Funktion von kleinen regulatorischen RNAs und der Codon-Verwendung bei der Regulation der RpoS (σ^S)- Untereinheit der RNA-Polymerase in *Escherichia coli*

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Tim Kolmsee

2011

Diese Arbeit entstand in der Zeit zwischen Januar 2007 und Juli 2011 am Institut für Biologie-Mikrobiologie in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Regine Hengge an der Freien Universität Berlin. Experimente zur Identifikation von *rpoS* regulierenden kleinen regulatorischen RNAs durch 454 Pyrosequenzierung wurden in einer Zusammenarbeit mit Dr. Cynthia Sharma und Prof. Dr. Jörg Vogel (Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie, Berlin) durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Regine Hengge
2. Gutachter: Prof. Dr. Kürşad Turgay

Disputation am: 10.10.2011

EIGENE PUBLIKATIONEN

Basineni SR, Madhugiri R, **Kolmsee T**, Hengge R, Klug G. (2009). The influence of Hfq and ribonucleases on the stability of the small non-coding RNA OxyS and its target *rpoS* in *E. coli* is growth phase dependent. *RNA Biol*. **6**: 584-94.

Kolmsee T, Hengge R. (2011). Rare codons play a positive role in the expression of the stationary phase sigma factor RpoS (σ^S) in *Escherichia coli*. *RNA Biol*. **8**: 913 – 921.

Kolmsee T, Delic D, Agyenim T, Calles C, Wagner R. (2011). Differential stringent control of *E. coli* rRNA promoters: effects of the initiating nucleotides (iNTPs) and DksA. *Microbiology* **157**: 2871-2879.

Kolmsee T, Possling A, Hengge R. (2011). Small regulatory RNAs are involved but not sufficient for RNA-based osmoregulation of *rpoS* in *Escherichia coli*. in preparation.

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Regine Hengge für die Möglichkeit, dieses interessante Thema zu bearbeiten, sowie für die vielen inspirierenden und motivierenden Diskussionen, die entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Ihr und Prof. Dr. Kürşad Turgay gilt auch mein Dank für die schnelle Begutachtung dieser Arbeit. Zudem möchte ich mich bei Prof. Dr. Kürşad Turgay auch für die vielen Ratschläge und Diskussionen, sowohl wissenschaftlicher, als auch nichtwissenschaftlicher Natur bedanken.

Allen ehemaligen und aktuellen Mitarbeitern der AG Hengge und AG Turgay danke ich für das angenehme Arbeitsumfeld und die vielfältigen Gespräche, die glücklicherweise nicht immer Arbeit zum Thema hatten und einem den Alltag bereichert haben. Vor allem möchte ich hierbei Alex, Anja, Christine, Christina, Eberhard, Franzi, Gisela, Klaus, Lydia, Natalia, Nicole, Noël, Sandra, Steffi, Stephanie und Viola, sowie allen anderen, die ich hier möglicherweise vergessen habe, danken.

Ein dickes Dankeschön gebührt auch Alex für die technische Hilfe, wie das Animpfen von Kulturen und die Unterstützung bei Experimenten, vor allem in der Endphase dieser Arbeit. Ich möchte mich auch bei meiner Praktikantin Viola bedanken. Ein besonderer Dank gilt auch Klaus für seine vielfältige Unterstützung innerhalb des Instituts, die ein Arbeiten im Labor oft erst ermöglicht haben. Danke auch an Arnhild und Mike und Frau Sauter für das Bereitstellen von Agarplatten, Lösungen und Wachstumsmedien. Ebenso bedanke ich mich bei Frau Niklas für ihre freundliche Hilfe im Laboralltag.

Ich möchte mich auch bei Harry Lenz und Herrn Kiske für ihre schnelle Hilfe bei technischen Problemen aller Art bedanken. Bei Bernd Richter möchte ich mich für die eine oder andere Pflanze bedanken, die meinen Balkon daheim geschmückt und mir so meinen Feierabend oft versüßt hat.

Frau Wedel und Frau Wurm danke ich für ihre humorvolle Unterstützung in bürokratischen und anderen Anliegen.

Auch meinen Eltern danke ich für ihre Unterstützung während der Promotionszeit. Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Freunden und Paul für ihre Unterstützung während der, emotional nicht immer ganz einfachen Zeit, vor allem beim Schreiben dieser Arbeit, bedanken.

INHALTSVERZEICHNIS

1 Zusammenfassung (Abstract) ... 1

Abstract ... 2

2 Einleitung ... 5

2.1 Globale Genregulation bei Bakterien als Adaptation an sich ändernde Umweltbedingungen ... 5

2.1.1 Struktur und Funktion bakterieller Promotoren und die RNA-Polymerase (RNAP) aus *E. coli* ... 6

2.1.2 Die bakterielle Transkription und ihre Regulation ... 8

2.1.3 Transkriptionsregulation durch Sigmafaktoren ... 10

2.2 Regulation durch kleine nichtkodierende regulatorische RNAs (sRNAs) ... 12

2.2.1 *cis*-kodierte (Antisense) sRNAs ... 14

2.2.2 *trans*-kodierte sRNAs ... 14

2.2.2.1 Translationale Repression durch *trans*-kodierte sRNAs ... 16

2.2.2.2 Translationale Aktivierung durch *trans*-kodierte sRNAs: die prototypische *rpoS* mRNA ... 17

2.2.2.3 Weitere physiologische Funktionen *trans* kodierter sRNAs ... 20

2.2.3 Proteinaktivitäts-modulierende sRNAs ... 20

2.2.3.1 6S RNA ... 21

2.2.3.2 CsrB und CsrC sRNAs ... 21

2.3 RpoS- der Masterregulator der generellen Stressantwort in *E. coli* ... 22

2.3.1 Das RpoS-kontrollierte Netzwerk ... 23

2.3.1.1 Struktur RpoS-abhängiger Promotoren und RpoS-Selektivität ... 23

2.3.1.2 RpoS und die Osmostressantwort ... 25

2.3.1.3 RpoS und die Säurestressantwort ... 26

2.3.2 Regulation der zellulären RpoS-Menge und der RpoS-Aktivität ... 27

2.3.2.1 Regulation der *rpoS* Transkription ... 27

2.3.2.2 Regulation des *rpoS* mRNA Abbaus ... 29

2.3.2.3 Regulation der *rpoS* Translation ... 31

2.3.2.4 Regulation der RpoS-Proteolyse ... 33

2.3.2.5 Regulation der RpoS-Aktivität ... 35
2.4 Codon-Usage und der Einfluss von raren Codons auf die Genexpression ... 35
2.5 Zielsetzung ... 38
3 Material und Methoden ... 40
3.1 Materialien und Chemikalien ... 40
3.2 Bakterienstämme, Bakteriophagen und Plasmide ... 41
3.3 Medien und Medienzusätze ... 46
3.3.1 Flüssigmedien ... 46
3.3.2 Feste Medien ... 46
3.3.3 Medienzusätze ... 46
3.4 Mikrobiologische Methoden ... 47
3.4.1 Sterilisation ... 47
3.4.2 Aufbewahrung von Bakterienstämmen ... 47
3.4.3 Wachstumsbedingungen ... 47
3.4.4 Bestimmung der Zelldichte in Flüssigkulturen ... 47
3.4.5 Herstellung eines P1-Lysats ... 47
3.4.6 P1-Transduktion ... 48
3.5 Biochemische Methoden ... 48
3.5.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ... 48
3.5.2 Immunoblot-Analyse (Westernblot) ... 50
3.5.3 *In vivo* Markierung von Proteinen mit L-[^{35}S]-Methionin („Pulse-Chase"-Experimente) und nachfolgender Immunopräzipitation zur Bestimmung der RpoS-Syntheserate in hyperosmotisch gestressten und ungestressten Zellen ... 51
3.5.4 Nicht-radioaktive Bestimmung der RpoS-Halbwertszeit *in vivo* ... 52
3.5.5 Hfq co-Immunopräzipitation, cDNA-Synthese und 454 Pyrosequenzierungs-analyse ... 53
3.5.6 Bestimmung der β-Galaktosidase-Aktivität ... 54
3.6 Molekularbiologische Methoden ... 55
3.6.1 Präparation von chromosomaler und Plasmid-DNA ... 55
3.6.2 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA und RNA ... 55
3.6.3 Agarosegelelektrophorese ... 55
3.6.4 Polymerasekettenreaktion (PCR) ... 56

3.6.5 Transformation 56
3.6.6 Klonierung 56
3.6.7 Konstruktion von Plasmiden 57
3.6.7.1 Konstruktion der *rpoS* Codonmutante 57
3.6.7.2 Klonierung der transkriptionalen tRNA::*lacZ*-Fusionen 58
3.6.7.3 Klonierung der translationalen *rpoS*::*gfp*-Fusionen 59
3.6.7.4 Klonierung der sRNA-Vektoren 60
3.6.8 Kreuzung der transkriptionalen *lacZ*-Fusionen in das Chromosom von *E. coli* 60
3.6.9 Herstellung der *arcZ*-, *omrA*- und *omrB*-Mutanten über eine „One-Step"-Inaktivierung 61
3.6.10 Elimination der kan-Kassette in der *rprA*::kan Mutante 62
3.6.11 Herstellung eines Stammes mit chromosomalen 3xFLAG-getaggten Hfq 62
3.6.12 Herstellung der chromosomalen *rpoS* Codonmutante 63
3.6.13 Isolation von Gesamt-RNA 64
3.6.14 Northernblot-Analyse 64
3.6.14.1 Agarosegel-Formaldehyd-Northernblot 64
3.6.14.2 Polyacrylamid-Harnstoff-Gel Northernblot 67
3.6.15 Bestimmung der Halbwertszeit der *rpoS* mRNA *in vivo* 68
4 Ergebnisse 69
4.1 Der Einfluss von raren Codons auf die Expression von RpoS 69
4.1.1 Die *rpoS* mRNA enthält signifikant mehr rare Codons als die *rpoD* mRNA 69
4.1.2 Die Substitution der raren Codons im *rpoS* Wildtyp durch häufigere synonyme *rpoD* Codons führt zu erniedrigten *rpoS* mRNA und RpoS-Proteinmengen 71
4.1.3 Die Substitution der raren Codons durch häufigere in der *rpoS* Codonmutante geht mit einem schnelleren Abbau der *rpoS* mRNA einher 73
4.1.4 Die häufigeren Codons der *rpoS* Codonmutante führen zu einer erhöhten Sensitivität der *rpoS* mRNA gegenüber der einzelstrangspezifischen Endoribonuklease RNase E 73
4.1.5 Die Effekte der raren Codons in *rpoS* sind unabhängig von anderen Mechanismen der *rpoS* Regulation (chromosomaler Kontext) und Wachstumsbedingungen 76
4.1.6 Die *rpoS* Codon-Usage hat keinen Einfluss auf die Proteolyse des RpoS-Proteins 78

4.2 Wachstumsphasen-abhängige tRNA-Regulation in *E. coli* und der mögliche Einfluss dieser Regulation auf die Expression und Regulation von *rpoS* 80

4.3 Auch andere co-evolvierte Wachstumsphasen-abhängig induzierte Isoenzyme als RpoS und RpoD zeigen eine Korrelation zwischen Codon-Usage und Wachstumsphase .. 86

4.4 Identifikation neuer an der RpoS-Regulation beteiligter sRNAs durch die Analyse von Hfq-gebundenen RNAs mittels 454 Pyrosequenzierung 89

4.4.1 Die Bioinformatische Analyse der cDNA-Bibliotheken aus der 454 Pyrosequenzierung 93

4.4.2 Verifikation der sRNA-Expressionsdaten aus der Pyrosequenzierungsanalyse in Northernblot-Analysen 96

4.4.1 Einige der hyperosmotisch induzierten sRNAs weisen auch eine verstärkte Akkumulation in einer *hns* Mutante auf 98

4.4.2 Charakterisierung der translationalen Regulation einer *rpoS*::*gfp*-Reportergenfusion durch die hyperosmotisch induzierten sRNA-Kandidaten 99

4.5 Die hyperosmotische und Säurestress-vermittelte RpoS-Induktion ist nicht ausschließlich von der translationalen Aktivierung durch sRNAs abhängig 103

4.5.1 Eine *dsrA* Mutante weist eine stark reduzierte Akkumulation und Induktion von *rpoS* mRNA und RpoS-Protein unter Osmo- und Säurestress-Bedingungen auf 104

4.5.2 Eine *dsrA* Mutante weist auch erniedrigte RpoS-Syntheseraten in Antwort auf hyperosmotischen Stress auf 108

4.5.3 Der positive Effekt von DsrA auf die hyperosmotische Akkumulation und Induktion von RpoS ist unabhängig von H-NS 108

4.5.4 Die hyperosmotische induzierte sRNA DsrA zeigt eine nur leichte Säurestress-Induktion 111

4.5.5 Die *rpoS* mRNA zeigt eine hyperosmotische Stabilisierung, die von der sRNA DsrA abhängig ist 113

4.5.6 Die hyperosmotische Induktion der *rpoS* mRNA bleibt auch in einer *rprA dsrA arcZ* Tripelmutante, sowie in einer *hfq* Mutante erhalten 116

4.6 Hyperosmotischer Stress könnte die *rpoS* Transkription auf Elongationsebene beeinflussen 119

4.6.1 Untersuchungen zum Einfluss von NusG an einem mutmaßlichen *rpoS* Transkriptions-Antiterminations-Mechanismus unter hyperosmotischem Stress 123

5 Diskussion 127

5.1 Rare Codons spielen eine positive Rolle bei der *rpoS* Expression 127

5.1.1 Codon-Usage und evolutionäre Selektion: die *rpoS* mRNA mit ihren raren Codons scheint der positiven Selektion zugunsten erhöhter mRNA Stabilität zu unterliegen 127

5.1.2 Die raren Codons in *rpoS* legen einen Mechanismus nahe, der die Translationselongation zugunsten der Stabilität der *rpoS* mRNA verlangsamt 130

5.1.3 Der positive Effekt der raren Codons in *rpoS* auf dessen Expression ist robust und unabhängig von Temperatur, Wachstumsbedingungen und anderen Regulationsmechanismen 135

5.1.4 Auch die Gene anderer co-evolvierter Wachstumsphasen-abhängig exprimierter Isoenzyme zeigen auffällige Unterschiede in ihrer Codon-Usage 136

5.1.5 Co-translationale Proteinfaltung und tRNA-Regulation haben keinen Einfluss auf die Codon-Usage-abhängige Regulation der *rpoS* Expression 138

5.2 Identifikation von sRNAs, die an der Osmo- und Säurestress-Induktion von RpoS beteiligt sind 139

5.2.1 Identifikation von hyperosmotisch und in einer *hns* Mutante induzierten sRNAs 140

5.2.2 Regulation einer translationalen *rpoS*::*gfp*-Fusion durch die sRNA-Kandidaten 143

5.2.3 Die Stimulierung der *rpoS* Translation unter hyperosmotischem Stress und Säurestress ist von der direkten Regulation durch die sRNA DsrA abhängig 144

5.2.3.1 Die hyperosmotische DsrA-abhängige RpoS-Induktion 144

5.2.3.2 Die DsrA-vermittelte RpoS-Induktion unter Säurestress 147

5.2.4 Die hyperosmotische Induktion der *rpoS* mRNA könnte auf Ebene der Transkriptionselongation und/oder durch eine Modulation des DsrA-unabhängigen Abbaus positiv reguliert werden 149

5.3 Ausblick 154

6 Literaturverzeichnis 157

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 2.1 Konsensusstruktur eines σ^{70}-abhängigen Promotors aus *E. coli*…..……..…7

Abbildung 2.2: Struktur-Funktions-Beziehungen bakterieller Sigmafaktoren der σ^{70}-Familie……..11

Abbildung 2.3: Translationale Aktivierung der *rpoS* mRNA durch sRNAs……...……..…18

Abbildung 2.4: Verschiedene Stressbedingungen beeinflussen die zellulären RpoS-Mengen auf verschiedenen Regulationsebenen…….28

Abbildung 4.1: In RpoS werden viele Aminosäure verstärkt von raren Codons spezifiziert, unter anderem auch solche, die von konservierten Aminosäuren in RpoD durch häufigere Codons spezifiziert werden…….....70

Abbildung 4.2: Die *rpoS* Codonmutante mit den häufigeren Codons führt im Vergleich zum Wildtyp zu niedrigeren Mengen an σ^S-Protein und *rpoS* mRNA…….....72

Abbildung 4.3: Die Substitution der raren Codons des *rpoS* Wildtyps durch häufigere synonyme Codons in der *rpoS* Codonmutante geht mit einer Destabilisierung der *rpoS* mRNA einher……..……74

Abbildung 4.4: Die mRNA der *rpoS* Codonmutante zeigt eine höhere Sensitivität gegenüber dem RNase E-, nicht aber gegenüber dem RNase III-abhängigen Abbau als jene des *rpoS* Wildtyps……75

Abbildung 4.5: Die chromosomale *rpoS* Codonmutante mit dem single-copy Codon-Allel zeigt ebenfalls einen gegenüber der *rpoS* Wildtyp mRNA beschleunigten Abbau, einhergehend mit erniedrigter Akkumulation von σ^S-Protein……..……77

Abbildung 4.6: *In vivo* Proteolyse von σ^S exprimiert vom (raren Codon) Wildtyp- und mutiertem häufigen Codon *rpoS* Allel……...……79

Abbildung 4.7: Akkumulierte σ^S-Mengen exprimiert vom raren Codon Wildtyp- und mutiertem häufigen Codon *rpoS* Allelen in verschiedenen *E. coli* Protease-Mutanten…….……80

Abbildung 4.8: Struktur zweier tRNA-Operons in *E. coli* am Beispiel des *argXproM*-Operons und des *serVargVYZQ*-Operons……...82

Abbildung 4.9: Expressionsprofil von transkriptionalen tRNA-Promotor-*lacZ*-Fusionen entlang der Wachstumskurve, deren Promotoren die Expression von tRNAs kontrollieren, die im *rpoS* Wildtyp rare und in der *rpoS* Codonmutante häufige Codons spezifizieren, in An- oder Abwesenheit von σ^S…….85

Abbildung 4.10: Sequenz-Alignment der stationäre Phasen-induzierten Transaldolase TalA und ihrem exponentielle Phasen-exprimiertem Isoenzym TalB und der stationäre Phasen-induzierten Transketolase TktB und ihrem exponentielle Phasen-exprimiertem Isoenzym TktA in *E. coli*……87

Abbildung 4.11: Sequenz-Alignment der stationäre Phasen- und Säurestress-exprimierten Glutamat-Decarboxylase Isoenzyme GadA und GadB…….....89

Abbildung 4.12: Deep-Sequenzierungsanalyse von Hfq co-immunopräzipitierten RNAs zur Identifikation von unter hyperosmotischen Stress induzierten sRNAs, die mögliche potenzielle Kandidaten der *rpoS* Regulation darstellen……91

Abbildung 4.13: α-FLAG co-Immunopräzipitation (co-IP) Hfq-assoziierter sRNAs aus hyperosmotisch geshifteten *E. coli* Zellen und ungestressten Zellen (Kontrolle) zur Identifikation von hyperosmotisch induzierten sRNAs durch 454 Pyrosequenzierung……...92

Abbildung 4.14: Statistische Analyse der cDNA-Sequenzierungsergebnisse aus der 454 Pyrosequenzierung der Hfq-assoziierten RNAs……..……94

Abbildung 4.15 Verifikation der hyperosmotischen Regulation der verschiedenen sRNAs aus den Pyrosequenzierungsdaten mittels Northernblot-Analysen…….……..…97

Abbildung 4.16: Expression der verschiedenen positiv Osmo-regulierten sRNAs in einer *hns* Mutante und einem isogenen Wildtyp-Stamm…….……99

Abbildung 4.17: Expressionstest der verschiedenen klonierten sRNA-Kandidaten des *rpoS*::*gfp*-Reportergen-Systems……..…..100

Abbildung 4.18: RpoS::GFP-Reportergen-Analyse zur Untersuchung der translationalen Regulation von *rpoS* durch verschiedene sRNAs……..102

Abbildung 4.19: Akkumulation und Induktion von σ^S-Protein und *rpoS* mRNA in hyperosmotisch gestressten und ungestressten *E. coli* Zellen in verschiedenen sRNA-defizienten Hintergründen und im Wildtyp-Hintergrund….……...105

Abbildung 4.20: Akkumulation und Induktion von RpoS und *rpoS* Transkript in Säure-gestressten und ungestressten *E. coli* Zellen im W3110 Wildtyp-Stamm und verschiedenen isogenen sRNA-Mutanten……107

Abbildung 4.21: RpoS-Syntheseraten einer *dsrA* Mutante und ihres isogenen Wildtyp-Stammes in hyperosmotisch gestressten und ungestressten Zellen (Kontrolle)...…109

Abbildung 4.22: Akkumulation und Induktion von RpoS in hyperosmotisch gestressten und ungestressten *E. coli* Zellen im W3110 Wildtyp und entsprechenden sRNA-Mutanten, sowie in einer *hns* und einer *hns*/*dsrA* Doppelmutante…110

Abbildung 4.23: Hyperosmotische und Säurestress-Regulation von DsrA und hyperosmotische Regulation von RprA in einer *dsrA* Mutante……...…..112

Abbildung 4.24: Hyperosmotische Stabilisierung der *rpoS* mRNA und Aufhebung dieser Stabilisierung in einer *dsrA* Mutante……114

Abbildung 4.25: Akkumulation und Induktion von σ^S und *rpoS* mRNA in hyperosmotisch gestressten und ungestressten Zellen eines W3110 Wildtypstamms und einer entsprechenden *rprA dsrA arcZ* Tripelmutante……..117

Abbildung 4.26: Akkumulation und Induktion des *rpoS* Transkripts in hyperosmotisch gestressten und ungestressten Kulturen einer *hfq* Mutante und eines isogenen W3110 Wildtypstamm……118

Abbildung 4.27: Hyperosmotische Induktion von RpoS::GFP-Hybridproteinen unterschiedlicher *rpoS* Sequenzlänge unter der Kontrolle einen konstitutiven Promotors……..……..120

Abbildung 4.28: Die *rpoS*120::*gfp*-Fusion unter der Kontrolle eines nicht Osmostress-sensitiven, konstitutiven Promotors zeigt eine hyperosmotische Induktion auf mRNA-Ebene…….……..121

Abbildung 4.29: Die *rpoS*378::*gfp*-Fusion unter der Kontrolle eines nicht Osmostress-sensitiven, konstitutiven Promotors zeigt eine hyperosmotisch Induktion auf mRNA-Ebene, unabhängig von der sRNA DsrA…….……123

Abbildung 4.30: Die Verdrängung von endogenem NusG durch Überexpression der NusG N-terminalen Domäne zeigt keinen Einfluss auf die *rpoS* Transkriptionselongation in ungestressten relativ zu hyperosmotisch gestressten Zellen…..125

Abbildung 5.1: Modell zur positiven Rolle der raren *rpoS* Codons bei dessen Expression...132

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 3.1 Verzeichnis der verwendeten Chemikalien und Materialien mit Herstellerangabe…….40

Tabelle 3.2 Bakterienstämme……42

Tabelle 3.3: Bakteriophagen…….43

Tabelle 3.4 Plasmide…….44

Tabelle 3.5: Medienzusätze und deren Konzentration…….46

Tabelle 3.6: Oligonukleotide für die Herstellung der *rpoS* Codonmutante (pRpoS(codon mt))……...57

Tabelle 3.7 Oligonukleotide für die Konstruktion der verschiedenen tRNA::*lacZ*-Fusionen..59

Tabelle 3.8 Oligonukleotide für die Klonierung der verschiedenen *rpoS*::*gfp*-Fusionen…….59

Tabelle 3.9: Oligonukleotide für die Herstellung der verschiedenen sRNA-Vektoren……....60

Tabelle 3.10: Oligonukleotide für die Konstruktion der Deletionsmutanten…….…..61

Tabelle 3.11: Oligonukleotide zur Herstellung des GB1000 *hfq*::FLAG::kan Stammes…….63

Tabelle 3.12: Oligonukleotide zur Herstellung der chromosomalen *rpoS* Codonmutante…..64

Tabelle 3.13: Oligonukleotide zur Herstellung der Dig-markierten DNA-Sonden…….67

Tabelle 4.1: Rare Aminosäure-Codons in *rpoS*, die in *rpoD* durch häufigere synonyme Codons repräsentiert werden……..…….70

Tabelle 4.2: *rpoS* mRNA Halbwertszeiten in verschiedenen Stamm-Hintergünden (W3110, RNase-Mutanten und isogene Wildtyp-Kontrollen……...75

Tabelle 4.3: tRNA-Operons und tRNA-Gene, die in *rpoS* und *rpoD* rare bzw. häufige Codons dekodieren und von denen in dieser Arbeit transkriptionale tRNA-Promotor-*lacZ*-Fusionen generiert und vermessen wurden……...83

Tabelle 4.4: Daten aus der Analyse der Hfq co-IP-Bibliotheken (ungestresste Kontroll-Kultur: TK_HIP_Ctr und hyperosmotisch gestresste Kultur: TK_HIP_NaCl)…….93

Tabelle 4.5: Ergebnisse des BLAST-Alignments der cDNAs aus den co-IP-Bibliotheken mit dem Genom des *E. coli* K12- Stammes W3110…….94

Tabelle 4.6: sRNAs in der co-IP-Bibliothek der hyperosmotisch gestressten Kultur, die gegenüber der ungestressten Kultur hochreguliert waren……..95

Tabelle 4.7: sRNAs in der co-IP-Bibliothek der hyperosmotisch gestressten Kultur, die gegenüber der ungestressten Kultur herunterreguliert waren…….……95

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Ampere
Å	Angström
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxiddisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat
ß-Gal	ß-Galaktosidase
Bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
cAMP	zyklisches Adenosin-3,5,-monophosphat
c-di-GMP	zyklisches di-Guanosinmonophosphat
Cm	Chloramphenicol
CRP	cAMP Rezeptorprotein
CTD	C-terminale Domäne
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
Dig	Digoxygenin
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
E	RNA-Polymerase-Kernenzym
$E_{260,\ 280}$	Extinktion bei 260 oder 280 nm
et al.	und andere
g	Gramm
h	Stunde
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl-ß-D-Thiogalaktopyranosid
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
l	Liter
LB	Luria-Bertani-Medium

m	milli
µ	mikro
M	molar
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
$MgSO_4$	Magnesiumsulfat
min	Minute
M9	Minimalmedium 9
mRNA	messenger RNA
mt	Mutante
n	nano
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
sRNA	kleine RNA
NaCl	Natriumchlorid
NBT	4-Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
Nt	Nukleotide
NTD	N-terminale Domäne
OD_{578}	Optische Dichte bei 578 nm
ONPG	ortho-Nitrophenyl-ß-D-Galaktopyranosid
ORF	open reading frame; offenes Leseraster
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	potentia hydrogenii
ppGpp	Guanosin-3`,5`-bipyrophosphat
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RBS	Ribosomenbindestelle
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNAP	RNA Polymerase
rpm	Umdrehungen pro Minute
S	Svedberg Einheit (Sedimentationskoeffizient)
^{35}S	radioaktives Schwefelisotop
SDS	Natriumdodecylphosphat
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N`,N`-Tetramethylethylendiamin
Tn	Transposon
Tris	Trishydroxyaminomethan
U	Unit(s) Enzymaktivitäts-Einheit
V	Volt

wt	Wildtyp
w/v	„weight per volume“ (Gewichtsprozent)
z.B.	zum Beispiel

1 ZUSAMMENFASSUNG (ABSTRACT)

RpoS (σ^S) ist der Masterregulator der generellen Stressantwort und der stationären Wachstumsphase in *E. coli* und anderen γ-Proteobakterien. Als eine Untereinheit der RNA-Polymerase (RNAP) dirigiert σ^S diese an die Promotoren von Stress-protektiven Genen und reprogrammiert die zelluläre Transkription, um die Integrität und das Überleben zu sichern. Die Regulation von σ^S selbst ist komplex und vollzieht sich sowohl auf transkriptionaler, als auch auf translationaler Ebene, sowie auf der Ebene der σ^S-Stabilität und Aktivität (d.h. der RNAP-Holoenzymbildung). Phylogenetisch ist RpoS ein naher Verwandter des vegetativen Sigmafaktors RpoD (σ^{70}), d.h. jenem Sigmafaktor, den es unter den Stressbedingungen innerhalb des RNAP-Holoenzyms ersetzt. Trotz ihrer großen Ähnlichkeit weisen RpoS und RpoD einen interessanten Unterschied bezüglich ihrer Codon-Usage auf. Die *rpoS* Sequenz enthält etwa doppelt soviele rare Codons wie die *rpoD* Sequenz, einschließlich elf rarer Codons, die in *rpoD* an homologen Positionen durch synonyme häufigere Codons repräsentiert werden. Der Austausch dieser elf raren Codons in *rpoS* durch die entsprechenden synonymen häufigeren *rpoD* Codons führte zu erniedrigten σ^S-Protein- und *rpoS* mRNA-Mengen. Mittels eines genetischen Ansatzes konnte gezeigt werden, dass die mRNA der *rpoS* Codonmutante mit den häufigeren Codons einen schnelleren RNase E-vermittelten Abbau aufweist als die mRNA des *rpoS* Wildtyps mit den natürlich auftretenden raren Codons. Weiterhin wurde demonstriert, dass die durch die raren Codons des Wildtyps vermittelte längere Halbwertszeit der *rpoS* mRNA unabhängig von anderen Regulationsmechanismen wie Transkription und Translationsinitiation ist. Die raren Codons in *rpoS* sind entlang der gesamten kodierenden Sequenz lokalisiert. Dies impliziert einen Mechanismus, indem durch das wiederholte transiente Pausieren von Ribosomen an den raren Codons das *rpoS* Transkript dichter mit Ribosomen beladen wird, wodurch die sterische Zugänglichkeit des Transkripts für die degradative RNase E vermindert wird. Eine Analyse der Sequenz anderer co-evolvierter Wachstumsphasen-abhängig exprimierter Isoenzympaare, sowie anderer Stationär-Phasen-assoziierter Gene offenbarte, dass das verstärkte Auftreten von raren Codons in stationäre Phase Genen ein möglicherweise generelleres Phänomen ist, um einen unökonomischen Abbau der entsprechenden mRNAs unter den limitierenden Bedingungen der stationären Wachstumsphase zu umgehen. Somit zeigt diese Arbeit neben den bekannten Aspekten der evolutionären Selektion zugunsten rarer Codons (z.B. effizientere co-translationale Proteinfaltung) einen zusätzlichen Aspekt auf: positive Selektion rarer Codons zugunsten der mRNA Stabilität.

Die 5´-untranslatierte Region (5´-UTR) der *rpoS* mRNA faltet sich in eine Translations-inkompetente Sekundärstruktur, in der die Translationsinitiation-Region

unzugänglich für die Ribosomen ist. In Antwort auf verschiedene Stressstimuli wird diese Sekundärstruktur mit Hilfe von kleinen nichtkodierenden regulatorischen RNAs (sRNAs) und dem RNA-Chaperon Hfq aufgeschmolzen, wodurch die *rpoS* Translation stimuliert wird. Es sind bisher drei sRNAs bekannt, welche die *rpoS* Translation aktivieren: RprA, DsrA und ArcZ. Zu Beginn dieser Arbeit war unbekannt, welche dieser charakterisierten sRNAs, oder aber ob eine andere sRNA an der bekannten translationalen Aktivierung von *rpoS* unter hyperosmotischem Stress und Säurestress beteiligt ist. Um solche potenziellen sRNA-Kandidaten zu identifizieren, wurde ein globaler Ansatz verfolgt, der auf einer Deep-Sequenzierungsanalyse von unter hyperosmotischen Stress mit Hfq co-immunopräzipitierter RNA basiert. In den sich anschließenden *in vivo* Funktionsanalysen wurde deutlich, dass die bekannte *rpoS* aktivierende sRNA DsrA die σ^S-Induktion unter Säure- und hyperosmotischem Stress, unabhängig von bereits beschriebenen σ^S-Regulatoren wie H-NS und RprA, vermittelt. In Einklang damit wurde gezeigt, dass DsrA selbst unter hyperosmotischem Stress verstärkt akkumuliert und unter diesen Bedingungen die *rpoS* Translation und als sekundäre Folge davon die Stabilisierung der *rpoS* mRNA positiv reguliert. Auffällig war, dass die *rpoS* mRNA sowohl in einer *dsrA* Mutante, einer *rprA dsrA arcZ* Tripelmutante, sowie in einer *hfq* Mutante immer noch hyperosmotisch induziert wird, also unter Bedingungen, in denen das *rpoS* Transkript aufgrund der ausbleibenden Translation destabilisiert werden sollte. Diese Beobachtungen und die Tatsache, dass die *rpoS* Transkriptionsinitiation von hyperosmotischem Stress, sowie einer *hfq* Deletion unbeeinflusst bleibt, deutete auf Mechanismen hin, welche die *rpoS* Transkription unter hyperosmotischem Stress positiv auf Ebene der Elongation regulieren. Konsistent mit dieser Hypothese war auch die Beobachtung, dass eine *rpoS*-Reportergenfusion unter der Kontrolle eines konstitutiven nicht Osmostress-sensitiven Promotors eine hyperosmotische Induktion des *rpoS* Reportergen-Transkripts aufwies. Alle diese Befunde deuten auf einen neuartigen Antiterminationsmechanismus durch Stress-induzierte Translation hin, deren genauer Mechanismus in zukünftigen Untersuchungen aufgeklärt werden muss.

ABSTRACT

RpoS (σ^S) is the master regulator of the general stress response and stationary growth phase in *E. coli*. As a subunit of RNA polymerase (RNAP), σ^S directs the latter to promoters of stress-protective genes, thereby reprogramming gene expression for maintenance and survival. Regulation of σ^S itself is complex and comprises transcriptional and translational regulation, as well as regulation of protein stability and activity (association with RNAP core enzyme). RpoS and the housekeeping sigma factor RpoD (σ^{70}) are of common evolutionary origin and accordingly they share a big sequence similarity. Nevertheless, there is a striking difference concerning the codon usage of the two co-evolved sigma factors RpoS and RpoD. In contrast

to the *rpoD* sequence, the *rpoS* sequence is enriched in rare codons (more than twice as many rare codons than *rpoD*). Particularly, there are eleven rare codons in *rpoS*, which are represented by more frequent synonymous codons at corresponding homologous positions in *rpoD*. Replacing these rare *rpoS* codons by the more common *rpoD* codons led to reduced *rpoS* mRNA half-life and σ^S protein levels. By using a series of endoribonuclease mutant strains, it was demonstrated that the *rpoS* transcript harboring the frequent codon allele (*rpoS* codon mutant) displayed an enhanced RNase E-dependent degradation compared to *rpoS* wild type mRNA containing the rare codons. Moreover, it was demonstrated that these rare codon-mediated increased mRNA stability was independent of other regulatory mechanisms, such as transcription and translation initiation. Rare codons within *rpoS* are located along the whole open reading frame. This implies a mechanism, in which slowing down translational elongation by stalled ribosomes at these rare codons ensures an enhanced ribosome density along the *rpoS* transcript, thereby reducing sterical access of degradative RNase E. The analysis of the sequences of other co-evolved growth phase-dependent induced pairs of isoenzymes, as well as other stationary phase associated genes, revealed that the occurrence of rare codons within stationary phase genes being possibly a more general feature in order to avoid a rapid mRNA turnover under conditions of limited resources. Therefore, this work highlights a new aspect of positive evolutionary selection in favor of rare codons, besides known aspects of positive evolutionary rare codon selection (e.g. more efficient co-translational protein folding): that is mRNA stability.

By forming intramolecular base pairs, the *rpoS* mRNA 5´-untranslated region (5´-UTR) folds into a translationally incompetent stem-loop structure which masks the translation initiation region, thereby inhibiting ribosome access. Under certain stress conditions, this stem-loop structure is opened by base-pairing with small noncoding regulatory RNAs (sRNAs), which is facilitated by the RNA chaperone Hfq. Complex formation between the sRNAs and the *rpoS* 5´-UTR thus activates *rpoS* translation. Three sRNAs have been described that activate *rpoS* translation: RprA, DsrA and ArcZ. None of these sRNAs or another known or unknown sRNA has been implicated in the well known rapid translational induction of *rpoS* during hyperosmotic and acid stress. To identify such potential sRNA candidates, a global approach was chosen, based on deep sequencing of Hfq co-immunoprecipitated RNAs derived from cells subjected to hyperosmotic stress. Subsequent *in vivo* functional analysis demonstrated that the known *rpoS* activating sRNA DsrA is responsible for the hyperosmotic and acid induction of σ^S, independently from known σ^S regulators, such as H-NS and RprA. In accordance with this, DsrA itself accumulates under hyperosmotic stress, thereby positively regulating *rpoS* translation and, probably secondary to this, *rpoS* mRNA stability under this stress condition. Strikingly however, the *rpoS* transcript is still hyperosmotically induced in a *dsrA* mutant, a *rprA dsrA arcZ* triple mutant, as well as in an *hfq* mutant. These are conditions that strongly disfavor *rpoS* mRNA stability due to absent translation. The latter observation and the fact that initiation of *rpoS* transcription is not

affected by hyperosmotic stress and a deletion of *hfq* suggested a mechanism that positively operates at the level of elongation of *rpoS* transcription under these conditions. Consistently, an *rpoS* reporter fusion under control of a non osmotic stress-sensing constitutive promoter yielded hyperosmotically induced *rpoS* fusion transcripts. Taken together, these results hint at a mechanism based on transcription antitermination by stress-induced translation. Future work will contribute to clarifying such a putative mechanism.

2 EINLEITUNG

2.1 Globale Genregulation bei Bakterien als Adaptation an sich ändernde Umweltbedingungen

In ihren natürlichen Habitaten sind Bakterien, wie das gram-negative, stäbchenförmige Enterobakterium *Escherichia coli* (*E .coli*) gewöhnlich verschiedensten Stressen ausgesetzt (Nährstofflimitation, Temperaturschwankungen, Änderungen der Osmolarität, pH-Änderungen, UV-Strahlung etc.). Diesen Herausforderungen begegnen Bakterien durch Anpassung ihrer Genexpression an die sich ändernden Bedingungen mittels regulatorischen Netzwerken, die sich schon früh in der langen Evolution der Bakterien herausgebildet haben. Der primäre Lebensraum von *E.coli* ist der Intestinaltrakt warmblütiger Säugetiere, in dem die Bakterien unter relativ konstanten Bedingungen bezüglich der Temperatur, niedriger Sauerstoffverfügbarkeit, sowie einer guten Nährstoffversorgung, leben. Nach der Ausscheidung aus dem Darm gelangt *E.coli* in eine völlige andere Umwelt (sekundäres Habitat), in der sich die äußeren Bedingungen häufig und schnell ändern können. Eine globale Änderung der Genexpression zur Anpassung an eine Stresssituation wird hierbei durch ein hierarchisch gegliedertes Netzwerk realisiert. An dessen oberster Stelle steht ein Masterregulator, der bestimmte Zielgene reguliert, deren Genprodukte wiederum für Regulatorproteine kodieren können. Diese Regulatorproteine ihrerseits können eigene Zielgene regulieren, wobei Signalintegration sowohl auf Ebene des Masterregulators, als auch auf allen untergeordneten Ebenen stattfinden kann (Hengge-Aronis, 2002). Zum einen werden spezifische Stressantworten ausgelöst, die in der Regel zu einer Eliminierung des eigentlichen Stressagenzes und der Reparatur von bereits eingetretenem Schaden führen. Zum anderen ist die generelle Stressantwort darauf ausgerichtet, die Zelle präventiv resistent gegenüber Stressen zu machen, die sie noch gar nicht erfahren hat („crossprotection“; Hengge-Aronis, 2000; Hengge 2011).

Der Masterregulator der generellen Stressantwort in *E.coli* ist RpoS, oder auch σ^S (σ^{38}), der als Sigma-Spezifitätsfaktor die RNA-Polymerase (RNAP) an die Promotoren von Stress-protektiven Zielgenen dirigiert und deren Transkription initiiert. Mehr als 500 Gene stehen unter direkter oder indirekter Kontrolle von RpoS (Weber *et al*., 2005; Hengge 2011). Das sind etwa 10% aller *E.coli* Gene. σ^S selbst unterliegt einer äußerst komplexen transkriptionalen und vor allem posttranskriptionalen Regulation, auf welche später detailliert eingegangen werden soll. Ebenso soll in den folgenden Kapiteln der Arbeit das RpoS-Regulon näher beschrieben werden.

2.1.1 Struktur und Funktion bakterieller Promotoren und die RNA-Polymerase (RNAP) aus *E. coli*

Die Transkription, der Vorgang bei dem die Sequenzinformation der DNA in die Sequenzinformation einer RNA umgeschrieben wird, wird von einer DNA-abhängigen RNA-Polymerase (RNAP) katalysiert. Als Promotoren werden jene konservierten DNA-Sequenzelemente bezeichnet, welche die RNA-Polymerase (RNAP) an die Startstellen der Transkription dirigieren und darüber hinaus häufig über zusätzliche Sequenzmodule verfügen, an die weitere regulatorische Proteine binden (Transkriptionsfaktoren). In Prokaryoten erfolgt die Transkription aller Gene durch eine einzige RNAP. Das RNAP-Kernenzym aus *E. coli* setzt sich aus insgesamt 5 Untereinheiten zusammen ($\alpha_2\beta\beta'\omega$) und hat ein Molekulargewicht von etwa 400 kDa (Ebright, 2000). Das Kernenzym alleine ist nicht in der Lage die Transkription am Promotor produktiv zu initiieren. Hierzu benötigt es in Form des Holoenzyms ($\alpha_2\beta\beta'\omega\sigma$) einen sogenannten Spezifitätsfaktor, den σ-Faktor, der für die spezifische Promotorerkennung zuständig ist (Burgess, 1969; Gross *et al*., 1998). Die C-terminale Domäne der kleinen α-Untereinheit (α-CTD) ist an der Bindung des Enzyms an einige Promotoren beteiligt, die ein sogenanntes AT-reiches UP-Element enthalten (Estrem *et al*., 1999; Gourse *et al*., 2000). Darüber hinaus vermittelt die α-CTD Wechselwirkungen mit Transkriptionsfaktoren (Gaal *et al*., 1996). Die beiden großen β- und β´- Untereinheiten bilden zusammen das aktive Zentrum. Es enthält zwei Magnesium-Ionen, die bei der Katalyse der Bildung neuer Phosphodiesterbindungen zwischen den Substrat-Nukleosidtriphosphaten unerlässlich sind (Vassylyev *et al*., 2002). Die kleine ω-Untereinheit fördert sowohl die Assemblierung, als auch die Stabilität des RNAP-Kernenzyms, indem es die β´-Untereinheit kontaktiert (Minakhin *et al*., 2001) und bleibt während des Transkriptionsvorganges mit dem Kernenzym assoziiert. Desweiteren sprechen *in vitro* Daten für eine mögliche Beteiligung der ω-Untereinheit an der Stringenten Kontrolle durch das Effektornukleotid ppGpp (Ventras *et al*., 2005).

Strukturdaten über bakterielle RNAPs konnten in den letzten Jahren mittels Elektronenmikroskopie, sowie hochauflösender Röntgenstrukturanalyse und Nukleinsäure-Protein Crosslinking-Studien gewonnen werden (Korzheva *et. al*, 2000; Vassylyev *et al*., 2002). Die Dimension des *E. coli* Kernenzyms beträgt 85 x 105 x 140 Å. In seiner Gesamtstruktur ähnelt das Enzym einer „Krabbenschere“. Der eine Arm der Schere wird von der β-Untereinheit, der andere Arm von der β´-Untereinheit gebildet. Zwischen den beiden Armen verläuft ein Kanal, der mit einem Durchmesser von 25 Å (Dimension 25 x 45 Å) über die geeignete Größe verfügt, um doppelsträngige DNA zu binden. Dort wo die beiden Arme

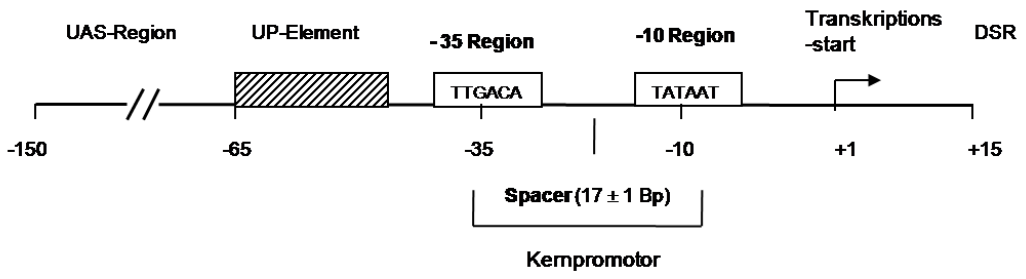


Abbildung 2.1 Konsensusstruktur eines σ^{70}-abhängigen Promotors aus *E. coli* (verändert nach Wagner, 2000). Die –35 und –10 Region des Kernpromotors werden durch eine 17± 1 Bp lange Spacer-Region voneinander getrennt. Die Konsensussequenzen der –35 und –10 Region bezieht sich auf die 5´→3´ Sequenz des Nichtmatrizen-Stranges. Weiterhin enthält ein solcher Promotor stromaufwärts (UP-Element und UAS-Region, „upstream activating sequence“) und stromabwärts (DSR, „downstream sequence region“) gelegene regulatorische Sequenzen. Zahlen geben die Positionen der Sequenzelemente relativ zum Transkriptionsstart (definiert als +1) wieder.

der „Krabbenschere“ zusammentreffen befindet sich das aktive Zentrum mit den an der Katalyse beteiligten Magnesium-Ionen.

Im Folgenden wird auf die Struktur RpoD (σ^{70}) -abhängiger Promotoren eingegangen. Der σ^{70}-Sigmafaktor, entsprechend nach seinem Molekulargewicht von 70 kDa benannt, initiiert die Transkription an Promotoren sogenannter Haushaltsgene, welche vornehmlich während der exponentiellen Wachstumsphase exprimiert werden (Gross *et al*., 1998). Zu diesen Haushaltsgenen zählen vor allem die ribosomalen RNA-Gene. Die schematische Struktur eines solchen σ^{70}-abhängigen Promotors ist in Abbildung 2.1 dargestellt. Ein solcher Promotor enthält einen Kernbereich, der sich aus zwei konservierten hexameren Sequenzmodulen, der –35 und der –10 Region, zusammensetzt. Anhand von Sequenzvergleichen von mehr als 300 natürlichen Promotoren (Lisser und Margalit, 1993) sind Konsensussequenzen für diese beiden Kernpromotorelemente abgeleitet worden. Für den initialen Schritt der Transkription ist die –10 Region und sehr häufig auch die –35 Region unentbehrlich. Durch sie erfolgt die Erkennung des Promotors durch den σ^{70}-Faktor des RNAP-Holoenzyms. Die initiale Bindung der RNAP an die Promotor-DNA wird durch die Interaktion eines Helix-Turn-Helix-DNA-Bindemotivs in der Subdomäne 4.2 des σ^{70}-Faktor mit der –35 Region, sowie durch die Wechselwirkung einer amphiphatischen α-Helix in der Subdomäne 2.4 mit der –10 Region vermittelt (Siegele *et al*., 1989; Waldburger *et al*., 1990). Getrennt werden -35 und –10 Region von einer Spacer-Region. Diese Region weist keine auffällige konservierte Sequenz auf, dennoch ist sie mit einer charakteristischen Länge von 17 ± 1 Basenpaaren (Bp) unentbehrlich, da sie für eine korrekte räumliche (anguläre) Orientierung von –35 und –10 Region zueinander sorgt. Per Definition erhält das erste transkribierte Nukleotid die Positionsnummer +1.

Bei natürlichen Promotoren sind die abgeleiteten Konsensussequenzen für die -10 und -35 Region nie gleichzeitig innerhalb eines Promotors verwirklicht worden. Synthetische Promotoren, welche die Konsensussequenzen der –35 und –10 Region vereint innerhalb eines

Kernpromotors aufweisen, gehören zu den stärksten überhaupt. In der Evolution wurden Promotoren daher vermutlich auf ihre Regulierbarkeit und nicht auf ihre Stärke hin optimiert (Wagner 2000).

Neben dem Kernbereich enthält ein solcher Konsensuspromotor konservierte regulatorische Sequenzen, die weiter stromaufwärts (UP-Element und UAS-Region), und im Falle einiger starker *E. coli* Phagen-Promotoren, auch stromabwärts (DSR-Element) lokalisiert sind. Das UP-Element, zwischen –65 und –45 gelegen, das zusätzliche Kontaktstellen zwischen Promotor-DNA und RNAP bereitstellt (Ross *et al*., 1993), wurde bereits zuvor beschrieben. Weiter stromaufwärts von dem Kernpromotorbereich gelegen sind in vielen Fällen weitere regulatorische DNA-Sequenzen, sogenannte UAS-Regionen („upstream activating sequences“). UAS-Regionen sind durch faktorunabhängige (intrinsische), alleine in der Natur der DNA-Sequenz begründete, starke Krümmungen gekennzeichnet. Intrinsisch gekrümmte UAS-Regionen enthalten eine Reihe von AT-Clustern und sind häufig stromaufwärts von starken Promotoren, wie den rRNA-Promotoren anzutreffen. Des Weiteren enthalten diese Sequenzen oft Bindestellen für regulatorische Proteine (Transkriptionsaktivatoren und Transkriptionsrepressoren) (Wagner 2000).

2.1.2 Die bakterielle Transkription und ihre Regulation

Nachfolgend soll kurz auf die Transkription und ihre Regulation eingegangen werden. Der Transkriptionszyklus lässt sich, wie nahezu alle biochemischen Polymerisationsreaktionen, in drei Schritte unterteilen: Initiation, Elongation und Termination (Record *et al*., 1996). Regulation findet dabei hauptsächlich auf der Ebene der Initiation der Transkription statt.

Bei der Initiation kontaktiert zunächst das RNAP-Holoenzym die Promotor-DNA und bildet einen binären geschlossenen Komplex aus. Im Anschluss daran erfolgt die Isomerisierung zu einem offenen binären Komplex durch Aufschmelzung der DNA im Bereich der -10 Region mit ihren schwachen AT-Basenpaarungen auf einer Länge von etwa 12 ± 2 Basenpaaren (Bp) (deHaseth und Helmann, 1995; deHaseth *et al*., 1998). Nach der Bindung des ersten Substrat-NTPs im aktiven Zentrum erfolgt die Bildung des ternären Initiationskomplexes. Nach einer oder mehrere Runden abortiver Transkription, d.h. der wiederholten Synthese und Freisetzung von 2-12 Nukleotiden langen Transkripten durch die stabil am Promotor gebundene RNAP, kann die Polymerase zum binären Initiationskomplex zurückreagieren, oder aber die produktive Phase der Transkription, die Elongation einleiten.

Nach der Freisetzung des σ-Faktors bildet sich ein Elongationskomplex aus, indem das RNAP-Kernenzym mit hoher Prozessivität den Templatestrang in 5´-Richtung transkribiert (bis zu 50 Nukleotide pro Sekunde werden in ein naszierendes RNA-Transkript eingebaut). Innerhalb des Elongationskomplexes liegt die DNA auf einer Länge von 14-18 Bp in Form einer sogenannten Transkriptionsblase aufgeschmolzen vor (Uptain *et al*., 1998). Das 3´-Ende des wachsenden Transkripts bildet innerhalb der Transkriptionsblase auf einer Länge von

etwa 8 Bp eine RNA-DNA-Hybridhelix aus (Nudler *et al*., 1997 und 1998). Herausgeschleust aus dem Komplex wird das wachsende Transkript am stromaufwärts gelegenen Ende der Blase. In dem Maße wie die DNA stromabwärts der Transkriptionsblase entwunden wird, wird sie stromaufwärts vor dem Komplex zusammengewunden. Die Elongation ist ein diskontinuierlicher Prozess, der durch lange Pausen unterbrochen werden kann (Kassavetis und Chamberlin, 1981; Artsimovitch *et al*., 2000). Solche Pausierungen können durch die Anwesenheit bestimmter Sekundärstrukturen im Transkript (Haarnadelschleifen) und bestimmte Effektoren, wie Effektornukleotide (Krohn und Wagner, 1996) oder regulatorische Proteine (Elongationsfaktoren) beeinflusst werden, die unmittelbar mit der RNAP interagieren. Als Beispiele seien die Elongationsfaktoren NusA und NusG erwähnt, die direkt mit der RNAP interagieren und Pausierungen positiv bzw. negativ beeinflussen (Mason und Greenblatt, 1991; Zellars und Squires 1999). Während NusG die Transkriptionselongation stimuliert, verlangsamt NusA diese meist, indem es Pausierungen der RNAP stimuliert (Ciampi, 2006). Desweiteren spielt NusG, zusammen mit NusA, NusB und NusE, eine entscheidende Rolle bei der Assemblierung von Transkriptions-Antiterminationskomplexen innerhalb von ribosomalen Operons und im Chromosom des Phagen λ (Roberts *et al*., 2008). Erreicht der Elongationskomplex bestimmte regulatorische DNA-Sequenzen (Terminatoren), so wird die Termination der Transkription eingeleitet, die mit einer Dissoziation des RNAP-Kernenzym von der DNA-Matrize und der Freisetzung des Transkripts einhergeht.

Für *E. coli* sind zwei verschiedene Mechanismen der Termination beschrieben worden: die faktorunabhängige (intrinsische) und die Rho-abhängige Termination. Bei der intrinsischen Termination kommt es zur Ausbildung einer charakteristischen Sekundärstruktur innerhalb des Transkripts. Diese Sekundärstruktur besteht aus einer GC-reichen Haarnadelschleife, gefolgt von 3-8 Uracilresten. Die Bildung der Haarnadelstruktur führt zu einer Pausierung der RNAP. Die hinter der Haarnadelschleife gebildete RNA-DNA-Hybridhelix aus dA•rU-Basenpaaren ist thermodynamisch instabil. Wahrscheinlich begünstigt durch die vorhergehende Pause dissoziiert das Transkript von der DNA-Matrize und die Transkription wird terminiert (Richardson, 1993).

Bei der Rho-abhängigen Termination erfordert die Beendigung der Transkription einen zusätzlichen Hilfsfaktor, das RNA-Bindeprotein Rho. Bei der faktorabhängigen Termination bindet das Rho-Hexamer zunächst an bestimmte C-reiche Sequenzen, den „*rut*-sites“ („Rho utiliziation sites“), im Transkript, die weit stromaufwärts vor dem 3´-Ende des Transkripts lokalisiert sein können. Rho ist eine ATP-getriebene DNA-RNA-Helikase. Mit seiner ATPase-Aktivität bewegt sich Rho entlang des Transkripts in 3´-Richtung, bis es auf die Transkriptionsblase trifft und dort als DNA-RNA-Helikase unter ATP-Hydrolyse die Auftrennung der RNA-DNA-Hybridhelix herbeiführt (Ciampi 2006; Jin *et al*., 1992). Dadurch kommt es zur Dissoziation des Elongationskomplexes und die Transkription wird terminiert. Während die Termination der Transkription *in vitro* alleine durch Rho vermittelt werden kann, ist für eine effiziente Termination *in vivo* meist auch die Anwesenheit von

NusG erforderlich (Ciampi, 2006). Neuere strukturelle Analysen sprechen dafür, dass NusG mit dem 30S ribosomalen Protein S10 (NusE) einen Komplex bildet, der Transkription und Translation eng miteinander koppelt (Burmann *et al*., 2010). So wurde modelliert, dass NusG, welches mit seiner N-terminalen Domäne die RNAP kontaktiert, mit seiner C-terminalen Domäne simultan mit NusE (S10) im aktiv translatierenden Ribosom interagiert, oder aber alternativ mit dem Terminationsfaktor Rho wechselwirkt (Burmann *et al*., 2010). Dies ist eine schlüssige Erklärung dafür, wie Rho als Polaritätsfaktor zwischen Transkription und Translation fungiert und warum Rho keine translatierten Transkripte vorzeitig terminieren kann. Weitere Unterstützung für die Existenz eines NusG-NusE-abhängigen Transkriptions-Translations-Komplexes kommt von entsprechenden *in vivo* Daten, die demonstrieren, dass die Rate der Transkriptionselongation unmittelbar von der Rate der Translation kontrolliert wird und das Verhältnis von eingebautem Nukleotid zu eingebauter Aminosäure 3:1 beträgt (Proshkin *et al*., 2010). Der stimulierende Effekt eines Ribosomes auf die RNAP wird hierbei offenbar erreicht, indem das spontane „Backtracking“ der RNAP durch das translatierende Ribosom unterdrückt wird (Proshkin *et al*., 2010). Ein solcher kooperativer Mechanismus könnte dafür sorgen, dass das Ausmaß und die Geschwindigkeit der Transkription stets an die Bedürfnisse der Translation angepasst werden.

2.1.3 Transkriptionsregulation durch Sigmafaktoren

Der am stärksten regulierte Schritt bei der bakteriellen Transkription ist der Initiationsschritt. Klassische Transkriptionsfaktoren wirken, indem sie die Häufigkeit einer produktiven Transkriptionsinitiation, oftmals durch Rekrutierung oder sterischer Hinderung der initialen Bindung des RNAP-Holoenzym, erhöhen oder erniedrigen. Alternative Sigmafaktoren hingegen redirigieren die RNAP an völlig neue Promotoren und können so ein an eine bestimmte Stresssituation angemessenes Genexpressionsprofil herbeiführen (Barnard *et al*., 2004; Gruber und Gross, 2003; Helmann 2011). Per Definition sind Sigmafaktoren (σ-Faktoren) dissoziierbare Untereinheiten der RNAP, die für die Promotorerkennung notwendig sind (Borukhov und Severinov, 2002). Erst die Assoziation eines σ-Faktors mit dem RNAP-Kernenzym (E) führt zur Bildung des Transkriptionsinitiations-kompetenten RNAP-Holoenzym (Eσ). Die Anzahl der Sigmafaktoren innerhalb der Bakterienspezies variiert stark. Während *E.coli* über insgesamt 7 verschiedene Sigmafaktoren verfügt, können die Genome andere Spezies, wie *Streptomyces coelicolor*, für mehr als 50 verschiedene Sigmafaktoren kodieren (Gruber und Gross 2003, Kill *et al*., 2005).

Zu den 7 σ-Faktoren in *E.coli* zählt der primäre vegetative Sigmafaktor RpoD (σ^{70}), der die Transkription der Haushaltsgene während des exponentiellen Wachstums, vor allem der ribosomalen Gene (ribosomale RNAs und ribosomale Proteine) initiiert (Gross *et al*., 1998). Daneben existieren in *E.coli* 6 verschiedene alternative Sigmafaktoren. So ist der in

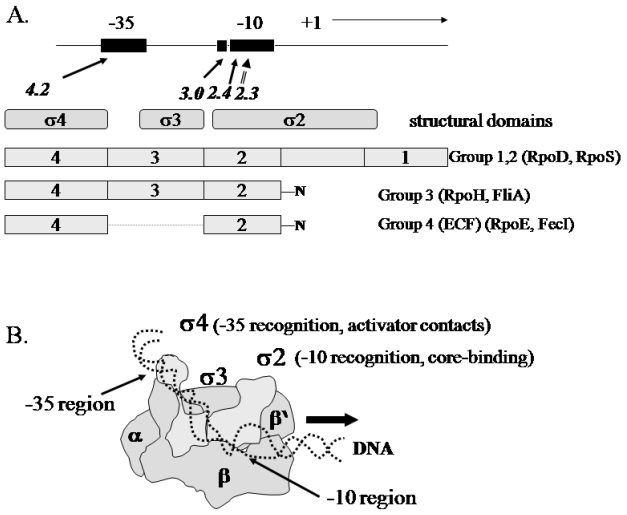


Abbildung 2.2: Struktur-Funktions-Beziehungen bakterieller Sigmafaktoren der σ^{70}-Familie (verändert, nach Helmann 2011). A, B: Domänen 2 und 4 der Faktoren der σ^{70}-Familie dienen der Promotorerkennung (siehe auch 2.1.1). Domäne 3 dient bei RpoS der Erkennung der „extended" -10-Region (siehe 2.3.1.1). Weitere Subdomänen innerhalb der Region 2 sind am Aufschmelzvorgang der Promotor-DNA bei der offenen Komplexbildung beteiligt. Regionen 2 und 3 sind außerdem an der Bindung des Sigmafaktors an die β -und β´-Untereinheiten des RNAP-Kernenzyms beteiligt.

dieser Arbeit untersuchte Sigmafaktor RpoS (σ^S/ σ^{38}) der Masterregulator der generellen Stressantwort (siehe auch 2.3) (Hengge 2011; Lonetto *et al*., 1992). Der alternative Hitzeschock-Sigmafaktor RpoH (σ^H/σ^{32}) dirigiert die Transkription eines großen Hitzeschock-Regulons, das unter anderem für Chaperone und Transkriptionsfaktoren kodiert (Grossman *et al*., 1984; Guisbert *et al*., 2008). FliA (σ^F/σ^{28}) ist der flagellare Sigmafaktor, der die Expression der späten Gene für Flagellen, sowie Chemotaxisgene kontrolliert (Barembruch und Hengge, 2007; Chilcott und Hughes 2000). RpoE (σ^E/ σ^{24}) zählt zu den sogenannten ECF-Sigmafaktoren („extracytoplasmatic function") und ist für die Aufrechterhaltung der Integrität der bakteriellen Zellhülle bei periplasmatischem Stress verantwortlich (Alba und Gross 2004; Lonetto *et al*., 1994; Hayden und Ades, 2008; Raivio, 2005). Ein weiterer ECF-Sigmafaktor, FecI (σ^{FecI}) kontrolliert die Transkription eines einzigen Operons, des *fec*-Operons, das für Komponenten des Eisencitrat-ABC-Transporter-Aufnahmesystems kodiert (Braun *et al*., 2003; Braun und Mahren, 2005). FecI-aktivierender Stimulus ist dabei die Anwesenheit von Eisencitrat im extrazellulären Medium (Brooks und Buchanan 2008). RpoN (σ^N/ σ^{54}) ist in *E.coli* für die Transkription von Genen des Stickstoffhaushalts verantwortlich und unter Stickstoffmangelbedingungen aktiv (Merrick, 1993).

Bakterielle σ-Faktoren lassen sich in zwei strukturell und funktionell voneinander verschiedene Familien einteilen, in die σ^{70}-Familie und die σ^{54}- Familie. Die Mehrheit gehört der σ^{70}-Familie an (Paget und Helmann, 2003; Helmann 2011). Mitglieder dieser Familie erkennen Promotorelemente, die in konservierten Sequenzelementen in der -35- und -10-Region relativ zum Transkriptionsstart lokalisiert sind (siehe Abbildung 2.2) (Haugen *et al*., 2008). Alle hier beschriebenen Sigmafaktoren in *E.coli* (RpoD, RpoS, RpoH, FliA, RpoE,

FecI), mit Ausnahme von RpoN, gehören der σ^{70}-Familie an. RpoN entsprechend der σ^{54}-Familie. Mitglieder der σ^{70}-Familie lassen sich entsprechen ihrer primären Domänenstruktur weiter in vier verschiedene Gruppen einteilen. Mitglieder der Gruppen 1 und 2 verfügen über vier konservierte Domänen, die ihrerseits in Subdomänen untergliedert werden (siehe Abbildung 2.2). Zur Gruppe 1 zählt der vegetative Sigmafaktor RpoD. RpoS ist ein Gruppe 2 Sigmafaktor, der zwar alle 4 Domänen aufweist, aber vor allem aufgrund des Fehlens der Linker-Regionen zwischen Domäne 1 und 2 stark verkürzt ist (Checroun *et al*., 2004; sie auch Abb.4.1). Sigmafaktoren der Gruppe 3, zu denen RpoH und FliA gehören, weisen zwar alle zur Promotorerkennung notwendigen Domänen 2 und 4, sowie Domäne 3 auf, allerdings keine Domäne 1. Die ECF Sigmafaktoren RpoE und FecI der Gruppe 4 enthalten ausschließlich die zur Promotorerkennung minimalen Domänen 2 und 4. Sigmafaktoren der weitaus kleineren σ^{54}- Familie hingegen erkennen Sequenzmodule, die bei -24 und bei -12 relativ zum Transkriptionsstart lokalisiert sind (Wigneshweraraj *et al*., 2008; Helmann, 2011). Auch die Bildung des offenen RNAP-Promotorkomplexes verläuft hier nach einem grundlegend anderen Mechanismus. So benötigt das $E\sigma^{54}$-Holoenzym ein ATP-abhängiges Aktivatorprotein, um die Promotor-DNA aufzuschmelzen (Rappas *et al*., 2007). In ihrer Aktivität reguliert werden bakterielle Sigmafaktoren häufig durch Antisigmafaktoren, indem die Antisigmafaktoren die Aktivität der Sigmafaktoren, durch Sequestrierung der letzteren, negativ regulieren. Diese Sequestrierung ist reversibel und kann situationsspezifisch aufgehoben werden (Helmann, 2011).

2.2 Regulation durch kleine nichtkodierende regulatorische RNAs (sRNAs)

Bakterien verfügen über ein breites Spektrum an Mechanismen, um ihre Genexpression den sich ändernden Bedingungen in ihrer Umwelt anzupassen. Ein großer Teil dieser Regulation findet auf Ebene der Transkriptionsinitiation durch „klassische“ Transkriptionsfaktoren statt. Doch hat sich vor allem im letzten Jahrzehnt zunehmend herauskristallisiert, dass kleine nichtkodierende regulatorische RNAs (sRNAs) eine wichtige Rolle bei der Regulation von Stressantworten auf posttranskriptionaler Ebene einnehmen (Gottesman 2011).

Die Entdeckung neuer kleiner nichtkodierender RNAs allein durch klassische genetische Methoden gestaltet sich im Allgemeinen sehr schwierig, da sie durch ihre geringe Größe durch eine ungerichtete (Transposon-) Mutagenese selten getroffen werden. Fortschritte bei der Suche nach neuen sRNAs brachten zunächst bioinformatische Methoden (zusammengefasst in einem Review von Livny und Waldor, 2007). Hierbei wurden die intergenischen Regionen (IGRs), in denen sRNAs lokalisiert sind, nach ihrer Konservierung zwischen verschiedenen Enterobakterien, sowie nach dem Vorhandensein von Promotoren und die für sRNAs typischen intrinsischen Transkriptionsterminatoren hin untersucht (Argaman *et al*., 2001; Wassarman *et al*., 2001; Chen *et al*., 2002). Methodische Fortschritte

führen seit einigen Jahren dazu, dass die computergestützten Suchmethoden immer mehr von experimentellen Methoden abgelöst werden. So haben Tiling Array-Analysen (Mikroarrays, die das gesamte Genom abdecken, auch die IGRs), sowie Hochdurchsatz-Sequenzierungsmethoden (Pyrosequenzierung) mit dem sRNA-Bindeprotein Hfq (siehe 2.2.2) co-immunopräzipitierter RNA zur Entdeckung einer Vielzahl neuer sRNAs geführt (Sharma und Vogel, 2009; MacLean *et al*., 2009; Wang *et al*., 2009; Sittka *et al*., 2008; Zhang *et al*., 2003). Für *E.coli* sind derzeit über 80 verschiedene sRNAs beschrieben worden.

Kleine nichtkodierende RNAs („small noncoding RNAs“, sRNAs) sind RNAs mit einer Länge zwischen 50 und 500 Nukleotiden, die weitverbreitet in verschiedenen Bakterienspezies als Regulatoren der Genexpression fungieren (Reviews: Brantl, 2009; Gottesman, 2005; Gottesman 2011; Gottesman und Storz, 2010; Waters und Storz 2009). Sie enthalten bis auf ganz wenige Ausnahmen keinen offenen Leserahmen (ORF), daher die Bezeichnung „nichtkodierend“. Eine Gruppe von sRNAs entfalten ihre regulatorische Wirkung, indem sie mit ihrer Ziel-mRNA Basenpaarungen eingehen und deren Translation und/oder mRNA Stabilität überwiegend negativ, in einigen Fällen aber auch positiv regulieren. Eine andere Gruppe von sRNAs fungieren als meist negative Modulatoren der Aktivität von Proteinen, indem sie die Sekundärstrukturen von deren „Substrat“-Nukleinsäuren imitieren.

Darüber hinaus existieren mit den Riboswitches und RNA-Thermosensoren weitere *cis* regulatotische RNAs, die in der 5´- untranslatierten Region (5´-UTR) lokalisiert Teil der mRNA sind, die sie regulieren (Reviews: Grundy und Herkin, 2006; Narberhaus *et al*., 2006). Solche RNA-Elemente können als Antwort auf Signale in ihrer Umwelt, zum Beispiel durch Bindung bestimmter metabolischer Liganden (Flavinmononukleotide, Purine, S-Adenosylmethionin, Lysin, etc.) und *second Messenger*-Nukleotide wie cyclo-di-GMP (Sudarsan *et al*., 2008; Hengge, 2010a; Lee *et al*., 2010) sowie durch erhöhte Temperatur, alternative Konformationen bzw. Sekundärstrukturen einnehmen und sowohl Transkription, als auch Translation zumeist reprimieren (Nudler und Mironov, 2004). Nur wenige Riboswitches sind bisher beschrieben worden, die die Genexpression aktivieren.

Eine einzigartige neue Klasse regulatorischer RNAs präsentieren die kürzlich entdeckten CRISPR RNAs („clustered regularly interspaced short palindromic repeats“ RNAs). Diese RNAs enthalten kurze Regionen mit Homologie zu Bakteriophagen- und Plasmidsequenzen und repräsentieren eine Art Immunsystem, das gegen das Eindringen von fremdem genetischem Material gerichtet ist (Bakteriophageninfektion und Plasmidkonjugation). Das CRISPR-System weist Parallelen zur Maschinerie der eukaryotischen RNA-Interferenz auf (Sorek *et al*., 2008; van der Oost *et al*., 2009; Karginov und Hannon, 2010).

Eine weitere Klasse von regulatorischen RNAs sind solche mit „Housekeeping“-Funktionen, wie der 4.5S RNA-Komponente des Signal-Erkennungspartikels (SRP) bei der Zielsteuerung von Proteinen, RNase P RNA, ein Ribozym, das die Prozessierung von tRNAs und anderer RNAs vermittelt und die tmRNA, eine Hybrid-RNA aus tRNA und mRNA, welche unvollständig translatierte Proteine für den Abbau markiert (Holbrook, 2008; Kazantsev und Pace 2006; Moore und Sauer 2007).

2.2.1 *cis*-kodierte (Antisense) sRNAs

Cis-kodierte sRNAs (auch antisense RNAs genannt) verfügen über eine komplette Komplementarität mit ihrer zu basenpaarenden Ziel-RNA, da sie auf dem zur Ziel-mRNA gegenüberliegenden Strand kodiert sind (Brantl, 2007; Wagner *et al*., 2002). Sie können sowohl auf mobilen genetischen Elementen (Bakteriophagen, Plasmide und Transposons), als auch auf dem bakteriellen Chromosom lokalisiert sein. Jene „antisense“ RNAs, die auf Plasmiden kodiert sind, dienen häufig der Kontrolle derer Kopienzahl. Ein Beispiel hierfür ist die 108 Nukleotide lange *cis* sRNA RNA I, welche die Kopienzahl von ColE1 Plasmiden negativ kontrolliert. Indem RNAI mit derjenigen RNA basenpaart (RNA II), die zum Replikationsprimer prozessiert wird, bleibt die Prozessierung der letzteren zum funktionsfähigen Replikationsprimer aus (Stougaard *et al*., 1981; Tomizawa *et al*., 1981). In Bakteriophagen sind *cis* RNAs am Wechsel von lsyogenem und lytischem Zyklus involviert, In Transposons kontrollieren sie deren Transpositionshäufigkeit. Die weitverbreitetste Funktion bakterieller *cis* RNAs ist die Reprimierung der Expression von potenziell toxischen Proteinen, indem sie die Translation der Toxin-kodierenden mRNAs blockieren, was häufig mit der Degradation der Ziel-mRNAs einhergeht (Gerdes und Wagner 2007; Fozo *et al*., 2008). So inhibiert die chromosomenkodierte Antitoxin *cis* sRNA SymR aus *E.coli* die Translation der SOS-induzierten mRNA für das Endonukleasetoxin SymE, einhergend mit dem Abbau der mRNA (Kawano *et al*., 2007). Andere *cis* sRNAs regulieren die Prozessierung ihrer Ziel-mRNAs. Ein Beispiel hierfür ist die chromosomenkodierte Stationärphasen-induzierte sRNA GadY, die auf dem gegenüberliegenden Strang der *gadX*-*gadW* mRNA lokalisiert ist. GadX und GadW sind Transkriptionsregulatoren der Säurestressantwort (siehe 2.3.1.3). Die Basenpaarung von GadY an die *gadX* 3´-UTR führt zur RNase III-abhängigen Prozessierung der polycistronischen *gadXW* mRNA, einhergehend mit der Stabilisierung der *gadX* mRNA und der Akkumulation von GadX Protein (Opdyke *et al*., 2004 und 2011; Tramonti *et al*., 2008).

2.2.2 *trans*-kodierte sRNAs

Das Gros der bakteriellen sRNAs, das als Antwort auf bestimmte Stressbedingungen exprimiert wird und mit ihren Ziel-mRNAs Basenpaarungen eingehen sind in *trans* agierende sRNAs. Anders als ihre *cis*-kodierten Pendants sind in *trans*-kodierte sRNAs an anderen

Genloki als ihre Ziel-mRNAs kodiert und verfügen daher nur über eine begrenzte Komplementarität zu diesen. Daraus ergibt sich, dass eine in *trans*-kodierte sRNA oft mit mehreren Ziel-mRNAs Basenpaarungen eingehen und diese regulieren kann (Gottesman 2005; Prévost *et al*., 2007). Die potenzielle Paarungsregion einer sRNAs mit ihrer mRNA umfasst typischerweise 10-25 Nukleotide, wobei 6-8 Basenpaarung mindestens zusammenhängend sein sollten (Waters und Storz, 2009; Gottesman und Storz 2010). *Trans*-kodierte sRNAs werden im Allgemeinen als eigene Einheiten transkribiert und weisen eine typische Länge von etwa 100 Nukleotiden auf. Tatsächlich sind bislang keine 3D-Strukturen bakterieller sRNAs, mit Ausnahme einiger Riboswitches, aufgeklärt worden. *Trans* sRNAs können verschiedene Sekundärstrukturen annehmen, die aus Haarnadelschleifen (Stem-Loop-Bereiche) bestehen, welche von einzelsträngigen Bereichen unterbrochen sind (siehe Abbildung 2.3 B) (Lease und Belfort, 2000; Altuvia *et al*., 1997; Geissmann und Touati, 2004). Der weitaus größte Teil aller *trans* sRNAs reprimieren ihre Ziel-mRNAs, indem sie deren Translation blockieren und/oder deren Abbau stimulieren. Aber auch einige Beispiele positiver sRNA-vermittelter Regulation sind beschrieben worden (siehe 2.2.2.1 und 2.2.2.2). In ihrer Funktionsweise ähneln bakterielle sRNAs den eukaryotischen Mikro-RNAs (miRNAs und siRNAs), unterliegen aber, im Gegensatz zu diesen (bis auf einzelne Ausnahmen) keiner Prozessierung.

Ein weiterer Unterschied zu *cis*-kodierten sRNAs, die oft konstitutiv exprimiert werden, ist, dass nahezu alle *trans* agierenden sRNAs unter spezifischen Stress- und Wachstumsbedingungen exprimiert werden und unter der Kontrolle globaler Transkriptionsfaktoren stehen. Die Gene einiger dieser sRNAs sind direkt den Genen der Regulatoren, durch die sie kontrolliert werden, benachbart (die *E.coli* sRNAs OxyS, GcvB und SgrS). In *E.coli* werden sRNAs unter Eisenmangel (Derepression von Fur-reprimierter sRNA RhyB), oxidativem Stress (OxyR-aktiviertes OxyS), periplasmatischem Stress (σ^E-induziertes MicA und RybB), erhöhte Glycinkonzentrationen (GcvA-aktiviertes GcvB), Änderungen der Glucosekonzentration (CRP-reprimiertes SpoT42 und CRP-aktiviertes CyaR) und erhöhte Glucose-6-Phosphat-Mengen (SgrR-aktiviertes SgrS) induziert.

sRNAs in *trans* benötigen aufgrund ihrer limitierten Komplementarität zur Ausübung ihrer Funktion das RNA-Chaperon Hfq (Franze de Fernandez *et al*., 1968; Muffler *et al*., 1996a und 1997b; Tsui *et al*., 1994; Valentin-Hansen *et al*., 2004). Hfq ist ein hexameres, ringförmiges RNA-Bindeprotein, bestehend aus 102 Aminosäuren (11.2 kDa) in *E.coli* und mit 50000 bis 60000 Molekülen pro Zelle (etwa 10000 Hexameren) eines der abundantesten Proteine überhaupt. Hfq ist homolog zu eukaryotischen Sm und Sm-ähnlichen Proteinen, die unter anderem in Spleißen und Abbau von mRNA involviert sind. Strukturelle und funktionelle Studien zum Mechanismus von Hfq sind immer noch nicht komplett und zudem nur für eine sehr begrenzte Zahl von sRNA/mRNA Paaren durchgeführt worden. Hfq bindet sowohl eine sRNA, als auch ihre regulierte mRNA in AU-reichen einzelsträngigen Regionen

und stimuliert deren Basenpaarung in *vitro* (Møller *et al*., 2002; Zhang *et al*., 2002; Kawamoto *et al*., 2006; Soper und Woodson, 2008; Updegrove *et al*., 2008). Möglicherweise remoduliert Hfq aktiv die Sekundärstrukturen der gebundenen RNAs, bringt sie zusammen und erhöht dadurch deren lokale Konzentration. Verschiedene Untersuchungen deuten zudem daraufhin, dass sowohl die proximale, als auch die distale Seite der Hfq-Ringpore an die RNAs binden (Schumacher *et al*., 2002; Mikulecky *et al*., 2004; Sun und Wartell, 2006; Link *et al*., 2009). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Hfq mit Ribosomen und RNase E, der primären degradativen Endonuklease in *E.coli* (siehe 2.3.2.2), interagiert (Moria *et al*., 2005). Die meisten *E.coli* sRNAs werden in einer *hfq* Mutante destabilisiert, da Hfq wahrscheinlich die sRNAs in Abwesenheit ihrer Ziel-mRNAs vor dem Abbau schützt. Hfq und RNase E erkennen ähnliche AU-reiche einzelsträngige Sequenzen (Gottesman und Storz, 2010). Ist die sRNA-mRNA Basenpaarung erst einmal vollzogen, unterliegen sowohl sRNA, als auch die mRNA meist der RNase E-abhängigen Degradation (Gottesman und Storz, 2010). Auch RNase III-abhängige Mechanismen sind beschrieben worden (Afonyushkin *et al*., 2005; Resch *et al*., 2008). *In vivo* lässt sich beobachten, dass in Hfq-defizienten *E.coli* Zellen sRNAs ihre Ziel-mRNAs nicht mehr regulieren. Tatsächlich co-immunopräzipitieren alle bisher bekannten *trans*-kodierten sRNAs mit Hfq *in vivo*. Das Nutzen dieser Eigenschaft hat sich bei der Identifizierung neuer sRNAs in *E.coli* (Zhang *et al*., 2003) und anderer Bakterien wie *Salmonella typhimurium* (Sittka *et al*., 2008) als sehr erfolgreich erwiesen. Anders als in *E. coli* benötigen einige *trans* agierende sRNAs in Gram-positiven Bakterien wie *Staphylococcus aureus* und *Bacillus subtilis*, aber auch das Gram-negative Bakterium *Helicobacter pylori* kein Hfq bzw. verfügen über kein Hfq für die Regulation ihrer Ziel-mRNAs, ein Hinweis auf andere zu Grunde liegende Mechanismen (Huntzinger *et al*., 2005; Boisset *et al*., 2007; Sharma *et al*., 2010).

2.2.2.1 Translationale Repression durch *trans*-kodierte sRNAs

Im Allgemeinen binden negativ-regulierende *trans*-kodierte sRNAs an die 5´-UTR ihrer Ziel-mRNA und maskieren die Ribosomenbindestelle (RBS), bestehend aus Shine-Dalgarno-Sequenz und Start-AUG, wodurch die mRNA unzugänglich für die Translationsmaschinerie wird und deren Translation inhibiert wird. Der damit einhergehende RNase E-abhängige Abbau der mRNA (Massé *et al*., 2003; Morita *et al*., 2005) kann als eine indirekte (sekundäre) Folge der ausbleibenden Translation angesehen werden. Die Bindung von Ribosomen und die Translation werden als für eine mRNA stabilisierende Faktoren angesehen (Deana und Belasco, 2005; Dreyfus, 2009). Die meisten sRNAs, die unter periplasmatischem Stress die Synthese von Porinen (Omp-Proteinen) inhibieren, nutzen diesen Mechanismus, wahrscheinlich ebenso die sRNA/mRNA-Paare DsrA/*hns*, OxyS/*fhlA*, RhyB/*sodB*, SpoT42/*galK* und SgrS/*ptsG* (Gottesman und Storz, 2010). Andere Untersuchungen haben allerdings gezeigt, dass eine Blockierung der Translation auch erreicht werden kann, wenn die sRNA weit stromauf- oder abwärts der RBS bindet. So binden die sRNAs GcvB und RhyB

bei einigen ihrer diversen Ziel-mRNAs weit (bis zu 50 Nukleotiden und mehr) stromaufwärts des AUG-Startcodons (Sharma *et al*., 2007; Vecerek *et al*., 2007). Für die sRNA RybB in *Salmonella* konnte nachgewiesen werden, dass die translationale Blockierung der *ompN* mRNA auch dann stattfindet, wenn die Paarungsregion bis in das fünfte Codon des ORF reicht (Bouvier *et al*., 2008). Die Basenpaarung zwischen der *Salmonella* sRNA MicC und der *ompD* mRNA findet sogar ausschließlich in der kodierenden Region im Bereich der Codons 23-26 statt und führt zum RNase E-vermittelten Abbau der mRNA, ohne die Bindung der Ribosomen und die Translationsinitiation zu inhibieren (Pfeiffer *et al*., 2009). Die unter oxidativem Stress OxyR-induzierte sRNA OxyS (Altuvia *et al*., 1997) inhibiert die *rpoS* Translation indirekt, möglicherweise indem sie Hfq austitriert (Zhang *et al*., 1998). In einem Ansatz mit einer Vektor-basierten sRNA-Bibliothek konnte in jüngerer Zeit mit DicF ein möglicher neuer negativer sRNA-Regulator der *rpoS* Expression identifiziert werden (Mandin und Gottesman, 2010).

2.2.2.2 Translationale Aktivierung durch *trans*-kodierte sRNAs: die prototypische *rpoS* mRNA

Typische von *trans*-kodierten sRNAs positiv regulierte Ziel-mRNAs bilden in ihrer 5´-UTR eine translationsinkompetente Sekundärstruktur (Haarnadelschleife) aus, in der die RBS sequestriert wird und unzugänglich für die Translationsmaschinerie ist. Die sRNAs aktivieren ihre Ziel-mRNAs über einen anti-antisense Mechanismus, indem sie durch Bindung diese inhibitorische Sekundärstruktur aufschmelzen, wodurch die mRNA zugänglich für die Ribosomen und deren Translation stimuliert wird (siehe Abbildung 2.3) (Prévost *et al*., 2007; Urban und Vogel, 2008; Review: Fröhlich und Vogel, 2009). Die translationale Aktivierung einer mRNA durch kleine sRNAs soll im Folgenden exemplarisch anhand der *rpoS* mRNA, als Prototyp einer aktivierten mRNA, detaillierter beschrieben werden. RpoS (σ^S) ist der Masterregulator der allgemeinen Stressantwort in Gram-negativen Bakterien (siehe 2.3) und die Regulation seiner Transkription und Translation Gegenstand dieser Arbeit.

Die mit 567 Nukleotiden (Nt) außergewöhnlich lange *rpoS* 5´-UTR (Lange *et al*., 1995) faltet sich in eine etwa 100 Nt lange translationsinkompetente Haarnadelschleife, die die RBS intramolekular sequestriert (Brown und Elliott, 1997). Bisher sind drei verschiedene in *trans* agierende sRNAs identifiziert worden, die mit der gleichen Region in der *rpoS* mRNA etwa 100 Nt stromaufwärts der RBS innerhalb der 5´-UTR Basenpaarungen eingehen (siehe Abb. 2.3) und die *rpoS* Translation durch Aufschmelzen dieser Sekundärstrukur stimulieren: DsrA, RprA und ArcZ (Lease *et al*., 1998; Sledjeski *et al*., 1996; Majdalani *et al*., 1998, 2001 und 2002; Mandin und Gottesman 2010).

Die 87 Nt große sRNA DsrA (deren Transkription bei niedrigen Temperaturen selbst induziert wird) stimuliert die RpoS Expression bei niedrigen Temperaturen (Sledjeski *et al*.,

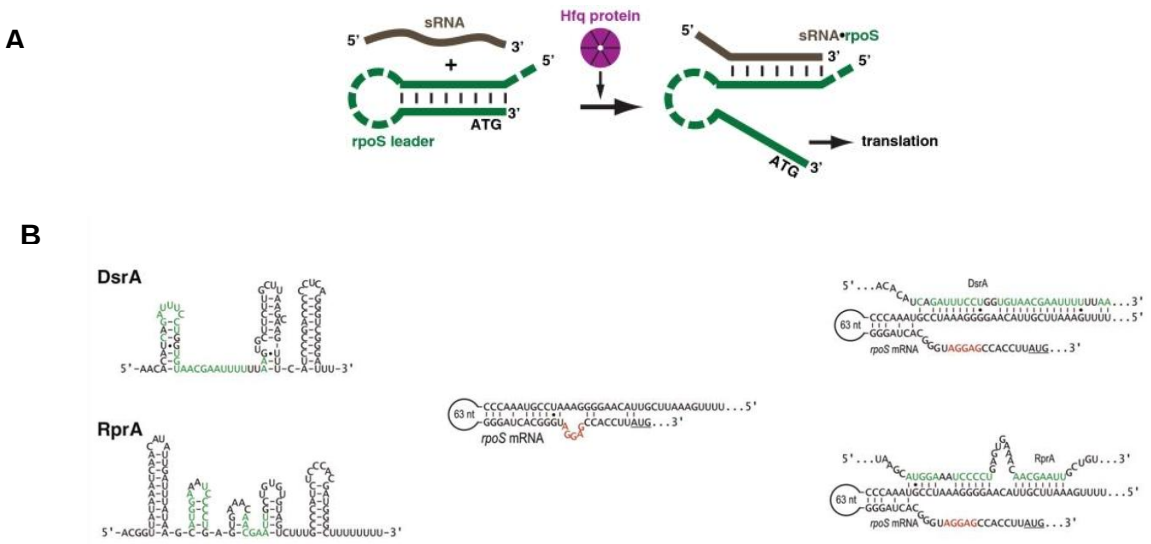


Abbildung 2.3: Translationale Aktivierung der *rpoS* mRNA durch sRNAs (**A**: aus Soper *et al.* 2010, **B:** aus Fröhlich und Vogel, 2009). Weitere Erläuterungen sind im Text beschrieben.

1996). RprA (105 Nt) steht unter der Kontrolle des RcsC/D/B-Phosphorelay-Systems (Majdalani *et al*., 2002), das als Antwort auf Zelloberflächenstress aktiviert wird (Majdalani und Gottesman, 2005). RprA akkumuliert mit zunehmender Zelldichte und erreicht ein Maximum in der stationären Phase (Argaman *et al*., 2001; Wassarman *et al*., 2001; Majdalani *et al*., 2002). Zudem konnte gezeigt werden, dass die osmotische Induktion von RpoS in Abwesenheit von DsrA zum Teil von RprA abhängig ist (Majdalani *et al*., 2001). In jüngerer Zeit konnte mit ArcZ eine weitere *rpoS* aktivierende sRNA identifiziert werden (Mandin und Gottesman, 2010). ArcZ ist konvergent und überlappend mit dem Gen für die Sensorkinase ArcB lokalisiert (Papenfort *et al*., 2009). Seine Expression wird vom ArcB/ArcA-Zweikomponenten-System unter anaeroben Bedingungen reprimiert, möglicherweise durch eine direkte Repression der *arcZ* Transkription durch Bindung des aktivierten (phosphorylierten) ArcA-Responseregulator an den *arcZ* Promotor (Mandin und Gottesman, 2010).

Das Arc-System („aerobic respiration control“) ist an der Umprogrammierung des aeroben zum anaeroben Metabolismus beteiligt und nimmt Änderungen der Redoxbedingungen während des Zellwachstums wahr (Malpica *et al*., 2006). Neben der *rpoS* Translation kontrolliert das aktivierte ArcB/ArcA-System zwei weitere Ebenen der *rpoS* Expression negativ, nämlich die Transkription und die Stabilität des RpoS-Proteins (Mika und Hengge, 2005) (siehe 2.3.2.1 und 2.3.2.4). ArcZ akkumuliert in der stationären Phase (Mandin und Gottesman, 2010) und unterliegt einer Hfq-abhängigen Prozessierung (Soper *et al*. 2010). Nur Vollängen-ArcZ (121 Nt) scheint Hfq spezifisch zu binden, aber lediglich die 56 Nt lange prozessierte Form repräsentiert die aktive Form, die *rpoS* mRNA bindet und reguliert (Soper *et al*., 2010).

In Übereinstimmung mit der Abhängigkeit der *rpoS* Translation von Hfq in *vivo* (Brown und Elliott, 1996; Muffler *et al*., 1996a) binden alle drei *rpoS* aktivierende sRNAs an Hfq in *vitro* (Updegrove *et al*., 2008; Soper und Woodson, 2008; Soper *et al*., 2010). Die Interaktion der *rpoS* mRNA mit ihren aktivierenden sRNAs ist sowohl *in vitro* (gezeigt für DsrA: Soper und Woodson 2008), als auch *in vivo* (Soper *et al*., 2010) abhängig von zwei verschiedenen einzelsträngigen Hfq-Bindestellen in der *rpoS* 5´-UTR: einem A_6-Element etwa 150 Nukleotide und einem repetitiven $(AAN)_4$-Element etwa 200 Nukleotide stromaufwärts des AUG-Startcodons, wobei das $(AAN)_4$-Element offenbar relevanter ist. Hierbei scheint Hfq eher die *rpoS* mRNA•sRNA Komplexe zu stabilisieren, als die Kinetik der Bildung der *rpoS* mRNA•sRNA Komplexe zu beeinflussen (Lease und Woodson, 2004; Soper und Woodson, 2008; Soper *et al*., 2010). Desweiteren konnte in anderen Studien gezeigt werden, dass Hfq DsrA und die *rpoS* mRNA an zwei verschiedenen Interaktionsoberflächen kontaktiert (Mikulecky *et al*., 2004) und selbst keine Sekundärstrukturänderungen sowohl in DsrA, als auch im *rpoS* Transkript induziert (Brescia *et al*., 2003; Lease und Woodson, 2004). Zudem wird der *rpoS*•DsrA Duplex nach seiner Bildung durch die doppelstrangspezifische Endonuklease RNase III abgebaut (Resch *et al*., 2008). Ein Vorgang, der an den RNase E-abhängigen gekoppelten Abbau negativ-regulierter mRNAs und ihrer sRNAs erinnert (Massé *et al*., 2003). Weiterhin scheint die DsrA-abhängige Aktivierung der *rpoS* mRNA Translation bei niedrigen Temperaturen neben Hfq auch von der DEAD-box Helikase CsdA abhängig zu sein (Resch *et al*., 2010).

Daneben existieren in *E. coli* noch weitere Ziel-mRNAs, die mittels *trans*-kodierter sRNAs in einem analogen Mechanismus wie die *rpoS* mRNA, aktiviert werden. Dazu zählt zum einen die sRNA GlmZ (207 Nt). GlmZ aktiviert selektiv die Translation der *glmS* mRNA innerhalb der dicistronischen *glmUS* mRNA (diskoordinierte Operonexpression) über einen anti-antisense Mechanismus, einhergehend mit einer starken Stabilisierung der *glmS* mRNA (Kalamorz *et al*., 2007; Urban und Vogel 2008). Die *glmS* mRNA kodiert die Glucosamin-6-Phosphat-Synthase, welche die alternative Synthese von Glucosamin-6-Phosphat aus Fructose und Glutamin vermittelt und aktiviert wird, wenn keine externen Aminozucker verfügbar sind. Die Aktivierung von GlmS durch GlmZ ist strikt von der kleinen, zu GlmZ sowohl strukturell als auch sequenziell sehr ähnlichen sRNA GlmY abhängig. GlmY verfügt nicht über die *glmS* mRNA Paarungsregion und antagonisiert die Inaktivierung von GlmZ durch Prozessierung, indem es wahrscheinlich als molekularer Mimikry an der GlmZ-Prozessierung beteiligte Faktoren von GlmZ wegtitriert (Reichenbach *et al*., 2008; Urban *et al*., 2007). Die unter Eisenmangel induzierte sRNA RhyB, die meist als negativer Regulator von Ziel-mRNAs fungiert, die nichtessentielle Eisenproteine kodieren, aktiviert die Translation der *shiA* mRNA ebenfalls über einen anti-antisense Mechanismus (Massé *et al*., 2005; Prévost *et al*., 2007). S*hiA* kodiert die Shikimat-Permease, welche an der Siderophorsynthese zur intrazellulären Akkumulation von Eisen aus der Umgebung involviert ist.

2.2.2.3 Weitere physiologische Funktionen *trans* kodierter sRNAs

Das prominenteste Ziel *trans* kodierter sRNAs sind eindeutige jene Transkripte, die Porine in der Außenmembran kodieren. In *E. coli* und *Salmonella* werden alle wichtigen Außenmembranproteine durch eine oder mehrere sRNAs heruntereguliert (Reviews: Guillier *et al*., 2006; Vogel und Papenfort 2006). Dazu zählen neben den in 2.2.2.1 erwähnten sRNAs unter anderem OmrA und OmrB, sowie MicA. OmrA und OmrB werden als zwei separate benachbarte Einheiten transkribiert. Sowohl die Expression von OmrA (88 Nt), als auch die von OmrB (82 Nt) steht unter der Kontrolle des EnvZ/OmpR-Zweikomponentensystems und wird dementsprechend unter Osmostressbedingungen exprimiert (OmrAB für „OmpR regulated sRNAs A and B“) (Guillier und Gottesmann 2006). Beide RNAs binden Hfq (Wassarman *et al*., 2001; Zhang *et al*., 2003). Mit ihren konservierten 5´-Enden (Guillier und Gottesman, 2008) binden sie eine Reihe von gemeinsamen Ziel-mRNAs, darunter *cirA*, *fecA* und *fepA*, die für Kanäle für den Durchtritt von Eisen-Siderophor-Komplexen durch die Außenmembran kodieren. Ein weiteres Ziel-Transkript, *ompT* kodiert eine Außenmembran-Protease (Guillier und Gottesman 2006). Darüber hinaus inhibieren sie durch direkte Basenpaarung ihren eigenen Regulator, den Responseregulator OmpR, wodurch ein negativer Feedback-Loop konstituiert wird (Guillier und Gottesman, 2008). Die Transkription der Porin-reprimierenden sRNAs MicA und RybB erfolgt durch die σ^E-haltige RNAP ($E\sigma^E$) und ist somit Teil des RpoE-Regulons (Johansen *et al*., 2006; Papenfort *et al*., 2006; Thompson *et al*., 2007; Udekwu *et al*., 2005; Udekwu und Wagner 2007). Eine weitere Gruppe von sRNAs (siehe Tabelle 2.1) ist an der Umgestaltung des Metabolismus als Antwort auf sich ändernde Umweltbedingungen beteiligt. Vor allem der Eisen- (RhyB) und Kohlenhydratstoffwechsel (GlmY, GlmZ, SgrS und Spot42) aber auch der Wechsel von aeroben zu anaeroben Wachstumsbedingungen (FNR-regulierte sRNA FnrS) sind hiervon betroffen. Eine andere Gruppe von sRNAs regulieren die Synthese von globalen Transkriptionsfaktoren (RpoS, OmpR).

2.2.3 Proteinaktivitäts-modulierende sRNAs

Neben den basenpaarenden sRNAs existieren in *E. coli* und anderen Bakterien verschiedene sRNAs, die an Proteine binden und deren Aktivität modulieren. Dabei inhibieren sie die Aktivität der Zielproteine, indem sie die Strukturen von deren „Substrat“-Nukleinsäuren imitieren (molekulare Mimikry) und beeinflussen dadurch Vorgänge wie Transkription, Translation und Prozessierung. Die prominentesten Beispiele hierfür sind die (i) 6S RNA, die an die RNAP bindet und diese sequestriert und die (ii) CsrB-Famile von sRNAs (CsrB und CsrC), die an das translationale Regulatorprotein CsrA binden und dieses von seinen Ziel-mRNAs wegtitriert.

2.2.3.1 6S RNA

Die etwa 180 Nukleotide lange 6S RNA aus *E. coli* weist eine charakteristische Sekundärstruktur auf, bestehend aus einer doppelsträngigen Haarnadelschleife mit einer zentralen einzelsträngigen Loop-Region, welche die DNA in einem offenen RNAP-Promotor-Komplex imitiert. Die 6S RNA bindet *in vitro* bevorzugt an das RpoD-haltige ($E\sigma^{70}$), nicht aber an das RpoS-haltige ($E\sigma^{S}$) RNAP-Holoenzym (Wassarman und Storz, 2000; Trotochaud und Wassarman, 2005; Review: Wassarman 2007). 6S RNA Mengen akkumulieren in der stationären Phase (Barrick *et al*., 2005), was eine Inhibition der Transkription von Genen einiger $E\sigma^{70}$-abhängiger Promotoren und die Stimulation der Expression einiger Gene von $E\sigma^{S}$-abhängigen Promotoren zur Folge hat (Sigmafaktorkompetition zugunsten von RpoS) (Trotochaud und Wassarman, 2004 und 2005). *In vivo* inhibiert die 6S RNA vor allem solche Promotoren, die eine degenerierte -35-Region aufweisen (Cavanagh *et al*., 2008). In die Interaktion der 6S RNA mit der RNAP ist die Region 4.2 innerhalb von RpoD involviert. Das ist die gleiche Region, die für die Erkennung des -35-Elements notwendig ist (Cavanagh *et al*., 2008). Auch wenn andere Aminosäuren in die Interaktion mit der Promotor-DNA und der 6S RNA verwickelt zu sein scheinen (Klocko und Wassarman, 2009). Interessanterweise fungiert die 6S RNA sowohl *in vitro* als auch *in vivo* als Template für die Transkription von 14-22 Nt langen RNAs, den sogenannten pRNAs, vor allem beim Herauswachsen der Zellen aus der stationären in die exponentielle Phase bei einem verbesserten Nahrungsangebot (Wassarman und Saecker 2006; Gildehaus *et al*., 2007). Möglicherweise dient diese Transkription der Freisetzung des 6S-RNA sequestrierten $E\sigma^{70}$-Holoenzyms, das dann wieder für die vegetative Genexpression zur Verfügung steht. Im Anschluss daran wird die 6S RNA abgebaut (Wurm *et al*., 2010).

2.2.3.2 CsrB und CsrC sRNAs

Die *E. coli* sRNAs CsrB (366 Nt) und CsrC (245 Nt) inhibieren die Aktivität des kleinen homodimeren RNA-Bindeproteins CsrA (csr: „carbon storage regulation“), indem sie CsrA sequestrieren und dieses von seinen Bindestellen in Ziel-mRNAs wegtitrieren (Babizke *et al*., 2007 und 2009). CsrA ist ein Repressor von Stationärphasenprozessen wie Gluconeogenese, Glycogenbiosynthese und Biofilmbildung und ein Aktivator von Glykolyse und Motilität (Gottesman und Storz, 2010). CsrA bindet an GGA-Motive in der 5´-UTR von Ziel-mRNAs und beeinflusst dadurch sowohl die Ribosomenbindung und damit die Translation, als auch die Stabilität der mRNA meist negativ. Ein Beispiel hierfür ist die *glgC* mRNA, die für die Glucose-1-Phosphat-Adenyltransferase kodiert (Baker *et al*., 2002), welche den ersten Schritt der Glycogenbiosynthese katalysiert. Auch die *pgaA* mRNA, die für die Polysaccharid-Adhesin Biosynthese für die Biofilmbildung verantwortlich ist, wird von CsrA reprimiert (Wang *et al*., 2005), ebenso die *hfq* mRNA (Baker *et al*., 2007). Ein Beispiel positiver posttranskriptionaler Regulation durch CsrA repräsentiert die *flhDC* mRNA, die für den Masterregulator der Flagellensynthese kodiert und durch CsrA-Bindung stabilisiert wird,

wobei die zugrundeliegenden Mechanismen noch ungeklärt sind (Wei *et al*., 2001). Reguliert wird CsrA durch die kleinen RNAs CsrB und CsrC (Liu *et al*., 1997; Weilbacher *et al*., 2003). Sie wirken der Aktivität von CsrA entgegen, indem sie es mit ihren vielen GGA-Motiven in deren einzelsträngigen Loop-Bereichen binden und von den Ziel-mRNAs wegtitrieren. Die CsrB und CsrC Transkription wird durch das BarA-UvrY Zweikomponentensystem unter Nährstoffmangelbedingungen stimuliert (Suzuki *et al*., 2002). Aber auch die Stabilität der beiden sRNAs unterliegt der spezifischen Regulation durch das Protein CsrD. CsrD rekrutiert die Endonuklease RNase E, was zur Degradation beider sRNA führt (Suzuki *et al*., 2006). Das Csr-system ist weitverbreitet und findet sich sowohl bei Gram-positiven, als auch bei Gram-negativen Vertretern. CsrB und CsrC Homologe inhibieren die Aktivität von CsrA Homologen unter anderem in Bakterien der Gattungen *Salmonella*, *Erwinia*, *Pseudomonas* und *Vibrio*, wo sie Prozesse wie Quorum Sensing und Virulenz beeinflussen (Lapouge *et al*., 2008; Lucchetti-Miganeh *et al*., 2008).

2.3 RpoS- der Masterregulator der generellen Stressantwort in *E. coli*

In ihren natürlichen Habitaten sind Bakterien gewöhnlich suboptimalen Wachstumsbedingungen wie Nahrungslimitation und anderen diversen Stressstimuli ausgesetzt. Ein Großteil der Ressourcen muss daher für die Aufrechterhaltung der Integrität und das Überleben aufgebracht werden. RpoS als Masterregulator der generellen Stressantwort in *E. coli* und verwandten Gram-negativen Bakterien gewährleistet das Überleben unter Stressbedingungen (Review: Hengge, 2011).

Anders als hochspezifische Stressantworten, die mit der Elimination des eigentlichen Stressagenzes und der Reparatur von bereits eingetretenem Schaden einhergehen, ist die RpoS-abhängige generelle Stressantwort präventiv darauf ausgerichtet, Schaden zu verhindern. (Hengge-Aronis, 2000). Hierbei werden Zellen, die einen Stress erfahren haben gleichzeitig auch resistent gegenüber einem anderen nicht erfahrenen Stress („cross-protection“) (Jenkins *et al*., 1988 und 1990; Lange und Hengge-Aronis 1991a; McCann *et al*., 1991). Weiterhin ist RpoS auch der Masterregulator der stationäre Wachstumsphasen-Genexpression (Lange und Hengge-Aronis, 1991b). In *E. coli* stehen etwa 10% aller Gene (mehr als 500 Gene) unter direkter oder indirekter Kontrolle der RpoS-haltigen RNAP ($E\sigma^S$) (Weber *et al*., 2005), deren Produkte stressprotektive Funktionen inne haben. Die RpoS-induzierte Genexpression beeinflusst unter anderem die Zellmorphologie, die Umgestaltung des Stoffwechsels (in Richtung eines anaeroben/fermentativen Metabolismus), die Entwicklung multipler Stressresistenz, die Akkumulation von protektiven (Osmoschutz-) Substanzen wie Trehalose und Speichersubstanzen wie Glycogen und die Biofilmbildung über die Expression von Curli-Fimbrien (Hengge, 2011).

Die Expression von σ^S selbst unterliegt einer äußerst komplexen Regulation, die sowohl auf transkriptionaler und translationaler, als auch auf posttranslationaler Ebene wirkt (regulierte RpoS-Proteolyse) (Lange und Hengge-Aronis 1994a; Hengge-Aronis, 2002). Aber auch der Abbau der *rpoS* mRNA (Basineni *et al*., 2009; Madhugiri *et al*., 2010; McCullen *et al*., 2010; Phadtare und Inouye, 2001; Resch *et al*., 2008), sowie die RpoS-Aktivität, d.h. die Assoziation mit dem RNAP-Kernenzym (Typas *et al*., 2007a) unterliegen der Regulation (siehe auch 2.3.2). Signalintegration kann dabei auf allen Regulationsebenen stattfinden. Während die graduelle Akkumulation von σ^S beim Übergang von der exponentiellen in die postexponentielle und schließlich stationäre Wachstumsphase überwiegend auf eine verstärkte *rpoS* Transkription und Translation zurückzuführen ist (Lange und Hengge-Aronis, 1994a; Lange et al., 1995), beruht die schnelle Akkumulation von RpoS bei plötzlich auftretenden lebensbedrohlichen Stressen unter exponentiellem Wachstum hauptsächlich auf der Hemmung der RpoS-Proteolyse (Bearson *et al*., 1996; Bougdour *et al*., 2008; Hengge, 2009; Lange und Hengge-Aronis, 1994a; Mandel und Silhavy, 2005; Muffler *et al*., 1996b und 1997). Solche σ^S-induzierenden Stresse sind beispielsweise Nährstofflimitation (Lange und Hengge-Aronis, 1994a; Mandel und Silhavy, 2005), hyperosmotischer Stress (Hengge-Aronis, 1996; Muffler *et al*., 1996b), Säurestress (Bearson *et al*., 1996; Heuveling *et al*., 2008), die Diauxie-Lag-Phase (Fischer *et al*., 1998), Hitzeschock (Muffler *et al*., 1997), oder Schädigungen der DNA und die Zugabe von Wasserstoff-Peroxid (Merrikh *et al*., 2009) (siehe Abbildung 2.4). Auch niedrigere Temperaturen unterhalb von 30°C (oberhalb des Kälteschocks) stimulieren die Expression von RpoS auf translationaler Ebene (Repoila *et al*., 2003; Sledjeski *et al*., 1996) (siehe auch 2.2.2.2 und Abbildung 2.4).

Bemerkenswerterweise wurde bereits 1923 veröffentlicht, das „alte“ *E. coli* Zellen (also RpoS-haltige Zellen aus der stationären Wachstumsphase) resistenter gegenüber Kälte, Hitze, Salz und Phenol sind als „junge“ Zellen (wachsende Zellen aus der exponetiellen Phase, die weitaus weniger RpoS enthalten), ohne natürlich Kenntnis über die Existenz von RpoS zu haben (Sherman und Albus, 1923). Etwa 8% -10% aller σ^S-abhängigen Gene kodieren für DNA-Bindeproteine oder Signaltransduktionsproteine (Weber *et al*., 2005). Dies impliziert, dass RpoS als Regulator an der Spitze von regulatorischen Kaskaden steht und viele Gene in Feedforward-Loops unter indirekter σ^S-Kontrolle stehen (Hengge, 2011). Solche regulatorischen Kaskaden oder Feedforward-Loops ermöglichen eine komplexere, auf die jeweiligen Umweltbedingungen feiner abgestimmte Regulation, da eine multiple Signalintegration auch auf nachgeschalteten Ebenen möglich ist.

2.3.1 Das RpoS-kontrollierte Netzwerk

2.3.1.1 Struktur RpoS-abhängiger Promotoren und RpoS-Selektivität

Auf den ersten Blick scheinen die RpoS-haltige RNAP ($E\sigma^S$) und die vegetative RpoD-haltige RNAP ($E\sigma^{70}$) ähnliche, kaum unterscheidbare Promotorsequenzen zu erkennen (Loewen und

Hengge-Aronis, 1994; Tanaka *et al*., 1995). Beide Holoenzyme transkribieren offenbar dieselben DNA-Templates *in vitro* und binden *in vitro* beide an Promotoren, die die σ^{70}-Konsensussequenz aufweisen (Nguyen *et al*., 1993; Tanaka *et al*., 1993; Gaal *et al*., 2001). Wie kann es dann trotzdem dazu kommen, dass $E\sigma^S$ spezifisch und selektiv ein eigenes Regulon aktiviert, dass zum $E\sigma^{70}$-Regulon eine physiologisch komplementäre Rolle einnimmt? *In vivo* Arbeiten haben zur entscheidenden Aufklärung dieses RpoS-Promotorselektivitäts-Paradoxons beigetragen. Während einige Promotoren *in vivo* ausschließlich σ^S-abhängig sind, kann von anderen aus die Transkription unter vegetativem Wachstum von $E\sigma^{70}$, in der stationären Wachstumsphase oder in langsam wachsenden Zellen von $E\sigma^S$ aktiviert werden (Raffaelle *et al*., 2005; Wade *et al*., 2006). Dies trifft unter anderem auf ribosomale (Raffaelle *et al*., 2005) und glykolytische Gene zu (Olvera *et al*., 2009). Merkmale, die σ^S-selektive Promotoren auszeichnet werden im Folgenden kurz beschrieben (ein ausführlicher Review: Typas *et al*., 2007b).

Zum einen kann die Topologie der Promotor-DNA bei der Diskriminierung zwischen $E\sigma^{70}$ und $E\sigma^S$ eine Rolle spielen. Während $E\sigma^{70}$ negativ superspiralisierte Promotor-DNA bevorzugt, ist $E\sigma^S$ in der Lage, die Transkription von relaxierter Promotor-DNA aus zu initiieren (Bordes *et al*., 2003; Colland *et al*., 1999; Kusano *et al*., 1996). Konsistent damit ist die Beobachtung, dass die Superhelikalität im Allgemeinen in der stationären Phase reduziert wird (Blot *et al*., 2006; Kusano *et al*., 1996).

Weiterhin weist $E\sigma^S$ eine größere Flexibilität gegenüber Abweichungen vom idealisierten Konsensuspromotor (siehe auch 2.1.1) auf als die vegetative $E\sigma^{70}$ RNAP. So führt unter anderem eine degenerierte -35-Region, sowie eine von der optimalen 17 Bp Länge abweichende Spacer-Region zu einer Sigmafaktor-Selektivität zugunsten von $E\sigma^S$ (Bordes *et al*., 2000; Gaal *et al*., 2001; Lacour *et al*., 2003; Lee und Gralla 2001; Typas und Hengge, 2006; Wise *et al*., 1996).

$E\sigma^S$-abhängige Promotoren verfügen über zusätzliche Kontaktstellen zwischen Polymerase und Promotor-DNA, durch das Vorhandensein einer erweiterten -10-Region. Dessen Konsensussequenz zwischen den Positionen -14 und -4 relativ zum Transkriptionsstart ist das Endekamer 5´-TCTATACTTAA-3´ (Basen die besonders stark konserviert sind, sind unterstrichen) (Weber *et al*., 2005). Ein hinreichendes Merkmal nahezu aller RpoS-abhängigen Promotoren ist die Anwesenheit eines C an Position -13, häufig begleitet von einem vorangehenden T(-14) (Becker und Hengge-Aronis, 2001; Gaal *et al*., 2001; Weber *et al*., 2005). Diese beiden Basen werden spezifisch von K173 in der Region 2.5 innerhalb von σ^S kontaktiert, während σ^{70} an dieser Position ein negativ geladenes E458 aufweist, dass in der Regel ein G(-13) kontaktiert (Becker und Hengge-Aronis, 2001). Desweiteren besitzen $E\sigma^S$-selektive Promotoren oft ein Transkriptions-stimulierendes AT-reiches Diskriminator-Motiv unmittelbar stromabwärts der -10-Region (Lee und Gralla, 2001; Ojangu *et al*., 2000; Pruteanu und Hengge-Aronis 2002; Weber *et al*., 2005), das in Kontrast

zu einem GC-reichen Diskriminator-Motiv stringent-kontrollierter $E\sigma^{70}$-abhängiger Promotoren steht (Haugen *et al*., 2006; Josaitis *et al*., 1995).

$E\sigma^{S}$ und $E\sigma^{70}$ nutzen UP-Elemente (siehe 2.1.1) auf unterschiedliche Art und Weise. Ein UP-Element setzt sich aus zwei leicht asymmetrischen distalen und proximalen Halbseiten zusammen, die jeweils von einer α-CTD der RNAP kontaktiert werden (Estrem *et al*., 1999; Gourse *et al*., 2000; Ross *et al*., 1993). Während ein vollständiges UP-Element (distale und proximale Halbseite) oder eine proximale UP-Element Halbseite die $E\sigma^{70}$-vermittelte Transkription stimulieren, fördert eine distale UP-Element Halbseite alleine die $E\sigma^{S}$-abhängige Transkription. Hierbei ist die Anwesenheit einer -35-Region obligatorisch (Typas und Hengge, 2005). Dies ist darauf zurückzuführen, dass RpoS unfähig ist, mit einer direkt benachbarten α-CTD zu interagieren.

Frühe Transkriptions-Elongationskomplexe (ECs) können mit der Sigma-Untereinheit assoziiert bleiben, die RpoD-haltigen stärker als die RpoS-haltigen. Solche Elongationskomplexe können mit -10-Element ähnlichen Sequenzen, die unmittelbar stromabwärts des Transkriptionsstarts lokalisiert sind, interagieren und ein Pausieren der RNAP bewirken (Brodolin *et al*., 2004; Nickels und Hochschild, 2004; Ring *et al*., 1996). Möglicherweise ist die $E\sigma^{S}$-vermittelte Transkription weniger sensitiv gegenüber diesen Pausierungsstellen als die $E\sigma^{70}$-vermittelte (Typas et al., 2007b), zumal RpoS eher dazu geneigt ist, den frühen Elongationskomplex zu verlassen als RpoD (Rafaelle *et al*., 2005).

Schließlich können auch „klassische“ Transkriptionsfaktoren, hier vor allem cAMP-CRP, oder auch Nukleoid-assoziierte (histonähnliche) Proteine, wie LRP, IHF und H-NS, durch unterschiedliche Interaktion mit $E\sigma^{S}$ und $E\sigma^{70}$ die Sigmafaktorselektivität zugunsten von $E\sigma^{S}$ beeinflussen (Hengge, 2011).

2.3.1.2 RpoS und die Osmostressantwort

Bei einem Anstieg der externen Osmolarität, einem hyperosmotischen Schock, kommt es durch den bedingten Wasserefflux aus der Bakterienzelle zur Dehydratation und einer damit einhergehenden Plasmolyse (ein Review über osmotischen Stress: Wood, 2011). Die starke Aufkonzentrierung von Biopolymeren wie Proteinen und Nukleinsäuren führt dabei zur Inhibierung von Prozessen wie der Synthese von Makromolekülen und der Atmungskette, wodurch das Wachstum stark eingeschränkt wird, wenn nicht sogar vollständig zum Erliegen kommt. Damit die intrazelluläre Osmolarität die externe wieder übertrifft und der Turgor aufrechterhalten wird, reagieren Bakterien mit der Akkumulation von Elektrolyten und kleinen organischen Osmoschutzsubstanzen, den sogenannten kompatiblen Soluten. In einer primären Antwort werden K^{+}-Ionen über Transportsysteme angehäuft, ebenso meist Glutamat als Gegenion. Für die längerfristige Anpassung an hochosmolare Bedingungen werden akkumulierte Ionen gegen kompatible Solute ausgetauscht, die entweder *de novo* synthetisiert und/oder aus der Umgebung über entsprechende Transportsysteme aufgenommen werden.

Solche Osmoschutzsubstanzen sind dadurch gekennzeichnet, dass sie chemisch und metabolisch inert sind und keine Nettoladung tragen, z.B. Zucker und Polyole (wie Trehalose, Mannitol und Glycerin) und Aminosäuren und ihre Derivate (Prolin, Glycin-Betain und Ectoin etc.).

Hohe Konzentrationen an K^+-Ionen können zur Folge haben, dass die Sigmafaktorkompetition zugunsten von σ^S beeinflusst wird (Lee *et al*., 2010). Zudem haben *in vitro* Studien demonstriert, dass Kalium-Glutamat die Assoziation von $E\sigma^{70}$ mit DNA inhibiert (Gralla und Vargas, 2006) und die $E\sigma^S$-vermittelte Transktiption stimuliert. Letzteres ist auf die spezifische Interaktion des C-Terminus von σ^S, einer aus 16 Aminosäuren bestehenden Extension (die in σ^{70} nicht vorhanden ist), mit der β-Flap-Domäne des RNAP-Kernenzyms zurückzuführen (Gralla und Huo 2008; Huo *et al*., 2008; Rosenthal *et al*., 2008).

RpoS ist ein Masterregulator der hyperosmotischen Stressantwort. Einige Transkripte, die σ^S-abhängig induziert werden, werden auch unter hyperosmotischem Stress induziert (Weber *et al*., 2005; Weber und Jung, 2002), ebenso viele Proteine (Weber *et al*., 2006a). So ist die Transkription des *otsBA* Operons, das die enzymatische Maschinerie für die Synthese des kompatiblen Soluten Trehalose kodiert, von $E\sigma^S$ abhängig. Ebenso die Expression der cytoplasmatischen (TreF) und periplasmatischen (TreA) Trehalase, die den Abbau von Trehalose nach Beendigung des hyperosmotischen Stresses vermitteln (Boos *et al*., 1990; Hengge-Aronis *et al*., 1991; Strøm und Kaasen, 1993). Weitere hyperosmotisch aktivierte, $E\sigma^S$-kontrollierte Gene sind beispielsweise *osmY*, das für ein periplasmatischen Protein kodiert, das Osmotoleranz vermittelt (Lange *et al*., 1993; Weichart *et al*., 1993; Yim und Villarejo, 1992). *OsmF* (*yehZ*), das für einen ABC Transporter für die Aufnahme einer (unbekannten) Osmoschutzsubstanz kodiert (Checroun und Gutierrez, 2004). Auch unter hypoosmotischen Stressbedingungen ist $E\sigma^S$ aktiv und kontrolliert die Expression von mechanosensitiven Kanälen, die den Efflux von Elektrolyten aus der Zelle in Antwort auf einen zu hohen Turgor unter solchen Bedingungen vermitteln (Stokes *et al*., 2003).

2.3.1.3 RpoS und die Säurestressantwort

RpoS ist auch ein Masterregulator der Säurestressantwort, die Bakterienzellen Resistenz gegenüber niedrigen (pH 4.5-5.5) und extrem niedrigen (pH < 3) pH-Werten verleiht (Review: Foster, 2004) und wird dementsprechend bei niedrigen pH-Werten induziert (Bearson *et al*., 1996; Heuveling *et al*., 2008). Die Transkription der Säurestress-Resistenzgene *gadX*, *gadW*, *gadY* (siehe 2.2.1) und *gadE* ist direkt von $E\sigma^S$ abhängig (Weber *et al*., 2005). GadX ist ein AraC-ähnlicher Transkriptionsfaktor, der in einem positiven Feedback-Loop die $E\sigma^S$-vermittelte Transkription von *gadE* und *gadY* aktiviert (Opdyke *et al*., 2004; Tramonti *et al*., 2002, 2006 und 2008; Weber *et al*., 2005). GadW ist ein GadX Paralog und ein dualer Regulator, der je nach Bedingung als Aktivator oder Repressor fungieren kann (Ma *et al*., 2002). Der LuxR-ähnliche Regulator GadE reguliert schließlich die

Kerngene der Säurestressantwort, einschließlich *gadA*, *gadBC*, *hdeAB* und *hdeD*, die für den phänotypischen Output verantwortlich sind und deren Transkription von der vegetativen $E\sigma^{70}$-RNAP vermittelt wird (Foster, 2004; Ma *et al*., 2003; Weber *et al*., 2005). Die beiden nahezu identischen Isoenzyme GadA und GadB kodieren für Pyridoxalphosphat-abhängige Glutamat-Decarboxylasen, die ein pH-Aktivitätsoptimum im sauren Bereich aufweisen. Durch die Decarboxylierung von Glutamat zur γ-Aminobuttersäure (GABA) werden Protonen verbraucht, wodurch der intrazelluläre pH-Wert wieder ansteigt. Intrazellulär generiertes GABA wird schließlich durch den Antiporter GadC mit Glutamat aus dem extrazellulären Medium ausgetauscht (Foster, 2004; Hersh *et al*., 1996; Smith *et al*., 1992). HdeA und HdeB sind periplasmatische Chaperone, die bei niedrigem pH-Wert aktiviert werden und die Rückfaltung von unter sauren Bedingungen denaturierten Proteinen unterstützen (Hong *et al*., 2005; Kern *et al*., 2007; Malki *et al*., 2008).

HdeD ist ein Membranprotein, das Resistenz gegenüber Säurestress bei hohen Zelldichten vermittelt (Mates *et al*., 2007). Neben den Kerngenen der Säurestressantwort trägt auch das $E\sigma^{S}$-abhängige *cfa* Gen, das für eine Cyclopropanfettsäure-Synthethase kodiert, zur Säureresistenz bei (Chang und Cronan, 1999; Eichel *et al*., 1999). Eine Cyclopropan-Modifizierung der Phospholipide in der Zellmembran trägt entscheidend zur Fitness von Bakterien unter extremen pH-Bedingungen bei. Schließlich kann das $E\sigma^{S}$- und auch Säure-induzierte DNA-Schutzprotein Dps die DNA vor zu starker Protonierung schützen (Choi *et al*., 2000).

2.3.2 Regulation der zellulären RpoS-Menge und der RpoS-Aktivität

2.3.2.1 Regulation der *rpoS* Transkription

Das *rpoS* Gen ist das zweite Gen innerhalb eines Operons mit dem *nlpD* Gen, welches für ein Lipoprotein unbekannter Funktion kodiert (Lange und Hengge-Aronis, 1994b). Die *rpoS* Transkription wird von drei verschiedenen $E\sigma^{70}$-abhängigen Promotoren aus vermittelt. Von den benachbarten Promotoren $nlpD_{p1+p2}$ aus, stromaufwärts des *nlpD* Gens lokalisiert, wird eine bicistronische mRNA erzeugt, die zur Basalexpression von *rpoS* unter exponentiellem Wachstum beiträgt (Lange und Hengge-Aronis, 1994b). Der primäre Promotor aber, der für die graduelle Induktion der *rpoS* mRNA ab der späten postexponentiellen Wachstumsphase und beim Übergang in die stationäre Phase verantwortlich ist, ist $rpoS_{p1}$. Der Wachstumsraten-regulierte $rpoS_{p1}$ Promotor ist innerhalb des *nlpD* Strukturgens lokalisiert und erzeugt eine monocistronische *rpoS* mRNA mit einer 567 Nukleotide langen 5´-UTR (Lange *et al*., 1995; Takayanagi *et al*., 1994).

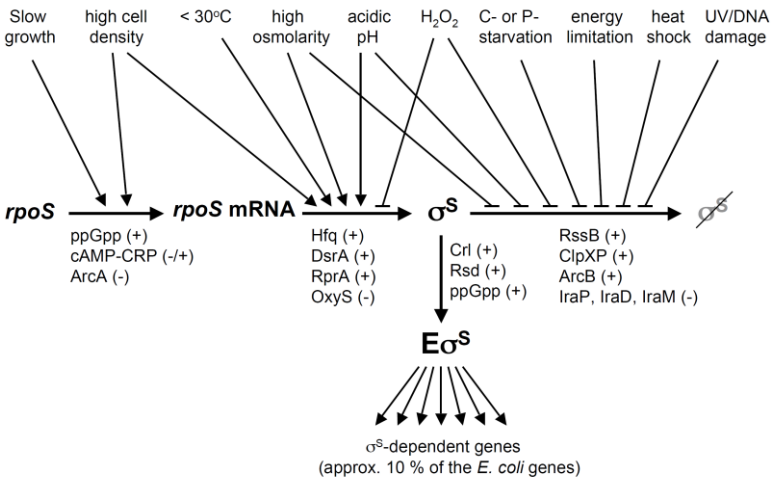


Abbildung 2.4: Verschiedene Stressbedingungen beeinflussen die zellulären RpoS-Mengen auf verschiedenen Regulationsebenen (aus Hengge, 2011).

Zwei verschiedene Transkriptionsfaktoren, cAMP-CRP und der Response-Regulator ArcA sind an der direkten transkriptionalen Regulation von *rpoS* beteiligt (Mika und Hengge, 2005). cAMP-CRP übt eine duale, sowohl positive als auch negative, Funktion bei der Regulation der *rpoS* Transkription, je nach Wachstumsbedingung, aus (Lange und Hengge-Aronis, 1991b und 1994a; McCann *et al*., 1993). Über einen kanonischen Klasse I–Aktivierungsmechanismus, durch direkte Bindung an $rpoS_{p1}$ an Position -61.5 stimuliert cAMP-CRP die *rpoS* Transkription während der späten postexponentiellen Wachstumsphase (Mika und Hengge, 2005). Ein indirekter, von Bindestellen innerhalb von $rpoS_{p1}$ unabhängiger, negativer Effekt von cAMP-CRP auf die *rpoS* Transkription lässt sich in der exponentiellen und frühen postexponentiellen Wachstumsphase beobachten (Lange und Hengge-Aronis, 1991b und 1994a). Der von seiner Sensorkinase ArcB aktivierte (phosphorylierte) Response-Regulator ArcA inhibiert die *rpoS* Transkription über einen Anti-Aktivierungsmechanismus, indem er als direkter Repressor an Position -62 innerhalb von $rpoS_{p1}$ bindet. Diese Bindestelle überlappt mit der kanonischen Klasse I-Aktivierungsbindestelle von cAMP-CRP (Mika und Hengge, 2005).

Der Masterregulator der Stringenten Kontrolle, das Effektornukleotid und Stressalarmon ppGpp beeinflusst die *rpoS* Transkription positiv, sowohl auf Ebene der Initiation, aber auch auf Transkriptionselogationsebene (Gentry *et al*., 1993; Hirsch und Elliott, 2002; Lange *et al*., 1995). ppGpp akkumuliert invers zur Wachstumsrate und unter verschiedenen Stressbedingungen, vor allen unter Aminosäuremangel, durch die Aktivität der beiden ppGpp-synthetisierenden Enzyme RelA und SpoT (Magnusson *et al*., 2005). *RelA spoT* Mutanten zeigen stark reduzierte *rpoS* mRNA Mengen unter allen Bedingungen (Gentry *et al*., 1999; Hirsch und Elliott, 2002; Lange *et al*., 1995). Zelluläre Mengen von ppGpp und σ^S korrelieren über einen weiten Bereich (Teich *et al*., 1999). Darüber hinaus beeinflusst ppGpp auch positiv die Akkumulation von Polyphosphat, welches seinerseits die *rpoS* Transkription stimulieren kann (Shiba *et al*., 1997). Daneben spielt ppGpp auch eine Rolle bei

der Regulation der RpoS-Proteolyse (Bougdour und Gottesman 2007) und RpoS-Aktivität (Jishage *et al*., 2002) (siehe auch 2.3.2.4 und 2.3.2.5).

Schließlich spielt das BarA/UvrY Zweikomponenten-System eine positive Funktion bei der *rpoS* Transkription in der exponentiellen Wachstumsphase, zumal der Response-regulator UvrY direkt an $rpoS_{p1}$ zu binden scheint (Hengge, 2008; Mukhopadhyay *et al*., 2000).

2.3.2.2 Regulation des *rpoS* mRNA Abbaus

Entsprechend ihrem schnellen Wachstum weisen die mRNAs in Bakterien Halbwertszeiten auf, die je nach Temperatur und anderen Bedingungen im Bereich einiger weniger Minuten angesiedelt sind (Bernstein *et al*., 2002; Selinger *et al*., 2003), bei 37°C sogar im Durchschnitt bei lediglich 1.3 Minuten (Arraiano *et al*., 2010). Der schnelle mRNA Abbau kann zur schnellen Anpassung von Bakterien an sich ändernde Umwelteinflüsse und damit zur posttranskriptionalen Kontrolle der Genexpression beitragen (Arraiano *et al*., 2010). In *E. coli* sind bisher mehr als 20 verschiedene RNasen identifiziert worden, die die Degradation, Prozessierung und Qualitätskontrolle von RNAs vermitteln. RNasen werden in zwei unterschiedliche Klassen eingeteilt: in Endonukleasen die die RNAs intern schneiden, und Exonukleasen, die RNAs von einem ihrer Enden her degradieren (Arraiano *et al*., 2010). In *E. coli* sind neben Endonukleasen bisher nur Exonukleasen beschrieben worden, die RNAs vom 3´-Ende her abbauen. Die Zugänglichkeit von RNase-sensitiven Positionen in einer RNA kann von Sequenzen/Strukturen innerhalb der RNA, der Anwesenheit von aktiv translatierenden (und damit protektierenden) Ribosomen, dem Status der Polyadenylierung (die anders als in Eukaryoten den Abbau stimuliert), sowie von in *trans* agierenden Faktoren (z.B. Hfq oder RNA-Helikasen) sowohl positiv, als auch negativ beeinflusst werden (Arraiano *et al*., 2010). Der initiale Schritt beim Abbau der meisten *E. coli* mRNAs wird von RNase E vermittelt, die polyribosomale mRNAs durch endoribonukleolytische Spaltung inaktiviert und zu kürzeren Fragmenten abbaut, welche dann durch die Aktivität von Exoribonukleasen und mit Hilfe der RNA-Helikase RhlB und der Poly(A)-Polymerase (PAP) weiter bis hin zu Ribonukleotiden abgebaut werden (Carpousis, 2007).

Die primäre degradative Endonuklease in *E. coli* ist RNase E, die neben dem Abbau von mRNAs in die Prozessierung der 5S rRNA (Misra und Apirion, 1979), 16S rRNA (Li *et al*., 1999), tRNAs (Ow und Kushner, 2002), transfer mRNAs (tmRNA) (Lin-Chao *et al*., 1999), der RNA-Komponente der RNase P (Lundberg und Altman, 1995; Ko *et al*., 2008) und den Abbau von sRNA/mRNA Paaren (siehe 2.2.2) involviert ist. RNase E ist ein großes, aus 1061 Aminosäuren bestehendes, vom *rne* Gen kodiertes, essentielles Enzym. Es besteht aus einer katalytischen N-terminalen Domäne und einer unstrukturierteren C-terminalen Domäne, welche sowohl für die Bindung des Enzyms an die innere Cytoplasmamembran und die Bindung von RNA verantwortlich ist und als Assemblierungsplattform für das RNA-

Degradosom, einem Proteinkomplex der den mRNA Abbau vermittelt, fungiert (Arraiano *et al*., 2010; Carpousis, 2007). RNase E ist eine einzelstrangspezifische Endonuklease mit einer Präferenz für AU-reiche Sequenzen (Mackie, 1992; McDowall *et al*., 1995) und einem 5´-monophoshoryliertem Transkriptende (Mackie, 1998). Innerhalb des Degradosomes ist RNase E als Homotetramer aktiv. Das Degradosom, ein großer Multiproteinkomplex der die generelle RNA-Degradationsmaschinerie darstellt, setzt sich neben RNase E aus der phosphorylytischen Exonuklease Polynukleotid-Phoshorylase (PNPase), der glykolytischen Enolase und der DEAD-Box ATP-abhängigen RNA-Helikase RhlB zusammen (Carpousis, 2007). Andere Co-Faktoren, die je nach Stressbedingung mit dem Degradosom assoziiert sind, sind beispielsweise die Poly(A)-Polymerase und andere DEAD-Box-Helikasen wie das Kälteschockprotein CsdA (siehe auch 2.2.2.2) (Carpousis, 2007). Eine weitere wichtige Exonuklease ist RNase II, die in *E. coli* die primäre degradative Exonuklease darstellt (Arraiano *et al*., 2010). RNase II bindet sequenzunabhängig RNA und ist an den terminalen Schritten des mRNA Abbaus beteiligt (Deutscher und Reuven, 1991).

Eine weitere wichtige, aber nicht essentielle Endonuklease ist die doppelstrangspezifische Endonuklease RNase III, die neben dem Abbau von mRNAs (Condon und Putzer, 2002; Calin-Jageman und Nicholson, 2003) und sRNAs wie MicA (Viegas *et al*., 2007) an der Prozessierung der 16S und 23 S rRNAs aus einem 30S rRNA Vorläufer beteiligt sind (Babitzke *et al*., 1993). Weiterhin ist RNase III auch in die Degradation von mRNA/sRNA Duplexen während der translationalen Repression involviert (siehe 2.2.2). Bei der Substratselektivität spielt eine Kombination aus sowohl strukturellen Determinanten, als auch sequenziellen Elementen innerhalb des RNA-Substrats, eine entscheidende Rolle (Arraiano *et al*., 2010). Die *E. coli* RNase III repräsentiert den Prototypen eines Klasse I Mitgliedes der RNase III Familie (es existieren vier verschiedene Unterklassen). Die vom *rnc* Gen kodierte *E. coli* RNase III ist als 52 kDa Homodimer aktiv (Li und Nicholson, 1996), wobei jede Untereinheit aus einer N-terminalen Endonuclease-Domäne (NucD) und einer C-terminalen doppelsträngigen RNA (dsRNA) Bindedomäne (dsRBD) besteht (Blaszczyk *et al*., 2001). Innerhalb des RNase III Homodimeres katalysiert jede Untereinheit die Hydrolyse eines Stranges des RNA-Duplexes.

Mit einer Halbwertszeit einiger weniger Minuten ist die Abbaurate der *rpoS* mRNA mit denen anderer *E. coli* mRNAs vergleichbar. Die beiden primären Endonukleasen RNase E und RNase III beeinflussen auch den Abbau der *rpoS* mRNA. Mehrere Studien konnten zeigen, dass RNase III die *rpoS* mRNA Degradation in der exponentiellen und postexponentiellen Wachstumsphase vermittelt (Basineni *et al*., 2009; McCullen *et al*., 2010; Resch *et al*., 2008). Dabei schneidet RNase III offenbar im doppelsträngigen Stem-Loop-Bereich der 5´-UTR (bei den Basen -15/-94) stromaufwärts nahe dem AUG-Startcodon (Resch *et al*., 2008). Die Abwesenheit von RNase III in einer *rnc* Mutante führt zu einer drei- bis fünffachen Stabilisierung der *rpoS* mRNA (Basineni *et al*., 2009; McCullen *et al*., 2010;

Resch *et al*., 2008), einhergehend mit entsprechend erhöhter Akkumulation von σ^S-Protein. Weiterhin wird das *rpoS* Transkript in der stationären Wachstumsphase bis zu etwa zweifach destabilisiert (Basineni *et al*., 2009), was impliziert, dass Änderungen der *rpoS* mRNA Stabilität nicht zur RpoS-Akkumulation in der stationären Phase beitragen. Die Inaktivierung von RNase E führt hierbei zu einer sehr moderaten (etwa 1.5-fachen) Stabilisierung der *rpoS* mRNA zur Folge (Basineni *et al*., 2009). Desweiteren deuten neuere Daten darauf hin, dass das *rpoS* Transkript bei Abwesenheit von sRNAs, insbesondere DsrA, über einen einen RNase E-abhängigen Mechanismus degradiert wird (McCullen *et al*., 2010). Also schützt DsrA die *rpoS* mRNA vor dem RNase E-vermittelten Abbau, während die Sensitivität des *rpoS* Transkripts gegenüber RNase III von der An-oder Abwesenheit von sRNAs unbeeinflusst bleibt (McCullen *et al*., 2010). In Übereinstimmung damit zeigt sich, dass die Basenpaarung zwischen RprA und DsrA und *rpoS* in der 5´-UTR zu einer Akkumulation von *rpoS* Transkript und RpoS-Protein führen und Mutationen, welche die sRNA/*rpoS* mRNA-Basenpaarung aufheben zu einer Destabilisierung der *rpoS* mRNA führen (McCullen *et al*., 2010). Eine Erniedrigung der Temperatur führt im Allgemeinen zur einer Stabilisierung der meisten RNAs, aufgrund der niedrigeren Aktivität von RNasen und einer höheren Stabilität von RNA-Sekundärstrukturen (Goldenberg *et al*., 1996; Jäger *et al*., 2004; Madhugiri *et al*., 2010). Auch die *rpoS* mRNA wird dementsprechend bei niedrigeren Temperaturen (25°C gegenüber 37°C) stabilisiert, während höhere Temperaturen von 42°C bis 43.5°C (Hitzeschock) aber entgegen dem allgemeinen Trend zu einer zwei-bis dreifachen Stabilisierung der *rpoS* mRNA (im Vergleich zur Halbwertszeit bei 37°C) führen (Madhugiri *et al*., 2010; McCullen *et al*., 2010). Hitzschock hat also neben der bekannten Stabilisierung von RpoS-Protein (Muffler *et al*., 1997) auch eine Stabilisierung der *rpoS* mRNA zur Folge, was demonstriert, dass auch ein Stress zu einem positiven Signalinput auf Ebene der *rpoS* mRNA Stabilität beitragen kann. Weiterhin führt die Überexpression der Kälteschockproteine CspC und CspE zu einer Stabilisierung der *rpoS* mRNA, einhergehend mit einer Akkumulation von σ^S Protein (Phadtare und Inouye, 2001). Eine *cspE* Mutation verändert jedoch die *rpoS* mRNA Menge in der Zelle nicht (A. Possling und R. Hengge, unveröffentlichte Daten).

2.3.2.3 Regulation der *rpoS* Translation

Die Rolle von kleinen nichtkodierenden regulatorischen RNAs (sRNAs) und des RNA-Chaperons Hfq bei der Regulation der *rpoS* Translation wurde bereits ausführlich in Kapitel 2.2.2 behandelt. Bedingungen, welche die *rpoS* Translation schnell und stark stimulieren, sind hyperosmotischer Stress (Lange *et al*., 1993; Muffler *et al*., 1996b) und Säurestress (Bearson *et al*., 1996; Heuveling *et al*., 2008), ebenso das Erreichen einer bestimmten Zelldichte in der post-exponentiellen Phase (Lange und Hengge-Aronis, 1994a). Auch niedrige Temperaturen fördern die *rpoS* Translation, allerdings geschieht dies langsamer (Repoila *et al*., 2003; Sledjeski *et al*., 1996). Neben den sRNAs und Hfq existieren noch eine Reihe von weiteren

Faktoren, welche die *rpoS* Translation regulieren. Dazu zählen unter anderem die Nukleoid-assoziierten Proteine HU und H-NS. Das histonähnliche Proteine HU repräsentiert einen positiven Regulator der *rpoS* Translation in der postexponentiellen Wachstumsphase (Balandina *et al*., 2001). HU kann in zwei Wachstumsphasen-abhängigen Isoformen vorliegen, wobei zwei homologe α- und β-Untereinheiten in exponentiell wachsenden Zellen ein α_2-Homodimer und ein postexponentiell induziertes αβ-Heterodimer bilden (Claret und Rouvière-Yaniv, 1997). Vor allem letzteres bindet die *rpoS* mRNA im Bereich der Translationsinitiations-Region (TIR) *in vitro* (Balandina *et al*., 2001; Traulsen und Hengge, unveröffentlichte Daten). Mögicherweise stimuliert das HU αβ-Heterodimer die *rpoS* Translation, indem es die translationsinkompetente Sekundärstruktur in der 5´-UTR zu einer translationskompetenten umstrukturiert.

Im Gegensatz dazu ist der globale Regulator H-NS ein negativer Regulator der *rpoS* Translation (Barth *et al*., 1995; Yamashino *et al*., 1995; Zhou und Gottesman, 2006). Das kleine basische, in *E. coli* 15.6 kDa große, H-NS Protein bindet konformationsspezifisch an intrinsisch gekrümmte DNA und fungiert als ein Repressor von mehr als 100 Genen *in vivo* (Dorman, 2004). Eine *hns* Mutante zeigt eine stark erhöhte *rpoS* Translation und eine erhöhte Akkumulation von σ^S Protein, vor allem in der exponentiellen Wachstumsphase (Barth *et al*., 1995; Yamashino *et al*., 1995), aber auch eine starke Stabilisierung des σ^S Proteins, besonders in schnell wachsenden Zellen (Yamashino *et al*., 1995; Zhou und Gottesman, 2006) (siehe 2.3.2.4). *In vitro* bindet H-NS offenbar sowohl die *rpoS* mRNA, als auch die sRNA DsrA mit relativ niedriger Affinität und kann offenbar deren Degradation in einzelsträngigen Bereichen stimulieren (Brescia *et al*., 2004).

Daneben gibt es noch einige weitere Regulatoren, die die *rpoS* Translation indirekt beeinflussen. LeuO, ein LysR-ähnlicher Transkriptionsfaktor, inhibiert die *rpoS* Translation bei niedrigen Temperaturen indirekt über die Repression von DsrA (Klauck *et al*., 1997). Der LysR-ähnliche Regulator LrhA reprimiert die *rpoS* Translation in einer Hfq-abhängigen Weise, möglichweise über eine nicht identifizierte sRNA (Peterson *et al*., 2006). Das *rpoS* Translations-aktivierende Rcs-Phosphorelaysystem (siehe auch 2.2.2.2) hat dabei offenbar einen inhibierenden Einfluss auch die *lrhA* Transkription (Peterson *et al*., 2006). Weitere Faktoren, die die *rpoS* Translation negativ regulieren, sind die Lon-Protease bei niedrigen Temperaturen (Ranquet und Gottesmann, 2007), die Phosphotransferase-System Komponente EIIA(Glc) (Ueguchi *et al*., 2001), sowie hohe zelluläre Konzentrationen an UDP-Glukose (Böhringer *et al*., 1995), ein mögliches Signal für gute Nährstoffversorgung. Zusätzliche positive Modulatoren der *rpoS* Translation hingegen sind das SsrA-System (tmRNA) (Ranquet und Gottesman, 2007) und das DnaK Chaperon (Muffler *et al*., 1997; Rockabrand *et al*., 1995 und 1998). Die genauen zugrundeliegenden molekularen Mechanismen all dieser Faktoren sind meist noch ungeklärt.

2.3.2.4 Regulation der RpoS-Proteolyse

Schnell wachsende *E. coli* Zellen akkumulieren nur sehr wenig σ^S Protein, da es mit einer Halbwertszeit (je nach Wachstumsbedingung) von nur 1-5 Minuten sehr schnell abgebaut wird (Lange und Hengge-Aronis, 1994a; Takayanagi *et al*., 1994). Die unmittelbare Hemmung der RpoS-Proteolyse bei plötzlich auftretenden lebensbedrohlichen Stressen unter exponentiellem Wachstum ist der wichtigste Mechanismus, der zur Akkumulation von σ^S unter solchen Stressbedingungen führt (beschrieben unter 2.3; für eine detaillierte Beschreibung der Regulation der RpoS-Proteolyse, siehe Review: Hengge, 2009).

Für die σ^S-Degradation verantwortlich ist die ATP-abhängige ClpXP-Protease (Schweder *et al*., 1996). Anders als die meisten anderen ClpXP-Substrate benötigt RpoS den spezifischen Erkennungsfaktor (Targeting-Faktor) RssB (auch SprE genannt), der RpoS zur ClpXP-Protease eskortiert (siehe Abbildung 2.4) (Muffler *et al*., 1996c; Pratt und Silhavy, 1996; Zhou und Gottesman, 1998). RssB ist ein Response-Regulator mit einer N-terminalen, an D58 phosphorylierbaren, Receiverdomäne (Bouché *et al*., 1998) und anders als bei Response-Regulatoren üblich einer C-terminalen Outputdomäne ohne ein DNA-Bindemotiv (Hengge, 2008). Sowohl die N-terminale, als auch die C-terminalen Domäne sind essentiell für die Bindung an RpoS *in vitro* und dessen Abbau *in vivo* (Klauck *et al*., 2001). Die Phosphorylierung von RssB ist für eine effiziente RpoS-Proteolyse notwendig (Bouché *et al*., 1998; Klauck *et al*., 2001). Phosphoryliertes RssB bindet mit hoher Affinität an σ^S-K173, einem Teil des sogenannten Turnover-Elements in der α-Helix der Region 3.0 (auch Region 2.5 genannt) (Becker *et al*., 1999; Stüdemann *et al*., 2003, Zhou *et al*., 2001), dass auch an der Bindung von $E\sigma^S$ an C(-13) RpoS-abhängiger Promotoren involviert ist (siehe 2.3.1.1). Nach der Bindung von phosphoryliertem RssB an RpoS in einer 1:1 Stöchiometrie (Klauck *et al*., 2001), wird eine Konformationsänderung in σ^S induziert die bewirkt, dass die nahe dem N-Terminus lokalisierte ClpX-Bindestelle freigelegt wird (Stüdemann *et al*., 2003). Nach der Interaktion des binären σ^S-RssB-Komplexes mit dem $ClpX_6$-Chaperon (ein Mitglied der AAA+ ATPase-Familie) wird RpoS unter ATP-Hydrolyse durch $ClpX_6$ entfaltet und der proteolytischen Kammer, bestehend aus zwei heptameren Ringen aus $ClpP_{14}$, zugeführt und abgebaut. Da RssB nicht mit σ^S co-degradiert wird, spielt es eine katalytische Rolle (Klauck *et al*., 2001; Zhou *et al*., 2001).

Wie werden verschiedene Stresssignale in diesen Proteolysemechanismus integriert? Einen Regulationsansatz bietet die Phosphorylierung von RssB. Ein potenzieller Phosphorylgruppen-Donor für RssB ist zum einen Acetyl-Phosphat *in vitro* (Bouché *et al*., 1998; Zhou und Gottesman, 1998) und *in vivo* (Bouché *et al*., 1998; Peterson *et al*., 2004), zum anderen das ArcB/ArcA Zweikomponenten-System *in vivo* (Mika und Hengge, 2005), wobei die Hybrid-Histidin-Sensorkinase ArcB auch *in vitro* als Phosphatdonor für RssB fungieren kann (Mika und Hengge, 2005; Yamamoto *et al*., 2005). Der Einfluss der RssB-Phoshorylierung bei der Regulation des RpoS-Abbaus spielt vor allem beim Eintritt in die

stationäre Wachstumsphase, sowie unter anderen Nahrungsmangelsituationen eine Rolle, bei denen die Nährstoffe allmählich (langsam) aufgebraucht werden. Bestehendes phosphoryliertes RssB wird im katalytischen Zyklus nicht dephosphoryliert (C. Kanow-Scheel und R. Hengge, unveröffentlichte Daten), daher wirken sich Änderungen im Phosphorylierungsstatus eventuell nur auf neusynthetisiertes RssB aus. Unter solchen Nahrungsmangelbedingungen nehmen die intrazellulären Mengen an Acetyl-Phosphat ab (Klein *et al*., 2007; McCleary und Stock, 1994). Die ArcB-Kinaseaktivität (Autophosphorylierung) wird durch die Anwesenheit von oxidierten Chinonen in der Atmungskette inhibiert (Georgellis *et al*., 2001; Malpica *et al*., 2004 und 2006). Der Redoxstatus der Chinone wird nicht nur durch die Verfügbarkeit des Elektronenendakzeptors O_2 während aerober Atmung beeinflusst, sondern auch vom Elektronen-Input, welcher unter Nahrungsmangel reduziert wird. Nahrungsmangel stimuliert daher die Dephosphorylierung der Sensorkinase ArcB, was eine reduzierte Phosphorylierung von RssB durch ArcB zur Folge hat, wodurch σ^S stabilisiert wird. Das Arc-System koordiniert die RpoS-Proteolyse auch mit der *rpoS* Transkription (siehe 2.3.2.1) und der *rpoS* Translation (siehe 2.2.2.2).

Weiterhin kann die RpoS-Proteolyse auch inhibiert werden, ohne dass der Phosphorylierungssatus von RssB moduliert wird. Da RssB der geschwindigkeitsbestimmende Faktor für den σ^S-Abbau *in vivo* ist (Pruteanu und Hengge-Aronis, 2002) und das σ^S:RssB Verhältnis in nichtgestressten Zellen etwa 20:1 beträgt (Becker *et al*., 2000), kann eine plötzliche starke Zunahme in der σ^S-Synthese (z.B. unter Osmo-oder Säurestressbedingungen) dazu führen, dass die Proteolysemaschinerie austitriert wird. Somit kann die RpoS-Stabilisierung unter solchen Bedingungen eine passive, sekundäre Konsequenz der der gesteigerten RpoS-Synthese und des damit verbundenen Titrationseffektes sein. Ein homöostatischer negativer Feedback-Loop, indem die Transkription von *rssB* (vom *rssAB* Operon ausgehend) von $E\sigma^S$ abhängig ist, sorgt zudem dafür, dass geringe Änderungen in der RpoS-Expression durch Anpassung der RssB-Expression ausbalanciert werden und das 20:1 σ^S:RssB-Verhältnis aufrechterhalten wird (Pruteanu und Hengge-Aronis, 2002; Ruiz *et al*., 2001).

Desweiteren kann RssB durch antagonistische, stressspezifische kleine regulatorische Proteine sequestriert und inaktiviert werden. Drei solche Antagonisten, genannt Ira Proteine („inhibitor of RssB activity“), sind bisher identifiziert worden. Dazu zählt IraP, dass in ppGpp-abhängiger Weise bei Phosphatmangel in *E. coli* und über das Magnesiummangel wahrnehmende PhoQ/P-System im eng verwandten Enterobakterium *Salmonella enterica* induziert wird (Bougdour *et al*., 2006, 2007 und 2008; Tu *et al*., 2006). IraM, das unter Magnesiummangel in PhoQ/P-abhängiger Weise in *E. coli* induziert wird (Bougdour *et al*., 2008). Und schließlich das von den SOS- und OxyR-Systemen unabhängig, bei DNA-Schädigungen und durch H_2O_2 induzierte IraD-Protein (Bougdour *et al*., 2008; Merrikh *et al*., 2009). In diesem Zusammenhang wird auch diskutiert, ob H-NS, das als ein negativer

Regulator der σ^S-Stabilität (in einer *hns* Mutante ist RpoS etwa 10-fach stabiler) unabhängig von der Phosphorylierung von RssB wirkt, ein möglicher negativer Regulator von einem oder mehreren der σ^S-stabilisierenden Ira-Proteine ist (Zhou und Gottesmann, 2006). Ferner ist σ^S in Assoziation mit dem RNAP-Kernenzym vor dem RssB-abhängigen Abbau geschützt. Somit trägt jeder Faktor, der die RpoS-Aktivität stimuliert, d.h. die Sigmafaktorkompetition zugunsten von σ^S beeinflusst, zur Stabilisierung von RpoS bei (siehe 2.3.2.5).

2.3.2.5 Regulation der RpoS-Aktivität

E. coli Zellen enthalten limitierende Mengen an RNAP-Kernenzym, um die verschiedene Sigmafaktoren zur Holoenzymbildung miteinander konkurrieren (Grigorova *et al.*, 2006; Gruber und Gross, 2003). Beim Eintritt in die stationäre Wachstumsphase erreicht die σ^S-Akkumulation zwar ein Maximum, erreicht aber dennoch nur etwa ein Drittel der Menge des vegetativen Sigmafaktors σ^{70} unter den gleichen Bedingungen (Jishage *et al.*, 1996). Zudem weist σ^{70} unter allen Sigmafaktoren *in vitro* die höchste Affinität für das RNAP-Kernenzym auf, σ^S hingegen die niedrigste (Colland *et al.*, 2002; Maeda *et al.*, 2000). Trotz dieser augenscheinlichen Überlegenheit des vegetativen Sigmafaktors in der Kompetition um das RNAP-Kernenzym kann ein alternativer Sigmafaktor wie RpoS aktiv werden, da seine Assoziation mit dem RNAP-Kernenzym der Regulation unterliegt. Das Alarmon ppGpp und sein Hilfsfaktor DksA beeinflussen die Kompetition um das RNAP-Kernenzym, indem sie offenbar die Affinität von σ^{70} für das RNAP-Kernenzym in der stationären Wachstumsphase vermindern (Jishage *et al.*, 2002; Laurie *et al.*, 2003; Magnusson *et al.*, 2005). Das Rsd-Protein, ein Antisigmafaktor für σ^{70}, bindet beim Übergang in die stationäre Phase an σ^{70} und sequestriert eine Fraktion von diesem, wodurch sich die Sigmafaktorkompetition zugunsten von RpoS verbessern kann (Ilag *et al.*, 2004; Jishage und Ishihama, 1998; Piper *et al.*, 2009). In ähnlicher Weise wirkt die 6S RNA (siehe 2.2.3.1) (Wassarman und Storz, 2000). Während die bisher erläuterten Faktoren die Sigmafaktorkompetition zugunsten alternativer Sigmafaktoren im Allgemeinen beeinflussen, fördert das Crl-Protein aktiv und spezifisch die Bildung des σ^S-haltigen RNAP-Holoenzyms ($E\sigma^S$) beim Eintritt in die stationäre Wachstumsphase (Typas *et al.*, 2007a). Schließlich können auch K^+-Ionen, wie sie unter hyperosmotischem Stress verstärkt akkumuliert werden, zur Sigmafaktorkompetition zugunsten von RpoS beitragen (siehe 2.3.1.2).

2.4 Codon-Usage und der Einfluss von raren Codons auf die Genexpression

Der konservierte universelle genetische Code determiniert, welche der 61 verschiedenen Basentriplets oder Codons in welche der 20 verschiedenen proteinogenen Aminosäuren translatiert wird (drei weitere Codons kodieren für Terminationssignale bei der Translation). Da mehr Codons als proteinogene Aminosäuren existieren, ist der genetische Code redundant

(oder auch degeneriert). Alle Aminosäuren, außer Methionin und Tryptophan, werden jeweils durch zwei bis sechs verschiedene Codons spezifiziert. Solche, als synonyme Codons bezeichnete Basentriplets unterscheiden sich gewöhnlich in einem Nukleotid in der dritten Position (bei einigen Aminosäuren auch in der zweiten Position). Auch wenn synonyme Codons die gleiche Aminosäure spezifizieren, so ist die Häufigkeit, mit der sie auftreten zwischen den meisten Organismen unterschiedlich. Ein Phänomen, das als Codon-Usage, oder auch Codon-Bias bezeichnet wird. Dies bedeutet, dass die Identität eines häufigen oder eines raren Codons für eine Aminosäure von Organismus zu Organismus (also von Genom zu Genom) verschieden, jedoch innerhalb eines Genoms im Allgemeinen konsistent ist (Gouy und Gautier, 1982; Grantham *et al*., 1980; Ikemura, 1985). In einigen wenigen Organismen ist die Codon-Bias eher schwächer ausgeprägt, d.h. verschiedene synonyme Codons werden mit ähnlicher Häufigkeit genutzt (Hershberg und Petrov, 2008). Die Codonpräferenz korreliert unmittelbar mit der Zusammensetzung des Pools an transfer RNAs (tRNAs) einer Zelle, d.h abundante tRNAs dekodieren häufigere Codons, seltener vorkommende tRNA Spezies hingegen rare Codons (Ikemura, 1981 und 1985). Die Zusammensetzung des tRNA Pools in *E. coli* hängt dabei nicht nur von der Kopienzahl der jeweiligen tRNA Spezies ab, sondern kann auch mit der Wachstumsrate variieren (Dong *et al*., 1996; Emilsson und Kurland, 1990; Emilsson *et al*., 1993; Rowley *et al*., 1993).

Als Ursache der Codon-Bias werden verschiedene Aspekte der Evolution diskutiert (Ermolaeva, 2001; Hershberg und Petrov, 2008; Smith und Eyre-Walker, 2001). Populationsgenetische Studien haben ergeben, dass synonyme Codons im Allgemeinen einer eher schwachen Selektion unterliegen und die Codon-Bias durch eine Kombination aus Selektion, Mutation und genetischer Drift aufrechterhalten wird. Das gegenwärtig akzeptierte Modell ist das Mutations-Selektions-Drift-Gleichgewichtsmodell (auch „major codon preference“ Modell) (Bulmer, 1991). Dieses Modell postuliert, dass eine gewisse Selektion zugunsten von häufigeren Codons gegenüber selteneren Codons stattfindet, aber Mutationsdruck und genetische Drift dafür sorgen, dass rare Codons in den Genomen persistieren. Die treibende Kraft für die Selektion ist hierbei die mit häufigeren Codons einhergehende höhere Effizienz und Genauigkeit der Translation. Nichtzufälliger Mutationsdruck trägt insofern zur Codon-Bias bei, indem einige Codons einer höheren Mutationsrate unterliegen als andere. Ein offenbar entscheidender Parameter ist hierbei der genomische GC-Gehalt eines Organismus (Chen *et al*., 2004; Knight *et al*., 2001). So verwenden Spezies, die einen hohen genomischen GC-Gehalt aufweisen, häufiger mit auf G oder C endende Codons als solche, die einen niedrigen GC-Gehalt aufweisen. Weiterhin korreliert die Codon-Bias generell mit dem Expressionsniveau von Genen, wobei Gene mit vermehrt häufigeren Codons tendenziell stärker exprimiert werden als solche, in denen verstärkt weniger häufige auftreten (Gouy und Gautier, 1982; Ikemura, 1985; Karlin *et al*., 1998). Diese überwiegende Korrelation zeigen auch Untersuchungen, die auf umfangreichen Genexpressionsdaten des gesamten *E. coli* Genoms (Microarrays) basieren (dos Reis *et al*.,

2003; Goetz und Fuglsang, 2005). Selektion kann möglicherweise in einigen Fällen auch in die entgegengesetzte Richtung zugunsten von raren Codons stattfinden, wie einige Beipsiele in *E. coli* und *Drosophila melanogaster* demonstrieren (DuMont *et al*., 2004; Konigsberg und Godson, 1983; Nielsen *et al*., 2007). Dies impliziert, dass in manchen Fällen auch ein anderer Selektionsdruck als effiziente und genaue Translation auf die Codon-Usage einwirken kann, z.B. die Notwendigkeit (lokaler) translationaler Pausierungen der Ribosomen, zumal rare Codons nicht zufällig in Genen lokalisiert sind, sondern häufig in Clustern auftreten (Clarke IV und Clark, 2008).

Der Einfluss von raren Codons auf die Translation beruht im Wesentlichen darauf, dass diese lokale Minima in der Geschwindigkeit der translatierenden Ribosomen verursachen. Solche, durch rare Codons verursachten lokalen Pausierungen der Ribosomen können für die korrekte co-translationale Faltung eines Proteins von großer Bedeutung sein (Komar, 2009; Marin, 2008; Zhang *et al*., 2009; Zhang und Ignatova 2011). So können z.B. synonyme Austausche von raren Codon durch häufigere, oder die Überexpression der entsprechenden raren tRNA Spezies für ein sekretorisches *E. coli* Protein zu dessen Fehlfaltung führen, wodurch dessen Sekretion ins Periplasma negativ beeinflusst wird (Zhang *et al*., 2009). Synonyme Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs), bei denen häufigere Codons und seltenere miteinander variiert werden, treten auch bei höheren Eukaryoten in ganz natürlicher Weise auf. Ein Beispiel hierfür sind membranale ABC-Transporter, die bei der Multidrug-Resistenz eine Rolle spielen. SNPs können hier zu alternativen Faltungswegen des Transportproteins führen, das dann verschiedene Substrat-Spezifitäten aufweist (Kimchi-Sarfaty *et al*., 2007; Tsai *et al*., 2008). Weiterhin zeigen *in silico* Studien, dass seltenere Codons gehäuft in den ersten 30-50 Codons eines ORFs auftreten und diese „Codon-Barriere“ (auch „ramp“) mit geringerer Effizienz translatiert wird (Fredrick und Ibba, 2010; Tuller *et al*., 2010). Diskutiert wird, dass die „ramp“ einen Mechanismus der späten Translationsinitiation darstellt und dafür sorgt, dass die hohe Ribosomendichte innerhalb der „ramp“ für einen optimaleren Ribosomenabstand stromabwärts während der Elongation sorgt und so „Verkehrsstaus“ vermieden werden. *In vivo* Daten, in welchen Ribosomendichte-Profile von mRNAs bestimmt wurden (basierend auf Deep-Sequenzierungsdaten von Ribosomen-protektierten mRNA Fragmenten), stützen die These der „ramp“ (Ingolia *et al*., 2009). Schließlich können an geclusterten raren Codons arretierte Ribosomen dafür sorgen, dass das tmRNA (SsrA) trans-Translations-System rekrutiert und aktiviert wird und eine entsprechende mRNA nachfolgend abgebaut und das unvollständig translatierte Polypeptid mittels SsrA-Tagging degradiert wird (Roche und Sauer, 1999).

Der Einfluss von raren Codons auf die Akkumulation und Stabilität von mRNAs kann sehr unterschiedlich und daher von Fall zu Fall verschieden sein. Für die *E. coli ompA* und *bla* Gene wurde gezeigt, dass die Anwesenheit von häufigen Codons direkt positiv mit der Halbwertszeit der entsprechenden mRNAs korreliert und der Austausch von häufigen durch

rare Codons in *ompA* dessen mRNA Abbaurate erhöht (Deana *et al*., 1996). Die Substitution seltenerer Codons im *bla* Gen durch häufigere geht dementsprechend mit einer Stabilisierung des *bla* Transkriptes einher (Deana *et al*., 1996). Ein Beispiel für eine Destabilisierung einer mRNA durch an raren Codons pausierten Ribosomen bietet auch die eukaryotische c-*myc* mRNA, die für einen Transkriptionsfaktor in Säugerzellen kodiert und dessen Mutation im Zusammenhang mit der Entstehung von Krebs diskutiert wird (Lemm *et al*., 2002). Aber auch gegensätzliche experimentelle Beobachtungen wurden gemacht. In *Saccharomyces cerevisiae* kann die Anwesenheit von konsekutiven raren Codons innerhalb einer mRNA (für Aminosäuren, die ausschließlich von einer seltenen tRNA spezifiziert werden) positiv mit deren Halbwertszeit korrelieren (Carlini, 2005). Interessanterweise kann auch eine Codon-Optimierung eines Gens für dessen heterologe Expression in *E. coli* oder *Streptomyces lividans* zum verstärkten mRNA Abbau führen (Lammertyn *et al*., 1996; Wu *et al*., 2004). Ein nahe dem 3´-Ende des *cat* Gens eingeführtes Cluster aus raren Codons führt zur Stabilisierung des *cat* Transkripts, einhergehend mit einer verstärkten Akkumulation von Protein (Gursky und Beabealashvilli, 1994).

2.5 Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit sollten verschiedene Aspekte der *rpoS* Translation und ihrer Regulation untersucht werden. Die beiden Sigmafaktoren RpoS und RpoD sind phylogenetisch eng miteinander verwandt. Vergleicht man die Sequenzen der beiden Sigmafaktoren, so wird deutlich, dass beide in *E. coli* zu 42% identisch sind. Trotz ihrer ausgeprägten Homologie auf der Ebene der Aminosäuresequenz fällt bei genauer Betrachtung der Nukleotid-Sequenz auf, dass innerhalb der *rpoS* Sequenz mehr als doppelt soviele rare Codons auftreten, wie innerhalb der *rpoD* Sequenz. Desweiteren handelt es sich dabei oft um rare *rpoS* Codons, die bei entsprechend konservierten Aminosäuren in der *rpoD* Sequenz durch häufigere Codons repräsentiert werden. Ziel dieser Arbeit war es zu klären, ob diese raren Aminosäurecodons alleine durch Mutationsdruck oder genetische Drift in *rpoS* persistieren, oder ob sie einem positiven Selektionsdruck unterliegen und ihnen möglicherweise eine regulatorische Funktion innewohnt. Hierzu sollte über eine *in vitro* Mutagenese eine *rpoS* Variante erzeugt werden, in der diese raren Codons durch die entsprechenden häufigeren *rpoD* Codons substituiert werden (im weiteren *rpoS* Codonmutante genannt). Nachfolgend wurden in *in vivo* Funktionsanalysen die Auswirkungen dieser „Codon-Optimierung“, sowohl im Kontext einer unter *tac* Promotorkontrolle stehenden Plasmid-basierten Codonmutante, als auch im physiologischen chromosomalen Kontext, untersucht. Dabei stellte sich entgegen der generellen Erwartungen heraus, dass die vermeintlich „optimierte“ *rpoS* Codonmutante im Vergleich zum *rpoS* Wildtyp sowohl reduzierte Transkript- als auch Proteinmengen aufweist. In nachfolgenden *in vivo* RpoS-Protein- und *rpoS* mRNA Abbaustudien mit Protease- bzw. Ribonuklease-

defizienten und entsprechenden isogenen Wildtyp-Stämmen sollte geklärt werden, auf welche Weise sich der positive Einfluss der raren Codons bei der σ^S-Expression auswirkt.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, neue sRNAs zu identifizieren, die an der translationalen Regulation von *rpoS* beteiligt sind. Die bereits bekannten sRNAs RprA und DsrA, welche die *rpoS* Translation stimulieren, schienen für die hyperosmotische und Säurestress-Induktion von σ^S nicht ausschließlich verantwortlich zu sein. Ebenso sind sie auch nicht an der gesteigerten *rpoS* Translation in einer *hns* Mutante beteiligt (Zhou und Gottesman, 2006). Zur Identifikation potenzieller unbekannter, an der *rpoS* Translation mitwirkender, sRNAs wurde eine Strategie gewählt, die auf der Deep-Sequenzierungsanalyse von mit Hfq co-immunopräzipitierter RNA basiert, mit hyperosmotischem Stress als RpoS-induzierende Modell-Stresssituation. Es wurde untersucht, ob solche potenziellen hyperosmotisch-induzierten sRNA Kandidaten in einer *hns* Mutante erhöhte Transkriptmengen aufweisen und somit auch sRNA Kandidaten für die gesteigerte *rpoS* Translation in H-NS-defizienten Zellen darstellen. Die Rolle dieser neuen sRNA Kandidaten bei der translationalen Regulation von σ^S sollte unter anderem durch Verwendung eines Vektor-basierten RpoS::GFP-Reportgensystems geklärt werden. Darüber hinaus sollten für die relevanten sRNAs Knockout-Mutanten generiert werden und der Einfluss der Mutationen auf die σ^S-Expression unter Osmo- und Säurestressbedingungen studiert werden. Weiterhin wurde untersucht, ob die Akkumulation und Halbwertszeit der *rpoS* mRNA *in vivo* der stressbedingten Regulation (hyperosmotischer Stress und Säurestress) unterliegen und ob sRNAs diese beeinflussen. Da sich während der Untersuchungen herauskristallisierte, dass offenbar auch die *rpoS* Transkription durch hyperosmotischen Stress beeinflusst wird, sollte geklärt werden, welche Regulationsebene hierbei betroffen ist.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Materialien und Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Materialien und Chemikalien wurden von den folgenden Herstellern bezogen: Amersham Bioscience Europe (Freiburg), AppliChem (Darmstadt), BioRad (München), Biozym (Hess. Oldendorf), Boehringer- Mannheim (Mannheim), Fluka (Neu-Ulm), Greiner Bio-One (Frickenhausen), Merck (Darmstadt), Millipore (Schwalbach), NeoLab (Heidelberg), New England Biolabs (NEB, Frankfurt am Main), Perkin-Elmer (USA), Promega (Mannheim), Roboklon (Berlin), Riedel de Haen (Selze), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Qiagen (Hilden) und VWR International (Darmstadt). Medienzusätze stammen von der Firma Difco Laboratories (Augsburg). Angaben zu Materialien und Chemikalien, die nicht in der nachfolgenden Tabelle gelistet sind, finden sich in den entsprechenden Anschnitten im Methodenteil.

Tabelle 3.1 Verzeichnis der verwendeten Chemikalien und Materialien mit Bezugsquelle

Produkt	Hersteller
Acrylamid-Bisacrylamid	Roth
Agarose	Biozym
Antibiotika	Sigma-Aldrich
APS	Roth
BCIP	Roth
Blotmembranen für Proteine (Roti-PVDF)	Roth
Blotmembranen für Proteine (Immobilon-FL) (bei Fluoreszenz-Immunodetektion)	Millipore
Blotmembranen für RNA (Nylonmembranen)	Roche
Bromphenolblau	Roth
DEPC	Roth
DNA-Längenmarker 100 bp; 100 bp extended	Roth
DNA-Polymerasen (Vent, Opti-Taq, Phusion)	NEB, Eurex (Polen), Biozym
dNTP / dig-markierte dNTP-Stammlösung	Qbiogene (Heidelberg), Roche
Elektroporationsapparatur	BioRad
ELISA-Reader (Modell 550)	BioRad
Fotopapier für Geldokumentationsanlage	SEIKO Precision (Hamburg)

Produkt	Hersteller
Geldokumentationsanlage	Alpha Innotech (USA)
Gelelektrophoreseanlagen	Peqlab (Erlangen), BioRad
Image Phosphor-Platten (Screens)	Fuji Photo Film (Japan)
IPTG	Roth
L-[35S]-Methionin	Amersham Bioscience
Methylenblau	Roth
NanoDrop 2000	Peqlab (Erlangen)
NBT	Appli-Chem
Oligonukleotide	Metabion (Martinsried)
ONPG	Serva
PCR-Geräte (Thermocycler)	MWG Biotech (Ebersberg)
PhosphoImager (FLA-2000G)	Fuji Photo Film (Japan)
Plasmidpräparationskits	Qiagen, Analytik Jena
polyklonales anti-RpoS Serum	Pineda (Berlin)
primäre monoklonale Antikörper (anti-Dig, anti-FLAG anti-GFP)	Roche, Sigma-Aldrich
Proteingrößenstandard	NEB
QIAquick Gel Extraction Kit/ PCR Purification Kit	Qiagen
Restriktionsenzyme	NEB
Sekundäre Antikörper	Dianova Immundiagnostik (Hamburg), Sigma-Aldrich
T4-DNA-Ligase	NEB
Temed	Roth
X-Gal	Appli-Chem
Xylencyanol	Roth

3.2 Bakterienstämme, Bakteriophagen und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme, Bakteriophagen und Plasmide sind im Folgenden tabellarisch aufgelistet.

Tabelle 3.2 Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Referenz
AP252	W3110 *dsrA*::kan	Laborsammlung (A. Possling)
AP254	W3110 *hfq*1::Ω (kan)	Laborsammlung (A.Possling)
BL321	*rnc-,nadB+, purI+*	Studier *et al*., 1975
BL322	*rnc+,nadB+, purI+*	Studier *et al*., 1975
FI1202	W3110 LacIq *lac*L8 *glnG*::Tn*5* λ202	Fiedler und Weiss, 1995
ER2566	F-λ-fhuA2[lon]ompTlacZ::T7gene1gal sulA11Δ(mcrC-mrr)114::IS10R(mcr-73::miniTn10-TetS)2R(zgb-210::Tn10)(TetS) endA1 [dcm]	NEB
GB1000	W3110Δ*lacI-A*::scar	Laborsammlung
MC4100	*E.coli* K12 F-*araD*139 Δ(*argF-lacU*) 169 *deoC flbB*5301 *relA*1 *rpsL*150 *ptsF*25 *rbsR*	Silhavy *et al.*, 1984
MG1655	*F-, λ-, ilvG-, rfb-50, rph-1*	Blattner *et al*., 1997
N3431	*lacZ43, relA1, spoT1, thi-1, rne-3071 (ts)*	Goldblum und Apririon, 1981
N3433	*lacZ43, relA1, spoT1, thi-1*	Goldblum und Apririon, 1981
TK11	W3110ΔlacU169 *rpoS*::kan	diese Arbeit
TK12	W3110ΔlacU169 [λRS45:*glyWleuZ*::*lacZ*]	diese Arbeit
TK13	W3110ΔlacU169 [λRS45:*glyU*::*lacZ*]	diese Arbeit
TK14	W3110ΔlacU169 [λRS45:*thrUglyT*::*lacZ*]	diese Arbeit
TK15	TK12 *rpoS*::kan	diese Arbeit
TK16	TK13 *rpoS*::kan	diese Arbeit
TK17	TK14 *rpoS*::kan	diese Arbeit
TK18	W3110ΔlacU169 [λRS45:*argXproM*::*lacZ*]	diese Arbeit
TK19	W3110ΔlacU169 [λRS45:*serVargVYZQ*::*lacZ*]	diese Arbeit
TK20	W3110ΔlacU169 [λRS45:*glyVXY*::*lacZ*]	diese Arbeit
TK21	W3110ΔlacU169 [λRS45:*proK*::*lacZ*]	diese Arbeit
TK22	TK18 *rpoS*::kan	diese Arbeit
TK23	TK19 *rpoS*::kan	diese Arbeit
TK24	TK20 *rpoS*::kan	diese Arbeit
TK25	TK21 *rpoS*::kan	diese Arbeit
TK34	TK11 *clpP*::cat	diese Arbeit
TK35	TK11 *lon*::scar	diese Arbeit
TK58	TK11 *lon*::scar *rssB*::cat	diese Arbeit
TK59	TK11 Δ*clpXPlon*::cat	diese Arbeit
TK60	GB1000 *rpoS*::Tn10	diese Arbeit
TK62	GB1000 *hfq*::FLAG::kan	diese Arbeit
TK70	N3431 *rne-3071 (ts) rpoS*::Tn10	diese Arbeit

TK71	N4333 *rne*+ *rpoS*::Tn10	diese Arbeit
TK72	BL321 *rnc*- *rpoS*::Tn10	diese Arbeit
TK73	BL322 *rnc*+ *rpoS*::Tn10	diese Arbeit
TK81	W3110 *rpoS*^{Codonmutante}	diese Arbeit
TK82	GB1000 *hns*::Tn10	diese Arbeit
TK86	W3110 *rprA*::kan	diese Arbeit
TK88	W3110 *rprA*::scar	diese Arbeit
TK92	W3110 *rprA*::scar *dsrA*1::cat *arcZ*::kan	diese Arbeit
TK93	W3110 *arcZ*::kan	diese Arbeit
TK100	W3110 *omrAB*::kan	diese Arbeit
TK108	W3110 *dsrA1*::cat	diese Arbeit
TK123	W3110 *hns*::Tn10	diese Arbeit
TK124	W3110 *hns*::Tn10 *dsrA*1::cat	diese Arbeit
W3110	*thyA36 deoC2 IN(rrnD-rrnE)I*	Hayashi *et al.*, 2006
W3110ΔlacU169	W3110Δ(*argF-lacU*)169 *zaj-3053*::Tn*10*	Nichols *et al.*, 1998 Peters *et al.*, 2003

Tabelle 3.3: Bakteriophagen

Lysat	Referenz
λRS45	Simons *et al.*, 1987
$P1_{vir}$	Laborsammlung
P1 (W3110 *arcZ*::kan)	diese Arbeit
P1 (MC4100 *clpP*::cat)	Maurizi *et al.*, 1990
P1 (MC4100 Δ*clpXPlon*::cat)	Laborsammlung
P1 (MC4100 *dsrA*1::cat)	Sledjeski und Gottesman, 1995
P1 (W3110 *dsrA*::kan)	Laborsammlung (A. Possling)
P1 (MC4100 *hfq*1::Ω)	Muffler *et al.*, 1996a
P1 (W3110 *hfq*::FLAG::kan)	diese Arbeit
P1 (MC4100 *hns*205::Tn10)	Dersch *et al.*, 1993
P1 (MC4100 *lon*::Tn10)	Maurizi *et al.*, 1985
P1 (W3110 *omrAB*::kan)	diese Arbeit
P1 (W3110 *rpoS*::*ccdB*::kan)	diese Arbeit
P1 (MC4100 *rpoS*::kan)	Bohannon *et al.*, 1991
P1 (MC4100 *rpoS*359::Tn10)	Lange und Hengge-Aronis, 1991a
P1 (MC4100 *rprA*::kan)	Pruteanu, M. Dissertation, FU Berlin, 2003
P1 (MC4100 *rssB*::cat)	Muffler *et al.*, 1996c

Tabelle 3.4 Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pArcZ	pZE12-Derivat mit *arcZ* Gen (Amp^R)	diese Arbeit
pCAB6	transkriptionaler *lacZ*-Fusionsvektor (Amp^R)	Barembruch und Hengge, 2007
pCP20	FLP-Helferplasmid (temperatursensitive Replikation,temperaturinduzierbare FLP- Synthese, Amp^R, Cm^R)	Datsenko und Wanner, 2000
pGlmZ	pZE12-Derivat mit *glmZ* Gen (Amp^R)	diese Arbeit
pJV300	pZE12-Derivat, kodiert 50 Nt Nonsense RNA, Kontroll-Plasmid (Amp^R)	Urban und Vogel, 2007
pKD13	Template-Plasmid für Kan^R-Kassette (Amp^R, Kan^R)	Datsenko und Wanner, 2000
pKD45	Template-Plasmid für CcdB-Toxin-Kan^R-Kassette (Amp^R, Kan^R)	Datsenko und Wanner
pKD46	λ Red Helferplasmid (temperatursensitive, Replikation, Amp^R)	Datsenko und Wanner, 2000
pNusG N	pRH800-Derivat mit NusG-NTD	Laborsammlung (F. Mika)
pOmrA	pZE12-Derivat mit *omrA* Gen (Amp^R)	diese Arbeit
pOmrB	pZE12-Derivat mit *omrB* Gen (Amp^R)	diese Arbeit
pRH800	auf pBR322 basierender Klonierungsvektor mit induzierbarem *tac* Promotor (Amp^R)	Lange und Hengge-Aronis, 1994a
pRL40.1 =pRpoS(wt)	pRH800-Derivat, enthält die *rpoS* kodierende Sequenz ohne die 5´-UTR (Amp^R)	Lange und Hengge-Aronis, 1994a
pRpoS120::GFP	pXG-10 mit *rpoS* (-567 bis +120) (Cm^R)	diese Arbeit
pRpoS378::GFP	pXG-10 mit *rpoS* (-567 bis +378) (Cm^R)	diese Arbeit
pRpoS570::GFP	pXG-10 mit *rpoS* (-567 bis +570) (Cm^R)	diese Arbeit
pRpoS741::GFP	pXG-10 mit *rpoS* (-567 bis +741) (Cm^R)	diese Arbeit
pRprA	(=pJV100IA-T4) Hochkopienvektor mit *E.coli rprA* Gen unter Kontrolle von P_{LIacO} (Amp^R)	Urban und Vogel, 2007
pRyeB	pZE12-Derivat mit *ryeB* Gen (Amp^R)	Laborsammlung (Dr. C. Pesavento)
p6S	pZE12-Derivat mit *ssrS* Gen (Amp^R)	diese Arbeit
p6SY	pZE12-Derivat mit *ssrS* und *ygfA* Genen (Amp^R)	diese Arbeit diese Arbeit
pSgrS	pZE12-Derivat mit *sgrS* Gen (Amp^R)	diese Arbeit
pSUB11	Template-Plasmid für FLAG::Kan^R Kassette (3xFLAG-Epitop) (Kan^R)	Uzzau *et al*., 2001
pTK25-3 =pRpoS(codon mt)	pRL40.1-Derivat mit dem häufigen Codon Allel der punktmutierten *rpoS* Codonmutante	diese Arbeit

pTK26-1	pCAB6-Derivat, transkriptionale *argXproM*::lacZ-Fusion (–202 bis + 23) (Amp^R)	diese Arbeit
pTK27-3	pCAB6-Derivat, transkriptionale *glyWleuZ*::lacZ-Fusion (–406 bis + 20) (Amp^R)	diese Arbeit
pTK28-1	pCAB6-Derivat, transkriptionale *glyU*::lacZ-Fusion (–299 bis + 21) (Amp^R)	diese Arbeit
pTK29-1	pCAB6-Derivat, transkriptionale *serVargVYZQ*::lacZ-Fusion (–400 bis + 21) (Amp^R)	diese Arbeit
pTK30-1	pCAB6-Derivat, transkriptionale *proK*::lacZ-Fusion (–349 bis + 21) (Amp^R)	diese Arbeit
pTK31-1	pCAB6-Derivat, transkriptionale *thrUglyT*::lacZ-Fusion (–265 bis + 25) (Amp^R)	diese Arbeit
pTK32-3	pCAB6-Derivat, transkriptionale *glyVXY*::lacZ-Fusion (–387 bis + 20) (Amp^R)	diese Arbeit
pXG-1	Niederkopien-GFP-Kontrollvektor (pXG-10-Derivat) mit RBS und ATG zur Expression von Vollängen-GFP unter Kontrolle von P_{LtetO} (Cm^R)	Urban und Vogel, 2007
pXG-10	Niederkopien-GFP-Fusionsvektor zur Klonierung der *rpoS*::*gfp*-Fusionen unter der Kontrolle des konstitutiven P_{LtetO} Promotors (Cm^R)	Urban und Vogel, 2007
pZE12-*luc*	Hochkopienvektor zur Klonierung der sRNAs unter der Kontrolle eines konstitutiven $P_{LlacO-1}$ Promotors (Amp^R)	Urban und Vogel, 2007

3.3 Medien und Medienzusätze

3.3.1 Flüssigmedien

Als reiches Medium wurde Luria-Bertani-Medium (LB) nach Silhavy *et al*. (1984) und als Minimalmedium M9 (Miller, 1972) mit 0.1 % Glukose bzw. 0.4 % Glyzerin als Kohlenstoffquelle verwendet. Im Rahmen einer „One-Step"-Inaktivierung chromosomaler Gene und der „Two-Step"-Mutagenese wurden elektrokompetente Zellen in SOB-Medium hergestellt und nach der Elektroporation der PCR-Produkte in SOC-Medium (SOB-Medium supplementiert mit 20mM Glukose) kultiviert (Hanahan, 1983). Zur Herstellung des SOB-Mediums wurden 20g Bacto-Trypton, 5g Bacto-Hefeextrakt und 0.5 g NaCl in 950 ml Aqua dest. gelöst und anschließend 10 ml einer 250 mM KCl-Lösung hinzugegeben und der pH-Wert mit 10 M NaOH auf 7.0 eingestellt und danach das Volumen auf einen Liter aufgefüllt. Nach dem Autoklavieren wurden 10mM $MgCl_2$ (Endkonzentration) hinzugegeben. Medium für die Kultivierung von *Staphylococcus aureus* Cowan I-Zellen wurde nach Kessler (1975 und 1976) hergestellt.

3.3.2 Feste Medien

Zur Verfestigung von Medien wurden zu einem Liter Medium 15 g Agar gegeben, autoklaviert und je etwa 25 ml in eine sterile Petrischale gegossen.

3.3.3 Medienzusätze

Die in Tabelle 3.5 aufgelisteten Medienzusätze wurden in hochkonzentrierten (100-1000-fach) Stammlösungen angesetzt und in der benötigten Konzentration sowohl den Flüssig- als auch den Festmedien zugesetzt.

Tabelle 3.5: Medienzusätze und deren Konzentration

Medienzusatz	Lösungsmittel	Endkonzentration
Ampicillin	H_2O	100 µg/ml
Arabinose	H_2O	10 mM
Chloramphenicol	70% Ethanol	20 µg/ml
Glukose	H_2O	0.1 %
Glyzerin	H_2O	0.4 %
IPTG	H_2O	100 µM
Kanamycin	H_2O	50 µg/ml
Natriumcitrat	H_2O	20 mM
Rifampicin	DMSO	500 µg/ml
Spectinomycin	H_2O	1.5 mg/ml
Tetracyclin	70% Ethanol	5 µg/ml
X-Gal	DMF	30 µg/ml

3.4 Mikrobiologische Methoden

3.4.1 Sterilisation

Medien und Lösungen wurden bei einem Überdruck von 1 bar für 20 Minuten bei 120 °C feucht autoklaviert. Glaswaren wurden 8 Stunden bei 180 °C trocken sterilisiert. Hitzeempfindliche Lösungen wurden durch einen Millipore-Filter (Porendurchmesser 0.25 µm) sterilfiltriert.

3.4.2 Aufbewahrung von Bakterienstämmen

Für die langfristige Lagerung von Bakterienstämmen wurden 930 µl einer in LB-Medium angezogenen Übernachtkultur mit 70 µl DMSO versetzt (7% Endkonzentration) und in Kryoröhrchen bei -80 °C tiefgefroren. Für eine kurzfristige Lagerung von bis zu einer Woche wurden Bakterienstämme auf Agarplatten bei 4 °C aufbewahrt.

3.4.3 Wachstumsbedingungen

Bakterienstämme in Flüssigkulturen wurden in gut belüfteten Gefäßen (maximal 20 % Füllung) bei 30 °C, 37 °C oder 43 °C bei 250-300 rpm im Schüttelwasserbad (Infors), Reagenzglasroller oder Schütteltisch (Infors) kultiviert. Die Vermehrung der Bakterien auf Agarplatten erfolgte bei 28 °C, 37 °C oder 43 °C im Brutraum oder im Brutschrank.

3.4.4 Bestimmung der Zelldichte in Flüssigkulturen

Die Zelldichte in einer Flüssigkultur wurde durch Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 578 nm (OD_{578}) in Photometer (Pharmacia) bestimmt. Als Nullabgleich (Referenz) diente hierbei das bakterienfreie Medium. Zur Messung der OD_{578} wurden die Bakterienkulturen ab einer OD_{578} von 0.3 bzw. 3.0 1:10 bzw. 1:20 in Wachstumsmedium verdünnt und die entsprechenden Werte (Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors) umgerechnet.

3.4.5 Herstellung eines P1-Lysats

Zur Herstellung von P1-Lysaten wurden 5 ml LB-Medium 1:100 mit einer Übernachtkultur angeimpft und bei 37 °C bis zu einer OD_{578} von 0.3 im Reagenzglasroller kultiviert. Nach Zugabe von einem Tropfen (10 µl) 1 M $CaCl_2$ und 1-2 Tropfen Wildtyp $P1_{vir}$-Lysats (W3110) wurden die Phagen-infizierten Zellen für 3-8 h bei 37 °C bis zu deren Lyse (LB wird klarer und Zelltrümmer sichtbar) bei 37 °C inkubiert. Zum Abtöten aller Zellen wurden anschließend 5-10 Tropfen Chloroform hinzugegeben, gevortext und die Suspension für

weitere 10 Minuten bei 37 °C im Reagenzglasroller inkubiert. Zur Abtrennung der Zelltrümmer aus dem Überstand wurde die Suspension danach für 10 Minuten bei 4000 g zentrifugiert. Der Überstand enthielt die P1-Phagen mit dem gesamten Genom des Bakterien-Donorstammes, sowie der eigenen Phagen-DNA, verpackt in Phagenpartikeln. Dieses Phagenlysat (Überstand) wurde in sterile Schraubdeckelröhrchen überführt, mit 2-3 Tropfen Chloroform versetzt und im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt.

3.4.6 P1-Transduktion

Unter Transduktion versteht man die Übertragung von DNA aus einer Donor- in eine Akzeptorzelle mittels Bakteriophagen. Die Stammkonstruktion durch P1-Transduktion erfolgte nach Miller (1972 und 1992). Hierbei wurden 5 ml einer in LB-Medium angezogenen Übernachtkultur des Akzeptorstammes abzentrifugiert und in 2.5 ml einer 10 mM $MgSO_4$-Lösung resuspendiert. Die Resuspension wurde dann mit 12.5 µl einer 1M $CaCl_2$-Lösung versetzt und 200 µl oder 500 µl der Zellsuspension mit 1-3 Tropfen P1-Lysat für 5-10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit 1 ml LB-Medium versetzt. Danach erfolgte die Inkubation der Suspension für 20 Minuten bei 37 °C im Reagenzglasroller. Um die Adsorption der Phagen an die Bakterien zu stoppen, wurde die Suspension mit einem Tropfen 1M Natriumcitrat versetzt und die Transduktionsansätze zur Selektion der gewünschten Transduktanten auf Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert. Zur Inaktivierung der Phagen enthielten die Agarplatten auch Natriumcitrat (20 mM Endkonzentration).

3.5 Biochemische Methoden

3.5.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe in einer Polyacrylamidmatrix. Im Probenpuffer enthaltenes SDS (Natrium-Lauroylsulfat, engl. „sodium dodecyl sulfate“), ein anionisches Detergenz, bindet an Proteine und denaturiert diese und überdeckt deren Eigenladungen mit seiner eigenen negativen Ladung. Dadurch wird ein konstantes Masse-Ladungsverhältnis geschaffen, wodurch Proteine ihrer Größe durch Anlegen eines elektrischen Feldes in einem Gel aufgetrennt werden. Hierbei wurde im Wesentlichen nach der Methode von Laemmli (1970) vorgegangen.

Einer wachsenden Bakterienkultur wurde zu einer gewünschten OD_{578} Proben entnommen. Hierbei wurde das entnommene Kulturvolumen so gewählt, dass der Gesamtproteingehalt 30 µg betrug. Für die Berechnung der Gesamtproteinmenge gilt dabei die folgende Beziehung zwischen der OD_{578} und der Proteinkonzentration: 1 ml

Zellsuspension einer OD_{578} von 1.0 entspricht 107 µg Gesamtprotein. Zur Herstellung von Gesamtproteinextrakten aus Proben von in M9-Minimalmedium gewachsenen Kulturen wurden diese direkt mit 10 % Trichloressigsäure (Endkonzentration) versetzt und für 20 Minuten auf Eis gefällt. Proben aus LB-Kulturen wurden zunächst kurz abzentrifugiert und in 200 µl 1x Z-Puffer resuspendiert und mit 10 % Trichloressigsäure (Endkonzentration) für 20 Minuten auf Eis gefällt. Nach der Fällung wurden die Proben für 10 Minuten bei 4 °C bei 14000 rpm in der Eppendorf Tischzentrifuge zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Pellets mit eiskaltem Aceton gewaschen. Im Anschluss daran wurden die Proben für weitere 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand abermals verworfen und die Pellets für 10 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Nach dem Trocknen wurden das Pellet, je nach gewünschter Gesamtproteinkonzentration, in 60 µl bzw. 150 µl 1x Probenpuffer resuspendiert (0.5 µg/µl bzw. 0.2 µg/µl Gesamtprotein). Nach dem Erhitzen der Proben für 5 Minuten bei 100 °C wurden die Proben kurz abzentrifugiert und direkt auf das SDS-Gel aufgetragen oder bis zur Auftragung bei -20 °C gelagert. Die SDS-PAGE wurde in Mini-PROTEAN II- oder III-Apparaturen (BioRad) durchgeführt. Hierbei wurde ein 12 %-iges Trenngel mit einem 4 %-igen Sammelgel überschichtet. Von jeder Probe wurden, falls nicht anders vermerkt, 1 µg Gesamtprotein (Immunodetektion von Plasmid-kodierten Proteinen) bzw. 5 µg Gesamtprotein (Immunodetektion von endogenen Proteinen) auf das Gel aufgetragen. Nach dem Auftrennen der Proteine bei 25 mA pro Gel und maximaler Spannung wurden die Gele der Immunoblot-Analyse (Western-Blot) zugeführt.

1x Z-Puffer:

0.06M $Na_2HPO_4.7H_2O$
0.04M $NaH_2PO_4.H_2O$
10 mM KCl
1 mM $MgSO_4$
0.05M β-Mercaptoethanol
pH 7.0

1x Probenpuffer:

0.06 M Tris, pH 6.8
2 % SDS
10 % Glyzerin
3 % β-Mercaptoethanol
0.005 % Bromphenolblau

Elektrophoresepuffer:

25 mM Tris
0.19 M Glycin
0.1 % SDS

4 %-iges Sammelgel (Angaben für 2 Gele):

1,25 ml Upper Gelbuffer (6,06g Tris, 0,8g SDS in 100ml Wasser; pH 6,8)
0,65 ml Rotiphorese Gel 30 (30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid)
3,07 ml Wasser
5 µl TEMED
25 µl 10% APS

12 %-iges Trenngel (Angaben für 2 Gele):

2,5 ml Lower Gelbuffer (36,34g Tris, 0,8g SDS in 200ml Wasser; pH 8,8)
4 ml Rotiphorese Gel 30 (30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid)
3,45 ml Wasser
5 µl TEMED
50 µl 10% APS

3.5.2 Immunoblot-Analyse (Westernblot)

Die Westernblot-Analyse (Immunoblotanalyse) ermöglicht den spezifischen Nachweis von Proteinen. Dazu werden die Proteine nach der Auftrennung in einem SDS-Gel auf eine Membran transferiert und dort mit einem spezifischen primären Antikörper zunächst markiert. Die eigentliche Nachweisreaktion erfolgt dann mit einem sekundären Antikörper, der gegen den primären Antikörper gerichtet ist und entweder mit einem Fluorophor gekoppelt ist, oder durch Kopplung mit einem Enzym, wie der alkalischen Phosphatase, ein chromogenes Substrat umsetzt. Dadurch wird das zu detektierende Protein in einer Farbreaktion visualisiert. Vor dem Proteintransfer wurde die Transfer-Membran zunächst für 5 Minuten durch Inkubation in Methanol aktiviert, dann kurz in Wasser und Transblotpuffer geschwenkt und anschließend luftblasenfrei auf das SDS-Gel gelegt. Das Gel mit der aufgelegten Membran wurde dann zwischen zwei in Transblotpuffer getränkten Filterpapieren (Roth) und zwei Schwammeinheiten gelegt, die Westernblot-Einheit geschlossen und in der Blotapparatur (Mini-PROTEAN II, BioRad) fixiert. Nach dem Einsetzten eines Kühlaggregats erfolgte das eigentliche Blotten für 1 h bei 100 V und maximaler Stromstärke in kaltem Transblotpuffer. Im Anschluss daran wurde die Membran für eine Stunde (oder über Nacht) in TBSTM inkubiert, um eine unspezifische Bindung des Antikörpers zu blockieren. Daran schloss sich eine einstündige Inkubation des primären Antikörpers in TBSTM an (polyklonales anti-RpoS-Serum $1:10^4$ verdünnt; monoklonale anti-FLAG und anti-GFP Antiköper $1:10^3$ verdünnt). Darauf erfolgte ein kurzes Schwenken der Membran in TBST, sowie ein dreimaliges Waschen der Membran für je 5 Minuten in TBST. Nun wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper für eine Stunde in TBSTM inkubiert (für RpoS: Cy2-anti-Kanninchen $1:10^3$ verdünnt, Dianova Immundiagnostik Hamburg; für FLAG-Epitop und GFP: Ziege-anti-Maus-IgG-alkalische Phosphatase Konjugat $1:10^4$ verdünnt, Sigma-Aldrich). Nach erneutem dreimaligem Waschen für je 5 Minuten in TBST wurde die mit dem sekundären Cy2-Antikörper behandelte Membran direkt mit Hilfe des Fluorescent Image Analyzer FLA-2000G (Fuji Photo Film Co.) und des Programms Image Reader Version 1.8E gescannt. Die mit dem sekundären, alkalische Phosphatase-gekoppeltem, Antikörper behandelten Membranen wurden zunächst für 15 Minuten in AP-Puffer inkubiert und dann durch Zugabe einer Färbelösung, die ein chromogenes Substrat enthält, entwickelt. Gestoppt wurde die Farbreaktion unmittelbar beim Sichtbarwerden der Banden durch Austausch der Färbelösung gegen Leitungswasser. Die getrockneten Membranen wurden fotografiert. Mittels des Programms Image Gauge Version 3.45 (Fuji Photo Film Co.) wurde der Schwärzungsgrad der Proteinbanden aus den verschiedenen Western-Blots, abzüglich der Schwärzung des Hintergrundes, quantifiziert.

Transblotpuffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % Methanol

TBST: 20 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.05 % Tween-20

TBSTM: TBST mit 5 % Magermilchpulver

AP-Puffer: 100 mM Tris pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$

Färbelösung: 10 ml AP-Puffer, 66 µl NBT (50 mg/ml in 70% DMF), 33 µl BCIP (50 mg/ml in DMF)

3.5.3 *In vivo* Markierung von Proteinen mit L-[^{35}S]-Methionin („Pulse-Chase"-Experimente) und nachfolgender Immunopräzipitation zur Bestimmung der RpoS-Syntheserate in hyperosmotisch gestressten und ungestressten Zellen

Mittels radioaktiver „Pulse-Chase"-Experimente werden Proteine *in vivo* durch den Einbau von L-[^{35}S]-Methionin (Amersham Bioscience) radioaktiv markiert. Durch eine sich anschließende Immunopräzipitation kann so unter anderem die Syntheserate eines Proteins bestimmt werden (Lange und Hengge-Aronis, 1994a). Dazu wurden die Zellen in M9-Minimalmedium mit 0.4 % Glyzerin bis zu einer OD_{578} von 0.3 kultiviert, die Kulturen geteilt und die eine Hälfte mit 0.3 M NaCl hyperosmotisch gestresst. 10 Minuten danach wurden den Kulturen Aliquots entnommen. Dabei wurden je 1 ml Probe in ein steriles Sarstedt-Röhrchen überführt und für die Dauer des Experiments in einem 37 °C Heizblock inkubiert. Die Proben wurden dann für die Dauer von 30 Sekunden mit 10 µCi L-[^{35}S]-Methionin radioaktiv markiert, gefolgt von einem „Chase" mit nicht-radioaktiven Methionin (0.2 mM Endkonzentration) für 20 Sekunden. Sofort danach wurden je 500 µl der Proben in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß mit vorgelegter Trichloressigsäure überführt (10 % Endkonzentration) und für 20 Minuten auf Eis gefällt. Im Anschluss daran wurden die Proben für 10 Minuten bei 4 °C und 14000 rpm in der Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert, einmal mit Aceton gewaschen und für 5 Minuten im Heizblock bei 37 °C getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde dann in 30 µl SDS-Puffer resuspendiert, für 2 Minuten bei 100 °C erhitzt, mit 970 µl HS-Puffer versetzt und für weitere 10 Minuten bei Raumtemperatur und 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand, welcher die Proteine im solubilisierten Zustand enthielt, wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit je 60 µl fixierten *Staphylococcus aureus* Cowan I-Zellen versetzt und für weitere 30 Minuten (unter gelegentlichem Invertieren) auf Eis inkubiert. Die Staphylokokken-Zellen tragen auf ihrer Oberfläche das Fab-bindende Protein A. Die Präparation des Staphylokokken-Protein A-Antikörper-Adsorbens erfolgte nach Kesser (1975). Die Inkubation diente der Entfernung von Proteinen, die unspezifische Bindungen mit den Staphylokokken-Zellen eingehen, um so potenzielle Hintergrundbanden bei der späteren Autoradiografie zu minimieren. Nach der Inkubation wurden die Proben für 5 Minuten bei 4 °C und 14000 rpm zentrifugiert, der Überstand zu 4 µl polyklonalem σ^S-Antiserum gegeben und über Nacht bei 4 °C im

Kühlschrank inkubiert. Am folgenden Tag konnten die Antigen-Antikörperkomplexe durch erneute Inkubation mit je 60 µl fixierten *Staphylococcus aureus* Cowan I-Zellen für 30 Minuten auf Eis (unter gelegentlichem Invertieren) gebunden werden. Nach einem Zentrifugationsschritt (5 Minuten bei 4 °C und 14000 rpm) wurden die Pellets nacheinander in den Staph. Puffern 1-3 gewaschen und anschließend in 30 µl 1x Probenpuffer (siehe 3.5.1) resuspendiert, für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert und für 5 Minuten bei Raumtemperatur und 14000 rpm abzentrifugiert. Anschließend wurden 20 µl des Überstandes auf einem 12 % SDS-Gel (siehe 3.5.1) aufgetrennt und das Gel nach dem Lauf auf ein Filterpapier (Schleicher und Schuell) gelegt, mit Frischhaltefolie abgedeckt und im Vakuumtrockner (BioRad) für 2 Stunden bei 80 °C getrocknet. Es folgte die Autoradiografie des getrockneten Gels, wobei IP-Platten (Image Phosphor-Platten, Fuji Photo Film Co.) für 2-3 Tage aufgelegt wurden. Die Auswertung der IP-Platten erfolgte mit dem PhosphoImager (Fluorescent Image Analyzer FLA-2000G, Fuji Photo Film Co.) und dem Programm Image Reader Version 1.8E. Zur Quantifizierung der Banden wurde das Programm Image Gauge Version 3.45 (Fuji Photo Film Co.) verwendet.

SDS-Puffer:	**HS-Puffer:**
2 % SDS	2 % Triton X-100
50 mM Tris-HCl pH 8.0	50 mM Tris-HCl pH 8.0
1mM EDTA	150 mM NaCl
	0.1 mM EDTA

Staph. Puffer 1:	**Staph. Puffer 2:**	**Staph. Puffer 3:**
1 % Triton X-100	0.1 % SDS	50 mM Tris-HCl pH 7.5
1M NaCl	0.5 M LiCl	
50 mM Tris-HCl pH 7.5	50 mM Tris-HCl pH 7.5	

3.5.4 Nicht-radioaktive Bestimmung der RpoS-Halbwertszeit *in vivo*

Mit dieser Methode lässt sich die Abbaurate eines Proteins *in vivo* bestimmen. Dabei wird die Proteinbiosynthese in einer wachsenden Kultur durch Zugabe eines Translations-inhibierenden Antibiotikums (wie Spectinomycin) inhibiert. In dieser Arbeit wurde die σ^S-Stabilität durch Zugabe von 1.5 mg/ml Spectinomycin ermittelt. Unmittelbar vor Spectinomycin-Zugabe, sowie zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Spectinomycin-Zugabe wurden Proben entnommen, aufbereitet und in einem 12 % SDS-Gel aufgetrennt (siehe 3.5.1) und der Immunoblot-Analyse (siehe 3.5.2) zugeführt.

3.5.5 Hfq co-Immunopräzipitation, cDNA-Synthese und 454 Pyrosequenzierungsanalyse

Zur Identifikation von unter hyperosmotischen Stress verstärkt akkumulierenden sRNAs, die potenzielle *rpoS* Translations-aktivierende sRNAs darstellen, wurde eine Strategie gewählt, die auf der Deep-Sequenzierungsanalyse (454 Pyrosequenzierung) von mit Hfq-co-immunopräzipitierter RNA beruht. Hierbei wurde der Stamm W3110 *hfq*::FLAG::kan (TK62) in M9 Minimalmedium mit 0.4 % Glyzerin bis zu einer OD_{578} von 0.3 kultiviert, die Kultur gesplittet und die eine Hälfte mit NaCl versetzt (0.3 M NaCl), die andere ungestresste Kontrolle mit dem gleichen Volumen an *Aqua dest*. versetzt. 6 Minuten später wurden die Zellen geerntet und eine co-Immunopräzipitation Hfq-assoziierter RNAs mit einem Äquivalent von je 50 OD Zellen mittels eines anti-FLAG-Antikörpers (Sigma-Aldrich) nach dem in Pfeiffer *et al*. (2007) beschrieben Protokoll durchgeführt. Die in dieser Arbeit durchgeführte Prozedur wich dabei in folgenden Punkten von der in Pfeiffer *et al*. (2007) beschrieben Prozedur ab. Nach dem Gefrieren des Pellets in flüssigem Stickstoff wurde dieses in 1 ml Lyse-Puffer resuspendiert. Anstelle von Aufschluss durch Glaskügelchen erfolgte der Zellaufschluss durch drei Passagen durch eine French-Press-Zelle (American Instrument Company) bei 800 psi. Für die co-Immunopräzipitation wurden zum Überstand 35 µl anti-FLAG-Antikörper und anschließend 75 µl Protein A-Sepharose-Beads (Sigma-Aldrich) gegeben. Im Anschluss daran wurden die Beads in 500 µl Lysis-Puffer resuspendiert und die RNA einer Phenol-Chloroform-Extraktion unterzogen. Für eine effizientere Präzipitation von kleinen RNAs, sowie zum Sichtbarmachen des kleinen RNA-Pellets wurde dem Fällungsansatz 1 µl Glykogenblau (Ambion) zugefügt. Zur Verifizierung des Hfq::FLAG Protein-Pulldowns wurden zum Protein A-Sepharose-Beads-haltigen Phenolrest 1.5 ml Aceton hinzugefügt, bei -20 °C für zwei Stunden inkubiert und nach einem 30minütigen Zentrifugationsschritt (4 °C, 13000 rpm) die Beads zweimal mit Aceton gewaschen, getrocknet und in 1x Probenpuffer (siehe 3.5.1) gelöst. Danach wurden die in 1x Probenpuffer gelösten Beads für 5 Minuten bei 99 °C aufgekocht und bei der Input-Kontrolle 0.05 OD Gesamtprotein, bei der co-IP-Fraktion 2.5 OD Gesamtprotein auf einem 15 %-igen SDS-Gel aufgetrennt (siehe 3.5.1) und der Immunoblotanalyse mittels eines monoklonalen anti-FLAG-Antikörpers zugeführt (siehe 3.5.2). Die cDNA-Synthese und die Pyrosequenzierung wurden wie in Berezikov *et al*. (2006) durchgeführt, ohne vor der cDNA-Synthese eine RNA-Größenfraktionierung durchzuführen. Die cDNA-Bibliotheken wurden von der vertis Biotechnologie AG (Freising) erstellt und am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik (Berlin) sequenziert. Ein Arbeitsflussschema der Prozedur ist in Abbildung 4.12 dargestellt. Eine Beschreibung der bioinformatischen Analyse der cDNA-Bibliotheken aus der 454 Pyrosequenzierungsanalyse ist unter 4.4.1 beschrieben.

3.5.6 Bestimmung der β-Galaktosidase-Aktivität

Die spezifische β-Galaktosidaseaktivität in Zellsuspensionen wurde nach Miller (1972 und 1992) mit *o*-Nitrophenol-β-D-Galactopyranosid (ONPG) als Substrat bestimmt und in µmol gespaltenes Substrat pro Minute und mg Zellprotein angegeben. Anders als im Protokoll beschrieben wurde die optische Dichte bei 578 nm und die Extinktion des Hydrolyseproduktes *o*-Nitrophenol bei 405 nm gemessen. Um die spezifische β-Galaktosidaseaktivität zu bestimmen wurden einer Kultur Proben entnommen und geeignete Aliquots mit Z-Puffer auf ein Volumen von 1 ml gebracht. Durch Zugabe von einem Tropfen 0.1 % SDS-Lösung und zwei Tropfen Chloroform und 10 Minuten Inkubation wurden die Zellen aufgeschlossen. Anschließend wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 200 µl ONPG (4mg/ml) gestartet und bei bereits leicht eintretender Gelbfärbung sofort mit 0.5 ml 1M $NaCO_3$ abgestoppt. Danach wurden die Reaktionsansätze für 10 Minuten abzentrifugiert und 333 µl des Überstandes in eine 96-Well Mikrotiterplatte überführt und die Extinktion bei 405 nm im Mikrotiterplatten-Lesegerät (BioRad, Modell 550) gemessen. Als Referenz fungierte ein Testansatz, der nur Z-Puffer anstelle der Zellsuspension enthielt. Die spezifische Aktivität eines Enzyms ist per Definition die umgesetzte Stoffmenge pro Zeit und Menge an Protein. Aus dem Lambert-Beerschen-Gesetz ($\Delta E = \Delta c \cdot d \cdot \varepsilon$) lässt sich die Formel für die spezifische β-Galaktosidaseaktivität herleiten, wenn man davon ausgeht, dass bei einer OD_{578} von 1.0 in 1 ml Zellsuspension 0.107 mg Protein enthalten sind.

Spezifische β-Galaktosidase-Aktivität [µmol/min/mg Protein]

$= \Delta n / (\Delta t / m_{Protein})$

$= V / (\varepsilon \cdot c_p) \cdot [\Delta E_{405} / (\Delta t \cdot V_B \cdot OD_{578})]$

$= 3{,}38 \cdot E_{405} / (\Delta t \cdot V_B \cdot OD_{578})$

Δc = Konzentrationsänderung
d = Schichtdicke der Küvette [cm]
ε = Extinktionskoeffizient von o-Nitrophenol bei 405 nm; ε = 4860 M-1 cm-1
Δn = Änderung der Stoffmenge
$m_{Protein}$ = Proteingehalt [mg]
V = Endvolumen des Testansatzes (1,7 ml)
c_p = Gesamtproteingehalt einer Bakteriensuspension bei OD578 = 1 ≈ 0,107 mg/ml
ΔE_{405} = Extinktionsänderung bei 405 nm
Δt = Reaktionszeit [min]
V_B = Volumen der eingesetzten Bakteriensuspension [ml]
OD_{578} = optische Dichte der Bakteriensuspension bei 578 nm

3.6 Molekularbiologische Methoden

3.6.1 Präparation von chromosomaler und Plasmid-DNA

Die Präparation von Plasmid-DNA erfolgte mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers. Chromosomale DNA wurde mit dem QIAamp DNA Mini Kit nach den Angaben des Herstellers (Qiagen) aufgereinigt. DNA wurde bei -20 °C aufbewahrt.

3.6.2 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA und RNA

Die Konzentrationen von Nukleinsäurelösungen wurden in einem NanoDrop 2000 Spektralphotometer (Peqlab, Erlangen) bei einer Wellenlänge von 260 nm (E_{260}) mit nur 1 µl Nukleinsäurelösung gemessen. Als Referenz dient dabei das Lösungsmittel (Wasser), indem die Nukleinsäuren gelöst waren. Für die Berechnung der Nukleinsäurekonzentrationen wurde dabei folgende vereinfachte Beziehung zugrundegelegt:

1 E_{260} = 50 µg/ml für doppelsträngige DNA

1 E_{260} = 40 µg/ml für RNA

Zur Kontrolle der Reinheit von Nukleinsäurelösungen wurden Spektren im Wellenlängenbereich von 230 nm bis 280 nm aufgenommen. Der Quotient der Extinktionswerte bei 260 und 280 nm (E_{260}/E_{280}) ist ein Maß für die Reinheit einer Nukleinsäurelösung. Für reine Proben sollte der Quotient zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Kontaminationen durch Proteine oder Phenol führen zu deutlich geringeren Werten.

3.6.3 Agarosegelelektrophorese

DNA-Proben aus Restriktionshydrolysen (Restriktionsenzymverdaus) bzw. PCR-Ansätzen wurden mit Gelauftragungspuffer versetzt (1x Endkonzentration) und in Anhängigkeit von der Länge der jeweiligen DNA-Fragmente in 0.8-1.2 %-igen Agarosegelen (in 1x TAE-Puffer) bei einer Stromstärke von 80-100 mA elektrophoretisch aufgetrennt. Als Laupuffer diente 1x TAE-Puffer. Zur Identifikation der Fragmentgrößen wurde ein DNA-Größenstandard, wie 100 Bp DNA-Marker (Roth) und 100 Bp extended DNA-Marker (Roth), mit aufgetragen. Nach dem Gellauf wurde die DNA durch Färbung 15minütige des Gels im Ethidiumbromidbad (0.5 µg/ml in Aqua dest.) und anschließende UV-Licht Exposition sichtbar gemacht.

Gelauftragungspuffer (6x):

0.25 % Bromphenolblau
0.25 % Xylencyanol
30 % Glyzerin
in 1x TAE

50x TAE-Stammlösung:

242 g Tris
57.1 ml Eisessig
100 ml 0.5 M EDTA pH 8.0
mit deionisiertem Wasser auf 1 l auffüllen

3.6.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

PCR-Reaktionen zur spezifischen Amplifikation von DNA-Bereichen wurden nach Standardprotokollen durchgeführt (Sambrook *et al*., 1989). Als DNA-Polymerasen für präparative PCRs wurden die Vent-Polymerase (NEB) und die Phusion-Polymerase (Biozym), für Kontroll-PCRs die Opti-Taq-Polymerase (Eurex) nach den Angaben des Herstellers eingesetzt. Die Oligonukleotide (Primer) wurden von Metabion (Martinsried) bezogen. Die PCR-Produkte wurden mittels Agarosegelelektrophorese (siehe 3.6.3) analysiert und für präparative Zwecke (z.B. Klonierungen) mit Hilfe des Gelextraction Kit (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers aus Agarosegelen gereinigt.

3.6.5 Transformation

Unter Transformation versteht man die Übertragung von DNA in Bakterienzellen. Die Retransformation von gereinigten Plasmiden in die gewünschten Rezipientenstämme erfolgte mit Hilfe der TSS-Transformation (Chung *et al*., 1989). DNA aus Ligationsansätzen, sowie DNA (PCR-Fragmente) für die homologe Rekombination in das Chromosom, wurde durch Elektroporation (Calvin und Hanawalt, 1988) in entsprechend kompetente Zellen (FI1202, ER2566; W3110 pKD46) übertragen. Elektrokompetente Zellen wurden nach dem Protokoll von Sambrook *et al*. (1989) hergestellt. Die Selektion für das jeweilige Plasmid bzw. für rekombinierte DNA erfolgte durch das Ausplattieren auf Antibiotika-Selektionsplatten.

3.6.6 Klonierung

Grundsätzlich wurde bei der Klonierung von Plasmid-DNA nach Standardprotokollen vorgegangen (Sambrook *et al*., 1989). Restriktionshydrolysen erfolgten mit Restriktionsenzymen der Firma NEB nach den Angaben des Herstellers. Verdaute Plasmid-DNA-Fragmente, oder verdaute PCR-Produkte wurden in der Regel mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers gereinigt. Zur Ligation wurden 7 µl verdaute Insert-DNA, 1 µl verdaute Plasmid-DNA, 1 µl 10x T4 DNA-Ligase-Puffer und 1 µl T4-Ligase (1 WU) (NEB) zusammenpipettiert und über Nacht bei 12 °C (von Fall zu Fall auch bei 4 °C), oder für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Ligationsansätze durch Elektroporation (siehe 3.6.5) in kompetente Zellen transformiert. Klonierte Plasmid-DNA-Konstrukte wurde anschließend durch Sequenzierung (AGOWA, Berlin) verifiziert.

3.6.7 Konstruktion von Plasmiden

3.6.7.1 Konstruktion der *rpoS* Codonmutante

Für die gerichtete Mutagenese in *rpoS* beim Austausch der selteneren Codons durch die häufigeren *rpoD* Codons wurde nach der Zweischritt-PCR-Mutagenese („four-primer two-step“-PCR) nach Becker und Hengge-Aronis (2001) vorgegangen. Hierbei tragen die „externen“ Primer (*Eco*RI N *rpoS* und *Hind*III C *rpoS*) die *Eco*RI/*Hind*III-Schnittstellen. Die „internen“ Primer enthalten jeweils die Punktmutationen für den Austausch der selteneren Codons durch die häufigeren *rpoD* Codons in der Mitte ihrer Sequenz. Alle Primer sind in Tabelle 3.6 aufgelistet (mit dem jeweiligen internen „forward“ Primer an oberster Stelle eines Primerpaares, sowie der zu austauschenden Base fett hinterlegt). Als Template für den ersten PCR-Schritt fungierte dabei das Plasmid pRL40.1 (Lange und Hengge-Aronis, 1994a). Die Prozedur wurde dabei mehrfach wiederholt, um die betreffenden Codons in *rpoS* nacheinander auszutauschen. Das jeweils resultierende punkmutierte *rpoS* Fragment wurde mit *Eco*RI und *Hind*III verdaut und in den ebenso verdauten pRL40.1 Vektor kloniert. Das pRL40.1 Derivat mit den ausgetauschten 11 synonymen Codons wurde pRpoS(codon mt) (=pTK25-3) genannt.

Tabelle 3.6: Oligonukleotide für die Herstellung der *rpoS* Codonmutante (pRpoS(codon mt))

Primername	Primersequenz
*Eco*RI N *rpoS*	5´-GGAAACAGAATTCGGCGGAACCAGG-3´
*Hind*III C *rpoS*	5´-GCCAAAACAGCCAAGCTTAATTACC-3´
S47 TCG >TCC	5´-CCGAAGAGGAACTGTTATC**C**CAGGGAGCCACACAGCG-3´ 5´-CGCTGTGTGGCTCCCTG**G**GATAACAGTTCCTCTTCGG-3´
G86 GGA > GGT	5´-CGCGCACTGCGTGG**T**GATGTCGCCTCTCGC-3´ 5´-GCGAGAGGCGACATC**A**CCACGCAGTGCGCG-3´
G126 GGG > GGT	5´-CGAAGAGGGCAACCTGGG**T**CTGATCCGCGCGG-3´ 5´-CCGCGCGGATCAG**A**CCCAGGTTGCCCTCTTCG-3´
S 143 TCA > TCC T144 ACA > ACC	5´-CGTGGTTTCCGCTTCTC**C**AC**C**TACGCAACCTGGTGG-3´ 5´-CCACCAGGTTGCGTA**G**GT**G**GAGAAGCGGAAACCACG-3´
R156 CGG > CGC	5´-CGCCAGACGATTGAACGCGCGATTATGAACC-3´ 5´-GGTTCATAATCGCGCGTTCAATCGTCTGGCG-3´
R180 CGA > CGT	5´-GCTGAACGTTTACCTGCGTACCGCACGTGAGTTGTCC-3´ 5´-GGACAACTCACGTGCGGTACGCAGGTAAACGTTCAGC-3´
P193 CCA > CCG	5´-GCTGGACCATGAACC**G**AGTGCGGAAGAGATCGC-3´ 5´-GCGATCTCTTCCGCACT**C**GGTTCATGGTCCAGC-3´
P205 CCA > CCG	5´-GCAACTGGATAAGCC**G**GTTGATGACGTCAGCC-3´ 5´-GGCTGACGTCATCAAC**C**GGCTTATCCAGTTGC-3´
S221 TCG > TCC	5´-CGAGCGCATTACCTC**C**GTAGACACCCCGCTGG-3´ 5´-CCAGCGGGGTGTCTAC**G**GAGGTAATGCGCTCG-3´
R277 CGA > CGT	5´-GCGTGAAGTGCTGGCACGTCGTTTCGGTTTGCTGGG-3´ 5´-CCCAGCAAACCGAAACGACGTGCCAGCACTTCACGC-3´

3.6.7.2 Klonierung der transkriptionalen tRNA::*lacZ*-Fusionen

Für die Konstruktion der tRNA::*lacZ*-Fusionen wurde der für die Herstellung von transkriptionalen *lacZ*-Reportergenfusionen konzipierte Vektor pCAB6 (Barembruch und Hengge, 2007) verwendet. Dabei wurden über eine PCR DNA-Fragmente amplifiziert, die meist etwa 200-400 Bp der vor dem Strukturgenbereich des jeweiligen tRNA-Operon lokalisierten Sequenzen, sowie die ersten 20-25 Bp des tRNA-Operon Strukturgenbereich enthielten (siehe Tab. 3.4). Diese Fragmente wurden mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Hind*III verdaut und in den ebenso geschnittenen pCAB6 Vektor kloniert. Die für die PCR-Amplifikation verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 3.7 aufgelistet.

Zur Klonierung der transkriptionalen *argXproM*::*lacZ*-Fusion wurde ein 225 Bp großes Fragment mit den Primern *Bam*HI *argXproM* forward und *Hind*III *argXproM* reverse und chromosomaler DNA (MC4100) als Template amplifiziert. Das resultierende Plasmid wurde als pTK26-1 bezeichnet.

Zur Klonierung der transkriptionalen *glyWleuZ*::*lacZ*-Fusion wurde ein 426 Bp großes Fragment mit den Primern *Bam*HI *glyWleuZ* forward und *Hind*III *glyWleuZ* reverse und chromosomaler DNA (MC4100) als Template amplifiziert. Das resultierende Plasmid wurde als pTK27-3 bezeichnet.

Zur Klonierung der transkriptionalen *glyU*::*lacZ*-Fusion wurde ein 320 Bp großes Fragment mit den Primern *Bam*HI *glyU* forward und *Hind*III *glyU* reverse und chromosomaler DNA (MC4100) als Template amplifiziert. Das resultierende Plasmid wurde als pTK28-1 bezeichnet.

Zur Klonierung der transkriptionalen *serVargVYZQ*::*lacZ*-Fusion wurde ein 521 Bp großes Fragment mit den Primern *Bam*HI *serVargVYZQ* forward und *Hind*III *serVargVYZQ* reverse und chromosomaler DNA (MC4100) als Template amplifiziert. Das resultierende Plasmid wurde als pTK29-1 bezeichnet.

Zur Klonierung der transkriptionalen *proK*::*lacZ*-Fusion wurde ein 370 Bp großes Fragment mit den Primern *Bam*HI *proK* forward und *Hind*III *proK* reverse und chromosomaler DNA (MC4100) als Template amplifiziert. Das resultierende Plasmid wurde als pTK30-1 bezeichnet.

Zur Klonierung der transkriptionalen *thrUglyT*::*lacZ*-Fusion wurde ein 290 Bp großes Fragment mit den Primern *Bam*HI *thrUglyT* forward und *Hind*III *thrUglyT* reverse. Das und chromosomaler DNA (MC4100) als Template amplifiziert. Das resultierende Plasmid wurde als pTK31-1 bezeichnet.

Zur Klonierung der transkriptionalen *glyVXY*::*lacZ*-Fusion wurde ein 407 Bp großes Fragment mit den Primern *Bam*HI *glyVXY* forward und *Bam*HI *glyVXY* forward und

chromosomaler DNA (MC4100) als Template amplifiziert. Das resultierende Plasmid wurde als pTK32-3 bezeichnet.

Tabelle 3.7 Oligonukleotide für die Konstruktion der verschiedenen tRNA::*lacZ*-Fusionen

Primername	Primersequenz
*Bam*HI *argXproM* forward	5´CGCGGATCCGCGTATGTCGCTGTTTGTTGGC3´
*Hind*III *argXproM* reverse	5´CCCAAGCTTCTATCCAGCTGAGCTACGGGC3´
*Bam*HI *glyWleuZ* forward	5´CGCGGATCCTGGATTGGGAAAGTGAAAACC3´
*Hind*III *glyWleuZ* reverse	5´CCCAAGCTTACCAACTGAGCTATTCCCGC3´
*Bam*HI *glyU* forward	5´CGCGGATCCTGGTAAATAATGGGCAAAGCGTGAAGG3´
*Hind*III *glyU* reverse	5´CCCAAGCTTCTACCATTGAACTACGCCCGC3´
*Bam*HI *serVargVYZQ* forward	5´ CGCGGATCCCAGCAGTCCAGTTACTAATC3´
*Hind*III *serVargVYZQ* reverse	5´CCCAAGCTTCAGCCTCTCGGCCACCTCACC3´
*Bam*HI *proK* forward	5´CGCGGATCCGGCCAATGCGCAGGCGTTTGCG3´
*Hind*III *proK* reverse	5´CCCAAGCTTACCAGGCTGCGCCAATCACCG3´
*Bam*HI *thrUglyT* forward	5´CGCGGATCCAGGAAGCTATCGTTGAAAAGC3´
*Hind*III *thrUglyT* reverse	5´CCCAAGCTTGCTCTACCTACTGAGCTAAGTCGG3´
*Bam*HI *glyVXY* forward	5´CGCGGATCCACTACCGTTATCTCGATGTCAGC3´
*Hind*III *glyVXY* reverse	5´CCCAAGCTTACCAACTGAGCTATTCCCGC3´

3.6.7.3 Klonierung der translationalen *rpoS*::*gfp*-Fusionen

Als Standardvektor für die Klonierung der translationalen *rpoS*::*gfp*-Fusionen diente pXG-10 (Urban und Vogel, 2007). Die Konstruktion der Fusionen erfolgte dabei wie in Urban und Vogel (2007) beschrieben. Hierbei wurden über eine PCR, mit chromosomaler DNA (W3110) als Template, DNA-Fragmente amplifiziert, welche die komplette *rpoS* 5´-UTR (ausgehend vom $rpoS_{P1}$-Transkriptionsstart), sowie kodierende *rpoS* ORF-Sequenzen unterschiedlicher Länge kodieren. Diese Fragmente wurden mit den Restriktionsenzymen *Bfr*BI und *Nhe*I verdaut und in den ebenso geschnittenen pXG-10 Vektor kloniert. Als Sense-Oligonukleotid („forward“ Primer) fungierte dabei bei allen PCR-Amplifikationen das Oligonukleotid *rpoS*::*gfp Bfr*BI fw. Eine Liste der verwendeten Oligonukleotide ist in Tabelle 3.8 aufgeführt.

Tabelle 3.8 Oligonukleotide für die Klonierung der verschiedenen *rpoS*::*gfp*-Fusionen

Primername	Primersequenz	Plasmid
rpoS::*gfp Bfr*BI fw	5´ ATACTGAGCACATGCATGGGTGAACAGAGTGCTAACA 3´	siehe unten
rpoS120::*gfp Nhe*I rev	5´GTTTTTTGCTAGCCAAATCGTTATCACTGG 3´	pRpoS120::GFP
*rpoS*378::*gfp Nhe*I rev	5´ GTTTTTTGCTAGCCCCCAGGTTGCCCTCTTCG 3´	pRpoS378::GFP
*rpoS*570::*gfp Nhe*I rev	5´ GTTTTTTGCTAGCGTCCAGCTTATGGGACAAC 3´	pRpoS570::GFP
*rpoS*741::*gfp Nhe*I rev	5´ GTTTTTTGCTAGCTTCCGGACCGTTCTCTTTTTCATCG 3´	pRpoS741::GFP

3.6.7.4 Klonierung der sRNA-Vektoren

Alle in dieser Arbeit konstruierten sRNA-Plasmide basieren auf dem Plasmid pZE12-*luc* und wurden nach dem Protokoll von Urban und Vogel (2007) generiert. Die verschiedenen sRNAs wurden hierbei, von ihrem Transkriptionsstart (+1) ausgehend, mit einem 5´-Monophosphat modifizierten „forward“ Primer und einem eine *Xba*I-Schnittstelle tragenden „reverse“ Primer über eine PCR mit genomischer DNA (W3110) als Template amplifiziert. Als Plasmid-Rückgrat für die Klonierung fungierte hierbei das, mit den Primern PLlacoB und PLlacoC über eine PCR mit pZE12-*luc* und durch anschließenden *Xba*I-Verdau generierte 2.2 Kb-Fragment. Nach dem *Xba*I-Verdau der amplifizierten sRNA-Fragmente wurden diese in das ebenso geschnittene, auf pZE12-*luc* basierende, 2.2 Kb-Fragment ligiert. Die Primer für die verschiedenen sRNA-Plasmid-Klonierungen sind in Tabelle 3.9 aufgeführt.

Tabelle 3.9: Oligonukleotide für die Herstellung der verschiedenen sRNA-Vektoren

Primer	Primersequenz	Plasmid
pZE ArcZ fw pZE ArcZ *Xba*I rev	5´p GTGCGGCCTGAAAAACAGTGCTGTGC 3´ 5´ GCTCTAGAGAAAGCGTGGGTGGCAAAAGCCAC 3´	pArcZ
pZE GlmZ fw pZE GlmZ *Xba*I rev	5´p GTAGATGCTCATTCCATCTCTTATGTTCGC 3´ 5´GCTCTAGACCTCCGGGGCCTTCCTGATAC 3´	pGlmZ
pZE OmrA fw pZE OmrA *Xba*I rev	5´p CCCAGAGGTATTGATTGGTGAGATTATTCGG 3´ 5´ GCTCTAGAGCGACAGTAAATTAGGTGCG 3´	pOmrA
pZE OmrB fw pZE OmrB *Xba*I rev	5´ p CCCAGAGGTATTGATAGGTGAAGTCAACTTC 3´ 5´ GCTCTAGAGTTACAGATTGATGACCGGC 3´	pOmrB
pZE 6S fw pZE 6S *Xba*I rev	5´p ATTTCTCTGAGATGTTCGCAAG 3´ 5´GCTCTAGAGAATCTCCGAGATGCCGCC 3´	p6S
pZE 6S fw pZE 6S+Y *Xba*I rev	5´p ATTTCTCTGAGATGTTCGCAAG 3´ 5´ GCTCTAGACTTACCACTCCCAGACTTTCGACG 3´	p6S+Y
pZE SgrS fw pZE SgrS *Xba*I rev	5´ p GATGAAGCAAGGGGGTGCCCCATGCGTCAG 3´ 5´ GCTCTAGATTTAGCGCGGCGAGAATAAAAAAAAC 3´	pSgrS
PLlacOB PLlacoC	5´CGCACTGACCGAATTCATTAA 3´ 5´GTGCTCAGTATCTTGTTATCCG 3´	2.2 Kb Fragment

3.6.8 Kreuzung der transkriptionalen *lacZ*-Fusionen in das Chromosom von *E. coli*

Die verschiedenen klonierten tRNA::*lacZ*-Fusionsplasmide (siehe Tabelle 3.7) wurden nach dem Protokoll von Simons *et al*. (1987) durch *in vitro* Rekombination auf den Phagen λRS45 übertragen. Der Transfer basiert auf einer doppelten homologen Rekombination der Phagen-Gene *bla´* und *lacZ´* mit den auf den Fusionsplasmiden divergent orientierten *bla* und *lacZ* Genen. Durch die Integration (Lysogenisierung) des Phagen an der *att*(λ)-site des Stammes

W3110ΔlacU169 wurde die jeweilige Fusion stabil ins Chromosom gekreuzt. Über einen PCR-Test auf Einzellysogenie (Powell *et al*., 1994), konnte eine mehrfache Integration des Phagen ins Chromosom ausgeschlossen werden.

3.6.9 Herstellung der *arcZ*-, *omrA*- und *omrB*-Mutanten über eine „One-Step"-Inaktivierung

Die *arcZ*-, *omrA*- und *omrB*-Deletionsmutanten wurden nach der Methode der „One-Step"-Inaktivierung von chromosomalen Genen nach Datsenko und Wanner (2000) generiert. Diese Methode basiert auf der Substitution chromosomaler Gene durch Antibiotika-Resistenzkassetten über homologe Rekombination. Für die Amplifizierung der kan-Kassette zur Konstruktion der *arcZ*::kan Mutante wurden die Primer ArcZ pKD13 fw und ArcZ pKD13 rev (siehe Tab. 3.10) verwendet. Als Matrize für die PCR-Reaktion diente das Plasmid pKD13. Damit wird die vollständige transkribierte Sequenz von *arcZ* durch die kan-Kassette ersetzt. Zur PCR-Amplifikation der kan-Kassette für die Herstellung der *omrA omrB* Doppelmutante (die Gene für diese sRNAs sind unmittelbar einander benachbart) wurden die Primer OmrAB pKD13 fw und OmrAB pKD13 rev (siehe Tab. 3.10) mit dem Vektor pKD13 als Matrize verwendet. Dadurch wird die vollständige transkribierte Region der beiden sRNAs durch eine kan-Kassette substituiert. Die PCR-Produkte für die Herstellung aller Deletionsmutanten wurden durch Elektroporation in den Stamm W3110 transformiert, der die pKD46 Plasmid-kodierte λRed-Rekombinase zur homologen Rekombination der PCR-Produkte exprimiert. Die korrekte Insertion der Antibiotikakassetten an den Genloki wurde über eine Test-PCR verifiziert, indem die Primer ArcZ loc Test fw und ArcZ loc Test rev für die *arcZ*::kan mutante, sowie die Primer OmrAB loc Test fw und OmrAB loc Test rev für die *omrAB*::kan Doppelmutante, jeweils in Kombination mit den Testprimern k1 und k2 (Datsenko und Wanner, 2000) verwendet wurden. Um andere unerwünschte Rekombinationsereignisse in den hergestellten Mutanten ausschließen zu können, wurde von den beiden Mutanten jeweils ein P1-Lysat hergestellt (siehe 3.4.5) und die *arcZ*::kan und die *omrAB*::kan Mutationen durch P1-Transduktion (siehe 3.4.6) erneut in den W3100-Stamm transduziert. in Die resultierenden Stämme wurden TK93 (W3100 *arcZ*::kan) und TK100 (W3110 *omrAB*::kan) benannt.

Tabelle 3.10: Oligonukleotide für die Konstruktion der Deletionsmutanten

Primername	Primersequenz
ArcZ pKD13 fw	5´CACATTTAACTGATTCATGTAACAAATCATTTAAGTTTTGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC 3´
ArcZ pKD13 rev	5´GTAGAAGTGCTGAAAGCGTGGGTGGCAAAAGCCACTAAAAAAATTCCGGGGATCCGTCGACC 3´
OmrAB pKD13 fw	5´GCGAAACGCTGTTGCGATTGACCGCTGGTGGCGTTTGGCTTCAGGTTGCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC 3´

OmrAB pKD13 rev	5´CGCGAGCGACAGTAAATTAGGTGCGAAAAAAAACCTGCGCATCCGC GCAGGTTATTCCGGGGATCCGTCGACC3´
ArcZ loc Test fw ArcZ loc Test rev	5´ GGTACGCATCACACATTTAACTG 3´ 5´GTGCTGAAAGCGTGGGTGGC 3´
OmrAB loc Test fw OmrAB loc Test rev	5´GATTGCAAACCTTTGGTTACAC 3´ 5´GTAAAAGCGAATGGAGGGAG 3´

3.6.10 Elimination der kan-Kassette in der *rprA*::kan Mutante

Zur Herstellung der *rprA dsrA arcZ* Tripelmutante (TK92) über P1-Transduktion (siehe 3.4.6) musste die kan-Kassette im Stamm W3110 *rprA*::kan (TK86) der zuvor über eine „One-Step“-Inaktivierung hergestellten *rprA*::kan Mutante (Stammsammlung AG Hengge) eliminiert werden. Dies geschah durch die temperatursensitive Expression der FLP-Rekombinase vom Plasmid pCP20 (Datsenko und Wanner, 2000). Der resultierende Stamm wurde mit TK88 (W3110 *rprA*::scar) bezeichnet.

3.6.11 Herstellung eines Stammes mit chromosomalen 3xFLAG-getaggten Hfq

Um einen Stamm mit einem chromosomalen Hfq-(3x)FLAG-Tag-Epitop für die co-Immunopräzipitation von Hfq-assoziierten RNAs mittels eines anti-FLAG-Antikörpers zu generieren, wurde nach dem Protokoll von Uzzau *et al*. (2001) vorgegangen. Diese Prozedur ist eine Modifikation der „One-Step“-Inaktivierung nach Datsenko und Wanner (2000). Dabei wurde mit den Primern *hfq*::FLAG::kan fw und *hfq*::FLAG::kan rev (siehe Tab. 3.11) mit dem Plasmid pSUB11 als Template über eine PCR eine 3xFLAG-Epitop-kodierende Sequenz zusammen mit einer kan-Kassette amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde dann durch Elektroporation in den Stamm GB1000 transformiert, der die pKD46 Plasmid-kodierte λRed-Rekombinase zur homologen Rekombination des PCR-Produkts exprimiert. Das 3xFLAG-Epitop mit der kan-Kassette wurde dabei C-Terminal zwischen der letzten Aminosäure von Hfq und dessen Stop-Codon im Leseraster integriert. Die korrekte Insertion der 3xFLAG-kan-Kassette wurde zum einen über eine Test-PCR verifiziert, in welcher die Genlokus-spezifischen Primer Test Hfq fw und Test Hfq rev (Tab. 3.11) miteinander und in Kombination mit den Primern k1 und k2 (Datsenko und Wanner, 2000) verwendet wurden. Zum anderen wurde mit den Genlokus-spezifischen Primern ein PCR-Produkt generiert, das die gesamte *hfq* kodierende Sequenz zusammen mit dem FLAG-Epitop enthält. Das PCR-Produkt wurde anschließend durch die Firma AGOWA (Berlin) mittels des Primers pSUB11 reverse (Tab. 3.11) sequenziert, wodurch die korrekt Insertion des FLAG-Epitops verifiziert werden konnte. Um andere unerwünschte Rekombinationsereignisse im hergestellten *hfq*::FLAG::kan Stamm ausschließen zu können, wurde vom letzteren ein P1-Lysat hergestellt

(siehe 3.4.5) und das *hfq*::FLAG::kan Konstrukt durch P1-Transduktion (siehe 3.4.6) erneut in den GB1000-Stamm transduziert. Der resultierende Stamm GB1000 *hfq*::FLAG::kan wurde als TK62 bezeichnet.

Tabelle 3.11: Oligonukleotide zur Herstellung des GB1000 *hfq*::FLAG::kan Stammes

Primername	Primersequenz
hfq::FLAG::kan fw	5´GCAGAATACTTCCGCGCAACAGGACAGCGAAGAAACCGAAGACTAC AAAGACCATGACGG 3´
hfq::FLAG::kan rev	5´ATCGCTGGCTCCCCGTGTAAAAAAACAGCCCGAAACCTTACCATATG AATATCCTCCTTAG 3´
Test Hfq fw	5´ GGTTGTTGGTGCTATCGCAGGCTGAATG 3´
Test Hfq rev	5´ CACCAGCATCATAACGGTCAAACAAGC3´
pSUB11 FLAG reverse	5´ CCTTGCGCCCTGAGTGCTTGCGGCAGC3´

3.6.12 Herstellung der chromosomalen *rpoS* Codonmutante

Um das chromosomale *rpoS*-Wildtypallel mit den selteneren Codons durch das punktmutierte häufige Codon-Allel zu ersetzten, wurde nach einer von Datsenko und Wanner entwickelten „Two-Step“-Mutagenese, die auf einer modifizierten „One-Step“-Inaktivierung (Datsenko und Wanner, 2000) basiert, vorgegangen (B. Wanner, persönliche Kommunikation). Hierzu wurde ein Fragment des Plasmids pKD45, das für eine Kanamycin-Resistenzkassette und ein CcdB-Toxin unter der Kontrolle eines Rhamnose-induzierbaren Promotors kodiert, mit den Primern *rpoS* codMT pKD45 fw und *rpoS* codMT pKD45 rev (siehe Tab. 3.12) amplifiziert. Diese Oligonukleotide tragen nicht-komplementäre Extensionen, die homolog zu den stromauf- und abwärts lokalisierten Bereichen in *rpoS* sind, die die Region mit den selteneren Codons in pRpoS(codon mt) (=pTK25-3) flankieren. Das resultierende DNA-Fragment wurde durch Elektroporation in den Stamm W3110 transformiert, der die pKD46 Plasmid-kodierte λRed-Rekombinase zur homologen Rekombination des PCR-Produkts exprimiert. Im Anschluss daran wurde die *rpoS*::kan/*ccdB*-Region innerhalb dieses Stammes durch den punktmutierten *rpoS* ORF ersetzt, der die seltenen zu häufigeren Codon-Substitutionen enthält. Dieses punktmutierte *rpoS* ORF-Fragment wurde über eine PCR mit den Primern *rpoS* loc fw und *rpoS* loc rev (Tab. 3.12) und dem Plasmid pRpoS(codon mt) als Template generiert. Das resultierende DNA-Fragment wurde durch Elektroporation in die *rpoS*::kan/*ccdB*-Mutante transformiert, welche die pKD46 Plasmid-kodierte λRed-Rekombinase zur homologen Rekombination des PCR-Produkts exprimiert. Entsprechende Transformanden wurde auf ihre Fähigkeit hin selektiert, auf M9-Minimalmedium-Agarplatten mit Rhamnose zu wachsen (um auf den Verlust des *ccdB* Toxingens hin zu selektieren). Mit den Primern *rpoS* loc fw und *rpoS* loc rev wurde von der DNA von positiven Klonen ein *rpoS* Fragment über eine PCR amplifiziert und dieses Fragment, zur Verifikation der

chromosomalen *rpoS* Codonmutante, mit den Primern *rpoS* 25-3 fw und *rpoS* 25-3 rev (Tab. 3.12) sequenziert (AGOWA, Berlin). Das resultierende W3110 *rpoS*^{Codonmutante}-Derivat wurde als TK81 bezeichnet.

Tabelle 3.12: Oligonukleotide zur Herstellung der chromosomalen *rpoS* Codonmutante

Primername	Primersequenz
rpoS codMT pKD45 fw	5´GTAGAACAGGAACCCAGTGATAACGATTTGGCCGAAGAGGAACTGTCAGAAGAACTCGTCAAGAAG 3´
rpoS codMT pKD45 rev	5´CACGACCTACATCTTCCAGTGTTGCCGCTTCGTACCCCAGCAAACCCGGATATTATCGTGAGGATG 3´
rpoS loc fw	5´ ATGAGTCAGAATACGCTGAAAGTTC 3´
rpoS loc rev	5´ TTACTCGCGGAACAGCGCTTCG 3´
rpoS 25-3 fw	5´ GCCAATCACTGGCGGAAATGC 3´
rpoS 25-3 rev	5´ CGTATGGGCGGTAATTTGACC 3´

3.6.13 Isolation von Gesamt-RNA

Für die Präparation von Gesamt-RNA wurden die Kulturen unter den gegebenen Wachstumsbedingungen bis zur gewünschten OD_{578} kultiviert und für die Zellernte 10 ml (LB-Kulturen) bis 20 ml (M9-Minimalmedium-Kulturen) abgenommen und mit Stop-Lösung (5 % Phenol in Ethanol) 1:9 versetzt (Bernstein *et al*., 2002). Die Isolation der Gesamt-RNA erfolgte durch die heiße Phenol-Methode nach dem Protokoll von Tani *et al*. (2002). Abweichend von Protokoll wurden die nach der Ethanolfällung in RNase-freiem Wasser resuspendierten RNA-Pellets beim DNase-Verdau mit 3 µl RNase-freier DNase I (30 U) (Roche) versetzt und für 45 Minuten bei 37°C inkubiert. Im Anschluss daran erfolgte eine Extraktion mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) (Roth) und Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) (Roth) unter Verwendung von Phase-Lock-Tubes (5 PRIME GmbH). Nach einer sich anschließenden Ethanolfällung wurden die RNA-Pellets in 50-150 µl RNase-freiem Wasser bei 4°C für mindestens zwei Stunden gelöst. Die isolierte und gelöste RNA wurde bei -80°C gelagert.

3.6.14 Northernblot-Analyse

3.6.14.1 Agarosegel-Formaldehyd-Northernblot

Die Auftrennung der Gesamt-RNA erfolgte in einem denaturierenden 1.2 %-igen Agarosegel mit 6.7 % Formaldehyd (Roth) und 1x MOPS (Roth) bei 80-100 Volt für etwa 3 Stunden mit 1x MOPS als Laufpuffer. Hierzu wurden (je nach Experiment) 5-20 µg Gesamt-RNA (gewöhnlich 10 µg) in einem Volumen von 10 µl mit 30 µl Ladepuffer versetzt und für 15 Minuten bei 65°C denaturiert. Nach dem Abkühlen (5 Minuten auf Eis) wurden die RNA-

Proben noch vor der Überschichtung des Formaldehyd-Agarosegels mit Laufpuffer in die trockenen Taschen pipettiert und bei 80 Volt für 10-15 Minuten in das Gel einlaufen gelassen. Danach wurde das Gel mit Laufpuffer überschichtet und die RNA-Proben bei 100 Volt für etwa 160-165 weitere Minuten aufgetrennt. Nach dem Gellauf wurde das Gel mehreren Waschschritten mit DEPC-Wasser (kurzes Spülen) und 20x SSC (2x 15 Minuten) unterzogen (Entfernen des Formaldehyds). Danach wurde die RNA vom Gel durch ein Vakuum-Blotgerät (BioRad) für 90 Minuten bei 5-7 Hg und 10x SSC als Blotpuffer auf eine positiv-geladenen Nylonmembran (Roche) transferiert. Nach zwei 5minütigen Waschschritten der Membran in 2x SSC wurden die RNA durch UV-Crosslinking (5-10 Minuten) auf der Membran fixiert und im Anschluss daran die ribosomalen RNAs (16S und 23S RNA) als Ladungskontrolle mit Methylenblau für 5 Minuten gefärbt. Nach der Fotografie der Membran wurde diese durch zweimalige Inkubation (5 Minuten) in Bleaching-Puffer entfärbt, worauf sich zwei 5minütige Waschschritte in 2x SSC anschlossen. Anschließend erfolgte die Hybridisierung der Membran mit einer, für die jeweilige zu detektierende RNA, spezifischen Dig-Sonde. Hierzu wurde die Membran zunächst für eine Stunde bei 50°C im Hybridisierungsofen (Biometra), unter ständiger Rotation, in einem Hybridisierungsröhrchen mit 10 ml Dig Easy Hyb Solution (Roche) prähybridisiert. Danach wurde die Prähybridisierungslösung gegen 15 ml einer auf 50°C vorgewärmten Dig Easy Hyb Solution (Roche) ausgetauscht, die die zuvor denaturierte Dig-markierte DNA-Sonde zur Detektion der jeweiligen RNA enthielt. Die Membran wurde im Hybridisierungsofen über Nacht bei 48°C mit der Dig-markierten DNA-Sonde hybridisiert. Zur Denaturierung der Dig-markierten DNA-Sonde wurden 10-15 µl einer zuvor über eine PCR-generierten Sonde mit DEPC-Wasser auf ein Volumen von 50 µl gebracht und für 15 Minuten bei 95°C denaturiert und anschließend für 5 Minuten auf NaCl-Eis abgekühlt. Die Sonde wurden dann zu den 15 ml der vorgewärmten Dig Easy Hyb Solution (siehe oben) gegeben. Die Dig-markierten DNA-Sonden wurden über eine PCR mit einer zuvor hergestellten unmarkierten DNA-„Sonde“ als Template („PCR auf PCR“) durch Zugabe des PCR DIG-labeling Mix (Roche) nach den Angaben des Herstellers amplifiziert. Die Primer für die Herstellung der Dig-markierten DNA-Sonden sind in Tabelle 3.13 aufgelistet.

Nach der Hybridisierung über Nacht wurde die Membran zweimal für je 5 Minuten bei 42°C in Waschpuffer 1 im Hybridisierungsofen gewaschen, worauf sich zwei Waschschritte für je 30 Minuten bei 42°C in Waschpuffer 2 anschlossen. Zur Detektion der Dig-markierten DNA-Sonde wurde die Membran zunächst für 30 Minuten bei Raumtemperatur in Blocking-Puffer und anschließend für 60-90 Minuten mit einem anti-Dig-AP-gekoppelten Antikörper (Roche) (1:10^4 verdünnt in 25 ml Blocking-Puffer) inkubiert. Nach zweimaligen Waschen in Detektionspuffer 1 (je 15 Minuten) und einer Äquilibrierung der Membran für einige Minuten in Detektionspuffer 2 (pH 9.5, Aktivitätsoptimum der alkalischen Phosphatase) erfolgte die Entwicklung des Northernblots durch Zugabe der CDP-Star-Substratlösung (Roche). Für die Signaldetektion wurden Chemilumineszenz-Filme (Roche) aufgelegt und die exponierten Filme mit einer Entwicklermaschine (Optimax Typ TR) entwickelt.

Ladepuffer (400 µl):

250 µl deionisiertes Formamid
83 µl 37% Formamid
50 µl 10x MOPS
4 µl 1% Bromphenolblau
13 µl DEPC Wasser

5l DEPC-Wasser:

mit 0.1 % DEPC
autoklaviert

10x MOPS:

0.4 M MOPS
0.05 M NaAcetat
0.01 M EDTA
0.1% DEPC
auf einen pH-Wert von 7.0
einstellen und autoklavieren

20x SSC:

3 M NaCl
0.3 M Natriumcitrat
0.1 % DEPC
auf einen pH-Wert von 7.0
einstellen und autoklavieren

Methylenblaulösung:

0.02 % Methylenblau
0.3 M NaAcetat (pH5.5)
0.1% DEPC
autoklavieren

Bleaching-Puffer:

0.2x SSC
1% SDS
0.1% DEPC
autoklavieren

Waschpuffer 1:

2x SSC
0.1% SDS
0.1% DEPC
autoklavieren

Waschpuffer 2:

0.1x SSC
0.1% SDS
0.1% DEPC
autoklavieren

Blocking-Puffer:

10 % Blocking-Reagenz
in Detektionspuffer 1

Blocking-Reagenz:

10 % (w/v) gelöstes Blocking-Reagenz
(Roche) in Detektionspuffer 1
(in Mikrowelle aufkochen, autoklavieren und 5 ml Aliquots bei -20°C lagern)

Detektionspuffer 1:

0.1 M Maleinsäure
0.15 M NaCl
0.175 M NaOH
auf pH-Wert von 7.5 einstellen

Detektionspuffer 2:

0.1 M Tris-HCl (pH 9.5)
0.1 M NaCl
0.05 $MgCl_2$

3.6.14.2 Polyacrylamid-Harnstoff-Gel Northernblot

Zur Auftrennung kleinerer RNAs (sRNAs), sowie zur Auftrennung von trunkierten *rpoS* und *rpoS*::*gfp* mRNA-Fragmenten wurden 4-6 %-ige Polyacrylamidgele (PAA-Gele) mit 7 M Harnstoff auf 1x TBE-Basis verwendet. Hierbei wurden (je nach Experiment) 3-8 µg Gesamt-RNA in einem Volumen von 5 µl mit 5µl Formamid-Probenpuffer versetzt und für 15 Minuten bei 65°C denaturiert. Nach dem Abkühlen (5 Minuten auf Eis) wurden die RNA-Proben dann in einem PAA-7M Harnstoff-Gel bei 10 mA mit 1x TBE-Laufpuffer getrennt (je nach Größe des Fragments für 60-90 Minuten). Nach dem Gellauf wurde die RNA auf eine positiv geladene Nylonmembran (Roche), mittels Elektroblotting in einer entsprechenden Blotapparatur (meist Mini-PROTEAN II, BioRad) bei 20 Volt und maximaler Stromstärke für eine Stunde, transferiert. Die geblottete RNA wurde dann durch UV-Licht-Exposition (5 Minuten Crosslinking) auf der Membran fixiert und anschließend zweimal in 2x SSC gewaschen (je 5 Minuten). Die Hybridisierung mit Dig-markierten DNA-Sonden und deren Detektion erfolgten wie für die Agarosegel-Formaldehyd-Northernblots (siehe 3.6.14.1) beschrieben. Für einen Reblot der Membran mit anderen Dig-markierten DNA-Sonden, wie z.B. für die 5S RNA, wurde der Blot „gestrippt“. Hierzu wurde die Membran zweimal für je 10 Minuten in heißem Milli-Q-Wasser inkubiert und danach für 5 Minuten in heißem 2xSSC gewaschen. Im Anschluss daran wurde die Membran in einem Hybridisierungsröhrchen über Nacht im Hybridisierungsofen (Biometra) bei 70°C in 2x SSC (siehe 3.6.14.1) gewaschen. Die Membran konnte dann erneut mit anderen Dig-markierten DNA-Sonden hybridisiert werden. Die Primer für die Herstellung der Dig-markierten DNA-Sonden sind in Tabelle 3.13 aufgelistet.

6 % PAA-Harnstoff-Gel:

7 M Urea (4.2 g)
1.5 ml Gel 40 (Roth)
1 ml10x TBE
80 µl APS (10 %)
10.6 µl TEMED
add 10 ml

Formamid-Probenpuffer:

95 % Formamid (Roth)
0.1 % w/v Xylencyanol
0.1 % w/v Bromphenolblau
10 mM EDTA

10x TBE:

108 g Tris
55 g Borsäure
40 ml 500 mM EDTA pH 8.0
add 1 l mit Milli-Q

Tabelle 3.13: Oligonukleotide zur Herstellung der Dig-markierten DNA-Sonden

Primername	Primersequenz	Dig-Sonde gegen
rpoS 3´NB fw *rpoS* 3´NB rev	5´ CGTTTGCCGATTCACATCGTAAAG 3´ 5´ CGTCATCTTGCGTGGTATCTTC 3´	*rpoS* mRNA 3´-Ende
rpoS 5´NB fw *rpoS* 5´NB rev	5´ GAGTCAGAATACGCTGAAAG 3´ 5´ GTGCGCGACGCGCAAAATAAAC 3´	*rpoS* mRNA 5´-Ende
FMO26 SB32	5´ACGGTTATAAATCAACACATTG 3´ 5´CGGAATTCTAAAAAAAAGCCCATCGT 3´	RprA

DsrA NB fw DsrA NB rev	5´ GTAGCGTTAATCATTCATATGGCG 3´ 5´ GTCTCTGAAGTGAATCGTTGAATG 3´	DsrA
OmrA loc NB fw OmrA loc NB rev	5´CGTGCAGACCACAATCAAGATC 3´ 5´ CGAGCGACAGTAAATTAGGTGCG 3´	OmrA
OmrB loc NB fw OmrB loc NB rev	5´ CTTCAGGTTGCTAAAGTGGTGATC 3´ 5´ CTGTTACAGATTGATGACCGG 3´	OmrB
RyeB NB fw RyeB NB rev	5´ GCTGATGACCACCACGCT 3´ 5´ CGTGCGCTAAAAGTTGGCATTAATGC3´	RyeB
ArcZ NB fw ArcZ NB rev	5´GTGCGGCCTGAAAAACAGTGC 3´ 5´GCGTGGGTGGCAAAAGCCAC 3´	ArcZ
GlmZ NB fw GlmZ NB rev	5´ GTAGATGCTCATTCCATCTC 3´ 5´ CAGGTCTGTATGACAACAAGTG 3´	GlmZ
MicA NB fw MicA NB rev	5´ GAAAGACGCGCATTTGTTATC 3´ 5´ GGCCACTCGTGAGTGGCC 3´	MicA
6S NB fw 6S NB rev	5´ CTCTGAGATGTTCGCAAGCGG 3´ 5´ GAATCTCCGAGATGCCGCCGC 3´	6S
SgrS NB fw SgrS NB rev	5´ GATGAAGCAAGGGGGTGC 3´ 5´ CCAGCAGGTATAATCTGCTGG 3´	SgrS
RydB loc NB fw RydB loc NB rev	5´ CGGCGGGTTAGCTTTATGAG 3´ 5´ GCGACACAGGCTTAAGGGTTTC 3´	RydB
gfp NB fw *gfp* NB rev	5´ GAAGGTGATGCAACATACGG3´ 5´ AATATAGTTCTTTCCTGTACATAACC 3´	*gfp* mRNA
5S NB fw 5S NB rev	5´TGCCTGGCAGTTCCCTACT 3´ 5´TGCCTGGCGGCAGTAG 3´	5S RNA

3.6.15 Bestimmung der Halbwertszeit der *rpoS* mRNA *in vivo*

Bei der Bestimmung der Abbaurate einer RNA *in vivo* wird die Transkription durch Zugabe des Transkriptions-inhibierenden Antibiotikums Rifampicin zu einer wachsenden Bakterienkultur inhibiert. In den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten wurde die Stabilität der *rpoS* mRNA durch Zugabe von Rifampicin (500 µg/ml Endkonzentration) bestimmt. Dabei wurden unmittelbar vor Zugabe des Antibiotikums, so wie zu unterschiedlichen Zeitpunkten danach Proben für die Gesamt-RNA-Präparation (3.6.13) entnommen und die isolierten RNAs der Northernblot-Analyse (3.6.14) zugeführt.

4 ERGEBNISSE

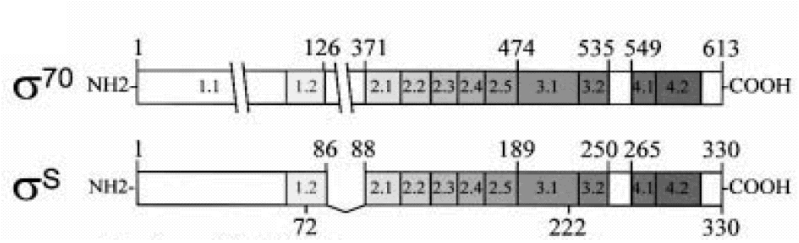
4.1 Der Einfluss von raren Codons auf die Expression von RpoS

4.1.1 Die *rpoS* mRNA enthält signifikant mehr rare Codons als die *rpoD* mRNA

RpoD und RpoS sind phylogenetisch eng miteinander verwandt. Als Angehörige der Gruppe 1 bzw. 2 der σ^{70}-Familie weisen beide die typischen vier Regionen auf (Helmann, 2011) und ebenso eine stark übereinstimmende Subdomänenstruktur (Abbildung 4.1 A). Während die N-terminale Domäne strukturell weniger definiert ist, faltet sich die Kernregion beider Sigmafaktoren in drei α-helikale Domänen. Anders als bei RpoD, in welchem die N-terminale Domäne und die C-terminale Kernregion zwischen den Domänen 1 und 2 durch eine aus etwa 240 Aminosäuren bestehende Linker-Region voneinander getrennt sind, grenzen diese beiden Domänen in σ^S unmittelbar aneinander. In den Regionen, die beiden Sigmafaktoren gemein ist, beträgt die Sequenzidentität in *E. coli* 42% (Hengge, 2011). Doch vergleicht man die DNA-Sequenzen beider Sigmafaktoren, so fällt auf, dass (bezogen auf beiden Sigmafaktoren gemeinsame Regionen) innerhalb von *rpoS* mehr als doppelt soviele Aminosäuren von raren Codons spezifiziert werden (16.7 %), wie in der *rpoD* Sequenz (7 %) (siehe Alignment in Abbildung 4.1 B, durch rote Buchstaben markiert). Weiterhin werden in der *rpoS* Sequenz an elf verschiedenen Positionen Aminosäuren durch rare Codons spezifiziert, die innerhalb von *rpoD* durch gleiche (homologe) Aminosäuren kodiert werden, welche von synonymen häufigeren Codons spezifiziert werden (gelb hinterlegte rot markierte Buchstaben in Abbildung 4.1 B). In Tabelle 4.1 sind diese elf Aminosäuren aufgelistet, mit ihren jeweiligen Positionen in σ^S bzw. σ^{70} und den zugrundeliegenden Codons, mit deren Häufigkeiten in *E. coli* (in % relativ zum häufigsten Codon, das die jeweilige Aminosäure spezifiziert; nach Wu und Saier, 1991).

Dies wirft die Frage auf, ob das verstärkte Auftreten von raren Codons in *rpoS* eine Folge evolutiven Mutationsdrucks und/oder genetischer Drift darstellt (Bulmer, 1991; Ermolaeva, 2001; Hershberg und Petrov, 2008; Smith und Eyre-Walker, 2001), zumal RpoS überwiegend in langsamen oder nichtwachsenden Zellen exprimiert wird und ein Selektionsdruck zugunsten von häufigeren Codons für eine effiziente und starke Translation

A



B

```
                                   10                  20                  30        40          50          60        70
RpoS    MSQNT---LK----------------VHD-LNEDA-----------EFDENGVEVFDEKA-----LVEYEPSDNDLAEE--ELLSQGATQ--RVLDATQLYLGEIGYSPL
        : ::    ::                :.: : ::             ... :..:..:       .. .. .: : ::   ..::.  ..  :. : ...:. :.:   :
RpoD    MEQNPQSQLKLLVTRGKEQGYLTYAEVNDHLPEDIVDSDQIEDIIQMINDMGIQVMEEAPDADDLMLAENTADEDAAEAAAQVLSSVESEIGRTTDPVRMYMREMGTVEL
                10        20        30        40        50        60        70        80        90       100       110

                80                          90          100       110       120       130       140       150
RpoS    LTAEEEVYFARRA...(2 aa)...........GDVASRR---RMIESNLRLVVKIARRYGNRGLALLDLIEEGNLGLIRAVEKFDPERGFRFSTYATWWIRQTIE
        :: : :. .:.:                    :.. .::   .:.:.:::::..::..: :::: .::::.:::.::..::.::. .::..::::::::::::.:
RpoD    LTREGEIDIAKRI...(243 aa).........GEAKARRAKKEMVEANLRLVISIAKKYTNRGLQFLDLIQEGNIGLMKAVDKFEYRRGYKFSTYATWWIRQAIT
                                         370       380       390       400       410       420       430       440

          160       170       180       190       200       210       220       230       240       250       260
RpoS    RAIMNQTRTIRLPIHIVKELNVYLRTARELSHKLDHEPSAEEIAEQLDKPVDDVSRMLRLNERITSVDTPLGGDSEKALLDILADEKENGPEDTTQDDDMKQSIVKWLFE
        :.: .:.::::.:.:... .:   : .:.. ... .::. ::.::..  : : . ..:.. ..  :..::.: : .. : :.. :   . : :..  .... .    :
RpoD    RSIADQARTIRIPVHMIETINKLNRISRQMLQEMGREPTPEELAERMLMPEDKIRKVLKIAKEPISMETPIGDDEDSHLGDFIEDTTLELPLDSATTESLRAATHDVLAG
                450       460       470       480       490       500       510       520       530       540       550

          270       280       290       300       310       320       330
RpoS    LNAKQREVLARRFGLLGYEAATLEDVGREIGLTRERVRQIQVEGLRRLREILQTQGLNIEALFRE
        :.:.. .::  :::.      :::.::... .::::.:::....::.::.  ... :  .... .
RpoD    LTAREAKVLRMRFGIDMNTDYTLEEVGKQFDVTRERIRQIEAKALRKLRHPSRSEVL--RSFLDD
                560       570       580       590       600       610
```

Abbildung 4.1: In RpoS werden viele Aminosäure verstärkt von raren Codons spezifiziert, unter anderem auch solche, die von konservierten Aminosäuren in RpoD durch häufigere Codons spezifiziert werden. (**A**) (aus Checroun *et al*., 2004) Trotz der großen Übereinstimmung von RpoS und RpoD in ihrer Domänen- und Subdomänenstruktur werden (**B**) in RpoS mehr als doppelt soviele Aminosäuren von raren Codons (rot markierte Buchstaben im RpoS-RpoD-Alignment in B) spezifiziert, wie in RpoD. Darüber hinaus werden in RpoS verstärkt auch solche raren Codons verwendet, die bei konservierten Aminosäuren in RpoD durch häufigere Codons spezifiziert werden (gelb hinterlegte, rote markierte Buchstaben).

Tabelle 4.1: Rare Aminosäure-Codons in *rpoS*, die in *rpoD* durch häufigere synonyme Codons repräsentiert werden (rare Codons in *E. coli* nach Grantham *et al*., 1980; Ikemura, 1985; Wu und Saier, 1991; Wu *et al*., 2010).

aa position in RpoS	aa position in RpoD	rare codons *rpoS* (% frequenc y in *E.coli*)	frequent c odons *rpoD* (% frequenc y in *E.coli*)
G 86	G 368	GGA (0%)	GGT (59%)
G 126	G 411	GGG (2%)	GGT (59%)
S 47	S 85	TCG (4%)	TCC (37%)
S 143	S 428	TCA (2%)	TCC (37%)
S 221	S 506	TCG (4%)	TCC (37%)
T 144	T 429	ACA (4%)	ACC (55%)
R 156	R 441	CGG (0%)	CGC (25%)
R 180	R 465	CGA (1%)	CGT (74%)
R277	R 562	CGA (1%)	CGT (74%)
P 193	P 478	CCA (15%)	CCG (77%)
P 205	P 490	CCA (15%)	CCG (77%)

nicht unbedingt notwendig erscheint. Eine andere dem entgegengesetzte Möglichkeit wäre, dass die raren Codons in *rpoS* einem positiven Selektionsdruck unterliegen. Letzteres würde darauf hindeuten, dass den raren Codons in *rpoS* eine positive regulatorische Funktion zukommt.

4.1.2 Die Substitution der raren Codons im *rpoS* Wildtyp durch häufigere synonyme *rpoD* Codons führt zu erniedrigten *rpoS* mRNA und RpoS-Proteinmengen

RpoS und RpoD repräsentieren zwei sehr ähnliche co-evolvierte Isoenzyme, die beide an das RNAP-Kernenzym binden und ähnliche Promotorsequenzen erkennen, aber dennoch eigene Regulons aktivieren und bezüglich ihrer Codon-Usage auffällige Unterschiede aufweisen. Um einen möglichen Einfluss der in *rpoS* verstärkt auftretenden raren Codons auf dessen Expression und Regulation zu untersuchen, wurde eine Codon-„optimierte“ *rpoS* Variante (nachfolgend *rpoS* Codonmutante genannt) über eine *in vitro* Mutagenese erzeugt (siehe 3.6.7.1). Bei dieser *rpoS* Codonmutante wurden die 11 raren Codons, die bei konservierten Aminosäuren in der *rpoD* Wildtyp-Sequenz durch abundantere Codons repräsentiert werden (siehe Tabelle 4.1), durch die häufigeren *rpoD* Codons substituiert. Eingeführt wurden entsprechende Punktmutationen in einen Vektor mittlerer Kopienzahl, der das *rpoS* Gen mit sehr stark verkürzter 5´-UTR unter Kontrolle eines IPTG-induzierbaren *tac* Promotors enthält (pRL40.1; Lange und Hengge-Aronis, 1994a), so dass die Expression gezielt durch Zugabe von IPTG initiiert werden konnte. Das *rpoS* Wildtyp- und das Codon-mutagenisierte Derivat von pRL40.1 (pRpoS(wt) bzw. pRpoS(codon mt)) wurden anschließend jeweils in einen RpoS-defizienten *E. coli* K-12 W3110 Stamm transformiert (*rpoS*::kan Mutante, Stamm TK11). Die Induktion von RpoS erfolgte dabei in komplexem Medium (LB) beim Übergang in die stationäre Phase bei einer OD_{578} von 3.0 (bei der auch unter physiologischen Bedingungen RpoS induziert wird). Durch Zugabe von 100 µM IPTG wurden RpoS-Proteinmengen hervorgebracht, die mit den physiologischen Mengen vergleichbar sind. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach IPTG-Zugabe (siehe Abb. 4.2) wurden den Kulturen anschließend Proben für Western- und Northernblot-Analysen entnommen. Die Extraktion von Gesamtprotein für die Immunoblotanalysen und die Präparation von Gesamt-RNA für die Northernblot-Analysen erfolgte dabei wie im Material-und Methodenteil unter 3.5.1 bzw. 3.6.13 beschrieben.

Wie aus Abbildung 4.2 hervorgeht, wies die vermeintlich „optimierte“ *rpoS* Codonmutante mit den häufigeren Codons gegenüber dem *rpoS* Wildtyp mit den raren Codons entgegen der Erwartung sowohl reduzierte σ^S-Proteinmengen, als auch erniedrigte *rpoS* Transkriptmengen auf. Hierbei waren die RpoS-Proteinmengen der Codonmutante im Vergleich zum Wildtyp um etwa 30-60% reduziert, unabhängig davon ob die Synthese neu induziert wurde oder die Zellen unter fortwährender Anwesenheit des Induktors wuchsen. In Übereinstimmung damit waren auch die *rpoS* mRNA Mengen um etwa 50% erniedrigt.

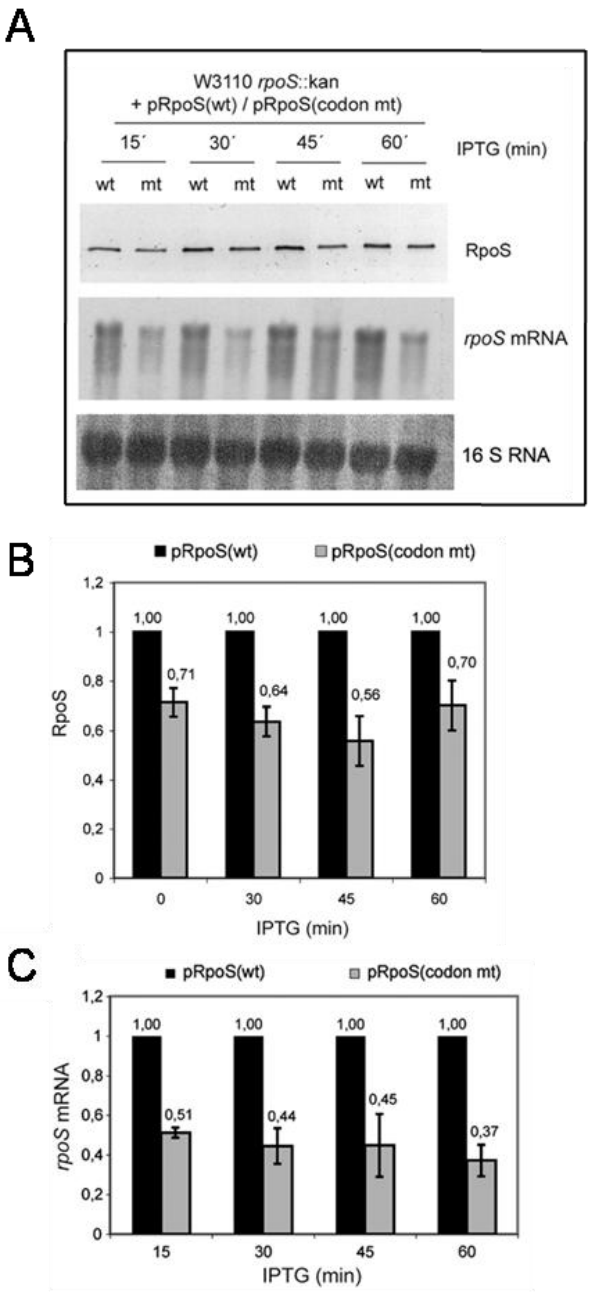


Abbildung 4.2: Die *rpoS* Codonmutante mit den häufigeren Codons führt im Vergleich zum Wildtyp zu niedrigeren Mengen an σ^S-Protein und *rpoS* mRNA. (**A**) Das RpoS-defiziente Derivat des Stammes W3110 (*rpoS*::kan) wurde mit jeweils einem Plasmid transformiert, dass das *rpoS* Wildtyp-Allel („wt“) oder die *rpoS* Codonmutante („mt“) (rare Codons durch häufigere ersetzt) unter *tac* Promotorkontrolle trägt. Die Stämme wurden unter aeroben Bedingungen in komplexem LB-Medium bei 37°C (supplementiert mit 100 µg/ml Ampicillin) bis zu einer OD_{578} von 3.0 herangezogen und die Expression von *rpoS* durch Zugabe vom 100 µM IPTG induziert. Anschließend wurden zu den angegebenen Zeiten nach IPTG-Induktionen Proben für Western- und Northernblot-Analysen entnommen. Hierzu wurde jeweils 1 µg Gesamtprotein auf einem 12%-igen SDS-Polyacrylamidgel für die sich anschließende Immunoblotanalyse elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Membran erfolgte die Detektion von RpoS mit einem polyklonalen, gegen RpoS gerichteten Antikörper und einem fluoreszierenden sekundären Anti-Kaninchen Cy2-gekoppelten IgG-Antikörper (beschrieben unter 3.5.2). Für die Bestimmung der *rpoS* mRNA wurden jeweils 10 µg Gesamt-RNA auf einem denaturierenden 1.2%-igen Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Nylonmembran erfolgte die Detektion des *rpoS* Transkripts mit einer gegen das *rpoS* mRNA 3´-Ende gerichteten DIG-markierten Sonde und einem gegen DIG gerichteten Antikörper, wie unter 3.6.14.1 beschrieben. Als Ladungskontrolle für den Northernblot erfolgte die Anfärbung der geblotteten 16S RNA durch Methylenblau-Färbung. Die Quantifizierung der Westernblot- und Northernblotdaten ist in (**B**) bzw. (**C**) gezeigt. Während in (A) ein einzelnes Experiment gezeigt ist, sind in den Quantifizierungen in (B) und (C) die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten gezeigt.

4.1.3 Die Substitution der raren Codons durch häufigere in der *rpoS* Codonmutante geht mit einem schnelleren Abbau der *rpoS* mRNA einher

Da die *rpoS* Codonmutante gegenüber dem *rpoS* Wildtyp sowohl erniedrigte RpoS-Proteinmengen als auch reduzierte *rpoS* Transkriptmengen aufweist, stellte sich die Frage, ob ein beschleunigter Abbau der *rpoS* mRNA für diese Beobachtungen verantwortlich ist. Um dies zu klären, wurden RNA-Abbauexperimente mittels Rifampicin-Kinetiken durchgeführt (siehe Material- und Methodenteil 3.6.15). Hierzu wurden *rpoS* Wildtyp und Codonmutante von einem Plasmid durch Zugabe von IPTG in einem RpoS-defizientem Hintergrund unter gleichen Wachstumsbedingungen wie unter 4.1.2 beschrieben bei einer OD_{578} von 3.0 induziert. 15 Minuten nach IPTG-Induktion erfolgte die Zugabe des Transkriptions-inhibierenden Antibiotikums Rifampicin (0.5 mg/ml Endkonzentration). Vor und nach Zugabe von Rifampicin wurden Proben für die Gesamt-RNA-Präparation entnommen, Gesamt-RNA isoliert und die entsprechenden *rpoS* mRNA-Mengen in Northernblot-Analysen bestimmt. Zusätzlich wurden auch vor Rifampicin-Zugabe Proben für die Extraktion von Gesamtprotein entnommen und die σ^S-Proteinspiegel mittels Immunoblot-Analysen bestimmt.

Wie die *in vivo* Abbauexperimente mit der *rpoS* mRNA in Abbildung 4.3 demonstrieren, wird das Transkript der *rpoS* Codonmutante mit den häufigeren Codons mit einer Halbwertszeit von etwa 0.9 Minuten doppelt so schnell abgebaut wie die mRNA des *rpoS* Wildtyps mit den raren Codons, deren Halbwertszeit 1.8 Minuten beträgt. Wie zuvor beobachtet, geht der schnellere Abbau der *rpoS* mRNA der Codonmutante gegenüber der mRNA des Wildtyps mit einer 2-3 fachen niedrigeren Akkumulation von *rpoS* Transkript bzw. σ^S-Protein einher. Weiterhin wurde der *rpoS* mRNA Abbau des Wildtyps und der Codonmutante, wie oben im Text beschrieben, bei niedrigeren Temperaturen (24°C und 16°C) untersucht. Auch hier zeigte sich, dass die Halbwertszeit der mRNA der *rpoS* Codonmutante gegenüber jener des *rpoS* Wildtyps etwa um den Faktor 2 erniedrigt ist. Die Daten sind in Tabelle 4.2 zusammengefasst. Die Ergebnisse deuten also darauf hin, dass die reduzierten *rpoS* mRNA und RpoS-Proteinmengen, die durch das punktmutierte häufige Codon Allel hervorgebracht werden, eine Konsequenz des gesteigerten mRNA Abbaus der Codonmutante sein könnten.

4.1.4 Die häufigeren Codons der *rpoS* Codonmutante führen zu einer erhöhten Sensitivität der *rpoS* mRNA gegenüber der einzelstrangspezifischen Endoribonuklease RNase E

In jüngerer Zeit konnten mit der doppelstrangspezifischen RNase III und einzelstrangspezifischen RNase E, welche die primären degradativen Endonukleasen für den

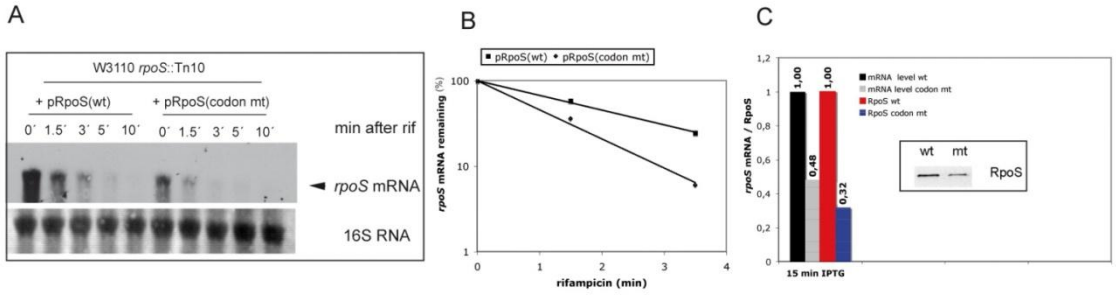


Abbildung 4.3: Die Substitution der raren Codons des *rpoS* Wildtyps durch häufigere synonyme Codons in der *rpoS* Codonmutante geht mit einer Destabilisierung der *rpoS* mRNA einher. (**A**) Die Stammhintergründe und Wachstumsbedingungen entsprechen den unter 4.1.2 und in Legende zu Abbildung 4.2 beschriebenen. 15 Minuten nach Zugabe von IPTG erfolgte die Inhibierung der Transkription durch Rifampicin. Zu den angegeben Zeiten wurden anschließend Proben für die RNA-Isolation entnommen und die *rpoS* Transkriptmengen mittels Northernblot-Analyse bestimmt (wie in Legende zu Abbildung 4.2 beschrieben). (**B**) Quantifizierung der Daten aus Abbildung 4.3 (A). (**C**) Gleichzeitig wurden die RpoS-Proteinmengen aus den gleichen Kulturen vor Rifampicinzugabe durch Westernblot-Analyse (siehe Legende Abbildung 4.2) bestimmt und quantifiziert, ebenso die *rpoS* mRNA-Mengen vor Rifampicin-Zugabe (Wildtyp („wt“) versus Codonmutante („mt“)) aus Abbildung 4.3 (A).

mRNA Abbau in *E. coli* darstellen (Arraiano *et al*., 2010), zwei Endoribonukleasen identifiziert werden, die am Abbau der *rpoS* mRNA beteiligt sind (Basineni *et al*., 2009; McCullen *et al*., 2010; Resch *et al*., 2008). Daraus ergab sich unmittelbar die Frage, ob eine und/oder beide Endoribonukleasen an dem im Vergleich zum Wildtyp beschleunigten Abbau der *rpoS* mRNA der Codon-„optimierten“ Mutante beteiligt sind. Um dies zu testen, wurde der *rpoS* mRNA Abbau in Stammhintergründen untersucht, die Mutationen in den Genen für RNase III (*rnc*) und RNase E (*rne*) tragen. Im Falle von RNase E handelt es sich um eine Temperatur-sensitive RNase E Mutante (rne^{ts}: thermolabiles *rne*-3071 Allel), bei der die thermoinstabile RNase E ab einer Temperatur von 43°C inaktiviert wird (Goldblum und Apririon, 1981). RNase E ist in *E. coli* ein essentielles Enzym, da es neben seiner Aktivität als Endoribonuklease auch das strukturelle Gerüst für die Assemblierung des RNA-Degradosomes darstellt (Arraiano *et al*., 2010; Carpousis, 2007). Um den mRNA Abbau des *rpoS* Wildtyps und der *rpoS* Codonmutante in den Endoribonuklease-defizienten Hintergründen zu untersuchen, wurden die bereits zuvor beschriebenen Vektoren (siehe 4.1.2 und 4.1.3) in RpoS-defiziente Hintergründe transformiert (*rpoS*::Tn10 Derivate des *E. coli* K12 Stammes MG1655), die auch Mutationen in den Genen für RNase III (rnc^{-}) und RNase E (rne^{ts}) tragen, sowie in den isogenen RNase E Wildtypstamm (rne^{+}) als Kontrollexperiment. Die *rnc* Mutante wurde anschließend bis zu einer OD_{578} von 3.0 in LB-Medium bei 37°C kultiviert und die *rpoS* Expression durch IPTG-Zugabe induziert. 15 Minuten danach wurde die Trankription durch Rifampicin inhibiert und zu verschiedenen Zeitpunkten Proben für die

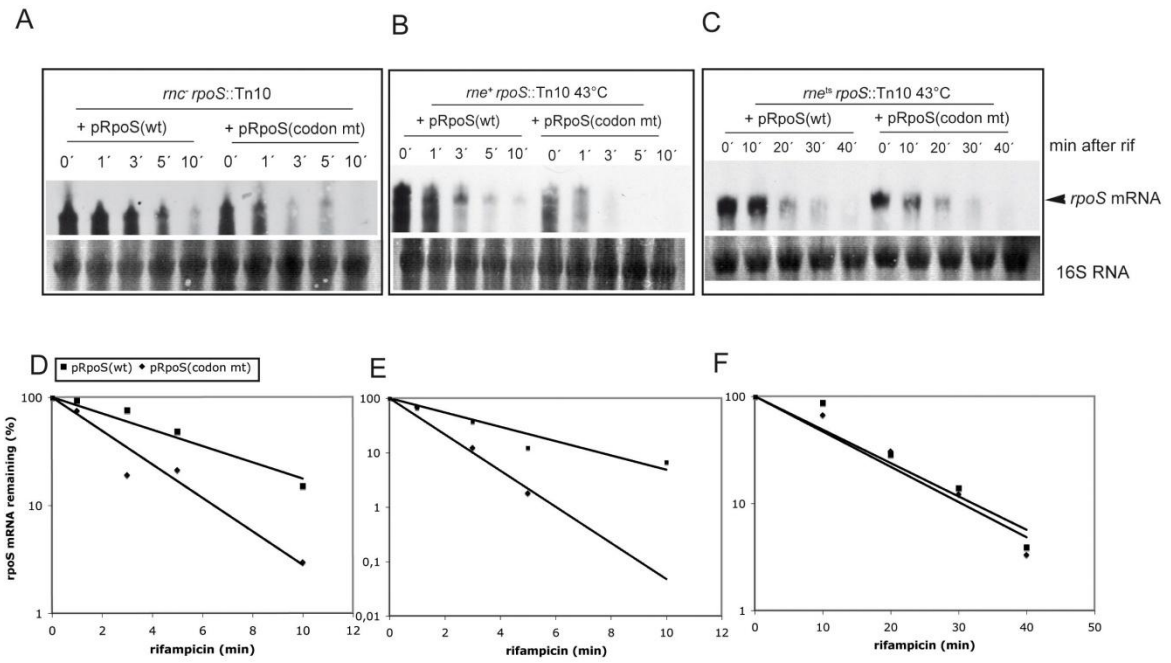


Abbildung 4.4: Die mRNA der *rpoS* Codonmutante zeigt eine höhere Sensitivität gegenüber dem RNase E-, nicht aber gegenüber dem RNase III-abhängigen Abbau als jene des *rpoS* Wildtyps. *rpoS*::Tn10 Derivate der *rnc* Mutante BL321 (**A**), sowie des *rne*$^{+}$ Wildtypstammes N3433 (**B**) und der isogenen *rne*^{ts} Mutante N3431 (**C**) die entweder das Plasmid mit dem *rpoS* Wildtyp- oder das punktmutierte häufige Codon-Allel tragen, wurden unter gleichen Bedingungen wachsen gelassen, mit Rifampicin behandelt und auf den *rpoS* mRNA Abbau hin untersucht, wie in den Legenden zu Abbildungen 4.2 und 4.3 und im Text beschrieben. Mit der Änderung, dass vor Rifampicin-Zugabe der *rne*$^{+}$ Wildtypstamm und die isogene *rne*^{ts} Mutante bis zu einer OD_{578} von 3.0 bei 30°C kultiviert wurden und nach IPTG-Zugabe, zur Inaktivierung der RNase E, für 15 Minuten auf 43°C geshiftet wurden. Die Quantifizierungen zu den *rpoS* mRNA Abbaureihen befinden sich in den Abbildungen unterhalb des jeweiligen Northernblots (**D**, **E** und **F**).

Tabelle 4.2: *rpoS* mRNA Halbwertszeiten in verschiedenen Stamm-Hintergründen (W3110 und RNase-Mutanten und isogene Wildtyp-Kontrollen) (aus den Daten aus 4.1.3 und Abb. 4.3 und 4.4).

genetic background and growth conditions	half-life *rpoS* mRNA wt [min]	half-life *rpoS* mRNA codon mt [min]
W3110 *rpoS*::Tn10 37°C	1.8	0.9
W3110 *rpoS*::Tn10 24°C	2.37	1.13
W3110 *rpoS*::Tn10 16°C	4.44	2.39
rnc^{-} (RNase III) 37°C	3.99	1.94
rne wt (RNase E wt) 43°C	2.5	1.4
rne^{ts} (RNase E ts 43°C)	9.65	9.14

RNA-Isolation entnommen und die *rpoS* Transkriptmengen mittels Northernblot-Analyse bestimmt. Ähnlich wurde auch für die *rne*^{ts} Mutante und den isogenen *rne*$^{+}$ Wildtypstamm vorgegangen, nur dass die Kulturen bis zu einer OD_{578} von 3.0 bei 30°C inkubiert wurden und nach Zugabe des Induktors bei 43°C kultiviert wurden, um die Inaktivierung der RNase E herbeizuführen. 15 Minuten nach dem Temperaturshift erfolgte dann die Zugabe von Rifampicin. Wie aus Abbildung 4.4 A hervorgeht, war der bereits beobachtete zweifache Unterschied in den Halbwertszeiten der *rpoS* mRNA zwischen Wildtyp und Codonmutante, mit dem schnelleren mRNA Abbau für letztere, auch in der RNase III-Mutante reproduzierbar

(Abbildung 4.4 A und D Tabelle 4.2). Die Inaktivierung der RNase E jedoch führte erwartungsgemäß nicht nur zu einer Verlangsamung des *rpoS* mRNA Abbaus (etwa vierfache Stabilisierung im Falle des *rpoS* Wildtyps), sondern auch zu einer Angleichung der mRNA Halbwertszeiten von *rpoS* Wildtyp und Codonmutante (Abbildung 4.4 C und F, Tabelle 4.2). Der Temperaturshift auf 43°C im isogenen RNase E Wildtypstamm dagegen hatte keinen Einfluss auf den schnelleren mRNA Abbau der *rpoS* Codonmutante gegenüber dem *rpoS* Wildtyp (Abbildung 4.4 B und E, Tabelle 4.2). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass der beschleunigte mRNA Abbau der *rpoS* Codonmutante gegenüber dem *rpoS* Wildtyp eine Folge der erhöhten Zugänglichkeit oder Aktivität gegenüber RNase E darstellt. Die Sensitivität gegenüber dem RNase III-abhängigen Abbau scheint von den Änderungen in der Codon-Usage unbeeinflusst zu bleiben.

4.1.5 Die Effekte der raren Codons in *rpoS* sind unabhängig von anderen Mechanismen der *rpoS* Regulation (chromosomaler Kontext) und Wachstumsbedingungen

Alle bisher dargestellten Ergebnisse beruhen auf Plasmid-kodierten *rpoS* Allelen (pRL40.1 und sein *rpoS* mutiertes häufiges Komplement) die eine chromosomale *rpoS* Deletion komplementieren. Bei diesem kontrollierbaren *rpoS* Expressionssystem steht die Expression der kodierenden *rpoS* Sequenz (ohne die lange 5´-UTR) unter direkter Kontrolle eines IPTG-induzierbaren *tac* Promotors. Die aus der chromosomalen *rpoS* Expression resultierende native *rpoS* mRNA enthält eine lange 5´-UTR, die sich in eine komplexe Translations-inkompetente Sekundärstruktur faltet und in Antwort auf verschiedene Stressbedingungen durch kleine regulatorische RNAs zu einer Translations-kompetenten mRNA moduliert werden kann (Repoila *et al*., 2003). Um zu untersuchen, ob die negativen Effekte der *rpoS* Codonmutante in Bezug auf die σ^S-Expression auch im chromosomalen Kontext unter physiologischer Transkriptions- und Translationskontrolle zu beobachten ist, wurde eine chromosomale *rpoS* Codonmutante erzeugt. Hierzu wurde das chomosomale *rpoS* Wildtyp-Allel des W3110 Stammes durch das punktmutierte häufige Codon-Allel von *rpoS* substituiert. Dies geschah mittels homologer Rekombination nach einer von Datsenko und Wanner entwickelten chromosomalen „Two-Step“-Mutagenese, die auf einer modifizierten Variante der „One-Step Inactivation“ basiert (Datsenko und Wanner, 2000; siehe Material und Methoden 3.6.12). Der resultierende Stamm TK81 (chromosomale *rpoS* Codonmutante) und sein parentaler W3110 *rpoS* Wildtypstamm wurden anschließend, sowohl in komplexem LB-Medium, als auch in M9 Minimalmedium (mit 0.1% Glukose als Kohlenstoffquelle) bei 37°C unter aeroben Bedingungen bis zum Übergang in die stationäre Wachstumsphase kultiviert (OD_{578} von 3.0 in LB bzw. 0.8 in M9) und Proben für die Bestimmung der σ^S-Proteinmengen entnommen. Im Anschluss daran wurden die Zellen mit Rifampicin behandelt

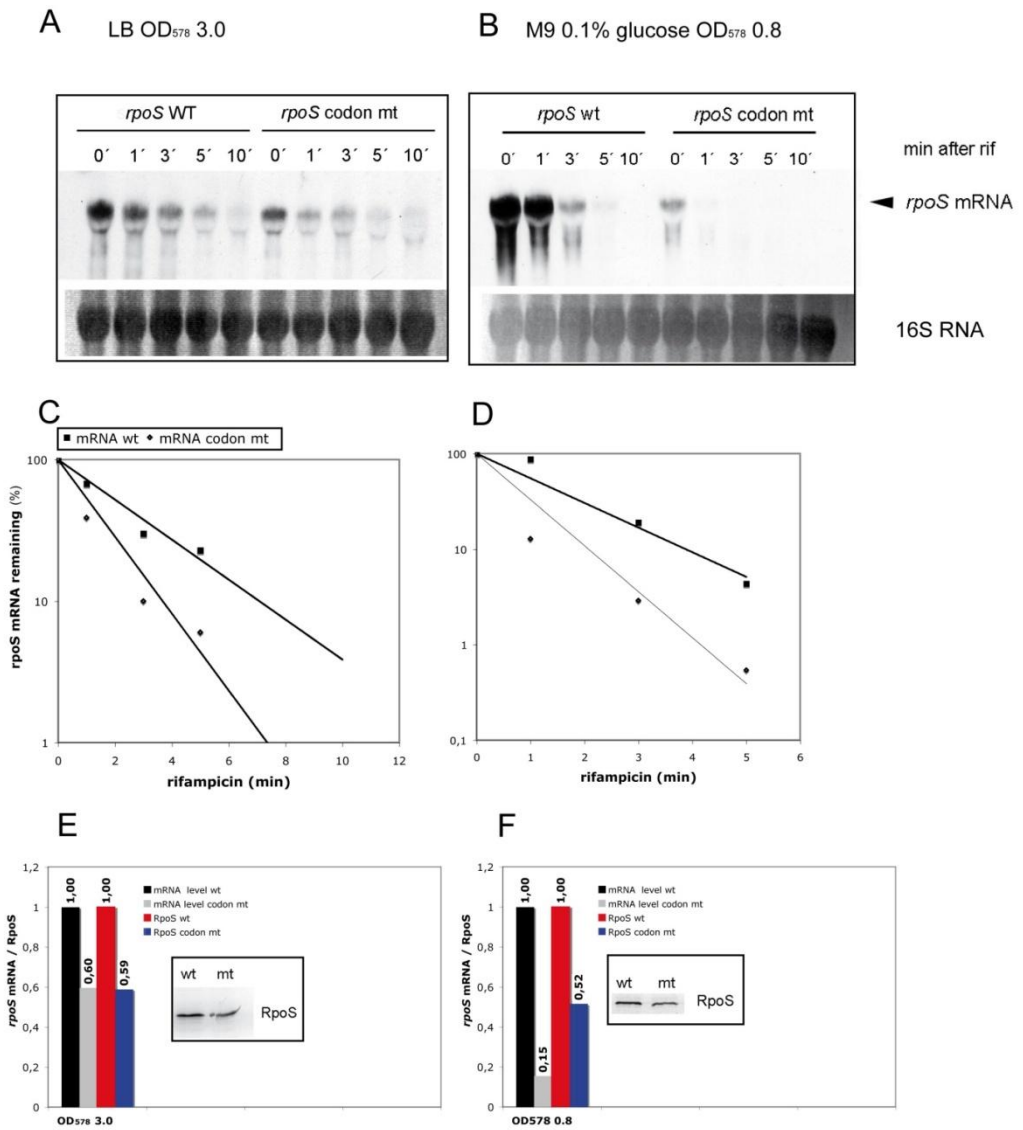


Abbildung 4.5: Die chromosomale *rpoS* Codonmutante mit dem single-copy Codon-Allel zeigt ebenfalls einen gegenüber der *rpoS* Wildtyp mRNA beschleunigten Abbau, einhergehend mit erniedrigter Akkumulation von σ^S-Protein. Der *rpoS* W3110 Wildtypstamm und die isogene *rpoS* Codonmutante wurden bei 37°C in LB-Medium (**A**) und in M9-Minimalmedium mit 0.1% Glukose (**B**) bis zum Übergang in die stationäre Phase kultiviert (OD_{578} von 3.0 bzw. 0.8) und Proben für die Bestimmung der RpoS-Proteinmengen entnommen. Anschließend wurden die Kulturen mit Rifampicin versetzt und Proben für die Gesamt-RNA Isolation zur Bestimmung der Halbwertszeiten der *rpoS* Transkripte entnommen. Die Bestimmung der RpoS-Proteinmengen erfolgte wie in der Legende zu Abbildung 4.2 und im Material und Methoden beschrieben, mit der Ausnahme das jeweils 5 µg Gesamtprotein eingesetzt wurde. Ebenso wurde der *rpoS* mRNA Abbau mittels Northernblot-Analysen, wie in Legende zu Abbildung 4.3 und im Material- und Methodenteil beschrieben, durchgeführt. (**C**) und (**D**) zeigen die Quantifizierungen der jeweiligen *rpoS* mRNA Abbaureihen der jeweiligen Northernblot-Analysen (oben). Die vor Rifampicin-Zugabe akkumulierten und quantifizierten *rpoS* Transkript- (aus den Abbildungen 4.5 A und B) und RpoS-Proteinmengen für Wachstum in LB- (**E**) und Minimalmedium (**F**) sind in den Abbildungen (E und F) dargestellt.

und Proben vor und nach Rifampicin-Zugabe zur Bestimmung der *rpoS* mRNA Halbwertszeiten entnommen.

Wie Abbildung 4.5 A und B illustrieren, wies die *rpoS* Codonmutante auch im chromosomalen Kontext sowohl in LB-Medium, als auch in M9-Minimalmedium einen

gegenüber dem *rpoS* Wildtyp beschleunigten *rpoS* mRNA Abbau auf. Während das *rpoS* Wildtyp-Transkript in LB-Medium eine Halbwertszeit von 1.77 Minuten aufwies, wurde die mRNA der Codonmutante mit einer Halbwertszeit 0.73 Minuten abgebaut (Abbildung 4.5 A und C). Ein ähnliches Resultat lieferte die Bestimmung des *rpoS* mRNA Abbaus (Wildtyp versus Codonmutante) in Minimalmedium (1.17 Minuten versus 0.63 Minuten, Abbildung 4.5 B und D). Der beschleunigte Abbau der *rpoS* mRNA der häufigen Codonmutante ging auch wiederum mit im Vergleich zum *rpoS* Wildtyp reduzierten Transkript- und Proteinmengen einher (Quantifizierungen in 4.5 E für LB-Medium und 4.5 F für Minimalmedium), wobei der negative Effekt der häufigen Codons der *rpoS* Mutante bei Wachstum in Minimalmedium offenbar stärker ausfiel.

Zusammenfassend lässt sich also festhalten, dass der positive Effekt der raren Codons des *rpoS* Wildtyps bezüglich der *rpoS* Expression sowohl im Plasmid- als auch im chromosomalen Kontext reproduzierbar ist, also unabhängig von der physiologischen Kontrolle der *rpoS* Transkription und der An- oder Abwesenheit der nativen 5´-UTR, und damit unabhängig von der Regulation der Translations-Initiation zu sein scheint. Weiterhin scheint der Effekt auch robust gegenüber den verschiedenen Wachstumsbedingungen zu sein (LB-Medium und M9-Minimalmedium), da er in beiden Medien reproduzierbar ist.

4.1.6 Die *rpoS* Codon-Usage hat keinen Einfluss auf die Proteolyse des RpoS-Proteins

Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass mit raren Codons einhergehende lokale Minima in der Translationsgeschwindigkeit, verbunden mit Pausierungen der Ribosomen, für die co-translationale Faltung von Proteinen in ihre native Konformation von großer Bedeutung sein können (Komar, 2009; Marin, 2008; Tsai *et al*., 2008; Zhang *et al*., 2009; Zhang und Ignatova 2011). Daher ist es denkbar, dass der Austausch der raren Codons durch abundantere in der *rpoS* Codonmutante zu einer Eliminierung der für die korrekte co-translationale Faltung notwendigen Pausierungen der Ribosomen führt. Daraus resultierendes unvollständig und/oder fehlgefaltetes RpoS-Protein könnte möglicherweise anschließend von der Maschinerie des Protein-Qualitätskontrollsystem, also Proteasen wie Lon, ClpAP und ClpXP (Schmidt *et al*., 2009; Van Melderen und Aertsen, 2009), erkannt und verstärkt abgebaut werden. RpoS unterliegt der spezifischen regulierten ClpXP-abhängigen Proteolyse (Hengge, 2009). Um einen möglichen Effekt der Codon-Bias in *rpoS* auf die Faltung und Stabilität von σ^S zu untersuchen, wurden nichtradioaktive Abbauexperimente durchgeführt. Hierzu wurden *rpoS* Wildtyp und Codonmutante vom *tac* Promotor-Plasmid in einer *rpoS* Mutante beim Eintritt in die stationäre Wachstumsphase induziert und die weitere Proteinbiosynthese durch Zugabe des Translations-inhibierenden Antibiotikums Spectinomycin (1.5 mg/ml Endkonzentration)

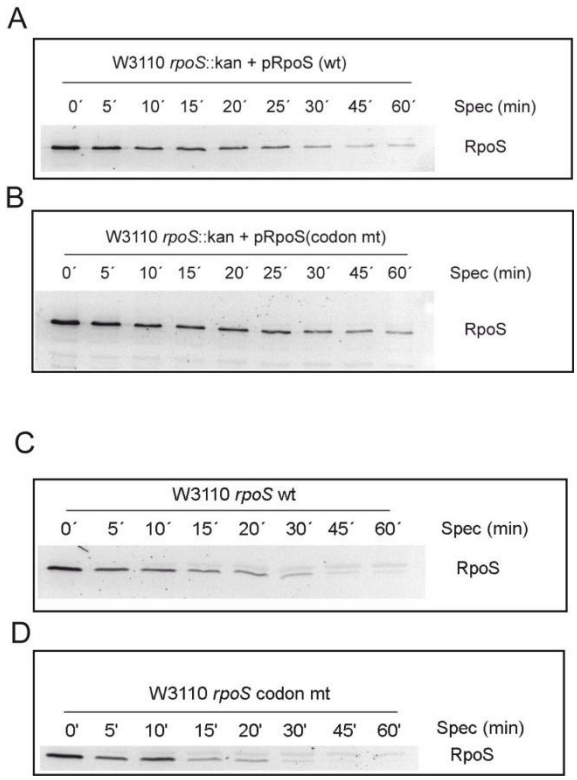


Abbildung 4.6: *In vivo* Proteolyse von σ^S exprimiert vom (raren Codon) Wildtyp- und mutiertem häufigen Codon *rpoS* Allel. (**A**) und (**B**): *rpoS* Wildtyp und Codonmutante auf einem *tac* Promotor-Plasmid kodiert, wurden in *E. coli* K-12 W3110 *rpoS*::kan Hintergründen in LB-Medium bei 37°C bis zu einer OD_{578} von 3.0 kultiviert und die σ^S-Expression durch Zugabe von 100 µM IPTG induziert. 30 Minuten später erfolgte die Zugabe von Spectinomycin (1.5 mg/ml). Vor und nach Spectinomycinzugabe wurden den Kulturen zu den angegebenen Zeitpunkten Proben für die RpoS-Detektion mittels Westernblot-Analyse entnommen. (**C**) und (**D**): der W3110 *rpoS* Wildtypstamm und die isogene chromosomale *rpoS* Codonmutante wurden bei 37°C in komplexen LB-Medium bis zu einer OD_{578} von 3.0 wachsen gelassen und der σ^S-Abbau wie unter (A) und (B) beschrieben bestimmt.

gehemmt. Zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach Zugabe von Spectinomycin wurden den Kulturen Proben für die sich anschließende Detektion von σ^S mittels Immunoblot-Analyse entnommen. Um den RpoS-Abbau des Wildtyps und der Codonmutante auch im chromosomalen Kontext zu testen, wurde mit dem W3110 *rpoS* Wildtyp-Stamm und der isogenen chromosomalen *rpoS* Codonmutante (TK81) genauso verfahren.

Wie aus Abbildung 4.6 hervorgeht, gab es zwischen *rpoS* Wildtyp und der *rpoS* Codonmutante keine signifikanten Unterschiede im RpoS-Abbau, sowohl im Plasmid-basierten als auch im chromosomalen Kontext. Die ungefähren Halbwertszeiten des σ^S-Proteins sind folgende: Abb. 4.6 (A) 9 Minuten, (B) 11 Minuten, (C) 10.6 Minuten und (D) 8.3 Minuten. In Übereinstimmung damit blieben die akkumulierten σ^S-Mengen der Codonmutante gegenüber dem *rpoS* Wildtyp etwa 1.5- zweifach reduziert, wenn die RpoS-Proteolyse in verschiedenen Protease-defizienten Hintergründen, wie einer *clpP*- oder *lon*-

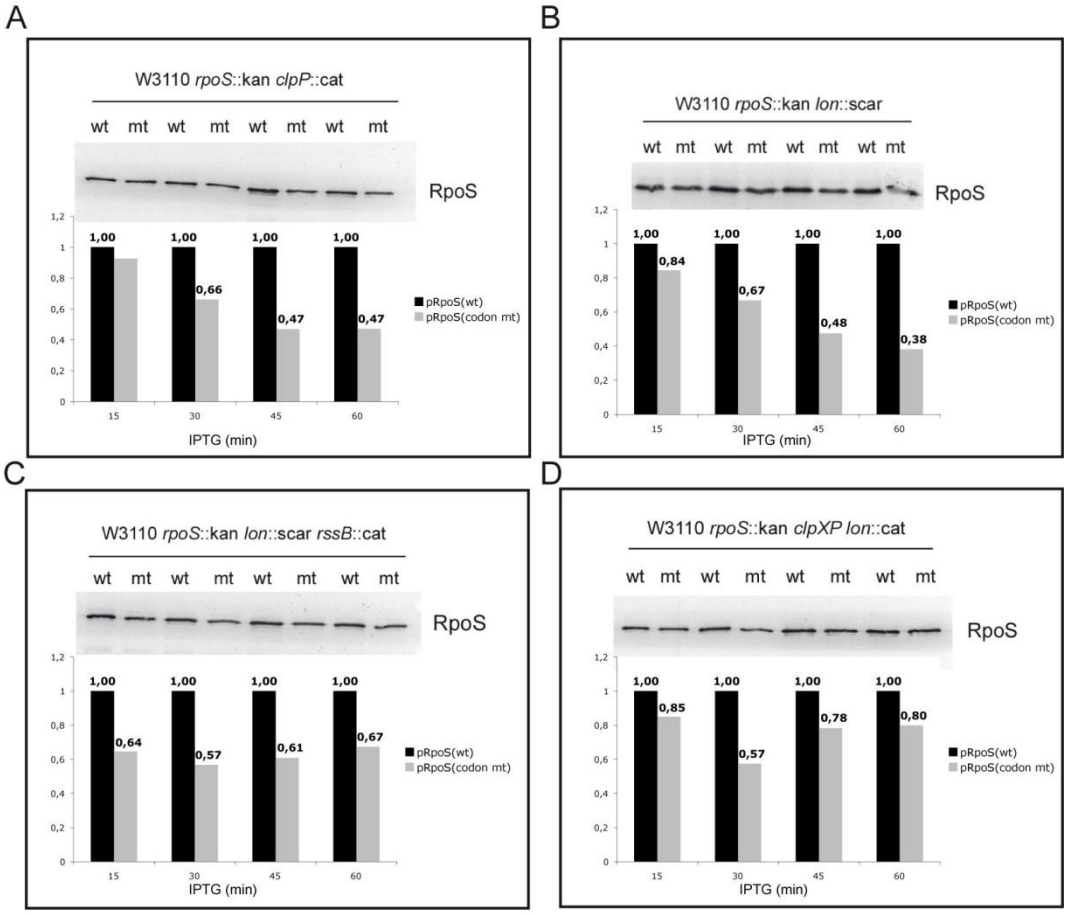


Abbildung 4.7: Akkumulierte σ^S-Mengen exprimiert vom raren Codon Wildtyp- und mutiertem häufigen Codon *rpoS* Allelen in verschiedenen *E. coli* Protease-Mutanten. Derivate des W3110 Stammes, die eine *rpoS*::kan Mutation, kombiniert mit Mutationen in (**A**) *clpP*, (**B**) *lon*, (**C**) Δ(*clpPX-lon*) oder (**D**) *lon rssB* tragen, transformiert mit dem *rpoS* Wildtyp-Plasmid pRpoS(wt) (wt) oder mit dem Plasmid der *rpoS* Codonmutante (pRpoS(codon mt) (mt)), wurden in LB-Medium bis zu einer OD_{578} von 3.0 kultiviert und die RpoS-Expression durch Zugabe von 100 µM IPTG induziert. 15 Minuten danach wurden Proben für die Bestimmung der σ^S-Mengen mittels Immunoblot-Analyse genommen. Unter den Westernblots befinden sich die jeweiligen Quantifizierungen.

Deletionsmutante (Einzel- oder Doppelmutante), oder einer *rssB*- Mutante (kodiert für einen σ^S-spezifischen Proteolyse-Targetingfaktor, siehe 2.3.2.4), eliminiert wurde (siehe Abbildung 4.7). Die Daten sprechen also dafür, dass σ^S-Faltung und Proteolyse keinen Einfluss auf den beobachteten positiven Effekt der raren Codons im *rpoS* Wildtyp auf dessen Expression haben.

4.2 Wachstumsphasen-abhängige tRNA-Regulation in *E. coli* und der mögliche Einfluss dieser Regulation auf die Expression und Regulation von *rpoS*

Alle Organismen verfügen über ein spezifisches Repertoire an Transfer-RNAs (tRNAs), die während der Translation als Bindeglieder zwischen der mRNA proteinkodierender Gene und

den entsprechenden Proteinen fungieren. tRNAs sind kleine stabile RNA-Moleküle (mit der typischen Kleeblatt-Struktur in der Sekundärstruktur), die aus 70-90 Nukleotiden bestehen und mit ihrem Anticodon bestimmte mRNA-Codons dekodieren, die nach dem genetischen Code einer betreffenden Aminosäure zugeordnet sind. In *E. coli* existieren insgesamt 79 verschiedene tRNA-Gene, welche in 41 Operons organisiert sind. Etwa ein Drittel dieser Gene sind zusammen mit ribosomalen RNAs (rRNAs) in sieben verschiedenen ribosomalen RNA-Operons kodiert und werden demnach mit diesen rRNAs co-reguliert (Komine *et al*., 1990; Keener und Nomura in Neidhardt *et al*., 1996). Solche tRNA-Spezies unterliegen, wie die co-transkribierten rRNAs, unter anderem der Stringenten Kontrolle durch das Alarmon ppGpp und seinem Co-Regulatorprotein DksA. Weiterhin werden die Promotoren solcher ribosomalen RNA-Operons auch Wachstumsraten-reguliert.

Die restlichen zwei Drittel der 79 tRNA-Gene sind in eigenen Operons kodiert. Abbildung 4.8 illustriert exemplarisch die Struktur eines solchen tRNA-Operons. Um die einzelnen tRNAs fertigzustellen, unterliegt das aus einem solchen tRNA-Operon erzeugte polycistronische Primärtranskript einer umfangreichen Prozessierung durch die Endonukleasen RNase E, RNase P und RNase Z, sowie die Exonukleasen RNase II, RNase D, RNase T und RNase PH (Arraiano *et al*., 2010). Ein Charakteristikum der tRNA-Gene ist ihr oft redundantes Auftreten in multipler Kopienzahl. Auch einige Promotoren solcher tRNA-Gene unterliegen der Stringenten Regulation, sowie der Wachstumsratenregulation. In vorangegangenen Arbeiten konnte für einige dieser tRNA-Spezies gezeigt werden, dass bestimmte tRNAs, die häufige Aminosäurecodons dekodieren mit zunehmender Wachstumsrate induziert werden. Andere tRNAs hingegen, die seltenere Codons spezifizieren werden invers mit steigender Wachstumsrate herunterreguliert (Dong *et al*., 1996; Emilsson und Kurland, 1990; Emilsson *et al*., 1993; Rowley *et al*., 1993). Interessanterweise wird hierbei die Expression einiger rarer tRNAs, die auch in RpoS seltene Codons translatieren (z.B. Glycly-, Prolyl-, Arginyl-tRNAs, siehe Tabelle 4.1 und Abbildung 4.8) bei steigender Wachstumsrate inhibiert.

Diese Beobachtungen führten daher zur Frage, ob diese Art der tRNA-Regulation auch die Expression von Stationärphase-Genen wie *rpoS* beeinflusst, in denen rare Codons, die von entsprechenden seltenen tRNAs gelesen werden, gehäuft vorkommen. Werden rare tRNAs der exponentiellen Wachstumsphase (hohe Wachstumsraten) zu häufigen tRNA-Spezies in der späten exponentiellen Wachstumsphase und/oder beim Übergang in die stationäre Phase (niedrige Wachstumsraten) und sorgen daher für eine effiziente Translation von Stationärphase-Genen wie *rpoS*? Und werden umgekehrt abundantere tRNA-Spezies, die beispielsweise die in *rpoD* entsprechenden häufigeren Codons dekodieren in der stationären Phase herunter- und in der exponentiellen Wachstumsphase hochreguliert? Unterliegen solche Wachstumsraten-regulierten tRNA-Operons auch einer Wachstumsphasen-abhängigen

A

B

Abbildung 4.8: Struktur zweier tRNA-Operons in *E. coli* am Beispiel des *argXproM*-Operons und des *serVargVYZQ*-Operons (aus EcoCyc, Keseler *et al*., 2005). (**A**) Das *argXproM*-Operon kodiert unter anderem für eine Arginyl-tRNA (tRNA Arg3 CCG) und eine Prolyl-tRNA (tRNA Pro3 UGG), die in *rpoS* rare Codons dekodieren (R156 CGG bzw. P193 und P205) und mit steigender Wachstumsrate herunterreguliert werden (Emilsson *et al*., 1993). (**B**) Das *serVargVYZQ* kodiert hingegen unter anderem in dreifacher Kopie für eine Arginyl-tRNA, die abundante Arginincodons spezifiziert (tRNA Arg2 ACG dekodiert das häufige Arginincodon CGT, siehe Tabelle 4.1). Diese tRNA wird bei steigender Wachstumsrate verstärkt exprimiert (Emilsson *et al*., 1993). Die Zahlen unterhalb der Transkriptionsstartstellen (gestrichelte Pfeile) geben deren Nukleotid-Positionen im Genom des *E. coli* Stammes W3110 wieder (mit (+) für den Sense- und (-) für den Antisensestrang der DNA). Grün hinterlegtes „FIS“ in (A) repräsentiert eine Bindestelle für den Transkriptionsfaktor FIS.

Regulation? Zur Beantwortung dieser Fragen wurden transkriptionale LacZ-Fusionen von Promotoren ausgewählter tRNA-Operons hergestellt (unter anderem die aus Abbildung 4.8) und die *in vivo* Aktivität dieser Promotoren mittels eines Reportergenassays (Bestimmung der spezifischen Aktivität der β-Galaktosidase) entlang der Wachstumskurve vermessen. Hierbei wurden transkriptionale LacZ-Fusionen von den in Tabelle 4.3 aufgelisteten tRNA-Operons generiert, die in Einzelkopie an der chromosomalen *att* (λ)-site des W3110 Δ*lacZ*::Tn10 Stammes lysogenisiert wurden (die Details zur Konstruktion der transkriptionalen LacZ-Fusionen sind im Material- und Methodenteil unter 3.6.7.2 und 3.6.8 beschrieben). Darüber hinaus wurde eine potenzielle σ^S-Abhängigkeit dieser tRNA-Promotoren analysiert, da die Möglichkeit in Erwägung gezogen wurde, dass RpoS einen positiven Feedback auf dieExpression von raren tRNA-Spezies und damit auf seine eigene Synthese ausübt. Hierzu wurden die spezifischen LacZ-Reportergen-Aktivitäten von *rpoS* Mutanten der Stämme, welche die verschiedenen chromosomalen tRNA-Promotor-*lacZ*-Fusionen tragen, ebenfalls *in vivo* entlang der Wachstumskurve bestimmt. Zur Bestimmung der spezifischen β-Galaktosidaseaktivität der verschiedenen tRNA-Promotor-*lacZ*-Fusionen (sowohl in den *rpoS* Wildtypstämmen, als auch in den *rpoS* Mutanten) wurden die *E. coli* Stämme in LB-Medium bei 37°C kultiviert und stündlich Proben zur Bestimmung der spezifischen β-Galaktosidaseaktivität, wie im Material- und Methodenteil unter 3.5.6 beschrieben, entnommen.

Tabelle 4.3: tRNA-Operons und tRNA-Gene, die in *rpoS* und *rpoD* rare bzw. häufige Codons dekodieren und von denen in dieser Arbeit transkriptionale tRNA-Promotor-*lacZ*-Fusionen generiert und vermessen wurden.

tRNA-Operon / tRNA-Gen	Funktion und Regulation	Referenz
argXproM	Kodiert rare tRNA Arg3 (Anticodon CCG) und rare tRNA Pro3 (Anticodon UGG), die in *rpoS* R156 (CGG) bzw. P193 und 205 (CCA) dekodieren. Werden mit steigender Wachstumsrate herunterreguliert	Dong *et al*., 1996; Emilsson *et al*., 1993
serVargVYZQ	Kodiert u.a. häufige tRNA Arg2 (Anticodon ACG), die in der *rpoS* Codonmutante R180 und 277 (CGT) bzw. in den korrespondieren-den Positionen in *rpoD* R (CGT) dekodiert. Wird mit steigender Wachstumsrate hochreguliert.	Dong *et al*., 1996; Emilsson *et al*., 1993
proK	Kodiert häufig tRNA Pro1 (Anticodon CGG), die in der *rpoS* Codonmutante P193 und 205 (CCG) bzw. in korrespondieren Positionen in *rpoD* P (CCG) dekodiert. Wird mit steigender Wachstumsrate hochreguliert.	Dong *et al*., 1996; Emilsson *et al*., 1993
glyWleuZ	Kodiert u.a. abundante tRNA Gly3 (Anticodon GCC), die in der *rpoS* Codonmutante G86 und 126 (GGT) und in entsprechenden Positionen in *rpoD* G (GGT) spezifiziert. Wird mit steigender Wachstumsrate hochreguliert.	Dong *et al*., 1996
thrUglyT	Kodiert rare tRNA Gly2 (Anticodon UCC), die im *rpoS* Wildtyp die raren Codons G86 und 126 (GGA bzw. GGG) dekodiert. Ebenso die rare tRNA Thr4, die im *rpoS* Wildtyp das rare Codon T144 (ACA) dekodiert. Werden bei steigender Wachstumsrate hochreguliert.	Dong *et al*., 1996; Emilsson *et al*., 1993
glyU	Kodiert rare tRNA Gly1 (Anticodon CCC), die im *rpoS* Wildtyp das rare G126 Codon (GGG) dekodiert. Wird mit steigender Wachstumsrate herunterreguliert.	Emilsson *et al*., 1993
glyVXY	Kodiert in dreifacher Kopie die abundante tRNA Gly3 (Anticodon GCC), die in der *rpoS* Codonmutante G86 und 126 (GGT) dekodiert. Ebenso entsprechende häufige Codons in *rpoD*. Wird mit steigender Wachstumsrate hochreguliert.	Dong *et al*., 1996; Emilsson *et al*., 1993

Wie aus Abbildung 4.9 ersichtlich ist, wiesen die diversen tRNA-Promotor-*lacZ*-Fusionen, sowohl jene der tRNA-Promotoren, welche die Expression von raren tRNAs kontrollieren, als auch jene, die die Expression von abundanteren tRNAs dirigieren, ein relativ ähnliches *in vivo* Expressionsprofil auf. Sowohl die Promotoren der selteneren tRNA-Spezies (Abbildung 4.9 A, C, E und G), als auch jene der häufigeren tRNAs (Abbildung 4.9 B, D und F) erreichten ein Aktivitätsmaximum nach 3-4 Stunden Wachstum in der postexponentiellen Phase bei einer OD_{578} zwischen 1.5 und 2.5. Desweiteren zeigten die Promotoren der abundanteren tRNA-Spezies eine erwartungsgemäß etwa dreimal höhere Aktivität (also spezifische β-Galaktosidaseaktivität) (Abb. 4.9 A, C, E und G), als die Promotoren der selteneren tRNA-Spezies (Abb. 4.9 B und F). Der Promotor des *thrUglyT* Operons, das eine rare Glycin- und Threonin-tRNA kodiert (Abb. 4.9 D) fiel hier offenbar aus dem Rahmen, da es eine mit den Promotoren der häufigen tRNAs vergleichbare spezifische β-Galaktosidaseaktivität zeigte. Dies ist insofern interessant, als dass diese tRNAs auch eine andere Regulation zeigen, als andere rare tRNAs und bei steigender Wachstumsrate nicht inhibiert, sondern offenbar verstärkt exprimiert werden und entsprechend höhere tRNA-Mengen aufweisen (siehe Tabelle 4.3; Dong *et al*., 1996; Emilsson *et al*., 1993). Weiterhin

zeigen fünf der sieben getesteten tRNA::*lacZ*-Fusionen (Abb. 4.9 A, B, D, E und F) eine deutlich stärkere Expression in einer *rpoS* Mutante als im isogenen Wildtyp-Hintergrund. Diese Fusionen scheinen also durch $E\sigma^S$ negativ reguliert zu werden und sprechen offenbar auf einen erhöhten $E\sigma^{70}$-Gehalt in der *rpoS* Mutante an. Zwei der sieben untersuchten Fusionen (Abb. 4.9 C und G) hingegen zeigen in der Übergangsphase hin zur stationären Phase in der *rpoS* Mutante eine leicht erniedrigte Expression. Hier könnte $E\sigma^S$ also partiell mit transkribieren.

Zusammenfassend lässt sich also festhalten, dass die Ergebnisse nicht für eine inverse Wachstumsphase-abhängige Regulation von raren und häufigeren tRNA-Spezies bezogen auf die Regulation der Transkriptionsinitiation (also der Promotoraktivität) sprechen. Die von Dong *et al*. (1996) und Emilsson *et al*. (1993) und anderen beobachtete inverse Regulation solcher tRNA-Paare (häufig und selten) muss also auf posttranskriptionaler Ebene geschehen (z.B. durch Prozessierungsereignisse und RNA-Abbau) oder Mechanismen der Transkriptionselongation einschließen.

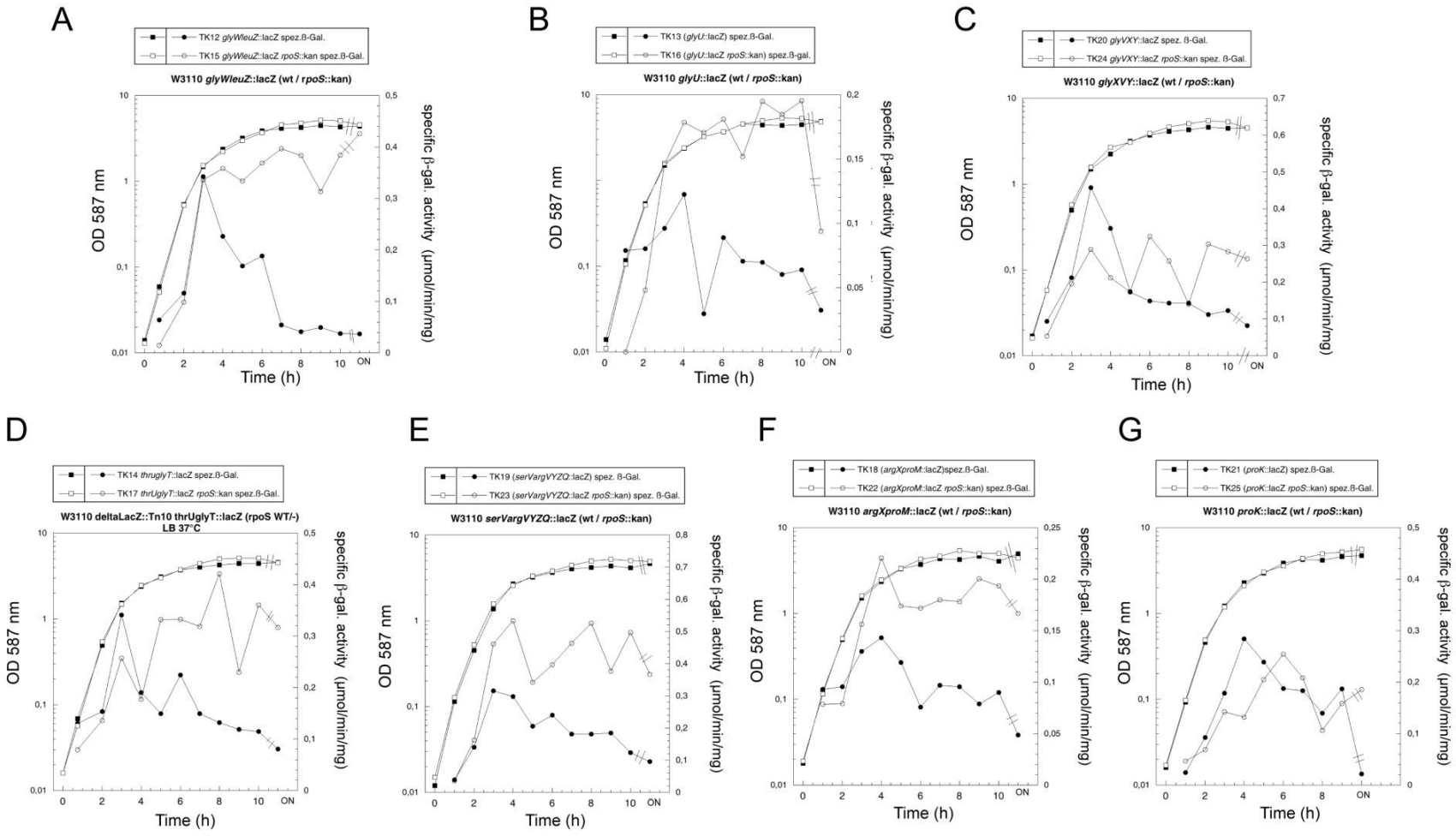


Abbildung 4.9: Expressionsprofil von transkriptionalen tRNA-Promotor-*lacZ*-Fusionen entlang der Wachstumskurve, deren Promotoren die Expression von tRNAs kontrollieren, die im *rpoS* Wildtyp rare und in der *rpoS* Codonmutante häufige Codons spezifizieren, in An- oder Abwesenheit von σ^S. W3110 Δ*lacZ*::Tn10 *rpoS* Wildtyp- und *rpoS*::kan Stämme, die jeweils eine tRNA-Promotor-*lacZ*-Fusion in Einzelkopie im Chromosom tragen (Stämme TK12-TK25), wurden in komplexem LB-Medium bei 37°C kultiviert und stündlich Proben zur Bestimmung der spezifischen β-Galaktosidaseaktivität entnommen. Geschlossene Quadrate stellen die Wachstumskurve des jeweiligen *rpoS* Wildtyp-Stammes, offene Quadrate jene der *rpoS*::kan Mutante dar. Geschlossene Kreise repräsentieren die ermittelte spezifische β-Galaktosidaseaktivität im *rpoS* Wildtyp-Hintergrund, offene Kreise jene in der *rpoS*::kan Mutante.

4.3 Auch andere co-evolvierte Wachstumsphasen-abhängig induzierte Isoenzyme als RpoS und RpoD zeigen eine Korrelation zwischen Codon-Usage und Wachstumsphase

RpoS und RpoD können auch als zwei sehr ähnliche Isoenzyme betrachtet werden, die einen gemeinsamen evolutionären Ursprung haben und beide an den gleichen Partner binden (das RNAP-Kernenzym) und die Transkriptionsinitiation von sehr ähnlichen Promotoren aus dirigieren. Auffällig ist jedoch, dass (bezogen auf beiden Isoenzymen gemeinsame Regionen) im stationäre Phase Sigmafaktor σ^S mehr als doppelt soviele Aminosäuren (16.7%) von raren Codons spezifiziert werden als beim exponentielle Wachstumsphasen „Housekeeping"-Sigmafaktor σ^{70} (7%) (Abbildung 4.1). Weiterhin werden elf verschiedene Positionen in den Sequenzen beider Isoenzyme, welche die gleiche Aminosäure kodieren, in *rpoS* durch rare, in der *rpoD* Sequenz hingegen durch synonyme häufigere Codons repräsentiert (Abbildung 4.1). Wie die bisherigen Ergebnisse zeigen, scheinen diese raren Codons für eine Stabilisierung der *rpoS* mRNA zu sorgen (Abbildung 4.3 und 4.5), indem sie die Zugänglichkeit des *rpoS* Transkripts gegenüber der einzelstrangspezifischen Endoribonuklease RNase E vermindern (Abbildung 4.4). Ein Mechanismus, der möglicherweise in der stationären Wachstumsphase, die im Allgemeinen durch limitierende energetische Ressourcen gekennzeichnet ist, von Vorteil sein kann, um einen unökonomischen schnellen Abbau von mRNAs zu umgehen. Diese Befunde führten zu der Fragestellung, ob auch andere stationäre Wachstumsphasen-assoziierte Gene existieren, in denen vermehrt rare Codons auftreten. Insbesondere solche, die für ein stationäre Phase-induziertes $E\sigma^S$-abhängiges Enzym kodieren, dessen Isoenzym-Komplement gemeinsamen evolutionären Ursprungs unter schnellem exponentiellem Wachstum induziert wird. Beispiele hierfür sind die Transaldolase und die Transketolase, die beide im Pentosephosphatweg agieren (Sprenger, 1995). Beide Enzyme treten in *E. coli* in zwei verschiedenen Isoformen auf, TalA/TalB und TktA/TktB. Die *talA* und *tktB* Gene sind in einem gemeinsamen $E\sigma^S$-abhängigen Operon kodiert, dessen Expression beim Eintritt in die stationäre Wachstumsphase induziert wird (Weber *et al*., 2005 und nicht gezeigte Daten). Die Gene, die für die entsprechenden Isoenzyme kodieren, *talB* und *tktA*, hingegen sind monocistronisch und werden in exponentiell wachsenden Zellen induziert und beim Eintritt in die stationäre Wachstumsphase reprimiert (Weber *et al*., 2005 und nicht gezeigte Daten). Ein Vergleich der Codon-Usage in den jeweiligen Isoenzymen (siehe Alignments in den Abbildungen 4.10 A und B) offenbarte ein bereits zuvor in RpoS und RpoD beobachtetes Muster. Trotz der hohen Homologie von TalA/TalB (63.7 % identische Aminosäuren) enthält das stationäre Phase-induzierte *talA* Gen in Analogie zur RpoS/RpoD mehr als fünfmal soviele rare Codons (32.6%) wie das exponentielle Phase-induzierte *talB* Gen (6.3 % rare

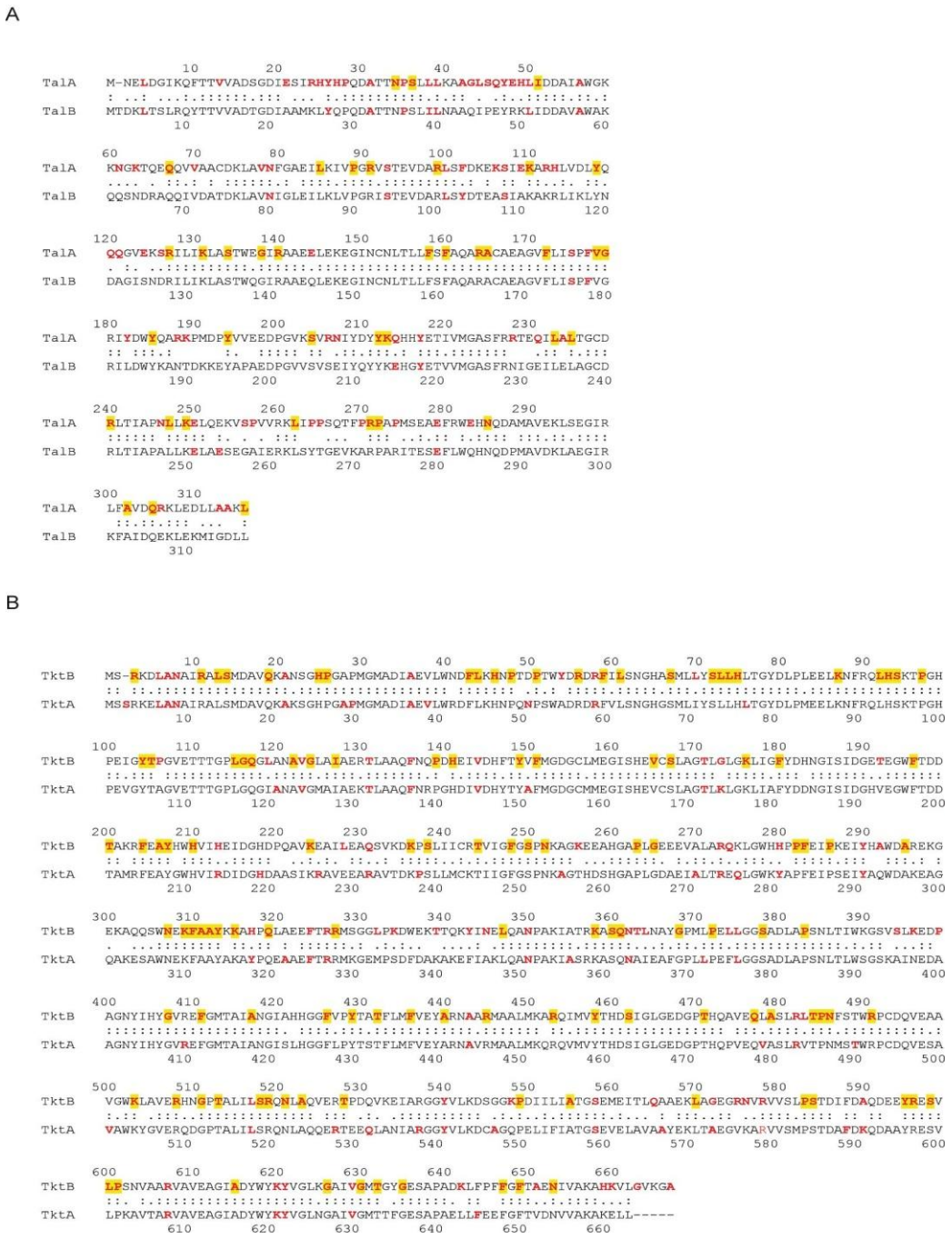


Abbildung 4.10: Sequenz-Alignment der (A) stationäre Phasen-induzierten Transaldolase TalA und ihrem exponentielle Phasen-exprimiertem Isoenzym TalB und (B) der stationäre Phasen-induzierten Transketolase TktB und ihrem exponentielle Phasen-exprimiertem Isoenzym TktA in *E. coli*. Aminosäuren, die von seltenen Codons spezifiziert werden, sind rot markiert. Synonyme Codons die selten im stationäre Phasen-assoziierten Enzym sind, hingegen häufig im exponentielle Phasen-assoziiertem Pendant eines Isoenzympaares, sind gelb hinterlegt.

Codons) (rot markierte Buchstaben im Alignment in Abb. 4.10 A). Desweiteren werden 38 verschiedene Positionen in den Sequenzen beider Isoenzyme (12 % aller Codons), welche die gleiche Aminosäure kodieren, in *talA* durch rare (gelb hinterlegte, rote markierte Buchstaben), in der *talB* Sequenz dagegen durch synonyme häufigere Codons repräsentiert (Abb. 4.10 A). Im Isoenzympaar TktA/TktB, deren Aminosäuresequenz-Identität 74.6 % beträgt, sieht die

Korrelation zwischen Codon-Usage und dem jeweiligen Wachstumsphasen-Kontext sehr ähnlich aus (Abb. 4.10 B). Während das stationäre Phase-exprimierte *tktB* Gen 28.3 % rare Codons enthält, weist das exponentielle Phase-induzierte *tktA* Gen lediglich zu 9.3 % rare Codons auf. 123 synonyme Codons (18.5 % aller Codons) sind selten in *tktB* und häufig in *tktA* (Abb. 4.10 B).

Weitere interessante Isoenzyme, die beide indirekt $E\sigma^S$-abhängig in der stationären Wachstumsphase und unter Säurestress in der exponentiellen Wachstumsphase exprimiert werden und in verschiedenen Operons lokalisiert sind, sind die Glutamat-Decarboxylasen GadA und GadB (siehe 2.3.1.3). Wie die Analyse der Codon-Usage in den beiden nahezu identischen Isoenzymen demonstrierte, zeigen auch die beiden stationäre Phasen-assoziierten, sowie Säurestress-induzierten Isoenzyme ein verstärktes Auftreten von raren Codons in ihrer Sequenz (Abbildung 4.11). Sowohl GadA, als auch GadB enthalten zu 21.4 % rare Codons. Also etwa in der Größenordnung, wie die zuvor untersuchten stationäre Phasen-exprimierten Isoenzyme (RpoS, TalA und TktB). Weiterhin enthält GadA an fünf verschiedenen Positionen rare Codons, die durch synonyme häufigere Codons in GadB repräsentiert werden und umgekehrt GadB an drei Positionen rare Codons, die in GadA häufig sind (Abb. 4.11). Diese geringen Unterschiede sind wahrscheinlich auf genetische Drift zurückzuführen.

Die bemerkenswerte Beobachtung, dass es auffällige Unterschiede in der Codon-Usage in exponentiellen und stationäre Phasen-exprimierten Isoenzymen gibt, impliziert die Existenz einer unmittelbaren Verbindung zwischen Codon-Usage und der Physiologie der bakteriellen Genexpression. Von daher ist es von Interesse zu untersuchen, ob es eine systematische Korrelation zwischen Codon-Usage und exponentielle Phasen- und stationäre Phasen-assoziierten Genen gibt. Hierzu wurde die Codon-Usage in mehreren exemplarischen exponentielle und stationäre Wachstumsphasen-Genen, sowie postexponentielle Phasen-induzierten Genen analysiert und miteinander verglichen. So enthält das $E\sigma^S$-kontrollierte stationäre Phasen-exprimierte *osmY* Gen, das für ein periplasmatisches, Osmotoleranz-vermittelndes Protein kodiert (siehe 2.3.1.2), zu 21.3 % rare Codons. Das stationäre Phasen-induzierte und indirekt über den Transkriptonsaktivator CsgD $E\sigma^S$- aktivierte *csgB* Gen (Hengge 2010b und 2011; Weber *et al*., 2006b), enthält mit 40.1 % einen außerordentlich hohen Anteil an raren Codons. Das *csgB* Gen kodiert für ein Nukleatorprotein, das für die Verankerung von den für die Biofilmbildung essentiellen adhäsiven Curli-Fimbrien in der Außenmembran verantwortlich ist. Typische exponentielle Phasen-aktivierte Gene, wie *rpsO* und *rpsB*, die für das ribosomale Protein S15 bzw. S2 der kleinen 30S-Untereinheit kodieren, weisen dagegen mit 11.1 % bzw. 6.6 % einen weitaus geringeren Anteil an raren Codons auf. Das *rpoA* Gen hingegen, dass für die α-Untereinheit der RNAP kodiert und sowohl in der exponentiellen, wie in der stationären Wachstumsphase exprimiert wird, enthält mit 20.3 % einen signifikant höheren Anteil an raren Codons als ausschließlich exponentielle Phasen

```
                10        20        30        40        50        60        70        80        90       100
GadA    MDQKLLTDFRSELLDSRFGAKAISTIAESKRFPLHEMRDDVAFQIINDELYLDGNARQNLATFCQTWDDENVHKLMDLSINKNWIDKEEYPQSAAIDLRC
        ::.: .::.::::::::::::.::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
GadB    MDKKQVTDLRSELLDSRFGAKSISTIAESKRFPLHEMRDDVAFQIINDELYLDGNARQNLATFCQTWDDENVHKLMDLSINKNWIDKEEYPQSAAIDLRC
                10        20        30        40        50        60        70        80        90       100

               110       120       130       140       150       160       170       180       190       200
GadA    VNMVADLWHAPAPKNGQAVGTNTIGSSEACMLGGMAMKWRWRKRMEAAGKPTDKPNLVCGPVQICWHKFARYWDVELREIPMRPGQLFMDPKRMIEACDE
        ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
GadB    VNMVADLWHAPAPKNGQAVGTNTIGSSEACMLGGMAMKWRWRKRMEAAGKPTDKPNLVCGPVQICWHKFARYWDVELREIPMRPGQLFMDPKRMIEACDE
               110       120       130       140       150       160       170       180       190       200

               210       220       230       240       250       260       270       280       290       300
GadA    NTIGVVPTFGVTYTGNYEFPQPLHDALDKFQADTGIDIDMHIDAASGGFLAPFVAPDIVWDFRLPRVKSISASGHKFGLAPLGCGWVIWRDEEALPQELV
        ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
GadB    NTIGVVPTFGVTYTGNYEFPQPLHDALDKFQADTGIDIDMHIDAASGGFLAPFVAPDIVWDFRLPRVKSISASGHKFGLAPLGCGWVIWRDEEALPQELV
               210       220       230       240       250       260       270       280       290       300

               310       320       330       340       350       360       370       380       390       400
GadA    FNVDYLGGQIGTFAINFSRPAGQVIAQYYEFLRLGREGYTKVQNASYQVAAYLADEIAKLGPYEFICTGRPDEGIPAVCFKLKDGEDPGYTLYDLSERLR
        ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
GadB    FNVDYLGGQIGTFAINFSRPAGQVIAQYYEFLRLGREGYTKVQNASYQVAAYLADEIAKLGPYEFICTGRPDEGIPAVCFKLKDGEDPGYTLYDLSERLR
               310       320       330       340       350       360       370       380       390       400

               410       420       430       440       450       460
GadA    LRGWQVPAFTLGGEATDIVVMRIMCRRGFEMDFAELLLEDYKASLKYLSDHPKLQGIAQQNSFKHT
        ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
GadB    LRGWQVPAFTLGGEATDIVVMRIMCRRGFEMDFAELLLEDYKASLKYLSDHPKLQGIAQQNSFKHT
               410       420       430       440       450       460
```

Abbildung 4.11: Sequenz-Alignment der stationäre Phasen- und Säurestress-exprimierten Glutamat-Decarboxylase Isoenzyme GadA und GadB. Aminosäuren, die von raren Codons spezifiziert werden sind rot markiert. Synonyme Codons die selten in einem Enzym des Paares sind, häufig dagegen im anderen, sind gelb hinterlegt.

Gene. Interessant hierbei ist, dass RpoA bzw. die RNAP eben auch in der stationären Wachstumsphase benötigt wird, was den höheren Anteil an raren Codons sinnvoll erscheinen lässt. Die hier beschriebenen Daten, zusammen mit den experimentellen Daten zur Codon-Usage in *rpoS*, sprechen also für eine Korrelation von Codon-Usage und Wachstumsphasen-abhängiger Genregulation. Möglicherweise umgehen Gene, die in der stationären Phase unter energetisch weniger günstigen Bedingungen exprimiert werden, einen unökonomischen Abbau ihrer mRNAs, indem sie ihre mRNAs vermehrt mit raren Codons „ausstatten“. Die an diesen raren Codons pausierenden und somit dichter aufeinanderfolgenden Ribosomen könnten dann solche mRNAs vor dem Zugriff vor RNase E schützen und stabilisieren. Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern also einen zusätzlichen Aspekt, warum rare Codons in Genen aus den genannten Gründen und Beobachtungen neben den bereits bekannten Aspekten (effektive co-translationale Proteinfaltung, effizientere Translationselongation durch eine rare Codon-Barriere am Anfang von mRNAs, siehe 2.4) einem positiven Selektionsdruck unterliegen können und nicht allein durch Mutationsdruck und genetische Drift persistieren.

4.4 Identifikation neuer an der RpoS-Regulation beteiligter sRNAs durch die Analyse von Hfq-gebundenen RNAs mittels 454 Pyrosequenzierung

Die *rpoS* mRNA repräsentiert ein paradigmatisches Beispiel einer mRNA, deren Translation durch die Interaktion der translationsinkompetenten 5´-UTR, in der die Ribosomenbindestelle

(RBS) intramolekular sequestriert vorliegt, mit sRNAs aktiviert wird (siehe 2.2.2.2). Bisher sind die drei sRNAs RprA, DsrA und ArcZ identifiziert worden, die zur translationalen Aktivierung der *rpoS* mRNA unter verschiedenen Stressbedingungen beitragen (siehe 2.2.2.2). Dennoch schien keine dieser sRNAs für die gesteigerte Translationsinduktion von *rpoS* unter hyperosmotischem Stress und Säurestress, sowie in einer *hns* Mutante (siehe 2.3.2.3) unter exponentiellem Wachstum verantwortlich zu sein (Majdalani *et al*., 2001; Zhou und Gottesman, 2006). Dies spricht für die Existenz weiterer, bisher nicht identifizierter sRNAs, die an der Regulation der *rpoS* Translation beteiligt sein könnten. Ziel dieser Arbeit war es daher, weitere sRNAs zu identifizieren, die an der σ^S Regulation beteiligt sind. Insbesondere solche, welche die hyperosmotische und Säurestress-induzierte Aktivierung der *rpoS* Translation vermitteln. Hierzu wurde ein experimenteller Ansatz gewählt, der sich schon zuvor bei der Identifikation von sRNAs als sehr fruchtbar erwiesen hat: die Detektion Hfq-assoziierter RNAs mittels Deep-Sequenzierung (454 Pyrosequenzierung) (siehe 2.2; Sharma und Vogel, 2009; Sittka *et al*., 2008). Hfq ist eines der abundantesten RNA-Bindeproteine in *E. coli* überhaupt und tatsächlich bindet es alle bisher identifizierten in *trans* agierenden sRNAs *in vivo*, um die sRNA•mRNA Duplexbildung, trotz begrenzter Komplementarität zwischen beiden, zu stabilisieren (siehe 2.2.2). In einer Pionierstudie von Zhang *et al*. (2003) in *E. coli* erfolgte die Detektion von mit Hfq co-immunopräzipitieren RNAs auf „hohe Dichte Mikroarrays“ (Tiling-Arrays). Die Detektion der Hfq-assoziierten RNAs mittels Deep-Sequenzierung (454 Pyrosequenzierung) (MacLean *et al*., 2009; Margulies *et al*., 2005) hat sich allerdings als effektiver erwiesen, da letztere durch eine, im Vergleich zu Microarrays-basierten Methoden, höhere Sensitivität gekennzeichnet ist und das parallele Sequenzieren von Hunderttausenden cDNAs in nur einem Sequenzierungslauf erlaubt.

Um neue potenzielle sRNA-Kandidaten, die an der translationalen Aktivierung der *rpoS* mRNA beteiligt sind, zu identifizieren, wurde die oben beschriebene Strategie, die auf der Deep-Sequenzierungsanalyse (454 Pyrosequenzierung) von mit Hfq co-immunopräzipitierter RNA beruht, gewählt. Hierbei fungierte hyperosmotischer Stress als σ^S induzierende Modell-Stresssituation. Zunächst wurde ein *E. coli* K12 W3110 Stamm erzeugt, in welchem dem endogenen chromosomalen Hfq Protein mittels homologer Rekombination durch das λ red-System ein C-terminales Tripel-FLAG-Tag-Epitop hinzugefügt wurde. Dies geschah nach einer in Anlehnung an Datsenko und Wanner (2000) modifizierten Methode (Uzzau *et al*., 2001) (siehe Material und Methoden 3.6.11). Der resultierende Stamm W3110 *hfq*::FLAG::kan (TK62) wurde anschließend in M9-Minimal-Medium, supplementiert mit 0.4 % Glycerol als Kohlenstoffquelle bei 37°C bis zu einer OD_{578} von 0.3 kultiviert und die Kultur gesplittet. Die eine Hälfte der Kultur wurde mit NaCl versetzt (0.3M Endkonzentration), die andere ungestresste Kontrolle (-NaCl) mit dem gleichen Volumen an *Aqua dest*. versetzt. 6 Minuten später wurden die Zellen geerntet, aufgeschlossen und die RNA mittels eines gegen den FLAG-Tag gerichteten α-FLAG-Antikörpers zusammen mit

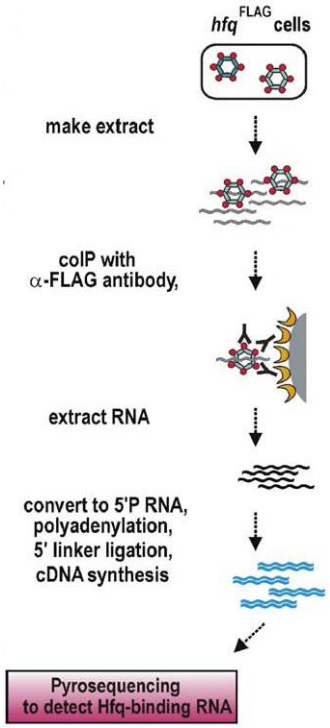


Abbildung 4.12: Deep-Sequenzierungsanalyse von Hfq co-immunopräzipitierten RNAs zur Identifikation von unter hyperosmotischen Stress induzierten sRNAs, die mögliche potenzielle Kandidaten der *rpoS* Regulation darstellen (verändert, aus Sharma und Vogel, 2009). Mit Hfq co-immunopräzipitierte RNA aus hyperosmotisch gestressten und ungestressten (Kontrolle) W3110 *hfq*::FLAG::kan Zellen wurde extrahiert, in 5´-Monophosphat RNA konvertiert, mit 5´-Linkern ligiert und einem 3´-Poly(A)-Tag versehen und in cDNA revers transkribiert. Zur Detektion der Hfq-gebundenen RNAs und der Identifikation von hyperosmotisch-induzierten sRNAs wurden die so erhaltenen cDNAs der Analyse durch Pyrosequenzierung zugeführt.

Hfq co-immunopräzipitiert (siehe Material und Methoden 3.5.5). Die extrahierte co-immunopräzipitierte RNA wurden nachfolgend durch Behandlung mit der sauren Tabak-Pyrophosphatase (TAP) in 5´-Monophosphat RNA konvertiert, mit spezifischen 5´-Linkern ligiert und einem 3´-Poly(A)-Tag versehen und in cDNA revers transkribiert. Die so erhaltenen cDNAs wurden schließlich der 454 Pyrosequenzierungsanalyse zugeführt. Abbildung 4.12 illustriert schematisch den Ablauf der hier beschriebenen Prozedur. Um die Hfq co-Immunopräzipitation vor der cDNA-Synthese und der sich anschließenden Pyrosequenzierungsanalyse auf Erfolg hin zu überprüfen, wurde zunächst die Osmo-Induktion von σ^S, die co-Immunopräzipitation des Hfq::FLAG-Proteins und der sRNA RprA als hyperosmotisch induzierte, Hfq-bindende Kontroll-sRNA in Western- und Northernblot-Analysen untersucht (siehe Abbildung 4.13).

Wie aus Abbildung 4.13 hervorgeht, war sowohl die hyperosmotische Induktion von σ^S, als auch die Immunopräzipitation des Hfq::FLAG Proteins, sowie die hyperosmotische Induktion der Hfq-abhängigen sRNA RprA und deren co-Immunopräzipitation erfolgreich. Daher konnten die RNA-Proben der weiteren Behandlung und cDNA-Synthese mit nachfolgender Deep-Sequenzierungsanalyse zugeführt werden.

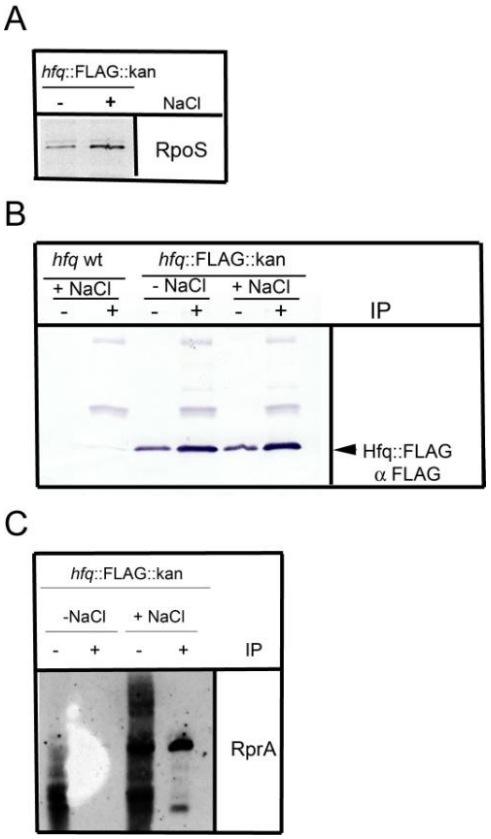


Abbildung 4.13: α-FLAG co-Immunopräzipitation (co-IP) Hfq-assoziierter sRNAs aus hyperosmotisch geshifteten *E. coli* Zellen und ungestressten Zellen (Kontrolle) zur Identifikation von hyperosmotisch induzierten sRNAs durch 454 Pyrosequenzierung. W3110 *hfq*::FLAG::kan Zellen wurde in M9-Minimalmedium mit 0.4 % Glycerin bei 37°C bis zu einer OD_{578} von 0.3 kultiviert, gesplittet und die eine Hälfte der Kultur mit 0.3 M NaCl (Endkonzentration) hyperosmotisch geshiftet. Im Anschluss daran wurde eine co-Immunopräzipitation und Extraktion der Hfq-assoziierten RNAs mittels eines α-FLAG Antikörpers, sowohl für die Osmo-gestresste Kultur, als auch für die ungestresste Kultur (Kontrolle) durchgeführt (siehe 3.5.5). (**A**) Zur Verifikation der Osmo-Induktion von RpoS wurden jeweils 5 µg Gesamtprotein auf einem 12%-igen SDS-Polyacrylamidgel separiert und eine Westernblot-Analyse mit einem gegen σ^S gerichteten polyklonalen Antikörper durchgeführt. Wie aus (A) hervorgeht, kommt es in der hyperosmotisch geshifteten Kultur zu einer etwa 5-fachen Osmo-Induktion von RpoS gegenüber der ungeshifteten Kultur. (**B**) Zur Verifkation des Hfq::FLAG Protein-Pulldowns aus den Extrakten der beiden Kulturen wurden als Input-Kontrolle (-IP: vor der Zugabe des monoklonalen α-FLAG Antikörpers) 0.05 OD Gesamtprotein, aus der co-IP-Fraktion (+IP) jeweils 2.5 OD Gesamtprotein aufgetragen und auf einem 15%-igen SDS-Polyacrylamidgel getrennt. Die Detektion des Hfq::FLAG-Proteins erfolgte mit einem monoklonalen gegen das FLAG-Tag-Epitop gerichteten Antikörper. Als Kontrolle wurde das gleiche Osmoshiftexperiment mit einem ungetaggten *hfq* Wildtypstamm (*hfq* wt) durchgeführt. Wie aus dem Westernblot ersichtlich ist, war die Anreicherung bzw. Immunopräzipitation des Hfq::FLAG-Proteins erfolgreich. Erwartungsgemäß zeigt die Kontrolle des isogenen *hfq* Wildtypstammes kein Signal auf der Höhe des Hfq::FLAG-Proteins. Die schwachen Banden oberhalb von Hfq::FLAG repräsentieren die schwere (55 kDa) und leichte Kette (28 kDa) des α-FLAG Antikörpers. (**C**) Um die hyperosmotische Induktion und co-Immunopräzipitation der Hfq-assoziierten sRNA RprA als Kontroll-sRNA zu überprüfen, wurden 0.25 OD Gesamt-RNA der Input-Kontrolle (-IP) und die 10-fache Menge (2.5 OD) an Gesamt-RNA der co-IP-Fraktion (+IP) auf einem denaturierenden 6 % Polyacrylamidgel mit 7 M Harnstoff elektrophoretisch getrennt und RprA mit einer DIG-markierten Sonde und einem α-DIG Antikörper, wie unter 3.6.14.2 beschrieben, detektiert. Wie der Northernblot zeigt, kommt es erwartungsgemäß zu der bekannten hyperosmotischen RprA-Induktion. Ebenso war die Anreicherung von RprA in der co-IP-Fraktion erfolgreich.

4.4.1 Die Bioinformatische Analyse der cDNA-Bibliotheken aus der 454 Pyrosequenzierung

Bei der Identifikation neuer potenziell *rpoS* regulierender sRNAs durch die Analyse von Hfq-assoziierten sRNAs hyperosmotisch gestresster Zellen durch 454 Pyrosequenzierung handelte es sich um ein Kooperationsprojekt mit der RNA-Biologie Gruppe von Prof. Dr. Jörg Vogel am Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie in Berlin. Die Rohdatenanalyse des 454 Pyrosequenzierungslaufs erfolgte wie nachfolgend beschrieben bis einschließlich zur Annotation der erhaltenen cDNA Bibliothek des 454 Pyrosequenzierungslaufs gegen das Genom des *E. coli* Stammes W3110 durch Dr. Cynthia Sharma aus der RNA-Biologie Gruppe von Prof. Dr. Jörg Vogel. Die eigentliche Analyse der cDNA Reads (auf den Rohdaten basierend) mittels des integrierten genomischen Browsers der Firma Affymetrix (IGB, siehe unten), die zur Identifikation der unter hyperosmotischem Stress differentiell regulierten sRNAs führte, wurde dagegen von mir in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Regine Hengge (FU Berlin) durchgeführt.

Bei der 454 Pyrosequenzierung wurden mehrere cDNA-Bibliotheken gemischt und innerhalb eines Sequenzierungslaufs simultan sequenziert. Aus diesem gemischten 454 Sequenzierungslauf wurden die co-IP Bibliotheken aus der ungestressten *hfq*::FLAG::kan Kultur (-NaCl Kontroll-co-IP: TK_HIP_Ctr, siehe Tabelle 4.4), sowie der hyperosmotisch gestressten Kultur (TK_HIP_NaCl, siehe Tabelle 4.4) über einen spezifischen, an die 5´-Adaptersequenz während der cDNA-Synthese angehängten, 4-mer Barcode-Tag (Linker-Tag „TGAT“ bzw. „TGGA“, siehe Tabelle 4.4) heraus extrahiert. Gleichzeitig wurden die ligierten 5´-Adaptorsequenzen, sowie der Poly(A)-Schwanz entfernt. Die Gesamtzahl aller Inserts aus den cDNA-Bibliotheken ist in Tabelle 4.4 aufgelistet.

Tabelle 4.4: Daten aus der Analyse der Hfq co-IP-Bibliotheken (ungestresste Kontroll-Kultur: TK_HIP_Ctr und hyperosmotisch gestresste Kultur: TK_HIP_NaCl), erstellt von Dr. Cynthia Sharma, Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie, Berlin (siehe Text).

Library	Linker tag	Inserts	Inserts < 18 nt	Inserts >= 18nt
TK_HIP_Ctr	TGAT	139890	10500	129390
TK_HIP_NaCl	TGGA	70412	2799	67613

In der co-IP Kontroll-Bibliothek (-NaCl) wurden 139890 cDNAs sequenziert (Tab. 4.4), die Längen zwischen 1-321 Basenpaaren (Bp) aufwiesen, wovon 92.5 % eine Länge ≥ 18 Bp aufwiesen (siehe Abbildung 4.14) und beim späteren Alignment gegen das W3110 Genom berücksichtigt wurden. Die co-IP-Bibliothek der hyperosmotisch gestressten Kultur (TK_HIP_NaCl) ergab 70412 cDNA Sequenzen (Tab. 4.4), die in ihrer Länge zwischen 1-364 Bp variierten, von denen 96 % eine Länge ≥ 18 Bp aufwiesen (siehe Abbildung 4.14) und beim späteren Alignment gegen das W3110 Genom berücksichtigt wurden.

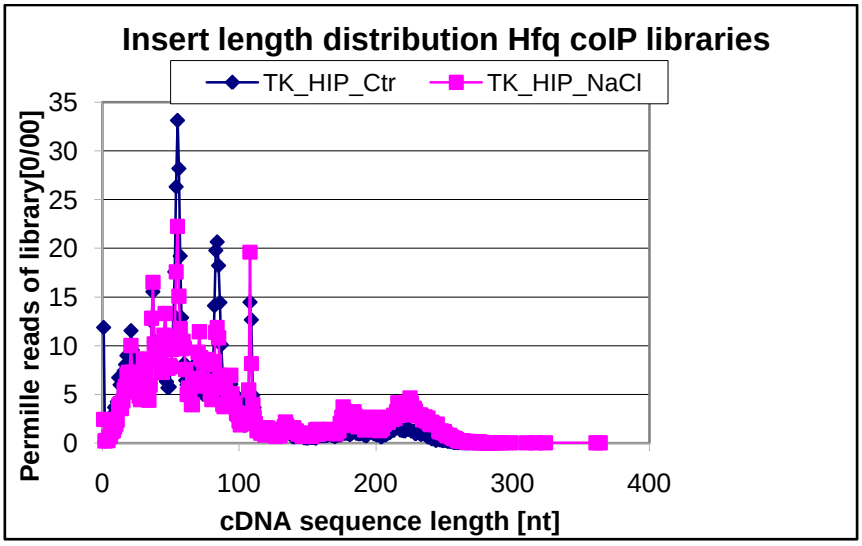


Abbildung 4.14: Statistische Analyse der cDNA-Sequenzierungsergebnisse aus der 454 Pyrosequenzierung der Hfq-assoziierten RNAs. Aufgetragen ist die Anzahl der cDNA-Reads gegen die Länge der erhaltenen cDNAs in Bp (erstellt von Dr. Cynthia Sharma, Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie, Berlin).

Beim Alignment der erhaltenen cDNA-Bibliotheken wurden nur solche cDNA-Inserts berücksichtigt, die gleich oder größer als 18 Bp waren. Hierzu wurden die cDNAs mit Hilfe des WU-BLAST 2.0 Algorithmus (http://blast.wustl.edu/) mit den folgenden Parametern gegen das Genom des *E. coli* K12 W3110 Stammes als Referenz kartiert:

```
-B=1 -V=1 -m=1 -n=-3 -Q=3 -R=3 -gspmax=1 -hspmax=1 -mformat=2 -e=0.0001

-B = 1 maximal number of database sequences to report alignments from
-V = 1 maximal number of reported alignments for a given database sequence
-m = 1,-n = -3 match, mismatch scoring system
-Q = 3 penalty score for a gap of length 1
-R = 3 penalty score for extending a gap by each letter after the first
-gspmax = 1 max. number of gapped high-scoring pairs (GSPs) saved per subject
sequence(default 0;0 >unlimited)
-hspmax = 1 max. number of ungapped HSPs saved per subject sequence (default 1000;
0 > unlimited)
-mformat = 2 specifies tabular output format (default 1)
-e = 0.0001 Expectation value (E) [Real] default = 10.0
```

Von diesen 129390 cDNAs ≥ 18Bp der Kontroll-co-IP-Bibliothek (TK_HIP_Ctr) ergaben 123321 cDNAs nach dem BLAST-Alignment mit dem W3110 Genom einen Treffer, während etwa 5 % der Sequenzen keinen Treffer ergaben (Tab. 4.5). Von den 67613 cDNAs ≥ 18Bp aus der co-IP-Bibliothek der hyperosmotisch gestressten Kultur (TK_HIP_NaCl) ergaben 64667 cDNAs einen Treffer, während etwa 4.6 % keinen Treffer ergaben.

Tabelle 4.5: Ergebnisse des BLAST-Alignments der cDNAs aus den co-IP-Bibliotheken mit dem Genom des *E. coli* K12- Stammes W3110 (erstellt von Dr. Cynthia Sharma, Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie, Berlin).

Library	Inserts >= 18nt	Total BLAST hits	>= 18nt but no hit
TK_HIP_Ctr	129390	123231	6159
TK_HIP_NaCl	67613	64667	2946

Der nächste Schritt in der bioinformatischen Analyse der 454 Pyrosequenzierungsdaten war die Visualisierung der genomischen Lokalisation der Treffer aus der WU-BLAST-Analyse, sowie die quantitative Auswertung der Daten mit Hilfe des integrierten genomischen Browsers (IGB) (http://www.affymetrix.com/support/developer/tools/download_igb.affx) der Firma Affymetrix. Da die co-IP-Kontroll-Bibliothek (TK_HIP_Ctr) und die co-IP-Bibliothek aus der hyperosmotisch gestressten Kultur (TK_HIP_NaCl) bezüglich ihrer Anzahl der cDNA Reads relativ große Unterschiede aufwiesen (siehe Tab. 4.4 und 4.5), musste ein Normalisierungsfaktor (NF) berücksichtigt werden. Hierbei wurde die Anzahl der gemappten Reads für jede Nukleotid-Position durch den NF dividiert und mit 1000 multipliziert. Um den Anreicherungsfaktor einer gegeben sRNA einer co-IP-Bibliothek im Vergleich zu der anderen co-IP-Bibliothek der beiden Bibliotheken abzuschätzen (sowohl auf dem Plus-, als auch auf dem Minus-Strang), wurde der Quotient aus der Anzahl der gemappten Reads für eine gegebene Position einer Bibliothek und der Anzahl der gemappten Reads an der entsprechenden Position der anderen Bibliothek gebildet. Bekannte sRNAs, die in der hyperosmotischen Kultur (+NaCl) gegenüber der Kontroll-Kultur (-NaCl) hochreguliert waren, sind in Tabelle 4.6 gelistet. Solche, die in der hyperosmotischen Kultur (+NaCl) gegenüber der Kontroll-Kultur (-NaCl) herunterreguliert waren, in Tabelle 4.7. Daneben gab es noch einige wenige 5´- und 3´-UTRs von Genen, die in der co-IP Bibliothek aus der hyperosmotisch geshifteten Kultur verstärkt auftraten, aber nicht weiter experimentell verfolgt wurden.

Tabelle 4.6: sRNAs in der co-IP-Bibliothek der hyperosmotisch gestressten Kultur, die gegenüber der ungestressten Kultur hochreguliert waren.

sRNA	approx. fold upregulation
SgrS	3
RydB	2-3
RprA	3-4
DsrA	1.5
RyeB	8-9
MicA (SraD)	1.5-2
OmrA (RygA)	1.5
OmrB (RygB)	2-3
SsrS (6S)	2-3
GlmZ (RyiA)	6-7

Tabelle 4.7: sRNAs in der co-IP-Bibliothek der hyperosmotisch gestressten Kultur, die gegenüber der ungestressten Kultur herunterreguliert waren.

sRNA	approx. fold downregulation
MicC	3-4
RyeE (CyaR)	4-5
ArcZ (RyhA)	3
SpoT42	1.5-2

Wie aus Tabelle 4.6 ersichtlich ist, spiegeln die Pyrosequenzierungsdaten die im Falle von OmrA und OmrB bereits beschriebene hyperosmotische Induktion wider (Guillier und Gottesman, 2006) (siehe auch 2.2.2.3). Ein Hinweis darauf, dass die hier angewandte Methode funktioniert. Auch eine Rolle von RprA bei der hyperosmotischen Induktion von σ^S, bei gleichzeitiger Abwesenheit von DsrA ist bereits zuvor beschrieben worden (Majdalani *et al*., 2001) (siehe auch 2.2.2.2). Interessanterweise scheint die sRNA ArcZ, die auch einen positiven Regulator der *rpoS* Translation repräsentiert (Mandin und Gottesmann, 2010) (siehe auch 2.2.2.2), unter den osmotischen Stressbedingungen herunterreguliert zu werden.

4.4.2 Verifikation der sRNA-Expressionsdaten aus der Pyrosequenzierungsanalyse in Northernblot-Analysen

Wie aus der Tabelle 4.6 hervorgeht, scheinen einige sRNAs (basierend auf den Pyrosequenzierungsdaten) unter hyperosmotischen Bedingungen verstärkt zu akkumulieren. Um dies weiter zu verifizieren, wurde die hyperosmotische Induktion dieser sRNAs, sowie die beobachtete hyperosmotische Repression der *rpoS* regulierenden sRNA ArcZ (Tab. 4.7) in Northernblot-Analysen untersucht. Hierzu wurde der *E. coli* K12-Stamm W3110 bei 37°C in M9-Minimalmedium mit 0.4 % Glyzerin bis zu einer OD_{578} von 0.3 kultiviert, die Kultur gesplittet und die eine Hälfte der Kultur mit 0.3 M NaCl (Endkonzentration) hyperosmotisch gestresst und die ungestresste Kultur mit dem gleichen Volumen an *Aqua dest*. versetzt. Sechs Minuten später wurden Proben für die Gesamt-RNA-Isolation entnommen. Die hyperosmotische Regulation der verschiedenen sRNAs wurde dann in den sich anschließenden Northernblot-Analysen untersucht (siehe Abbildung 4.15).

Wie Abbildung 4.15 illustriert, stimmen die Northernblot-Daten im Falle von OmrA, OmrB und RprA recht gut mit den Daten aus den Pyrosequenzierungen (Tabelle 4.6) überein, da sie auch eine hyperosmotische Induktion der jeweiligen sRNAs zeigen und die Osmo-Induktion von OmrA im Vergleich zu OmrB auch gemäß den Northernblot-Daten schwächer ausfällt. Auch die, aus den Pyrosequenzierungsdaten hervorgehende, leichte hyperosmotische Induktion von MicA (Tab. 4.6) ist im Northernblot reproduzierbar. Ebenso ist die Repression von ArcZ in der hyperosmotisch gestressten Kultur reproduzierbar (Tab. 4.7). Dagegen fällt die hyperosmotische Induktion von RyeB und GlmZ laut den Northernblot-Analysen weitaus schwächer aus, als es die Pyrosequenzierungsdaten vermuten lassen (Tab. 4.6). Für GlmZ ist im Northernblot eine verstärkte Akkumulation der unprozessierten Form (obere Bande in Abb. 4.15 F) erkennbar. Im Falle der 6S RNA ist im Northernblot, im Gegensatz zur Pyrosequenzierungsanalyse (Tab. 4.6), gar keine Induktion in den Salz-gestressten Zellen zu erkennen. Die hyperosmotische Induktion von DsrA hingegen fällt laut den Northernblot-Daten stärker aus, als in der Pyrosequenzierungsanalyse ermittelt (vgl. Abb. 4.15 I und Tab.

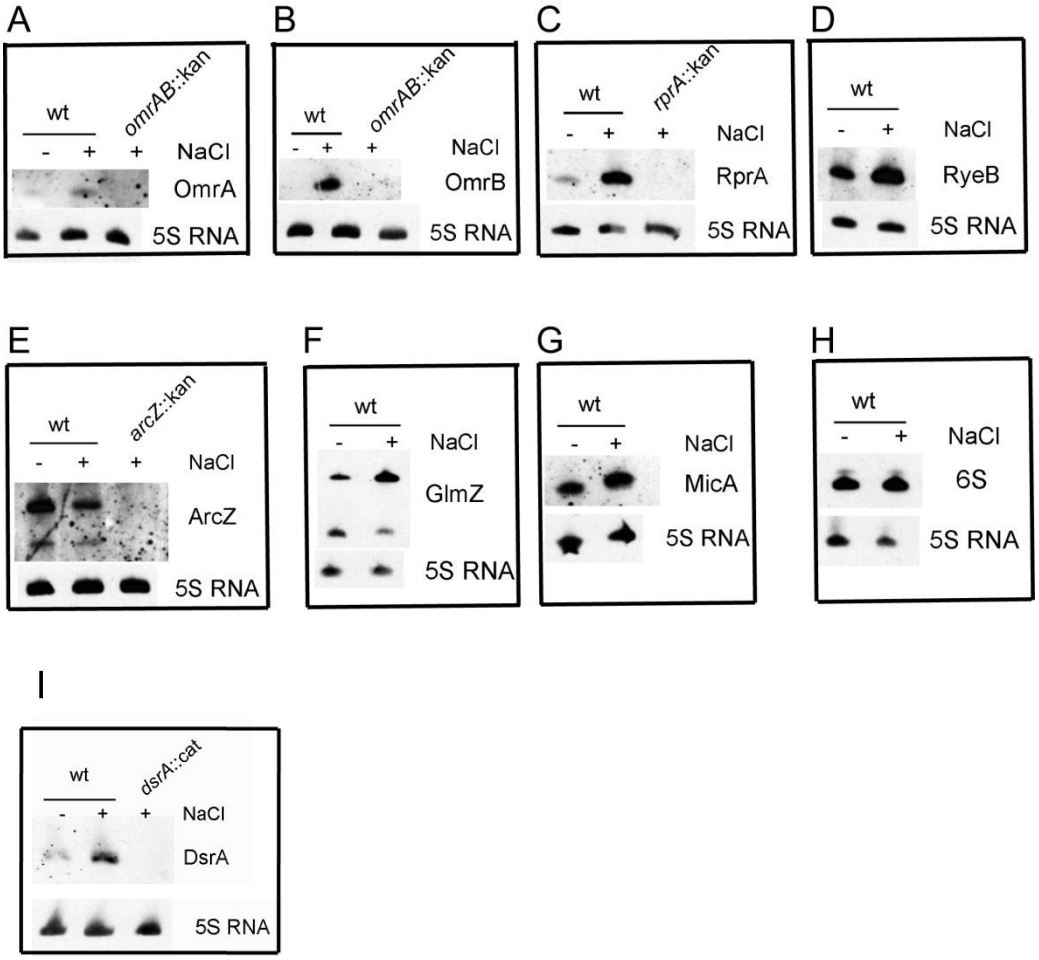


Abbildung 4.15 Verifikation der hyperosmotischen Regulation der verschiedenen sRNAs aus den Pyrosequenzierungsdaten mittels Northernblot-Analysen. Der *E. coli* Stamm W3110 wurde bei 37°C in M9-Minimalmedium mit 0.4 % Glyzerin bis zu einer OD_{578} von 0.3 kultiviert, die Kultur gesplittet und die eine Hälfte der Kultur mit 0.3 M NaCl (Endkonzentration) hyperosmotisch gestresst. Sechs Minuten später wurden aus der ungestressten und der hyperosmotisch gestressten Kultur Proben für die Gesamt-RNA-Isolation entnommen und die sRNA-Akkumulation mittels Northernblot-Analyse verfolgt. Hierzu wurden je 5 µg Gesamt-RNA auf einem denaturierenden 6 %-igen Polyacrylamidgel mit 7M Harnstoff aufgetrennt und anschließend auf eine Nylonmembran transferiert. Die Detektion der verschiedenen sRNAs erfolgte dann mit einer, für die jeweilige sRNA spezifischen, DIG-markierten Sonde und einem α-DIG Antikörper, wie unter 3.6.14.2 beschrieben. Im Falle der sRNAs (**A**) OmrA und (**B**) OmrB, (**C**) RprA , (**E**) ArcZ und DsrA (**I**) wurde, als Negativkontrolle und zur Zuordnung der Banden, Gesamt-RNA aus einer hyperosmotisch geshifteten Kultur einer entsprechenden, in dieser Arbeit hergestellten, Knockout-Mutante mit aufgetragen. Als Ladungskontrolle erfolgte die Detektion der ribosomalen 5S RNA mit einer spezifischen DIG-Sonde, wie weiter oben im Text beschrieben.

4.6) Die sRNAs SgrS und RydB waren in den Northernblot-Analysen nicht detektierbar und sind daher auch nicht gezeigt.

4.4.1 Einige der hyperosmotisch induzierten sRNAs weisen auch eine verstärkte Akkumulation in einer *hns* Mutante auf

Ziel der 454 Pyrosequenzierungsanalyse der unter hyperosmotischen Bedingungen Hfq-assoziierten RNAs war es, neue sRNAs zu identifizieren, die an der *rpoS* Regulation beteiligt sind. Insbesondere solche, welche die *rpoS* Translation direkt positiv regulieren. Die bisher gezeigten Daten (Tabelle 4.6 und Abbildung 4.15) liefern einige potenzielle Kandidaten, die an der *rpoS* Regulation beteiligt sein könnten. Andererseits ist auch das Nukleoid-assoziierte globale Regulatorprotein H-NS (siehe 2.3.2.3) ein negativer Regulator der *rpoS* Translation (Barth *et al*., 1995; Yamashino *et al*., 1995). So zeigt eine *hns* Mutante eine, vor allem in der exponentiellen Wachstumsphase, stark erhöhe Akkumulation von σ^S-Protein, zum einen verursacht durch eine Stabilisierung des σ^S-Proteins (Yamashino *et al*., 1995; Zhou und Gottesman, 2006), aber auch durch eine gesteigerte Translation der *rpoS* mRNA (Barth *et al*., 1995; Yamashino *et al*., 1995). Vorstellbar ist daher, dass in einer *hns* Mutante eine sRNA hochreguliert wird, welche die *rpoS* Translation positiv reguliert. Von daher war es von Interesse zu überprüfen, ob eine oder mehrere der hyperosmotisch induzierten sRNAs aus den Pyrosequenzierungs-Bibliotheken auch in H-NS-defizienten Zellen verstärkt akkumulieren. Um dies zu testen, wurde ein W3110 Δ*lacI-A*::scar Stamm (GB1000) und eine isogene *hns* Mutante, die ein *hns*::Tn10 Allel trägt (GB1000 *hns*::Tn10; Stamm TK82) in LB-Medium bei 37°C bis zu einer OD_{578} von 0.5 kultiviert und Proben für die Gesamt-RNA Isolation entnommen. Die Expression der verschiedenen sRNAs (Wildtyp *vs*. *hns* Mutante) wurde dann in den sich anschließenden Northernblot-Analysen verfolgt (siehe Abbildung 4.16).

Abbildung 4.16 demonstriert die Akkumulation der verschiedenen sRNAs in einer *hns* Mutante und dem isogenen Wildtyp-Hintergrund. Wie erkennbar ist, zeigen einige der zuvor als hyperosmotisch induziert identifizierten sRNAs auch eine verstärkte Akkumulation in einer *hns* Mutante gegenüber dem Wildtyp-Stamm. Vor allem die sRNAs OmrA (8-fache Akkumulation), OmrB (3-fache Akkumulation), RyeB (17-fache Akkumulation) und MicA (6-fache Akkumulation) weisen eine deutlich verstärkte Akkumulation in H-NS-defizienten Zellen auf. Die sRNAs SgrS und 6S hingegen zeigen nur eine sehr schwach verstärkte Akkumulation (1.5-fach, bzw. 1.3-fach) in der *hns* Mutante, während GlmZ und RydB in der *hns* Mutante gar nicht differentiell reguliert zu sein schein (Abb. 4.16).

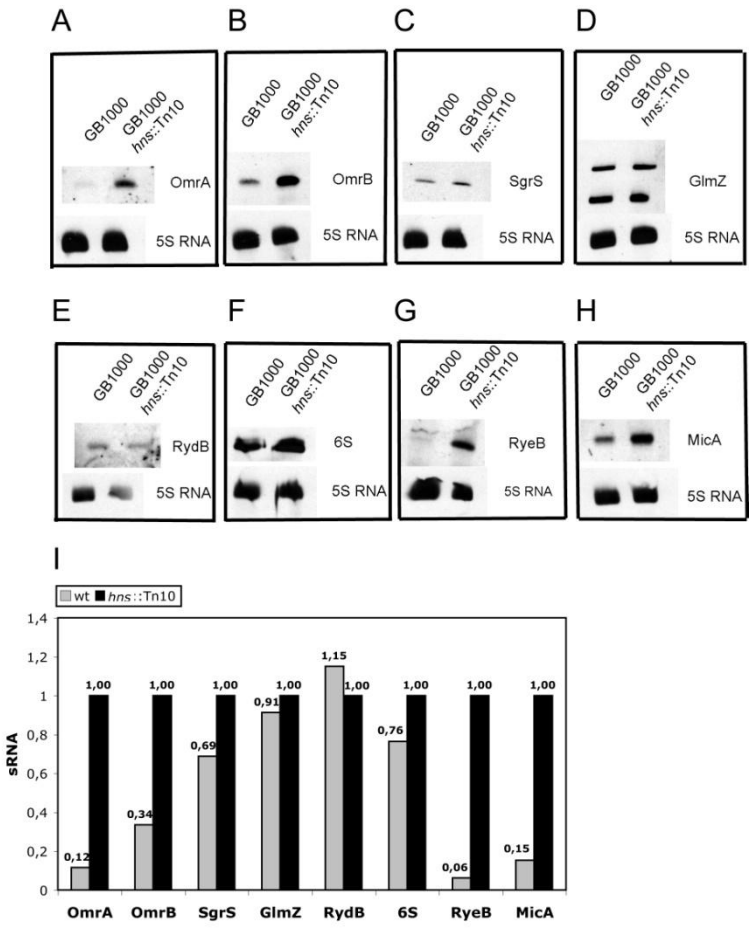


Abbildung 4.16: Expression der verschiedenen positiv Osmo-regulierten sRNAs in einer *hns* Mutante und einem isogenen Wildtyp-Stamm. Der Stamm GB1000 (W3110 Δ*lacI-A*::scar) und seine isogene *hns* Mutante wurden bei 37°C in komplexen LB-Medium bis zu einer OD_{578} von 0.5 kultiviert und anschließend Proben für die Gesamt-RNA-Isolation entnommen. Die Expressionsmuster der verschiedenen sRNAs wurden im Anschluss daran, wie zuvor beschrieben (siehe Legende zu Abbildung 4.15), in Northernblot-Analysen untersucht, ebenso die 5S RNA als Ladungskontrolle. Die Quantifizierungen der Daten ist in Abbildung (**I**) gezeigt.

4.4.2 Charakterisierung der translationalen Regulation einer *rpoS*::*gfp*-Reportergenfusion durch die hyperosmotisch induzierten sRNA-Kandidaten

Im Folgenden sollte die translationale Regulation von *rpoS* durch die aus den Pyrosequenzierungs- und Northernblot-Daten erhaltenen sRNA-Kandidaten (siehe Tabelle 4.6 und Abbildungen 4.15 und 4.16) untersucht werden. Hierzu wurde ein GFP-Reportergen-System verwendet, dass der Untersuchung der Spezifität der Interaktion von sRNAs mit (potenziellen) Ziel-mRNAs dient (Urban und Vogel, 2007). In diesem System werden die 5´-UTR und Translations-Initiations-Region (TIR) der zu untersuchenden Ziel-mRNA in einem Niederkopienzahl-Vektor an das *gfp* Gen, das für das grün fluoreszierende Protein kodiert, fusioniert (N-terminale GFP-Fusion). Die Expression der Ziel-mRNA-Fusion steht dann unter

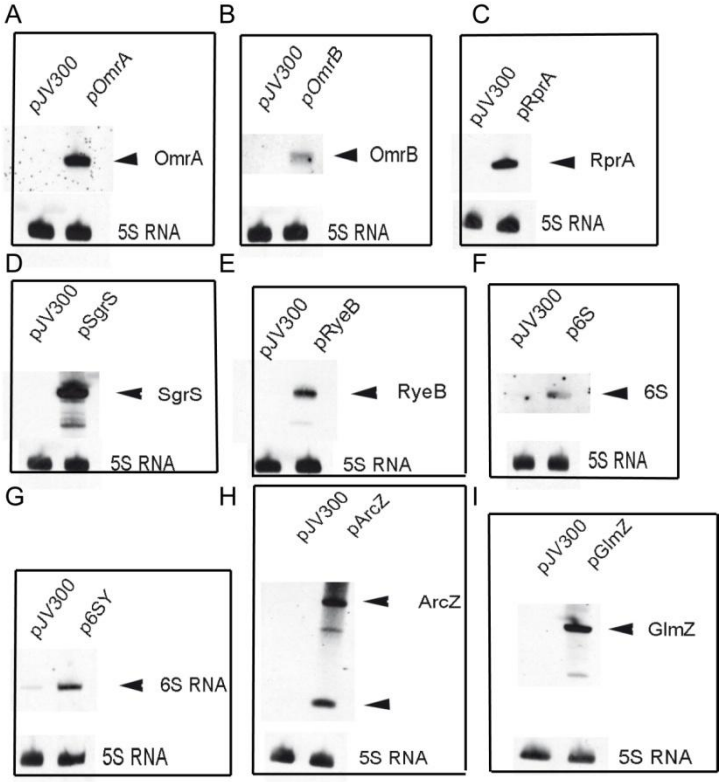


Abbildung 4.17: Expressionstest der verschiedenen klonierten sRNA-Kandidaten des *rpoS*::*gfp*-Reportergen-Systems. Der *E. coli* Stamm W3110 wurde mit den verschieden sRNA-Vektorkonstrukten (psRNA) und dem Nonsense-RNA-Vektor pJV300 als Negativkontrolle transformiert, in LB-Medium (supplementiert mit 100 µg/ml Ampicillin) bei 37°C bis zu einer OD_{578} von 1.0 kultiviert und Proben für die Gesamt-RNA-Präparation und die sich anschließenden Northernblot-Analysen entnommen. Die Detektion der verschiedenen sRNAs vollzog sich wie in Legende zu Abbildung 4.15 beschrieben, einschließlich der 5S RNA als Ladungskontrolle.

der Kontrolle des konstitutiven P_{LtetO} Promotors (Lutz und Bujard, 1997). Die zu testende sRNA hingegen wird in einen Hochkopienzahl-Vektor kloniert und steht unter der Kontrolle des konstitutiven P_{LlacO} Promotors (Lutz und Bujard, 1997). Das entsprechende sRNA-Kontroll-Plasmid pJV300 kodiert eine 50 Nt lange Nonsense-RNA (Urban und Vogel, 2007).

Um den Einfluss der verschiedenen sRNAs auf die *rpoS* Translation zu studieren, wurde eine RpoS::GFP-Fusion kloniert, welche die komplette 567 Nt lange *rpoS* 5´-UTR einschließlich der ersten 40 Aminosäurecodons des ORF enthält (pRpoS120::GFP). Diese Fusion reflektiert ausschließlich die translationale Regulation von *rpoS*, da dass für die RpoS-Proteolyse essentielle durch RssB erkannte Turnover-Element (siehe 2.3.2.4) nicht vorhanden ist. Folgende sRNA-Kandidaten wurden zum Studium der translationalen *rpoS* Regulation kloniert: OmrA, OmrB und RyeB, da diese sRNAs der zuvor getestet hyperosmotischen Induktion unterliegen (Tab. 4.6 und Abb. 4.15) und auch in einer *hns* Mutante hochreguliert werden (Abb. 4.16), was sie zu besonders interessanten potenziellen *rpoS* regulierenden Kandidaten macht. Ebenso wurde die sRNA GlmZ untersucht, da sie eine Osmo-Induktion zeigt (Tab. 4.6 und Abb. 4.15) und zudem interessant ist, weil sie ähnlich wie die bekannten *rpoS* aktivierenden sRNAs RprA und DsrA die Translation ihrer Ziel-mRNA *glmS* über einen

sehr ähnlichen anti-antisense Mechanismus aktiviert (siehe 2.2.2.2). Die laut den Pyrosequenzierungsdaten (Tab. 4.6) hyperosmotisch induzierten sRNAs SgrS und die 6S RNA wurde auch in die Untersuchungen mit einbezogen, auch wenn für diese beiden sRNAs im Northernblot keine hyperosmotische Induktion verifiziert werden konnte (Abb. 4.15) und beide in einer *hns* Mutante eine nur sehr schwach verstärkte Akkumulation aufweisen (Abb. 4.16). Die 6S RNA war hier auch insofern interessant, als dass sie durch Beeinflussung der Sigmafaktorkompetition um das RNAP-Kernenzym zugunsten der $E\sigma^S$-Holoenzymbildung als ein positiver Regulator von RpoS bekannt ist (siehe 2.2.3.1). Weiterhin wurde die 6S RNA in zwei verschiedenen Varianten kloniert: das 6S RNA-Gen alleine (p6S) und das 6S RNA-Gen (*ssrS*) zusammen mit dem stromabwärts lokalisierten *ygfA* Gen des dicistronischen Operons (p6SY), da in Literatur beschrieben ist, dass die 6S RNA-Akkumulation durch die Co-Expression von *ygfA* stärker ausfällt (Wassarman und Storz, 2000). Die sRNA MicA wurde in den folgenden Untersuchungen nicht weiter berücksichtigt, da sie in der Pyrosequenzierungs- (Tab. 4.6) und Northernblot-Analyse (Abb. 4.15) eine nur sehr schwache hyperosmotische Induktion aufwies und zudem zuvor in einer Untersuchung einer anderen Arbeitsgruppe gezeigt wurde, dass MicA keinen Einfluss auf die translationale Regulation einer *rpoS*::*gfp*-Fusion ausübt (Urban und Vogel, 2007). Auch eine weitere Analyse der Regulation der *rpoS* Translation durch die sRNA RydB wurde verworfen, da diese in der Northernblot-Analyse keine Osmo-Induktion zeigte, bzw. nicht detektierbar war und kein differentielles Regulationsmuster in einer *hns* Mutante aufwies (Abb. 4.16). Die sRNA ArcZ wurde als Positivkontrolle in die Analysen miteinbezogen, da sie bereits zuvor als ein positiver Regulator der *rpoS* Translation identifiziert worden war (Mandin und Gottesman, 2010) (siehe 2.2.2.2).

Vor der eigentlichen Untersuchungen des Einflusses der verschiedenen sRNAs auf die translationale Regulation der *rpoS*::*gfp*-Fusion wurde zunächst in einem Kontroll-Experiment die Expression der diversen klonierten sRNA in Northernblot-Analysen verifiziert. Hierzu wurden die verschiedenen sRNA-Plasmidkonstrukte, sowie die Nonsense-RNA Plasmid-Kontrolle pJV300 in den *E. coli* Stamm W3110 transformiert, die Kulturen bis zu einer OD_{578} von 1.0 bei 37°C in LB-Medium wachsen gelassen und Proben für die Gesamt-RNA-Isolation und die sich anschließende Northernblot-Analyse genommen. Wie die Northernblots in Abbildung 4.17 illustrieren, waren alle sRNA-Vektoren funktionell, d.h. alle exprimierten die diversen klonierten sRNAs.

Um den Einfluss der verschiedenen sRNAs auf die translationale Regulation von *rpoS* zu studieren, wurden die oben beschrieben sRNA-Plasmidkonstrukte (pSRNA), sowie das Plasmid-kodierte *rpoS*120::*gfp* Konstrukt (pRpoS120::GFP) in den *E. coli* W3110 Stamm co-transformiert und in komplexen LB-Medium (supplementiert mit 100 µg/ml Ampicillin und 20 µg/ml Chloramphenicol) bei 37°C kultiviert. Nachfolgend wurden bei einer OD_{578} von 1.0 und 3.0 Proben für die Westernblot-Analyse entnommen.

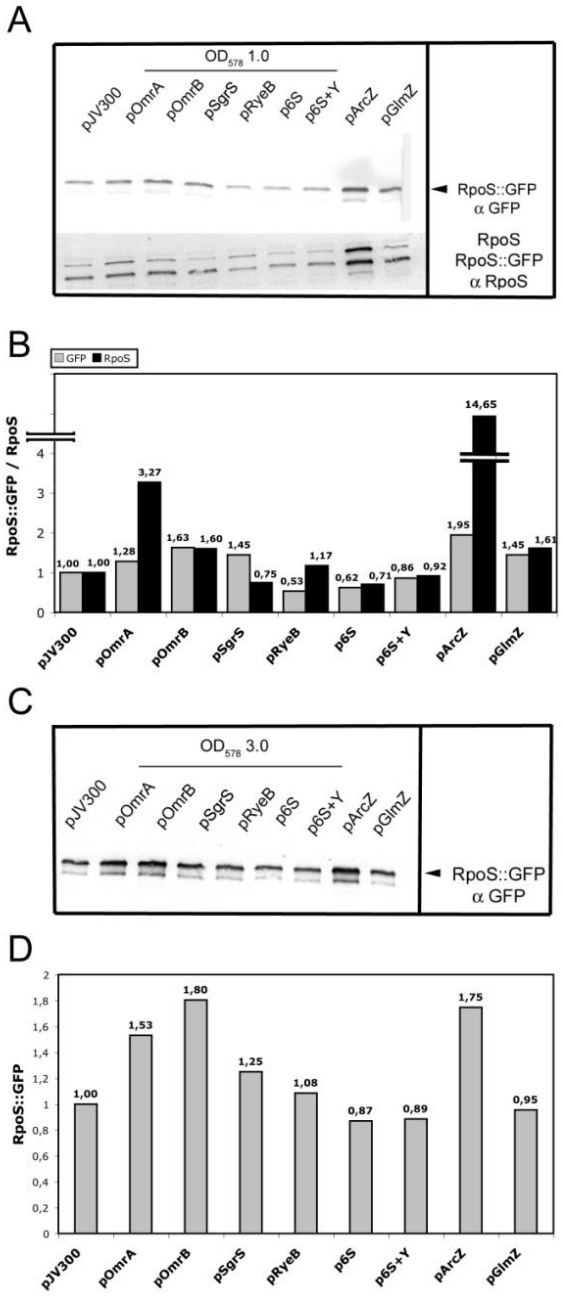


Abbildung 4.18: RpoS::GFP-Reportergen-Analyse zur Untersuchung der translationalen Regulation von *rpoS* durch verschiedene sRNAs. Der *E.coli* K12 Stamm W3110 wurde jeweils mit einem der verschiedenen sRNA-Plasmide (pSRNA), sowie mit dem *rpoS*120::*gfp*-haltigen Plasmid (pRpoS120::GFP) co-transformiert und in LB-Medium (supplementiert mit 100 µg/ml Ampicillin und 20 µg/ml Chloramphenicol) bei 37°C kultiviert. (**A**) Sowohl in der postexponentiellen Phase (OD_{578} 1.0), als auch (**C**) beim Eintritt in die stationäre Wachstumsphase (OD_{578} 3.0) wurden Proben für die nachfolgenden Westernblot-Analysen entnommen. Anschließend wurde jeweils 1 µg Gesamtprotein auf einem 12%-igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Membran erfolgte die Detektion des RpoS::GFP-Hybridproteins zum einen mit einem monoklonalen gegen GFP gerichteten Antikörper (A und C: α GFP), zum anderen mit einem polyklonalen gegen σ^S gerichteten Antikörper (α RpoS), der auch die Detektion des endogenen RpoS (Abb. 4.18 A unterer Blot, obere Banden) ermöglichte. Die Quantifizierungen der Daten befinden sich unterhalb der jeweiligen Westernblots (**B** und **D**). Graue Balken zeigen die Quantifizierungen der mittels des α GFP-Antikörpers detektieren Proteine (B und D), schwarze Balken (B) jene aus der Detektion mittels des α RpoS-Antikörpers.

Wie aus dem oberen Westernblot in Abbildung 4.18 A (α-GFP-Blot: OD_{578} 1.0) hervorgeht, zeigt die translationale *rpoS*::*gfp*-Fusion leicht erhöht akkumulierte Mengen an RpoS::GFP-Hybridprotein bei Überexpression einiger der getesteten sRNAs in Relation zum pJV300 Kontrollvektor (1.3- bis 2-fache Aktivierung). Dabei ergibt sich folgende Abstufung (sRNAs geordnet nach abnehmender *rpoS*::*gfp*-Aktivierung): ArcZ (Positivkontrolle) > OmrB > SgrS und GlmZ > OmrA. Aus den oberen Banden im unteren Westernblot in Abbildung 4.18 A (α-RpoS-Blot: OD_{578} 1.0) geht hervor, dass das chromosomale RpoS durch die Überexpression von ArcZ 14-fach stärker akkumuliert, als in der Kontrolle (pJV300). Die Überexpression von OmrA führt zu einer 3-fachen Aktivierung der endogenen σ^S-Expression, jene von OmrB und GlmZ zu einer leichten 1.6-fachen Aktivierung. Die Überexpression der sRNAs RyeB und 6S (p6S) hingegen hat eine leichte Reduktion an RpoS::GFP-Hybridprotein (etwa 2-fach) zur Folge (Abb. 4.18 A, oberer Westernblot). Im Westernblot in Abbildung 4.18 C (α-GFP-Blot: OD_{578} 3.0) ist ersichtlich, dass die Überexpression der folgenden sRNAs (geordnet nach abnehmender *rpoS*::*gfp*-Aktivierung) eine, in Relation zur pJV300-Kontrolle, 1.3- bis 1.8-fache Aktivierung der translationalen *rpoS*::*gfp*-Fusion zur Folge hat: OmrB ≥ ArcZ > OmrA > SgrS. Die anderen sRNAs haben hier keinen signifikanten Einfluss auf die Expression von RpoS::GFP. Zusammengenommen demonstrieren die Ergebnisse also, das vor allem die Überexpression von ArcZ, OmrA und OmrB zu einer Aktivierung der translationalen *rpoS*-Fusion führt. Um den Einfluss dieser sRNAs auf die translationale Aktivierung von (endogenem) *rpoS* unter physiologisch relevanten Stressbedingungen (hyperosmotischer Stress und Säurestress) zu untersuchen, wurden in den nachfolgenden Experimenten Knock-out Mutanten in diesen sRNA-Genen in *in vivo* Funktionsanalysen studiert (siehe 4.5).

4.5 Die hyperosmotische und Säurestress-vermittelte RpoS-Induktion ist nicht ausschließlich von der translationalen Aktivierung durch sRNAs abhängig

Die hyperosmotische Induktion von σ^S (siehe 2.3.1.2) beinhaltet posttranskriptionale Regulationsmechanismen (Muffler *et al*., 1996b), die sowohl auf einer gesteigerten σ^S-Synthese basieren, als auch auf einer (sekundären) Stabilisierung des σ^S-Proteins. Eine systematische Untersuchung der Rolle von sRNAs bei der Osmoregulation von RpoS wurde dabei bisher noch nicht durchgeführt. Wie die bisherigen Ergebnisse zeigen, führt vor allem die Überexpression der sRNAs OmrA, OmrB und ArcZ zur Aktivierung einer translationalen *rpoS*::*gfp*-Fusion (siehe 4.4.4, Abb. 4.18). Um den Beitrag dieser sRNAs auf die, unter physiologischen Stressbedingungen (hyperosmotischer Stress und Säurestress), stimulierte *rpoS* Translation zu studieren, wurden in den nachfolgenden Experimenten knock-out Mutanten in diesen sRNA-Genen auf ihre Fähigkeit hin untersucht, die σ^S-Expression unter den relevanten Stresssituationen zu vermitteln. Hierzu wurden diese Mutanten zunächst

mittels der „One-Step Inactivation“-Methode nach Datsenko und Wanner (2000) generiert (siehe auch Material- und Methoden 3.6.9). Im Falle von OmrA und OmrB wurde eine Doppelmutante hergestellt, da die Gene dieser beiden sRNAs unmittelbar einander benachbart sind. In den sich anschließenden Experimenten wurde auch der Einfluss der bekannten *rpoS* aktivierenden sRNAs RprA und DsrA auf die hyperosmotische und Säurestress-induzierte σ^S-Induktion untersucht (siehe 4.5.1).

4.5.1 Eine *dsrA* Mutante weist eine stark reduzierte Akkumulation und Induktion von *rpoS* mRNA und RpoS-Protein unter Osmo- und Säurestress-Bedingungen auf

Um den Einfluss der verschiedenen sRNAs auf die hyperosmotische Regulation von RpoS zu untersuchen, wurden mit dem *E. coli* W3110 Wildtypstamm und den entsprechenden sRNA knock-out Mutanten Osmoshift-Experimente durchgeführt. Hierbei wurden die entsprechenden Stämme in M9-Minimalmedium mit 0.4 % Glyzerin als Kohlenstoffquelle bei 37°C bis zu einer OD_{578} von 0.3 kultiviert, die Kulturen gesplittet und die eine Hälfte der Kulturen mit 0.3 M NaCl (Endkonzentration) hyperosmotisch gestresst. 10 Minuten danach wurden Proben für die Gesamtprotein-Extraktion und Gesamt-RNA-Isolation entnommen und die Induktion und Akkumulation des σ^S-Proteins und der *rpoS* mRNA in der sich anschließenden Immunoblot-Analyse bzw. Northernblot-Analyse verfolgt.

Wie aus dem Westernblot in Abbildung 4.19 hervorgeht, weisen die verschiedenen sRNA-defizienten Hintergründe der osmotisch gestressten Kulturen gegenüber dem W3110 Wildtyp reduzierte σ^S-Mengen auf. Während die Deletion von RprA, OmrA und OmrB und ArcZ einen nur leichten Einfluss auf die RpoS-Akkumulation hat (25-50 % reduzierte σ^S-Mengen), ist die Akkumulation von σ^S in einer *dsrA* Mutante gegenüber dem isogenen Wildtypstamm besonders stark beeinträchtigt (etwa 80 % bzw. mehr als 4-fach reduzierte σ^S-Mengen). Auch die basalen RpoS-Mengen in den einzelnen sRNA-Mutanten vor Osmoinduktion sind in Allgemeinen verglichen mit jenen des Wildtyps erniedrigt.

Wie der Northernblot in Abbildung 4.19 demonstriert, folgen die *rpoS* Transkriptmengen weitgehend den RpoS-Proteinmengen. Während die akkumulierten *rpoS* mRNA Mengen der hyperosmotisch geshifteten Kulturen in den RprA-, OmrA-, OmrB- und ArcZ-defizienten Hintergründen gegenüber dem Wildtyp nur leicht reduziert sind (20-40 % niedrigere Transkriptmengen), ist die *rpoS* mRNA-Akkumulation in der *dsrA* Mutante besonders stark beeinträchtigt (mehr als 90 % reduzierte *rpoS* Transkriptmengen). Dennoch kommt es auch in einer *dsrA* Mutante zu einer hyperosmotischen Induktion des σ^S-Proteins (1.6-fache Induktion) und der *rpoS* mRNA (2.7-fache Induktion), auch wenn diese Induktion im Vergleich zum Wildtyp (3.5-fache Induktion von σ^S und 13-fache Induktion der *rpoS*

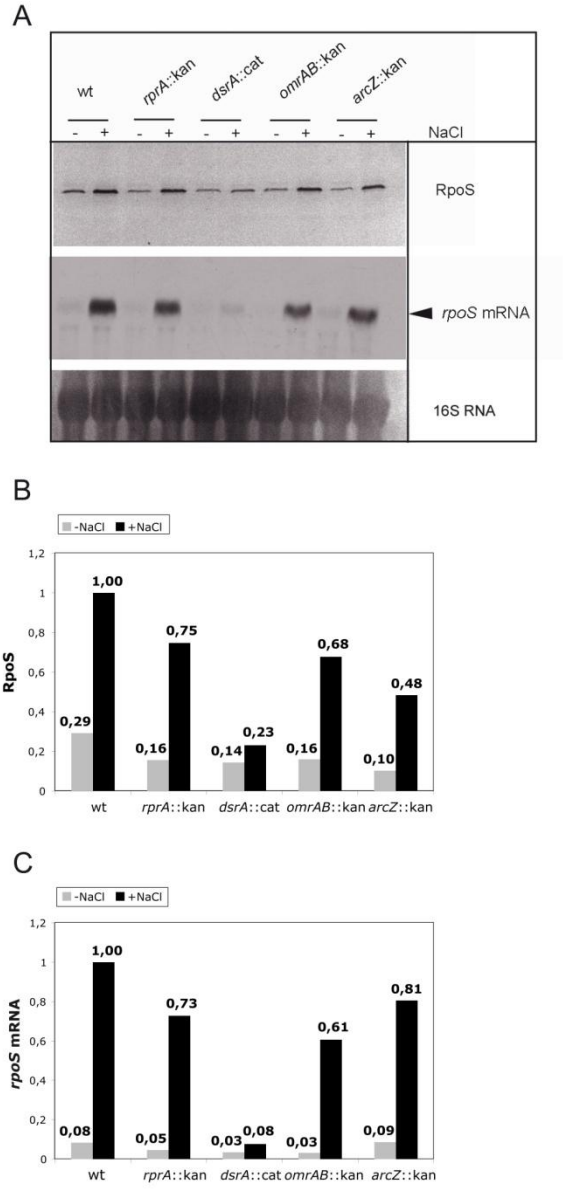


Abbildung 4.19: Akkumulation und Induktion von σ^S-Protein und *rpoS* mRNA in hyperosmotisch gestressten und ungestressten *E. coli* Zellen in verschiedenen sRNA-defizienten Hintergründen und im Wildtyp-Hintergrund. Der *E. coli* W3110 Wildtypstamm und die entsprechenden sRNA-defizienten Hintergründe wurden in M9-Minmalmedium mit 0.4 % Glyzerin bei 37°C bis zu einer OD_{578} von 0.3 kultiviert, die Kulturen gesplittet und die eine Hälfte der Kulturen mit 0.3 M NaCl hyperosmotisch gestresst. 10 Minuten danach wurde den Kulturen Proben für die sich anschließenden Western- und Northernblot-Analysen entnommen. Zur Detektion von σ^S wurden je 5 µg Gesamtprotein auf einem 12%-igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Detektion von σ^S erfolgte mit einem gegen RpoS gerichteten polyklonalen Antiserum. Zur Detektion der *rpoS* mRNA wurden je 10 µg Gesamt-RNA auf einem denaturierendem 1.2%-igen Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Nylonmembran erfolgte die Detektion des *rpoS* Transkripts mit einer gegen das *rpoS* mRNA 3´-Ende gerichteten DIG-markierten Sonde und einem gegen DIG gerichteten Antikörper, wie unter 3.6.14.1 beschrieben. Als Ladungskontrolle für den Northernblot erfolgte die Anfärbung der geblotteten 16S RNA durch Methylenblau. Die Quantifizierung der Westernblot- und Northernblotdaten ist in (**B**) bzw. (**C**) gezeigt. Hierbei wurden die akkumulierten RpoS-Protein- bzw. *rpoS* mRNA Mengen jeweils auf die σ^S- bzw. *rpoS* mRNA Menge des hyperosmotisch gestressten Wildtyp-Hintergrundes (wt + NaCl) normiert.

mRNA) und den anderen sRNA Mutanten (etwa 4-5-fache Induktion von σ^S und 9-20-fache Induktion der *rpoS* mRNA) wesentlich geringer ausfällt. Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die hyperosmotische Induktion und Akkumulation von σ^S und der *rpoS* mRNA vor allem in einer *dsrA* Mutante stark beeinträchtigt ist.

RpoS ist auch ein Masterregulator der Säurestressantwort (siehe 2.3.1.3) und wird dementsprechend in Zellen, die einem plötzlichen Säurestress unterworfen werden, induziert (Bearson *et al*., 1996; Heuveling *et al*., 2008; Weber *et al*., 2005). Im nachfolgenden Experiment wurde in Analogie zum oben beschriebenen Osmostress-Experiment der Einfluss der verschiedenen sRNAs auf die Säurestress-abhängige σ^S-Regulation untersucht. Hierzu wurde der W3110 Stamm und die isogenen sRNA-Mutanten in M9-Minimalmedium supplementiert mit 0.1 % Glukose bei 37°C bis zu einer OD_{578} von 0.3 kultiviert, die Kulturen gesplittet und jeweils die eine Hälfte der Kulturen durch Zugabe von 2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure (MES, 170 mM Endkonzentration) Säure gestresst (führt zur Absenkung des pH-Wertes des Mediums auf 5.0). 10 Minuten später wurden den Kulturen Proben für die Gesamtprotein-Extraktion und Gesamt-RNA-Isolation entnommen und die Induktion und Akkumulation von RpoS-Protein und *rpoS* Transkript in der sich anschließenden Immunoblot-Analyse bzw. Northernblot-Analyse verfolgt.

Wie die Immunoblot-Analyse in Abbildung 4.20 illustriert, ergibt sich für das Säurestress-Experiment in Bezug auf die Akkumulation und Induktion von σ^S-Protein ein ähnliches Bild wie beim Osmostress-Experiment. Während die Menge an akkumuliertem RpoS-Protein aus den Säure-gestressten Kulturen in einer *rprA* und *arcZ* Mutante gegenüber dem isogenen Wildtypstamm leicht reduziert ist (etwa 30% niedrigere RpoS-Proteinmengen) und in der *omrA*/*omrB* Mutante sogar unbeeinflusst zu sein scheint, ist die RpoS-Akkumulation in der *dsrA* Mutante besonders stark reduziert (77 % niedrigere σ^S-Proteinmengen). Wie der Northernblot in Abbildung 4.20 zeigt, ist auch die Akkumulation des *rpoS* Transkripts in den Säure-gestressten Kulturen im Falle der *dsrA* Mutante im Vergleich zum Wildtyp besonders stark reduziert (79 % niedrigere *rpoS* mRNA-Mengen). Interessanterweise und anders als beim Osmostress-Experiment beobachtet, weist auch die Säure-gestresste *arcZ* Mutante im Vergleich zum Wildtyp signifikant niedrigere akkumulierte *rpoS* mRNA Mengen auf (73 % erniedrigte Transkriptmengen). Ob dieser Effekt der Tatsache geschuldet ist, dass eine verminderte *rpoS* Translation in der *arcZ* Mutante zu einer Destabilisierung der *rpoS* mRNA führt, oder aber indirekter Natur ist, wurde in den nachfolgenden Experimenten nicht weiterverfolgt. Interessant ist hierbei allerdings die Tatsache, dass die sRNA ArcZ einen direkten negativen Einfluss auf das, die *rpoS* Transkription negativ regulierende Arc-System ausübt (Mandin und Gottesman, 2010; Mika und Hengge, 2005) und eine Derepression des Arc-Systems in der *arcZ* Mutante eine verminderte *rpoS* Transkription zur Folge haben könnte (siehe Diskussion 5.2.3.2). Dennoch

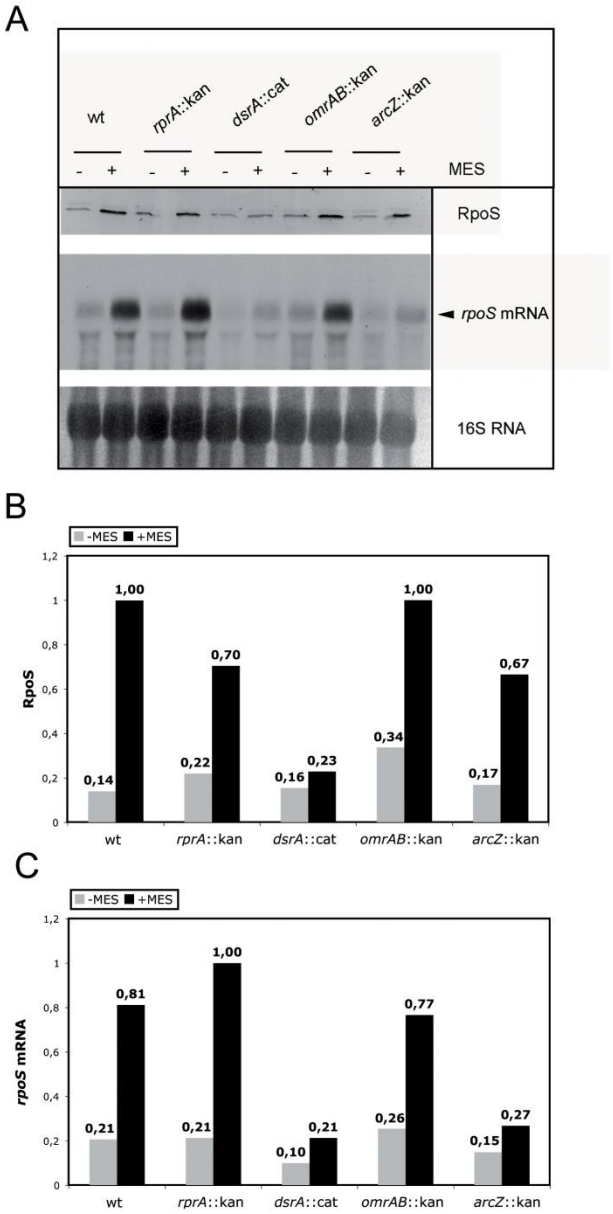


Abbildung 4.20: Akkumulation und Induktion von RpoS und *rpoS* Transkript in Säure-gestressten und ungestressten *E. coli* Zellen im W3110 Wildtyp-Stamm und verschiedenen isogenen sRNA-Mutanten. Der *E. coli* W3110 Wildtypstamm und die entsprechenden sRNA-defizienten Hintergründe wurden in M9-Minmalmedium mit 0.1 % Glukose bei 37°C bis zu einer OD_{578} von 0.3 kultiviert, die Kulturen gesplittet und die eine Hälfte der Kulturen mit 170 mM MES Säure-gestresst (senkt den pH-Wert des Mediums auf 5.0). 10 Minuten später wurden Proben für die sich anschließenden Western- und Northernblot-Analysen entnommen. Die Detektion von σ^S-Protein und *rpoS* mRNA erfolgte wie in der Legende zu Abbildung 4.19 beschrieben. Als Ladungskontrolle für den Northernblot erfolgte die Anfärbung der geblotteten 16S RNA durch Methylenblau. Die Quantifizierung der Westernblot- und Northernblotdaten ist in (**B**) bzw. (**C**) gezeigt. Hierbei wurden die akkumulierten RpoS-Protein- bzw. *rpoS* Transkriptmengen jeweils auf die σ^S- bzw. *rpoS* mRNA Menge des Säure-gestressten Wildtyp-Hintergrundes (wt + MES) normiert.

zeigen auch die Säurestress-Experimente eine leichte, wenn auch im Vergleich zum Wildtyp (7-fache Induktion) und den übrigen sRNA-Mutanten (3-4-fache Induktion) signifikant verminderte, Induktion des σ^S-Proteins in der *dsrA* Mutante (1.4-fache Induktion). Ähnlich verhält es sich mit der Induktion des *rpoS* Transkripts. Hierbei kommt es sowohl in der *dsrA*,

als auch in der *arcZ* Mutante trotz der niedrigeren Akkumulation zu einer Induktion der *rpoS* mRNA (etwa 2-fach), selbst wenn diese im Vergleich zum Wildtyp (4-fache Induktion) und der *rprA* und *omrA*/*omrB* Mutante (5-fache bzw. 3-fache Induktion) vermindert ist. Es lässt sich also festhalten, dass die Säurestress-Akkumulation und Induktion von σ^S-Protein und *rpoS* Transkript besonders in einer *dsrA* Mutante signifikant niedriger ausfällt. Weiterhin weist auch eine *arcZ* Mutante eine schwächere Säurestress-Akkumulation und Induktion der *rpoS* mRNA auf.

4.5.2 Eine *dsrA* Mutante weist auch erniedrigte RpoS-Syntheseraten in Antwort auf hyperosmotischen Stress auf

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass die Akkumulation und Induktion des RpoS-Proteins und der *rpoS* mRNA in einer *dsrA* Mutante unter hyperosmotischem Stress und Säurestress deutlich reduziert ist (siehe Abbildungen 4.19 und 4.20). Die beobachteten reduzierten σ^S-Mengen unter den untersuchten Stressbedingungen legen nahe, dass auch die Syntheseraten des σ^S-Proteins von der *dsrA* Mutation negativ betroffen sind. Um diese zu untersuchen, wurde der Stamm W3110 und die entsprechende *dsrA* Mutante in M9-Minimalmedium mit 0.4 % Glyzerin bei 37 °C bis zu einer OD_{578} von 0.3 wachsen gelassen, die Kulturen gesplittet und jeweils die eine Hälfte der Kulturen mit 0.3 M NaCl (Endkonzentration) hyperosmotisch gestresst und die andere Hälfte (ungestresste Kontrolle, - NaCl) mit dem gleichen Volumen an *Aqua dest*. versetzt. Die σ^S-Syntheseraten der *dsrA* Mutante und ihres isogenen Wildtypstammes wurden anschließend 10 und 20 Minuten nach dem Osmoshift mittels radioaktiver ^{35}S-Pulse-Chase-Experimente mit nachfolgender Immunopräzipitation (siehe Material und Methoden 3.5.3) bestimmt und miteinander verglichen.

Wie aus Abbildung 4.21 hervorgeht, führt der hyperosmotische Stress erwartungsgemäß (Muffler *et al*., 1996b) zu einer 1.5-fachen (10 Minuten NaCl) bis 3-fachen (20 Minuten NaCl) Steigerung der σ^S-Syntheserate im W3110 Wildtyp. In der *dsrA* Mutante hingegen hat der hyperosmotische Shift einen etwa 2-fachen Rückgang in der σ^S-Syntheserate zur Folge. Die Daten deuten also daraufhin, dass die sRNA DsrA an der hyperosmotischen translationalen Aktivierung von *rpoS* beteiligt ist.

4.5.3 Der positive Effekt von DsrA auf die hyperosmotische Akkumulation und Induktion von RpoS ist unabhängig von H-NS

Das Nukleoid-assoziierte globale Regulatorprotein H-NS ist ein negativer Regulator der *rpoS* Translation (Barth *et al*., 1995; Yamashino et al., 1995) (siehe 2.3.2.3). Weiterhin unterliegt

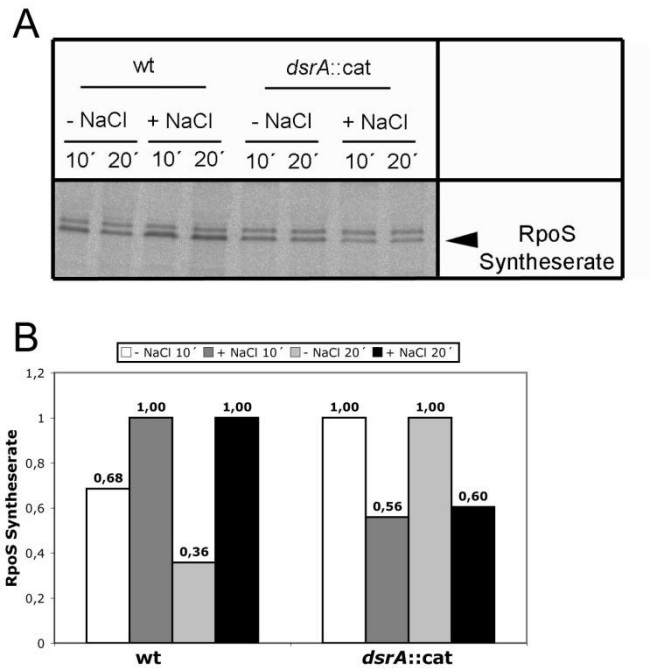


Abbildung 4.21: RpoS-Syntheseraten einer *dsrA* Mutante und ihres isogenen Wildtyp-Stammes in hyperosmotisch gestressten und ungestressten Zellen (Kontrolle). Der W3110 Stamm und seine *dsrA* Mutante wurden in M9-Minimalmedium 0.4 % Glyzerin bis zu einer OD_{578} von 0.3 bei 37 °C kultiviert, die Kulturen gesplittet und jeweils eine Hälfte der Kulturen mit 0.3 M NaCl hyperosmotisch geshiftet. 10 und 20 Minuten danach wurden Proben für die Bestimmung der σ^S-Syntheseraten mittels radioaktiver „Pulse-Chase"-Experimente entnommen. Hierbei wurden die Aliquots aus den Kulturen für 30 Sekunden mit L-[^{35}S]-Methionin radioaktiv markiert, gefolgt von einem 20 Sekunden „Chase" mit nichtradioaktivem Methionin und nachfolgender Immunopräzipitation mit einem polyklonalen Antiserum gegen σ^S (siehe Material und Methoden, 3.5.3). Die originalen PhosphoImager-Bilder der SDS-Gele sind in (**A**), deren Quantifizierung in (**B**) gezeigt.

ebenso die Stabilität des σ^S-Proteins der negativen Kontrolle durch H-NS (Yamashino *et al.*,1995; Zhou und Gottesman, 2006) (siehe 2.3.2.4). Dementsprechend zeigt eine *hns* Mutante eine erhöhte *rpoS* Translation und Akkumulation von RpoS-Protein, aber auch eine starke Stabilisierung des RpoS-Proteins. Gleichzeitig unterliegt aber H-NS selbst der negativen Regulation durch die sRNA DsrA, indem DsrA durch spezifische Basenpaarung mit der *hns* mRNA deren Translation inhibiert und zudem, möglicherweise als sekundäre Folge der ausbleibenden *hns* Translation, den Abbau der *hns* mRNA stimuliert (Lease *et al.*, 1998; Lease und Belfort, 2000; Sledjeski und Gottesman, 2005). In der *dsrA* Mutante sollten die H-NS-Mengen höher sein und damit auch die Repression der *rpoS* Translation, sowie die Destabilisierung von σ^S verstärkt auftreten. Vorstellbar ist also, dass die beobachtetereduzierte hyperosmotische Akkumulation und Induktion von σ^S in der *dsrA* Mutante indirekter Natur ist und auf der Derepression von H-NS beruht. Um dies zu testen, wurde die hyperosmotische Akkumulation und Induktion von σ^S sowohl in einer *hns* Einzelmutante, als auch in einer *hns*/*dsrA* Doppelmutante untersucht. Da die *hns* Mutanten kein Wachstum in Minimalmedium

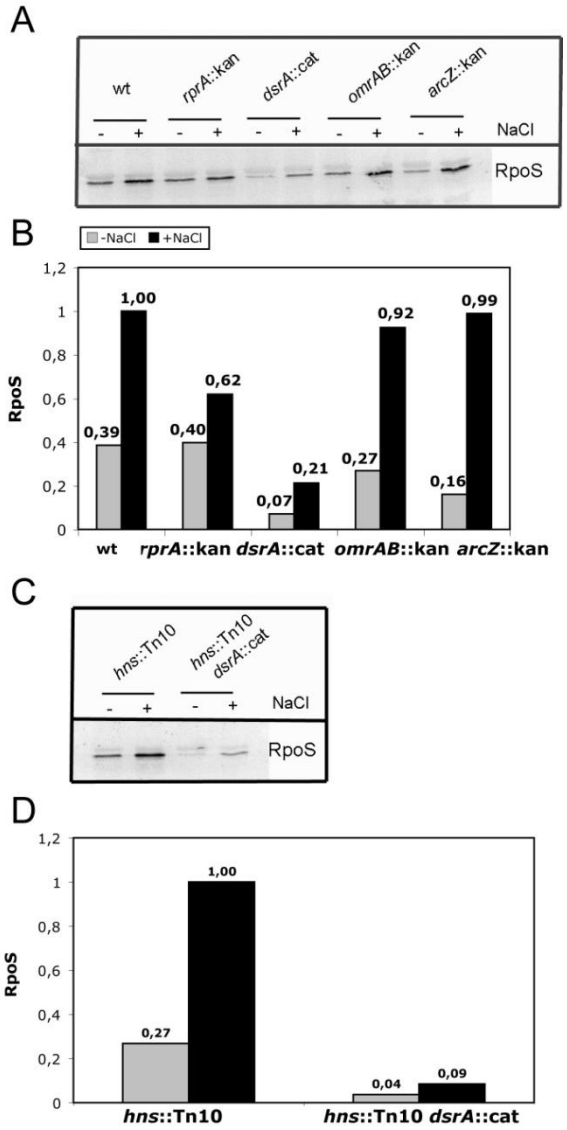


Abbildung 4.22: Akkumulation und Induktion von RpoS in hyperosmotisch gestressten und ungestressten *E. coli* Zellen im W3110 Wildtyp und entsprechenden sRNA-Mutanten, sowie in einer *hns* und einer *hns*/*dsrA* Doppelmutante. Der *E. coli* W3110 Wildtypstamm und die entsprechenden sRNA-Mutanten (**A**), sowie die *hns* und *hns*/*dsrA*-defizienten Hintergründe (**C**) wurden in LB-Medium bei 37°C bis zu einer OD_{578} von 0.5 kultiviert, die Kulturen gesplittet und jeweils die eine Hälfte der Kulturen mit 0.5 M NaCl hyperosmotisch gestresst und die andere Hälfte der Kulturen ungestresst belassen. 10 Minuten danach wurde den Kulturen Proben für die sich anschließenden Immunoblot-Analysen entnommen. Zur Detektion von σ^S wurden je 5 µg Gesamtprotein auf einem 12%-igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Detektion von σ^S erfolgte mit einem gegen RpoS gerichteten polyklonalen Antiserum. Die Quantifizierungen der Westernblots ist jeweils unterhalb des Blots in (**B**) bzw. (**D**) gezeigt. In (B) wurden die akkumulierten RpoS-Protein-Mengen jeweils auf die σ^S-Menge des hyperosmotisch gestressten Wildtyp-Hintergrundes (wt + NaCl) normiert, in (D) auf die akkumulierte σ^S-Menge der hyperosmotisch gestressten *hns*::Tn10 Mutante (*hns*::Tn10 + NaCl).

aufwiesen (nicht gezeigte Daten), wurden die Osmoshift-Experimente in komplexem LB-Medium durchgeführt. Um den zuvor in M9-Minimalmedium untersuchten Einfluss der verschiedenen sRNAs auf die hyperosmotische σ^S-Regulation auch in LB-Medium zu verifizieren, wurde gleichzeitig der Einfluss der verschiedenen sRNAs auf die RpoS-

Osmoinduktion in LB-Medium reproduziert. Der W3110 Stamm und die entsprechenden sRNA-Mutanten, sowie die *hns* Mutante und die *hns*/*dsrA* Doppelmutante wurden in komplexem LB-Medium bei 37 °C bis zu einer OD_{578} von 0.5 kultiviert, gesplittet und die jeweils die eine Hälfte der gesplitteten Kulturen mit 0.5 M NaCl hyperosmotisch gestresst. Die andere Hälfte der Kulturen (ungestresste -NaCl Kontrollen) wurden mit dem gleichen Volumen an *Aqua dest*. versetzt. 10 Minuten später wurden Proben für die sich anschließenden Westernblot-Analysen entnommen, in denen die hyperosmotische Induktion des σ^S-Proteins im Wildtyp und den entsprechenden Mutanten verfolgt wurde.

Wie Abbildung 4.22 A und B illustrieren, waren die zuvor in M9-Minimalmedium beobachteten Effekte der sRNA-Mutanten auf die hyperosmotische Akkumulation und Induktion von RpoS im Wesentlichen reproduzierbar. Während das Fehlen von RprA in einer im Vergleich zum Wildtyp nur leicht verminderten hyperosmotischen Akkumulation von σ^S resultiert (38 % reduzierte RpoS-Mengen), führt vor allem die *dsrA* Deletion zu einer starken Reduktion an σ^S (79 % niedrigere Mengen im Vergleich zum Wildtyp). Auch die basalen RpoS-Mengen in den *dsrA* und *arcZ* Mutanten vor Osmoinduktion sind verglichen mit jenen des Wildtyps signifikant erniedrigt. Dennoch weist auch die *dsrA* Mutante eine hyperosmotische 3-fache Induktion von σ^S auf, die mit jener des Wildtyps und der *omrA*/*omrB*- und *arcZ* Mutanten (3-fache bis 6-fache Induktion) vergleichbar ist. In diesem gezeigten Experiment ist die σ^S-Osmoinduktion in der *rprA* Mutante (1.6-fach) sogar niedriger als in der *dsrA* Mutante. In Abbildung 4.22 C und D ist die hyperosmotische σ^S-Induktion in einer *hns* und einer *hns*/*dsrA* Doppelmutante gezeigt. Auch in einer *hns* Mutante kommt es zu der zuvor beobachteten hyperosmotischen Akkumulation und Induktion von RpoS (etwa 3.7-fache Induktion), während die σ^S-Osmoinduktion und Akkumulation in einer *hns*/*dsrA* Doppelmutante deutlich erniedrigt ist (92 % reduzierte RpoS-Proteinmengen und lediglich etwa 2-fache Induktion). Diese Daten implizieren also, dass die hyperosmotische Aktivierung von *rpoS* durch DsrA direkt und unabhängig von H-NS vermittelt wird. Würde die Osmoinduktion von σ^S durch DsrA indirekt auf der Repression von H-NS mittels DsrA beruhen, so wäre zu erwarten, dass die reduzierte hyperosmotische Akkumulation und Induktion von σ^S der *dsrA* Mutante in der *hns*/*dsrA* Doppelmutante aufgehoben wäre. Auch die Osmoinduktion und Akkumulation von σ^S in der *hns* Einzelmutante verdeutlicht, dass H-NS offensichtlich nicht an der hyperosmotischen σ^S- Regulation beteiligt ist.

4.5.4 Die hyperosmotische induzierte sRNA DsrA zeigt eine nur leichte Säurestress-Induktion

Wie die bisherigen Ergebnisse illustrieren, ist die hyperosmotische und Säurestress-abhängige Akkumulation und Induktion von σ^S vor allem von der kleinen sRNA DsrA abhängig. Die übrigen relevanten getesteten sRNAs (RprA, OmrA, OmrB und ArcZ) haben einen nur sehr

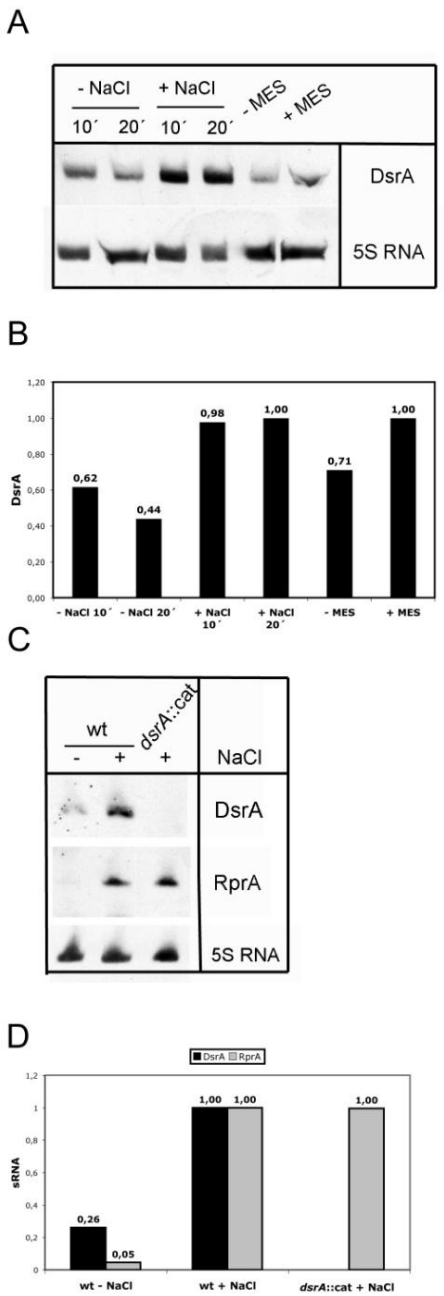


Abbildung 4.23: Hyperosmotische und Säurestress-Regulation von DsrA und hyperosmotische Regulation von RprA in einer *dsrA* Mutante. (**A**) Der W3110 Stamm wurde bei 37 °C in M9-Minimalmedium mit 0.4 % Glyzerin bzw. 0.1 % Glukose im Falle des Säurestress-Experiments bis zu einer OD_{578} von 0.3 kultiviert, die Kulturen gesplittet und jeweils die eine Hälfte der Kulturen mit 0.3 M NaCl (Endkonzentration) hyperosmotisch bzw. mit 170 mM MES (Endkonzentration) Säure-gestresst und die ungestressten Kulturen mit dem gleichen Volumen an *Aqua dest*. versetzt. 10 bzw. 20 Minuten später (Osmostress-Experiment) bzw. 10 Minuten später im Falle des Säurestress-Experiments wurden Proben für die Gesamt-RNA-Isolation entnommen und die DsrA-Akkumulation in Northernblot-Analysen verfolgt. Hierzu wurden jeweils 3 µg Gesamt-RNA auf einem denaturierenden 6%-igen 7M Harnstoff Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt und nach dem Membrantransfer DsrA mittels einer spezifischen DIG-markierten Sonde und eines α-DIG Antikörpers, wie unter 3.6.14.2 beschrieben, detektiert. Die 5S RNA diente als Ladungskontrolle. Die Quantifizierung der Daten ist in (**B**) gezeigt. Abbildung (**C**) zeigt den DsrA- bzw. RprA-Northernblot aus einer 10 minütigen hyperosmotisch geshifteten W3110 Wildtyp-Kultur und seiner isogenen *dsrA* Mutante aus einem unabhängigen Experiment. Die Prozedur war hier die gleiche, wie unter (A) beschrieben, nur dass der Blot nach der DsrA-Detektion wie unter 3.6.14.2 beschrieben gestrippt und mit einer RprA-spezifischen Sonde inkubiert wurde. Die Quantifizierung zu (C) ist in (**D**) gezeigt.

leichten bzw. überwiegend gar keinen signifikanten Einfluss auf die Säurestress- und Osmoinduktion von RpoS. Von daher stellte sich die Frage, ob DsrA, neben der bereits beobachteten hyperosmotischen Induktion (Abb. 4.15), auch unter Säurestress induziert wird. Auch war es von Interesse zu erfahren, ob möglicherweise die Regulation der kleinen RpoS-regulierenden sRNA RprA in der *dsrA* Mutante verändert ist und für die Deregulation von RpoS im DsrA-defizienten Hintergrund unter hyperosmotischem Stress verantwortlich ist. Um die zu untersuchen, wurde die hyperosmotische und Säurestress-abhängige Regulation von DsrA in Northernblot-Analysen verfolgt. Dazu wurde der *E. coli* K12 W3110 Stamm und eine entsprechende *dsrA* Mutante bei 37 °C in M9-Minimalmedium mit 0.4 % Glyzerin (0.1 % Glukose im Falle des Säurestress-Experiments) bis zu einer OD_{578} von 0.3 kultiviert, die Kulturen gesplittet und jeweils die eine Hälfte der Kulturen mit 0.3 M NaCl (Endkonzentration) hyperosmotisch bzw. mit 170 mM MES (Endkonzentration) Säure-gestresst und die ungestressten Kulturen mit dem gleichen Volumen an *Aqua dest*. versetzt. 10 bzw. 20 Minuten später wurden Proben für die Gesamt-RNA-Isolation entnommen.

Abbildungen 4.23 A und C zeigen die bereits zuvor beobachtete hyperosmotische Induktion DsrA. So führt der hyperosmotische Shift im Vergleich zur ungestressten Kontrolle zu einer etwa 2-fachen (Abb. 4.23 A) bis 4-fachen (Abb. 4.23 C) Induktion von DsrA. Im Säurestress-Experiment (Abb. 4.23 A) zeigt DsrA keine eindeutig verstärkte Akkumulation, hier kommt es lediglich zu einer schwachen 1.4-fachen Säure-Induktion. Die sRNA RprA zeigt eine starke etwa 20-fache hyperosmotische Induktion, aber keine veränderte Regulation in einer hyperosmotisch gestressten *dsrA* Mutante (Abb. 4.23 C). Die gezeigten Daten untermauern somit weiter, dass die hyperosmotische σ^S-Induktion zu einem großen Teil direkt von der sRNA DsrA abhängig ist. In Einklang mit der Tatsache, dass die hyperosmotische und Säurestress-Akkumulation und Induktion von σ^S und der *rpoS* mRNA in einer *dsrA* Mutante stark reduziert ist (Abb. 4.19, Abb. 4.20, Abb. 4.21), wird DsrA selbst hyperosmotisch induziert (Abb. 4.23). Eine Derepression von H-NS in der *dsrA* Mutante als Ursache der negativen hyperosmotischen Deregulation von σ^S konnte zuvor ausgeschlossen werden (Abb. 4.22), ebenso eine verändere Regulation (d.h. niedrigere RprA-Mengen) von RprA (Abb. 4.23). Die direkte gezeigte Osmoinduktion von DsrA (Abb. 4.23) spricht für eine direkte Regulation der *rpoS* Translation durch DsrA unter den relevanten Stressbedingungen.

4.5.5 Die *rpoS* mRNA zeigt eine hyperosmotische Stabilisierung, die von der sRNA DsrA abhängig ist

Wie die Osmostress-Experimente illustrieren (Abb. 4.19), kommt es unter hyperosmotischem Stress im Allgemeinen zu einer deutlichen Induktion der *rpoS* mRNA. Die hyperosmotische Akkumulation und Induktion des *rpoS* Transkripts ist in einer *dsrA* Mutante vermindert (Abb. 4.19). Dennoch kommt es auch in einem DsrA-defizienten Hintergrund zu einer, wenn auch

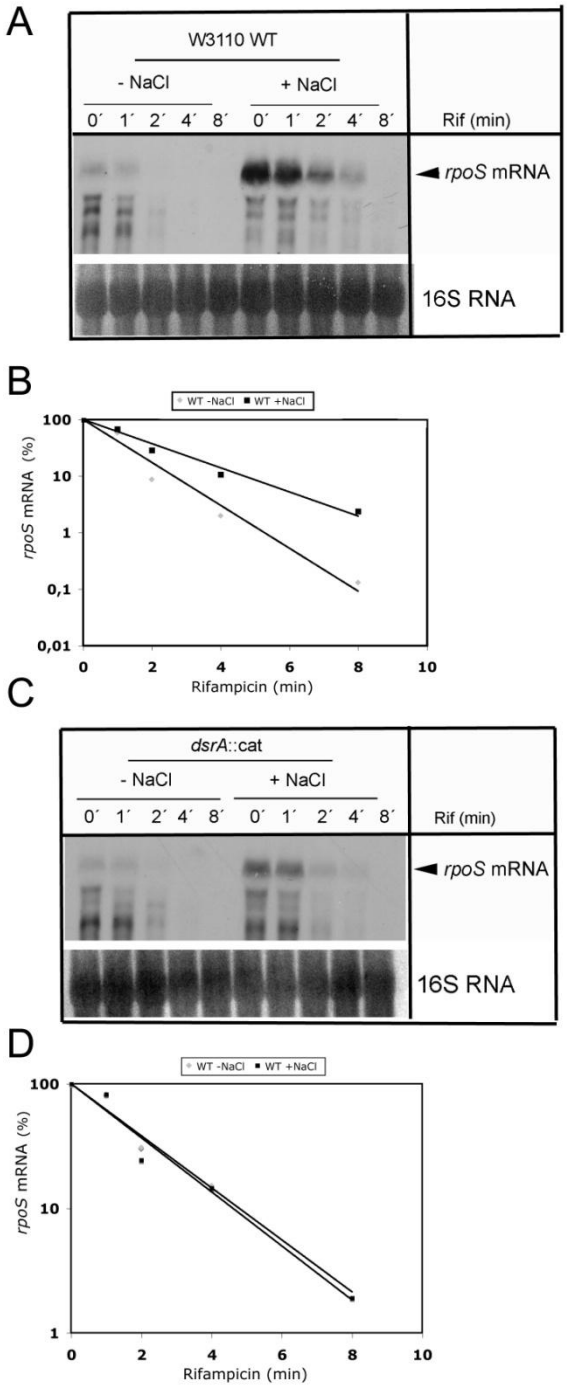


Abbildung 4.24: Hyperosmotische Stabilisierung der *rpoS* mRNA und Aufhebung dieser Stabilisierung in einer *dsrA* Mutante. Der W3110 Wildtypstamm (**A**) und die isogene *dsrA* Mutante (**C**) wurden in M9-Minimalmedium mit 0.4 % Glyzerin bei 37 °C bis zu einer OD_{578} von 0.3 wachsen gelassen, die Kulturen gesplittet und jeweils die eine Hälfte der Kultur mit 0.3 M NaCl hyperosmotisch gestresst. Zur Inhibierung der weiteren Transkription und Ermittlung der *rpoS* mRNA-Stabilitäten wurden die Zellen 10 Minuten später mit Rifampicin behandelt (0.5 mg/ml Endkonzentration) und Proben vor (0´) und nach Rifampicin-Zugabe und zu den angegebenen Zeiten entnommen und die verbleibenden *rpoS* Transkriptmengen mittels Northernblot-Analyse bestimmt. Hierzu wurden 10 µg Gesamt-RNA (W3110 Wildtyp) bzw. 20 µg Gesamt-RNA (*dsrA* Mutante) auf einem denaturierenden 1.2% Formaldehyd-Agarosegel elektrophoretisch getrennt und nach dem Membrantransfer die *rpoS* mRNA mittels einer DIG-markierten Sonde (gegen das *rpoS* mRNA 3´-Ende gerichtet) und einem α-DIG Antikörper detektiert. Als Ladungskontrolle erfolgte die Färbung der geblotteten 16S RNA durch Methylenblau. (**B**) und (**D**) zeigen die Quantifizierung der Daten aus dem jeweiligen Northernblot oberhalb.

verminderten, Induktion der *rpoS* mRNA. Vorangegangene Untersuchen konnten eine gesteigerte Promotoraktivität, d.h. eine verstärkte Transkriptionsinitiation, bei der hyperosmotischen Regulation von *rpoS* ausschließen, da nur eine translationale *rpoS*::*lacZ*-Fusion, nicht aber eine transkriptionale, die hyperosmotische *rpoS* Induktion zeigt (Lange und Hengge-Aronis, 1994a; Muffler *et al*., 1996b). Von daher stellte sich die Frage, inwieweit hyperosmotischer Stress, welcher die *rpoS* Translation aktiviert, auch die Stabilität der *rpoS* mRNA beeinflusst und ob eine Stabilisierung der *rpoS* mRNA an deren hyperosmotischen Induktion involviert ist. Da DsrA auch an der translationalen hyperosmotischen Aktivierung von *rpoS* beteiligt ist, war es auch von Interesse zu untersuchen, in wieweit DsrA an einer möglichen hyperosmotischen Stabilisierung des *rpoS* Transkripts beteiligt ist. Um dies zu testen, wurde der W3110 Wildtypstamm und die entsprechende *dsrA* Mutante in M9-Minimalmedium mit 0.4 % Glyzerin bei 37 °C bis zu einer OD_{578} von 0.3 kultiviert, die Kulturen gesplittet und jeweils die eine Hälfte der Kulturen mit 0.3 M NaCl hyperosmotisch geshiftet. Die andere Hälfte der Kulturen (ungestresste -NaCl-Kontrolle) wurde mit dem gleichen Volumen an *Aqua dest*. versetzt. 10 Minuten später erfolgte die Zugabe des Transkriptions-inhibierenden Antibiotikums Rifampicin (0.5 mg/ml Endkonzentration). Vor und nach Rifampicin-Zugabe wurden dann Proben für die Gesamt-RNA-Isolation entnommen und die *rpoS* mRNA-Mengen mittels Northernblot-Analyse detektiert.

Wie die Quantifizierung des *rpoS* mRNA-Abbauexperiments aus Abbildung 4.24 A in Abbildung 4.24 B demonstriert, führt der hyperosmotische Shift im W3110 Wildtyp-Hintergrund zu einer etwa 1.8-fachen Stabilisierung der *rpoS* mRNA ($t_{1/2}$ –NaCl: 0.79 Minuten; $t_{1/2}$ +NaCl: 1.41 Minuten). Der DsrA-defiziente Hintergrund hingegen zeigt in Antwort auf den hyperosmotischen Shift keine Stabilisierung des *rpoS* Transkripts (Abb. 4.24 C und D). Hier ist die Abbaurate vor und nach dem hyperosmotischen Stress in etwa gleich ($t_{1/2}$ –NaCl: 1.38 Minuten; $t_{1/2}$ +NaCl: 1.41 Minuten). Auffällig ist hierbei, dass die ermittelte Halbwertszeit der *rpoS* mRNA hier mit etwa 1.4 Minuten höher bzw. gleich hoch ist, wie im *dsrA* Wildtypstamm vor bzw. nach dem hyperosmotischen Shift. Dies könnte daran liegen, dass die absoluten ermittelten *rpoS* mRNA Halbwertszeiten in der *dsrA* Mutante aufgrund der sehr niedrigen *rpoS* Transkriptmengen in der *dsrA* Mutante schwer zu bestimmen waren und daher weniger Aussagekraft haben. Festzuhalten bleibt, dass der hyperosmotische Shift zu einer etwa 2-fachen Stabilisierung der *rpoS* mRNA führt und diese Stabilisierung *per se* in einer *dsrA* Mutante ausbleibt. Das Ergebnis legt nahe, dass die hyperosmotische Stabilisierung der *rpoS* mRNA eine indirekte Folge der verstärkten *rpoS* Translation darstellt.

4.5.6 Die hyperosmotische Induktion der *rpoS* mRNA bleibt auch in einer *rprA dsrA arcZ* Tripelmutante, sowie in einer *hfq* Mutante erhalten

Die bisherigen Ergebnisse haben gezeigt, dass die hyperosmotische und Säurestress-Akkumulation und Induktion von σ^S und der *rpoS* mRNA vor allem durch die sRNA DsrA vermittelt wird (Abb. 4.19 und 4.20) und möglicherweise durch direkte Interaktion von DsrA mit der *rpoS* mRNA und der damit verbundenen gesteigerten *rpoS* Translation zustande kommt (Abb. 4.21). Weiterhin scheinen die positiven Effekte von DsrA auf die *rpoS* Expression unter den relevanten Stressbedingungen unabhängig von H-NS und RprA (Abb. 4.22 und 4.23) zu sein. Darüber hinaus bewirkt die DsrA-vermittelte gesteigerte *rpoS* Translation unter hyperosmotischen Stress eine offenbar etwa 2-fache Stabilisierung der *rpoS* mRNA (Abb. 4.24). Wie würde sich das gleichzeitige Fehlen der drei bekannten *rpoS* aktivierenden sRNAs RprA, DsrA und ArcZ (siehe 2.2.2.2) in einer *rprA dsrA arcZ* Tripelmutante auf die hyperosmotische Akkumulation und Induktion von σ^S und vor allem auf die Induktion *rpoS* mRNA auswirken? In einer solchen Tripelmutante ist davon auszugehen, dass die *rpoS* Translation besonders stark negativ beeinträchtigt ist. Zur Beantwortung der obigen Frage wurde die hyperosmotische Akkumulation und Induktion von σ^S und *rpoS* Transkript in einer *rprA dsrA arcZ* Tripelmutante untersucht. Weiterhin wurde die hyperosmotische Akkumulation und Induktion des *rpoS* Transkripts in einer *hfq* Mutante mit jener des W3110 Wildtyps verglichen. Hierzu wurde der W3110 Wildtypstamm und die entsprechende sRNA-Tripelmutante, sowie eine *hfq* Mutante in M9-Minimalmedium mit 0.4 % Glyzerin bei 37 °C bis zu einer OD_{578} von 0.3 kultiviert, die Kulturen gesplittet und jeweils die eine Hälfte der Kulturen mit 0.3 M NaCl (Endkonzentration) gestresst. Die andere ungestresste Hälfte der Kulturen (-NaCl-Kontrolle) wurde jeweils mit dem gleichen Volumen an *Aqua dest*. versetzt. 10 und 20 Minuten danach wurden Proben für die Western- und Northernblot-Analysen entnommen, in denen die Akkumulation und Induktion von σ^S und *rpoS* Transkript verfolgt werden konnte.

Wie aus Abbildung 4.25 hervorgeht, zeigt die *rprA dsrA arcZ* Tripelmutante, wie zuvor für die *dsrA* Einzelmutante beobachtet (Abb. 4.19), gegenüber dem Wildtyp sowohl niedrigere basale, als auch hyperosmotisch akkumulierte σ^S-Mengen (73 % und 82 % reduziert nach 10 bzw. 20 minütigen hyperosmotischen Shift) auf. Ebenso ist die σ^S-Osmoinduktion in der sRNA-Tripelmutante gegenüber dem Wildtyp deutlich reduziert. Das gleichzeitige Fehlen der drei verschiedenen sRNAs scheint sich hier nicht unbedingt additiv auf die σ^S-Akkumulation und Induktion auszuwirken. Ähnlich dazu weist die sRNA-Tripelmutante gegenüber der Wildtyp-Kontrolle sowohl deutlich erniedrigte basale, als auch hyperosmotisch akkumulierte *rpoS* Transkriptmengen auf. Dennoch zeigt sich auch hier, dass

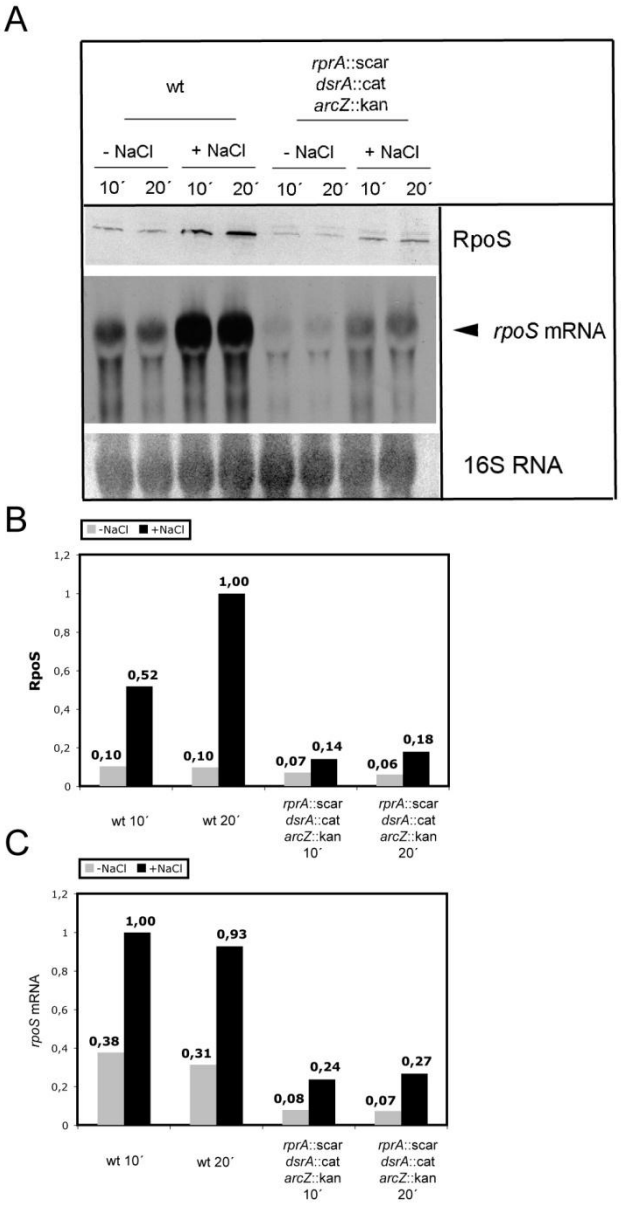


Abbildung 4.25: Akkumulation und Induktion von σ^S und *rpoS* mRNA in hyperosmotisch gestressten und ungestressten Zellen eines W3110 Wildtypstamms und einer entsprechenden *rprA dsrA arcZ* Tripelmutante. (**A**) Der W3110 Stamm und die isogene sRNA-Tripelmutante wurden in M9-Minimalmedium mit 0.4 % Glyzerin bei 37 °C bis zu einer OD_{578} von 0.3 kultiviert, gesplittet und die eine Hälfte der Kulturen mit 0.3 M NaCl hyperosmotisch gestresst. Danach wurde zu den angegebenen Zeiten Proben für die Gesamtprotein- und Gesamt-RNA-Präparation entnommen und die σ^S und *rpoS* mRNA-Mengen in den sich anschließenden Western-und Northernblot-Analysen, wie in Legende zu Abbildung 4.19 beschrieben, untersucht. Die Quantifizierung des Westernblots ist in (**B**), jene des Northernblots in (**C**) gezeigt. Hierbei wurden die akkumulierten RpoS-Protein- bzw. *rpoS* mRNA Mengen jeweils auf die σ^S- bzw. *rpoS* mRNA Menge des hyperosmotisch gestressten Wildtyp-Hintergrundes (wt + NaCl) normiert.

die hyperosmotische Induktion der *rpoS* mRNA auch in der sRNA-Tripelmutante stattfindet. In dem gezeigten Experiment ist sogar die Stärke der hyperosmotischen Induktion in der *rprA dsrA arcZ* Mutante mit jener des Wildtyps vergleichbar (etwa 3-fache Induktion).

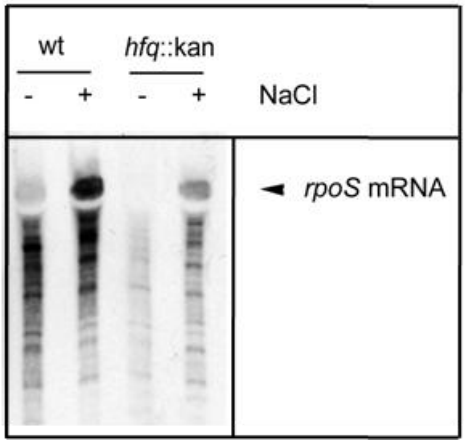


Abbildung 4.26: Akkumulation und Induktion des *rpoS* Transkripts in hyperosmotisch gestressten und ungestressten Kulturen einer *hfq* Mutante und eines isogenen W3110 Wildtypstamm. Der W3110 Stamm und die entsprechende *hfq* Mutante wurden wie in der Legende zu Abbildung 4.25 kultiviert und jeweils eine Hälfte der Kulturen einem hyperosmotischen Stress ausgesetzt. Die *rpoS* mRNA Mengen wurden im Anschluss daran durch Northernblot-Analyse ermittelt. Hierzu wurde jeweils 8 µg Gesamt-RNA auf einem denaturierenden 4 %-igen Polyacrylamidgel mit 7M Harnstoff aufgetrennt und anschließend auf eine Nylonmembran transferiert. Die Detektion der *rpoS* mRNA erfolgte mit einer DIG-markierten Sonde (gegen das *rpoS* mRNA 5´-Ende gerichtet) und einem α-DIG Antikörper. Das gezeigte Experiment wurde mit freundlicher Unterstützung von Alexandra Possling (FU Berlin) durchgeführt.

Wie Abbildung 4.26 demonstriert, weisen selbst Hfq-defiziente Zellen noch eine hyperosmotische *rpoS* mRNA-Induktion auf. Erwartungsgemäß sind sowohl die basalen, als auch die hyperosmotisch akkumulierten *rpoS* Transkriptmengen in der *hfq* Mutante gegenüber dem Wildtypstamm stark reduziert. Dies impliziert, dass die hyperosmotische Induktion des *rpoS* Transkripts nicht alleine durch die gesteigerte sRNA-vermittelte Translation der *rpoS* mRNA und der damit einhergehenden Stabilisierung der *rpoS* mRNA (2-fache hyperosmotische Stabilisierung, siehe Abb. 4.24) zustande kommen kann. Auch das Fehlen der drei verschiedenen, die *rpoS* Translation positiv regulierenden sRNAs RprA, DsrA und ArcZ, sowie das Fehlen von Hfq und der damit verbunden stark eingeschränkten *rpoS* Translation und Destabilisierung der *rpoS* mRNA führt immer noch zu einer eindeutigen hyperosmotischen Induktion des *rpoS* Transkripts. Da sich die Effekte der drei sRNAs und jene von Hfq auf die hyperosmotische σ^S-Induktion zum Teil additiv auswirken, könnte dies darauf hindeuten, dass auch andere Mechanismen als die posttranskriptionale *rpoS* Regulation bei der hyperosmotischen *rpoS* mRNA-Induktion eine Rolle spielen. Nicht auszuschließen ist auch, dass eine Hfq-unabhängige sRNA die *rpoS* Translation unter den Stressbedingungen positiv reguliert und als sekundäre Folge davon die Stabilität der *rpoS* mRNA positiv beeinflusst. Die Tatsache, dass die *rpoS* Promotoraktivität bzw. Transkriptionsinitiation von hyperosmotischem Stress unbeeinflusst bzw. nicht zur *rpoS* Expression beizutragen scheint (Lange und Hengge-Aronis, 1994a; Muffler *et al*., 1996b), legt eine Beteiligung von Mechanismen nahe, die auf der Ebene der Transkriptionselongation operieren. Untersuchungen hierzu wurden in den nachfolgenden Experimenten durchgeführt.

4.6 Hyperosmotischer Stress könnte die *rpoS* Transkription auf Elongationsebene beeinflussen

Wie die bisherigen Ergebnisse illustrieren, findet eine hyperosmotische Induktion der *rpoS* mRNA sowohl in einer *dsrA* Mutante (Abb. 4.19), als auch in einer *rprA dsrA arcZ* Tripelmutante (Abb. 4.25), sowie in einer *hfq* Mutante (Abb. 4.26) statt. Dies sind Bedingungen, unter denen die *rpoS* Translation stark reduziert ist (Abb. 4.21). Weiterhin wird die DsrA-vermittelte gesteigerte *rpoS* Translationsinduktion unter hyperosmotischem Stress von einer etwa 2-fachen Stabilisierung der *rpoS* mRNA begleitet (Abb. 4.24), die in einer *dsrA* Mutante ausbleibt. Die Daten könnten darauf hindeuten, dass auch andere Mechanismen als posttranskriptionale an der hyperosmotischen *rpoS* Expression beteiligt sind. Aus der Tatsache, dass die *rpoS* Transkriptionsinitiation von hyperosmotischem Stress unbeeinflusst bleibt (Lange und Hengge-Aronis, 1994a; Muffler *et al*., 1996b), lässt sich schlussfolgern, dass offenbar Mechanismen existieren müssen, welche die *rpoS* Transkriptionselongation beeinflussen. Um dies zu testen, wurde die hyperosmotische Regulation von den unter 4.4.4 beschriebenen Plasmid-kodierten translationalen *rpoS*::*gfp*-Fusionen (pRpoS120::GFP, pRpoS378::GFP) untersucht, deren Transkription unter der Kontrolle eines nicht nativen konstitutiven P_{LtetO} Promotors (Lutz und Bujard, 1997) steht. Diese Fusionen enthalten die komplette 567 Nt lange *rpoS* 5´-UTR einschließlich der ersten 40 bzw. 126 Aminosäurecodons des ORF auf einem Vektor in Niederkopienzahl. Diese Fusionen reflektieren ausschließlich die Transkriptionselongations- und translationale Regulation von *rpoS*, da dass für die RpoS-Proteolyse essentielle Turnover-Element (siehe 2.3.2.4) nicht vorhanden ist. Es ist hinreichend bekannt, dass die osmotische Regulation von *rpoS* auch posttranskriptionale Regulationsmechanismen beinhaltet, die neben der translationalen Regulation auch auf Ebene der σ^S-Stabilität agieren (Muffler *et al*., 1996b). Um zu überprüfen, ob das GFP-Fusionssystem zum Studium der *rpoS*-Osmoregulation geeignet ist, wurden weitere *rpoS*::*gfp*-Fusionen kloniert, die auch weiter stromabwärts gelegene Sequenzen des *rpoS* ORF enthalten und neben der Transkriptionselongation und der translationalen Regulation auch die RpoS-Proteolyse reflektieren. Hierzu wurden N-terminale *rpoS*::*gfp*-Fusionen, welche die komplette *rpoS* 5´-UTR und *rpoS* ORF-Sequenzen unterschiedlicher Länge enthalten (pRpoS378::GFP, pRpoS570::GFP, pRpoS741::GFP; siehe Material- und Methoden, 3.6.7.3), in den bereits beschrieben P_{LtetO} Promotor-Niederkopienzahl-Vektor kloniert. Die Konstrukte wurden dann in den *E. coli* W3110 Stamm transformiert und die Zellen bei 37 °C in M9-Minimalmedium mit 0.4 % Glyzerin (supplementiert mit 20 µg/ml Chloramphenicol) bis zu einer OD_{578} von 0.3 kultiviert. Danach wurden die Kulturen gesplittet und jeweils die eine Hälfte der Kulturen mit 0.3 M NaCl (Endkonzentration) hyperosmotisch gestresst. Die andere Hälfte der Kulturen (-NaCl-Kontrolle) wurden mit dem gleichen Volumen an *Aqua dest*. versetzt. 10 Minuten danach

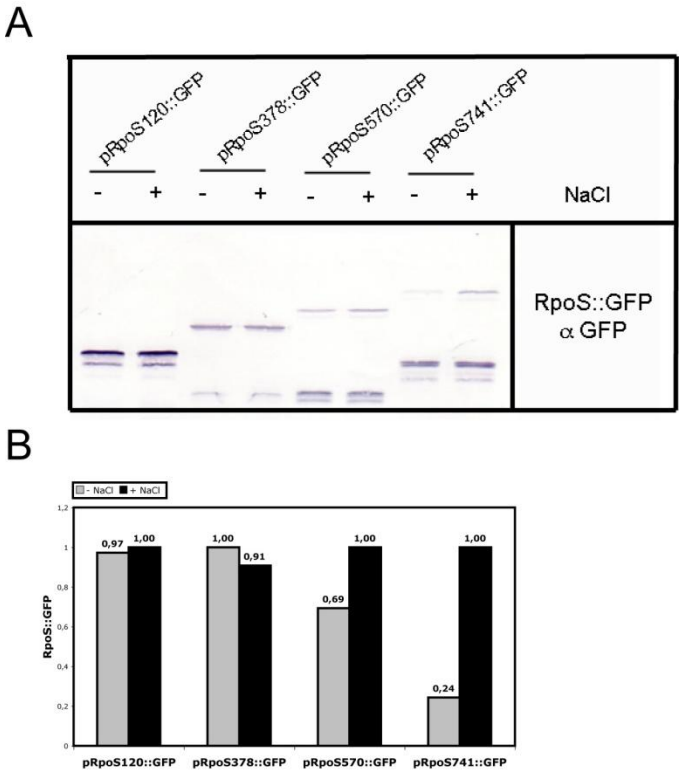


Abbildung 4.27: Hyperosmotische Induktion von RpoS::GFP-Hybridproteinen unterschiedlicher *rpoS* Sequenzlänge unter der Kontrolle einen konstitutiven Promotors. (**A**) Der W3110 Stamm wurde mit den verschiedenen Plasmid-basierten *rpoS*::*gfp*-Fusionen transformiert und die Kulturen in M9-Minimalmedium mit 0.4 % Glyzerin (supplementiert mit 20 µg/ml Chloramphenicol) bei 37 °C bis zu einer OD_{578} von 0.3 kultiviert. Danach wurden die Kulturen gesplittet und jeweils die eine Hälfte der Kulturen mit 0.3 M NaCl (Endkonzentration) hyperosmotisch gestresst. 10 Minuten später wurden Proben für die Gesamtprotein-Extraktion genommen und die Osmoinduktion der Hybridproteine in Immunoblot-Analysen verfolgt. Hierzu wurde jeweils 1 µg Gesamtprotein auf einem 12%-igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Membran erfolgte die Detektion der RpoS::GFP-Hybridproteine mit einem monoklonalen gegen GFP gerichteten Antikörper (α GFP). Die Quantifizierung der Daten ist in (**B**) gezeigt.

wurden den Kulturen Proben entnommen und die osmotische Induktion der RpoS::GFP-Hybridproteine in Westernblot-Analysen verfolgt.

Wie sich aus Abbildung 4.27 entnehmen lässt, zeigen die längeren Fusionen (pRpoS570::GFP und RpoS741::GFP) eine hyperosmotische Induktion der Hybridproteine, vor allem das lange RpoS741::GFP-Fusionsprotein. Dies lässt sich damit erklären, dass die längeren Fusionen das für die σ^S-Proteolyse notwendige Turnoverelement (siehe 2.3.2.4) aufweisen und somit eine Osmo-Induktion auf Proteinebene zeigen. Die kürzeren Hybridproteine RpoS120::GFP und RpoS378::GFP hingegen weisen höhere basale Hybridproteinmengen auf als die längeren Osmo-induzierten Hybridproteine, zeigen aber keine weitere Induktion in Antwort auf den hyperosmotischen Stress, da sie das Turnoverelement nicht enthalten. Die weiteren sichtbaren Banden unterhalb der RpoS::GFP-Fusionsproteine stellen wahrscheinlich Abbauprodukte der RpoS::GFP-Hybride dar.

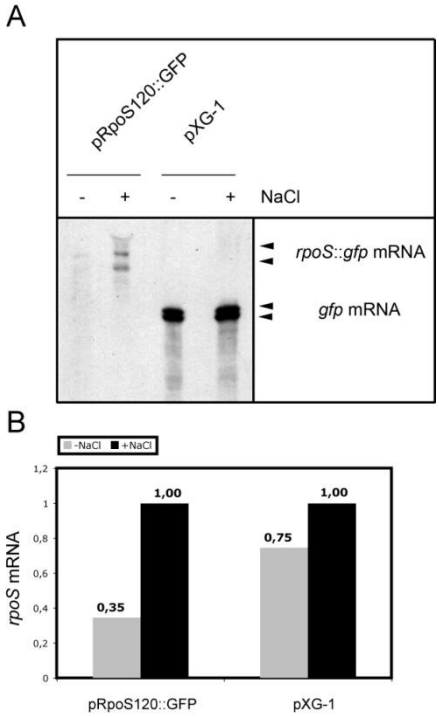


Abbildung 4.28: Die *rpoS*120::*gfp*-Fusion unter der Kontrolle eines nicht Osmostress-sensitiven, konstitutiven Promotors zeigt eine hyperosmotisch Induktion auf mRNA-Ebene. (**A**) Der *E. coli* W3110 Stamm wurde mit dem *rpoS120*::*gfp*-Fusionsplasmid bzw. der *gfp*-Kontrolle (pXG-1) transformiert und die Kulturen in M9-Minimalmedium mit 0.4 % Glyzerin (supplementiert mit 20 µg/ml Chloramphenicol) bei 37 °C bis zu einer OD_{578} von 0.3 kultiviert. Danach wurden die Kulturen gesplittet und jeweils die eine Hälfte der Kulturen mit 0.3 M NaCl (Endkonzentration) hyperosmotisch gestresst. 10 Minuten später wurden Proben für die Gesamt-RNA-Präparation entnommen und die Osmoinduktion der *gfp* mRNAs mittels Northernblot-Analyse getestet. Hierzu wurden jeweils 5 µg Gesamt-RNA auf einem 4.5 %-igen denaturierendem Polyacrylamid / 7M Harnstoff-Gel elektrophoretisch getrennt und das *rpoS*::*gfp* bzw. das *gfp* Transkript nach dem Membrantransfer mittels einer gegen den *gfp* Anteil gerichteten DIG-markierten Sonde und einem α-DIG Antikörper detektiert. Die Quantifizierung der Daten ist in (**B**) gezeigt.

Zum Studium der hyperosmotischen Regulation der *rpoS* Transkriptionselongation wurde daher zunächst nur mit der kurzen *rpoS*120::*gfp*-Fusion und der *rpoS*:378::gfp-Fusion weitergearbeitet. Mit diesen Fusionen lassen sich die posttranslationalen Effekte (d.h. die σ^S-Proteolyse), die co-translational ablaufen und somit auch die *rpoS*::*gfp* Transkription bzw. die Stabilität des *rpoS*::*gfp* Transkripts beeinflussen können, eliminieren. Um einen möglichen Beitrag der Transkriptionselongation auf die hyperosmotische Induktion der *rpoS* mRNA zu studieren, wurde das pRpoS120::GFP-Plasmid, sowie das entsprechende *gfp*-Kontrollplasmid (pXG-1), welches ausschließlich das *gfp* Gen unter der Kontrolle des konstitutiven P_{LtetO} Promotors enthält, in den W3110 Stamm transformiert. Mit diesen Kulturen wurden, wie zuvor für die anderen *rpoS*::*gfp*-Fusionen beschrieben (siehe im Text dieses Kapitels weiter oben), Osmoshift-Experimente durchgeführt. 10 Minuten nach dem hyperosmotischen Stress wurde den Kulturen Proben für die Gesamt-RNA-Isolation entnommen und die hyperosmotische Akkumulation und Induktion der *rpoS*120::*gfp* bzw *gfp* mRNA in Northernblot-Analysen verfolgt.

Aus Abbildung 4.28 lässt sich entnehmen, dass der hyperosmotische Stress in einer deutlichen Akkumulation und etwa 3-fachen Induktion des *rpoS*120::*gfp* Transkripts resultiert (Doppelbande in Abb. 4.28 A), während die *gfp* mRNA alleine (pXG-1 Kontrolle) in Antwort auf den hyperosmotischen Stress nur sehr schwach induziert wird (Doppelbande in Abb. 4.28 A: etwa 1.3-fache Induktion). Dies verdeutlicht, dass die hyperosmotische Induktion des *rpoS* Transkripts nicht nur der Regulation der mRNA Stabilität unterliegt (Abb. 4.24), sondern möglicherweise auch auf der Ebene der Transkriptionselongation reguliert wird. Die Transkriptionsinitiation des *rpoS*120::*gfp* Transkripts unterliegt im hier verwendeten GFP-Reportergensystem ausschließlich der Kontrolle des nicht nativen konstitutiven P_{LtetO} Promotors. Stresssignale, welche die *rpoS* Transkription beeinflussen, können hier nicht auf der Ebene der Transkriptionsinitiation integriert werden. Die sehr leichte Induktion der *gfp*-Kontrolle könnte hier möglicherweise eine indirekte Folge der Änderung der Superhelkalität der Plasmid-DNA durch die Salzbedingungen sein.

Um einen möglichen Beitrag von chromosomalen DsrA auf die hyperosmotische Induktion der *rpoS*::*gfp* mRNA zu untersuchen, wurde auch die hyperosmotische Induktion der *rpoS*378::*gfp* mRNA in einer *dsrA* Mutante mit jener in einem isogenen *dsrA* Wildtypstamm verglichen. Hierzu wurde das pRpoS378::GFP-Plasmid in den W3110 Stamm und in die entsprechende *dsrA* Mutante transformiert. Mit diesen Kulturen wurden, wie zuvor für die anderen *rpoS*::*gfp*-Fusionen beschrieben (siehe im Text dieses Kapitels weiter oben), Osmoshift-Experimente durchgeführt. 10 Minuten nach dem hyperosmotischen Stress wurde den Kulturen Proben für die Gesamt-RNA-Isolation entnommen und die hyperosmotische Akkumulation und Induktion der *rpoS*378::*gfp* mRNA in Northernblot-Analysen verfolgt.

Abbildung 4.29 zeigt, dass auch die *rpoS*378::*gfp*-Fusion in Antwort auf den osmotischen Stress deutlich induziert wird und diese Induktion auch in einer *dsrA* Mutante erhalten bleibt. Ähnlich wie für die chromosomale *rpoS* mRNA beobachtet (Abb. 4.19) ist auch die Akkumulation des Hybridtranskriptes in einer *dsrA* Mutante reduziert, wenn auch weniger stark ausgeprägt. Dies deutet darauf hin, dass die beobachtete hyperosmotische Induktion der *rpoS*378::*gfp* mRNA unter der Kontrolle eines nicht Osmo-sensitiven Promotors nicht auf einer DsrA-vermittelten Stabilisierung des Transkripts basiert, sondern möglicherweise auch die Transkriptionselongations-Ebene in Antwort auf dem Osmostress positiv reguliert wird, oder aber der DsrA-unabhängige Abbau der *rpoS* mRNA unter den Stressbedingungen inhibiert wird.

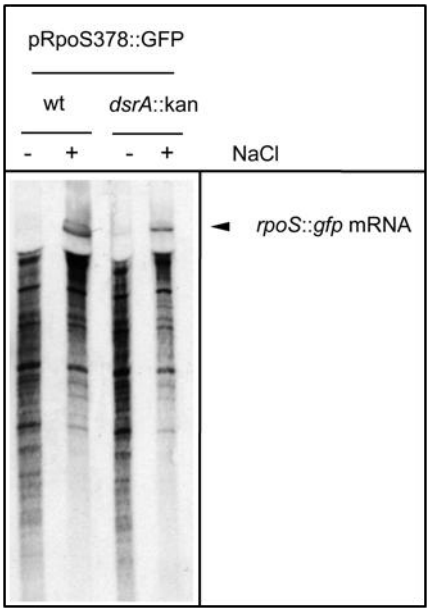


Abbildung 4.29: Die *rpoS*378::*gfp*-Fusion unter der Kontrolle eines nicht Osmostress-sensitiven, konstitutiven Promotors zeigt eine hyperosmotisch Induktion auf mRNA-Ebene, unabhängig von der sRNA DsrA. Die hyperosmotische Induktion des *rpoS*378::*gfp* Transkripts wurde im *E. coli* Stamm W3110 und der entsprechenden *dsrA* Mutante, transformiert mit dem *rpoS*378::*gfp*-Fusionsplasmid, wie in der Legende zu Abbildung 4.28 beschrieben, verfolgt. Das gezeigte Experiment wurde freundlicherweise von Alexandra Possling (FU Berlin) durchgeführt.

4.6.1 Untersuchungen zum Einfluss von NusG an einem mutmaßlichen *rpoS* Transkriptions-Antiterminations-Mechanismus unter hyperosmotischem Stress

NusG ist ein Transkriptionsfaktor, der eine wichtige Funktion bei der Regulation der Elongation und Termination der Transkription einnimmt (siehe 2.1.2). Während die Transkriptionselongation von NusG stimuliert wird (Ciampi, 2006) und NusG ein wichtiger Bestandteil von Transkriptions-Antiterminationskomplexen ist, beispielsweise innerhalb von ribosomalen Operons (Roberts *et al*., 2008), ist für eine effiziente Termination der Transkription von mRNAs *in vivo* die Anwesenheit von NusG meist unerlässlich (Ciampi, 2006). Jüngere Untersuchungen haben zudem gezeigt, dass NusG zusammen mit dem ribosomalen Protein S10 der kleinen 30S Untereinheit (NusE) einen Komplex ausbildet, der Transkription und Translation möglicherweise eng miteinander koppelt (Burmann *et al*., 2010). Dafür sprechen unter anderem neuere Daten, die zeigen, dass die Rate der Transkriptionselongation unmittelbar von der Translationsrate kontrolliert wird (Proshkin *et al*., 2010; siehe 2.1.2). Mit seiner N-terminalen Domäne kontaktiert NusG die RNAP, mit seiner C-terminalen Domäne entweder NusE (also das translatierende Ribosom), oder aber den Transkriptions-Terminationsfaktor Rho (Burmann *et al*., 2010; siehe auch 2.1.2). Möglicherweise also basiert die beobachtete positive sRNA-unabhängige Regulation der *rpoS* Transkription unter hyperosmotischem Stress (Abb. 4.28 und 4.29) auf einem NusG-

abhängigen Transkriptions-Antiterminationsmechanismus. Hierbei wäre vorstellbar, dass Bedingungen, unter denen die *rpoS* Translation niedrig ist (schnell wachsende, ungestresste Zellen in der exponentiellen Phase), zu einer vorzeitigen Transkriptionstermination führen, da NusG anstelle des Ribosoms Rho kontaktiert. Umgekehrt würde die Stimulation der *rpoS* Translation durch plötzlichen Stress zu einer Antitermination der Transkription führen, da NusG anstelle des Terminationsfaktors Rho via NusE das translatierende Ribosom kontaktiert.

Um einen möglichen Einfluss von NusG auf die hyperosmotische σ^S-Regulation zu studieren, wurde die hyperosmotische Akkumulation und Induktion von σ^S und *rpoS* mRNA in *E. coli* Zellen verfolgt, in denen das endogene NusG durch die Überexpression der N-terminalen NusG-Domäne austitriert wird (Mooney *et al*., 2010). Da NusG in *E. coli* essentiell für das Überleben ist (Downing *et al*., 1990) und nicht deletiert werden kann, musste in den Experimenten das endogene NusG durch die Überexpression der N-terminalen Domäne (NTD) von NusG depletiert werden. Die überexprimierte NusG-NTD ist zwar in der Lage die RNAP zu kontaktieren, nicht jedoch den Terminationsfaktor Rho, da es hierzu die C-terminale Domäne benötigt (Mooney *et al*., 2010).

Der *E. coli* W3110 Stamm wurde zunächst mit dem NusG-NTD Überexpressionsplasmid pNusG N (freundliche Gabe von Dr. Franziska Mika, FU Berlin), sowie dem entsprechenden leeren Kontrollplasmid pRH800 transformiert und mit den transformierten *E. coli* Zellen Osmostress-Experimente durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen entweder in LB-Medium oder in M9-Minimalmedium mit 0.4 % Glyzerin (jeweils supplementiert mit 100 µM Ampicillin) bei 37 °C bis zu einer OD_{578} von 0.1 (LB-Medium) bzw. 0.2 (Minimalmedium) kultiviert und die Expression der N-terminalen NusG-Domäne durch Zugabe von 1mM IPTG induziert. Etwa eine Stunde nach Induktion, in der die Kulturen etwa eine OD_{578} von 0.5 (LB-Medium) bzw. 0.3 (Minimalmedium) erreicht hatten, wurden die Zellen gesplittet und jeweils die eine Hälfte der Kulturen mit 0.5 M NaCl (LB-Medium) bzw. 0.3 M NaCl (Minimalmedium) hyperosmotisch gestresst. 10 Minuten danach wurde den Kulturen Proben für die Gesamtprotein-Extraktion und Gesamt-RNA-Isolation entnommen und die hyperosmotische Induktion von σ^S und *rpoS* mRNA in den sich anschließenden Immunoblot- und Northernblot-Analysen verfolgt.

Wie Abbildung 4.30 demonstriert, ist die NusG-Depletion alleine offenbar nicht ausreichend, um eine mögliche vorzeitige Termination der Transkription in ungestressten Zellen, in denen die *rpoS* Translation sehr niedrig sein sollte, zu unterbinden. Wäre NusG an einer vorzeitigen Transkriptionstermination in ungestressten Zellen beteiligt, so wäre zu erwarten, dass die NusG-Depletion zu wesentlich höheren basalen *rpoS* Transkriptmengen in ungestressten Zellen führen sollte. Dadurch sollten sich die *rpoS* mRNA-Mengen in ungestressten und hyperosmotisch gestressten Zellen einander angleichen. Dies ist aber

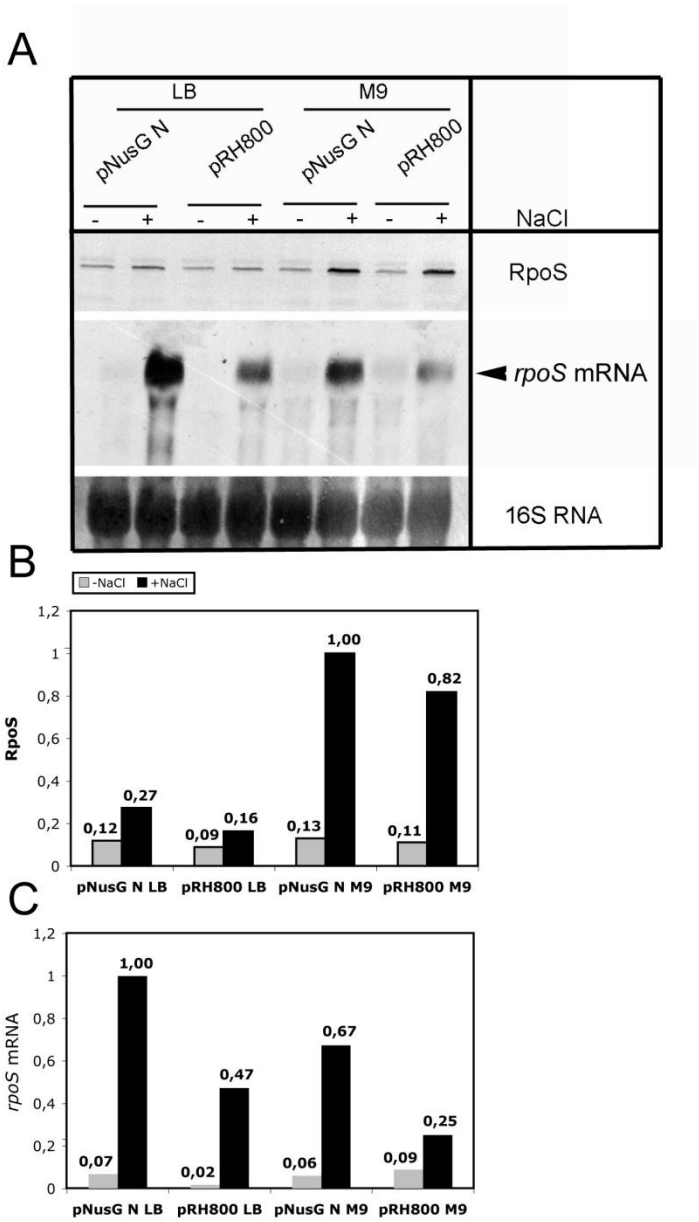


Abbildung 4.30: Die Verdrängung von endogenem NusG durch Überexpression der NusG N-terminalen Domäne zeigt keinen Einfluss auf die *rpoS* Transkriptionselongation in ungestressten relativ zu hyperosmotisch gestressten Zellen. (**A**) Der W3110 Stamm wurde mit dem NusG-NTD Überexpressionsvektor (pNusG N) und der Leervektor-Kontrolle (pRH800) transformiert und in LB-Medium bzw. M9-Minimalmedium mit 0.4 % Glyzerin (jeweils supplementiert mit 100 µM Ampicillin) bei 37 °C bis in die frühe exponentielle Phase kultiviert und die NusG-NTD-Expression durch Zugabe von 1mM IPTG induziert. Etwa eine Stunde danach bei einer OD_{578} von 0.5 (LB-Medium) bzw. 0.3 (Minimalmedium) wurden Osmostress-Experimente, wie im Text beschrieben, durchgeführt. 10 Minuten nach dem Osmoshift wurde den Kulturen Proben entnommen und die hyperosmotische Akkumulation und Induktion von σ^S und *rpoS* mRNA in Western- bzw. Northernblot-Analysen verfolgt. Zur Detektion von σ^S wurden je 5 µg Gesamtprotein auf einem 12%-igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt. Die Detektion von σ^S erfolgte mit einem gegen RpoS gerichteten polyklonalen Antiserum. Zur Detektion der *rpoS* mRNA wurden je 10 µg Gesamt-RNA auf einem denaturierendem 1.2%-igen Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Nylonmembran erfolgte die Detektion des *rpoS* Transkripts mit einer gegen das *rpoS* mRNA 3´-Ende gerichteten DIG-markierten Sonde und einem gegen DIG gerichteten Antikörper. Als Ladungskontrolle für den Northernblot erfolgte die Anfärbung der geblotteten 16S RNA durch Methylenblau. Die Quantifizierung der Westernblot- und Northernblotdaten ist in (**B**) bzw. (**C**) gezeigt. Hierbei wurden die akkumulierten RpoS-Protein- bzw. *rpoS* mRNA Mengen jeweils auf die σ^S- bzw. *rpoS* mRNA Menge des hyperosmotisch gestressten Stammes mit der stärksten Akkumulation an σ^S bzw. *rpoS* mRNA normiert.

offensichtlich nicht der Fall. Auf den ersten Blick ist NusG also nicht an einem möglichen *rpoS* Transkriptions-Antiterminationsmechanismus unter hyperosmotischem Stress beteiligt. Vielmehr sind sowohl die hyperosmotisch induzierten σ^S-Mengen, also auch die *rpoS* Transkriptmengen in Zellen, welche die NusG-NTD überexprimieren, höher. Vor allem die *rpoS* mRNA-Mengen akkumulieren in den NusG depletierten Kulturen etwa 2-fach (LB-Medium) bis 2.7-fach (M9-Minimalmedium) stärker als in den Kontrollkulturen. Dies ist möglicherweise der Tatsache geschuldet, dass die RNAP-kontaktierende NusG-NTD die Transkriptionselongation verstärkt stimuliert (Mooney *et al*., 2010). Die Ergebnisse sprechen also dafür, dass andere oder zusätzliche Faktoren als NusG an einem mutmaßlichen Transkriptions-Antiterminationsmechanismus bei der *rpoS* Regulation unter Stressbedingungen beteiligt sind.

5 DISKUSSION

5.1 Rare Codons spielen eine positive Rolle bei der *rpoS* Expression

RpoS und RpoD sind phylogenetisch eng miteinander verwandte co-evolvierte Sigmafaktoren. Trotz der großen Übereinstimmung in ihrer Aminosäuresequenz (46 % Identität) zeigt ein Vergleich der DNA-Sequenzen, dass die *rpoS* Sequenz mehr als doppelt soviele rare Codons enthält (16.7 %) wie *rpoD* (7 %), einschließlich einer Reihe von selteneren Codons in *rpoS*, die durch abundantere synonyme Codons in *rpoD* an homologen Positionen repräsentiert werden (Abbildung 4.1 und Tabelle 4.1). Ausgangspunkt dieser Arbeit war daher die Fragestellung, ob das verstärkte Auftreten von raren Codons in *rpoS* allein evolutionären Mutationsdruck und genetische Drift widerspiegelt (siehe 2.4 und weiter unten im Text), oder aber einen positiven Selektionsdruck darstellt. Letzteres würde bedeuten, dass den raren Codons in *rpoS* eine positive regulatorische Funktion innewohnt. Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen dafür, dass letzteres der Fall ist, da die raren Codons in *rpoS* positiv mit seiner Expressionsstärke korrelieren (Abb. 4.2-4.5).

5.1.1 Codon-Usage und evolutionäre Selektion: die *rpoS* mRNA mit ihren raren Codons scheint der positiven Selektion zugunsten erhöhter mRNA Stabilität zu unterliegen

Synonyme Codons, welche die gleiche Aminosäure spezifizieren, werden innerhalb eines Genoms im Allgemeinen mit unterschiedlicher Häufigkeit genutzt. Dieses Phänomen wird als Codon-Usage, oder auch Codon-Bias bezeichnet (siehe 2.4). Unterschiede in der Codon-Usage zu haben ist eine weitverbreitete Eigenschaft sowohl prokaryotischer, als auch eukaryotischer Genome. Hierbei werden häufigere Codons von entsprechend abundanteren tRNAs dekodiert, während rarere Codons von selteneren tRNA-Spezies dekodiert werden (Ikemura, 1981 und 1985; Dong *et al*., 1996). Ein „praktischer“ Nutzen der Codon-Bias ist es, horizontale Gentransfer-Ereignisse detektierbar und datierbar zu machen. Während des Zeitpunkts des Transfers weisen die transferierten Gene eine Codon-Usage auf, die typisch für das Donor-Genom ist. Mit der Zeit jedoch evolviert die Codon-Usage des horizontal transferierten Genbereichs und passt sich der Codon-Usage des Wirtgenoms an (Ermolaeva, 2001). Verschiedene evolutive Aspekte werden als Ursache der Codon-Usage diskutiert (Ermolaeva, 2001; Hershberg und Petrov, 2008; Smith und Eyre-Walker, 2001). Das

Mutations-Selektions-Drift-Gleichgewichtsmodell (auch „major codon preference“ Modell) (Bulmer, 1991) postuliert, dass eine gewisse Selektion von häufigeren Codons gegenüber selteneren stattfindet, aber Mutationsdruck und genetische Drift auch für eine Persistenz seltenerer Codons sorgen (siehe 2.4). Die weitläufige Meinung ist also, dass häufigere Codons einer positiven Selektion zu Ungunsten rarer Codons unterliegen. Die treibende Kraft ist hierbei die translationale Selektion, d.h. die mit gängigeren Codons einhergehende höhere Effizienz und Genauigkeit der Translation. Messenger RNAs die Codons nutzen, welche von abundanteren tRNA-Spezies erkannt werden, werden möglicherweise effizienter (höhere Translationsgeschwindigkeit) und mit weniger Fehlern translatiert als solche, die seltenere Codons nutzen (Hershberg und Petrov, 2008). Vor allem deshalb, weil die Anzahl der inkorrekten tRNAs, die vor der Ankunft der korrekten tRNAs „abgelehnt“ werden müssen, statistisch minimiert wird (Ermolaeva, 2001). Es konnte experimentell gezeigt werden, dass mRNAs, die häufigere Codons enthalten, eine höhere Translationselongationsrate aufweisen als solche, in denen vermehrt seltenere Codons auftreten (Robinson *et al*., 1984; Sørensen *et al*., 1989). Sørensen *et al*., (1989) haben die Translationselongationsraten direkt *in vivo* gemessen und konnten zeigen, dass das Einführen von kurzen Abschnitten aus raren bzw. häufigeren Codons in die *lacZ* mRNA deren Translationselongationsrate signifikant beeinflusst. Dabei war die Rate des Aminosäure-Einbaus an den abundanteren Codons etwa sechsmal so schnell wie die Einbaurate an den selteneren Codons. Andererseits ist die Ansicht, dass eine Zunahme der Elongationsgeschwindigkeit zu einer erkennbaren Zunahme der Translationsrate insgesamt führt, umstritten (Hershberg und Petrov, 2008). Dies wäre der Fall, wenn die Elongation der Translation und nicht die Initiation der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Proteinbiosynthese wäre. Es gibt Hinweise die daraufhin deuten, dass dies nicht der Fall ist (Bulmer, 1991; Hershberg und Petrov, 2008). Allerdings könnte eine Steigerung der Translationselongationsrate auch indirekt die Translationsgeschwindigkeit positiv beeinflussen, indem sie den Pool an freien Ribosomen erhöht und so die Translationsinitiations-Rate für alle mRNAs erhöht (Hershberg und Petrov, 2008).

Im Allgemeinen ist es dennoch anerkannt, dass die Expression eines Proteins positiv mit der Zahl der häufigeren Codons korreliert (Gouy und Gautier, 1982; Ikemura, 1985; Karlin *et al*., 1998) (siehe 2.4). In Übereinstimmung damit kann die Expression eines heterologen Proteins im Allgemeinen verbessert werden, wenn sub-optimale Codons durch rekombinante Wirts-spezifische optimale Codons substituiert werden (Carrier und Keasling, 1997; Makrides, 1996). Der Codon-Adaptations-Index (CAI) ist ein Maß dafür, inwieweit ein gegebenes Gen optimale Codons nutzt, die gewöhnlich überwiegend in stark exprimierten Referenzgenen (wie Gene für ribosomale Proteine) genutzt werden (Sharp und Li, 1987). Je mehr die Codon-Usage eines gegebenen Gens jener eines Codon-optimierten Referenzgens entspricht, desto höher ist der CAI. Ein maximales Optimum ist bei einem CAI von 1.0 erreicht. Dos Reis *et al*. (2003), sowie Goetz und Fuglsang (2005) haben den Einfluss der

Codon-Usage auf die Akkumulation von mRNAs im globalen Maßstab, basierend auf Microarray-Analysen, untersucht. Auch in deren Studien stellte sich heraus, dass ein hoher CAI (> 0.5, also Codon-optimierte Gene) im Allgemeinen mit stärker akkumulierten mRNA-Mengen einhergeht. Dies stützt die These bezüglich der Translations-Selektion hin zu häufigeren Codons, zumal eine effizientere stärkere Translation gewöhnlich als ein mRNA stabilisierender Faktor angesehen wird (Deana und Belasco, 2005; Dreyfus, 2009). Dennoch scheint dies nicht für alle untersuchten Gene prinzipiell gültig zu sein. So haben die Microarray-Studien offenbart, dass eine Gruppe von Genen, die einen niedrigen CAI (< 0.3, also einen hohen Anteil von sub-optimalen Codons enthalten) aufweisen, stark exprimiert werden (dos Reis *et al*., 2003). In dieser Gruppe von Genen handelt es sich vor allem um solche, die über horizontalen Gentransfer in das *E. coli* Genom integriert wurden (Lawrence und Ochman, 1998; Médigue *et al*., 1991) (siehe auch weiter oben im Text). Weiterhin wurde in den Microarray-Studien deutlich, dass die Korrelation des CAI mit den mRNA-Mengen in Minimalmedium in allen Fällen schlechter war, als in komplexem reichem LB-Medium (Goetz und Fuglsang, 2005). Dies bedeutet also, dass der CAI offensichtlich unter optimaleren Nahrungsbedingungen (also unter sehr schnellem Wachstum) besser mit mRNA-Mengen korreliert, als unter Bedingungen in denen die Ressourcen limitiert sind. Dieser Befund fügt sich gut in die Ergebnisse dieser Arbeit ein. Diese zeigen, dass die vielen raren Codons in *rpoS*, einem Faktor welcher unter Bedingungen der Nahrungslimitation verstärkt exprimiert wird, positiv mit seiner Expressionsstärke korrelieren. Dazu passt auch die Hypothese, dass das Paradigma „häufige Codons-starke Expression“ stärker bei Bakterien betont ist, die an bestimmte ökologische Nischen angepasst sind, welche ein schnelles Wachstum erlauben (Anderson und Kurland, 1990). Die Untersuchungen hier demonstrieren, dass die natürlich auftretenden raren Codons in der *rpoS* Sequenz das *rpoS* Transkript vor dem RNase E-abhängigen Abbau schützen (Abb. 4.4) und somit einen positiven Effekt auf die *rpoS* mRNA Stabilität und die Akkumulation des *rpoS* Transkripts haben (Abb. 4.3 und 4.5), verbunden mit einer gesteigerten Expression des σ^S-Proteins (Abb. 4.3 und 4.5). Somit legen die Ergebnisse dieser Arbeit nahe, dass die raren Codons in *rpoS* einer positiven evolutionären Selektion unterliegen, hin zu erhöhter mRNA Stabilität.

Auch andere Arbeiten haben diskutiert, dass bei der Codon-Bias evolutionäre Selektion auch in die andere Richtung, d.h. positive Selektion zugunsten vermeintlich „suboptimaler“ Codons stattfinden kann (DuMont *et al*., 2004; Konigsberg und Godson, 1983; Nielsen *et al*., 2007). So zeigt auch das *notch* Gen aus Drosophila, das einen transmembranalen Rezeptor für die Zell-Zell-Kommunikation kodiert, einen hohen Anteil an raren Codons (DuMont *et al*., 2004; Nielsen *et al*., 2007). Auch Konigsberg und Godson (1983) fanden heraus, dass das Gen für die DNA Primase *dnaG*, einen auffällig hohen Anteil an raren Codons aufweist, während benachbarte Gene des Operons, unter anderem auch *rpoD*, eine normale Codon-Usage aufweisen. Ebenso weisen die Gene für verschiedene Transkriptionsfaktoren (*lacI*, *trpR* und *araC*) einen hohen Anteil an raren Codons auf

(Konigsberg und Godson, 1983). Diese Autoren und andere (Saier, 1995) haben vorgeschlagen, dass die verstärkte Akkumulation von raren Codons in diesen Genen einen Mechanismus darstellt, um deren Genexpression auf ein für den Organismus angemessenes Niveau niedrig zu halten. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen, zumindest im Falle von *rpoS*, nahe, dass das Gegenteil zutrifft. Die raren Codons in *rpoS* korrelieren mit einer höheren σ^S-Expression (Abb. 4.2-4.5). Insgesamt also lässt sich festhalten, dass für bestimmte Gene die evolutionäre Selektion zugunsten von selteneren Codons stattfindet, was impliziert, dass in bestimmten Fällen ein anderer Selektionsdruck als effiziente und akkurate Translation auf die Codon-Bias einwirkt. So die Notwendigkeit lokaler translationaler Pausierungen, z.B. bei den bereits eingeführten bekannten Selektionsmechanismen bezüglich der effizienten co-translationalen Faltung von Proteinen und der Regulation der späten Translationsintiation durch eine rare Codon-Barriere am Anfang von Genen (siehe Einleitung 2.4). Auch andere Selektionsdrücke werden im Zusammenhang mit der Codon-Usage diskutiert, wie z.B. die Struktur von mRNAs, welche von deren Sequenz determiniert wird. Ebenso werden regulatorische Elemente wie Transkriptionsfaktor-Bindestellen, RNA-Lokalisationselemente, Translationsinitiations-Stellen, Spleißsignale und mRNA-Stabilität (wie im Falle von *rpoS*) diskutiert (Hershberg und Petrov, 2008), ebenso transkriptionale Selektion und Protein-Hydrophobizität (Ermolaeva, 2001).

5.1.2 Die raren Codons in *rpoS* legen einen Mechanismus nahe, der die Translationselongation zugunsten der Stabilität der *rpoS* mRNA verlangsamt

Es ist im Allgemeinen bekannt, dass rare Codons innerhalb einer mRNA die translationale Elongation verlangsamen, da die an den raren Codons befindlichen translatierenden Ribosomen an letzteren transient pausieren (Deana und Belasco, 2005; Mitarai *et al*., 2008; Pedersen *et al*., 2011; Robinson *et al*., 1984; Sørensen *et al*., 1989) (siehe auch 5.1.1). Das Pausieren eines translatierenden Ribosoms an einem raren Codon kann weiterhin dazu führen, dass die dem Ribosom weiter stromabwärts lokalisierten mRNA-Bereiche zugänglicher gegenüber dem endonukleolytischen Abbau durch RNasen werden, oder aber die mRNA innerhalb des Codons in der ribosomalen A-Stelle degradiert wird (Garza-Sánchez *et al*., 2009; Hayes und Sauer, 2003; Lemm *et al*., 2002; Sunohara *et al*., 2004). Darüber hinaus können an raren Codons arretierte Ribosomen die Rekrutierung und Aktivierung des tmRNA (SsrA-) trans-Translations-Systems stimulieren, wodurch eine entsprechende mRNA nachfolgend abgebaut und das unvollständig translatierte Polypeptid mittels SsrA-Tagging degradiert wird (Roche und Sauer, 1999). Generell wird also die Ansicht vertreten, dass rare Codons den mRNA-Abbau fördern und die Expression eines gegebenen Proteins vermindern. In Übereinstimmung damit konnte beispielsweise in *Saccharomyces cerevisiae* demonstriert werden, dass in einigen instabilen mRNAs verstärkt rare Codons auftreten (Herrick *et al*.,

1990). Konsistent damit sind auch experimentelle Daten, die zeigen, dass häufigere Codons positiv mit der Stabilität der *ompA* und *bla* mRNA korrelieren (Deana *et al*., 1996). Aber auch gegenteilige experimentelle Beobachtungen wurden gemacht, die gezeigt haben, dass die Codon-Optimierung heterologer Gene den mRNA-Abbau stimulieren kann (Lammertyn *et al*., 1996; Wu *et al*., 2004). Weiterhin existieren Befunde, die darauf hindeuten, dass ein Cluster aus raren Codons positiv mit der Stabilität einer mRNA korrelieren kann (Carlini, 2005; Gursky und Beabealashvilli, 1994) (siehe Einleitung 2.4). Dies impliziert, dass die Anwesenheit von raren Codons und pausierenden Ribosomen an diesen Codons unterschiedliche, Kontext-spezifische Auswirkungen haben kann.

Diese Arbeit über den Masterregulator der generellen Stressantwort σ^S in *E. coli* liefert einen weiteren Fall der mRNA Stabilisierung durch eine Serie von verstärkt natürlich auftretenden raren Codons. Innerhalb der *rpoS* Sequenz sind diese raren Codons entlang des gesamten ORF lokalisiert. Im Gegensatz dazu enthält das Gen für den vegetativen Sigmafaktor σ^{70}, einem σ^S sehr ähnlichem co-evolviertem Sigmafaktor, weitaus weniger rare Codons und stellt daher eine natürliche „Negativkontrolle“ dar (Abb. 4.1 und Tab. 4.1). Die Ergebnisse dieser Arbeit demonstrieren, dass alleine der Austausch der elf verschiedenen synonymen Codons, die rar in *rpoS* sind, durch die korrespondierenden häufigen *rpoD* Codons ausreicht, um den Abbau der *rpoS* mRNA zu beschleunigen (Abb. 4.3 und 4.5). Die gesteigerte Degradation des *rpoS* Transkripts der häufigen Codonmutante ist hierbei abhängig von der einzelstrangspezifischen Endonuklease RNase E (Abb. 4.4), einer der beiden primären Endonukleasen in *E. coli*, die den Abbau der meisten mRNAs initiiert (Arraiano *et al*., 2010; Carpousis, 2007; Dreyfus, 2009). Dies impliziert einen Mechanismus, in dem das transiente und repetitive Pausieren von Ribosomen an den vielen raren Codons im *rpoS* Wildtyp-Transkript zu einer Verlangsamung der Geschwindigkeit der Translationselongation insgesamt führt. Da die Initiation der Translation, d.h. die Neubeladung des Transkripts mit Ribosomen, von den raren Codons unbeeinflusst bleiben sollte, ist davon auszugehen, dass das wiederholte Pausieren der Ribosomen zu einer Erhöhung der Verweildauer jedes einzelnen Ribosoms und damit der Ribosomendichte entlang des *rpoS* Transkripts führt und daher die Zugänglichkeit von RNase E Erkennungs- und Spaltungsstellen vermindert wird (siehe Modell Abbildung 5.1). Offensichtlich gilt also im Falle von *rpoS* die Devise „weniger ist mehr“. Die Anwesenheit von raren Codons und die damit einhergehenden Pausierungen der Ribosomen führen zu einer *Erniedrigung* der Translationsgeschwindigkeit, was wiederum (über die Stabilisierung der *rpoS* mRNA) eine *erhöhte* Akkumulation des *rpoS* Transkripts und des Proteinproduktes σ^S zur Folge hat.

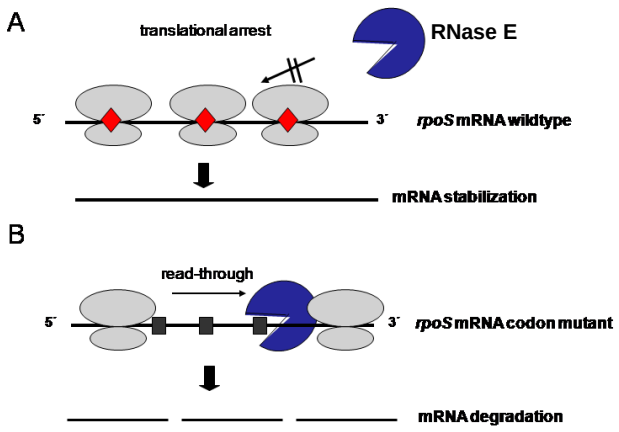


Abbildung 5.1: Modell zur positiven Rolle der raren *rpoS* Codons bei dessen Expression. (**A**) Das verstärkte Auftreten von raren Codons (rote Rauten) entlang der gesamtem Sequenz des *rpoS* ORF hat ein wiederholtes Pausieren der translatierenden Ribosomen (graue Kugeln) und damit eine Erniedrigung der Geschwindigkeit der Translationselongation insgesamt zur Folge, wodurch die Ribosomendichte entlang des *rpoS* Transkripts erhöht wird. Dadurch werden interne Erkennungs- und Hydrolysestellen durch die arretierten Ribosomen bedeckt und sind daher unzugänglich für die Endonuklease RNase E (blauer offener Kreis), was in einer Stabilisierung der *rpoS* mRNA resultiert. (**B**) Im Falle der *rpoS* Codonmutante mit den häufigen Codons (graue Quadrate) ist die Translationselongationsrate erhöht, die Ribosomendichte entlang des *rpoS* Transkripts dadurch erniedrigt. Dies hat zur Folge, dass größere Bereiche entlang der mRNA unbedeckt sind und das *rpoS* Transkript daher sensitiver gegenüber dem RNase E-abhängigen Abbau wird.

In Übereinstimmung mit dem oben geschilderten Modell konnte in einer Reihe von Untersuchungen gezeigt werden, dass eine Erniedrigung der Geschwindigkeit der Translationselongation im Allgemeinen positiv mit der Stabilität einer mRNA korreliert. So ist gut dokumentiert, dass Antibiotika wie Chloramphenicol, Tetracyclin und Fusidinsäure, welche die Translokation der Ribosomen entlang einer mRNA und damit die Translationselongation verlangsamen, zu einer deutlichen Stabilisierung einer mRNA führen (Cremer *et al*., 1974; Flache *et al*., 1992; Fry *et al*., 1972; Pato *et al*., 1973; Varmus *et al*., 1971). Antibiotika wie Kasugamycin und Puromycin hingegen, die ihre Wirkung entfalten, indem sie die Interaktion von Ribosomen und mRNAs gänzlich unterbinden und daher „nackte“ Transkripte herbeiführen, bewirken eine weitreichende Destabilisierung von mRNAs (Cremer *et al*., 1974; Pato *et al*., 1973; Schneider *et al*., 1978; Varmus *et al*., 1971).

Auch eine Entkopplung von Transkription und Translation durch die T7 RNAP, kann zu einer weitreichenden RNase E-abhängigen Destabilisierung einer mRNA führen (Chow und Dennis, 1994; Iost und Dreyfus, 1995; Makarova *et al*., 1995). Unter gewöhnlichen Bedingungen hat die Rate der Transkriptionsinitiation oder Transkriptionselongation durch die native *E. coli* RNAP keinen Einfluss auf die mRNA Stabilität (Carrier und Keasling, 1997), zumal Transkription und Translation wahrscheinlich über einen NusG•NusE (S10)-

Komplex unmittelbar miteinander gekoppelt sind (Burmann *et al*., 2010) und damit *in vivo* die Rate der Transkriptionselongation unmittelbar von der Rate der Translationselongation kontrolliert wird (Proshkin *et al*., 2010) (siehe auch 2.1.2). Anders ist die Situation, wenn ein mittels der T7 RNAP synthetisiertes Transkript translatiert wird. Die Bakteriophagen T7 RNAP synthetisiert eine mRNA etwa 8-mal schneller als die native *E.coli* RNAP oder die translatierenden Ribosomen und zeigt ferner keine Polaritätseffekte (Iost *et al*., 1992; Iost und Dreyfus, 1995). Dies führt dazu, dass bei einer Desynchronisation von Transkription und Translation durch die T7 RNAP-dirigierte Transkription große Bereiche einer mRNA von Ribosomen unbedeckt sind, was eine RNase E-abhängigen Destabilisierung eines Transkripts, wie gezeigt für die *lacZ* mRNA, zur Folge hat (Iost und Dreyfus, 1995). Diese Befunde sind ebenfalls konsistent mit den Ergebnissen dieser Arbeit und mit dem Modell, dass die raren Codons im *rpoS* Wildtyp und die damit verbundene höhere Ribosomendichte entlang des *rpoS* Transkripts die Sensitivität der *rpoS* mRNA gegenüber RNase E vermindern.

In diesem Zusammenhang ist es auch interessant diese Situation in den Kontext mit Arbeiten zu stellen, die untersucht haben, wie sich eine differentielle Regulation der Translationsinitiation auf die Stabilität von mRNAs auswirkt. Effizientere Ribosomenbindestellen korrelieren in der Regel positiv mit der Halbwertszeit einer mRNA, während translational inkompetente mRNAs, an die keine Ribosomen binden, rasch abgebaut werden (Jain und Kleckner, 1993). Weiterhin führt auch eine Inhibierung der Translationsinitiation durch eine inhibitorische Sekundärstruktur (Yarchuk *et al*., 1992), die Bindung von Translations-reprimierenden sRNAs (Massé *et al*., 2003), die Interaktion mit dem RNA-Chaperon Hfq (Vytvytska *et al*., 2000), oder Riboswitches (Deana und Belasco, 2005) zu einer verminderten Ribosomendichte entlang einer mRNA, einhergehend mit einem beschleunigtem Abbau, gewöhnlich durch RNase E. Andererseits führen Translationsinitiations-stimulierende sRNAs, wie die *rpoS* Translations-aktivierenden sRNAs DsrA und RprA, zu einer Stabilisierung der *rpoS* mRNA (Lease und Belfort, 2000; McCullen *et al*., 2010). Eine gesteigerte Translationsinitiation kann also auch zu einer höheren Ribosomendichte entlang einer mRNA führen, verbunden mit deren gesteigerter Stabilität (Deana und Belasco, 2005). Darüber hinaus kann die Besetzung der Ribosomenbindestelle aber auch weit stromabwärts lokalisierte Bereiche einer mRNA vor dem RNase E-abhängigen Abbau schützen, da in einigen Fällen der Eintritt von RNase E in eine mRNA eine 5´→3´-Direktionalität aufweist, in welche auch eine 5´-UTR involviert sein kann (Deana und Belasco, 2005). Anders als der homologe vegetative σ^{70}-Faktor, der keine Anreicherung von raren Codons aufweist, wird *rpoS* auch auf der translationalen Ebene reguliert (siehe 2.3.2.3). Für eine effiziente Translationsinitiation muss dabei eine inhibitorische Translations-inkompetente Sekundärstruktur innerhalb der 5´-UTR durch das RNA-Chaperon Hfq und sRNAs, in Antwort auf verschiedene Stressbedingungen, aufgeschmolzen werden (Soper *et al*., 2010) (siehe auch 2.2.2.2). Von daher ist vorstellbar, dass in Bezug auf den *rpoS* mRNA Abbau, eine ineffiziente Translationsinitiation möglicherweise durch den Schutz vor dem

RNase E-abhängigen Abbau mittels wiederholt pausierender Ribosomen an den raren Codons, kompensiert wird. Mechanistisch allerdings scheint die von den raren Codons-abhängige höhere *rpoS* mRNA Stabilität nicht von der Translationsinitiations-Kontrolle abhängig zu sein, da der stabilisierende Effekt der raren Codons in *rpoS* auch im Plasmid-Kontext ohne die chromosomale native 5´-UTR zu beobachten ist (vergleiche Abb. 4.3 und 4.5).

Pedersen *et al*., (2011) haben in jüngster Zeit modelliert, dass vor allem die Ribosomendichte in der frühen kodierenden Region einer mRNA zwischen den Codons 20 und 45 von besonderer Bedeutung für deren Stabilität ist. Sie kommen zu dem Schluss, dass langsam translatierte Codons (also seltenere) vor dem 20. Codon zu einer Destabilisierung einer mRNA führen, da distale Regionen eines Transkripts in diesem Falle weniger stark von Ribosomen besetzt sind. Sind seltenere und somit langsamer translatierte Codons hingegen nach dem 45. Codon einer mRNA lokalisiert, so korreliert dies positiv mit der Halbwertszeit einer mRNA, da Ribosomen stromaufwärts dieses Codons einen „Rückstau“ bilden, der eine protektive Barriere gegen den endonukleolytischen Abbau darstellt. Diese *in silico* Studien sind ebenfalls konsistent mit den Ergebnissen dieser Arbeit, da der Bereich, welcher die raren Codons in *rpoS* umfasst, die durch homologe abundantere synonyme Codons in *rpoD* repräsentiert werden, ab dem 47. Codon beginnt (ab S47, siehe Abb. 4.1 und Tab. 4.1). Im Allgemeinen ist es schwierig, RNase E-Erkennungs- und Hydrolysestellen innerhalb eines Transkripts vorherzusagen, da solche Positionen innerhalb einer mRNA einer AU-reichen einzelsträngigen nur schwachen Konsensussequenz folgen (Carrier und Keasling, 1997). Dennoch lässt eine genauere Inspektion der *rpoS* Sequenz eine interessante Hypothese zu. Vor allem in einem Fenster zwischen den Codons V24 und K28 der frühen kodierenden *rpoS* Sequenz ist eine AU-reiche Sequenz aus Clustern von Thyminen und Adeninen lokalisiert, die eine potenzielle RNase E Erkennungs- und Spaltungsstelle darstellen könnte. Dies würde gut in das oben beschriebene Modell passen, dass die ab dem Codon S47 lokalisierten raren Codons in *rpoS* für eine höhere Ribosomendichte in der frühen kodierenden Region sorgen, und so eine potenzielle RNase E-sensitive Position abschirmen. Weiterhin ist anzumerken, dass die beiden beschriebenen Modelle (i) RNase E-protektive Ribosomenbarriere in der frühen kodierenden *rpoS* Sequenz durch rare Codons, oder (ii) Abschirmung von RNase E-sensitiven Positionen durch seltenere Codons entlang der gesamten *rpoS* Sequenz (Abb. 5.1), sich keinesfalls gegenseitig ausschließen.

Auf den ersten Blick scheinen all diese Beobachtungen im Widerspruch zu den experimentellen Befunden von beispielsweise Deana *et al*., (1996) zu stehen. In deren Arbeit wurde die Beobachtung gemacht, dass der Austausch von häufigeren schneller translatierten Codons im *ompA* Gen durch seltenere langsamer translatierte mit einem beschleunigtem Abbau der *ompA* mRNA einhergeht (Deana *et al*., 1996). Entsprechend konnte im Falle der *bla* mRNA demonstriert werden, dass die Substitution von natürlich auftretenden raren Codons durch abundantere mit einer Stabilisierung der *bla* mRNA verbunden ist (Deana *et*

al., 1996). Im Unterschied zu den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten haben Deana *et al*., (1996) den Einfluss der Codon-Usage auf die mRNA Stabilität aber nur in einem lokalen engbegrenzten Bereich, im Falle von *ompA* von Codon 183-190, in der *bla* mRNA im Bereich der Codons 104-138 untersucht (Deana *et al*., 1996). Die Ergebnisse andere (siehe weiter oben) und dieser Arbeit zeigen aber, dass die Codon-Usage bzw. die Translationselongationsgeschwindigkeit entlang einer *gesamten* mRNA einen signifikanten Einfluss auf die Stabilität von Transkripten ausübt.

5.1.3 Der positive Effekt der raren Codons in *rpoS* auf dessen Expression ist robust und unabhängig von Temperatur, Wachstumsbedingungen und anderen Regulationsmechanismen

Der positive Effekt der raren Codons auf die Stabilität der *rpoS* mRNA ist robust und auch unter verschiedenen Temperaturen, Wachstumsbedingungen, sowie in verschiedenen Stammhintergründen sichtbar. Unter Verwendung des induzierbaren *rpoS* Expressionssystems (Plasmid-kodiertes, IPTG-induzierbares Wildtyp *rpoS* und *rpoS* Codonmutante im RpoS-defizienten W3110 Hintergrund, siehe Abb. 4.2) wurden sowohl das *rpoS* Wildtypkonstrukt mit den raren Codons, als auch die *rpoS* Codonmutante mit den häufigeren Codons beim Eintritt in die stationäre Wachstumsphase bei verschiedenen Temperaturen von 24°C und 16°C (nicht gezeigte Daten), sowie unter Hitzeschock bei 43°C (Abb. 4.4 B) induziert. Wie bereits für 37°C beschrieben, war die Halbwertszeit der mRNA der *rpoS* Codonmutante gegenüber jener des *rpoS* Wildtyps, sowohl bei niedrigeren Temperaturen von 24°C und 16°C, als auch unter Hitzeschockbedingungen bei 43°C etwa um den Faktor 2 erniedrigt (Tabelle 4.2). Möglich wäre auch die Beobachtung gewesen, dass sich die Halbwertszeiten von *rpoS* Wildtyp mRNA und jener der Codonmutante vor allem bei niedrigeren Temperaturen aneinander annähern. Dies wäre insbesondere der Fall unter der Annahme, dass eine Erniedrigung der Temperatur global die Translokation der translatierenden Ribosomen entlang von mRNAs verlangsamt, wodurch der destabilisierende Effekt der abundanteren Codons in der *rpoS* Codonmutante gewissermaßen kompensiert wird. Die Ergebnisse dieser Arbeit demonstrieren jedoch, dass dies offensichtlich nicht der Fall ist. Scheinbar (und erwartungsgemäß) ist auch die Translationsinitiation unter den niedrigeren Temperaturen global erniedrigt, was eine globale Stabilisierung durch die langsamere Translokalisation der translatierende Ribosomen kompensiert.

Darüber hinaus demonstrieren die Ergebnisse dieser Arbeit auch, dass eine Temperaturerniedrigung, vor allem von 37°C auf 16°C, *per se* einen 2-3-fachen stabilisierenden Einfluss auf die *rpoS* mRNA ausübt. Dies ist konsistent mit Beobachtungen einer anderen Studie, die einen ähnlichen Effekt von niedrigeren Temperaturen auf die Stabilität des *rpoS* Transkripts beobachtete (Madhugiri *et al*., 2010). Dies ist im Allgemeinen

auch so zu erwarten, da niedrigere Temperaturen im Allgemeinen mit einer höheren Stabilität von RNAs, aufgrund der niedrigeren Aktivität von RNasen und der höheren thermodynamischen Stabilität von RNA-Sekundärstrukturen, einhergehen (Goldenberg *et al*., 1996; Jäger *et al*., 2004). Auch bei höheren Hitzeschocktemperaturen konnten in den Arbeiten von Madhugiri *et al*., (2010) und McCullen *et al*., (2010) eine deutliche etwa 2-3-fache Stabilisierung des *rpoS* Transkripts nachgewiesen werden, während die Ergebnisse dieser Arbeit eine nur sehr moderate Stabilisierung des *rpoS* Transkripts zeigen (etwa 1.3-fache Stabilisierung). Grund dafür könnte sein, dass in dem in dieser Arbeit verwendeten System die *rpoS* 5´-UTR, die eine translationsinhibitorische Sekundärstruktur ausbildet, abwesend ist und die *rpoS* mRNA dadurch vor allem bei höheren Temperaturen (höhere Aktivität von RNasen) zugänglicher für den ribonukleolytischen Abbau wird. Dies impliziert, dass die *rpoS* 5´-UTR bei höheren Temperaturen einen stabilisierenden Effekt auf die *rpoS* mRNA ausübt.

Desweiteren lässt sich feststellen, dass der positive Effekt der raren Codons auf die Stabilität der *rpoS* mRNA des Wildtyps in verschiedenen Stammhintergründen reproduzierbar ist. Die in Abbildung 4.4 A und B verwendeten Stammhintergründe (RNase III-Mutante *rnc*$^-$, RNase E-Wildtypstamm *rne*$^+$) sind alle Derivate des *E. coli* K12 Stammes MG1655 und zeigen alle, wie zuvor für den W3110 Stamm beobachtet (Abb. 4.3 und 4.5), einen beschleunigten Abbau des Transkripts der *rpoS* Codonmutante gegenüber der *rpoS* mRNA des Wildtyps.

Weiterhin zeigt auch ein Vergleich des *rpoS* mRNA Abbaus (Wildtyp versus Codonmutante) im Plasmid-basierten Kontext (Abb. 4.3) mit jenem im chromosomalen Kontext (Anwesenheit der *rpoS* 5´-UTR) (Abb. 4.5), dass der stabilisierende Effekt der raren Codons auf das *rpoS* Transkript unabhängig von anderen Regulationsmechanismen, wie Transkription und Translationsinitiation, zu sein scheint. Wie im Falle der Vektor-basierten Expression (Abb. 4.3) ist eine Destabilisierung der *rpoS* mRNA durch das Einführen der häufigeren Codons ebenfalls im chromosomalen Kontext zu beobachten (Abb. 4.5), in welchem die physiologische Regulation der *rpoS* Transkription und Translationsinitiation stattfindet. Zudem ist der positive Effekt der raren Codons auf die *rpoS* Expression unabhängig von der Zusammensetzung des Wachstumsmediums, da dieser sowohl in komplexem LB- als auch in Minimalmedium reproduzierbar ist (vgl. Abb. 4.5 A und B).

5.1.4 Auch die Gene anderer co-evolvierter Wachstumsphasen-abhängig exprimierter Isoenzyme zeigen auffällige Unterschiede in ihrer Codon-Usage

RpoS ist der primäre Sigmafaktor für die Genexpression in der stationären Wachstumsphase, die im Allgemeinen durch limitierende energetische Ressourcen gekennzeichnet ist. Von daher ist es sinnvoll, dass unter diesen limitierenden Bedingungen exprimierte Gene wie *rpoS*

durch die Ausstattung mit raren Codons ihre mRNAs verstärkt mit Ribosomen beladen, um einem unökonomischen RNase E-abhängigen Abbau ihrer Transkripte entgegenzuwirken. Die Analyse der Codon-Usage in anderen Wachstumsphasen-abhängig induzierten homologen Isoenzympaaren als RpoS und RpoD impliziert, dass dieses Prinzip möglicherweise eine allgemeine Gültigkeit aufweist. Ein Beispiel von Wachstumsphasen-abhängigen homologen Isoenzympaaren liefern sowohl die Transaldolase (TalA/TalB), als auch die Transketolase (TktA/TktB), die beide im Pentosephosphatweg agieren (Sprenger, 1995). Die *talA* und *tktB* Gene bilden ein gemeinsames Operon unter $E\sigma^S$-Kontrolle, dass beim Eintritt in die stationäre Phase aktiviert wird, während *talB* und *tktA* monocistronische Gene darstellen, die in schnell wachsenden exponentielle Phase-Zellen exprimiert werden (Weber *et al*., 2005 und nicht gezeigte Daten). Ein Vergleich der Codon-Usage in den sehr ähnlichen Genen (64.2 % Aminosäureidentität für TalA/TalB und 74.6 % Aminosäureidentität für TktA und TktB) offenbart Erstaunliches. Das Stationärphasen-exprimierte *talA* Gen enthält etwa fünfmal soviele rare Codons (32.6 % rare Codons) wie das exponentielle Phasen-induzierte *talB* Gen (6.3 % rare Codons) (Abb. 4.10 A, siehe 4.3). Hierbei werden 38 verschiedene homologe Positionen in den Sequenzen beider Isoenzyme (12 % aller Codons) in *talA* durch seltenere, in *talB* hingegen durch synonyme häufigere Codons repräsentiert (Abb.4.10 A). Ähnlich ist die Situation beim *tktA*/*tktB* Genpaar. Während das stationäre Phasen-exprimierte *tktB* zu 28.3 % rare Codons aufweist, enthält das exponentielle Phasen-Komplement *tktA* lediglich zu 9.3 % rare Codons (Abb. 4.10 B, siehe 4.3). 123 synonyme Codons (18.5 % aller Codons) sind selten in *tktB* und häufig in *tktA* (Abb. 4.10 B). Neben den Isoenzympaaren RpoS/RpoD, TalA/talB und TktA/TktB zeigen auch andere Wachstumsphasen-assoziierte Gene bemerkenswerte Unterschiede in ihrer Codon-Usage. So enthalten beispielsweise die stationäre Phasen-assoziierten Gene *osmY* und *csgB* ebenfalls einen hohen Anteil an selteneren Codons (21.3 % bzw. 40.1 %) (siehe 4.3), während typische Gene der exponentiellen Phase wie *rpsO* und *rpsB*, die für ribosomale Proteine kodieren, einen weitaus geringeren Anteil an raren Codons aufweisen (11.1 % bzw. 6.6 %) (siehe 4.3). Das *rpoA* Gen, das für die α-Untereinheit der RNAP kodiert, hingegen weist mit 20.3 % einen deutlich höheren Anteil an raren Codons auf als andere exponentielle Phasen Gene (siehe 4.3), möglicherweise, weil *rpoA* (also die RNAP) auch in der stationäre Phase unter energetisch limitierenden Bedingungen benötigt wird. Diese bemerkenswerten Unterschiede in der Codon-Usage in exponentielle und stationäre Wachstumsphasen-exprimierten Isoenzymen und anderen Genen deuten auf einen unmittelbaren Zusammenhang zwischen der Codon-Usage und der Physiologie der bakteriellen Genexpression hin.

5.1.5 Co-translationale Proteinfaltung und tRNA-Regulation haben keinen Einfluss auf die Codon-Usage-abhängige Regulation der *rpoS* Expression

Rare Codons innerhalb einer mRNA können durch die Pausierungen der translatierenden Ribosomen lokale Minima in der Translationsgeschwindigkeit hervorrufen, die für die co-translationale Faltung von Proteinen in ihre korrekte native Konformation relevant sein können (Komar, 2009; Marin, 2008; Tsai *et al*., 2008; Zhang *et al*., 2009; Zhang und Ignatova 2011) (siehe 2.4). Von daher war es denkbar, dass die Substitution der raren Codons durch die häufigeren Codons in der *rpoS* Codonmutante zu einer Eliminierung der für die co-translationale Faltung wichtigen Pausierungen der Ribosomen führt. Daraus resultierendes unvollständig oder fehlgefaltetes σ^S-Protein könnte nachfolgend von der Maschinerie des Protein-Qualitätskontrollsystem, also Proteasen wie Lon und ClpXP, schneller erkannt und degradiert werden (Schmidt *et al*., 2009; Van Melderen und Aertsen, 2009). Da RpoS der natürlichen regulierten Proteolyse durch die ClpXP-Protease und dem Erkennungsfaktor RssB unterliegt (siehe 2.3.2.4), stellte sich also die Frage, ob der RpoS-Abbau im Falle der Codonmutante beschleunigt wird. Wie Abbildungen 4.6 und 4.7 zeigen, scheint dies nicht der Fall zu sein. So weisen *rpoS* Wildtyp und Codonmutante keine signifikanten Unterschiede im Abbau des σ^S-Proteins auf (Abb. 4.6). Konsistent damit ist auch die Beobachtung, dass die akkumulierten σ^S-Mengen der Codonmutante gegenüber dem Wildtyp in verschiedenen Protease-defizienten Hintergründen (*clpP*-oder *lon*-Mutante) oder in einer *rssB*-Mutante um den Faktor 1.5-bis 2-fach reduziert bleiben (Abb. 4.7). Die Daten sprechen also dafür, dass σ^S-Faltung und Proteolyse keinen Einfluss auf den beobachteten positiven Effekt der raren Codons im *rpoS* Wildtyp auf dessen Expression haben.

Dong *et al*., (1996) und andere (siehe 4.2) haben berichtet, dass einige der raren tRNAs, die rare Codons dekodieren in *E. coli* einer Wachstumsraten-abhängigen Regulation unterliegen, wobei einige tRNAs, die seltenere Codons spezifizieren invers mit steigender Wachstumsrate herunterreguliert werden. Insbesondere auch solche tRNA-Spezies, die in *rpoS* rare Codons dekodieren (Tab. 4.1 und 4.3). Von daher stellte sich die Frage, ob solche tRNAs auch einer Wachstumsphasen-abhängigen Regulation unterliegen und in der stationären Wachstumsphase (niedrigere Wachstumsraten) verstärkt exprimiert werden. Dadurch könnte die Expression von stationäre-Phasen Genen wie *rpoS*, in denen vermehrt rare Codons von solchen tRNA-Spezies dekodiert werden, positiv reguliert werden. Wie aus Abbildung 4.9 hervorgeht, ist dies offensichtlich nicht der Fall. Sowohl die Promotoren der selteneren tRNAs, als auch jene der abundanteren zeigen ein sehr ähnliches Expressionsprofil. Das Expressionsmaximum wird bei allen tRNA-Promotor-LacZ-Fusionen beim Übergang bzw. Eintritt in die stationäre Wachstumsphase erreicht (Abb. 4.9). Sollte die von Dong *et al*., (1996) und anderen beschriebene inverse Wachstumsraten-Regulation der raren tRNAs

wirklich existieren, so muss diese also auf posttranskriptionaler Ebene realisiert werden und Prozessierungsereignisse und/oder Mechanismen der Transkriptionselongation beinhalten. Weiterhin zeigen die Expressionsprofile, dass die Aktivität der tRNA-Promotoren in einem RpoS-defizienten Hintergrund in dem meisten Fällen hochreguliert wird (Abb. 4.9 A, B, D, E und F). Dabei handelt es sich offenbar um einen indirekten Effekt, da in einer *rpoS* Mutante durch die Abwesenheit von σ^S die Sigmafaktorkompetition zugunsten der vegetativen $E\sigma^{70}$-RNAP beeinflusst wird und die tRNA-Operons von der vegetativen RNAP transkribiert werden. Einige tRNA-*lacZ*-Fusionen (Abb. 4.9 C und G) zeigen in einer *rpoS* Mutante eine nahezu unveränderte Aktivität. Möglicherweise handelt es sich dabei um hochaffine $E\sigma^{70}$-tRNA-Promotoren, die bereits bei niedrigeren $E\sigma^{70}$-Konzentrationen mit Polymerase gesättigt sind und daher den indirekten Effekt bezüglich der Sigmafaktorkompetition nicht zeigen.

5.2 Identifikation von sRNAs, die an der Osmo- und Säurestress-Induktion von RpoS beteiligt sind

Ein weiteres wichtiges Ziel dieser Arbeit war es, kleine nichtkodierende regulatorische RNAs (sRNAs) zu identifizieren, die an der bekannten Induktion von σ^S unter hyperosmotischem Stress und Säurestress beteiligt sind (siehe 2.3.2.3). Vornehmlich sollten dabei vor allem solche sRNAs identifiziert werden, die bei der translationalen Aktivierung von *rpoS* unter solchen Stressbedingungen eine Rolle spielen (siehe 2.2.2.2). Es waren bisher drei sRNAs beschrieben worden, welche die *rpoS* Translation durch Aufschmelzen der inhibitorischen Sekundärstruktur in der *rpoS* 5´-UTR aktivieren: DsrA, RprA und ArcZ (siehe 2.2.2.2). Zu Beginn dieser Arbeit wurde im Falle der sRNA DsrA die Ansicht vertreten, dass diese sRNA die *rpoS* Translation unter niedrigen Temperaturen stimuliert (Sledjeski *et al*., 1996) und nicht an der bekannten Osmoinduktion von RpoS beteiligt ist. Zudem konnte zuvor gezeigt werden, dass RprA nur teilweise, bei gleichzeitiger Abwesenheit von DsrA, zur hyperosmotischen Induktion von σ^S beiträgt (Majdalani *et al*., 2001). Auch eine Beteiligung der sRNA ArcZ an der translationalen Aktivierung von *rpoS* unter den Stressbedingungen wurde bisher nicht untersucht. Es war lediglich bekannt, dass ArcZ unter der Kontrolle des ArcB/ArcA-Zweikomponenten-System steht und seine Expression unter anaeroben Bedingungen vom letzteren reprimiert wird (Mandin und Gottesman, 2010). Um neue, oder bekannte sRNAs zu identifizieren, die an der Induktion von RpoS unter Stressbedingungen (hyperosmotischer Stress und Säurestress) beteiligt sind, wurden unter hyperosmotischem Stress Hfq-assoziierte sRNAs mittels 454 Pyrosequenzierung identifiziert (siehe 4.4).

5.2.1 Identifikation von hyperosmotisch und in einer *hns* Mutante induzierten sRNAs

Wie aus Tabelle 4.7 hervorgeht, konnten durch die Pyrosequenzierungsanalyse eine Reihe von sRNAs identifiziert werden, die unter hyperosmotischen Stress verstärkt exprimiert werden, darunter die bekannten RpoS positiv regulierenden sRNAs RprA und DsrA (wenn letztere auch nur moderat induziert wird), OmrA, OmrB, RyeB, SgrS, RydB, GlmZ und die 6S RNA. Die hyperosmotische Induktion dieser sRNAs konnte in den Northernblot-Analysen (Abb. 4.15 und Abb. 4.23) im Wesentlichen verifiziert werden. Nur die hyperosmotische Induktion der sRNAs RyeB und GlmZ fiel in den Northernblot-Analysen deutlich schwächer aus, als es die entsprechenden Pyrosequenzierungsdaten erwarten ließen, während die 6S RNA gar keine Osmo-Induktion im Northernblot zeigte (vgl. Tab. 4.6 und Abb. 4.15). Dass Daten aus Pyrosequenzierungsanalysen nicht immer mit Northernblot-Daten übereinstimmen, zeigt auch die Arbeit von Sittka *et al*., (2008). Hier zeigte sich, dass die Anreicherung von einigen sRNAs aus einer Hfq-coIP-Bibliothek in Northernblot-Analysen zum Teil nicht verifiziert werden konnte. Auch die Hfq-unabhängige 6S RNA (Wassarman *et al*., 2001) zeigt laut den Pyrosequenzierungsdaten eine verstärkte Akkumulation unter hyperosmotischen Stress, was laut den Northernblot-Daten allerdings nicht der Fall ist. Die 6S RNA ist eine sehr abundante sRNA und von daher offenbar auch in den Fraktionen aus Hfq-co-immunopräzipitierten RNAs anwesend. Denkbar ist daher, dass einige 6S RNAs in der co-IP-Bibliothek aus der ungestressten Kontroll-Kultur verloren gingen und dadurch in dieser unterrepräsentiert waren, wodurch die Pyrosequenzierungsanalyse eine vermeintliche hyperosmotische 6S RNA-Induktion aufzeigte. Interessanterweise wird die *rpoS* Translations-aktivierende sRNA ArcZ unter hyperosmotischen Stress herunterreguliert, wie sowohl die Pyrosequenzierungs- als auch die Northernblot-Daten demonstrieren (Tab. 4.6 und Abb. 4.15), also unter Bedingungen, in denen RpoS verstärkt exprimiert wird (Lange *et al*., 1993; Muffler *et al*., 1996b). Dies impliziert, dass diese sRNA nicht an der hyperosmotischen σ^S-Induktion beteiligt ist.

Weiterhin zeigen die Daten, dass OmrB unter hyperosmotischem Stress stärker akkumuliert als OmrA (Tab. 4.6 und Abb. 4.15). Dieser Befund ist konsistent mit Ergebnissen von Guillier und Gottesman (2006) die auch gezeigt haben, dass die OmrB-Mengen unter hyperosmotischem Stress höher sind als jene von OmrA. OmrA und OmrB werden von zwei einander unmittelbar benachbarten Genen kodiert und stehen unter der Kontrolle des EnvZ/OmpR-Zweikomponentensystem. Dementsprechend werden sie unter den hyperosmotischen Bedingungen induziert (Guillier und Gottesman, 2006). Dabei reprimieren sie eine Reihe von Ziel-mRNAs, die neben dem eigenen Aktivator OmpR und der Protease OmpT (Guillier und Gottesman, 2008) für Porine in der Außenmembran für den Durchtritt von Eisen-Siderophor-Komplexen kodieren (CirA, FecA, FepA) (Guillier und Gottesman, 2006) (siehe 2.2.2.3). Auch die sRNA MicA, die eine (wenn auch moderate) hyperosmotische

Induktion zeigt (Tab. 4.6 und Abb. 4.15), reprimiert die *ompA* und *ompX* mRNAs, die für Porine kodieren (Gottesman und Storz, 2010). Bis dato war bekannt, dass MicA in der stationären Wachstumsphase und als Teil des RpoE-Regulons unter periplasmatischem Stress akkumuliert und seine Expression entsprechend von der Eσ^E-Polymerase kontrolliert wird (Storz und Gottesman, 2011). Dong und Schellhorn (2009) haben gezeigt, dass die σ^E-Akkumulation in Minimalmedium vor allem in der exponentiellen Phase von RpoS positiv reguliert wird. Auch die Osmostressexperimente in Tab. 4.6 und Abb. 4.15 wurden in Minimalmedium durchgeführt. Denkbar ist daher, dass die moderate hyperosmotische Induktion von MicA in Eσ^E-abhängiger Weise indirekt über die verstärkte hyperosmotische RpoS-Induktion positiv reguliert wird. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen also mit dem hyperosmotischen Stress eine neue Situation auf, unter der MicA leicht verstärkt akkumuliert. Die Repression von bestimmten Porinen unter hyperosmotischem Stress kann durchaus einen physiologischen Nutzen bringen. So ist z.B. bekannt, dass hohe Osmolarität innerhalb des Wirtes von *E. coli* Zellen im Intestinaltrakt vorherrscht und dort mit dem Auftreten von Gallensalzen korreliert. Da diese toxisch sind, werden viele Porine reduziert exprimiert und mit OmpC ein Porin synthetisiert, dessen Pore zu klein ist, um den Durchtritt von Gallensalzen zu ermöglichen (Guillier *et al*., 2006).

Weiterhin konnte mit dieser Arbeit erstmalig eine hyperosmotische Induktion der σ^S-aktivierenden sRNAs RprA und DsrA direkt nachgewiesen werden (Tab. 4.6 und Abb. 4.15 und 4.23). Auch wenn eine mögliche Funktion von RprA, bei Abwesenheit von DsrA, bei der Osmo-Induktion einer translationalen *rpoS*::*lacZ*-Fusion aufgezeigt wurde (Majdalani *et al*., 2001), ist das Expressionsprofil von RprA unter plötzlichem hyperosmotischem Stress nie direkt untersucht wurden. Es war bis dato nur bekannt, dass die Expression von RprA unter der Kontrolle des Zelloberflächenstress-wahrnehmenden RcsC/D/B-Phosphorelay-Systems steht (Majdalani *et al*., 2002) und in der stationären Phase akkumuliert (Wassarman *et al*., 2001) (siehe 2.2.2.2). Madhugiri *et al*. (2010) haben lediglich gezeigt, dass RprA nur unter moderaten Osmostressbedingungen bei niedrigen ansteigenden Sucrose-Konzentrationen in LB-Medium stabilisiert wird, haben aber nicht die hyperosmotische Induktion von RprA *per se* untersucht. In Übereinstimmung mit der Kontrolle der RprA-Expression durch das Zelloberflächenstress-wahrnehmenden RcsC/D/B-Phosphorelay-Systems (Majdalani *et al*., 2002) wird letzteres auch durch gesteigerte Osmolarität aktiviert (Sledjeski und Gottesman, 1996; Francez-Charlot *et al*., 2005).

Majdalani *et al*. (2001) haben die Auswirkungen von hyperosmotischem Stress auf die Aktivität einer transkriptionalen *dsrA*::*lacZ*-Fusion studiert und fanden heraus, dass ein osmotischer Schock keinen Einfluss auf die *dsrA* Promotoraktivität hat. Sie kamen daher zum Schluss, dass DsrA unter diesen Bedingungen nicht induziert wird. Die Ergebnisse dieser Arbeiten ergeben ein anderes Bild. Sie zeigen, dass DsrA unter hyperosmotischem Stress, je nach Experiment, etwa 2-4-fach induziert wird (Abb. 4.23). Die Stimulation der DsrA-

Transkription unter niedrigen Temperaturen ist bereits beschrieben (Sledjeski *et al*., 1996). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen mit der positiven DsrA-Regulation unter hyperosmotischen Stress einen neuen Aspekt der Stress-abhängigen DsrA-Induktion auf. Die verstärkte Akkumulation von DsrA bei niedrigen Temperaturen ist eine Kombination aus gesteigerter Transkriptionsinitiation am *dsrA* Promotor und einer Stabilisierung der sRNA (Repoila und Gottesman, 2001). Ob die verstärkte Akkumulation von DsrA unter Osmostress ebenfalls auf eine Stabilisierung der sRNA zurückzuführen ist, muss in zukünftigen Experimenten geklärt werden. Dies scheint jedoch wahrscheinlich zu sein, da eine transkriptionale *dsrA*::lacZ-Fusion unter der Kontrolle des nativen Promotors keine gesteigerte Reportergenaktivität aufweiset (Majdalani *et al*., 2001; siehe oben).

Die Akkumulation der noch wenig erforschten sRNA RyeB ist offenbar auch Osmo-induziert (Tab. 4.6 und Abb. 4.15 D). Weiterhin wird möglicherweise die inaktivierende Prozessierung der sRNA GlmZ (siehe 2.2.2.2) unter hyperosmotischem Stress inhibiert, da die NaCl-Zugabe mit einer verstärkten Akkumulation von Vollängen-GlmZ und einer Abnahme von trunkiertem GlmZ einhergeht (Abb. 4.15 F). Die Regulation und physiologische Funktion der sRNAs RyeB und GlmZ unter den Osmostressbedingungen muss in zukünftigen Experimenten untersucht werden.

Einige der der hyperosmotisch induzierten sRNAs, werden auch in einer *hns* Mutante hochreguliert (OmrA, OmrB, SgrS, 6S, RyeB und MicA; Abb. 4.16), was sie zu besonders interessanten potenziellen *rpoS* Translations-aktivierenden Kandidaten macht. Denn es ist bekannt, dass die *rpoS* Translation in einer *hns* Mutante hochreguliert wird (siehe 2.3.2.3). Wie kommt es zu der verstärkten Akkumulation dieser sRNAs in einer *hns* Mutante? Es ist zunächst festzuhalten, dass H-NS ein globaler Transkriptionsrepressor ist und eine *hns* Mutante pleiotrope Effekte zeigt (Dorman, 2004). Etwa 5 % aller Gene stehen unter direkter oder indirekt negativer transkriptionaler Kontrolle durch H-NS (Hommais *et al*., 2001). Daher ist es denkbar, dass einige der sRNAs in der *hns* Mutante direkt oder indirekt dereprimiert werden. So ist für die 6S RNA bereits beschrieben worden, dass deren Transkription in H-NS-defizienten Zellen offenbar direkt dereprimiert wird, vor allem in der stationären Phase und moderater in der exponentiellen Phase (Neusser *et al*., 2008). Letztere Beobachtungen sind auch konsistent mit den Daten dieser Arbeit, die eine moderate Derepression der 6S RNA in der exponentiellen Wachstumsphase demonstrieren (Abb. 4.16). Für OmrA und OmrB kommt neben einer direkten Derepression der Transkription auch eine indirekte Regulation in Frage, zumal Guillier und Gottesman (2005) angedeutet haben, dass die Expression dieser sRNAs zumindest zum Teil von $E\sigma^S$ abhängig ist und RpoS in einer *hns* Mutante hochreguliert wird (Barth *et al*., 1995; Yamashino *et al*., 1995) (siehe 2.3.2.3). Ob die verstärkte Akkumulation der sRNAs RyeB und MicA in der *hns* Mutante (Abb. 4.16) direkter oder indirekter Natur ist und z.B. über $E\sigma^S$ reguliert wird, müssen zukünftige Untersuchungen klären. Desweiteren ist auffällig, dass die in der *hns* Mutante verstärkt akkumulierten sRNAs auch unter

hyperosmotischem Stress induziert werden (vgl. Tab. 4.6, Abb. 4.15 und 4.16). Dies ist insofern nicht verwunderlich, als dass H-NS als ein Transkriptionsrepressor von Osmostress-assoziierten Genen bekannt ist (Barth *et al*., 1996; Hommais *et al*., 2001). *In vitro* und *in vivo* Studien haben gezeigt, dass die Zugabe von Osmolyten wie NaCl DNA-Krümmungen reduzieren oder aufheben kann und dadurch die Interaktion von H-NS mit DNA inhibiert wird (Dorman, 2004). Von daher ist nicht auszuschließen, dass die Induktion der sRNAs unter hyperosmotischen Stress (Abb. 4.15) durch eine Depression der Transkription durch Inhibierung der H-NS-Promotor-DNA Interaktion unter den Hochsalzbedingungen zustande kommt. Außerdem könnte ein Osmo-aktivierter Transkriptionsfaktor, wie z.B. OmpR im Falle von OmrA und OmrB, H-NS antagonisieren.

5.2.2 Regulation einer translationalen *rpoS*::*gfp*-Fusion durch die sRNA-Kandidaten

Um potenzielle neue sRNAs zu identifizieren, welche die *rpoS* Translation stimulieren, wurden die aus den Pyrosequenzierungsdaten und Northernblot-Analysen unter hyperosmotischem Stress (Tab. 4.6 und Abb. 4.15) bzw. in einer *hns* Mutante (Abb. 4.16) induzierten sRNA-Kandidaten auf ihre Fähigkeit hin untersucht, eine translationale *rpoS*::*gfp*-Fusion zu aktivieren (Abb. 4.18). Vorangegangene Arbeiten haben gezeigt, dass die Überexpression der sRNA MicA keinen signifikanten Einfluss auf die Expression einer translationalen *rpoS*::*gfp*-Fusion hat, während die bekannten *rpoS* aktivierenden sRNAs RprA und DsrA die Expression der letzteren stimulieren (Urban und Vogel, 2007). Wie die Daten in Abbildung 4.18 demonstrieren, hat lediglich die Überexpression der sRNAs OmrA, OmrB, neben der bekannten *rpoS* Translations-aktivierenden sRNA ArcZ als Positivkontrolle, eine moderate stimulierende Wirkung auf die Expression der translationalen *rpoS*::*gfp*-Fusion. So führt die Überexpression dieser beiden sRNAs zu einer 1.5-1.8-fachen Aktivierung der Fusion (Abb. 4.18), sowie zu einer verstärkten Akkumulation von endogenem σ^S. Dies stimmt mit den Ergebnissen vorangegangener Untersuchungen ein, die eine 1.5- 2-fache Aktivierung einer translationalen *rpoS*::*lacZ*-Fusion durch die Überexpression von OmrA und OmrB ergaben (Mandin und Gottesman, 2010; Wassarman *et al*., 2001). Die Überexpression der sRNAs SgrS führt zu einer sehr moderaten 1.3-1.5-fachen Aktivierung der *rpoS*::*gfp*-Fusion (Abb. 4.18), was ebenfalls mit den Daten von Urban und Vogel (2007), die die gleiche *rpoS*::*gfp*-Fusion verwendeten, übereinstimmt. In einer ähnlichen Größenordnung bewegt sich auch die SgrS-abhängige Aktivierung einer translationalen *rpoS*::*lacZ*-Fusion (Mandin und Gottesman, 2010). Auch die Überexpression der sRNA GlmZ hat nur eine moderate 1.5-fach gesteigerte Akkumulation des RpoS::GFP-Reporterhybridproteins zur Folge (Abb. 4.18). Die Daten dieser Arbeit zeigen also, dass die sRNA-Kandidaten einen nur sehr moderaten positiven Einfluss auf die Aktivierung der *rpoS*::*gfp*-Fusion haben, was es nicht wahrscheinlich erscheinen lässt, dass sie einen signifikanten positiven Einfluss auf die *rpoS* Regulation ausüben. Im Vergleich dazu führt die Überexpression der bekannten *rpoS*

Translations-aktivierenden sRNAs RprA und DsrA in dem hier verwendeten GFP-Reportergen-System zu einer 3-fachen (RprA) bzw. 7-fachen (DsrA) Aktivierung der *rpoS*::*gfp*-Fusion (Urban und Vogel, 2007). Ob die in dieser Arbeit beobachtete schwache positive Regulation der *rpoS*::*gfp*-Fusion durch die sRNA-Kandidaten direkter Natur ist, wurde nicht weiterverfolgt. In der Arbeit von Wassarman *et al*. (2001) wurde auch die Hfq-assoziierte sRNA RybB als ein positiver Regulator einer translationalen *rpoS*::*lacZ*-Fusion identifiziert. So wurde gezeigt, dass die Überexpression von RybB zu einer etwa 2-fachen Aktivierung der translationalen *rpoS*750::*lacZ* Fusion in Minimalmedium in der stationären Phase führt (Wassarman *et al*., 2001). Dennoch ist es unwahrscheinlich, dass RybB einen aktivierenden Einfluss auf die *rpoS* Translation unter hyperosmotischem Stress ausübt. Die Pyrosequenzierungsdaten dieser Arbeit ergaben, dass RybB unter den Osmostressbedingungen nicht induziert wird (nicht gezeigte Daten). Andere Untersuchungen haben ergeben, dass die *rpoS* Translation bei konstitutiver Aktivierung des Pho Regulons in einer Hfq-abhängigen Weise aktiviert wird (Ruiz und Silhavy, 2003). Teil des Pho Regulon sind die *pst* Gene, die für Komponenten der Transportmaschinerie von anorganischem Phosphat kodieren. Schurdell *et al*. (2007) konnten zeigen, dass eine RNA-Regionen zwischen den *pstA* und *pstB* Genen die *rpoS* Expression stimuliert. Dies impliziert die Existenz einer weiteren sRNA, welche die *rpoS* Translation unter Phosphatmangel-Bedingungen stimuliert. Die Pyrosequenzierungsdaten dieser Arbeit legen jedoch nahe, dass diese potenzielle sRNA bei der Aktivierung der *rpoS* Translation unter hyperosmotischem Stress keine Rolle spielt, dass sie unter diesen Bedingungen nicht akkumuliert bzw. detektierbar ist (nicht gezeigte Daten). Nicht auszuschließen ist auch, dass diese putative sRNA nicht an Hfq bindet und daher in der Pyrosequenzierungsanalyse nicht detektierbar war.

5.2.3 Die Stimulierung der *rpoS* Translation unter hyperosmotischem Stress und Säurestress ist von der direkten Regulation durch die sRNA DsrA abhängig

Um den Beitrag von OmrA und OmrB, sowie den bekannten *rpoS* Translations-stimulierenden sRNAs RprA, DsrA und ArcZ auf die RpoS-Regulation unter physiologischen Stressbedingungen zu untersuchen, wurden in diesen fünf sRNA-Genen knock-out Mutanten generiert. Die Akkumulation und Induktion von σ^S und *rpoS* mRNA unter hyperosmotischem Stress und Säurestress wurden dann in den verschiedenen sRNA-defizienten Hintergründen studiert (Abb. 4.19 und 4.20).

5.2.3.1 Die hyperosmotische DsrA-abhängige RpoS-Induktion

Wie aus Abbildung 4.19 hervorgeht, hat vor allem die Deletion von DsrA einen stark negativen Effekt auf die hyperosmotische Akkumulation und Induktion von σ^S-Protein und

rpoS mRNA. Während die Deletion der anderen sRNAs (RprA, OmrA, OmrB, ArcZ) immer noch zu einer deutlichen hyperosmotischen σ^S-Induktion führen, die mit jener des Wildtyp-Hintergrunds vergleichbar ist (3.5-5-fache Induktion), ist die hyperosmotische σ^S-Induktion vor allem in der *dsrA* Mutante reduziert (1.6-fache Induktion). Dies zeigt, dass die hyperosmotische σ^S-Induktion von DsrA abhängig ist. Dieses Ergebnis unterscheidet sich von zuvor publizierten Daten, die zeigen, dass das Ausmaß der hyperosmotischen Induktion einer translationalen *rpoS*::*lacZ*-Fusion von der An-oder Abwesenheit von DsrA unbeeinflusst bleibt und in einer *dsrA* Mutante von der sRNA RprA abhängig ist (Majdalani *et al*., 2001). Anders als in dieser Arbeit, in der die Osmo-Induktion von endogenem RpoS untersucht wurde, haben Majdalani *et al*. (2001) die Osmo-Induktion einer translationalen *rpoS*::*lacZ*-Fusion studiert (*rpoS*750::*lacZ*), die zwar sowohl die transkriptionale als auch die posttranskriptionale RpoS-Regulation (*rpoS* Translation und σ^S-Proteolyse) reflektiert, nicht aber die Regulation der RpoS-Aktivität, d.h. die Assoziation von σ^S mit dem RNAP-Kernenzym zur $E\sigma^S$-Holoenzymbildung. Es ist bekannt, dass K^+-Ionen, die unter hyperosmotischen Stress in einer primären Antwort verstärkt akkumulieren, die Sigmafaktorkompetition zugunsten von σ^S beeinflussen können (Lee *et al*., 2010) (siehe 2.3.1.2). Im RNAP-Holoenzym ist σ^S vor dem Abbau geschützt. Somit trägt jeder Faktor, die die σ^S-Aktivität positiv beeinflusst (wie K^+-Ionen unter hyperosmotischen Stress) zu dessen Stabilisierung bei (Hengge, 2011) (siehe 2.3.2.4). Damit DsrA sein volles regulatorisches Potenzial bei der hyperosmotischen σ^S-Induktion entfalten kann, bedarf es möglicherweise also auch der positiven Regulation von der *rpoS* Translations-Induktion nachgeschalteten Ebenen. Das heißt der Inhibierung der σ^S-Proteolyse durch Stimulation der RpoS-Aktivität unter den hyperosmotischen Stressbedingungen, die von der translationalen *rpoS*::*lacZ*-Fusion nicht reflektiert wird. Dies könnte eine Erklärung für die Diskrepanz zwischen den Beobachtungen dieser Arbeit und denen von Majdalani *et al*. (2001) sein. Auch sind die Wachstumsbedingungen in den beiden Arbeiten verschieden. Majdalani *et al*. (2001) haben die hyperosmotische *rpoS*::*lacZ*-Induktion in Minimalmedium durch Zugabe von Sucrose statt NaCl untersucht und eine Wachstumstemperatur von 32°C statt 37°C gewählt. Auch dies könnte zu den unterschiedlichen Beobachtungen bezüglich der DsrA-Anhängigkeit der hyperosmotischen RpoS-Induktion führen.

DsrA scheint unter den gegeben Wachstumsbedingungen (M9 Minimalmedium mit 0.4 % Glyzerin) einen weiteren positiven Effekt auf die *rpoS* Translation *per se*, unabhängig vom hyperosmotischen Stress, zu haben. So sind die akkumulierten σ^S-Mengen in der *dsrA* Mutante generell erniedrigt, sowohl die basalen σ^S-Mengen in ungestressten Zellen, als auch die akkumulierten σ^S-Mengen unter den induzierenden Stressbedingungen (Abb. 4.19). Ähnliches gilt auch für die anderen untersuchten sRNAs RprA, OmrA, OmrB und ArcZ, wenn auch in geringerem Ausmaß (Abb. 4.19). Dieser Befund ist konsistent mit den Beobachtungen vorangegangener Arbeiten, die gezeigt haben, dass vor allem die Deletion von *dsrA* mit einer erniedrigten Aktivität einer translationalen *rpoS*::*lacZ*-Fusion in ungestressten

Zellen bei Kultivierung in Minimalmedium verbunden ist (Majdalani *et al*., 2001; Mandin und Gottesman, 2010). Dennoch hat DsrA offenbar eine spezifische Funktion bei der hyperosmotischen σ^S-Induktion, die unabhängig von der DsrA-vermittelten Translation von *rpoS* in Minimalmedium zu sein scheint. So ist die Stärke der hyperosmotische σ^S-Induktion in einer *dsrA* Mutante signifikant negativ beeinträchtigt ist (Abb. 4.19; siehe oben im Text). In Übereinstimmung damit kommt es unter hyperosmotischem Stress zu einer verstärkten Akkumulation von DsrA selbst (2-4 fache Induktion, Abb. 4.23), wahrscheinlich bedingt durch eine Stabilisierung von DsrA (siehe 5.2.1).

Die *rpoS* Transkriptmengen folgen im Osmostressexperiment weitgehend den σ^S-Proteinmengen (Abb. 4.19). Auch hier ist vor allem die hyperosmotische Induktion der *rpoS* mRNA im DsrA-defizienten Hintergrund stark reduziert (2.7 fache Induktion in der *dsrA* Mutante versus 9-20 fache Induktion im Wildtyp und den übrigen sRNA Mutanten). Der hyperosmotische Stress führt im Wildtyp-Hintergrund zu einer etwa 2-fachen Stabilisierung der *rpoS* mRNA (Abb. 4.24), wahrscheinlich sekundär durch die unter diesen Bedingungen verstärkte Translation des *rpoS* Transkripts. Aktive Translation wird als ein für eine mRNA stabilisierender Faktor gesehen (Deana und Belasco, 2005; Dreyfus, 2009). Translationale Effekte scheinen einen offenbar nur moderaten Einfluss auf die Stabilität der *rpoS* mRNA auszuüben. So demonstrieren auch die Untersuchungen zum Einfluss der Codon-Usage (d.h. Translation) auf die Stabilität der *rpoS* mRNA in dieser Arbeit einen etwa 2-fachen Effekt auf dessen Stabilität (Siehe Abb. 4.3-4.5 und Diskussion 5.1.1). Die verminderte hyperosmotische *rpoS* mRNA-Induktion in der *dsrA* Mutante (Abb. 4.19) kann zumindest teilweise auf die unter diesen Bedingungen ausbleibende etwa 2-fache Stabilisierung der *rpoS* mRNA zurückgeführt werden (Abb. 4.24). Sehr wahrscheinlich ist dies eine Folge der im DsrA-defizienten Hintergrund verminderten *rpoS* Translation. Eine positive Rolle von DsrA bei der Stabilisierung der *rpoS* mRNA zeigen auch andere Arbeiten (Lease und Belfort, 2000; McCullen *et al*., 2010). Lease und Belfort (2000) haben demonstriert, dass die Überexpression von DsrA zu einer etwa 3-fachen Stabilisierung des *rpoS* Transkripts führt. Ebenso geht die Aufhebung der Basenpaarung zwischen DsrA und der *rpoS* mRNA durch Einführung von Punktmutationen mit einer Destabilisierung des *rpoS* Transkripts einher. Dabei scheint DsrA die *rpoS* mRNA vor dem RNase E-abhängigen Abbau zu schützen (McCullen *et al*., 2010).

Folgende Beobachtungen dieser Arbeit sind Indizien dafür, dass die DsrA-vermittelte hyperosmotische Induktion von σ^S auf direkter Regulation beruht. Zum einen fungiert DsrA offenbar selbst als Osmoregulator, da es unter den hyperosmotischen Stressbedingungen verstärkt akkumuliert (Abb. 4.23). Zum anderen ist DsrA unter hyperosmotischem Stress möglicherweise aktiv an der Stimulation der *rpoS* mRNA Translation beteiligt. Dementsprechend bleibt die Steigerung der σ^S-Syntheserate als Antwort auf den Osmostress-Stimulus in einer *dsrA* Mutante aus (Abb. 4.21). Offenbar kommt es im DsrA-defizienten

Hintergrund sogar zu einem 2-fachen Rückgang in der σ^S-Syntheserate in Antwort auf den osmotischen Stress (Abb. 4.21). Die ausbleibende DsrA-vermittelte translationale Aktivierung der *rpoS* mRNA geht erwartungsgemäß mit einen Verlust der DsrA-abhängigen Stabilisierung des *rpoS* Transkripts einher (Abb. 4.24).

Desweiteren scheinen die positiven Effekte von DsrA auf die hyperosmotische σ^S-Induktion unabhängig von anderen σ^S-Regulatoren wie H-NS und RprA zu sein (Abb. 4.22 C und 4.23 C). Die sRNA DsrA reguliert zwei globale Regulatoren auf unterschiedliche Weise. Während die *rpoS* Expression durch DsrA positiv reguliert wird, wird die Translation der *hns* mRNA durch DsrA reprimiert, einhergehend mit einem beschleunigtem Abbau des *hns* Transkripts (Lease *et al*., 1998; Lease und Belfort, 2000). In der *dsrA* Mutante sollte H-NS verstärkt akkumulieren und damit auch die Repression der *rpoS* Translation, sowie eine Destabilisierung des σ^S-Proteins verstärkt auftreten. Daher wäre es möglich, dass die beobachtete reduzierte hyperosmotische Akkumulation und Induktion von σ^S in der *dsrA* Mutante indirekter Natur ist und auf der Derepression von H-NS basiert. In diesem Falle wäre eine *hns* Mutation epistatisch zu einer *dsrA* Mutation. Wie aus Abbildung 4.22 (C und D) hervorgeht ist dies nicht der Fall. Auch in einer *hns* Mutante kommt es zu einer hyperosmotischen Akkumulation und Induktion von RpoS, während die RpoS-Osmoinduktion und Akkumulation in einer *hns*/*dsrA* Doppelmutante stark erniedrigt ist. Würde die hyperosmotische σ^S-Induktion indirekt auf der Repression von H-NS durch DsrA basieren, so wäre die starke σ^S-Osmoinduktion in der *hns*/*dsrA* Doppelmutante wieder hergestellt. In Analogie dazu ist die DsrA-vermittelte σ^S-Induktion unter niedrigen Temperaturen ebenfalls unabhängig von H-NS (Sledjeski *et al*., 1996).

Die in dieser Arbeit beobachtete hyperosmotische σ^S-Induktion in einer *hns* Mutante steht gewissermaßen im Widerspruch zu zuvor publizierten Beobachtungen. Barth *et al*. (1995) haben gezeigt, dass die osmotische Induktion einer translationalen *rpoS*::*lacZ*-Fusion in einer *hns* Mutante vollständig verloren geht. Eine Erklärung hierfür ist, dass die *rpoS*::*lacZ*-Fusion nicht die komplette σ^S-Regulation reflektiert, insbesondere nicht die Regulation der σ^S-Aktivität (das Fusionsprotein bindet nicht an die RNAP). Es ist bekannt, dass σ^S unter hyperosmotischem Stress verstärkt mit dem RNAP-Kernenzym assoziiert ist und dadurch vor dem Abbau geschützt ist (siehe weiter oben im Text in dieser Sektion). Eine andere Erklärung hierfür könnte die in der Arbeit von Barth *et al*. (1995) und dieser Arbeit unterschiedlichen Wachstumsbedingungen sein. In dieser Arbeit wurde die RpoS-Osmoinduktion in einer *hns* Mutante in komplexen LB-Medium statt Minimalmedium studiert. Außerdem wurden in dieser Arbeit Derivate des *E. coli* Stammes W3110 statt des Stammes MC4100 verwendet.

5.2.3.2 Die DsrA-vermittelte RpoS-Induktion unter Säurestress

Wie aus Abbildung 4.20 hervorgeht, ist auch die Säurestressinduktion von σ^S vor allem in einer *dsrA* Mutante stark reduziert. So ist die Akkumulation und Induktion von σ^S und *rpoS*

mRNA in der *dsrA* Mutante negativ beeinträchtigt (1.4-fache Induktion des σ^S-Proteins und 2-fache Induktion der *rpoS* mRNA), während das σ^S-Protein im Wildtyp-Hintergrund und den anderen sRNA-Mutanten deutlich stärker Säure-induziert wird (3-7-fache Induktion). Dies impliziert, dass DsrA auch unter diesen Bedingungen, ähnlich wie unter hyperosmotischem Stress, maßgeblich an der σ^S-Induktion beteiligt ist, auch wenn DsrA unter den Säurestress-Bedingungen, wenn überhaupt, nur sehr moderat verstärkt akkumuliert (Abb. 4.23). Microarray-Studien haben ergeben, dass die Überexpression von DsrA unter anderem eine Induktion der Säurestress-Resistenzgene *gadX*, *gadA*, *gadB*, *hdeA*, *hdeB* und *hdeD* zur Folge hat (Lease *et al*., 2004). Alle diese Gene sind unter direkter oder indirekter Kontrolle von RpoS (siehe 2.3.1.3). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Induktion einiger dieser Säurestressgene bei Überexpression einer DsrA-Variante, die nicht mehr in der Lage ist die *rpoS* mRNA zu regulieren, ausbleibt (Lease *et al*., 2004). Zudem sind die Überlebenschancen von *E. coli* Zellen in einer *dsrA* Mutante unter Säurestress stark vermindert (Lease *et al*., 2004). Diese Beobachtungen zeigen, dass DsrA eine essentielle positive physiologische Funktion bei der Säurestressresistenz hat und offenbar einige DsrA-induzierte Säurestressresistenzgene indirekt über RpoS reguliert werden. Sie fügen sich gut in das Ergebnis dieser Arbeit die zeigt, dass die σ^S-Induktion unter Säurestress von DsrA vermittelt wird.

Interessanterweise und anders als beim Osmostressexperiment beobachtet, sind die Säurestress-akkumulierten und induzierten *rpoS* Transkriptmengen auch in einer *arcZ* Mutante im Vergleich zum Wildtyp deutlich erniedrigt (Abb. 4.20). Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass die *rpoS* mRNA in einer *arcZ* Mutante unter den Säurestressbedingungen destabilisiert wird. Weiterhin übt die sRNA ArcZ einen direkten negativen Einfluss auf die Akkumulation und Stabilität der *arcB* mRNA aus (Mandin und Gottesman, 2010). Daraus lässt sich folgern, dass *arcB* mRNA in einer *arcZ* Mutante dereprimiert wird. Eine dadurch verstärkt exprimierte ArcB-Sensorkinase hätte über die damit einhergehende verstärkte Phosphorylierung des ArcA-Responseregulators eine Repression der *rpoS* Transkription zur Folge (Mika und Hengge, 2005). Dies wäre eine andere mögliche Erklärung für die deutlich erniedrigten *rpoS* Transkriptmengen in einer *arcZ* Mutante unter Säurestress. Warum ist dieser Effekt unter Säurestress, nicht aber unter Osmostressbedingungen (Abb. 4.19) detektierbar? ArcB nimmt offenbar direkt Änderungen in den Redoxbedingungen in der Zelle wahr (Malpica *et al*., 2006). Reduzierte Chinone in der Atmungskette wirken dabei stimulierend auf die (Phosphorylierungs-)Aktivität von ArcB. Nicht auszuschließen ist daher, dass unter den Säurestressbedingungen (hohe H^+-Ionenkonzentration) die Chinone verstärkt im reduzierten Zustand vorliegen und das Arc-System daher aktiver ist. Dies würde zusammen, mit der in der *arcZ* Mutante ohnehin gesteigerten Aktivität des Arc-Systems, zu einer besonders ausgeprägten Repression der *rpoS* Transkription führen. Ein anderer Erklärungsansatz wäre, dass der Säurestress den Protonengradienten bzw. die protonenmotorische Kraft negativ beeinflusst. Eine Studie hat gezeigt, dass eine Abnahme der

protonenmotorischen Kraft über der Zytoplasmamembran zur einer Aktivierung von ArcB führen kann (Malpica *et al*., 2006). Weiterhin wird ArcZ selbst unter hyperosmotischem Stress herunterreguliert (Tab. 4.7 und Abb. 4.15). Somit könnte man auch erwarten, dass sich eine *arcZ* Mutation unter hyperosmotischem Stress weniger stark auf die Transkription der *rpoS* mRNA auswirkt.

Auf Proteinebene ist der Effekt der *arcZ* Mutation auf die Säurestress-Induktion von σ^S weniger stark ausgeprägt. Hier kommt es nur zu einer leichten Reduktion in den σ^S-Mengen. ArcA konkurriert mit RssB um die Phosphorylierung durch ArcB (Mika und Hengge, 2005). Höhere ArcA-Mengen in einer *arcZ* Mutante könnten daher dazu führen, dass RssB weniger phosphoryliert und σ^S dadurch stabilisiert wird. Dies wäre eine Erklärung dafür, warum die *arcZ* Mutation kaum einen Einfluss auf die Säurestress-Induktion von σ^S-Protein hat.

5.2.4 Die hyperosmotische Induktion der *rpoS* mRNA könnte auf Ebene der Transkriptionselongation und/oder durch eine Modulation des DsrA-unabhängigen Abbaus positiv reguliert werden

Die Ergebnisse dieser Arbeit demonstrieren, dass sowohl in einer *dsrA* Mutante, als auch in einer *rprA dsrA arcZ* Tripelmutante die *rpoS* mRNA etwa 3-fach hyperosmotisch induziert wird (Abb. 4.19 und 4.25). Auch in Hfq-defizienten *E. coli* Zellen kommt es immer noch zu einer Induktion des *rpoS* Transkripts in Antwort auf den osmotischen Stress, auch wenn die Akkumulation der *rpoS* mRNA insgesamt im Vergleich zum Wildtyp erwartungsgemäß stark reduziert ist (Abb. 4.26). In der Tripelmutante ist die *rpoS* Translation stark reduziert, da alle bekannten *rpoS* Translations-stimulierenden sRNAs deletiert sind. In einer *hfq* Mutante ist die *rpoS* Translation stark reduziert (Muffler *et al*., 1996a). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass eine Stabilisierung der *rpoS* mRNA als sekundäre Folge der verstärkten Stress-induzierten Translation als Ursache der noch beobachteten restlichen *rpoS* mRNA Osmoinduktion ausgeschlossen werden kann. In Übereinstimmung damit bleibt die moderate 2-fache *rpoS* mRNA Stabilisierung in Antwort auf den hyperosmotischen Stress in einer *dsrA* Mutante aus (Abb. 4.24).

Weiterhin ist hinreichend bekannt, dass die *rpoS* Transkriptionsinitiation von hyperosmotischem Stress unbeeinflusst bleibt (Lange und Hengge-Aronis, 1994a; Muffler *et al*., 1996b) und auch Hfq keinen Einfluss auf die *rpoS* Promotoraktivität ausübt (Muffler *et al*., 1996a). Es könnten also Mechanismen existieren, die die *rpoS* Transkription unter hyperosmotischen Stress positiv beeinflussen und auf Ebene der Transkriptionselongation operieren. In guter Übereinstimmung mit dieser Hypothese zeigen die *rpoS*120::*gfp*- und *rpoS*378::*gfp*-Fusionen unter der Kontrolle eines konstitutiven nahezu nicht Osmostress-

sensitiven Promotors eine hyperosmotische Akkumulation und Induktion der *rpoS*::*gfp* Transkripte (Abb. 4.28 und 4.29), die unabhängig von der chromosomal kodierten *rpoS* mRNA stabilisierenden sRNA DsrA ist (Abb. 4.29). Allerdings könnte hier auch ein reduzierter DsrA-unabhängiger Abbau von in Transkription befindlicher (nascenter) *rpoS* mRNA in Betracht gezogen werden. Wie aus Abbildung 4.29 ersichtlich ist, nimmt der Anteil der trunkierten *rpoS* mRNA Fragmenten in Antwort auf den hyperosmotischen Stress ab. Eine mögliche reduzierte vorzeigte Termination der Transkription, oder reduzierter Abbau von nascenter *rpoS* mRNA könnte hier zur hyperosmotischen Induktion der *rpoS* mRNA beitragen.

Die Elongation der Transkription bietet neben ihrer Initiation eine weitere Ebene, auf der die Genexpression in Antwort auf sich ändernde Umweltbedingungen kontrolliert werden kann. Solche Regulationsmechanismen sind weithin als Attenuation und Antitermination bekannt. Attenuation basiert auf der co-transkriptionalen Translation von Leader-Peptiden und spielt unter anderem eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Transkription von Aminosäure-Biosyntheseoperons (Gollnick und Babitzke, 2002). Antiterminationsmechanismen sind grundsätzlich darauf ausgerichtet, die Wirkung von Terminatoren zu unterbinden, um die Expression von stromabwärts lokalisierten Genen zu stimulieren (Review: Santangelo und Artsimovitch, 2011). Terminatoren am 3´-Ende eines Gens verhindern eine ungewünschte Transkription in die weiter stromabwärts lokalisierten Gene, während Terminatoren in den von Genen stromaufwärts lokalisierten Leader-Regionen oder kodierenden Regionen die kontrollierte Expression von Strukturgenen durch Integration von z.B. Stresssignalen erlauben. Es existieren zwei verschiedenene Arten der Transkriptionstermination: die intrinsische (faktorunabhängige) Termination, bestehend aus einer RNA-Sekundärstruktur (GC-reiche palindromische Haarnadelschleife, der ein Cluster von U-Resten folgt) und die faktorabhängige Termination durch das RNA-Bindeprotein Rho (siehe 2.1.2). Intrinsische Terminatoren erzeugen die 3´-Enden von etwa 80% aller RNAs, während die Rho-vermittelte Termination etwa 20% aller RNA 3´-Enden erzeugt, einschließlich derer von mRNAs und stabiler kleiner RNAs (Peters *et al*., 2009). Rho-abhängige Terminatoren, bestehend aus Cytosin-reichen RNA-Elementen („*rut*-sites“) sind äußerst komplex können demnach nicht einfach durch Sequenzanalyse vorhergesagt werden (siehe 2.1.2). In allen Fällen aber interagiert Rho mit „nackten“ Bereichen von naszierenden Transkripten, die nicht translatiert oder von RNA-Bindeproteinen gebunden werden (Ciampi, 2006; Santangelo und Artsimovitch, 2011). Grundsätzlich sind zwei verschiedene Antiterminationsmechanismen zu unterscheiden: Mechanismen, die die RNAP passiv oder aktiv beeinflussen. Passive Regulationsmechanismen dominieren und inhibieren beispielsweise die Bildung einer RNA-Terminations-Haarnadelschleife oder unterbinden die Wirkung von Rho (Santangelo und Artsimovitch, 2011). Aktive Regulationsmechanismen hingegen basieren auf einer direkten Interaktion von RNA-Elementen oder regulatorischen Proteinen mit der RNAP, die dadurch über Terminationssignale hinweg transkribieren kann

(prozessive Antitermination). Prozessive Antiterminationsmechanismen spielen eine wichtige Rolle bei der positiven Regulation der Elongation der Transkription von Phagen-Genen und ribosomalen RNA-Operons (Santangelo und Artsimovitch, 2011).

Ein weiterer Mechanismus zur positiven Regulation der Transkriptionselongation ist die Antitermination durch Translation. Transkription und Translation sind in Archaeen und Bakterien miteinander gekoppelt. Die simultane fortlaufende Translation ist für eine ununterbrochene RNA-Synthese unerlässlich (Ciampi, 2006). So wird die Transkription einer untranslatierten RNA durch Rho terminiert, wenn die RNAP durch einen Antiterminator nicht modifiziert wird. Ein Modell postuliert, dass (i) die translatierenden Ribosomen die Rho-RNA-Interaktion unterbinden, indem sie „*rut*-sites“ verdecken. Für eine effiziente Rho-vermittelte Transkriptionstermination *in vivo* ist die Anwesenheit des Transkriptionsfaktors NusG erforderlich (Ciampi, 2006) (siehe 2.1.2). So schlägt ein anderes Modell vor, dass (ii) die Ribosomen mit Rho um die Bindung an NusG konkurrieren. NMR-Studien haben ergeben, dass NusG mit dem ribosomalen Protein NusE (S10) einen Komplex bildet, der Transkription und Translation möglicherweise eng miteinander koppelt (Burmann *et al*., 2010) (siehe 2.1.2). In Übereinstimmung damit wird die Rate der Transkriptionselongation *in vivo* unmittelbar von der Rate der Translation kontrolliert (Proshkin *et al*., 2010). Es wurde modelliert, dass NusG, welches mit seiner NTD die RNAP kontaktiert, mit seiner CTD mit NusE im aktiv translatierenden Ribosom interagiert, oder aber alternativ mit Rho (Burmann *et al*., 2010). Dies impliziert, dass Transkripte wie die *rpoS* mRNA, deren Translation in schnell wachsenden ungestressten Zellen ineffizient initiiert wird, unter solchen Bedingungen durch Rho vorzeitig terminiert werden. Umgekehrt würde eine verstärkte effizientere Translationsinitiation in Antwort auf diverse Stresse dazu führen, dass NusG anstelle von Rho das Ribosom kontaktiert, einhergehend mit einer Antitermination der Transkription. Es ist bekannt, dass eine ineffiziente Translationsinitiation zu einer vorzeitigen Termination der Transkription der *lacZ* mRNA führen kann (Ciampi, 2006). So haben *in vitro* und *in vivo* Studien demonstriert, dass eine ineffiziente Translationsinitiation zur Aktivierung von vier kryptischen Rho-abhängigen Terminatoren in der *lacZ* mRNA führt, die RNAP Pausierungsstellen entsprechen (Ciampi, 2006).

In Abbildung 4.24 A (0 Minuten-Wert vor Rifampicin-Behandlung) sieht man, dass im W3110 Wildtypstamm vor dem hyperosmotischen Stress im *rpoS* Transkriptmuster verstärkt trunkierte *rpoS* mRNA-Varianten auftreten, die in der entsprechenden hyperosmotisch gestressten Probe (0 Minuten-Wert vor Rifampicin-Behandlung) weniger präsent sind. Dies könnte theoretisch auf eine vorzeitige Termination der Transkription bei ausbleibender oder ineffizienterer Translation in Abwesenheit des Stresses hindeuten. Allerdings sind solche Effekte kaum von Abbaueffekten zu unterscheiden, da eine geringere Translation in Abwesenheit des Stresses auch mit einem verstärkten Abbau der *rpoS* mRNA

einhergeht, was sicherlich auch zum verstärkten Auftreten der trunkierten *rpoS* Transkripte beiträgt. Ein ähnliches Bild ergibt sich aus Abbildung 4.29 (siehe auch weiter oben im Text).

Aus Abbildung 4.30 geht hervor, dass die Verdrängung des essentiellen NusG-Faktors durch Überexpression der NusG-NTD (Mooney *et al*., 2010) offenbar nicht ausreichend ist bzw. in dem hier getesteten System zu ineffizient ist, um eine potenzielle Antitermination der *rpoS* Transkription in ungestressten Zellen zu erzielen. Wäre NusG an einer vorzeitigen Transkriptionstermination beteiligt, so wäre zu erwarten, dass die basalen *rpoS* mRNA-Mengen in ungestressten Zellen höher sind und sich an jene der hyperosmotisch gestressten Zellen angleichen. Das heißt also, dass NusG möglicherweise im Falle von *rpoS* nicht an einem Antiterminationsmechanismen beteiligt ist, oder die NusG-Verdrängung ineffizient ist und endogenes Vollängen-NusG immer noch Rho kontaktiert und die *rpoS* Transkription vorzeitig terminiert. Ein anderer Erklärungsansatz wäre, dass im Falle von *rpoS* Modell (i) zur Antitermination durch Translation zutreffend ist (siehe weiter im Text oben). Die höheren hyperosmotisch induzierten *rpoS* Transkriptmengen in Zellen, welche die NusG-NTD überexprimieren (Abb. 4.30) resultieren wahrscheinlich daraus, dass die RNAP-kontaktierende NusG-NTD die Transkriptionselongation verstärkt stimuliert (Mooney *et al*., 2010).

Jedenfalls sollte eine mögliche Antitermination durch Translation über Rho vermittelt werden. Deshalb wäre es für weiterführende Untersuchungen notwendig, Rho zu inaktivieren. Sowohl *rho* als auch *nusG* sind essentielle Gene, da sie die NusG-abhängige Rho-vermittelte Termination der Transkription des *rac* Prophagen herbeiführen (Cardinale *et al*., 2008). Dessen *kil* Gen kodiert für KilR, einen Inhibitor der Zellteilung. Interessanterweise kann *nusG* in *rac* Prophagen-defizienten Zellen deletiert werden, während *rho* essentiell bleibt (Cardinale *et al*., 2008). Daher müsste Rho durch Zugabe des Rho-spezifischen Antibiotikums Bicyclomycin inaktiviert werden (Peters *et al*., 2009) und die hyperosmotische Regulation der *rpoS* mRNA dann in Anwesenheit von Bicyclomycin studiert werden. Hinweise auf eine mögliche Beteiligung von Rho an einem putativen *rpoS* Transkriptions-Antiterminationsmechanismus liefert eine neuere Arbeit von Tran *et al*. (2011). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass eine *hns* Mutante besonders sensitiv gegenüber Bicyclomycin ist, während eine *hfq* Mutante gegenüber Bicyclomycin besonders resistent ist. H-NS und Hfq sind Faktoren, welche die *rpoS* Translation negativ bzw. positiv regulieren (siehe 2.3.2.3). Dementsprechend ist zu erwarten, dass höhere σ^S-Mengen in der *hns* Mutante, bzw. niedrigere in der *hfq* Mutante zu einer höheren Sensitivität bzw. Resistenz gegenüber Bicyclomycin führen, falls Rho einen negativen Regulator von *rpoS* darstellen sollte. In diesen Mutanten wäre zu erwarten, dass die σ^S-Mengen bei gleichzeitiger Rho-Inaktivierung besonders hoch wären, was negative Effekte auf das zelluläre Wachstum mit sich bringen könnte (Sigmafaktorkompetition).

Die Kälteschockproteine und RNA-Chaperone der CspA-Familie (CspA-CspI) sind als Mediatoren der Transkriptions-Antitermination bei niedrigen Temperaturen weithin bekannt (Phadtare und Severinov, 2010). Microarray-Studien mit *csp* Deletionsmutanten und Transkriptions-Antiterminations-inkompetenten *csp* Varianten haben ergeben, dass die Transkription einiger Gene bei einem Kälteschock von der Antiterminationsaktivität dieser Kälteschockproteine abhängig ist. Zudem ist auch die Expression von *rpoS* bei 15°C von der Anwesenheit der Csp Kälteschockproteine abhängig. Für CspE konnte demonstriert werden, dass dieses Kälteschockprotein in der Lage ist, die transkriptionale Antitermination an Rho-unabhängigen Terminatoren herbeizuführen (Phadtare und Severinov, 2010). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von CspC und CspE die *rpoS* mRNA und σ^S-Protein positiv regulieren (Phadtare und Inouye, 2001), aber die CspE-vermittelte positive *rpoS* Regulation offenbar posttranskriptional und unabhängig von seiner Antiterminationsaktivität vermittelt wird (Phadtare *et al*., 2002). In Übereinstimmung damit haben Untersuchungen ergeben, dass CspE weder einen Einfluss auf die Menge der *rpoS* mRNA, noch auf die hyperosmotische Regulation der *rpoS* Transkription hat (A. Possling und R. Hengge unveröffentlichte Daten). Zukünftige Experimente müssen aber klären, ob möglicherweise andere Csp Proteine an einem mutmaßlichen Antiterminationsmechanismus bei der Regulation der *rpoS* Transkription unter Stress beteiligt sind.

Kürzlich wurde publiziert, dass auch das RNA-Chaperon Hfq die Antitermination an Rho-abhängigen Terminatoren vermitteln kann (Rabhi *et al*., 2011). Offenbar bildet Hfq mit Rho einen Komplex aus und inhibiert dadurch die ATPase- und Helikase-Aktivität von Rho *in vitro* und *in vivo*. NusG scheint hierbei die Hfq-vermittelte Antitermination zu inhibieren. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass eine Beteiligung von Hfq an einem *rpoS* Transkriptions-Antiterminationsmechanismus eher unwahrscheinlich ist. Wäre dies der Fall, wäre zu erwarten, dass die ohnehin sehr niedrigen *rpoS* Transkriptmengen in einer *hfq* Mutante vor und nach dem hyperosmotischen Shift sehr ähnlich sein sollten. Abbildung 4.26 demonstriert, dass dies nicht der Fall ist und die *rpoS* mRNA auch in Hfq-defizienten Zellen immer noch hyperosmotisch induziert wird.

Äußerst interessante Schlussfolgerungen lässt eine Betrachtung der physiologischen Regulation der RNase E-Aktivität selbst zu. Die zelluläre Menge und die Aktivität von RNase E unterliegen einer komplexen Regulation (Arraiano *et al*., 2010; Gottesman, 2011). Wie auch bei anderen Ribonukleasen wird die zelluläre RNase E-Konzentration über einen Feedback-Loop autoreguliert, indem RNase E den Abbau seiner eigenen mRNA moduliert und so die zellulären Mengen des Enzyms in einem begrenzten Rahmen hält (Arraiano *et al*., 2010). Desweiteren wird die Aktivität von RNase E von verschiedenen Protein-Inhibitoren reguliert, nämlich RraA und RraB („regulator of ribocuclease activity A and B“), sowie dem ribosomalen Protein L4 (Arraiano *et al*. 2010; Gottesman, 2011). Diese Regulatorproteine interagieren mit der C-terminalen Domäne von RNase E und inhibieren so den

endonukleolytischen Abbau einer selektiven Gruppe von Transkripten (Lee *et al*., 2003; Gao *et al*., 2006; Singh *et al*., 2009). Interessant ist dabei, dass die Transkription des *rraA* Gens selbst unter der Kontrolle von $E\sigma^S$ steht und beim Eintritt in die stationäre Phase aktiviert wird, einhergehend mit einer verstärkten Akkumulation von RraA Protein (Zhao *et al*., 2006). Zudem zeigen Microarray-Daten, dass die Überexpression bzw. Deletion von *rraA* die Akkumulation einer Reihe von $E\sigma^S$-anhängigen Transkripten positiv bzw. negativ beeinflusst (Lee *et al*., 2003) und auch die Stabilität des *rpoS* Transkripts selbst durch die Überexpression von RraA oder die Depletion von RNase E positiv reguliert wird (Zhao *et al*., 2006). Das Protein L4 der ribosomalen 50S-Untereinheit ist eines von mehreren ribosomalen Proteinen, die als Komponenten der Translationsmaschinerie auch extraribosomale Funktionen aufweisen (Wool, 1996). Es ist bekannt, dass einige Stress-responsive Proteine zusammen mit einigen freien ribosomalen Proteinen unter induzierenden Stressbedingungen co-akkumulieren (Singh *et al*., 2009). Die Arbeiten von Singh *et al*., (2009) haben gezeigt, dass auch L4 ein Proteininhibitor der RNase E-Aktivität darstellt und die Überexpression von L4 zu einer verstärkten RNase E-abhängigen Akkumulation von mRNAs führt, deren Aktivitäten in bakteriellen Stressantworten involviert sind, darunter auch die *lon* mRNA, sowie die *rpoS* mRNA. Diese Befunde implizieren also, dass die RNase E-abhängige Degradation von mRNAs besonders in der stationären Wachstumsphase, sowie unter Stressbedingungen kritisch zu sein scheint. Von daher wäre es denkbar, unter hyperosmotischen Stress die Aktivität von RNase E (und dem Degradosom) in einem positiven Feedback-Loop in einer RraA-abhängigen Weise positiv zugunsten der Stabilität der *rpoS* mRNA (Vollängen-Transkript und trunkierte *rpoS* Fragmente) moduliert wird. Dies würde die DsrA-unabhängige hyperosmotische Induktion der *rpoS* Vollängen-mRNA, sowie die Reduktion der trunkierten *rpoS* Fragmente unter Osmostress erklären (Abb. 4.24 und 4.29).

Grundsätzlich wären bei der positiven Regulation der *rpoS* Transkriptionselongation unter Stress auch Rho-unabhängige Antiterminationsmechanismen nicht auszuschließen. So ist durchaus vorstellbar, dass hyperosmotischer oder Säurestress und die damit verbundenen hohen Konzentrationen an Ionen oder kompatiblen Soluten (z.B. K^+, H^+ oder Trehalose) zu alternativen Sekundärstrukturen im *rpoS* Transkript führen, die Antitermination herbeiführen könnten.

5.3 Ausblick

Diese Arbeit hat neue interessante Zusammenhänge zwischen der Codon-Usage und der Physiologie der bakteriellen Genexpression aufgezeigt. So könnten Stationärphasen-assoziierte Gene wie *rpoS* unter den limitierenden Bedingungen einen unökonomischen Abbau ihrer Transkripte umgehen, indem sie ihre mRNA, zur verstärkten Beladung mit Ribosomen, vermehrt mit raren Codons ausstatten.

In zukünftigen Experimenten sollte das oben dargestellte Modell näher untersucht und gegebenenfalls verifiziert werden. Mittels „Ribosome-Footprinting“, basierend auf der Deep-Sequenzierungsanalyse von Ribosomen-protektierten mRNA-Fragmenten (Ingolia *et al.*, 2009), sollten die Ribosomenprofile entlang der *rpoS* mRNA (Wildtyp versus Codonmutante) ermittelt werden. Hierbei würde sich zeigen, ob die *rpoS* mRNA des Wildtyps tatsächlich eine höhere Ribosomendichte aufweist als jene der Codonmutante. Zudem könnte man die Positionen der pausierenden Ribosomen genau bestimmen. Einfache Experimente hierzu wären auch RNA-Stabilitätsexperimente in Anwesenheit des Antibiotikums Kasugamycin. Dieses Antibiotikum inhibiert die Translationsinitiation und erzeugt „nackte“ Transkripte. Basieren die *rpoS* mRNA Stabilitätsunterschiede (Wildtyp versus Codonmutante) auf einem differentiellen Ribosomenverkehr, so wäre zu erwarten, dass sich die Halbwertszeiten von *rpoS* Wildtyp mRNA und jener der Codonmutante einander angleichen. Sind die natürlich auftretenden raren Codons in *rpoS* ein evolutionärer Selektionsvorteil (höhere mRNA Stabilität), so wäre es interessant, mehr über die langfristigen Folgen der Substitution dieser Codons durch die häufigeren zu erfahren. Hierzu könnten in Langzeitstudien mit stationäre Phase Kulturen mit Stämmen, welche die chromosomale *rpoS* Codonmutante und den isogenen *rpoS* Wildtyp exprimieren, die Auswirkungen der häufigen Codons in der Mutante studiert werden. Wie wirken sich die Unterschiede in der Codon-Usage (Wildtyp versus Codonmutante) auf das langfristige Überleben aus? Gibt es langfristige Unterschiede in den globalen Genexpressionsprofilen zwischen *rpoS* Wildtyp und Codonmutante? Zur Beantwortung der letzten Frage könnten entsprechende Microarray-Analysen beitragen. Weiterhin sollten auch rare Codons in anderen stationäre Phasen exprimierten Enzymen eines co-evolvierten Isoenzympaares (TalA/TalB; TktB/TktA) durch die häufigeren homologen synonymen Codons des exponentielle Phasen Pendants substituiert werden. In sich anschließenden RNA-Stabilitätsexperimenten mit dem Wildtyp und der häufigen Codon-Variante könnte geklärt werden, ob der positive Einfluss von raren Codons in Stationärphasen-Genen auf deren mRNA Stabilität ein generelleres Phänomen ist. Vor allem sollte hier auch geklärt werden, ob das verstärkte Auftreten von raren Codons in allen Stationärphasen-Genen zu beobachten ist.

Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit demonstriert werden, dass die sRNA DsrA die hyperosmotische und Säurestress-Induktion von σ^S vermittelt. In einem RNA-Stabilitätsexperiment sollte geklärt werden, ob die verstärkte Akkumulation von DsrA unter hyperosmotischen Stress auf einer Stabilisierung der sRNA beruht. Die Tatsache, dass die *rpoS* mRNA in einer *dsrA*, sRNA-Tripelmutante (*rprA dsrA arcZ*), sowie in einer *hfq* Mutante immer noch hyperosmotisch induziert wird, impliziert einen Antiterminationsmechanismus, der auf Ebene der Transkriptionselongation operiert. Entsprechend zeigt eine *rpoS*::*gfp*-Fusion unter der Kontrolle eines konstitutiven nicht Osmo-sensitiven Promotors eine hyperosmotische Induktion des *rpoS*::*gfp*-Hybridtranskripts. RNA-Stabilitätsexperimente in zukünftigen Studien müssen klären, ob die beobachtete Osmo-Induktion der *rpoS* Transkripte

auf einer Stabilisierung beruht. Um zu analysieren, ob Rho in einem mutmaßlichen *rpoS* Transkriptions-Antiterminationsmechanismus involviert ist, muss die hyperosmotische Regulation der *rpoS* mRNA in Anwesenheit des Rho-inhibierenden Antibiotikums Bicyclomycin studiert werden. Um den Einfluss von NusG an einem putativen Antiterminationsmechanismus bei der transkriptionalen *rpoS* Regulation zu untersuchen, sollte eine echte *nusG* Knockout-Mutante in einem *rac* (*kil*) Prophagen-defizienten Stamm generiert werden und die hyperosmotische *rpoS* Regulation in diesem Stammhintergrund analysiert werden. Auch andere Regulatoren in *E. coli*, wie beispielsweise die Csp Kälteschockproteine sind charakterisierte Regulatoren der Transkriptions-Antitermination. Von daher wäre es auch interessant die transkriptionale *rpoS* Regulation in Hintergründen zu untersuchen, die Deletionen in den Genen für diese Regulatoren tragen.

Zudem sollte in zukünftigen Experimenten untersucht werden, ob eine mögliche Osmoregulation der RNase E (Degradosom-)- Aktivität über RraA an der positiven Regulation der *rpoS* mRNA unter hyperosmotischem Stress beteiligt ist. Hierzu sollte eine *rraA* Mutante generiert und die hyperosmotische *rpoS* Regulation in diesem Hintergrund studiert werden.

6 LITERATURVERZEICHNIS

Afonyushkin T, Vecerek B, Moll I, Bläsi U, Kaberdin VR. (2005). Both RNase E and RNase III control the stability of sodB mRNA upon translational inhibition by the small regulatory RNA RyhB. *Nucleic Acids Res*. **33**: 1678-89.

Aiba H. (2007). Mechanism of RNA silencing by Hfq-binding small RNAs. *Curr Opin Microbiol*. **10**: 134-9.

Alba, B. M. & C. A. Gross, (2004) Regulation of the Escherichia coli sigma-dependent envelope stress response. *Mol Microbiol* **52**: 613-619.

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

Altuvia S, Zhang A, Argaman L, Tiwari A, Storz G. (1998). The Escherichia coli OxyS regulatory RNA represses fhlA translation by blocking ribosome binding. *EMBO J*. **17**: 6069-75.

Andersson SG, Kurland CG. (1990). Codon preferences in free-living microorganisms. *Microbiol Rev*. **54**: 198-210.

Argaman L, Hershberg R, Vogel J, Bejerano G, Wagner EG, Margalit H, Altuvia S. (2001). Novel small RNA-encoding genes in the intergenic regions of Escherichia coli. *Curr Biol*. **11**: 941-50.

Arraiano CM, Andrade JM, Domingues S, Guinote IB, Malecki M, Matos RG, Moreira RN, Pobre V, Reis FP, Saramago M, Silva IJ, Viegas SC. (2010). The critical role of RNA processing and degradation in the control of gene expression. *FEMS Microbiol Rev*. **34**: 883-923.

Artsimovitch, I.; Landick, R. (2000). Pausing by bacterial RNA polymerase is mediated by mechanistically distinct classes of signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 7090-5.

Babitzke P, Granger L, Olszewski J, Kushner SR. (1993). Analysis of mRNA decay and rRNA processing in Escherichia coli multiple mutants carrying a deletion in RNase III. *J Bacteriol*. **175**: 229-39.

Babitzke, P. & Romeo, T. (2007). CsrB sRNA family: sequestration of RNA-binding regulatory proteins. *Curr. Opin. Microbiol.* **10**: 156–163.

Babitzke P, Baker CS, Romeo T. (2009). Regulation of translation initiation by RNA binding proteins. *Annu Rev Microbiol*. **63**: 27-44.

Baker, C. S., I. Morozov, K. Suzuki, T. Romeo, and P. Babitzke. (2002). CsrA regulates glycogen biosynthesis by preventing translation of *glgC* in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. **44**: 1599–1610.

Baker CS, Eöry LA, Yakhnin H, Mercante J, Romeo T, Babitzke P. (2007). CsrA inhibits translation initiation of Escherichia coli hfq by binding to a single site overlapping the Shine-Dalgarno sequence. *J Bacteriol*. **189**: 5472-81.

Balandina A, Claret L, Hengge-Aronis R, Rouviere-Yaniv J. (2001) The Escherichia coli histone-like protein HU regulates rpoS translation. *Mol Microbiol*. **39**: 1069-79.

Barembruch, C. & R. Hengge, (2007) Cellular levels and activity of the flagellar sigma factor FliA of Escherichia coli are controlled by FlgM-modulated proteolysis. *Mol Microbiol* **65**: 76-89.

Barnard, A., A. Wolfe & S. Busby, (2004) Regulation at complex bacterial promoters: how bacteria use different promoter organizations to produce different regulatory outcomes. *Curr Opin Microbiol* **7**: 102-108.

Barrick, J. E., Sudarsan, N., Weinberg, Z., Ruzzo, W. L. & Breaker, R. R. (2005). 6S RNA is a widespread regulator of eubacterial RNA polymerase that resembles an open promoter. *RNA* **11**: 774–784.

Barth M, Marschall C, Muffler A, Fischer D, Hengge-Aronis R. (1995). Role for the histone-like protein H-NS in growth phase-dependent and osmotic regulation of sigma S and many sigma S-dependent genes in Escherichia coli. *J Bacteriol*. **177**: 3455-64.

Basineni SR, Madhugiri R, Kolmsee T, Hengge R, Klug G. (2009). The influence of Hfq and ribonucleases on the stability of the small non-coding RNA OxyS and its target rpoS in E. coli is growth phase dependent. *RNA Biol*. **6**: 584-94

Bearson, S. M. D., W. H. Benjamin Jr., W. E. Swords, and J. W. Foster (1996). Acid shock induction of RpoS is mediated by the mouse virulence gene *mviA* of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol*. **178**: 2572-2579.

Becker G, Klauck E, Hengge-Aronis R. (1999). Regulation of RpoS proteolysis in Escherichia coli: the response regulator RssB is a recognition factor that interacts with the turnover element in RpoS. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **96**: 6439-44.

Becker G, Klauck E, Hengge-Aronis R. (2000). The response regulator RssB, a recognition factor for sigmaS proteolysis in Escherichia coli, can act like an anti-sigmaS factor. *Mol Microbiol*. **35**: 657-66.

Becker, G., and R. Hengge-Aronis (2001). What makes an *Escherichia coli* promoter σS-dependent? Role of the -13/-14 nucleotide promoter positions and region 2.5 of σS. *Mol Microbiol*. **39**: 1153-1165.

Berezikov, E., Thuemmler, F., van Laake, L. W., Kondova, I., Bontrop, R., Cuppen, E. & Plasterk, R. H. A. (2006). Diversity of microRNAs in human and chimpanzee brain. *Nat Genet*. **38**: 1375–1377.

Bernstein JA, Khodursky AB, Lin PH, Lin-Chao S, Cohen SN. (2002). Global analysis of mRNA decay and abundance in Escherichia coli at single-gene resolution using two-color fluorescent DNA microarrays. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **99**: 9697-702.

Blaszczyk J, Tropea JE, Bubunenko M, Routzahn KM, Waugh DS, Court DL, Ji X. (2001). Crystallographic and modeling studies of RNase III suggest a mechanism for double-stranded RNA cleavage. *Structure* **9**: 1225-36.

Blattner FR *et al*., (1997). The complete genome sequence of Escherichia coli K-12. *Science* **277**: 1453-62.

Blot, N., R. Mavathur, M. Geertz, A. Travers, and G. Muskhelisvili (2006). Homeostatic regulation of supercoiling sensitivity coordinates transcription of the bacterial genome. *EMBO Rep*. **7**: 710-715.

Bohannon DE, Connell N, Keener J, Tormo A, Espinosa-Urgel M, Zambrano MM, Kolter R (1991). Stationary-phase-inducible "gearbox" promoters: differential effects of katF mutations and role of sigma 70. *J Bacteriol*. **173**: 4482-92.

Böhringer J, Fischer D, Mosler G, Hengge-Aronis R. (1995). UDP-glucose is a potential intracellular signal molecule in the control of expression of sigma S and sigma S-dependent genes in Escherichia coli. *J Bacteriol.* **177**: 413-22.

Boisset S, Geissmann T, Huntzinger E, Fechter P, Bendridi N, Possedko M, Chevalier C, Helfer AC, Benito Y, Jacquier A, Gaspin C, Vandenesch F, Romby P. (2007). Staphylococcus aureus RNAIII coordinately represses the synthesis of virulence factors and the transcription regulator Rot by an antisense mechanism. *Genes Dev*. **21**: 1353-66.

Boos, W., U. Ehmann, H. Forkl, W. Klein, M. Rimmele, and P. Postma (1990). Trehalose transport and metabolism in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. **172**: 3450-3461.

Bordes, P., R. Repoila, A. Kolb, and C. Gutierrez (2000). Involvement of differential efficiency of transcription by EσS and Eσ70 RNA polymerase holenzymes in growth phase regulation of the *Escherichia coli osmE* promoter. *Mol Microbiol*. **35**: 845-853.

Bordes, P., A. Conter, V. Moales, J. Bouvier, A. Kolb, and C. Gutierrez (2003). DNA supercoiling contributes to disconnect σS accumulation from σS-dependent transcription in *Escherichia coli. Mol Microbiol*. **48**: 561-571.

Bouché S, Klauck E, Fischer D, Lucassen M, Jung K, Hengge-Aronis R. (1998). Regulation of RssB-dependent proteolysis in Escherichia coli: a role for acetyl phosphate in a response regulator-controlled process. *Mol Microbiol*. **27**: 787-95.

Bougdour A, Wickner S, Gottesman S. (2006). Modulating RssB activity: IraP, a novel regulator of sigma(S) stability in Escherichia coli. *Genes Dev*. **20**: 884-97.

Bougdour A, Gottesman S. (2007). ppGpp regulation of RpoS degradation via anti-adaptor protein IraP. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **104**: 12896-901.

Bougdour, A., C. Cunning, P. J. Baptiste, T. Elliott, and S. Gottesman (2008). Multiple pathways for regulation of sigmaS (RpoS) stability in *Escherichia coli* via the action of multiple anti-adaptors. *Mol Microbiol*. **68**:298-313.

Bouvier M, Sharma CM, Mika F, Nierhaus KH, Vogel J. (2008). Small RNA binding to 5' mRNA coding region inhibits translational initiation. *Mol Cell*. **32**: 827-37.

Brantl S. (2007) Regulatory mechanisms employed by cis-encoded antisense RNAs. *Curr Opin Microbiol*. **10**: 102-9.

Brantl S. (2009). Bacterial chromosome-encoded small regulatory RNAs. *Future Microbiol*. **4**: 85-103

Braun, V., S. Mahren & M. Ogierman, (2003) Regulation of the FecI-type ECF sigma factor by transmembrane signalling. *Curr Opin Microbiol* **6**: 173-180.

Braun, V. & S. Mahren, (2005) Transmembrane transcriptional control (surface signalling) of the Escherichia coli Fec type. *FEMS Microbiol Rev* **29**: 673-684.

Brennan RG, Link TM. (2007). Hfq structure, function and ligand binding. *Curr Opin Microbiol*. **10**: 125-33.

Brescia CC, Mikulecky PJ, Feig AL, Sledjeski DD. (2003). Identification of the Hfq-binding site on DsrA RNA: Hfq binds without altering DsrA secondary structure. *RNA* **9**: 33-43.

Brescia CC, Kaw MK, Sledjeski DD. (2004). The DNA binding protein H-NS binds to and alters the stability of RNA in vitro and in vivo. *J Mol Biol*. **339**: 505-14.

Brodolin, K., N. Zenkin, A. Mustaev, D. Mamaeva, and H. Heumann (2004). The σ70 subunit of RNA polymerase induces *lacUV5* promoter-proximal pausing of transcription. *Nat. Struct. Mol. Biol*. **11**: 551-557.

Brooks, B. E. & S. K. Buchanan, (2008) Signaling mechanisms for activation of extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. *Biochim Biophys Acta* **1778**: 1930-1945.

Brown L, Elliott T. (1996). Efficient translation of the RpoS sigma factor in Salmonella typhimurium requires host factor I, an RNA-binding protein encoded by the hfq gene. *J Bacteriol*. **178**: 3763-70.

Brown L, Elliott T. (1997). Mutations that increase expression of the rpoS gene and decrease its dependence on hfq function in Salmonella typhimurium. *J Bacteriol*. **179**: 656-62.

Bulmer M. (1991). The selection-mutation-drift theory of synonymous codon usage. *Genetics* **129**: 897-907.

Burgess RR. (1969). Separation and characterization of the subunits of ribonucleic acid polymerase. *J Biol Chem*. **244**:6168-76.

Burmann BM, Schweimer K, Luo X, Wahl MC, Stitt BL, Gottesman ME, Rösch P. (2010). A NusE:NusG complex links transcription and translation. *Science* **328**: 501-4.

Calin-Jageman I, Nicholson AW. (2003). RNA structure-dependent uncoupling of substrate recognition and cleavage by Escherichia coli ribonuclease III. *Nucleic Acids Res*. **31**: 2381-92.

Calvin, N. M. and Hanawalt, P.C. (1988). High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *J Bacteriol*. **170**: 2796-2801.

Cardinale CJ, Washburn RS, Tadigotla VR, Brown LM, Gottesman ME, Nudler E. (2008). Termination factor Rho and its cofactors NusA and NusG silence foreign DNA in E. coli. *Science* **320**: 935-8.

Carlini DB. (2005). Context-dependent codon bias and mesenger RNA longevity in the yeast transcriptome. *Mol Biol Evol*. **22**: 1403-11.

Carpousis AJ. (2007). The RNA degradosome of Escherichia coli: an mRNA-degrading machine assembled on RNase E. *Annu Rev Microbiol*. **61**: 71-87.

Carrier TA, Keasling JD. (1997). Controlling messenger RNA stability in bacteria: strategies for engineering gene expression. *Biotechnol Prog*. **13**: 699-708.

Cavanagh AT, Klocko AD, Liu X, Wassarman KM. (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**: 1242-56.

Chang YY, Cronan JE Jr. (1999). Membrane cyclopropane fatty acid content is a major factor in acid resistance of Escherichia coli. *Mol Microbiol*. **33**: 249-59.

Checroun, C., Bordes, P., Leroy, O., Kolb, A. & Gutierrez, C. (2004). Interactions between the 2.4 and 4.2 regions of sigmaS, the stress-specific sigma factor of *Escherichia coli*, and the -10 and -35 promoter elements. *Nucleic Acids Res*. **32** (1): 45-53.

Checroun, C., and C. Gutierrez (2004). σS-dependent regulation of *yehZYXW*, which encodes a putative osmoprotectant ABC transporter of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett*. **236**: 221-226.

Chen S, Lesnik EA, Hall TA, Sampath R, Griffey RH, Ecker DJ, Blyn LB. (2002). A bioinformatics based approach to discover small RNA genes in the Escherichia coli genome. *Biosystems*. **65**: 157-77.

Chen SL, Lee W, Hottes AK, Shapiro L, McAdams HH. (2004). Codon usage between genomes is constrained by genome-wide mutational processes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **101**: 3480-5.

Chilcott, G. S. & K. T. Hughes, (2000) Coupling of flagellar gene expression to flagellar assembly in Salmonella enterica serovar typhimurium and Escherichia coli. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**: 694-708.

Choi SH, Baumler DJ, Kaspar CW. (2000). Contribution of dps to acid stress tolerance and oxidative stress tolerance in Escherichia coli O157:H7. *Appl Environ Microbiol*. **66**: 3911-6.

Chow J, Dennis PP. (1994). Coupling between mRNA synthesis and mRNA stability in Escherichia coli. *Mol Microbiol*. **11**: 919-31.

Chung, C. T., Niemala, S. L. and Mitter, R. H. (1989). One-step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci USA*. **86**: 2172-2175.

Ciampi MS. (2006). Rho-dependent terminators and transcription termination. *Microbiology* **152**: 2515-28.

Claret, L., and J. Rouvière-Yaniv (1997). Variation in HU composition during growth of *E. coli*: the heterodimer is required for long term survival. *J Mol Biol*. **273**: 93-104.

Clarke TF 4th, Clark PL. (2008). Rare codons cluster. *PLoS One*. **3**: e3412.

Colland, F., N. Fujita, D. Kotlarz, A. Ishihama, and A. Kolb (1999). Positioning of σS, the stationary phase σ factor, in *Escherichia coli* RNA polymerase-promoter open complexes. *EMBO J*. **18**: 4049-4059.

Colland F, Fujita N, Ishihama A, Kolb A. (2002). The interaction between sigmaS, the stationary phase sigma factor, and the core enzyme of Escherichia coli RNA polymerase. *Genes Cells* **7**: 233-47.

Condon C, Putzer H. (2002). The phylogenetic distribution of bacterial ribonucleases. *Nucleic Acids Res*. **30**: 5339-46.

Cremer K, Silengo L, Schlessinger D. (1974). Polypeptide formation and polyribosomes in Escherichia coli treated with chloramphenicol. *J Bacteriol*. **118**: 582-9.

Datsenko KA, Wanner BL. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **97**: 6640-5.

Deana A, Ehrlich R, Reiss C. (1996). Synonymous codon selection controls in vivo turnover and amount of mRNA in Escherichia coli bla and ompA genes. *J Bacteriol*. **178**: 2718-20.

Deana A, Belasco JG. (2005). Lost in translation: the influence of ribosomes on bacterial mRNA decay. *Genes Dev*. **19**: 2526-33.

deHaseth PL, Helmann JD. (1995). Open complex formation by Escherichia coli RNA polymerase: the mechanism of polymerase-induced strand separation of double helical DNA. *Mol Microbiol*.**16** :817-24.

deHaseth PL, Zupancic ML, Record MT Jr.(1998). RNA polymerase-promoter interactions: the comings and goings of RNA polymerase. *J Bacteriol*. **180**:3019-25.

Dersch P, Schmidt K, Bremer E. (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**: 875-89.

Deutscher MP, Reuven NB. (1991). Enzymatic basis for hydrolytic versus phosphorolytic mRNA degradation in Escherichia coli and Bacillus subtilis. P*roc Natl Acad Sci U S A*. **88**: 3277-80.

Dong H, Nilsson L, Kurland CG. (1996). Co-variation of tRNA abundance and codon usage in Escherichia coli at different growth rates. *J Mol Biol*. **260**: 649-63.

Dong T, Schellhorn HE. (2009). Control of RpoS in global gene expression of Escherichia coli in minimal media. *Mol Genet Genomics*. **281**: 19-33.

Dorman CJ. (2004). H-NS: a universal regulator for a dynamic genome. *Nat Rev Microbiol*. **2**: 391-400.

dos Reis M, Wernisch L, Savva R. (2003). Unexpected correlations between gene expression and codon usage bias from microarray data for the whole Escherichia coli K-12 genome. *Nucleic Acids Res*. **31**: 6976-85.

Downing WL, Sullivan SL, Gottesman ME, Dennis PP. (1990). Sequence and transcriptional pattern of the essential Escherichia coli secE-nusG operon. *J Bacteriol*. **172**: 1621-7.

Dreyfus M. (2009). Killer and protective ribosomes. *Prog Mol Biol Transl Sci*. **85**: 423-66.

DuMont VB, Fay JC, Calabrese PP, Aquadro CF. (2004). DNA variability and divergence at the notch locus in Drosophila melanogaster and D. simulans: a case of accelerated synonymous site divergence. *Genetics* **167**: 171-85.

Ebright RH. (2000). RNA polymerase: structural similarities between bacterial RNA polymerase and eukaryotic RNA polymerase II. ***J** Mol Biol***. 304** :687-98.

Emilsson V, Kurland CG. (1990). Growth rate dependence of transfer RNA abundance in Escherichia coli. *EMBO J*. **9**: 4359-66.

Emilsson V, Näslund AK, Kurland CG. (1993). Growth-rate-dependent accumulation of twelve tRNA species in Escherichia coli. *J Mol Biol*. **230**: 483-91.

Eichel J, Chang YY, Riesenberg D, Cronan JE Jr. (1999). Effect of ppGpp on Escherichia coli cyclopropane fatty acid synthesis is mediated through the RpoS sigma factor (sigmaS). *J Bacteriol*. **181**: 572-6.

Ermolaeva MD. (2001). Synonymous codon usage in bacteria. *Curr Issues Mol Biol*. **3**: 91-7.

Estrem ST, Ross W, Gaal T, Chen ZW, Niu W, Ebright RH, Gourse RL. (1999). Bacterial promoter architecture: subsite structure of UP elements and interactions with the carboxy-terminal domain of the RNA polymerase alpha subunit. *Genes Dev*. **13**: 2134-47.

Fiedler, U. and V. Weiss (1995). A common switch in activation of the response regulators NtrC and PhoB: phosphorylation induces dimerization of the receiver modules. *EMBO J*. **14**: 3696-705.

Fischer D, Teich A, Neubauer P, Hengge-Aronis R. (1998). The general stress sigma factor sigmaS of Escherichia coli is induced during diauxic shift from glucose to lactose. *J Bacteriol*. **180**: 6203-6.

Flache P, Baumeister R, Hillen W. (1992). The Tn10-encoded tetracycline resistance mRNA contains a translational silencer in the 5' nontranslated region. *J Bacteriol*. **174**: 2478-84.

Foster, J. W. (2004). *Escherichia coli* acid resistance: tales of an amateur acidophile. *Nature Rev Microbiol*. **2**: 898-907.

Fozo EM, Hemm MR, Storz G. (2008). Small toxic proteins and the antisense RNAs that repress them. *Microbiol Mol Biol Rev*. **72**: 579-89.

Francez-Charlot A, Castanié-Cornet MP, Gutierrez C, Cam K. (2005). Osmotic regulation of the Escherichia coli bdm (biofilm-dependent modulation) gene by the RcsCDB His-Asp phosphorelay. *J Bacteriol*. **187**: 3873-7.

Franze de Fernandez, M. T., L. Eoyang, and J. T. August. 1968. Factor fraction required for the synthesis of bacteriophage Qb RNA. *Nature* (London) **219**: 588-590.

Fredrick K, Ibba M. (2010). How the sequence of a gene can tune its translation. *Cell* **141**: 227-9.

Fröhlich KS, Vogel J. (2009). Activation of gene expression by small RNA. *Curr Opin Microbiol*. **12**: 674-82.

Fry M, Israeli-Reches M, Artman M. (1972). Stabilization and breakdown of Escherichia coli messenger ribonucleic acid in the presence of chloramphenicol. *Biochemistry* **11**: 3054-9.

Gaal T, Ross W, Blatter EE, Tang H, Jia X, Krishnan VV, Assa-Munt N, Ebright RH, Gourse RL. (1996). DNA-binding determinants of the alpha subunit of RNA polymerase: novel DNA-binding domain architecture. *Genes Dev*. **10**:16-26.

Gaal, T., W. Ross, S. T. Estrem, L. H. Nguyen, R. R. Burgess, and R. L. Gourse (2001). Promoter recognition and discrimination by EσS RNA polymerase. *Mol Microbiol*. **42**: 939-954.

Gao J, Lee K, Zhao M, Qiu J, Zhan X, Saxena A, Moore CJ, Cohen SN, Georgiou G. (2006). Differential modulation of E. coli mRNA abundance by inhibitory proteins that alter the composition of the degradosome. *Mol Microbiol*. **61**: 394-406.

Garza-Sánchez F, Shoji S, Fredrick K, Hayes CS. (2009). RNase II is important for A-site mRNA cleavage during ribosome pausing. *Mol Microbiol*. **73**: 882-97.

Geissmann, T. A. & Touati, D. (2004). Hfq, a new chaperoning role: binding to messenger RNA determines access for small RNA regulator. *EMBO J*. **23**: 396–405.

Gentry, D. R., V. J. Hernandez, L. H. Nguyen, D. B. Jensen, and M. Cashel (1993). Synthesis of the stationary-phase sigma factor σS is positively regulated by ppGpp. *J Bacteriol*. **175**: 7982-7989.

Georgellis D, Kwon O, Lin EC. (2001). Quinones as the redox signal for the arc two-component system of bacteria. *Science* **292**: 2314-6.

Gerdes K, Wagner EG. (2007). RNA antitoxins. *Curr Opin Microbiol*. **10:** 117-24.

Gildehaus N, Neusser T, Wurm R, 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*. **35**: 1885-96.

Goldblum K, Apririon D. (1981). Inactivation of the ribonucleic acid-processing enzyme ribonuclease E blocks cell division. *J Bacteriol*. **146**: 128-32.

Goldenberg D, Azar I, Oppenheim AB. (1996). Differential mRNA stability of the cspA gene in the cold-shock response of Escherichia coli. *Mol Microbiol*. **19**: 241-8.

Görke B, Vogel J. (2008). Noncoding RNA control of the making and breaking of sugars. *Genes Dev*. **22**: 2914-25.

Gottesman, S**.** 2005. Micros for microbes: non-coding regulatory RNAs in bacteria. *TrendsGenet*. **21:**399-404.

Gottesman S, Storz G. 2010 Bacterial Small RNA Regulators: Versatile Roles and Rapidly Evolving Variations. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. Oct 27. [Epub ahead of print] doi: 10.1101/cshperspect.a003798.

Gottesman, S (2011.) Roles of mRNA stability, Translational Regulation, and small RNAs in Stress Response Regulation. In: Bacterial Stress Responses (2nd edition eds. G. Storz and R. Hengge), ASM Press, Washington, D.C., pp. 59-73.

Goetz RM, Fuglsang A. (2005). Correlation of codon bias measures with mRNA levels: analysis of transcriptome data from Escherichia coli. *Biochem Biophys Res Commun*. **327**: 4-7.

Gollnick P, Babitzke P. (2002). Transcription attenuation. *Biochim Biophys Acta*. **1577**: 240-50.

Gourse RL, Ross W, Gaal T. (2000). UPs and downs in bacterial transcription initiation: the role of the alpha subunit of RNA polymerase in promoter recognition. *Mol Microbiol*. **37**: 687-95.

Gouy M, Gautier C. (1982). Codon usage in bacteria: correlation with gene expressivity. *Nucleic Acids Res*. **10**: 7055-74.

Gralla JD, Vargas DR. (2006). Potassium glutamate as a transcriptional inhibitor during bacterial osmoregulation. *EMBO J*. **25**: 1515-21.

Gralla, J. D., and Y. X. Huo (2008). Remodeling and activation of *Escherichia coli* RNA polymerase by osmolytes. *Biochemistry* **47**: 13189-12196.

Grantham R, Gautier C, Gouy M, Mercier R, Pavé A. (1980). Codon catalog usage and the genome hypothesis. *Nucleic Acids Res*. **8**: 49-62.

Grigorova IL, Phleger NJ, Mutalik VK, Gross CA. (2006). Insights into transcriptional regulation and sigma competition from an equilibrium model of RNA polymerase binding to DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **103**: 5332-7.

Gross, C. A., Chan, C, L. & Lonetto, A. M. (1996). A structure/function analysis of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Philosophical Transactions of the Royal Society London* **351**: 475-482.

Gross CA, Chan C, Dombroski A, Gruber T, Sharp M, Tupy J, Young B. (1998). The functional and regulatory roles of sigma factors in transcription. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. **63**:141-55.

Grossman, A. D., J. W. Erickson & C. A. Gross, (1984) The htpR gene product of E. coli is a sigma factor for heat-shock promoters. *Cell* **38**: 383-390.

Gruber, T. M. & C. A. Gross, (2003) Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space. *Annu Rev Microbiol* **57**: 441-466.

Grundy FJ, Henkin TM. (2006). From ribosome to riboswitch: control of gene expression in bacteria by RNA structural rearrangements. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. **41**: 329-38.

Guillier M, Gottesman S. (2006). Remodelling of the Escherichia coli outer membrane by two small regulatory RNAs. *Mol Microbiol*. **59**: 231-47.

Guillier M, Gottesman S, Storz G. (2006). Modulating the outer membrane with small RNAs. *Genes Dev*. **20**: 2338-48.

Guillier M, Gottesman S. (2008). The 5' end of two redundant sRNAs is involved in the regulation of multiple targets, including their own regulator. *Nucleic Acids Res*. **36**: 6781-94.

Guisbert, E., T. Yura, V. A. Rhodius & C. A. Gross, (2008) Convergence of molecular, modeling, and systems approaches for an understanding of the Escherichia coli heat shock response. *Microbiol Mol Biol Rev* **72**: 545-554.

Gursky YG, Beabealashvilli RSh. (1994). The increase in gene expression induced by introduction of rare codons into the C terminus of the template. *Gene* **148**: 15-21.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of E.coli with plasmids. *J Mol Biol*. **166**: 557-580.

Haugen, S. P., M. B. Berkmen, W. Ross, and R. L. Gourse (2006). rRNA promoter regulation by nonoptimal binding of sigma region 1.2: an additional recognition element for RNA polymerase. *Cell* **125**: 1069-1082.

Haugen, S. P., W. Ross & R. L. Gourse, (2008) Advances in bacterial promoter recognition and its control by factors that do not bind DNA. *Nat Rev Microbiol* **6**: 507-519.

Hayashi K *et al*. (2006). Highly accurate genome sequences of Escherichia coli K-12 strains MG1655 and W3110. *Mol Syst Biol*. **2**: 2006-7.

Hayden, J. D. & S. E. Ades, (2008) The extracytoplasmic stress factor, sigmaE, is required to maintain cell envelope integrity in Escherichia coli. *PLoS One* **3**: e1573.

Hayes CS, Sauer RT. (2003). Cleavage of the A site mRNA codon during ribosome pausing provides a mechanism for translational quality control. *Mol Cell*. **12**: 903-11.

Helmann, J.D (2011) Regulation by alternative sigmafactors. In: Storz G, Hengge R, eds. Bacterial Stress Responses. Washington D.C.: ASM Press : 31-44.

Hengge-Aronis, R., W. Klein, R. Lange, M. Rimmele, and W. Boos (1991). Trehalose synthesis genes are controlled by the putative sigma factor encoded by *rpoS* and are involved in stationary phase thermotolerance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. **173**: 7918-7924.

Hengge-Aronis, R. (1996). Back to log phase: σS as a global regulator in the osmotic control of gene expression in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. **21**: 887-893.

Hengge-Aronis (2000). The general stress response in *Escherichia coli*, p. 161-178. In: G. Storz and R. Hengge-Aronis (ed.) Bacterial Stress Responses, ASM Press, Washington, DC.

Hengge-Aronis, R.(2002). Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the σS subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli*. *Microbiol Mole. Biol Rev*. **66**: 373-395.

Hengge, R. (2008). The two-component network and the general stress sigma factor RpoS (σS) in *Escherichia coli*. *Adv. Exp. Med. Biol*. **631**: 40-53.

Hengge, R. (2009). Proteolysis of σS (RpoS) and the general stress response in *Escherichia coli*. *Res Microbiol*. **160**: 667-676.

Hengge R. (2010a). Cyclic-di-GMP reaches out into the bacterial RNA world. *Sci Signal*. **3**: pe44.

Hengge, R. (2010b). Role of c-di-GMP in the regulatory networks of *Escherichia coli*, p. (in press). *In* A. J. Wolfe and K. L. Visick (ed.), The second messenger cyclic-di-GMP. ASM Press, Washington, D.C.

Hengge, R. (2011.) The general stress response in Gram-negative bacteria. In: Bacterial Stress Responses (2nd edition eds. G. Storz and R. Hengge), ASM Press, Washington, D.C., pp. 251-289.

Herrick D, Parker R, Jacobson A. (1990). Identification and comparison of stable and unstable mRNAs in Saccharomyces cerevisiae. *Mol Cell Biol*. **10**: 2269-84.

Hersh BM, Farooq FT, Barstad DN, Blankenhorn DL, Slonczewski JL. (1996). A glutamate-dependent acid resistance gene in Escherichia coli. *J Bacteriol*. **178**: 3978-81.

Hershberg R, Petrov DA. (2008). Selection on codon bias. *Annu Rev Genet*. **42**: 287-99.

Heuveling, J., A. Possling, and R. Hengge (2008). A role for Lon protease in the control of the acid resistance genes of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. **69**: 534-547.

Hirsch, M., and T. Elliott (2002). Role of ppGpp in *rpoS* stationary phase regulation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. **184**: 5077-5087.

Holbrook SR. (2008). Structural principles from large RNAs. *Annu Rev Biophys*. **37**: 445-64.

Hommais F, Krin E, Laurent-Winter C, Soutourina O, Malpertuy A, Le Caer JP, Danchin A, Bertin P. (2001). Large-scale monitoring of pleiotropic regulation of gene expression by the prokaryotic nucleoid-associated protein, H-NS. *Mol Microbiol*. **40**: 20-36.

Hong, W., W. Jiao, J. Hu, J. Zhang, C. Liu, X. Fu, D. Shen, B. Xia, and Z. Chang (2005). Periplasmic protein HdeA exhibits chaperone-like activity exclusively within stomach pH range by transforming into disordered conformation. *J Biol Chem*. **280**: 27029-27034.

Huntzinger E, Boisset S, Saveanu C, Benito Y, Geissmann T, Namane A, Lina G, Etienne J, Ehresmann B, Ehresmann C, Jacquier A, Vandenesch F, Romby P. (2005). Staphylococcus aureus RNAIII and the endoribonuclease III coordinately regulate spa gene expression. *EMBO J*. **24**: 824-35.

Huo, Y. X., A. Z. Rosenthal, and J. D. Gralla (2008). General stress response signalling: unwrapping transcription complexes by DNA relaxation via the sigma38 C-terminal domain. *Mol Microbiol*. **70**: 369-378.

Ilag LL, Westblade LF, Deshayes C, Kolb A, Busby SJ, Robinson CV. (2004). Mass spectrometry of Escherichia coli RNA polymerase: interactions of the core enzyme with sigma70 and Rsd protein. *Structure* **12**: 269-75.

Ikemura T. (1981). Correlation between the abundance of Escherichia coli transfer RNAs and the occurrence of the respective codons in its protein genes: a proposal for a synonymous codon choice that is optimal for the E. coli translational system. *J Mol Biol*. **151**: 389-409.

Ikemura T. (1985). Codon usage and tRNA content in unicellular and multicellular organisms. *Mol Biol Evol*. **2**: 13-34.

Ingolia NT, Ghaemmaghami S, Newman JR, Weissman JS.(2009). Genome-wide analysis in vivo of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling. *Science* **324**: 218-23.

Iost I, Guillerez J, Dreyfus M. (1992). Bacteriophage T7 RNA polymerase travels far ahead of ribosomes in vivo. *J Bacteriol*. **174**: 619-22.

Iost I, Dreyfus M. (1995). The stability of Escherichia coli lacZ mRNA depends upon the simultaneity of its synthesis and translation. *EMBO J*. **14**: 3252-61.

Jäger S, Evguenieva-Hackenberg E, Klug G. (2004). Temperature-dependent processing of the cspA mRNA in Rhodobacter capsulatus. *Microbiology* **150**: 687-95.

Jain C, Kleckner N. (1993). IS10 mRNA stability and steady state levels in Escherichia coli: indirect effects of translation and role of rne function. *Mol Microbiol*. **9**: 233-47.

Jenkins, D. E., J. E. Schultz, and A. Matin.(1988).Starvation-induced cross-protection against heat or H2O2 challenge in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. **170**: 3910-3914.

Jenkins, D. E., S. A. Chaisson, and A. Matin. (1990). Starvation-induced cross-protection against osmotic challenge in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. **172**: 2779-2781.

Jin D. J., Burgess R. R., Richardson J. P., Gross C. A., (1992). Termination efficiency at rho-dependent terminators depends on kinetic coupling between RNA polymerase and rho. *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A* **89**: 1453-7.

Jishage M, Iwata A, Ueda S, Ishihama A. (1996). Regulation of RNA polymerase sigma subunit synthesis in Escherichia coli: intracellular levels of four species of sigma subunit under various growth conditions. *J Bacteriol*. **178**: 5447-51.

Jishage M, Ishihama A. (1998). A stationary phase protein in Escherichia coli with binding activity to the major sigma subunit of RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **95**: 4953-8.

Jishage, M., K. Kvint, V. Shingler, and T. Nyström (2002). Regulation of sigma factor competition by the alarmone ppGpp. *Genes Dev*. **16**: 1260-1270.

Johansen J, Rasmussen AA, Overgaard M, Valentin-Hansen P. (2006). Conserved small non-coding RNAs that belong to the sigmaE regulon: role in down-regulation of outer membrane proteins. *J Mol Biol*. **364**: 1-8.

Josaitis, C. A., T. Gaal, and R. L. Gourse (1995). Stringent control and growth-rate dependent control have nonidentical promoter sequence requirements. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 1117-1121.

Kalamorz F, Reichenbach B, März W, Rak B, Görke B. (2007). Feedback control of glucosamine-6-phosphate synthase GlmS expression depends on the small RNA GlmZ and involves the novel protein YhbJ in Escherichia coli. *Mol Microbiol*. **65**: 1518-33.

Karginov FV, Hannon GJ. (2010). The CRISPR system: small RNA-guided defense in bacteria and archaea. *Mol Cell*. **37**: 7-19

Karlin S, Mrázek J, Campbell AM. (1998). Codon usages in different gene classes of the Escherichia coli genome. *Mol Microbiol*. **29**: 1341-55.

Kassavetis G. A., Chamberlin M. J. (1981).Pausing and termination of transcription within the early region of bacteriophage T7 DNA *in vitro*. *J Biol Chem*. **256**: 2777-86

Kawamoto H, Koide Y, Morita T, Aiba H. (2006). Base-pairing requirement for RNA silencing by a bacterial small RNA and acceleration of duplex formation by Hfq. *Mol Microbiol*. **61**: 1013-22.

Kawano M, Aravind L, Storz G. (2007). An antisense RNA controls synthesis of an SOS-induced toxin evolved from an antitoxin. *Mol Microbiol*. **64**: 738-54.

Kazantsev AV, Pace NR. (2006). Bacterial RNase P: a new view of an ancient enzyme. *Nat Rev Microbiol*. **4**: 729-40.

Keener, J. and Nomura, M. (1996). ″Regulation of Ribosome Synthesis″ in Neidhardt96: Neidhardt FC, Curtiss III R, Ingraham JL, Lin ECC, Low Jr KB, Magasanik B, Reznikoff WS, Riley M, Schaechter M, Umbarger HE "Escherichia coli and Salmonella, Cellular and Molecular Biology, Second Edition." American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1996.

Kern R, Malki A, Abdallah J, Tagourti J, Richarme G. (2007). Escherichia coli HdeB is an acid stress chaperone. *J Bacteriol*. **189**: 603-10.

Keseler IM, Collado-Vides J, Gama-Castro S, Ingraham J, Paley S, Paulsen IT, Peralta-Gil M, Karp PD. (2005). EcoCyc: a comprehensive database resource for Escherichia coli. *Nucleic Acids Res* **33** (Database issue): D334-337.

Kessler SW. (1975). Rapid isolation of antigens from cells with a staphylococcal protein A-antibody adsorbent: parameters of the interaction of antibody-antigen complexes with protein A. *J Immunol*. **115**: 1617-24.

Kessler SW. (1976). Cell membrane antigen isolation with the staphylococcal protein A-antibody adsorbent. *J Immunol*. **117**: 1482-90.

Kill, K., T. T. Binnewies, T. Sicheritz-Ponten, H. Willenbrock, P. F. Hallin, T. M. Wassenaar & D. W. Ussery, (2005) Genome update: sigma factors in 240 bacterial genomes. *Microbiology* **151**: 3147-3150.

Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim IW, Sauna ZE, Calcagno AM, Ambudkar SV, Gottesman MM. (2007). A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science* **315**: 525-8.

Klauck, E., J. Böhringer, and R. Hengge-Aronis (1997). The LysR-like regulator LeuO in *Escherichia coli* is involved in the translational regulation of *rpoS* by affecting the expression of the small regulatory DsrA-RNA. *Mol Microbiol*. **25**: 559-569.

Klauck E, Lingnau M, Hengge-Aronis R. (2001). Role of the response regulator RssB in sigma recognition and initiation of sigma proteolysis in Escherichia coli. *Mol Microbiol*. **40**: 1381-90.

Klein, A. H., A. Shulla, S. A. Reimann, D. H. Keating, and A. J. Wolfe (2007). The intracellular concentration of acetyl phosphate in *Escherichia coli* is sufficient for direct phosphorylation of two-component response regulators. *J Bacteriol*. **189**: 5574-5581.

Klocko AD, Wassarman KM. (2009). 6S RNA binding to Esigma(70) requires a positively charged surface of sigma(70) region 4.2. *Mol Microbiol*. **73**: 152-64.

Knight RD, Freeland SJ, Landweber LF. (2001). A simple model based on mutation and selection explains trends in codon and amino-acid usage and GC composition within and across genomes. *Genome Biol*. **2**: RESEARCH0010.

Ko JH, Han K, Kim Y, Sim S, Kim KS, Lee SJ, Cho B, Lee K, Lee Y. (2008). Dual function of RNase E for control of M1 RNA biosynthesis in Escherichia coli. *Biochemistry* **47**: 762-70.

Komar AA. (2009). A pause for thought along the co-translational folding pathway. *Trends Biochem Sci*. **34**: 16-24.

Komine Y, Adachi T, Inokuchi H, Ozeki H. (1990). Genomic organization and physical mapping of the transfer RNA genes in *Escherichia coli* K12. *J Mol Biol*. **212**: 579-98.

Konigsberg W, Godson GN. (1983). Evidence for use of rare codons in the dnaG gene and other regulatory genes of Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **80**: 687-91.

Korzheva, N.; Mustaev, A.; Kozlov, M.; Malhotra, A.; Nikiforov, V.; Goldfarb, A.; Darst, S. A. (2000). A structural model of transcription elongation. *Science* **289**: 619-625.

Krohn M, Wagner R. (1996). Transcriptional pausing of RNA polymerase in the presence of guanosine tetraphosphate depends on the promoter and gene sequence. *J Biol Chem*. **271**: 23884-94.

Kusano, S., Q. Q. Ding, N. Fujita, and A. Ishihama (1996). Promoter selectivity of *Escherichia coli* RNA polymerase Eσ70 and Eσ38 holoenzymes - Effect of DNA supercoiling. *J Biol Chem*. **271**: 1998-2004.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

Lacour, S., A. Kolb, and P. Landini (2003). Nucleotides from -16 to -12 determine specific promoter recognition by bacterial σS-RNA polymerase. *J Biol Chem*. **278**: 37160-37168.

Lammertyn E, Van Mellaert L, Bijnens AP, Joris B, Anné J. (1996). Codon adjustment to maximise heterologous gene expression in Streptomyces lividans can lead to decreased mRNA stability and protein yield. *Mol Gen Genet*. **250**: 223-9.

Lange, R., and R. Hengge-Aronis (1991a). Identification of a central regulator of stationary phase gene expression in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. **5**: 49-59.

Lange, R., and R. Hengge-Aronis (1991b). Growth phase-regulated expression of *bolA* and morphology of stationary phase *Escherichia coli* cells is controlled by the novel sigma factor σS (*rpoS*). *J Bacteriol*. **173**: 4474-4481.

Lange, R., M. Barth, and R. Hengge-Aronis (1993). Complex transcriptional control of the σS-dependent stationary phase-induced and osmotically regulated *osmY* (*csi-5*) gene suggestsnovel roles for Lrp, cyclic AMP (cAMP) receptor protein-cAMP complex and integration host factor in the stationary phase response of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. **175**: 7910-7917.

Lange R, Hengge-Aronis R. (1994a). The cellular concentration of the sigma S subunit of RNA polymerase in Escherichia coli is controlled at the levels of transcription, translation, and protein stability. *Genes Dev*. **8**: 1600-12.

Lange, R., and R. Hengge-Aronis (1994b). The *nlpD* gene is located in an operon with *rpoS* on the *Escherichia coli* chromosome and encodes a novel lipoprotein with a potential function in cell wall formation. *Mol Microbiol*. **13**:733-743.

Lange R, Fischer D, Hengge-Aronis R. (1995). Identification of transcriptional start sites and the role of ppGpp in the expression of rpoS, the structural gene for the sigma S subunit of RNA polymerase in Escherichia coli. *J Bacteriol*. **177**: 4676-80.

Lapouge K, Schubert M, Allain FH, Haas D. (2008). Gac/Rsm signal transduction pathway of gamma-proteobacteria: from RNA recognition to regulation of social behaviour. *Mol Microbiol*. **67**: 241-53.

Laurie AD, Bernardo LM, Sze CC, Skarfstad E, Szalewska-Palasz A, Nyström T, Shingler V. (2003). The role of the alarmone (p)ppGpp in sigma N competition for core RNA polymerase. *J Biol Chem*. **278**: 1494-503.

Lawrence JG, Ochman H. (1998). Molecular archaeology of the Escherichia coli genome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **95**: 9413-7.

Lease RA, Cusick ME, Belfort M. (1998). Riboregulation in Escherichia coli: DsrA RNA acts by RNA:RNA interactions at multiple loci. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **95**: 12456-61.

Lease, R. A. & Belfort, M. (2000). A trans-acting RNA as a control switch in *Escherichia coli*: DsrA modulates function by forming alternative structures. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **97**: 9919–9924.

Lease RA, Smith D, McDonough K, Belfort M. (2004). The small noncoding DsrA RNA is an acid resistance regulator in Escherichia coli. *J Bacteriol*. **186**: 6179-85.

Lease RA, Woodson SA (2004). Cycling of the Sm-like protein Hfq on the DsrA small regulatory RNA. *J Mol Biol*. **344**: 1211-23.

Lee ER, Baker JL, Weinberg Z, Sudarsan N, Breaker RR. (2010). An allosteric self-splicing ribozyme triggered by a bacterial second messenger. *Science* **329**: 845-8

Lee, S. J., and J. D. Gralla (2001). Sigma38 (*rpoS*) RNA polymerase promoter engagement via -10 region nucleotides. *J Biol Chem*. **276**: 30064-30071.

Lee K, Zhan X, Gao J, Qiu J, Feng Y, Meganathan R, Cohen SN, Georgiou G. (2003). RraA. a protein inhibitor of RNase E activity that globally modulates RNA abundance in E. coli. *Cell* **114**: 623-34.

Lee CR, Cho SH, Kim HJ, Kim M, Peterkofsky A, Seok YJ. (2010). Potassium mediates Escherichia coli enzyme IIA(Ntr) -dependent regulation of sigma factor selectivity. *Mol Microbiol*. **78**: 1468-83.

Lemm I, Ross J.(2002). Regulation of c-myc mRNA decay by translational pausing in a coding region instability determinant. *Mol Cell Biol*. **22**: 3959-69.

Li H, Nicholson AW. (1996). Defining the enzyme binding domain of a ribonuclease III processing signal. Ethylation interference and hydroxyl radical footprinting using catalytically inactive RNase III mutants. *EMBO J*. **15**: 1421-33.

Li Z, Pandit S, Deutscher MP. (1999). RNase G (CafA protein) and RNase E are both required for the 5' maturation of 16S ribosomal RNA. *EMBO J*. **18**: 2878-85.

Lin-Chao S, Wei CL, Lin YT. (1999). RNase E is required for the maturation of ssrA RNA and normal ssrA RNA peptide-tagging activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **96**: 12406-11.

Link TM, Valentin-Hansen P, Brennan RG. (2009). Structure of Escherichia coli Hfq bound to polyriboadenylate RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **106**: 19292-7.

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

Liu, M. Y., G. Gui, B. Wei, J. F. Preston III, L. Oakford, U. Yuksel, D. P. Giedroc, and T. Romeo. (1997). The RNA molecule CsrB binds to the global regulatory protein CsrA and antagonizes its activity in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. **272**: 17502–17510.

Livny J, Waldor MK. (2007). Identification of small RNAs in diverse bacterial species. *Curr Opin Microbiol*. **10**: 96-101.

Loewen, P. C., and R. Hengge-Aronis (1994). The role of the sigma factor σS (KatF) in bacterial global regulation. *Annu. Rev. Microbiol*. **48**: 53-80.

Lonetto, M., M. Gribskov & C. A. Gross, (1992) The sigma 70 family: sequence conservation and evolutionary relationships. *J Bacteriol* **174**: 3843-3849.

Lonetto, M. A., K. L. Brown, K. E. Rudd & M. J. Buttner, (1994) Analysis of the Streptomyces coelicolor sigE gene reveals the existence of a subfamily of eubacterial RNA polymerase sigma factors involved in the regulation of extracytoplasmic functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 7573-7577.

Lucchetti-Miganeh C, Burrowes E, Baysse C, Ermel G. (2008). The post-transcriptional regulator CsrA plays a central role in the adaptation of bacterial pathogens to different stages of infection in animal hosts. *Microbiology* **154**: 16-29.

Lundberg U, Altman S. (1995). Processing of the precursor to the catalytic RNA subunit of RNase P from Escherichia coli. *RNA* **1**: 327-34.

Lutz R, Bujard H. (1997). Independent and tight regulation of transcriptional units in Escherichia coli via the LacR/O, the TetR/O and AraC/I1-I2 regulatory elements. *Nucleic Acids Res*. **25**: 1203-10.

Ma, Z., H. Richard, D. L. Tucker, T. Conway, and J. W. Foster (2002). Collaborative regulation of *Escherichia coli* glutamate-dependent acid resistance by two AraC-like regulators, GadX and GadW (YhiW). *J Bacteriol*. **184**: 7001-7012.

Ma, Z., S. Gong, H. Richard, D. L. Tucker, T. Conway, and J. W. Foster (2003). GadE(YhiE) activates glutamate decarboxylase-dependent acid resistance in *Escherichia coli* K-12. Mol *Microbiol*. **49**: 1309-1320.

Mackie GA. (1992). Secondary structure of the mRNA for ribosomal protein S20. Implications for cleavage by ribonuclease E. *J Biol Chem*. **267**: 1054-61

Mackie GA. (1998). Ribonuclease E is a 5'-end-dependent endonuclease. *Nature* **395**: 720-3.

MacLean D, Jones JD, Studholme DJ. (2009). Application of 'next-generation' sequencing technologies to microbial genetics. *Nat Rev Microbiol*. **7**: 287-96.

Madhugiri R, Basineni SR, Klug G. (2010). Turn-over of the small non-coding RNA RprA in E. coli is influenced by osmolarity. *Mol Genet Genomics*. **284**: 307-18.

Maeda H, Fujita N, Ishihama A. (2000). Competition among seven Escherichia coli sigma subunits: relative binding affinities to the core RNA polymerase. *Nucleic Acids Res*. **28**: 3497-503.

Magnusson, L. U., A. Farewell, and T. Nyström (2005). ppGpp: a global regulator in *Escherichia coli*. *Trends Microbiol*. **13**: 236-242.

Majdalani N, Cunning C, Sledjeski D, Elliott T, Gottesman S. (1998). DsrA RNA regulates translation of RpoS message by an anti-antisense mechanism, independent of its action as an antisilencer of transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **95**: 12462-7

Majdalani N, Chen S, Murrow J, St John K, Gottesman S. (2001). Regulation of RpoS by a novel small RNA: the characterization of RprA. *Mol Microbiol*. **39**: 1382-94.

Majdalani N, Hernandez D, Gottesman S. (2002). Regulation and mode of action of the second small RNA activator of RpoS translation, RprA. *Mol Microbiol*. **46**: 813-26.

Majdalani, N. and S. Gottesman (2005). The Rcs phosphorelay: a complex signal transduction system. *Annu Rev Microbiol*. **59**: 379-405.

Makarova OV, Makarov EM, Sousa R, Dreyfus M. (1995). Transcribing of Escherichia coli genes with mutant T7 RNA polymerases: stability of lacZ mRNA inversely correlates with polymerase speed. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **92**: 12250-4.

Makrides SC. (1996). Strategies for achieving high-level expression of genes in Escherichia coli. *Microbiol Rev*. **60**: 512-38.

Malki A, Le HT, Milles S, Kern R, Caldas T, Abdallah J, Richarme G. (2008). Solubilization of protein aggregates by the acid stress chaperones HdeA and HdeB. *J Biol Chem*. **283**: 13679-87.

Malpica R, Franco B, Rodriguez C, Kwon O, Georgellis D. (2004). Identification of a quinone-sensitive redox switch in the ArcB sensor kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **101**: 13318-23.

Malpica R, Sandoval GR, Rodríguez C, Franco B, Georgellis D. (2006). Signaling by the arc two-component system provides a link between the redox state of the quinone pool and gene expression. *Antioxid Redox Signal*. **8**: 781-95.

Mandel, M. J., and T. J. Silhavy (2005). Starvation for different nutrients in *Escherichia coli* results in differential modulation of RpoS levels and stability. *J Bacteriol*. **187**: 434-442.

Mandin P, Gottesman S. (2010). Integrating anaerobic/aerobic sensing and the general stress response through the ArcZ small RNA. *EMBO J*. **29**: 3094-107.

Margulies M, Egholm M, Altman WE *et al*. (2005). Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* **437**: 376-80.

Marin M. (2008). Folding at the rhythm of the rare codon beat. *Biotechnol J*. **3**: 1047-57.

Mason SW, Greenblatt J. (1991). Assembly of transcription elongation complexes containing the N protein of phage lambda and the Escherichia coli elongation factors NusA, NusB, NusG, and S10. *Genes Dev*. **5**:1504-12.

Massé, E., Escorcia, F. E. & Gottesman, S. (2003). Coupled degradation of a small regulatory RNA and its mRNA targets in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* **17**: 2374–2383.

Massé E, Vanderpool CK, Gottesman S. (2005). Effect of RyhB small RNA on global iron use in Escherichia coli. *J Bacteriol*. **187**: 6962-71.

Mates, A. K., A. K. Sayed, and J. W. Foster (2007). Products of the *Escherichia coli* acid fitness island attenuate metabolite stress as extremely low pH and mediate a cell density-dependent acid resistance. *J Bacteriol*. **189**: 2759-2768.

Maurizi MR, Trisler P, Gottesman S. (1985). Insertional mutagenesis of the lon gene in Escherichia coli: lon is dispensable. *J Bacteriol*. **164**: 1124-35.

Maurizi MR. *et al*., (1990). Sequence and structure of Clp P, the proteolytic component of the ATP-dependent Clp protease of Escherichia coli. *J Biol Chem*. **265**: 12536-45.

McCann, M. P., C. D. Fraley, and A. Matin (1993). The putative s factor KatF is regulated posttranscriptionally during carbon starvation. *J Bacteriol*. **175**: 2143-2149.

McCann, M. P., J. P. Kidwell, and A. Matin (1991). The putative sigma factor KatF has a central role in development of starvation-mediated general resistance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. **173**: 4188-4194.

McCleary WR, Stock JB. (1994). Acetyl phosphate and the activation of two-component response regulators. *J Biol Chem*. **269**: 31567-72.

McCullen CA, Benhammou JN, Majdalani N, Gottesman S (2010). Mechanism of positive regulation by DsrA and RprA small noncoding RNAs: pairing increases translation and protects rpoS mRNA from degradation. *J Bacteriol*. **192**: 5559-71.

McDowall KJ, Kaberdin VR, Wu SW, Cohen SN, Lin-Chao S. (1995). Site-specific RNase E cleavage of oligonucleotides and inhibition by stem-loops. *Nature* **374**: 287-90.

Médigue C, Rouxel T, Vigier P, Hénaut A, Danchin A. (1991). Evidence for horizontal gene transfer in Escherichia coli speciation. *J Mol Biol*. **222**: 851-6.

Merrick MJ. (1993) In a class of its own--the RNA polymerase sigma factor sigma 54 (sigma N). *Mol Microbiol*. **10**: 903-9.

Merrikh, H., A. E. Ferrazzoli, A. Bougdour, A. Olivier-Mason, and S. T. Lovett (2009). A DNA damage response in *Escherichia coli* involving the alternative sigma factor, RpoS. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**: 611-616.

Mika F, Hengge R. (2005). A two-component phosphotransfer network involving ArcB, ArcA, and RssB coordinates synthesis and proteolysis of sigmaS (RpoS) in E. coli. *Genes Dev*. **19**: 2770-81.

Mikulecky PJ, Kaw MK, Brescia CC, Takach JC, Sledjeski DD, Feig AL. (2004). Escherichia coli Hfq has distinct interaction surfaces for DsrA, rpoS and poly(A) RNAs. *Nat Struct Mol Biol*. **11**: 1206-14.

Miller, J. H. (1972). Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Miller, J. H. (1992). A short course in bacterial genetics. A laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Minakhin L., Bhagat S., Brunning A., Campell E. A., Darst S. A., Ebright R. H., Severinov K. (2001). Bacterial RNA polymerase subunit omega and eukaryotic RNA subunit RPB6 are sequence, structural, and functional homologs and promote RNA polymerase assembly. *Proc.Natl.Acad.Sci. U S A* **98**: 892-7.

Misra TK, Apirion D. (1979). RNase E, an RNA processing enzyme from Escherichia coli. *J Biol Chem***. 254**: 11154-9.

Mitarai N, Sneppen K, Pedersen S. (2008). Ribosome collisions and translation efficiency: optimization by codon usage and mRNA destabilization. *J Mol Biol*. **382**: 236-45.

Møller T, Franch T, Højrup P, Keene DR, Bächinger HP, Brennan RG, Valentin-Hansen P. (2002). Hfq: a bacterial Sm-like protein that mediates RNA-RNA interaction. *Mol Cell*. **9**: 23-30.

Mooney RA, Schweimer K, Rösch P, Gottesman M, Landick R. (2009). Two structurally independent domains of E. coli NusG create regulatory plasticity via distinct interactions with RNA polymerase and regulators. *J Mol Biol*. **391**: 341-58.

Moore SD, Sauer RT. (2007). The tmRNA system for translational surveillance and ribosome rescue. *Annu Rev Biochem*. **76**: 101-24.

Morita T, Maki K, Aiba H. (2005). RNase E-based ribonucleoprotein complexes: mechanical basis of mRNA destabilization mediated by bacterial noncoding RNAs. *Genes Dev*. **19**: 2176-86.

Muffler A, Fischer D, Hengge-Aronis R. (1996a). The RNA-binding protein HF-I, known as a host factor for phage Qbeta RNA replication, is essential for rpoS translation in Escherichia coli. *Genes Dev*. **10**: 1143-51.

Muffler, A., D. D. Traulsen, R. Lange, and R. Hengge-Aronis (1996b). Posttranscriptional osmotic regulation of the σS subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. **178**: 1607-1613.

Muffler A, Fischer D, Altuvia S, Storz G, Hengge-Aronis R. (1996c). The response regulator RssB controls stability of the sigma(S) subunit of RNA polymerase in Escherichia coli. *EMBO J*. **15**: 1333-9.

Muffler, A., M. Barth, C. Marschall, and R. Hengge-Aronis (1997). Heat shock regulation of σS turnover: a role for DnaK and relationship between stress responses mediated by σS and σ32 in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. **179**: 445-452.

Muffler, A., D. D. Traulsen, D. Fischer, R. Lange, and R. Hengge-Aronis. (1997b). The RNA-binding protein HF-I plays a global regulatory role which is largely, but not exclusively, due to its role in expression of the σS subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. **179**: 297-300.

Mukhopadhyay, S., J. P. Audia, R. N. Roy, and H. E. Schellhorn (2000). Transcriptional induction of the conserved alternative sigma factor RpoS in *Escherichia coli* is dependent on BarA, a probable two-component regulator. *Mol. Microbiol*. **37**: 371-381.

Narberhaus, F., T. Waldminghaus and S. Chowdhury (2006). RNA thermometers. *FEMS Microbiol Rev* **30**: 3-16.

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

Nguyen, L. H., D. B. Jensen, N. E. Thompson, D. R. Gentry, and R. R. Burgess (1993). In vitro functional characterization of overproduced *Escherichia coli katF/rpoS* gene product. *Biochemistry* **32**: 11112-11117.

Nguyen, L. H., and R. R. Burgess (1997). Comparative analysis of the interactions of *Escherichia coli* σS and σ70 RNA polymerase holoenzyme with the stationary phasespecific *bolA*p1 promoter. *Biochemistry* **36**: 1748-1754.

Nichols, B. P., O. Shafiq, *et al*. (1998). Sequence analysis of Tn10 insertion sites in a collection of Escherichia coli strains used for genetic mapping and strain construction. *J Bacteriol*. **180**: 6408-11.

Nickels, B. E., and A. Hochschild (2004). Regulation of RNA polymerase through the secondary channel. *Cell* **118**: 281-284.

Nielsen R, Bauer DuMont VL, Hubisz MJ, Aquadro CF. (2007). Maximum likelihood estimation of ancestral codon usage bias parameters in Drosophila. *Mol Biol Evol*. **24**: 228-35.

Nudler, E., A. Mustaev, E. Lukhtanov and A. Goldfarb (1997). The RNA-DNA hybridmaintains the register of transcription by preventing backtracking of RNA polymerase. *Cell* **89**: 33-41.

Nudler, E., I. Gusarov, E. Avetissova, M. Kozlov and A. Goldfarb (1998). Spatial organization of transcription elongation complex in *Escherichia coli*. *Science* **281**: 424-428.

Nudler E, Mironov AS. (2004). The riboswitch control of bacterial metabolism. *Trends Biochem Sci*. **29**:11-7.

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 σS-dependent transcription in *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol*. **182**: 6707-6713.

Olvera, L., A. Mendoza-Vargas, N. Flores, M. Olvera, J. C. Sigala, G. Gosset, E. Morett, and F. Bolívar (2009). Transcription analysis of central metabolism genes in *Escherichia coli*. Possible roles of σ38 in their expression, as a response to carbon limitation. *PLoS One* **4**:e7466.

Opdyke JA, Kang JG, Storz G. (2004). GadY, a small-RNA regulator of acid response genes in Escherichia coli *J Bacteriol*. **186**: 6698-705.

Opdyke JA, Fozo EM, Hemm MR, Storz G. (2011). RNase III participates in GadY-dependent cleavage of the gadX-gadW mRNA. *J Mol Biol*. **406**: 29-43

Ow MC, Kushner SR. (2002). Initiation of tRNA maturation by RNase E is essential for cell viability in E. coli. *Genes Dev*. **16**: 1102-15.

Paget, M. S. & J. D. Helmann, (2003) The sigma70 family of sigma factors. *Genome Biol* **4**: 203.

Papenfort K, Pfeiffer V, Mika F, Lucchini S, Hinton JC, Vogel J. (2006). SigmaE-dependent small RNAs of Salmonella respond to membrane stress by accelerating global omp mRNA decay. *Mol Microbiol*. **62**: 1674-88.

Papenfort K, Said N, Welsink T, Lucchini S, Hinton JC, Vogel J. (2009). Specific and pleiotropic patterns of mRNA regulation by ArcZ, a conserved, Hfq-dependent small RNA. *Mol Microbiol*. **74**: 139-58.

Pato ML, Bennett PM, von Meyenburg K. (1973). Messenger ribonucleic acid synthesis and degradation in Escherichia coli during inhibition of translation. *J Bacteriol*. **116**: 710-8.

Pedersen M, Nissen S, Mitarai N, Lo Svenningsen S, Sneppen K, Pedersen S. (2011). The functional half-life of an mRNA depends on the ribosome spacing in an early coding region. *J Mol Biol*. **407**: 35-44.

Peters JM, Mooney RA, Kuan PF, Rowland JL, Keles S, Landick R. (2009). Rho directs widespread termination of intragenic and stable RNA transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **106**: 15406-11.

Peters, J. E., T. E. Thate, *et al*. (2003). Definition of the Escherichia coli MC4100 genome by use of a DNA array. *J Bacteriol*. **185**: 2017-21.

Peterson CN, Ruiz N, Silhavy TJ. (2004). RpoS proteolysis is regulated by a mechanism that does not require the SprE (RssB) response regulator phosphorylation site. *J Bacteriol*. **186**: 7403-10.

Peterson, C. N., V. J. Carabetta, T. Chowdhury, and T. J. Silhavy (2006). LrhA regulates *rpoS* translation in response to the Rcs phosphorelay system in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. **188**: 3175-3181.

Pfeiffer V, Sittka A, Tomer R, Tedin K, Brinkmann V *et al*. (2007) A small non-coding RNA of the invasion gene island (SPI-1) represses outer membrane protein synthesis from the Salmonella core genome. *Mol Microbiol*. **66**: 1174–1191.

Pfeiffer V, Papenfort K, Lucchini S, Hinton JC, Vogel J. (2009). Coding sequence targeting by MicC RNA reveals bacterial mRNA silencing downstream of translational initiation. *Nat Struct Mol Biol*. **16**: 840-6.

Phadtare S, Inouye M. (2001). Role of CspC and CspE in regulation of expression of RpoS and UspA, the stress response proteins in Escherichia coli. *J Bacteriol*. **183**: 1205-14.

Phadtare S, Inouye M, Severinov K. (2002). The nucleic acid melting activity of Escherichia coli CspE is critical for transcription antitermination and cold acclimation of cells. *J Biol Chem*. **277**: 7239-45.

Phadtare S, Severinov K. (2010). RNA remodeling and gene regulation by cold shock proteins. *RNA Biol*. **7**: 788-95.

Piper SE, Mitchell JE, Lee DJ, Busby SJ. (2009). A global view of Escherichia coli Rsd protein and its interactions. *Mol Biosyst*. **5**: 1943-7.

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

Powell BS, Rivas MP, Court DL, Nakamura Y, Turnbough CL Jr. (1994). Rapid confirmation of single copy lambda prophage integration by PCR. *Nucleic Acids Res*. **22**: 5765-6.

Pratt LA, Silhavy TJ. (1996). The response regulator SprE controls the stability of RpoS. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **93**: 2488-92.

Prévost K, Salvail H, Desnoyers G, Jacques JF, Phaneuf E, Massé E. (2007). The small RNA RyhB activates the translation of shiA mRNA encoding a permease of shikimate, a compound involved in siderophore synthesis. *Mol Microbiol*. **64**: 1260-73.

Proshkin S, Rahmouni AR, Mironov A, Nudler E. (2010). Cooperation between translating ribosomes and RNA polymerase in transcription elongation. *Science* **328**: 504-8.

Pruteanu, M., and R. Hengge-Aronis (2002). The cellular level of the recognition factor RssB is rate-limiting for σS proteolysis: Implications for RssB regulation and signal transduction in σS turnover in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. **45**: 1701-1714.

Rabhi M, Espéli O, Schwartz A, Cayrol B, Rahmouni AR, Arluison V, Boudvillain M. (2011). The Sm-like RNA chaperone Hfq mediates transcription antitermination at Rho-dependent terminators. *EMBO J*. **doi**: 10.1038/emboj.2011.192.

Raffaelle, M., E. I. Kanin, J. Vogt, R. R. Burgess, and A. Z. Ansari (2005). Holoenzyme switching and stochastic release of sigma factor from RNA polymerase in vivo. *Mol. Cell* **20**: 357-366.

Raivio, T. L., (2005) Envelope stress responses and Gram-negative bacterial pathogenesis. *Mol Microbiol* **56**: 1119-1128.

Ranquet C, Gottesman S. (2007). Translational regulation of the Escherichia coli stress factor RpoS: a role for SsrA and Lon. *J Bacteriol*. **189**: 4872-9.

Rappas, M., D. Bose & X. Zhang, (2007) Bacterial enhancer-binding proteins: unlocking sigma54-dependent gene transcription. *Curr Opin Struct Biol* **17**: 110-116.

Record, M. T.; Reznikoff, W. S.; Craig, M. L.; McQuade, K. L.; Schlax, P. J. (1996). "*Escherichia coli* RNA polymerase ($E\sigma^{70}$), promoters, and the kinetics of the steps of transcription initiation." Neidhard, F. C., Curtiss III, R., Ingraham, J. L., Lin, E. C. C., Low, K. B., Magasanik, B., Reznikoff, W. S., Riley, M., Schaechter, M., Umbarger, H. E. *Escherichia coli* and *Salmonella* Cellular and Molecular Biology Washington, D. C. **2**: 792-821.

Reichenbach B, Maes A, Kalamorz F, Hajnsdorf E, Görke B. (2008). The small RNA GlmY acts upstream of the sRNA GlmZ in the activation of glmS expression and is subject to regulation by polyadenylation in Escherichia coli. *Nucleic Acids Res*. **36**: 2570-80.

Repoila F, Gottesman S. (2001). Signal transduction cascade for regulation of RpoS: temperature regulation of DsrA. *J Bacteriol*. **183**: 4012-23.

Repoila, F., N. Majdalani, and S. Gottesman (2003). Small non-coding RNAs, co-ordinators of adaptation processes in *Escherichia coli*: the RpoS paradigm. *Mol Microbiol*. **48**:855-861.

Resch A, Afonyushkin T, Lombo TB, McDowall KJ, Bläsi U, Kaberdin VR. (2008). Translational activation by the noncoding RNA DsrA involves alternative RNase III processing in the rpoS 5'-leader. *RNA* **14**: 454-9.

Resch A, Većerek B, Palavra K, Bläsi U. (2010). Requirement of the CsdA DEAD-box helicase for low temperature riboregulation of rpoS mRNA. *RNA Biol*. **7**: 796-802.

Richardson, J. P. (1993). Transcription termination. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **28**: 1-30.

Ring, B. Z., W. S. Yarnell, and J. W. Roberts (1996). Function of *E. coli* RNA polymerase sigma factor σ70 in promoter-proximal pausing. *Cell* **86**: 485-493.

Roberts JW, Shankar S, Filter JJ. (2008). RNA polymerase elongation factors. *Annu Rev Microbiol*. **62**: 211-33.

Robinson M, Lilley R, Little S, Emtage JS, Yarranton G, Stephens P, Millican A, Eaton M, Humphreys G. (1984). Codon usage can affect efficiency of translation of genes in Escherichia coli. *Nucleic Acids Res*. **12**: 6663-71.

Roche ED, Sauer RT. (1999). SsrA-mediated peptide tagging caused by rare codons and tRNA scarcity. *EMBO J*. **18**: 4579-89.

Rockabrand, D., T. Arthur, G. Korinek, K. Livers, and P. Blum (1995). An essential role for the *Escherichia coli* DnaK protein in starvation-induced thermotolerance, H2O2 resistance, and reductive division. *J Bacteriol*. **177**: 3695-3703.

Rockabrand, D., K. Livers, T. Austin, R. Kaiser, D. Jensen, R. Burgess, and P. Blum (1998). Roles of DnaK and RpoS in starvation-induced thermotolerance of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. **180**: 846-854.

Rosenthal, A. Z., Y. Kim, and J. D. Gralla (2008). Poising of *Escherichia coli* RNA polymerase and its release from the sigma38 C-terminal tail for *osmY* transcription. *J Mol Biol*. **376**: 938-949.

Ross, W., K. K. Gosink, J. Salomon, K. Igarashi, C. Zou, A. Ishihama, K. Severinov, and R. L. Gourse (1993). A third recognition element in bacterial promoters - DNA binding by the alpha-subunit of RNA polymerase. *Science* **262**: 1407-1413.

Rowley KB, Elford RM, Roberts I, Holmes WM. (1993). In vivo regulatory responses of four Escherichia coli operons which encode leucyl-tRNAs. *J Bacteriol*. **175**: 1309-15.

Ruiz, N., C. N. Peterson, and T. J. Silhavy (2001). RpoS-dependent transcriptional control of *sprE*: regulatory feedback loop. *J Bacteriol*. **183**: 5974-5981.

Ruiz N, Silhavy TJ. (2003). Constitutive activation of the Escherichia coli Pho regulon upregulates rpoS translation in an Hfq-dependent fashion. *J Bacteriol*. **185**: 5984-92.

Saier MH Jr. (1995). Differential codon usage: a safeguard against inappropriate expression of specialized genes? *FEBS Lett*. **362**: 1-4.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Santangelo TJ, Artsimovitch I. (2011). Termination and antitermination: RNA polymerase runs a stop sign. *Nat Rev Microbiol*. **9**: 319-29.

Schmidt R., Bukau B., Mogk A. (2009). Principles of general and regulatory proteolysis by AAA+ proteases in *Escherichia coli*. *Res Microbiol*. **160**: 629-36.

Schneider E, Blundell M, Kennell D. (1978). Translation and mRNA decay. *Mol Gen Genet*. **160**: 121-9.

Schumacher MA, Pearson RF, Møller T, Valentin-Hansen P, Brennan RG. (2002). Structures of the pleiotropic translational regulator Hfq and an Hfq-RNA complex: a bacterial Sm-like protein. *EMBO J*. **21**: 3546-56.

Schurdell MS, Woodbury GM, McCleary WR. (2007). Genetic evidence suggests that the intergenic region between pstA and pstB plays a role in the regulation of rpoS translation during phosphate limitation. *J Bacteriol*. **189**: 1150-3.

Schweder T, Lee KH, Lomovskaya O, Matin A. (1996). Regulation of Escherichia coli starvation sigma factor (sigma s) by ClpXP protease. *J Bacteriol*. **178**: 470-6

Selinger DW, Saxena RM, Cheung KJ, Church GM, Rosenow C. (2003). Global RNA half-life analysis in Escherichia coli reveals positional patterns of transcript degradation. *Genome Res*. **13**: 216-23.

Sharp PM, Li WH (1987). The codon Adaptation Index--a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. *Nucleic Acids Res*. **15**: 1281-95.

Sharma CM, Darfeuille F, Plantinga TH, Vogel J. (2007). A small RNA regulates multiple ABC transporter mRNAs by targeting C/A-rich elements inside and upstream of ribosome-binding sites. *Genes Dev*. **21**: 2804-17.

Sharma CM, Vogel J. (2009). Experimental approaches for the discovery and characterization of regulatory small RNA. *Curr Opin Microbiol*. **12**: 536-46.

Sharma CM, Hoffmann S, Darfeuille F, Reignier J, Findeiss S, Sittka A, Chabas S, Reiche K, Hackermüller J, Reinhardt R, Stadler PF, Vogel J. (2010). The primary transcriptome of the major human pathogen Helicobacter pylori. *Nature* **464**: 250-5.

Sherman JM, Albus WR. (1923). Physiological Youth in Bacteria. *J Bacteriol*. **8**:127-39.

Shiba T, Tsutsumi K, Yano H, Ihara Y, Kameda A, Tanaka K, Takahashi H, Munekata M, Rao NN, Kornberg A. (1997). Inorganic polyphosphate and the induction of rpoS expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **94**: 11210-5.

Siegele DA, Hu JC, Walter WA, Gross CA. (1989). Altered promoter recognition by mutant forms of the sigma 70 subunit of Escherichia coli RNA polymerase. *J Mol Biol*. **206**: 591-603.

Silhavy, T.J., Berman, M.L. and Enquist, L.W. (1984). Experiments with gene fusions. Cold Spring Habor Laboratory Press. Cold Spring Habor, New York

Simons, R. W., Houman, F. and Kleckner, N. (1987). Improved single and multicopy lacbased cloning vectors for protein and operon fusions. *Gene* **53**: 85-96.

Singh D, Chang SJ, Lin PH, Averina OV, Kaberdin VR, Lin-Chao S. (2009). Regulation of ribonuclease E activity by the L4 ribosomal protein of Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **106**: 864-9.

Sittka A, Lucchini S, Papenfort K, Sharma CM, Rolle K, Binnewies TT, Hinton JC, Vogel J. (2008). Deep sequencing analysis of small noncoding RNA and mRNA targets of the global post-transcriptional regulator, Hfq. *PLoS Genet*. **4**: e1000163.

Sledjeski D, Gottesman S. (1995). A small RNA acts as an antisilencer of the H-NS-silenced rcsA gene of Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **92**: 2003-7.

Sledjeski DD, Gottesman S. (1996). Osmotic shock induction of capsule synthesis in Escherichia coli K-12. *J Bacteriol*. **178**: 1204-6.

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

Smith NG, Eyre-Walker A. (2001). Why are translationally sub-optimal synonymous codons used in Escherichia coli? *J Mol Evol*. **53**: 225-36.

Smith DK, Kassam T, Singh B, Elliott JF. (1992). Escherichia coli has two homologous glutamate decarboxylase genes that map to distinct loci. *J Bacteriol*. **174**: 5820-6.

Sørensen MA, Kurland CG, Pedersen S. (1989). Codon usage determines translation rate in Escherichia coli. *J Mol Biol*. **207**: 365-77.

Soper TJ, Woodson SA. (2008). The rpoS mRNA leader recruits Hfq to facilitate annealing with DsrA sRNA. *RNA* **14**: 1907-17.

Soper T, Mandin P, Majdalani N, Gottesman S, Woodson SA. (2010). Positive regulation by small RNAs and the role of Hfq. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **107**: 9602-7

Sorek R, Kunin V, Hugenholtz P. (2008). CRISPR--a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea. *Nat Rev Microbiol*. **6**: 181-6.

Sprenger GA. (1995). Genetics of pentose-phosphate pathway enzymes of Escherichia coli K-12. *Arch Microbiol*. **164**: 324-30.

Squires CL, Zaporojets D. (2000). Proteins shared by the transcription and translation machines. *Annu Rev Microbiol*. **54**:775-98.

Stokes NR, Murray HD, Subramaniam C, Gourse RL, Louis P, Bartlett W, Miller S, Booth IR. (2003). A role for mechanosensitive channels in survival of stationary phase: regulation of channel expression by RpoS. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **100**: 15959-64.

Stougaard P, Molin S, Nordström K. (1981). RNAs involved in copy-number control and incompatibility of plasmid R1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **78**: 6008-12.

Strøm, A. R., and I. Kaasen (1993). Trehalose metabolism in *Escherichia coli*: stress protection and stress regulation of gene expression. *Mol Microbiol*. **8**: 205-210.

Stüdemann A, Noirclerc-Savoye M, Klauck E, Becker G, Schneider D, Hengge R. (2003). Sequential recognition of two distinct sites in sigma(S) by the proteolytic targeting factor RssB and ClpX. *EMBO J*. **22**: 4111-20.

Studier FW. (1975). Genetic mapping of a mutation that causes ribonucleases III deficiency in Escherichia coli. *J Bacteriol*. **124**: 307-16.

Sudarsan N, Lee ER, Weinberg Z, Moy RH, Kim JN, Link KH, Breaker RR. (2008). Riboswitches in eubacteria sense the second messenger cyclic di-GMP. *Science* **321**: 411-3.

Sun X, Wartell RM. (2006). Escherichia coli Hfq binds A18 and DsrA domain II with similar 2:1 Hfq6/RNA stoichiometry using different surface sites. *Biochemistry* **45**: 4875-87.

Sunohara T, Jojima K, Tagami H, Inada T, Aiba H. (2004). Ribosome stalling during translation elongation induces cleavage of mRNA being translated in Escherichia coli. *J Biol Chem*. **279**: 15368-75.

Suzuki K, Wang X, Weilbacher T, Pernestig AK, Melefors O, Georgellis D, Babitzke P, Romeo T. (2002). Regulatory circuitry of the CsrA/CsrB and BarA/UvrY systems of Escherichia coli. *J Bacteriol*. **184**: 5130-40.

Suzuki K, Babitzke P, Kushner SR, 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**: 2605-17.

Takayanagi, Y., K. Tanaka, and H. Takahashi (1994). Structure of the 5 ´upstream region and the regulation of the *rpoS* gene of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet*. **243**: 525-531.

Tanaka, K., Y. Takayanagi, N. Fujita, A. Ishihama, and H. Takahashi (1993). Heterogeneity of the principal sigma factor in *Escherichia coli*: the *rpoS* gene product, σ38, is a second principal sigma factor of RNA polymerase in stationary phase *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 3511-3515.

Tanaka, K., S. Kusano, N. Fujita, A. Ishihama, and H. Takahashi (1995). Promoter determinants for *Escherichia coli* RNA polymerase holoenzyme containing σ38 (the *rpoS* gene product). *Nucl. Acids Res*. **23**: 827-834.

Tani TH, Khodursky A, Blumenthal RM, Brown PO, Matthews RG. (2002). Adaptation to famine: a family of stationary-phase genes revealed by microarray analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **99**: 13471-6.

Teich, A., S. Meyer, H. Y. Lin, L. Andersson, S. O. Enfors, and P. Neubauer (1999). Growth rate related concentration changes of the starvation response regulators σS and ppGpp in glucose-limited fed-batch and continuous cultures of *Escherichia coli*. *Biotechnol Progr*. **15**: 123-129.

Thompson KM, Rhodius VA, Gottesman S. (2007). SigmaE regulates and is regulated by a small RNA in Escherichia coli. *J Bacteriol*. **189**: 4243-56.

Tomizawa J, Itoh T, Selzer G, Som T. (1981). Inhibition of ColE1 RNA primer formation by a plasmid-specified small RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **78**: 1421-5.

Tramonti, A., P. Visca, M. De Canio, M. Falconi, and D. De Biase (2002). Functional characterization and regulation of *gadX*, a gene encoding an AraC/XylS-like transcriptional activator of the *Escherichia coli* glutamic acid decarboxylase system. *J Bacteriol*. **184**: 2603-2613.

Tramonti, A., M. De Canio, I. Delany, V. Scarlato, and D. De Biase (2006). Mechanisms of transcription activation exerted by GadX and GadW at the *gadA* and *gadBC* gene promoters of the glutamate-based acid resistance system in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. **188**: 8118-8127.

Tramonti A, De Canio M, De Biase D. (2008). GadX/GadW-dependent regulation of the Escherichia coli acid fitness island: transcriptional control at the gadY-gadW divergent promoters and identification of four novel 42 bp GadX/GadW-specific binding sites. *Mol Microbiol*. **70**: 965-82.

Tran L, van Baarsel JA, Washburn RS, Gottesman ME, Miller JH. (2011). Single-gene deletion mutants of Escherichia coli with altered sensitivity to bicyclomycin, an inhibitor of transcription termination factor Rho. *J Bacteriol*. **193**: 2229-35.

Trotochaud AE, Wassarman KM. (2004). 6S RNA function enhances long-term cell survival. *J Bacteriol*. **186**: 4978-85.

Trotochaud AE, Wassarman KM. (2005). A highly conserved 6S RNA structure is required for regulation of transcription. *Nat Struct Mol Biol*. **12**: 313-9.

Tsai CJ, Sauna ZE, Kimchi-Sarfaty C, Ambudkar SV, Gottesman MM, Nussinov R. (2008). Synonymous mutations and ribosome stalling can lead to altered folding pathways and distinct minima. *J Mol Biol*. **383**: 281-91.

Tsui, H.-C. T., H.-C. L. Leung, and M. E. Winkler (1994). Characterization of broadly pleiotropic phenotypes caused by an *hfq* insertion mutation in *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol*. **13**: 35-49.

Tu X, Latifi T, Bougdour A, Gottesman S, Groisman EA. (2006). The PhoP/PhoQ two-component system stabilizes the alternative sigma factor RpoS in Salmonella enterica. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **103**: 13503-8.

Tuller T, Carmi A, Vestsigian K, Navon S, Dorfan Y, Zaborske J, Pan T, Dahan O, Furman I, Pilpel Y. (2010). An evolutionarily conserved mechanism for controlling the efficiency of protein translation. *Cell* **141**: 344-54.

Typas, A., C. Barembruch, and R. Hengge (2007a). Stationary phase reorganisation of the *E.coli* transcription machinery by Crl protein, a fine-tuner of σS activity and levels. *EMBO J*. **26**: 1569-1578.

Typas, A., G. Becker, and R. Hengge (2007b). The molecular basis of selective promoter activation by the σS subunit of RNA polymerase. *Mol Microbiol*. **63**: 1296-1306.

Typas, A., and R. Hengge (2005). Differential ability of σS and σ70 of *Escherichia coli* to utilize promoters containing half or full UP-element sites. *Mol Microbiol*. **55**: 250-260.

Typas, A., and R. Hengge (2006). Role of the spacer between the -35 and -10 region in σS promoter selectivity in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. **59**: 1037-1051.

Udekwu KI, Darfeuille F, Vogel J, Reimegård J, Holmqvist E, Wagner EG. (2005). Hfq-dependent regulation of OmpA synthesis is mediated by an antisense RNA. *Genes Dev*. **19**: 2355-66.

Udekwu KI, Wagner EG. (2007). Sigma E controls biogenesis of the antisense RNA MicA. *Nucleic Acids Res*. **35**: 1279-88.

Ueguchi C, Misonou N, Mizuno T. (2001). Negative control of rpoS expression by phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system in Escherichia coli. *J Bacteriol*. **183**: 520-7.

Urban JH, Papenfort K, Thomsen J, Schmitz RA, Vogel J. (2007). A conserved small RNA promotes discoordinate expression of the glmUS operon mRNA to activate GlmS synthesis. *J Mol Biol*. **373**: 521-8.

Urban JH, Vogel J. (2007). Translational control and target recognition by Escherichia coli small RNAs in vivo. *Nucleic Acids Res*. **35**: 1018-37.

Urban JH, Vogel J. (2008). Two seemingly homologous noncoding RNAs act hierarchically to activate glmS mRNA translation. *PLoS Biol*. **6:** e64.

Updegrove T, Wilf N, Sun X, Wartell RM. (2008). Effect of Hfq on RprA-rpoS mRNA pairing: Hfq-RNA binding and the influence of the 5' rpoS mRNA leader region. *Biochemistry* **47**: 11184-95.

Uptain, S. M., C. M. Kane and M. J. Chamberlin (1997). Basic mechanisms of transcriptelongation and its regulation. *Annual Reviews of Biochemistry* **66**: 117-172.

Uzzau, S., Figueroa-Bossi, N., Rubino, S. & Bossi, L. (2001). Epitope tagging of chromosomal genes in *Salmonella*. *Proc Nat Acad Sci U.S.A.* **98**: 15264–15269.

Valentin-Hansen P, Eriksen M, Udesen C. (2004). The bacterial Sm-like protein Hfq: a key player in RNA transactions. *Mol Microbiol*. **51:** 1525-33

van der Oost J, Jore MM, Westra ER, Lundgren M, Brouns SJ. (2009). CRISPR-based adaptive and heritable immunity in prokaryotes. *Trends Biochem Sci*. **34**: 401-7.

Van Melderen L, Aertsen A. (2009). Regulation and quality control by Lon-dependent proteolysis. *Res Microbiol*. **160**: 645-51.

Varmus HE, Perlman RL, Pastan I. (1971). Regulation of lac transcription in antibiotic-treated E. coli. *Nat New Biol*. **230**: 41-4.

Vassylyev, D. G., Sekine, S., Laptenko, O., Lee, J., Vassylyeva, M.N., Borukhov, S. & Yokoyama, S. (2002). Crystal structure of a bacterial RNA polymerase holoenzymeat 2.6 Å resolution. *Nature* **417**: 712-719.

Vecerek B, Moll I, Bläsi U. (2007). Control of Fur synthesis by the non-coding RNA RyhB and iron-responsive decoding. *EMBO J*. **26**: 965-75.

Viegas SC, Pfeiffer V, Sittka A, Silva IJ, Vogel J, Arraiano CM. (2007). Characterization of the role of ribonucleases in Salmonella small RNA decay. *Nucleic Acids Res*. **35**: 7651-64.

Vogel J, Papenfort K. (2006). Small non-coding RNAs and the bacterial outer membrane. *Curr Opin Microbiol*. **9**: 605-11.

Vrentas CE, Gaal T, Ross W, Ebright RH, Gourse RL. (2005). Response of RNA polymerase to ppGpp: requirement for the omega subunit and relief of this requirement by DksA. *Genes Dev*. **19**:2378-87.

Vytvytska O, Moll I, Kaberdin VR, von Gabain A, Bläsi U. (2000). Hfq (HF1) stimulates ompA mRNA decay by interfering with ribosome binding. *Genes Dev*. **14**: 1109-18.

Wade, J. T., D. C. Roa, D. C. Grainger, D. Hurd, S. J. Busby, K. Struhl, and E. Nudler (2006). Extensive functional overlap between sigma factors in *Escherichia coli*. *Nat. Struct. Mol. Biol* **13**: 806-814.

Wagner, R. (2000). Transcription Regulation in Prokaryotes. Oxford, Oxford University Press

Wagner EG, Altuvia S, Romby P. (2002). Antisense RNAs in bacteria and their genetic elements. *Adv Genet*. **46**:361-98.

Waldburger C, Gardella T, Wong R, Susskind MM. (1990). Changes in conserved region 2 of Escherichia coli sigma 70 affecting promoter recognition. *J Mol Biol*. **215**: 267-76.

Wang, X., A. K. Dubey, K. Suzuki, C. S. Baker, P. Babitzke, and T. Romeo. (2005). CsrA post-transcriptionally represses *pgaABCD*, responsible for synthesis of a biofilm polysaccharide adhesin of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. **56**: 1648–1663.

Wang Z, Gerstein M, Snyder M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet*. **10**: 57-63.

Wassarman KM, Repoila F, Rosenow C, Storz G, Gottesman S. (2001). Identification of novel small RNAs using comparative genomics and microarrays. *Genes Dev*. **15**: 1637-51.

Wassarman KM, Storz G. (2000). 6S RNA regulates E. coli RNA polymerase activity. *Cell* **101**: 613-23.

Wassarman KM, Saecker RM. (2006). Synthesis-mediated release of a small RNA inhibitor of RNA polymerase. *Science* **314**: 1601-3.

Wassarman KM. (2007). 6S RNA: a regulator of transcription. *Mol Microbiol*. **65**: 1425-31.

Waters LS, Storz G. (2009) Regulatory RNAs in bacteria. *Cell*. **136**: 615-28.

Weber A, Jung K. (2002). Profiling early osmostress-dependent gene expression in Escherichia coli using DNA macroarrays. *J Bacteriol*. **184**: 5502-7.

Weber A, Kögl SA, Jung K. (2006a). Time-dependent proteome alterations under osmotic stress during aerobic and anaerobic growth in Escherichia coli. *J Bacteriol*. **188**: 7165-75.

Weber, H., T. Polen, J. Heuveling, V. Wendisch, and R. Hengge (2005). Genome-wide analysis of the general stress response network in *Escherichia coli*: σS-dependent genes, promoters and sigma factor selectivity. *J Bacteriol*. **187**: 1591-1603.

Weber H, Pesavento C, Possling A, Tischendorf G, Hengge R. (2006b) Cyclic-di-GMP-mediated signalling within the sigma network of Escherichia coli. *Mol Microbiol*. **62**: 1014-34.

Wei BL, Brun-Zinkernagel AM, Simecka JW, Prüss BM, Babitzke P, Romeo T. (2001). Positive regulation of motility and flhDC expression by the RNA-binding protein CsrA of Escherichia coli. *Mol Microbiol*. **40**: 245-56.

Weichart, D., R. Lange, N. Henneberg, and R. Hengge-Aronis (1993). Identification and characterization of stationary phase-inducible genes in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. **10**: 407-420.

Weilbacher, T., K. Suzuki, A. K. Dubey, X. Wang, S. Gudapaty, I. Morozov, C. S. Baker, D. Georgellis, P. Babitzke, and T. Romeo. (2003). A novel sRNA component of the carbon storage regulatory system of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. **48**: 657–670.

Wigneshweraraj, S., D. Bose, P. C. Burrows, N. Joly, J. Schumacher, M. Rappas, T. Pape, X. Zhang, P. Stockley, K. Severinov & M. Buck, (2008) Modus operandi of the bacterial RNA polymerase containing the sigma54 promoter-specificity factor. *Mol Microbiol* **68**: 538-546.

Wise, A., R. Brems, V. Ramakrishnan, and M. Villarejo (1996). Sequences in the -35 region of *Escherichia coli rpoS*-dependent genes promote transcription by EσS. *J Bacteriol*. **178**: 2785-2793.

Wood, JM. (2011). Osmotic Stress In: Storz G, Hengge R, eds. Bacterial Stress Responses. Washington D.C.: ASM Press: xx-xx.

Wool IG. (1996). Extraribosomal functions of ribosomal proteins. *Trends Biochem Sci*. **21**: 164-5.

Wu X, Jörnvall H, Berndt KD, Oppermann U. (2004). Codon optimization reveals critical factors for high level expression of two rare codon genes in Escherichia coli: RNA stability and secondary structure but not tRNA abundance. *Biochem Biophys Res Commun*. **313**: 89-96.

Wu LF, Saier Jr. MH. (1991). Differences in codon usage among genes encoding proteins of different function in *Rhodobacter capsulatus*. *Res Microbiol*. **142**: 943-9.

Wu X, Wu S, Li D, Zhang J, Hou L, Ma J, Liu W, Ren D, Zhu Y, He F. (2010). Computational identification of rare codons of Escherichia coli based on codon pairs preference. *BMC Bioinformatics* **11**: 61.

Wurm R, Neusser T, Wagner R (2010). 6S RNA-dependent inhibition of RNA polymerase is released by RNA-dependent synthesis of small de novo products. *Biol Chem*. **391**: 187-96.

Yamamoto K, Hirao K, Oshima T, Aiba H, Utsumi R, Ishihama A. (2005). Functional characterization in vitro of all two-component signal transduction systems from Escherichia coli. *J Biol Chem*. **280**: 1448-56.

Yamashino, T., C. Ueguchi, and T. Mizuno (1995). Quantitative control of the stationary phase-specific sigma factor, σS, in *Escherichia coli*: involvement of the nucleoid protein H-NS. *EMBO J*. **14**:594-602.

Yarchuk O, Jacques N, Guillerez J, Dreyfus M. (1992). Interdependence of translation, transcription and mRNA degradation in the lacZ gene. *J Mol Biol*. **226**: 581-96.

Yim, H. H., and M. Villarejo (1992). *osmY*, a new hyperosmotically inducible gene, encodes a periplasmic protein in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. **174**:3637-3644.

Zellars M, Squires CL (1999). Antiterminator-dependent modulation of transcription elongation rates by NusB and NusG. *Mol Microbiol*. **32**: 1296-304.

Zhang A, Altuvia S, Tiwari A, Argaman L, Hengge-Aronis R, Storz G. (1998). The OxyS regulatory RNA represses rpoS translation and binds the Hfq (HF-I) protein. *EMBO J*. **17**: 6061-8.

Zhang G, Hubalewska M, Ignatova Z. (2009). Transient ribosomal attenuation coordinates protein synthesis and co-translational folding. *Nat Struct Mol Biol*. **16**: 274-80.

Zhang G, Ignatova Z. (2011). Folding at the birth of the nascent chain: coordinating translation with co-translational folding. *Curr Opin Struct Biol*. **21**: 25-31.

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

Zhang A, Wassarman KM, Rosenow C, Tjaden BC, Storz G, Gottesman S. (2003). Global analysis of small RNA and mRNA targets of Hfq. Mol Microbiol. **50**: 1111-24.

Zhao M, Zhou L, Kawarasaki Y, Georgiou G. (2006). Regulation of RraA, a protein inhibitor of RNase E-mediated RNA decay. *J Bacteriol*. **188**: 3257-63.

Zhou Y, Gottesman S. (1998). Regulation of proteolysis of the stationary-phase sigma factor RpoS. *J Bacteriol*. **180**: 1154-8.

Zhou Y, Gottesman S, Hoskins JR, Maurizi MR, Wickner S. (2001). The RssB response regulator directly targets sigma(S) for degradation by ClpXP. *Genes Dev*. **15**: 627-37.

Zhou Y, Gottesman S. (2006). Modes of regulation of RpoS by H-NS. *J Bacteriol*. **188**: 7022-5.