer distinkten Region der β´ Untereinheit steht (Artsimovitch et al. 2003).
In den obigen Kapiteln 4.2.1 bis 4.2.4. konnte der ω-Untereinheit der *E. coli* RNAP unter stringenten Bedingungen, eine Beeinflussung der Transkription des *rrnB* P1 nachgewiesen werden. Dieser war sowohl auf Transkriptionselongation- (4.2.4) als auch auf Transkriptionsinitiationsebene (4.2.1 bis 4.2.3) zu beobachten. Daraus folgend wurde im anschließenden Teil dieser Arbeit eine eventuelle direkte Beteiligung der ω-Untereinheit an der Bildung offener Promotor-RNAP-Komplexe

untersucht. Hierzu wurde die Bildung der offenen Komplexe in Ab- bzw. Anwesenheit von ω in Abhängigkeit zur Reaktionstemperatur *in vitro* gemessen. Um einen Einfluss durch Transkriptionselongation bzw. Reinitiation auf die gesammelten Daten zu vermeiden, wurden die Analysen im Gegensatz zu 4.2.4 mittels (pseudo-)single-round *in vitro* Transkription auf die Transkription des ersten gebildeten offenen Komplexes fokussiert (3.3.4.2). Hierbei wurde superhelikale *rrnB* P1-Promotor-DNA von 100 nM wildtypischer bzw. ω-deletierter RNAP transkribiert. Je RNAP-Spezies wurde eine Probe bei 1 °C, 4 °C, 8 °C, 12 °C, 16 °C, 20 °C, 25 °C bzw. 30 °C transkribiert. Anschließend wurden die Transkriptionsansätze auf einem 10 %igen PAA-Gel aufgetrennt und densitometrisch ausgewertet. Die Ergebnisse dieser Studien wurden in Abbildung 4.2.5.1 dargestellt.

Wie in 4.2.5.1 dargestellt, konnte bei der Initiation der *E. coli* RNAP eine deutliche Abhängigkeit der Bandenintensität zur jeweiligen Assoziationstemperatur beobachtet werden. Mit steigenden Analysetemperaturen nahmen auch die gemessenen Transkriptmengen zu. Dieser Trend schien sich durch die ω-Untereinheit nicht gravierend beeinflussen zu lassen. Bei Temperaturen bis zu 8 °C lag die Intensität der WT-RNAP-Proben bei bis zu ca. 10% der maximalen, in den WT-Ansätzen gemessenen Intensitäten. Bei den Produkten der ω-freien Komplexe erreichten die Bandenintensitäten bei Temperaturen bis zu 8 °C maximal 15 % der stärksten Δω-Bande. In einem Temperaturbereich von 12 °C bis 16°C konnte in den Proben beider RNAP-Varianten ein steiler Anstieg der Transkriptmengen beobachtet werden, welcher ω-unabhängig bei 20 °C sein Maximum verzeichnete. Anschließend schienen sich die Intensitäten der WT- und Δω-Proben in den getesteten Temperaturen über 20 % auf ein Plateau einzupendeln.

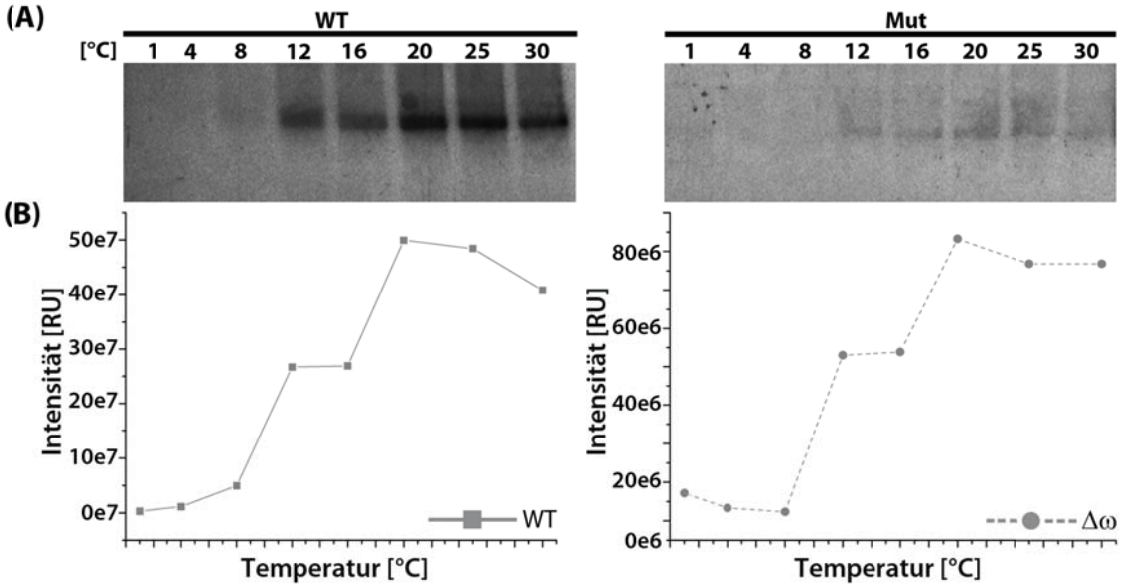


Abb. 4.2.5.1 Auswirkungen der ω-Deletion auf die temperaturabhängige RNAP-Initiationskompetenz bei der *rrnB* P1-Transkription
Dargestellt ist das Autoradiogramm (A) samt Quantifizierung (B) einer (pseudo-)single-round *in vitro* Transkription. Das einzelne Transkript der superhelikalen Promotor-DNA wurde sowohl von wildtypischer (WT) als auch von ω-deletierter (Δω) *E. coli* RNAP synthetisiert. Die jeweilige Assoziationstemperatur variierte hierbei, wie in der Abbildung indiziert, in einem Bereich von 1 °C bis 30 °C. Die gebildeten Transkripte wurden auf einem 10 %igen PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und densitometrisch ausgewertet. Hierzu wurden die Intensitäten der gemessenen Schwärzungen in „relativen Units“ und in Abhängigkeit zur Temperatur dargestellt.

Da in der obigen Analyse der *E. coli* ω-Untereinheit unter nicht stringenten Bedingungen keine direkte Beteiligung an der Bildung offener Komplexe nachgewiesen werden konnte, wurde im Folgendem die direkte Beteiligung von Omega auf die Bildung offener Komplexe unter stringenten Bedingungen untersucht. Nach obigem Beispiel wurde hierbei die Auswirkung der ω-Deletion auf die Komplexbildung mittels (pseudo-)single-round *in vitro* Transkription analysiert. Um einen potentiell fördernden bzw. benachteiligenden Effekt der ω-Untereinheit auf die P1-Komplexbildug sensitiver detektieren zu können, wurden die Analysen bei suboptimalen Komplexbildungsbedingungen durchgeführt. Hierzu wurde die RNAP-Assoziationstemperatur in den Reaktionen auf 12 °C herabgesenkt. Wie in 4.2.5.1 zu erkennen, beträgt die Bildung der offenen P1-Komplexe beider RNAP-Varianten bei dieser Temperatur ca. 65 % der maximal gemessenen. Parallel wurden beide RNAP-Ansätze zusätzlich unter Standardassoziationstemperatur (30 °C) analysiert. In zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten wurden in Anwesenheit (+)

bzw. Abwesenheit (-) von 300 µM ppGpp (P) und/oder 2 µM DksA (D) RNAP-Promotor-Komplexe durch 100 nM wildtypischer (WT) bzw. ω-freien (Δω) RNAP initiiert. Die gebildeten Transkripte dieser Ansätze wurden auf einem 10 %igen dPAA-Gel aufgetrennt und, wie in Abbildung 4.2.5.2 dargestellt, densitometrisch analysiert. Zur quantitativen Auswertung dieser Ergebnisse wurden je RNAP-Spezies die gemessenen Intensitäten der einzelnen P1-Promotorbanden (P1) über die Intensitäten der dazugehörigen RNA1-Promotorbanden (R) normalisiert und in Relation zur Intensität der effektorfreien Probe betrachtet. Repräsentativ abgebildet ist eines dieser zwei Experimente.

Die Abbildung zeigt, dass sich durch Reduzieren der Komplexassoziationstemperatur auf 12 °C der schon in 4.2.1 bis 4.2.4 beschriebene Effekt von Omega auf die RNAP-*rrnB* P1-Interaktion nicht beeinflussen lässt. Unabhängig von der analysierten Temperatur zeigten sich die Transkriptmengen beider RNAP-Variationen von DksA in Abwesenheit von ppGpp unbeeinflusst. Die Zugabe von DksA in Gegenwart von ppGpp resultierte, ebenfalls temperaturunabhängig, in einem Transkriptionseinbruch um ca. 84 % in den WT- bzw. 85 % in den Δω-Ansätzen. Während sowohl bei 12 °C als auch bei 30 °C Analysetemperatur die Transkription der wildtypischen Komplexe durch die Zugabe von 300 µM ppGpp um 60 % abnahm, wirkte sich ppGpp in den gleichen Konzentrationen nicht auf die Intensitäten der Δω-transkribierten Produkte aus.

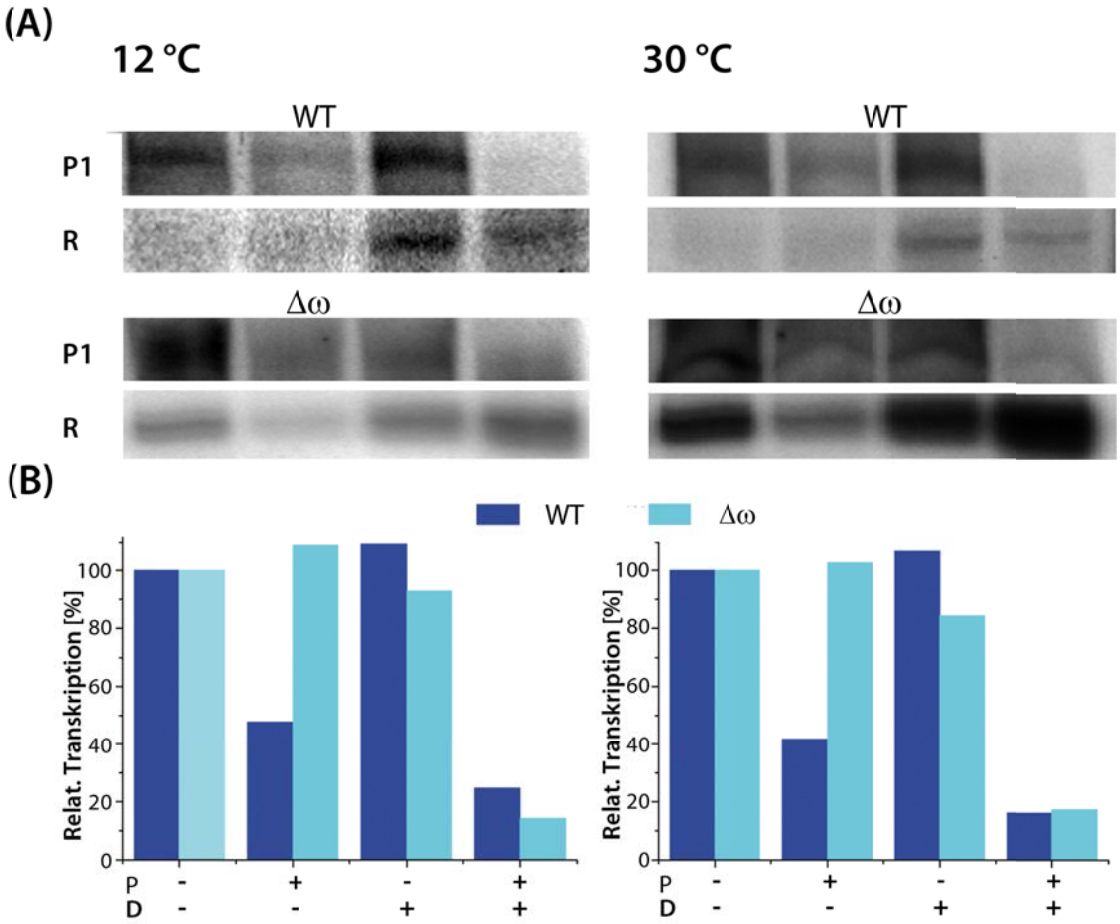


Abb. 4.2.5.2 Analysen zur Beteiligung der *E. coli* RNAP-ω-Untereinheit auf die stringent regulierte, offene Komplexbildung des *rrnB* P1-Promotors unter temperaturabhängigen Aspekten

Gezeigt sind die repräsentativen Ausschnitte eines Autoradiogrammes aus einer von zwei unabhängig voneinander durchgeführten (pseudo-)single-round *in vitro* Transkription (A), sowie die quantitative graphische Darstellung der in A gezeigten Bandenintensitäten (B). Als Transkriptionsmatrizen diente superhelikale Promotor-DNA, welche von wildtypischer (WT) bzw. ω-deletierter (Δω) *E. coli* RNAP transkribiert wurde. Diese DNA enthielt sowohl den *rrnB* P1-Promotor (obere Spalten; P1) als auch den Promotor für die RNA1-Transkription (untere Spalten; R). Beide Promotoren wurden in Anwesenheit (+) und/oder Abwesenheit (-) von 300 µM ppGpp (P) bzw. 2 µM DksA (D) transkribiert. Desweiteren wurden die Transkriptionskomplexinitiationen bei 30 °C mit den Initiationen der Komplexe, die bei 12 °C durchgeführt wurden, verglichen. Alle Transkripte wurden auf einem 10 %igen dPAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und densitometrisch ausgewertet. Dazu wurden die relativen Schwärzungsgrade der einzelnen Banden über die Intensitäten der gleichbehandelten RNA1-Transkripte normalisiert und prozentual zur der jeweiligen Bandenintensität der effektorfreien P1-Transkription dargestellt.

4.3 *In vivo* Analysen zur Bedeutung des Effektorproteins DksA für das stringente Verhalten von *Escherichia coli*

In den ersten beiden Kapiteln des Ergebnisteils dieser Arbeit konnte schon zahlreich auf die besondere Rolle des Effektorproteins DksA für die stringente Regulierung in *Escherichia coli* hingewiesen werden. Während DksA alleine kaum einen Einfluss auf die Aktivität der ribosomalen RNA-Promotoren in *E. coli* hat, wird der Effekt des stringenten Effektors ppGpp durch DksA konzentrationsabhängig deutlich gesteigert (siehe 4.1). Im Gegensatz dazu unterliegt die Aktivierung der Aminosäurensynthese durch Promotoren wie den *hisG*-Promotor primär dem Einfluss von DksA und wird durch ppGpp lediglich gesteigert (siehe 4.2). Ebenfalls konnte in 4.2 gezeigt werden, dass durch DksA die Abhängigkeit der stringenten Regulation ribosomaler Promotoren von der RNAP ω-Untereinheit, aufgehoben werden kann. Um die Bedeutung von DksA in *E. coli* unter stringenten Bedingungen näher charakterisieren zu können, wurden im Folgenden vergleichende Analysen zwischen dem *E. coli* Wildtypstamm (MG1655) und einer *E.coli* DksA-Deletionsmutante (CF9239) *in vivo* durchgeführt.

4.3.1 Einfluss von DksA auf das Populationswachstum von *E. coli* Zellen in Abhängigkeit bzw. Unabhängigkeit zur stringenten Kontrolle

Zur Phänotypisierung der DksA-Deletionsmutante unter stringenten und nicht stringenten Bedingungen wurden die beiden WT- und ΔdksA-Stämme, wie in 3.1.3 beschrieben, in Wachstumskurvenanalysen über einen Zeitraum von 24 Stunden miteinander verglichen. Hierzu wurden zwei mit 100 ml YT-Medium gefüllten Erlenmeyerkolben 1:100 mit übernachtkultivierten MG1655 (WT)- bzw. CF9239 (ΔdksA)-Zellen angeimpft. Zu den in Abbildung 4.3.1.1 indizierten Zeitpunkten wurden den Kolben jeweils ein Aliquot zur Zelldichtebestimmung nach 3.2.1.3 entnommen und die daraus resultierende Werte halblogarithmisch in der Abbildung 4.3.1.1 zusammengefasst. Nach Erreichen einer OD (optischen Dichte) von 0,6 bei 600 nm wurde in je einem Erlenmeyerkolben der beiden Zellstämme, wie in 3.3.6.1 beschrieben, die Stringente Kontrolle durch Zugabe von Serinhydroxamat (SHX; 250 µg/ml f.c.) ausgelöst (graue, gestrichelte Linie). Der zweite Kolben blieb zur Analyse

des Zellkulturwachstums unter Standardbedingungen SHX-unbehandelt. Zur Analyse des Wachstumsverhaltens der dargestellten Stämme wurden die Ergebnisse aus je fünf voneinander unabhängig durchgeführten Wachstumskurven gemittelt und samt Standardabweichung graphisch dargestellt.

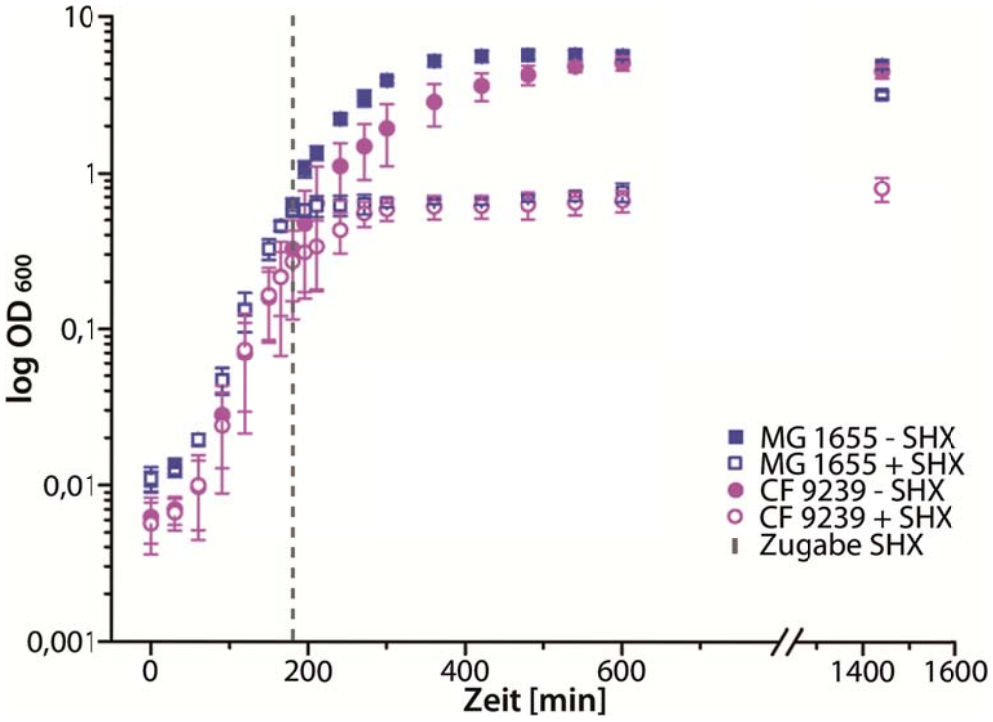


Abb. 4.3.1.1 Phänotypisierung der *E. coli* Stämme MG1655 und CF9239 basierend auf Wachstumsverhalten in stringent bzw. nicht stringenten Bedingungen
Zusammenfassend dargestellt ist die gemittelte Zunahme der optischen Dichte (λ 600 nm) zweier MG1655 (WT)- bzw. CF9239 (ΔdksA)- Flüssigkulturen gegen die Zeit. Hierzu wurden die vier Zellkulturen zum dargestellten Zeitpunkt Null aus einer Übernachtflüssigkultur 1 zu 100 angeimpft und das Zellpopulationswachstum über die Zunahme der optischen Dichte, wie in der Abbildung dargestellt, über einen Zeitraum von 24 Stunden dokumentiert. Bei Erreichen einer Zelldichte von 0,6 bis 0,7 OD_{600} (graue, gestrichelte Linie), wurde sowohl in einer der WT- als auch in einer der ΔdksA-Zellkulturen durch die Zugabe von Serinhydroxamat (250 µg/ml f.c.) die Stringente Kontrolle ausgelöst. Die dargestellten Ergebnisse der oben beschriebenen Analyse repräsentieren die gemittelten Werte aus fünf unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

Wie in der Abbildung 4.3.1. dargestellt, zeichneten sich die beiden analysierten Zellstämme in ihrem Populationswachstum unter Standardbedingungen (kein SHX) durch allenfalls geringe Wachstumsunterschiede aus. Sowohl die MG1655- als auch die CF9239-Populationen der SHX-freien Kulturen, erreichten nach vergleichbar andauernder lag-Phase die exponentielle Wachstumsphase. In dieser Phase konnte unabhängig von DksA ca. alle 30 min eine Verdopplung der Zellzahl gemessen

werden. Auffallend ist jedoch, dass das SHX-freie, exponentielle Wachstum der ΔdksA-Kulturen in allen Messungen in Relation zu den WT-Kulturen früher bzw. flacher in die anschließende stationäre Phase überging. Dieses hatte zur Folge, dass, während die Populationen des MG1655 nach durchschnittlich sechs bis sieben Stunden ein Plateau erreichten, die CF9239-Populationen durchschnittlich neun bis zehn Stunden brauchten, um sich auf ihre, mit der WT-vergleichbaren, maximalen Zelldichte einzustellen. Auch die Zugabe von SHX in den oben beschriebenen Konzentrationen konnte in den ersten Stunden der Kultivierung keinen differentiellen Effekt auf das Populationswachstum der beiden Stämme provozieren. Dabei vergiftet Serinhydroxamat die L-Serin-spezifische-Aminoacyltransferase, so dass schnell keine mit Serin beladenen t-RNAs mehr vorliegen. Dadurch binden unbeladene tRNAs am Ribosom und lösen so die Stringente Kontrolle aus. Dieser Effekt war in beiden Stämmen unabhängig von DksA zu beobachten. Beide Populationen reagierten mit abruptem Abbruch des exponentiellen Wachstums auf die SHX-Supplementierung. Die durch SHX erzwungene strickte Stagnation im Populationswachstum umspannte in beiden Zellstämmen einen vergleichbar langen Zeitraum. Durchschnittlich sechs bis sieben Stunden nach SHX-Vergiftung, war eine seichte Wiederaufnahme der WT- bzw. ΔdksA-Zellteilung zu beobachten. Während die Populationsdichte der WT-Kulturen jedoch nach 24 Stunden ein mit den SHX-freien WT-Kultur vergleichbares Niveau erreichte, war die Zelldichte der ΔdksA-freien Kulturen nach 24 Stunden deutlich geringer als die der SHX-freien Kulturen des gleichen Stammes.

4.3.2 2D-PAGE-Analysen zu dem Einfluss von DksA auf Proteom in *E. coli* vor und nach dem Auslösen der Stringenten Kontrolle.

Wie in 4.3.1 beschrieben, wurden WT (MG1655) - bzw. Δω (CF9239)-Zellen entweder in der exponentiellen Phase oder 30 min nach Auslösen der Stringenten Kontrolle durch Serinhydroxamat isoliert und lysiert. 400 µg Aceton-gefälltes Gesamtprotein wurde in Rehydrationspuffer aufgnommen und über einen immobilisierten pH-Gradienten nach ihrem isoelektrischen Punkt differenziert aufgetrennt (IEF). Dieser ersten Dimension der Proteintrennung folgte eine SDS-

PAGE zur Trennung der Proteine in einer zweiten Dimension nach ihrem Molekulargewicht (siehe 3.3.6). Die Detektion der so in zwei Dimensionen aufgetrennten Proteine fand über Coomassiefärbung statt und wurde in den Abbildungen 4.3.2.1 und 4.3.2.2 dargestellt.

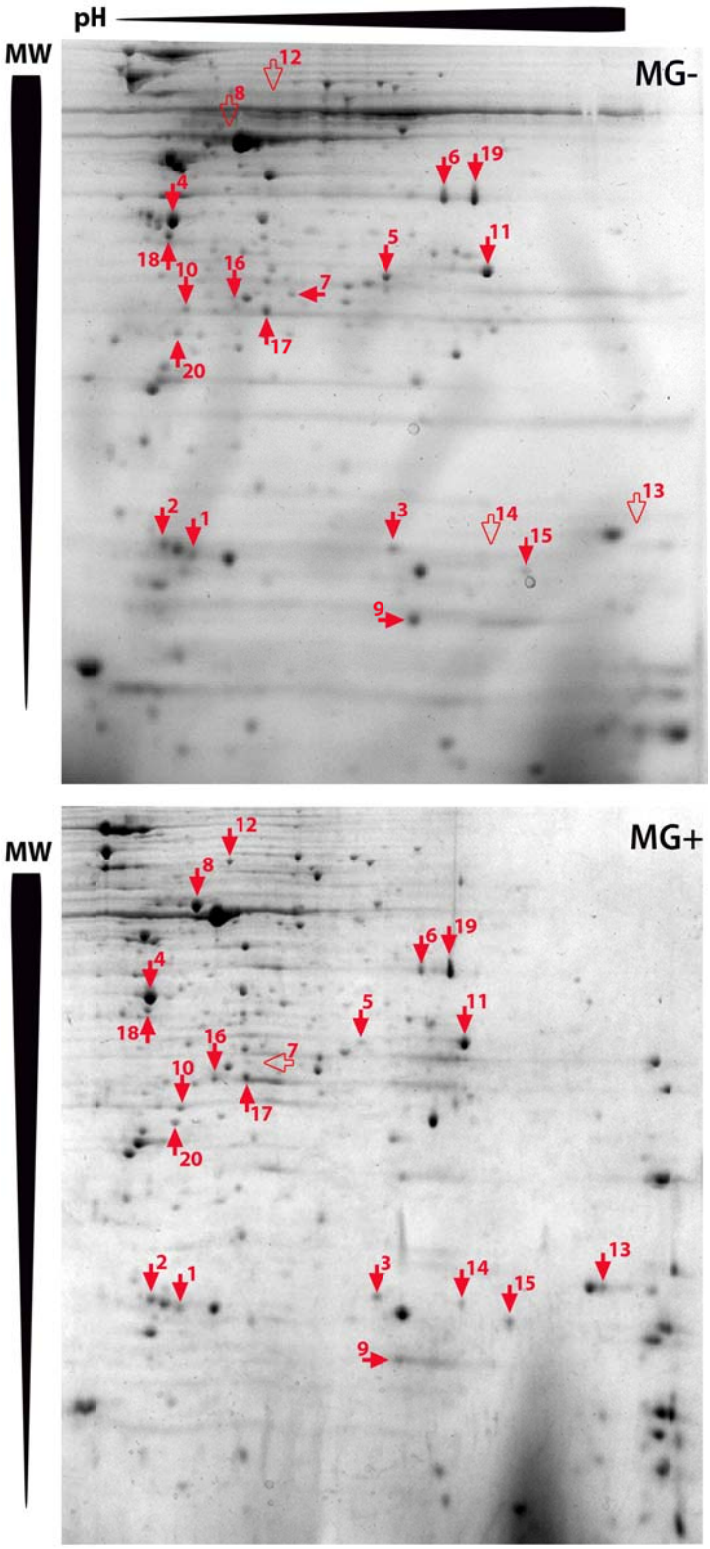


Abb. 4.3.2.1 MG1655 2D-PAGE-Proteomanalyse im Rahmen der Stringenten Kontrolle
Gezeigt sind zwei repräsentative Coomassie-gefärbte SDS-PAGE nach IEF. Die dargestellten Zellproteine entstammen aus unbehandelten bzw. SHX-behandelten MG1655-Zellen (siehe 3.3.1.1). MG- bezeichnet das Proteom der Zellen, die sich zum Zeitpunkt der Proteinextrakt-gewinnung in exponentiellem Wachstum befanden. Die Proteine des MG+-Gels enstammen aus Zellen 30 min nach Induktion der Stringenten Kontrolle durch SHX-Zugabe. Der immobilisierte pH-Gradient (pH 3 bis 10; nicht linear) ist schematisch von links (pH 3) nach rechts (pH 10) angedeutet. Ebenfalls angedeutet ist die Auftrennung der Proteine nach Molekulargewicht (MW).

Die dargestellten Analysen verliefen parallel zu Proteomanalysen des CF9239-Stammes (siehe 4.3.2.2) nach gleichem Schema. Nach dem Vergleich aller vier Gele (MG-, MG+, CF-, CF+) wurden differentiell exprimierte Proteine durch rote Pfeile gekenzeichnet. Wenn die Expression eines Proteins auf einem Gel in Gegensatz zu einem anderen Gel ganz eingestellt zu sein schien, wurde die Stelle des fehlenden Proteinspots durch einen rot konturierten Pfeil gekennzeichnet. Bei der Kennzeichnung der Proteine wurde sich auf die Proteine beschränkt, die in fünf von fünf Gelen den gleichen Trend gezeigt haben (hoch oder herunter reguliert in Abhängigkeit von SHX und/oder des Genotyps). Identifizierte Proteine wurden nummeriert und mittels MALDI-TOF analysiert.
(Dr Tino Polen, Forschungszentrum Juelich GmbH)

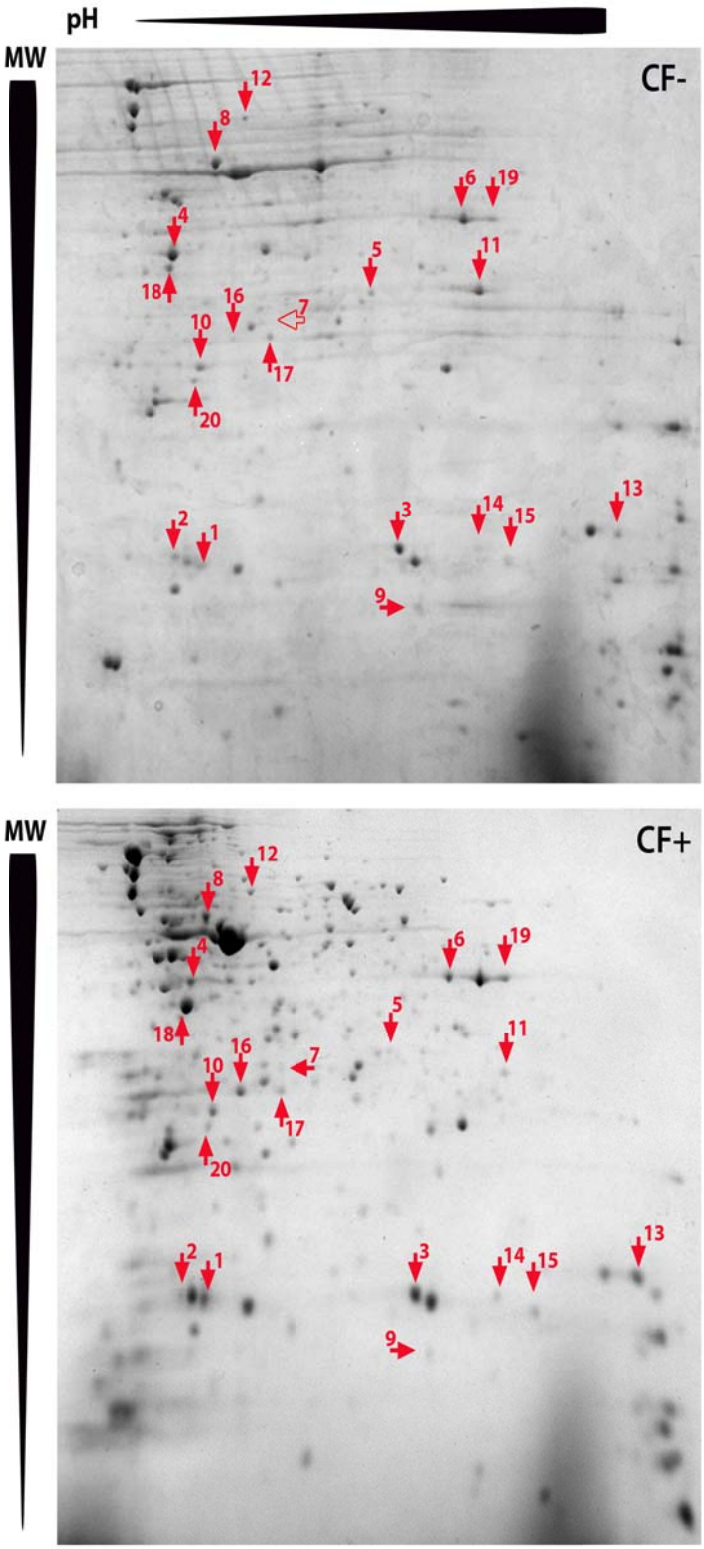


Abb. 4.3.2.2 CF9239 2D-PAGE-Proteomanalyse im Rahmen der Stringenten Kontrolle

Gezeigt ist die zweite Dimension einer CF9239 2D-Proteomanalyse.

Die dargestellten Coomassie-gefärbten Proteine entstammen entweder logarithmisch wachsenden CF9239-Zellen (CF-) oder Zellen des gleichen Stammes, bei denen 30 min vor Proteinentnahme durch SHX die Stringente Kontrolle ausgelöst wurde (CF+). Der nicht lineare pH-Gradient der ersten Dimension (IEF) von pH 3 bis pH 10 wurde von links nach rechts ansteigend dargestellt (pH; siehe obere Beschriftung der Abbildung). Weiterhin am linken Bildrand schematisch angedeutet ist die Trennrichtung der Gele nach Molekulargeweicht (MW).

Die dargestellten Analysen verliefen parallel zu Proteomanalysen des MG1655-Stammes (siehe 4.3.2.1) nach gleichem Schema. Die Proeinexpressionen aller Gele wurde miteinander verglichen und differentiell exprimierte Proteine wurden durch nummerierte rote Pfeile gekennzeichnet. Wenn ein Protein eines Geles auf einem anderen Gel komplett zu fehlen schien, wurde das Fehlen an der jeweiligen Stelle durch einen rot konturierten Pfeil dargestellt. Die Kenzeichnung beschränkte sich auf Proteine, bei denen in fünf unabhängigen Präparationen 5x die gleiche relative Expression in Abhängigkeit zu SHX und Phenotyp identifiziert werden konnten. Identifizierte Proteine wurden nummeriert und Dank der freundlichen Unterstützung von Dr Tino Polen und Kollegen (Forschungszentrum Juelich GmbH) mittels MALDI-TOF analysiert.

Die Identifizierung von differentiell synthetisiertem Protein wurde bei dieser Art der Analyse erheblich durch das Aufbringen unterschiedlicher Proteinmengen beeinträchtigt. Daher wurden in ersten Analysen versucht, die Einbringung identischer Proteinmengen zu gewährleisten. Dazu wurde nach der Proteinfällung die Proteinmenge vor Einquellen in die pH-Gradientenstripes mittels Bradford-Methode abgeglichen. Hier stellte sich das Lösen der Pellets nach Acetonfällung als kleine Herausforderung dar, da es nach der Acetonfällung nicht mehr in *Aqua dest*. zu lösen war. Daher wurden die Proteinpellets in Rehydrationspuffer gelöst (siehe 3.3.6.5), Bradford-abgeglichen und der Proteinabgleich mittels SDS-PAGE kontrolliert. Trotz übereinstimmenden Bradford- und SDS-PAGE-Abgleichungen zeigte sich, dass die identisch eingebrachten Proteinmengen der vier gleichzeitig angefertigten und gleichbehandelten Gele (MG-; MG+; CF- und CF+) nicht gleichmäßig in den immobiliserten pH-Gradienten eingequollen werden konnten. Daher wurde die 2D-Analysen insgesamt 7x wiederholt. Die anschließende Proteinauswahl für die MALDI-TOF-Typisierung konzentrierte sich auf Proteine, die in mindestens fünf der sieben Gele aufgetrennt werden konnten und die in diesen fünf Gelen immer die gleiche relative Expression (im Vergleich zu den jeweiligen anderen drei Ansätzen) zeigten. Diese Proteine wurden nummeriert (siehe oben), mit einem sterilen Skalpell aus den Gelen geschnitten und dank der freundlichen Unterstützung von Dr Tino Polen und Kollegen aus dem Forschungszentrum Juelich GmbH mittels MALDI-TOF identifizert. Bei Proteinen, die im Vergleich von zwei der vier getesteten Bedingungen (Genotyp- bzw. SHX-Supplementierung) reproduziert nur auf einem der beiden Gele detektiert werden konnten, wurden die fehlenden Positionen durch rot umrandete Pfeile indiziert.

Das MALDI-TOF Ergebnis der in Abb. 4.3.2.1 und Abb. 4.3.2.2 gekenzechneten Proteine wurde in der Tabelle 4.3.2.1 samt Regulation und funktioneller Gruppierung zusammengefasst. Die Interpretation der Daten ist Gegenstand der Diskussion dieser Arbeit (siehe 5.3).

Tab. 4.3.2.1 Differentiell synthetisierte Proteine nach SHX-Stimulation in MG1655 und CF9239:
Zusammengefasst in funktionellen Gruppen ist das Erbebnis der MALDI-TOF-Identifikation der in Abb.4.3.2.1 und 4.3.2.2 indizierten Proteinspots.

Spot Nr.	Protein	MG - zu MG +	MG - zu CF -	MG - zu CF +	CF - zu CF +	MG + zu CF -	MG + zu CF +	Funktionelle Gruppe
2	b4200 rpsF, 30S ribosomal subunit protein S6	0	0	+	+	0	+	Protein Biosynthese
11	b0169 rpsB, 30S ribosomal subunit protein S2	0	0	-	-	0	-	
13	b3985 rplJ, 50S ribosomal subunit protein L10	0	+	+	- 0	+	+	
18	b0170 tsf, protein chain elongation factor EF-Ts	0	0	+	+	0	+	
4	b0170 tsf, protein chain elongation factor EF-Ts	0	0	-	-	0	-	
9	b3707 tnaC, tryptophanase leader peptide	- 0	- 0	-	- 0	0	0	
5	b2096 gatY, D-tagatose 1,6-bisphosphate aldolase 2, catalyti	-	0	-	- 0	0 +	0	Kohlenstoff-hydrat Stoffwechsel
6	b1779 gapA, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A	-	-	0	+	0	- 0	
19	b1779 gapA, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A	0	0	0	0	0	0	
17	b3919 tpiA, triosephosphate isomerase	0	0	0	- 0	0	-	
16	b4384 deoD, purine-nucleoside phosphorylase	+	0	+	+	0 +	0	Pyrin/ Pyrimidin-Stoffwechsel
20	b0469 apt, adenine phosphoribosyltransferase	0 +	0	0	0	-	-	
10	b2498 upp, uracil phosphoribosyltransferase	0	0 +	+	0	0	0	
3	b3764 yifE, conserved protein	0	+	+	0	+	+	Stressinduz. Mutagenese-antwort
7	b0779 uvrB, excinulease of nucleotide excision repair, DNA d	-	-	-	0	0	0	DNA-Reparatur
12	b0606 ahpF, alkyl hydroperoxide reductase, F52a subunit, FAD	+	+	+	0	0	0	
14	b0180 fabZ, (3R)-hydroxymyristol acyl carrier protein dehydr	0 +	0	0	0	0	0	Fettsäures-Synthese
15	b2519 pbpC, fused transglycosylase/transpeptidase	0 +	0	0	0 +	0	0	Zellwand aufbau
1	b2998 yghW	-	0	-	-	-	0	Uncharac-terized protein
8	b4334 yjiL	+	+	+	0	0	0	

Orange und rot hinterlegt sind die Proteine, die mittels MALDI-TOF nicht eindeutig (rot unsicherer als orange) identifiziert werden konnten. Proteinspots, die auf den Gelen in Relation zu den getesteten Bedingungen stark zu- bzw. abnahmen, wurden mit „+“ bzw. „-“

gekenzeichnet. „- 0“ bzw. „0 +“ deuten eine schwache Ab- bzw. Zunahme der Proteinspotintensitäten an, während unveränderte Intensitäten mit „0“ gekennzeichnet wurden.

5 Diskussion

Seit über 40 Jahren ist die bakterielle Anpassung an äußere Stressfaktoren, wie „pH-shift“, Temperaturveränderung und vor allem Nähstoffmangel, Bestandteil ausgiebiger Analysen. Viele dieser Stressoren aktivieren globale Netzwerke diverser Anpassungsmechanismen. Einer der bestuntersuchten Anpassungsmechanismen in *E. coli* ist die sogenannte Stringente Kontrolle (siehe 1.1 sowie 1.6). Diese zeichnet sich unter anderem durch eine abrupte Drosselung der Zellteilungsaktivität aus. Die auf diesem Wege eingesparten Ressourcen können z.B. der Aminosäurebiosynthese bzw. dem Aminosäuretransport zugeführt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die grundliegenden Mechanismen des Netzwerks der Stringenten Kontrolle in *E. coli* analysiert und die Ergebnisse sollen im Folgenden diskutiert werden.

5.1 Einfluss der Startnukleotide auf die stringente Regulation ribosomaler Promotoren

Ideale Wachstumsbedingungen (ausreichend Nährstoffe, idealer pH etc.) ermöglichen in *E. coli* eine Phase exponentiellen Wachstums. Dieses geht neben der erhöhten Replikationsrate mit einer rapiden und energieaufwändigen Transkriptions- und Translationsaktivität einher. Beiden Prozessen liegt die Bildung stabiler RNAs wie die der rRNA zugrunde, deren Transkription unter stringenten Bedingungen radikal einbricht. In *E. coli* wird die Synthese der ribosomalen RNA über die Aktivität der sieben rRNA-Operons gesteuert, welche sich in ihren Sequenzen durch vereinzelte Basenaustausche unterscheiden. Da das Erfolgsrezept bakteriellen Wachstums auf einer schnellen Adaption der Proteinsynthese beruht, ist es gut vorstellbar, dass dieses durch Aufkommen mehrerer leicht unterschiedlicher Ribosomen-Subpopulationen mit daraus resultierenden variierenden Charakteristika deutlich optimiert wird. Selbst einzelne Basenaustausche in rRNAs wirken sich drastisch auf die Funktion von Ribosomen aus (Beispiel: Antibiotikaresistenz) (Triman and Adams 1997). Weiterhin ist bekannt, dass die Zahl der rRNA-Operons in unterschiedlichen Bakterien mit der Komplexität ihrer Lebensweisen zu korrelieren scheint. Studien in denen einzelne

ribosomale Operons in *E. coli* deletiert wurden, ergaben, dass für optimales Zellwachstum fünf der *rrn*-Operons genügen, eine optimale Anpassung an Veränderungen der Nährstoffbedingungen und Temperatur jedoch die Gegenwart aller sieben bedarf (Condon et al. 1995). Die konservierten Mikroheterogenitäten innerhalb der sieben ribosomalen *E. coli* Operons scheinen demnach einen Pool an spezialisierten Funktionen für die Anpassung an veränderte Umweltbedingungen zur Verfügung zu stellen. Ein weiteres Bespiel für die differenzierte Codierung einer RNA auf unterschiedlichen Genen zur Anpassung an Umweltbedingungen konnte von Gundersen et al für den Malariaerreger Plasmodium beschrieben werden. Der Lebenszyklus dieses eukaryotischen, einzelligen Parasits ist in einen wirts- (in der Anopheles-Mücke) und zwischenwirtsspezifischen (im Säuger) unterteilt. Dabei wird die Transkription der 18S rRNA, je nachdem, ob sich der Parasit in dem Wirt oder in dem Zwischenwirt befindet, durch eines von zwei unterschiedlichen 18S rRNA-Genen reguliert (Gunderson et al. 1987).

Die von mir hier vorgelegte Arbeit beschäftigte sich mit einer Sequenzvariation an der Position +1 (Sartnukleotid) der jeweiligen *rrn* P1-Promotoren. Hierzu dienten exemplarisch vier Plasmide mit je einem wildtypischen *rrn* P1-Promotoren (*rrnB*, *rrnH*, *rrnE*, *rrnD*) sowie zwei Plasmide mit je einer Variante des *rrnD* P1-Promotors als Transkriptionsmatrize. Die erste Variante beinhaltete einen Basenaustausch von G zu A an der Position +1, während die zweite zusätzlich zu dem von G zu A an Position +1 einen Austausch von T zu C an Position +3 in sich trug. Letztere war dadurch in ihrer -18- bis +3-Sequenz identisch zu der -18- bis +3-Sequenz des *rrnH* und *rrnE* P1-Promotors. Während demnach fünf dieser *rrn* P1-Promotoren ein ATP an der Position +1 aufwiesen, startete das Transkript des P1-Promotors an dieser Stelle mit einem GTP (siehe Abb. 1.5.2.1). In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass diese Varianz des Startnukleotids (G statt A) *in vivo* mit einer differentiellen Regulierung der Promotoren durch ppGpp und DksA einhergeht (Kolmsee et al. 2011). So zeigte sich der P1-Promotor des *rrnD*-Operons deutlich weniger stringent reguliert als die anderen. Durch Austausch des *rrnD* P1-Startnukleotids von G zu A konnte eine stringente Regulation der *rrnD*-Variante erreicht werden, welche in ihrer Intensivität vergleichbar zu den anderen *rrn*-Operons verlief. Aufbauend auf diesen Beobachtungen wurden in dieser Arbeit *in vitro* Transkriptionsanalysen zur genaueren

Charakterisierung der differentiellen stringenten Regulierung ribosomaler P1-Promotoren vorgenommen.

Wie von Kolmsee et al. 2011 (Kolmsee et al. 2011) für die *in vivo* Analysen beschrieben, nahm die Transkription der rRNA P1-Promotoren unter stringenten Bedingungen (ppGpp in Gegenwart von DksA) rapide ab (Einbruch der Transkription je nach Konzentration des zugegebenen DksA-Proteins zwischen 50 % und 80 %). Unerwarteterweise galt dieses jedoch nicht nur für die mit einem ATP startenden sondern auch für die mit einem GTP startenden Transkripte. Ausgehend von den Erkenntnissen der *in vivo* Analysen war eine deutlich verminderte Reaktion des *rrnD* P1-Promotors in Relation zu den anderen Promotoren erwartet worden (siehe später). Weiterführend zu den *in vivo* Studien, konnte der Einfluss der beiden Effektoren auf den oben beschriebenen Transkriptionseinbruch *in vitro* differentiell analysiert und zugeordnet werden. So zeigten sich alle getesteten Promotoren durch DksA allein in Konzentrationen bis zu 2 µM nicht stringent reguliert. Dieses steht in Widerspruch zu den veröffentlichten Daten von Rutherford et al. (Rutherford et al. 2007), in denen sowohl eine Reduzierung der Stabilität offener Komplexe aller Promotoren, als auch eine stringente Regulation ribosomaler Promotoren durch DksA (in Abwesenheit von ppGpp) beschrieben wurde. Auch wenn dieses in dieser Arbeit nicht bestätigt werden konnte, ist zu erwähnen, dass bei allen durchgeführten Messungen Schwankungen von 10-15% auftreten konnten, aufgrund dessen schwache stringente Einflüsse durch DksA nicht detektierbar sein könnten. Die Quantifizierung der P1-Transkripte erfolgte über Normalisierung der P1-Bandenintensitäten, mit denen der auf dem Plasmid mitkodierten, als nicht stringent reguliert geltenden RNA1. Die durch Rutherford et al. oben beschriebenen, promotorsequenzunabhängigen Effekte könnten sich daher durch dieses Vorgehen während der Quantifikation gegenseitig relativiert haben. Da bei den dargestellten RNA1-Produkten, zumindest in einem Bereich von bis zu 2 µM DksA, keine deutliche Veränderung der Produktmengen ersichtlich gewesen ist, ist dieses jedoch unwahrscheinlich.

Im Gegensatz zu DksA verursachte ppGpp alleine einen Einbruch von ca. 40 % bis 50 % in allen getesteten Ansätzen.

In vielen Fällen konnte nach Zugabe von 4 µM DksA, vor allem in den gebildeten RNA1-Transkripten, ein ppGpp-unabhängiger Anstieg der Promotoraktivität beobachtet werden. Diese Steigerung der RNA1-Promotoraktivität war stellenweise so gravierend, dass die P1-Transkription dieser Proben nach Abgleich mit der RNA1-Intensität in der Quantifikation bis zu 30 % einzubrechen schien. Dieser Transkriptionseinbruch spiegelte jedoch nicht die jeweiligen P1-Bandenmuster wider und war daher lediglich ein Artefakt resultierend aus der Quantifizierung der P1-Banden über die RNA1-Aktivität (siehe 4.1). Eine ähnliche promotorunabhängige Aktivierung durch DksA konnte in anderen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe (Masterarbeit Lilli Olgeiser, unveröffentlichte Daten) beobachtet werden. Im Gegensatz zu vielen anderen Transkriptionsfaktoren basiert die Regulation der Transkription durch DksA nicht auf der Bindung des Transkriptionsfaktors an distinkten Nukleinsäuremotiven, sondern auf der Bindung der RNA-Polymerse (Lemke et al. 2011). Dabei bindet die lange „coiled-coil"-Domäne des DksA-Proteins im sekundären Kanal der RNAP nahe dem aktiven Zentrum. Diese Transkriptionsregulation über direkte RNAP-Interaktion, anstelle der Erkennung bestimmter Promotormotive, ermöglicht dem Transkriptionsfaktor prinzipiell eine struktur- und sequenzübergreifende Regulation „aller" Promotoren. Lediglich die Art der Promotorregulation (aktivierend, inhibierend oder neutral) könnte nach solch einer Reprogrammierung der RNAP durch distinkte Promotormotive determiniert sein. Während das DksA-Protein, wie oben erwähnt, promotorübergreifend die Bildung offener Komplexe benachteiligt (Rutherford et al. 2007), ist DksA ebenso maßgeblich an der direkten Aktivierung von Aminosäurebiosynthesepromotoren beteiligt (siehe 4.2 und (Paul et al. 2005)). Es ist vorstellbar, dass in verhältnismäßig hohen Konzentrationen von DksA bestimmte Regulationsbarrieren überwunden werden und Promotormotive, die unter geringer DksA-Konzentration nicht aktiviert werden, ab einer bestimmten DksA-Konzentration auf den DksA-RNAP-Komplex reagieren.

A. A. Travers analysierte 1984 die sogenannten Diskriminatorsequenzen (siehe 1.5.2), deren Sequenzen über Inhibierung bzw. Aktivierung innerhalb der Stringenten Kontrolle entschieden (Travers 1984). Er konnte nicht nur zeigen, dass der positiv stringenten Regulierung diverser Promotoren ein AT-reicher Diskriminator zugrunde liegt, sondern zusätzlich, dass innerhalb dieser AT-reichen Diskriminatorsequenz distinkte Positionen (Position -4; -3 und +3 in Relation zum Trankriptionsstart) höher

konserviert sind. Zusammenfassend ist vorstellbar, dass die oben beschriebenen, unerwarteten Promotoraktivierungen auf möglicherweise kryptischen Variationen dieser oder ähnlicher Promotorstrukturen zurückzuführen sind (Zacharias et al. 1989, Zacharias et al. 1990).

Nachdem es wie oben beschrieben nicht gelang, die *in vivo* beobachtete differentielle stringente Regulierung der *rrn*-Promotoren nachzustellen, wurde versucht durch Variationen die obig gewählten, standardmäßig in unserem Labor durchgeführten Bedingungen der *in vitro* Transkriptionen der *in vivo* Situation anzugleichen. Inspiriert aus den Ergebnissen von Kriel et al. (Kriel et al. 2012), welche in *Bacillus subtilis* einen Mechanismus der Stringenten Kontrolle basierend auf einer Ausdünnug des GTP-Pools beschrieb, wurden „multiple-round“ *in vitro* Transkriptionen unter GTP-limitierten Bedingungen durchgeführt (siehe Material und Methoden). Dieses hatte jedoch ebenfalls keine differentielle Regulation der *rrn*-Promotoren zur Folge (siehe Abb. 4.1.2).

Es ist bekannt, dass die binären offenen Komplexe der rRNA P1-Promotoren nur durch Binden der ersten NTPs der Transkriptsequenz eine stabile Konformation (RPi, intermediärer Komplex) ausbilden können (Barker et al. 2001, Gourse 1988, Langert et al. 1991). Die Km-Werte für den Einbau dieser iNTPs scheinen in *rrn*-Promotoren ungewöhnlich hoch zu sein und durch die Gegenwart von ppGpp noch gesteigert zu werden (Lew and Gralla 2004, Schneider et al. 2002). Es konnte gezeigt werden, dass ppGpp die Halbwertszeit ribosomaler Promotoren zusätzlich verkürzt (Barker et al. 2001). Desweiteren wurde vermutet, dass die Bindung von DksA im aktiven Zentrum der RNAP den NTP-Einbau behindert (Rutherford et al. 2009). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch Erhöhen der jeweiligen iNTP-Konzentrationen die Regulation der jeweiligen *rrn*-Promotoren differentiell beeinflusst werden kann (siehe Abb. 4.1.3 und 4.1.4). Die erhöhten iNTP-Titer scheinen die obig beschriebenen Effekte von DksA und ppGpp direkt zu kompensieren. Ein ähnlicher Mechanismus konnte in unserem Labor von Lars Jöres 2003 für ATP-startende *rrn*-Promotoren beschrieben werden (Jores and Wagner 2003). Die Annahme einer direkten Kompensation des ppGpp- und DksA-vermittelten Mechanismus durch das Startnukleotid wird von der Beobachtung unterstützt, dass diese Kompensation durch

hohe Konzentrationen an DksA wieder aufgehoben werden kann (siehe Abb. 4.1.3 und 4.1.4).

Lange Zeit konnte die Struktur der *E. coli* RNAP, im Gegensatz zu der von *Thermus thermophilus,* kristallographisch nicht aufgeklärt werden. Aufgrund der hohen Homologie der beiden Enzyme, wurden daher Erkenntnisse über die stringente Regulation in *E. coli* aus der RNAP-Struktur von *Thermus thermophilus* gezogen. Diese ließ vermuten, dass ppGpp in *E. coli* ebenso wie DksA im aktiven Zentrum der RNAP bindet und dort die Koordination des katalytisch essentiellen Mg^{2+} beeinflusst. Dadurch könnte die Zugänglichkeit des Mg^{2+} für die iNTPs direkt oder indirekt beeinträchtigt werden. Durch einen Überschuss an iNTPs könnte dieser Prozess kompensiert werden (Jores and Wagner 2003). In Anbetracht der Erkenntnisse aus der kürzlich veröffentlichten Kristallstruktur der *E. coli* RNAP (Zuo et al. 2013) wird jedoch ein anderer Mechanismus wahrscheinlicher.Die Autoren konnten für die *E. coli* RNAP eine ppGpp-Bindestelle außerhalb des aktiven Zentrums an der β´- und der ω-Untereinheit identifizieren. Aufbauend auf der Position dieser Bindestelle wurde ein allosterischer Regulationsmechanismus postuliert.

Der Aufbau der RNAP wird mit der Struktur einer Krabbenschere verglichen. Sie besteht aus unbeugsamen Modulen, die jedoch zueinander eine gewisse Mobilität aufweisen (Murakami et al. 2002, Cramer et al. 2001, Tagami et al. 2010). Das katalytische Zentrum liegt zwischen dem sog. „core“ und dem „shelf“ Modul. Durch die Bindung von ppGpp wird die intrinsische Flexibilität dieser beiden RNAP-Module in *E. coli* stark beeinträchtigt. Diese Flexibilität spielt unter anderem bei dem Nukleotideinbau eine erhebliche Rolle, so dass sich ppGpp verlangsamend auf den (i)NTP-Einbau auswirkt (Zuo et al. 2013). Wie oben erwähnt, ist der Einbau der iNTPs für die Stabilität und damit für die Regulation ribosomaler Promotoren von zentraler Bedeutung, womit die Regulation dieser Promotorenklasse durch ppGpp erklärt wird. Auch in diesem Mechanismus könnte ein Überangebot an iNTPs die ppGpp-induzierte Destabilisierung der offenen ribosomalen Komplexe kompensieren.

Aufgrund der oben beschriebenen Beobachtungen, inklusive der von Jöres und Wagner (Jores and Wagner 2003), kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei

der Substratkompensation um ein potentes regulatorisches Element der Stringenten Kontrolle in *E. coli* handelt.

5.2 Bedeutung der ω-Untereinheit für die Stringente Kontrolle in *E. coli*

1969 wurde die ω-Untereinheit gleichzeitig mit der Entdeckung der anderen *E. coli* RNAP-Untereinheiten erstmals beschrieben (Burgess 1969b). Dennoch sind die Aufgaben und Funktionen der β-, β´-, α-, sowie der σ-Untereinheiten im Aufbau bzw. in der Regulation vieler Prozesse bis heute bei weitem besser untersucht und verstanden als für ω (Sarkar et al. 2013). Die ω-Untereinheit ist auf dem *rpoZ*-Gen kodiert und mit 10,1 kDa (91 AS) die kleinste Untereinheit des „Multisubunit"-Komplexes (Burgess 1969b, Gentry and Burgess 1990). „cross-link"-Studien haben ergeben, dass ω exklusiv an β´ bindet und diese Bindung die Assemblierung von β´ an den α_2β-Komplex fördert (Gentry and Burgess 1993, Ghosh et al. 2001).

Lange Zeit galt ω nicht als RNAP-Untereinheit, da eine Deletion von ω im Gegensatz zu α, β, und β´ *in vivo* keinerlei Einfluss auf den Zellstamm zu haben schien (Burgess 1969a). Weiterführende Analysen ergaben jedoch, dass diese Deletion *in vivo* durch Proteine wie DksA und dem globalen Chaperon GroEL kompensiert wurde (Vrentas et al. 2005, Minakhin et al. 2001).

Nach dem in dieser Arbeit den iNTPs eine Rolle in der Regulation ribosomaler Promotoren bestätigt werden konnte (siehe 4.1), folgten Analysen zur Charakterisierung weiterer, der Stringenten Kontrolle zugrunde liegender Komponenten. Zu diesem Zeitpunkt war eine Beteiligung von ω an der Stringenten Kontrolle durch Vorarbeiten anderer Gruppen zwar beschrieben worden (Mathew and Chatterji 2006, Chatterji et al. 2007), der Mechanismus war jedoch noch im Unklaren (Ross et al. 2013). Zudem konnte ω in den bis dahin angestellten Studien unserer Arbeitsgruppe nicht eindeutig als Faktor der Stringenten Kontrolle identifiziert werden (Delic Denis - Diplomarbeit 2006 (Einleitung), Athanasios Platis - Diplomarbeit

2010). Darauf aufbauend wurde ω als Komponente der Stringenten Kontrolle in dieser Arbeit tiefergehend analysiert.

In einem ersten Schritt wurde die Auswirkung der ω-Untereinheit auf die Bindung der RNAP an stringenten und nicht stringenten Promotoren in Form von Retardierungsanalysen (siehe 4.2.1 und 4.2.2) untersucht. Hierzu wurden die gebildeten Komplexe der Δω- und der WT-RNAP unter dem Einfluss von ppGpp und/oder DksA miteinander verglichen. Mittels Analyse der Komplexbildung beider Polymerasen an einen als nicht stringent geltenden Promotor wurde das System auf seine Anwendbarkeit hin überprüft. Weiterhin konnte so getestet werden, ob sich die ω-Untereinheit in unserem System auch unter nicht stringenten Aspekten auf die Bindung an Promotoren auswirkt. Als Bindepartner diente das *tac*-Promotorfragment. Wie in 1.6 beschrieben, handelt es sich bei dem *tac*-Promotor um einem starken, jedoch in der Natur nicht vorkommenden Promotor, der in der Vergangenheit als nicht stringent reguliert charakterisiert werden konnte (Pribnow 1975, Zacharias et al. 1989). Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen konnten ω nicht mit der Regulation stringent unabhängiger Promotoren in Verbindung bringen. Weder DksA noch ppGpp oder beide Effektoren gemeinsam hatten in den getesteten Konzentrationen und in Relation zur WT-Probe einen Effekt auf die Bindung der Promotorfragmente (siehe Komplexe K2). In Anbetracht des in 4.1 diskutierten unspezifischen Effekts von DksA auf Promotoren, die als nicht stringent reguliert gelten, ist zu erwähnen, dass ein vergleichbarer Effekt unter den getesteten Bedingungen auf den *tac*-Promotor nicht beschrieben werden konnte. Desweiteren konnte durch die Messung der *tac*-RNAP-Bindungen gezeigt werden, dass das System Schwankungen im Bereich von ca. 10 % der Gesamtkomplexintensität unterlag, welche unabhängig von der Probenzusammensetzung auftauchten. Wie in der Abbildung dargestellt, kam es bei den *tac*-Bindeanalysen regelmäßig zur Bildung unspezifischer Komplexe oberhalb der spezifischen Komplexbande. Gerade bei nativen Gelen ist dies keine Seltenheit. Das hier eingesetzte *tac*-Fragment hatte eine Länge von ca. 400 bp. Potentielle Dimere, beispielsweise resultierend aus Bindungen nicht vollständig aufgefüllter Schnittstellen, hätten demnach eine Länge von ca. 800 bp. Sollten diese von einer Polymerase gebunden werden, könnte das Laufverhalten dieses RNAP-„Doppelfragment-Komplexes“, wie in der Abbildung dargestellt, von dem der „Einzelfragment-Komplexe“ abweichen.

Auch an der Transkriptionskontrolle stringent positiv kontrollierter Promotoren, unter Bedingungen der Stringenten Kontrolle, scheint ω nicht beteiligt zu sein. Stellvertretend dazu wurde in den hier vorliegenden Analysen die stringente Regulation des *hisG*-Promotors untersucht, welcher alle strukturellen Merkmale eines stringent positiv gesteuerten Promotors enthält (Travers 1984).

In Anbetracht der durchschnittlichen 10 % Schwankungen nahmen die Komplexe der RNAP- und *hisG*-Fragmente in Relation zur effektorfreien Probe durch Zugabe von 2 µM DksA um 35 % bis 45 % zu. Dieser positive Effekt von DksA auf die Stabilität der gebildeten Komplexe scheint sowohl ω- als auch ppGpp-unabhängig zu sein. Er ist in beiden Polymerase-Präparationen auch in Abwesenheit von ppGpp vergleichbar zu beobachten und lässt sich durch die Zugabe von ppGpp nicht zusätzlich steigern.

Die Retardierungsanalysen des stringent inhibierten *rrnB* P1-Promotors zeigten in Abhängigkeit von ω und in Einklang mit den Schilderungen von Vrentas et al. (Vrentas et al. 2010) eine deutlich differenzierte stringente Regulation. Hierbei zeigten die spezifischen Komplexe der wildtypischen RNAP (Komplex 1 u 2, Abb. 4.2.1.3) einen mit den *in vitro* Transkriptionen unter Standardbedingungen (siehe 4.1.1) vergleichbaren stringenten Verlauf. DksA alleine wirkte sich weder initiationsfördernd noch hemmend auf die Komplexbildung aus. Währenddessen verursachte ppGpp auch in Abwesenheit von ppGpp einen Einbruch der Komplexbildung um ca. 40 %. Dieser konnte durch die Supplementierung von DksA in Gegenwart von ppGpp zusätzlich um ca. 20 % gesteigert werden. Im Gegensatz dazu konnte die Abwesenheit der ω-Untereinheit, zusätzlich zu der für die WT-Komplexe beschriebenen Toleranz gegenüber DksA, die Sensitivität der Komplexe gegenüber ppGpp in Abwesenheit von DksA aufgehoben werden. Ausschließlich durch Kombination der beiden Effektoren konnte die Komplexbildung an dem *rrnB* P1-Promotor gestört werden. Dieses resultierte in einem mit der WT-Situation vergleichbaren Einbruch der Komplexbildung um insgesamt 52 % in Relation zur effektorfreien Probe.

Die Retardierungsanalysen der *rrnB* P1-Promotorregulierung wurden durch das Auftreten von effektor- und ω-unabhängigen, unspezifischen Banden erheblich erschwert. Zusätzlich zu den schon für die *tac*-Retardierungsanalysen diskutierten unspezifischen Komplexen Nr. 1 (vermutlich Komplexe mit dimerisierten Fragmenten,

Länge hier ca. 500 bp für das Dimer), konnten regelmäßig drei weitere Komplexe (Nr. 2 bis 4) aufgetrennt werden (siehe 4.2.1.3 und 4.2.2.1). Während sich die Komplexe Nr. 3 und 4 in Abhängigkeit zu ω gleichermaßen negativ stringent kontrolliert zeigten, waren die Komplexe Nr. 2 nur eingeschränkt ppGpp und/oder DksA gesteuert (ausführlich beschrieben in 4.2.1.3). Durch die in 4.2.2 durchgeführten Analysen konnten die Komplexe Nr. 3 und 4 deutlich als die der spezifischen RNAP-Promotorinteraktion identifiziert werden. Diese zeigten nicht nur als einziges den typischen in der Literatur beschriebenen Verlauf ribosomaler Promotoren unter Bedingungen der Stringenten Kontrolle, sondern standen auch als einzige in direkter Abhängigkeit zur Gegenwart der iNTPs, eine Besonderheit, die allen rRNA P1-Promotoren in *E.coli* gemein ist. Das unterschiedliche Laufverhalten im Gel könnte darauf deuten, dass es sich um zwei unterschiedliche Komplexe handeln könnte. So wäre es z.B. möglich, dass es sich bei den Komplexen mit höherer Mobilität beispielsweise um Elongationskomplexe handelt. Für den Komplex Nr. 2 wäre einer Interaktion mit einer unspezifischen RNAP-Bindestelle denkbar. Diese scheint ziemlich stabil zu sein, sich jedoch in ihren Bindemotiven von denen der ribosomaler Promotoren zu unterscheiden. Dadurch reagiert sie in Relation zu den rRNA -RNAP-Komplexe anders auf ppGpp und/oder DksA. Auch wenn die Natur von Komplex Nr. 2 nicht genauer aufzuklären war, ist jedoch auszuschließen, dass es sich bei den unspezifischen Banden um Komplexe aus reinitiiertem Core-Enzym nach Sigmadissoziation handeln könnte. Diese Möglichkeit wäre nicht nur aus der in 1.2.1 beschriebenen Unabdingbarkeit des Sigmafaktors für RNAP-Promotorinitiationen unwahrscheinlich, sondern konnte auch durch den in 4.2.2.1 dargestellten Ansatz aus Core-Enzym in Gegenwart von Promotor und iNTP ausgeschlossen werden.
Im Gegensatz zu 4.2.1.3 ergab die Analyse in 4.2.2.1 zusätzliche Banden in der RNAP-freien Spur. Durch Zugabe von Holo-Enzymen konnte diese Bandenbildung wieder aufgehoben werden. Dies spricht für ein typisches Artefakt resultierend aus einem fehlerhaften Zurückfalten des Fragments nach der radioaktiven Markierung. Dieses Artefakt sollte die Retardierungsanalysen allenfalls gerinfügig beeinträchtigen und bestätigt jedoch durch sein Erscheinen in den Proben des Core-Enzym-Ansatzes, dass dort keine RNAP-Promotor-Bindung stattgefunden hat.

Durch BiaCore-Messungen (siehe 3.3.5) konnte bei der Bildung der offenen *tac*-RNAP-Komplexe unabhängig von Omega ein KD-Wert von 10^{-9} bis 10^{-10} M bestimmt

werden. Die RNAP-Komplexe des *his*G-Promotors bildeten sich bei KD-Werten zwischen 10^{-7} bis 10^{-9} M (WT) bzw. 10^{-6} bis 10^{-8} M (Δω), während die offenen Komplexe zwischen *rrnB* P1-Promotor und RNAP mit einem KD von 10^{-8} bis 10^{-9} M in der Wildtypsituation und 10^{-7} bis 10^{-8} M entstanden. Es ist anzumerken, dass bei diesen KD-Werten immer von der gleichen RNAP-Charge ausgegangen wurde, so dass sie nicht als allgemein gültig, sondern ausschließlich in Relation zur vorliegenden Chargenqualität angesehen werden können. Desweiteren ist zu erwähnen, dass die absoluten KD-Werte der Proben durch Anwesenheit des Kompetitors Herparin (siehe unten) vor Komplexbildung verschoben wurden. Um dennoch Vergleiche zwischen zwei unterschiedlichen Chargen (hier WT und Δω) anstellen zu können, wurden die Einflüsse der getesteten Faktoren auf die Komplexbildung in Relation zur Komplexbildung des jeweiligen *tac*-Promotor-RNAP-Komplexes bestimmt. Dieser konnte sowohl mittels BiaCore-Messung als auch in den Retardierungen als nicht durch die getesteten Faktoren (ω, DksA und ppGpp) beeinflusst beschrieben werden und eignete sich daher gut als interner Standard. Es konnte gezeigt werden, dass durch Zugabe von DksA der KD der *hisG*-Komplexe um das 3-fache (WT) bzw. 5-fache (Δω) gesenkt werden konnte. Im Gegensatz zu den Retardierungsanalysen konnte dieser Effekt durch die zusätzliche Zugabe von ppGpp, unabhängig von ω, sogar noch gesteigert werden. Parallel dazu konnte auch im BiaCore die ω-abhängige ppGpp-Sensitivität des *rrnB* P1-Promotors dargestellt werden. Während in der wildtypischen Probe der KD nach Zugabe von ppGpp um das 100-fache anstieg, blieb selbiger in Abwesenheit von ω ppGpp-unbeeinflusst. DksA hatte in Abwesenheit von ppGpp in keiner der beiden RNAP-Spezies einen Effekt auf die Komplexbildung. Eine Messung der P1-Komplexe in Gegenwart beider Effektoren war unter den getesteten Bedingungen leider nicht möglich, da unter diesen Umständen augenscheinlich keine Komplexe gebildet werden konnten. Dieses steht gänzlich im Widerspruch zu den bisher Dargestellten und lässt sich durch die Anwesenheit des Heparins vor Komplexbildung erklären. Eine besondere Herausforderung dieser Analysen begründete sich in der Art und Weise wie RNAP Promotor-DNA erkennt und bindet. Dieses geschieht nicht etwa durch herkömmliche Assoziation an der Zielsequenz, sondern beinhaltet einen Vorgang nicht spezifischen Bindens an jeglicher DNA. Zahlreiche unspezifische Interaktionen zwischen DNA und RNAP konnten in der Vergangenheit beschrieben werden. Wahrscheinlich sind hierbei Kontakte an den Fragmentkanten, die vorzugweise von RNAPs gebunden werden. Auch sind

sogenannte „sliding“ Mechanismen beschrieben worden, die auf schwache unspezifische Interaktionen zwischen RNAP und DNA basieren und wichtige Intermediate der spezifischen Promotorerkennung sind (Wagner 2000).Auch wenn „sliding“ aufgrund der geringen Länge der hier eingesetzten Fragmente keine Rolle spielen sollte, ist eine unspezifische Interaktion der RNAP an die DNA nach vergleichbarem Mechanismus nicht auszuschließen. Unter Standardbedingungen konnte im BiaCore nicht zwischen unspezifischer und spezifischer Bindung unterschieden werden, welches die Analyse spezifischer Promotoreffekte korrumpierte. Zur Vermeidung dieser Heparin-sensitiven, unspezifischen Bindungen wurden die Messungen in Anwesenheit von Heparin durchgeführt. Hierbei wurden Konzentrationen gewählt, in denen die Bindungen der RNAP in Relation zu den Heparin-freien Ansätzen, um 30 % bis 50 % vermindert waren (siehe 3.3.5.2). Die in 1.3.1 beschriebenen Eigenschaften von RNAP-Promotorkomplexen, während der Transkripitonsinitiation unterschiedliche stabile Konformationen auszubilden, führte dazu, dass sich bei der Messung der Komplexkinetiken auf die Bestimmung der KD-Werte beschränkt wurde und auf die Berechnung der K_{on}- und K_{off}-Werte verzichtet wurde.

Nach Charakterisierung der ω-abhängigen Initiation der oben beschriebenen, unterschiedlich stringent gesteuerten Promotoren folgten „run-off“ *in vitro* Transkriptionsanalysen, wodurch der Rahmen der Analysen von Transkriptionsinitiation zusätzlich um den Einfluss der Transkriptionselongation erweitert wurde. Da es sich bei den eingesetzten Transkriptionsmatrizen um linearisierte Fragmente handelte, wurde die Termination durch „Abfallen“ der RNAP nach Erreichen des Fragmentendes erzwungen („run-off“-Transkription). Daher waren Analysen der ebenfalls als potenziell regulativ geltenden Termination nicht möglich. Dazu hätte die Transkription durch distinkte Terminationsmotive terminiert werden müssen.

Auffallend war die hohe probeübergreifende Bildung unspezifischer Produkte in den *in vitro* Transkriptionen besonders häufig in den Transkripten des *hisG*-Promotors zu beobachten. Oft sind diese auf Durchleseprodukte der Terminationssignale zurückzuführen. Dieses konnte jedoch, wie oben erläutert, in diesem Falle ausgeschlossen werden. Während alle drei Promotorfragmente eine vergleichbare

Länge von ca. 350 bp haben, war das aus der Promotorsequenz abgeleitete erwartete Transkript des *hisG*-Promotors mit 40 bp mit Abstand das kürzeste. Um dennoch einen vergleichbaren radioaktiven Einbau zu erhalten, wurde *hisG*-Fragment in Überschuss zugegeben und in höherer Konzentration auf dem Gel aufgetragen. Bei geringer Transkriptgröße steigt zusätzlich auch die Wahrscheinlichkeit, dass sich das gewünschte Zielfragment in der Anzahl der bp weniger deutlich von Abbruchtranskripten der Reaktion unterscheidet. Diese sind in Transkriptionsreaktionen häufiger zu beachten und bei einer Größe von bis zu ca. 10 nt sogar Anteil transkriptionsregulatorischer Mechanismen. Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass es sich bei den unspezifischen Banden der kleineren Fragmente um diese sogenannten abortiven Transkripte handelt. Die unspezifischen Produkte oberhalb der Laufhöhe der jeweiligen spezifischen Promotortranskripte könnten aus vorzeitig initiierten Transkriptionen entstammen oder auf nicht denaturierte Polymere zurückzuführen sein. Letzteres könnte zumindest für die Produkte der Fall sein, die einen ähnlich stringent gesteuerten Verlauf zeigen wie die spezifischen Promotorprodukte. In Bezug auf die *hisG*-Transkription ist zusätzlich zu erwähnen, dass sich drei „spezifische“ Produkte identifizieren ließen. Ein Phänomen, das unter bestimmten Bedingungen bei einigen Promotoren *in vitro* öfters zu beobachten ist und z.B. durch Transkriptionsstartverschiebungen um wenige Nukleotide zu erklären ist.

Das Einbeziehen der Transkriptionselongation mittels „multiple-round“ *in vitro* Transkription wirkte sich in keiner Weise auf das in den Initiationsstudien beschriebene Muster der ω-abhängigen, stringenten Steuerung des *tac*-Promotors aus. Im Gegensatz dazu, waren die *hisG*-Ergebnisse der „multiple-round“ *in vitro* Transkription 100 % deckungsgleich mit denen der Initiationsstudien. Obwohl auch hier die Aktivität des Aminosäurebiosynthese Operon-Promotors durch Co-Supplementierung von DksA und ppGpp deutlich gesteigert werden konnte, könnte sich dieser Effekt als ω-abhängig herausstellen. In zwei von drei Fällen war die Aktivierung des Promoters durch DksA und ppGpp in Anwesenheit von ω deutlich intensiver als in den ω-freien Proben. Vergleicht man jedoch die Bandenintensität der *hisG*-Produkte beider RNAP-Spezies in Gegenwart von DksA und ppGpp im Autoradiogramm, so ist zu erkennen, dass sich beide Proben deutlich weniger gravierend voneinander unterscheiden, als es die Quantifizierung vermuten lassen würde. Der steile Anstieg in der WT-Probe resultierte aus der verhältnismäßig

geringen Bandenintensität der effektorfreien Probe, über die die Transkription der anderen Proben relativiert wurde. Mangels eines internen Standards lässt sich dieses an dieser Stelle nicht endgültig aufklären. Weiterhin konnte abweichend zu den Initiationsstudien in der Abwesenheit von ω keine gesteigerte Transkription des Promotors durch DksA alleine induziert werden. Vergleichbar mit den Initiationsstudien mittels BiaCore und im Widerspruch zu den Retardierungsanalysen, wirkte sich die gleichzeitige Präsenz beider Effektoren, deutlich stärker auf die Transkription des *hisG*-Promotors aus als auf die von DksA alleine. Trotz der Widrigkeiten der *hisG*-Analysen, ergab die P1 *in vitro* Analyse (wie oben für die *tac*-Transkription beschrieben) ein Regulationsmuster, welches innerhalb der 10%-Schwankungen deckungsgleich mit den Initiationsstudien verlief.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass in Einklang mit den letzten Veröffentlichungen die ω-Untereinheit ein wichtiger Faktor der Transkriptionsregulation in *E. coli* ist (Vrentas et al. 2010, Sarkar et al. 2013, Ross et al. 2013). Dabei beschränkt sich der Einfluss von Omega auf die Regulation stringent negativ regulierter Promotoren. Weder stringent unabhängig, noch positiv gesteuerte Promotoren sind sensitiv für die ω-vermittelte Regulation.

Lange Zeit wurde aufbauend auf einer RNAP-Struktur aus *T. thermophilus* für ppGpp einen ähnlichen Regulationsmechanismus wie für DksA vermutet. Dabei schien ppGpp direkt im aktiven Zentrum zu agieren. Neuste Veröffentlichungen identifizierten jedoch in der *E.coli* RNAP eine ppGpp-Bindestelle, welche abseits des aktiven Zentrums lokalisiert ist (Ross et al. 2013, Zuo et al. 2013). Diese Bindestelle involviert einen Teil von ω, welches die Beteiligung dieser RNAP-Untereinheit an der Regulation negativ stringent regulierter Promotoren erklärt. Unterstützt wird dieses durch die Beobachtung, dass DksA-abhängige Promotoren wie die des *hisG*-Promotors über einen anderen Wirkmechanismus (der Bindung des Proteins im sekundären Kanal der RNAP) ω-unabhängig reguliert werden.

In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass ppGpp und DksA nicht nur synergistisch, sondern auch antagonistisch zueinander als Regulator fungieren (Aberg et al. 2009). Auch diese Beobachtung wäre durch die Regulierung über zwei unterschiedliche Wirkmechanismen gut zu erklären. Bisher ist der synergistische

Mechanismus von ppGpp und DksA anhand der neu beschriebenen ppGpp-Bindestelle noch nicht geklärt. Die Arbeiten von Ross et al. 2013 (Ross et al. 2013) und Zuo et al. 2013 (Zuo et al. 2013) beschreiben einen allosterischen Regulationsmechanismus durch ppGpp. Hierbei wird durch eine Bindung des Alarmons an ω und β´ die intrinsische Dynamik der RNAP wie oben beschrieben gestört. Die Bindung durch DksA könnte zu einer Konformationsänderung führen, die es ppGpp ermöglicht trotz fehlender ω-Bindestelle alternativ zu binden und so die RNAP-Modulflexibilität sterisch zu behindern. 2009 postulierte Rutherford et al. (Rutherford et al. 2009) ein Modell, in dem DksA, ebenfalls wie oben für ppGpp beschrieben, allosterisch die Aktivität stringent gesteuerter Promotoren reguliert. Hierbei beeinflusst die Bindung im sekundären Kanal der RNAP, wie es auch kürzlich für pppGpp beschrieben wurde (siehe oben), die intrinsische Flexibilität des Enzyms. Dieser Effekt könnte ausschlaggebend für die beschriebene kompensatorische Wirkung von DksA auf die ω-abhängige ppGpp-Toleranz ribosomaler Promotoren sein. Die Deletion von ω trunkiert die ppGpp-Bindestelle, so dass die ppGpp-RNAP-Interaktion ausschließlich über die Bindung von ß´ stattfinden kann. Es wäre denkbar, dass diese Bindung alleine nicht stark genug ist, die intrinsische Flexibilität der RNAP ausreichend zu limitieren. Der oben beschriebene fixierende Effekt durch DksA könnte in diesem Fall die dazu fehlende Energie kompensieren und gemeinsam mit ppGpp die Module der ΔωRNAP adäquat fixieren.

Auf die markante Rolle des binären offenen Komplexes in der Transkription und damit in der Anpassung von Bakterien an Umweltbedingungen ist in dieser Arbeit des öfteren hingewiesen worden. Daher wurde parallel zu dem oben beschriebenen Einfluss der ω-Untereinheit auf die Regulation des *rrnB* P1-Promotors analysiert, ob ω eine direkte Involvierung in der Isomerisierung vom geschlossenen zum offenen Komplex nachgewiesen werden kann. Das Aufschmelzen der Promotorstränge geschieht in der Regel bei Temperaturen unterhalb der sich aus den Basenpaaren ableitenden Schmelztemperatur. Die dazu notwendige Energie entstammt unter anderem aus der Superhelikalität der DNA und der Interaktion mit der RNAP (Wagner 2000). Dabei sind nicht alle Untereinheiten des Enzymes gleichermaßen an dem Strangaufbruch beteiligt. So konnten beispielsweise distinkten Domänen der σ^{70} eine

direkte Beteiligung an der Bildung des binären offenen Komplexes nachgewiesen werden (Wagner 2000). Weiterhin konnte Burns et al. 1999 eine Beteiligung der α-Untereinheit bei der Bildung offener Komplexe an bestimmten Promotoren nachweisen (Burns et al. 1999).

Die Beteiligung von ω an der offenen Komplexbildung wurde anhand von „(pseudo)-single-round“ *in vitro* Transkriptionen analysiert. Diese ermöglicht eine Betrachtung des ersten Transkripts einer Transkription und lässt daher direkte Schlüsse auf die Bildung stabiler offener Komplexe zu. Obwohl, wie oben beschrieben, die Trennung der Promotorstränge unterhalb der Schmelztemperatur der Basenpaare liegt, ist sie dennoch nicht temperaturautark. So konnte die Arbeitsgruppe um Gourse beispielsweise in diversen Veröffentlichungen eine temperaturabhängige Isomerisierung der *rrnB* P1-Promotorkomplexe beschreiben (Rutherford et al. 2009). Daher wurde untersucht, ob sich die An- bzw. Abwesenheit von ω auf die Isomerisierungstemperatur vom geschlossenem zum offenen Komplex auswirkt. Die Analysen mit variierender Initiationstemperatur (von 1 °C bis 30 °C,) ergaben eine deckungsgleiche prozentuale Bildung binärer offener Komplexe in beiden RNAP-Varianten (Abb. 4.2.5.1). Es ist zu betonen, dass in diesen Experimenten der *rrnB* P1-Promotor in Form von superhelikaler Plasmid-DNA eingesetzt wurde. Ein hoher Grad an Superhelikalität wirkt sich fördernd auf die DNA-Strangtrennung aus und erniedrigt damit die benötigte Schmelztemperatur. So konnte nach dreifacher Expositionszeit der in Abb. 4.2.5.1 dargestellten Röntgenfilme ω-unabhängig selbst bei Temperaturen um 1 °C die ersten offenen Komplexe beobachtet werden. Die optimale Temperatur zur Bildung offener Komplexe beider RNAP-Spezies lag bei 20 °C. Temperaturen über 20 °C schienen die offene Komplexbildung beider RNAP eher zu hindern. So konnte ein Einbruch in der Menge der gebildeten offenen Komplexe bei Temperaturen von 25 °C und darüber beobachtet werden. Dieser scheint in Gegenwart von ω etwas seichter zu verlaufen. Dennoch ist im Großen und Ganzen davon ausgegangen worden, dass in Abwesenheit von DksA und/oder ppGpp die ω-Untereinheit keinen Einfluss auf die temperaturabhängige Bildung offener Komplexe und somit nicht auf die Thermodynamik der Komplexbildung ausübt.

Darauf aufbauend wurde in weiterführenden Analysen getestet, ob durch stringente Bedingungen die Isomerisierung zu den offenen Komplexen ω-abhängig beeinflusst

werden kann. Dieses geschah wie nach obigem Beispiel durch Herabsetzen der Initiationstemperatur in „(pseudo)-single-round“ *in vitro* Transkriptionen. Es wurde je ein Transkriptionsansatz mit wildtypischer bzw. ω-defizienter RNAP parallel angesetzt, aliquotiert und die Transkription in den Aliquoten entweder bei 12 °C oder 30 °C initiiert. Wie in Abbildung 4.2.5.1 zu erkennen ist, lag die Komplexbildung bei einer Transkriptionsinitationstemperatur von 12 °C ω-unabhängig bei ca. 65 % der maximalen Komplexmenge. Es wurde erwartet, dass sich unter diesen suboptimalen Bedingungen für die offene Komplexbildung ein Effekt durch ω bevorzugt auswirken würde. Die Analysen zeigten jedoch, dass sich die An- bzw. Abwesenheit der ω-Untereinheit auf die getesteten Ansätze unabhängig von den beiden gewählten Initiationstemperaturen auswirkte. Es ist daher festzustellen, dass unter den getesteten Bedingungen die ω-Untereinheit die temperaturabhängige Bildung der stringent regulierten *rrnB* P1-Promotorkomplexe nicht beeinflusst.

5.3 DksA als globaler Regulator der Stringenten Kontrolle

Sowohl die Ergebnisse der in 4.1 als auch der in 4.2 diskutierten Analysen unterstreichen die in der Literatur beschriebene zentrale Rolle des DksA-Proteins im Prozess der Stringenten Kontrolle. Das 17,9 kDa große Protein ist einerseits ein zentraler Faktor bei der ppGpp-vermittelten Regulation diverser stringent gesteuerter Promotoren, konnte jedoch anderseits sowohl für zahlreiche ppGpp-unabhängige als auch ppGpp-entgegengesetzter Mechanismen verantwortlich gemacht werden (Aberg et al. 2009). Aufgrund der zentralen Bedeutung dieses Proteins für die Anpassung von *Escherichia coli* im Rahmen der Stringenten Kontrolle, wurde in dieser Arbeit DksA weitergehend analysiert. Die in Abb. 4.3.1.1 dargestellten Wachstumsanalysen zeigen deutlich, dass DksA trotz der hohen Anzahl an Prozessen, an denen dieses Protein beteiligt ist, im Vollmedium nicht essentiell ist. Der Verlauf der Wachstumskurven verdeutlicht, dass sowohl der *E. coli* Wildtyp- als auch der Deletionsstamm ein vergleichbares exponentielles Wachstum zeigen und eine vergleichbare maximale Zelldichte erreichen. Ähnliches konnte schon durch Kang et al. 1990 beschrieben werden. In ihrer Arbeit konnte zum ersten Mal das DksA-Protein beschrieben werden (Kang and Craig 1990). Schon damals wurde vermutet, dass DksA eine Komponente

zahlreicher Anpassungsprozesse in *E. coli* sein könnte. Dennoch zeigte die Deletion in Vollmedium keinerlei Auswirkung auf das Zellwachstum. Lediglich in Minimalmedium war ein deutlich reduziertes Zellwachstum der DksA-freien *E. coli*-Zellen zu beobachten.

Desweiteren ist jedoch in den in Abb. 4.3.1.1 gezeigten Graphen zu erkennen, dass der Δ*dksA*-Stamm die unterschiedlichen Wachstumsphasen (Latenz-, exponentielle-, stationäre Phase) versetzt zum Wildtypstamm vollzieht. Besonders deutlich wird dies bei dem frühzeitigen Austritt der DksA-Mutante aus der (Kang and Craig 1990) exponentiellen Phase und dem langgezogenen Eintritt in die stationäre Phase. Nach mathematischem „Fitten“ der Kurven konnte gezeigt werden, dass die Mutante ca. 1,2-mal so lange wie der WT-Stamm braucht, um 20 % bzw. 50 % der maximalen Zelldichte zu erreichen. Um 80 % der maximalen Zelldichte zu erreichen, benötigt der DksA-freie Zellstamm sogar 1,5-mal so lange. Das Erreichen hoher Zelldichte geht unter anderem mit der Verarmung des Zellmediums einher. Wie oben beschrieben, wirkt sich die Deletion von DksA auf das Wachstum der *E. coli*-Zellen unter Minimalbedingungen aus. Es ist also vorstellbar, dass die Δ*dksA*-Zellen eine Beeinträchtigung in der Anpassung an das Medium stationärer Zellen aufweisen und sich diese im veränderten Kurvenverlauf bei Verlassen der exponentiellen Phase ausdrückt.

Die Zugabe von SHX verursachte in beiden Stämmen einen abrupten Einbruch des Zellwachstums. Dieses verdeutlicht, dass auch ohne DksA *E. coli* stringent reguliert werden kann. Wahrscheinlich wird das Fehlen von DksA zumindest teilweise von ppGpp kompensiert. Auch wenn Wildtyp und Mutante gleicherweise die Zellteilung nach SHX-Zufuhr abstoppen, benötigt die Mutante deutlich länger, um sich von diesem SHX-Impuls wieder zu erholen. 21 Std. nach Auslösen der Stringenten Kontrolle, hatte der WT-Stamm eine Zelldichte erreicht, die vergleichbar mit der maximalen Zelldichte des SHX-freien Ansatzes war. Im Gegensatz dazu war die Zelldichte der SHX-belasteten Δ*dksA*-Zellkultur zum gleichen Zeitpunkt weiterhin deutlich unter der maximalen Zelldichte der SHX-freien Δ*dksA*-Zellkuktur.

Die oben beschriebene Phänotypisierung der DksA-Mutante unter stringent- und nicht stringenter Bedingungen folgten vergleichende Proteomanalysen. Hierzu wurden 30

min nachdem je in eine der beiden MG1655- bzw. CF9239-Kulturen durch SHX die Stringente Kontrolle ausgelöst wurde, allen der vier oben beschriebenen Flüssigkultur Zellen entnommen. Nach der Lyse wurde aus diesen Zellen Proteinextrakt aufgereinigt, anhand dessen mittels 2D-Gelelektrophorese die jeweiligen Proteome analysiert wurden.

In Tabelle 4.3.2.1 wurden alle in Abb. 4.3.2.1 und 4.3.2.2 identifizerten Proteine nach Funktion und Analysebedingung (jeweiliger Zellstamm in An- oder Abwesenheit von SHX) zusammengefasst.

Erwartungsgemäß ergab der Vergleich der beiden Proteome des WT-Stammes und der ΔdksA-Stammes schon ohne Auslösen der Stringenten Kontrolle markante Unterschiede. Dieses verdeutlicht, dass DksA nicht nur als Modulator der Stringenten Kontrolle in der Zelle fungiert, sondern darüber hinaus auch an einer Vielzahl anderer zellulärer Prozesse involviert ist (Magnusson et al. 2007). Als eine dieser Funktionen ist Unterdrückung des *dnak*-Phänotyps zu nennen, die die Entdeckung des DksA-Proteins zufolge hatte (Kang and Craig 1990).

Von besonderem Interesse waren in dieser Arbeit die Unterschiede in der Proteinexpression zwischen beiden Zellstämmen, die sich ausschließlich unter dem Einfluss von SHX unterschieden (kein Unterschied im Vergleich MG - zu CF - (Spalte 4 Tab. 4.3.2.1), jedoch Unterschied im Vergleich CF+ zu MG+ (Spalte 8 Tab. 4.3.2.1)). Bei diesen Spots handelt es sich um Proteine, deren unterschiedliche Expression ausschließlich auf das Fehlen von DksA im Rahmen der Stringenten Kontrolle zurückzuführen ist, welches direkt für die Beeinflussung der Stringenten Kontrolle durch DksA auf Proteinebene steht. Von den 20 stark reproduzierbaren, eingeschickten Proteinen traf dieses auf 11 zu. Berücksichtigt man die in Tab 4.3.2.1 vorgenommene funktionelle Einteilung der Proteine, wird deutlich, dass fünf der sechs identifizierten Proteine der Proteinbiosynthese einen Teil dieser 11 differenziel exprimierten Proteine bilden. Weiterhin traf dieses auf zwei von drei identifizierten Proteinen sowohl des Kohlenhydrat- als auch des Pyrin/Pyrimidinstoffwechsels zu. Bei den durch 2D-PAGEs analysierten Proteinen konnten weiterhin zwei der diferentiell exprimierten Proteine dem DNA-Reparatur-Mechanismus zugeordnet

werden. Auch diese zeigten in Gegenwart von SHX eine differentielle Expression im WT- und ΔdksA-Stamm.

Diese stringente Bedeutung von DksA auf Proteine der oben beschriebenen funktionellen Gruppen konnte auch in der Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen gezeigt werden. Diese konnten DksA- und/oder ppGpp-Deletionen in Zusammenhang mit verändertem Zellmetabolismus, Transport, Translation und DNA/RNA-Metabolismus in Verbindung bringen (Durfee et al. 2008, Cashel 1996, Perron et al. 2005). Aberg und Kollegen haben 2009 (Aberg et al. 2009) Transkriptionsanalysen veröffentlicht, in denen die Transkription von früh stationären *E. coli* Deletionsstämmen (OD_{600} 1,5; ppGpp0, Δ*dksA* und $ppGpp^0$-Δ*dksA*-Doppelmutante) miteinander verglichen wurde. Trotz des abweichenden experimentellen Aufbaus dieser Arbeit (Stringente Kontrolle durch 30 min SHX im Gegensatz zu frühstationären Zellen), konnten zahlreiche Übereinstimmungen in den Resultaten der hier dargestellten Proteomanalysen und den von Aberg veröffentlichten Transkriptomanalysen erkannt werden. Von den 20 identifizerten Proteinen wurden von Aberg 13 auch auf Transkriptionsebene erkannt. Allerdings zeigten diese nicht immer das gleiche Expressionsmuster. Dass nicht alle 20 der hier identifizierten Proteine in der oben genannten Transkriptionsanalyse vertreten sind bzw. ein unterschiedliches Expressionsmuster aufweisen, ist wahrscheinlich in dem oben beschriebenen unterschiedlichen experimentellen Aufbau bezüglich des Schaffens stringenter Bedingungen begründet. Durfee et al. veröffentlichten 2008 Transkriptionsanalysen von *E.coli* K-12 WT- und *relA*Δ251-Zellen, in denen die Stringente Kontrolle vergleichbar mit dieser Arbeit durch SHX ausgelöst wurde. Allerdings wurden bei diesen Trankriptomanalysen die Auswirkungen der Stringenten Kontrolle zeitlich gegliedert in 5; 10 und 30 min nach SHX Zugabe analysiert. Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass sich diese Chronologie drastisch auf die Anzahl der stringent regulerten Gene auswirkt (Durfee et al. 2008). Es ist zu vermuten, dass die Stringente Kontrolle unter den von Aberg et al. beschriebenen Bedingungen noch nicht so weit vorangeschritten war wie jene unter den gewählten Bedingungen der vorliegenden Arbeit. Diese Vermutung wird zusätzlich von der Beobachtung unterstützt, dass 7 der 13 sowohl auf Transkiptions- als auch auf Proteinebene identifizierten differenziell exprimierten Proteinen bzw. Genen (Vergleich MG1655 und CF9239) vor SHX-Supplementierung einen

vergleichbaren Trend bezüglich ihrer Expression verzeichneten. 30 min nach SHX-Zugabe traff dieses nur noch auf 4 der 13 Proteine/Gene zu.

Bei den in dieser Arbeit vorgestellten 2D-Gel-Proteomanalysen kann nicht zwischen direkten und indirekten Effekten von DksA auf das Proteom in *E. coli* unterschieden werden, da die aufgetrennte Proteinsuspension die Gesamtheit aller Proteine unabhängig ihres Induktions- bzw. Repressionsmechanismus darstellt. Die dargestellte Expression der Proteine ist also die Summe vieler Einflüsse wie beispielsweise Transkription, Translation und Proteinabbau.

Durch 2D-Proteomanalysen, in denen die Proteine in kurzen aufeinander folgenden Zeitpunkten isoliert würden, könnten direkte Effekte durch DksA zumindest annähernd von den nicht direkten Effekten differenziert werden. Hierbei sprächen schnelle, kurz nach SHX-Zugabe auftretende Veränderungen des Proteoms für eine direkte Regulation durch DksA. Mit zunehmender Dauer zwischen Auslösen der Stringenten Kontrolle und Proteinisolation würde die Wahrscheinlichkeit einer indirekten Regulation steigen.

Desweiteren konnte gezeigt werden, dass einige der in ΔdksA-Stämmen beobachteten Veränderungen nur bedingt direkt auf die DksA-Proteinfunktion zurückzuführen sind und vielmehr auf der daraus resultierenden Verschiebung der RNAP-Interaktionspartner beruhen. Die Deletion des DksA-Proteins resultiert demnach in einer erhöhten Zugänglichkeit des sekundären Kanals der RNAP. Dieser kann dann durch andere Transkriptionsfaktoren mit DksA-kompetitiver Bindestelle (z.B Gre-Faktoren) gebunden werden. Ein ähnlicher Mechanismus konnte für die in DksA-defizienten Stämmen gesteigerte Induktion von Genen der Chemotaxis und Flagellenbildung beschrieben werden. Diese zeigte sich als Gre-Faktor-abhängig und konnte durch Entfernen der Gre-Faktoren unterdrückt werden (Aberg et al. 2009).

6 Ausblick

In dem ersten Teil dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein hoher Titer an Startnukleotiden den Effekt von ppGpp und DksA auf ribosomale Promotoren kompensiert. Ribosomale Promotoren bilden kurzlebige und instabile offene Komplexe aus, welche erst nach Einbau der jeweiligen Startnukleotide stabilisiert werden können. Die KD-Werte dieser Startnukleotide gelten als vergleichbar hoch, wurden aber in *E.coli* für die einzelnen Nukleotide noch nie richtig bestimmt. Es wäre daher interessant, diese Zusammenhänge genauer zu analysieren. Eine Herausforderung bei solch einer KD-Wert-Bestimmung wäre die Limitierung des radioaktiv einzubauenden Nukleotids. Vorarbeiten haben jedoch gezeigt, dass dieses Problem durch nicht radioaktive *in vitro* Transkriptionen, deren Transkripte anschließend durch „primer extension“ detektiert wurden, umgangen werden konnte.

Desweiteren ist zu erwähnen, dass ppGpp lange Zeit als Effektor galt, der ebenso wie DksA im sekundären Kanal der *E. coli* RNAP bindet. Synergistische Effekte wurden durch gemeinsame Interaktionen im Rahmen dieser Bindestelle erklärt. Durch die neue von Zuo et al. identifizierte Bindestelle wird die Diskussion über die gegenseitige Beeinflussung jedoch neu entfacht, so dass es auch hier weiterer Studien bedarf.

Abschließend wäre es von Interesse die im dritten Teil dieser Arbeit dargestellten Proteomanalysen auszuweiten um z.B. durch Proteomkinetiken und diversen weiteren Mutanten (Bsp. Gra-Deletion (siehe Diskussion)) indirekte von direkten DksA-Effekten im Rahmen der stringenten Kontrolle unterscheiden zu können.

7 Danksagung

Sicherlich hat nicht jeder das Glück wie ich von sich zu behaupten zu können, er habe seine Dissertation in einem so großen Institut mit so vielen Kollegen anfertigen können, die einem alle durch die Bank weg freundlich und hilfreich zu Seite gestanden haben. Angesichts dessen gilt mein Dank in erster Linie gleichermaßen jedem einzelnen meiner Institutskollegen. Ich möchte mich bei Euch dafür bedanken, dass ihr mir stets hilfsbereit und lösungsorientiert zur Seite gestanden habt und dass ich mit Euch auch außerhalb der Laborbank zahlreiche schöne Augenblicke erleben durfte.

Desweiteren möchte ich an dieser Stelle jedoch nicht versäumen, einigen dieser Personen gesondert zu danken:

Besonders danken möchte ich Prof. Dr. Rolf Wagner für seine Geduld und die wissenschaftlichen Betreuung während dieser Arbeit. Seine Tür stand uns stets offen und die letzten Jahre waren für mich sehr lehrreich.

Ebenfalls möchte ich mich bei Prof. Dr. Dieter Willbold für die Übernahme der Konferenz bedanken sowie für die zahlreichen durch ihn mit ermöglichten Institutsaktivitäten, durch die ein gleichermaßen produktives wie abwechslungsreiches Arbeitsklima geschaffen wurde.
Dank sei ebenfalls allen früheren und jetztigen Mitarbeitern der AG Wagner (Ümit, Tom, Philipp, Jan, Athanasios, Zihni, Vero, Melina, Sabine, René, Nina, Reini und Benedikt) für wissenschaftliche Diskussionen, Anregungen und Hilfe bei Problemen gesagt.

Ebenso gilt großer Dank Frau Dr. Eva Birkmann, die mir damals als wissenschaftliche Hilfskraft ermöglichte, Teil dieses Instituts zu werden.

Ganz besonderen Dank gilt ebenfalls den Kollegen und Kolleginnen, mit denen ich mir all die Jahre das Büro geteilt habe. Hierbei sind besonders Dr. Lars Lüres, Steffen Hübinger und Michael Wördehoff zu nennen.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Mutter, meinem Bruder, Hansi und Steffi Hüsken, Elena Winkler und Dr. Giannantonio Panzer bedanken. In der Wissenschaft verläuft auf dem ersten Blick nicht immer alles ganz nach Plan. Es war daher ein großer Segen für mich, in euch Menschen gehabt zu haben, die mir in allen Situationen Kraft und Ausdauer gegeben haben, um da stehen zu können, wo ich jetzt bin.

8 Literaturverzeichnis

ABERG A, FERNANDEZ-VAZQUEZ J, CABRER-PANES JD, SANCHEZ A AND BALSALOBRE C. 2009. Similar and divergent effects of ppGpp and DksA deficiencies on transcription in Escherichia coli. Journal of bacteriology 191: 3226-3236.

ARTSIMOVITCH I AND LANDICK R. 2000. Pausing by bacterial RNA polymerase is mediated by mechanistically distinct classes of signals. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97: 7090-7095.

ARTSIMOVITCH I, SVETLOV V, MURAKAMI KS AND LANDICK R. 2003. Co-overexpression of Escherichia coli RNA polymerase subunits allows isolation and analysis of mutant enzymes lacking lineage-specific sequence insertions. The Journal of biological chemistry 278: 12344-12355.

ATKINSON GC, TENSON T AND HAURYLIUK V. 2011. The RelA/SpoT homolog (RSH) superfamily: distribution and functional evolution of ppGpp synthetases and hydrolases across the tree of life. PloS one 6: e23479.

BARKER MM, GAAL T AND GOURSE RL. 2001. Mechanism of regulation of transcription initiation by ppGpp. II. Models for positive control based on properties of RNAP mutants and competition for RNAP. Journal of molecular biology 305: 689-702.

BATTESTI A AND BOUVERET E. 2006. Acyl carrier protein/SpoT interaction, the switch linking SpoT-dependent stress response to fatty acid metabolism. Molecular microbiology 62: 1048-1063.

BEUTEL BA AND RECORD MT, JR. 1990. E. coli promoter spacer regions contain nonrandom sequences which correlate to spacer length. Nucleic acids research 18: 3597-3603.

BIMBOIM HCUD, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. n. 7: Nucleic Acids Res. .

BLATTNER FR ET AL. 1997. The complete genome sequence of Escherichia coli K-12. Science (New York, NY) 277: 1453-1462.

BOTT K, STEWART, G. C., AND ANDERSON, A. G. 1984. In*:* HOCH, JAAG, A. T. (EDS) (Ed.) In Syntro Conference on Genetics and Biotechnology of Bacilli, New York: Academic Press, Inc., p. 19-34.

BOUTTE CC AND CROSSON S. 2013. Bacterial lifestyle shapes stringent response activation. Trends in microbiology 21: 174-180.

BRODOLIN KL, STUDITSKY VM AND MIRZABEKOV AD. 1993. Conformational changes in E. coli RNA polymerase during promoter recognition. Nucleic acids research 21: 5748-5753.

BRUNNER M AND BUJARD H. 1987. Promoter recognition and promoter strength in the Escherichia coli system. The EMBO journal 6: 3139-3144.

BURGESS RR. 1969a. A new method for the large scale purification of Escherichia coli deoxyribonucleic acid-dependent ribonucleic acid polymerase. The Journal of biological chemistry 244: 6160-6167.

BURGESS RR. 1969b. Separation and characterization of the subunits of ribonucleic acid polymerase. The Journal of biological chemistry 244: 6168-6176.

BURGESS RR. 1971. RNA polymerase. Annual review of biochemistry 40: 711-740.

BURNS HD, ISHIHAMA A AND MINCHIN SD. 1999. Open complex formation during transcription initiation at the Escherichia coli galP1 promoter: the role of the RNA polymerase alpha subunit at promoters lacking an UP-element. Nucleic acids research 27: 2051-2056.

CASHEL M. 1974. Preparation of guanosine tetraphosphate (ppGpp) and guanosine pentaphosphate (pppGpp) from Escherichia coli ribosomes. Analytical biochemistry 57: 100-107.

CASHEL M, D. R. GENTRY, V. J. HERNANDEZ, AND D. VINELLA. 1996. The stringent response. In*:* F. C. NEIDHARDT, RCI, J. L. INGRAHAM, E. C. C. LIN, K. B. LOW, B. MAGASANIK, W. S. REZNIKOFF, M. RILEY, M. SCHAECHTER, AND H. E. UMBARGER (ED.) (Ed.) Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology, Washington, DC: ASM Press, p. 1458-1496.

CHAKRABORTY A ET AL. 2012. Opening and closing of the bacterial RNA polymerase clamp. Science (New York, NY) 337: 591-595.

CHATTERJI D, OGAWA Y, SHIMADA T AND ISHIHAMA A. 2007. The role of the omega subunit of RNA polymerase in expression of the relA gene in Escherichia coli. FEMS microbiology letters 267: 51-55.

CHEN H, TANG H AND EBRIGHT RH. 2003. Functional interaction between RNA polymerase alpha subunit C-terminal domain and sigma70 in UP-element- and activator-dependent transcription. Molecular cell 11: 1621-1633.

CONDON C, LIVERIS D, SQUIRES C, SCHWARTZ I AND SQUIRES CL. 1995. rRNA operon multiplicity in Escherichia coli and the physiological implications of rrn inactivation. Journal of bacteriology 177: 4152-4156.

CRAMER P, BUSHNELL DA AND KORNBERG RD. 2001. Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 angstrom resolution. Science (New York, NY) 292: 1863-1876.

DAGERT M AND EHRLICH SD. 1979. Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of Escherichia coli cells. Gene 6: 23-28.

DALEBROUX ZD, SVENSSON SL, GAYNOR EC AND SWANSON MS. 2010. ppGpp conjures bacterial virulence. Microbiology and molecular biology reviews : MMBR 74: 171-199.

DE BOER HA, COMSTOCK LJ AND VASSER M. 1983. The tac promoter: a functional hybrid derived from the trp and lac promoters. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 80: 21-25.

DEMING JW. 1986. Ecological strategies of barophilic bacteria in the deep ocean. Microbiological sciences 3: 205-211.

DENAPOLI J, TEHRANCHI AK AND WANG JD. 2013. Dose-dependent reduction of replication elongation rate by (p)ppGpp in Escherichia coli and Bacillus subtilis. Molecular microbiology 88: 93-104.

DEUSCHLE U, KAMMERER W, GENTZ R AND BUJARD H. 1986. Promoters of Escherichia coli: a hierarchy of in vivo strength indicates alternate structures. The EMBO journal 5: 2987-2994.

DICKSON RR, GAAL T, DEBOER HA, DEHASETH PL AND GOURSE RL. 1989. Identification of promoter mutants defective in growth-rate-dependent regulation of rRNA transcription in Escherichia coli. Journal of bacteriology 171: 4862-4870.

DURFEE T, HANSEN AM, ZHI H, BLATTNER FR AND JIN DJ. 2008. Transcription profiling of the stringent response in Escherichia coli. Journal of bacteriology 190: 1084-1096.

EDLIN G AND MAALOE O. 1966. Synthesis and breakdown of messenger RNA without protein synthesis. Journal of molecular biology 15: 428-434.

ENGLISH BP, HAURYLIUK V, SANAMRAD A, TANKOV S, DEKKER NH AND ELF J. 2011. Single-molecule investigations of the stringent response machinery in living bacterial cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 108: E365-373.

GAAL T, BARKEI J, DICKSON RR, DEBOER HA, DEHASETH PL, ALAVI H AND GOURSE RL. 1989. Saturation mutagenesis of an Escherichia coli rRNA promoter and initial characterization of promoter variants. Journal of bacteriology 171: 4852-4861.

GAAL T, ROSS W, BLATTER EE, TANG H, JIA X, KRISHNAN VV, ASSA-MUNT N, EBRIGHT RH AND GOURSE RL. 1996. DNA-binding determinants of the alpha subunit of RNA polymerase: novel DNA-binding domain architecture. Genes & development 10: 16-26.

GAUSING K. 1977. Regulation of ribosome production in Escherichia coli: synthesis and stability of ribosomal RNA and of ribosomal protein messenger RNA at different growth rates. Journal of molecular biology 115: 335-354.

GENTRY D, XIAO H, BURGESS R AND CASHEL M. 1991. The omega subunit of Escherichia coli K-12 RNA polymerase is not required for stringent RNA control in vivo. Journal of bacteriology 173: 3901-3903.

GENTRY DR AND BURGESS RR. 1990. Overproduction and purification of the omega subunit of Escherichia coli RNA polymerase. Protein expression and purification 1: 81-86.

GENTRY DR AND BURGESS RR. 1993. Cross-linking of Escherichia coli RNA polymerase subunits: identification of beta' as the binding site of omega. Biochemistry 32: 11224-11227.

GESZVAIN K, GRUBER TM, MOONEY RA, GROSS CA AND LANDICK R. 2004. A hydrophobic patch on the flap-tip helix of E.coli RNA polymerase mediates sigma(70) region 4 function. Journal of molecular biology 343: 569-587.

GHOSH P, ISHIHAMA A AND CHATTERJI D. 2001. Escherichia coli RNA polymerase subunit omega and its N-terminal domain bind full-length beta' to facilitate incorporation into the alpha2beta subassembly. European journal of biochemistry / FEBS 268: 4621-4627.

GOURSE RL. 1988. Visualization and quantitative analysis of complex formation between E. coli RNA polymerase and an rRNA promoter in vitro. Nucleic acids research 16: 9789-9809.

GOURSE RL, GAAL T, BARTLETT MS, APPLEMAN JA AND ROSS W. 1996. rRNA transcription and growth rate-dependent regulation of ribosome synthesis in Escherichia coli. Annual review of microbiology 50: 645-677.

GREINER DP, HUGHES KA, GUNASEKERA AH AND MEARES CF. 1996. Binding of the sigma 70 protein to the core subunits of Escherichia coli RNA polymerase, studied by iron-EDTA protein footprinting. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 93: 71-75.

GROISMAN EA AND OCHMAN H. 1994. How to become a pathogen. Trends in microbiology 2: 289-294.

GROSS CA, CHAN CL AND LONETTO MA. 1996. A structure/function analysis of Escherichia coli RNA polymerase. Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences 351: 475-482.

GROSS CA, LONENO, M. UND LOSICK, R. , S. L.UND YAMAMOTO, K. R. (EDS) 1992. Bacterial sigma factors. . In: MCKNIGHT (Ed.) Transcriptional regulation, p. 129-176.

GUNDERSON JH, SOGIN ML, WOLLETT G, HOLLINGDALE M, DE LA CRUZ VF, WATERS AP AND MCCUTCHAN TF. 1987. Structurally distinct, stage-specific ribosomes occur in Plasmodium. Science (New York, NY) 238: 933-937.

HANAHAN D 1985. Techniques for transformation of E.coli. DNA cloning. n. Vol. I.

HARLEY CB AND REYNOLDS RP. 1987. Analysis of E. coli promoter sequences. Nucleic acids research 15: 2343-2361.

HASELTINE WA AND BLOCK R. 1973. Synthesis of guanosine tetra- and pentaphosphate requires the presence of a codon-specific, uncharged transfer ribonucleic acid in the acceptor site of ribosomes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 70: 1564-1568.

HEINEMANN M AND 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. European journal of biochemistry / FEBS 247: 990-999.

HEYDUK T, HEYDUK E, SEVERINOV K, TANG H AND EBRIGHT RH. 1996. Determinants of RNA polymerase alpha subunit for interaction with beta, beta', and sigma subunits: hydroxyl-radical protein footprinting. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 93: 10162-10166.

HILLEBRAND A, WURM R, MENZEL A AND WAGNER R. 2005. The seven E. coli ribosomal RNA operon upstream regulatory regions differ in structure and transcription factor binding efficiencies. Biological chemistry 386: 523-534.

HILLEN W, KLEIN RD AND WELLS RD. 1981. Preparation of milligram amounts of 21 deoxyribonucleic acid restriction fragments. Biochemistry 20: 3748-3756.

HIRVONEN CA, ROSS W, WOZNIAK CE, MARASCO E, ANTHONY JR, AIYAR SE, NEWBURN VH AND GOURSE RL. 2001. Contributions of UP elements and the transcription factor FIS to expression from the seven rrn P1 promoters in Escherichia coli. Journal of bacteriology 183: 6305-6314.

HOCHSCHILD A AND DOVE SL. 1998. Protein-protein contacts that activate and repress prokaryotic transcription. Cell 92: 597-600.

HSU LM. 1996. Quantitative parameters for promoter clearance. Methods in enzymology 273: 59-71.

HUI I AND DENNIS PP. 1985. Characterization of the ribosomal RNA gene clusters in Halobacterium cutirubrum. The Journal of biological chemistry 260: 899-906.

HURWITZ J. 2005. The discovery of RNA polymerase. The Journal of biological chemistry 280: 42477-42485.

IGARASHI K, FUJITA N AND ISHIHAMA A. 1989. Promoter selectivity of Escherichia coli RNA polymerase: omega factor is responsible for the ppGpp sensitivity. Nucleic acids research 17: 8755-8765.

IGARASHI K, HANAMURA A, MAKINO K, AIBA H, AIBA H, MIZUNO T, NAKATA A AND ISHIHAMA A. 1991. Functional map of the alpha subunit of Escherichia coli RNA polymerase: two modes of transcription activation by positive factors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 88: 8958-8962.

IGARASHI K AND ISHIHAMA A. 1991. Bipartite functional map of the E. coli RNA polymerase alpha subunit: involvement of the C-terminal region in transcription activation by cAMP-CRP. Cell 65: 1015-1022.

IMSHENETSKY AA, LYSENKO SV AND KAZAKOV GA. 1978. Upper boundary of the biosphere. Applied and environmental microbiology 35: 1-5.

JORES L AND WAGNER R. 2003. Essential steps in the ppGpp-dependent regulation of bacterial ribosomal RNA promoters can be explained by substrate competition. The Journal of biological chemistry 278: 16834-16843.

JOSAITIS CA, GAAL T AND GOURSE RL. 1995. Stringent control and growth-rate-dependent control have nonidentical promoter sequence requirements. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 92: 1117-1121.

KANG PJ AND CRAIG EA. 1990. Identification and characterization of a new Escherichia coli gene that is a dosage-dependent suppressor of a dnaK deletion mutation. Journal of bacteriology 172: 2055-2064.

KANJEE U, OGATA K AND HOURY WA. 2012. Direct binding targets of the stringent response alarmone (p)ppGpp. Molecular microbiology 85: 1029-1043.

KASAI K, NISHIZAWA T, TAKAHASHI K, HOSAKA T, AOKI H AND OCHI K. 2006. Physiological analysis of the stringent response elicited in an extreme thermophilic bacterium, Thermus thermophilus. Journal of bacteriology 188: 7111-7122.

KIMURA M AND ISHIHAMA A. 1995. Functional map of the alpha subunit of Escherichia coli RNA polymerase: insertion analysis of the amino-terminal assembly domain. Journal of molecular biology 248: 756-767.

KIMURA M AND ISHIHAMA A. 1996. Subunit assembly in vivo of Escherichia coli RNA polymerase: role of the amino-terminal assembly domain of alpha subunit. Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms 1: 517-528.

KLAPPENBACH JA, SAXMAN PR, COLE JR AND SCHMIDT TM. 2001. rrndb: the Ribosomal RNA Operon Copy Number Database. Nucleic acids research 29: 181-184.

KOLMSEE T, DELIC D, AGYENIM T, CALLES C AND WAGNER R. 2011. Differential stringent control of Escherichia coli rRNA promoters: effects of ppGpp, DksA and the initiating nucleotides. Microbiology (Reading, England) 157: 2871-2879.

KOLMSEE T AND HENGGE R. 2011. Rare codons play a positive role in the expression of the stationary phase sigma factor RpoS (sigma(S)) in Escherichia coli. RNA biology 8: 913-921.

KRASNY L AND GOURSE RL. 2004. An alternative strategy for bacterial ribosome synthesis: Bacillus subtilis rRNA transcription regulation. The EMBO journal 23: 4473-4483.

KRIEL A, BITTNER AN, KIM SH, LIU K, TEHRANCHI AK, ZOU WY, RENDON S, CHEN R, TU BP AND WANG JD. 2012. Direct regulation of GTP homeostasis by (p)ppGpp: a critical component of viability and stress resistance. Molecular cell 48: 231-241.

KROHN M 1994. Pausierung der DNA-abhängigen RNA-Polymerase als ein Mittel der globalen Transkriptionskontrolle in Escherichia coli. Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf.

KROHN M AND WAGNER R. 1995. A procedure for the rapid preparation of guanosine tetraphosphate (ppGpp) from Escherichia coli ribosomes. Analytical biochemistry 225: 188-190.

KROHN M AND WAGNER R. 1996. Transcriptional pausing of RNA polymerase in the presence of guanosine tetraphosphate depends on the promoter and gene sequence. The Journal of biological chemistry 271: 23884-23894.

LAEMMLI UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.

LAFAUCI G, WIDOM RL, EISNER RL, JARVIS ED AND RUDNER R. 1986. Mapping of rRNA genes with integrable plasmids in Bacillus subtilis. Journal of bacteriology 165: 204-214.

LANGERT W, MEUTHEN M AND MUELLER K. 1991. Functional characteristics of the rrnD promoters of Escherichia coli. The Journal of biological chemistry 266: 21608-21615.

LAPTENKO O, LEE J, LOMAKIN I AND BORUKHOV S. 2003. Transcript cleavage factors GreA and GreB act as transient catalytic components of RNA polymerase. The EMBO journal 22: 6322-6334.

LEMKE JJ, SANCHEZ-VAZQUEZ P, BURGOS HL, HEDBERG G, ROSS W AND GOURSE RL. 2011. Direct regulation of Escherichia coli ribosomal protein promoters by the transcription factors ppGpp and DksA. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 108: 5712-5717.

LEW CM AND GRALLA JD. 2004. Mechanism of stimulation of ribosomal promoters by binding of the +1 and +2 nucleotides. The Journal of biological chemistry 279: 19481-19485.

LINDAHL L AND ZENGEL JM. 1986. Ribosomal genes in Escherichia coli. Annual review of genetics 20: 297-326.

LISSER S AND MARGALIT H. 1993. Compilation of E. coli mRNA promoter sequences. Nucleic acids research 21: 1507-1516.

LONG EO AND DAWID IB. 1980. Repeated genes in eukaryotes. Annual review of biochemistry 49: 727-764.

LOTTSPEICH FZ, H., HRSG. 1998. Bioanalytik. Spektrum Akademischer Verlag.

LUND E AND KJELDGAARD NO. 1972. Metabolism of guanosine tetraphosphate in Escherichia coli. European journal of biochemistry / FEBS 28: 316-326.

MAGNUSSON LU, FAREWELL A AND NYSTROM T. 2005. ppGpp: a global regulator in Escherichia coli. Trends in microbiology 13: 236-242.

MAGNUSSON LU, GUMMESSON B, JOKSIMOVIC P, FAREWELL A AND NYSTROM T. 2007. Identical, independent, and opposing roles of ppGpp and DksA in Escherichia coli. Journal of bacteriology 189: 5193-5202.

MANIATIS T, FRITSCH, E.F., AND SAMBROOK, J. 1982. Molecular cloning: A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour.

MATHEW R AND CHATTERJI D. 2006. The evolving story of the omega subunit of bacterial RNA polymerase. Trends in microbiology 14: 450-455.

MATHEW R, RAMAKANTH M AND CHATTERJI D. 2005. Deletion of the gene rpoZ, encoding the omega subunit of RNA polymerase, in Mycobacterium smegmatis results in fragmentation of the beta' subunit in the enzyme assembly. Journal of bacteriology 187: 6565-6570.

MCCLURE WR. 1985. Mechanism and control of transcription initiation in prokaryotes. Annual review of biochemistry 54: 171-204.

MILON P, TISCHENKO E, TOMSIC J, CASERTA E, FOLKERS G, LA TEANA A, RODNINA MV, PON CL, BOELENS R AND GUALERZI CO. 2006. The nucleotide-binding site of bacterial translation initiation factor 2 (IF2) as a metabolic sensor. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103: 13962-13967.

MINAKHIN L, BHAGAT S, BRUNNING A, CAMPBELL EA, DARST SA, EBRIGHT RH AND SEVERINOV K. 2001. Bacterial RNA polymerase subunit omega and eukaryotic RNA polymerase subunit RPB6 are sequence, structural, and functional homologs and promote RNA polymerase assembly. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98: 892-897.

MITTENHUBER G. 2001. Comparative genomics and evolution of genes encoding bacterial (p)ppGpp synthetases/hydrolases (the Rel, RelA and SpoT proteins). Journal of molecular microbiology and biotechnology 3: 585-600.

MULLIGAN ME, HAWLEY DK, ENTRIKEN R AND MCCLURE WR. 1984. Escherichia coli promoter sequences predict in vitro RNA polymerase selectivity. Nucleic acids research 12: 789-800.

MULLIS KBUF, F. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerasecatalyzed chain reaction. Methods Enzymal ISS.

MURAKAMI K, FUJITA N AND ISHIHAMA A. 1996. Transcription factor recognition surface on the RNA polymerase alpha subunit is involved in contact with the DNA enhancer element. The EMBO journal 15: 4358-4367.

MURAKAMI K, KIMURA M, OWENS JT, MEARES CF AND ISHIHAMA A. 1997. The two alpha subunits of Escherichia coli RNA polymerase are asymmetrically arranged and contact different halves of the DNA upstream element. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 94: 1709-1714.

MURAKAMI KS. 2013. X-ray crystal structure of Escherichia coli RNA polymerase sigma70 holoenzyme. The Journal of biological chemistry 288: 9126-9134.

MURAKAMI KS, MASUDA S, CAMPBELL EA, MUZZIN O AND DARST SA. 2002. Structural basis of transcription initiation: an RNA polymerase holoenzyme-DNA complex. Science (New York, NY) 296: 1285-1290.

MURRAY HD, SCHNEIDER DA AND GOURSE RL. 2003. Control of rRNA expression by small molecules is dynamic and nonredundant. Molecular cell 12: 125-134.

MURRAY KD AND BREMER H. 1996. Control of spoT-dependent ppGpp synthesis and degradation in Escherichia coli. Journal of molecular biology 259: 41-57.

MUSTAEV A, KOZLOV M, MARKOVTSOV V, ZAYCHIKOV E, DENISSOVA L AND GOLDFARB A. 1997. Modular organization of the catalytic center of RNA polymerase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 94: 6641-6645.

NEGISHI T, FUJITA N AND ISHIHAMA A. 1995. Structural map of the alpha subunit of Escherichia coli RNA polymerase: structural domains identified by proteolytic cleavage. Journal of molecular biology 248: 723-728.

NEWLANDS JT, ROSS W, GOSINK KK AND GOURSE RL. 1991. Factor-independent activation of Escherichia coli rRNA transcription. II. characterization of complexes of rrnB P1 promoters containing or lacking the upstream activator region with Escherichia coli RNA polymerase. Journal of molecular biology 220: 569-583.

NOURAINI S, ARCHAMBAULT J AND FRIESEN JD. 1996. Rpo26p, a subunit common to yeast RNA polymerases, is essential for the assembly of RNA polymerases I and II and for the stability of the largest subunits of these enzymes. Molecular and cellular biology 16: 5985-5996.

NUDLER E, MUSTAEV A, LUKHTANOV E AND GOLDFARB A. 1997. The RNA-DNA hybrid maintains the register of transcription by preventing backtracking of RNA polymerase. Cell 89: 33-41.

OPALKA N, CHLENOV M, CHACON P, RICE WJ, WRIGGERS W AND DARST SA. 2003. Structure and function of the transcription elongation factor GreB bound to bacterial RNA polymerase. Cell 114: 335-345.

PAUL BJ, BARKER MM, ROSS W, SCHNEIDER DA, WEBB C, FOSTER JW AND GOURSE RL. 2004. DksA: a critical component of the transcription initiation machinery that potentiates the regulation of rRNA promoters by ppGpp and the initiating NTP. Cell 118: 311-322.

PAUL BJ, BERKMEN MB AND GOURSE RL. 2005. DksA potentiates direct activation of amino acid promoters by ppGpp. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102: 7823-7828.

PEREDERINA A, SVETLOV V, VASSYLYEVA MN, TAHIROV TH, YOKOYAMA S, ARTSIMOVITCH I AND VASSYLYEV DG. 2004. Regulation through the secondary channel--structural framework for ppGpp-DksA synergism during transcription. Cell 118: 297-309.

PERRON K, COMTE R AND VAN DELDEN C. 2005. DksA represses ribosomal gene transcription in Pseudomonas aeruginosa by interacting with RNA polymerase on ribosomal promoters. Molecular microbiology 56: 1087-1102.

PLATT T. 1994. Rho and RNA: models for recognition and response. Molecular microbiology 11: 983-990.

POLYAKOV A, SEVERINOVA E AND DARST SA. 1995. Three-dimensional structure of E. coli core RNA polymerase: promoter binding and elongation conformations of the enzyme. Cell 83: 365-373.

PRIBNOW D. 1975. Bacteriophage T7 early promoters: nucleotide sequences of two RNA polymerase binding sites. Journal of molecular biology 99: 419-443.

PUL U, WURM R, LUX B, MELTZER M, MENZEL A AND WAGNER R. 2005. LRP and H-NS--cooperative partners for transcription regulation at Escherichia coli rRNA promoters. Molecular microbiology 58: 864-876.

RAMAGOPAL S AND DAVIS BD. 1974. Localization of the stringent protein of Escherichia coli on the 50S ribosomal subunit. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 71: 820-824.

RECORD MT, JR., REZNIKOFF, W. S., CRAIG, M. L., MCQUADE, K. L. & SCHLAX, P. J. 1996. Escherichia coli RNA Polymerase (Eσ70), promoters and the kinetics of the steps of transcription initiation. In*:* NEIDHARDT, FC, CURTIS III, R., INGRAHAM, J. L., LIN, E. C. C., LOW, K. B., MAGASANIK, B., REZNIKOFF, W. S., RILEY, M., SCHAECHTER, M. &

UMBARGER, H.E. (EDS.) (Ed.) Escherichia coli and Salmonella Cellular and Molecular Biology, Washington, DC: ASM Pess, p. 792-821.

RICHARDSON JP. 1993. Transcription termination. Critical reviews in biochemistry and molecular biology 28: 1-30.

RIGGS DL, MUELLER RD, KWAN HS AND ARTZ SW. 1986. Promoter domain mediates guanosine tetraphosphate activation of the histidine operon. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 83: 9333-9337.

ROBINSON CK ET AL. 2013. Microbial diversity and the presence of algae in halite endolithic communities are correlated to atmospheric moisture in the hyper-arid zone of the Atacama Desert. Environmental microbiology.

ROSS W, SCHNEIDER DA, PAUL BJ, MERTENS A AND GOURSE RL. 2003. An intersubunit contact stimulating transcription initiation by E coli RNA polymerase: interaction of the alpha C-terminal domain and sigma region 4. Genes & development 17: 1293-1307.

ROSS W, VRENTAS CE, SANCHEZ-VAZQUEZ P, GAAL T AND GOURSE RL. 2013. The magic spot: a ppGpp binding site on E. coli RNA polymerase responsible for regulation of transcription initiation. Molecular cell 50: 420-429.

RUTHERFORD ST, LEMKE JJ, VRENTAS CE, GAAL T, ROSS W AND GOURSE RL. 2007. Effects of DksA, GreA, and GreB on transcription initiation: insights into the mechanisms of factors that bind in the secondary channel of RNA polymerase. Journal of molecular biology 366: 1243-1257.

RUTHERFORD ST, VILLERS CL, LEE JH, ROSS W AND GOURSE RL. 2009. Allosteric control of Escherichia coli rRNA promoter complexes by DksA. Genes & development 23: 236-248.

RYMER RU, SOLORIO FA, TEHRANCHI AK, CHU C, CORN JE, KECK JL, WANG JD AND BERGER JM. 2012. Binding mechanism of metalNTP substrates and stringent-response alarmones to bacterial DnaG-type primases. Structure (London, England : 1993) 20: 1478-1489.

SARKAR P, SARDESAI AA, MURAKAMI KS AND CHATTERJI D. 2013. Inactivation of the bacterial RNA polymerase due to acquisition of secondary structure by the omega subunit. The Journal of biological chemistry 288: 25076-25087.

SCHMIDT TMIFJD, J. R. LUPSKI, AND G. M. WEINSTOCK (EDS) 1997. Multiplicity of ribosomal RNA operons in prokaryotic genomes. . Bacterial genomes: physical structure and analysis New York, N. Y: Chapman and Hall, p. 221-229.

SCHNEIDER DA, GAAL T AND GOURSE RL. 2002. NTP-sensing by rRNA promoters in Escherichia coli is direct. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99: 8602-8607.

SRIVATSAN A AND WANG JD. 2008. Control of bacterial transcription, translation and replication by (p)ppGpp. Current opinion in microbiology 11: 100-105.

STEFANO JE AND GRALLA J. 1979. Lac UV5 transcription in vitro. Rate limitation subsequent to formation of an RNA polymerase-DNA complex. Biochemistry 18: 1063-1067.

TAGAMI S, SEKINE S, KUMAREVEL T, HINO N, MURAYAMA Y, KAMEGAMORI S, YAMAMOTO M, SAKAMOTO K AND YOKOYAMA S. 2010. Crystal structure of bacterial RNA polymerase bound with a transcription inhibitor protein. Nature 468: 978-982.

TANG H, SEVERINOV K, GOLDFARB A AND EBRIGHT RH. 1995. Rapid RNA polymerase genetics: one-day, no-column preparation of reconstituted recombinant Escherichia coli RNA polymerase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 92: 4902-4906.

TRAVERS AA. 1984. Conserved features of coordinately regulated E. coli promoters. Nucleic acids research 12: 2605-2618.

TRAXLER MF, SUMMERS SM, NGUYEN HT, ZACHARIA VM, HIGHTOWER GA, SMITH JT AND CONWAY T. 2008. The global, ppGpp-mediated stringent response to amino acid starvation in Escherichia coli. Molecular microbiology 68: 1128-1148.

TRIMAN KL AND ADAMS BJ. 1997. Expansion of the 16S and 23S ribosomal RNA mutation databases (16SMDB and 23SMDB). Nucleic acids research 25: 188-191.

UPTAIN SM, KANE CM AND CHAMBERLIN MJ. 1997. Basic mechanisms of transcript elongation and its regulation. Annual review of biochemistry 66: 117-172.

VRENTAS CE, GAAL T, BERKMEN MB, RUTHERFORD ST, HAUGEN SP, VASSYLYEV DG, ROSS W AND GOURSE RL. 2008. Still looking for the magic spot: the crystallographically defined binding site for ppGpp on RNA polymerase is unlikely to be responsible for rRNA transcription regulation. Journal of molecular biology 377: 551-564.

VRENTAS CE, GAAL T, BURGESS RR AND GOURSE RL. 2010. An improved procedure for the purification of the Escherichia coli RNA polymerase omega subunit. Protein expression and purification 71: 190-194.

VRENTAS CE, GAAL T, ROSS W, EBRIGHT RH AND GOURSE RL. 2005. Response of RNA polymerase to ppGpp: requirement for the omega subunit and relief of this requirement by DksA. Genes & development 19: 2378-2387.

WAGNER R 2000. Transcription Regulation in Prokaryotes. New York: Oxford University Press Inc.

WHITMAN WB, COLEMAN DC AND WIEBE WJ. 1998. Prokaryotes: the unseen majority. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95: 6578-6583.

WILSON C AND DOMBROSKI AJ. 1997. Region 1 of sigma70 is required for efficient isomerization and initiation of transcription by Escherichia coli RNA polymerase. Journal of molecular biology 267: 60-74.

ZACHARIAS M, GORINGER HU AND 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. The EMBO journal 8: 3357-3363.

ZACHARIAS M, GORINGER HU AND WAGNER R. 1990. The signal for growth rate control and stringent sensitivity in E. coli is not restricted to a particular sequence motif within the promoter region. Nucleic acids research 18: 6271-6275.

ZHANG G, CAMPBELL EA, MINAKHIN L, RICHTER C, SEVERINOV K AND DARST SA. 1999. Crystal structure of Thermus aquaticus core RNA polymerase at 3.3 A resolution. Cell 98: 811-824.

ZUO Y, WANG Y AND STEITZ TA. 2013. The mechanism of E. coli RNA polymerase regulation by ppGpp is suggested by the structure of their complex. Molecular cell 50: 430-436.