

1. Summaries

1.1 Summary (English version)

Different environmental stimuli cause bacteria to exchange the sigma subunit in the RNA polymerase (RNAP) and, thereby, tune their gene expression according to the newly emerging needs. Sigma factors are usually thought to recognise clearly distinguishable promoter DNA determinants. However, the case seems to be different for the housekeeping sigma factor in *Escherichia coli*, σ^{70} (RpoD) and σ^S (RpoS), the principle sigma factor in stationary phase and in stressful conditions. These two sigma factors show a high degree of sequence similarity and were found to bind favourably to almost identical -35 and -10 elements in-vitro. Nevertheless, the two sigma factors have clearly different regulons in-vivo, being responsible together for the regulation of more than 90% of the entire genome.

The answer to the “ σ^S promoter selectivity paradox” has puzzled researchers for a long period and only recently has started to be elucidated. A combination of features allows promoter discrimination to be generated between $E\sigma^{70}$ and $E\sigma^S$. Beyond a clear different nucleotide preference in the extended -10 region, the baseline is that $E\sigma^S$ seems to tolerate more efficiently minor deviations in several features of an optimal consensus promoter. This way $E\sigma^S$ is enabled to define its own “field of action”; a conclusion in large parts based on results presented in this work. But even when the cis-features are not present or not sufficient, further σ^S - promoter selectivity can be introduced by trans-acting factors. Part of my work has been focused on clarifying how such factors exert their role.

First, by using several natural and synthetic promoters, I was able to show an implication of the UP-element in $E\sigma^{70}/E\sigma^S$ competition for promoters carrying canonical -10 and -35 elements. UP-elements are A/T rich motifs, located upstream of the -35 box, into which binding of the α subunit C-terminal domain (α CTD) leads to transcriptional activation. Only $E\sigma^S$ was shown to use efficiently the distal UP-element sub-site, whereas full UP-elements or proximal UP-element half-sites favoured $E\sigma^{70}$ -mediated transcription, provided that a -35 box was co-present. By genetic analysis this differential behaviour of the two holoenzymes was attributed to an inability of σ^S to interact with an adjacently placed α CTD. In contrast, such a direct interaction between α CTD and σ^{70} is known to stimulate transcription. Footprinting analysis verified that the two RNAPs adopt separate ways in-vitro for initiating transcription from the same promoters, and that their binding-kinetics to the promoters with the various UP-elements configurations corresponds perfectly to their in-vivo preference for them.

Furthermore, a new alignment of 80 experimentally determined σ^S -dependent promoters indicated that many of them do possess a -35 element, in contradiction to the current belief, but the majority has it “misplaced” by 1-2bp. Thus, $E\sigma^S$ does not show the rigid preference of $E\sigma^{70}$ for 17bp spacers between the -10 and -35 hexamers. These “misplaced” -35 elements were found to be functional in many cases. In addition, the high conservation of longer or shorter spacers than 17 bp in σ^S -dependent genes was due to the σ^S promoter selectivity that these deviations conferred. Finally, the distinctive structural flexibility of $E\sigma^S$ in recognising “misplaced” -35 elements was shown to be due to a different interaction of its region 4 with the β flap subunit of RNAP and/or due to the unique way $E\sigma^S$ binds to the extended -10 promoter region.

Apart from the intrinsic cis-acting features that generate promoter selectivity, it is quite frequent that promoters gain their selectivity only with the aid of additional transcriptional regulators. In the case of *proP* (P2), Fis acts as a class II transcriptional regulator and co-activates the promoter with $E\sigma^S$. It could be demonstrated that the selective $E\sigma^S$ -Fis synergy on this promoter is due to the fact that Fis binds at position -41 and sterically forces RNAP to

operate with a 16bp-spaced promoter; this requirement can be successfully met by $E\sigma^S$, but not by $E\sigma^{70}$. In addition, the molecular outer face of the domain 4 of σ^S is better suited for interacting with Fis.

But even before σ^S competes with σ^{70} for promoter recognition, one of its main problems (and that of other alternative sigmas) is to out-compete the vegetative σ^{70} from core RNAP in stress situations. The cell invests different factors and mechanisms to ensure a rapid down regulation of σ^{70} effectiveness, and, thereby, to ensure that all alternative sigmas get their portion of core RNAP. Crl was shown here to directly help σ^S compete with σ^{70} for limiting amounts of core RNAP, both in-vivo and in-vitro, by supporting $E\sigma^S$ formation. In addition, a microarray analysis could confine the role of Crl in stationary phase to that of an auxiliary factor of σ^S , especially when the latter was present in lower cellular amounts. Finally, the pathways enabling Crl to exert a dual role in the regulation of σ^S levels and activity were identified.

To conclude, this project aimed to characterise the function of different cis- and trans-acting elements that support the major “stress response” sigma factor, σ^S , to control its substantial regulon (up to 10% of the entire genome). In order to achieve that, σ^S has to harshly compete with the housekeeping sigma, both for limited amounts of core RNAP, but also for recognition of almost identical core promoter sequences.

1.2 Zusammenfassung (Deutsche Version)

Unterschiedliche Umweltstimuli veranlassen Bakterien dazu, die Sigma-Untereinheit in der RNA-Polymerase (RNAP) auszutauschen und dadurch ihre Genexpression auf die neu aufkommenden Bedürfnisse einzustellen. Normalerweise gilt, dass unterschiedliche Sigmafaktoren klar unterscheidbare Promotor-DNA Determinanten erkennen. Im Fall des vegetative Sigmafaktors in *Escherichia coli*, σ^{70} (RpoD) und σ^S (RpoS), dem Hauptsigmafaktor in der Stationärphase und unter Stressbedingungen verhält es sich jedoch anders. Diese beiden Sigmafaktoren zeigen ein hohes Maß an Sequenzähnlichkeit und binden bevorzugt an fast identische -35 und -10 Elemente *in vitro*. Dennoch haben die beiden Sigmafaktoren *in vivo* klar unterscheidbare Regulons und sind dabei gemeinsam für die Regulation von mehr als 90% des gesamten Genoms verantwortlich.

Die Lösung des „ σ^S Promotor-Selektivitäts Paradoxes“ beschäftigt Forscher bereits seit langer Zeit und erst kürzlich ist es gelungen, ihr näher zu kommen. Eine Kombination von Eigenschaften ermöglicht die Unterscheidung von Promotoren durch $E\sigma^{70}$ und $E\sigma^S$. Neben einer eindeutig unterschiedlichen Nukleotid-Präferenz in der erweiterten -10 Region gilt generell, dass $E\sigma^S$ effektiver geringfügige Abweichungen von einem optimalen Konsensus-Promotor zu tolerieren scheint. Auf diese Weise wird es $E\sigma^S$ möglich, sein eigenes „Aktionsfeld“ zu definieren; eine Schlussfolgerung, die zu großen Teilen auf Ergebnissen basiert, die in dieser Arbeit präsentiert werden. Doch selbst wenn die *in cis* wirkende Faktoren nicht oder nur unzureichend vorhanden sind, kann σ^S -Promoterselektivität durch *in trans* wirkende Faktoren hervorgerufen werden. Ein Teil meiner Arbeit hat sich mit der Klärung der Frage beschäftigt, wie derartige Faktoren ihre Rolle ausüben.

Erstens konnte ich durch die Verwendung von mehreren natürlichen und synthetischen Promotoren eine Beteiligung des UP-Elements am Wettbewerb von $E\sigma^{70}$ und $E\sigma^S$ um Promotoren mit kanonischen -10 und -35 Elementen etablieren. UP-Elemente sind A/T-reiche Motive, die stromaufwärts von der -35 Box lokalisiert sind. Die Bindung der UP-Elemente durch die C-terminale Domäne der α -Untereinheit (α CTD) führt zur Transkriptionsaktivierung. Nur $E\sigma^S$ kann die distale Halbseite des UP-Elements effizient nutzen, während vollständige UP-Elemente oder proximale UP-Element Halbseiten $E\sigma^{70}$ -vermittelte Transkription begünstigen, vorausgesetzt, dass gleichzeitig eine -35 Box vorhanden ist. Genetische Analysen konnten dieses unterschiedliche Verhalten der zwei Holoenzyme darauf zurückführen, dass σ^S unfähig ist, mit einer benachbart platzierten α CTD zu interagieren. Im Gegensatz dazu ist bekannt, dass eine polare Interaktion zwischen der α CTD und σ^{70} die Transkription stimuliert. Footprint Analysen bestätigten, dass die beiden RNAPs *in vitro* auf unterschiedliche Weise die Transkription an den gleichen Promotoren initiieren. Die jeweiligen Kinetiken ihrer Bindung an die Promotoren mit den verschiedenen UP-Element-Konfigurationen korrespondieren perfekt mit ihren *in vivo*-Präferenzen für diese.

Des Weiteren wies ein Alignment von 80 experimentell bestimmten σ^S -abhängigen Promotoren darauf hin, dass viele dieser Promotoren, im Widerspruch zu derzeitigen Annahmen, ein -35 Element besitzen. Die Mehrzahl der Promotoren trägt dieses jedoch um 1-2bp „versetzt“. Daher zeigt $E\sigma^S$ nicht die rigide Präferenz, die $E\sigma^S$ für 17bp-Spacer besitzt. Diese „versetzten“ -35 Elemente sind in vielen Fällen funktionsfähig. Außerdem war die starke Konservierung von Spacern, die länger oder kürzer als 17 bp sind, in σ^S -abhängigen Genen auf die σ^S -Promotor-Selektivität zurückzuführen, die diese Abweichungen bewirkten. Schließlich konnte gezeigt werden, dass die spezifische strukturelle Flexibilität von $E\sigma^S$ bei der Erkennung von „versetzten“ -35 Elementen auf einer unterschiedlichen Interaktion der

Region 4 von σ^S mit der β -Flap-Untereinheit der RNAP und/oder auf der unterschiedlichen Art und Weise, wie $E\sigma^S$ an die erweiterte -10 Promotorregion bindet, beruht.

Abgesehen von den intrinsischen *in cis* wirkenden Faktoren, die Promotor-Selektivität bewirken, erhalten Promotoren relativ häufig ihre Selektivität nur durch die Funktion von zusätzlichen transkriptionalen Regulatoren. Im Fall von *proP* (P2) agiert Fis als ein Klasse II transkriptionaler Regulator und co-aktiviert den Promotor zusammen mit $E\sigma^S$. Wir konnten zeigen, dass die selektive $E\sigma^S$ -Fis-Synergie an diesem Promotor darauf zurückzuführen ist, dass Fis an Position -41 bindet und RNAP sterisch dazu zwingt, mit einem 16bp-Spacer zu interagieren. Diese Voraussetzung kann erfolgreich von $E\sigma^S$, jedoch nicht von $E\sigma^{70}$ erfüllt werden. Zudem ist die nach außen gerichtete Oberfläche von σ^S von vornherein besser für eine Interaktion mit Fis geeignet.

Doch noch bevor σ^S mit σ^{70} um die Promotor-Erkennung konkurriert ist eins seiner Hauptprobleme (und das von anderen Sigmafaktoren) erfolgreich mit dem vegetativen σ^{70} um die Kern-RNAP zu konkurrieren. Die Zelle investiert unterschiedliche Faktoren und Mechanismen, um eine schnelle Runterregulierung der Effektivität von σ^{70} zu gewährleisten und dadurch sicher zu stellen, dass alle alternativen Sigmafaktoren ihren Anteil an Kern-RNAP erhalten. Hier wurde gezeigt, dass Crl sowohl *in vivo* als auch *in vitro* σ^S direkt hilft, mit σ^{70} um die limitierende Menge an Kern-RNAP zu konkurrieren, indem es die Bildung von $E\sigma^S$ unterstützt. Außerdem konnten Microarray-Analysen die Rolle von Crl in der Stationärphase auf die eines Hilfsfaktors für σ^S einschränken, besonders wenn letzterer in niedrigeren zellulären Konzentrationen vorhanden war. Schließlich wurden die Wege identifiziert, die es Crl ermöglichen, eine doppelte Rolle in der Regulation von σ^S -Spiegeln und -Aktivität auszuüben.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es das Ziel meiner Dissertation war, die Funktion verschiedener *in cis* und *in trans* wirkender Elemente zu charakterisieren, die den Hauptsigmafaktor der „Stressantwort“ σ^S dabei unterstützen, sein umfangreiches Regulon (bis zu 10% des gesamten Genoms) zu aktivieren. Dafür muss σ^S hart mit dem vegetative Sigmafaktor konkurrieren, sowohl um limitierte Mengen an Kern-RNAP als auch um die Erkennung von fast identischen Kern-Promotor-Sequenzen.