

**Untersuchungen zur Expression, Stabilität und
Funktion der regulatorischen 6S RNA von *E. coli***

Inaugural-Dissertation

Zur

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

vorgelegt von

Thomas Neußer

aus Düsseldorf

Mai 2008

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

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

Referent: Prof. Dr. R. Wagner

Koreferent: Prof. Dr. J. Ernst

Tag der mündlichen Prüfung: 25.06.2008

Für meine Familie

Zusammenfassung

Die 184 Nukleotide lange 6S RNA aus *Escherichia coli* ist eine stabile RNA, die über die Wachstumsphasen akkumuliert. Als regulatorische RNA hat sie eine bedeutende Funktion bei der Anpassung an wechselnde Wachstumsbedingungen. Aufgrund ihrer konservierten Sekundärstruktur, die einem offenen DNA-Promotor ähnelt, kann die 6S RNA *in vivo* spezifisch an das $E\sigma^{70}$ -Holoenzym der RNA-Polymerase binden und dadurch die Transkription beeinflussen. Wichtig für das Verständnis der Funktion der 6S RNA ist die Frage, wie die Akkumulation über die Wachstumsphase erfolgt.

Das Gen für die 6S RNA (*ssrS*) wird von den beiden Tandempromotoren *ssrS* P1 und P2 kontrolliert. Der erste Teil dieser Arbeit beschreibt die Effekte von Nukleoid-assoziierten Proteinen (NAPs), die für ihre phasenabhängige Regulation bekannt sind, auf die Synthese der 6S RNA. Dazu wurde die *in vivo* Expression der 6S RNA mittels *primer extension*-Analysen von Gesamt-RNA aus Deletionsmutanten von einzelnen NAPs (FIS, H-NS, LRP bzw. StpA) untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass alle Proteine außer StpA die 6S RNA-Expression in der stationären Phase dereprimieren.

Alle verwendeten NAPs bildeten spezifische Komplexe mit der ungekrümmten, aber flexiblen *upstream*-Region des *ssrS*-Gens in Gelretardierungsexperimenten. H-NS und StpA binden kooperativ, FIS und LRP dagegen sequenzspezifisch. H-NS, LRP und StpA inhibieren *in vitro* die Transkription mit den Holoenzymen $E\sigma^{70}$ und $E\sigma^{38}$ von beiden *ssrS* Promotoren. Dagegen weist FIS eine differentielle Regulation auf. Während mit dem $E\sigma^{70}$ -Holoenzym der *ssrS* P1 leicht aktiviert wurde, dirigierte FIS die Transkription des $E\sigma^{38}$ -Holoenzym vom σ^{38} -abhängigen P2 zum σ^{70} -abhängigen P1 Promotor. Die Wirkung von FIS und LRP auf die *in vitro* Transkriptionsreaktion ist gut mit den DNase I *footprint*-Ergebnissen beider Proteine erklärbar, für die außerdem überlappende Bindestellen identifiziert werden konnten. Es konnte gezeigt werden, dass beide *ssrS* Promotoren nicht der Stringenten Kontrolle unterliegen, jedoch gibt es Hinweise auf eine Autoregulation der 6S RNA. Die Expression der 6S RNA wird durch die konzertierte Wirkung der NAPs in Abhängigkeit veränderter Umweltbedingungen gesteuert und dadurch in das globale Regulationsnetzwerk der Zelle eingebunden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit zeigten Transkriptomvergleiche zwischen Wildtyp und *ssrS*-Deletionsmutante geringe Veränderung der mRNA-Level in der stationären Phase. Neben Genen, die in Stressanpassung involviert sind, waren vor allem mRNAs der ribosomalen Proteinoperons in Abwesenheit der 6S RNA reduziert.

Die RNA-Polymerase kann die 6S RNA *in vitro* als *template* für die DNA-unabhängige Synthese der so genannten *de novo* RNA benutzen. Bei plötzlich verbesserten Nährstoffbedingungen in der stationären Phase zeigte die 6S RNA eine verringerte Stabilität. Vermutlich ist die Bildung des *de novo*-Transkripts beim Freisetzen der RNA-Polymerase von der 6S RNA notwendig, womit sie eine wichtige Rolle beim schnellen Umschalten bei wechselnden Umweltbedingungen übernimmt.

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG
1 EINLEITUNG	11
1.1 Kleine RNAs verändern die Genexpression.....	11
1.2 Entdeckung kleiner RNAs in <i>E. coli</i>	12
1.3 Regulation durch kleine RNAs in Bakterien	12
1.4 Die 6S RNA aus <i>Escherichia coli</i>	16
1.4.1 Funktion der 6S RNA.....	17
1.4.2 Struktur und Stabilität der 6S RNA.....	19
1.4.3 Regulation und Prozessierung der 6S RNA	20
1.5 RNA-Synthese: Transkription	22
1.5.1 Struktur und Funktion der bakteriellen RNA-Polymerase	22
1.5.2 Struktur und Funktion von Promotoren.....	25
1.5.3 Der Ablauf der Transkription	27
1.6 Transkriptionsregulation in <i>E. coli</i>	29
1.6.1 Einfluss der Krümmung auf die Transkription	29
1.6.2 Nukleoid-assoziierte Proteine beeinflussen die DNA-Dynamik	31
1.7 Fragestellung und Konzeption der Arbeit	36
2 ERGEBNISSE.....	37
2.1 Die Stabilität der 6S RNA.....	37
2.1.1 Rifampicin-Kinetik zur Bestimmung der 6S RNA Halbwertszeit.....	38
2.2 Wie wird die 6S RNA-Expression reguliert?	40
2.2.1 Einfluss der NAPs auf die 6S RNA-Expression in verschiedenen Wachstumsphasen <i>in vivo</i>	40
2.2.2 Charakterisierung der Bindung der NAPs an verschiedene <i>ssrS</i> -Promotorfragmente.....	47
2.2.3 Der Einfluss von Regulatoren auf die Transkription beider <i>ssrS</i> -Promotoren <i>in vitro</i>	65
2.2.4 Beitrag der einzelnen <i>ssrS</i> -Promotoren P1 und P2 an der Transkription der 6S RNA in verschiedenen Stämmen	69
2.3 Transkriptomanalysen.....	73
2.4 Proteomanalysen	79

2.5	Verändert sich die 6S RNA-Konzentration bei plötzlich verbessertem Nährstoffangebot?.....	82
-----	---	----

3 DISKUSSION 85

3.1 Regulation der zellulären 6S RNA-Konzentration85

3.1.1	Die Stabilität der 6S RNA	85
3.1.2	NAPs beeinflussen die <i>ssrS</i> -Expression <i>in vivo</i>	87
3.1.3	Bindung der Transkriptionsfaktoren an die regulatorische Region des <i>ssrS</i> -Gens <i>in vitro</i>	89
3.1.4	Vergleich der <i>ssrS</i> -Promotornutzung unter Einfluss von verschiedenen Regulatoren <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> 93	
3.1.5	Autoregulation der 6S RNA	97
3.1.6	Wird die 6S RNA stringent reguliert?	98

3.2 Globale Effekte durch das Fehlen der 6S RNA99

3.3 Die 6S RNA wird unter *upshift*-Bedingungen schnell abgebaut.....106

3.4 Ausblick.....109

4 MATERIAL 111

4.1 Allgemeines111

4.2 Verwendete Bakterienstämme und Plasmide111

4.2.1	<i>E. coli</i> Stämme.....	111
4.2.2	Plasmide	112

4.3 Nukleinsäuren.....113

4.3.1	Oligonukleotide	113
4.3.2	DNA-Fragmente	114
4.3.3	Nukleotide	115

4.4 Proteine116

4.4.1	Restriktionsendonukleasen:	116
4.4.2	Polymerasen und Polymeraseuntereinheiten	116
4.4.3	Transkriptionsfaktoren.....	117
4.4.4	Enzyme und sonstige Proteine.....	117

4.5 Molekulargewichtsmarker.....118

4.6 Puffer und Medien.....118

4.6.1	Puffer	118
4.6.2	Medien.....	119

4.7	Feinchemikalien	120
4.8	Verschiedenes	122
5	METHODEN.....	123
5.1	Allgemeine und mikrobiologische Methoden.....	123
5.1.1	Arbeitsbedingungen beim Umgang mit Bakterien	123
5.1.2	Kultivierung von Bakterienstämmen.....	123
5.1.3	Herstellung kompetenter Zellen	125
5.1.4	Transformation kompetenter Zellen mit Vektor-DNA	125
5.2	Allgemeine molekularbiologische Methoden	126
5.2.1	UV/VIS-Spektroskopie	126
5.2.2	Isolation von Nukleinsäuren und Proteinen aus Bakterien.....	128
5.2.3	Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren	133
5.2.4	Konzentrierung von Proteinen durch Acetonfällung	135
5.2.5	Gelelektrophoresen.....	135
5.2.6	Nachweismethoden von Nukleinsäuren und Proteinen	139
5.2.7	Enzymatische Reaktionen	142
5.3	Spezielle molekularbiologische Methoden	145
5.3.1	<i>Primer extension</i> zur quantitativen Analyse von RNA	145
5.3.2	<i>Primer extension</i> -Sequenzierung von RNA	146
5.3.3	Retardierungsanalysen (<i>Gelshift</i> -Experimente).....	146
5.3.4	'Maxam-Gilbert'-Sequenzierung von DNA	147
5.3.5	<i>in vitro</i> Transkriptionen.....	150
5.3.6	Transkriptomanalysen	152
5.3.7	Isoelektrische Fokussierung (IEF).....	155
6	ANHANG	159
6.1	Tabellen und Abbildungen	159
6.2	Abkürzungsverzeichnis.....	163
6.3	Veröffentlichungen.....	167
6.4	Literaturverzeichnis.....	168
6.5	Danksagung	183
6.6	Eidesstattliche Erklärung.....	185

1 Einleitung

1.1 Kleine RNAs verändern die Genexpression

Bakterien adaptieren schnell und effizient an die sie umgebenden Umweltbedingungen und sind in der Lage die unterschiedlichsten Lebensräume zu besiedeln. Um sich auf die verschiedensten und fortlaufend wechselnden Gegebenheiten (wie z. B. Veränderung der Temperatur, Osmolarität oder des Nahrungsangebotes) einzustellen, müssen Bakterien ihre Genexpression anpassen. Das bedeutet sie verändern die Biosynthese der Makromoleküle DNA (Replikation), RNA (Transkription) und Protein (Translation). Die komplexe Regulation der Genexpression erfolgt auf allen Ebenen und kann außerdem durch posttranslationale Modifikation oder Veränderung der Stabilität von Makromolekülen beeinflusst werden. Bei Bakterien läuft die Regulation der Genexpression hauptsächlich auf Ebene der Transkription. Neben der klassischen Funktion als *transfer*-, *messenger*- und ribosomaler RNA, ist heute bekannt, dass RNAs darüber hinaus vielfältige Aufgaben übernehmen können. Dazu gehören katalytische Funktion (Ribozyme) und genetische Speicherfunktion (Retroviren, Viroide). In den vergangenen Jahren gelangte mehr und mehr die Gruppe der kleinen, nicht proteinkodierenden (*noncoding*, nc) RNAs in den Fokus des Interesses, die in allen Organismen gefunden werden. Viele von ihnen übernehmen regulatorische Funktion der Genexpression. Es gibt beispielsweise die große Gruppe der *micro* RNAs (miRNAs), die hauptsächlich in Eukaryoten vorkommen und an nahezu allen zellulären Prozessen beteiligt sind. Für diese meist 21 Nukleotide langen miRNAs wird vorhergesagt, dass sie schätzungsweise 30 % der proteinkodierenden Gene mitregulieren (Filipowicz *et al.* 2008). Für die Entdeckung des Mechanismus der sogenannten *RNA interference* (RNAi) erhielten Fire und Mello 2006 den Nobelpreis für Medizin. In dieser Arbeit liegt der Schwerpunkt auf der 6S RNA, einer kleinen ncRNA aus *E. coli*. Deshalb soll hier auf die regulatorische Wirkung kleiner ncRNAs aus Bakterien näher eingegangen werden. Inzwischen wurden ca. 60 kleine regulatorische RNAs in *E. coli* gefunden, deren Entdeckungsgeschichte im Folgenden kurz vorgestellt wird (Gottesman 2005).

1.2 Entdeckung kleiner RNAs in *E. coli*

In den vergangenen Jahren war *Escherichia coli* als molekularbiologischer Modellorganismus Vorreiter bei der Entdeckung der kleinen RNA-Regulatoren. Der Grund für die späte Aufmerksamkeit für nicht-kodierende (*noncoding*) RNAs lag einfach daran, dass sie klein sind (meist zwischen 50 und 500 Nukleotiden) und deswegen weder bei Genomsequenzierungen noch bei Mutationssuchen besonders aufgefallen sind. Dazu kam, dass sie kein Proteinleseraster besitzen und daher nicht als selbstständige Gene identifiziert wurden. Die ersten kleinen RNAs, neben der 5S RNA und tRNAs, wurden auf Polyacrylamidgelen entdeckt. Eher zufällig konnten die ersten Funktionszuordnungen erfolgen, wie z. B. bei der 4,5S RNA, der tmRNA und der RNase P RNA (1.3). Im Jahr 1999 waren erst zehn kleine RNAs in *E. coli* bekannt (Wassarman *et al.* 1999).

Die Identifikation von konservierten Sequenzen außerhalb von proteinkodierenden Genen sowie die Beobachtung dass diese Sequenzen charakteristische *stem loops* ausbilden, hat erfolgreich zur Entdeckung weiterer, bis dahin unbekannter, kleiner RNAs geführt (Rivas *et al.* 2001; Wassarman *et al.* 2001). Für die Suche nach kleinen RNAs wurden neue Ansätze gewählt. Beispielsweise wurde nach Promotoren oder Rho-unabhängigen Transkriptionsterminatoren in intergenischen Bereichen gesucht (Argaman *et al.* 2001; Chen *et al.* 2002). Außerdem konnten weitere Kandidaten durch Anlegung von cDNA-Banken kleiner Transkripte gefunden werden (Vogel *et al.* 2003). Es wird angenommen, dass die Zahl der *noncoding* RNAs in *E. coli* ungefähr 1-2 % der Zahl an proteinkodierenden Genen entspricht (Gottesman 2005). Eine ähnliche Abschätzung gibt es auch für Eukaryoten (Xu *et al.* 2004).

1.3 Regulation durch kleine RNAs in Bakterien

Die Zahl der neu entdeckten, kleinen *noncoding* RNAs steigt kontinuierlich an. Ein gemeinsames Funktionsmerkmal stellt meist eine schnelle und effektive Anpassung an Stress oder veränderte Lebensumstände dar. Dies erfordert eine präzise Regulation der RNA-Expression, die in den meisten Fällen durch bestimmte Stressbedingungen induziert werden.

Hier sind beispielsweise Eisenmangel (RhyB), oxidativer Stress (OxyS) oder niedrige Temperaturen (DsrA) zu nennen.

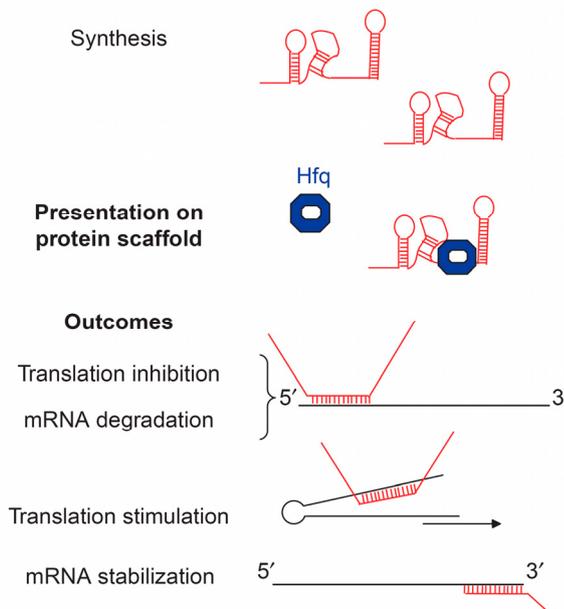


Abbildung 1.1: Wirkung von basenpaarenden ncRNAs in Prokaryoten.

Kleine RNAs sind meist stark strukturierte Einzeltranskripte, die nicht prozessiert werden und gemeinsam mit ihrer Ziel-mRNA (nicht gezeigt) an Hfq binden. Mit dessen Hilfe bilden ncRNA in den häufigsten Fällen mit dem 5'-Ende der mRNA Basenpaare aus. Die Auswirkung dieser Paarung kann Translationsinhibierung, Translationsaktivierung oder eine veränderte Stabilität sein (Gottesman 2005).

Kleine regulatorische RNAs können in drei Kategorien mit unterschiedlichen Wirkmechanismen eingeteilt werden. Zu der ersten und sicher auch zahlenmäßig größten Gruppe gehören die RNAs, die über direkte Basenpaarungen mit ihrer Ziel-RNA wechselwirken und dadurch in erster Linie als Regulatoren der Translation und mRNA-Stabilität agieren (Storz 2002; Storz *et al.* 2004). Meist ist bei der Interaktion zwischen den RNA-Molekülen das Protein Hfq beteiligt, das RNA-Chaperon-Aktivität besitzt. Als Ergebnis dieser Regulation kann die Translation aktiviert oder reprimiert werden oder die Stabilität der mRNA verändert werden (siehe Abbildung 1.1) (Gottesman 2005). Die zweite Kategorie besteht aus ncRNAs, die Bestandteil eines RNA-Protein-Partikels sind und dabei strukturell und funktionell wichtige Aufgaben übernehmen. Hier sind zum Beispiel die 4,5S RNA oder die katalytisch aktive RNase P RNA zu nennen. Die 4,5S RNA ist integraler Bestandteil des

signal recognition particle (SRP). Die ist ein RNA-Protein-Komplex, der spezifische Proteine für die Secretion und Insertion erkennt und kotranslationell zur Zellmembran transportiert. Zur dritten Gruppe zählen die RNAs, die Strukturen anderer Nukleinsäuren auf molekularer Ebene imitieren (molekulare Mimikry). Dazu gehören die CsrB und CsrC, sowie die 6S RNA (siehe Kapitel 1.4).

Die kleine ncRNA MicF wird bei einer Vielfalt verschiedener Stressbedingungen, wie zum Beispiel erhöhte Temperatur oder bei Kontakt mit Giften, induziert (Storz *et al.* 2004). MicF ist in *trans* zu ihrer Ziel-mRNA *ompF* kodiert und blockiert dort die Shine-Dalgarno-Sequenz durch einen *antisense* Mechanismus. Dadurch wird die Translation und Expression des Außenmembranproteins OmpF inhibiert (Mizuno *et al.* 1984; Wassarman *et al.* 1999; Storz *et al.* 2004). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass eine Reihe von Außenmembranproteinen von kleinen RNAs kontrolliert werden. In *E. coli* gibt es mindestens acht, dieser RNAs, die bei der stressabhängigen Regulation post-transkriptionell beteiligt sind (Vogel and Papenfort 2006).

DsrA ist eine ncRNA mit einer Länge von 85 Nukleotiden, die bei niedrigen Temperaturen verstärkt exprimiert wird. Sie paart mit der *rpoS* mRNA und führt zu gesteigerter Translation des stationären σ -Faktors σ^{38} , in dem die *rpoS* mRNA vor der Ausbildung einer translationshemmenden Sekundärstruktur bewahrt wird (Lease *et al.* 1998; Majdalani *et al.* 1998). Dadurch wird beispielsweise die Transkription von *otsA* und *otsB* induziert und Trehalose akkumuliert. Auf diese Weise schützt sich die Zelle vor thermischen Schäden oder Sauerstoffradikalen. Neben DsrA können noch zwei weitere *noncoding* RNAs mit der *rpoS* mRNA interagieren, wobei RprA die Translation aktiviert und OxyS diese inhibiert (Storz *et al.* 2004).

Als globaler RNA-Regulator kann die OxyS RNA mehr als 40 Gene aktivieren oder inhibieren (Altuvia *et al.* 1997). Die Transkription von OxyS wird bei oxidativem Stress aktiviert. Diese regulatorische ncRNA besitzt neben der *rpoS* mRNA als weitere Ziel-mRNA die in *trans* kodierte *fhlA* mRNA eines Transkriptionsfaktors. OxyS bindet an die Shine-Dalgarno-Sequenz und inhibiert auf diese Weise die Translation. (Altuvia *et al.* 1998; Argaman and Altuvia 2000).

Eine andere kleine RNA Spot 42 wird durch cAMP-CRP reprimiert, wenn keine Glukose im Medium vorliegt. Spot 42 RNA kann mit Sequenzen innerhalb der *galETMK* mRNA Basenpaare ausbilden. Ist Glukose im Medium, wird Spot 42 RNA verstärkt transkribiert und blockiert die Ribosomenbindestelle der *galk* mRNA, wodurch es zu einem erhöhten GALE zu GalK-Verhältnis kommt (Moller *et al.* 2002).

Häufig wird für die Funktion der kleinen RNAs *in vivo* das Protein Hfq (*host factor for Q β*) benötigt, das ursprünglich als ein bei der Replikation erforderter Wirtsfaktor des Bakteriophagen Q β indentifiziert wurde. Es besitzt Homologie mit SM- und SM-ähnlichen Proteinen von Degradasom- und *splicing*- Komplexen von Eukaryoten und Archaeen (He and Parker 2001). Dies konnte durch Vergleiche der Kristallstrukturen von Hfq aus *Staphylococcus aureus* und *E. coli* mit der von eukaryotischen und archaealen SM- und SM-ähnlichen Proteinen bestätigt werden (Schumacher *et al.* 2002; Sauter *et al.* 2003). Diese Proteine bilden Ringstrukturen aus sechs oder sieben Monomeren (Moller *et al.* 2002). Hfq bindet an A/U-reiche Regionen und zeigt RNA-Chaperon-Aktivität. So vermittelt es zwischen ncRNAs und ihren Ziel-mRNAs, so dass Basenpaarung ermöglicht werden, die nach Entfernung von Hfq Bestand haben. Als Beispiel hierfür können auch OxyS RNA und Spot 42 RNA genannt werden, die bei Hfq-Anwesenheit aneinander binden (Moller *et al.* 2002; Zhang *et al.* 2002; Moll *et al.* 2003).

Es gibt weiterhin spezielle RNAs, die durch Nachahmung von Strukturen wirken. Die tmRNA vereint die Eigenschaften sowohl einer tRNA als auch einer mRNA in einem Molekül und übernimmt eine Qualitätskontrollfunktion bei der Translation. Sie kann, wie eine tRNA, mit der Aminosäure Alanin beladen werden und bei gestoppter Translation, etwa bei defekten mRNAs, in die *A-site* des Ribosom binden (Komine *et al.* 1994). Nun wird das Alanin an die Polypeptidkette gehängt und die Translation kann fortgesetzt werden, jedoch von dem 10 Aminosäure langen Leserahmen der tmRNA. Dadurch erhält dieses fehlerhafte Protein am C-Terminus ein Signalpeptid und wird von einer ATP-abhängigen Protease erkannt und abgebaut (Withey and Friedman 2002).

Ein weiteres Beispiel für molekulare Mimikry von RNAs sind CsrB und CsrC, die 18 bzw. 9 Bindestellen für das globale Regulatorprotein CsrA enthalten. Dieses bindet meist mehrfach an 5'-untranslatierte Bereiche und beeinflusst deren Stabilität und Translationseffizienz. Die

vorhandene CsrB- und CsrC-Konzentrationen bestimmen zusammen die Verfügbarkeit von freiem CsrA (Romeo 1998). Außerdem wurde dazu ein weiteres involviertes Protein (CsrD) entdeckt, das die beiden kleinen RNAs degradiert (Suzuki *et al.* 2006). Zusätzlich wurde eine CsrA-Bindestelle an der Shine-Dalgarno-Sequenz der *hfq* mRNA gefunden, wodurch die Translation inhibiert wird (Baker *et al.* 2007).

Desweiteren gibt es auch *cis* regulatorische RNAs, wie z. B. die so genannten *riboswitches*. Dies sind mRNA-Strukturen meist am 5'-Ende, die direkt mit Liganden, wie Flavinmononukleotide, Purinen, Methionin, Lysin oder Coenzymen (B12) wechselwirken können. Durch die Bindung erfolgt eine Strukturveränderung, die zu einer vorzeitigen Termination der Transkription führt. Eine Reihe von Stoffwechselwegen, wie Vitaminsynthese (Riboflavin, Thiamin) werden durch *riboswitches* reguliert (Nudler and Mironov 2004). Auch RNA-Thermometer zählen ebenfalls zu den *cis* regulierte RNA-Molekülen, die jedoch temperaturabhängig ihre Sekundärstruktur verändern, wodurch am 5'-Ende die Zugänglichkeit der Ribosomenbindestelle verändert wird (Narberhaus *et al.* 2006).

Die meisten regulatorischen RNA wirken auf posttranskriptioneller bzw. translationeller Ebene. Eine Ausnahme stellt die 6S RNA dar, die direkt die Transkription beeinflussen kann.

1.4 Die 6S RNA aus *Escherichia coli*

Die *E. coli* 6S RNA hat eine Länge von 184 Nukleotiden. Sie wurde bereits 1967 zum ersten Mal auf Polyacrylamidgelen von *in vivo* markierter Gesamt-RNA beschrieben (Hindley 1967) und konnte als eine der ersten stabilen *E. coli* RNAs sequenziert werden (Brownlee 1971). Desweiteren wurde gezeigt, dass die 6S RNA Teil eines größeren RNA-Protein-Komplexes ist (Lee *et al.* 1978), aufgrund eines fehlenden Phänotyps blieb die Funktion der 6S RNA jedoch über 30 Jahre rätselhaft (Lee *et al.* 1985). Wassarman und Storz fanden 2000 heraus, dass es sich bei dem spezifischen Proteinbindepertner der 6S RNA um die σ^{70} -assoziierte RNA-Polymerase ahndelt. Dies gab einen ersten Anhaltspunkt auf die Funktion der 6S RNA (Wassarman and Storz 2000).

1.4.1 Funktion der 6S RNA

Sowohl bei Überexpression als auch bei Deletion der 6S RNA konnte unter verschiedenen Bedingungen kein Phänotyp gefunden werden (Hsu *et al.* 1985; Lee *et al.* 1985). Die einzige bekannte Eigenschaft der 6S RNA war, dass sie eine besondere Stabilität zeigte (1.4.2). Erst im Jahr 2000 konnte die Koimmunopräzipitation der 6S RNA mit den RNA-Polymerase-Untereinheiten α , β und β' nachgewiesen werden (Wassarman and Storz 2000). Dabei sedimentierte die 6S RNA mit dem $E\sigma^{70}$ -Holoenzym, aber nicht mit σ^{70} oder σ^{38} alleine. Es konnten direkte Interaktion an β , β' und σ^{70} festgestellt werden (Wassarman and Storz 2000; Gildehaus *et al.* 2007). Aufgrund der spezifischen Wechselwirkung mit $E\sigma^{70}$, der Akkumulation in der stationären Phase und der *in vivo* Inhibierung von σ^{70} -abhängigen Promotoren wird bis heute davon ausgegangen, dass die 6S RNA bei der Anpassung der globalen, wachstumsphasenabhängigen Genexpression eine Rolle spielt. Dabei soll die 6S RNA durch Mimikry eines offenen Promotors das $E\sigma^{70}$ -Holoenzym in der stationären Phase binden und inaktivieren können. Im Zuge dessen wird angenommen, dass es zu einer bevorzugten Assemblierung und Nutzung des $E\sigma^{38}$ -Holoenzym kommt, wodurch verstärkt stationäre Phase-spezifische Gene transkribiert werden. Allerdings konnte auch eine schwache Bindung der 6S RNA an das $E\sigma^{38}$ -Holoenzym gezeigt werden (Gildehaus *et al.* 2007). Desweiteren sind die *in vivo* und *in vitro* Ergebnisse zur Promotorsensitivität der 6S RNA nicht eindeutig, da es widersprüchliche Ergebnisse zur Wirkung auf wachstumsphasenabhängige Promotoren gibt (Kim *et al.* 2004; Trotochaud and Wassarman 2004; Geißen 2007; Gildehaus *et al.* 2007). Nach neuesten Erkenntnissen gilt ein Promotor als sensitiv für die Hemmung durch die 6S RNA, wenn er entweder eine schwache -35-Region oder eine *extended* -10-Region (außer bei einem Konsensus -35-Element) besitzt. Die Kombination beider Kernpromotorelemente modulierten den 6S RNA-Effekt auf den Promotor (Cavanagh *et al.* 2008). Generell kann geschlossen werden, dass die 6S RNA das Überleben bei Nahrungsmangelbedingungen verbessert, in dem sie die Transkription in der stationären Phase verändert. Die Wirkung auf das $E\sigma^{70}$ -Holoenzym scheinen direkter Natur zu sein, wohingegen der Einfluss auf σ^{38} -abhängige Promotoren eher indirekt durch eine Umverteilung der RNA-Polymerasen erfolgt.

Einen ähnlichen Mechanismus zeigt die B2 RNA aus der Maus. Sie kann an die RNA-Polymerase II binden, allerdings mimikriert sie keinen Promotor, sondern besetzt spezifisch eine besondere Region auf der Polymeraseoberfläche. Auf diese Weise wird die Transkription bei Hitzeschock gehemmt (Espinoza *et al.* 2004; Espinoza *et al.* 2007).

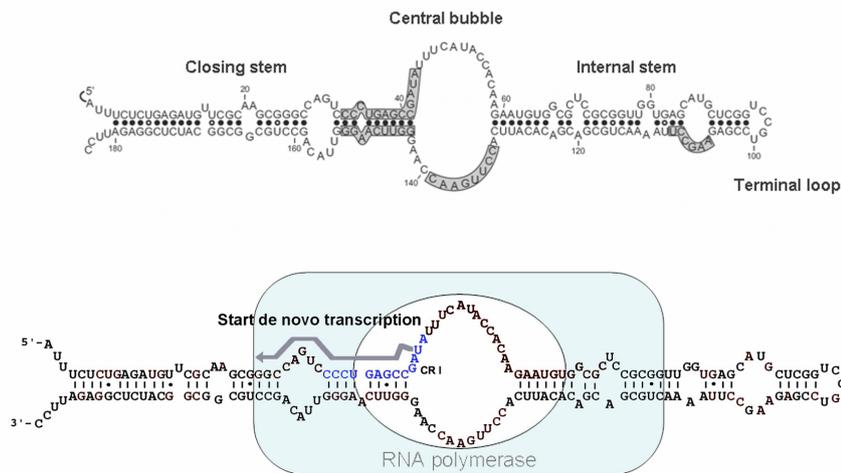


Abbildung 1.2: Die Sekundärstruktur der 6S RNA.

Der obere Teil zeigt die Sekundärstruktur der 6S RNA, ermittelt durch Strukturvergleiche (Brown and Ellis 2005). Dabei sind die hochkonservierten Sequenzen grau hinterlegt. Der *closing stem*, der *internal stem*, die zentrale Blase sowie der terminale *loop* sind eingezeichnet. Im unteren Teil ist das Promotormimikry-Modell schematisch dargestellt. Dabei liegt die 6S RNA im aktiven Zentrum der RNA-Polymerase. Außerdem kann die 6S RNA als *template* für die Synthese sogenannten *de novo* RNA dienen.

Inzwischen sind auch Phänotypen unter speziellen Gegebenheiten identifiziert worden. Deletionsmutanten von *ssrS* zeigen bei Konkurrenz gegen den Wildtyp unter lang andauernden stationären Bedingungen einen Wachstumsnachteil (Trotochaud and Wassarman 2004). Weiterhin überleben Zellen ohne 6S RNA bei erhöhten pH-Werten besser als der Wildtyp, da das Gen für das *phage shock protein F* (*pspF*) dereprimiert wird (Trotochaud and Wassarman 2006).

Neueste Untersuchungen ergaben, dass bei *in vitro* Transkriptionen die 6S RNA als *template* des $E\sigma^{70}$ -Holoenzym benutzt werden kann, wodurch in Abwesenheit von DNA kurze (14-24 Nukleotide) und auch lange (170-220 Nukleotide) spezifische RNAs, sogenannte *de novo* RNA oder pRNA (*product* RNA) entstehen können (Wassarman and Saecker 2006;

Gildehaus *et al.* 2007). Dies erfolgt *in vitro* bei erhöhten Nukleotidkonzentrationen und weist auf einen möglichen Einfluss der 6S RNA *in vivo* beim Umschalten von stationärem zu exponentiellem Wachstum bei verbesserten Bedingungen hin (Wassarman and Saecker 2006). Der Nachweis des *de novo*-Transkripts stützt eindeutig und überzeugend das Promotor-*mimikry*-Modell und eröffnet ein neues Feld der Transkriptionsregulation in Prokaryoten.

1.4.2 Struktur und Stabilität der 6S RNA

Mittels *in silico* Phylogenie-Vergleichen von berechneten Sekundärstrukturen wurden bei verschiedenen Eubakterien mehr als 100 Homologe der 6S RNA gefunden, deren Sekundärstruktur in drei konservierte Hauptbereiche unterteilt werden kann (Barrick *et al.* 2005; Brown and Ellis 2005). Einen *closing stem*, eine zentrale einzelsträngige Domäne (*bubble*) und den terminalen *loop*. Die Struktur ist überwiegend doppelsträngig, wobei die Stammregionen mehrere kleine interne *loops* enthalten (Abbildung 1.2). Diverse Sekundärstrukturvorhersagen wurde durchgeführt (Vogel *et al.* 1987; Wassarman and Storz 2000; Trotochaud and Wassarman 2005; Willkomm *et al.* 2005) und mit chemischen und enzymatischen *mapping*-Analysen bestätigt (Gildehaus 2001; Barrick *et al.* 2005). In Abbildung 1.2 ist die Sekundärstruktur der 6S RNA gezeigt. Aufgrund ihrer Bindung an $E\sigma^{70}$ und ihrer stark konservierten Sekundärstruktur, die einem geöffneten DNA-Doppelstrang innerhalb der Transkriptionsblase der RNA-Polymerase ähnelt, wird für die 6S RNA das Promotor-*mimikry*-Modell postuliert (Wassarman and Storz 2000; Barrick *et al.* 2005).

Die zentrale Blase der 6S RNA ist sehr flexibel, hat einen niedrigen Schmelzpunkt und kann variable Strukturen einnehmen, weshalb auf eine große Dynamik in diesem Molekülbereich geschlossen wird. In Temperaturgradienten-Gelelektrophoresen (TGGE) denaturiert die 6S RNA irreversibel bei etwa 45°C, wodurch die kompakte Struktur aufgelöst wird und die Mobilität der 6S RNA reduziert wird (Gildehaus 2001).

Die 6S RNA wurde als Teil des 11S Ribonukleoproteinpartikel identifiziert (Lee *et al.* 1978; Hsu *et al.* 1985). Die Interaktion mit Protein verleiht der 6S RNA ihre extreme Stabilität *in vivo*. So wurde festgestellt, dass aufgereinigte 6S RNA nach Zugabe von Zellextrakt eine verringerte Stabilität aufweist (Lee *et al.* 1978). Auch unter unterschiedlichsten

Wachstumsbedingungen konnte für die 6S RNA keine Bedingung gefunden werden, bei der die Stabilität verringert wird (Lee *et al.* 1978). Im Verlauf dieser Arbeit ergab sich ein erster Hinweis auf eine verminderte Stabilität aus der Beobachtung, dass die relative 6S RNA-Menge bei Verdünnung in frischem Medium abnahm.

1.4.3 Regulation und Prozessierung der 6S RNA

Das *ssrS*-Gen (*small stable RNA S*) kodiert für die 6S RNA und ist Teil eines dicistronischen Leserahmens, zusammen mit dem *downstream* liegenden Gen *ygfA*. Die Aminosäuresequenz dieses putativen Proteins besitzt Ähnlichkeit mit eukaryotischen Methenyltetrahydrofolat-Synthetasen und wird *in vivo* exprimiert (Hsu *et al.* 1985). Beide koexprimierten Gene *ssrS* und *ygfA* haben Homologe in diversen Eubakterien und in vielen Fällen sind sie gemeinsam als *ssrS-ygfA*-Operon konserviert (Barrick *et al.* 2005). Im Bereich des *ssrS* P2 Promotors liegt das Gen *ygfE*. YgfE ist funktionell homolog zu dem in die Zellteilung involvierten Proteins ZapA von *B. subtilis* (Small *et al.* 2007). In Abbildung 1.3 ist die *ssrS-ygfA*-Promotorregion mit den Tandempromotoren *ssrS* P1 und P2 schematisch dargestellt.

Beide *ssrS* Promotoren tragen zur Expression der 6S RNA bei. Der proximale P1 Promotor ist σ^{70} -spezifisch und der P2 Promotor wird sowohl von $E\sigma^{38}$ als auch von $E\sigma^{70}$ erkannt und es werden Vorläufermoleküle von den Positionen -9 und -224 gebildet (Griffin and Baillie 1973), (Kim and Lee 2004). Die 5'-Prozessierung des entstehenden P1-Primärtranskripts erfolgt relativ langsam durch die RNasen E und G, während das längere P2-Primärtranskript nur durch die RNase E prozessiert wird (Kim and Lee 2004), siehe Abbildung 1.3). Die bei der 3'-Prozessierung beteiligten Enzyme sind noch nicht identifiziert. Es wird jedoch vermutet, dass die finale 3'-Reifung, ähnlich wie bei tRNAs, durch Trimmen von Exonukleasen abläuft (Li *et al.* 1998). Die entstehenden reifen 6S RNA-Moleküle sind nicht einheitlich 184 Nukleotide lang, sondern können an ihrem 5'-Ende um bis zu zwei Nukleotide verkürzt sein (Gildehaus 2001; Kim and Lee 2004).

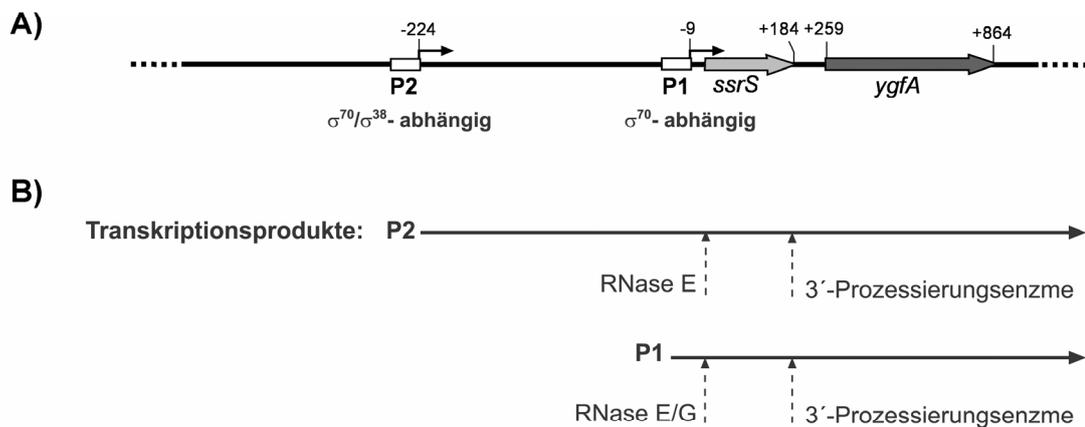


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung des *ssrS-ygfA*-Operons.

A) Gezeigt ist die *ssrS-ygfA*-Transkriptionseinheit mit den Positionen der Transkriptionsstartstellen bezogen auf das reife 5'-Ende der 6S RNA. Die *ssrS*-Promotoren P1 und P2 und ihre σ -Abhängigkeit sind angegeben. B) Abgebildet sind die Transkriptionsprodukte der beiden Promotoren und die Prozessierungsstellen durch die RNasen, soweit sie bekannt sind.

Die 6S RNA akkumuliert über die Wachstumsphasen von etwa 1.000 Kopien pro Zelle in der exponentiellen auf 10.000 Moleküle pro Zelle in der stationären Phase (Lee *et al.* 1978; Wassarman and Storz 2000), über die wachstumsphasenabhängige Regulation der 6S RNA ist hingegen wenig bekannt. Aufgrund der Promotorstrukturen und deren unterschiedlicher σ -Faktorabhängigkeit wird angenommen, dass die Transkription der 6S RNA durch den Wechsel der σ -Faktoren der RNA-Polymerase-Holoenzyme reguliert werden kann. Es gibt allerdings widersprüchliche Ergebnisse zur Akkumulation der 6S RNA im *rpoS*-Deletionsstamm (Wassarman and Storz 2000); (Kim and Lee 2004) (siehe 3.1.4).

Da *in vivo* unter Bedingungen der Stringenten Kontrolle keine Konzentrationsabnahme der 6S RNA erfolgt, wird angenommen, dass die *ssrS* Promotoren vermutlich nicht stringent reguliert werden (Ikemura and Dahlberg 1973; Hsu *et al.* 1985). Der proximale Promotor P1 besitzt jedoch eine GC-reiche Sequenz *downstream* der -10-Region, die charakteristisch für negativ stringent regulierte Promotoren ist.

1.5 RNA-Synthese: Transkription

Bakterien können sich schnell und effektiv an die sie umgebenden Umstände anpassen. Dazu ist eine präzise Regulation der Genexpression notwendig. Die zentrale Regulationsebene hierfür ist die Transkription, die durch die DNA-abhängige RNA-Polymerase durchgeführt wird und im Folgenden vorgestellt werden soll.

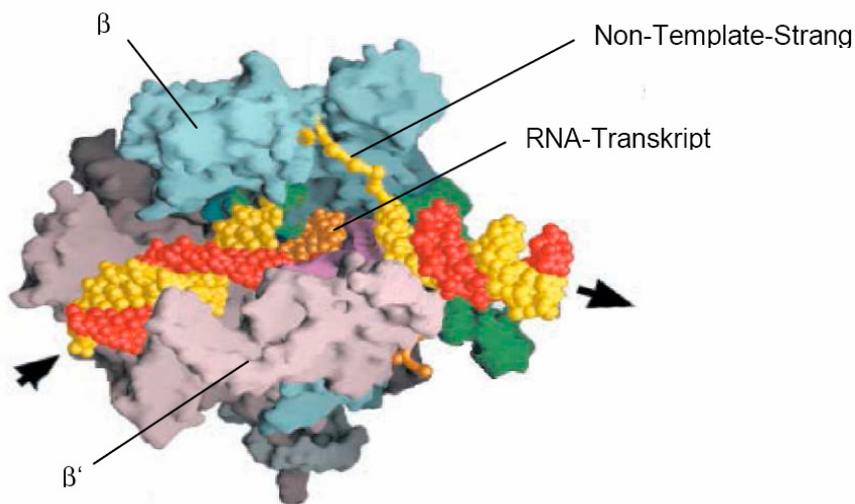


Abbildung 1.4: Dreidimensionales Struktur eines Elongationskomplexes von *Thermus aquaticus*. Die β -Untereinheit der RNA-Polymerase ist in blau-grün und die β' -Untereinheit lila abgebildet. Der *template*-Strang ist rot und der *non-template* Strang gelb eingefärbt. Das wachsende RNA-Transkript ist orange. Die Ein- und Austrittsstellen der DNA sind mit Pfeilen markiert (Korzheva *et al.* 2000).

1.5.1 Struktur und Funktion der bakteriellen RNA-Polymerase

Im Gegensatz zu Eukaryoten, die drei verschiedene DNA-abhängige RNA-Polymerasen besitzen, wird bei Prokaryoten die gesamte RNA-Synthese von einer einzigen DNA-abhängige RNA-Polymerase durchgeführt. Das *core*-Enzym besteht aus fünf Untereinheiten ($\alpha_2\beta\beta'\omega$), jedoch ist für die spezifische Promotorerkennung zusätzlich ein σ -Faktor notwendig. Mit Assoziation des σ -Faktors spricht man vom Holo-Enzym ($\alpha_2\beta\beta'\omega\sigma$), das ein Molekulargewicht von ca. 460 kDA besitzt (Record *et al.* 1996).

Mit einer Auflösung von 2,6 Å konnte die Struktur der RNA-Polymerase aus *Thermus thermophilus* aufgeklärt werden, von der man aufgrund der Homologie auf die Struktur der

E. coli RNA-Polymerase zurückschließen kann (Vassylyev *et al.* 2002) (Abbildung 1.4). In einer *E. coli* Zelle gibt es geschätzte 1000-3000 RNA-Polymerasen, wobei nur ungefähr 1 % frei vorkommt, also nicht an Nukleinsäure gebunden (Igarashi *et al.* 1991).

1.5.1.1 Der σ -Faktor

Bei *E. coli* sind sieben verschiedene, alternative σ -Faktoren bekannt, die die Transkription von bestimmten Gengruppen dirigieren und unter anderem dafür sorgen, dass die Genexpression an veränderte Bedingungen angepasst werden kann. Die σ -Untereinheiten sind Faktoren mit denen das Holo-Enzym spezifische Promotorensequenz erkennen kann. Das *core*-Enzym alleine ist zwar elongationsaktiv, kann aber weder spezifisch DNA binden noch die Transkription initiieren. Neben der Promotorerkennung wechselwirken σ -Faktoren mit Transkriptionsfaktoren, helfen beim Aufschmelzen des DNA-Doppelstrangs und dirigieren den Transkriptionsstart (Borukhov and Severinov 2002).

Der Großteil der in der logarithmischen Wachstumsphase exprimierten *housekeeping*-Gene wird von Promotoren transkribiert, die von dem Sigmafaktor σ^{70} erkannt werden. Desweiteren gibt es bei *E. coli* sechs alternative σ -Faktoren, die für Transkription stationärer Phase-spezifischer Gene (σ^{38}), der Hitzeschockgene (σ^{32} , σ^{24}), der Gene für die Synthese der Flagellen (σ^{28}), des Eisenmetabolismus (σ^{19}) und der Stickstoffverwertung (σ^{54}) zuständig sind (Ishihama 1999). Alle σ -Faktoren gehören zu der homologen σ^{70} -Familie bis auf σ^{54} , was eine eigene Familie bildet. Eine Übersicht der *E. coli* σ -Faktoren mit einer ungefähren Anzahl kontrollierter Gene ist in Abbildung 1.5 abgebildet.

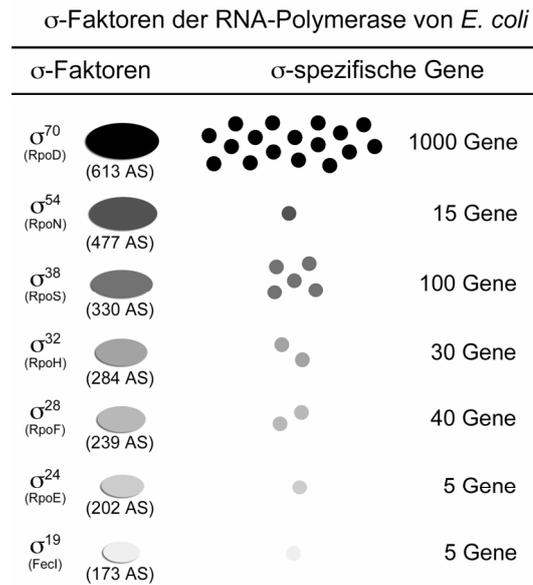


Abbildung 1.5: Die *E. coli* σ-Faktoren in einer schematischen Übersicht.

Dargestellt sind die bekannten σ-Faktoren mit ihrer Anzahl an Aminosäuren (AS) und einer ungefähren Abschätzung ihrer spezifischen Gene (Reckendrees 2004) verändert nach (Ishihama 2000).

Sigma 70

Der Sigmafaktor σ^{70} besitzt ein Molekulargewicht von 70 kDA (613 Aminosäuren) und wird durch das Gen *rpoD* kodiert. Die Anzahl der σ^{70} -Moleküle beläuft sich etwa auf 700-1000 Kopien pro Zelle (Jishage and Ishihama 1995). Der σ^{70} -Faktor besteht wie alle Mitglieder der σ^{70} -Familie aus vier Domänen mit mehreren Unterdomanen und ist in Abbildung 1.6 dargestellt. Die Erkennung der β - und β' -Untereinheit des core-Enzyms erfolgt durch die Region 2.1 und 3.2. Die Region 2.4 wechselwirkt mit der -10-Promotorregion, die Region 2.5 mit der extended -10-Region und die Region 4.2 erkennt die -35-Region des Promotors. In den Regionen 2.4 und 2.5 sind helix-turn-helix-Motive enthalten. Für die Isomerisierung vom geschlossen zum offenen Komplex ist die Region 2.3 mitverantwortlich. Die Röntgenstruktur von σ^{70} ist bis auf die Region 1.1 aufgeklärt. Diese ist sehr sauer und unterbindet dadurch vermutlich eine DNA-Bindung von freien σ^{70} -Molekülen. Erst nach Bindung des core-Enzyms und damit einhergehender Konformationsänderung erfolgt die Wechselwirkung mit der DNA (Dombroski et al. 1993).

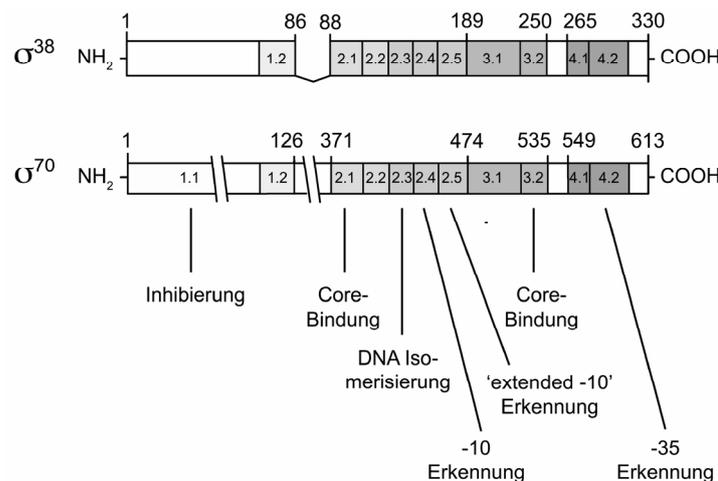


Abbildung 1.6: Funktionelle Domänen der σ -Faktoren σ^{70} und σ^{38} im Vergleich.

Grenzen der vier konservierten Domänen sind mit den Aminosäurepositionen markiert. Die Funktion einzelner Regionen ist angegeben. (Reckendrees 2004 nach (Checroun *et al.* 2004).

Sigma 38

Beim Übergang in die stationäre Phase reduzieren *E. coli* Zellen ihr Wachstum stark und verändern ihre Genexpression. Dabei werden anstatt der *housekeeping*-Gene nun spezifische Gene exprimiert, die für das Überleben in der stationären Phase gebraucht werden. Der σ^{38} -Faktor kontrolliert neben diesen Genen auch solche, die bei Stress, hoher Osmolarität oder Nahrungsmangel notwendig sind (Hengge-Aronis 1996). σ^{38} wird von dem Gen *rpoS* kodiert (330 Aminosäuren, 37,8 kDa), gehört zur σ^{70} -Familie und hat auch die größte Homologie zu σ^{70} . In der stationären Phase steigt σ^{38} auf eine Kopienzahl von 200-300 pro Zelle, erreicht jedoch maximal 30 % so viele Kopien wie σ^{70} (Ishihama 2000). Außerdem ist die Affinität von σ^{70} an das *core*-Enzym etwa fünffach höher als die von σ^{38} (Colland *et al.* 2002), weshalb der Mechanismus der Funktionsübernahme von σ^{38} in der stationären Phase noch nicht vollständig verstanden ist.

1.5.2 Struktur und Funktion von Promotoren

Die Transkriptionsstartstellen werden als Promotoren bezeichnet. Promotoren sind konservierte DNA-Abschnitte *upstream* von Genen, an denen die DNA-abhängige RNA-Polymerase binden kann und die Transkription initiiert wird. Dabei enthält die Primärsequenz

des Promotors Informationen, die eine Diskriminierung von verschiedenen Holoenzymen erlaubt. σ -Faktoren kontrollieren gewöhnlich Regulons, die aus verschiedenen unabhängigen Operons bestehen. Auf diese Weise kann ein σ -Faktor eine Vielzahl an Promotoren differentiell regulieren. Manche Promotoren werden nur von einem Holo-Enzym erkannt, andere wiederum, wie beispielsweise $E\sigma^{70}$ - und $E\sigma^{38}$ -Holoenzyme zeigen oft *in vitro* und zum Teil *in vivo* eine überlappende Promotorspezifität. Im Folgenden wird auf die σ^{70} - und σ^{38} -abhängigen Promotoren kurz eingegangen.

1.5.2.1 Der σ^{70} -spezifische Konsensuspromotor

Für die Ermittlung der Konsensussequenz der σ^{70} -abhängige Promotoren wurden mehr als 300 verschiedene natürliche Promotoren miteinander verglichen und es kristallisierten sich drei Hauptstrukturelemente heraus (Lisser and Margalit 1993). Der Kernpromotor besteht aus einer -10- (5'-TATAAT-3') und einer -35-Region (5'-TTGACA-3'), die durch einen 17 ± 1 bp langen Spacer voneinander getrennt sind. Dessen Sequenz ist nicht konserviert, jedoch verändert vor allem die Länge und auch das Purin zu Pyrimidinverhältnis die Stärke des Promotors (Beutel and Record 1990). Die konservierten hexameren Sequenzen wurden aufgrund der Lage ihrer Zentren (10 bzw. 35 bp) *upstream* des Transkriptionsstart (+1) so genannt. Zusätzlich zu den Kernpromotorelementen gibt es die *upstream* aktivierende Sequenz (UAS), an die Transkriptionsfaktoren binden können. Außerdem gibt es bei einigen Promotoren *downstream* Sequenzregionen (DSR), die die Transkriptionsstärke ebenfalls mitregulieren können. Als Vertreter eines σ^{70} -abhängigen Promotors wird in dieser Arbeit der *rrnB* P1 Promotor verwendet, der aufgrund weiterer Regulationsmerkmale *in vivo* zu den stärksten Promotoren überhaupt gehört.

1.5.2.2 Der σ^{38} -spezifische Promotor

Der σ^{38} -spezifische Promotor besteht ebenfalls aus den drei Kernpromotorelementen, nämlich der -10-Region, -35-Region und Spacer. Allerdings sind Unterschiede zu dem σ^{70} -abhängigen Promotor bekannt. Die konservierte Konsensussequenz der -10-Region von σ^{38} -spezifischen Promotoren lautet: 5'-KCTATACT-3' (K bedeutet T oder G) und enthält eine verlängerte

(*extended*) -10-Region (Position -14 bis -7) in *upstream*-Richtung. Dabei ist ein C an Position -13 hochkonserviert (85 %) für den σ^{38} -abhängigen Promotor (Becker and Hengge-Aronis 2001). Die -35-Region ist degeneriert und wenig konserviert (Lee and Gralla 2001), trotzdem ist sie bedeutend für σ^{38} -abhängige Transkription (Hengge-Aronis 2002). Bei einigen, aber nicht allen, σ^{38} -Promotoren ist eine A/T-reiche Sequenz zwischen -10-Region und +1 für eine Transkriptionsaktivierung verantwortlich, andere werden durch eine verkürzte UP-Sequenz aktiviert (Ojangu *et al.* 2000; Germer *et al.* 2001). Ein typischer σ^{38} -Promotor ist der *bolA* Promotor. Viele der σ^{38} -Promotoren zur Klasse der *gearbox*-Promotoren, deren Aktivität invers zur Wachstumsrate korreliert (Jishage and Ishihama 1999).

1.5.3 Der Ablauf der Transkription

Der Prozess der Transkription kann in drei Phasen unterteilt werden: die Initiation, die Elongation und die Termination. In jeder dieser Phasen, die im Folgenden vorgestellt werden, kann Regulation erfolgen.

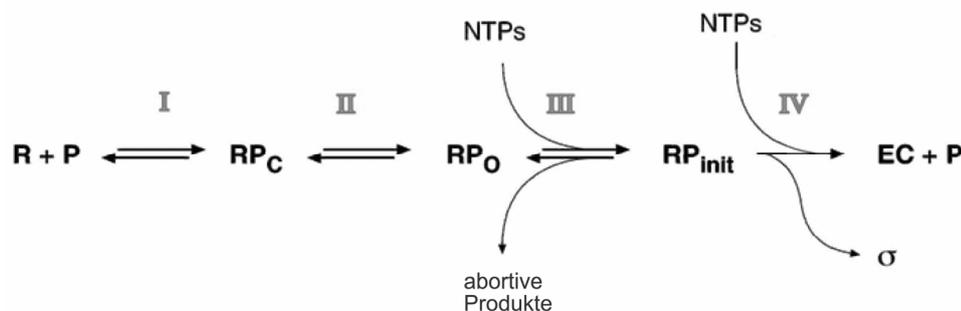


Abbildung 1.7: Ablauf der Transkriptionsinitiation.

Dargestellt sind die vier Phasen (I-IV) der Initiation. (I): Bindung der RNA-Polymerase (R) an den Promotor (P) unter Bildung des geschlossenen Komplexes (RP_C). (II): Isomerisierung zum offenen Komplex (RP_O). (III): Mit Einbau der ersten NTPs wird der ternäre Komplex (RP_{init}) gebildet. Freisetzung von kurzen abortiven Produkten bei Rückreaktion. (IV): Dissoziation des σ -Faktors und Bildung des Elongationskomplexes (Record *et al.* 1996).

Die Transkriptionsinitiation kann in mindestens vier Schritte unterteilt werden, die in Abbildung 1.7 schematisch dargestellt sind. Zunächst erfolgt die DNA-Promotorbindung zum reversiblen Initiationskomplex. Dieser sogenannte geschlossene Komplex (RP_C) aus RNA-Polymerase und Promotor trägt seinen Namen, weil der DNA-Doppelstrang noch nicht

aufgeschmolzen ist. Durch das Aufschmelzen der DNA-Doppelhelix im Bereich der -10-Region wird eine 10-15 Nukleotid große Transkriptionsblase gebildet. Diese Isomerisierung zum offenen Komplex (RP_O) ist reversibel und σ interagiert spezifisch mit dem *non-template*-Strang (Roberts and Roberts 1996). Durch den Einbau der ersten NTPs im aktiven Zentrum erfolgt der Übergang zum ternären Initiationskomplex (RP_{init}), der strukturell dem binären Komplex (RP_O) gleicht (Newlands *et al.* 1991). Ab dem dritten eingebauten NTP bewegt sich die RNA-Polymerase in *downstream*-Richtung. An diesem Punkt kann die Initiation unter Abspaltung abortiver Transkripte (2-12 Nukleotide) abgebrochen werden und der binäre Komplex entstehen (abortive Initiation) oder die RNA-Polymerase verlässt unter Freisetzen des σ -Faktors den Promotor. Nach diesem Übergang zum Elongationskomplex (EC) bei einer Transkriptlänge von 7-12 Nukleotiden erfolgt die prozessive Elongation durch das *core*-Enzym (Record *et al.* 1996).

Bei der Elongation bewegt sich das *core*-Enzym in 5'-Richtung entlang des *template*-Strangs und transkribiert die RNA-Kette mit einer Geschwindigkeit von etwa 50 Nukleotiden pro Sekunde. Dabei wird der DNA-Doppelstrang entwunden und die Transkriptionsblase ist in einem Bereich von 14-18 Nukleotiden geöffnet (Uptain *et al.* 1997). Das wachsende 3'-Ende der RNA bildet über 8-9 Basenpaarungen ein DNA-RNA-Hybrid mit dem *template*-Strang (Nudler *et al.* 1997; Nudler *et al.* 1998). Das 5'-Ende des Transkripts fängt, sobald es den *exit channel* verlassen hat, an sich zu falten. Dabei können sich Strukturen bilden, die direkt oder durch Bindung weiterer Faktoren die Transkription pausieren lassen können (Krohn and Wagner 1996; Artsimovitch and Landick 2000).

Bei der Termination der Transkription wird die RNA-Synthese beendet in dem die gebildete RNA entlassen wird und die Polymerase die *template*-DNA verlässt. Dieser Vorgang kann faktorabhängig oder faktorunabhängig erfolgen (Richardson 1993). Bei der faktorunabhängigen (intrinsischen) Termination wird ein stabiler *hairpin* mit folgendem Poly-U-Schwanz gebildet, wodurch der Elongationskomplex destabilisiert wird. Bei der faktorabhängigen Termination bindet das Rho-Protein an sogenannte *rut sites* (*rho utilisation sites*) der wachsenden RNA, bewegt sich unter ATP-Verbrauch Richtung 3'-Ende und vermittelt beim Pausieren der Transkription durch eine Entwindung des RNA-DNA-Hybrids die Dissoziation des Elongationskomplexes (Platt 1994).

1.6 Transkriptionsregulation in *E. coli*

Jacob und Monod erklärten 1961 mit ihrem Operon-Modell die Expressionsregulation der *lac*-Gene des Bakteriophagen λ (Jacob and Monod 1961). Dieser klassische Regulationsmechanismus erfolgt durch die hochaffine Bindung des *lac*-Repressor an die Operatorsequenz, die sich direkt *downstream* des Promotors befindet, wodurch die Transkription inhibiert wird. Wichtig ist bei allen Formen der Regulationen, dass diese reversibel sind. Erst bei der Anwesenheit eines Induktors (1,6-Allo-Laktose) wird die Affinität des *lac*-Repressors verringert und man spricht von einer Derepression. Es gibt eine Vielzahl an Beispielen, bei denen dieses Regulationskonzept nachgewiesen wurde. Die bindenden Transkriptionsfaktoren besitzen häufig einen modularen Aufbau. Sie bestehen meist aus geradzahligem Multimeren, die eine symmetrische Struktur aufweisen und mit ihrer DNA-Bindungsdomäne palindromische Sequenzen erkennen. Oft besitzen sie Oligomerisierungsdomänen und Bereiche, die für die Affinitätsveränderung verantwortlich sind. Das daraus resultierende Wirkungsspektrum ist sehr breit gefächert und lässt durch die große Zahl der teilnehmenden Faktoren die Komplexität erahnen.

1.6.1 Einfluss der Krümmung auf die Transkription

Neben den angesprochenen Transkriptionsfaktoren spielt die Struktur der Ziel-DNA eine entscheidende Rolle bei der Transkriptionsregulation. Die normale B-Form der DNA ist keine starre, gestreckte Struktur, sondern kann unterschiedliche Konformationen einnehmen, sich krümmen oder Schleifen bilden. Die Strukturen können rein sequenzabhängig, also intrinsisch sein, oder durch Proteine verändert werden. Bei der Transkriptionsinitiation wird die DNA um die RNA-Polymerase gewickelt, dies wird durch intrinsisch gekrümmte Promotor-*upstream*-Bereiche erleichtert und auch als *wrapping* bezeichnet.

Für viele DNA-bindenden Proteine gilt, dass sie bevorzugt mit gekrümmten DNA-Sequenzen interagieren (Yamada *et al.* 1990; Yamada *et al.* 1991; Zacharias *et al.* 1992). Durch Bindung von Transkriptionsfaktoren kann gerade, jedoch flexible, DNA gekrümmt werden oder vorhandene Krümmung verstärkt werden. Eine solche proteininduzierte Krümmung wird als

bending bezeichnet. Die lokale sequenzabhängige Krümmung wird durch eine Reihe Modelle beschrieben, wobei in Abbildung 1.8 zwei schematisch vorgestellt werden sollen.

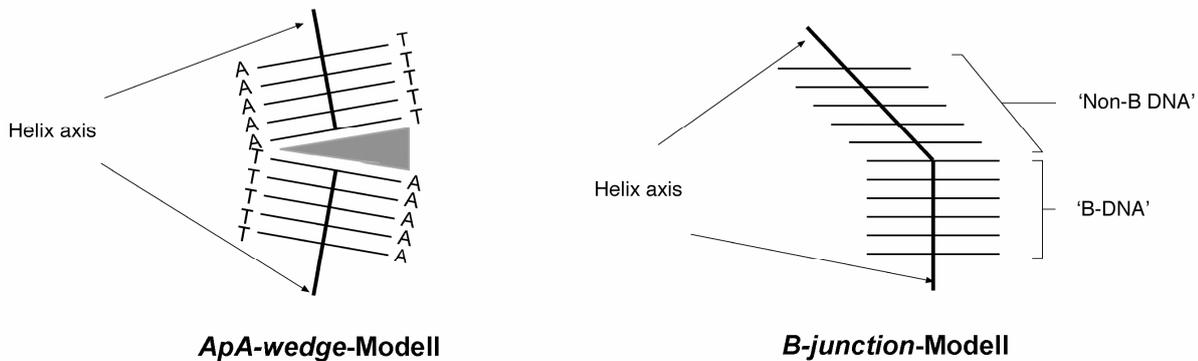


Abbildung 1.8: DNA-Krümmungsmodelle.

Beim *ApA-wedge*-Modell kommt es zur DNA-Krümmung durch Winkelveränderungen (*roll* und *tilt*) der Basenpaare zueinander bei sich wiederholenden ApA-Dinukleotidsequenzen und das *B-junction*-Modell geht von einer Krümmung durch Veränderung der DNA-Form aus.

Das *ApA-wedge*-Modell geht davon aus, dass sich jedes ApA-Dinukleotid des gestapelten Basenpaares durch *roll*- und *tilt*-Winkelveränderung von $5\text{-}15^\circ$ verdreht, wodurch eine Abweichung der gestreckten Helixachse erfolgt. Wenn dieser 'Keil' sich in helikaler Periodizität (alle 10 bis 11 Basen) wiederholt, wird die Helixachse planar gekrümmt (Wu and Crothers 1984; Diekmann and Wang 1985). Eine alternative Erklärung liefert das *B-junction*-Modell. Es erklärt die Krümmung durch einen Wechsel zwischen einer B-förmigen und einer nicht-B-förmigen DNA, wodurch ebenfalls ein Knick in der Helixachse auftritt. Durch helikaler Wiederholung von solchen Knicks kommt es ebenfalls in Raumrichtung zu einer planaren Krümmung (Wagner 2000).

Intrinsisch gekrümmte DNA-Fragmente migrieren in nativen PAA-Gelen langsamer als gestreckte, wobei die Lage des Krümmungszentrums einen Einfluss auf die Mobilität besitzt. Wenn sich die Krümmung im Zentrum des DNA-Fragments befindet, ist die beobachtete Wanderungsgeschwindigkeit am geringsten. Das Verhältnis der erwarteten zur beobachteten Mobilität gibt den *k*-Faktor an, der bei $k > 1$ auf eine gekrümmte Konformation schließen lässt (Thompson and Landy 1988). Inzwischen sind mehrere verlässliche Modelle für die Berechnung der DNA-Krümmung verfügbar (Dlakic and Harrington 1998).

1.6.2 Nukleoid-assoziierte Proteine beeinflussen die DNA-Dynamik

In Bakterien wird das zirkuläre Genom als Nukleoid bezeichnet. Das Nukleoid liegt in einer stark kompaktierten Struktur mit zahlreichen DNA-Schleifen (*loops*) vor, die sich dynamisch verändern können. Die Kompaktierung und strukturellen Funktionsveränderungen erfolgen durch Superspiralisierung, makromolekulares *crowding* und Architekturproteine, die auch als Nukleoid-assoziierten Proteine (NAPs) bezeichnet werden. Sie binden bevorzugt an gekrümmte DNA und zeichnen sich durch eine hohe Kopienzahl aus, die meist wachstumsratenabhängig reguliert wird. Früher wurden NAPs Histon-ähnliche Proteine genannt, da sie klein sind, DNA kompaktieren und in hoher Zahl vorkommen. Allerdings gibt es keine Sequenzhomologie zu eukaryotischen Histonen und sie besitzen zum Teil völlig andere Funktionen. So können sie auch als direkte Transkriptionsfaktoren wirken. Es gibt ca. 10 verschiedene NAPs, die entweder strukturell oder regulatorisch auf alle Abläufe Einfluss nehmen, bei denen DNA eine Rolle spielt. Dazu gehören Reaktionen wie DNA-Replikation, Rekombination, Reparatur und Transkription. So kann die Transkription und damit die gesamte Genexpression direkt oder indirekt verändert werden. Weiterhin beeinflussen NAPs die Superhelikalität der DNA und modulieren die Zugänglichkeit durch Veränderung der *loop*-Strukturen. Auf diese Weise kann die Transkription auch indirekt reguliert werden. Durch eine veränderte Topologie wird jedoch auch die Bindung der NAPs moduliert. Die NAPs und die Topologie der DNA können sich gegenseitig in Abhängigkeit der vorliegenden Umweltbedingungen beeinflussen und spielen eine wichtige Rolle bei der Anpassung an wechselnde Umweltbedingungen. Im Folgenden sollen die in dieser Arbeit verwendeten globalen Transkriptionsregulatoren vorgestellt werden.

1.6.2.1 H-NS (*histone-like nucleoid structuring protein*)

H-NS besitzt ein Molekulargewicht von 15,6 kDa (136 Aminosäuren), ist als Dimer aktiv und beeinflusst die Expression von etwa 200 Genen. H-NS wird durch die kleine RNA DsrA negativ reguliert, die bei niedrigen Temperaturen induziert wird. H-NS ist hoch konserviert in Gram-negativen Bakterien und bindet bevorzugt relativ sequenzunspezifisch an gekrümmte AT-reiche Bereiche, wie sie oft in der Nähe bakterieller Promotoren zu finden sind (Schröder

and Wagner 2002). Für H-NS ist kein typisches DNA-Bindemotiv bekannt. Der C-Terminus bindet an die DNA und über den N-Terminus können H-NS-Moleküle dimerisieren und oligomerisieren. Verbunden sind die beiden Domänen durch einen flexiblen Linker, der für die Oligomerisierung notwendig ist. Aufgrund des flexiblen Linkers konnte H-NS bis jetzt nicht kristallisiert werden, aber es gibt NMR-Untersuchungen der beiden strukturierten terminalen Domänen. Der N-terminale Bereiche bildet eine *coiled coil*-Struktur, über die die Protein-Protein-Wechselwirkung vermittelt wird (Esposito *et al.* 2002; Bloch *et al.* 2003). Der exakte Mechanismus der DNA-Bindung, der Dimerisierung und der Oligomerisierung ist bis heute nicht eindeutig geklärt.

H-NS kann entlang der DNA oligomerisieren, wodurch sich Nukleoproteinkomplexe bilden. Dies führt dazu, dass die Transkription inhibiert wird (*silencing*, siehe Abbildung 1.9 B), da die RNA-Polymerase nicht mehr an die proteinbedeckte DNA binden kann. Auf diese Weise kann z. B. Fremd-DNA mit einem anderen GC-Gehalt, die durch horizontalen Gentransfer aufgenommen wurde, inaktiviert werden (Lucchini *et al.* 2006; Navarre *et al.* 2006). Außerdem ist bekannt, dass H-NS durch Dimer-Dimer-Interaktionen zwei benachbarte DNA-Bereiche miteinander verbrücken kann und so zu einem Einschluss der an den Promotor gebundenen RNA-Polymerase führt (*trapping*, siehe Abbildung 1.9 C und Abbildung 1.10) (Dame *et al.* 2002).

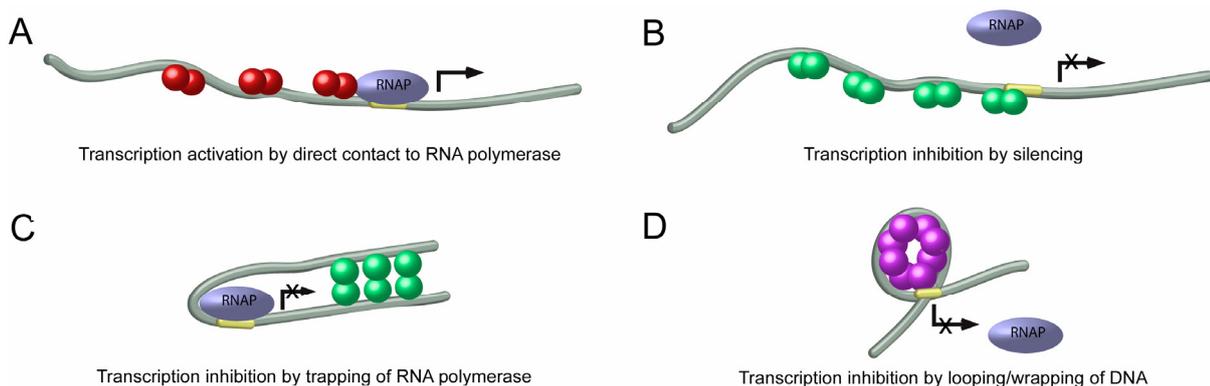


Abbildung 1.9: Transkriptionsregulation durch Nukleoid-assoziierte Proteine.

A) Aktivierung der Transkription durch direkte Wechselwirkung mit der RNA-Polymerase (*recruiting*). B) Transkriptionsinhibition durch Abdeckung der Promotoren (*silencing*). C) Inhibition der Transkription durch Einschluss der RNA-Polymerase (*trapping*). D) Transkriptionshemmung durch *loop*-Bildung bzw. Strukturierung von DNA-Bereichen (*looping / wrapping*) (Pul 2007).

1.6.2.2 FIS (*factor for inversion stimulation*)

FIS ist ein 11,2 kDa (98 AS) großes Protein, dessen Name ursprünglich von der Stimulation von DNA-Inversionsereignissen durch ortsspezifische Rekombinasen stammt (Kahmann *et al.* 1985). Die FIS-Konzentration ist sehr stark wachstumsphasenabhängig. Das Expressionsmaximum von FIS liegt in der frühen logarithmischen Phase mit ca. 100.000 Kopien pro Zelle und ist dadurch zu diesem Zeitpunkt die Hauptproteinkomponente des Nukleoids. Danach sinkt die Anzahl stark auf etwa 100 Kopien pro Zelle in der stationären Phase ab.

FIS-Homodimere erkennen die große Furche der DNA über ein *helix-turn-helix*-Motiv der C-terminalen Domäne. Dabei wird eine degenerierte palindromische Konsensussequenz gebunden (Hübner and Arber 1989), wodurch eine Verbiegung (*bending*) der DNA um 40-90° erfolgt (siehe Abbildung 1.10)(Zhang *et al.* 2004). Gene, die durch FIS aktiviert werden, besitzen oft mehrere FIS-Bindestellen nebeneinander im *upstream*-Bereich des Promotors. Bei Repression durch FIS finden sich gewöhnlich Bindestellen im Kernpromotor oder downstream des Transkriptionsstarts. Bei Bindung von FIS erfolgt eine mehrfache Krümmungsinduktion, wodurch eine Änderung der DNA-Topologie hervorgerufen werden kann. Neben der direkten Beeinflussung der Superhelikalität wirkt FIS auch indirekt durch Inhibierung der DNA-Gyrase-Gene auf die DNA-Topologie (Keane and Dorman 2003). Eine FIS-abhängige Transkriptionsaktivierung kann durch Wechselwirkung von FIS mit der α -C-terminalen Domäne der RNA-Polymerase erfolgen (*recruiting*, siehe Abbildung 1.9 A) (Bokal *et al.* 1997). Dies ist auch am Beispiel der rRNA-Operons gezeigt, wobei die Lage und die angulare Orientierung für die Stärke der Aktivierung wichtig sind (Zacharias *et al.* 1992; Hillebrand 2001).

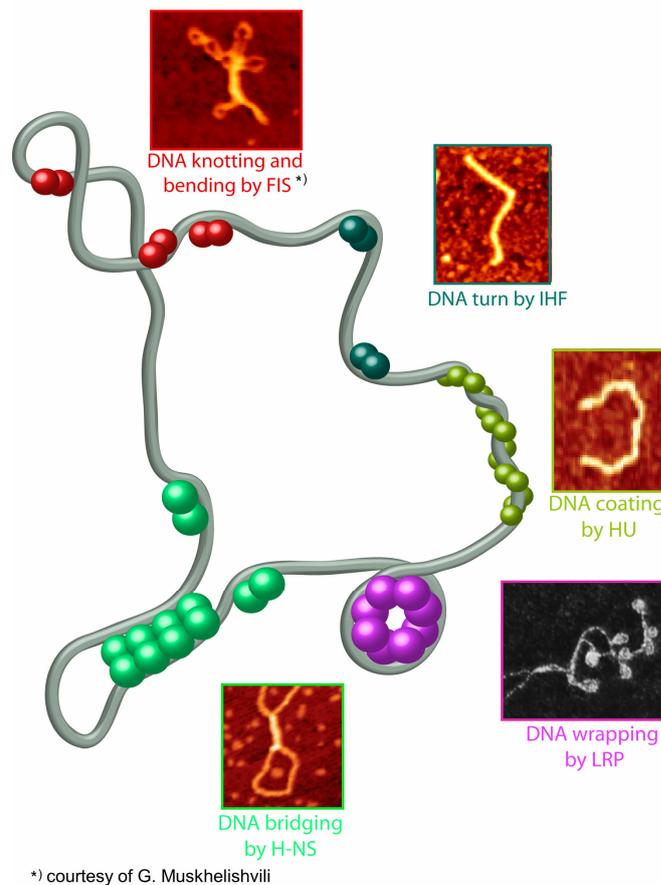


Abbildung 1.10: Schematische Darstellung und AFM-Aufnahmen der unterschiedlichen Einflüsse von Nukleoid-assoziierten Proteinen.

Mögliche Einflüsse der verschiedenen NAPs auf die DNA-Struktur. Krümmungsinduktion durch FIS, IHF und HU, DNA-Umwicklung von LRP sowie Verbrückung von DNA-Doppelsträngen durch H-NS (Pul 2007).

1.6.2.3 LRP (*leucine-responsive regulatory protein*)

LRP ist ein basisches Protein mit einer Masse von 18,8 kDa (163 Aminosäuren), welches sowohl in Gram-positiven als auch in Gram-negativen Bakterien konserviert ist. Es reguliert nahezu 10 % der Gene in *E. coli* und erreicht eine Zahl von ca. 3000 Molekülen pro Zelle bei Wachstum in Vollmedium. Seine Expression verläuft invers zur Wachstumsrate und wird vor allem durch die Verfügbarkeit und Qualität der Nahrungsressourcen beeinflusst. Daher gehört LRP zur Familie der FFRPs (*feast and famine regulatory proteins*), die sowohl in Archae- als auch in Eubakterien gefunden werden (Landgraf *et al.* 1996; Kawashima *et al.* 2008). LRP ist als Dimer aktiv, jedoch ist auch die Bildung höherer Oligomere möglich (Tetramere, Octamere, Hexadecamere). Der Oligomerisierungszustand von LRP verändert sich in

Anwesenheit von der Aminosäure Leucin, wodurch auch die DNA-Bindungsaffinität beeinflusst wird (Chen and Calvo 2002). Die Bindung an DNA erfolgt meist kooperativ über ein *helix-turn-helix*-Motiv am N-Terminus. LRP kann die DNA krümmen (*wrapping*), *loops* oder Nukleosomen-ähnliche Strukturen ausbilden (siehe Abbildung 1.9 D und Abbildung 1.10), (Pul *et al.* 2007). Die Bindestellen liegen häufig überlappend mit denen anderer Nukleoid-assoziiierter Proteine, was auf eine konzertierte Regulation hinweist (Pul *et al.* 2005). Der C-Terminus weist Homologie mit der RAM-Domäne (*regulation of amino acid metabolism*) auf, mit der Aminosäurestoffwechselwege in Prokaryoten allosterisch reguliert werden. Desweiteren ist der C-Terminus sowohl für die Dimerisierung als auch für die Oligomerisierung verantwortlich (de los Rios and Perona 2007).

1.6.2.4 StpA (suppressor of the *td*-phage phenotype)

StpA besitzt ein Molekulargewicht von 15,3 kDa (134 Aminosäuren) und ist ein Homolog von H-NS. Beide Proteine besitzen 58 % identische Aminosäuresequenzen, weswegen eine ähnliche Struktur angenommen wird (Dorman 2004). StpA und H-NS können die Funktion des jeweils anderen Proteins in vielen Fällen ersetzen und regulieren sich selber und gegenseitig in einer Rückkopplungsschleife. StpA kann Heteromere mit H-NS bilden, wobei nicht klar ist, ob sie biologisch relevant sind (Williams and Rimsky 1997). StpA bindet, wie H-NS, an gekrümmte DNA, inhibiert meist die Transkription und kann die DNA kompaktieren. Die Expression von StpA wird abhängig von der Temperatur, der Wachstumsphase und auch von dem Transkriptionsfaktor LRP reguliert. Desweiteren üben StpA und H-NS einen gemeinsamen Einfluss auf die Expression von Virulenzgenen aus, sowie auf die homologe Rekombination und Reparatur von Doppelstrangbrüchen (Muller *et al.* 2006; Shiraishi *et al.* 2007).

StpA wurde zuerst als Faktor entdeckt, der den Phänotyp einer *splicing*-defekten Mutante des T4-Phagens im Tymidylat-Synthase-Gen unterdrücken kann (Zhang and Belfort 1992). Dabei kann StpA falsch gefaltete *td* Vorläufer-RNA in die aktive Form umfalten, so dass die *splicing*-Reaktion ablaufen kann (Rajkowitsch *et al.* 2005). StpA besitzt folglich eine RNA-Chaperonaktivität, wobei die RNA-Affinität von StpA höher ist als die von H-NS.

1.7 Fragestellung und Konzeption der Arbeit

Die stabile 6S RNA aus *E. coli* akkumuliert in der stationären Phase und nach derzeitigen Erkenntnissen gilt sie als Regulator beim Wechsel von der σ^{70} -abhängigen zur σ^{38} -abhängigen Transkription. Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf Untersuchungen den Konzentrationsverlauf der 6S RNA über die Wachstumsphasen besser zu verstehen. Es sollten dazu detaillierte Informationen zur Expression dieses Moleküls ermittelt werden. Dabei standen die beiden Fragen im Vordergrund: wie wird die 6S RNA reguliert und wie diese hängt diese Regulation mit der Funktion der 6S RNA zusammen?

Zunächst war im ersten Teil der Arbeit beabsichtigt, den Einfluss der wachstumsphasenabhängig exprimierten und transkriptionsregulierenden Nukleoid-assoziierten Proteine FIS, H-NS, LRP und StpA auf die Expression der 6S RNA zu analysieren. Hierbei sollte die *in vivo* Akkumulation der 6S RNA über die Wachstumsphasen in Stämmen verfolgt werden, die Deletionen in den oben genannten Transkriptionsfaktoren besitzen. Da nicht alle Deletionsstämme den gleichen isogenen Stammhintergrund haben, war geplant, die 6S RNA-Konzentration jeder Deletionsmutante und der H-NS/StpA-Doppelmutante mit dem jeweiligen wildtypischen Stamm mittels quantitativer *primer extension*-Analyse zu vergleichen. Desweiteren sollte mittels Retardierungsanalysen bestimmt werden, ob FIS, H-NS, LRP und StpA *in vitro* an die regulatorische Region des *ssrS*-Gens binden können und wenn ja, an welchen Positionen diese Bindung erfolgt. Dazu war vorgesehen unterschiedliche *ssrS*-Fragmente zu benutzen und DNase I *footprint*-Analysen durchzuführen. Außerdem sollte mit gereinigten Holoenzymen durch *in vitro* Transkriptionen ermittelt werden, ob die Nukleoid-assoziierten Proteine einen direkten Einfluss auf die Transkription der beiden *ssrS* Promotoren *in vitro* haben.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit war vorgesehen zu untersuchen, welche globalen Auswirkungen das Fehlen der 6S RNA auf die Genexpression der *E. coli* Zelle hat. Hierzu sollten Transkriptomanalysen mit der DNA-Chiptechnologie und Proteomanalysen mittels 2D-Gelelektrophoresen durchgeführt werden. Es wurde sich von diesen beiden globalen Ansätzen versprochen, einen ersten Einblick auf die durch 6S RNA regulierten Operons zu erhalten, um mögliche Netzwerke zu identifizieren.

2 Ergebnisse

Die über die Wachstumsphasen akkumulierte stabile 6S RNA ist an der phasenabhängigen Adaption von Bakterien an Bedingungen der stationären Phase beteiligt. Über die Regulation der Expression der 6S RNA ist wenig bekannt. Lediglich der Wechsel von der σ^{70} -abhängigen zur σ^{38} -abhängigen Transkription beim Übergang von der exponentiellen zur stationären Phase ist bereits näher untersucht. Die Konzentration einer RNA in der Zelle wird grundsätzlich durch die Geschwindigkeiten von Synthese und Abbau bestimmt. Daher soll im Folgenden zunächst die Stabilität der 6S RNA in verschiedenen Wachstumsphasen untersucht werden. Des Weiteren soll *in vivo* und *in vitro* analysiert werden, ob Nukleoid-assoziierte Proteine, wie FIS, H-NS, LRP und StpA, die bekanntermaßen für eine Anpassung an Stress und Bedingungen der stationären Phase zuständig sind, einen Einfluss auf die 6S RNA-Expression haben. Außerdem sollen im Transkriptom und im Proteom nach Zielmolekülen gesucht werden, deren Expression durch das Fehlen der 6S RNA möglicherweise beeinflusst wird. Schließlich soll getestet werden, ob die 6S RNA einen messbaren metabolischen *turnover* bei verschiedenen physiologischen Bedingungen zeigt.

2.1 Die Stabilität der 6S RNA

Als erstes sollte die Stabilität der 6S RNA in verschiedenen Wachstumsphasen analysiert werden. Zur Untersuchung von RNA-Stabilitäten hat sich die Methode der Rifampicin-Kinetik bewährt. Darunter versteht man die Abbaukinetik von RNA nach Zugabe von Rifampicin. Dieses Antibiotikum inhibiert spezifisch die Initiation der Transkription, so dass sich nach Rifampicinzugabe leicht die Lebensdauer von RNA-Transkripten *in vivo* bestimmen lässt.

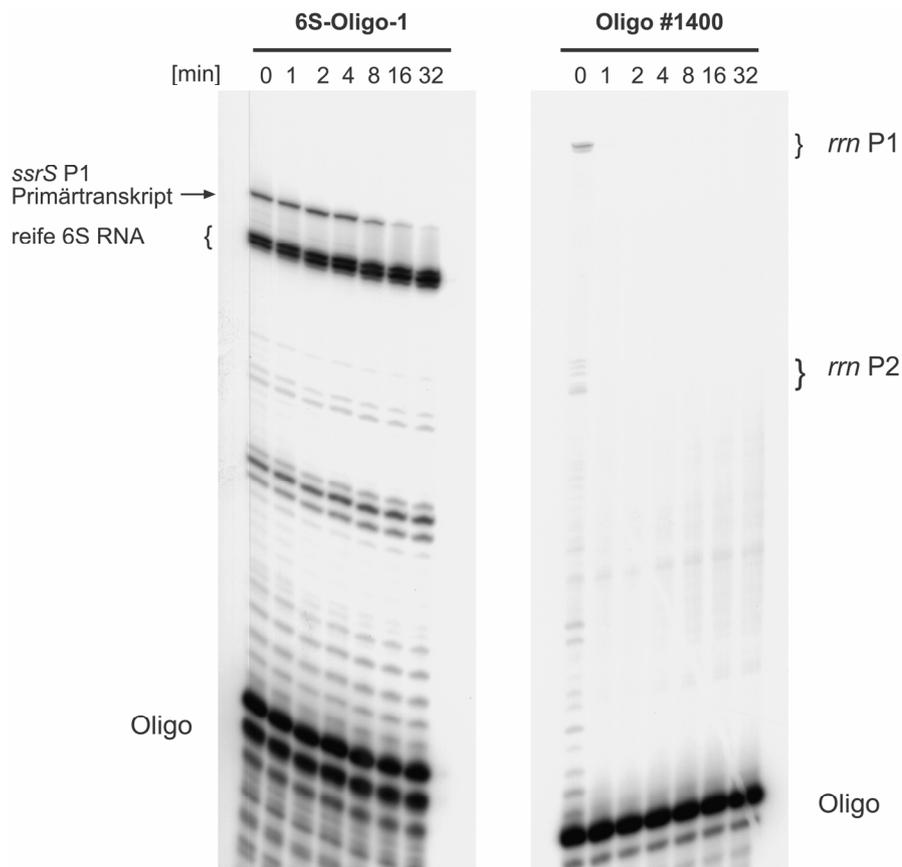


Abbildung 2.1: Primer extension-Analyse von Gesamt-RNA aus dem Wildtyp MG1655 zur Bestimmung der Halbwertszeit der 6S RNA.

Die Zugabe des Rifampicins erfolgte in der logarithmischen Phase. Die Zeitabstände der Probenentnahme in min sind angegeben. Die entstehenden cDNAs der reifen und der unprozessierten 6S RNA (6S-Oligo-1) auf der linken Seite, sowie die der ribosomalen *rrn* P1 und P2 Promotoren (Oligo#1400) auf der rechten Seite, sind gekennzeichnet. Die Auftrennung der cDNAs erfolgte auf einem 15%igen denaturierenden Polyacrylamidgel.

2.1.1 Rifampicin-Kinetik zur Bestimmung der 6S RNA Halbwertszeit

Um Aufschluss über die Stabilität der 6S RNA zu erhalten, wurden Rifampicin-Kinetiken im Wildtyp-Stamm (MG1655) in verschiedenen Wachstumsphasen durchgeführt. Dazu wurden Zellen in YT-Medium bei 37°C inkubiert und bei der gewünschten Wachstumsphase schnell mit Rifampicin auf eine Endkonzentration von 1 mg/ml eingestellt. Das Antibiotikum verhindert dabei die weitere Transkriptionsinitiation, indem es an die β -Untereinheit der RNA-Polymerase bindet. Nach der Zugabe des Rifampicins wurden in unterschiedlichen zeitlichen Abständen Aliquots der Zellkultur abgenommen, umgehend mittels heißer Phenololyse aufgeschlossen und extrahiert (5.2.2.3). Die aufgereinigte Gesamt-RNA wurde

anschließend als *template* bei der *primer extension*-Analyse (5.3.1) genutzt. Dafür wurde das 6S RNA-spezifische 6S-Oligo-1 und als Positivkontrolle des Assays das Oligo#1400 verwendet, welches gegen die sehr kurzlebige *leader*-Region der ribosomalen Operons hybridisiert. Das 3'-Ende der 5'-radioaktiv markierten Oligonukleotide wird mit einer viralen Reversen Transkriptase *in vitro* verlängert und sequenzspezifisch in eine cDNA (*complementary DNA*) umgeschrieben.

Die Abbildung 2.1 zeigt exemplarisch eine Rifampicin-Kinetik zur Bestimmung von Halbwertszeiten von RNA-Molekülen. Es ist ersichtlich, dass in der Positivkontrolle mit dem Oligo#1400 die cDNA der ribosomalen *leader*-RNA schon nach einer Minute nicht mehr zu erkennen ist. Dies zeigt, dass die Methode erwartungsgemäß funktioniert, da die Halbwertszeit des *leaders* im Bereich von etwa 30 bis 45 sec liegt (Schäferkordt 2001). Im Gegensatz dazu ist die 6S RNA ein äußerst stabiles Molekül. Oberhalb der reifen 6S RNA findet man die unprozessierte Primärtranskript-RNA des *ssrS* P1 Promotors. Die Bandenintensität der unprozessierten 6S RNA verringert sich kontinuierlich nach Zugabe von Rifampicin. Die 5'-Reifung der Vorläufer-RNA durch Prozessierungsenzyme RNase E und G läuft weiter ab. Die 5'-Prozessierung des *ssrS* P1-Vorläufers *in vivo* ist mit einer hier ermittelten Halbwertszeit von $t_{1/2} < 8$ min vergleichsweise langsam (Li *et al.* 1998). Dagegen nehmen die cDNA-Banden der reifen und prozessierten 6S RNA sogar 32 min nach Rifampicinzugabe in der logarithmischen Phase nicht ab. Im Gegenteil scheint sie um den Anteil der prozessierten Vorläufer-RNA zuzunehmen. Die oben genannten Ergebnisse konnten auch für die 6S RNA aus der stationären Phase gezeigt werden. Folglich ist die 6S RNA *in vivo* über die Wachstumsphasen äußerst stabil und ihre Halbwertszeit liegt über der Generationszeit einer Bakterienzelle. Diese Beobachtung stimmt mit früheren Untersuchungen überein, bei denen kein nennenswerter Abbau der 6S RNA in verschiedenen Mangelsituationen ermittelt werden konnte (Lee *et al.* 1978). Bisher gibt es erste Anhaltspunkte für eine verringerte Stabilität bei verbesserten Wachstumsbedingungen. Deshalb ist zu vermuten, dass die 6S RNA aufgrund ihrer langen Lebensdauer im Verlauf der Wachstumsphasen akkumuliert, ihre Konzentration daher nur durch Neusynthese verändert wird.

2.2 Wie wird die 6S RNA-Expression reguliert?

Die beiden Tandempromotoren P1 und P2 des *ssrS*-Gens kontrollieren die Transkription der 6S RNA und gewährleisten deren Synthese, die, zusammen mit der Stabilität, zur Akkumulation der 6S RNA über die Wachstumsphasen führt. In dieser Arbeit wurde der Einfluss von wachstumsphasenspezifischen Transkriptionsfaktoren analysiert. Diese Nukleoid-assoziierten Proteine (NAPs) sind für die Genregulation bei der Anpassung an wechselnde Umweltbedingungen und plötzlich auftretenden Stress bekannt.

2.2.1 Einfluss der NAPs auf die 6S RNA-Expression in verschiedenen Wachstumsphasen *in vivo*

Um festzustellen, ob die oben genannten Transkriptionsfaktoren an der Regulation der 6S RNA beteiligt sind, sollte untersucht werden, ob die 6S RNA-Expression in Abwesenheit dieser Proteine verändert wird. Hierzu wurden Deletionsstämme für H-NS, StpA, FIS und LRP sowie deren wildtypische Parentalstämme benutzt. Mittels *primer extension*-Analysen (5.3.1) sollte der Einfluss der Transkriptionsfaktoren auf die Synthese der 6S RNA in unterschiedlichen Wachstumsphasen untersucht werden.

2.2.1.1 *Primer extension*-Analysen der 6S RNA in verschiedenen Stammhintergründen

Die 6S RNA Expression wurde in Stämmen analysiert, die Deletionen für die Transkriptionsfaktoren FIS, H-NS, LRP oder StpA besitzen. Da die Deletionen für die jeweiligen Faktoren in unterschiedlichen genetischen Hintergründen vorlagen, wurden die einzelnen Deletionsmutanten mit ihrem individuell korrespondierenden, isogenen Elternstamm verglichen. Die verwendeten und direkt verglichenen Stämme sind als Paare in Tabelle 2.1 aufgelistet.

Tabelle 2.1: Kurzbeschreibung der direkt miteinander verglichenen E. coli Stämme.

Wildtyp	Deletionsmutante
CSH50	CSH50 <i>fis::kan</i> (<i>fis</i> ⁻ -Mutante)
MC4100	PD32 (<i>hns</i> ⁻ -Mutante)
MC4100	GS997 (<i>lrp</i> ⁻ -Mutante)
GM37	CJD1124 (<i>stpA</i> ⁻ -Mutante)
BSN26	BSN29 (<i>hns</i> ⁻ , <i>stpA</i> ⁻ -Doppelmutante)

Sämtliche Stämme zeigten normales Wachstum in YT-Medium und ihre Wachstumsraten (5.1.2.3) variierten nicht signifikant ($\mu \approx 2$), so dass indirekte Effekte auf die 6S RNA-Expression durch veränderte Wachstumsraten ausgeschlossen werden konnten. Einzige Ausnahmen in dieser Hinsicht ist die Doppelmutante für *hns* und *stpA* (BSN29). Durch das Fehlen beider homologer Regulatoren weist letztere mit $\mu \approx 1,5$ eine deutlich geringere Wachstumsrate auf und erreicht eine geringere optische Dichte in der stationären Phase als der dazugehörige Wildtyp (BSN26). Dadurch ergab sich für die Doppelmutante eine Verdopplungszeit von ≈ 40 min in der exponentiellen Phase. Die anderen Stämme dagegen verdoppelten sich alle ≈ 30 min.

Alle Stammpaare wurden parallel kultiviert, die Wachstumskurven aufgenommen und zu verschiedenen Phasen Zellen isoliert. Dabei wurden Zellen aus der logarithmischen Phase (OD_{600} ca. 0,8), aus der Umschalt- oder Transitionsphase (OD_{600} ca. 2,0) und aus der stationären Phase ($OD_{600} \geq 4$) geerntet. Aus den Zellen wurde die Gesamt-RNA isoliert (5.2.2.3) und in einer vergleichenden *primer extension*-Reaktion (5.3.1) analysiert. In Abbildung 2.2 A ist ein Autoradiogramm eines solchen Experiments exemplarisch abgebildet. Abbildung 2.2 B zeigt schematisch die Zeitpunkte der Zellernte über die Wachstumsphasen. Neben dem 6S RNA spezifischen Oligonukleotid (6S-Oligo-1) wurde ein 5S RNA spezifisches Oligonukleotid (PE-5S-Oligo) in den gleichen Hybridisierungsansatz gegeben, um einen internen Standard für die spätere Quantifizierung zu erhalten. In Pilotexperimenten wurden sowohl die eingesetzte Gesamt-RNA-Menge als auch die für die radioaktiv markierten Oligonukleotide titriert, um die Proportionalität der Signalintensitäten zu prüfen.

Primärtranskripts. Das unprozessierte Transkript des *ssrS* P2 Promotors konnte in keinem Stamm und in keiner Wachstumsphase nachgewiesen werden. Grund dafür könnte zum einen sein, dass die Prozessierung des Primärtranskripts des *ssrS* P2 Promotors schnell abläuft, zum anderen, dass der P2 Promotor unter den getesteten Bedingungen nicht oder unterhalb der Nachweisgrenze exprimiert wird. Zudem sind *primer extension*-Signale bei einem Abstand von über 200 Nukleotiden zwischen Hybridisierungsposition und Transkriptende ungenau und schwer detektierbar. Das PE-5S-Oligo liefert eine reife und eine unprozessierte Abbruchbande, die gemeinsam quantifiziert wurden.

Über den Wachstumsphasenverlauf fällt die Zunahme der reifen 6S RNA-Menge auf, während das Primärtranskript bis zur Transitionsphase zunimmt und in der stationären Phase verschwindet. In der stationären Phase unterscheiden sich die Mengen der reifen 6S RNA (siehe Abbildung 2.2 A; *fis*⁺ und *fis*⁻ Spur 3). Nach Normalisierung auf den internen Standard konnte für die *fis*⁻-Mutante eine erhöhte 6S RNA Expression, also eine Derepression, nachgewiesen werden. Unterhalb der Banden der reifen 6S RNA sind weitere Signale zu sehen, die auf strukturbedingte Abbrüche während der *primer extension*-Reaktion zurückzuführen sind.

2.2.1.2 Verifizierung der Ziel-RNA von 6S-Oligo-1 mittels *primer extension*-Sequenzierung

Um sicher zu stellen, dass mit dem gewählten 6S-Oligo-1 nur ein spezifisches Ziel, nämlich die 6S RNA, erkannt wird, wurde eine *primer extension*-Sequenzierung durchgeführt. Mit der Methode lässt sich die Sequenz der Ziel-RNA identifizieren. In Abbildung 2.2 C ist eine solche RNA-Sequenzierung mit den vier Abbruchansätzen (A, C, G, U) abgebildet. Die Sequenz zwischen den Positionen 4 und 25 der reifen 6S RNA ist angegeben und die Spezifität für die 6S RNA als Ziel-RNA von 6S-Oligo-1 bestätigt.

2.2.1.3 Die Effekte der Transkriptionsfaktoren auf die wachstumsphasen abhängige Akkumulation der 6S RNA

Für die quantitative Auswertung der *primer extension*-Analyse wurden mindestens drei unabhängige Experimente für jeden Stamm durchgeführt. Die Intensitäten der drei Abbruchbanden der reifen 6S RNA und die des *ssrS* P1 Primärtranskripts wurden quantifiziert und addiert, da sie zusammen die aktuelle Akkumulation der 6S RNA in der jeweiligen Wachstumsphase repräsentieren. Die beiden Abbruchsignale der 5S RNA wurden ebenfalls addiert, ins Verhältnis zu den 6S RNA-Signalen gesetzt und als interner Standard genutzt. Die relativen 6S RNA-Mengen wurden auf den jeweiligen Wildtyp in der stationären Phase bezogen, für den 100% festgelegt wurden. In Abbildung 2.3 sind typische Gelausschnitte mit den 5S und 6S RNA-Signalen abgebildet. Die quantitative Auswertung ist in Balkendiagrammen dargestellt.

In allen Stämmen erkennt man den erwarteten Anstieg der relativen 6S RNA-Menge über die Wachstumsphasen, wobei eine fünf- (MC4100, CSH50 und GM37) bis zehnfache (BSN26) Zunahme zwischen der exponentiellen und der stationären Phase in den wildtypischen Stämmen zu finden ist. Die Akkumulation der 6S RNA im Verlauf der Wachstumskurve ist für die unterschiedlichen wildtypischen Stammhintergründe vergleichbar.

Bei den FIS-, H-NS- oder LRP-Deletionsmutanten ist die relative 6S RNA-Menge in der stationären Phase im Vergleich zum dazugehörigen Wildtypen 2- bis 3-fach erhöht (Abbildung 2.3 A-C). In allen Deletionsstämmen, bis auf die Doppelmutante, ist schon in der Transitionsphase eine leichte Derepression zu beobachten. Eine reprimierende Wirkung auf die 6S RNA-Expression stimmt für H-NS und LRP mit ihrer bekannten Funktion als globale Regulatoren, die häufig reprimierend wirken, überein (Schroder and Wagner 2002; Kawashima *et al.* 2008). Den größten Effekt zeigt die *lrp*⁻-Deletionsmutante mit der dreifachen 6S RNA-Konzentration in der stationären Phase (Abbildung 2.3 C). Diese Beobachtung gibt einen klaren Hinweis auf einen Effekt von LRP auf die 6S RNA-Regulation.

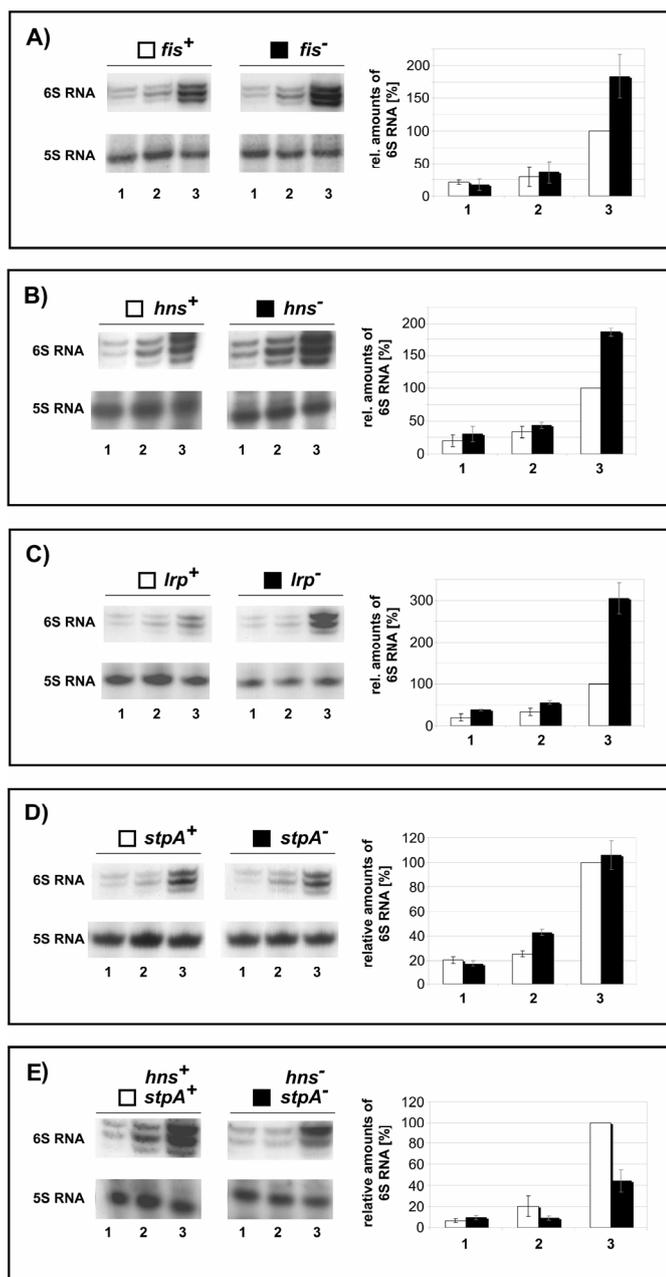


Abbildung 2.3: Übersicht der Wachstumsphasen abhängigen Akkumulation der 6S RNA in Deletionsstämmen im Vergleich mit ihren jeweiligen Wildtypen.

Auf der linken Seite der Abbildung sind typische Beispiele für Autoradiogrammausschnitte von *primer extension*-Experimenten für die untersuchten Stämme aus den verschiedenen Wachstumsphasen: (1: logarithmische Phase; 2: Transitionsphase; 3: stationäre Phase) dargestellt. Auf der rechten Seite zeigen Balkendiagramme eine quantitative Zusammenfassung mehrerer *primer extension*-Analysen (3 bis 7 unabhängige Experimente), bei der die 5S rRNA als interner Standard verwendet wurde. A) Analyse für den *fis*⁻-Stamm CSH50*fis::kan* und den isogenen Wildtyp CSH50. B) Analyse für den *hns*⁻-Stamm PD32 und den isogenen Wildtyp MC4100. C) Analyse für den *lrp*⁻-Stamm GS997 und den isogenen Wildtyp MC4100. D) Analyse für den *stpA*⁻-Stamm CJD1124 und den isogenen Wildtyp GM37. E) Analyse für den *hns*⁻ und *stpA*⁻-Stamm BSN29 und den isogenen Wildtyp BSN26.

FIS wirkt typischerweise als Transkriptionsaktivator und besitzt ein scharfes Expressionsmaximum in der frühen logarithmischen Phase, deshalb werden hier die größten FIS-Effekte erwartet. Die Transkription der 6S RNA in der logarithmischen Phase wird allerdings nicht signifikant verändert. Zwar kann FIS auch reprimierend wirken, aufgrund des Expressionsmaximums in der frühen logarithmischen Phase ist es jedoch wahrscheinlich, dass die im späteren Wachstumsverlauf gefundene Derepression der 6S RNA-Menge auf indirekte Effekte zurückzuführen ist.

Das Fehlen von StpA lässt die 6S RNA Expression unwesentlich vom normalen Verlauf abweichen (Abbildung 2.3 D). Man erkennt eine etwa zweifache Derepression in der Transitionsphase, allerdings keine signifikante Änderung in der stationären Phase. Daraus kann geschlossen werden, dass StpA die Akkumulation der 6S RNA nicht nennenswert beeinflusst oder dass die Funktion durch das homologe Protein H-NS übernommen werden kann. Deswegen stellt sich die Frage wie die 6S RNA-Expression auf das Fehlen beider Proteine (H-NS und StpA) reagiert. In diesem Fall zeigt sich, dass die 6S RNA-Akkumulation in der Transitions- und in der stationären Phase um mehr als die Hälfte im Vergleich zum Wildtyp reduziert wird (Abbildung 2.3 E). Ein solch starker Effekt spiegelt sich auch im verlangsamten Wachstum wider und ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die DNA-Kompaktierung durch das Fehlen von H-NS und StpA stark gestört ist. Von dieser drastischen Veränderung des Regulationsnetzwerks der Zelle ist auch die 6S RNA-Expression betroffen, wobei hier indirekte Effekte der als Repressoren bekannten Proteine sicher nicht ausgeschlossen werden können.

Die *in vivo* beobachteten Einflüsse der untersuchten NAPs auf die Konzentration der 6S RNAs sind nicht zwangsläufig direkt. Es ist möglich, dass die gemessenen Effekte in Teilen oder gänzlich von einer sekundären Umorganisation der globalen Regulation herrühren. Um diese Frage aufzuklären, wurde die Funktion der einzelnen Faktoren auf die Transkription *in vitro* untersucht.

2.2.2 Charakterisierung der Bindung der NAPs an verschiedene *ssrS*-Promotorfragmente

Das *E. coli* *ssrS*-Gen gehört zu einem dicistronischen Leseraster gemeinsam mit dem *downstream* liegenden Gen *ygfA*, dessen Funktion noch ungeklärt ist. Die Transkription beider Gene wird durch zwei Promotoren kontrolliert, wobei der distale P2 Promotor von σ^{70} - und σ^{38} -spezifischen RNA-Polymerasen, der proximale P1 Promotor jedoch ausschließlich von σ^{70} -Holoenzymen transkribiert wird (Kim and Lee 2004). Eine schematische Anordnung des Operons ist in Abbildung 2.4 A zu sehen.

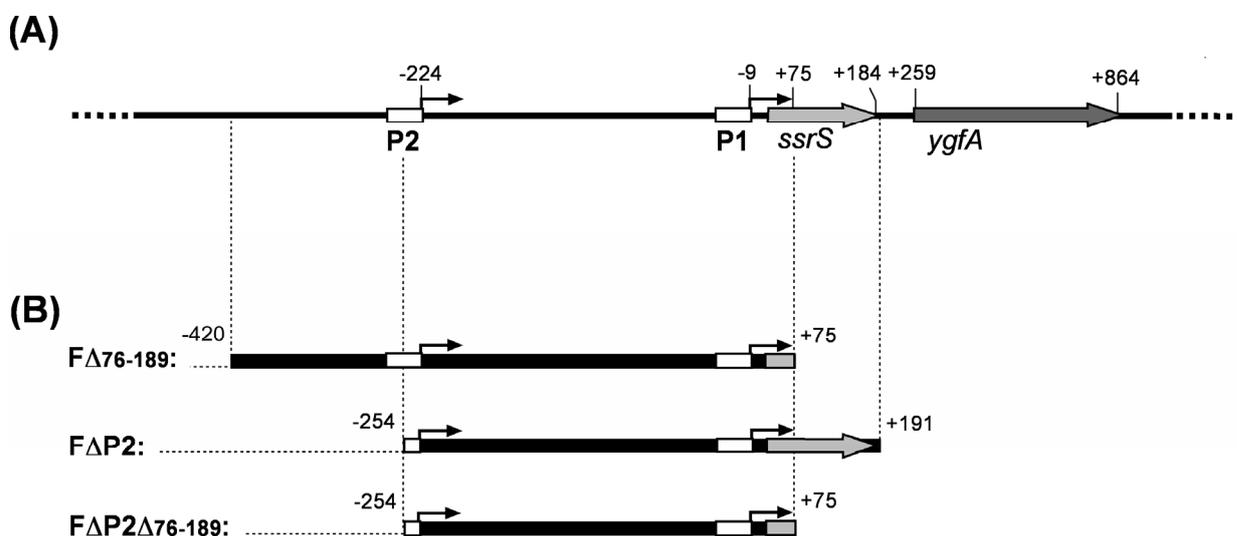


Abbildung 2.4: Schematische Anordnung des *ssrS*-Gens mit der *upstream* regulatorischen Region der 6S RNA Promotoren.

Alle angegebenen Positionen sind auf das 5'-Nukleotid der reifen 6S RNA bezogen, das als +1 gesetzt wurde. A) Die gezeigte Transkriptionseinheit besteht aus den Genen *ssrS* und *ygfA*, die von den dargestellten Promotoren P2 (σ^{70} - und σ^{38} -spezifisch) und P1 (σ^{70} -spezifisch) kontrolliert werden. B) Die drei für die Bindungsstudien verwendeten DNA-Fragmente F Δ 76-189, F Δ P2 und F Δ P2 Δ 76-189 sind abgebildet.

Um zu kontrollieren, ob die *in vivo* gefundenen Effekte direkt auf das Fehlen der NAPs zurückzuführen sind, wurden als nächstes *in vitro* Analysen durchgeführt, die sich in mehrere Teilschritte wie folgt aufspalten:

1. Untersuchung der Bindung der Transkriptionsfaktoren an die regulatorischen DNA-Regionen, wobei auch die Krümmung bzw. Flexibilität der DNA analysiert wurde.
2. Exakte Lokalisierung der potentiellen Binderegionen durch DNase I *footprints*.
3. Funktionsstudien der Transkriptionsfaktoren auf die Transkription *in vitro*.

Zunächst wurden mehrere Fragmente mit unterschiedlichen *upstream*-Regionen ausgewählt und deren Krümmung rechnerisch bestimmt. Anschließend wurde die Bindefähigkeit der Transkriptionsfaktoren an die Fragmente auf nativen PAA-Gelen in Retardierungsexperimenten analysiert. Weiterhin wurde der Einfluss der Temperatur und des Antibiotikums Distamycin auf die Bindung der Transkriptionsfaktoren untersucht. Distamycin verändert die DNA-Struktur von gekrümmten Fragmenten und ist deshalb hilfreich bei krümmungsabhängigen Bindungsstudien.

2.2.2.1 Die *ssrS*-Fragmente und ihre intrinsische Krümmung

Um eine grobe Übersicht über die potentielle Bindestellen *upstream* vom P2, *upstream* P1 und im *ssrS*-Gen selber zu erhalten, wurden drei Fragmente ausgewählt. Das Fragment F Δ_{76-189} beinhaltet die *upstream*-Region beider Promotoren P1 und P2 sowie die ersten 75 Basenpaare des *ssrS*-Gens. Das Fragment F Δ P2 enthält nur die *upstream*-Region des P1 Promotors (einschließlich der -10-Region des P2 Promotors) und die komplette Sequenz des *ssrS*-Gens. Das Fragment F Δ P2 Δ_{76-189} trägt ebenfalls nur die *upstream*-Region des P1 Promotors (einschließlich der -10-Region des P2 Promotors) und die ersten 75 Basenpaare des *ssrS*-Gens. Eine schematische Übersicht über die verwendeten DNA-Fragmente ist in Abbildung 2.4 B dargestellt. Alle Fragmente sind so ausgewählt, dass sie überhängende 5'-Enden besitzen, mit deren Hilfe die Fragmente radioaktiv markierbar sind (5.2.7.2).

Tabelle 2.2: Theoretisch berechnete k-Werte der verwendeten DNA-Fragmente.

Die mit verschiedenen Modellen des Programms *DIAMOD* erhaltenen End-zu-End-Abstände der verwendeten Fragmente aus Tabelle 6.2 wurden benutzt, um k-Werte zu berechnen. Hierzu wurde der als ungekrümmt berechnete IDEAL End-zu-End-Abstand durch den End-zu-End-Abstand des jeweiligen Berechnungsmodells dividiert. In Abbildung 2.5 ist exemplarisch eine berechnete Konformation dargestellt. (* Thompson und Landy 1988)

Fragment	Theoretisch berechnete k-Werte* mit dem Berechnungsmodell		
	Gabriel	Brukner	Goodsell
F Δ_{76-189}	1,041	1,053	1,085
F Δ P2	1,039	1,063	1,032
F Δ P2 Δ_{76-189}	1,035	1,055	1,032
<i>AvaII</i>	1,035	1,069	1,039

Von den ausgesuchten, regulatorisch wirkenden DNA-Bindeproteinen FIS, H-NS, LRP und StpA ist bekannt, dass sie bevorzugt mit intrinsisch gekrümmten DNA-Regionen wechselwirken (Hillebrand *et al.* 2005; Pul *et al.* 2005). Konformationen von Nukleinsäuren lassen sich mithilfe von bioinformatischen Programmen dreidimensional berechnen und liefern Informationen über die intrinsische Krümmung eines Moleküls. Die theoretischen End-zu-End-Abstände für die unterschiedlichen Konformere der DNA-Fragmente wurden mit dem Programm *DIAMOD* (Dlatic and Harrington 1998) rechnerisch ermittelt. Es wurden die Parameter *trinukleotide model* und *non-repitive sequence* verwendet, um die End-zu-End-Distanzen der intrinsisch gekrümmten sowie der gestreckten (Ideal-Algorithmus) Konformere für jedes DNA-Fragmente zu berechnen. Aus diesen beiden Werten kann der Krümmungsfaktor k bestimmt werden (Thompson and Landy 1988). Im Anhang sind in Tabelle 6.2 die berechneten End-zu-End-Abstände und in Tabelle 2.2 die k-Faktoren der verwendeten Fragmente mit den jeweiligen Algorithmen aufgeführt. In Abbildung 2.5 A ist exemplarisch die dreidimensionale Darstellung des Fragments F Δ_{76-189} abgebildet. Es zeigt im Gegensatz zu der UAS-Region des *rrnD* Operons Abbildung 2.5 B) keine Krümmung.

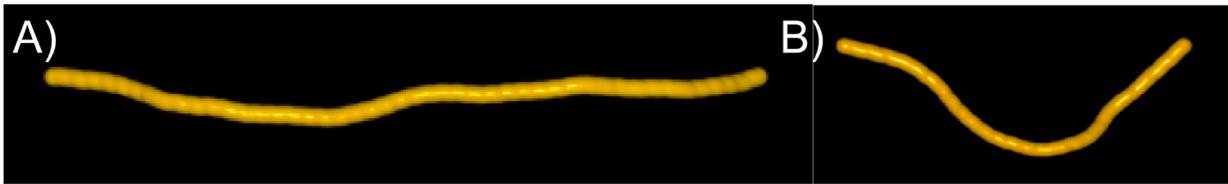


Abbildung 2.5: Berechnete Konformation von DNA-Abschnitten.

Mit dem Programm *DIAMOD* (Gabriel-Algorithmus) errechnete dreidimensionale Strukturkonformation des Fragments $F\Delta_{76-189}$ mit einem k-Faktor von 1,04 (A) und der UAS-Region des *rrnD* P1 Promotors mit einem k-Faktor von 1,34.

2.2.2.2 Bindung der Transkriptionsfaktoren an $F\Delta_{76-189}$

Mit dem DNA-Fragment $F\Delta_{76-189}$ des *ssrS*-Gens und den gereinigten Transkriptionsfaktoren wurden *in vitro* Retardierungsanalysen durchgeführt. Ziel war es zu untersuchen, ob FIS, H-NS, LRP und StpA an die regulatorischen Regionen *upstream* der beiden *ssrS*-Promotoren binden. Das Fragment wurde dazu mit dem Restriktionsenzym *BglI* aus dem Vektor pUC18-6S hydrolysiert, aufgereinigt und radioaktiv markiert. Für die Bindestudien wurden 2 nM radioaktiv markiertes DNA-Fragment mit unterschiedlichen Proteinkonzentrationen bei Raumtemperatur inkubiert. Die Bindung erfolgte in Anwesenheit einer Kompetitorkonzentration von 50 ng/ μ l Heparin, um unspezifische Wechselwirkungen zu verhindern. Anschließend folgte eine Auftrennung von Komplexen und freien DNA-Fragmenten in einem nativen PAA-Gel (5.3.3).

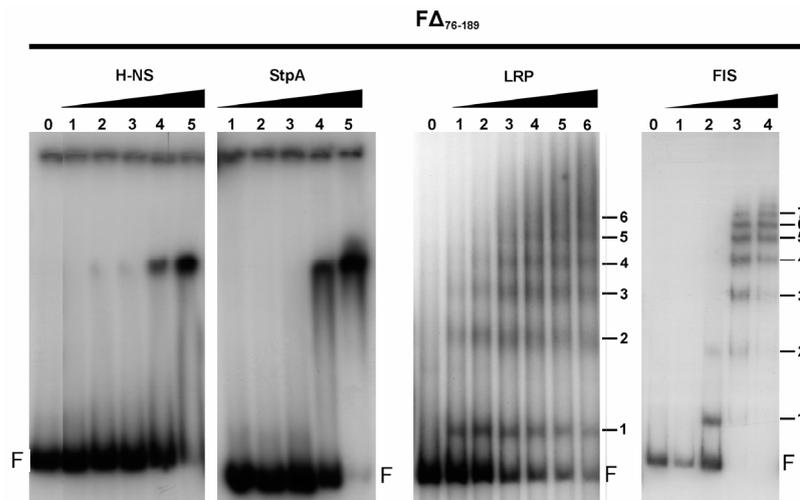


Abbildung 2.6: Retardierungsanalysen der Transkriptionsfaktoren an das Fragment $F\Delta_{76-189}$.

Bindung von H-NS, StpA, LRP und FIS an das $F\Delta_{76-189}$, das die *upstream* Regionen beider *ssrS* Promotoren und die ersten 75 Basen des 6S RNA-Gens besitzt. Die mit 0 bezeichneten Spuren enthielten nur den Bindepuffer und das freie markierte Fragment, welches mit F bezeichnet wird. Die nummerierten Spuren enthielten Retardierungsansätze mit folgende Proteinkonzentrationen: H-NS (1 = 2 μ M; 2 = 3 μ M; 3 = 4 μ M; 4 = 5 μ M; 5 = 6 μ M); StpA (1 = 0,5 μ M; 2 = 1 μ M; 3 = 2 μ M; 4 = 4 μ M; 5 = 6 μ M); LRP (1 = 0,25 μ M; 2 = 0,5 μ M; 3 = 0,75 μ M; 4 = 1 μ M; 5 = 1,25 μ M; 6 = 1,5 μ M); FIS (1 = 0,1 μ M; 2 = 0,5 μ M; 3 = 1,5 μ M; 4 = 2,5 μ M). Die entstandenen Komplexbanden mit LRP und FIS sind mit 1-6 bzw. 1-7 durchnummeriert.

In Abbildung 2.6 ist die Bindung aller untersuchten Regulatoren an das DNA-Fragment $F\Delta_{76-189}$ zu erkennen. Es fällt auf, dass für FIS und LRP mehrere distinkte Komplexbanden aufgelöst werden können, während H-NS und StpA nur einen Komplex mit einem großen Molekulargewicht bilden. Diese Beobachtung stimmt mit dem Fakt überein, dass auf dem Fragment für FIS und LRP Konsensussequenzen für mehrere Bindestellen vorhergesagt werden. Sowohl für H-NS als auch für StpA sind keine Konsensussequenzen bekannt, daher entfällt eine Vorhersage potentieller Bindestellen. H-NS und StpA zeigen eine Bindung mit hoher Kooperativität direkt zu einer Komplexbande mit großem Molekulargewicht, wobei keine Zwischenbanden, sondern eine für diese Proteine typische diffuse Bande, zu sehen ist. Diese kooperative Bindung von H-NS konnte auch an den ribosomalen Promotoren gezeigt werden (Afflerbach *et al.* 1999). Die Affinität von StpA zur DNA ist höher als die von H-NS, zu erkennen daran, dass bei 4 μ M Protein im Falle von StpA mehr freie DNA komplexiert wird als mit H-NS. Während H-NS und StpA, wie schon häufig beobachtet, im niedrigen mikromolaren Bereich binden, reichen bei FIS und LRP submikromolare Konzentration aus, um eine stabile Wechselwirkung mit der DNA einzugehen. Abhängig von der eingesetzten

Proteinkonzentration können 6 Komplexe für LRP und 7 Komplexe für FIS aufgelöst werden. Dies weist auf die Besetzung von einzelnen Bindestellen hin. Über die Lokalisation dieser Bindestellen sollen mit Hilfe der Fragmente F Δ P2 und F Δ P2 Δ ₇₆₋₁₈₉ genauere Aussagen getroffen werden können.

Es sollte erwähnt werden, dass H-NS und StpA die Tendenz haben, unspezifisch vor allem an gekrümmte DNA zu binden. Deswegen wurde ein rigides und ungekrümmtes DNA-Fragment gesucht, welches nicht mit H-NS und StpA interagiert, um eine unspezifische Wechselwirkung ausschließen zu können. Ein solches Fragment ist das *AvaII*-Fragment (4.3.2), welches ebenfalls einen sehr geringen k-Faktor besitzt und bei dem sogar mit doppelter Fragmentmenge (4 nM) unter den verwendeten Bindebedingungen nur eine minimale Interaktion mit H-NS und StpA festzustellen ist (Abbildung 6.1 im Anhang). Für dieses Fragment wurden beispielsweise mehrere Konsensussequenzen von FIS vorhergesagt und die Besetzung dieser putativen Bindestellen (auch für LRP) konnte nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Daraus kann gefolgert werden, dass nicht an jedes DNA-Fragment an automatisch alle NAPs binden können.

2.2.2.3 Bindung der Transkriptionsfaktoren an F Δ P2 und F Δ P2 Δ ₇₆₋₁₈₉

Um genauere Aussagen über die Position der Bindestellen treffen zu können, wurden drei Teilbereiche des *ssrS*-Gens voneinander unterschieden. Hierzu wurden die Bandenmuster von zwei Fragmentpaaren direkt miteinander verglichen. Die Fragmente F Δ P2 und F Δ P2 Δ ₇₆₋₁₈₉ wurden verwendet, um die *upstream*-Region des P1 Promotors und den Bereich *downstream* der Position +75 bis zum Ende des 6S RNA-Gens zu untersuchen. Außerdem wurden die Fragmente F Δ ₇₆₋₁₈₉ und F Δ P2 Δ ₇₆₋₁₈₉ einander gegenübergestellt, um näheres über die Bindung der Faktoren im *upstream*-Bereich des *ssrS* P2 Promotors zwischen den Positionen -420 und -254 und über die *upstream*-Region des P1 Promotors (Position -254 bis +75) zu erfahren. Die Retardierungsanalysen wurden analog zu denen mit dem Fragment F Δ ₇₆₋₁₈₉ durchgeführt. H-NS und StpA bilden auch mit den hier untersuchten Fragmenten F Δ P2 und F Δ P2 Δ ₇₆₋₁₈₉ nur einen Komplex mit großem Molekulargewicht (Daten nicht gezeigt).

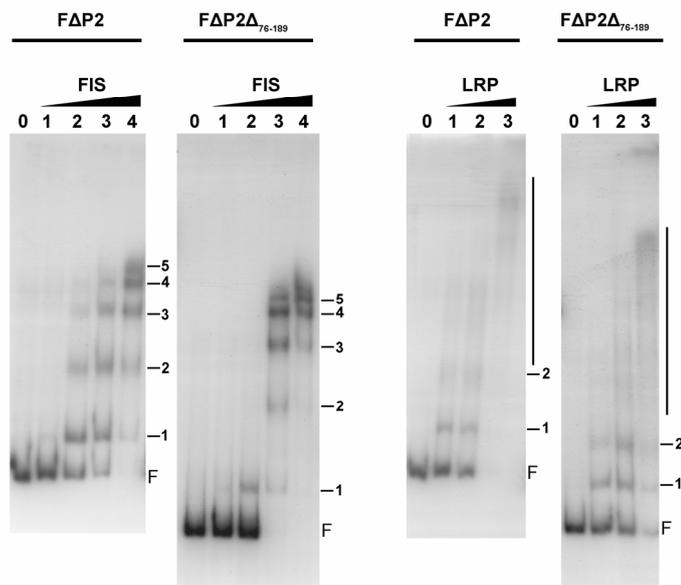


Abbildung 2.7: Retardierungsanalyse von FIS und LRP mit den Fragmenten F Δ P2 und F Δ P2 Δ ₇₆₋₁₈₉.

Bindung von LRP und FIS an das Fragment F Δ P2, das die *upstream* Regionen des *ssrS* P1 Promotors und das komplette 6S RNA-Gen besitzt und an das Fragment F Δ P2 Δ ₇₆₋₁₈₉, welches die *upstream* Regionen des *ssrS* P1 Promotors und die ersten 75 Basen des 6S RNA-Gens trägt. Die jeweils eingesetzten Fragmente sind angegeben. Die mit 0 bezeichneten Kontrollspuren enthalten nur den Bindepuffer und das freie markierte Fragment, welches am Rand mit F bezeichnet wird. Die Spurnummer der einzelnen Proteine enthielten folgende Proteinkonzentrationen: FIS (1 = 0,1 μ M; 2 = 0,5 μ M; 3 = 1,5 μ M; 4 = 2,5 μ M); LRP (1 = 0,5 μ M; 2 = 1 μ M; 3 = 2 μ M). Die entstandenen Komplexbanden mit LRP und FIS sind am Rand mit 1-2 bzw. 1-5 durchnummeriert. Die eingezeichnete vertikale Linie weist auf Oligomere mit großem Molekulargewicht oder auf Aggregate hin.

In Abbildung 2.7 sind typische Analysen von Retardierungsexperimenten der Fragmente F Δ P2 und F Δ P2 Δ ₇₆₋₁₈₉ mit den Proteinen FIS und LRP einander gegenübergestellt. Man erkennt für beide Transkriptionsfaktoren das gleiche Bandenmuster mit derselben Anzahl an Komplexbanden. Da sich beide DNA-Fragmente nur in der *downstream*-Region unterscheiden (siehe Abbildung 2.4), kann geschlussfolgert werden, dass weder FIS noch LRP im *ssrS*-Strukturgen *downstream* der Position +75 binden können.

Dagegen werden beim Vergleich der Fragmente F Δ ₇₆₋₁₈₉ und F Δ P2 Δ ₇₆₋₁₈₉ (Abbildung 2.6 und Abbildung 2.7) Unterschiede in der Bandenanzahl gefunden. Unzweifelhaft können für FIS zwei Komplexbanden weniger in dem kürzeren Fragment (F Δ P2 Δ ₇₆₋₁₈₉) gezählt werden. Aus dieser Beobachtung kann abgeleitet werden, dass FIS vornehmlich an die *ssrS* P1 *upstream*-Region binden kann und sich zwei Bindestellen *upstream* des P2 Promotors befinden. Es ist also naheliegend, dass FIS durch die Bindung auf beide Promotoren regulatorisch einwirken und die Expression der 6S RNA mitsteuern könnte.

Zwei typische LRP-Komplexe findet man mit allen hier untersuchten Fragmenten. Dies deutet auf zwei Bindestellen hin, die sich zwischen den Positionen -254 und +75 im *upstream*-Bereich des *ssrS* P1 Promotors befinden. Für das Fragment $F\Delta_{76-189}$ konnten sechs distinkte Komplexbanden ermittelt werden, wohingegen beim Fehlen der P2 *upstream*-Region mit dem DNA-Fragment $F\Delta P2\Delta_{76-189}$ nur noch die schon angesprochenen zwei aufgelöst werden können. Dies lässt vermuten, dass LRP bevorzugt die Region *upstream* des P2 bindet und ebenfalls an der Regulation der 6S RNA Expression beteiligt sein könnte.

2.2.2.4 Einfluss der Temperatur auf die Stabilität der DNA-Proteinkomplexe

Um die thermische Stabilität der DNA-Proteinkomplexe zu analysieren, wurden Bindungsansätze der Transkriptionsfaktoren FIS, H-NS, LRP und StpA mittels Temperaturgradienten-Gelelektrophorese (TGGE) (5.2.5.3) aufgetrennt. Diese Technik ermöglicht die Analyse von temperaturabhängigen Strukturübergängen eines oder mehrerer biologischer Makromoleküle in Abhängigkeit eines linearen Temperaturbereiches. Die damit einhergehende Mobilitätsänderungen ermöglichen es mehrere Konformere eines Moleküls oder Komplexes gleichzeitig auf einem Gel zu detektieren. Durch die ansteigende Temperatur in einem Gel bei der TGGE kann sowohl die Krümmung des DNA-Fragments aufgehoben, als auch die Proteinstruktur verändert werden, wodurch sich die Gestalt des Komplexes und der Besetzungszustand ändern kann. Die Proteinkonzentrationen wurden so gewählt, dass eine Komplexbildung mit dem DNA-Fragment $F\Delta_{76-189}$ zu erwarten war. Die Bindungsansätze wurden in Gegenwart von 50 ng/ μ l Heparin durchgeführt und der Temperaturgradient wurde im rechten Winkel zur Elektrophoreserichtung eingestellt (siehe Abbildung 2.8).

Das freie DNA-Fragment $F\Delta_{76-189}$ alleine zeigt in den TGGE-Analysen keine Anzeichen für eine intrinsische Krümmung in den gewählten Temperaturbereichen. Dies ist in guter Übereinstimmung mit den sehr niedrigen Krümmungsfaktoren k für die Fragmente (Tabelle 2.2), welche durch das Programm *DIAMOD* berechneten wurden. Oberhalb von 65°C schmilzt der DNA-Doppelstrang von $F\Delta_{76-189}$ in seine Einzelstränge auf (Gildehaus 2005).

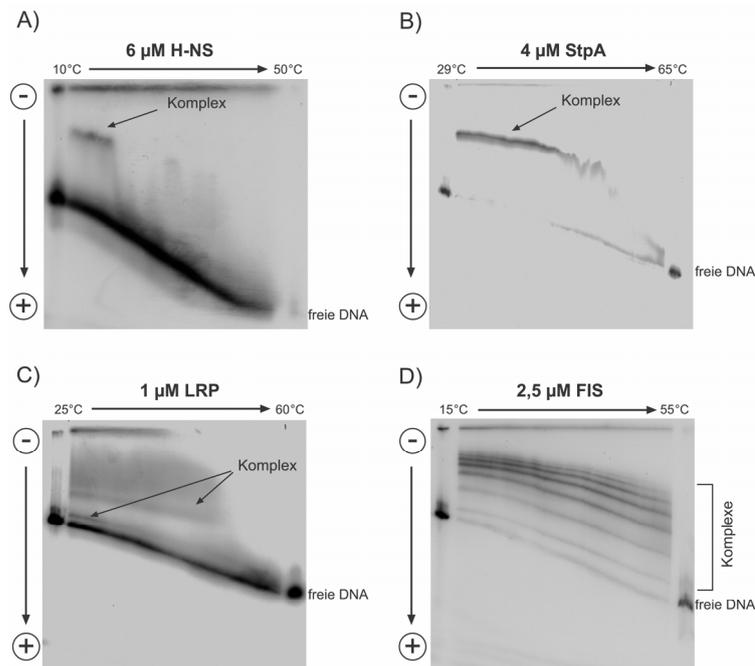


Abbildung 2.8: Analyse der Stabilität der Protein-DNA-Komplexe mittels Temperaturgradienten-Gelelektrophorese.

Abgebildet sind 5%ige native PAA-Gele mit Bindeansätzen der Transkriptionsfaktoren in den angegebenen Konzentrationen, die in Temperaturgradienten aufgetrennt wurden. Für diese Analysen wurde das radioaktiv markierte Fragment $\text{F}\Delta_{76-189}$ (2 nM) verwendet. Die freie DNA und die Komplexe sind markiert, die eingestellten Temperaturgradienten und die Richtung der Elektrophorese sind angegeben.

Die untersuchten DNA-Proteinkomplexe verhalten sich in der TGGE sehr unterschiedlich (siehe Abbildung 2.8). Der H-NS-Komplex ist der temperaturlabilste und zerfällt schon bei etwa 20°C. Dagegen bleibt der Komplex von StpA mit dem Fragment stabil bis zu einer Temperatur von ungefähr 47°C. Bei LRP und FIS konnten mehrere distinkte Komplexe aufgelöst werden, die auch eine unterschiedliche Thermostabilität in der TGGE zeigen. Der nur knapp über dem freien Fragment migrierende primäre LRP-Komplex dissoziiert interessanterweise bei etwa 31°C, während die darüber laufenden Komplexe erst bei ca. 49°C auseinander fallen. Die unteren vier Komplexe mit FIS sind bei 55°C noch stabil, während die beiden höher laufenden Komplexe bei etwa 51°C bzw. 53°C zerfallen.

Aus den TGGE-Analysen kann geschlossen werden, dass es eine Hierarchie in der Stabilität der DNA-Proteinkomplexe gibt, die sich schon bei den Bindungsaffinitäten angedeutet hat. Am stabilsten bindet FIS vor LRP, StpA und H-NS. Ob diese unterschiedliche thermische Stabilität der Komplexe durch Strukturänderungen der DNA oder des Proteins

herrühren, ist mit der TGGE alleine nicht zu beantworten. Deswegen wurden Retardierungsanalysen der Proteinkomplexe unter Einfluß von Distamycin durchgeführt. Weiterhin wurden die genauen Positionen der einzelnen Bindestellen mittels DNase I *footprint*-Analysen bestimmt.

2.2.2.5 Einfluss von Distamycin auf die Stabilität der DNA-Proteinkomplexe

Um den Einfluss der DNA-Konformation auf die Komplexstabilität zu untersuchen, wurde dem Bindeansatz das Antibiotikum Distamycin zugegeben. Distamycin bindet in die kleine Furche der DNA und verändert deren Konformation in einen gestreckten Zustand (van Dyke *et al.* 1982). Es ist bekannt, dass die hier verwendeten transkriptionsregulierenden NAPs Krümmung bei gestreckter, aber flexibler DNA induzieren können (Afflerbach *et al.* 1999). Neben der Krümmungsaufhebung versteift Distamycin das DNA-Fragment und dessen Flexibilität, die wichtig für die Stabilität der Wechselwirkung mit dem Protein sein kann, geht verloren. Abbildung 2.9 zeigt den Effekt von Distamycin auf die bereits gebildeten DNA-Proteinkomplexe. Dieselben Ergebnisse wurden erzielt, wenn Distamycin bereits vor dem Protein zur DNA gegeben wurde. Die Reihenfolge der Zugabe ist folglich unerheblich.

In Anwesenheit von Distamycin ohne Protein bleibt die Mobilität des DNA-Fragments unverändert (Daten nicht gezeigt). Dies weist übereinstimmend mit den TGGE-Ergebnissen und den *DIAMOD*-Computerberechnungen darauf hin, dass keine statische Krümmung vorliegt.

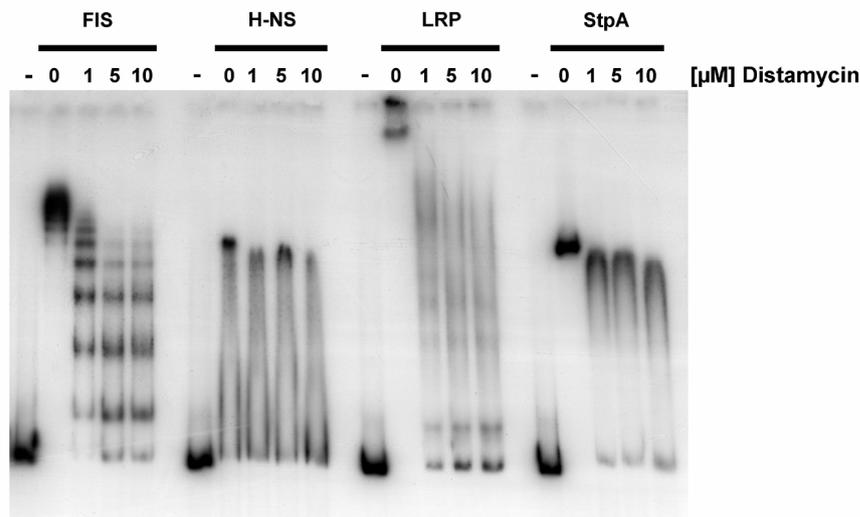


Abbildung 2.9: Bindung der Transkriptionsfaktoren an das Fragment $F\Delta_{76-189}$ in Anwesenheit von Distamycin.

Der Effekt von steigenden Distamycinkonzentrationen auf die Bindung der verschiedenen Transkriptionsfaktoren an das DNA-Fragment $F\Delta_{76-189}$. Zur Bindung wurden FIS (2,5 μM), H-NS (6 μM), LRP (4 μM) und StpA (6 μM) vorgelegt und dann zu den unter Einfluss von 50 ng/ μl Heparin gebildeten Komplexen die angegebene Distamycinkonzentration zugegeben. Bei (-) wurde das freie Fragment aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte auf einem 5%igen nativen PAA-Gel.

Die Bindung und Stabilität aller Protein-DNA-Komplexe wird durch Distamycin schon bei einer relativ geringen Konzentration von 1 μM erheblich beeinträchtigt. Die Komplexbanden mit H-NS und StpA schmierern mit Distamycin nach unten, wobei der StpA-Komplex stabiler ist und weiter oben im Gel verweilen kann. Dies deutet erneut darauf hin, dass der hochmolekulare Komplex unter Distamycineinfluss stabiler ist als der von H-NS. Auch die Bindung von FIS und LRP wird durch die Anwesenheit von 1 μM Distamycin stark beeinträchtigt und die Komplexe mit hoher Proteinbesetzung nehmen ab, während die unteren 5 FIS- und die unteren 3 LRP-Komplexe über die komplette Distamycinreihe stabil sind. Daraus kann gefolgert werden, dass die induzierte Krümmung für die höhere Besetzung erforderlich ist, nicht aber für die primäre Bindung.

Die hier erhaltenen Ergebnisse sind Hinweis darauf, dass erst durch die Bindung der Transkriptionsfaktoren die Konformation der DNA verändert und das Fragment gekrümmt wird. Das setzt voraus, dass das DNA-Fragment die Fähigkeit zur Krümmung haben muss, also in einem gewissen Maße flexibel ist.

2.2.2.6 Analyse der DNA-Binderegion der Transkriptionsfaktoren durch DNase I *footprints*

In den Retardierungsanalysen mit den verschiedenen Bereichen der *ssrS upstream* DNA-Region konnten für LRP und FIS unterschiedliche Bindestellen grob eingegrenzt werden. Um diese exakter und mit größerer Genauigkeit bestimmen zu können, wurden DNase I *footprint*-Experimente (5.3.4.1) durchgeführt. Für die Klenowmarkierung (5.2.7.2) des unteren Strangs wurde das Fragment F Δ_{76-189} und [α - 32 P]-dATP verwendet. Für den oberen Strang wurde das Fragment F Δ_{76-189} mit *EcoRV* geschnitten und anschließend mittels [α - 32 P]-dCTP radioaktiv markiert.

Für die beiden in hohem Maße kooperativ bindenden Proteine H-NS und StpA, für die keine diskreten Bindestellen aufgelöst werden konnten, sollte jeweils der Bereich der initialen Bindung ermittelt werden. Dazu wurden Bindeansätze zur Bildung der Komplexe angesetzt und anschließend aufgeteilt. Der eine Teil wurde mit DNase I versetzt und auf einem denaturierenden Gel aufgetragen (Abbildung 2.10), während der andere Teil zur Überprüfung der Komplexbildung auf einem nativen PAA-Gel aufgetrennt wurde (Abbildung 2.11 A). Die Desoxyribonuklease I (DNase I) ist eine Endonuklease, die doppelsträngige DNA spezifisch, aber sequenzunabhängig, hydrolysiert.

Durch gebundene Proteine können DNA-Abschnitte sowohl geschützt als auch strukturell so verändert werden, dass die DNase I verstärkt schneidet. In Abbildung 2.10 ist exemplarisch ein Autoradiogramm eines DNase I *footprints* mit dem oberen Strang des DNA-Fragments F Δ_{76-189} und den regulatorischen Proteinen H-NS, StpA, LRP und FIS abgebildet.

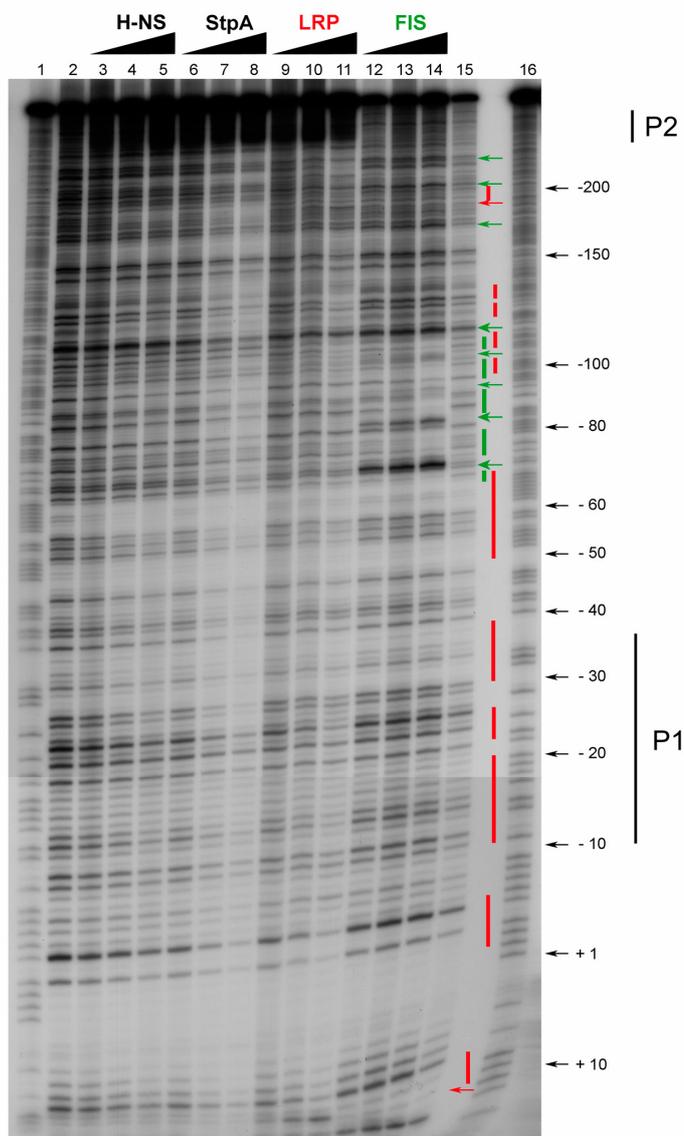


Abbildung 2.10: DNase I footprint-Analysen zur Bestimmung der Bindestellen von H-NS, StpA, LRP und FIS an der regulatorischen Region des *ssrS*-Gens.

Autoradiographie eines DNase I footprints des *non-template* Strangs des Fragments $F\Delta_{76-189}$ mit steigenden Proteinkonzentrationen von H-NS (Spuren 3-5: 2, 4 und 8 μM), StpA (Spuren 6-8: 1, 2, und 4 μM), LRP (Spuren 9-11: 2, 4 und 8 μM) und FIS (Spuren 12-14: 500 nM, 1 und 2 μM) ist abgebildet. Die Spuren 2 und 15 zeigen DNase I-Hydrolyseprodukte von $F\Delta_{76-189}$ in Abwesenheit von Proteinen. In Spur 1 und 16 wurden G+A-Sequenzierungen aufgetragen. Am Rand sind geschützte Bereiche für LRP durch rote und für FIS durch grüne Linien angedeutet. Verstärkte Hydrolyseaktivität ist durch Pfeile mit der gleichen Farbkodierung gekennzeichnet. Die Sequenzpositionen bezogen auf das 5'-Ende der reifen 6S RNA sind am Rand markiert, wie auch die Lage der *ssrS* Promotoren P1 und P2.

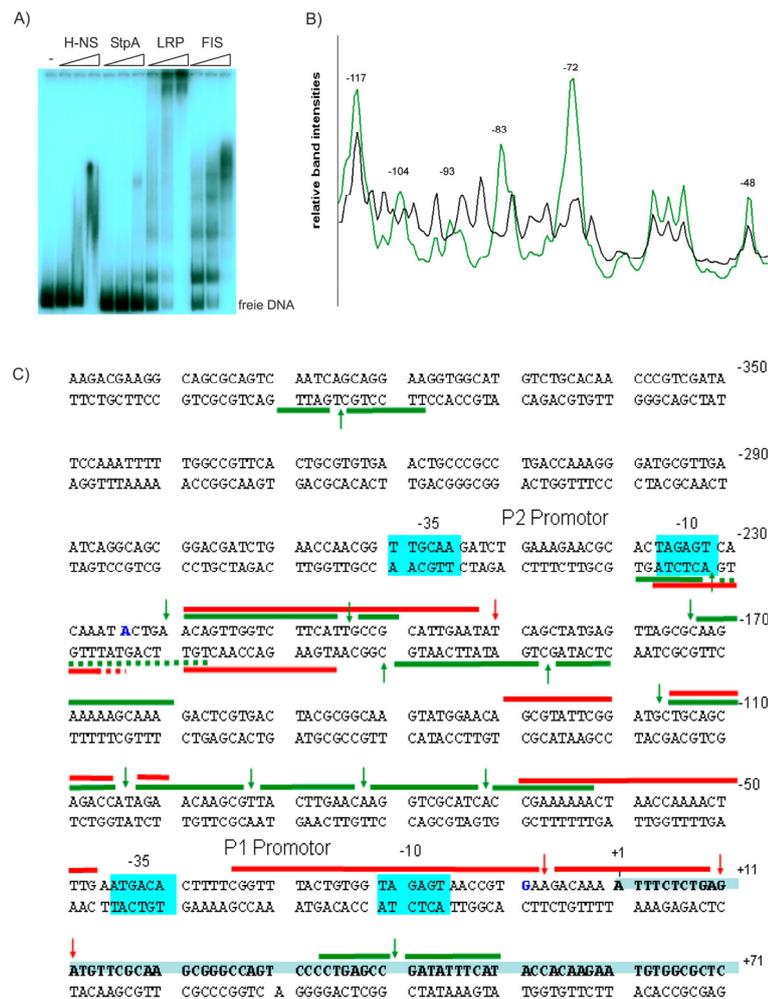


Abbildung 2.11: Auswertung zu den DNase I footprint-Analysen.

A) Autoradiogramm des gleichen Retardierungsansatzes vor DNase I-Zugabe diente zur Kontrolle der Proteinbindung an das Fragment $F_{\Delta 76-189}$. Folgende Proteinkonzentrationen wurden eingesetzt: H-NS (2, 4 und 8 μ M), StpA (1, 2, und 4 μ M), LRP (2, 4 und 8 μ M) und FIS (500 nM, 1 und 2 μ M). Durch (-) ist das Fragment in Abwesenheit von Proteinen gekennzeichnet. B) Zur Verdeutlichung der geschützten Bereiche und der hyperreaktiven Positionen sind in Gegenwart (grün) und Abwesenheit (schwarz) von FIS Profile der Bandenintensität zwischen den Positionen -45 und -120 dargestellt. C) Angegeben ist die *upstream*-Sequenz von Position -409 bis +71 in Bezug auf das reife 5'-Ende der 6S RNA, deren Sequenz selber fett gedruckt und hinterlegt ist. Über und unter den Zeilen sind geschützte Bereiche des oberen bzw. unteren DNA-Strang für LRP durch rote und für FIS durch grüne Balken angedeutet. Verstärkte Hydrolyseaktivität ist durch Pfeile mit gleicher Farbkodierung für den oberen und unteren Strang gekennzeichnet. Die Lage der -10 und -35 Region der *ssrS* Promotoren P1 und P2 ist blau hinterlegt.

Während für LRP und FIS diskrete Bindestellen auflösbar sind, können für H-NS und StpA keine klar definierten Bindestellen gefunden werden. H-NS und StpA schützen die DNA über einen großen Bereich einschließlich der beiden Promotoren P1 und P2. Dies passt zu der kooperativen Bindeeigenschaft beider Proteine, die generell für diffuse *footprint*-Protektionsmuster bekannt sind (Schröder and Wagner 2002). Wie auch in den

Retardierungsanalysen, zeigt StpA eine deutlich höhere Bindeaktivität als H-NS. Außerdem ist bei StpA zwischen den Positionen -30 und -65 eine besonders starke Protektion zu finden, während ein vergleichbarer Schutz durch H-NS nicht beobachtet wurde. Dies könnte ein Startpunkt der kooperativen Bindung von StpA an das Fragment sein, der schließlich zu dem hohen Besetzungsgrad führt.

Zur Identifikation von Bindestellen von FIS und LRP wurden die Bandenintensitäten der Spuren mit und ohne Protein zunächst optisch miteinander verglichen. In gut aufgelösten Bereichen, in denen geschützte und verstärkte Banden erkennbar waren, wurden außerdem quantitative densitometrische Profile über die gesamte Spur in relative Bandenintensitäten erstellt und übereinander gelegt. Ein Beispiel für einen solchen Vergleich von Profilen ist in Abbildung 2.11 B gezeigt. Hier wurden die relativen Bandenintensitäten von Spur 14 (mit FIS) und 15 (ohne FIS) aus Abbildung 2.10 zwischen den Positionen -45 und -120 (bezogen auf das reife 5'-Ende der 6S RNA) direkt miteinander verglichen. Man erkennt gut die erhöhten Intensitäten in Anwesenheit von FIS (Positionen -72, -83, -93, -104 und -117) und die geschützten Bereiche zwischen den Peaks, bei denen die relativen Intensitäten des FIS Profils unterhalb des Profils der DNA ohne Protein liegen. Die hyperreaktiven Stellen liegen dabei typischerweise benachbart zu geschützten Regionen.

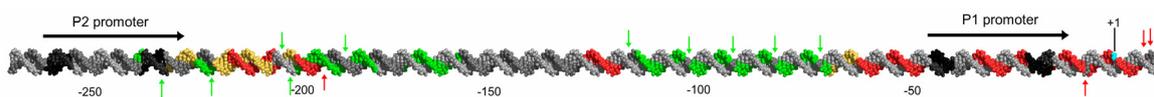


Abbildung 2.12: Aus den *footprint*-Analysen abgeleitetes raumfüllendes Kalottenmodell des *upstream*-Bereichs des 6S RNA-Gens mit eingezeichneten Proteinbindestellen für FIS und LRP.

Die *ssrS* P1 und P2 Promotoren sind mit schwarzen Pfeilen angegeben, die -10 und die -35 Region sind schwarz eingefärbt und die Sequenzpositionen sind auf den 5'-Terminus der reifen 6S RNA bezogen. Geschützte Bereiche durch FIS sind grün und durch LRP sind rot gefärbt, wobei hyperreaktive Stellen mit Pfeilen im gleichen Farbkode angegeben sind. Überlappende Bindestellen sind gelb gehalten.

Eine Zusammenfassung der aufgelösten Bindestellen von LRP und FIS von mehreren unabhängigen Versuchen für den *non-template* und den *template* Strang ist in Abbildung 2.11 C dargestellt.

Es gibt auf dem Fragment $F\Delta P2\Delta_{76-189}$ zwei Sequenzabschnitte die ohne *mismatch* mit der LRP-Konsensussequenz übereinstimmen (Cui *et al.* 1995). Eine Bindung mit diesem vorhergesagten DNA-Bereich (zwischen den Positionen -6 und +9, sowie zwischen -131 und -117) konnte in den vorliegenden Experimenten verifiziert werden. LRP bindet in vier Abschnitten zwischen den Positionen +10 und -235 und zeigt damit eine starke Bindekapazität an den *ssrS* P1 Promotor. Dies steht im Widerspruch zu den Bindeanalysen von LRP mit dem Fragment $F\Delta P2\Delta_{76-189}$. Diesem fehlt im Vergleich zu Fragment $F\Delta_{76-189}$ die P2 *upstream* Region, jedoch können deutlich weniger Komplexe aufgelöst werden. Nahe der -10 Region des P2 Promotors befindet sich noch eine LRP-Bindestelle. Diese liegt nahe dem Sequenzabschnitt, an dem sich die Schnittstelle von *Bgl*III befindet. Es ist möglich, dass damit eine wichtige Interaktionssequenz zerschnitten wurde oder die Auflösung der verwendeten DNA-Fragmente nicht ausreichte. Da LRP in der Nähe des Transkriptionsstarts des P2 Promotors bindet, können beide *ssrS* Promotoren durch LRP reguliert werden. Auch FIS interagiert überwiegend mit der P1 Promotorregion und bindet hauptsächlich zwischen den Position -60 bis -240. Diese Ergebnisse werden durch Retardierungsstudien unterstützt. Außerdem konnte noch eine FIS-Bindestelle *upstream* des P2 Promotors (-378 bis -390) sowie eine im Strukturgen der 6S RNA (+35 bis +50) nachgewiesen werden. Folglich besteht für FIS ebenfalls die Möglichkeit, die Transkription von beiden *ssrS* Promotoren zu beeinflussen. Eine Zusammenfassung der *footprint*-Ergebnisse ist in

Abbildung 2.12 dargestellt. Dort sind gut die überlappenden Binderegionen von FIS und LRP (in gelb) zu erkennen, die sich ungefähr an den Sequenzpositionen -60 bis -70, -100 bis -115 und -200 bis -230 befinden. Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass FIS und LRP funktionell konzertiert miteinander interagieren könnten. Das Fehlen von FIS bzw. LRP führte zu einer Dereprimierung *in vivo* (Abbildung 2.3) und könnte ein Hinweis darauf sein, dass sie möglicherweise als Antagonisten um Bindestellen konkurrieren.

2.2.2.7 Vorhersage von Proteinbindestellen für FIS und LRP durch bioinformatische Analyse

Die hier ermittelten Bindestellen von FIS und LRP wurden außerdem mit ihren bekannten Konsensussequenzen verglichen. Beide Proteine erkennen neben flexibler oder gekrümmter DNA außerdem degenerierte palindromische Konsensussequenzen, die mittels Sequenzkonservierung und Aptamer-Bindungsstudien bestimmt wurden (Hübner and Arber 1989; Cui *et al.* 1995). LRP erkennt eine stringenter Konsensussequenz als FIS, weshalb für LRP 4 Fehlpaarungen beim Sequenzvergleich zugelassen wurden und zwei Bindestellen vorausgesagt wurden. Eine der LRP-Bindestellen befindet sich *upstream* vom *ssrS* P1 Promotor und eine *downstream* davon, überlappend mit der Transkriptionsstartstelle des P1 Promotors. Beide vorhergesagten Bindestellen wurden im *footprint* Experiment geschützt und könnten die initialen Komplexbanden 1 bzw. 2 sein, die bei den Gelverzögerungsstudien gefunden wurden. Die größere Zahl an LRP-Komplexen mit dem Fragment F Δ_{76-189} im Vergleich zur Vorhersage könnte an der größeren Degenerierung der LRP-Konsensussequenz liegen oder daran, dass LRP einen höherem Oligomerisierungszustand einnimmt und hochmolekulare Aggregate zusammen mit der DNA bildet. Eine weitere mögliche Ursache für den höheren Besetzungszustand des Fragments in den Bindungsstudien könnte eine durch LRP induzierte Schleifenbildung sein, die für das *rrnB* P1 Fragment schon gezeigt werden konnte (Pul *et al.* 2007).

```

CATGGGTCTAAAGACGAAGGCAGCGCAGTCAATCAGCAGGAAGGTGGCATGTCTGCACAACCCGTCGA
TATCCAAATTTTTGGCCGTTCACTGCGTGTGAACTGCCGCCTGACCAAAGGGATGCGTTGAATCAGG
CAGCGGACGATCTGAACCAACGGTTGCAA-35GATCTGAAAGAACGCACP2TAGAGT-10CACAAATACTGAACAG
TTGGTCTTCATTGCCGCATTGAATATCAGCTATGAGTTAGCGCAAGAAAAGCAAAGACTCGTGACTA
CGCGGCAAGTATGGAACAGCGTATTCGGATCCTGCAGCAGACCATAGAACAAGCGTTACTTGAACAAG
GTCGCATCACCGAAAAAATAACCAAACTTTGA-35ATGACAP1CTTTTCGGTTTACTGTGG-10TAGAGTAACC
GT+1GACAAATTTCTCTC6S RNAAGATGTTTCGCAAGCGGGCCAGTCCCCTGAGCCGATATTTTCATACCACA
AGAATGTGGCGCTCCGCGGTTGGTGAGCATGCTCGGTCCGTCCGAGAAGCCTTAAAACCTGCGACGACA
CATTCACCTTGAACCAAGGGTTCAAGGGTTACAGCCTGCGGCGGCATCTCGGAGATTCCGGGGATC

```

Abbildung 2.13: Potentielle Bindestellen für FIS und LRP innerhalb der regulatorischen *ssrS*-Region.

Aufgeführt ist die *ssrS* upstream Sequenz von Position -420 bis +191 des Vektors pUC18-6S. Die Promotoren P1, P2 und die -10 und -35-Elemente sind eingezeichnet. Die Transkriptionsstartstellen sind durch Pfeile markiert und das 5'-Ende der reifen 6S RNA ist als +1 angegeben. Die letzten sechs und kursiv geschriebenen Nukleotide stammen aus dem Plasmid. Potentielle FIS-Bindestellen, entsprechend der Konsensussequenz (Hengen *et al.* 1997), sind gelb hinterlegt. Es wurden 2 mismatches zugelassen. Potentielle LRP-Bindestellen entsprechend der jeweiligen Konsensussequenz sind unterstrichen.

Für FIS wurde eine stark degenerierte Konsensussequenz nach Hübner und Arber (1989) verwendet, die nach einer aktuelleren Arbeit modifiziert wurde (Hengen *et al.* 1997). Dabei wurden zwei *mismatches* erlaubt, wenn nicht beide in den stringent konservierten Positionen 1 und 15 der Konsensusregion liegen (Abbildung 2.13). Nach dieser Regel wurden acht Bindestellen für FIS vorausgesagt, wobei vier *upstream* vom P1, drei *upstream* vom P2 und eine im *ssrS* Strukturgen selber liegen. Von den vorhergesagten FIS-Bindestellen konnten im DNase I *footprint* nur drei wiedergefunden werden. Grund hierfür könnte sein, dass die primäre Sequenz nicht allein ausschlaggebend für eine Wechselwirkung ist, sondern dass auch Krümmung und Flexibilität, sowie die initiale Besetzung von Bindestellen, eine Rolle spielen können. Diese potentiellen Bindungsregionen aus dem Konsensussequenzvergleich passen allerdings gut mit der in Retardierungsergebnissen erhaltenen Anzahl an Komplexen zusammen.

2.2.3 Der Einfluss von Regulatoren auf die Transkription beider *ssrS*-Promotoren *in vitro*

Alle in dieser Arbeit untersuchten Transkriptionsfaktoren konnten *in vitro* spezifisch an DNA-Fragmente binden, die die *ssrS* Promotoren P1 und P2 tragen. Um herauszufinden, ob die *in vivo* gemessenen Effekte beim Fehlen der Regulatorproteine auf die Akkumulation der 6S RNA Einfluss nehmen, wurden *in vitro* Transkriptionsanalysen durchgeführt. In der bakteriellen Zelle wird die Transkription durch ein kompliziertes Regulationsnetzwerk kontrolliert. Um dieses System zu analysieren, wird es mit Hilfe der *in vitro* Transkription in seine einzelnen Komponenten zerlegt. Dadurch eignet sich diese Methode besonders zur Beantwortung der Frage, ob es sich um direkte oder indirekte Effekte der Proteine auf die Expression der 6S RNA handelt.

Um die beiden *ssrS* Promotoren zu testen, wurde das Plasmid p6S-T als superhelikales *template* verwendet, welches die 420 Bp *upstream*-Region (bezogen auf das reife 5'-Ende der 6S RNA) und das komplette *ssrS*-Gen vor den effizient terminierenden Doppelterminatoren T1T2 des ribosomalen *rrnB* Operons enthält. Die Transkriptionsreaktion wurde mit den beiden Holoenzymen $E\sigma^{70}$ und $E\sigma^{38}$ in Anwesenheit von unterschiedlichen Konzentrationen von FIS, H-NS, LRP und StpA durchgeführt, um deren Einfluss auf die beiden Promotoren des 6S RNA-Gens zu analysieren. Des Weiteren sollte getestet werden, ob der *ssrS* P1 Promotor unter Stringenter Kontrolle steht. Bei der Stringenten Kontrolle handelt es sich um eine regulatorische Antwort der bakteriellen Zelle auf Aminosäuremangel. Dabei wird sehr schnell das kleine Effektormolekül ppGpp synthetisiert, welches zusammen mit dem Protein DksA eine Stoffwechselantwort auf die Mangelsituation auslöst und die Synthese stabiler RNAs, vor allem der ribosomalen RNAs inhibiert. In dieser Arbeit wurde der Einfluss von ppGpp und DksA auf die 6S RNA Transkription untersucht. Als bekannter, negativ stringent regulierter Kontrollpromotor wurde der *rrnB* P1 Promotor des Plasmids pRT3H Δ P2 eingesetzt, um die Wirksamkeit von ppGpp und DksA sicherzustellen (Paul *et al.* 2004).

Für die Transkription wurden die Regulatorproteine mit der *template*-DNA vorinkubiert, bevor die Reaktion mit RNA-Polymerase gestartet wurde (5.3.5). Beispiele der Ergebnisse sind in Abbildung 2.14 dargestellt. Für die beiden *ssrS* Promotoren P1 und P2 wurden spezifische Transkriptionsprodukte gefunden, die abhängig von dem verwendeten RNA-

Polymerase-Holoenzym in ihrer Stärke variieren. Das Holoenzym $E\sigma^{70}$ steuert hauptsächlich den *ssrS* P1 Promotor und nur mit geringerer Effizienz den P2 Promotor an. Genau umgekehrt sieht die Verteilung mit dem Holoenzym $E\sigma^{38}$ aus, das bevorzugt, aber nicht ausschließlich, von dem *ssrS* P2 Promotor transkribiert. Auch eine Kreuzreaktion des σ^{38} -abhängigen P2 Promotors mit dem heterologen Holoenzym $E\sigma^{70}$ ist möglich. Diese Beobachtung korrelieren weitgehend mit den publizierten *in vivo* Ergebnissen von Kim und Lee (Kim and Lee 2004). Anders als von Kim und Lee (2004) veröffentlicht, kann der *ssrS* P1 Promotor *in vitro* allerdings auch mit dem $E\sigma^{38}$ -Holoenzym transkribiert werden und ist nicht ausschließlich σ^{70} -abhängig.

In Anwesenheit der NAPs werden die *ssrS* Promotoren unterschiedlich in ihrer Aktivität beeinflusst. FIS aktiviert den P1 Promotor mit dem Holoenzym $E\sigma^{70}$ leicht, mit dem Holoenzym $E\sigma^{38}$ überraschenderweise deutlich stärker. Im Gegensatz dazu wird bei steigenden FIS-Konzentrationen der σ^{38} -abhängige P2 Promotor mit $E\sigma^{38}$ effektiv inhibiert (Abbildung 2.14 B). Diese duale Wirkung von FIS auf die Expression der beiden 6S RNA-Promotoren erklärt nicht die *in vivo* gefundenen Effekte und deutet auf eine indirekte Funktion von FIS auf die 6S RNA-Expression in der Zelle hin.

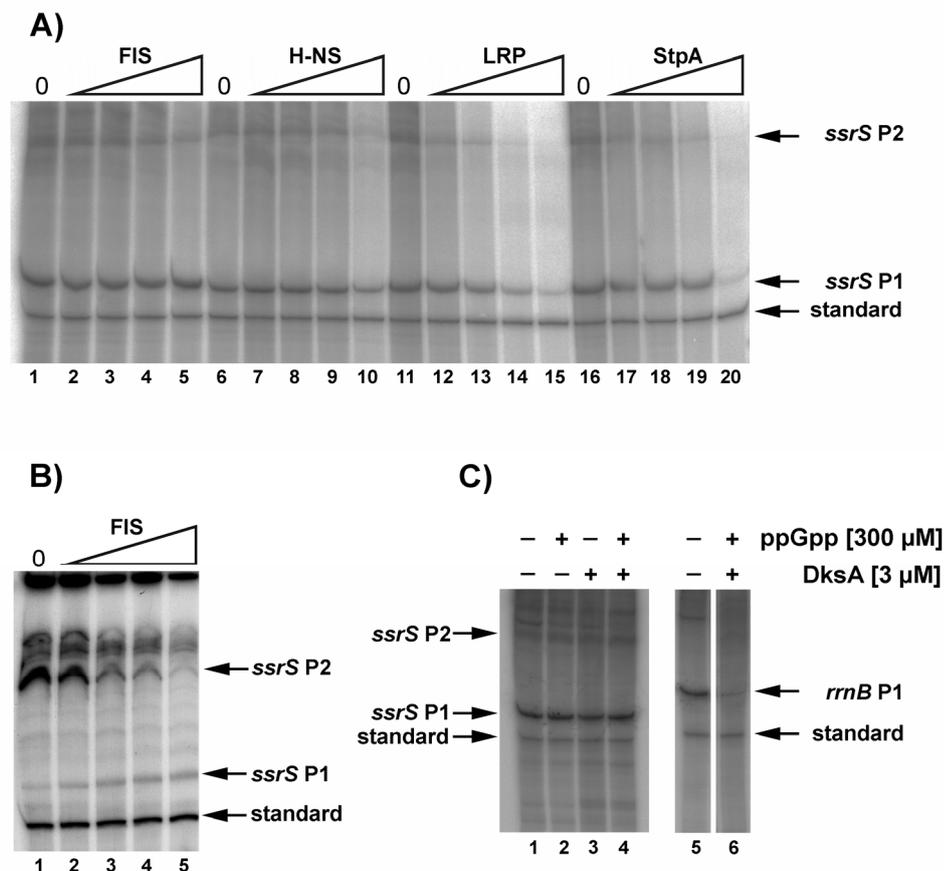


Abbildung 2.14: Einflüsse bakterieller Regulatoren auf die *in vitro* Transkription der *ssrS*-Promotoren.

In vitro Transkriptionsreaktionen wurden mit verschiedenen RNA Polymerase-Holoenzymen und dem Plasmid p6S-T durchgeführt. Die entstehenden Produkte wurden auf einem 10%igen denaturierenden PAA-Gel separiert. Eine 0 über der Spur bedeutet, dass nur der jeweilige Puffer ohne Protein zugegeben wurde. Die Transkriptionsprodukte sowie der Standard sind am Rand angegeben. A) Transkription mit $E\sigma^{70}$ und steigenden Proteinkonzentrationen: FIS Spuren 2-5: 0,25 μ M, 0,5 μ M, 1 μ M und 2 μ M; H-NS Spuren 7-10: 0,5 μ M, 1 μ M, 2 μ M und 4 μ M; LRP Spuren 12-15: 0,38 μ M, 0,75 μ M, 1,5 μ M und 3 μ M; StpA Spuren 17-20: 0,25 μ M, 0,5 μ M, 1 μ M und 2 μ M. B) Transkription mit $E\sigma^{38}$ und steigenden FIS-Proteinkonzentrationen: FIS Spuren 2-5: 0,25 μ M, 0,5 μ M, 1 μ M und 2 μ M. C) Transkription mit $E\sigma^{70}$ in An- (+) und Abwesenheit (-) von ppGpp und DksA. Im linken Teil ist die Transkription von den *ssrS* Promotoren P1 und P2 (p6S-T) und im rechten Teil vom *rrnB* P1 Promotor (pRT3H Δ P2) abgebildet.

Die Anwesenheit der Regulatorproteine H-NS, LRP und StpA bewirkt eine Inhibierung der Transkription für beide *ssrS*-Promotoren. Dies gilt sowohl für $E\sigma^{38}$ als auch für $E\sigma^{70}$, die ihre jeweiligen bevorzugten Promotoren ungefähr im gleichen Maße hemmen. Die hemmende Wirkung auf die Transkription mit dem Holoenzym $E\sigma^{70}$ ist in Abbildung 2.14 A dargestellt. Allerdings variiert die durch die Proteine hervorgerufene Stärke der Inhibierung. Eine quantitative Auswertung von drei unabhängigen Versuchen ergab, dass eine Hemmung um 50 % bei unterschiedlichen Proteinkonzentrationen erfolgt. Für H-NS wurde sie

schätzungsweise bei 2-4 μM , für LRP etwa bei 1,5-3 μM und für StpA bei $\leq 1 \mu\text{M}$ erreicht. Der Einfluss vor allem von H-NS und LRP auf die Transkriptaubeuten *in vitro* stimmt mit den *in vivo* gefundenen aktivierenden Effekten auf die 6S RNA-Akkumulation bei den Deletionsmutanten überein. Diese Beobachtung macht einen direkten Einfluss dieser beiden Regulatoren auf die 6S RNA-Expression wahrscheinlich. Der deutliche Effekt von StpA auf die 6S RNA-Transkription *in vitro* konnte bei den *in vivo* Studien nicht gefunden werden. Dies schließt einen direkten Effekt von StpA auf die 6S RNA-Akkumulation nicht aus, macht ihn aber unwahrscheinlicher als für H-NS und LRP.

2.2.3.1 Analyse der *ssrS*-Transkription Bedingungen der Stringenten Kontrolle

Im *downstream*-Bereich der -10 Region des *ssrS* P1 Promotors befindet sich ein GC-reiches Element (CCGTG), welches Homologie zu einer stringenten Diskriminatorregion (GCGC) aufweist (Travers 1980; Zacharias *et al.* 1989), aber nicht direkt an die -10 Region angrenzt. Um zu testen, ob der *ssrS* P1 Promotor stringent reguliert wird, wurden *in vitro* Transkriptionen mit dem $\text{E}\sigma^{70}$ Holoenzym in Anwesenheit von ppGpp und DksA durchgeführt. DksA beeinflusst in vielen Fällen die ppGpp-abhängige Regulation (Magnusson *et al.* 2007). Das experimentelle Ergebnis ist in Abbildung 2.14 C dargestellt und zeigt, dass ppGpp und DksA weder einzeln noch in Kombination einen Effekt auf die Transkription vom *ssrS* P1 Promotor aufweist. Als Kontrolle des Systems und der Komponenten wurden eine *in vitro* Transkriptionsreaktionen mit dem negativ stringent regulierten ribosomalen *rrnB* P1 Promotor durchgeführt (Potrykus *et al.* 2006), bei dem eine nahezu vollständige Hemmung der Transkription durch ppGpp und DksA beobachtet wurde. Daraus lässt sich schließen, dass die 6S RNA nicht der Stringenten Kontrolle unterliegt. Dies stimmt mit den Beobachtungen älterer *in vivo* Arbeiten überein (Ikemura and Dahlberg 1973; Hsu *et al.* 1985).

Zusammenfassend kann gefolgert werden, dass aufgrund der *in vitro* Bindung und der funktionellen Beeinflussung der *in vitro* Transkription die *in vivo* gemessenen Effekte auf die Transkription der 6S RNA durch H-NS, LRP und StpA direkt sind, während die beobachteten

Wirkungen von FIS mehrschichtiger Natur sind und auch auf indirekten globalen Einflüssen beruhen können.

2.2.4 Beitrag der einzelnen *ssrS*-Promotoren P1 und P2 an der Transkription der 6S RNA in verschiedenen Stämmen

Um die beiden *ssrS*-Promotoren getrennt voneinander *in vivo* untersuchen zu können, wurden Plasmide mit dem P1 bzw. dem P2 Promotor vor dem *cat*-Gen kloniert. Damit ist es möglich, die Tandempromotoren voneinander zu entkoppeln und den jeweiligen Anteil des P1 und des P2 Promotors zu bestimmen. Diese *cat*-Fusionstranskripte besitzen eine relativ kurze Halbwertszeit von wenigen Minuten (Hillebrand 2001), d. h. es werden die momentanen Transkriptionsraten des Promotors gemessen und nicht die Akkumulation über die gesamte Wachstumsphase. Somit ist es möglich, die aktuelle Promotornutzung beispielsweise in einer bestimmten Wachstumsphase zu ermitteln. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass man diese Plasmide in verschiedene Stammhintergründe transformieren und dadurch die Auswirkung des Fehlens eines Proteins auf einen bestimmten Promotor analysieren kann. In dieser Arbeit wurden mit den Fusionskonstrukten die Transkriptionsraten der *ssrS* Promotoren in der exponentiellen und der stationären Phase in die *fis*⁻-, *ssrS*⁻- und *rpoS*⁻-Stämme und deren parentalen Wildtypstämme analysiert. Bei den *primer extension*-Analysen kann man sich zunutze machen, dass sich auf dem Vektor pKK232-8 die RNAI befindet, die bei der Plasmidreplikationsregulation involviert ist. Die cDNA-Produkte des RNAI-Oligos sind als Quantifizierungsstandard verwendbar und korrigieren so gleichzeitig die plasmidkopienzahlabhängige Transkriptionsänderung.

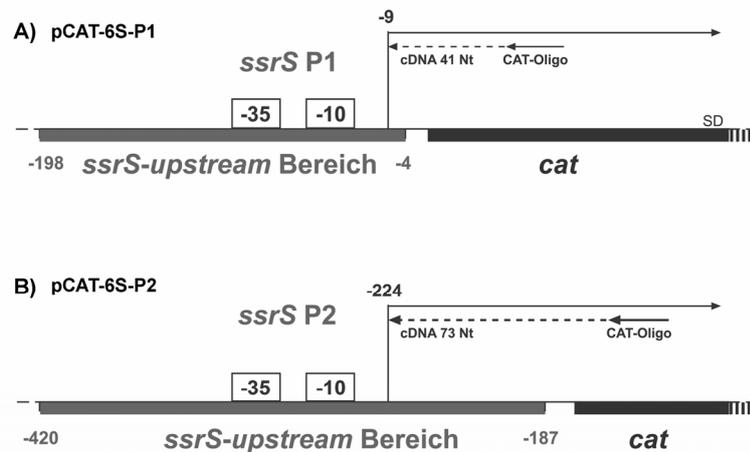


Abbildung 2.15: Schematische Darstellung der *ssrS* Reporterkonstrukte pCAT-6S-P1 und pCAT-6S-P2.

A) Ausschnitt des Vektors pCAT-6S-P1 mit dem eingefügten *ssrS upstream*-Bereich von -198 bis -4, der den P1 Promotor mit seiner -10 und -35 Region enthält. Der Transkriptionsstart erfolgt an Position -9. Mit dem *cat*-Oligo erhält man reverse Transkriptionsprodukte mit einer Länge von 41 Nt. B) Ausschnitt des Vektors pCAT-6S-P2 mit dem eingefügten *ssrS upstream*-Bereich von -420 bis -187, der den P2 Promotor mit seiner -10 und -35 Region enthält. Der Transkriptionsstart erfolgt an Position -224. Mit dem *cat*-Oligo erhält man reverse Transkriptionsprodukte mit einer Länge von 73 Nt. Die Lage der Shine-Dalgarno-Sequenz (SD) ist angedeutet. Die eingezeichneten Positionen der *ssrS upstream*-Bereiche beziehen sich auf das 5'-Ende der reifen 6S RNA.

Zur Konstruktion der Reporterkonstrukte pCAT-6S-P1 und pCAT-6S-P2 wurde ein Fragment mit dem *ssrS* P1 bzw. P2 Promotor vor das promotorlose *cat*-Gen des Plasmids pKK232-8 kloniert. Die korrekte Orientierung des Einbaus konnte relativ leicht durch Chloramphenicolzugabe selektiert werden, da nur Promotorfragmente in der richtigen Orientierung die Resistenz gegen das Antibiotikum vermitteln. Das ist ein Beleg dafür, dass beide *ssrS*-Promotoren unter normalen Wachstumsbedingungen aktiv sind. Der *ssrS* P1 Promotorbereich von Position -4 bis -198 (bezogen auf das reife 5'-Ende der 6S RNA) wurde so vor das *cat*-Gen gesetzt, dass die mit dem *cat*-Oligo entstehende cDNA eine Länge von 41 Basen hat. Das *ssrS* P2 Promotorfragment, das sich von Position -420 bis -187 (bezogen auf das reife 5'-Ende der 6S RNA) erstreckt, wurde ebenfalls vor das *cat*-Gen kloniert. Die reverse Transkription von dem *cat*-Oligo ergibt ein Transkript von 71 Basen. Ein Schema der erhaltenen Fusionskonstrukte ist in Abbildung 2.15 dargestellt. Die Plasmide pCAT-6S-P1 bzw. pCAT-6S-P2 wurden separat in die *fis*⁻, *ssrS*⁻ und *rpoS*⁻-Deletionsstämme sowie deren jeweiligen isogenen Wildtypstamm transformiert. Es wurden aus drei unabhängigen Anzuchten Zellen aus der exponentiellen ($OD_{600} = 0,7$) und der stationären Phase ($OD_{600} \geq 2,7$) geerntet, daraus Gesamt-RNA isoliert und schließlich mit dem *cat*-Oligo und

dem RNAI-Oligo zusammen in einem Ansatz *primer extension*-Analysen durchgeführt (5.3.1). Ein typisches Autoradiogramm eines solchen Experiments ist in Abbildung 2.16 abgebildet. Man erkennt, dass der Hauptanteil der Transkription vom *ssrS* P1 Promotor kommt. Dies ist sowohl in der logarithmischen als auch überraschenderweise in der stationären Phase der Fall.

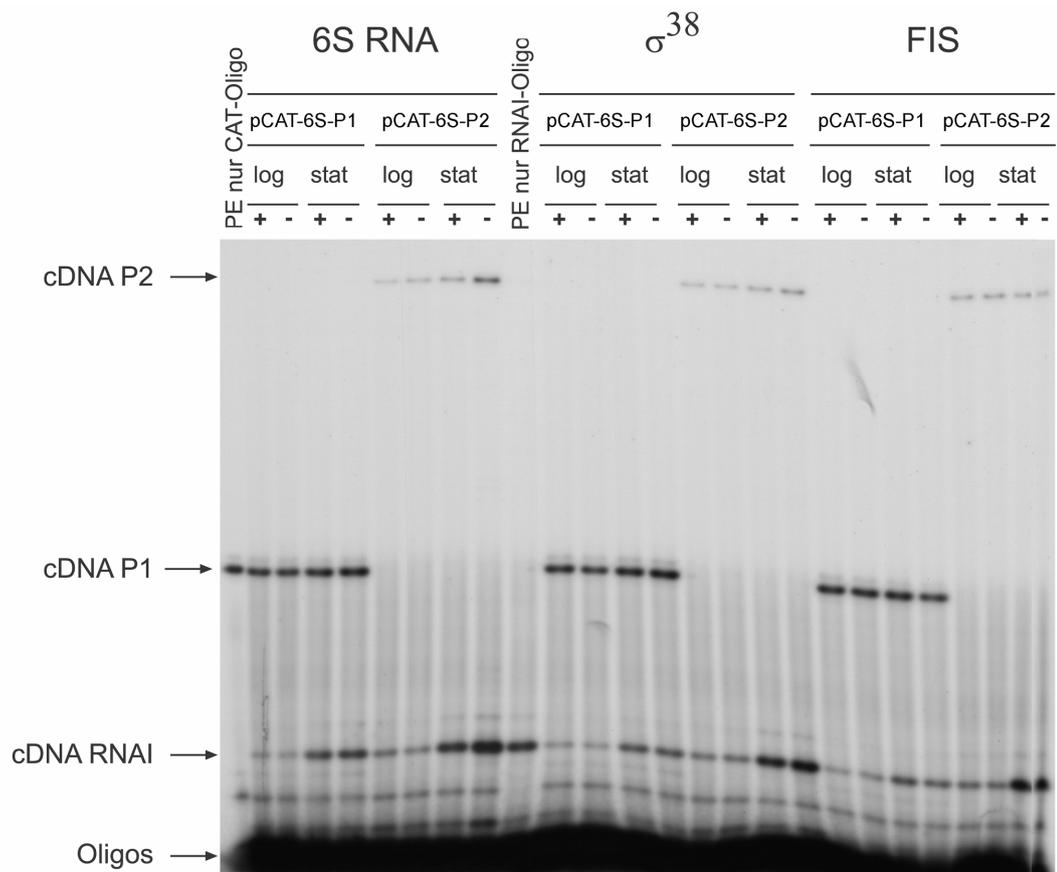


Abbildung 2.16: Primer extension-Analyse mit den Fusionskonstrukten pCAT-6S-P1 und pCAT-6S-P2 in verschiedenen Stammhintergründen.

Gesamt-RNA aus den Stämmen MC4100BW (*ssrS*⁺), MM139 (*ssrS*⁻), MC4100RH (*rpoS*⁺), RH90 (*rpoS*⁻), CSH50 (*fis*⁺) und CSH50*fis::kan* (*fis*⁻) wurde isoliert. Plus bzw. minus über den Spuren steht für verwendete Gesamt-RNA aus Wildtyp bzw. Deletionsmutante, log für die logarithmische und stat für die stationäre Phase. Die Zellen trugen entweder das Plasmid pCAT-6S-P1 oder pCAT-6S-P2. Die entstandenen cDNA-Produkte vom *cat*-Oligo (cDNA P1 und P2) und vom RNAI-Oligo (cDNA RNAI) sind markiert.

Bei der quantitativen Auswertung der *ssrS* P1 und P2 cDNA-Produkte wurde deren Schwärzung durch die der RNAI-Bande dividiert. Die relativen Produktmengen wurden

jeweils auf den Wildtyp bezogen, der 100% gesetzt wurde. Die zusammengefassten Ergebnisse aus drei unabhängigen Versuchen sind in den Diagrammen der Abbildung 2.17 wiedergegeben. Da die Standardabweichungen der Resultate aus der logarithmischen Phase stark variieren und keine signifikante Tendenz zu erkennen ist, sind nur Daten der stationären Phase dargestellt. Es fällt auf, dass die Unterschiede zwischen den untersuchten Stammpaaren relativ gering sind. In der *ssrS*-Mutante bewirkt das Fehlen der 6S RNA in der stationären Phase eine Derepression für den *ssrS* P1 und in stärkerem Maße für den P2 Promotor. Dies deutet auf eine Autoregulation der 6S RNA hin, die durch *in vitro* Transkriptionsexperimente bereits für beide *ssrS* Promotoren gefunden werden konnte (Gildehaus 2005).

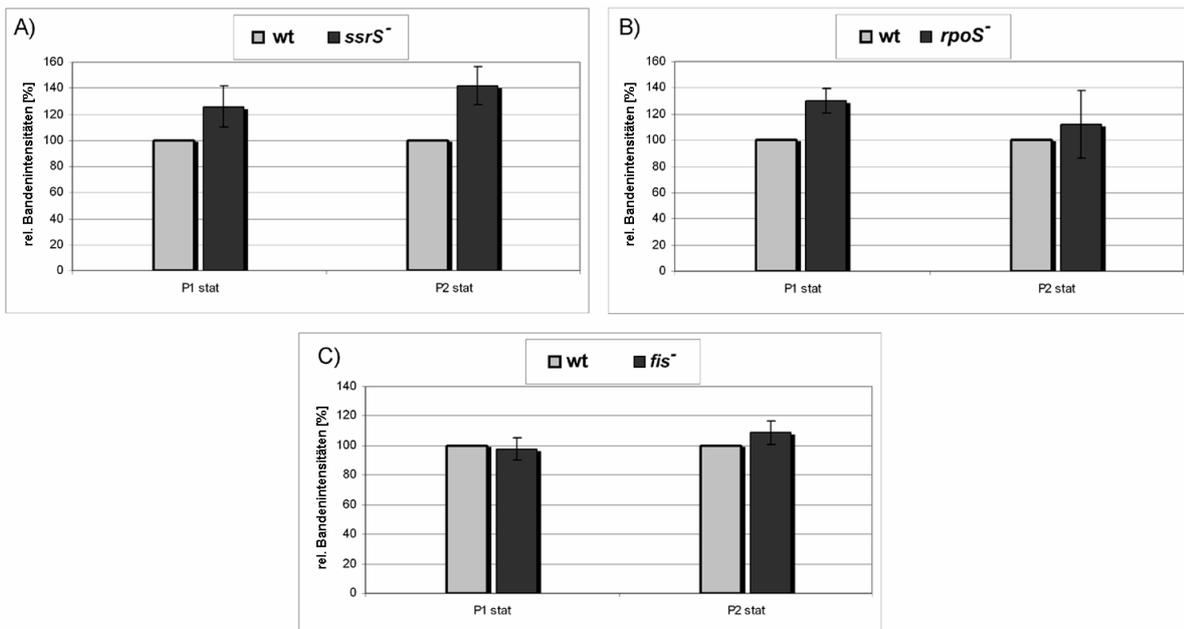


Abbildung 2.17: Quantitative Auswertung der *primer extension*-Analysen der Fusionskonstrukte aus der stationären Phase.

Dargestellt sind Balkendiagramme für den Vergleich der gemessenen P1 und P2 cDNA-Produkte (im Verhältnis zur RNAI) aus der stationären Phase. Hierfür besitzen die verwendeten Stämme entweder das Plasmid pCAT-6S-P1 oder pCAT-6S-P2. Der Wert für den jeweiligen Wildtyp (grau) wurde auf 100 % und der für die Deletionsmutante (schwarz) in Relation gesetzt. Analysiert wurden die Stammpaare MC4100BW (*ssrS*⁺) und MM139 (*ssrS*⁻) (in A), MC4100RH (*rpoS*⁺) und RH90 (*rpoS*⁻) (in B) sowie CSH50 (*fis*⁺) und CSH50*fis::kan* (*fis*⁻) (in C).

Da der P2 Promotor sowohl σ^{70} als auch σ^{38} -abhängig ist (Kim and Lee 2004), sollte untersucht werden, ob sich in Abwesenheit von RpoS die Aktivität des *ssrS* P2 Promotors

ändert. Für die *rpoS*⁻-Mutante wurde erwartet, dass die Expression des P2 Promotors sinkt, doch sie blieb relativ zum Wildtyp unverändert. Die Expression vom *ssrS* P1 Promotor in der stationären Phase ist sogar leicht aktiviert. Es könnte sein, dass durch die Abwesenheit von RpoS in der stationären Phase mehr freies *core*-Enzym vorhanden ist und die Transkription durch σ^{70} oder andere alternative Sigmafaktoren übernommen werden kann. Der Anteil der σ^{38} -abhängigen Transkription für den *ssrS* P2 Promotor in der stationären Phase scheint daher geringer als angenommen.

Das Fehlen von FIS hat überraschenderweise keinen signifikanten Einfluss auf beide *ssrS*-Promotoren in der stationären Wachstumsphase (Abbildung 2.17 C). Eine Derepression in der stationären Phase konnte nicht gezeigt werden. Grund hierfür könnte sein, dass mit den *cat*-Fusionskonstrukten nur die kurzlebigen RNA-Produkte erfasst werden und nicht die Akkumulation der 6S RNA. Möglicherweise wurde die erwartete verstärkte Transkriptionsrate verpasst und die Akkumulation der 6S RNA ist schon weitgehend abgeschlossen.

Es sollte erwähnt werden, dass die Ergebnisse der Fusionskonstrukte durch die Entkopplung der beiden Promotoren gegenüber der Situation *in vivo* verfälscht sein können, weil dadurch beispielsweise die Kommunikation zwischen den *ssrS* Promotoren (wie *in vitro* für FIS gezeigt) gestört sein könnte. Außerdem ist das *ssrS*-Gen aus seinem genomischen Kontext entfernt worden, weshalb das benutzte System artifiziell ist und nicht die genaue *in vivo* Situation widerspiegelt.

Im Folgenden sollen die Auswirkungen des Fehlens der 6S RNA sowohl auf die Gesamt-Expression der mRNA als auch auf Proteinebene untersucht werden, um Hinweise auf die Regulationsziele der 6S RNA zu erhalten.

2.3 Transkriptomanalysen

Die bakterielle 6S RNA gilt als Regulator für das Umschalten vom exponentiellen Wachstum in die stationäre Phase. Grund dafür ist die effektive Bindung der 6S RNA an das σ^{70} Holoenzym im Gegensatz zum σ^{38} -Holoenzym. Außerdem wird die Akkumulation der 6S RNA über die Wachstumsphase als Hinweis einer wachstumsphasenabhängigen Funktion gedeutet. Allerdings zeigt sich weder beim Fehlen noch bei Überexpression der 6S RNA ein

offensichtlicher Phänotyp. Nur unter extremen Bedingungen, wie beim Langzeitüberleben und beim Wachstum bei hohem pH-Wert, konnten geringe Wachstumsphänotypen zwischen Wildtyp und *ssrS*-Deletionsmutante ausgemacht werden (Trotochaud and Wassarman 2004; Trotochaud and Wassarman 2006).

Zur Klärung der direkt oder indirekt an der Funktion der 6S RNA beteiligten zellulären Komponenten sollten zunächst die Unterschiede in der Gesamt-RNA-Expression, also im Transkriptom, in der stationären Phase zwischen Wildtyp (MC4100BW) und *ssrS*-Deletionsmutante (MM139) verglichen werden. Dazu wurden zunächst üN-Kulturen (3 ml YT-Medium) kultiviert, um davon üT-Vorkulturen (25 ml YT-Medium) anzuziehen. Von denen wurden dann in der exponentiellen Phase erneut identische OD₆₀₀-Werte zum Animpfen der üT-Hauptkulturen (100 ml YT-Medium) verwendet. Dies diente dazu ausschließlich exponentiell wachsende Zellen in die Hauptkultur einzusetzen, um eine unterschiedliche *lag*-Phase zu vermeiden und so eine optimale Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Die Zellen wurden dann aus der frühstationären Phase geerntet und daraus Gesamt-RNA aufgereinigt (5.2.2.3). Die anschließenden Transkriptom-Analysen wurden im Forschungszentrum Jülich am Institut für Biotechnologie in Zusammenarbeit mit Dr. Tino Polen durchgeführt. Von der Gesamt-RNA des Wildtyps und der *ssrS*-Deletionsmutante wurde mit Hilfe von Zufallshexameren und reverser Transkriptase cDNA synthetisiert und diese gleichzeitig unter Verwendung der dUTP-Analoga Cy3-dUTP oder Cy5-dUTP fluoreszenzmarkiert (5.3.6.1). Nach der Hydrolyse der RNA wurden die beiden markierten cDNA-Sonden gemeinsam gegen die auf dem *E. coli* DNA-Chip (Operon) gespotteten 70mer DNA-Oligonukleotide hybridisiert (5.3.6.2) und zum Vergleich relativer mRNA-Spiegel die Cy3- zu Cy5-Fluoreszenzverhältnisse bestimmt und ausgewertet (5.3.6.3 und 5.3.6.4). Die Genexpressionsveränderung der rund 4300 ORFs des K12-Stamms wurden für diejenigen ausgewertet, bei denen das Cy3- oder das Cy5-Fluoreszenzsignal mindestens dreifach größer als das Hintergrundsignal war (Signal zu Rausch Verhältnis ≥ 3). Andernfalls wurden die signale als zu schwach angenommen, um die Expression auszuwerten.

Tabelle 2.3: Ausgewählte Gene, deren mRNA-Level in der frühstationären Phase der *ssrS*-Deletionsmutante im Vergleich zum Wildtyp erhöht ist.

Die komplette Genliste findet sich mit Erhöhungsfaktor, Zahl der auswertbaren Experimente und p-Wert in Tabelle 6.4 im Anhang.

Funktionelle Gruppe	Gene	Kurzbeschreibung
Regulatoren	<i>hha</i>	Modulator der Genexpression mit H-NS
	<i>nanR</i>	Transkriptionsregulator
	<i>slyA</i>	Transkriptionsregulator (Antagonist von H-NS)
	<i>uspA</i>	globale, universelle Stressantwort
	<i>acrR</i>	DNA-bindender Transkriptionsrepressor
Aminosäuremetabolismus	<i>leuL</i>	Leu-Operon <i>leader</i> -Peptid
	<i>thrL</i>	Thr-Operon <i>leader</i> -Peptid
Phosphatmetabolismus	<i>pgpB</i>	Phosphatidylglycerophosphatase B
	<i>ppc</i>	Phosphoenolpyruvat-Carboxylase
	<i>ygdP</i>	Dinukleosid-Polyphosphatase
Membranproteine	<i>sstT</i>	Natrium:Serin/Threonin Symporter
	<i>mtr</i>	Tryptophantransporter
	<i>oppF</i>	Oligopeptid-Transporteruntereinheit
	<i>corA</i>	Magnesium/Nickel/Kobalt-Transporter
	<i>kch</i>	Spannungsabhängiger Kaliumkanal

Für den relativen Vergleich wurden drei unabhängige RNA-Präparationen aus der frühstationären Phase von unabhängigen Anzuchten der beiden Stämme benutzt. Da einmal die Fluoreszenzmarkierung getauscht wurde (*color swap*), um eventuell unterschiedliche cDNA-Markierungseffizienzen auszuschließen, ergaben sich vier Vergleiche. Als Ergebnis dieser Vergleiche zeigte sich, dass in der *ssrS*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp sowohl erhöhte als auch verringerte mRNA-Level zu finden sind. Die kompletten Tabellen dazu befinden sich im Anhang (Tabelle 6.4 und Tabelle 6.5). Ausgewertet wurden nur Fluoreszenzsignalverhältnisse von Genen, bei denen die Zahl der auswertbaren Experimente $n \geq 2$ war. Der angegebene p-Wert sagt aus, wie groß die Wahrscheinlichkeit ist, dass der gemessene Unterschied dem Zufall entspringt. Wenn der p-Wert unter 0,05 (5 %) liegt, gilt der betrachtete Faktor als signifikant erhöht bzw. erniedrigt. Mit steigendem p-Wert nimmt die Signifikanz unterschiedlicher RNA-Level zwischen Wildtyp und *ssrS*-Deletionsmutante ab.

Auffällig ist, dass diese Unterschiede generell relativ gering ausfallen. Die größte Erhöhung der relativen Transkriptmenge in der 6S RNA-Mutante beläuft sich auf etwa das 2,5- bis dreifache und die größte Erniedrigung liegt bei etwa 50 %. Der Großteil der mRNA-Level ($\approx 98\%$) bleibt unverändert bzw. die Veränderung bewegt sich in einem minimalen, nicht signifikanten Bereich. Dagegen stehen 30 erhöhte und 42 erniedrigte mRNA-Spiegel in der *ssrS*-Mutante, wobei die hypothetischen Gene nicht berücksichtigt wurden (Tabelle 2.3 und Tabelle 2.4). Die geringe Zahl und der geringe Umfang der Veränderungen der mRNA-Spiegel ist insgesamt nicht überraschend, berücksichtigt man, dass das Ausschalten des 6S RNA-Gens (*ssrS*⁻) keinen unmittelbar erkennbaren Phänotyp verursacht.

Auffällig sind, bei den in der *ssrS*-Deletionsmutante erhöhten mRNA-Leveln (Tabelle 2.3), vor allem die Regulatoren (*hha*, *nanR*, *slyA*, *uspA*, *acrR*), sowie mRNAs, deren Proteine zu der Aminosäure metabolisierenden bzw. aufnehmenden Gruppe gehören. Desweiteren werden Gene in der *ssrS*-Deletionsmutante erhöht gemessen, die der Phosphatregulation zuzuordnen oder als Komponenten der Zellmembran (Transporter bzw. Membranproteine) bekannt sind. Manche der erhöht exprimierten Gene befinden sich in einem gemeinsamen Operon und ihre Expression wird von einem gemeinsamen Promotor kontrolliert. Beispielweise liegt das Gen des hypothetischen Proteins *ybaJ* vor dem Gen *hha*. Beide werden von dem Promotor *ybaJ* P1 transkribiert und beide mRNA-Produkte sind in der *ssrS*-Mutante erhöht. Ein anderes Beispiel sind die Gene *allD* und *ylbA*, die sich im gleichen Operon befinden und auch beide erhöhte mRNA-Level aufweisen. Allerdings finden sich nicht generell alle Gene eines Operons erhöht, was unter anderem auf eine unterschiedliche Stabilität der mRNA hindeutet.

In Tabelle 2.4 sind die Gene aufgelistet, die in der *ssrS*-Deletionsmutante im Vergleich zum Wildtyp einen erniedrigten mRNA-Spiegel aufweisen. Hier fällt vor allem die Vielzahl an Genen der ribosomalen Proteinoperons auf, sowie Gene, deren Proteinprodukte bei der Translation eine Rolle spielen, wie der Translationselongationsfaktor (EF-2 oder EF-G) oder das 16S rRNA prozessierende Enzym RimM. Außerdem ist in Abwesenheit der 6S RNA die Erniedrigung der beiden RNA-Polymeraseuntereinheiten β und β' von besonderem Interesse, da diese gemeinsam mit ribosomalen Proteinen im rProteinoperon L10 kodiert sind und ihre Expression einen Einfluss auf die RNA-Polymerasekonzentration hat. Dies ist ein weiteres Beispiel für eine Koexpression von Genen, die im selben Operon liegen. In diesem Operon

sind alle ribosomalen Proteine, auch das L10, vermindert exprimiert, jedoch wurde das L10-Protein, aufgrund des zu hohen p-Wertes, nicht in die Liste aufgenommen. Weiterhin werden auch die mRNA-Spiegel von Genen, die für Regulatoren kodieren (*fnr*, *lysR*, *flhD*), des Phosphatstoffwechsels und die Proteinzusammensetzung der Zellmembran (Transporter und Membranproteine) in der *ssrS*-Deletionsmutante vergleichsweise verringert.

Tabelle 2.4: Ausgewählte Gene, deren mRNA-Level in der frühstationären Phase der *ssrS*-Deletionsmutante im Vergleich zum Wildtyp erniedrigt ist.

Die komplette Genliste findet sich mit Verringerungsfaktor, Zahl der auswertbaren Experimente und p-Wert in Tabelle 6.5 im Anhang.

Funktionelle Gruppe	Gene	Kurzbeschreibung
rProtein Operon <i>α</i>	<i>rpsD</i>	S4
rProtein Operon <i>str</i>	<i>rpsL</i> , <i>rpsG</i> , <i>fusA</i>	S12, S7, <i>fusA</i> (EF-G)
rProtein Operon <i>spc</i>	<i>rplN</i> , <i>rpsH</i> , <i>rpmJ</i>	L14, S8, L36
rProtein Operon L11	<i>rplK</i> , <i>rplA</i>	L11, L1
rProtein Operon S10	<i>rplB</i> , <i>rpsC</i>	L2, S3
rProtein Operon L10	<i>rplL</i> , <i>rpoB</i> , <i>rpoC</i>	L12, RNA-Polymerase-Untereinheit β und β'
Restliche 50S rProteine	<i>rplM</i> , <i>rplS</i> , <i>rplY</i> , <i>rpmE</i> , <i>rpmG</i>	L13, L19, L25, L31, L33
Einzelne 30S rProteine	<i>rpsF</i> , <i>rpsP</i> , <i>rpsR</i> <i>rpsU</i> , <i>sra</i> ,	S6, S16, S18, S21, S22
Translation	<i>rimM</i>	16S rRNA-prozessierendes Protein
	<i>fusA</i>	Elongationsfaktor EF-G (s. o. <i>str</i>)
	<i>yciH</i>	Translationsinitiationsfaktor <i>SuiI</i>
Regulatoren	<i>uspE</i>	Stressinduziertes Protein
	<i>fnr</i>	Globaler Regulator und anaerobes Wachstum
	<i>lysR</i>	DNA-bindender Transkriptionsregulator
	<i>flhD</i>	Transkriptionsaktivator
Membranproteine	<i>phe</i>	Phenylalanintransporter
	<i>livK</i>	Leucintransporter-Untereinheit
	<i>osmC</i>	osmotisch- & stressinduziertes Membranprotein
	<i>potG</i>	ATP-bindende ABC-Transporteruntereinheit
	<i>mglA</i>	ATP-bindende ABC-Transporteruntereinheit
	<i>tauA</i>	Taurintransporter-Untereinheit
	<i>gltK</i>	Glutamat/Aspartat-Transporteruntereinheit

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass durch das Fehlen der 6S RNA in der frühstationären Phase erwartungsgemäß relativ wenige mRNA-Verhältnisse verändert werden und diese Veränderungen dazu gering ausfallen. Das zumindest ist aufgrund des nicht einfach feststellbaren Phänotyps der *ssrS*-Mutante zu erwarten. Dazu muss erwähnt werden, dass der Grund für diese veränderten mRNA-Level, unabhängig ob erhöht oder erniedrigt, das Ergebnis unterschiedlicher Effekte sein kann. Jeder mRNA-Spiegel wird über die Neusyntheserate und über die Abbaurate eingestellt. Es ist daher davon auszugehen, dass sowohl direkte als auch indirekte Effekte durch die Deletion der 6S RNA auftreten. Da eine reprimierende Wirkung durch die 6S RNA auf die Transkription angenommen wird, sollten sich theoretisch die Kandidatengene für eine direkte Beeinflussung eher in der Liste der Tabelle 2.3 befinden. Dies heißt aber nicht, dass alle Gene, die in der *ssrS*-Deletionsmutante im Vergleich zum Wildtyp mit erhöhtem mRNA-Level auffallen, direkt durch die 6S RNA reguliert werden. Die Unterscheidung zwischen einem direkten und einem indirekten Einfluss ist aber allein mit der DNA-Chip-Technologie nicht möglich, da mRNA-Spiegel nicht zwangsläufig mit der Promotorstärke bzw. der Transkriptionsrate korrelieren bzw. nicht nachvollziehbar ist, welcher Faktor für die veränderte Regulation verantwortlich ist. Es ist beispielsweise denkbar, dass die 6S RNA die Expression eines Regulorgens leicht beeinflusst, wodurch dessen nachgeschalteten Gene reguliert werden. Wie schon angesprochen, ist auch eine Regulation über den *turnover* der mRNA möglich. Mit der DNA-Chip-Technologie ist es jedoch möglich, ein globales Bild des Transkriptom zu erhalten, welches helfen kann, den biologischen Sinn der 6S RNA zu finden.

Um zu untersuchen, ob die veränderten mRNA-Niveaus der Stämme MC4100BW und MM139 sich ebenfalls auf das Gesamtproteinmuster auswirken, wurden Proteomanalysen mittels 2D-Gelelektrophorese durchgeführt.

2.4 Proteomanalysen

Die Transkriptomanalysen aus der frühstationären Phase zeigen, dass durch das Fehlen der 6S RNA das Gesamt-RNA-Muster der Zelle sich in geringem Maße verändert. Dabei ist besonders auffallend, dass die mRNA-Spiegel von einer Reihe ribosomaler Proteine verändert sind. Um zu untersuchen, ob sich diese gefundenen Effekte auch auf der Proteinebene zwischen Wildtyp und *ssrS*-Deletionsmutante fortsetzen, wurden Proteomanalysen durchgeführt. Hierzu wurde Gesamtprotein von den Stämmen MC4100BW und MM139 verglichen, die aus der gleichen Anzucht und der gleichen frühstationären Wachstumsphase stammten, wie die Zellen der Transkriptomanalysen. Mittels 2D-Gelelektrophorese sollten globale Veränderungen des Proteinmusters detektiert werden. Es ist beispielsweise mit dieser Methode möglich, unterschiedliche Proteinexpressionsmuster und auch Phosphorylierungszustände einzelner Proteinspots zu erkennen. Die eindeutige Zuordnung der auffälligen Proteinspots sollte anschließend mittels Massenspektrometrie erfolgen.

Nach der Gesamtproteinisolation (5.2.2.4) und der Proteinkonzentrationsbestimmung (5.2.1.3) wurden 300 µg Gesamtprotein mittels Acetonfällung präzipitiert (5.2.4) und komplett in die isoelektrische Fokussierung (IEF; 5.3.7) eingesetzt. Dabei wurden die Proteine anhand ihres isoelektrischen Punktes (pI) in der ersten Dimension auf einem pH-Streifen (pH 3-10, nicht linear, siehe 4.8) aufgetrennt. Im rechten Winkel zur IEF erfolgte die Trennung in der zweiten Dimension nach dem Molekulargewicht mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE (5.2.5.5). Anschließend wurden die Proteine mit Coomassie gefärbt (5.2.6.3) und man erhielt eine zweidimensionale Verteilung des Gesamtproteins. Die erhaltenen Spotmuster konnten miteinander verglichen werden. Eine grobe Zuordnung jedes Spots über den isoelektrischen Punkt und das Molekulargewicht ermöglicht eine Eingrenzung der in Frage kommenden Proteine. Dabei können sich jedoch in der Gelmatrix Proteine mit ähnlichem isoelektrischen Punkt und ähnlichem Molekulargewicht überlagern.

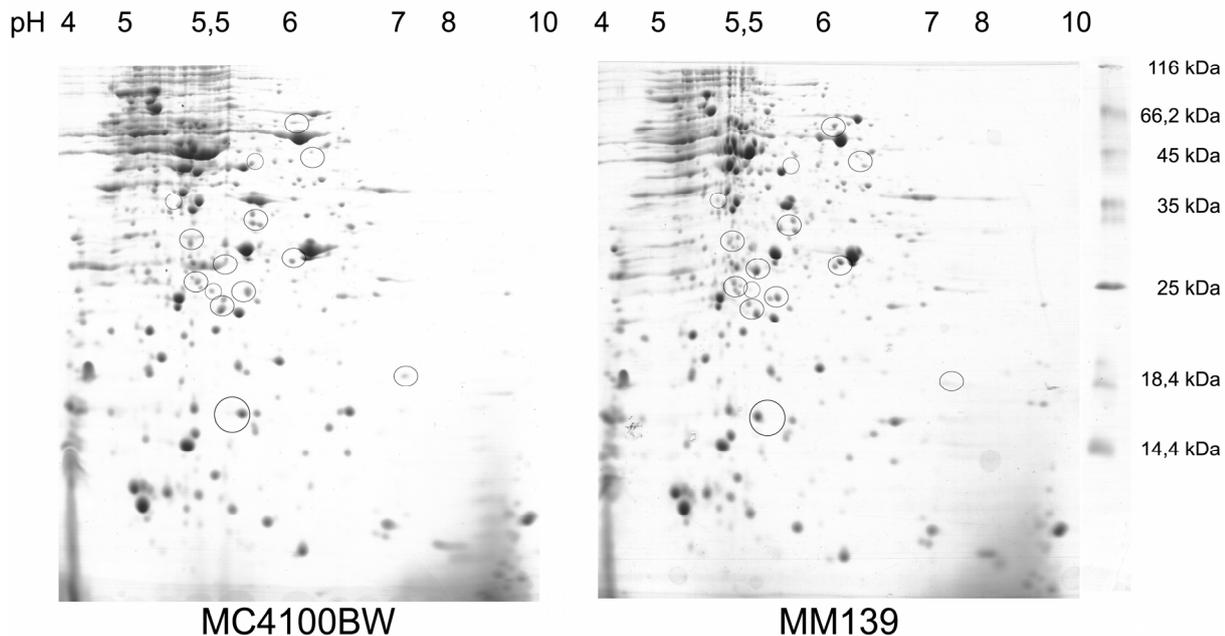


Abbildung 2.18: Proteomanalysen mittels 2D-Gelelektrophorese mit Gesamt-Protein der Stämme MC4100BW (wt) und MM139 (*ssrS*) aus der frühstationären Phase.

Proteommuster der beiden Stämme MC4100BW (wt) und MM139 (*ssrS*) aus der frühstationären Phase nach isoelektrischer Fokussierung und anschließender SDS-PAGE. Der pH-Gradient ist nicht linear und deshalb an markanten Punkten angegeben. Zusätzlich ist ein Molekulargewichtsmarker aufgetragen, dessen Werte rechts gezeigt sind. Die Färbung erfolgte durch Comassie Blue. Eingezeichnet sind exemplarische Proteinspots, die auffällige Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante aufweisen.

In Abbildung 2.18 ist exemplarisch ein Vergleich zwischen dem Gesamtproteinmuster des Wildtyps und der *ssrS*-Deletionsmutante aus der frühstationären Phase dargestellt. Das globale Proteinmuster sieht sehr ähnlich aus, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass vergleichbare Bedingungen während der zweidimensionalen Auftrennung vorherrschten. Eine große Zahl an diskreten Proteinspots ist erkennbar. Die Methode funktioniert erwartungsgemäß und die Proteinmuster sind mit bereits publizierten Gesamtproteinmustern anderer *E. coli* 2D-Gelelektrophoresen vergleichbar. Bei detaillierter Analyse sind quantitative Unterschiede zwischen einzelnen Proteinspots beim Vergleich von Wildtyp und *ssrS*-Deletionsmutante erkennbar. Einige dieser Intensitätsabweichungen wurden eingekreist. Dabei fällt auf, dass einige Spots im Wildtyp verstärkt und einige verringert sind. Außerdem ist bei wenigen Spots die relative Lage zueinander verändert. Dies deutet auf eine Modifikation des Proteins hin. Jedoch muss erwähnt werden, dass in einer Reihe von fünf Experimenten mit gleicher oder unabhängig isolierter Proteincharge diese Unterschiede im

Proteinmuster zwischen Wildtyp und *ssrS*-Deletionmutante nicht reproduziert werden konnten. Die Unterschiede der Gesamtproteinmuster zwischen Wildtype und *ssrS*-Deletionmutante sind sehr gering und fallen nicht größer aus als zwischen zwei Wildtypen bzw. zwei *ssrS*-Deletionmutanten aus unterschiedlichen Experimenten. Deswegen wurde auf eine weiterführende massenspektrometrische Analyse der in ihrer Intensität veränderten Proteinspots verzichtet.

Um quantitative Ergebnisse zu erhalten, muss eine sensitivere Variante der Proteindetektion Verwendung finden. Beispielsweise könnten die Proteine fluoreszenzmarkiert werden, wodurch die Signalintensitäten genauer und in einem erweiterten Konzentrationbereich aufgelöst werden können. Eine andere Möglichkeit ist der Einbau von radioaktiven Nukliden, wie zum Beispiel ^{35}S , in die Proteine. Dies wäre noch sensitiver und es ist durch die Zugabe von radioaktiv markierten Aminosäuren möglich, einen Puls auszulösen, ab dem nur die neustratierten Proteine markiert werden. Auf diese Weise wird nur die aktuelle Proteinneusynthese beobachtet und nicht die Akkumulation der Proteine über die Wachstumsphase. Außerdem sollte ein pH-Streifen mit größerem Auflösungspotential im Bereich zwischen pH 4,5 und pH 6,5 verwendet werden, um die Vielzahl an Proteinspots in diesem Bereich besser voneinander trennen zu können.

Die Auflösung und quantitativen Auswertungsmöglichkeiten sind bei der 2D-Gelelektrophorese mit anschließender Coomassie-Färbung nicht so groß wie bei den fluoreszenzbasierten Transkriptomanalysen, so dass keine vergleichbaren statistischen Aussagen getroffen werden konnten. Die Unterschiede in den RNA-Spiegeln zwischen Wildtyp und *ssrS*-Deletionmutante fielen schon mit einem maximalen Faktor von 2 bis 3 gering aus, wobei die Quantifizierung der Signale einfacher und exakter ist, als bei den Proteomanalysen mit anschließender Coomassie-Färbung. Die vorläufig ermittelten Ergebnisse sind nicht signifikant genug, um eindeutige Aussagen zu treffen. Die Unterschiede durch das Fehlen der 6S RNA scheinen also auch auf Proteomebene gering auszufallen. Diese Beobachtung überrascht nicht, da unter normalen Bedingungen kein Wachstumsphänotyp zu finden ist.

Es ist weiterhin denkbar, dass die Bedingungen, bei denen die 6S RNA deutlich ihre Funktion entfaltet und bei denen größere Unterschiede im Transkriptom und im Proteom vorliegen, erst noch gefunden werden müssen. Verschiedene Stressbedingungen könnten daraufhin

untersucht werden, wie zum Beispiel osmotischer Stress oder auch eine Kombination verschiedener Bedingungen. Im folgenden Teil sollte untersucht werden, ob die 6S RNA beim schnellen Umschalten aus der stationären Situation zu exponentiellem Wachstum in ihrer Konzentration verändert wird. Ob die Stabilität der 6S RNA bei Verdünnung in frischem Medium beeinflusst wird, sollte im nächsten Abschnitt untersucht werden.

2.5 Verändert sich die 6S RNA-Konzentration bei plötzlich verbessertem Nährstoffangebot?

Wie auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, ist die 6S RNA sehr stabil und akkumuliert in der stationären Phase. Sie liegt dabei im Komplex mit dem $E\sigma^{70}$ -Holoenzym der RNA-Polymerase vor (Wassarman and Storz 2000). Wenn die Nahrungsbedingungen sich rasch verbessern (*upshift*), muss die Bindung der 6S RNA an das $E\sigma^{70}$ -Holoenzym möglichst schnell aufgehoben werden, damit die RNA-Polymerase frei wird, um möglichst rasch die Transkription der ribosomalen rRNAs und Haushaltsgene zu aktivieren, die für logarithmisches Wachstum wichtig sind. Um durch das Freisetzen potentielle Anfälligkeit für einen enzymatischen Abbau der 6S RNA zu testen, wurde ihr Konzentrationsverlauf in der Zelle in den ersten 10 min nach *upshift* in kurzen Zeitabständen bestimmt.

2.5 Verändert sich die 6S RNA-Konzentration bei plötzlich verbessertem Nährstoffangebot?

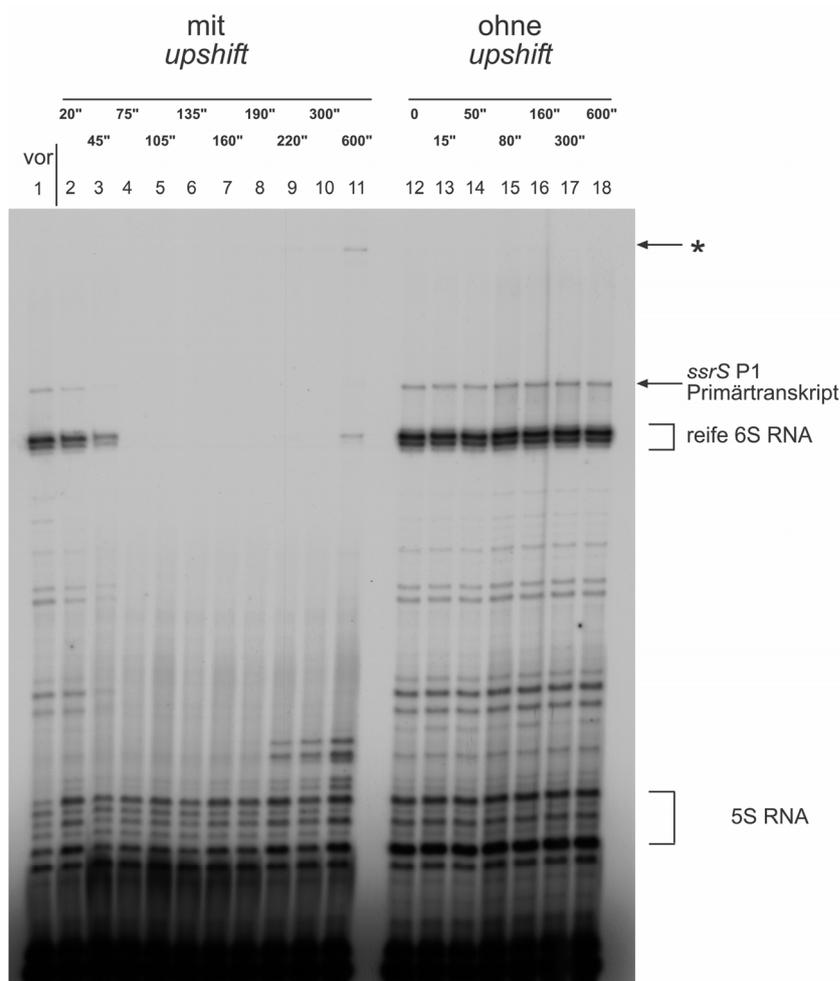


Abbildung 2.19: Bestimmung der Konzentration der 6S RNA unter *upshift*-Bedingungen.

Primer extension-Analyse von Gesamt-RNA aus stationären, wildtypischen MG1655 Zellen in 0,2 % glukosehaltigem 1 x M9-Minimalmedium mit (links) und ohne (rechts) *upshift* mittels Zugabe von 0,1 Volumen 10 x LB-Medium. In Spur 1 ist die Probe vor dem *upshift* aufgetragen und die Spuren 2-11 entsprechen den darüber angegebenen Zeitwerten (in sec) nach *upshift*. Als Kontrolle wurde in ähnlichen Zeitabständen Gesamt-RNA aus parallel angezogenen Zellen isoliert, die keinem *upshift* unterworfen waren. Die cDNA-Produkte der 5S RNAs, der reifen 6S RNA und das Primärtranskript des *ssrS* P1 Promotors sind angegeben. Mit dem Stern ist ein unvollständig prozessiertes Produkt der 5S RNA markiert.

Zunächst wurden wildtypische Zellen des Stammes MG1655 in 1 x M9-Minimalmedium mit 0,2 % Glukose (4.6.2) angezogen, bis sie die stationäre Phase erreichten ($OD_{600} \approx 1,5-1,8$). Um eine rasch verbesserte Situation des Nahrungsangebotes herzustellen (*upshift*), wurden 10 ml Zellkultur entnommen und durch 10 ml vorgewärmtes 10 x LB-Medium (4.6.2) ersetzt. Nun wurden in kurzen zeitlichen Abständen (20-30 sec) Proben entnommen, schockgefroren und daraus Gesamt-RNA isoliert (5.2.2.3). Außerdem wurden aus einer parallel angezogenen Kultur, bei der kein *upshift* ausgelöst wurde, ebenfalls Proben entnommen. In die folgende Hybridisierung für die *primer extension*-Analyse wurde 1 µg Gesamt-RNA sowie die beiden

Oligonukleotide 6S-Oligo-1 und PE-5S-Oligo (4.3.1) eingesetzt, um den Konzentrationsverlauf der 6S RNA relativ zu der 5S RNA in der ausgelösten *upshift*-Situation im Vergleich zu stationären Bedingungen zu verfolgen.

In Abbildung 2.19 ist ein Autoradiogramm eines solchen Experiments abgebildet. Es ist deutlich zu erkennen, dass die 6S RNA-Konzentration ohne *upshift* konstant bleibt, während sich die 6S RNA-Menge nach dem *upshift* drastisch verringert. Schon nach etwa einer Minute ist die reife 6S RNA und auch das *ssrS*-Primärtranskript komplett verschwunden. Dies deutet auf einen sehr schnellen und direkten Abbau hin. Desweiteren erscheint schon 10 min nach dem *upshift* ein Teil der 6S RNA wieder, woraus geschlossen werden kann, dass die Neusynthese über die beiden *ssrS*-Promotoren sehr schnell einsetzt. In der Probe 10 min nach *upshift* ist oberhalb der 6S RNA eine weitere Bande zu erkennen (mit Stern markiert). Es konnte gezeigt werden, dass dieses cDNA-Produkt von dem 5S RNA-spezifischen Oligonukleotid herrührt und dem nicht vollständig durch die RNase III prozessierten 5S RNA-Vorläufer entspricht (Daten nicht gezeigt). Dies ist ein klarer Hinweis darauf, dass die Transkription der rRNA-Operons schon 5 min nach *upshift* aktiviert wird. Abschließend soll erwähnt werden, dass dieses vorläufige Ergebnis zum ersten Mal zeigt, dass die äußerst stabile 6S RNA *in vivo* einem *turnover* unterworfen ist, der durch ein abrupt verbessertes Nahrungsangebot ausgelöst wird. Diese Beobachtung unterstreicht daher deutlich die wachstumsabhängige Funktion, die offenbar bei raschen Anpassungsreaktionen eine Rolle spielt, Situationen, die weder bei den Transkriptom- noch bei den Proteomanalysen bisher untersucht wurden.

3 Diskussion

3.1 Regulation der zellulären 6S RNA-Konzentration

Der Hauptbestandteil der vorliegenden Arbeit beschäftigt sich mit der Regulation des *ssrS*-Gens, welches das Strukturgen für die 6S RNA darstellt und sich zusammen mit dem Gen *ygfA* in einem Leseraster befindet. Die Transkription beider Gene startet von den beiden Tandem-Promotoren P1 und P2, von denen aus zwei unterschiedliche Vorläufer-RNAs synthetisiert und anschließend zur reifen 6S RNA prozessiert werden (Kim and Lee 2004). Die Funktion des offenen Leserahmens *ygfA* ist unbekannt, allerdings wird das Protein *in vivo* exprimiert (Hsu *et al.* 1985). Der distale P2 Promotor kann sowohl vom σ^{38} - als auch vom σ^{70} -abhängigen Holoenzym transkribiert werden, während der proximale Promotor P1 nur vom Holoenzym $E\sigma^{70}$ genutzt werden kann (Kim and Lee 2004) (Abbildung 2.14). Die 6S RNA akkumuliert über die Wachstumsphasen und wechselwirkt bevorzugt mit dem $E\sigma^{70}$ -Holoenzym der RNA-Polymerase. Aufgrund dieser Interaktion kommt es zu einer herabgesetzten Funktionalität der RNA-Polymerase (Wassarman and Storz 2000). Daher ist es naheliegend, dass die 6S RNA bei der Anpassung an Bedingungen der stationären Phase und Stress beteiligt ist.

Zum besseren Verständnis der 6S RNA-Funktion ist es wichtig, mehr über die beobachtete wachstumsphasenabhängige Akkumulation zu erfahren. Dazu wurden in dieser Arbeit die bekannten phasenabhängigen Transkriptionsregulatoren FIS, H-NS, LRP und StpA ausgewählt und deren Effekte auf die 6S RNA-Transkription analysiert. Diese Transkriptionsfaktoren werden selber phasenabhängig exprimiert und sind bei der Anpassung der globalen Genexpression an wechselnde Bedingungen und Stress beteiligt.

3.1.1 Die Stabilität der 6S RNA

Um die Synthese und/oder Akkumulation der 6S RNA zu studieren, sind Informationen über ihre Stabilität von großer Wichtigkeit. Die *E. coli* 6S RNA ist ein sehr stabiles Molekül. Dies wurde schon in Rifampicin-Kinetiken und Pulsmarkierungsexperimenten bei Kohlenstoff-, Stickstoff- und Phosphatmangel gezeigt (Lee *et al.* 1978). Dabei nimmt die 6S RNA-Menge

scheinbar bei Phosphatmangelbedingungen zu. Grund hierfür ist vermutlich, dass die 6S RNA im Verhältnis zu den anderen RNAs stabiler ist und dass in Pulsmarkierungsexperimenten bei Phosphatmangel die neusynthetisierten RNAs aus Nukleotiden von ehemals markierten RNAs bestehen, die bereits abgebaut wurden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch unter Standardlaborbedingungen in der logarithmischen und stationären Phase die 6S RNA äußerst stabil ist, selbst nach 32 min konnte kein nennenswerter Abbau festgestellt werden (Abbildung 2.1). Ihre Halbwertszeit ist damit größer als die Generationszeit einer Bakterienzelle und mit Ausnahme der im Ergebnisteil beschriebenen *upshift*-Situation konnten bisher keine Bedingungen oder Wachstumssituation gefunden werden, bei denen die Stabilität der 6S RNA verringert ist. Diese extrem lange Lebensdauer ist sicher ein Grund für die Akkumulation der 6S RNA über die Wachstumsphase hinaus.

Es stellt sich die Frage, was die Gründe für diese ungewöhnliche Stabilität einer RNA *in vivo* sind. Unter anderem ist die über weite Bereiche doppelsträngige Sekundärstruktur und der stabile Pentaloop des Moleküls zu nennen (Abbildung 1.2), der so stabil ist, dass die Hybridisierung eines sequenzspezifischen Oligonukleotids an diese Region nicht möglich ist (Wassarman and Storz 2000; Gildehaus 2001). Dies allein kann aber nicht die Ursache dieser besonderen Stabilität sein, da vor allem der zentrale Loop sehr variabel ist, leicht aufschmilzt und Angriffsmöglichkeiten für zelluläre Nukleasen bieten sollte. Der entscheidende Grund der extremen Stabilität der 6S RNA *in vivo* ist sehr wahrscheinlich die Bindung an die RNA-Polymerase und die daraus resultierende Protektion vor Abbau. Ein erster Hinweis darauf war die Tatsache, dass *in vivo* die 6S RNA stabiler als die 4,5S RNA ist, jedoch bei Zugabe von Zellextrakten zu aufgereinigten, proteinfreien RNAs die 6S RNA eine geringere Stabilität als die 4,5S RNA zeigte (Lee *et al.* 1978). Später konnte gezeigt werden, dass ein deutlicher Schutz gegen Nukleaseverdau durch die Komplexbildung mit der RNA-Polymerase herrührt (Wassarman and Storz 2000).

Die Konzentration der 6S RNA wird weder durch eine veränderte Halbwertszeit beeinflusst, noch durch fortschreitende Zellteilungen, beispielsweise in der logarithmischen Phase, verdünnt. Deswegen ist man bisher davon ausgegangen, dass die hauptsächliche Regulationsebene der 6S RNA-Expression die Neusynthese ist.

3.1.2 NAPs beeinflussen die *ssrS*-Expression *in vivo*

Mit *primer extension*-Analysen wurden *in vivo* die Gleichgewichtskonzentrationen der akkumulierten 6S RNA zu verschiedenen Wachstumsphasen, in unterschiedlichen Deletionsstämmen und ihren parentalen Wildtypen untersucht. Dabei kann man mit der verwendeten Methode Promotoaktivitäten bestimmen. Aufgrund der Stabilität der 6S RNA wird in diesem Fall jedoch hauptsächlich Akkumulation gemessen. Ob Unterschiede in der RNA-Menge auf direkte oder indirekte regulatorische Einflüsse zurückzuführen sind, geht aus der Analyse nicht hervor.

Der signifikanteste Unterschied in der 6S RNA-Expression zwischen den verglichenen Stämmen wurde erwartungsgemäß in der stationären Phase gefunden, da hier die 6S RNA-Konzentration am höchsten ist und damit ihre Wirkung maximal sein sollte. Mit Ausnahme von StpA wurde bei allen untersuchten Einzeldelentionsstämmen eine signifikante Derepression in der stationären Phase gemessen. Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass FIS, LRP und H-NS in Verzögerungsgelelektrophoresen und *footprint*-Analysen *in vitro* direkt und spezifisch mit der regulatorischen Region des *ssrS*-Gens wechselwirken können. Weiterhin konnten direkte Effekte von FIS, LRP und H-NS in Transkriptionsreaktionen *in vitro* bestätigt werden. Bei Abwesenheit von StpA konnte in der Deletionsmutante keine signifikante Änderung der 6S RNA-Akkumulation in der stationären Phase gemessen werden. Obwohl auch StpA *in vitro* an die regulatorische Region bindet und die Transkription von beiden *ssrS*-Promotoren mit $E\sigma^{70}$ - und $E\sigma^{38}$ -Holoenzymen inhibiert. Diese Diskrepanz könnte dadurch erklärt werden, dass das homologe Protein H-NS das Fehlen von StpA kompensieren kann. Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass H-NS und StpA in vielen, aber nicht in allen Fällen die Funktion des homologen Proteins übernehmen können (Sonden and Uhlin 1996; Williams *et al.* 1996; Williams and Rimsky 1997). Außerdem ist es denkbar, dass die intrazelluläre Konzentration von StpA, die niedriger ist als die von H-NS (Sonnenfield *et al.* 2001), nicht ausreicht um auf die Expression der *ssrS* Promotoren einzuwirken. Klarheit über die gegenseitige *in vivo* Kompensierung der Funktionen beider Proteine sollte die *hns*- und *stpA*-Doppelmutante bringen. Hier wurde eine stark verringerte 6S-RNA-Menge in der Transitionsphase und in der stationären Phase beobachtet. Allerdings zeigte die Doppelmutante einen klaren Wachstumsratenunterschied im Vergleich zu ihrem Wildtyp,

wodurch die stationäre Phase nicht so schnell erreicht werden konnte und die RNA-Mengen der beiden Stämme nicht direkt vergleichbar waren. Die globale Regulation der *hns*- und *stpA*-Doppelmutante ist schwer beeinträchtigt, da mit H-NS ein wichtiges Nukleoid-assoziiertes Protein für die Strukturierung der DNA und mit StpA gleichzeitig auch das *backup*-Protein fehlt.

In einem ähnlichen experimentellen Ansatz wie in dieser Arbeit (Abbildung 1.4) haben Kim und Lee die 6S RNA-Expression in einem *rpoS*-Deletionsstamm und dem Wildtypstamm mittels Northern-Blot-Analysen verglichen (Kim and Lee 2004). In beiden Stämmen verläuft die Akkumulation der 6S RNA sehr ähnlich und stimmt gut mit dem in dieser Arbeit ermittelten Wachstumsphasenverlauf der 6S RNA-Expression überein. Allerdings steigt die 6S RNA in beiden verwendeten Stämmen von der logarithmischen Phase zur stationären Phase nur um das Zweifache an. Basierend auf einer verringerten Transkription des *ssrS* P2 Promotors, ist die Konzentration der 6S RNA in der *rpoS*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp über die gesamte Wachstumsphase leicht erniedrigt. Mit der in dieser Arbeit verwendeten *primer extension*-Analyse konnten keine Vorläufermoleküle des *ssrS* P2 Promotors detektiert werden. Grund hierfür ist die sehr schnelle Prozessierung des P2 Vorläufers (Kim and Lee 2004), aber auch die Tatsache, dass weniger als 1/100 Gesamt-RNA in die *primer extension*-Reaktion, im Gegensatz zur Northern-Blot-Analyse, eingesetzt wurde (Kim and Lee 2004). Trotzdem konnten für die reife 6S RNA, besonders in der stationären Phase, starke Signale detektiert werden. In der exponentiellen Phase wird eine Zahl von 1000 (Wassarman and Storz 2000) bis 1500 (Lee *et al.* 1978) und 10000 6S RNA-Moleküle in der stationären Phase (Wassarman and Storz 2000) angenommen. In den hier präsentierten Gesamt-RNA-Analysen stieg die relative 6S RNA-Menge in dem untersuchten Wildtyp von der logarithmischen zur stationären Phase um das Fünffache an. Bei Kim und Lee (Kim and Lee 2004) steigt die relative 6S RNA-Menge allerdings nur um das Zweifache an. Dies verdeutlicht, dass eine präzise Bestimmung der Molekülzahl der 6S RNA in den verschiedenen Wachstumsphasen unerlässlich ist, um einen besseren Überblick über die Funktion der 6S RNA zu erhalten.

3.1.3 Bindung der Transkriptionsfaktoren an die regulatorische Region des *ssrS*-Gens *in vitro*

Die *upstream* regulatorische Region des *ssrS*-Gens beeinflusst zusammen mit einer Vielzahl an Regulatoren die Synthese der 6S RNA. Die Akkumulation dieses extrem stabilen Moleküls wird während der Wachstumsphasen über die Transkription von den beiden *ssrS* Promotoren P1 und P2 gesteuert. Viele der Nukleoid-assoziierten Proteine binden bevorzugt an gekrümmte Bereiche der DNA. Wenn sich diese intrinsische Krümmung *upstream* von Promotoren befindet, werden meist Promotorstärken beeinflusst. Durch Computerberechnungen mit dem *DIAMOD*-Programm konnte *in silico* keine nennenswerte intrinsische Krümmung festgestellt werden (Tabelle 2.1). Außerdem konnte weder durch thermische Einflüsse in TGGE-Analysen (Abbildung 2.8) noch durch chemische Konformationsveränderung mittels Zugabe des Antibiotikums Distamycin (Abbildung 2.9) ein Mobilitätseffekt in nativen Gelelektrophoresen beobachtet werden, der auf eine Krümmung der verwendeten Fragmente schließen lässt. Die *ssrS upstream*-Region ist folglich nicht intrinsisch gekrümmt.

Die hier untersuchten Transkriptionsregulatoren FIS, H-NS, LRP und StpA binden differentiell an die regulatorische Region des *ssrS*-Gens. Diese NAPs sind bekannt für ihre bevorzugte Wechselwirkung mit gekrümmten DNA-Sequenzen. Dies gilt insbesondere für H-NS und StpA, die beide kein typisches DNA-Bindemotiv besitzen und vor allem intrinsisch gekrümmte AT-reiche DNA-Sequenzen binden können (Tippner and Wagner 1995). Außerdem ist bekannt, dass auch nicht gekrümmte DNA bei entsprechender Flexibilität H-NS binden kann, wodurch Krümmung induziert wird (Spurio *et al.* 1997; Afflerbach *et al.* 1999). Beide Proteine binden in Gelretardierungsexperimenten kooperativ, wobei StpA, wie in den meisten Fällen, eine höhere Affinität zu den verwendeten DNA-Fragmenten besitzt als H-NS (Azam and Ishihama 1999). Gründe für die vergleichsweise niedrige Affinität sind zum einen die hohe Konzentration des eingesetzten Kompetitors Heparin (50 ng/μl) und zum anderen die Tatsache, dass die *ssrS*-Fragmente nicht statisch vorgekrümmt sind. Nachdem die initiale Bindung erfolgt ist, polymerisieren beide Proteine kooperativ entlang des Doppelstrangs. Dies ist auch bei den *footprint*-Analysen erkennbar, bei denen die DNA über die gesamte *upstream*-Region geschützt wird. Durch eine solche hochmolekulare Besetzung wirkt H-NS

reprimierend auf Promotoren, da die Bindung der Polymerase oder Aktivatoren blockiert und damit die Transkription gehemmt wird. Das Absättigen von DNA-Bindestellen durch H-NS hat Ähnlichkeit mit dem bei eukaryotischer Genregulation bekannten Phänomen des *silencing*. Außerdem kann H-NS beispielsweise die *upstream* und *downstream* Bereiche des *rrnB* P1 Promotors miteinander verbrücken, eine Schleife (*loop*) bilden und die Elongation der Transkription hemmen (*trapping*). Ob eine solche Schleifenbildung bei den *ssrS*-Promotoren stattfindet, ist nicht bekannt und kann aus den vorliegenden Ergebnissen nicht geschlossen werden. Auf welchem Mechanismus die Effekte bei den *in vitro* NAPs basieren, ist unklar, obgleich ein Polymerisieren entlang der DNA naheliegend ist.

FIS und LRP binden, wie H-NS und StpA, an gekrümmte DNA-Bereiche, können jedoch zusätzlich eine degenerierte Konsensussequenz erkennen. Daraus ergibt sich eine deutlich höhere Affinität im Vergleich zu H-NS und StpA und mehrere Besetzungszustände werden aufgelöst. Allerdings binden FIS und LRP nicht kooperativ. Während in Verzögerungsgelelektrophoresen FIS hauptsächlich an die *upstream*-Region des *ssrS* P1 Promotors bindet, interagiert LRP vornehmlich mit der des *ssrS* P2 Promotors. Im Strukturgen der 6S RNA von Position +75 bis +191 binden sowohl FIS als auch LRP erwartungsgemäß nicht.

Die exakten Positionen der Bindestellen konnten in hochauflösenden *footprint*-Analysen bestimmt werden. Wie schon aus Gelretardierungen bekannt war, gibt es an den beiden *ssrS* Promotoren P1 und P2 und ihren *upstream*-Regionen eine Vielzahl von Bindestellen, die durch FIS bzw. LRP besetzt werden können. Die FIS-Bindestellen liegen vornehmlich innerhalb und *downstream* des P2 Promotors. Deshalb wird der P2 Promotor vermutlich bei *in vitro* Transkriptionen mit beiden Holoenzymen inhibiert. Außerdem befinden sich mehrere Bindestellen für FIS *upstream* des *ssrS* P1 Promotors, wodurch eine verstärkte RNA-Polymeraserekrutierung erfolgen könnte. Dabei wird die Bindekonstante der RNA-Polymerase an den Promotor durch eine direkte Wechselwirkung mit dem *upstream* gebundenem FIS erhöht und die Transkription durch *recruiting* aktiviert (Bokal *et al.* 1997). Dagegen bindet LRP innerhalb und *downstream* der P1 und P2 Promotorbereiche. Auf diese Weise könnte LRP die Transkription an den *ssrS*-Promotoren, wie bei den *in vitro* Transkriptionen zu erkennen war, hemmen. Dies kann entweder durch Blockierung des

Promotors selber oder durch Aufhalten der begonnen Elongationsreaktion geschehen. Die überlappenden Bindebereiche von FIS und LRP lassen unter bestimmten Bedingungen eine antagonistische Wirkung der beiden Regulatoren FIS und LRP vermuten.

Die gebildeten Protein-DNA-Komplexe wurden in TGGE-Analysen auf ihre thermische Stabilität hin untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die Stabilität der Komplexe direkt mit ihrer DNA-Affinität korrelierte. Die hochmolekularen Komplexe mit den beiden strukturspezifisch bindenden Proteinen H-NS und StpA waren temperatursensitiver als die Komplexe mit FIS oder LRP, deren Bindung Sequenzspezifität besitzt. H-NS reagiert am sensitivsten auf Temperaturerhöhung. Dies stimmt gut mit der Beobachtung überein, dass die Oligomerisierung von H-NS durch steigende Temperatur gestört wird (Stella *et al.* 2006). Daher spielt H-NS an der temperaturabhängigen Regulation von Virulenzgenen eine Rolle (Prosseda *et al.* 1998). Da StpA positiv bei erhöhten Temperaturen reguliert wird, ist es nicht überraschend, dass der StpA-Komplex relativ temperaturstabil ist (Sonden and Uhlin 1996). Es ist gut vorstellbar, dass durch Bindung an das ungekrümmte Fragment Krümmung induziert wird. Ob nun durch Temperaturerhöhung diese Krümmung aufgehoben oder ob die Proteininteraktion geschwächt wird und deshalb der Komplex dissoziiert, ist unklar. Wahrscheinlich ist, dass eine Kombination aus beiden Effekten vorliegt.

Bei den sequenzspezifisch bindenden Proteinen FIS und LRP sind die Komplexe stabiler, jedoch gab es Unterschiede zwischen den einzelnen Komplexbanden. Beispielsweise zerfiel der primäre LRP-Komplex bei niedrigerer Temperatur (ca. 31°C) als der höherbesetzte Komplex (ca. 49°C). Dies könnte auf eine höhere Organisation der LRP-Besetzung hinweisen, bei der durch Protein-Protein-Wechselwirkungen die Thermostabilität der Bindung erhöht wird. Dagegen sind die beiden am höchsten besetzten FIS-Komplexe weniger stabil (ca. 51 bzw. 53°C) als die vier schneller wandernden Komplexe, die einer Temperatur von 55°C widerstehen konnten. Dies ist ein Indiz dafür, dass die Bildung der FIS-Komplexe unabhängig voneinander erfolgt. FIS und LRP sind für ihre Veränderung der DNA-Struktur bekannt und induzieren wahrscheinlich beim Binden DNA-Krümmung, die dann weitere Protein-Besetzungen ermöglichen kann. Bei steigender Temperatur wird die DNA gestreckt, die krümmungsabhängig gebunden Faktoren dissoziieren von dem Fragment ab und nur die Komplexe bleiben stabil, bei denen zusätzlich sequenzspezifische Interaktion erfolgen kann.

Mit den hier durchgeführten TGGE-Analysen kann nicht zwischen Strukturänderungen der Nukleinsäure oder des Proteins unterschieden werden, es wird aber die Mobilitätsänderung der Komplexe deutlich.

Zur Analyse der Komplexstabilität in Abhängigkeit der DNA-Struktur wurden Bindeansätze mit steigenden Mengen des Antibiotikums Distamycin versetzt. Dieses erkennt AT-reiche Regionen, bindet in die kleine Furche der DNA und überführt sie in eine gestreckte Konformation. Dadurch wird sowohl die intrinsische als auch die bindungsinduzierte Krümmung aufgehoben und der Doppelstrang rigider. Alle hier verwendeten Transkriptionsfaktoren wurden in ihrer Bindung beeinflusst und wiesen ein verändertes Bandenmuster in Anwesenheit von Distamycin auf. Allerdings verblieb der Großteil der markierten Fragmente in Komplexen und daraus kann man schließen, dass entweder die Distamycinkonzentration nicht ausreicht, die Bindung krümmungsunabhängig ist oder die Stabilität der Proteinbindung höher als die Distamycinaffinität ist. Alle Faktoren binden also mit einem gewissen Anteil, jedoch nicht ausschließlich krümmungsspezifisch. Der Einfluss der elektrostatischen Wechselwirkung müsste mit dem Polyanion Heparin oder anderen Ionen in Titrationsreihen getestet werden.

Die diskret auflösbaren, hochmolekularen Komplexe mit H-NS und StpA wurden durch Distamycin gestört und schmierten über die gesamte Spur. Der Komplex mit StpA ist weniger distamycinsensitiv. Die restliche schwache Wechselwirkung von H-NS könnte elektrostatischer Natur sein. Die einzelnen FIS- und LRP-Komplexe zeigten erneut unterschiedliche Sensitivität. Die hochbesetzten Komplexe waren sensitiver gegenüber Distamycin (und damit die Bindung krümmungsabhängiger) als die niedrigbesetzten Komplexe. Dies bedeutet, dass die niedrigbesetzten Komplexe von FIS und LRP krümmungsunabhängiger sind und/oder die Proteinbindung stabiler ist, aufgrund der zusätzlichen Sequenzspezifität.

Für FIS und LRP ist bekannt, dass sie mit Helix-Turn-Helix-Motiven die große Furche der DNA erkennen (Kostrewa *et al.* 1992; Wang and Syvanen 1992; Cui *et al.* 1995). Das genaue Strukturmotiv für die DNA-Bindung von H-NS und StpA ist jedoch unbekannt. Da Distamycin auf alle untersuchten Proteinkomplexe Effekte zeigt, unabhängig davon, ob

Distamycin vor- oder nachgelegt wurde, kann gefolgert werden, dass die NAPs nicht mit Distamycin um die kleine Furche konkurrieren, sondern mit der großen Furche interagieren.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass das verwendete Fragment F Δ_{76-189} nicht intrinsisch gekrümmt vorliegt, aber flexibel ist und durch Proteinbindung eine Veränderung der DNA-Struktur erlaubt. Durch den Einfluss von steigender Temperatur und Distamycin kann die proteininduzierte Krümmung aufgehoben werden, wobei die Temperatur auch auf die Proteinstruktur selber einwirkt. Die hier untersuchten Transkriptionsregulatoren, die eine Tendenz zur Bindung an gekrümmte DNA haben, interagieren auch mit ungekrümmter, aber flexibler DNA. Diese Bindung an die 6S RNA *upstream* Region ist daher nicht unspezifisch, sondern passt zu der Spezifität und den Bindeeigenschaften dieser pleiotropen Regulatoren.

3.1.4 Vergleich der *ssrS*-Promotornutzung unter Einfluss von verschiedenen Regulatoren *in vitro* und *in vivo*

Um den Einfluss der beiden *ssrS*-Promotoren, sowie die Wirkung der NAPs auf die Expression der 6S RNA aufzuklären, wurden *in vitro* Transkriptionen durchgeführt (Abbildung 2.14). Damit ist es möglich, die direkte Wirkung von Einzelkomponenten, wie verschiedenen Holoenzymen oder Transkriptionsfaktoren, auf die Transkriptionsreaktion einzelner Promotoren zu studieren. Erwartungsgemäß transkribiert das E σ^{70} -Holoenzym von beiden *ssrS* Promotoren, wobei die Haupttranskriptmenge vom P1 stammt. Dagegen werden Produkte mit dem E σ^{38} -Holoenzym nahezu vollständig vom P2 Promotor aus gebildet. Die entstehenden Transkriptmengen stehen in guter Übereinstimmung mit den *in vivo* gemessenen Promotorstärken (Abbildung 2.16). Die gefundene σ -Faktorspezifität der beiden *ssrS*-Promotoren stimmt mit den publizierten Beobachtungen überein (Kim and Lee 2004). Allerdings zeigt bei *in vitro* Transkriptionen mit dem E σ^{70} -Holoenzym der *ssrS* P1 Promotor nur eine ~ 3 -fach und bei *in vivo* Messungen in der logarithmischen Phase (OD₆₀₀ = 0,5) eine etwa 5-fach höhere Aktivität als der P2 (Kim and Lee 2004). Die Effizienz der für beide *in vitro* Systeme E σ^{70} und E σ^{38} einzeln isolierten Komponenten ist nicht direkt vergleichbar. Die unterschiedliche Spezifität der beiden Promotoren trägt wahrscheinlich zur 6S RNA-Synthese unter diversen Wachstumsbedingungen bei.

Wie in Abbildung 2.6 gezeigt, können die in unterschiedlichen Regulationsnetzwerken involvierten Transkriptionsfaktoren FIS, H-NS, LRP und StpA mit den regulatorischen Regionen der beiden *ssrS* Promotoren P1 und P2 spezifische Bindungen eingehen. *In vitro* Transkriptionen mit den $E\sigma^{70}$ - und $E\sigma^{38}$ -Holoenzymen mit steigenden Konzentrationen der Regulatoren wurden durchgeführt, um deren funktionellen Einfluss auf die Expression des *ssrS*-Gens und damit auf die Synthese der 6S RNA zu untersuchen (Abbildung 2.14).

H-NS reguliert Gene, die an Stress und wachstumsphasenabhängiger Adaption beteiligt sind (Schröder and Wagner 2002), weswegen H-NS als möglicher *ssrS*-Regulator in Betracht kommt. Beispielsweise führt eine Überexpression von H-NS zu einer künstlich ausgelösten stationären Phase (McGovern *et al.* 1994). In der *hns*-Deletionsmutante wird die 6S RNA in der stationären Phase dereprimiert (Abbildung 2.3). *In vitro* bindet H-NS an die regulatorische Region des *ssrS*-Gens und inhibiert leicht die Transkription (Abbildung 2.6 und Abbildung 2.14). Diese negative Regulation *in vivo* und *in vitro* der 6S RNA-Synthese stimmt mit der Tatsache überein, dass H-NS meist als Repressor wirkt. Dies erklärt allerdings nicht die Zunahme der Expression der 6S RNA, da H-NS in der stationären Phase sein Expressionsmaximum hat und die Transkription der 6S RNA hemmt. H-NS kann auf andere Regulatoren Einfluss nehmen und z. B. eine FIS-abhängige Aktivierung aufheben.

Auch StpA inhibiert die *in vitro* Transkription von beiden *ssrS*-Promotoren. Diese Inhibierung ist stärker als für H-NS und korrespondiert gut sowohl mit den Bindungsaffinitäten der beiden Proteine an die *upstream*-Region des *ssrS*-Gens als auch mit der Tatsache, dass vergleichbare Effekte für mehrere Promotoren gezeigt werden konnten (Schröder and Wagner 2002). StpA ist das Homolog zu H-NS und kann in manchen, aber nicht in allen Fällen die Funktion von H-NS übernehmen (Sonden and Uhlin 1996; Williams *et al.* 1996; Williams and Rimsky 1997). Dies erklärt die *in vivo* Analysen, bei denen kein Effekt auf die 6S RNA-Akkumulation in dem *stpA*-Deletionstamm gefunden wurde. Im umgekehrten Fall konnte StpA das Fehlen von H-NS nicht kompensieren. Diese Beobachtung kann durch die *in vivo* viel geringere Konzentration von StpA im Vergleich zu H-NS erklärt werden (Sonnenfield *et al.* 2001). Es konnte gezeigt werden, dass H-NS und StpA Heterodimere bilden können (Sonden and Uhlin 1996; Williams *et al.* 1996; Williams and Rimsky 1997; Wolf *et al.* 2006), wodurch eine weitere Dimension der möglichen

Genregulation durch diese beiden Proteine hinzukommt und die Komplexität der untersuchten Netzwerke verdeutlicht.

LRP ist bekannt als Regulator, der die Transkription an die Qualität des vorherrschenden Nahrungsangebots anpassen kann. Dabei wirkt LRP sowohl als Aktivator als auch als Repressor (Cui *et al.* 1996). Beim Fehlen von LRP kommt es zu einer Derepression der 6S RNA-Konzentration in der stationären Phase (Abbildung 2.3). Die beobachtete Bindung von LRP an die regulatorische Region des 6S RNA-Gens passt gut mit den beiden vorhergesagten Konsensussequenzen (Abbildung 2.62.2.2.6) und der effektiven Inhibierung der Transkription der beiden *ssrS*-Promotoren *in vitro* (Abbildung 2.14) zusammen. Die hochmolekularen Komplexe aus den Bindungsanalysen lassen weitere Bindestellen in der regulatorischen *ssrS*-Region vermuten und stimmen mit der Eigenschaft von LRP überein, hochmolekulare DNA-Protein-Komplexe eingehen zu können (Pul *et al.* 2007). Die *footprint*-Analysen zeigen überlappende Bindestellen von LRP und FIS und lassen eine antagonistische Wirkungsweise dieser beiden Proteine vermuten. Beispiele für solche Kompetitionen um überlappende Bindestellen sind bekannt (Falconi *et al.* 1996; Afflerbach *et al.* 1999) und könnten durch kompetierende Bindestudien oder weitere Doppelmutanten analysiert werden.

FIS ist vor allem als Aktivator in der logarithmischen Phase bekannt und benötigt dafür einen bestimmten Abstand der Bindestelle *upstream* zum Kernpromotor (Zacharias *et al.* 1992; Bokal *et al.* 1997). Wenn FIS Gene negativ reguliert, findet sich die Bindestelle meist im Promotorbereich selber oder *downstream* davon. Diese Beobachtung stimmt mit den *footprint*-Analysen und den *in vitro* Transkriptionen sehr gut überein und erklärt den gegensätzlichen Effekt von FIS auf die beiden *ssrS*-Promotoren. Dabei wird die Transkription des $E\sigma^{70}$ -Holoenzym durch FIS leicht aktiviert, während mit dem $E\sigma^{38}$ -Holoenzym der *ssrS* P2 inhibiert und der P1 aktiviert wird (Abbildung 2.14). Diese duale Regulation durch FIS lässt sich sehr anschaulich durch die beschriebene Lage der Bindestellen an den *ssrS*-Promotorbereichen erklären. Die beobachtete differentielle Regulation der *ssrS*-Promotoren und die mögliche antagonistische Wirkungsweise mit LRP lassen eine komplexe Regulation vermuten und deuten daraufhin, dass die *in vivo* beobachtete Derepression in der stationären Phase ein indirekter Effekt ist. Es ist aber durchaus denkbar, dass FIS unter bestimmten Wachstumssituationen einen Beitrag zur Akkumulation der 6S RNA leistet. Dabei ist

anzunehmen, dass FIS für die hohe Zahl von 1000 6S RNA-Molekülen pro Zelle in der exponentiellen Phase mitverantwortlich ist. Weiterhin ist eine direkte Regulation durch Einflussnahme auf die Expression der Sigmafaktoren möglich und dadurch auf die selektive Nutzung der *ssrS*-Promotoren P1 und P2. So könnten beispielsweise in der stationären Phase die wenigen vorhandenen FIS-Moleküle ausreichen, um die Repression vom σ^{38} -abhängigen Holoenzym am *ssrS* P2 zu gewährleisten. Allerdings zeigen die *in vivo* Experimente (Abbildung 2.17) mit der *fis*-Deletionsmutante und den *cat*-Konstrukten einen Einfluss von FIS auf die Expression der *ssrS*-Promotoren in der stationären Phase. Eine weitere Bedeutung der FIS-Regulation könnte darin liegen, dass in der logarithmischen Phase bei hoher FIS-Konzentration in der Zelle die 6S RNA-Synthese der σ^{38} -abhängige *ssrS* P2 Promotor nicht benutzt wird, auch wenn RpoS stressabhängig induziert werden sollte (z. B. Osmoschock). Es ist ebenfalls denkbar, dass FIS eine regulierende Rolle bei sich plötzlich verbessernden Bedingungen spielt. Dies könnte mit den in dieser Arbeit konstruierten *cat*-Fusionsplasmiden untersucht werden.

Die sehr wahrscheinlich direkten Effekte von H-NS, StpA und LRP, sowie die weniger wahrscheinlichen Einflüsse von FIS auf die Expression der 6S RNA bilden nicht nur ein Netzwerk der Wachstumsphasenregulation, sondern koppeln die 6S RNA-Synthese außerdem an unterschiedliche Stressbedingungen und wechselnde Umwelteinflüsse.

Genomweite *in vivo* Analysen von Bindestellen verschiedener Nukleoid-assoziiierter Proteine beschreiben das komplexe Netzwerk dieser Regulatoren (Grainger *et al.* 2006). Die angehangenen Daten zeigen eine signifikante FIS-Bindung an den *upstream* Bereich des *ssrS*-Gens. Die Funktion der 6S RNA verbirgt sich im Zusammenspiel dieses globalen Netzwerkes, in dem viele Regelkreise ineinander greifen. Daraus ergibt sich eine hochkomplexe und konzertierte Regulation der 6S RNA, abgestimmt auf die jeweilige Wachstumsphase und die vorherrschenden Umweltbedingungen, mit dem Ziel einer ausbalancierten 6S RNA-Konzentration.

3.1.5 Autoregulation der 6S RNA

Die 6S RNA-Promotorspezifität wurde von Cavanagh *et al.* mittels *microarray*-Analysen untersucht (Cavanagh *et al.* 2008). Dabei kristallisierten sich zwei Bedingungen heraus, die für die Vorhersage eines 6S RNA sensitiven Promotors von Bedeutung sind. Einmal ist die Anwesenheit einer *extended* -10-Region wichtig und zum anderen eine schwache -35-Region im Vergleich mit der Konsensussequenz σ^{70} -abhängiger Promotoren. Der *ssrS* P1 Promotor besitzt eine *extended* -10-Region (Abbildung 3.1) und wird als 6S RNA sensitiv vorhergesagt, im Gegensatz zu dem P2 Promotor, der keine der beiden Kriterien erfüllt. Aufgrund der vorhandenen *extended* -10-Region und der postulierten σ -Faktorabhängigkeit der beiden Promotoren wurde bereits eine Autoregulation der 6S RNA vermutet (Kim and Lee 2004).

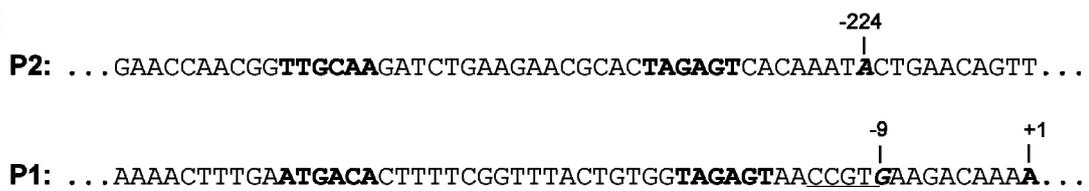


Abbildung 3.1: Die Promotorsequenzen der *ssrS* P1 und P2 Promotoren.

Gezeigt werden die Kernpromotorsequenzen für die *ssrS* Promotoren P1 und P2, wobei die -10 und -35 Regionen fett geschrieben und die Transkriptionsstartpositionen -9 und -224 markiert sind. Das Nukleotid des 5'-Endes der reifen 6S RNA ist fett als +1 eingezeichnet und die eine putative GC-reiche Diskriminatorsequenz ist unterstrichen.

Bei *in vitro* Transkriptionsanalysen wurde der Effekt der 6S RNA auf die Transkription der *ssrS*-Promotoren untersucht. Hierbei stellte sich heraus, dass die 6S RNA ihre eigene Synthese direkt beeinflussen kann. Überraschenderweise war die Inhibierung für beide Promotoren im homologen System ähnlich (Gildehaus 2005).

In dieser Arbeit wurden die *in vivo* Transkriptionsraten der beiden *ssrS*-Promotoren des Wildtyps und der *ssrS*-Deletionsmutante mit den *cat*-Fusionskonstrukten gemessen. Hierbei stellte sich heraus, dass sowohl der P1 als auch der P2 Promotor bei Abwesenheit der 6S RNA in der stationären Phase dereprimiert, also stärker exprimiert, wird. Diese relative

Verstärkung ist im Fall des σ^{38} -abhängigen P2 Promotors sogar noch höher, wobei der absolute Anteil des *ssrS* P1 Promotors an der 6S RNA-Transkription sehr viel größer ist. Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass den Nukleoid-assoziierten Proteinen die 6S RNA selber auch die Fähigkeit der Regulation des *ssrS-ygfA*-Operons besitzt und damit in der Lage ist, ihre eigene Synthese mitzuregulieren. Eine solche direkte *feedback*-Regulation der 6S RNA deutet darauf hin, dass bei zu hohen Expressionsniveaus die eigene Neusynthese sehr schnell reprimiert werden kann.

3.1.6 Wird die 6S RNA stringent reguliert?

Eines der einschneidendsten und schnellsten regulatorischen Netzwerke in Bakterien ist die Stringente Kontrolle. Sie wird bei Aminosäuremangel durch nicht aminoacylierte tRNAs hervorgerufen und am Ribosom ausgelöst. Es folgt eine schnelle Synthese von hohen ppGpp-Konzentrationen im millimolaren Bereich durch das ribosomassoziierte Protein RelA. Zusammen mit seinem synergistisch wirkenden Koaktivator DksA inhibiert ppGpp in erster Linie die Synthese der stabilen ribosomalen RNAs. Dabei wird ppGpp im aktiven Zentrum des offenen Komplexes der RNA-Polymerase mit der *coil coiled*-Domäne von DksA und Mg^{2+} -Ionen koordiniert. Gleichzeitig werden beispielsweise Gene der Aminosäuresynthese oder der Proteolyse direkt oder indirekt aktiviert (Magnusson *et al.* 2005). Wie eine direkte Aktivierung mechanistisch abläuft, ist noch unverstanden.

Beim Vergleich der Promotorregionen von negativ stringent regulierten Genen in *E. coli* stellte sich heraus, dass es eine konservierte GC-reiche Sequenz zwischen der -10 Region und der Transkriptionsstartstelle gibt. Dieses sogenannte Diskriminatorelement (GCGC) ist ein notwendiges, aber nicht ausreichendes Element für die Stringente Kontrolle von negativ regulierten Genen (Travers 1980; Zacharias *et al.* 1989). Der σ^{38} -abhängige *ssrS* P2 Promotor zeigt keine GC-reiche Sequenz, während der σ^{70} -abhängige P1 Promotor eine solche GC-reiche Region (CCGTG, siehe Abbildung 3.1) aufweist, die als Diskriminatorelement wirken könnte. Allerdings schließt sich dieser Bereich nicht direkt an die -10 Region an, sondern ist durch zwei Adenine getrennt. Es ist bekannt, dass H-NS und StpA das Netzwerk der Stringenten Kontrolle mit beeinflussen (Johansson *et al.* 2000). Die meisten Gene der stabilen RNAs (tRNAs und rRNAs) werden typischerweise stringent reguliert, wohingegen

für die 6S RNA angenommen wird, dass sie nicht unter Stringenter Kontrolle steht (Ikemura and Dahlberg 1973; Hsu *et al.* 1985). Unter stringenten Bedingungen *in vivo* nimmt die 6S RNA im Verhältnis zur 5S RNA sogar zu (Ikemura and Dahlberg 1973).

Um Klarheit über eine Beteiligung der Stringenten Kontrolle bei der 6S RNA-Expression zu erhalten, wurde die Wirkung der verantwortlichen Effektoren auf die *ssrS*-Transkription in einem direkten und funktionellen Test untersucht. Hierzu wurden *in vitro* Transkriptionen in Gegenwart von DksA, hohen ppGpp-Konzentrationen und in Kombination mit beiden Effektoren durchgeführt. Während der negativ stringent regulierte *rrnB* P1 Promotor, der als Kontrolle diente, nahezu komplett gehemmt wurde, ist kein klarer inhibitorischer Effekt von ppGpp, DksA oder beiden zusammen auf die Transkription der *ssrS* Promotoren zu erkennen (Abbildung 2.14). Folglich werden *in vitro* das *ssrS*-Gen und wahrscheinlich auch das *ygfA*-Gen nicht stringent reguliert. Dies ist in guter Übereinstimmung mit der Annahme, dass auch *in vivo* keine Stringente Kontrolle des *ssrS*-Gens erfolgt (Ikemura and Dahlberg 1973; Hsu *et al.* 1985). Daraus kann geschlossen werden, dass beide Gene nicht direkt an die Aminosäureregulation gekoppelt sind. Es ist aber anzunehmen, dass die Regulation in Abhängigkeit von Aminosäuren komplizierter ist, da beispielsweise Leucin als Effektor von LRP durchaus Einfluss auf die 6S RNA-Expression nehmen kann. Es sollte außerdem erwähnt werden, dass die hier durchgeführten Experimente zur Stringenten Kontrolle nicht ausschließen, dass durch basale Änderungen der ppGpp-Konzentration (zwischen 10 und 80 μM) eine wachstumsratenabhängige Kontrolle der 6S RNA-Transkription trotzdem möglich ist. In diesem Konzentrationsbereich korreliert die Wachstumsrate linear invers zur ppGpp-Konzentration (Baracchini and Bremer 1988; Zacharias *et al.* 1989).

3.2 Globale Effekte durch das Fehlen der 6S RNA

Viele kleine, nicht kodierende RNAs erfüllen wichtige regulatorische Funktionen bei der Anpassung an veränderte Umwelt- oder Wachstumsbedingungen (Storz *et al.* 2005). Sie sind dafür prädestiniert, weil sie vergleichsweise schnell und ökonomisch synthetisiert werden, ohne dass dafür weitere Translationsschritte notwendig sind.

Die meisten regulatorischen RNAs üben ihre Funktion post-transkriptionell aus, im Gegensatz dazu wirkt die 6S RNA auf Transkriptionsebene. Sie bindet bevorzugt an das $E\sigma^{70}$ -Holoenzym und soll dadurch die σ^{70} -abhängige Transkription in der stationären Phase herunterregulieren, in dem ein offener DNA-Promotor mimikriert wird (Wassarman and Storz 2000; Barrick *et al.* 2005). Allerdings stimmt dieser Zusammenhang nicht für alle untersuchten Promotoren (Trotochaud and Wassarman 2006; Gildehaus *et al.* 2007). Vor allem *extended* -10-Promotoren gelten als sensitiv für die 6S RNA (Trotochaud and Wassarman 2004).

In jüngster Zeit wurde postuliert, dass die Anwesenheit einer *extended* -10-Region oder ein schwaches -35-Element einen 6S RNA-sensitiven Promotor definieren (Cavanagh *et al.* 2008). Die Auswertung dieser DNA-Chip-Analysen wurde jedoch auf die σ^{70} -abhängigen Promotoren beschränkt (Mitchell *et al.* 2003). In der vorliegenden Arbeit wurde mittels *microarray*-Analysen das gesamte Transkriptom des Wildtyps und der *ssrS*-Deletionsmutante verglichen, um zu untersuchen, welche Veränderungen durch die 6S RNA in der bakteriellen Zelle hervorgerufen werden. Allerdings befanden sich auf dem DNA-Chip keine DNA-Oligonukleotide, die eine Detektion der stabilen rRNAs oder der kleinen regulatorischen RNAs, wie beispielsweise DsrA, CsrB, MicF, OxyS, RhyB, Spot 42 oder 6S RNA selber, erlauben würden.

Die Liste der Gene, die entweder erhöht oder verringert in der *ssrS*-Deletionsmutante vorlagen, lässt sich in funktionelle Gruppen einteilen (Tabelle 2.3 und Tabelle 2.4). Diese Zuordnung ist nicht immer völlig eindeutig, da z. B. der Oligopeptidtransporter *oppF* auch in die Gruppe Aminosäuremetabolismus hätte eingeteilt werden können. In wenigen Fällen sind die mRNA-Level von Genen, die in gemeinsamen Operons liegen und von den gleichen Promotoren kontrolliert werden, in der *ssrS*-Deletionsmutante in der gleichen Richtung verändert. Dies könnte erwartet werden, da die Synthese der koexprimierten Gene gleich sein sollte. Eine solche Korrelation ist aber bei der Mehrheit nicht zu finden und deutet darauf hin, dass die mRNAs unterschiedliche Lebensdauer besitzen. Diese kann durch die Struktur der RNA bestimmt sein oder durch aktiven Abbau erfolgen.

An den ermittelten Kandidatengen ist vor allem augenscheinlich, dass viele eine Verbindung zu Stress oder Änderung der Umweltbedingungen aufweisen. Dazu zählen, neben

den klassischen Stressarten für ein Bakterium, wie Mangel an bestimmten Nährstoffen, hohe Osmolarität oder ungünstige Temperatur, auch Wirtswechsel oder Abwehr gegen das Immunsystem. Auf alle Einflüsse reagieren Bakterien durch eine veränderte Nutzung ihres genetischen Potentials. Dazu gehört auch die 6S RNA, bei deren Fehlen in der stationären Phase es zu einer Veränderung der globalen Stressantwort kommt, bei der stressabhängige Gene sowohl aktiviert als auch gehemmt werden. Im Folgenden werden die durch das Fehlen der 6S RNA veränderten Gene kurz vorgestellt und ihre Funktion bei der Stressantwort erläutert.

Zu den Genen die in Abwesenheit der 6S RNA verändert sind (siehe Tabelle 2.3 und 2.4), gehören *uspE* und *uspA*, die für eine allgemeine Stressantwort mitverantwortlich sind. Das Fehlen beider Proteine führt zu einem komplexen Phänotyp. Sie sind unter anderem bei der Flagellensynthese, Mobilität, Zellaggregation und Adhäsion an Wirtszellen beteiligt (Siegele 2005). Der Transkriptionsaktivator der Flagellensynthese FlhD greift hier ebenfalls ein (Pruss *et al.* 1997). Weiterhin besitzt Hha als Modulator der Genexpression Einfluss auf Virulenzfaktoren wie Hämolysin und auf die Biofilmbildung (Balsalobre *et al.* 1999; Barrios *et al.* 2006). Neben Hha sind auch SlyA und LysR in die Pathogenität von Bakterien involviert. SlyA fungiert dabei als Transkriptionsaktivator von Virulenzgenen wie Hämolysin in dem Enterobakterium *Salmonella enterica serovar typhimurium* und gilt als potentieller Faktor für enteroinvasive *E. coli* (EIEC)(Spory *et al.* 2002). Die Familie der LysR-Regulatoren spielt ebenfalls eine Rolle bei der Pathogenität der enterohämorrhagischen und enteropathogenen *E. coli* (EHEC und EPEC)(Heroven and Dersch 2002). Außerdem besitzen Hha und Vertreter der LysR-Familie einen Einfluss auf Quorum sensing (Sperandio *et al.* 2002; Barrios *et al.* 2006). Dies ist interessant, da in DNA-Chip-Untersuchungen gezeigt wurde, dass das mit der 6S RNA kotranskribierte Gen *ygfA* bei der Biofilmbildung signifikant induziert wird (Ren *et al.* 2004). Diese Beispiele verdeutlichen, dass die Zellmembran neben dem Transport von Stoffen und der Reizweiterleitung eine zentrale Rolle bei Stress einnimmt. Weiterhin werden Gene in Abwesenheit der 6S RNA differentiell reguliert, die bei der Wachstumsphasenregulation und Stress (*osmC*, *uspA*), sowie bei bestimmten Nahrungssituationen (*fnr*, *tauA*, *uspA*) involviert sind (Gordia and Gutierrez 1996; van der Ploeg *et al.* 2001; Kang *et al.* 2005; Siegele 2005).

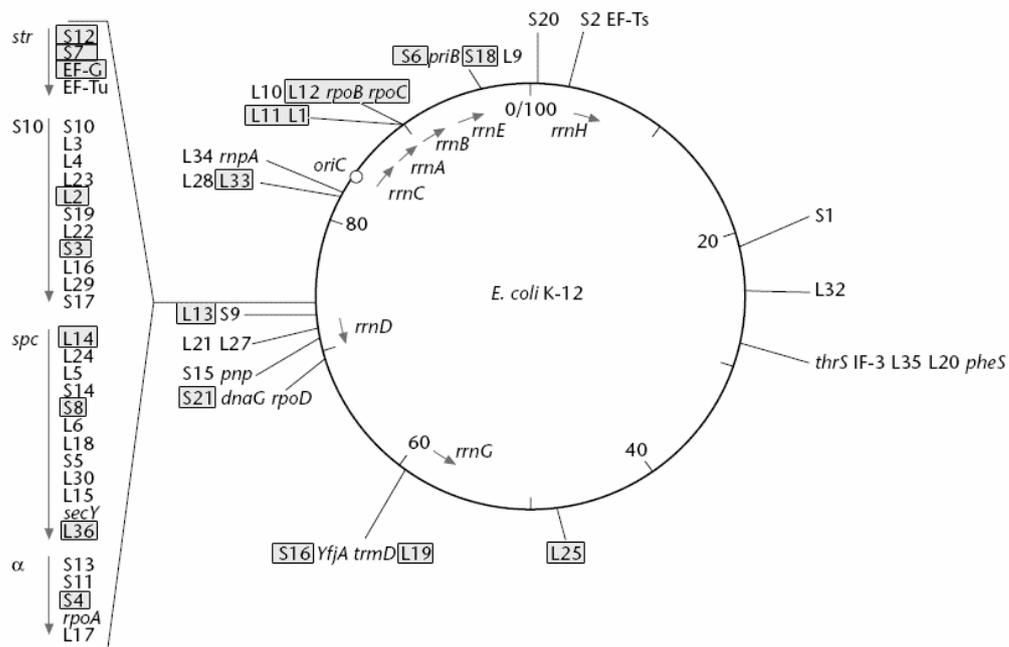


Abbildung 3.2: Lage und Organisation der ribosomalen Bestandteile auf dem *E. coli* Chromosom.
 Die Transkriptionseinheiten der ribosomalen RNAs sind innerhalb und die der ribosomalen Proteine außerhalb des schematischen Chromosoms angegeben. Mit grauen Kästchen sind die ribosomalen Proteine gekennzeichnet, die bei den Transkriptomanalysen in der *ssrS*-Deletionsmutante signifikant reduziert waren (Tabelle 2.4) (Wagner 2001).

Von den insgesamt 42 in der Mutante verringerten Genen befinden sich 24 Gene in Operons für ribosomale Proteine (Tabelle 6.5). Anscheinend wird durch das Fehlen der 6S RNA die globale Translation beeinflusst, weswegen hierauf das Hauptaugenmerk gelegt werden soll.

Die Verteilung der Transkriptionseinheiten der ribosomalen Proteine (rProteine) im *E. coli*-Genom ist in Abbildung 3.2 dargestellt (Wagner 2001). In rProtein-Operons, in denen mehr als zwei rProteine kodiert sind, gibt es meist rProteine für die kleine und die große ribosomale Untereinheit. In den Operons für die rProteine werden z. B. auch nicht-ribosomale Translationsfaktoren und RNA-Polymerase-Untereinheiten kotranskribiert. Bei niedriger Translationseffizienz erfolgt verstärkter Abbau der rProtein mRNAs. Außerdem wird die Translation der rProteine untereinander gekoppelt, um eine gleichmäßige Expression zu gewährleisten. Zum Beispiel kann das ribosomale Protein L4 sowohl an die 23S rRNA als

auch in schwächerem Maße an die *leader*-Region des eigenen S10-Operons binden (Abbildung 3.3). Bei einem Überschuss an L4 erfolgt die Bindung an den 5'-Bereich der rProtein mRNA, wodurch die Translation reprimiert wird und weiterhin bei gerade transkribierten mRNAs die Bildung einer Rho-unabhängigen Terminationsstruktur ermöglicht und damit die Transkription beendet wird. Die Expression der ribosomalen Proteine ist folglich sehr komplex und auf mehreren Ebenen reguliert.

Wieso kommt es beim Fehlen der 6S RNA in der stationären Phase zu einer Verringerung der mRNA-Level der rProteine? Zur Beantwortung dieser Frage werden im Folgenden mehrere Möglichkeiten diskutiert.

Wie bereits erwähnt, kann der mRNA-Spiegel durch die Summe der Synthese und des Abbaus gesteuert werden. Die denkbar einfachste und direkteste Erklärung wäre, dass die 6S RNA direkt die Transkription der rProtein mRNA aktiviert und deswegen die Neusynthese in der Mutante verringert ist. Dies ist aber unwahrscheinlich, da es keine Erklärung gibt, weshalb nur die Promotoren der rProteine reguliert werden sollten.

Eine weitere mögliche Ursache ist eine Umverteilung der RNA-Polymerase. Wenn in der stationären Phase die $E\sigma^{70}$ -Holoenzyme nicht durch die 6S RNA inhibiert werden, wird die Transkription der rRNA-Operons, die $\approx 80\%$ der transkribierenden RNA-Polymerase umfassen kann (Wagner 2000), nicht gehemmt und läuft im Vergleich zum Wildtyp verstärkt ab. Dadurch könnten bei Abwesenheit der 6S RNA weniger RNA-Polymerasen für die rProtein-Operons frei sein und deren mRNA-Neusynthese verringert ausfallen. Dieses Modell stimmt gut mit der angenommenen Funktion der 6S RNA überein, benötigt jedoch als Schlüsselexperiment eine Analyse der Promotorstärke der ribosomalen RNA-Operons. Wenn in der *ssrS*-Deletionsmutante die Transkription der rRNA Promotoren stärker abläuft als im Wildtyp, wäre dies ein guter Hinweis für die Richtigkeit der Hypothese.

Weiterhin kann der Effekt auf eine erniedrigte Translationseffektivität der rProtein mRNA zurückzuführen sein, wodurch es zu einem verstärkten Abbau kommt. Dies könnte aufgrund des veränderten Translationsapparates bei 6S RNA-Abwesenheit erfolgen, ist allerdings nicht sehr wahrscheinlich.

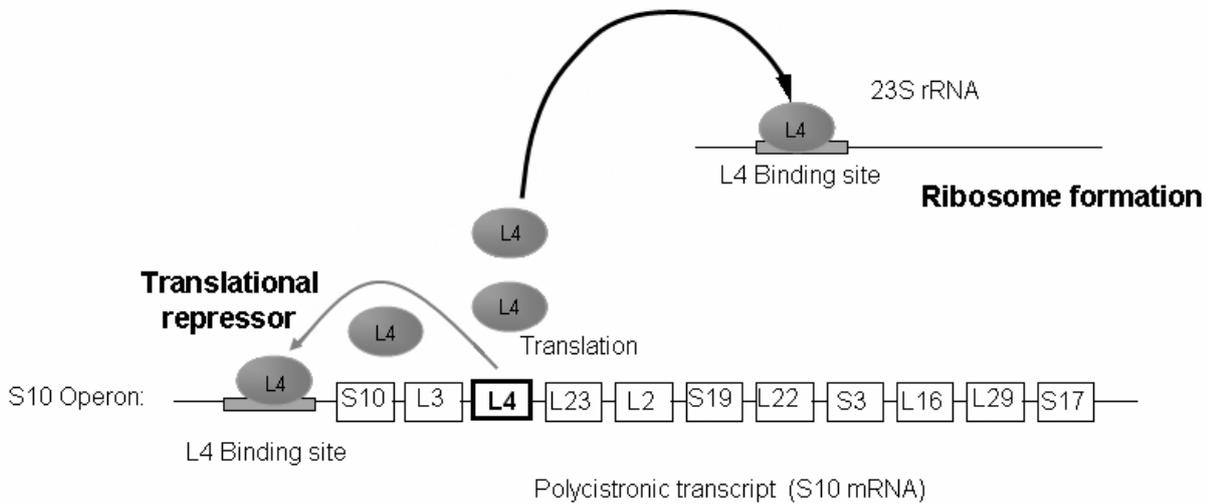


Abbildung 3.3: Translationale Rückkopplung durch das ribosomale Protein L4

Das ribosomale Protein L4 aus dem S10-Operon bindet bei einem Überschuss der 23S rRNA an diese zur Ribosomenassemblierung und die Translation des S10-Operons läuft weiter. Bei einem Überschuss an L4 interagiert es mit dem 5'-Ende der eigenen mRNA, wodurch die Translation gehemmt wird.

Außerdem ist denkbar, dass es durch Konzentrationserhöhung der freien ribosomalen Proteine zur *feedback* Inhibierung auf Translationsebene kommt und dadurch mRNA verstärkt abgebaut wird (Cole and Nomura 1986). Eine Erhöhung der freien rProteine könnte durch einen verstärkten *turnover* der Ribosomen in der 6S RNA-Mutante hervorgerufen werden. Hierbei könnten die Ribosomen als Sensor für zellulären Stress fungieren und gezielt abgebaut werden. Bekannt ist eine ähnliche Regulation für Ribosomen, die unter Kälteschock formiert wurden. Solche instabile Ribosomen werden abgebaut, um die Zelle so vor defekten Ribosomen bzw. fehlerhafter Translation zu schützen (VanBogelen and Neidhardt 1990).

Generell passt die verringerte Expression der RNA-Polymerase-Untereinheiten β und β' zu der Annahme, dass die Zelle in Abwesenheit der 6S RNA weniger freie RNA-Polymerasen benötigt und deswegen ihre Synthese drosselt. Es ist denkbar, dass die rProteine, da sie koexprimiert werden, nur 'Trittbrettfahrer' der Regulation der RNA-Polymerase sind, deren Konzentration entscheidend ist beim Fehlen der 6S RNA. Dies setzt voraus, dass die Zelle die Konzentration ihrer freien RNA-Polymerase wahrnehmen kann. Dagegen spricht jedoch die

Inhibierung von ribosomalen Proteingenen, die nicht mit Genen der RNA-Polymerase kotranskribiert werden.

Die durchgeführten Proteomanalysen konnten keinen Aufschluss über ein verändertes Gesamt-Proteinmuster geben. Dennoch kann vermutet werden, dass das Fehlen der 6S RNA einen geringen Einfluss auf das Proteom besitzt. Dies stimmt überein mit der Beobachtung, dass die *ssrS*-Deletionsmutante keinen ausgeprägten Phänotyp aufweist. Viele wichtige Regulatoren, wie FIS oder H-NS, zeigen keinen auffälligen Phänotyp der betreffenden Deletionsmutante unter normalen Laborbedingungen in Vollmedium, da sie spezialisiert für eine bestimmte Situation sind. Erst bei Auslösung des entsprechenden Stresses kommt meist der Nachteil der Mutante zum Vorschein. Ähnlich ist es mit der 6S RNA, für die der entscheidende Funktionsauslöser noch nicht gefunden zu sein scheint. Vermutlich ist die 6S RNA bei der Kompensation von Stressfaktoren involviert. Einen Hinweis auf einen bestimmten Auslöser gibt die Beobachtung, dass bei osmotischem Stress anscheinend mehr 6S RNA-Moleküle mit der β -Untereinheit der RNA-Polymerase wechselwirken und koimmunopräzipitieren, als unter stationären Bedingungen (Windbichler *et al.* 2008). Es ist auch denkbar, dass eine bestimmte Kombination von verschiedenen Stressarten entscheidend für einen offensichtlichen 6S RNA-Phänotyp ist. Andererseits kann es sein, dass die Funktion der 6S RNA darin besteht, die gesamte Transkription in der stationären Phase zu dämpfen und ein schnelles Umschalten bei verbesserten Bedingungen zu ermöglichen. Dabei kann die 6S RNA einer von mehreren Regulatoren sein, die in die gleiche Richtung wirken. Beispielsweise könnte in der *ssrS*-Deletionsmutante der σ^{70} -spezifische Antisigmafaktor Rsd die Funktion der 6S RNA übernehmen. So ist es für die Zelle möglich, bei dem Ausfall eines Regulators einen alternativen Regulationsweg zu beschreiben. Es ist eine Vielzahl von Beispielen dafür bekannt, dass wichtige Funktionen in der Zelle mehrfach, auf die Situation angepasst, reguliert werden können.

3.3 Die 6S RNA wird unter *upshift*-Bedingungen schnell abgebaut

Die metabolische Stabilität der 6S RNA ist außergewöhnlich und in dieser Arbeit bestätigt worden (Abbildung 2.1). Es stellt sich die Frage, welcher biologische Sinn sich dahinter verbirgt. In der stationären Phase liegen über 90% der 6S RNA-Moleküle im Komplex mit der σ^{70} -RNA-Polymerase vor (Wassarman and Storz 2000). Bei verbesserten Umständen und beim Umschalten in die exponentielle Wachstumsphase müssen diese inaktivierten RNA-Polymerasen wieder freigegeben und die Bindung an die 6S RNA aufgehoben werden. Dabei wäre es einfach und ökonomisch, die 6S RNA abzubauen. Ein solcher Abbau der 6S RNA müsste schnell vonstatten gehen und spezifisch sein, damit unmittelbar die neuzugänglichen Ressourcen verwerten werden können, um gegenüber anderen Organismen konkurrenzfähig zu sein. Vermutlich ist ein solcher Abbau aktiv, und es sollte keine passive und relativ langsame Verdünnung durch Zellteilung erfolgen.

In jüngster Zeit konnte in zwei Laboratorien unabhängig gezeigt werden, dass die *E. coli* DNA-abhängige RNA-Polymerase mit der 6S RNA in Abwesenheit von DNA *in vitro* Transkripte bilden kann (Wassarman and Saecker 2006). Diese *de novo* Transkripte haben eine Länge von 14 bis 24 Nukleotiden und entstehen bevorzugt bei erhöhten NTP-Leveln (>50 μ M) (Wassarman and Saecker 2006; Gildehaus *et al.* 2007). Weiterhin wurden lange Transkripte zwischen 170 und 220 Nukleotiden gefunden, über die noch wenig bekannt ist (Gildehaus 08). In Zellextrakten aus der stationären Phase konnte bei NTP-Zugabe die Entstehung der kurzen *de novo* Transkripte nachgewiesen werden, die zusammen mit der 6S RNA einen Komplex eingehen können (Wassarman and Saecker 2006). Die Bildung der 6S RNA-*de novo*-Transkript-Komplexe konnte nach *upshift* gezeigt werden und wird durch die Zugabe von Rifampicin gehemmt. In *Northern Blot*-Analysen nach *upshift* wird eine langsame Abnahme der 6S RNA postuliert, die nach zwei Stunden nahezu komplett abgebaut ist (Wassarman and Saecker 2006).

Dagegen konnte in dieser Arbeit der Verlauf der 6S RNA-Konzentration unmittelbar nach *upshift* gezeigt werden (Abbildung 2.1). Überraschenderweise ist bereits etwa 1 min nach *upshift* keine 6S RNA mehr nachweisbar. Die Diskrepanz der verschiedenen 6S RNA-

Konzentrationsverläufe könnte auf unterschiedliche *upshift*-Situationen zurückzuführen sein. Es ist weiterhin denkbar, dass in der Arbeit von Wassarman und Saecker das Zeitfenster (erst ab 5 min nach Verdünnung in frischem Medium) zu spät angelegt wurde, um den Abbau zu untersuchen und stattdessen schon die Neusynthese der 6S RNA gemessen worden war, die dann mit einsetzender Zellteilung langsam verdünnt wurde.

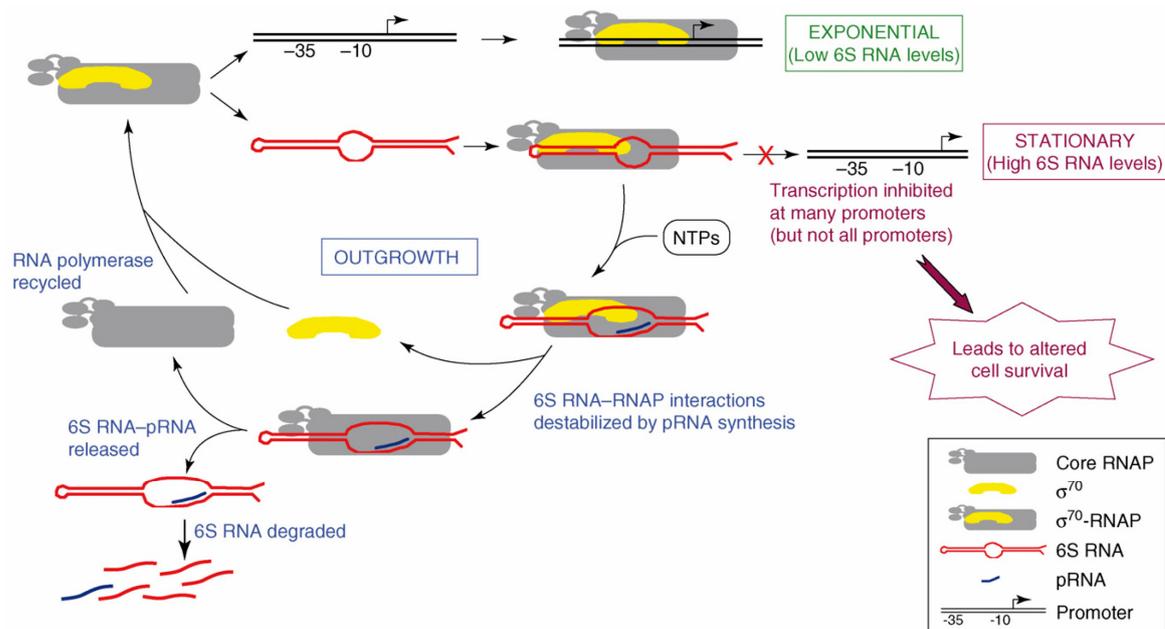


Abbildung 3.4: Funktionsmodell für die dynamische Wechselwirkung zwischen 6S RNA, Promotor und RNA-Polymerase in verschiedenen Wachstumsphasen.

In der exponentiellen Phase ist die 6S RNA-Konzentration in der Zelle niedrig und das σ^{70} -Holoenzym transkribiert die Haushaltsgene. Beim Übergang in die stationäre Phase mit steigenden 6S RNA-Mengen wechselwirkt sie mit der RNA-Polymerase, wodurch viele Promotoren inhibiert werden und die Genexpression verändert wird. Bei Verdünnung in frischem Medium (*outgrowth*) steigt der NTP-Spiegel, die 6S RNA-abhängige *de novo* RNA (pRNA) wird synthetisiert und σ^{70} kann abdissoziieren. Die 6S RNA mit dem *de novo* Transkript wird abgebaut und das Holo-Enzym steht wieder für die nächste Initiation zur Verfügung (Wassarman 2007).

Biologisch sinnvoller ist, dass die Reaktion auf verbesserte Nahrungsbedingungen äußerst schnell im Bereich von Minuten erfolgt, und dies wahrscheinlich auf eine direkte Abbaureaktion zurückzuführen ist, bei der vermutlich die 6S RNA selber oder der 6S RNA-*de novo*-Transkript-Komplex erkannt werden. Es scheint plausibel, dass die Polymerasen schnell und effektiv wieder freigesetzt werden müssen, um für die Transkription der unter verbesserten Bedingungen benötigten Haushaltsgene zur Verfügung zu stehen.

Überraschend ist das frühzeitige Einsetzen der Neusynthese der 6S RNA schon nach 10 min. Diese verläuft wahrscheinlich über den σ^{70} -abhängigen *ssrS* P1 Promotor, von dem allerdings kein Primärtranskript zu erkennen ist, da es eventuell unterhalb der Nachweisgrenze liegt. Es ist möglich, dass 10 min nach *upshift* die FIS-Konzentration ausreichend angestiegen ist, um für die 6S RNA-Synthese mitverantwortlich zu sein.

Diese Untersuchungen unterstützen das Modell der dynamischen Interaktion zwischen der 6S RNA, Promotor-DNA und der RNA-Polymerase in verschiedenen Wachstumsphasen (Abbildung 3.4)(Wassarman 2007). Allerdings scheint das Modell dynamischer zu sein als bisher angenommen. In der stationären Phase ist der überwiegende Teil der $E\sigma^{70}$ -Holoenzyme durch gebundene 6S RNA inaktiviert. Unter *upshift*-Bedingungen wird angenommen, dass bei steigenden Nukleotidkonzentrationen die 6S RNA-Polymerase-Wechselwirkung durch die Synthese der *de novo* RNA destabilisiert wird und σ^{70} sowie der 6S RNA-*de novo*-Transkript-Komplex von dem *core*-Enzym abdissoziieren. Dabei wird die 6S RNA vermutlich aktiv abgebaut. Durch die reduzierte 6S RNA-Konzentration können sich vermehrt transkriptionsaktive $E\sigma^{70}$ -RNA-Polymerasen bilden und die Transkription der nun benötigten Haushaltsgene übernehmen.

Es bleibt ungeklärt, ob der gestiegene NTP-Spiegel tatsächlich das Signal für die *de novo*-Transkript-Synthese ist. Weiterhin ist zu untersuchen, warum die 6S RNA im Laufe der exponentiellen Phase, in der die NTP-Konzentrationen hoch bleiben, stabil ist. Es ist denkbar, dass hierfür ein weiterer Faktor verantwortlich ist. Außerdem ist unklar, wie und wodurch der schnelle Abbau der 6S RNA erfolgt. Diesbezüglich könnten verschiedenen RNase-Deletionsstämme unter *upshift*-Bedingungen auf den Abbau der 6S RNA untersucht werden. Desweiteren ist von großem Interesse, wie schnell dies tatsächlich erfolgt. Außerdem ist die Regulation der 6S RNA-Neusynthese nach dem *upshift* von Bedeutung. Hierzu eignen sich die in dieser Arbeit hergestellten Fusionskonstrukte, die Aufschluss über die *ssrS* P1 bzw. P2 Promotornutzung in unterschiedlichen Deletionshintergründen geben können.

3.4 Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Regulation des *ssrS*-Gens in *E. coli* durch die Nukleoid-assoziierten Proteine in ein kompliziertes Netzwerk eingebunden ist, welches von der Wachstumsphase abhängig ist, aber auch von Stress oder veränderten Nahrungsbedingungen beeinflusst werden kann. Dies ist allerdings nur ein kleiner Bestandteil der globalen Regulation auf die 6S RNA und besonders wichtig während der *upshift*-Situation. Mit der 6S RNA gemeinsam wird das Protein YgfA exprimiert. Hier sollte analysiert werden, welche Funktion es erfüllt und warum die beiden Gene in einem Operon liegen.

Ebenfalls von Interesse ist die systematische Suche nach spezifischeren Phänotypen bei 6S RNA-Deletion oder -Überexpression. Hierzu würden sich z. B. osmotischer Schock oder andere Stressarten anbieten. Besonders interessant wäre dabei die Analyse einer *ssrS-rsd*-Doppelmutante, da der Antisigmafaktor Rsd möglicherweise als *backup*-System für die 6S RNA wirken kann.

Sowohl die Wirkung als auch die Funktion der 6S RNA sind mechanistisch noch nicht vollständig verstanden. Vor allem die promotorspezifische Wirkung der 6S RNA ist nach wie vor voller Widersprüche und bedarf Aufklärung. Auch die Stabilität des Moleküls muss analysiert werden, um zu klären, welches Signal für den Abbau verantwortlich ist und ob die Freisetzung der Polymerase durch die Synthese des *de novo*-Transkript erfolgt. Zusätzlich stellt sich die Frage, ob das *de novo*-Transkript *in vivo* gebildet wird und darüber hinaus eine biologische Aufgabe in der Zelle übernimmt.

4 Material

4.1 Allgemeines

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

4.2 Verwendete Bakterienstämme und Plasmide

4.2.1 *E. coli* Stämme

Tabelle 4.1: Übersicht über die verwendeten *Escherichia coli* Stämme, deren Genotypen und Referenzen.

Stamm	Genotyp	Referenz
HB 101	F ⁻ , <i>proA2</i> , <i>recA13</i> , <i>ara-14</i> , <i>lacY1</i> , <i>galK2</i> , <i>xyl-5</i> , <i>mtl-1</i> , <i>rpsL20</i> (Str ^r)	(Boyer and Roulland-Dussoix 1969)
XL-1-blue	<i>recA1</i> , <i>lac</i> ⁻ , <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> , <i>thi</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , [F ⁻ : <i>proAB</i> , <i>lac</i> ^{iq} , <i>lacZ</i> ΔM15, Tn 10]	(Stratagene)
MG1655	F ⁻ , λ ⁻ , <i>ilvG</i> ⁻ , <i>rfb-50</i> , <i>rph</i> ⁻¹	(Blattner <i>et al.</i> 1997)
MC4100	F ⁺ , <i>araD139</i> , Δ(<i>argF-lac</i>) U169, <i>deoC1</i> , <i>flb5301</i> , <i>relA1</i> , <i>rpsL150</i> , <i>ptsF25</i> , <i>rbsR</i>	(Casadaban 1976)
PD32	MC4100 <i>hns-206::amp^r</i>	(Dersch <i>et al.</i> 1993)
GS997	MC4100 <i>lrp::Tn10</i>	(Stauffer and Stauffer 1999)
GM37	MC4100	(Free <i>et al.</i> 1998)
CJD1124	GM37 Δ <i>stpA::tet^r</i> (Tn10)	(Free <i>et al.</i> 1998)
MC4100RH	F ⁺ , <i>araD139</i> , Δ(<i>argF-lac</i>) U169, <i>deoC1</i> , <i>flb5301</i> , <i>relA1</i> , <i>rpsL150</i> , <i>ptsF25</i> , <i>rbsR</i>	(Lange and Hengge-Aronis 1991)
RH90	MC4100RH <i>rpoS::kan</i>	(Lange and Hengge-Aronis 1991)

Stamm	Genotyp	Referenz
MC4100BW	F ⁺ , <i>araD139</i> , Δ(<i>argF-lac</i>) U169, <i>deoC1</i> , <i>flb5301</i> , <i>relA1</i> , <i>rpsL150</i> , <i>ptsF25</i> , <i>rbsR</i>	(Lee <i>et al.</i> 1985)
MM139	MC4100BW <i>ssr-1</i>	(Lee <i>et al.</i> 1985)
CSH50	F ⁻ , <i>ara</i> , Δ(<i>lac pro</i>), <i>strA</i> , <i>thi</i>	(Miller 1972)
CSH50 <i>fis::kan</i>	CSH50 <i>fis::km^r</i>	(Koch <i>et al.</i> 1988)
BSN26	MC411 <i>trp::Tn10</i>	(Johansson <i>et al.</i> 1998)
BSN29	MC411 <i>trp::Tn10</i> , Δ <i>hns stpA60::kan^r</i>	(Johansson <i>et al.</i> 1998)

4.2.2 Plasmide

pUC18-1 Derivat des pUC18, trägt P1-Fragment des *rrnB*-Operons aus pKK3535 (*SspI/DdeI*, 235 bp) in der *SmaI*-Schnittstelle des pUC18.
(Zacharias *et al.* 1990)

pUC18-6S pUC18-Derivat mit dem das *E. coli* *ssrS*-Gen inklusive 'upstream'-Sequenzen und Promotoren in der *SmaI*-Schnittstelle der MCS (auch: pUC18-6S-2).
(Gildehaus 2001)

p6S-T pCP1-Derivat, trägt das *E. coli* *ssrS*-Gen inklusive *upstream*-Bereich und den Promotoren aus pUC18-6S (*EcoRI/HincII*) in der *EcoRI/Ecl136II*-Schnittstelle von pCP1.
(Schäferkordt 2001)

pRT3HΔP2 Derivat des pBR322, trägt *rrnB* P1, einen Teil des 16S RNA- und des 5S-RNA-Gens vor den Terminatoren T1T2 des *rrnB* P1 Operons (auch pRT4).
(Bradaczek 1991)

pKK232-8 Derivat des pBR322 mit Amp-Resistenz und promotorlosem *cat*-Gen stromabwärts einer MCS mit Terminatorregion des *rrnB* Operons.
(Brosius 1984)

pCAT-6S-P1 Derivat von pKK232-8 bei dem der *ssrS* P1 Promotor aus einer PCR mit den Oligonukleotiden Oligo-6S-D und Oligo-6S-E vor das *cat*-Gen in den *SmaI*

linearisierten pKK232-8 eingesetzt wurde.

Diese Arbeit

pCAT-6S-P2 Derivat von pKK232-8 bei dem der *ssrS* P2 Promotor (257 bp *AluI*-Fragment aus pUC18-6S) vor das *cat*-Gen in den *SmaI* linearisierten pKK232-8 eingesetzt wurde.
Freundliche Gabe von Z. Arslan.

4.3 Nukleinsäuren

4.3.1 Oligonukleotide

- 6S-Oligo-1 5'-GTG GTA TGA AAT ATG GGC-3'
hybridisiert an die Nukleotidposition 38 bis 56 der reifen 6S RNA und ergibt in einer *primer extension*-Reaktion cDNA-Produkte einer Länge von 54, 55 bzw. 56 Basen für die reife 6S RNA je nach Prozssierung.
- PE-5S-Oligo 5'-ACC ACC GCG CTA CTG CCG-3'
komplementär zu Position 8 bis 25 der 5S rRNA und wird in Primer Extension Reaktionen verwendet, um einen interner Standard zu erhalten.
- Oligo-6S-D 5'-GTC TTC ACG GTT ACT CTA CCA C-3'
bindet an Position -25 bis -4 (bezogen auf die reife 6S RNA) '*upstream*' vom *ssrS*-Gens und dient als 3'-Primer für die PCR bei der Klonierung des Vektors pCAT-6S-P1.
- Oligo-6S-E 5'-GTT GGT CTT CAT TGC CGC-3'
bindet an Position -216 bis -199 (bezogen auf die reife 6S RNA) *upstream* vom *ssrS*-Gens und dient als 5'-Primer für die PCR bei der Klonierung des Vektors pCAT-6S-P1.

<i>cat</i> -Oligo	5'-CCT ACT CAA GCT TGG CTG-3' komplementär von +13 bis +30 zum (+)-Strang (<i>upstream</i> der Ribosomenbindestelle) des <i>cat</i> -Gens des Vektors pKK232-8, dies entspricht der Position +24 bis +41 relativ zum <i>ssrS</i> P1-Start im Plasmid pCAT-6S-P1 sowie der Position +56 bis +73 relativ zum <i>ssrS</i> P2-Start im Plasmid pCAT-6S-P2.
RNAI-Oligo	5'-TCAGCAGAGCGCAGATACCA-3' bindet an die RNAI von Position +28 bis +9 und ergibt in der <i>primer extension</i> -Reaktion ein cDNA-Produkt von 28 Basen.
Oligo#1400	5'-GAT TGT CTG ATA AAT TGT T-3' hybridisiert gegen die <i>leader</i> -Positionen L-C56 bis L-A38, die sich <i>upstream</i> aller ribosomalen <i>rrn</i> Operons befindet.
Zufallshexamere	Sechs Basen lange Zufallsoligonukleotide für die fluoreszenzmarkierte cDNA-Synthese für die Transkriptomanalysen (Invitrogen, Karlsruhe).

4.3.2 DNA-Fragmente

P1-Fragment	gewonnen durch <i>EcoRI</i> und <i>BamHI</i> Restriktion aus pUC18-1, Länge 256 Bp, enthält <i>rrnB</i> P1-Sequenz von -193 bis +63 relativ zum P1-Start.
FΔ₇₆₋₁₈₉	494 Bp großes Fragment, das mit <i>BtgI</i> aus pUC18-6S geschnitten wurde. Es enthält die <i>ssrS upstream</i> Region mit beiden Promotoren und den ersten 75 Basen des 6S RNA-Gens von Position -420 bis +75 (bezogen auf die reife 6S RNA).
FΔP2	445 Bp großes Fragment, das Resultat eines <i>BglII</i> und <i>BamHI</i> -Doppelverdau des Plasmids pUC18-6S. Es enthält die <i>ssrS upstream</i> Region mit dem P1 Promotor und die komplette Sequenz des <i>ssrS</i> -Strukturgens von Position -225 bis +191 (bezogen auf die reife 6S RNA).

FΔP2Δ₇₆₋₁₈₉	329 Bp großes Fragment, das mit <i>BtgI</i> und <i>BgIII</i> aus dem Plasmid pUC18-6S hydrolysiert wurde. Es enthält die <i>ssrS upstream</i> Region mit dem P1 Promotor und die komplette Sequenz des <i>ssrS</i> -Strukturgens von Position -225 bis +191 (bezogen auf die reife 6S RNA).
<i>AvaII</i>-Fragment	222 bp großes Fragment mit <i>AvaII</i> aus pUC18-1 geschnitten, beinhaltet einen Teil des offenen Leserasters des <i>bla</i> -Gens.

4.3.3 Nukleotide

Adenosin-5'-triphosphat	Roche, Mannheim
Cytidin-5'-triphosphat	Roche, Mannheim
Guanosin-5'-triphosphat	Roche, Mannheim
Uridin-5'-triphosphat	Roche, Mannheim
Adenosin-5'-triphosphat, "FPLC ultra pure"	Pharmacia, München
Cytidin-5'-triphosphat, "FPLC ultra pure"	Pharmacia, München
Guanosin-5'-triphosphat, "FPLC ultra pure"	Pharmacia, München
Uridin-5'-triphosphat, "FPLC ultra pure"	Pharmacia, München
2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat	Roche, Mannheim
2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat	Roche, Mannheim
2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat	Roche, Mannheim
2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat	Roche, Mannheim
2',3'-Didesoxyadenosin-5'-triphosphat	Roche, Mannheim
2',3'-Didesoxycytidin-5'-triphosphat	Roche, Mannheim
2',3'-Didesoxyguanosin-5'-triphosphat	Roche, Mannheim
2',3'-Didesoxythymidin-5'-triphosphat	Roche, Mannheim
Adenosin-5'-[γ - ³² P]-triphosphat	Hartmann, Braunschweig
2'-Desoxyadenosin-5'-[α - ³² P]-triphosphat	Hartmann, Braunschweig
2'-Desoxycytidin-5'-[α - ³² P]-triphosphat	Hartmann, Braunschweig
Cytidin 5'-[α - ³² P]-triphosphat	Hartmann, Braunschweig

Uridin-5'-[α - ³² P]-triphosphat	Hartmann, Braunschweig
Cy3-dUTP ($\lambda_{EX\ max}$ 550 nm, $\lambda_{EM\ max}$ 570 nm)	Amersham Biosciences, Freiburg
Cy5-dUTP ($\lambda_{EX\ max}$ 649 nm, $\lambda_{EM\ max}$ 670 nm)	Amersham Biosciences, Freiburg
Guanosin-3',5'-(bis)-diphosphat	freundliche Gabe von C. Pohl

4.4 Proteine

4.4.1 Restriktionsendonukleasen:

<i>Ava</i> II	New England Biolabs, USA
<i>Bam</i> HI	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Bgl</i> II	Roche, Mannheim
<i>Btg</i> I	New England Biolabs, USA
<i>Eco</i> RI	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Eco</i> RV	New England Biolabs, USA
<i>Sma</i> I	New England Biolabs, USA

4.4.2 Polymerasen und Polymeraseuntereinheiten

<i>AMV</i> Reverse Transkriptase	Promega, Madison, USA
Reverse Transkriptase Superscript II	Invitrogen, Karlsruhe
DNA-Polymerase I, Klenow Fragment	Promega, Madison, USA
Phusion High Fidelity DNA Polymerase	Finnzymes, Espoo, Finnland
RNA-Polymerase aus <i>E. coli</i>	Holoenzym nach (Burgess and Jendrisak 1975), verändert nach (Gonzales <i>et al.</i> 1977), charakterisiert nach (Chamberlin <i>et al.</i> 1979); freundliche Gabe von R. Wurm

	<i>core</i> -Enzym nach (Burgess and Jendrisak 1975), (Lowe <i>et al.</i> 1979) freundliche Gabe von R. Wurm
σ^{70} -Untereinheit der RNA-Polymerase	nach (Igarashi and A. 1991), verändert nach (Borukhov and Goldfarb 1993) freundliche Gabe von R. Wurm
σ^{38} -Untereinheit der RNA-Polymerase	nach (Tanaka <i>et al.</i> 1993) freundliche Gabe von R. Wurm

4.4.3 Transkriptionsfaktoren

FIS	nach (Koch and Kahmann 1986) freundliche Gabe von R. Wurm
H-NS	nach (Tippner <i>et al.</i> 1994) freundliche Gabe von R. Wurm
LRP	nach (Roesch and Blomfield 1998) freundliche Gabe von R. Wurm
StpA	nach (Zhang <i>et al.</i> 1995) freundliche Gabe von R. Wurm
DksA	nach (Delic 2006) freundliche Gabe von D. Delic

4.4.4 Enzyme und sonstige Proteine

DNase I (RNase-frei)	Roche, Mannheim
Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I	Promega, Madison, USA
Lysozymchlorid	Sigma, St. Louis, USA
Rinderserumalbumin (BSA)	New England Biolabs, USA
Rinderserumalbumin (BSA), acetyliert	New England Biolabs, USA

Ribonuklease A (RNase A)	Sigma, St. Louis, USA
T4-Polynukleotidkinase	New England Biolabs, USA
T4-DNA-Ligase	Roche, Mannheim

4.5 Molekulargewichtsmarker

Kb-Leiter	GibcoBRL, Eggenstein
SmartLadder (SmL)	Eurogentec, Seraing, Belgien
Peq Gold Protein Marker	Biotechnologie GmbH, Erlangen

4.6 Puffer und Medien

4.6.1 Puffer

Formamid-Probenpuffer:	95 % (v/v) deionisiertes Formamid 25 mM EDTA, pH 8,0 0,1 % (w/v) Bromphenolblau 0,1 % (w/v) Xylencyanol
Harnstoff-Probenpuffer	7 M Harnstoff 0,1 % (w/v) Bromphenolblau 0,1 % (w/v) Xylencyanol in 2 x TBE-Puffer
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
1 x TE-Puffer:	10 mM Tris-HCl, pH 8,0 1 mM EDTA, pH 8,0

4.6.2 Medien

YT-Medium:	8 g/l Trypton 5 g/l Hefe-Extrakt 5 g/l NaCl in <i>Aqua dest.</i> auf pH 7,4 einstellen und autoklavieren
YT-Festmedium (YT-Platten):	YT-Medium mit 15 g/l Agar
5 x M9-Minimalmedium:	30 g/l Na ₂ HPO ₄ 15 g/l KH ₂ PO ₄ 2,5 g/l NaCl 5 g/l NH ₄ Cl autoklavieren und lagern, bei Bedarf auf 1 x verdünnen und mit Glukose (f.c. 0,2%)

	im Erlenmeyerkolben autoklavieren. Vor dem Animpfen sterile Lösungen Thiamin (f.c. 1 mg/l), MgSO ₄ (f.c. 1 mM) und CaCl ₂ (f. c. 0,1 mM) zugeben.
10 x LB-Medium mit 2% Glukose	2 g Glukose 10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl mit <i>Aqua dest.</i> auf 100 ml auffüllen und auf pH 7,5 einstellen

4.7 Feinchemikalien

Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agar	Gibco BRL, Eggenstein
Agarose	Sigma, St. Louis, USA
Agarose, 'ultra pure'	Seakem, Hamburg
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Chimika Janssen, Belgien
Ammoniumperoxidisulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Ammoniumsulfat	J. T. Baker, Groß-Gerau
Ampicillin	Sigma, St. Louis, USA
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Chloramphenicol	Boehringer, Mannheim
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blue R250	Serva, Heidelberg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Riedel-de-Haen, Seelze
Dithiothreitol (DTT)	Jansen, Beerse, Belgien
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid (EtBr)	Boehringer, Mannheim

Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck, Darmstadt
Formaldehyd	Riedel-de-Haen, Seelze
Formamid	J. T. Baker, Groß-Gerau
Glycerin	J. T. Baker, Groß-Gerau
Glycin	Roth, Karlsruhe
Glykogen	Boehringer, Mannheim
Harnstoff	J. T. Baker, Groß-Gerau
Hefeextrakt	Gibco BRL, Eggenstein
Heparin	Sigma, St. Louis, USA
HEPES	Merck, Darmstadt
IPG-Puffer	Amersham Pharmacia Biotech, Schweden
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	J. T. Baker, Groß-Gerau
Kaliumglutamat	Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Magnesiumdichlorid (MgCl ₂)	Merck, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
N,N'-Methylenbisacrylamid	Serva, Heidelberg
Natriumacetat	Riedel-de-Haen, Seelze
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	J. T. Baker, Groß-Gerau
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Natriumdeoxycholat	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
Natriumthiosulfat	Merck, Darmstadt
Pepstatin A	Calbiochem, Nottingham, UK
Phenol	Roth, Karlsruhe
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Serva, Heidelberg
Polyethylenglykol (PEG ₆₀₀₀)	ICN Biomedicals Inc., Ohio
Rifampicin	Sigma Aldrich, Steinheim
Saccharose	J. T. Baker, Groß-Gerau
Salzsäure (HCl)	Roth, Karlsruhe
Silbernitrat	Roth, Karlsruhe

N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Merck, Darmstadt
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Merck, Darmstadt
Trypton	Difco, Detroit, USA
Xylencyanol	Serva, Heidelberg

4.8 Verschiedenes

Amberlite Mischbettionenaustauscher	Roth, Karlsruhe
Bradford-Reagenz	Bio-Rad, Richmond, USA
Chromatographiepapier 3MM	Whatman, England
DE 81-Papier	Whatman, England
DryStrip Cover Fluid Mineralöl	Amersham Pharmacia Biotech, Schweden
<i>E. coli</i> DNA-Chip Genome AROS™ Version 2.0	Operon
Gelbondfolie	PAGfilm FMC, Rockland, USA
IEF Electrode Strip	Amersham Pharmacia Biotech, Schweden
Microcon Membranen YM-30	Millipore, Schwalbach
MN Faltenfilter	Mischerey-Nagel, Düren
PhosphoImager Screen BAS 2340	FUJI, Japan
pH-Streifen Immobiline DryStrip	
18 cm pH 3-10 NL (nicht linear)	Amersham Pharmacia Biotech, Schweden
Röntgenfilme RX	FUJI, Japan
Röntgenfilme X-OMAT AR	Kodak, New Haven, USA
Sterilfilter FB 030/3 (0,2 µm)	Schleicher und Schuell, Dassel
Tetenal Roentogen liquid (Entwickler)	Tetenal Photowerk, Norderstedt
Tetenal Roentogen Superfix (Fixierer)	Tetenal Photowerk, Norderstedt
Thermopapier K65HM-CE	Mitsubishi Electric Europe, England
Verstärkerfolie DuPont Cronex (Lightning Plus Screen)	DuPont, Bad Homburg
VS Filtermembran (Porengröße 0,025 µm, ø 2,5 cm)	Millipore, Neu Isenburg

5 Methoden

5.1 Allgemeine und mikrobiologische Methoden

5.1.1 Arbeitsbedingungen beim Umgang mit Bakterien

Bei dem Umgang mit Bakterienstämmen wurde unter sterilen Bedingungen gearbeitet, dabei wurden die Vorschriften des Gentechnikgesetzes für das Arbeiten mit genetisch veränderten Organismen GvO's (S1) eingehalten. Anfallender mikrobiologischer Abfall wurde vor der Entsorgung autoklaviert.

5.1.1.1 Sterilisation von Lösungen und Glasgeräten

Alle verwendeten temperaturstabilen Lösungen, Puffer und Medien wurden durch Dampfdrucksterilisation (20 min, 120°C, 2-3 bar) autoklaviert. Temperatursensitive Lösungen wurden mit Hilfe von 0,2 µm Membranfiltern (Schleicher und Schuell) sterilfiltriert. Glasgeräte wurden für 4 h bei 210°C hitzesterilisiert.

5.1.2 Kultivierung von Bakterienstämmen

5.1.2.1 Anzucht auf Agarplatten

Alle Bakterienstämme wurden vor der Benutzung aus Sicherheitsstocks auf YT-Platten (4.6.2), die gegebenenfalls mit einem selektiven Antibiotikum supplementiert wurden, mit einer sterilen Impföse ausgestrichen und bei 37°C bis zum sichtbaren Wachstum von Einzelkolonien inkubiert. Anschließend konnten die Einzelkolonien auf eine neue Platte (Masterplatte) umgesetzt oder in Flüssigkultur übernommen werden. Die kurzzeitige

Lagerung von Zellen auf YT-Platten erfolgt bei 4°C und für eine langfristige Sicherung von Stämmen wurden Glycerinkulturen angelegt.

5.1.2.2 Anzucht von *E. coli*-Flüssigkulturen

Zur Anzucht von über Nacht (üN)-Kulturen wurden Einzelkolonien mit einem sterilen Zahnstocher von einer YT-Platte gepickt, und in 3 ml YT-Medium (4.6.2) überführt, welches gegebenenfalls mit einem selektiven Antibiotikum versehen wurde. Aus üN-Kulturen wurden sterile Medien stets 1:100 angeimpft. Die Inkubation der Flüssigkultur erfolgte auf einem Rundschtüttler (New Brunswick Scientific Gio Gyrotory, ca. 200 rpm) bei 37°C über Nacht.

5.1.2.3 Erstellung von Wachstumskurven und Berechnung von Wachstumsraten

Zur Erstellung von Wachstumskurven wurden 100 ml Flüssigkulturen nach Animpfen alle 30 min eine Probe zur Streumessung (5.2.1.1) entnommen. Die Messwerte wurden halblogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen. Die Wachstumsrate (hier: μ = Verdopplungen / h) errechnet sich aus der Geradengleichung der linearisierten Steigung der Wachstumskurve während des exponentiellen Wachstums (maximale Teilungsrate der Zelle) nach der Formel:

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

M_1 = OD₆₀₀ zum Anfang des exponentiellen Wachstums

M_2 = OD₆₀₀ zum Ende des exponentiellen Wachstums

t_1 = Zeitpunkt zu M_1

t_2 = Zeitpunkt zu M_2

5.1.2.4 Anlegen von Glycerinkulturen (Glycerinstocks)

Zur langfristigen Sicherung von Bakterienstämmen wurden Glycerinkulturen angelegt. Dazu wurde 1 ml einer üN-Kultur (5.1.2.2) des gewünschten Stammes in einem sterilen Stockgläschen mit 200 µl 100 % (v/v) Glycerin versetzt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, dabei wurde die Glycerinkultur mehrmals invertiert. Danach wurde die Bakterienkultur bei -70°C eingefroren und gelagert.

5.1.3 Herstellung kompetenter Zellen

Zur Herstellung von kompetenten Zellen (Dagert and Ehrlich 1979) wurden 100 ml YT-Medium (4.6.2) mit 1/100 Volumen einer üN-Kultur (5.1.2.2) angeimpft und bis zum Erreichen einer optischen Dichte von OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,6 bei 37°C schüttelnd inkubiert. Je 40 ml Kultur wurden in sterile, vorgekühlte Corex-Zentrifugengläschen überführt und für 20 min auf Eis gekühlt. Anschließend wurden die Zellen 5 min bei 4500 rpm und 4°C pelletiert (Heraeus Megafuge 1.0R). Der Überstand wurde dekantiert, das Zellpellet vorsichtig in 20 ml eiskaltem 0,1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert und eine Stunde bei 4°C inkubiert. Die Resuspension wurde erneut, wie oben beschrieben, zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Pellet in 2 ml 85 mM CaCl₂-Lösung mit 15% Glycerin vorsichtig aufgenommen. Nach Aliquotieren zu je 200 µl in sterile Eppendorfgefäße wurden die kompetenten Zellen für 16 h bei 4°C inkubiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

5.1.4 Transformation kompetenter Zellen mit Vektor-DNA

Die Transformation erfolgte nach einer Methode von Hanahan (Hanahan 1985). Für jeden Transformationsansatz wurde ein Aliquot mit 200 µl kompetenten Zellen langsam auf Eis aufgetaut, mit 5-60 ng Plasmid-DNA aus einem Ligationsansatz (5.2.7.5) vorsichtig vermischt und 1 h auf Eis inkubiert. Es folgte ein dreiminütiger Hitzeschock bei 42°C und danach wurde 800 µl vorgewärmtes YT-Medium (4.6.2) zugegeben. Zur Ausbildung der Antibiotikaresistenz wurde die Zellsuspension 1 h bei 37°C inkubiert und dabei leicht geschüttelt. Anschließend wurden 50 – 300 µl Kultur auf selektive und vorgewärmte

YT-Platten (4.6.2) ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bis zum Anwachsen von Einzelkolonien bei 37°C inkubiert. Die Transformationsrate der kompetenten Zellen pro μg Plasmid-DNA wurde durch Auszählen der Kolonien unter Berücksichtigung der eingesetzten DNA-Menge und des ausplattierten Kulturvolumens bestimmt und lag abhängig vom Stamm und Plasmid zwischen $2 \cdot 10^5$ und $5 \cdot 10^6$ Transformanden pro μg DNA.

5.2 Allgemeine molekularbiologische Methoden

5.2.1 UV/VIS-Spektroskopie

5.2.1.1 Streumessung zur Bestimmung der Zelldichte in Flüssigkeiten

Das Bakterienwachstum wurde im Spektralphotometer (Beckman, Typ DU 64) mittels Streumessung bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. Dazu wurde ein Aliquot der Zellkultur entnommen und gegebenenfalls mit sterilem YT-Medium (4.6.2) verdünnt, damit die OD_{600} -Werte im linearen Bereich zwischen 0,1 und 0,9 liegen. Das Spektralphotometer wurde zuvor gegen steriles YT-Medium kalibriert.

5.2.1.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte durch Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 260 nm im Beckman UV/VIS-Spektralphotometer (Typ DU 64). Zur Messung wurden ausschließlich Suprasil-Quarzküvetten verwendet. Um in einem linearen Bereich zu messen, wurde die Probe falls nötig mit *Aqua dest.* verdünnt, so dass die Absorptionswerte in einem Bereich zwischen 0,1 und 0,9 lagen. Das Spektralphotometer wurde zuvor mit *Aqua dest.* kalibriert. Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors berechnet sich die Konzentration der Probe aus der Absorption bei 260 nm mittels des

folgenden vereinfachten Zusammenhangs:

$$1 A_{260} = 50 \mu\text{g/ml doppelsträngiger Nukleinsäure}$$

$$1 A_{260} = 37 \mu\text{g/ml einzelsträngiger Nukleinsäure}$$

Der Reinheitsgrad der Nukleinsäure wurde mit einem UV-Spektrum der Wellenlängen von 220 nm bis 320 nm überprüft. Die Reinheit einer Nukleinsäurelösung wurde über den Quotienten E_{260}/E_{280} abgeschätzt. Für eine reine Probe sollte der Wert zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Verunreinigungen durch Proteine oder Phenolreste würden den Wert verringern.

Desoxynukleotidlösungen und Desoxyoligonukleotidlösungen wurden nach dem Ansetzen spektrometrisch auf die angegebene Konzentration hin überprüft. Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz lassen sich Konzentrationen von absorbierenden Substanzen mittels des substanzspezifischen Extinktionskoeffizienten errechnen.

Nach Lambert-Beer gilt:

$$E = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

mit:

E = gemessene Extinktion bei angegebener Wellenlänge λ

ε = substanzspezifischer molarer Extinktionskoeffizient bei angegebener Wellenlänge λ

c = molare Konzentration der absorbierenden Lösung

d = Länge des Lichtweges durch die absorbierende Lösung, also Durchmesser der Küvette (hier 1 cm)

Für die Konzentration gilt folglich:

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

Die spezifischen Extinktionskoeffizienten für die Desoxynukleotide werden bei Maniatis *et al.* (Maniatis 1982) wie folgt angegeben:

$$2'\text{-Desoxyadenosin-5'-triphosphat } \varepsilon_{259} = 1,54 \cdot 10^4 [\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}]$$

$$2'\text{-Desoxycytidin-5'-triphosphat } \varepsilon_{271} = 9,1 \cdot 10^3 [\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}]$$

$$2'\text{-Desoxyguanosin-5'-triphosphat } \varepsilon_{253} = 1,37 \cdot 10^4 [\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}]$$

$$2'\text{-Desoxythymidin-5'-triphosphat } \varepsilon_{260} = 7,4 \cdot 10^3 [\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}]$$

5.2.1.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentrationsbestimmung von proteinhaltigen Lösungen erfolgte mit dem "Bradford-Microassay" der Firma Bio Rad. Dazu wurden 5 bis 20 µl Proteinlösung mit *Aqua dest.* auf 800 µl aufgefüllt, mit 200 µl Bradford-Reagenz versetzt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Absorption der Probe in einem Spektralphotometer (Beckman Typ DU 64) bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Das Photometer wurde zuvor gegen 5 bis 20 µl des jeweiligen Proteinlagerungspuffers auf 800 µl mit *Aqua dest.* aufgefüllt und 200 µl Bradford-Reagenz kalibriert. Anhand einer zuvor erstellten Eichgeraden mit bekannten Proteinkonzentrationen (1 bis 15 µg BSA) wurde die Konzentration der untersuchten Probe ermittelt.

5.2.2 Isolation von Nukleinsäuren und Proteinen aus Bakterien

5.2.2.1 Plasmidpräparation im analytischen Maßstab

Die hier verwendete Methode geht auf Birnboim und Doyle (Birnboim and Doly 1979) zurück und wird allgemein als 'Alkalische Lyse' bezeichnet. Eine 3 ml üN-Kultur wurde pelletiert (2 x 5 min, 12000 rpm in Hettich Mikro22) und das Zellpellet in 100 µl Lyselösung I aufgenommen, gevortext und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 200 µl frisch angesetzte Lyselösung II zugegeben, kurz gemischt und weitere 5 min auf Eis gestellt. Anschließend folgte eine Zugabe von 150 µl 3 M Kaliumacetat pH 4,8 und eine Inkubation für 5 min auf Eis. Die Suspension wurde 5 min bei 12000 rpm zentrifugiert (Hettich Mikro22), der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und Phenol/Chloroform extrahiert (5.2.3.1). Nach einer Ethanol-fällung (5.2.3.2) wurde das Pellet kurz getrocknet (Heto, SpeedVac VR-1) und in 15-25µl TE-Puffer (4.6.1) gelöst.

Lyselösung I	25 mM Tris-HCl, pH 8,0
	50 mM Glukose
	10 mM EDTA, pH 8,0
	3 mg/ml Lysozymchlorid
Lyselösung II	200 mM NaOH
	1% (w/v) SDS

5.2.2.2 Plasmidpräparation im präparativen Maßstab

Für die präparative Isolierung von superspiralisierter Plasmid-DNA (Hillen *et al.* 1981) wurde 800 ml YT-Medium (4.6.2) mit dem entsprechenden Antibiotikum supplementiert, mit 8 ml Vorkultur (25 ml \bar{u} N-Kultur) angeimpft und \bar{u} N auf einem Schüttler (New Brunswick Scientific Gio Gyrotory) bei 37°C inkubiert. Die Zellkultur wurde auf zwei JA-10 Becher verteilt und für 10 min bei 8000 rpm und 4°C (Beckman Zentrifuge J2-21, JA-10-Rotor) zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in insgesamt 16 ml Saccharoselösung bei 4°C resuspendiert. Danach wurden je 8 ml in ein Ti55.2-Polycarbonatröhrchen überführt und mit je 3 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0 sowie mit 3 ml Lysozymlösung versetzt, mehrmals invertiert und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden je 2 ml frisch angesetzte Brij-Doc-Lösung hinzugegeben und weitere 10 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation für 30 Minuten bei 44000 rpm und 4°C (Beckman L8-55 Ultrazentrifuge, Rotor Ti55.2). Der klare Überstand wurde mit RNase A versetzt (Endkonzentration 50 μ g/ml) und für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurde Proteinase K (Endkonzentration 50 μ g/ml) hinzugegeben und weitere 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Fällung der Plasmide erfolgte in JA-17 Becher nach Zugabe eines halben Volumens PEG-Lösung für 30 Minuten auf Eis und durch die darauf folgende Zentrifugation für 30 Minuten bei 10000 rpm und 4°C (Beckman Zentrifuge JA-17-Rotor). Das Pellet wurde in 3 ml TE-Puffer (4.6.1) aufgenommen und anschließend Phenol/Chloroform extrahiert (5.2.3.1). Nach der Ethanol-fällung (5.2.3.2) wurde das Pellet in einem geeigneten Volumen

TE-Puffer aufgenommen und die Konzentration der DNA-Lösung spektralphotometrisch (5.2.1.2) und über Agarosegelelektrophorese (5.2.5.1) bestimmt.

Saccharose-Lösung:	25 % (w/v) Saccharose 50 mM Tris-HCl, pH 8,0
Lysozym-Lösung:	20 mg/ml Lysozymchlorid 50 mM Tris-HCl, pH 8,0
Brij-Doc-Lösung:	2 Volumen 10 % (w/v) Brij 35 1 Volumen 10 % (w/v) Na-Deoxycholat in <i>Aqua dest.</i> pH 8,0
RNase A:	20 mg/ml in 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 (nach Maniatis <i>et al.</i> , 1982) von DNase-Aktivität befreit
Proteinase K:	20 mg/ml in <i>Aqua dest.</i>
PEG-Lösung:	30 % (w/v) PEG ₆₀₀₀ in 1,5 M NaCl

5.2.2.3 Isolation von Gesamt-RNA

Die Isolation von Gesamt-RNA aus *E. coli* erfolgte nach einer von Liebig beschriebenen leicht abgewandelten Methode (Liebig and Wagner 1995). Dabei werden 5-12 ml einer Flüssigkultur in einem Greinerröhrchen für 5 min bei 6000 rpm und 4°C (Heraeus Megafuge 1,0R) zentrifugiert. Das Zellpellet wurde schnell in 0,5 ml Puffer I resuspendiert, in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt, sofort mit 0,5 ml 60°C heißem Phenol (gesättigt mit 20 mM NaOA, pH 5,3) versetzt und gevortext. Es folgte eine Inkubation für 5 min bei 60°C und sorgfältiges Vortexen. Die Proben wurden anschließend 5 min bei 12000 rpm zentrifugiert (Hettich Mikro22) und die wässrige Phase solange mit Chloroform-gesättigtem Phenol extrahiert bis keine Interphase mehr zu erkennen war. Dann folgte eine Extraktion mit Chloroform, die wässrige Phase wurde mit dem dreifachen Volumen absolutem Ethanol versetzt und für 30 min bei -70°C gefällt. Danach wurden die Proben 45 min bei 14000 rpm zentrifugiert (Hettich Mikro22), der Überstand verworfen und das Pellet mit 80%igem

Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und anschließend getrocknet. Die RNA wurde in 50 μ l *Aqua dest.* gelöst und standardmäßig die restliche genomische DNA mittels DNase I (RNase-frei!) hydrolysiert. Dazu wurde 1,6 μ l 3 M NaOAc (pH 5,3), 5 μ l 100 mM MgCl₂ und 2 Units RNase-freie DNase I zugegeben und für 30-60 min bei 37°C inkubiert. Es folgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion (5.2.3.1) und eine Fällung mit 3 Volumen absolutem Ethanol (s.o.). Die RNA wurde dann nach dem Trocknen (Heto SpeedVac VR-1) in 30-60 μ l TE-Puffer (4.6.1) gelöst und dessen Reinheit und Konzentration spektralphotometrisch (5.2.1.2) und die Qualität auf einem 1%igen Agarosegel (5.2.5.1) analysiert.

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

Bei der RNA-Isolation für die Rifampicin-Kinetik zur Bestimmung von Halbwertszeiten von RNA-Molekülen wurde das Protokoll leicht verändert. Das Antibiotikum Rifampicin blockiert die bakterielle Transkription und so können RNA-*turnover*-Analysen *in vivo* durchgeführt werden. Hierzu wurden 100 ml YT-Medium 1/100 mit einer \bar{u} N-Kultur des Stammes MG1655 angeimpft, bei 37°C schüttelnd inkubiert und die Wachstumskurve aufgenommen. In der logarithmischen ($OD_{600} = 0,78$) Wachstumsphase wurde Rifampicin zugegeben (Endkonzentration 1 μ g/ml). Es wurden zu verschiedenen Zeiten 5 ml Zellkultur direkt auf 5 ml 60°C heißes Phenol (gesättigt mit 20 mM NaOA, pH 5,3) gegeben und intensiv gevortext. Die weitere Aufarbeitung der Gesamt-RNA-Proben erfolgte wie oben beschrieben.

Für die Gesamt-RNA-Aufreinigung für die *upshift*-Experimente wurde 100 ml 0,2 % glukosehaltiges 1 x M9-Medium (4.6.2, in Erlenmeyerkolben mit Schikanen) 1/100 mit einer \bar{u} N-Kultur des Stammes MG1655 angeimpft und die Zellen 8-10 Stunden bei 37°C geschüttelt, bis sie in der stationären Phase waren. Der *upshift* erfolgte, indem 10 ml Kultur entnommen und sofort 10 ml vorgewärmtes 10 x LB-Medium mit 2 % Glukose (4.6.2) zugegeben und nach verschiedenen Zeiten Proben gezogen wurden. Dabei wurden 4 ml Kultur in zwei vorgekühlte 2 ml-Eppendorfgefäße verteilt und sofort in flüssigem Stickstoff

schockgefroren. Danach wurden die Zellen bei 0-2°C zentrifugiert (12000 rpm, Sigma 202-MK) und gleichzeitig langsam aufgetaut. Als noch Eis im Überstand war, allerdings die Zellen schon pelletiert waren, wurde der Überstand verworfen. Auf jedes Zellpellet wurde 250 µl 60°C heißes Phenol (gesättigt mit 20 mM NaOA, pH 5,3) und 250 µl Puffer I (s.o.) gegeben und sorgfältig gevortext. Dann erfolgte eine Inkubation der Proben für 7 min bei 60°C und zwischenzeitlich wurde gevortext. Nach der Extraktion wurden die wässrigen Überstände identischer Proben in einem Eppendorfgefäß vereinigt und wie oben beschrieben weiter aufgereinigt. Zur zusätzlichen Aufreinigung wurde nach der Ethanolfällung das RNA-Pellet in 200 µl in 20 mM NaOAc (pH 5,3) und 1 mM EDTA (ohne SDS) aufgenommen und erneut gefällt, um eventuell vorhandene und für die reverse Transkription störende SDS-Reste zu entfernen. In die folgende Hybridisierung für die *primer extension*-Analyse wurde 1 µg Gesamt-RNA eingesetzt.

5.2.2.4 Proteinisolation im analytischen Maßstab

Aus den gleichen Flüssigkulturen wie bei der Isolation der Gesamt-RNA für die Transkriptomanalysen wurden mit 10 ml Aliquots entnommen zur Isolation von Gesamtprotein für die Proteomanalysen. Die *E. coli* Zellsuspension wurde 5 min bei 5000 rpm und 4°C zentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0R), das Pellet wurde bis zur Aufarbeitung bei -20°C gelagert und dann in 1 ml Lysepuffer aufgenommen, resuspendiert und in Eppendorfgefäße überführt. Der Aufschluss erfolgte mit Hilfe einer Nadelsonde 40T des Ultraschallgerätes (Labsonic U, Braun Biotech Int.) bei einer Leistung von 40 W (*repeating duty cycle*: 0,5 und *power range switch*: low). Dabei wurde die Zellsuspension viermal für 30 sec dem Ultraschall ausgesetzt und sonst auf Eis gehalten. Anschließend wurden die Zelltrümmer abzentrifugiert (10 min, 13000 rpm, Hettich Mikro22), die Proteinlösung in ein frisches Gefäß überführt und die Proteinkonzentration bestimmt (5.2.1.3).

Lysepuffer: 50 mM Tris-HCl, pH 7,5
 2 mM EDTA
 0,2 mM PMSF

5.2.3 Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren

5.2.3.1 Phenol/Chloroform-Extraktion

Zur Entfernung von Proteinen aus einer wässrigen Nukleinsäurelösung wurde eine Phenol/Chloroform-Extraktion durchgeführt. Bei dieser proteindenaturierenden Methode wurde die Nukleinsäurelösung mit einem Volumen Phenol/Chloroform (Verhältnis 1:1) versetzt und für eine Minute sorgfältig gevortext. Zur Trennung der wässrigen von der organischen Phase wurde der Ansatz 5 min zentrifugiert. Bei kleinen Volumina (Eppendorfgefäß) wurde bei 12000 rpm (Hettich Mikro22), bei präparativen Volumina (Greinerröhrchen) bei 6000 rpm zentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0R). Die obere, wässrige, nukleinsäurehaltige Phase wurde abgenommen und in ein neues Gefäß überführt, wohingegen die Interphase und die organische Phase verworfen wurden. Die Phenol/Chloroform-Extraktion wurde solange wiederholt, bis keine Interphase mehr vorhanden war. Zur Entfernung der Phenolreste aus der wässrigen Phase wurde ein Volumen Chloroform zugegeben, 1 min gevortext und wieder 5 min zentrifugiert. Der jetzt proteinfreie wässrige Überstand wurde abgehoben, in ein neues Gefäß überführt und die Nukleinsäure durch eine ethanolische Fällung (5.2.3.2) konzentriert.

5.2.3.2 Ethanolfällung von Nukleinsäuren

Zur Fällung von Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen wurde diese mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,5) und 2,5-3 Volumen absolutem Ethanol (-20°C) versetzt. Die Fällung erfolgte bei 4°C für 30-60 Minuten oder in flüssigem Stickstoff für 3 Minuten. Danach wurden die gefällten Nukleinsäuren durch 30minütige Zentrifugation bei 12000 rpm (kleine Volumina, Eppendorfgefäß, Hettich Mikro22) oder bei 6000 rpm (große Volumina, Greinerröhrchen, Heraeus Megafuge 1.0 R) pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen, die Pellets mit einem Volumen 80 %igen Ethanol (-20°C) versetzt, und durch eine erneute 20minütige Zentrifugation gewaschen. Anschließend wurden die Pellets im Vakuumkonzentrator (Heto SpeedVac VR-1) lyophilisiert und zum Schluss in einem geeigneten Volumen *Aqua dest.* oder TE-Puffer (4.6.1) aufgenommen.

5.2.3.3 Dialyse von Nukleinsäuren

DNA-Lösungen bis zu einem Volumen von 100 µl wurden mit Hilfe der Mikrotropfendialyse entsalzt. Hierzu wurden in eine sterilen Petrischale mit 30-40 ml TE-Puffer (4.6.1) gefüllt und ein VS Millipore Membranfilter (Durchmesser 2,5 cm, Porengröße 0,025 µm) mit der glänzenden Seite nach oben auf die Oberfläche der Flüssigkeit gelegt. Anschließend wurde die zu dialysierende Probe auf den Membranfilter pipettiert. Die Dialyse erfolgte für 1-2 Stunden bei Raumtemperatur, danach wurde die Probe vorsichtig vom Filter abgenommen und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Der Membranfilter wurde zum Schluss 2 x mit je 10 µl TE-Puffer gespült, um auf dem Filter verbliebene Nukleinsäure aufzunehmen.

5.2.3.4 Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen nach der 'freeze-squeeze'-Methode

Um DNA-Fragmente aus präparativen Agarosegelen zu isolieren wurde die von Silhavy *et al.*, (Silhavy 1984) beschriebene 'freeze-squeeze'-Methode verwendet. Die Agarosegelstücke, welche das gewünschte Fragment enthielten, wurden durch eine 2,5 ml Spritze ohne Kanüle in ein Greinerröhrchen gepresst. Die Spritze wurde anschließend zweimal mit 400 µl mit TE gesättigtem Phenol gespült und dieses mit der gepressten Agarose vereinigt. Die Proben wurden daraufhin 5 min gevortext und danach 15 Minuten in flüssigem Stickstoff eingefroren. Nach dem Auftauen wurden die Proben erneut gevortext und wieder eingefroren. Nach dem erneuten Auftauen wurden die Proben für 15 min zentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0R, 6000 rpm, RT). Die wässrige, obere Phase wurde abgenommen und in ein neues Gefäß überführt. Die Phenolphase wurde mit 400 µl TE-Puffer versetzt und die oben beschriebene Prozedur wurde wiederholt. Nach der zweiten Zentrifugation wurden die wässrigen Phasen vereinigt und mit Phenol/Chloroform extrahiert (5.2.3.1) und mit Ethanol gefällt (5.2.3.2). Fragmente, die für Retardierungsanalysen (5.3.3) verwendet werden sollten wurden dialysiert (5.2.3.3). Die Konzentration der isolierten DNA-Fragmente wurde schließlich spektralphotometrisch und mittels Agarosegelelektrophorese (5.2.5.1) bestimmt.

5.2.4 Konzentrierung von Proteinen durch Acetonfällung

Bei der denaturierenden Acetonfällung wurden 300 µg Gesamtproteinproben mit 4 Volumen Aceton vermischt und 1 h bei -20°C inkubiert. Die ausgefällten Proteine wurden für 30 min bei 14000 rpm (Hettich Mikro22) abzentrifugiert, getrocknet (Heto SpeedVac VR-1) und in Rehydratisierungspuffer aufgenommen.

5.2.5 Gelelektrophoresen

5.2.5.1 Agarosegelelektrophorese

Zur analytischen und präparativen Auftrennung von DNA und RNA wurden 0,5 bis 1,5 %ige (w/v) Agarosegele verwendet (Maniatis 1982). Dazu wurden 100 ml 1 x TAE-Puffer mit der entsprechenden Menge Agarose aufgeköcht, bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte. Nachdem die Lösung auf unter 60°C abgekühlt war, wurde sie mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und als ein Flachbettgel (14 x 11 cm) gegossen. Als die Gelmatrix vollständig verfestigt war, wurde das Agarosegel in eine Elektrophoresekammer mit 1 x TAE-Laufpuffer gelegt, der ebenfalls 0,5 µg/ml Ethidiumbromid enthielt. Die aufzutrennenden Proben wurden mit TAE-Probenpuffer (4.6.1) (1 x Endkonzentration) versetzt und bei 80 bis 120 V für 1-2 Stunden elektrophoretisch getrennt. Eine visuelle Detektion der Nukleinsäure ist durch Anregung des in die doppelsträngigen Bereiche interkalierten Ethidiumbromid mit langwelligem UV-Licht möglich. Die emittierte Fluoreszenz konnte auf einem Transilluminator (Herolab UVT 2035) bei 302 nm visualisiert werden. Zur Dokumentation wurden die Gele mit einer SW-Kamera (Sanyo B/W CCD, Modell VC 25-12) mit einem UV-Filter, aufgenommen und mittels eines Videoprinters (Mitsubishi P67E) auf Thermopapier (4.8) ausgedruckt.

Für präparative Gele wurde 'ultrapure' Agarose verwendet und die Visualisierung der Nukleinsäuren erfolgte bei 320 nm. Bei RNA-Auftrennung wurde die Elektrophoresekammer und der Gelschlitten vorher 1-2 h mit 0,1% DEPC-Lösung behandelt, um eventuell vorhandene Nukleasen zu inaktivieren.

5.2.5.2 Native Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

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

Die native PAGE wurde zur Analyse kurzer DNA-Fragmente und für die Verzögerungsgelelektrophorese (5.3.3) verwendet. Es wurden 5%ige Gellösungen mit einer Vernetzung von 46:1 (Acrylamid:Bisacrylamid) angesetzt und die Polymerisation wurde durch die Zugabe von 0,05 % (v/v) TEMED und 0,5 % (v/v) 10 % APS gestartet. Die Gellösung wurde zwischen zwei saubere Glasplatten gegossen. Das auspolymerisierte Gel (330 x 250 x 1 mm) wurde in die Elektrophoresekammer eingespannt. Als Laufpuffer wurde 0,5 x TBE-Puffer (4.6.1) verwendet. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit entsprechendem Volumen TBE-Probenpuffer (4.6.1) versetzt und bei Raumtemperatur und 20-30 mA elektrophoretisch aufgetrennt. Um ein Aufheizen des Gels zu verhindern, wurde ein Ventilator vor die Apparatur gestellt. Die Visualisierung der aufgetrennten Nukleinsäuren und deren Komplex mit Transkriptionsfaktoren erfolgte mittels Autoradiographie (5.2.6.4).

5.2.5.3 Temperaturgradienten-Gelelektrophorese (TGGE)

Die Temperaturgradienten-Gelelektrophorese, kurz TGGE, (Rosenbaum and Riesner 1987; Riesner *et al.* 1989) ermöglicht eine Strukturanalyse von RNA-, DNA-Molekülen und Protein-Nukleinsäure-Komplexen. Dabei wird ein linearer Temperaturgradient im rechten Winkel zur Elektrophoreselaufrichtung angelegt. Dies ermöglicht, dass jedes Molekül bzw. jeder Komplex einer konstanten Temperatur ausgesetzt ist, bei der eine dementsprechende Struktur eingenommen wird. Diese verursacht je nach eingenommenen dreidimensionalen Zustand eine mehr oder weniger starke Verzögerung in der Gelmatrix. Zur Auftrennung wurde ein 5%iges natives PAA-Gel (5.2.5.2) verwendet, welches zur besseren Handhabung auf eine

Gelbondfolie (4.8) polymerisiert wurde. Als Laufpuffer wurde 0,5 x TBE-Puffer verwendet. Zunächst wurde das Gel mit der Seite der Gelbondfolie auf die horizontale Heizplatte gelegt, welche auf die niedrigere Temperatur vortemperiert wurde. Zur besseren Wärmeleitfähigkeit zwischen Platte und Gel diente eine dünne luftblasenfreie Schicht 30%ige Glycerinlösung. Der sechsfache Bindeansatz (5.3.3) wurde mit TBE-Probenpuffer auf 0,5 x TBE eingestellt und in die lange Tasche (1 x 130 x 1,5 mm) gegeben, ein einfacher Bindeansatz auf die beiden kleinen Taschen (1 x 5 x 1,5 mm) am Rand verteilt und 15 min bei 300 V elektrophoretisiert. Nach dem Einlaufen der Probe wurde die Tasche vorsichtig mit 0,5 x TBE-Puffer gefüllt und das Gel luftblasenfrei (auch an der Tasche!) mit einer Folie bedeckt, sodass nur die äußeren Ränder zugänglich blieben, an denen über sterile Schwämme der Kontakt für die Elektrophorese angelegt wurde. Anschließend wurde bei 50 V für 15 min elektrophoretisiert bis der lineare Temperaturgradient sich eingestellt hatte. Danach wurde die Elektrophorese bei 250-300 V fortgesetzt. Die Visualisierung der aufgetrennten Nukleinsäuren erfolgte mittels Autoradiographie (5.2.6.4) oder Ethidiumbromid-Färbung (5.2.6.1).

5.2.5.4 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (dPAGE)

Die denaturierende PAGE trennt Nukleinsäuren strukturunabhängig anhand des Molekulargewichts. Durch die Verwendung von 7 M Harnstoff und hohen Geltemperaturen verläuft die Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen. Es wurden 10 und 15%ige Gele (310 x 395 x 0,5 mm, 20:1 Vernetzung Acrylamid:Bisacrylamid) benutzt, die in drei Stufen vorgeheizt wurden (10 min 25 W, 10 min 50 W, 10 min 75 W). Als Laufpuffer wurde 1 x TBE-Laufpuffer verwendet. Die zu analysierenden Nukleinsäureproben wurden mit Formamid- oder Harnstoff-Probenpuffer versetzt, 3 min bei 96°C denaturiert und danach sofort auf Eis überführt. Anschließend wurden die Proben auf das vorgeheizte Gel aufgetragen und bei 75 bis 100 W aufgetrennt. Bei dieser Leistung beträgt die Außentemperatur des Gels etwa 70°C. Um die radioaktive Kontamination des Anodenpuffers gering zu halten, wurde die Anodenseite der Platten mit DE-81 Ionenaustauscherpapier (4.8) umwickelt. Die aufgetrennten Proben wurden über Autoradiographie (5.2.6.4) sichtbar gemacht.

5.2.5.5 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Um Proteine unter denaturierenden Bedingungen in Abhängigkeit ihres Molekulargewichtes zu trennen, wurde die diskontinuierliche Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli 1970) eingesetzt. Bei einer diskontinuierlichen Elektrophorese werden ein engporiges Trenngel und ein weitporiges Sammelgel miteinander kombiniert, wobei durch unterschiedliche pH-Werte in Trenn- und Sammelgel die Auflösung erhöht wird. Das 6%ige Sammelgel fokussiert die Proteine zuerst und die Separation erfolgt anschließend im 15%igen Trenngel. Natriumdodecylsulfat (SDS) wirkt als denaturierendes Agens, in dem die hydrophoben Reste der SDS-Anionen an die Proteinketten (1,4 g SDS/g Protein) binden und dadurch ein festes Verhältnis von Proteinmasse zu Ladung gewährleistet. Auf diese Weise wird die Eigenladung überdeckt und es erfolgt eine Auftrennung der Proteine nach dem Molekulargewicht.

Nach der isoelektrischen Fokussierung (5.3.7) der Proteine und der Auftrennung nach ihrem isoelektrischen Punkt wurden die proteinhaltigen pH-Streifen auf das auspolymerisierte Sammelgel gelegt. Der Molekularmarker (12 µl) wurde vor dem Auftragen mit 3 µl β-Mercaptoethanol versetzt, 3 min bei 96°C denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Danach wurde der Proteinmolekularmarker auf 3 MM Chromatographiepapier (4 x 4 mm) pipettiert, neben den pH-Streifen auf das Sammelgel gelegt und beides luftblasenfrei mit 0,5%iger Agaroselösung überschichtet. In die Anodenkammer wurde 1 x und in die Katodenkammer 2 x SDS-Laufpuffer gefüllt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 30°C über Nacht mit dem Elektrophoresesystem (GE Healthcare Ettan DALTsix), mit dem bis zu sechs Gele parallel gefahren werden konnten. Zunächst wurde 1 h 80 V (10 mA/Gel und 1 W/Gel) und anschließend 150 V (12 mA/Gel und 2 W/Gel) Spannung über Nacht (15-18 h) angelegt. Zur Visualisierung der aufgetrennten Proteine wurde das Gel anschließend mit Coomassie (5.2.6.3) gefärbt.

Trenngel	15 % (w/v) Acrylamid-/Bisacrylamid-Lösung (30:1)
	375 mM Tris-HCl, pH 8,8
	0,1 % (w/v) SDS

Sammelgel	6 % (w/v) Acrylamid-/Bisacrylamid-Lösung (30:1) 125 mM Tris-HCl, pH 6,8 0,1 % (w/v) SDS
1 x SDS-Puffer:	50 mM Tris-HCl, pH 8,8 380 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS

5.2.6 Nachweismethoden von Nukleinsäuren und Proteinen

5.2.6.1 Ethidiumbromid-Färbung von Nukleinsäuren

Die Nachweisgrenze von doppelsträngiger DNA beträgt bei der Ethidiumbromid-Färbung 10-20 ng pro Bande in PAA-Gelen (5.2.5.2) und 20-30 ng pro Bande in Agarosegelen (5.2.5.1). Bei Letzteren wurde sowohl in die Gellösung als auch in den Laufpuffer Ethidiumbromid mit einer Konzentration von 0,5 µg/ml eingesetzt. PAA-Gele wurden nach der Auftrennung 20 min in einer EtBr-Färbelösung (2 µg/ml EtBr in *Aqua dest.*) geschwenkt. Insbesondere bei präparativen Gelen liegt der Vorteil dieser Nachweismethode darin, dass sie reversibel ist. Durch Anregung mit langwelligem UV-Licht (302 nm) konnten die Nukleinsäuren durch Interkalation des Ethidiumbromids in doppelsträngigen Bereiche auf einem Transilluminator (Herolab UVT 2035) detektiert werden. Zur Dokumentation wurden die Bandenmuster mit einer SW-Kamera (Sanyo B/W CCD, Modell VC 25-12) mit einem UV-Filter, aufgenommen und mittels eines Videoprinters (Mitsubishi P67E) auf Thermopapier (4.8) ausgedruckt.

5.2.6.2 Silberfärbung von DNA

Mit der Silberfärbung (Beidler *et al.* 1982) können Nukleinsäuremengen ab 5 ng nachgewiesen werden. Die Methode beruht auf reduktiver Einlagerung von Silberionen an Oberflächen. Die Reduktion erfolgt durch Formaldehyd in der Entwicklerlösung. Nach der Elektrophorese wird das Gel erst 5 min in Fixierlösung I und anschließend 10 min in

Silbernitratlösung (1,9 g/l AgNO₃) geschwenkt. Nach mehrmaligem Waschen mit *Aqua dest.* erfolgte die Visualisierung des Bandenmusters durch Schwenken in frisch angesetzter Entwicklerlösung. Bei Erreichen der gewünschten Bandenintensität wurde die Reaktion durch 10 min Inkubation in Fixierlösung II gestoppt.

Fixierlösung I	10 % (v/v) Ethanol 0,5 % (v/v) Essigsäure
Entwicklerlösung	15 g NaOH 0,08 g Natriumborhydrid (Na ₂ BH ₄) 4 ml Formaldehyd ad 1 l <i>Aqua dest.</i>
Fixierlösung II	0,75 % (w/v) Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)

5.2.6.3 Coomassie-Färbung von Proteinen

Der Nachweis von Proteinen in Polyacrylamidgelen erfolgte bei der Coomassie-Färbung mit dem Farbstoff 'Coomassie Brilliant Blue R250' für eine Stunde auf einem Horizontalschüttler. Mit Hilfe der Entfärbelösung wurde das Gel solange entfärbt, bis der Hintergrund hellblau bis klar war und die Proteinbanden deutlich zu erkennen waren. Die Gele wurden anschließend in Folie eingeschweißt und gescannt (Mustec P3600). Mit der Coomassie-Färbung können Proteinbanden ab 300 ng nachgewiesen werden, zudem ermöglicht es diese Methode eine quantitative Aussage über Proteinkonzentrationen im Gel zutreffen.

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

5.2.6.4 Autoradiographie

Der Nachweis radioaktiv markierter Nukleinsäuren in Polyacrylamidgelen erfolgte über die Belichtung von Röntgenfilmen. Nach der Elektrophorese wurden die Gele auf einen alten Röntgenfilm oder auf Whatman 3 MM Papier aufgezogen, mit Polyethylenfolie bedeckt und in eine Expositionskassette (Siemens) gelegt. In der Dunkelkammer wurde ein Röntgenfilm (Kodak X-OMAT AR oder FUJI RX) auf das Gel gelegt, und dieser für 2 bis 10 Tage bei -20°C exponiert. Falls nötig wurde zusätzlich noch eine Verstärkerfolie (DuPont Cronex) aufgelegt und der Röntgenfilm bei -70°C exponiert.

Die Entwicklung der Röntgenfilme erfolgte in einem Tetenal Roentogen Entwicklerbad für 2-4 min durch Reduktion der im Film enthaltenen Silberionen. Der Entwicklungsprozess wurde in 3 %iger Essigsäure gestoppt (30 sec), anschließend wurde in einem Tetenal Fixierbad für 3 min fixiert. Zum Schluss wurden die Röntgenfilme mit Wasser abgespült, getrocknet und gegebenenfalls gescannt (Mustec P3600).

5.2.6.5 Densitometrie

Zur quantitativen Auswertung von radioaktiv markierten Nukleinsäuren wurden Phosphoimager Screens (BAS 2340, FUJI) auf die Polyacrylamidgele gelegt und diese 2-5 h bei Raumtemperatur exponiert. Anschließend wurden die Screens mit einem Phosphoimager (BioImager FAS 3000) gescannt und mit Hilfe der Computersoftware *Image Reader Fla. V.1.8 E* und *Image Gauge V3.0* ausgewertet. Dabei wurde für jede Bande nach Abzug von Hintergrund ein Schwärzungswert ermittelt, der mit anderen verglichen werden konnte.

5.2.7 Enzymatische Reaktionen

5.2.7.1 Restriktionshydrolysen von DNA

Bei denen in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzymen handelte es sich ausschließlich um Endonukleasen des Typs II (Zabeau 1979) bei denen die Erkennungs- und die Spaltungssequenz übereinstimmen. Die hydrolytische Spaltung doppelsträngiger DNA führte, abhängig vom verwendeten Enzym, zu glatten ('*blunt*') oder zu 3'- bzw. 5'-überhängenden ('*sticky*') Enden. Bei den Hydrolysen wurde in Bezug auf Temperatur und Pufferbedingungen den Herstelleranweisungen gefolgt. Bei präparativen Ansätzen wurde eine DNA-Konzentration von 1 µg/µl nicht überschritten. Wurden die erhaltenen Fragmente in weitere enzymatische Reaktionen eingesetzt, folgte nach der Restriktion eine Phenol/Chloroform Extraktion (5.2.3.1) und eine Ethanol-fällung (5.2.3.2). Die entstandenen Restriktionsfragmente wurden anschließend auf Agarosegelen oder auf Polyacrylamidgelen (5.2.5) analysiert.

5.2.7.2 Klenow-Markierung von DNA-Fragmenten

Mit Hilfe des Klenow-Fragments können, aufgrund der fehlenden 5'-3'-Exonukleaseaktivität, doppelsträngige DNA-Fragmente mit 5'-überhängenden Enden mit den entsprechenden komplementären Nukleotiden aufgefüllt werden. Bei Verwendung von radioaktiven Nukleotiden werden die 3'-Enden radioaktiv markiert. Dazu wurde in einem 25 µl Ansatz 0,5-1 µg geschnittenes DNA-Fragment, 5 U Klenow-Polymerase, je 400 µM des nicht-radioaktiven dNTP's und 2 µCi des [α -³²P]dNTP (dATP oder dCTP mit 3000 Ci/mmol) in 1 x Klenow-Puffer für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Ansatz wurde mit TE-Puffer auf 50 µl aufgefüllt und eine Phenol/Chloroform-Extraktion (5.2.3.1) sowie eine Ethanol-fällung (5.2.3.2) durchgeführt. Das lyophilisierte Fragment wurde in TE-Puffer aufgenommen und in Retardierungsanalysen (5.3.3) und als Standard in *in vitro* Transkriptionen (5.3.5) verwendet.

10 x Klenow-Puffer:	500 mM Tris-HCl, pH 7,2
	100 mM MgSO ₄
	1 mM DTT
	500 µg/ml BSA, acetyliert

5.2.7.3 5'-Phosphorylierung zur radioaktiven Markierung von DNA-Oligonukleotiden

Synthetisch hergestellte Desoxyoligonukleotide sind am 5'-Ende unphosphoryliert und können deshalb ohne vorangegangene Dephosphorylierung in einer Kinasierungsreaktion mit [γ -³²P]-ATP am 5'-Ende radioaktiv markiert werden, um als Sonde eingesetzt werden zu können. Dabei wird die γ -Phosphatgruppe des ATP's mit der freien 5'-OH-Gruppe der Nucleinsäure durch das Enzym T4-Polynukleotidkinase (PNK) kovalent verknüpft. In einem Reaktionsvolumen von 25 µl wurden 10 pmol ssDNA-Oligonukleotide, 50 µCi [γ -³²P]-ATP, 1 Unit T4-PNK in 1 x Kinasepuffer für 45 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde das Enzym für 20 min bei 68°C inaktiviert und das Oligonukleotid wurde durch Zugabe von 1/20 Volumen Glykogen (20 µg/ml), 1/10 Volumen 7,5 M Ammoniumacetat (NH₄OAc, pH 5,0) und 4 Volumen absoluten Ethanol auf flüssigem Stickstoff gefällt, zentrifugiert, anschließend gewaschen und getrocknet. Das Pellet wurde in 20 µl TE-Puffer aufgenommen und gelöst. Zur Bestimmung der Markierungseffizienz wurde 1 µl Aliquot des markierten Oligonukleotids im Szintillationszähler vermessen. Für die folgenden *primer extension*- (5.3.1) oder *primer extension*-Sequenzierungsexperimente (5.3.2) wurden jeweils 3 x 10⁵ bis 1 x 10⁶ cpm eingesetzt.

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

5.2.7.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mit der Polymerasekettenreaktion können Nukleinsäurefragmente *in vitro* spezifisch amplifiziert werden. Dabei hybridisieren Oligonukleotide sequenzspezifisch flankierend an die Ziel-DNA (*annealing*) und werden von einer thermostabilen DNA-Polymerase verlängert (Amplifikation). Durch anschließende Denaturierung werden die gebildeten Doppelstränge getrennt und durch wiederholte Zyklen von Hybridisierung der Oligonukleotide, deren Verlängerung und Denaturierung durch Temperaturveränderung kommt es zu einer exponentiellen Amplifikation der Ziel-DNA. Die verwendete Phusion *high-fidelity* DNA-Polymerase besitzt eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität (*proof reading correction*), wodurch die Fehlerrate beim Nukleotideinbau sehr gering gehalten wird ($4,4 \times 10^{-7}$, Finnzymes). Die Hybridisierungstemperaturen der Oligonukleotide wurden mit der *nearest neighbor*-Methode (www.finnzymes.com) kalkuliert.

Die Reaktion erfolgte in 1 x Phusion HF-Puffer (1,5 mM MgCl₂, Finnzymes) mit je 200 µM dNTP, 0,5-1 ng *template*-DNA, 0,5 µM jedes Oligonukleotid (Oligo-6S-D und Oligo-6S-E) und 0,4 U Phusion *high-fidelity* DNA-Polymerase pro 20 µl Ansatz. Zehn verschiedenen *annealing*-Temperaturen zwischen 56-65°C wurden gewählt, um die Temperatur zu ermitteln, bei der die größte Ausbeute des gewünschten Produkts gefunden werden konnte. 35 Amplifikationszyklen des PCR-Programms wurden in einem Thermocycler (Eppendorf, Mastercycler epgradient S) durchlaufen.

PCR-Programm:	initiale Denaturierung:	30 sec 98°C	
	Amplifikationszyklen:	8 sec 98°C	(Denaturierung)
		20 sec 56-65°C	(<i>annealing</i>)
		15 sec 72°C	(Verlängerung)
	finale Produktverlängerung	5 min 72°C	

Analytische Agarosegelelektrophorese (5.2.5.1) zeigte, dass alle geprüften Temperaturen nur ein Produkt in gleicher Ausbeute lieferte, weswegen alle PCR-Ansätze vereinigt wurden und das DNA-Fragment über ein 0,5%iges präparatives Agarosegel getrennt und daraus isoliert wurde (5.2.3.4), bevor es in die Ligation eingesetzt wurde.

5.2.7.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Bei der Ligation werden DNA-Moleküle kovalent miteinander verknüpft. Für die hier verwendete 'blunt'-Ligation wurde 1 U der T4-DNA-Ligase, 60 ng geöffnetes Plasmid (hier pKK232-8 mit *Sma*I hydrolysiert) mit verschiedenen Vektor- zu Insertverhältnissen (1:5 und 1:10), in 1 x Ligasepuffer und einem Reaktionsvolumen von 10 µl über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Ansätze wurden anschließend in Transformationsexperimente (5.1.4) eingesetzt.

1 x Ligasepuffer	50 mM Tris-HCl, pH 7,5
	10 mM MgCl ₂
	10 mM DTT
	1 mM ATP

5.3 Spezielle molekularbiologische Methoden

5.3.1 *Primer extension* zur quantitativen Analyse von RNA

Primer-Extension Reaktionen wurden ähnlich der von Stern beschriebenen Methode durchgeführt (Stern *et al.* 1988). Bei der Primer-Extension wird die zu analysierenden RNA als *template* genutzt, von welchem eine virale Reverse Transkriptase (*AMV*) *in vitro* eine sequenzspezifische 'complementary' DNA (cDNA) synthetisiert. Diese cDNA-Fragmente geben indirekt die Fragmentlängen der RNA wieder und können über dPAGE aufgetrennt werden. Für die Primer-Extension wurde zunächst mit [γ -³²P]ATP markiertes spezifisches Oligonukleotid (5.2.7.3) an die zu untersuchende, aufgereinigte und DNA-freie RNA hybridisiert. Hierzu wurden 0,5-1 µg RNA mit 1-2 µl spezifischem Oligonukleotid ($3 \times 10^5 - 6 \times 10^5$ cpm) in 100 mM KCl, 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) in einem Volumen von 4,5 µl bei 68°C für 3 min inkubiert und dann langsam (1°C/min) auf Raumtemperatur (<28°C) abgekühlt. 2 µl dieses Hybridisierungsansatzes wurden anschließend mit 3 µl Prämix versehen, bestehend aus 1 µl 5 x *AMV*-Puffer und 2 µl einer 4dNTP-Lösung, die 1 Unit *AMV* reverse Transkriptase enthielt. Nach der Inkubation von 30 min bei 42°C wurde die Reaktion

durch Zugabe von 5 µl Formamid- oder Harnstoff-Probenpuffer gestoppt. Vor dem Auftragen auf eine 10% oder 15% dPAGE (5.2.5.4) wurden die Proben 3 min bei 96°C denaturiert.

5x *AMV*-RT-Puffer: 125 mM Tris-HCl, pH 8,3
125 mM KCl
125 mM DTT
125 mM MgCl₂

4dNTP-Lösung: je 330 µM dATP, dCTP, dGTP, dTTP und 1 U *AMV*-RT/Ansatz in 60 mM Tris-HCl, pH 7,5

5.3.2 *Primer extension*-Sequenzierung von RNA

Die Primer-Extension-Sequenzierung erfolgte analog zur Primer-Extension-Reaktion (5.3.1), wobei das Volumen der Hybridisierung 8.5 µl betrug. Für die Sequenzierungsreaktion wurden in einem Gesamtvolumen von 6 µl 2 µl des Hybridisierungsansatzes mit 2 µl des jeweiligen d(d)NTP-Mixes und einer Unit *AMV*-RT in 1 x *AMV*-RT-Puffer 30 min bei 42°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 6 µl Harnstoff-Probenpuffer gestoppt und wie beschrieben über dPAGE (5.2.5.4) analysiert.

d(d)NTP-Mix: je 250µM dATP, dCTP, dGTP, dTTP, zusätzlich dazu im:
A-Mix: 50 µM ddTTP
C-Mix: 50 µM ddGTP
G-Mix: 50 µM ddCTP
T-Mix: 50 µM ddTTP
alle in 60 mM Tris-HCl, pH 7.5

5.3.3 Retardierungsanalysen (*Gelshift*-Experimente)

Die Retardierungsanalysen kann zur qualitativen und quantitativen Analyse von DNA-Promotorfragmenten und Transkriptionsfaktoren herangezogen werden. Diese Methode zur Analyse der Bindung beruht auf einem verzögerten Laufverhalten von DNA-

Proteinkomplexen im Vergleich zu freier DNA. Die Verringerung der Mobilität im Gel von diesen Komplexen kann sowohl durch das größere Molekulargewicht als auch durch eine proteininduzierte Konformationsänderung der DNA verursacht werden.

Die Retardierungsanalysen wurden mit radioaktiv markierten Promotorfragmenten (4.3.2) und mit Transkriptionsfaktoren (4.4.3) durchgeführt. In einem Reaktionsvolumen von 14 μ l wurden jeweils 2 nM Promotorfragment mit unterschiedlichen Konzentrationen des Transkriptionsfaktors (verdünnt im jeweiligen TGED-Puffer) in Anwesenheit von 1 x Bindepuffer 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei wurde für die Titrationsreihe mit einem Protein beachtet, dass die Summe von Proteinlösung und TGED-Puffer gleich war, so dass identische Salzkonzentrationen vorlagen. Danach wurde Heparin zugegeben (50 ng/ μ l), um unspezifische Wechselwirkungen zwischen DNA und Protein zu unterbinden. Anschließend wurden die Proben mit 5 μ l 2 x TBE-Probenpuffer versetzt und auf einem 5%igen nativen PAA-Gel (46:1 Acrylamid: Bisacrylamid) getrennt (5.2.5.2). Die Visualisierung der Komplexbanden erfolgte über Autoradiographie (5.2.6.4).

10 x Bindepuffer	500 mM Tris-HCl, pH 7,4
	700 mM KCl
	150 mM NaCl
	10 mM EDTA, pH 8,0
	100 mM β -Mercaptoethanol
TGED-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 8,0
	5% Glycerin
	0,1 mM EDTA, pH 8,0
	0,1 mM DTT
	200 mM (TGED ₂₀₀) oder 300 mM (TGED ₃₀₀) NaCl

5.3.4 'Maxam-Gilbert'-Sequenzierung von DNA

Für die DNase I *footprint*-Analysen war es notwendig einen Längenstandard der verwendeten DNA als Sequenzierspuren für die Gelelektrophorese bereitzustellen. Die Sequenzierung erfolgte durch eine basenspezifische, chemische Spaltung endmarkierter DNA nach Maxam

und Gilbert (Maxam and Gilbert 1980). Dabei wurden die Purine (Adenin und Guanin) mit Formiat chemisch modifiziert. Durch die Inkubation mit Piperidin bei 90°C wurden die anschließende Abspaltung der modifizierten Basen und die Katalyse der Strangbrüche an den depurinierten Basenpositionen bewirkt.

Die Sequenzierungsreaktion wurde wie folgt durchgeführt: In einem Volumen von 10 µl wurde [α -³²P]-endmarkierte DNA (1.000.000 cpm) aus einer Klenow-Markierung (5.2.7.2) mit 1 µg der entsprechenden, nicht markierten, DNA versetzt und das Volumen mit *Aqua dest.* eingestellt. Es wurden 25 µl Formiat (Ameisensäure) zugegeben und der Ansatz für 3 min 45 sec bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 200 µl Hydrazinpuffer gestoppt. Die DNA wurde mittels absolutem Ethanol in flüssigem Stickstoff gefällt (5.2.3.2), anschließend zweimal mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und danach lyophilisiert (Savant, Speedvac Concentrator). Zur vollständigen Entfernung von Formiat und Hydrazinpuffer wurde das Pellet in 200 µl *Aqua dest.* resuspendiert und erneut mit Ethanol gefällt, gewaschen und lyophilisiert. Dann erfolgten die Abspaltung der modifizierten Basen und die Induktion der Strangbrüche durch die Inkubation der DNA in 10 % (v/v) Piperidin für 30 min bei 90°C. Der Ansatz (70 µl) wurde daraufhin, zur Entfernung des Piperidins, für mehrere Stunden lyophilisiert. Anschließend wurde das DNA-Pellet in 30 µl *Aqua dest.* aufgenommen und Piperidinreste durch erneute Evaporation entfernt. Dieser Vorgang wurde noch zweimal mit je 20 µl *Aqua dest.* wiederholt. Im Anschluss daran wurde das DNA-Pellet in 50 µl *Aqua dest.* resuspendiert, mit 2,5 µl Glykogen (20 mg/ml) versetzt und noch einmal in flüssigem Stickstoff Ethanol gefällt, gewaschen und evaporiert. Zum Schluss wurde das Pellet im Szintillationszähler (Beckman, LS 5000 TD) gemessen und in 10 µl TE-Puffer aufgenommen.

Hydrazin-Puffer: 300 mM Na-Acetat, pH 5,0
 100 mM EDTA, pH 8,0
 25 µg/ml Glykogen

5.3.5 *in vitro* Transkriptionen

Bei *in vitro* Transkriptionen können die Transkriptionseinheiten von der DNA abhängigen RNA-Polymerase aus *E. coli* abgelesen werden. Bei Verwendung von superspiralisierten (*ccc'*) Plasmiden, die den zellulären Verhältnissen näher kommen, sind intrinsische Terminatorstrukturen am Ende des Transkriptionsbereiches notwendig. Hier beendet die RNA Polymerase die Transkription, dissoziiert vom *template* ab und kann am Promotor erneut die Transkription beginnen.

5.3.5.1 *in vitro* Transkriptionen mit superspiralisierten Plasmiden

Zur Untersuchung der Transkriptionsregulation der *ssrS*-Promotoren, wurden *in vitro* Transkriptionen mit dem RNA-Polymerase-Holoenzymen $E\sigma^{70}$ und $E\sigma^{38}$ und den Transkriptionsfaktoren FIS, H-NS, LRP und StpA durchgeführt. Hierzu wurde das superspiralisierte DNA-Plasmid p6S-T verwendet, welches den *upstream*-Bereich des *ssrS*-Gens mit beiden Promotoren P1 und P2 enthält. Die Transkriptionen mit dem Holoenzym $E\sigma^{38}$ fand in Anwesenheit von 160 mM und die mit $E\sigma^{70}$ bei 80 mM Kaliumglutamat statt.

In einem Gesamtvolumen von 50 μ l wurden 5 nM superhelikales *template*, Startnukleotide (bei $E\sigma^{70}$: für P1: 500 μ M GTP und 50 μ M ATP; bei $E\sigma^{38}$: für P2: 500 μ M ATP und 50 μ M CTP), 20 μ Ci [α - 32 P]-NTP (3000 Ci/mmol) der Proteinlösung (unter Berücksichtigung des jeweiligen TGED-Puffers) und 9 nM aktive RNAP in dem jeweiligen 1 x KGlu-Puffer für 10 min bei 30°C inkubiert. Nach Zugabe von 50 ng/ μ l Heparin und weiterer Inkubation bei 30°C für 5 min wurde die Reaktion durch die Zugabe von 3,25 μ l 4dNTP-Lösung (je 10 mM ATP, CTP, GTP, UTP) gestartet. Nach 5 min bei 30°C wurde der Ansatz mit 7,6 μ l *chase*-Lösung versetzt, erneut 5 min bei 30°C inkubiert und ein Aliquot mit Formamid-Probenpuffer gemischt, der zusätzlich 1 μ l radioaktiv markiertes P1-Fragment (4.3.2) als Standard enthielt. Die Proben wurden für drei Minuten bei 96°C denaturiert, sofort auf Eis überführt und auf einem 10 %igen denaturierenden Polyacrylamidgel (5.2.5.4) aufgetrennt.

10 x Kaliumglutamat -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 oder 1.6 M Kaliumglutamat
<i>chase</i> -Lösung:	je 2 mM rATP, rCTP, rGTP, rUTP
	2 mg/ml Heparin
	1 mM Tris-HCl, pH 7,0

5.3.5.2 Rekonstitution von RNA-Polymerasen

Die in dieser Arbeit verwendeten DNA abhängigen RNA-Polymerasen $E\sigma^{70}$ und $E\sigma^{38}$ wurden durch Reassemblierung des *core*-Enzyms mit dem jeweiligen Sigmafaktor erhalten. Sowohl das *core*-Enzym als auch die Sigmafaktoren lagen in hoher Reinheit vor. Die Rekonstitution erfolgte durch die Vorlage der *core*-Enzymlösung, welche vorher mit AB-Diluent verdünnt wurde. Die mit 1 x TGDE verdünnten Sigmafaktoren wurden vorsichtig hinzu gegeben und das benötigte Volumen mit AB-Diluent eingestellt. Die Rekonstitutionsansätze wurden eine Stunde auf Eis inkubiert.

Die Aktivität des $E\sigma^{70}$ -Holoenzym wurde mit Hilfe des Chamberlin-Assays bestimmt, danach sind nur ca. 20 % des rekonstituierten $E\sigma^{70}$ -Holoenzym aktiv. Die Aktivitätsmessung des $E\sigma^{38}$ -Holoenzym wurde über vergleichende 'multiple round' *in vitro* Transkriptionen bestimmt. Für die Rekonstitution der RNAP-Holoenzyme wurden die folgenden molaren *core*-Enzym: Sigmafaktor Verhältnisse eingesetzt (angelehnt an (Reckendrees 2004; Gildehaus 2005).

$$core : \sigma^{70} = 1 : 15$$

$$core : \sigma^{38} = 1 : 180$$

AB-Diluent:	10 mM Tris-HCl, pH 8,0
	10 mM MgCl ₂
	10 mM β -Mercaptoethanol
	50 mM NaCl
	100 μ g/ml BSA, acetyliert
	0,1 mM EDTA, pH 8,0
	5 % (v/v) Glycerin

5.3.6 Transkriptomanalysen

Die Transkriptom-Analysen wurden im Forschungszentrum Jülich am Institut für Biotechnologie in Zusammenarbeit mit Dr. Tino Polen durchgeführt.

5.3.6.1 Synthese fluoreszenzmarkierter cDNA-Sonden

Für den Vergleich genomweiter Genexpressionsmuster wurden fluoreszenzmarkierte cDNA-Sonden synthetisiert, die der gleichen Menge der zu vergleichenden RNA-Proben (15-25 μ g) entsprach. Die Synthese erfolgte durch Umschreibung präparierter RNA in cDNA mittels reverser Transkriptase (Superscript II, 4.4.2) mit Zufallshexamer-Primern (4.3.1) im 30 μ l-Ansatz. Als Fluoreszenzfarbstoffe wurden jeweils die dUTP-Analoga Cy3-dUTP ($\lambda_{\text{EX max}}$ 550 nm, $\lambda_{\text{EM max}}$ 570 nm) oder Cy5-dUTP ($\lambda_{\text{EX max}}$ 649 nm, $\lambda_{\text{EM max}}$ 670 nm) mit je 100 μ M (4.3.3) im Nukleotidmix (500 μ M dATP, dGTP, dCTP, 200 μ M dTTP, Invitrogen) eingesetzt. Nach der Synthese (2 h, 42°C) wurde die RNA in 25 mM NaOH hydrolysiert (10 min, 70°C), mit HCl neutralisiert und der Ansatz (50 μ l) zum Abtrennen von nicht eingebauten Nukleotiden mit Wasser in 500 μ l verdünnt und über Membranen (Microcon YM-30, Millipore, Schwalbach) durch Größenausschluss eingengt (3 Wiederholungen, Vereinigung von Cy3- und Cy5-markierter Sonde nach der ersten Wiederholung). Die so erhaltene Cy3- bzw. Cy5-markierte cDNA-Sonde (in 5-15 μ l) der zu vergleichenden RNA-Proben wurden sofort in Hybridisierungsexperimenten eingesetzt.

5.3.6.2 Hybridisierungsexperimente mit *E. coli* DNA-Chips und fluoreszenzmarkierter cDNA-Sonden

Die verwendeten *E. coli* DNA-Chips wurden von Operon bezogen und basieren auf gespotteten 70mer Oligo-DNA-Nukleotiden (Operon *E. coli* Genome AROSTTM Version 2.0, 4.8). Diese DNA-Chips umfassen 9308 Oligonucleotide von insgesamt vier verschiedenen *E. coli* Genomen und 3 Plasmiden. Die Anzahl der ORFs ist wie folgt: 4269 ORFs von K12, 5306 ORFs von O157:H7 (EDL933), 5251 ORFs von O157:H7 (Sakai), 5366 ORFs von CFT073, 3 Gene von OSAK1, 10 Gene von pO157_Sakai und 97 Gene von pO157_EDL933. In dieser Arbeit wurde sich auf die Auswertung der ORFs des K12-Stamms beschränkt. Jedes Oligonukleotid hat einen Amino-Linker am 5'-Ende für die kovalente Kopplung an die beschichtete Glasoberfläche.

Zur Bestimmung relativer mRNA-Spiegel wurden die aus den beiden zu vergleichenden RNA-Proben erhaltenen Cy3- und Cy5-fluoreszenz markierten cDNA-Sonden gleichzeitig auf einem DNA-Chip hybridisiert. Dazu wurden die vereinigten und aufgereinigten Cy3- / Cy5-markierten cDNA-Sonden (<5 µl Volumen) in 55 µl Hybridisierungspuffer (Operon) aufgenommen, 5 min bei 65°C denaturiert und auf den vorbereiteten Chip gegeben. Die Hybridisierung erfolgte bei 42°C über Nacht in einer Hybridisierungsstation Molecular Devices (MAUI, Biomicro). Sowohl die Vorbehandlung der DNA-Chips als auch das stringente Waschen nach der Hybridisierung wurde entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt (Hybridisierungs-Puffer-Kit OPHYB-1, Operon). Die Messung der Fluoreszenz erfolgte direkt nach dem Waschen und Trocknen (Zentrifugation für 10 min bei 200 x g) der DNA-Chips.

5.3.6.3 Messung und Quantifizierung der Fluoreszenz hybridisierter DNA-Chips

Zur Bestimmung relativer mRNA-Spiegel wurde die Cy3- und Cy5-Fluoreszenz der Spots gemessen. Das Verhältnis von Cy3- und Cy5-Fluoreszenz eines Spots korreliert direkt mit dem Verhältnis der Anzahl der mRNA-Moleküle in den verglichenen RNA-Proben und ist ein Maß für den relativen mRNA-Spiegel (Shalon *et al.* 1996).

Zum Messen der orts aufgelösten Fluoreszenz auf den DNA-Chips wurde der GenPix 4000 A laser scanner (Axon Inc.) verwendet. Dieser bestrahlt die DNA-Chip-Oberfläche (10 x 10 µm Raster) zum Anregen der fluoreszierenden Molekülgruppe von Cy3- und Cy5-dUTP mit monochromatischem Licht zweier verschiedener Wellenlängen, je eine zur Anregung von Cy3-dUTP und Cy5-dUTP (532 nm, 635 nm), und registriert die daraufhin emittierte Cy3- und Cy5-Fluoreszenz (im grünen bzw. roten Wellenlängenbereich) mit lichtempfindlichen Kathoden. Diese wandeln die Cy3- und Cy5-Fluoreszenzen in elektrischen Strom um, der weiter verstärkt wird (GenPix 4000 A laser scanner, Axon Inc.). Die gemessene Stromstärke korreliert direkt mit der Cy3- bzw. Cy5-Fluoreszenz und wird durch die Software numerischen Intensitäten auf einer Skala von 0 bis 65535 zugeordnet (GenePix Pro 6.0 Software, Axon Inc.). Mit Hilfe der Software wurde die orts aufgelöste Information für die Cy3- und Cy5-Fluoreszenz anhand der numerischen Werte als Fluorogramm bildlich dargestellt und im 16-bit-TIFF-Format elektronisch gespeichert (GenePix Pro 6.0 Software).

Fluorogramme wurden mit der Software GenePix Pro 6.0 quantitativ analysiert. Mit der Software wurden die Medianwerte der Cy3- und Cy5-Fluoreszenzintensitäten von den Fluorogramm-Bildpunkten (1 Bildpunkt entsprach 10 x 10 µm auf dem DNA-Chip) innerhalb des kreisförmig markierten Bereichs eines Spots (Abbildung 5.1 A und B) ermittelt und nach Subtraktion der jeweiligen Medianwerte der Hintergrundintensität das Verhältnis der Cy3- / Cy5-Netto-Fluoreszenzintensitäten berechnet (Abbildung 5.1 C). Dieses Verhältnis wurde verwendet, um den relativen mRNA-Spiegel der Gene anzugeben.

Die Berechnung von Signal/Rausch-Verhältnissen für Cy3- und Cy5- Fluoreszenzsignale erfolgte durch Bildung des Quotienten $\text{Signalintensität}_{\text{Spot}} / \text{Signalintensität}_{\text{Spot-Hintergrund}}$. Wenn das Signal/Rausch-Verhältnis für die Cy3- und die Cy5-Fluoreszenz kleiner als drei war, wurden die Signale als zu schwach angenommen, um zuverlässig ausgewertet werden zu können und in weiteren Analysen nicht berücksichtigt.

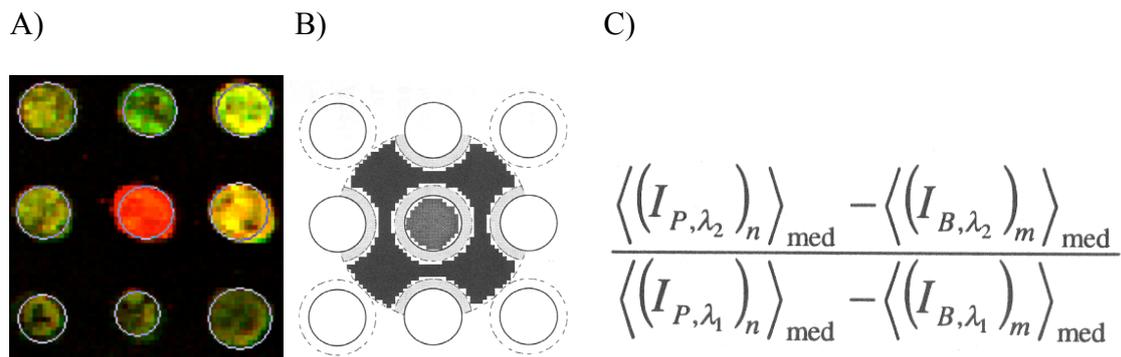


Abbildung 5.1: Quantitative Bestimmung der Fluoreszenzintensitäten.

A) Die Quantifizierung der Fluoreszenz der einzelnen Spots auf DNA-Chips erfolgte mit Hilfe der Software GenePix Pro 6.0. B) Schematische Darstellung der Quantifizierung der Spot-Fluoreszenz. Alle Bildpunkte innerhalb des Kreises (grau) gehören zum Spot. Außerhalb einer 2-Bildpunkte-breiten Kreisregion (hellgrau), deren Intensitäten nicht berücksichtigt werden, liegen die Bildpunkte des Hintergrundes (doppelter Spottedurchmesser, dunkelgrau). Jeder Bildpunkt enthält die numerische Information der ortsaufgelösten Cy3- und Cy5-Fluoreszenz. Vor der Berechnung des Cy3-/Cy5-Netto-Fluoreszenz-Verhältnisses eines Spots wurde der Medianwert der Hintergrundfluoreszenz von dem Medianwert der Spotfluoreszenz subtrahiert C) (aus dem Handbuch zur GenePix Pro 6.0 Software).

5.3.6.4 Hintergrundkorrektur, Normalisierung und Speicherung der DNA-Chip-Daten

Um die durch die Cy3- / Cy5-Fluoreszenz-Verhältnisse repräsentierten relativen mRNA-Spiegel verschiedener DNA-Chip-Experimente miteinander vergleichen zu können, wurden die numerischen Werte normalisiert (Eisen *et al.* 1998). Die Hintergrundkorrektur und Normalisierung erfolgte mit Hilfe der R-packages marray (Dudoit 2002) und limma (Ritchie *et al.* 2007). Alle Fluorogramme und für weitere Analysen relevanten DNA-Chip-Daten, wie Cy3- und Cy5-Fluoreszenzintensitäten, normalisierte Cy3- / Cy5-Fluoreszenz-Verhältnisse (relativer mRNA-Spiegel), Positionen der Gene auf dem DNA-Chip sowie die Informationen zur Durchführung des Experiments wurden in der Jülich Microarray Database elektronisch gespeichert (Polen and Wendisch 2004).

5.3.7 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Bei der isoelektrische Fokussierung (IEF) mit immobilisierten pH-Gradienten (IPG) handelt es sich um ein elektrophoretisches Verfahren, bei dem jedes Protein unter Einfluss eines

elektrischen Feldes bis zu der Position im pH-Streifen wandert, an dem seine Nettoladung Null ist. Dieser pH-Wert wird isoelektrischer Punkt (pI) genannt. Neben der Aminosäurezusammensetzung bestimmen Modifikationen (wie z. B. Phosphorylierung, Glykosylierung, Oxidationszustand) den Ladungszustand.

Für die erste Dimension der 2D-Gelelektrophorese wurden 300 µg acetongefälltes Gesamtprotein (5.2.4) in 350 µl Rehydratationspuffer mit 2 % IPG-Puffer (4.7) und 66 mM DTT über Nacht bei Raumtemperatur in die pH-Streifen (4.8) eingequollen. Dabei wurden die Streifen mit Mineralöl (4.8) überschichtet. Am folgenden Tag wurden die pH-Streifen kurz in *Aqua dest.*, getaucht und überschüssiges Wasser abgetupft. Die feuchten pH-Streifen wurden anschließend auf die Kühlplatte der dafür vorgesehenen und auf 20°C temperierten Elektrophoresevorrichtung (GE Healthcare Ettan IPGphor3) gelegt. Feuchtes Elektrodenpapier wurde quer zu den pH-Streifen auf die Gelenden gelegt und dann die Elektroden angebracht. Die Fokussierung erfolgte unter dem angegebenen Programm.

Einstellung des Ettan IPGphor3 für die IEF: Programm für 36000 kWh bei 20°C

Step1	Stp	500 V	1 h
Step2	Grd	1000 V	1 h
Step3	Grd	8000 V	3 h
Step4	Grd	8000 V	2 h 40 min

Nach der IEF wurde der pH-Streifen 15 min bei Raumtemperatur in 10 ml Äquibrierungslösung mit 100 mg DTT geschwenkt und diese danach verworfen. Nach 15 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur in 10 ml Äquibrierungslösung mit 480 mg Iodacetamid wurde der pH-Streifen vorsichtig auf das SDS-Gel gelegt und mit 0,5%iger Agaroselösung fixiert. Danach erfolgte die Trennung in der zweiten Dimension mittels SDS-PAGE (5.2.5.5).

Rehydratationspuffer	7 M Harnstoff 2 M Thioharnstoff 4 % CHAPS 0,5 % (w/v) Triton X 100 0,05% (w/v) Bromphenolblau in <i>Aqua dest.</i>
Äquilibrierungslösung	36,04 g Harnstoff (6 M) 16 ml Aqua dest. , 5 min bei 37°C rühren 10 ml 0,5 M Tris-HCl, pH 8,5 20 ml 10% (w/v) SDS 30 ml Glycerin 0,5% (w/v) Bromphenolblau

6 Anhang

6.1 Tabellen und Abbildungen

Tabelle 6.1: Quantifizierung der 6S RNA cDNA-Banden der *primer extension*-Analysen von Gesamt-RNA aus verschiedenen Stammhintergründen.

Angegeben sind die Mittelwerte der relativen 6S RNA bezogen auf 100% des Wildtyps in der stationären Phase. Die Werte wurden gegen den internen Standard 5S RNA normiert und die Standardabweichung (s) ist angegeben. Die Diagramme zu den Werten finden sich in Abbildung 2.3.

Stamm	log Phase [%]	s [%]	Transitionsphase [%]	s [%]	stationäre Phase [%]	s [%]
CSH50	20,9	3,5	29,5	15,6	100	--
CSH50fis:: <i>kan</i>	17,2	9,2	36,2	17,0	183,4	33,1
MC4100	20,1	8,8	33,4	9,0	100	--
PD32	30,2	11,7	43,6	4,7	186,2	6,6
GS997	37,6	2,0	55,3	4,7	305,7	36,3
GM37	20,3	2,7	25,3	2,5	100	--
CJD1124	17,2	2,5	42,9	2,5	105,5	11,8
BSN26	6,9	1,3	18,7	10,0	100	--
BSN29	10,1	0,8	9,4	1,9	46,3	11,0

Tabelle 6.2: Mit dem Programm *DIAMOD* theoretisch berechnete End-zu-End-Abstände der verwendeten Fragmente mit den verschiedenen Berechnungsmodellen.

Für die Berechnung der End-zu-End-Abstände wurden die Programmeinstellungen *trinukleotide model* und *non-repititive sequence* verwendet.

		End-zu-End-Abstände mit dem Berechnungsmodell [nm]			
Fragment	Bp	Gabriel	Brukner	Goodsell	Ideal
F Δ ₇₆₋₁₈₉	494 Bp	155,54	153,77	149,17	161,93
F Δ P2	445 Bp	144,44	141,15	145,43	150,11
F Δ P2 Δ ₇₆₋₁₈₉	329 Bp	107,09	105,11	107,49	110,91
<i>Ava</i> II	222 Bp	72,25	69,93	71,92	74,75

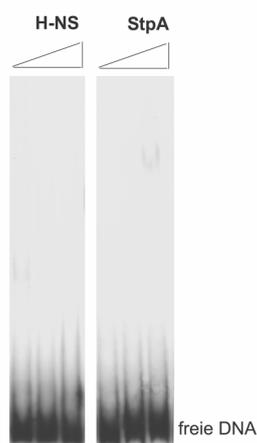


Abbildung 6.1: Gelverzögerungsanalysen mit dem *AvaII*-Fragment und H-NS und StpA.

Bindung von H-NS und StpA an das *AvaII*-Fragment, welches als Kontrollfragment zum Ausschluss von unspezifischer Wechselwirkung der beiden Proteine verwendet wurde. 4 nM *AvaII*-Fragment und steigende Proteinkonzentrationen (2 μ M, 4 μ M und 6 μ M für beide Proteine) wurden in die Bindungsansätze eingesetzt. In dem gleichen Experiment konnte für FIS und LRP Komplexbildung gezeigt werden.

Tabelle 6.3: Quantifizierungswerte der *primer extension*-Analysen der Fusionskonstrukte mit den Plasmiden pCAT-6S-P1 und pCAT-6S-P2 aus der stationären Phase.

Angegeben sind die Mittelwerte der relativen Promotorstärken bezogen auf 100% des Wildtyps. Die Werte wurden gegen den internen Standard RNAI normiert und die Standardabweichung (s) ist angegeben. Die Diagramme zu den Werten finden sich in Abbildung 2.17.

Stamm	Promotor	Restaktivität [%]	s
MC4100BW	<i>ssrS</i> P1 stat	100	--
MM139	<i>ssrS</i> P1 stat	125,7	16
MC4100BW	<i>ssrS</i> P2 stat	100	--
MM139	<i>ssrS</i> P2 stat	141,9	14,7
MC4100RH	<i>ssrS</i> P1 stat	100	--
RH90	<i>ssrS</i> P1 stat	130,1	9,3
MC4100RH	<i>ssrS</i> P2 stat	100	--
RH90	<i>ssrS</i> P2 stat	111,9	25,9
CSH50	<i>ssrS</i> P1 stat	100	--
CSH50fis::kan	<i>ssrS</i> P1 stat	97,5	7,4
CSH50	<i>ssrS</i> P2 stat	100	--
CSH50fis::kan	<i>ssrS</i> P2 stat	108,6	8,0

Tabelle 6.4: Erhöhte mRNA-Spiegel in der frühstationären Phase der *ssrS*-Deletionsmutante im Vergleich zum Wildtyp.

Angegeben sind die Gene mit erhöhten mRNA-Spiegel des Stammes MM139 im Vergleich zum MC4100BW aus der frühstationären Phase. Der durchschnittliche Faktor der Erhöhung ist aufgeführt. In Spalte n ist die Anzahl der zuverlässig auswertbaren Signale zu finden, aus denen sich der Faktor berechnet. Mindestens zwei unabhängige Ansätze mussten auswertbar sein. Die weiß hinterlegten Kandidaten hatten einen p-Wert unterhalb von 5 % und wurden als signifikant eingestuft, während dieser p-Wert für die grau hinterlegten Kandidaten überschritten wurde. ORF's für hypothetische, nicht charakterisierte Proteine wurden nicht berücksichtigt.

Gene	Faktor	n	p-Wert	Kurzbeschreibung
<i>leuL</i>	2,55	2	0,0403	b0075, leu operon leader peptide
<i>hha</i>	2,34	4	0,0144	b0460, modulator of gene expression, with H-NS
<i>ssrT</i>	2,02	2	0,0271	b3089, sodium:serine/threonine symporter
<i>nanR</i>	1,77	2	0,0210	b3226, transcriptional regulator NanR
<i>thrL</i>	1,73	4	0,0448	b0001, thr operon leader peptide
<i>ybgI</i>	1,73	3	0,0442	b0710, conserved metal-binding protein
<i>mtr</i>	1,66	4	0,0404	b3161, tryptophan transporter of high affinity
<i>pgpB</i>	1,65	2	0,0380	b1278, phosphatidylglycerophosphatase B
<i>ppc</i>	1,56	3	0,0170	b3956, phosphoenolpyruvate carboxylase
<i>ilvB</i>	1,55	2	0,0439	b3671, acetolactate synthase large subunit
<i>manA</i>	1,54	3	0,0167	b1613, mannose-6-phosphate isomerase
<i>slyA</i>	1,52	3	0,0348	b1642, transcriptional regulator SlyA
<i>uspA</i>	1,50	4	0,0295	b3495, universal stress global response regulator
<i>guaD</i>	2,78	3	0,1200	b2883, guanine deaminase
<i>ygjP</i>	2,13	2	0,1152	b3085, predicted metal dependent hydrolase
<i>paaJ</i>	1,91	2	0,0879	b1397, acetyl-CoA acetyltransferase
<i>yiaK</i>	1,91	2	0,1061	b3575, 2,3-diketo-L-gulonate dehydrogenase
<i>purH</i>	1,90	2	0,1065	b4006, bifunctional phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide
<i>purC</i>	1,86	2	0,0525	b2476, phospho-ribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase
<i>lpp</i>	1,85	2	0,1729	b1677, murein lipoprotein
<i>oppF</i>	1,80	2	0,1181	b1247, oligopeptide transporter subunit
<i>yfcY</i>	1,77	2	0,1488	b2342, acetyl-CoA acetyltransferase
<i>allD</i>	1,77	2	0,0989	b0517, ureidoglycolate dehydrogenase
<i>corA</i>	1,77	2	0,0868	b3816, magnesium/nickel/cobalt transporter
<i>acrR</i>	1,73	2	0,1757	b0464, DNA-binding transcriptional repressor
<i>kch</i>	1,72	2	0,1548	b1250, voltage-gated potassium channel
<i>coaA</i>	1,71	2	0,1728	b3974, pantothenate kinase
<i>ygdP</i>	1,66	3	0,0645	b2830, dinucleoside polyphosphate hydrolase
<i>ffh</i>	1,56	3	0,1001	b2610, SRP component with 4.5S RNA (ffs)
<i>dicA</i>	1,50	2	0,0791	b1570, Qin prophage; predicted regulator for DicB

Tabelle 6.5: Erniedrigte mRNA-Spiegel in der frühstationären Phase der *ssrS*-Deletionsmutante im Vergleich zum Wildtyp.

Angegeben sind die Gene mit erniedrigten mRNA-Spiegel des Stammes MM139 im Vergleich zum MC4100BW aus der frühstationären Phase. Der durchschnittliche Faktor der Verringerung ist aufgeführt. In Spalte *n* ist die Anzahl der zuverlässig auswertbaren Signale zu finden, aus denen sich der Faktor berechnete. Mindestens zwei unabhängige Ansätze mussten auswertbar sein. Die weiß hinterlegten Kandidaten hatten einen p-Wert unterhalb von 5 % und wurden als signifikant eingestuft, während dieser p-Wert für die grau hinterlegten Kandidaten überschritten wurde. ORF's für hypothetische, nicht charakterisierte Proteine wurden nicht berücksichtigt.

Gene	Faktor	n	p-Wert	Kurzbeschreibung
<i>rpoC</i>	0,54	3	0,0175	b3988, DNA-directed RNA polymerase subunit beta'
<i>rpmG</i>	0,55	4	0,0366	b3636, 50S ribosomal protein L33
<i>rimM</i>	0,56	4	0,0181	b2608, 16S rRNA-processing protein
<i>rplS</i>	0,57	4	0,0261	b2606, 50S ribosomal protein L19
<i>rplK</i>	0,58	4	0,0081	b3983, 50S ribosomal protein L11
<i>dsdA</i>	0,59	2	0,0061	b2366, D-serine dehydratase
<i>uspE</i>	0,59	4	0,0462	b1333, stress-induced protein
<i>rplM</i>	0,62	4	0,0490	b3231, 50S ribosomal protein L13
<i>fusA</i>	0,62	4	0,0141	b3340, elongation factor EF-2
<i>rpsL</i>	0,64	4	0,0393	b3342, 30S ribosomal protein S12
<i>tdcG</i>	0,64	2	0,0191	b4471, L-serine dehydratase 3
<i>rpsF</i>	0,64	4	0,0458	b4200, 30S ribosomal protein S6
<i>rpsR</i>	0,65	4	0,0005	b4202, 30S ribosomal protein S18
<i>rplN</i>	0,65	4	0,0069	b3310, 50S ribosomal protein L14
<i>fnr</i>	0,67	3	0,0432	b1334, global regulator of anaerobic growth
<i>rpsG</i>	0,66	4	0,0092	b3341, 30S ribosomal protein S7
<i>phoQ</i>	0,53	2	0,1110	b1129, sensory histidine kinase in two-component system
<i>rpoB</i>	0,58	3	0,1010	b3987, DNA-directed RNA polymerase subunit beta
<i>rplA</i>	0,61	3	0,1210	b3984, 50S ribosomal protein L1
<i>sdaB</i>	0,61	2	0,0505	b2797, L-serine deaminase II
<i>pheP</i>	0,62	2	0,2564	b0576, phenylalanine transporter
<i>livK</i>	0,62	2	0,1293	b3458, leucine transporter subunit
<i>osmC</i>	0,62	3	0,1158	b1482, osmotically and stress-inducible membrane protein
<i>rpsC</i>	0,64	3	0,0660	b3314, 30S ribosomal protein S3
<i>potG</i>	0,64	2	0,2174	b0855, transporter subunit: ATP-binding component of ABC superfamily
<i>mglA</i>	0,64	2	0,1292	b2149, transporter subunits of ABC superfamily: ATP-binding components
<i>rplY</i>	0,65	4	0,0502	b2185, 50S ribosomal protein L25
<i>tauA</i>	0,65	2	0,1964	b0365, taurine transporter subunit
<i>rpsP</i>	0,66	4	0,0559	b2609, 30S ribosomal protein S16
<i>gltK</i>	0,66	2	0,1161	b0653, glutamate and aspartate transporter subunit
<i>lysR</i>	0,66	2	0,1205	b2839, DNA-binding transcriptional dual regulator

Gene	Faktor	n	p-Wert	Kurzbeschreibung
<i>flhD</i>	0,66	2	0,1139	b1892, transcriptional activator FlhD
<i>malX</i>	0,66	2	0,0937	b1621, fused maltose and glucose-specific PTS enzymes
<i>rpmE</i>	0,66	3	0,1295	b3936, 50S ribosomal subunit protein L31
<i>rpsD</i>	0,66	3	0,1685	b3296, 30S ribosomal protein S4
<i>yciH</i>	0,67	2	0,0793	b1282, translation initiation factor Sui1
<i>rplB</i>	0,68	4	0,0060	b3317, 50S ribosomal protein L2
<i>sra</i>	0,68	4	0,1020	b1480, 30S ribosomal subunit protein S22
<i>rpsH</i>	0,68	4	0,0095	b3306, 30S ribosomal protein S8
<i>rpmJ</i>	0,68	4	0,0017	b3299, 50S ribosomal protein L36
<i>rplL</i>	0,68	4	0,0663	b3986, 50S ribosomal protein L7/L12
<i>rpsU</i>	0,69	2	0,1980	b3065, 30S ribosomal protein S21

6.2 Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström
A	Adenosin
A _{260,280}	Absorption bei 260 oder 280 nm
AMV-RT	' <i>Avian myeloblastosis virus</i> ' – Reverse Transkriptase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
BLA	β-Lactamase
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytidin
°C	Grad Celsius
ccc	' <i>covalently closed circle</i> '
CAT	Chloramphenicolacetyltransferase
cDNA	' <i>complementary DNA</i> ' (komplementäre DNA)
Ci	Curie (2,22 x 10 ¹² dpm)

cm	Zentimeter
Cm	Chloramphenicol
cpm	<i>'counts per minute'</i>
ddNTP	Didesoxyribonukleinsäure
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dpm	Zerfälle / min
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
f	femto (10^{-15})
f.c.	<i>'final concentration'</i> , Endkonzentration
FIS	<i>'factor of inversion stimulation'</i>
G	Guanosin
GTP	Guanosintriphosphat
GvO	Genetisch veränderter Organismus
kB	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
λ	lambda = Wellenlänge
LRP	<i>'leucine-responsive regulatory Protein'</i>
m	milli (10^{-3})

M	Mol
mA	Milliampere
MCS	multiple Klonierungsstelle
mol	molar (Mol / L)
mg	Milligramm
min	Minute
mm	Millimeter
mmol	Millimolar
mRNA	messenger RNA
μ	Mikro (10 ⁻⁶)
μg	Mikrogramm
μM	Mikromolar
n	nano (10 ⁻⁹)
NAP	nucleoid-assoziiertes Protein
Nt	Nukleotid
NaOAc	Natriumacetat
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD	Optische Dichte
ORF	<i>'open reading frame'</i> , offener Leserahmen
p	pico (10 ⁻¹²)
[³² P]	Phosphor-32, Massezahl 32, radioaktiv
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	<i>primer extension</i>
PEG	Polyethylenglykol
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNAP	RNA-Polymerase
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen / min

rProteine	ribosomale Proteine
rrn	ribosomale Transkriptionseinheit
rRNA	ribosomale RNA
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SRP	<i>'signal recognition particle'</i>
ss	einzelsträngig
h	Stunde
T	Thymidin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit, Aktivitätseinheit von Enzymen
UAS	<i>'upstream activating sequence'</i>
UE	Untereinheit
üN	über Nacht
UTP	Uraciltriphosphat
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
VIS	sichtbares Licht
v/v	<i>'volume per volume'</i> (Volumenprozent)
W	Watt
w/v	<i>'weight per volume'</i> (Gewichtsprozent)
YT	<i>'yeast tryptome'</i>
z. B.	zum Beispiel

6.3 Veröffentlichungen

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

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

6.4 Literaturverzeichnis

- Afflerbach, H., O. Schröder and R. Wagner (1999). "Conformational changes of the upstream DNA mediated by H-NS and FIS regulate *E. coli rrnB* P1 promoter activity." *J. Mol. Biol.* **286**(2): 339-53.
- Altuvia, S., D. Weinstein-Fischer, A. Zhang, L. Postow and G. Storz (1997). "A small, stable RNA induced by oxidative stress: role as a pleiotropic regulator and antimutator." *Cell* **90**(1): 43-53.
- Altuvia, S., A. Zhang, L. Argaman, A. Tiwari and G. Storz (1998). "The *Escherichia coli* OxyS regulatory RNA represses *fhlA* translation by blocking ribosome binding." *Embo J* **17**(20): 6069-75.
- Argaman, L. and S. Altuvia (2000). "*fhlA* repression by OxyS RNA: kissing complex formation at two sites results in a stable antisense-target RNA complex." *J Mol Biol* **300**(5): 1101-12.
- Argaman, L., R. Hershberg, J. Vogel, G. Bejerano, E. G. Wagner, H. Margalit and S. Altuvia (2001). "Novel small RNA-encoding genes in the intergenic regions of *Escherichia coli*." *Curr Biol* **11**(12): 941-50.
- Artsimovitch, I. and R. Landick (2000). "Pausing by bacterial RNA polymerase is mediated by mechanistically distinct classes of signals." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(13): 7090-5.
- Azam, T. A. and A. Ishihama (1999). "Twelve species of the nucleoid-associated protein from *Escherichia coli*. Sequence recognition specificity and DNA binding affinity." *J Biol Chem* **274**(46): 33105-13.
- Baker, C. S., L. A. Eory, H. Yakhnin, J. Mercante, T. Romeo and P. Babitzke (2007). "CsrA inhibits translation initiation of *Escherichia coli* hfq by binding to a single site overlapping the Shine-Dalgarno sequence." *J Bacteriol* **189**(15): 5472-81.
- Balsalobre, C., J. Johansson, B. E. Uhlin, A. Juarez and F. J. Munoa (1999). "Alterations in protein expression caused by the *hha* mutation in *Escherichia coli*: influence of growth medium osmolarity." *J Bacteriol* **181**(10): 3018-24.
- Baracchini, E. and H. Bremer (1988). "Stringent and growth control of rRNA synthesis in *Escherichia coli* are both mediated by ppGpp." *J. Biol. Chem.* **263**: 2597-2602.
- Barrick, J. E., N. Sudarsan, Z. Weinberg, W. L. Ruzzo and R. R. Breaker (2005). "6S RNA is a widespread regulator of eubacterial RNA polymerase that resembles an open promoter." *Rna* **11**(5): 774-84.
- Barrios, A. F., R. Zuo, D. Ren and T. K. Wood (2006). "Hha, YbaJ, and OmpA regulate *Escherichia coli* K12 biofilm formation and conjugation plasmids abolish motility." *Biotechnol Bioeng* **93**(1): 188-200.
- Becker, G. and R. Hengge-Aronis (2001). "What makes an *Escherichia coli* promoter σ^S dependent? Role of the -13/-14 nucleotide promoter positions and region 2.5 of σ^S ." *Mol. Microbiol.* **39**: 1153-1165.

- Beidler, J. L., P. R. Hillard and R. L. Rill (1982). "Ultrasensitive staining of nucleic acids with silver." *Analytical. Biochem.* **126**: 374-380.
- Beutel, B. A. and M. T. Record, Jr. (1990). "E. coli promoter spacer regions contain nonrandom sequences which correlate to spacer length." *Nucleic Acids Res* **18**(12): 3597-603.
- Birnboim, H. C. and J. Doly (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." *Nucleic Acids Res* **7**(6): 1513-23.
- Blattner, F. R., G. Plunkett III, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau and Y. Shao (1997). "The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12." *Science* **277**: 1453-1462.
- Bloch, V., Y. Yang, E. Margeat, A. Chavanieu, M. T. Auge, B. Robert, S. Arold, S. Rimsky and M. Kochoyan (2003). "The H-NS dimerization domain defines a new fold contributing to DNA recognition." *Nat Struct Biol* **10**(3): 212-8.
- Bokal, A. J., W. Ross, T. Gaal, R. C. Johnson and R. L. Gourse (1997). "Molecular anatomy of a transcription activation patch: FIS-RNA polymerase interactions at the *Escherichia coli* rrnB P1 promoter." *Embo J* **16**(1): 154-62.
- Borukhov, S. and A. Goldfarb (1993). "Recombinant *Escherichia coli* RNA polymerase: purification of individually overexpressed subunits and *in vitro* assembly." *Protein expression and Purification* **4**: 503-511.
- Borukhov, S. and K. Severinov (2002). "Role of the RNA polymerase sigma subunit in transcription initiation." *Research in Microbiology* **153**: 557-562.
- Boyer, H. W. and D. Roulland-Dussoix (1969). "A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*." *J. Mol. Biol.* **41**: 459-472.
- Bradaczek, C. (1991). Untersuchung nahe am Promotor P1 des rrnB-Operons bindender Proteine aus *E. coli*. Dissertation, Physikalische Biologie, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
- Brosius, J. (1984). "Plasmid vectors for the selection of promoters." *Gene* **27**: 151-160.
- Brown, J. W. and J. C. Ellis (2005). Comparative analysis of RNA secondary structures: 6S RNA. Weinheim, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.
- Brownlee, G. G. (1971). "Sequence of 6S RNA of *E. coli*." *Nat New Biol* **229**(5): 147-9.
- Burgess, R. R. and J. J. Jendrisak (1975). "A procedure for the rapid, large scale purification of *E. coli* DNA-dependent RNA polymerase involving Polymin P precipitation and DNA cellulose chromatography." *Biochemistry* **14**: 4636-4638.
- Casadaban, M. J. (1976). "Transposition and fusion of *lac* genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage lambda and Mu." *J. Mol. Biol.* **104**: 541-555.
- Cavanagh, A. T., A. D. Klocko, X. Liu and K. M. Wassarman (2008). "Promoter specificity for 6S RNA regulation of transcription is determined by core promoter sequences and competition for region 4.2 of sigma70." *Mol Microbiol* **67**(6): 1242-56.

Chamberlin, M. J., W. C. Nierman, J. Wiggs and N. Neff (1979). "A quantitative assay for bacterial RNA polymerases." *J. Biol. Chem.* **254**: 10061-10069.

Checroun, C., P. Bordes, O. Leroy, A. Kolb and C. Gutierrez (2004). "Interactions between the 2.4 and 4.2 regions of σ^S , the stress-specific σ factor of *Escherichia coli*, and the -10 and -35 promoter elements." *Nucleic Acids Res.* **32**: 45-53.

Chen, S. and J. M. Calvo (2002). "Leucine-induced dissociation of *Escherichia coli* Lrp hexadecamers to octamers." *J Mol Biol* **318**(4): 1031-42.

Chen, S., E. A. Lesnik, T. A. Hall, R. Sampath, R. H. Griffey, D. J. Ecker and L. B. Blyn (2002). "A bioinformatics based approach to discover small RNA genes in the *Escherichia coli* genome." *Biosystems* **65**(2-3): 157-77.

Cole, J. R. and M. Nomura (1986). "Changes in the half-life of ribosomal protein messenger RNA caused by translational repression." *J Mol Biol* **188**(3): 383-92.

Colland, F., N. Fujita, A. Ishihama and A. Kolb (2002). "The interaction between σ^S , the stationary phase sigma factor, and the core enzyme of *Escherichia coli* RNA polymerase." *Genes Cells* **7**: 233-247.

Cui, Y., M. A. Midkiff, Q. Wang and J. M. Calvo (1996). "The leucine-responsive regulatory protein (Lrp) from *Escherichia coli*. Stoichiometry and minimal requirements for binding to DNA." *J Biol Chem* **271**(12): 6611-7.

Cui, Y., Q. Wang, G. D. Stormo and J. M. Calvo (1995). "A consensus sequence for binding of Lrp to DNA." *J Bacteriol* **177**(17): 4872-80.

Dagert, M. and S. D. Ehrlich (1979). "Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells." *Gene* **6**(1): 23-8.

Dame, R. T., C. Wyman, R. Wurm, R. Wagner and N. Goosen (2002). "Structural basis for H-NS-mediated trapping of RNA polymerase in the open initiation complex at *rrnB* P1." *J. Biol. Chem.* **277**: 2146-2150.

de los Rios, S. and J. J. Perona (2007). "Structure of the *Escherichia coli* leucine-responsive regulatory protein Lrp reveals a novel octameric assembly." *J Mol Biol* **366**(5): 1589-602.

Delic, D. (2006). Untersuchungen des *E. coli*-Proteins DksA bei der Synthese ribosomaler RNAs unter Bedingungen der Stringenten Kontrolle. Diplomarbeit, Physikalische Biologie, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

Dersch, P., K. Schmidt and E. Bremer (1993). "Synthesis of the *Escherichia coli* K-12 nucleoid-associated DNA-binding protein H-NS is subjected to growth-phase control and autoregulation." *Mol Microbiol* **8**(5): 875-89.

Diekmann, S. and J. C. Wang (1985). "On the sequence determinants and flexibility of the kinetoplast DNA fragment with abnormal gel electrophoretic mobilities." *J Mol Biol* **186**(1): 1-11.

Dlagic, M. and R. E. Harrington (1998). "Diamod: display and modeling of DNA bending." *Bioinformatics* **14**: 326-331.

- Dombroski, A. J., W. A. Walter and C. A. Gross (1993). "Amino-terminal amino acids modulate σ -factor DNA-binding activity." *Genes & Development* **7**: 2446-2455.
- Dorman, C. J. (2004). "H-NS: a universal regulator for a dynamic genome." *Nature Reviews Microbiology* **2**: 391-400.
- Dudoit, S., and Yang, Y.H. (2002). Bioconductor R packages for exploratory analysis and normalization of cDNA microarray data., Springer, New York.
- Eisen, M. B., P. T. Spellman, P. O. Brown and D. Botstein (1998). "Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(25): 14863-8.
- Espinoza, C. A., T. A. Allen, A. R. Hieb, J. F. Kugel and J. A. Goodrich (2004). "B2 RNA binds directly to RNA polymerase II to repress transcript synthesis." *Nat Struct Mol Biol* **11**(9): 822-9.
- Espinoza, C. A., J. A. Goodrich and J. F. Kugel (2007). "Characterization of the structure, function, and mechanism of B2 RNA, an ncRNA repressor of RNA polymerase II transcription." *Rna* **13**(4): 583-96.
- Esposito, D., A. Petrovic, R. Harris, S. Ono, J. F. Eccleston, A. Mbabaali, I. Haq, C. F. Higgins, J. C. Hinton, P. C. Driscoll and J. E. Ladbury (2002). "H-NS Oligomerization Domain Structure Reveals the Mechanism for High Order Self-association of the Intact Protein." *J Mol Biol* **324**(4): 841-50.
- Falconi, M., A. Brandi, A. La Teana, C. O. Gualerzi and C. L. Pon (1996). "Antagonistic involvement of FIS and H-NS proteins in the transcriptional control of hns expression." *Mol Microbiol* **19**(5): 965-75.
- Filipowicz, W., S. N. Bhattacharyya and N. Sonenberg (2008). "Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?" *Nat Rev Genet* **9**(2): 102-14.
- Free, A., R. M. Williams and C. J. Dorman (1998). "The StpA protein functions as a molecular adapter to mediate repression of the *bgl* operon by truncated H-NS in *Escherichia coli*." *J Bacteriol* **180**(4): 994-7.
- Geißen, R. (2007). Analysen des Einfluss der 6S RNA aus *Escherichia coli* auf die Transkription unterschiedlicher Promotoren in vivo. Diplomarbeit, Physikalische Biologie, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
- Germer, J., G. Becker, M. Metzner and R. Hengge-Aronis (2001). "Role of activator site position and a distal UP-element half-site for sigma factor selectivity at a CRP/H-NS-activated sigma-dependent promoter in *Escherichia coli*." *Mol Microbiol* **41**(3): 705-16.
- Gildehaus, N. (2001). Strukturelle und funktionelle Charakterisierung der 6S RNA aus *E. coli* und ihre Beteiligung an der Ausbildung eines Transkriptionskomplexes. Diplomarbeit, Physikalische Biologie, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
- Gildehaus, N. (2005). Analysen zur Funktion und Interaktion der phasenabhängig exprimierten *E. coli* 6S RNA. Dissertation, Physikalische Biologie, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

- Gildehaus, N., T. Neusser, R. Wurm and R. Wagner (2007). "Studies on the function of the riboregulator 6S RNA from *E. coli*: RNA polymerase binding, inhibition of in vitro transcription and synthesis of RNA-directed de novo transcripts." *Nucleic Acids Res* **35**(6): 1885-96.
- Gonzales, N., J. Wiggs and M. J. Chamberlin (1977). "A simple procedure for resolution of *E. coli* RNA polymerase holoenzyme from core polymerase." *Arch. Biochem. Biophys.* **182**: 404-408.
- Gordia, S. and C. Gutierrez (1996). "Growth-phase-dependent expression of the osmotically inducible gene *osmC* of *Escherichia coli* K-12." *Mol Microbiol* **19**(4): 729-36.
- Gottesman, S. (2005). "Micros for microbes: non-coding regulatory RNAs in bacteria." *Trends Genet* **21**(7): 399-404.
- Grainger, D. C., D. Hurd, M. D. Goldberg and S. J. Busby (2006). "Association of nucleoid proteins with coding and non-coding segments of the *Escherichia coli* genome." *Nucleic Acids Res* **34**(16): 4642-52.
- Griffin, B. E. and D. L. Baillie (1973). "Precursors of stable RNA accumulated in a mutant of *E. coli*." *FEBS Lett* **34**(2): 273-9.
- Hanahan, D. (1985). Techniques for transformation of *E. coli*.
- He, W. and R. Parker (2001). "The yeast cytoplasmic Lsm1/Pat1p complex protects mRNA 3' termini from partial degradation." *Genetics* **158**(4): 1445-55.
- Hengen, P. N., S. L. Bartram, L. E. Stewart and T. D. Schneider (1997). "Information analysis of Fis binding sites." *Nucleic Acids Res.* **25**: 4994-5002.
- Hengge-Aronis, R. (1996). "Back to log phase: sigma S as a global regulator in the osmotic control of gene expression in *Escherichia coli*." *Mol Microbiol* **21**(5): 887-93.
- Hengge-Aronis, R. (2002). "Stationary phase gene regulation: what makes an *Escherichia coli* promoter sigmaS-selective?" *Curr Opin Microbiol* **5**(6): 591-5.
- Heroven, A. K. and P. Dersch (2002). "Two different open reading frames named *slyA* in the *E. coli* sequence databases." *Trends Microbiol* **10**(6): 267-8.
- Hillebrand, A. (2001). Transkriptionsfaktor- und wachstumsabhängige Regulation der sieben verschiedenen ribosomalen RNA-Operons in *Escherichia coli*. Dissertation, Physikalische Biologie, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
- Hillebrand, A., R. Wurm, A. Menzel and R. Wagner (2005). "The seven *E. coli* ribosomal RNA operon upstream regulatory regions differ in structure and transcription factor binding efficiencies." *Biol. Chem.* **386**: 523-534.
- Hillen, W., R. D. Klein and R. D. Wells (1981). "Preparation of milligram amounts of 21 deoxyribonucleic acid restriction fragments." *Biochemistry* **20**(13): 3748-56.
- Hindley, J. (1967). "Fractionation of 32P-labelled ribonucleic acids on polyacrylamide gels and their characterization by fingerprinting." *J Mol Biol* **30**(1): 125-36.
- Hsu, L. M., J. Zagorski, Z. Wang and M. J. Fournier (1985). "*Escherichia coli* 6S RNA gene is part of a dual-function transcription unit." *J Bacteriol* **161**(3): 1162-70.

- Hübner, P. and W. Arber (1989). "Mutational analysis of a prokaryotic recombinational enhancer element with two functions." *EMBO J.* **8**: 577-585.
- Igarashi, K. and I. A. (1991). "Bipartite functional map of the *E. coli* RNA polymerase α subunit: Involvement of the C-terminal region in transcription activation by cAMP-CRP." *Cell* **65**: 1015-1022.
- Igarashi, K., N. Fujita and A. Ishihama (1991). "Identification of a subunit assembly domain in the alpha subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase." *Journal of Molecular Biology* **218**: 1-6.
- Ikemura, T. and J. E. Dahlberg (1973). "Small ribonucleic acids of *E. coli*. II. Noncoordinate accumulation during the stringent control." *J. Biol. Chem.* **248**: 5033-5041.
- Ishihama, A. (1999). "Modulation of the nucleoid, the transcription apparatus, and the translation machinery in bacteria for stationary phase survival." *Genes to Cells* **4**: 135-143.
- Ishihama, A. (2000). "Functional modulation of *Escherichia coli* RNA polymerase." *Annu Rev Microbiol* **54**: 499-518.
- Jacob, F. and J. Monod (1961). "Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins." *Journal of Molecular Biology* **3**: 318-356.
- Jishage, M. and A. Ishihama (1995). "Regulation of RNA polymerase sigma subunit synthesis in *Escherichia coli*: Intracellular levels of σ^{70} and σ^{38} ." *Journal of Bacteriology* **177**: 6832-6835.
- Jishage, M. and A. Ishihama (1999). "Transcriptional organization and role of the *Escherichia coli* *rsd* gene, encoding the regulator of RNA polymerase Sigm D." *J. Bacteriol.* **181**: 3768-3776.
- Johansson, J., C. Balsalobre, S. Y. Wang, J. Urbonaviciene, D. J. Jin, B. Sonden and B. E. Uhlin (2000). "Nucleoid proteins stimulate stringently controlled bacterial promoters: a link between the cAMP-CRP and the (p)ppGpp regulons in *Escherichia coli*." *Cell* **102**(4): 475-85.
- Johansson, J., B. Dagberg, E. Richet and B. E. Uhlin (1998). "H-NS and StpA proteins stimulate expression of the maltose regulon in *Escherichia coli*." *J Bacteriol* **180**(23): 6117-25.
- Kahmann, R., F. Rudt, C. Koch and G. Mertens (1985). "G inversion in bacteriophage Mu DNA is stimulated by a site within the invertase gene and a host factor." *Cell* **41**: 771-780.
- Kang, Y., K. D. Weber, Y. Qiu, P. J. Kiley and F. R. Blattner (2005). "Genome-wide expression analysis indicates that FNR of *Escherichia coli* K-12 regulates a large number of genes of unknown function." *J Bacteriol* **187**(3): 1135-60.
- Kawashima, T., H. Aramaki, T. Oyamada, K. Makino, M. Yamada, H. Okamura, K. Yokoyama, S. A. Ishijima and M. Suzuki (2008). "Transcription regulation by feast/famine regulatory proteins, FFRPs, in archaea and eubacteria." *Biol Pharm Bull* **31**(2): 173-86.

- Keane, O. M. and C. J. Dorman (2003). "The gyr genes of Salmonella enterica serovar Typhimurium are repressed by the factor for inversion stimulation, Fis." *Mol Genet Genomics* **270**(1): 56-65.
- Kim, E. Y., M. S. Shin, J. H. Rhee and H. E. Choy (2004). "Factors influencing preferential utilization of RNA polymerase containing sigma-38 in stationary-phase gene expression in *Escherichia coli*." *J Microbiol* **42**(2): 103-110.
- Kim, K. S. and Y. Lee (2004). "Regulation of 6S RNA biogenesis by switching utilization of both sigma factors and endoribonucleases." *Nucleic Acids Res* **32**(20): 6057-68.
- Koch, C. and R. Kahmann (1986). "Purification and properties of the *Escherichia coli* host factor required for inversion of the G segment in bacteriophage Mu." *J. Biol. Chem.* **261**: 15673-15678.
- Koch, C., J. Vandekerckhove and R. Kahmann (1988). "*Escherichia coli* host factor for site-specific DNA inversion: cloning and characterization of the *fis* gene." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**: 4237-4241.
- Komine, Y., M. Kitabatake, T. Yokogawa, K. Nishikawa and H. Inokuchi (1994). "A tRNA-like structure is present in 10Sa RNA, a small stable RNA from *Escherichia coli*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(20): 9223-7.
- Korzheva, N., A. Mustaev, M. Kozlov, A. Malhotra, V. Nikiforov, A. Goldfarb and S. A. Darst (2000). "A structural model of transcription elongation." *Science* **289**: 619-625.
- Kostrewa, D., J. Granzin, D. Stock, H.-W. Choe, J. Labahn and W. Saenger (1992). "Crystal structure of the factor for inversion stimulation FIS at 2 Å resolution." *Journal of Molecular Biology* **226**: 209-226.
- Krohn, M. and R. Wagner (1996). "Transcriptional pausing of RNA polymerase in the presence of guanosine tetraphosphate depends on the promoter and gene sequence." *J. Biol. Chem.* **271**: 23884-23894.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(5259): 680-5.
- Landgraf, J. R., J. Wu and J. M. Calvo (1996). "Effects of nutrition and growth rate on Lrp levels in *Escherichia coli*." *J Bacteriol* **178**(23): 6930-6.
- Lange, R. and R. Hengge-Aronis (1991). "Identification of a central regulator of stationary phase gene expression in *Escherichia coli*." *Molecular Microbiology* **5**: 49-59.
- Lease, R. A., M. E. Cusick and M. Belfort (1998). "Riboregulation in *Escherichia coli*: DsrA RNA acts by RNA:RNA interactions at multiple loci." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(21): 12456-61.
- Lee, C. A., M. J. Fournier and J. Beckwith (1985). "*Escherichia coli* 6S RNA is not essential for growth or protein secretion." *J Bacteriol* **161**(3): 1156-61.
- Lee, S. J. and J. D. Gralla (2001). "Sigma38 (rpoS) RNA polymerase promoter engagement via -10 region nucleotides." *J Biol Chem* **276**(32): 30064-71.

- Lee, S. Y., S. C. Bailey and D. Apirion (1978). "Small stable RNAs from *Escherichia coli*: evidence for the existence of new molecules and for a new ribonucleoprotein particle containing 6S RNA." *J Bacteriol* **133**(2): 1015-23.
- Li, Z., S. Pandit and M. P. Deutscher (1998). "3' exoribonucleolytic trimming is a common feature of the maturation of small, stable RNAs in *Escherichia coli*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(6): 2856-61.
- Liebig, B. and R. Wagner (1995). "Effects of different growth conditions on the *in vivo* activity of the tandem *Escherichia coli* ribosomal RNA promoters P1 and P2." *Mol. Gen. Genet.* **249**: 328-335.
- Lisser, S. and H. Margalit (1993). "Compilation of *E. coli* mRNA promoter sequences." *Nucleic Acids Research* **21**: 1507-1516.
- Lowe, P. A., D. A. Hager and R. R. Burgess (1979). "Purification and properties of the sigma subunit of *Escherichia coli* DNA-dependent RNA polymerase." *Biochemistry* **18**(7): 1344-52.
- Lucchini, S., G. Rowley, M. D. Goldberg, D. Hurd, M. Harrison and J. C. Hinton (2006). "H-NS mediates the silencing of laterally acquired genes in bacteria." *PLoS Pathog* **2**(8): e81.
- Magnusson, L. U., A. Farewell and T. Nystrom (2005). "ppGpp: a global regulator in *Escherichia coli*." *TRENDS in Microbiology* **13**: 236-242.
- Magnusson, L. U., B. Gummesson, P. Joksimovic, A. Farewell and T. Nystrom (2007). "Identical, Independent, and Opposing Roles of ppGpp and DksA in *Escherichia coli*." *J Bacteriol* **189**(14): 5193-202.
- Majdalani, N., C. Cunning, D. Sledjeski, T. Elliott and S. Gottesman (1998). "DsrA RNA regulates translation of RpoS message by an anti-antisense mechanism, independent of its action as an antisilencer of transcription." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(21): 12462-7.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. (1982). Molecular cloning: A laboratory manual.
- Maxam, A. M. and W. Gilbert (1980). "Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages." *Methods Enzymol* **65**(1): 499-560.
- McGovern, V., N. P. Higgins, R. S. Chiz and A. Jaworski (1994). "H-NS over-expression induces an artificial stationary phase by silencing global transcription." *Biochimie* **76**(10-11): 1019-29.
- Miller, J. H. (1972). Experiments in Molecular Genetics. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Mitchell, J. E., D. Zheng, S. J. Busby and S. D. Minchin (2003). "Identification and analysis of 'extended -10' promoters in *Escherichia coli*." *Nucleic Acids Res* **31**(16): 4689-95.
- Mizuno, T., M. Y. Chou and M. Inouye (1984). "A unique mechanism regulating gene expression: translational inhibition by a complementary RNA transcript (micRNA)." *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**(7): 1966-70.

- Moll, I., D. Leitsch, T. Steinhauser and U. Blasi (2003). "RNA chaperone activity of the Sm-like Hfq protein." *EMBO Rep* **4**(3): 284-9.
- Moller, T., T. Franch, P. Hojrup, D. R. Keene, H. P. Bachinger, R. G. Brennan and P. Valentin-Hansen (2002). "Hfq: a bacterial Sm-like protein that mediates RNA-RNA interaction." *Mol Cell* **9**(1): 23-30.
- Moller, T., T. Franch, C. Udesen, K. Gerdes and P. Valentin-Hansen (2002). "Spot 42 RNA mediates discoordinate expression of the E. coli galactose operon." *Genes Dev* **16**(13): 1696-706.
- Muller, C. M., U. Dobrindt, G. Nagy, L. Emody, B. E. Uhlin and J. Hacker (2006). "Role of histone-like proteins H-NS and StpA in expression of virulence determinants of uropathogenic *Escherichia coli*." *J Bacteriol* **188**(15): 5428-38.
- Narberhaus, F., T. Waldminghaus and S. Chowdhury (2006). "RNA thermometers." *FEMS Microbiol Rev* **30**(1): 3-16.
- Navarre, W. W., S. Porwollik, Y. Wang, M. McClelland, H. Rosen, S. J. Libby and F. C. Fang (2006). "Selective silencing of foreign DNA with low GC content by the H-NS protein in *Salmonella*." *Science* **313**(5784): 236-8.
- Newlands, J. T., W. Ross, K. K. Gosink and R. L. Gourse (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.
- Nudler, E., I. Gusarov, E. Avetisova, M. Kozlov and A. Goldfarb (1998). "Spatial organization of transcription elongation complex in *Escherichia coli*." *Science* **281**: 424-428.
- Nudler, E. and A. S. Mironov (2004). "The riboswitch control of bacterial metabolism." *Trends Biochem Sci* **29**(1): 11-7.
- Nudler, E., A. Mustaev, E. Lukhtanov and A. Goldfarb (1997). "The RNA-DNA hybrid maintains the register of transcription by preventing backtracking of RNA polymerase." *Cell* **89**: 33-41.
- Ojangu, E. L., A. Tover, R. Teras and M. Kivisaar (2000). "Effects of combination of different -10 hexamers and downstream sequences on stationary-phase-specific sigma factor sigma(S)-dependent transcription in *Pseudomonas putida*." *J Bacteriol* **182**(23): 6707-13.
- Paul, B. J., M. M. Barker, W. Ross, D. A. Schneider, C. Webb, J. W. Foster and R. L. Gourse (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**(3): 311-22.
- Platt, T. (1994). "Rho and RNA: models for recognition and response." *Molecular Microbiology* **11**: 983-990.
- Polen, T. and V. F. Wendisch (2004). "Genomewide expression analysis in amino acid-producing bacteria using DNA microarrays." *Appl Biochem Biotechnol* **118**(1-3): 215-32.

- Potrykus, K., D. Vinella, H. Murphy, A. Szalewska-Palasz, R. D'Ari and M. Cashel (2006). "Antagonistic regulation of Escherichia coli ribosomal RNA rrnB P1 promoter activity by GreA and DksA." *J Biol Chem* **281**(22): 15238-48.
- Prosseda, G., P. A. Fradiani, M. Di Lorenzo, M. Falconi, G. Micheli, M. Casalino, M. Nicoletti and B. Colonna (1998). "A role for H-NS in the regulation of the virF gene of Shigella and enteroinvasive Escherichia coli." *Res Microbiol* **149**(1): 15-25.
- Pruss, B. M., D. Markovic and P. Matsumura (1997). "The Escherichia coli flagellar transcriptional activator flhD regulates cell division through induction of the acid response gene cadA." *J Bacteriol* **179**(11): 3818-21.
- Pul, Ü., R. Wurm, B. Lux, M. Meltzer, A. Menzel and R. Wagner (2005). "LRP and H-NS - cooperative partners for transcription regulation at E. coli rRNA promoters." *Molecular Microbiology* **58**: 864-876.
- Pul, Ü., R. Wurm and R. Wagner (2007). "The Role of LRP and H-NS in Transcription Regulation: Involvement of Synergism, Allostery and Macromolecular Crowding." *J Mol Biol* **366**: 900-915.
- Pul, Ü. u. W., R. (2007). "Nukleoid-assoziierte Proteine in Mikroorganismen." *Biospektrum* **05**: 495-497.
- Rajkowitsch, L., K. Semrad, O. Mayer and R. Schroeder (2005). "Assays for the RNA chaperone activity of proteins." *Biochem Soc Trans* **33**(Pt 3): 450-6.
- Reckendrees, B. (2004). In vitro Analysen prokaryotischer Transkriptionsmechanismen während der exponentiellen und stationären Phase der Genregulation. Dissertation, Physikalische Biologie, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
- Record, M. T., W. S. Reznikoff, M. L. Craig, K. L. McQuade and P. J. Schlx (1996). Escherichia coli RNA polymerase ($E\sigma^{70}$), promoters, and the kinetics of the steps of transcription initiation. Washington, D. C., ASM Press.
- Ren, D., L. A. Bedzyk, S. M. Thomas, R. W. Ye and T. K. Wood (2004). "Gene expression in Escherichia coli biofilms." *Appl Microbiol Biotechnol* **64**(4): 515-24.
- Richardson, J. P. (1993). "Transcription termination." *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **28**: 1-30.
- Riesner, D., G. Steger, R. Zimmat, R. A. Owens, M. Wagenhöfer, W. Hillen, S. Vollbach and K. Henco (1989). "Temperature-gradient gel electrophoresis of nucleic acids: analysis of conformational transitions, sequence variations, and protein-nucleic acid interactions." *Electrophoresis* **10**: 377-389.
- Ritchie, M. E., J. Silver, A. Oshlack, M. Holmes, D. Diyagama, A. Holloway and G. K. Smyth (2007). "A comparison of background correction methods for two-colour microarrays." *Bioinformatics* **23**(20): 2700-7.
- Rivas, E., R. J. Klein, T. A. Jones and S. R. Eddy (2001). "Computational identification of noncoding RNAs in E. coli by comparative genomics." *Curr Biol* **11**(17): 1369-73.

- Roberts, C. W. and J. W. Roberts (1996). "Base-specific Recognition of the nontemplate strand of promoter DNA by the *E. coli* RNA polymerase." *Cell* **86**: 495-501.
- Roesch, P. L. and I. C. Blomfield (1998). "Leucine alters the interaction of the leucine-responsive regulatory protein (Lrp) with the fim switch to stimulate site-specific recombination in *Escherichia coli*." *Mol Microbiol* **27**(4): 751-61.
- Romeo, T. (1998). "Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non-coding RNA molecule CsrB." *Mol Microbiol* **29**(6): 1321-30.
- Rosenbaum, V. and D. Riesner (1987). "Temperature-gradient gelelectrophoresis: thermodynamic analysis of nucleic acids and proteins in purified form and in cellular extracts." *Biophys. Chem.* **26**: 235-246.
- Sauter, C., J. Basquin and D. Suck (2003). "Sm-like proteins in Eubacteria: the crystal structure of the Hfq protein from *Escherichia coli*." *Nucleic Acids Res* **31**(14): 4091-8.
- Schäferkordt, J. (2001). Untersuchungen zur extraribosomaler RNA-Regionen bei der Biogenese der kleinen ribosomalen Untereinheit in *Escherichia coli*. Dissertation, Physikalische Biologie, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
- Schroder, O. and R. Wagner (2002). "The bacterial regulatory protein H-NS--a versatile modulator of nucleic acid structures." *Biol Chem* **383**(6): 945-60.
- Schröder, O. and R. Wagner (2002). "The bacterial regulatory protein H-NS - A versatile modulator of nucleic acid structures." *Biological Chemistry* **383**: 945-960.
- Schumacher, M. A., R. F. Pearson, T. Moller, P. Valentin-Hansen and R. G. Brennan (2002). "Structures of the pleiotropic translational regulator Hfq and an Hfq-RNA complex: a bacterial Sm-like protein." *Embo J* **21**(13): 3546-56.
- Shalon, D., S. J. Smith and P. O. Brown (1996). "A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization." *Genome Res* **6**(7): 639-45.
- Shiraishi, K., Y. Ogata, K. Hanada, Y. Kano and H. Ikeda (2007). "Roles of the DNA binding proteins H-NS and StpA in homologous recombination and repair of bleomycin-induced damage in *Escherichia coli*." *Genes Genet Syst* **82**(5): 433-9.
- Siegele, D. A. (2005). "Universal stress proteins in *Escherichia coli*." *J Bacteriol* **187**(18): 6253-4.
- Silhavy, P. G., Berman, M. L. & Enquist, L. W. (1984). Experiments with gene fusions., Cold Spring Harbour Press.
- Small, E., R. Marrington, A. Rodger, D. J. Scott, K. Sloan, D. Roper, T. R. Dafforn and S. G. Addinall (2007). "FtsZ polymer-bundling by the *Escherichia coli* ZapA orthologue, YgfE, involves a conformational change in bound GTP." *J Mol Biol* **369**(1): 210-21.
- Sonden, B. and B. E. Uhlin (1996). "Coordinated and differential expression of histone-like proteins in *Escherichia coli*: regulation and function of the H-NS analog StpA." *Embo J* **15**(18): 4970-80.

- Sonnenfield, J. M., C. M. Burns, C. F. Higgins and J. C. Hinton (2001). "The nucleoid-associated protein StpA binds curved DNA, has a greater DNA-binding affinity than H-NS and is present in significant levels in hns mutants." *Biochimie* **83**(2): 243-9.
- Sperandio, V., C. C. Li and J. B. Kaper (2002). "Quorum-sensing Escherichia coli regulator A: a regulator of the LysR family involved in the regulation of the locus of enterocyte effacement pathogenicity island in enterohemorrhagic E. coli." *Infect Immun* **70**(6): 3085-93.
- Spory, A., A. Bosserhoff, C. von Rhein, W. Goebel and A. Ludwig (2002). "Differential regulation of multiple proteins of Escherichia coli and Salmonella enterica serovar Typhimurium by the transcriptional regulator SlyA." *J Bacteriol* **184**(13): 3549-59.
- Spurio, R., M. Falconi, A. Brandi, C. L. Pon and C. O. Gualerzi (1997). "The oligomeric structure of nucleoid protein H-NS is necessary for recognition of intrinsically curved DNA and for DNA bending." *Embo J* **16**(7): 1795-805.
- Stauffer, L. T. and G. V. Stauffer (1999). "Role for the leucine-responsive regulatory protein (Lrp) as a structural protein in regulating the *Escherichia coli* gcvTHP operon." *Microbiology* **145**(Pt 3): 569-76.
- Stella, S., M. Falconi, M. Lammi, C. O. Gualerzi and C. L. Pon (2006). "Environmental Control of the In vivo Oligomerization of Nucleoid Protein H-NS." *J Mol Biol* **355**(2): 169-74.
- Stern, S., D. Moazed and H. F. Noller (1988). "Structural analysis of RNA using chemical and enzymatic probing monitored by primer extension." *Methods Enzymol.* **164**: 481-489.
- Storz, G. (2002). "An expanding universe of noncoding RNAs." *Science* **296**(5571): 1260-3.
- Storz, G., S. Altuvia and K. M. Wassarman (2005). "An Abundance of RNA Regulators." *Annu Rev Biochem* **74**: 199-217.
- Storz, G., J. A. Opdyke and A. Zhang (2004). "Controlling mRNA stability and translation with small, noncoding RNAs." *Curr Opin Microbiol* **7**(2): 140-4.
- Suzuki, K., P. Babitzke, S. R. Kushner and T. Romeo (2006). "Identification of a novel regulatory protein (CsrD) that targets the global regulatory RNAs CsrB and CsrC for degradation by RNase E." *Genes Dev* **20**(18): 2605-17.
- Tanaka, K., Y. Takayanagi, N. Fujita, A. Ishihama and H. Takahashi (1993). "Heterogeneity of the principal σ factor in *Escherichia coli*: the *rpoS* gene product, σ^{38} , is a second principal σ factor of RNA polymerase in stationary-phase *Escherichia coli*." *Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A.* **90**: 3511-3515.
- Thompson, J. F. and A. Landy (1988). "Empirical estimation of protein-induced DNA bending angles: applications to lambda site-specific recombination complexes." *Nucleic Acids Res.* **16**: 9687-9705.
- Tippner, D., H. Afflerbach, C. Bradaczek and R. Wagner (1994). "Evidence for a regulatory function of the histone-like *Escherichia coli* protein H-NS in ribosomal RNA synthesis." *Mol Microbiol* **11**(3): 589-604.

- Tippner, D. and R. Wagner (1995). "Fluorescence analysis of the Escherichia coli transcription regulator H- NS reveals two distinguishable complexes dependent on binding to specific or nonspecific DNA sites." *J Biol Chem* **270**(38): 22243-7.
- Travers, A. A. (1980). "Promoter sequence for stringent control of bacterial RNA synthesis." *J. Bacteriol.* **141**: 973-976.
- Trotochaud, A. E. and K. M. Wassarman (2004). "6S RNA function enhances long-term cell survival." *J Bacteriol* **186**(15): 4978-85.
- Trotochaud, A. E. and K. M. Wassarman (2005). "A highly conserved 6S RNA structure is required for regulation of transcription." *Nature Structural Biol.* **12**: 313-319.
- Trotochaud, A. E. and K. M. Wassarman (2006). "6S RNA Regulation of *pspF* Transcription Leads to Altered Cell Survival at High pH." *J Bacteriol* **188**(11): 3936-43.
- Uptain, S. M., C. M. Kane and M. J. Chamberlin (1997). "Basic mechanisms of transcript elongation and its regulation." *Annual Reviews of Biochemistry* **66**: 117-172.
- van der Ploeg, J. R., E. Eichhorn and T. Leisinger (2001). "Sulfonate-sulfur metabolism and its regulation in Escherichia coli." *Arch Microbiol* **176**(1-2): 1-8.
- van Dyke, M., R. P. Hertzberg and P. B. Dervan (1982). "Map of distamycin, netropsin, and actinomycin binding sites on heterogeneous DNA:DNA cleavage-inhibition patterns with methidiumpropyl-EDTA-Fe(II)." *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A.* **79**: 5470-5474.
- VanBogelen, R. A. and F. C. Neidhardt (1990). "Ribosomes as sensors of heat and cold shock in Escherichia coli." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(15): 5589-93.
- Vassilyev, D. G., S. I. Sekine, O. Laptenko, J. Lee, M. N. Vassilyeva, S. Borukhov and S. Yokoyama (2002). "Crystal structure of a bacterial RNA polymerase holoenzyme at 2.6 Å resolution." *Nature* **417**: 712-719.
- Vogel, D. W., R. K. Hartmann, J. C. Struck, N. Ulbrich and V. A. Erdmann (1987). "The sequence of the 6S RNA gene of Pseudomonas aeruginosa." *Nucleic Acids Res* **15**(11): 4583-91.
- Vogel, J., V. Bartels, T. H. Tang, G. Churakov, J. G. Slagter-Jager, A. Huttenhofer and E. G. Wagner (2003). "RNomics in Escherichia coli detects new sRNA species and indicates parallel transcriptional output in bacteria." *Nucleic Acids Res* **31**(22): 6435-43.
- Vogel, J. and K. Papenfort (2006). "Small non-coding RNAs and the bacterial outer membrane." *Curr Opin Microbiol* **9**(6): 605-11.
- Wagner, R. (2000). Transcription Regulation in Prokaryotes. Oxford, Oxford University Press.
- Wagner, R. (2001). Translational components in prokaryotes: genetics and regulation. Encyclopedia of Life Sciences. N. P. Group. London, Macmillan Publishers Ltd.: 1-8.
- Wang, J. Y. and M. Syvanen (1992). "DNA twist as a transcriptional sensor for environmental changes." *Molecular Microbiol.* **6**: 1861-1866.
- Wassarman, K. M. (2007). "6S RNA: a small RNA regulator of transcription." *Curr Opin Microbiol* **10**(2): 164-8.

- Wassarman, K. M., F. Repiola, C. Rosenow, G. Storz and G. Gottesmann (2001). "Identification of novel small RNAs using comparative genomics and microarrays." *Genes & Development* **15**: 1637-1651.
- Wassarman, K. M. and R. M. Saecker (2006). "Synthesis-mediated release of a small RNA inhibitor of RNA polymerase." *Science* **314**(5805): 1601-3.
- Wassarman, K. M. and G. Storz (2000). "6S RNA regulates *E. coli* RNA polymerase activity." *Cell* **101**: 613-623.
- Wassarman, K. M., A. Zhang and G. Storz (1999). "Small RNAs in *Escherichia coli*." *Trends Microbiol.* **7**: 37-45.
- Williams, R. M. and S. Rimsky (1997). "Molecular aspects of the *E. coli* nucleoid protein, H-NS: a central controller of gene regulatory networks." *FEMS Microbiol Lett* **156**(2): 175-85.
- Williams, R. M., S. Rimsky and H. Buc (1996). "Probing the structure, function, and interactions of the *Escherichia coli* H-NS and StpA proteins by using dominant negative derivatives." *J Bacteriol* **178**(15): 4335-43.
- Willkomm, D. K., J. Minnerup, A. Huttenhofer and R. K. Hartmann (2005). "Experimental RNomics in *Aquifex aeolicus*: identification of small non-coding RNAs and the putative 6S RNA homolog." *Nucleic Acids Res* **33**(6): 1949-60.
- Windbichler, N., F. von Pelchrzim, O. Mayer, E. Csaszar and R. Schroeder (2008). "Isolation of small RNA-binding proteins from *E. coli* : evidence for frequent interaction of RNAs with RNA polymerase." *RNA Biol* **5**(1).
- Withey, J. H. and D. I. Friedman (2002). "The biological roles of trans-translation." *Curr Opin Microbiol* **5**(2): 154-9.
- Wolf, T., W. Janzen, C. Blum and K. Schnetz (2006). "Differential dependence of StpA on H-NS in autoregulation of stpA and in regulation of bgl." *J Bacteriol* **188**(19): 6728-38.
- Wu, H. M. and D. M. Crothers (1984). "The locus of sequence-directed and protein-induced DNA bending." *Nature* **308**: 509-513.
- Xu, P., M. Guo and B. A. Hay (2004). "MicroRNAs and the regulation of cell death." *Trends Genet* **20**(12): 617-24.
- Yamada, H., S. Muramatsu and T. Mizuno (1990). "An *Escherichia coli* protein that preferentially binds to sharply curved DNA." *J Biochem (Tokyo)* **108**(3): 420-5.
- Yamada, H., T. Yoshida, K. Tanaka, C. Sasakawa and T. Mizuno (1991). "Molecular analysis of the *Escherichia coli* hns gene encoding a DNA-binding protein, which preferentially recognizes curved DNA sequences." *Mol Gen Genet* **230**(1-2): 332-6.
- Zabeau, M. R., R. (1979). The role of restriction endonucleases in molecular genetics., Academic Press.
- Zacharias, M., H. U. Göringer and R. Wagner (1989). "Influence of the GCGC discriminator motif introduced into the ribosomal RNA P2- and tac promoter on growth rate control and stringent sensitivity." *EMBO J.* **11**: 3357-3363.

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

Zacharias, M., H. U. Göringer and R. Wagner (1992). "Analysis of the Fis-dependent and independent transcription activation mechanism of the *E. coli* ribosomal RNA P1 promoter." *Biochemistry* **31**: 2621-2628.

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

Zhang, A., V. Derbyshire, J. L. Salvo and M. Belfort (1995). "*Escherichia coli* protein StpA stimulates self-splicing by promoting RNA assembly *in vitro*." *RNA* **1**(8): 783-93.

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

Zhang, J., Y. Zeuner, A. Kleefeld, G. Udden and A. Janshoff (2004). "Multiple site-specific binding of Fis protein to *Escherichia coli* *nuoA-N* promoter DNA and its impact on DNA topology visualised by means of scanning force microscopy." *Chembiochem* **5**(9): 1286-9.

6.5 Danksagung

Einen außerordentlichen Dank an Prof. Dr. Rolf Wagner für die wissenschaftliche Betreuung, die Erlaubnis immer und alles fragen zu dürfen und sein Durchhaltevermögen beim Publizieren unserer Daten. Ich durfte von seinem beeindruckenden Fachwissen profitieren, das dem eines Eydeeten sehr nahe kommt!

Dank an Prof. Dr. J. Ernst für die Übernahme der Koreferenz.

Ein Dankeschön auch Tino Polen für die Zusammenarbeit in Sachen DNA-Chips.

Vielen Dank Reini! Für alle aufreinigten Proteine, für köstliche Hefezöpfe (in genau richtiger Größe), für helfende Hände im Labor, praktischen Rat sowie für die vielen kleinen Dinge, die du machst und die so oft übersehen werden.

Großen Dank meinem `Leidensgenossen` Ümmi! Für gute Zusammenarbeit, moralische Unterstützung und große Hilfe über 5 Jahre gemeinsamer Forschung. Für kurze, aber sehr intensive Fußballspiele und auch für deine philosophischen Ausführungen in Sachen Wochentage.

Dankeschön Nina und Resi für die Zeit im goldenen Westen! Für kurz angedeutete Schüppchen, westfälische Trockenheit bzw. schallendes Lachen, lustige Schachprofile und natürlich für denkwürdige (gefühlte) Freitage. Ihr habt euch in Sachen Leidenschaft echt entwickelt!!

Dank allen früheren (vor allem: Cori, Nina, Marc, Britta, Bibi) und aktuellen (Tommy, Zihni, Philli, Superinti) Labor-Hanselkollegen aus Ost, Südost und West. Für jede Hilfe, Unterstützung und wissenschaftliche Diskussion. Aber auch für's Korrekturlesen, Zitate von K. A. Lauer, großartige Geburtstagsfrühstückx, gemeinsame Hä-brä-isch-Kurse, Upsi's und eine unübertroffene Arbeitsatmosphäre.

Dank an Frau Greschkowitz und Frau Beckmann für ihre wertvolle Hilfe im Labor und Bernd für viele gemeinsame und unterhaltsame Mensagänge.

Danke auch meinen leichtfüßigen Brüdern, meinem cuñado cubano, Beule, Peter und Kalle. Wir sehen uns zwar leider viel zu selten, aber wir wissen, dass wir uns aufeinander verlassen können.

Besonders möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken für Unterstützung, Halt und Vertrauen bei allem was ich mache.

Der größte Dank gilt Annia und Daniel. Ihr seid in der letzten Zeit viel zu kurz gekommen und habt zwischenzeitlich alleinerziehende Mutter mit Kind `gespielt`.

Danke für Geduld Verständnis Unterstützung Vertrauen Liebe Alles

Ich freu mich auf unsere Zeit!

6.6 Eidesstattliche Erklärung

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

Düsseldorf, Mai 2008