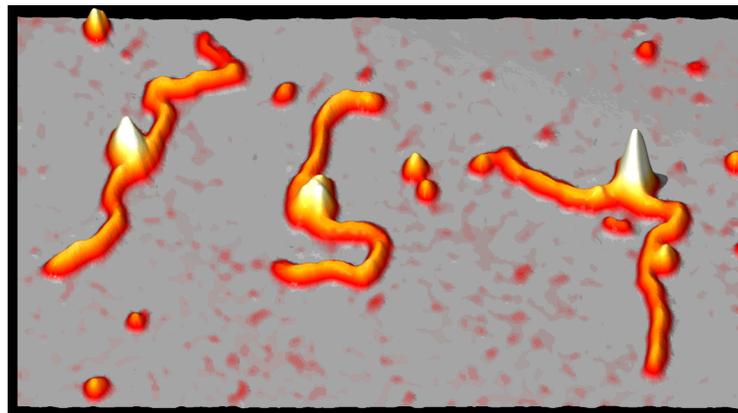


Regulation der Transkription aus der Distanz: Untersuchungen an einem prokaryotischen Promotor-Enhancer-System



Alexandra Schulz

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlichen-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Diplom-Biologin Alexandra Schulz
aus Tönisvorst

Tag der mündlichen Prüfung: 29.10.1999

Gutachter: Prof. Dr. Jörg Langowski
Prof. Dr. Ekkehardt Bautz

Danksagung

Dr. Karsten Rippe gilt besonderer Dank für die Einarbeitung in das Thema, die Betreuung der Arbeit und viele Antworten auf Fragen zu molekularbiologischen und biophysikalischen Methoden sowie Macintosh-Computern. Seine Begeisterung und sein Lob haben viel zum Gelingen der Arbeit beigetragen, denn: "Es geht doch!"

Prof. Dr. Jörg Langowski danke ich für die wissenschaftliche Unterstützung, wertvolle thematische Anregungen und die guten Arbeitsbedingungen.

Prof. Dr. Ekkehard K. F. Bautz danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferats.

Norbert Mücke danke ich für seine Hilfe bei der Rasterkraftmikroskopie und viele physikalische und technische Erklärungen.

Nathalie Brun danke ich für die gute Zusammenarbeit im Labor, das Teilen von Puffern und anderen Reagenzien, ihre Unterstützung bei der HPLC-Aufreinigung von DNA-Fragmenten und für manche lustige Geschichte.

Den nicht namentlich genannten Mitarbeitern der Abteilung Biophysik der Makromoleküle danke ich für die gute Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Dr. Claudia Pfannschmidt sei herzlich gedankt für das sorgfältige Korrekturlesen, wertvolle Anregungen und ihre Aufmunterungen auf mündlichem und elektronischem Wege.

Andreas Hunziker danke ich für das sorgfältige Sequenzieren der Transkriptionsplasmide.

Mein herzlichster Dank gilt meinen Eltern, die mir diesen Weg ermöglichten und mir Vertrauen gaben, das gesteckte Ziel zu erreichen.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Februar 1996 bis Juni 1999 in der Abteilung Biophysik der Makromoleküle (Leitung Prof. Dr. Jörg Langowski) am Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg angefertigt.

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	1
1. Zweikomponenten-Signaltransduktionssysteme	3
2. Das Aktivatorprotein NtrC	4
3. Transkriptionsaktivierung von RNAP- σ^{54} durch NtrC.	6
4. Das <i>glnALG</i> -Operon	7
5. Das Modellsystem	8
6. Die lokale Konzentration des Enhancers in der Nähe des Promotors	10
7. Einfluß der DNA-Konformation auf die lokale Konzentration	11
8. Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit	15
Material und Methoden	17
1. Chemikalien und Verbrauchsmaterial	17
2. Mikrobiologische Methoden	18
2.1 Bakterienstämme	18
Bakterienstamm für die Proteinexpression	18
Bakterienstamm für die Plasmidpräparation	19
2.2 Plasmide und DNA-Oligonukleotid-Duplexe	19
Übersicht der verwendeten Plasmide	19
Übersicht der verwendeten Oligonukleotide	20
Plasmide für die Proteinexpression	21
Plasmid für Rasterkraftmikroskopie.	22
Plasmide für die Transkriptionsexperimente	22
2.3 Nährmedien und Glycerinkulturen.	24
Nährmedien	25
Selektivmedien	25
Glycerinkulturen.	25
2.4 Transformation	25
2.5 Plasmidfermentation	26
3. DNA-Präparation.	27
3.1 Plasmid Mini- und Maxipräparation	27
Minipräparation	27
Maxipräparation	27
3.2 Konzentrationsbestimmung der DNA	28
3.3 Analytische Agarosegele und Chloroquingele	29
Agarosegele	29
Chloroquingele	29
3.4 Gelextraktion der Plasmid-Monomere aus Agarosegelen	31
3.5 DNA-Restriktionsspaltungen.	32
3.6 Nichtdenaturierende Polyacrylamidgele	33
3.7 Gelextraktion von DNA-Fragmenten aus Polyacrylamidgelen	33
3.8 HPLC-Aufreinigung der DNA	34
3.9 DNA-Sequenzierreaktion	34

3.10 DNA-Sequenziergel (Harnstoff-Polyacrylamidgel).	35
3.11 DNA-Modifikationen	37
DNA-Dephosphorylierung.	37
Auffüllen der überhängenden Enden mit Klenow-Polymerase	37
DNA-Ligation	37
Topoisomerase-Reaktion.	38
Herstellung von Topoisomeren	39
4. Proteinexpression und -aufreinigung	39
4.1 Proteinexpression.	39
Expressionstest.	40
4.2 Proteinaufreinigung.	41
Zellaufschluß.	41
Affinitätschromatographie	41
Ionenaustauschchromatographie.	43
Konzentrationsbestimmung der Proteine	44
SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).	44
Gelfärbung/Entfärbung	45
Konservierung gefärbter Polyacrylamidgele.	46
5. Rasterkraftmikroskopie.	46
5.1 Aufbau und Funktionsweise des Rasterkraftmikroskops.	46
Interaktion zwischen Spitze und Probe	48
Auflösung – Einfluß der Spitzengeometrie	49
SFM-Flüssigkeitszelle	51
5.2 Rasterkraftmikroskopie von RNAP- σ^{54} und DNA	52
Bildanalyse.	53
Datenanalyse.	53
Analyse der RNAP- σ^{54} -Bindungsstelle	54
Messung des DNA-Verbiegungswinkels.	54
Messung der DNA-Konturlänge	55
Bestimmung der Persistenzlänge	56
6. Transkriptionsexperimente	56
6.1 Aktivitätsbestimmung der aufgereinigten Proteine.	56
6.2 Transkriptionskinetiken.	58
Transkriptionsreaktion	58
Autoradiographie	59
Phosphorimager-Auswertung	59
Theoretische Analyse der DNA-Krümmung.	60
Ergebnisse	61
1. Proteinexpression und -aufreinigung	61
1.1 Erstellung des Expressionsvektors für wt-NtrC	61
1.2 Proteinexpression.	61
1.3 Native Proteinaufreinigung	63
1.3 Konzentrationsbestimmung der Proteine.	66
1.4 Aktivitätstest der Proteine	66
2. Analytische Ultrazentrifugation	68
3. Rasterkraftmikroskopie.	70

3.1 Rasterkraftmikroskopaufnahmen	70
3.2 Position der Bindung der RNAP· σ^{54}	73
3.3 Konformation des geschlossenen RNAP· σ^{54} -DNA-Komplexes	75
3.4 DNA-Verbiegungswinkel der RNAP· σ^{54} -DNA-Komplexe	77
3.5 DNA-Persistenzlänge	82
3.6 Messung der DNA-Konturlänge	83
4. Transkriptionsexperimente	87
4.1 Charakterisierung der Transkriptionsplasmide	87
4.2 Transkriptionskinetiken	89
Abstand Enhancer-Promotor	93
Position der Krümmung	94
Unterschiede zwischen superhelikalen und linearisierten Plasmiden	95
4.3 Analyse der DNA-Krümmung	97
Diskussion	99
1. Proteinaufreinigung und -aktivität	100
2. Analytische Ultrazentrifugation	101
3. Rasterkraftmikroskopie	102
3.1 DNA-Bindungsstelle von RNAP· σ^{54}	104
3.2 Verbiegungswinkel der RNAP· σ^{54}	105
3.3 Messungen der DNA-Konturlänge von RNAP· σ^{54} -DNA-Komplexen	107
3.4 Modell für den geschlossenen Komplex von RNAP· σ^{54}	110
4. Transkriptionsexperimente	112
4.1 Transkriptionsplasmide	114
4.2 Transkriptionskinetiken superhelikaler und linearisierter Plasmide	115
Vergleich superhelikaler und linearisierter Plasmide	116
Vergleich linearer DNA mit und ohne Krümmung	118
Vergleich superhelikaler Plasmide mit und ohne Krümmung	118
Plasmide mit erhöhter Aktivierungsrate	120
5. Abschließende Bemerkungen und Ausblick	121
Zusammenfassung	123
Anhang	125
1. Plasmidkarten der Expressionsplasmide	125
2. Plasmidkarten der Transkriptionsplasmide	127
3. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	134
Literaturverzeichnis	137
Stichwortverzeichnis	147

Verzeichnis der Abbildungen

1.1	Aktivierung des RNA-Polymerase II-Transkriptionskomplexes durch Enhancer	2
1.2	Domänen des Aktivatorproteins NtrC	5
1.3	Das <i>glnALG</i> -Operon	7
1.4	Das Modellsystem	9
1.5	Molare lokale Konzentration j_M	11
1.6	Interaktion von Enhancer und Promotor an verschiedenen DNA-Konformationen . . .	13
2.1	Restriktionsstellen des gekrümmten Oligonukleotid-Duplexes	23
2.2	Detektion der Änderung der Schwingungsamplitude	47
2.3	Verschiedene Definitionen der Auflösung für das Rasterkraftmikroskop	49
2.4	Einfluß der Spitzegeometrie auf das mikroskopische Abbild	50
2.5	Schematische Darstellung einer Zelle für Messungen in Flüssigkeit	51
2.6	Definition des DNA-Verbiegungswinkels θ	55
2.7	Auswertung der SFM-Bilder	55
3.1	Überexpression von wt-NtrC aus Plasmid pNTRC-3	62
3.2	Überexpression von σ^{54} aus Plasmid pS54-2	63
3.3	Native Proteinaufreinigung von wt-NtrC mit (His) ₆ -Peptid	64
3.4	Native Proteinaufreinigung von σ^{54} mit (His) ₆ -Peptid	65
3.5	Überprüfung der Aktivität durch <i>in vitro</i> -Transkriptionsexperimente	67
3.6	DNA-Fragment für die Rasterkraftmikroskopie	70
3.7	RNAP· σ^{54} -DNA-Komplexe	71
3.8	Spezifische RNAP· σ^{54} -Komplexe am <i>glnA</i> -Promotor	72
3.9	Histogramm der Bindungsposition von RNAP· σ^{54}	74
3.10	Beobachtete Konformationen des geschlossenen RNAP· σ^{54} -DNA-Komplexes	76
3.11	Histogramm der Verbiegungswinkel der RNAP· σ^{54} -DNA-Komplexe	78
3.12	Histogramm des intrinsischen DNA-Verbiegungswinkels am <i>glnA</i> -Promotor	80
3.13	Histogramm der Verbiegungswinkel der NtrC-DNA-Komplexe	81
3.14	Verteilung der End-zu-End-Abstände der freien DNA	82
3.15	Histogramm der gemessenen Konturlängen der Proben in Flüssigkeit	84
3.16	Histogramm der gemessenen Konturlängen der Proben in Luft	85
3.17	Anomales Laufverhalten der gekrümmten DNA-Fragmente	87
3.18	Beispiele für Phosphorimagerbilder der Transkriptionskinetiken	89
3.19	Beispiele für die quantitative Auswertung der Phosphorimagerbilder	90
3.20	Abhängigkeit der Aktivierungsrate vom Abstand Enhancer-Promotor	93

3.21	Abhängigkeit der Aktivierungsrate von der Position der Krümmung	94
3.22	Aktivierungsrate der linearisierten Plasmide	95
3.23	Verhältnis der Aktivierungsrate superhelikaler gegenüber linearisierten Plasmiden . .	96
3.24	Krümmung der DNA zwischen Enhancer und Promotor.	97
4.1	Hydrodynamische Modelle von NtrC.	101
4.2	Modell des geschlossenen Komplexes der RNAP· σ^{54}	111
4.3	Schematische Darstellung des Ablaufs der <i>in vitro</i> -Transkriptionsreaktion	113
4.4	Gekrümmtes Oligonukleotid-Duplex AS5-AS6	115
4.5	Typische Plasmidkonformationen im thermodynamischen Gleichgewicht.	119

Verzeichnis der Tabellen

2.1	Extinktionskoeffizienten der verwendeten Oligonukleotide	28
3.1	Konzentration der aufgereinigten Proteine	66
3.2	Ergebnisse der analytischen Ultrazentrifugation	69
3.3	Verteilung der verschiedenen Bindungsorte der RNAP· σ^{54} auf der DNA	75
3.4	Verteilung der Konformationen im geschlossenen RNAP· σ^{54} -DNA-Komplex	77
3.5	Verbiegungswinkel ($^{\circ}$) der RNAP· σ^{54} -DNA-Komplexe und der freien Promotor-DNA	79
3.6	Gemessene Konturlänge (nm) der RNAP· σ^{54} -DNA-Komplexe und freier DNA	86
3.7	Vergleich der tatsächlichen und scheinbaren Länge der gekrümmten DNA-Fragmente	88
3.8	Ergebnisse der Transkriptionsexperimente und strukturelle Merkmale der Plasmide	91
3.9	ΔLk und Superhelixdichte (σ) der verwendeten Plasmide	92
3.10	Vergleich der Aktivierungsraten superhelikaler und linearisierter Plasmide	96
4.1	Vergleich der berechneten lokalen Konzentration mit ausgewählten Plasmiden.	116

Einleitung

Bei allen Organismen wird Entwicklung, Wachstum und Metabolismus zu einem wesentlichen Teil auf der Ebene der Transkription reguliert. In Eukaryoten erfolgt die Steuerung der Genexpression durch Fernwechselwirkungen, d. h. die regulatorischen Proteinfaktoren sind weit entfernt von ihrem Zielpromotor auf der DNA gebunden (Pugh, 1996; Greenblatt, 1997; Ptashne & Gann, 1997; Myer & Young, 1998; Blackwood & Kadonaga, 1998; Hampsey & Reinberg, 1999). Die Initiation der Transkription ist dabei ein wichtiger Schlüsselschritt. Dieser Prozeß wird in der Regel durch Aktivatorproteine gesteuert, die an spezifische DNA-Sequenzen (Enhancer) binden und durch Wechselwirkung mit dem am Promotor gebundenen Transkriptionskomplex die Transkription starten. Dabei kann die Distanz zwischen Enhancer und Promotor auf der DNA *in vivo* mehrere Tausend Basenpaare betragen. Der Kontakt zwischen am Enhancer und Promotor gebundenen Proteinen kann unter Schleifenbildung der DNA (DNA-Looping) erfolgen (Abb. 1.1; Ptashne, 1986; Müller *et al.*, 1989; Dunaway & Dröge, 1989). In Eukaryoten ist dieser Vorgang wahrscheinlich ein allgemeines, äußerst wichtiges Regulationsprinzip (Ptashne & Gann, 1997; Blackwood & Kadonaga, 1998). Für das Verständnis des Mechanismus der Transkriptionsinitiation sind quantitative biophysikalische Untersuchungen mit genau definierten Proteinkomponenten notwendig. Diese lassen sich mit den komplexen eukaryotischen Systemen nur schwer durchführen. Es existieren jedoch bei Prokaryoten verschiedene Gene, deren Expression ebenfalls durch Fernwechselwirkung reguliert wird. Diese Systeme sind viel einfacher und lassen allgemeine Schlüsse auf den Einfluß der DNA-Struktur und der Wechselwirkung der Proteine auf die Regulation der Transkription aus der Distanz zu. Bei diesen Promotoren sind die Bindungsstellen für die notwendigen Aktivatorproteine so lokalisiert, daß eine Interaktion mit der RNA-Polymerase am Promotor eine Schleifenbildung der DNA erfordert (Reitzer *et al.*, 1989; Su *et al.*, 1990; Wedel *et al.*, 1990; Collado-Vides *et al.*, 1991; Gralla, 1991; Porter *et al.*, 1993; Gralla & Collado-Vides, 1996). Diese Promotoren sind durch eine Konsensussequenz charakterisiert, die eine besondere Form des RNA-Polymerase-

rase-Holoenzym erfordert (Hunt & Magasanik, 1985; Hirschman *et al.*, 1985; Ausubel, 1984). Sie enthält den alternativen Sigma-Faktor σ^{54} , der für die Promotorerkennung verantwortlich ist.

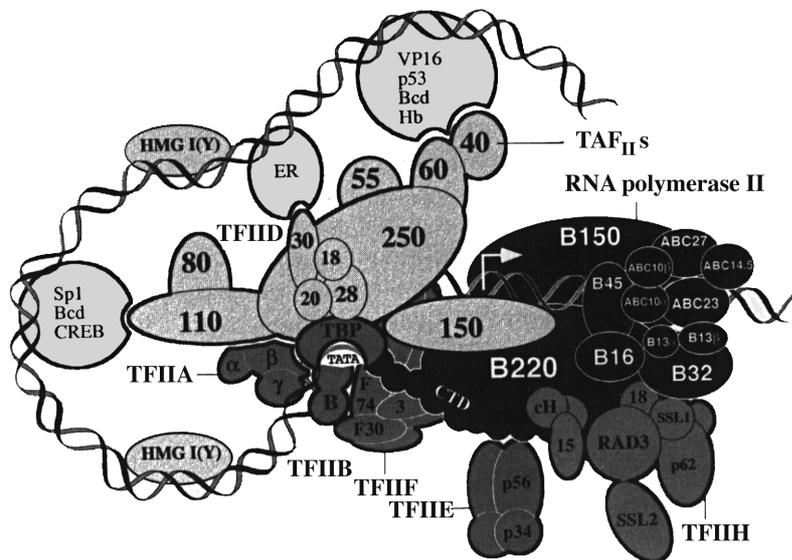


Abb. 1.1 Aktivierung des RNA-Polymerase II-Transkriptionskomplexes durch Enhancer

Die Abbildung zeigt einige der zahlreichen beteiligten Proteinfaktoren des RNA-Polymerase II-Transkriptionskomplexes sowie genspezifische Aktivatorproteine (VP16, Sp1, etc.), die an der DNA-Enhancersequenz gebunden haben. Deutlich erkennbar ist die Komplexität des Systems, die *in vitro*-Transkriptionsexperimente äußerst schwierig macht. Das Bild wurde aus Pugh (1996) entnommen. In den letzten Jahre wurden weitere beteiligte Proteinfaktoren identifiziert.

In *E. coli* besteht der aktive Polymerasekomplex normalerweise aus dem Minimalenzym (Core-Enzym, RNAP) mit den Untereinheiten $\alpha_2\beta\beta'$ und dem σ^{70} -Faktor (RNAP· σ^{70}). Dieses Holoenzym benötigt im einfachsten Fall nur eine geeignete Promotorsequenz, an die es bindet, und kann dann ohne Hilfe von Aktivatorproteinen und anderen Kofaktoren die Transkription starten. Ein bekanntes Beispiel zur Regulation der RNAP· σ^{70} -Aktivität ist das *lac*-Operon, das Gene zum Abbau von Lactose enthält. Durch Bindung des *lac*-Repressors an den entsprechenden Promotor kann in diesem System die Bindung der Polymerase unterdrückt werden (Schlax *et al.*, 1995 sowie dort enthaltene Referenzen). Anstelle des σ^{70} -Faktors können auch verschiedene alternative σ -Faktoren, wie das σ^{54} -Protein, an das Core-Enzym der RNA-Polymerase binden. Diese Faktoren erkennen andere Promotorsequenzen, wodurch die Möglichkeiten zur Transkriptionsregulation erweitert werden. Im Gegensatz zu RNAP· σ^{70} kann RNAP· σ^{54} (RNA-Polymerase plus σ^{54}) die Transkription nicht ohne Hilfe eines Aktivatorproteins starten. Die Interaktion zwischen Polymerase und dem Aktivatorprotein erfolgt unter Schleifenbildung

der DNA (Reitzer & Magasanik, 1986; Reitzer *et al.*, 1989; Su *et al.*, 1990; Wedel *et al.*, 1990; Gralla & Collado-Vides, 1996; Rippe *et al.*, 1997). Aus Sequenzanalysen ist bekannt, daß σ^{54} bestimmte Sequenzmotive wie Regionen saurer Aminosäuren, glutaminreiche Bereiche und hydrophobe Wiederholungen besitzt, die als wichtig für die Aktivität eukaryotischer Transkriptionsfaktoren angesehen werden (Sasse-Dwight & Gralla, 1990; Gralla, 1991; Wong *et al.*, 1994; Tintut *et al.*, 1994; Hsieh & Gralla, 1994; Hsieh *et al.*, 1994). Dadurch unterscheidet sich σ^{54} stark vom σ^{70} -Faktor (Merrick & Gibbins, 1985; Popham *et al.*, 1991). Unter anderem werden σ^{54} -abhängige Gene bei Stickstoffmangel eingeschaltet (Kustu *et al.*, 1989).

1. Zweikomponenten-Signaltransduktionssysteme

Zur Anpassung an sich schnell ändernde Umweltbedingungen, wie z. B. Stickstoff-, Sauerstoff-, Phosphatmangel und veränderte Osmolarität der Umgebung, haben sich bei Bakterien Paare von Proteinen entwickelt, die sich in zwei große Familien mit weitgehend homologen Proteindomänen einteilen lassen (Nixon *et al.*, 1986; Ronson *et al.*, 1987; Kofoid & Parkinson, 1988; Albright *et al.*, 1989; Stock *et al.*, 1989). Diese sogenannten Zweikomponenten-Signaltransduktionssysteme (im folgenden nur Zweikomponenten-Systeme genannt) spielen eine wichtige Rolle in der koordinierten, umweltabhängigen Regulation vieler zellulärer Vorgänge, die meist über die Transkription gesteuert werden (Stock *et al.*, 1990). Mittlerweile konnten in jedem Organismenreich - Prokaryota, Archaea und Eukaryota - Zweikomponenten-Systeme charakterisiert werden.

Zweikomponenten-Systeme bestehen aus einer sensorischen Komponente (= Modulator) und einer regulatorischen Komponente (= Effektor). Beim Modulator handelt es sich meist um ein membranständiges Protein, das aus einer sensorischen Region, der sogenannten Input-Domäne, und einer ca. 240 Aminosäure langen Transmitter-Domäne besteht. Letztere autophosphoryliert mit Hilfe von ATP, wenn durch den Sensor ein Signal aufgenommen wird. Die Phosphorylierungsstelle ist ein Histidinrest in einem stark konservierten Motiv. Von der Transmitter-Domäne der Histidinkinase wird die Phosphatgruppe auf die Receiver-Domäne des Effektors übertragen. Dort befindet sich im aktiven Zentrum eine sogenannte saure Tasche, die einen konservierten Aspartatrest besitzt, der phosphoryliert wird. Durch diese Phosphorylierung kommt es zu einer Konformationsänderung der Receiver-Domäne, die auf noch unbe-

kannte Weise die Output-Domäne des Effektors aktiviert. Nun kann das aktivierte Protein auf der Ebene der Transkription wirken, so daß die zellulären Vorgänge den neuen Umweltbedingungen angepaßt werden.

Ein sehr gut untersuchtes Zweikomponenten-System besteht aus den Proteinen NtrB (*nitrogen regulatory protein B*, auch *nitrogen regulator II* oder NR_{II}) und NtrC (*nitrogen regulatory protein C*, auch *nitrogen regulator I* oder NR_I), die im Stickstoffmetabolismus von *E. coli* eine wichtige Rolle spielen. In der Bakterienzelle nimmt das Protein NtrB als nicht membranständiger Modulator (Ronson *et al.*, 1987) über andere Signalproteine den Umweltstimulus (Stickstoffmangel) auf und autophosphoryliert mit Hilfe von ATP am Histidin 139 (Keener & Kustu, 1988). Die Phosphatgruppe wird auf das Aspartat 54 von NtrC übertragen, wodurch das Protein in seine aktivierte Form (NtrC-P) überführt wird (Ninfa & Magasanik, 1986; Keener & Kustu, 1988; Weiss & Magasanik, 1988). Als Effektor dieses Zweikomponenten-Systems kann NtrC nun die Transkription aktivieren.

2. Das Aktivatorprotein NtrC

NtrC zählt zur Proteinfamilie der Aktivatoren für σ^{54} -abhängige Promotoren und besteht aus drei Domänen (Morett & Segovia, 1993; Shingler, 1996). Die N-terminale regulatorische Domäne mit ~120 Aminosäuren besitzt an Position 54 einen Aspartatrest der phosphoryliert wird (Keener & Kustu, 1988; Nixon *et al.*, 1986; Weiss & Magasanik, 1988; Volkman *et al.*, 1995). Durch die Phosphorylierung wird die ATPase-Aktivität des Proteins induziert, und die Transkription kann starten. Die zentrale Domäne mit ~240 Aminosäureresten besitzt ein ATP-Bindemotiv, welches direkt für die Transkriptionsaktivität notwendig ist (Weiss *et al.*, 1991). Im Gegensatz zu eukaryotischen Enhancer-bindenden Proteinen finden sich bei NtrC keine Sequenzmotive wie saure, glutamin- oder prolinreiche Regionen. Es gibt jedoch Bereiche, die für die Oligomerisierung des Proteins verantwortlich sind (Flashner *et al.*, 1995). Für mehr als 50 prokaryotische Regulationsproteine konnte bisher eine Homologie der zentralen Domäne gefunden werden. Alle diese Proteine werden durch Phosphorylierung aktiviert und gehören zu der Gruppe der Receiver- oder Effektor-Proteine von Zweikomponenten-Systemen. Die C-terminale Domäne (~60 Aminosäuren) bindet mit einem Helix-Turn-Helix-Motiv an die Enhancer-DNA (Contreras & Drummond, 1987). Die Sequenz dieser Domäne ähnelt der des

FIS-Proteins (*factor for inversion stimulation*) (Kostrewa *et al.*, 1991; Kostrewa *et al.*, 1992; North *et al.*, 1993).

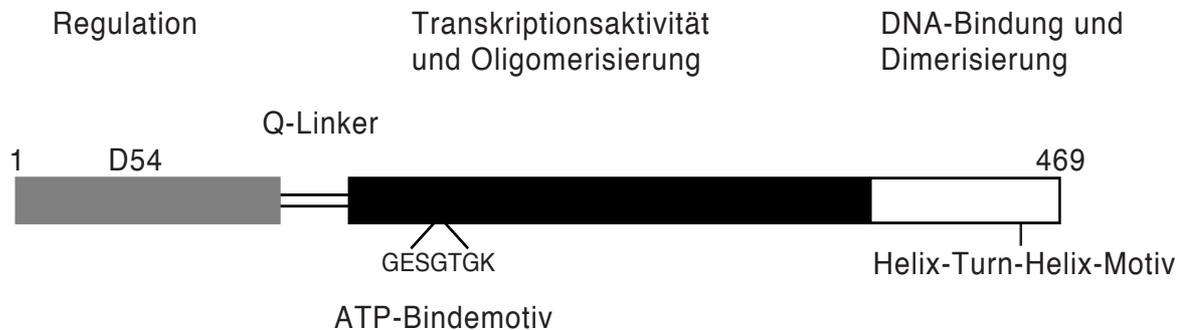


Abb. 1.2 Domänen des Aktivatorproteins NtrC

NtrC ist 496 Aminosäuren lang und besteht aus den Domänen für die Regulation (~ 120 Aminosäuren), die Transkriptionsaktivität und Oligomerisierung (~ 240 Aminosäuren) und die DNA-Bindung und Dimerisierung (~ 60 Aminosäuren). Die regulatorische Domäne wird an Aspartat 54 (D54) phosphoryliert. Die Aktivierungsdomäne besitzt ein ATP-Bindemotiv (GESGTGK).

In verschiedenen Untersuchungen wurden NtrC-Mutanten gefunden, die auch ohne Phosphorylierung die Transkription aktivieren. Zwei dieser konstitutiven Mutanten sind NtrC^{S160F} und NtrC^{D54E}. Bei letzterer ist die Phosphorylierungsstelle, das Aspartat an Position 54, gegen Glutamat ausgetauscht (Klose *et al.*, 1993). Scheinbar wird dadurch eine Konformation im Protein erreicht, die der des phosphorylierten NtrC ähnelt. Eine andere wichtige Mutante ist NtrC^{D54E,S160F}. Diese Doppelmutante besitzt gegenüber den Einfachmutanten eine erhöhte ATPase-Aktivität (Klose *et al.*, 1993). Diese ATPase-Funktion findet sich auch beim phosphorylierten Wildtyp-NtrC (wt-NtrC). Sowohl die Mutanten als auch das Wildtyp-Protein müssen ATP hydrolysieren, um den Übergang der RNA-Polymerase in den offenen Komplex katalysieren zu können (Weiss *et al.*, 1991; Wedel & Kustu, 1995). Aus diesen und weiteren Untersuchungen konnte geschlossen werden, daß das Phosphat von der Histidinkinase NtrB, die am Histidin 139 phosphoryliert ist, auf das Aspartat 54 des NtrC übertragen wird (Klose *et al.*, 1993). Durch die Phosphorylierung des NtrC erhöht sich die Kooperativität des Proteins als multimerer Komplex an zwei DNA-Bindungsstellen zu binden (Porter *et al.*, 1993; Weiss *et al.*, 1992; Chen & Reitzer, 1995; Wyman *et al.*, 1997) und die ATPase-Funktion wird aktiviert (Weiss *et al.*, 1991).

In manchen Arbeiten wird NtrC mit vier Untereinheiten dargestellt. Dann ist zwischen der N-terminalen Domäne und dem restlichen Protein ein proteasesensitiver Linker (Drummond *et*

al., 1986; Wootton & Drummond, 1989) hervorgehoben, dem Aufgaben bei der Interaktion der Proteine untereinander zugeordnet werden (Abb. 1.2). In Lösung kommt das Protein als Dimer vor. Erst im phosphorylierten Zustand, gebunden an die DNA, multimerisiert es (Reitzer & Magasanik, 1983; Porter *et al.*, 1993; Flashner *et al.*, 1995; Klose *et al.*, 1994; Wyman *et al.*, 1997). Für die Bakterien ist NtrC ein wichtiges Aktivatorprotein im *glnALG*-Operon, das den Stickstoffmetabolismus reguliert, indem es unter DNA-Looping die Transkription aktiviert.

3. Transkriptionsaktivierung von RNAP- σ^{54} durch NtrC

Sowohl das Aktivatorprotein NtrC als auch RNAP- σ^{54} können unabhängig voneinander an die DNA binden (Hirschman *et al.*, 1985; Ninfa *et al.*, 1987; Sasse-Dwight & Gralla, 1988). Das RNAP- σ^{54} -Holoenzym erkennt dabei mit Hilfe der C-terminalen Region des Sigma-Faktors die spezifische Promotorsequenz, kann die DNA jedoch nicht schmelzen, und es entsteht ein stabiler geschlossener Komplex (Sasse-Dwight & Gralla, 1988; Kustu *et al.*, 1989; Popham *et al.*, 1989; Sasse-Dwight & Gralla, 1990; Wedel *et al.*, 1990; Cannon *et al.*, 1993; Cannon *et al.*, 1997). Durch Mutationsuntersuchungen an σ^{54} wurde gezeigt, daß Komplexe bestimmter Mutanten mit dem RNA-Polymerase-Kernenzym die Transkription ohne NtrC aktivieren können. Das bedeutet, daß der σ^{54} -Faktor mit der Wildtyp-Sequenz das Aufschmelzen der Promotor-DNA in Abwesenheit von NtrC verhindert, obwohl diese Aktivität im RNAP- σ^{54} -Holoenzym lokalisiert ist (Kustu *et al.*, 1989; Wang *et al.*, 1995; Wang & Gralla, 1996). Für den Übergang vom geschlossenen zum offenen Komplex ist eine Wechselwirkung zwischen phosphoryliertem NtrC (NtrC-P) am Enhancer und der RNAP- σ^{54} am Promotor notwendig (Sasse-Dwight & Gralla, 1988; Popham *et al.*, 1989). Sie findet unter Schleifenbildung der DNA statt, eine direkte DNA-Verbindung zwischen Enhancer und Promotor ist aber nicht nötig. Für die Aktivierung durch NtrC konnte dies in Versuchen mit DNA-Katenanen gezeigt werden, wobei sich Enhancer und Promotor jeweils auf einem anderen DNA-Plasmid befanden (Wedel *et al.*, 1990). Außerdem konnte der DNA-Schleifen-Komplex zwischen NtrC und RNAP- σ^{54} durch Untersuchungen mit dem Elektronenmikroskop (Su *et al.*, 1990) und Rasterkraftmikroskop (Rippe *et al.*, 1997a) direkt visualisiert werden. Darüber hinaus können die Bindungsstellen für NtrC bis 3000 Basenpaare verschoben werden, ohne daß ein großer Ein-

fluß auf die Transkription zu bemerken ist (Reitzer & Magasanik, 1986; Wedel *et al.*, 1990). Auch die Position vor oder hinter dem Promotor scheint dabei keinen Einfluß zu haben (Reitzer & Magasanik, 1986). Die DNA-Bindungssequenz von NtrC entspricht demnach der Definition eines Enhancers (Reitzer & Magasanik, 1986; Buck *et al.*, 1986). In dem Loop-Intermediat mit NtrC-P und RNAP- σ^{54} wird durch die ATPase-Aktivität des Aktivatorproteins ATP hydrolysiert, und der Promotor schmilzt zum offenen Komplex auf (Sasse-Dwight & Gralla, 1988; Popham *et al.*, 1989). Dann kann die Transkription starten. Diese Art der Transkriptionsaktivierung aus der Distanz durch DNA-Looping ist der Transkriptionsregulation in Eukaryoten sehr ähnlich.

4. Das *glnALG*-Operon

Die Regulation der Transkription von RNAP- σ^{54} durch NtrC spielt im *glnALG*-Operon eine wichtige Rolle. Ammonium ist die bevorzugte Stickstoffquelle der Enterobakterien (z. B. *E. coli*, *K. aerogenes* und *S. typhimurium*). Ist es im Medium nicht vorhanden, wird beim Übergang in ein stickstoffarmes Medium zuerst das *glnALG*-Operon mit den drei Promotoren *glnAp1*, *glnAp2* und *glnLp* aktiviert (Reitzer, 1996) (Abb. 1.3).

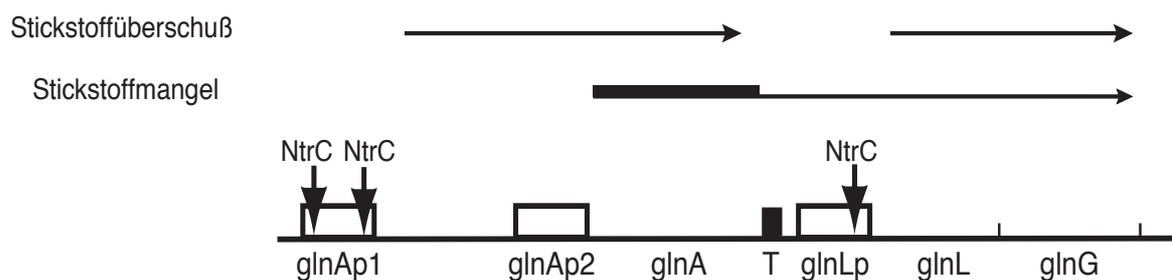


Abb. 1.3 Das *glnALG*-Operon

Die waagerechten Pfeile über dem schematisch dargestellten Operon zeigen die Transkription von Zellen bei Stickstoffüberschuß bzw. Stickstoffmangel. Bei Stickstoffmangel erhöht sich die Menge an *glnA*-Transkript deutlich. Die senkrechten Pfeile stehen für NtrC-Bindungsstellen. Zwischen *glnAp1* und *glnAp2* sind nur die beiden starken Bindungsstellen eingezeichnet. Die drei schwachen Bindungsstellen für NtrC wurden zur Vereinfachung nicht eingezeichnet. *glnA* = Gen für Glutaminsynthetase, *glnL* = Gen für NtrB, *glnG* = Gen für NtrC, o = Promotoren, n = Terminator.

Das Strukturgen der *glnA*-Promotoren ist die Glutaminsynthetase (*glnA*), während der Promotor *glnLp* für *glnL* (NtrB) und *glnG* (NtrC) verantwortlich ist. In einer stickstoffreichen Umgebung wird die Transkription nur von *glnAp1* und *glnLp* reguliert, da diese von der σ^{70} -abhängigen RNA-Polymerase erkannt werden. Dabei reguliert NtrC seine eigene Synthese, indem es teilweise die Transkription vom *glnLp*-Promotor blockiert, was zu einer Konzentration von ca. 5 Molekülen NtrC-Dimer pro Zelle führt (Reitzer & Magasanik, 1983). Befindet sich der Organismus in einem stickstoffarmen Medium, wird die Transkription des Glutaminsynthetase-Gens ausschließlich vom *glnAp2*-Promotor aktiviert. Dies ist der wichtigste und stärkste Promotor des Operons, der nur von der σ^{54} -abhängigen RNA-Polymerase erkannt wird (Hirschman *et al.*, 1985; Reitzer & Magasanik, 1985). Da in diesem Fall über den zwischen *glnAp2* und *glnLp* liegenden Terminator hinweggelesen wird, werden dabei auch die Gene für NtrB und NtrC transkribiert. Bei Stickstoffmangel erhöht sich die Anzahl der Glutaminsynthetase-Moleküle auf 1000 und die für NtrC auf ca. 70 Dimere pro Zelle (Reitzer & Magasanik, 1983).

5. Das Modellsystem

Das hier untersuchte System besteht aus einer DNA mit dem *glnAp2*-Promotor, dem Enhancer mit zwei NtrC-Bindungsstellen, RNAP· σ^{54} -Holoenzym und dem Aktivatorprotein NtrC (Abb. 1.4). Die σ^{54} -Konsensussequenz des *glnAp2*-Promotors aus dem *glnALG*-Operon ist 16 Nukleotide lang und erstreckt sich von -11 bis -26 strangaufwärts vom Transkriptionsstart (Hunt & Magasanik, 1985; Hirschman *et al.*, 1985; Ausubel, 1984). Innerhalb dieser Sequenz befindet sich an Position -12 ein hochkonserviertes C-Nukleotid und bei -24/-25 ein GG-Dinukleotid. Diese Positionen sind wichtig für die Promotorerkennung durch σ^{54} und das Aufschmelzen der DNA. Die C-terminale Domäne von σ^{54} besitzt ein Helix-Turn-Helix-Motiv, das die Polymerase in Kontakt mit der DNA an Position -24 bringt. Position -12 wird von den hydrophoben Bereichen am N-Terminus von σ^{54} bedeckt, die für das Aufschmelzen der Promotor-DNA wichtig sind (Sasse-Dwight & Gralla, 1988; Sasse-Dwight & Gralla, 1990; Hsieh & Gralla, 1994).

Die natürliche Sequenz strangaufwärts des *glnAp2*-Promotors enthält zwei starke (-148 bis -132 und -116 bis -100 vom Transkriptionsstart entfernt) und drei schwache (-94 bis -81, -73

bis -60 und -53 bis -37 vom Transkriptionsstart entfernt) Bindungsstellen für NtrC. Die Aktivierung der Transkription erfolgt am besten, wenn die beiden starken Bindungsstellen vorhanden sind (Reitzer & Magasanik, 1986; Reitzer *et al.*, 1989), was im Modellsystem der Fall ist (Abb. 1.4). Diese lassen sich bis 3000 Basenpaare vom Transkriptionsstart verschieben, ohne daß sich die Transkriptionsaktivität deutlich verringert (Reitzer & Magasanik, 1986; Buck *et al.*, 1986; Wedel *et al.*, 1990). Eine starke Verminderung der Aktivität ist allerdings zu beobachten, wenn der Abstand zwischen Enhancer und Promotor zu klein (< 30 bp) wird (Reitzer & Magasanik, 1986; Reitzer *et al.*, 1989).

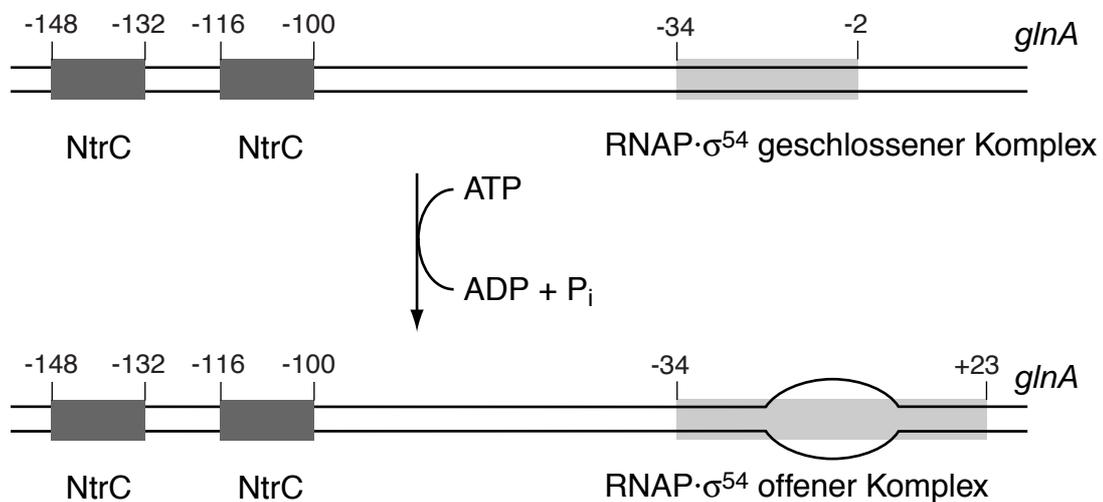


Abb. 1.4 Das Modellsystem

Die Bildung des offenen Komplexes am *glnAp2*-Promotor von *E. coli* erfordert die Hydrolyse von ATP. Die beiden starken Bindungsstellen von NtrC und ihre Position sind im Schema angegeben. Die hellere Box der oberen Bildhälfte entspricht der DNA-Bedeckung durch die Polymerase im geschlossenen Komplex. Darin enthalten ist der Promotor, der sich von -11 bis -26 ausgehend vom Transkriptionsstart (+1) erstreckt. Im offenen Komplex interagiert die RNA-Polymerase mit einem längeren DNA-Bereich von Position -34 bis +23.

Zur weiteren Vereinfachung wurde auf die Histidinkinase NtrB verzichtet, da sich NtrC in ausreichendem Maße auch durch einen chemischen Phosphodonor phosphorylieren läßt (Feng *et al.*, 1992) bzw. konstitutiv aktive Mutanten verwendet werden können. Somit konnte für die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente ein einfaches, genau definiertes System aus aufgereinigten Proteinkomponenten eingesetzt werden.

6. Die lokale Konzentration des Enhancers in der Nähe des Promotors

DNA-Looping wird nicht nur für die Transkriptionsaktivierung, sondern auch für andere wichtige Vorgänge in der Zelle, wie Rekombination (Kanaar & Cozzarelli, 1992; Schiedner *et al.*, 1990; Heichman & Johnson, 1990), Replikation (Stenzel *et al.*, 1991) und DNA-Verpackung (Crothers, 1993; Schild *et al.*, 1993) als wichtiger Mechanismus angesehen, um die Interaktion zwischen zwei entfernt auf der DNA liegenden Orten zu ermöglichen. Die Wahrscheinlichkeit einer solchen Interaktion hängt entscheidend von der Flexibilität, Länge und Konformation der dazwischen liegenden DNA ab. Mit DNA-Zyklisierungsexperimenten wurde die lokale Konzentration in Abhängigkeit von der DNA-Länge untersucht (Shore *et al.*, 1981; Shore & Baldwin, 1983; Crothers *et al.*, 1992; Hagerman & Ramadevi, 1990a; Hagerman & Ramadevi, 1990b). In diesen Experimenten erwies sich eine Entfernung von ca. 500 Basenpaaren zwischen den zu ligierenden Enden als optimal. Bei der Loop-Bildung kommt es zur Verbiegung und Verdrehung der DNA, was für kürzere DNA-Fragmente, die sich wie ein elastischer Stab verhalten, einen relativ großen Energieaufwand bedeutet. Die Steifheit der DNA wird durch die Persistenzlänge ausgedrückt. Sie gibt an, über welche Länge die DNA-Richtung "persistiert", d. h. sich nur wenig ändert. Unter physiologischen Salzkonzentrationen liegt ihr Wert bei ca. 50 nm (Hagerman, 1988). Bei DNA-Fragmenten, die viel länger sind als die Persistenzlänge, ist die Richtung der Kette am Anfang und am Ende voneinander unabhängig. Längere DNA-Fragmente sind also flexibel und eine Verbiegung der Kette erfolgt spontan bei Raumtemperatur. Gleichzeitig erhöht sich aber mit der Länge die Anzahl der möglichen Konformationen, wodurch die lokale Konzentration des einen Endes in der Nähe des anderen wiederum herabgesetzt wird.

Die Konzentration des einen Endes in der Umgebung des anderen wird als lokale Konzentration j_M bezeichnet und läßt sich aus den physikalischen Eigenschaften des Polymers berechnen (Abb. 1.5; Jacobson & Stockmayer, 1950). Gegenüber den Zyklisierungsexperimenten muß bei Untersuchungen mit Protein-Protein-Wechselwirkungen durch Looping noch der Besetzungsgrad der Protein-Bindungsstellen, die Größe der Proteine bzw. Proteinkomplexe, die konformationelle Flexibilität der Proteine in bezug auf die richtige torsionale Orientierung und die Struktur der DNA (Krümmung, Superhelizität usw.) berücksichtigt werden. Bisher wurde in *in vivo*-Experimenten die lokale Konzentration des *lac*-Operators in Abhängigkeit von der DNA-Länge ermittelt (Bellomy & Record, 1990; Mossing & Record, 1986).

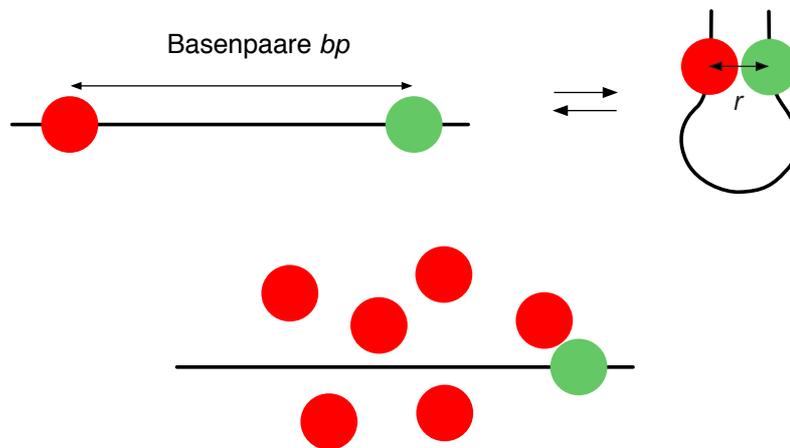


Abb. 1.5 Molare lokale Konzentration j_M

Der Parameter j_M gibt für zwei auf demselben DNA-Strang gebundene Proteine die molare Konzentration des einen Proteins in der Umgebung des anderen Proteins an. Der Wert von j_M hängt unter anderem vom Abstand der beiden Proteine auf der DNA ab, der hier in Basenpaaren bp angegeben wird. Wie unten in der Abbildung dargestellt entspricht die Größe von j_M derjenigen Proteinkonzentration, die das freie Protein in Lösung haben müßte, um dieselbe Kontaktwahrscheinlichkeit wie mit einer DNA-Verbindung zu erreichen.

7. Einfluß der DNA-Konformation auf die lokale Konzentration

In Computersimulationen wurde für lineare DNA von 1000 Basenpaaren eine lokale Konzentration des Enhancers in der Umgebung des Promotors von 10^{-8} bis 10^{-9} M berechnet (Shore & Baldwin, 1983; Mossing & Record, 1986; Hagerman & Ramadevi, 1990a; Rippe *et al.*, 1995). Da ein Transkriptionsfaktor mit 100 - 1000 Molekülen im Zellkern eine Konzentration von 10^{-9} bis 10^{-7} M besitzt, entspricht der berechnete Wert etwa der Konzentration der freien Proteine in Lösung. Dieses Ergebnis bedeutet, daß für lineare DNA-Fragmente die Schleifenbildung keinen Effekt auf die Interaktionswahrscheinlichkeit hätte, da sich j_M gegenüber der Konzentration der freien Proteine in Lösung nicht signifikant unterscheiden würde.

DNA ist jedoch ein flexibles Polymer, das verschiedene Konformationen einnehmen kann. So sind bei *in vivo* vorkommenden DNA-Molekülen die Enden eines DNA-Doppelstrangs nicht frei gegeneinander beweglich. Bei Plasmiden, bakteriellen Chromosomen, Chloroplasten-, Mitochondrien- und viraler DNA liegt die DNA in einer kovalent geschlossenen, ringförmigen Konformation vor. Die in der Zelle stattfindende enzymatische Entwindung der DNA-Helix

kann daher nicht durch eine Verdrehung der DNA-Enden gegeneinander ausgeglichen werden. Stattdessen wird die DNA-Entwindung durch die Ausbildung einer rechtshändigen DNA-Superhelix kompensiert, in der die beiden DNA-Doppelstränge umeinander gewunden sind (Bates & Maxwell, 1993). Dies wird als negative Superhelizität bezeichnet. Alternativ dazu kann die DNA-Entwindung auch durch eine reduzierte Verwindung der beiden Einzelstränge in der DNA-Helix oder durch eine Umwicklung von DNA-gebundenen Proteinen ausgeglichen werden. Die Chromosomen der Eukaryoten bestehen zwar aus linearer DNA, die jedoch durch die Bindung an Proteine in Schleifen von 100 - 150 kb in ihrer Beweglichkeit eingeschränkt ist. Im topologischen Sinn sind diese einzelnen Domänen daher einer zirkulären DNA ähnlich und ebenfalls negativ superhelikal. Interessanterweise entspricht ihre Superhelixdichte in Abwesenheit von Proteinen mit $\sigma = -0.06$ der von Bakterien (s. Material und Methoden, 3.3; Giaever & Wang, 1988).

Es gibt auch Einflüsse auf die Konformation, die sich aus der DNA-Sequenz ergeben. Unterschiedliche molekulare Eigenschaften von dA-dT- und dG-dC-Basenpaaren haben spezifische lokale Abweichungen der DNA-Struktur zur Folge (Dickerson & Drew, 1981; Hagerman, 1990). Weisen diese Abweichungen, die z. B. durch die Verkippung (*wedge*) benachbarter Basen zueinander entstehen, wiederholt in dieselbe Richtung und befinden sich in Phase mit der Helixwindung der DNA, wird die DNA gekrümmt (Trifonov & Sussman, 1980). Eine besonders starke Krümmung wird durch dA₄₋₆-Blöcke mit einer Periodizität von 10 bis 11 Basenpaaren hervorgerufen (Wu & Crothers, 1984; Diekmann & Wang, 1985). DNA-Fragmente mit repetitiven Adenin-Blöcken, die sich in Phase mit der Helixwindung befinden, zeigen bei der Analyse durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese ein verändertes Laufverhalten gegenüber DNA-Fragmenten mit einer Zufallssequenz. Durch die Krümmung der DNA wandern sie verlangsamt durch die Gelporen. Dieser als Wanderungsanomalie bezeichnete Effekt ist am stärksten, wenn sich die Krümmung in der Mitte des Fragments befindet (Wu & Crothers, 1984). Mittlerweile gibt es eine Reihe von Modellen, die aufgrund der DNA-Sequenz eine Vorhersage über den Grad der Krümmung machen können (Satchwell *et al.*, 1986; Calladine *et al.*, 1988; Koo & Crothers, 1988; Cacchione *et al.*, 1989; Bolshoy *et al.*, 1991; Goodsell & Dickerson, 1994; Schätz & Langowski, 1997).

Neben der intrinsischen Krümmung der DNA kann die DNA-Verbiegung auch durch Proteine induziert werden (Abb. 1.6B). Ein solches DNA-verbiegendes Protein ist IHF (*integration host factor*), das beim *glnHp2*-Promotor neben NtrC zusätzlich eine Rolle bei der Transkriptionsak-

tivierung spielt (Claverie-Martin & Magasanik, 1991). Seine Bindungsstelle befindet sich zwischen Promotor und Enhancer. Dieses heterodimere Protein verbiegt die DNA um ca. 160° (Rice *et al.*, 1996). Es kann alleine weder die Transkription aktivieren, noch beeinflusst es die Bindung der Polymerase und des Aktivatorproteins an die DNA (Claverie-Martin & Magasanik, 1991).

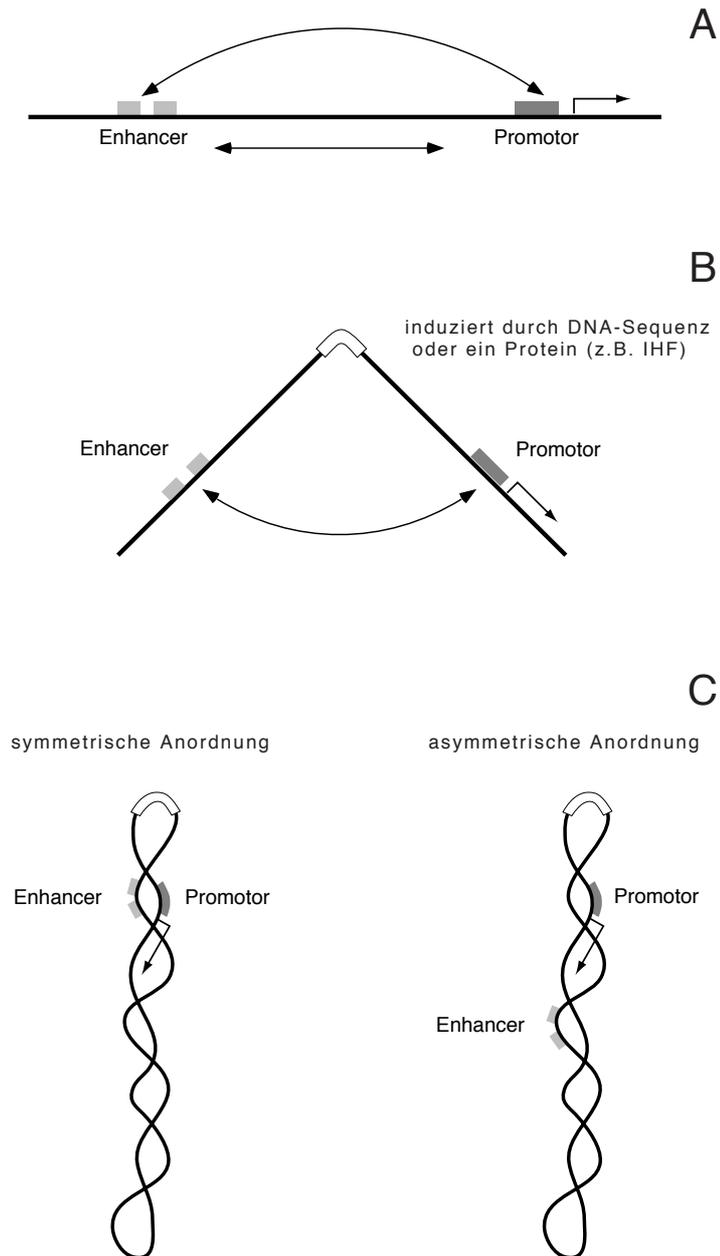


Abb. 1.6 Interaktion von Enhancer und Promotor an verschiedenen DNA-Konformationen

A, Veränderung der Distanz zwischen Enhancer und Promotor. B, Eine Krümmung zwischen Enhancer und Promotor kann durch eine intrinsische DNA-Sequenz oder ein Protein induziert werden. C, In einem superhelikalen Plasmid sorgt die eingefügte Krümmung für die Annahme einer bestimmten Konformation. Enhancer und Promotor können zur Krümmung symmetrisch oder asymmetrisch angeordnet sein.

Durch die Verbiegung bringt es die Proteine näher zueinander und stimuliert so die Wechselwirkung des Aktivatorproteins mit der Polymerase (Goodman & Nash, 1989; Molina-Lopez *et al.*, 1994; Parekh & Hatfield, 1996). Auf linearen DNA-Matrizen ermöglicht die Bindung von IHF eine erhöhte Aktivierung der Transkription (Claverie-Martin & Magasanik, 1991). Befinden sich die Bindungsstellen für NtrC weiter vom Promotor entfernt, vermindert es beim *glnHp2*-Promotor die Aktivierung. Für den *glnAp2*-Promotor besitzt IHF bei linearer DNA eine inhibitorische Wirkung (Claverie-Martin & Magasanik, 1992). Die Aktivierung der Transkription auf superhelikalen Plasmiden zeigt nur dann eine Abhängigkeit von IHF, wenn die Bindungsstellen für alle drei Proteine (RNAP- σ^{54} , NtrC und IHF) nicht in Phase mit der Helixperiode liegen (Claverie-Martin & Magasanik, 1992).

In den numerischen Simulationen linearer DNA ergab sich nach Einfügen einer Krümmung ein Anstieg der lokalen Konzentration (j_M) um 1 bis 2 Größenordnungen je nach Abstand der beiden Orte (Rippe *et al.*, 1995; Merlitz *et al.*, 1998). Durch diese Konformationsänderung erhöht sich somit die Kontaktwahrscheinlichkeit. Gegenüber relaxierten Plasmiden zeigen superhelikale Plasmide ein um zwei Größenordnungen erhöhtes j_M (Vologodskii *et al.*, 1992). Durch Einfügen einer Krümmung kann die lokale Konzentration eines superhelikalen Plasmids zusätzlich gesteigert werden und erreicht bei einem Abstand von 1000 Basenpaaren einen Wert von $4 \cdot 10^{-5}$ M (Klenin *et al.*, 1995). Dabei ist allerdings die Position der Krümmung bezüglich der beiden DNA-Orte von Bedeutung. Verschiedene Befunde zeigen, daß sich in einem superhelikalen Plasmid die eingefügte Krümmung in der Endschleife des Plasmids befindet (Laundon & Griffith, 1988; Klenin *et al.*, 1995; Wedemann *et al.*, 1998; Pfannschmidt & Langowski, 1998a). Die Endschleife des Plasmids ist der Bereich mit der stärksten DNA-Verbiegung, so daß sich die Krümmung dort in der energetisch günstigsten Position befindet. Dies führt zu einer verringerten, thermischen Fluktuation des Plasmids und es nimmt bevorzugt eine bestimmte Konformation ein (Abb. 1.6C; Kremer *et al.*, 1993). Die beiden miteinander interagierenden Orte können zur Krümmung symmetrisch oder asymmetrisch angeordnet sein. Bei einer symmetrischen Anordnung liegen die Orte auf der Superhelix einander gegenüber und die Kontaktwahrscheinlichkeit nimmt zu, während bei einer asymmetrischen Anordnung der Abstand voneinander größer und die Kontaktwahrscheinlichkeit kleiner wird (Diekmann & Langowski, 1995; Klenin *et al.*, 1995).

8. Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit

Sowohl für Eukaryoten als auch für Prokaryoten ist eine durch DNA-Looping vermittelte Interaktion zwischen DNA-gebundenen Proteinen ein vielfach verwendetes Erklärungsmodell für die Transkriptionsaktivierung aus der Distanz. Bisherige Arbeiten beschäftigen sich überwiegend mit einer qualitativen Charakterisierung der beteiligten Komponenten. Da für eine Untersuchung der Initiation der Transkription ein eukaryotisches System aufgrund seiner vielen Bestandteile sehr aufwendig wäre, sollte in der vorliegenden Arbeit ein einfaches prokaryotisches Modellsystem für quantitative Messungen verwendet werden. Dieses genau definierte *in vitro*-System besteht aus einer DNA-Matrize, der *E. coli* RNA-Polymerase, dem σ^{54} -Faktor und dem Aktivatorprotein NtrC.

Für biophysikalische Messungen mußten die beteiligten Komponenten zunächst in ausreichenden Mengen hoch aufgereinigt hergestellt werden. Unter anderem war geplant, die verschiedenen Assoziationszustände des NtrC-Proteins mit der analytischen Ultrazentrifuge in Sedimentations- und Gleichgewichtsläufen zu untersuchen. Dafür wurden relativ große Mengen spektroskopisch sauberer Proteine benötigt.

Danach sollte die Bindung der RNAP- σ^{54} an die DNA und die Konformation des geschlossenen Komplexes am *glnAp2*-Promotor mittels Rasterkraftmikroskopie analysiert werden. Die Versuchsbedingungen waren dabei so zu wählen, daß sich der offene Komplex nicht bilden konnte. Im Vergleich zu vorherigen Untersuchungen (Rippe *et al.*, 1997a) sollten die Experimente nicht nur in Luft sondern auch in Flüssigkeit durchgeführt werden. Das Ziel von Messungen der DNA-Konturlänge und des Verbiegungswinkels war es zu untersuchen, ob die DNA um die Polymerase gewunden ist. Außerdem war ein Vergleich von Messungen in Luft und in Flüssigkeit geplant, um so einen möglichen Einfluß der Trocknung auf die Proben festzustellen.

Im letzten Teil der Arbeit sollte der Einfluß von intrinsischer DNA-Krümmung auf den Transkriptionsaktivierungsprozeß quantitativ beschrieben werden. Bisher gab es nur numerische Computersimulationen mit linearer DNA (Rippe *et al.*, 1995; Merlitz *et al.*, 1998) und superhelikalen Plasmiden (Klenin *et al.*, 1995), mit denen der Einfluß der jeweiligen Konformation auf die lokale Konzentration (j_M) eines Ortes in der Umgebung des anderen berechnet worden war. Um Vorhersagen aus diesen theoretischen Arbeiten in Bezug auf die Transkriptionsaktivierungsrate experimentell zu testen, sollte eine Anzahl von Plasmiden hergestellt werden, die

sich durch die Position einer eingefügten intrinsischen Krümmung zwischen Enhancer und Promotor sowie in der Entfernung dieser beiden DNA-Orte zueinander unterscheiden. Die erhaltenen quantitativen Werte für die Aktivierungsrate der Transkription sollten dann mit den numerischen Simulationen verglichen werden.

Material und Methoden

1. Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Alle verwendeten Chemikalien hatten den Reinheitsgrad p. a. (*pro analysi*) und stammten, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Merck (Darmstadt, Deutschland) oder Fluka (Neu-Ulm, Deutschland). Die sonstigen Chemikalien und Verbrauchsmaterialien wurden von folgenden Firmen bezogen:

<u>Produkt</u>	<u>Hersteller/Quelle</u>
Acrylamid/Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agar	DIFCO Laboratories, Detroit, MI, USA
Agarose	FMC BioProducts über Biozym, Hess. Oldendorf, Deutschland
Alkalische Phosphatase	Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland
Antibiotika	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Autoradiographiefilme	Dupont, Bad Homburg, Deutschland
Brilliant Blau R 250	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
BSA	New England Biolabs, Schwalbach, Deutschland
Carbamyolphosphat	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Desoxynukleotide (dNTPs)	AGS GmbH, Heidelberg, Deutschland
Dialysemembran	Spectrum, Houston, Texas, USA, über Roth
DNA-Molekulargewichtsmarker	Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland; AGS GmbH, Heidelberg, Deutschland
Gelextraktions-Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Glycerin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hefeextrakt	DIFCO Laboratories, Detroit, MI, USA
IPTG	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Klenow-Fragment	Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland
NAP-5-Säule	Pharmacia, Freiburg, Deutschland
Ni-NTA-Agarose	Qiagen, Hilden, Deutschland
NP-40	Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland
Oligonukleotide	MWG, Ebersberg, Deutschland; Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Plasmidpräparations-Kits	Qiagen, Hilden, Deutschland
PMSF	Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland
Protein-Molekulargewichtsmarker	BioRad, München, Deutschland
Radioaktive Nuklide	Hartmann Analytic, Braunschweig, Deutschland
Repel-Silane	Pharmacia, Freiburg, Deutschland
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Schwalbach, Deutschland; AGS GmbH, Heidelberg, Deutschland
Ribonukleotide (NTPs)	Pharmacia, Freiburg, Deutschland
RNA-Polymerase Core-Enzym	Epicentre Technologies über Biozym, Oldendorf, Deutschland; Prof. H. Heumann, Max-Planck-Institut für Biochemie, München
Sequenase-Kit	USB, Cleveland, Ohio, USA
Silizium-Spitzen	L.O.T. Oriel, Darmstadt, Deutschland; Nanotools, München, Deutschland
Taurin	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
T4-DNA-Ligase	Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland
Tris-Base	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Trypton	DIFCO Laboratories, Detroit, MI, USA
Zellulosefolien	Biotrend, Köln, Deutschland

Zum Ansetzen der Puffer und Lösungen wurde nur Reinstwasser verwendet, welches über ein Seralpur PRO 90 CN-Reinstwassersystem gewonnen und teilweise autoklaviert wurde.

2. Mikrobiologische Methoden

2.1 Bakterienstämme

Bakterienstamm für die Proteinexpression

BL21(DE3)pLysS: $F^- ompT hsdS_B(r_B^- m_B^-) gal dcm$ (DE3) pLysS

Diese Zellen besitzen auf ihrem Bakterienchromosom das Gen für die T7-RNA-Polymerase, welches von einem IPTG-induzierbaren *lacUV5*-Promotor kontrolliert wird (Studier, 1990; Novagen Handbuch). Nach ihrer Synthese transkribiert T7-RNA-Polymerase das Gen des Zielproteins, das sich auf dem pET15b-Vektor befindet. Der dort vorhandene *T7lac*-Promotor wird ebenfalls durch IPTG induziert. Eine weitere Kontrolle der gezielten Transkription des gewünschten Gens gelingt dadurch, daß in diesen Zellen das Plasmid pLysS vorhanden ist. Es besitzt neben einer Sequenz für Chloramphenicol-Transferase (Resistenz gegen Chloramphenicol) eine Sequenz für T7-Lysozym, welches an die Polymerase bindet und dadurch ein natür-

licher Inhibitor der T7-RNA-Polymerase ist (Moffat & Studier, 1987; Studier, 1990). Ein schwacher Promotor vor dem Lysozymgen sorgt für die Expression geringer Mengen des Proteins, so daß auch nur geringe Mengen T7-RNA-Polymerase inhibiert werden können. Sobald die Konzentration an T7-RNA-Polymerase durch Zugabe von IPTG steigt, geht der inhibitorische Effekt verloren. Jedoch hilft Lysozym bei der Lyse der Zellen. Nach Zugabe von Detergens, welches die innere Membran zerstört, gelangt Lysozym an die äußere Peptidoglycanschicht der Membran und kann sie abbauen. Dies führt zur Lyse der Zellen. Die kompetenten BL21(DE3)pLysS-Zellen wurden von Novagen (Madison, WI, USA) bezogen.

Bakterienstamm für die Plasmidpräparation

NovaBlue: endA1 hsdR17($r_{K12}^- m_{K12}^+$) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proA⁺B⁺ lacI^qZDM15::Tn10]

Dieser Stamm weist eine recA-Mutation auf. Dadurch wird die homologe Rekombination der DNA in diesen Organismen abgeschaltet, so daß die Entstehung von Konkateren reduziert wird. Die kompetenten Zellen wurden freundlicherweise von Frau Claudia Pfannschmidt zur Verfügung gestellt (Pfannschmidt, 1998b).

2.2 Plasmide und DNA-Oligonukleotid-Duplexe

Übersicht der verwendeten Plasmide

<u>Plasmid</u>	<u>Beschreibung</u>	<u>Quelle</u>
Expressionsplasmide		
pET15b	Expressionsvektor	Novagen
pNTRC-1	Expressionsplasmid für NtrC ^{S160F}	Rippe 1997, unveröffent.
pNTRC-2	Expressionsplasmid für NtrC ^{D54E,S160F}	Rippe <i>et al.</i> , 1997
pNTRC-3	Expressionsplasmid für wt-NtrC	diese Arbeit
pS54-2	Expressionsplasmid für σ^{54}	Rippe <i>et al.</i> , 1997
Transkriptionsplasmide		
pVW7	<i>glnA</i> -Promotor und Enhancersequenz für NtrC im Abstand von 109 bp	Weiss <i>et al.</i> , 1992
pCA119-66	gekrümmte DNA-Sequenz (Oligonukleotid-Duplex AS5-AS6) in die <i>Pst</i> I-Stelle von pVW7 kloniert	diese Arbeit
pCA455-66	in die <i>Cl</i> I-Stelle von pCA119-66 sind 2 x 33 bp	diese Arbeit

	und 270 bp aus pUC18/ <i>HinP1I</i> kloniert	
pCA461-66	in die <i>Clal</i> -Stelle von pCA119-66 sind 103 bp, 109 bp und 130 bp aus pUC18/ <i>HinP1I</i> kloniert	diese Arbeit
pCA538-66	in die <i>Clal</i> -Stelle von pCA119-66 sind 109 bp, 103 bp, 33 bp und 174 bp aus pUC18/ <i>HinP1I</i> kloniert	diese Arbeit
pCA728-66	in die <i>Clal</i> -Stelle von pCA119-66 sind 33 bp, 109 bp, 130 bp und 337 bp aus pUC18/ <i>HinP1I</i> kloniert	diese Arbeit
pCA119-666	in die <i>BstBI</i> -Stelle von pCA119-66 sind 65 bp, 103 bp, 332 bp und 100 bp aus pUC18/ <i>HinP1I</i> kloniert	diese Arbeit
pCA293-119	in die <i>Clal</i> -Stelle von pCS119-119 sind 174 bp aus pUC18/ <i>HinP1I</i> kloniert	diese Arbeit
pCA380-213	in die <i>Clal</i> -Stelle von pCS119-119 sind 100 bp, 28 bp, 33 bp und 100 bp aus pUC18/ <i>HinP1I</i> und in die <i>BstBI</i> -Stelle sind 147 bp aus pET15b/ <i>HpaII</i> kloniert	diese Arbeit
pCS119-119	in die <i>BstBI</i> -Stelle von pCA119-66 wird ein 53 bp langes Oligonukleotid (AS7-AS8) kloniert	diese Arbeit
pCS293-293	in die <i>Clal</i> - und <i>BstBI</i> -Stelle von pCS119-119 sind jeweils 174 bp aus pUC18/ <i>HinP1I</i> kloniert	diese Arbeit
pCS456-451	in die <i>Clal</i> -Stelle von pCS119-119 sind 337 bp und in die <i>BstBI</i> -Stelle 332 bp aus pUC18/ <i>HinP1I</i> kloniert	diese Arbeit
pCS261-202	in die <i>Clal</i> -Stelle von pCS119-119 sind 109 bp und 33 bp aus pUC18/ <i>HinP1I</i> und in die <i>BstBI</i> -Stelle 135 bp unbekannter Herkunft kloniert	diese Arbeit
pVW7-158	Deletion von 326 bp aus der Transkriptionssequenz von pVW7 durch Restriktionsverdau mit <i>BsaAI</i> und <i>BstDSI</i>	diese Arbeit
pTH8	besitzt alle 5 Bindungsstellen für NtrC und eine intrinsische Krümmung 73 bp vom Promotor in Richtung Enhancer entfernt	Hunt & Magasanik, 1985

andere Plasmide

pJES534	<i>glnA</i> -Promotor und Enhancersequenz für NtrC im Abstand von 454 bp, für Rasterkraftmikroskopie	Porter <i>et al.</i> , 1993
pUC18	für Fragmente, die zur Herstellung der Transkriptionsplasmide verwendet wurden	Norlander <i>et al.</i> , 1983 Messing, 1983

Die Plasmidkarten für die in dieser Arbeit konstruierten Plasmide befinden sich im Anhang.

Übersicht der verwendeten Oligonukleotide

Name Sequenz (5'→3')

Oligonukleotide zur Ergänzung der 14 N-terminalen Aminosäuren von NtrC

AS1 TAT GCA ACG AGG GAT AGT CTG GGT AGT CGA TGA CGA TAG TTC CAT CCG

AS2 ATG GAA CTA TCG TCA TCG ACT ACC CAG ACT ATC CCT CGT TGC A

Oligonukleotide für die Sequenzierreaktionen der Expressionsplasmide

T7 propri TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG

T7 terpri GCT AGT TAT TGC TCA GCG G

Oligonukleotide zur Einführung der Krümmung in die Transkriptionsplasmide

AS5 GTA TCG ATA AAA AAT ATA TAA AAA TCT CTA AAA AAT ATA TAA AAA TCT CTA
AAA AAT ATA TAA AAA TTC GAA CTG CA

AS6 GTT CGA ATT TTT ATA TAT TTT TTA GAG ATT TTT ATA TAT TTT TTA GAG ATT
TTT ATA TAT TTT TTA TCG ATA CTG CA

Oligonukleotide zur Herstellung der symmetrischen Transkriptionsplasmide

AS7 CGA ATG AGC ATG ACG CAG TCG ATG AAT TGT CAG CTC GAC GTG CGA CTA CGC AT

AS8 CGA TGC GTA GTC GCA CGT CGA GCT GAC AAT TCA TCG ACT GCG TCA TGC TCA TT

Plasmide für die Proteinexpression

Die Expressionsplasmide pNTRC-1 für NtrC^{S160F}, pNTRC-2 für NtrC^{D54E,S160F} und pS54-2 für σ^{54} wurden von Dr. Karsten Rippe für vorhergehende Arbeiten konstruiert und zur Verfügung gestellt (Rippe *et al.*, 1997a). Wie bei diesen Plasmiden wurde pET15b (Studier, 1990) für die Konstruktion von pNTRC-3 mit der Sequenz des wt-NtrC-Proteins als Vektor verwendet. Das Plasmid pFI20 (Fiedler, 1996), ein Derivat von pRH800 (Lange & Hengge-Aronis, 1994), enthält das Gen für wt-NtrC. Es wurde freundlicherweise von Verena Weiss und Ulrike Fiedler, Universität Konstanz, zur Verfügung gestellt. Aus diesem Plasmid wurde das NtrC-Gen isoliert und in den Expressionsvektor kloniert. Eine Spaltung mit *Van91I* ergab vier Fragmente unterschiedlicher Länge, von denen das größte Fragment das NtrC-Gen enthielt, allerdings ohne die Sequenz für die 14 N-terminalen Aminosäuren. Die fehlende Sequenz wurde nach Isolierung des Fragments aus dem Gel durch Ligation eines entsprechenden Oligonukleotid-Duplexes (AS1-AS2) ergänzt. Die Sequenz wurde so gewählt, daß gleichzeitig eine *NdeI*-Schnittstelle am Ende erzeugt wurde. Nach *BamHI*-Verdauung entstand das richtige Fragment (1544 bp), welches aus einem Gel ausgeschnitten wurde. Die Ligation von pET15b, ebenfalls mit *NdeI* und *BamHI* geschnitten, mit dem 1544 bp-Fragment ergab schließlich das Expressionsplasmid pNTRC-3. So konstruiert besitzt das NtrC-Protein ein N-terminales (His)₆-Peptid

mit der Sequenz MGSSHHHHHSSGLVPRGS, das die Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie ermöglicht (siehe 4.2). Zusätzlich befindet sich auf dem Plasmid ein Ampicillin-Resistenzgen, welches für das Enzym β -Lactamase codiert, das Ampicillin durch Spaltung seines β -Lactamrings inaktiviert.

Plasmid für Rasterkraftmikroskopie

Das Plasmid pJES534 (Porter *et al.*, 1993) besitzt den *glnA*-Promotor und die Enhancer-Sequenz für das Aktivatorprotein NtrC in einem Abstand von 454 bp, wenn man von der Mitte der jeweiligen Sequenz rechnet. Aufgrund seiner Konstruktion erhält man bei der Transkription ein 155 nt langes RNA-Transkript ohne Uracil. Durch eine Restriktionsspaltung mit *PvuII* (siehe 3.5) ergibt sich aus pJES534 ein 1036 bp langes Fragment, welches den Promotor und Enhancer besitzt. Nach HPLC-Aufreinigung (siehe 3.8) wurde dieses Fragment für die Rasterkraftmikroskopie-Untersuchungen verwendet (siehe 5.2).

Plasmide für die Transkriptionsexperimente

Alle Plasmide für die Transkriptionsexperimente, außer pTH8 (Hunt & Magasanik, 1985), wurden von pVW7 (Weiss *et al.*, 1992) abgeleitet. Der Abstand von der Mitte des Enhancers bis zur Mitte des Promotors beträgt bei diesem Plasmid 109 bp. Durch Einfügen eines gekrümmten Oligonukleotid-Duplexes (AS5-AS6) in die *PstI*-Schnittstelle zwischen Enhancer und Promotor wurde das Plasmid pCA119-66 konstruiert. Hier beträgt der Abstand zwischen den beiden DNA-Sequenzen (Mitte des Enhancers - Mitte des Promotors) 185 bp, wie sich aus der Addition der beiden Zahlen (119-66) im Namen ergibt. Dabei steht die erste Zahl für den Abstand in DNA-Basenpaaren von der Mitte des Enhancers bis zur Mitte der Krümmung, während die zweite Zahl für den Abstand von der Mitte der Krümmung bis zur Mitte des Promotors steht. Die beiden Buchstaben geben Auskunft über die Position der Krümmung: Der Quotient aus dem Abstand Enhancer - Krümmung durch den Abstand Enhancer - Promotor gibt die genaue Position der Krümmung an. Liegt dieser Wert zwischen 0.4 und 0.6, wird die Position der Krümmung als symmetrisch in Hinblick auf Enhancer und Promotor bezeichnet und die Plasmide erhalten in ihrem Namen CS ("*Curved Symmetric*"). Sind die Plasmide mit CA ("*Curved Asymmetric*") bezeichnet, liegt der Wert des Quotienten außerhalb des Bereiches von 0.4 bis 0.6. Das Plasmid besitzt dann eine gekrümmte DNA-Sequenz, die in Hinblick auf die Entfernung zu Enhancer und Promotor asymmetrisch liegt.

Die Sequenz des gekrümmten Oligonukleotid-Duplexes wurde so gewählt, daß eine *ClaI*- und eine *BstBI*-Schnittstelle in das Plasmid eingefügt wurden, während die *PstI*-Stelle verdoppelt wurde, so daß sie die Sequenz begrenzt (Abb. 2.1). Bei einer Erstüberprüfung der neuen Plasmide sollten die *PstI*-Stellen verwendet werden, um zu kontrollieren, ob sich die Länge des Fragments zum Ausgangsplasmid vergrößert hatte.

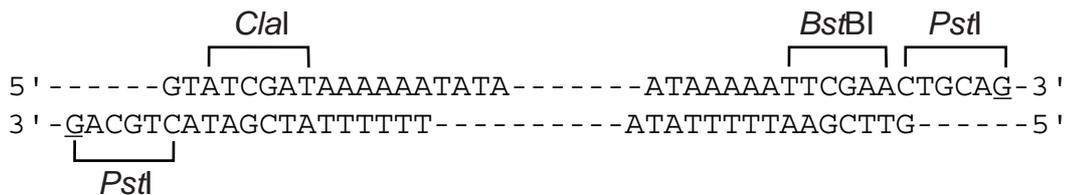


Abb. 2.1 Restriktionsstellen des gekrümmten Oligonukleotid-Duplexes

Die Abbildung zeigt Anfang und Ende der Sequenz des gekrümmten Oligonukleotid-Duplexes (AS5-AS6) und zusätzlich das aus pVW7 stammende 3'-terminale G der *PstI*-Schnittstelle (G). Die Klammern umfassen die jeweilige Erkennungssequenz der genannten Restriktionsendonukleasen.

Bei pCA119-66 befindet sich die *ClaI*-Schnittstelle in Richtung des Enhancers, während die *BstBI*-Stelle zum Promotor gerichtet liegt. Diese beiden Restriktionsenzyme schneiden die DNA mit einem 5'-CG-Überhang (*ClaI*: AT↓CGAT, *BstBI*: TT↓CGAA). Daher ist es möglich, weitere Fragmente, die ebenfalls einen CG-Überhang besitzen, einzubauen, um verschiedene Abstände zwischen Enhancer und Promotor zu erzeugen. Dazu wurde pUC18 mit *HinP1I* (G↓CGC) komplett verdaut, wodurch 17 Fragmente entstanden. Aus einer Ligation von *ClaI*-geschnittenem pCA119-66 mit dem *HinP1I*-verdauten pUC18, ergaben sich nach Transformation (siehe 2.4), kleiner Plasmidfermentation und Plasmidaufreinigung (Minipräparation, siehe 3.1) ein Satz von Plasmiden. Diese wurden zunächst durch eine Restriktionsspaltung mit *PstI* untersucht. Auf einem analytischen Agarosegel (siehe 3.3) zeigten sich die unterschiedlichen Fragmentlängen der in die *ClaI*-Schnittstelle eingefügten Sequenzen bei den verschiedenen Plasmiden.

Von diesen Plasmiden wurden einige für eine Sequenzierung ausgewählt (siehe 3.9). Es ergaben sich die Plasmide pCA455-66, pCA461-66, pCA538-66 und pCA728-66, bei denen jeweils der Abstand von der Mitte des Enhancers bis zur Mitte der Krümmung größer ist (455, 461, 538 und 728 bp), als der Abstand von der Krümmung bis zum Promotor (66 bp).

Für Plasmide mit einem größeren Abstand von der Mitte der Krümmung bis zur Mitte des Promotors wurde die *BstBI*-Schnittstelle von pCA119-66 geschnitten und wieder eine Ligation mit *HinP1I*-geschnittenem pUC18 durchgeführt. Von den hier letztendlich erzeugten Plasmiden

den wurde für die Transkriptionsexperimente nur pCA119-666 verwendet. Bei diesem Plasmid ist der Abstand von der Krümmung bis zum Promotor größer als bei den vorherigen Plasmiden.

Daneben wurden Plasmide konstruiert, die in der *Cla*I-Schnittstelle Fragmente von *Hin*P1I-verdautem pUC18 und in der *Bst*BI-Stelle Fragmente von *Hpa*II-verdautem pET15b enthalten. Da die Restriktionsspaltung von pET15b mit *Hpa*II 35 Fragmente ergab, wurden Fragmente der Länge von 123 bp bis 180 bp aus einem Gel extrahiert (siehe 3.7) und bei der Ligation verwendet. Es ergaben sich die Plasmide pCS261-202 und pCA380-213.

Weitere symmetrische Plasmide (pCS für das Vorhandensein der gekrümmten Sequenz, die eine symmetrische Position in Hinblick auf die Entfernung zu Enhancer und Promotor besitzt) wurden nach Einfügen eines Oligonukleotid-Duplexes (AS7-AS8) in die *Bst*BI-Schnittstelle von pCA119-66 konstruiert. Dadurch entstand zunächst pCS119-119, welches aufgrund der Sequenzwahl des Oligonukleotid-Duplexes (AS7-AS8) weiterhin eine *Bst*BI-Schnittstelle besitzt. Zur Konstruktion bestimmter Abstände zwischen Enhancer und Promotor wurde pUC18 *Hin*P1I-verdaut und die Fragmente mit 174, 331, 332 und 337 bp aus dem Gel extrahiert. Zuerst erfolgte ein Einbau in die *Cla*I-Schnittstelle, wodurch die Plasmide pCA293-119 und pCA456-119 entstanden. In diese Plasmide wurden in die *Bst*BI-Schnittstelle noch einmal die gleichen Fragmente ligiert. Das Ergebnis waren die Plasmide pCS293-293 und pCS456-451.

Als interne Kontrolle für die Transkriptionsexperimente diente pVW7-158. Dazu wurde aus der Transkript-Sequenz von pVW7 (484 Nukleotide) durch eine Restriktionsspaltung mit *Bsa*AI und *Bst*DSI ein 326 bp-Fragment herausgeschnitten, so daß ein Transkript mit nur noch 158 Nukleotiden entstand.

2.3 Nährmedien und Glycerinkulturen

Für die mikrobiologischen Arbeiten wurden nur autoklavierte Gefäße, Materialien und Lösungen verwendet. Das Autoklavieren erfolgte bei 121 °C für mindestens 30 Minuten. Manche Lösungen, wie z. B. Glucoselösungen, können nicht autoklaviert werden und wurden daher mit einem 0.22 µm-Filter sterilfiltriert.

Nährmedien

- LB-Medium (Luria-Bertani-Medium): 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, mit NaOH auf pH 7.5 einstellen
- LB-Medium für Petrischalen: Zugabe von 1.5 % (w/v) Agar zum LB-Medium
- SOB-Medium: 20 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 0.5 g/l NaCl, 2.5 mM KCl, pH 7.5, autoklavieren; vor Gebrauch werden 5 ml einer sterilen Lösung von 2 M MgCl₂ zugeben
- SOC-Medium: SOB-Medium ansetzen und autoklavieren, bei einer Temperatur unter 60 °C werden 20 mM Glucose (sterilfiltriert) zugegeben

Selektivmedien

Gibt man zu den autoklavierten Medien, wenn sie unter 50 °C abgekühlt sind, ein oder mehrere sterilfiltrierte Antibiotika, so erhält man Selektivmedien. Die Antibiotika-Konzentration in Flüssigmedium betrug 75 µg/ml Ampicillin (Amp) bzw. 20 µg/ml Chloramphenicol (Chl). Für Agarplatten wurde eine Konzentration von 100 µg/ml Ampicillin bzw. 34 µg/ml Chloramphenicol verwendet. Die Antibiotika wurden als Stammlösungen bei -20 °C mit folgenden Konzentrationen gelagert: 200 mg/ml Ampicillin in Wasser, 34 mg/ml Chloramphenicol in Ethanol.

Glycerinkulturen

Nach Zugabe von 15 % (v/v) sterilem Glycerin ist es möglich, Bakterienkulturen nahezu unbegrenzt bei -80 °C aufzubewahren. Dazu wurden 2 ml-Kryoröhrchen mit jeweils 150 µl Glycerin gefüllt und mit 850 µl einer Selektivkultur, deren Zellen sich in der logarithmischen Wachstumsphase mit einer optischen Dichte (OD) von 0.3-0.4 bei 600 nm befanden, gemischt. Die Glycerinkulturen wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Zur erneuten Verwendung der Zellen wurde mit einer sterilen Öse ein kleines Stück Eis entnommen und auf einer Selektivplatte ausgestrichen.

2.4 Transformation

Als Transformation bezeichnet man das Einschleusen von isolierter DNA in Bakterienzellen, die fähig (kompetent) sind diese DNA aufzunehmen. Wenn es sich bei dem DNA-Molekül um ein Plasmid handelt, dessen Replikationsstartpunkt von der Wirtszelle erkannt wird, so replizieren die transformierten Bakterien das Plasmid. Es kann dann durch Aufreinigung in ausreichend großen Mengen gewonnen werden (siehe 3.1). Handelt es sich dagegen bei dem Plasmid um einen Expressionsvektor, so kann vom Bakterium unter kontrollierten Bedingungen ein

bestimmtes Protein exprimiert werden (siehe 4.1). Die nachfolgende Transformationsvorschrift wurde für alle in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme (siehe 2.1) angewandt:

- Auftauen eines 25 µl-Aliquots der bei -80 °C aufbewahrten kompetenten Zellen auf Eis
- Zugabe der Plasmid-DNA (ca. 1 ng)
- Inkubation für 1 Stunde auf Eis
- Thermischer Schock bei 42 °C für 45 Sekunden
- Inkubation für 2 Minuten auf Eis
- Zugabe von 180 µl SOC-Medium
- Inkubation bei 37 °C unter leichtem Schütteln für 1 Stunde (Reparatur der beschädigten Membran, Expression der Antibiotikaresistenz)
- Ausplattieren von je 100 µl auf eine Selektivagarplatte
- Inkubieren der Zellen bei 37 °C ü. N. im Wärmeschrank

2.5 Plasmidfermentation

Mit einem Klon einer Selektivplatte oder direkt aus der Glycerinkultur wurden 10 ml LB-Medium (Amp) angeimpft. Diese Vorkultur wuchs über Nacht bei 37 °C bis zu einer $OD_{600} \sim 1$. Nach dem Waschen der Zellen (abzentrifugieren, Überstand verwerfen und wieder in LB-Medium (Amp) aufnehmen) wurden sie zu 500 ml LB-Medium (Amp) gegeben und wuchsen weiter bei 37 °C. War die optische Dichte von $OD_{600} \sim 1.5$ erreicht, wurde Chloramphenicol bis zu einer Endkonzentration von 170 µg/ml zugegeben. Die Kultur wuchs über Nacht (16-18 h) weiter. Chloramphenicol wirkt als kompetitiver Inhibitor des Peptidyltransferasekomplexes an den 70S-Ribosomen und hemmt somit die Proteinbiosynthese. Ebenso wird die Replikation der chromosomalen DNA gestoppt, da sie von der Proteinbiosynthese abhängig geregelt wird. Dies führt dazu, daß sich die Bakterienzellen nicht mehr vermehren. Die Plasmidreplikation läuft unabhängig davon weiter, so daß die Anzahl der Plasmide pro Zelle zunimmt (Amplifikation), was zu einer erhöhten Plasmidkonzentration in der Bakterienkultur führt.

Die Zellen wurden durch 15minütiges Zentrifugieren bei 6000 x g und 4 °C geerntet. Der Überstand wurde verworfen. Das Sediment wurde bei -80 °C gelagert oder sofort weiter verarbeitet (siehe 3.1).

3. DNA-Präparation

3.1 Plasmid Mini- und Maxipräparation

Minipräparation

Mit einer Minipräparation läßt sich in kurzer Zeit aus einer Bakterienkultur Plasmid-DNA aufreinigen, die ausreichend sauber für Restriktionsanalysen, Ligationen, Transformationen und Sequenzierungen ist. Für DNA-Minipräparationen wurde in dieser Arbeit der QIAprep Spin Miniprep Kit von Qiagen verwendet (QIAGEN, 1995b). Die Durchführung basiert auf drei Schritten: Präparation eines Lysats, Adsorption der DNA auf der QIAprep-Membran und Waschen und Eluieren der Plasmid-DNA.

Die abzentrifugierten Zellen einer 10 ml Bakterienkultur wurden in einem NaOH/SDS-Puffer in Anwesenheit von RNaseA lysiert. Durch das SDS werden die Phospholipid- und Proteinkomponenten der Zellmembran angegriffen, was zur Lyse der Zellen führt. Dadurch gelangt der alkalische Puffer an den Zellinhalt, so daß die DNA und Proteine denaturieren. Dauert dieser Zustand nicht zu lange, läßt sich die Plasmid-DNA wieder in die native Form bringen. Mit der Zugabe von 3 M Na-acetat (pH 5.5) wurde deshalb der Puffer neutralisiert und die Salzkonzentration erhöht. Dies führte zur Präzipitation von denaturiertem Protein, Zelltrümmern und chromosomaler DNA, die sich innerhalb von 10 Minuten vollständig abzentrifugieren ließen. Der klare Überstand wurde auf eine Säule geladen. Unter Wirkung chaotroper Salze und einem pH < 7.5 adsorbierte die Plasmid-DNA an die spezielle Silikagelmembran, während RNA, zelluläre Proteine und Metabolite mit dem Säulendurchfluß entfernt wurden. Salze wurden mit einem Alkoholpuffer herausgewaschen. Die aufgereinigte Plasmid-DNA wurde mit 10 mM Tris/HCl, pH 8.5 (niedrige Salzkonzentration, basischer pH-Wert) eluiert.

Maxipräparation

Die Maxipräparationen der Plasmide wurden ebenfalls mit dem dafür vorgesehenen Kit von Qiagen (Qiagen Plasmid Maxi Kit) durchgeführt (QIAGEN, 1995a). Das Protokoll ist dem für eine Minipräparation ähnlich. Ein Unterschied bestand allerdings in dem hier verwendete Anionenaustauschmaterial der Säulen, von dem die Plasmid-DNA mit einem Hochsalzpuffer (1.25 M NaCl, 50 mM Tris/HCl, pH 8.5) eluiert wurde. Anschließend erfolgte eine Isopropanolfällung, nach der das Sediment in 10 mM Tris/HCl, pH 7.5, 10 mM NaCl, 0.1 mM EDTA aufgenommen wurde.

3.2 Konzentrationsbestimmung der DNA

Unter Anwendung des Lambert-Beerschen-Gesetzes kann die Konzentration einer absorbierenden Substanz spektralphotometrisch bestimmt werden. Das Absorptionsvermögen (= Extinktion E) einer Lösung ist bei gegebener Wellenlänge der durchstrahlten Schichtdicke d und der molaren Konzentration c des absorbierenden Stoffes proportional. Es gilt:

$$E = \log\left(\frac{I_0}{I_D}\right) = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (2.1)$$

mit I_0 = Intensität des eingestrahnten monochromatischen Lichts, I_D = Intensität des Lichts nach dem Durchgang durch die Probe und ε = Extinktionskoeffizient (charakteristische Stoffkonstante für die eingestellte Wellenlänge, angegeben in $M^{-1} \cdot cm^{-1}$).

Die Absorptionsmessungen für die Konzentrationsbestimmungen wurden mit dem Ultrospec 3000-Gerät (UV/Visible Spectrophotometer) von Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland) durchgeführt. Um gleichzeitig die Reinheit einer DNA zu überprüfen, wurde stets ein Spektrum über einen Wellenbereich von 220-350 nm aufgenommen. Der Quotient E_{260}/E_{280} ist ein Kriterium für die Reinheit von DNA-Präparationen und sollte über 1.8 liegen. Die molare Stoffkonzentration läßt sich mit dem Extinktionskoeffizienten ε berechnen. Dieser beträgt bei Plasmid-DNA $6500 M^{-1} \cdot cm^{-1}$ pro Nukleotid. Das entspricht $50 \mu g/ml$ für 1 OD. Zur Konzentrationsbestimmung von Oligonukleotiden kann dieser mittlere Wert nicht verwendet werden, da diese Moleküle einzelsträngig sind und die vier Basen in verschiedener Häufigkeit enthalten. Für die Oligonukleotide wurden die Extinktionskoeffizienten mit der "nearest neighbor"-Methode (Puglisi & Tinoco, 1989) errechnet. Im folgenden sind die Extinktionskoeffizienten der verwendeten Oligonukleotide aufgeführt (siehe 2.2):

Tab. 2.1 Extinktionskoeffizienten der verwendeten Oligonukleotide

Oligonukleotid	Extinktionskoeffizient ($M^{-1} \cdot cm^{-1}$)
AS1	487000
AS2	414000
T7 propri	206000
T7 terpri	183000
AS5	833000
AS6	774000
AS7	524000
AS8	504000

3.3 Analytische Agarosegele und Chloroquingele

Agarosegele

In dieser Arbeit wurden stets 1%ige (w/v) Agarosegele in 1x TAE-Puffer verwendet. Bei Verwendung einer mittelgroßen Gelkammer (Gelgröße 14 x 14 x 0.5 cm) wurde die Elektrophorese bei 120 V und RT durchgeführt.

- 1.2 g Agarose mit 120 ml 1x TAE-Puffer in der Mikrowelle erhitzen, bis sich die Agarose gelöst hat
- die Lösung auf ca. 60 °C abkühlen lassen
- auf den Gelträger gießen, dessen Enden abgedichtet sind, und den Kamm einfügen
- Agarose erstarren lassen
- Abdichtungen entfernen und Gelträger mit Gel in die Gelkammer überführen, deren Reservoirs mit 1x TAE-Puffer gefüllt sind; Kamm herausziehen
- maximal 15 µl Probenvolumen laden, darin enthalten 0.2 bis 0.5 µg DNA/Probe und 1/5 des Volumens Ladepuffer (DNA BlueRun, AGS GmbH)

Nach der Elektrophorese wurden die Gele für 15 Minuten in einer Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml, verdünnt aus einer 10 mg/ml Ethidiumbromid-Stammlösung) inkubiert. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA, wobei sich seine Fluoreszenz erhöht (siehe auch 3.4). Die Anregung erfolgt mit UV-Licht, wodurch die Positionen der DNA-Banden detektiert werden können. Die Nachweisgrenze liegt bei etwa 50 ng DNA/Bande.

50x TAE-Puffer :

242 g	Tris
57.1 ml	Eisessig
100 ml	0.5 M EDTA (pH 8.0)
	mit H ₂ O auf 1 l auffüllen

5x Ladepuffer:

25 mM	Tris/HCl, pH 7.0
150 mM	EDTA
0.05 %	Bromphenolblau (w/v)
25 %	Glycerin (v/v)

Chloroquingele

Chloroquin ist wie Ethidiumbromid ein DNA-entwindender Interkalator, der die Superhelizität der DNA verändert. Das Wanderungsverhalten von DNA auf Chloroquingelen gibt Aufschluß über die Anzahl ihrer superhelikalen Verwindungen und damit über ihre Superhelixdichte. Zur Auftrennung von DNA-Topoisomeren wurden einem 1%igen Agarosegel und dem 1x TAE-Puffer 1.0 µg/ml Chloroquin zugesetzt. Durch eine Topoisomerase-Reaktion (siehe 3.11)

erzeugte Plasmid-Topoisomere von pVW7 wurden auf einem Chloroquingel aufgetrennt und dienten als Marker zur Bestimmung der Superhelixdichte nativer Plasmid-DNA, die sich auf dem gleichen Gel befand.

Für doppelsträngige DNA ist die Verwindungszahl Lk eine wichtige topologische Größe. Sie gibt die Anzahl der Windungen eines DNA-Strangs um den anderen Strang an. Für ein entspanntes (relaxiertes) Molekül ergibt sich

$$Lk = Lk_0 = \frac{N}{h_0} \quad (2.2)$$

wobei N die Anzahl der Basenpaare des Moleküls und h_0 die Anzahl der Basenpaare pro Helixwindung (= 10.5 bp) ist (Horowitz & Wang, 1984). Der Wert von N/h_0 ist im allgemeinen nicht ganzzahlig, d. h., sollte die DNA zu einem Ring geschlossen werden, würden sich die Enden nicht genau treffen. Für kovalent geschlossene Plasmide ist Lk ganzzahlig und eine topologische Invariante, d. h. sie verändert sich bei kontinuierlicher Deformation wie Dehnung und Verbiegung nicht. Plasmide gleicher Sequenz, die sich nur durch ihre Verwindungszahl unterscheiden, werden als Topoisomere bezeichnet. Sie können nur durch einen Strangbruch ineinander überführt werden. Die Differenz der Verwindungszahl ΔLk (Gl. 2.3) ergibt sich aus der Abweichung der Verwindungszahl Lk eines zirkulären DNA-Moleküls von Lk_0 des gleichen Moleküls im relaxierten Zustand. Diese Größe kann durch Gelelektrophorese, wie oben beschrieben, experimentell bestimmt werden.

$$\Delta Lk = Lk - Lk_0 \quad (2.3)$$

Die meisten natürlichen DNA-Moleküle sind unterwunden, so daß ΔLk ein negatives Vorzeichen besitzt. Da eine eingeführte Torsionsänderung in einem kleinen Molekül mehr Torsionsstreß erzeugt als in einem längeren, wird ΔLk auf die Plasmidlänge normiert. Es ergibt sich die spezifische Differenz der Verwindungszahl oder die Superhelixdichte σ (Gl. 2.4). Bei nativen Bakterienplasmiden beträgt sie -0.06.

$$\sigma = \frac{\Delta Lk}{Lk_0} \quad (2.4)$$

3.4 Gelextraktion der Plasmid-Monomere aus Agarosegelen

Die Gelextraktion der Plasmid-Monomere für die Transkriptionskinetiken (siehe 6.2), wurde mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, 1997a) durchgeführt. Das Prinzip dieses Kits beruht auf einer speziellen Silikagelmembran, die in einer kleinen Säule gepackt ist und zusammen mit den mitgelieferten Puffern für eine Wiedergewinnung der DNA und Abtrennung von Agarose und Verunreinigungen sorgt. Die DNA bindet an die Membran in Gegenwart von Hochsalzpuffer (pH 7.5), während die Verunreinigungen durch die Säule fließen und durch Waschvorgänge beseitigt werden. Die DNA wird schließlich mit Tris-Puffer oder Wasser (pH 8.5) eluiert. Da jedoch mit dem Standardprotokoll nur unzureichende Mengen der Monomere zurückgewonnen werden konnten, ist im folgenden ein verbessertes Protokoll für die Säulen und Puffer des QIAquick Gel Extraction Kit (QG-, PE- und EB-Puffer) aufgeführt, mit dem man wenigstens 50% des eingesetzten Materials zurückerhalten konnte. Weiterhin waren die zusätzlichen Bemerkungen des Herstellers zu beachten.

Die Auftrennung der DNA erfolgte in einem 1%igen Agarosegel (SeaKem GTG Agarose) in einer kleinen horizontalen Gelkammer (10 x 15 cm, RT, 34 V). Der Kamm wurde in der Mitte abgeklebt, so daß eine große Tasche entstand. Gel, Puffer und Probe enthielten schon während der Elektrophorese Ethidiumbromid (Gel 1 µg/ml, Puffer 1 µg/ml und Probe 40 µg/ml der 10 mg/ml Stammlösung). Die Zugabe von Ethidiumbromid erhöht die maximale DNA-Menge, die pro Agarosegel geladen werden kann, um den Faktor 10. Außerdem läßt sich bei ausreichender DNA-Menge die Position der Banden im Gel ohne UV-Beleuchtung erkennen.

Ethidiumbromid besitzt seine maximale Sensitivität bei Licht von 254 nm, welches aber DNA schädigt (Bildung von Thymindimeren). Möchte man intakte DNA-Moleküle aus dem Gel extrahieren, sollte Licht der Wellenlänge von 366 nm verwendet werden, welches allerdings ca. 10x weniger sensitiv ist als kürzere Wellenlängen. Es reicht aber völlig für eine Kontrolle der DNA-Banden aus.

Vorgehen bei der Extraktion:

- Ausschneiden der gewünschten DNA mit einer frischen, scharfen Skalpellklinge, Beseitigung überschüssiger Agarose und Überführung der Gelstücke (max. 200 mg) in ein 2 ml-Eppendorfreaktionsgefäß
- Pro 100 mg Gelstück werden 4 Volumen des gelben QG-Puffers (pH 7.5) zugegeben
- 20 Minuten Inkubation bei 50 °C; während dieser Zeit die Proben alle 3-4 Minuten gut auf dem Vortexer schütteln

- Nach der vollständigen Auflösung der Gelstücke, muß die Farbe der Probe immer noch gelb (pH-Wert) sein
- Zugabe von 1.5 Gelvolumen Isopropanol und gutes Vermischen
- Die Proben auf die Säulen geben (ein Auftrag sollte nicht mehr als 700 µl betragen, falls nötig mehrmals auftragen) und 1 Minute zentrifugieren (Tischzentrifuge, max. Umdrehungen)
- Zugabe von 600 µl QG-Puffer und 1 Minute zentrifugieren, Durchfluß verwerfen
- Zum Waschen 750 µl PE-Puffer zugeben, 3 Minuten warten, 1 Minute zentrifugieren, Durchfluß verwerfen und Arbeitsschritt wiederholen
- Zusätzliches Zentrifugieren für 1 Minute zur vollständigen Beseitigung der Restflüssigkeit
- Überführen der Säule in ein frisches 1.5 ml-Eppendorfreaktionsgefäß
- Zur Elution 50 µl vorgewärmten EB-Puffer (oder ein Puffer der Wahl) mit pH 8.5 in die Mitte der Säule pipettieren ohne die Oberfläche zu verletzen, 1 Minute stehen lassen und anschließend 1 Minute zentrifugieren
- Proben einer Extraktion vereinigen, durch eine Ethanol-fällung konzentrieren und im gewünschten Puffer aufnehmen

3.5 DNA-Restriktionsspaltungen

Für analytische und präparative Restriktionsspaltungen wurden verschiedene Restriktionsenzyme eingesetzt. Die optimalen Reaktionsbedingungen, wie Art und Ionenstärke des Puffers, pH-Wert und Temperatur, waren für die einzelnen Enzyme verschieden und wurden gemäß den Herstellerempfehlungen gewählt.

Für eine Restriktionsspaltung mit zwei Enzymen, die nicht im selben Puffer aktiv sind, wurde erst die Restriktionsspaltung des im Niedrigsalzpuffer aktiven Enzyms und anschließend die zweite Spaltung bei höherem Salzgehalt durchgeführt. Waren die Enzyme jedoch nur in ganz unterschiedlichen Puffern aktiv, mußte die DNA zwischen den beiden Restriktionsspaltungen durch eine Ethanol-fällung gereinigt werden. Besaßen die Enzyme verschiedene Temperatur-optima, wurde erst die Reaktion mit der niedrigeren Temperatur durchgeführt. Der Ansatz für eine analytische Restriktionsspaltung betrug 10 µl, in dem 1-3 µg Plasmid-DNA und 1-5 U Enzym enthalten waren. Dabei betrug der Anteil der Enzymlösung nicht mehr als 10 % des Gesamtvolumens. Für präparative Restriktionsspaltungen wurden die Ansätze entsprechend größer gewählt.

3.6 Nichtdenaturierende Polyacrylamidgele

Auf einem Polyacrylamidgel lassen sich kleine DNA-Fragmente elektrophoretisch trennen. Das Netzwerk des Acrylamids weist eine kleinere Porengröße auf als die großen Agarosemoleküle, so daß diese Methode viel empfindlicher für strukturelle Unterschiede der DNA ist. Repetitive Adeninblöcke, $[A_nN_{10-n}]$ mit $n \geq 4$, zeigen in dieser Gelmatrix eine Wanderungsanomalie, d. h. sie erscheinen unter einem höheren Molekulargewicht als von der Sequenz her erwartet. Dieser Wanderungsunterschied wurde als Krümmung der DNA interpretiert (siehe Einleitung). Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten (10-900 bp) wurden 8%ige Polyacrylamidgele verwendet.

Zusammensetzung für 50 ml Gellösung (20 x 20 cm Glasplatten):

10 ml	40%ige Acrylamidlösung (Acrylamid/Bisacrylamid 29:1)
34 ml	H ₂ O
5 ml	10x TBE (0.9 M Tris, 0.9 M Borat, 20 mM EDTA, pH 8.0)
1 ml	10% (w/v) APS
15 µl	TEMED

Für kleinere Gele (8 x 10 cm Glasplatten) wurden 10 ml Gellösung benötigt. Sollten in einem kürzeren Zeitraum mehrere Polyacrylamid-Gelelektrophoresen (PAGEs) erfolgen, wurde eine Stammlösung ohne TEMED angefertigt, die im Kühlschrank aufbewahrt wurde. Nach der Elektrophorese wurde die Gelmatrix in einer Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml) inkubiert, so daß die DNA-Banden durch UV-Beleuchtung sichtbar gemacht und mit einem Videosystem aufgezeichnet werden konnten. Mit dem Computerprogramm Bio Image Intelligent Quantifier (B. I. Systems, Ann Arbor, MI, USA) wurde über den DNA-Standard die scheinbare Länge der DNA-Fragmente berechnet. Der Vergleich mit der wirklichen Länge der Fragmente gab Auskunft über das Maß der Gelanomalie.

3.7 Gelextraktion von DNA-Fragmenten aus Polyacrylamidgelen

DNA-Fragmente bis ca. 700 bp ließen sich besser aus Polyacrylamidgelen extrahieren als aus einem Agarosegel. Dazu wurde der QIAEX II Extraction Kit verwendet (QIAGEN, 1997b). Hierbei liegt das Silikagelmaterial nicht als Säule gepackt vor, sondern in einer Suspension. Nach der Elektrophorese wurde das Gel in einer Ethidiumbromidlösung (1 µl/ml) gefärbt, die entsprechende Bande mit langwelligem UV-Licht lokalisiert und ausgeschnitten. Das Gelstück

wurde weiter zerkleinert und in Diffusionspuffer gegeben. Die DNA bindet unter Hochsalzpuffer an die Silikagelkugeln des Kits, die zu den Proben gegeben werden. Verunreinigungen bleiben in der Lösung und werden durch Waschschrte entfernt. Schließlich kann man durch Zugabe eines Elutionspuffers die DNA von den Silikagelkugeln lösen. Die genaue Durchführung erfolgte wie vom Hersteller beschrieben.

3.8 HPLC-Aufreinigung der DNA

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) wurde im Rahmen dieser Arbeit für die Aufreinigung des 1036 bp-Fragments aus der *PvuII*-Restriktionsspaltung des Plasmids pJES534 verwendet (Porter *et al.*, 1993). Hierfür wurde eine 4.6 mm x 10 cm Gen-Pak™-Säule der Fa. Millipore (Milford, MA, USA) unter folgendem Puffersystem benutzt: Puffer A (50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 0.2 M NaCl, 0.1 mM EDTA) und Puffer B (50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 0.8 M NaCl, 0.1 mM EDTA). Die Säule wurde mit 40 % Puffer B äquilibriert. Mit einer Flußrate von 0.5 ml/min wurde folgender Gradient zur DNA-Eluierung verwendet: 0.44 M bis 0.50 M NaCl in 2.5 ml, 0.50 M bis 0.53 M NaCl in 2.5 ml, 0.53 M bis 0.55 M NaCl in 15 ml und 0.55 M bis 0.57 M NaCl in 10 ml. Ein Aliquot jeder gesammelten 2 ml-Fraktion wurde auf einem 1%igen Agarosegel analysiert. Die entsprechenden Proben wurden vereinigt, über eine NAP-5-Säule entsalzt und mit 10 mM Tris/HCl, pH 7.5, 10 mM NaCl und 0.1 mM EDTA eluiert.

3.9 DNA-Sequenzierreaktion

Die DNA-Sequenzierung wurde nach dem Kettenabbruch-Verfahren direkt am Plasmid vorgenommen (Sanger *et al.*, 1977). Durch alkalische Denaturierung wurde die DNA einzelsträngig, so daß sie als Matrize für die enzymatische Synthese eines komplementären Strangs dienen konnte, der letztendlich analysiert wurde. Die Matrizen-DNA wurde mit einem Sequenzier-Primer hybridisiert, dessen Sequenz nur zu einer einzigen Stelle der Matrize komplementär war und dessen 3'-Ende 20-40 Nukleotide vor Beginn der zu sequenzierenden Sequenz lag. Von diesem Primer aus erfolgte die enzymatische Synthese des zur Matrize komplementären Strangs. Sie fand in 4 Reaktionsgefäßen statt, in denen jeweils Matrizen-DNA plus Primer, Enzym und alle 4 dNTPs vorlagen, von denen das dATP an der α -Phosphatgruppe mit ^{35}S

radioaktiv markiert war. Zusätzlich enthielt jedes Reaktionsgefäß eines der 4 Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTPs).

Während der Reaktionszeit laufen in den Ansätzen gleichzeitig zahlreiche Primer-Verlängerungen ab. Das Enzym akzeptiert sowohl die dNTPs als auch das jeweilige ddNTP als Substrat. Wird jedoch ein ddNTP zur Kettenverlängerung eingebaut, stoppt die Reaktion, da aufgrund des Fehlens der 3'-Hydroxygruppe kein weiteres Nukleotid angefügt werden kann (Kettenabbruch). Somit erhält man in jeder der 4 Einzelreaktionen eine statistische Verteilung von Ketten verschiedener Länge. Das 5'-Ende jedes Fragments wird vom Primer gebildet, während sich am 3'-Ende das Didesoxynukleotid der entsprechenden Reaktion befindet. Die 4 Reaktionsansätze wurden nebeneinander in einer denaturierenden Harnstoff-PAGE (siehe 3.10) aufgetragen, nach Größe getrennt und durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Von dem zu erkennenden Bandenmuster läßt sich die fortlaufende Nukleotidsequenz direkt ablesen.

Die Sequenzierungen wurden mit dem Sequenase Quick-Denature Plasmid Sequencing Kit von USB durchgeführt (USB, 1993). Die Expressionsplasmide (pNTRC-1, pNTRC-2, pNTRC-3 und pS54-2) wurden dahingehend überprüft, ob die Sequenz der Gene beim Einklonieren in den Vektor pET15b beibehalten wurde. Als Primer wurden der T7 Promotor-Primer (T7 propri, siehe 2.2) und der T7 Terminator-Primer (T7 terpri, siehe 2.2) verwendet, die zu diesem Vektorsystem gehören. Die Analysen der Transkriptionsplasmide erfolgten durch eine Fluoreszenz-Sequenzierung mit dem BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (mit AmpliTaq DNA-Polymerase) von PE Applied Biosystems (Weiterstadt, Deutschland) in einem DNA-Sequencer (ABI Modell 373A) und wurden freundlicherweise von Herrn Andreas Hunziker durchgeführt.

3.10 DNA-Sequenziergel (Harnstoff-Polyacrylamidgel)

Eine gute Qualität der Gelelektrophorese beeinflußt das Ausmaß der Sequenzinformation, die man aus einer Sequenzierreaktion erhalten kann. Dabei bestimmt die Länge bzw. die Zeit, die ein Gel läuft, die Sequenzregion, die lesbar ist. Unter optimalen Bedingungen ist es möglich, 300 oder sogar mehr Basen zu lesen. Für die Elektrophorese der Proben aus der DNA-Sequenzierreaktion wurde ein denaturierendes Harnstoff-Polyacrylamidgel verwendet. Dazu wurde eine 6%ige Gellösung mit 8 M Harnstoff hergestellt. Die 40 x 20 cm großen Glasplatten wur-

den gesäubert und eine davon mit Repel-Silane behandelt, welches das spätere Ablösen des Gels erleichtert. Nach dem Zusammenbau der Glasplatten, die durch einen 0.5 mm dicken Abstandhalter getrennt waren, wurde zunächst ein Dichtungsrand zwischen die Glasplatten am unteren Rand pipettiert. War er polymerisiert, wurde die restliche Gellösung luftblasenfrei zwischen die Glasplatten gegossen und der Kamm eingeführt. Nach der Polymerisation wurde das Gel in die vorbereitete Gelelektrophorese-Apparatur, in deren Pufferkammern sich 1x Glycerinpuffer befand, eingespannt. Das Gel wurde 1 Stunde bei 20 W vorelektrophoresiert, damit es gleichmäßig auf ca. 50 °C temperiert war. Die Proben wurden vor dem Auftragen 2 Minuten bei 75 °C denaturiert. Währenddessen wurde der Harnstoff mit Puffer aus den Geltaschen gespült. Von den Proben wurden je 3 µl geladen. Die Gelelektrophorese fand bei 30 W statt. Nach 1 Stunde wurden die gleichen Proben noch einmal in unbenutzte Geltaschen geladen. So gelang es, den Lesebereich zu vergrößern. Wenn vom zweiten Probenauftrag die Bromphenolblau-Bande fast aus dem Gel herauslief, wurde die Elektrophorese gestoppt. Bromphenolblau läuft in einem 6%igen Polyacrylamidgel entsprechend einem DNA-Fragment der Größe von 26 Nukleotiden (Xylencyanol läuft 106 Nukleotiden entsprechend). Das Gel wurde mit Blottingpapier von der Glasplatte abgezogen, mit Frischhaltefolie abgedeckt und 1 Stunde getrocknet (Geltrockner Modell 583, BioRad, München, Deutschland). Über Nacht wurde ein autoradiographischer Film auf das getrocknete Gel gelegt. Nach Entwicklung (siehe 6.2) konnte die Sequenz direkt von unten nach oben abgelesen werden (5' → 3'-Richtung).

20x Glycerinpuffer:	216 g/l	Tris-Base
	72 g/l	Taurin (2-Aminoethansulfonsäure)
	4 g/l	Na ₂ EDTA·2H ₂ O (Titriplex)
		filtrieren oder autoklavieren
6%ige Gellösung:	15 ml	40 % Acrylamid/Bisacrylamid (19:1)
	5 ml	20x Glycerinpuffer
	35 ml	H ₂ O
	48 g	Harnstoff unter Rühren und Erwärmen lösen, mit H ₂ O auf 100 ml auffüllen
Dichtungsrand:	5 ml	6%ige Gellösung
	50 µl	10% (w/v) APS
	10 µl	TEMED
Gel:	95 ml	6%ige Gellösung
	700 µl	10% (w/v) APS
	40 µl	TEMED

3.11 DNA-Modifikationen

DNA-Dephosphorylierung

Beim Klonieren in eine einzige Restriktionsstelle besteht das Problem, daß es beim Plasmid zu einer Selbstligation (Religation) kommen kann. Um diesen Vorgang zu unterdrücken und den Anteil des gewünschten rekombinierten Plasmids zu erhöhen, ist es von Vorteil, das Ausgangsplasmid nach seiner Spaltung mit alkalischer Phosphatase (AP) zu behandeln. Diese Phosphomonoesterase ist bei alkalischem pH-Wert aktiv und entfernt die 5'-Phosphatgruppen an den Enden linearer DNA, die für eine Ligierungsreaktion notwendig sind. Eine Ligation zwischen AP-behandelten (dephosphorylierten) DNA-Fragmenten wird somit verhindert.

Für die Dephosphorylierung (30 Minuten bei 37 °C) wurden nach Ablauf der Restriktionsspaltung 0.05 U der alkalischen Phosphatase pro pmol DNA-Ende zur Restriktionsreaktion zugesetzt.

Auffüllen der überhängenden Enden mit Klenow-Polymerase

Das Klenow-Fragment (auch großes Fragment der DNA-Polymerase I) ist ein Teilfragment der DNA-Polymerase aus *E. coli*, welches nach Spaltung mit Subtilisin entsteht. Im Gegensatz zum Gesamtzym besitzt das Klenow-Fragment keine 5'→3'-Exonuklease-Aktivität mehr, sondern nur noch die 3'→5'-Exonuklease- und 5'→3'-Polymerase-Aktivität. Hier wurde das Klenow-Fragment zum Auffüllen überhängender 5'-Enden nach einem Restriktionsverdau eingesetzt, d. h. es wurde die 5'→3'-Polymerase-Aktivität genutzt, die die Anlagerung von Mononukleotiden aus Desoxynukleosid-5'-triphosphaten an das 3'-OH-Ende der Matrizen-DNA katalysiert. In einem 25 µl-Ansatz befanden sich 2 µg DNA, ein Gemisch der dNTPs (25 mM in der Stammlösung), Ligationspuffer (siehe DNA-Ligation) und das Klenow-Fragment. Die Inkubation erfolgte für 30 Minuten bei 37 °C.

DNA-Ligation

Die DNA-Ligase des *E. coli*-Phagen T4 katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen benachbarten 3'-Hydroxy- und 5'-Phosphatenden doppelsträngiger DNA-Ketten, so daß aus DNA-Fragmenten oder ringoffenen Plasmiden wieder geschlossene ringförmige Moleküle entstehen. Die hier verwendete T4-DNA-Ligase verbindet sowohl kohäsive als auch glatte Enden. Ebenso kann sie offene Phosphodiesterbindungen (*nick*) in einem Strang der Doppelhelix schließen.

Die Ligationsreaktion fand in einem Volumen von 20-50 μl je nach Bedarf ü. N. in Ligationspuffer statt. Reaktionen mit überstehenden Enden wurden bei 4 °C, solche mit glatten Enden bei RT durchgeführt. Zur Ligation eines Fragments oder Oligonukleotids in ein Plasmid wurde 10x mehr vom Fragment oder Oligonukleotid in der Reaktion eingesetzt, um die Religation des Plasmids zu unterdrücken. Außerdem wurde sie durch Dephosphorylierung (siehe oben) der 5'-Phosphatgruppen an den Enden linearer DNA unterdrückt. Eine 10minütige Inkubation bei 65 °C stoppte die Reaktion. Folgte nach der Ligation eine Transformation, wurde keine Hitzeinaktivierung durchgeführt, da sie zu einem drastischen Ausbeuteverlust an transformierten Zellen führt.

Ligationspuffer: 66 mM Tris/HCl, pH 7.5
5 mM MgCl_2
1 mM Dithioerythrit
1 mM ATP

Topoisomerase-Reaktion

DNA-Topoisomerasen sind Enzyme, die, ohne die Nukleotidsequenz zu verändern, DNA-Moleküle in verschiedene topologische Formen überführen können. Dies gelingt, da sie die Anzahl der Windungen der Doppelhelix verändern, zusätzlich spiralisieren und sogar verflechten oder verknoten können. Die hier verwendete Topoisomerase I kann durch Einführen eines Einzelstrangbruchs ohne Kofaktoren ein DNA-Molekül entspannen. Topoisomerasen des Typ II (z. B. Gyrase) durchtrennen hingegen beide DNA-Stränge bei der Reaktion.

Zur Überprüfung der entstandenen DNA-Banden wurde ein analytisches Agarosegel (siehe 3.3) angefertigt. Nach der Plasmidaufreinigung (siehe 3.1) zeigten sich stets mehrere Banden in einem Gel. Es sollte verifiziert werden, ob es sich um Plasmid-Monomere, -Dimere oder ringoffene Plasmide handelte. Ein 10 μl -Ansatz enthielt ca. 0.4 μg Plasmid-DNA, 12.5 U Topoisomerase I, 1x Topoisomerasepuffer und 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ BSA. Nach einer Reaktionszeit von ca. 1 Stunde bei 37 °C wurde die Probe auf ein Agarosegel geladen.

10x Topoisomerasepuffer: 350 mM Tris/HCl, pH 7.5
720 mM KCl
50 mM MgCl_2
50 mM DTT

Der Topoisomerasepuffer wurde steril filtriert, aliquotiert und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die Aliquots wurden nur einmal verwendet, da die Topoisomerasereaktion empfindlich auf mehrfach aufgetautes DTT reagiert.

Herstellung von Topoisomeren

Nach der “*band counting*”-Methode von Keller (1975) kann man die Superhelizität von Plasmid-DNA durch Messung der Differenz der Verwindungszahl ΔLk in einem Chloroqingel bestimmen (siehe 3.3). Dazu wird eine Referenzleiter von Topoisomeren benötigt, die durch Zugabe von Ethidiumbromid zu der Topoisomerase-Reaktion erzeugt wurde (Singleton & Wells, 1982). Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und reduziert die Anzahl der Helixwindungen abhängig von seiner Konzentration im Ansatz. Die Topoisomerase I relaxiert die verbleibenden superhelikalen Verwindungen.

Nach der Reaktion (ü. N. bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$) wurden Ethidiumbromid und Topoisomerase I durch mehrfache Phenolextraktion entfernt. Auf einem Agarosegel aufgetragen ergab jeder Reaktionsansatz einen Satz von Banden, wobei sich benachbarte Banden jeweils durch eine superhelikale Windung unterscheiden. Für eine genaue Bestimmung des Unterschieds der Verwindungszahl nativ superhelikaler Plasmide wurde eine Elektrophorese mit einem Chloroqingel durchgeführt.

30 μl-Ansatz:	3 μg	pVW7
	0-8 μl	Ethidiumbromid-Lösung (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)
	0.5 μl	Topoisomerase I (12.5 U)
	3 μl	10x Topoisomerasepuffer
		H ₂ O ad 30 μl

4. Proteinexpression und -aufreinigung

4.1 Proteinexpression

Die Proteinexpressionen für die Proteine wt-NtrC, NtrC^{S160F}, NtrC^{D54E,S160F} und σ^{54} fanden alle im 10 Liter-Fermenter statt. In einer 100 ml Vorkultur LB-Medium (Amp/Chl) wuchsen die Zellen bis zu einer optischen Dichte von $\text{OD}_{600} \sim 0.6-1.0$ heran. Mit den gewaschenen Zellen (siehe 2.5) wurden 9 Liter LB-Medium (Amp/Chl) im Fermenter angeimpft. Die Bakterien wuchsen unter Belüftung (7 l/min), Rühren (ca. 400 rpm) und pH-Kontrolle (pH 7.5) wieder bis $\text{OD}_{600} \sim 0.6$ heran. Nun wurde die Expression des gewünschten Proteins mit einer Endkon-

zentration von 1 mM IPTG induziert. Für maximal 3 Stunden wuchsen die Zellen weiter. Da später der Verlauf der Proteinexpression kontrolliert werden sollte, wurden vor der Induktion und nach jeden weiteren 30 Minuten 1 ml-Proben entnommen. Die Ernte der Zellen erfolgte durch eine 15minütige Zentrifugation bei 6000 x g und 4 °C. Die Sedimente wurden bei -80 °C gelagert.

Die *E. coli* RNA-Polymerase (Core-Enzym), die zur Bildung des RNAP- σ^{54} -Holoenzym benötigt wurde, wurde freundlicherweise von Prof. Hermann Heumann (MPI für Biochemie, München) zur Verfügung gestellt oder von Epicentre Technologies bezogen.

Expressionstest

Durch den Expressionstest erhält man eine Information darüber, ob die den Expressionsvektor enthaltenen Zellen nach der Induktion durch 1 mM IPTG korrekt Protein produziert haben. Dieser Test wurde als Vorversuch (50 ml-Kultur) und auch als Kontrolle einer Fermentation im präparativen Maßstab durchgeführt.

Von einer Kultur, die bis zu einer OD₆₀₀ von 0.6-1.0 gewachsen war, wurde direkt vor der Induktion und danach im Abstand von 30 Minuten maximal 3 Stunden lang je 1 ml Probe entnommen. Die Proben wurden 5 Minuten abzentrifugiert (Tischzentrifuge, max. Umdrehungen), der Überstand verworfen und das Sediment in 100 µl SDS-Ladepuffer aufgenommen. Die Zellen wurden durch 20minütige Inkubation bei 95 °C aufgeschlossen, wobei die meisten Proteine in Lösung gehen. Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert, und aus dem Überstand wurden 20 µl auf ein SDS-Polyacrylamidgel geladen (siehe 4.2).

Auf dem Gel zeigte sich nach der Coomassie-Färbung (siehe 4.2) ein Proteinmuster, bei dem die Bande des interessierenden Proteins vor der Induktion schwach ist und nach der Induktion im Laufe der Zeit zunimmt.

IPTG-Stocklösung: 0.2M IPTG, bei -20 °C lagern

2x SDS-Ladepuffer: 25 mM Tris/HCl, pH 6.8
 20 % Glycerin
 2 % SDS
 300 mM β -Mercaptoethanol
 0.1 % Bromphenolblau

4.2 Proteinaufreinigung

Zellaufschluß

Das Zellsediment von 1 Liter Kultur (ca. 4 g), das durch Fermentation im präparativen Maßstab gewonnen und bei -80 °C gelagert wurde, wurde auf Eis aufgetaut und in maximal 40 ml Lysepuffer aufgenommen. Auf Eis wurde das Zellmaterial 4 x 15 Sekunden mit Ultraschall behandelt (Branson SONIFIER 250 mit den Einstellungen: *output control*: 5; *duty cycle*: 50 %), unterbrochen von 1minütigen Pausen auf Eis, um ein zu starkes Erwärmen der Probe zu verhindern.

Die Zelltrümmer wurden durch eine 20minütige Zentrifugation bei 4 °C und 12.000 rpm (Sorvall RC 5B Plus, Rotor: SS-34) entfernt. Anschließend erfolgte eine Filtration des Überstands (0.45 µm bzw. 0.22 µm Porenweite). Von diesem Aufreinigungsschritt und allen weiteren wurde eine Probe (10-20 µl) genommen und mit der doppelten Menge 1x SDS-Ladepuffer versehen, so daß später der Verlauf der Aufreinigung auf einem SDS-Polyacrylamidgel dokumentiert werden konnte.

Lysepuffer:	0.1%	NP-40
	1 mM	PMSF
	1 mM	EDTA
	1x	Bindungspuffer (s. u.)

Affinitätschromatographie

Das Prinzip der Affinitätschromatographie beruht auf einer spezifischen Interaktion zweier Reaktionspartner. Dazu muß eine Säulenmatrix vorhanden sein, die kovalent gebunden einen Liganden enthält, der fähig ist, den zu isolierenden Stoff spezifisch zu binden. Nach Waschschritten zur Entfernung nicht gebundener Stoffe muß der zu isolierende Stoff spezifisch von der Säule eluiert werden können.

In dieser Arbeit wurde eine Ni-NTA-Chelatagarose-Säule (im folgenden als Ni-NTA-Säule bezeichnet) verwendet, die sich hervorragend für die Aufreinigung von Proteinen mit einem (His)₆-Peptid (6 Histidine) eignet. An ein Säulenmaterial ist über eine Kohlenstoffkette der Ligand Ni-NTA gebunden. Das Nickelion ist mit 4 Liganden gebunden und wird bei der Elution nicht ausgewaschen. An die beiden freien Bindungsstellen kann eine Bindung zu zwei Imidazolringen des (His)₆-Peptids stattfinden. Durch die Elution mit einer Imidazolösung wird das gebundene Protein von der Säule gelöst, da das freie Imidazol die an das Säulenma-

terial gebundenen Histidinreste verdrängt. Somit gelingt in einem zeitsparenden Ein-Schritt-Vorgehen eine Aufreinigung des Proteins mit (His)₆-Peptid aus einem komplexen Proteingemisch. Die Ni-NTA-Affinitätschromatographie wurde mit einer FPLC-Anlage (*Fast Protein Liquid Chromatography*) durchgeführt. Die FPLC arbeitet mit geringerem Druck als die HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*, siehe 3.8), aber mit physiologischen Puffersystemen und metallfreien Oberflächen, so daß sie sehr gut für die Reinigung von aktiven Biomolekülen geeignet ist.

Bevor der Überstand vom Zellaufschluß auf die Ni-NTA-Säule geladen wurde, wurde MgCl₂ (Endkonzentration 2 mM) zur Probe zugegeben, um EDTA zu komplexieren. Alle Chromatographiestritte fanden mit einer Flußrate von 0.5 ml/min statt. Die mit 1x Bindungspuffer äquilibrierte Säule wurde mit dem Überstand beladen. Nach vollständigem Auftrag und Durchfluß der nichtbindenden Proteine erfolgte das Waschen mit 1x Waschpuffer. Für σ^{54} wurde dazu ein Waschpuffer mit einer Endkonzentration von 20 mM Imidazol verwendet, da in Vorversuchen mit dem NtrC-Waschpuffer (60 mM Imidazol) zuviel σ^{54} in diesem Schritt von der Säule gewaschen wurde. Die Elution wurde mit 1x Elutionspuffer durchgeführt.

8x Bindungspuffer: 40 mM Imidazol
 4 M NaCl
 160 mM Tris/HCl, pH 7.9

8x NtrC-Waschpuffer: 480 mM Imidazol
 4 M NaCl
 160 mM Tris/HCl, pH 7.9

8x σ^{54} -Waschpuffer: 60 mM Imidazol
 4 M NaCl
 160 mM Tris/HCl, pH 7.9

10x Elutionspuffer: 2.5 M Imidazol
 2.5 M NaCl
 200 mM Tris/HCl, pH 7.9

Den 1x Puffern vor Gebrauch β -Mercaptoethanol (Endkonzentration 10 mM) zugeben.

Die gesammelten Eluatfraktionen wurden vereinigt, mit EDTA (Endkonzentration 5 mM) versehen und ü. N. gegen MonoQ-Puffer A dialysiert.

Ionenaustauschchromatographie

Die Grundlage der Trennung bei der Ionenaustauschchromatographie liegt in der reversiblen Adsorption geladener Moleküle an eine immobilisierte Säulenmatrix mit entgegengesetzter Ladung. Die hier verwendete MonoQ HR 5/5 Säule (Pharmacia, Freiburg, Deutschland) ist ein starker Anionenaustauscher. Ihre positiv geladene Gelmatrix (geladene Gruppe $-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$, Kugelgröße $10\ \mu\text{m}$) tritt mit den negativen Aminosäureseitenketten der Proteine in Wechselwirkung. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgt bei dieser Säule mit einem Salzgradienten.

Das dialysierte Eluat der Ni-NTA-Säule wurde auf die mit MonoQ-Puffer A äquilibrierte MonoQ-Säule aufgetragen. Nach weiteren 5 Minuten mit 100 % MonoQ-Puffer A wurde der Gradient von 0 % auf 100 % MonoQ-Puffer B in 150 ml mit einer Flußrate von 0.5 ml/min gestartet. Die NtrC-Proteine eluierten bei 20 mM Tris/HCl (pH 7.9), 180 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT und 5 % (v/v) Glycerin von der Säule, während σ^{54} bei 20 mM Tris/HCl (pH 7.9), 350 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT und 5 % (v/v) Glycerin eluierte. Ein Teil der Eluate wurde direkt mit flüssigem Stickstoff eingefroren, bei anderen Teilen wurde die Glycerinkonzentration auf 30 % oder 50 % erhöht.

MonoQ-Puffer A:	20 mM	Tris/HCl, pH 7.9
	50 mM	KCl
	0.1 mM	EDTA
	1 mM	DTT
	5 %	Glycerin

MonoQ-Puffer B: für NtrC	20 mM	Tris/HCl, pH 7.9
	500 mM	KCl
	0.1 mM	EDTA
	1 mM	DTT
	5 %	Glycerin

MonoQ-Puffer B: für σ^{54}	20 mM	Tris/HCl, pH 7.9
	750 mM	KCl
	0.1 mM	EDTA
	1 mM	DTT
	5 %	Glycerin

Die Puffer filtern und entgasen, das DTT wird erst kurz vor Gebrauch zugegeben.

Dialyse-Puffer:	50 mM	Tris/HCl, pH 7.9
	100 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
	30 %/50 %	Glycerin
	1 mM	DTT

Konzentrationsbestimmung der Proteine

Die Konzentrationen der Protein-Stammlösungen wurden durch eine Absorptionsmessung bei 280 nm unter Verwendung der entsprechenden Extinktionskoeffizienten bestimmt, die aus der Aminosäuresequenz kalkuliert wurden (Gill & von Hippel, 1989; Rippe *et al.*, 1997a).

Extinktionskoeffizient:	σ^{54}	$\epsilon = 42900 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
	NtrC	$\epsilon = 46400 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
	cRNAP	$\epsilon = 198500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese lassen sich Proteine unter denaturierenden Bedingungen nach ihrem Molekulargewicht trennen. Dem Proteingemisch wird dabei Natriumdodecylsulfat (SDS) zugegeben. SDS ist ein anionisches Detergens, das nichtkovalente Wechselwirkungen in nativen Proteinen zerstört, so daß die Peptidkette entfaltet wird und das Protein gegebenenfalls in seine Untereinheiten zerfällt. Durch hydrophobe Wechselwirkungen kommt es zu einer gleichmäßigen Beladung der Polypeptidketten mit dem negativ geladenen SDS, wobei die Eigenladungen der Proteine überdeckt werden. Dadurch erlangen die SDS-Proteinmizellen hydrodynamisch äquivalente Konformationen und gleiche Ladungsdichte pro Längeneinheit, d. h. ein ungefähr konstantes Verhältnis von Ladung zu Masse. Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) ist eine diskontinuierliche Elektrophorese, bei der das denaturierte Proteingemisch zunächst in einem großporigen Sammelgel mit niedrigem pH-Wert konzentriert wird. Die eigentliche Auftrennung der verschiedenen Proteine erfolgt in einem Trenngel mit engeren Poren und höherem pH-Wert.

Die 20 x 21 cm großen Glasplatten wurden mit 1 mm-Abstandhaltern durch Klammern fixiert und der untere Rand mit ca. 1 ml der Trenngellösung abgedichtet. Das Trenngel wurde luftblasenfrei zwischen die Glasplatten gegossen, bis ca. 4/5 der Höhe erreicht waren. Damit eine gerade Oberkante entstand, wurde die Gellösung mit Ethanol überschichtet. Nach Polymerisation des Trenngels konnte das Ethanol abgegossen werden, die Sammelgellösung über das

Trenngel gegossen und der Probenkamm eingesetzt werden. Nach Abschluß der Polymerisation wurde das Gel in die Elektrophoresekammer, deren Pufferreservoirs mit 1x Tris-Glycin-Puffer versehen waren, eingespannt. Nach Entfernen des Probenkamms und Spülen der Probenaschen konnten die Proben, die im Verlauf der Proteinaufreinigung genommen wurden, aufgetragen werden.

12%iges Trenngel: (40 ml)	13.1 ml	H ₂ O
	16.0 ml	30% Acrylamid/Bisacrylamid (37.5:1)
	10.0 ml	1 M Tris/HCl, pH 9.1
	0.4 ml	10% SDS
	0.5 ml	10% APS
	15 µl	TEMED
4%iges Sammelgel: (10 ml)	7.25 ml	H ₂ O
	1.3 ml	30% Acrylamid/Bisacrylamid (37.5:1)
	1.25 ml	1M Tris/HCl, pH 6.8
	0.1 ml	10% SDS
	0.1 ml	10% APS
	10 µl	TEMED
1x Tris-Glycin-Puffer:	25 mM	Tris
	250 mM	Glycin (Elektrophoresegrad)
	0.1 %	SDS

Es wurde eine 10x Stocklösung hergestellt aus der sich der pH-Wert von 8.3 nach Verdünnung zum 1x Puffer ergibt.

Gelfärbung/Entfärbung

Proteine, die durch eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt wurden, wurden mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blue R 250 gefärbt. Der Farbstoff wurde in einem Gemisch aus Methanol:Ethanol:Essigsäure gelöst, das die Polypeptide gleichzeitig fixiert. Nach Herstellen der Färbelösung wurde diese ü. N. gerührt und vor Gebrauch filtriert. Das Gel wurde so lange (mindestens 1 Stunde) in einem passenden Gefäß in ausreichend Färbelösung geschwenkt, bis es gleichmäßig blau erschien. Dann wurde die Färbelösung gegen die Entfärbelösung ausgetauscht und weiter geschwenkt. Nach gründlicher Entfärbung (mehrmaliger Austausch der Entfärbelösung) konnten Proteinmengen von < 0.1 µg auf dem Gel detektiert werden.

Coomassie-Färbelösung:	0.2% (w/v)	Coomassie Brilliant Blue R 250
	42.5% (v/v)	Ethanol
	5% (v/v)	Methanol
	10% (v/v)	Essigsäure
Entfärbelösung:	7 % (v/v)	Essigsäure

Konservierung gefärbter Polyacrylamidgele

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die gefärbten SDS-Polyacrylamidgele zu Dokumentationszwecken zwischen Zellophanfolien konserviert. Dazu wurde ein Geltrocknungsrahmen (Kem-En-Tec, Kopenhagen, Dänemark) mit entsprechend großen Zellophanfolien verwendet. Das Gel und die zwei Folien wurden für 20 Minuten in eine 3%ige bzw. 10%ige Glycerinlösung gelegt, um die bei der Trocknung auftretenden Spannungen zu reduzieren.

- den oberen Teil des aufgeklappten Rahmens auf einen Tisch legen und eine vorbehandelte Folie darüberlegen
- das Gel auflegen, einige Milliliter 3%ige Glycerinlösung hinzupipettieren und vorhandene Luftblasen entfernen
- das Gel mit der zweiten Folie luftblasenfrei bedecken, die untere Rahmenhälfte auflegen und die Rahmen zusammendrücken
- das Gel ü. N. unter dem Abzug trocknen

5. Rasterkraftmikroskopie

Mit Hilfe des Rasterkraftmikroskops (SFM = *Scanning Force Microscope* oder AFM = *Atomic Force Microscope*), welches 1986 von Binnig *et al.* entwickelt wurde, läßt sich durch Abtasten einer Oberfläche mit einer sehr feinen Spitze ein topographisches Abbild im Bereich weniger Nanometer erzeugen. Dabei werden, im Gegensatz zur traditionellen Mikroskopie, kein Licht- oder Elektronenstrahl und keine Linsen verwendet.

5.1 Aufbau und Funktionsweise des Rasterkraftmikroskops

In einer Halterung sitzt ein biegsamer Federbügel, an dessen Ende sich eine sehr feine Spitze aus Silizium oder Siliziumnitrid befindet. Durch ein piezoelektrisches Element wird der Federbügel zur Schwingung gebracht. Beim Abtasten der auf eine glatte Oberfläche gebundenen

Probe wird die Spitze in Kontakt mit der Oberfläche gebracht. Dadurch wird die Amplitude der Schwingung der vertikal oszillierenden Spitze gedämpft. Die Detektion erfolgt durch einen Laserstrahl, der von der Rückseite des Federbügels auf eine 4-Quadranten-Photodiode reflektiert wird (Abb. 2.2).

Eine Auslenkung des Laserstrahls aus seiner geeichten Position führt zu einer Spannungsänderung an der Photodiode. Über einen elektronischen Regelkreis wird das Präparat mit Hilfe eines piezoelektrischen Elements, das sich unter der Probe befindet, auf oder ab bewegt (z-Richtung), bis die ursprüngliche Schwingungsamplitude wieder erreicht ist. An das piezoelektrische Element, das meist in Röhrenform verwendet wird, können Spannungen angelegt werden, die es ermöglichen, daß das Präparat sehr genau in x-, y- und z-Richtung bewegt werden kann. Die Bewegung in x- und y-Richtung Zeile für Zeile führt dabei zum Abtasten der Probe, während die Bewegung in z-Richtung die Kraft zwischen Probe und Spitze konstant hält.

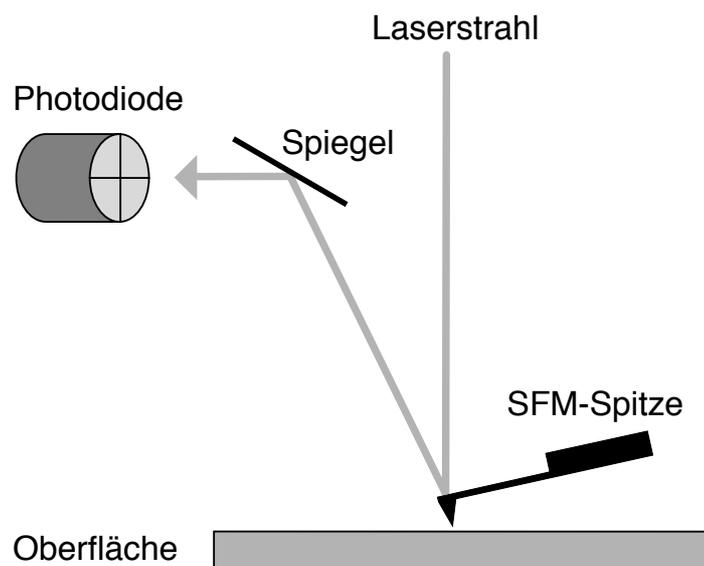


Abb. 2.2 Detektion der Änderung der Schwingungsamplitude
Der an der Spitze des Federbügels reflektierte Laserstrahl trifft auf eine Quadranten-Photodiode. So können Verbiegungen der Spitze und damit Änderungen der Topographie nachgewiesen werden.

Somit ergibt sich aus der Bewegung des piezoelektrischen Elements in z-Richtung für jeden Punkt der x-y-Ebene die Höhe der Probe. Durch ein Computerprogramm werden diese Informationen in ein topographisches Bild umgesetzt.

Interaktion zwischen Spitze und Probe

Zur Untersuchung von biologischen Proben wurde das Rasterkraftmikroskop bisher in zwei verschiedenen Modi eingesetzt, dem Kontakt- und dem Tapping-Modus.

Im Kontakt-Modus ist die Spitze während des Abtastvorgangs ständig mit der Oberfläche in Kontakt, und es wirken Kräfte zwischen 1 und 10 nN. Dadurch kommt es zwischen Spitze und Probe zu Kompression und Scherung, wodurch die Probe möglicherweise beschädigt wird. Dies ist besonders bei biologischen Proben, die relativ weich sind, ein Problem. Im Tapping-Modus (Hansma *et al.*, 1993) hingegen oszilliert der Federbügel auf und ab. Bei Kontakt mit der Probe wird die Schwingungsamplitude der Spitze gedämpft. Außerdem kommt es während des Abtastens immer nur zu einem kurzen Kontakt der Spitze mit der Probe, so daß Bewegungen der Probe durch Scherkräfte reduziert werden. Daher ist es möglich auch schwach befestigte Proben abzutasten. In dieser Arbeit wurde für die Untersuchungen der biologischen Proben in Luft und Flüssigkeit nur der Tapping-Modus eingesetzt.

Obwohl bei Messungen in Luft die Probe getrocknet ist, ist sie noch von einer dünnen Schicht adsorbierten Wassers umgeben (Bustamante *et al.*, 1993; Bustamante & Rivetti, 1996). Durch diese Wasserschicht kommt es zwischen Spitze und Probe zu Kapillarkräften, die im Größenbereich von einigen hundert Nanonewton liegen. Um diesen anziehenden Kräften in der Wasser-Luft-Grenzschicht entgegenzuwirken, werden für Messungen in Luft härtere Federbügel verwendet als beim Abtasten in Flüssigkeit. Jeder Federbügel besitzt eine charakteristische Federkonstante k in [N/m], die sich aus der Geometrie des Federbügels und seiner Resonanzfrequenz errechnen läßt. Wenn die Verbiegung des Federbügels, die durch den Kontakt der Spitze mit der Probe hervorgerufen wird, klein ist im Verhältnis zur Länge des Trägers, gilt das Hookesche Gesetz (Gl. 2.5): Die Kraft F ist das Produkt aus der Federkonstanten k und der Verbiegung $z-z_0$.

$$F = -k(z - z_0) \quad (2.5)$$

Die Federkonstanten von kommerziell erhältlichen SFM-Federbügeln liegen zwischen 0.1 und 100 N/m. Für biologische Proben in Luft werden Federbügel mit Federkonstanten von 20-60 N/m und in Flüssigkeit mit 1 N/m verwendet. Dadurch ergeben sich Kräfte zwischen Spitze und Probe von 1-10 nN in Luft und 100-1000 pN in Flüssigkeit. Die Resonanzfrequenz des Federbügels liegt in Luft bei 50-500 kHz und in Flüssigkeit bei etwa 5-40 kHz, dabei oszilliert die Spitze in Luft etwa 20 nm und in Flüssigkeit 1-5 nm.

Auflösung – Einfluß der Spitzengeometrie

Für die Auflösung im Rasterkraftmikroskop gibt es keine generelle Definition (Guckenberger, 1998) wie sie für Licht- und Elektronenmikroskope bekannt ist. Hier spielt nicht nur der Geräteaufbau eine große Rolle, sondern auch die Beschaffenheit der zu untersuchenden Probe (Bustamante & Rivetti, 1996).

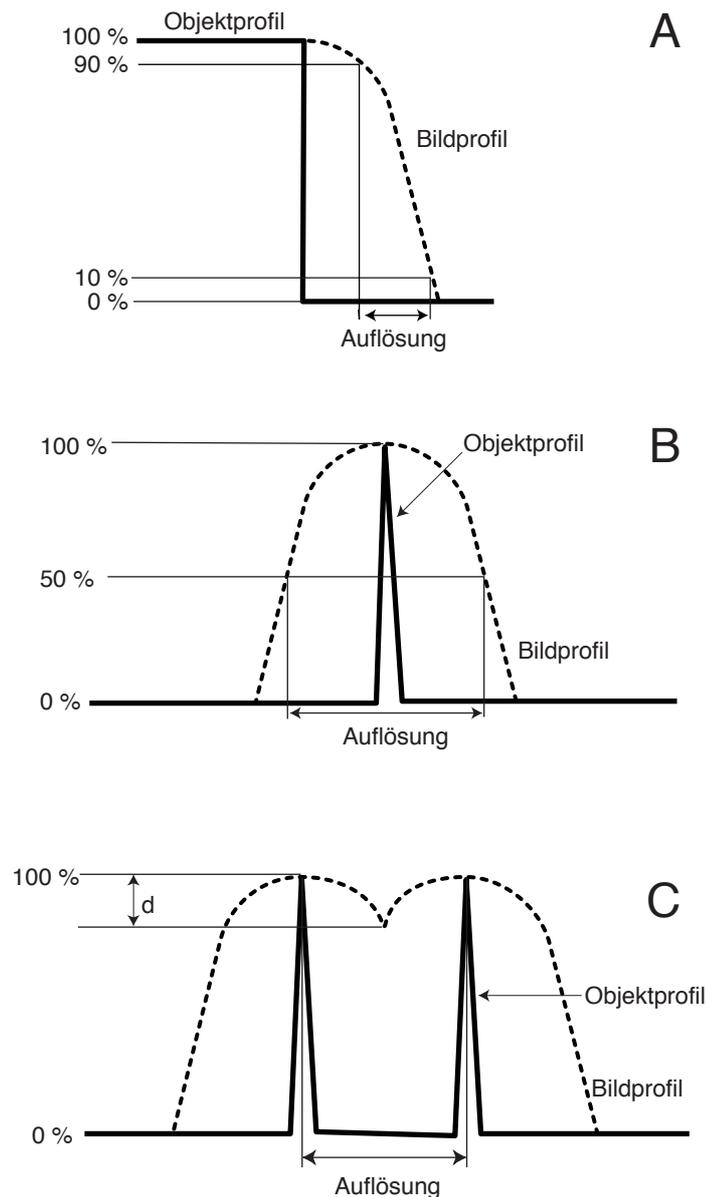


Abb. 2.3 Verschiedene Definitionen der Auflösung für das Rasterkraftmikroskop

A, Definition der Auflösung für eine scharfe Kante: Es werden die Werte bei 10 und 90 % der Objekthöhe verwendet (an Stelle dieser Werte werden häufig auch die Werte bei 25 und 75 % verwendet). B, Definition der Auflösung für ein einzelnes Objekt: Wert der Objektbreite bei halber Objekthöhe. C, Definition der Auflösung für zwei getrennte Objekte: Das Tal zwischen den beiden Objekten muß mindestens 19 % der Gesamthöhe (Rayleigh Kriterium) betragen.

Abbildung 2.3 zeigt drei verschiedene Möglichkeiten die Auflösung einer Probe zu bestimmen. In Teilabbildung A gibt die seitliche Differenz zwischen 10 und 90 % des Bildprofils Auskunft über die Auflösung. Oft werden auch die Werte bei 25 und 75 % verwendet. Zur Bestimmung der Auflösung in Abb. 2.3B werden die beiden Bildprofilpunkte rechts und links des Objekts verwendet, bei denen 50 % der maximalen Höhe erreicht sind. Im dritten Fall sollen zwei benachbarte Objekte als solche erkannt werden. Dazu muß das Bildprofil zwischen den beiden Objekten um mindestens 19 % (= Rayleigh Kriterium) der vollen Höhe absinken. Hierbei ist zu beachten, daß der Wert für die Auflösung von der Höhendifferenz der beiden Objekte abhängt (Bustamante & Rivetti, 1996). Typischerweise erhält man Auflösungen von 5-10 nm lateral und 2 Å horizontal. Dabei hat die Spitzengeometrie den größten Einfluß auf die Auflösung des Geräts, da die laterale Auflösung direkt vom Endradius der Spitzenkrümmung (r) und dem Öffnungswinkel der Spitze (Φ) abhängt (Bustamante *et al.*, 1993). Abbildung 2.4 zeigt, wie sich die Spitzengeometrie auf die Abbildung der Probe auswirkt.

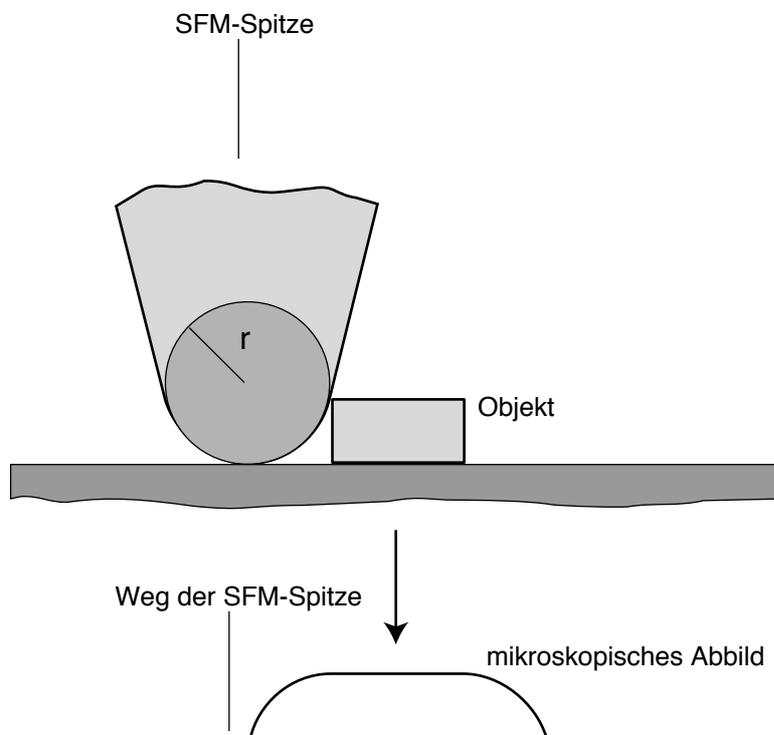


Abb. 2.4 Einfluß der Spitzengeometrie auf das mikroskopische Abbild

Schematische Darstellung der Überlagerung der Geometrien von Spitze und Probe im SFM. Aus dem Weg der Spitze wird deutlich wie sich das mikroskopische Abbild vom abgetasteten Objekt unterscheidet.

Aus Abb 2.4 wird deutlich, daß sich das mikroskopische Abbild der Probe in erster Näherung um den Durchmesser der Spitze verbreitert. Da sich die Spitze beim Abtastvorgang der Probe nähert, sich über sie hinweg bewegt und sich schließlich hinter ihr befindet, ergibt sich für die detektierte Struktur eine gemessene Weite, die aus der Probenweite und dem Durchmesser ($2 \times$ Radius) der Spitze zusammengesetzt ist. Um eine optimale Auflösung zu erreichen, wurden möglichst feine Spitzen verwendet. Unter anderem handelte es sich dabei um Spitzen, auf die im Rasterelektronenmikroskop durch eine elektronenstrahlinduzierte Materialablagerung eine noch feinere Spitze gesetzt wurde (Keller & Chou, 1992).

SFM-Flüssigkeitszelle

Für Aufnahmen in Flüssigkeit wurde eine spezielle Meßzelle (Digital Instruments, Santa Barbara, CA, USA) verwendet, die mit einem O-Ring gegenüber der Probenoberfläche abgedichtet ist (Abb. 2.5). Da sie einen Zu- und Ablauf besitzt, können Lösungen ausgetauscht werden, indem sie mittels einer Spritze vorsichtig injiziert werden. Das Füllvolumen der Flüssigkeitszelle beträgt ca. $30 \mu\text{l}$.

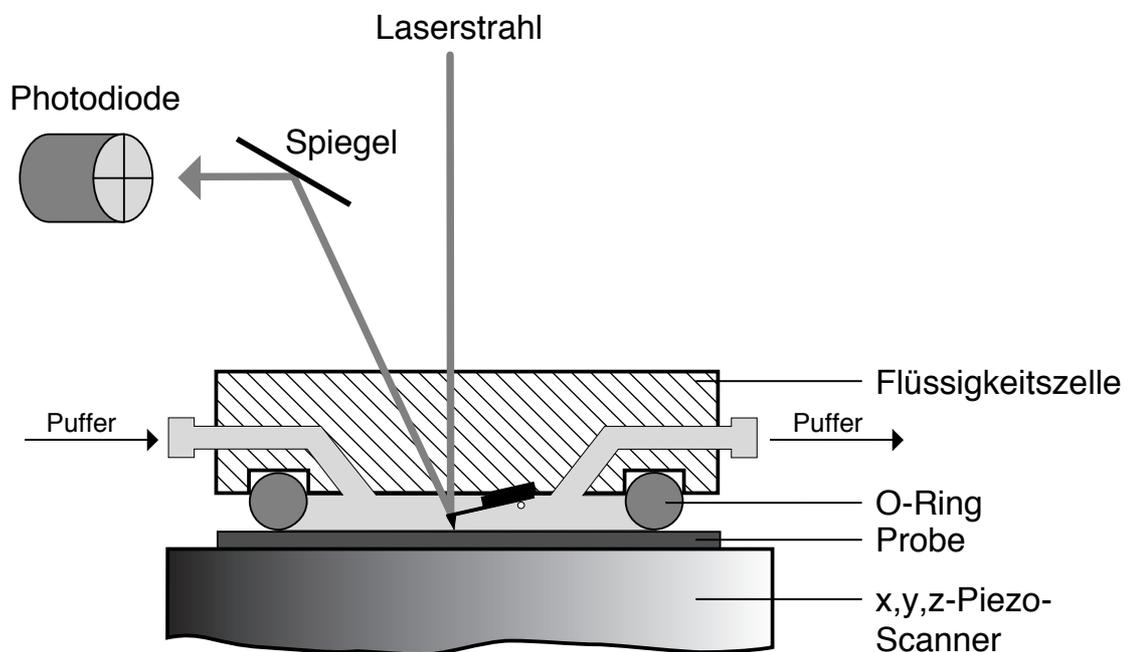


Abb. 2.5 Schematische Darstellung einer Zelle für Messungen in Flüssigkeit

Die Flüssigkeitszelle besitzt ein Volumen von ca. $30 \mu\text{l}$ und wird durch einen O-Ring gegen den Glimmer abgedichtet. Über einen Zu- und Ablauf kann der Puffer in der Zelle während der Messungen ausgetauscht werden. Der übrige Aufbau ist in Abb. 2.2 beschrieben.

5.2 Rasterkraftmikroskopie von RNAP- σ^{54} und DNA

Die Rasterkraftmikroskop-Aufnahmen wurden mit dem Nanoscope III (Digital Instruments, Santa Barbara, CA, USA) aufgenommen. Für die Untersuchungen von RNAP- σ^{54} -DNA-Komplexen wurden drei unterschiedliche Protokolle erarbeitet, die im folgenden erläutert sind. Es wurden jeweils fünf unabhängige Untersuchungen in Flüssigkeit und Luft durchgeführt.

Protokoll I (Puffer):

Für Aufnahmen in Flüssigkeit (Puffer) wurde die SFM-Flüssigkeitszelle (Digital Instruments) verwendet (Abb. 2.5). Sie wurde auf den frisch gespaltenen Glimmer (Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland) gesetzt, wobei ein O-Ring die Zelle abdichtet und für ein Füllvolumen von ca. 30 μ l sorgt. Die Zelle wurde mit einer Lösung von RNAP- σ^{54} und dem 1036 bp-Fragment, welches den *glnA*-Promotor besitzt, in 0.5x HS-Puffer in Konzentrationen von 0.5-1 nM für das Protein und die DNA gefüllt. Die Probe äquilibrierte 10 Minuten. Während dieser Zeit ließen sich die Komplexe nicht gut sichtbar machen, da sie nicht ausreichend an die Glimmeroberfläche gebunden waren und von der Nadelspitze noch verschoben werden konnten. Um die DNA fester an den Glimmer zu binden, wurden 60 μ l Ni-Puffer in die Flüssigkeitszelle gegeben. Nach weiteren 10 Minuten waren die Komplexe ausreichend fest an die Glimmeroberfläche gebunden, so daß reproduzierbar gute Bilder aufgenommen werden konnten. Danach konnte der Ni-Puffer in der Zelle gegen 0.5x HS-Puffer ohne sichtbaren Effekt auf die Konformation der Komplexe ausgetauscht werden. Die Bilder wurden im Tapping-Modus aufgenommen, wobei elektronenstrahlgeschärfte Silizium-Spitzen (Nanotools) verwendet wurden. Sie wiesen eine typische Kraftkonstante von 1 N/m, eine Resonanzfrequenz von 100-140 kHz in Luft und einen Spitzenradius von 5-10 nm (Spezifikationen vom Hersteller) auf. Für das Abtasten in Flüssigkeit wurden Vibrationsfrequenzen von 18 bis 30 kHz benutzt.

4x HS-Puffer:	40 mM	Hepes/KOH, pH 8.0
	80 mM	Mg-acetat
	400 mM	K-acetat

Ni-Puffer:	5 mM	Hepes/KOH, pH 8.0
	2 mM	MgCl ₂
	5 mM	NiSO ₄

Protokoll II (Luft, waschen mit 1 ml):

Die Protein-DNA-Komplexe wurden gebildet, indem 3 bis 4 nM des 1036 bp *PvuII*-Fragments aus pJES534 mit 3 nM RNAP- σ^{54} in 0.5x HS-Puffer für 10 Minuten bei 37 °C inkubiert wurden. Anschließend wurde zu dieser Lösung 0.2% (v/v) Nonidet-P 40 zu einer Endkonzentration von 0.01 % gegeben. Von dieser Mischung wurden 20 μ l auf einen frisch abgezogenen Glimmer pipettiert, der mit 1 ml Wasser gewaschen und mit Stickstoff getrocknet wurde. Der Glimmer wurde ins SFM-Gerät eingebaut. Die Bilder wurden in Luft bei Umgebungsfeuchtigkeit mit geätzten Silizium-Spitzen (Typ Nanosensor; L.O.T. Oriel) mit einer Kraftkonstanten von 17 bis 64 N/m, einer Dicke von 3.5 bis 5.0 μ m, einer Resonanzfrequenz zwischen 250 und 400 kHz und einem Spitzenradius von 10 nm (Spezifikationen des Herstellers) aufgenommen.

Protokoll III (Luft, waschen mit 50 ml):

Die Herstellung der Proben erfolgte wie für Protokoll II, allerdings mit 4 bis 10 nM RNAP- σ^{54} und 1 bis 2 nM DNA. Nach dem Aufbringen der Probe auf den frisch abgezogenen Glimmer wurde dieser mit 50 ml Wasser gewaschen. Die weiteren Schritte entsprachen Protokoll II.

Bildanalyse

Die Bildaufnahmen erfolgten mit der Software des Rasterkraftmikroskops. Ein Bild war aus 512 x 512 Bildpunkten zusammengesetzt und wurde mit einer Rasterfrequenz von 2 bis 4 Bildzeilen pro Sekunde über 2 bis 4 μ m aufgenommen. Zur Weiterverarbeitung wurden die Bildschirmdateien als TIFF-Dateien exportiert. Die TIFF-Dateien wurden mit dem Bildverarbeitungsprogramm Adobe Photoshop 3.0 (Adobe Systems, Mountain View, CA, USA) auf einem Macintosh Computer konvertiert und mit dem Programm NIH Image Version 1.58 (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA) ausgewertet, das Messungen des Verbiegungswinkels und der Konturlänge ermöglicht.

Datenanalyse

Die gesammelten Daten wurden mit dem Programm Kaleidagraph Version 3.08 (Synergy Software, Reading, PA, USA) analysiert und dargestellt. Dabei entsprachen die Fehlerbalken für jede Kategorie jeweils der Quadratwurzel der Anzahl der Proben. Die statistische Analyse der Daten wurde mit dem Programm JMP Version 3.1.5 (SAS Institute, USA) vorgenommen.

Analyse der RNAP- σ^{54} -Bindungsstelle

Die Auswertung erfolgte nur an Molekülen, die ohne Berührung zu anderen Molekülen auf dem Glimmer lagen. RNAP- σ^{54} war sowohl an verschiedenen Stellen auf dem DNA-Fragment als auch an den Enden gebunden. Die letztgenannten Moleküle wurden nur für die Auswertung der prozentualen Verteilung der Bindungsstellen herangezogen. Für die Bestimmung des Verbiegungswinkels und der scheinbaren Konturlänge, wurden nur DNA-Fragmente verwendet, bei denen die RNAP- σ^{54} nicht am Ende gebunden war.

Vom Mittelpunkt der gebundenen RNAP- σ^{54} wurde zu jedem Ende des DNA-Fragments die Strecke gemessen und das Verhältnis r der Länge des kürzeren Arms zur gesamten DNA-Konturlänge berechnet (Abb. 2.7). Der *glnA*-Promotor befindet sich 139 nm von einem Ende und 213 nm vom anderen Ende der DNA entfernt, so daß sich eine Konturlänge von 352 nm ergibt. Dies entspricht einem theoretischen Wert von $r = 0.40$ für den geschlossenen Komplex der RNAP- σ^{54} am Promotor. Aufgrund der so bestimmten Position der Polymerase wurde zwischen spezifischen und unspezifischen Komplexen unterschieden. Bei den Messungen in Flüssigkeit waren die meisten Komplexe in der Umgebung des Promotors gebunden (Abb. 3.9). Die aus der Gaußverteilung erhaltene Standardabweichung von 0.03 wurde verwendet, um den Bereich von 0.34 bis 0.46 ($r = 0.40 \pm 0.06$) für spezifisch gebundene Komplexe zu definieren. Dieser Bereich entsprach dem theoretischen Wert für r und zwei Standardabweichungen der Verteilung der in Flüssigkeit gemessenen Proben. Komplexe außerhalb dieses Bereiches wurden als unspezifisch gebundene RNAP- σ^{54} ausgewertet.

Messung des DNA-Verbiegungswinkels

Der DNA-Verbiegungswinkel der gebundenen RNAP- σ^{54} wurde ermittelt, indem jeweils am Eintritts- und Austrittspunkt der DNA in die RNAP- σ^{54} eine Gerade gelegt und der Winkel α am Schnittpunkt der beiden Geraden gemessen wurde (Rees *et al.*, 1993). Der DNA-Verbiegungswinkel θ ist definiert als $\theta = 180^\circ - \alpha$ (Abb. 2.6, Abb. 2.7).

Mit Hilfe von NtrC-Protein konnte die intrinsische Verbiegung des *glnA*-Promotors bestimmt werden. Dazu wurde NtrC^{D54E,S160F} an den Enhancer gebunden und für getrocknete Proben verwendet, für Proben in Flüssigkeit wurde wt-NtrC verwendet. Die RNAP- σ^{54} wurde bei diesen Untersuchungen als zirkuläre Maske mit den entsprechenden Dimensionen des Proteins in Flüssigkeit (35 nm Durchmesser) und Luft (27 nm Durchmesser), die zunächst bestimmt werden mußten, über die Position des Promotors gelegt. Die Messungen des Verbiegungswinkels

erfolgten wie oben beschrieben. Außerdem wurde gleichzeitig der DNA-Verbiegungswinkel der am Enhancer gebundenen NtrC-Moleküle auf gleiche Weise gemessen.

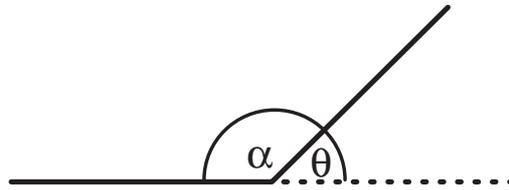


Abb. 2.6 Definition des DNA-Verbiegungswinkels θ

Auf den SFM-Bildern wurde der Winkel α gemessen und daraus wie angegeben θ bestimmt.

Messung der DNA-Konturlänge

Die Messung der Konturlänge wurde an den gleichen Komplexen durchgeführt, an denen auch der Verbiegungswinkel gemessen wurde. Die Konturlänge jedes Moleküls wurde durch zwei Linien bestimmt, die jeweils von der Mitte der RNAP· σ^{54} zum Ende der DNA reichten (s. Analyse der RNAP· σ^{54} -Bindungsstelle und Abb. 2.7).

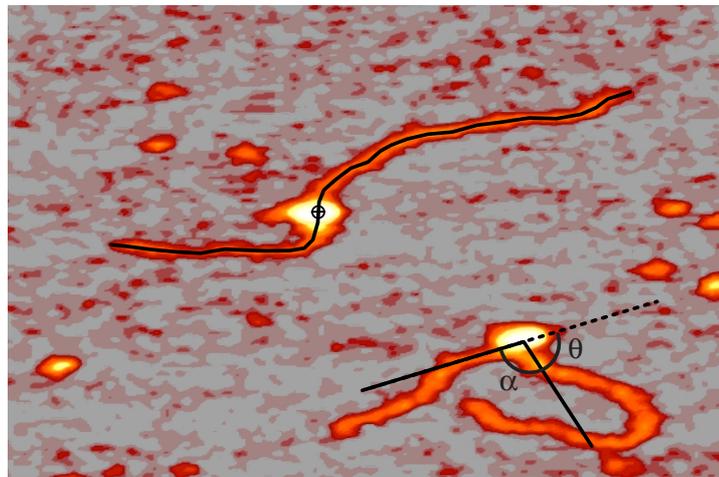


Abb. 2.7 Auswertung der SFM-Bilder

Am oberen Molekül ist die Messung der Konturlänge dargestellt. Von der Mitte der RNAP· σ^{54} (s. Markierung) wurde zu jedem DNA-Ende eine Linie gezogen und deren Länge gemessen. Daraus wurde die Konturlänge des Moleküls und die Bindungsposition von RNAP· σ^{54} bestimmt (s. Text). Das untere Molekül zeigt die Messung des Verbiegungswinkels (s. Abb. 2.6).

Durch Addition der zu einem Komplex gehörenden Längen erhielt man die Konturlänge. Zusätzlich wurden freie DNA-Moleküle in Flüssigkeit und in Luft analysiert. Die Konturlänge dieser Moleküle wurde bestimmt, indem eine Linie durch die Mitte der DNA von einem Ende zum anderen gelegt wurde.

Bestimmung der Persistenzlänge

Zur Bestimmung der Persistenzlänge des gesamten DNA-Fragments wurde der End-zu-End-Abstand der Moleküle gemessen. Die Werte für die Konturlänge und den End-zu-End-Abstand wurden in Gl. 2.6 (Rivetti *et al.*, 1996) eingesetzt und die Persistenzlänge berechnet.

$$\langle R^2 \rangle_{2D} = 4PL \left(1 - \frac{2P}{L} \left(1 - e^{-\frac{L}{2P}} \right) \right) \quad (2.6)$$

mit R^2 = mittleres Quadrat des End-zu-End-Abstands, P = Persistenzlänge und L = Konturlänge. Entsprechend wurde die Persistenzlänge für die Promotorregion bestimmt.

6. Transkriptionsexperimente

Die Transkriptionsreaktionen wurden nach einer ähnlichen Vorgehensweise wie von Klose *et al.* (1993) durchgeführt. Dabei handelt es sich um einen “*single round transcription assay*” bei dem die DNA nur einmal abgelesen wird. Dies wird erreicht, indem der Transkriptionsreaktion Heparin zugesetzt wird, welches die Bindung der RNAP· σ^{54} an die DNA verhindert und Komplexe aus RNAP· σ^{54} und der Promotor-DNA zerstört, bei denen die DNA noch nicht aufgeschmolzen ist (geschlossener Komplex). Der Komplex aus RNAP· σ^{54} und aufgeschmolzener DNA (offener Komplex) wird jedoch nicht von Heparin zerstört. Somit ist die Transkriptionsreaktion nur für diejenigen RNAP· σ^{54} -Moleküle einmal möglich, die sich zum Zeitpunkt der Heparinzugabe im offenen Komplex mit der DNA befinden. Eine zweite Transkriptionsrunde wird vom zugegebenen Heparin verhindert. Mit dieser Versuchsanordnung läßt sich die Kinetik der Bildung des offenen Komplexes messen, die gleichzeitig der Aktivierung der Transkriptionsinitiation durch die Loop-Bildung von am Enhancer gebundenem NtrC und promotorgebundener RNAP· σ^{54} entspricht.

6.1 Aktivitätsbestimmung der aufgereinigten Proteine

Vor der Durchführung der Transkriptionskinetiken mußte die Konzentration der Proteine (NtrC, RNAP· σ^{54} , σ^{54}) sowie von Carbamylphosphat ermittelt werden, bei der die Menge des radioaktiven RNA-Transkripts maximal war. Der aufgereinigte σ -Faktor (σ^{54}) wurde zunächst

mit dem Kernenzym der RNA-Polymerase im Verhältnis 1:1 gemischt. In verschiedenen Versuchsreihen wurde jeweils die Menge eines Proteins von 0 bis 90 nM variiert, während die anderen Proteine in ausreichender, konstanter Menge vorhanden waren. Als DNA-Matrize wurde das Plasmid pJES534 verwendet, welches zwei Bindungsstellen für NtrC und ca. 450 bp entfernt den RNAP- σ^{54} -spezifischen *glnA*-Promotor besitzt. Von den entstandenen Transkripten ließ sich die Menge an Protein ablesen, die für eine optimale Transkriptionsreaktion nötig war. War trotz Erhöhung der Proteinmenge keine vermehrte Ausbeute an radioaktivem Transkript festzustellen, wurde in den folgenden Experimenten die Proteinmenge verwendet, die am niedrigsten konzentriert dieses maximale Transkriptsignal erzeugte. Analoge Testreihen wurden auch mit Carbamylphosphat durchgeführt. Im folgenden ist der Versuchsaufbau zur Bestimmung der optimalen RNAP- σ^{54} -Konzentration dargestellt: In 18 μ l Bindungsansatz befanden sich 5 nM pJES534, 0-90 nM RNAP- σ^{54} , 200 nM wt-NtrC, 1 mM DTT, 1x HAM-Puffer und 100 μ g/ml BSA. Zur Bindung der Proteine an die DNA wurde der Ansatz für 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Zu jeder Probe wurde 1 μ l einer 1 M Carbamylphosphatlösung (Endkonzentration 50 mM) gegeben, wodurch das Aktivatorprotein phosphoryliert wurde, und es wurde weitere 5 Minuten inkubiert. Durch Zugabe von 1 μ l einer 100 mM ATP-Lösung (Endkonzentration 5 mM) wurde das Aufschmelzen der Promotor-DNA induziert und für weitere 10 Minuten inkubiert. In dieser Zeit bildete sich ein Gleichgewicht zwischen offenen und geschlossenen Komplexen am *glnA*-Promotor. Zu 5 μ l des Bindungsansatzes wurden dann 15 μ l eines RNA-Elongationsansatzes mit 53 μ M GTP, 33 μ M CTP, 2.7 μ Ci α - 32 P-CTP, 1x HAM-Puffer, 1 mM DTT und 0.133 mg/ml Heparin gegeben, und das RNA-Transkript konnte gebildet werden. Die Reaktion wurde nach 10 Minuten durch Zugabe von Formamid-Stop-Puffer unterbrochen. Auf ein Harnstoff-Polyacrylamidgel (50 ml Gellösung für 20 x 20 cm Glasplatten, siehe 3.10) wurden je 15 μ l Probe aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 20 mA/Gel. Die RNA-Transkripte wurden durch Autoradiographie visualisiert.

5x HAM-Puffer:

1 M	Hepes/KOH, pH 8.0
4 M	K-acetat
100 mM	Mg-acetat

Formamid-Stop-Puffer:

- 10 ml 1x TBE mit einer Spatelspitze Bromphenolblau versetzen und filtern (0.22 μ m)
- 10 ml Formamid mit 200 μ l der gefilterten Bromphenolblau-Lösung mischen

6.2 Transkriptionskinetiken

Transkriptionsreaktion

Die Transkriptionsreaktion des zu untersuchenden Plasmids fand in Gegenwart eines zweiten Plasmids statt, welches als interne Kontrolle diente. Vom Kontrollplasmid pVW7-158 wurde ein 158 nt langes Transkript erzeugt, welches gut vom 484 nt langen Transkript des anderen Plasmids unterschieden werden konnte.

Zunächst wurden der Bindungsansatz ohne Proteine und der RNA-Elongationsansatz zusammengemischt. Während der 5minütigen Inkubationszeit des Bindungsansatzes mit RNAP· σ^{54} und wt-NtrC bei 37 °C, in der die Proteine an die DNA binden, wurde der RNA-Elongationsansatz in 2 μ l-Aliquots aufgeteilt. Nach Zugabe von 1.1 μ l einer 1 M Carbamylphosphatlösung (Endkonzentration 20 mM) zum Bindungsansatz wurden weitere 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. In dieser Zeit wurde wt-NtrC durch Carbamylphosphat phosphoryliert, welches als Phosphodonor agiert. Dadurch wird die Multimerisierung des Proteins am Enhancer ermöglicht. Durch Zugabe von 2.75 μ l einer 100 mM ATP-Lösung (Endkonzentration 5 mM) wird die Kinetik gestartet. ATP ermöglicht die Loop-Bildung zwischen phosphoryliertem wt-NtrC und promotorgebundener RNAP· σ^{54} sowie das Aufschmelzen der DNA. Alle 10 Sekunden wurde ein 5 μ l-Aliquot des Bindungsansatzes zu einem 2 μ l-Aliquot des RNA-Elongationsansatzes pipettiert. Auf einen 0-Wert wurde nach einigen Experimenten verzichtet, da ohne ATP reproduzierbar kein Transkript entstand. Die Transkriptionsreaktion jeder Probe wurde nach 10 Minuten durch Zugabe von 10 μ l Formamid-Stop-Puffer beendet. Von den Proben wurden je 8 μ l auf ein Harnstoff-Polyacrylamidgel (siehe 3.10) aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurden die radioaktiven Transkriptbanden durch Autoradiographie visualisiert. Mit einem Phosphorimager (Molecular Dynamics, Krefeld, Deutschland) wurde das Probensignal quantifiziert und ausgewertet.

Bindungsansatz : (55 μ l)	5 nM	Plasmid X
	5 nM	Kontrollplasmid pVW7-158
	1 mg/ml	BSA
	0.5 x	HS-Puffer
	1 mM	DTT
	50 nM	RNAP· σ^{54}
	80 nM	wt-NtrC

RNA-Elongationsansatz:	24 μ Ci	α - ³² P-CTP
(22 μ l)	1.77 mM	GTP
	1.77 mM	UTP
	0.08 mM	CTP
	0.5x	HS-Puffer
	1 mM	DTT
	0.08 mg/ml	Heparin
 4x HS-Puffer:	 40 mM	 Hepes/KOH, pH 8.0
	80 mM	Mg-acetat
	400 mM	K-acetat

Autoradiographie

Nach der Trocknung wurden die Gele ü. N. mit einem Autoradiographiefilm exponiert. Die Silberhalogenidteilchen des Röntgenfilms werden durch die β -Strahlung des radioaktiven Phosphats an den Stellen zersetzt, an denen sich im Gel das radioaktive Transkript befindet. Die Entwicklung der Filme erfolgte mit einer Agfa-Entwicklungsmaschine (Modell CURIX HT-330 U). Das Bild gibt ortstreu und über einen bestimmten Bereich auch quantitativ die Verteilung der Radioaktivität wieder.

Phosphorimager-Auswertung

Für eine quantitative Auswertung der Transkriptionskinetiken wurden die Gele in einer Expositionskassette (20 x 25 cm, Molecular Dynamics, Krefeld, Deutschland) positioniert und die Phosphorbildplatte (20 x 25 cm, Molecular Dynamics) aufgelegt. Die Expositionszeit betrug 3 bis 4 Tage. Danach erfolgte die Auswertung mit dem Phosphorimager (Molecular Dynamics).

Die Phosphorbildplatten bestehen aus feinen Kristallen von BaFBr:Eu⁺², die von einer organischen Matrix stabilisiert werden. Die energiereiche Strahlung der radioaktiven Probe (β -Strahlung) hebt das Eu⁺² in einen angeregten Zustand, in dem es schließlich zu Eu⁺³ oxidiert wird. Dieser Oxidationszustand ist stabil und wird auch dann beibehalten, wenn die Bildplatte von der radioaktiven Probe genommen wird. Im Phosphorimager wird die Bildplatte mit einem Helium-Neon-Laser, der rotes Licht der Wellenlänge 633 nm emittiert, Pixel für Pixel abgetastet. Die Energie des Laserlichts wird absorbiert, wodurch Elektronen freigesetzt werden, die vorher im BaFBr-Kristallgitter festgehalten wurden, so daß Eu⁺³ zu Eu⁺² reduziert wird. Während dieses Vorgangs wird Energie in Form von blauem Licht abgegeben, welches detektiert wird. Letztendlich entsteht ein digitales Bild des Gels, das mit Hilfe des Programms Image-

Quant v. 1.2 (Molecular Dynamics) ausgewertet werden kann. Die ermittelten Daten wurden in das Programm Kaleidagraph Version 3.08 (Synergy Software, Reading, PA, USA) übertragen und graphisch dargestellt. Vor einer Wiederverwendung wurden die Bildplatten in ihren Grundzustand versetzt. Dazu wurden sie für 12 Minuten auf einem Image Eraser (Molecular Dynamics) gelöscht.

Theoretische Analyse der DNA-Krümmung

Die intrinsische Krümmung der DNA kann anhand verschiedener Modelle aus der Sequenz vorhergesagt werden (Goodsell & Dickerson, 1994; Schätz & Langowski, 1997). Für die hier verwendeten Transkriptionsplasmide wurde die Sequenz vom Anfang des Enhancers bis zum Ende des Promotors auf Krümmung untersucht. Dazu wurde das Computerprogramm *Curvature* (Schätz, 1998) verwendet, das auf einem Algorithmus von Bolshoy basiert (Bolshoy *et al.*, 1991). Mit Hilfe der von Michael Habeck vorgenommenen Programmerweiterung zur graphischen Darstellung von Molekülen gelang es, neben der erwarteten Krümmung des eingefügten Oligonukleotids noch weitere Krümmungen in dem DNA-Bereich zwischen Enhancer und Promotor zu ermitteln und darzustellen.

Ergebnisse

1. Proteinexpression und -aufreinigung

1.1 Erstellung des Expressionsvektors für wt-NtrC

Zur Expression von Wildtyp-NtrC (wt-NtrC) mußte ein geeigneter Vektor hergestellt werden, während für die Proteine NtrC^{S160F}, NtrC^{D54E,S160F} und σ^{54} schon fertige Expressionsvektoren vorhanden waren (Rippe *et al.*, 1997a). Das Gen für wt-NtrC wurde dazu aus dem Plasmid pFI20 (Fiedler, 1996) herausgeschnitten und in den Plasmidvektor pET15b kloniert, der auch für die anderen Proteine verwendet worden war. Das entstandene Plasmid enthält die wt-NtrC-Sequenz mit einem (His)₆-Peptid am N-Terminus und wurde als pNTRC-3 bezeichnet. Die Richtigkeit der Sequenz von pNTRC-3 und der anderen Expressionsvektoren wurde durch eine Sequenzierreaktion überprüft (s. Material und Methoden, 3.9 und 3.10). Die Plasmidkarten der Expressionsplasmide befinden sich im Anhang der Arbeit.

1.2 Proteinexpression

Für die geplanten Experimente mußten ausreichende Mengen der Proteine σ^{54} , wt-NtrC und der Mutanten NtrC^{S160F} und NtrC^{D54E,S160F} exprimiert und aufgereinigt werden. Dazu wurde für jedes Protein eine Fermentation im 10 Liter-Fermenter durchgeführt (s. Material und Methoden, 4.1). Die gewonnenen Zellen wurden zunächst bei -80 °C bis zur weiteren Aufarbeitung gelagert. Die Verwendung des Vektors pET15b ermöglichte eine hohe Expression der Zielproteine in den *E. coli*-Zellen BL21(DE3)pLysS. Die Induktion dieses Prozesses erfolgte mit IPTG (s. Material und Methoden, 4.1) und ließ sich durch Analyse von Proben, die der Bakterienkultur im Abstand von 30 Minuten entnommen wurden, auf einem SDS-Polyacrylamidgel verfolgen. Nach der Induktion zeigte sich eine im zeitlichen Verlauf stärker werdende

Bande, die vor der Induktion nicht zu sehen war. In Abb. 3.1 entspricht diese Bande wt-NtrC mit (His)₆-Peptid (MW 54 kDa, ohne (His)₆-Peptid MW 52 kDa).

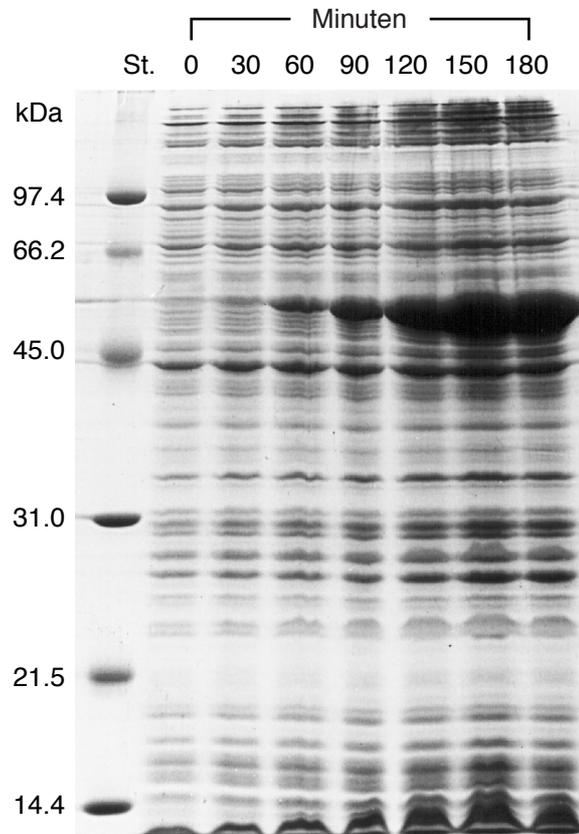


Abb. 3.1 Überexpression von wt-NtrC aus Plasmid pNTRC-3

Das denaturierende SDS-Gel zeigt Proben, die vor bzw. zu den angegebenen Zeiten nach der Induktion mit IPTG der *E. coli*-Kultur entnommen wurden. Im Laufe der Zeit nahm die Menge an überexprimiertem Wildtyp-NtrC deutlich zu. In Spur 1 ist ein Molekulargewichtsmarker aufgetragen. Das überexprimierte NtrC-Protein hat das erwartete Molekulargewicht von 54 kDa.

Die Mutanten NtrC^{S160F} und NtrC^{D54E,S160F} konnten genauso gut wie das Wildtyp-Protein überexprimiert werden. Abbildung 3.2 zeigt das Ergebnis für σ^{54} . Hierbei fällt auf, daß sich die zunehmende Bande nicht bei 56 kDa befindet, sondern bei ca. 70 kDa. Dieses langsamere Laufverhalten wurde schon in der Literatur beschrieben (Hunt & Magasanik, 1985). Es ist wahrscheinlich auf die negative Nettoladung von ca. -35 unter den gewählten Gelbedingungen (pH 9.0) zurückzuführen. Glykoproteine, Lipoproteine, sehr positive oder negative Proteine binden SDS auf untypische Weise, was zu einem anomalen Laufverhalten im Gel führen kann (Hawcroft, 1997). Eine genaue Erklärung für dieses Phänomen ist jedoch nicht bekannt. Die Kontrolle mit einem nativen 8%igen Polyacrylamidgel zeigte σ^{54} in einer Laufhöhe von ca. 48

kDa. Da das Protein selbst negativ geladen ist, läuft es in diesem Gel etwas schneller. Damit ist das Laufverhalten im denaturierenden Polyacrylamidgel eindeutig auf die untypische Beladung mit SDS zurückzuführen.

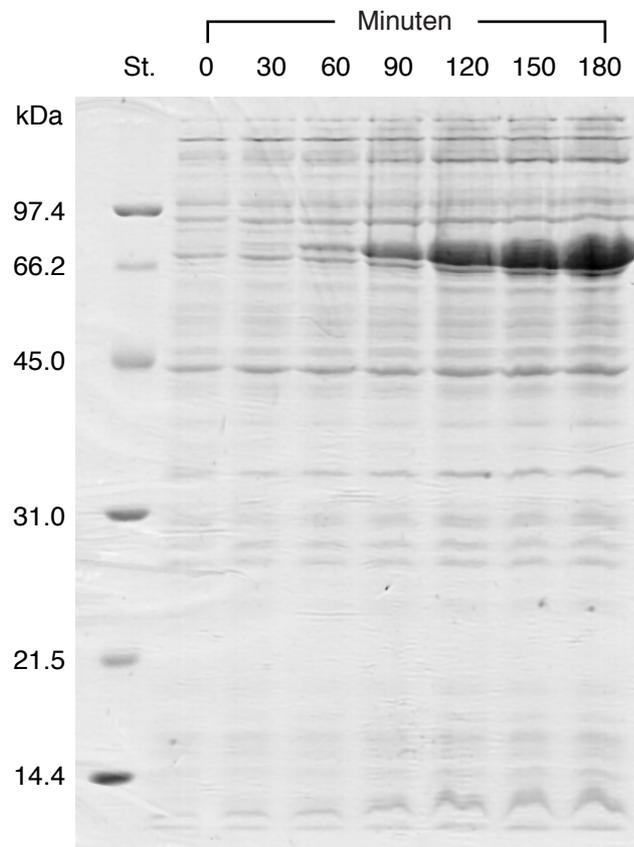


Abb. 3.2 Überexpression von σ^{54} aus Plasmid pS54-2

Das denaturierende SDS-Gel zeigt Proben, die vor bzw. zu den angegebenen Zeiten nach der Induktion mit IPTG der *E. coli*-Kultur entnommen wurden. Im Laufe der Zeit nahm die Menge an überexprimiertem σ^{54} deutlich zu. In Spur 1 ist ein Molekulargewichtsmarker aufgetragen. Obwohl σ^{54} mit dem (His)₆-Peptid ein Molekulargewicht von 56 kDa besitzt, läuft es im SDS-Gel in der Höhe von ca. 70 kDa.

1.3 Native Proteinaufreinigung

Für die Proteinaufreinigung wurden ca. 4 g Zellen in Lysepuffer aufgenommen und mit Ultraschall behandelt, wobei der größte Teil des Proteins in Lösung geht. Um den Verlauf der Aufreinigung zu dokumentieren, wurde auf einem SDS-Polyacrylamidgel von jedem Aufreinigungsschritt eine Probe analysiert (Abb. 3.3). Die überexprimierten Proteine besitzen ein N-terminales (His)₆-Peptid, das eine Affinitätschromatographie an einer Ni-NTA-Säule ermöglicht. Das aufzureinigende Protein sollte als einziges an die Säule binden, da seine sechs Histi-

die meisten Proteine haben nicht an die Säule gebunden und befanden sich im Durchlauf oder dissoziierten beim Waschen von der Säule, während wt-NtrC erst im Elutionsschritt bei höheren Imidazolkonzentrationen in großer Menge von der Säule eluierte.

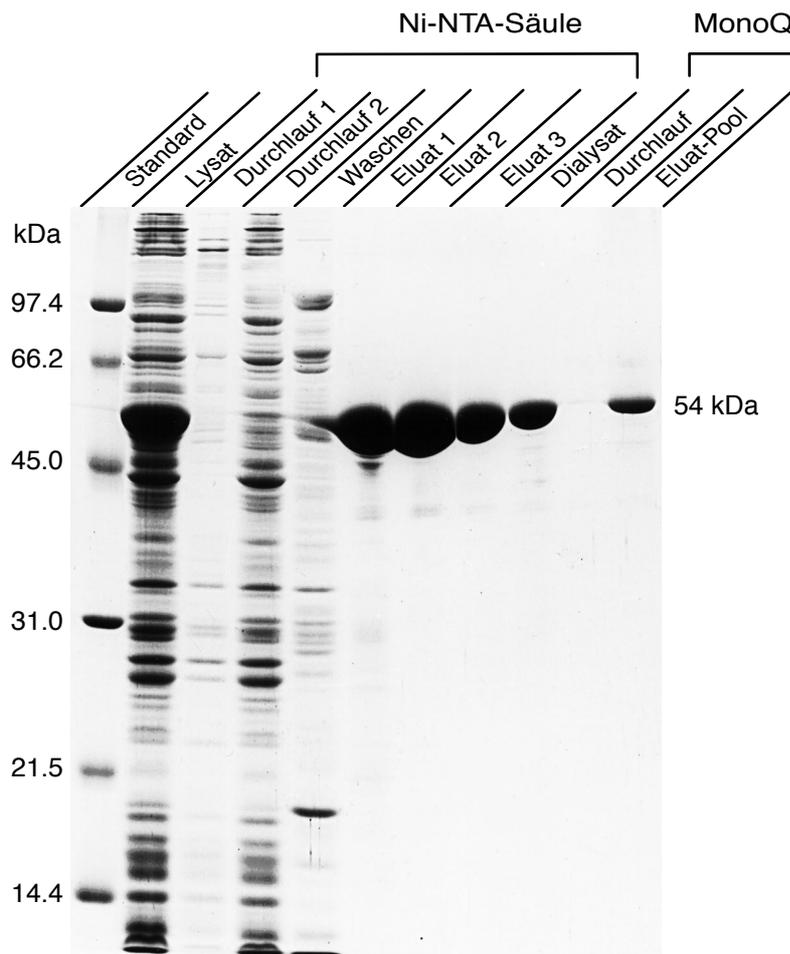


Abb. 3.3 Native Proteinaufreinigung von wt-NtrC mit $(\text{His})_6$ -Peptid

Im Lysat erkennt man eine große Menge von überexprimiertem wt-NtrC. Diese Probe entspricht dem letzten Probenauftrag in Abb. 3.1 (180 Minuten nach der Induktion). Mit Hilfe des $(\text{His})_6$ -Peptids konnte die Aufreinigung des Proteins mit einer Ni-NTA-Säule durchgeführt werden. Das Eluat von der Ni-NTA-Säule wurde nach Dialyse noch mit einer MonoQ-Anionenaustauscher-Säule aufgetrennt, um letzte Verunreinigungen zu entfernen.

Zur weiteren Aufreinigung wurde anschließend eine Anionenaustauschchromatographie mit einer MonoQ-Säule durchgeführt (s. Material und Methoden, 4.2). Das Eluat der Ni-NTA-Säule wurde ü. N. gegen den Auftragspuffer der MonoQ-Säule dialysiert und verdünnt aufgetragen, um eine Aggregation der Proteine zu vermeiden. Die Elution der Fraktionen erfolgte

über einen Salzgradienten. Der Durchlauf der MonoQ-Säule zeigt, daß wt-NtrC fast vollständig gebunden hatte. Im Eluat-Pool lag wt-NtrC schließlich als sauber aufgereinigtes Protein vor (Abb. 3.3).

Die Aufreinigung der NtrC-Mutanten verlief entsprechend der von wt-NtrC. Noch bessere Ergebnisse lieferten die Aufreinigungen von σ^{54} . Nachdem durch Vorversuche eine optimale Imidazolkonzentration für den Waschpuffer der Ni-NTA-Säule gefunden werden konnte, so daß das Protein nicht schon im Waschschrift von der Säule eluierte, konnte gegenüber wt-NtrC die doppelte Menge σ^{54} aus der gleichen Menge Zellen aufgereinigt werden.

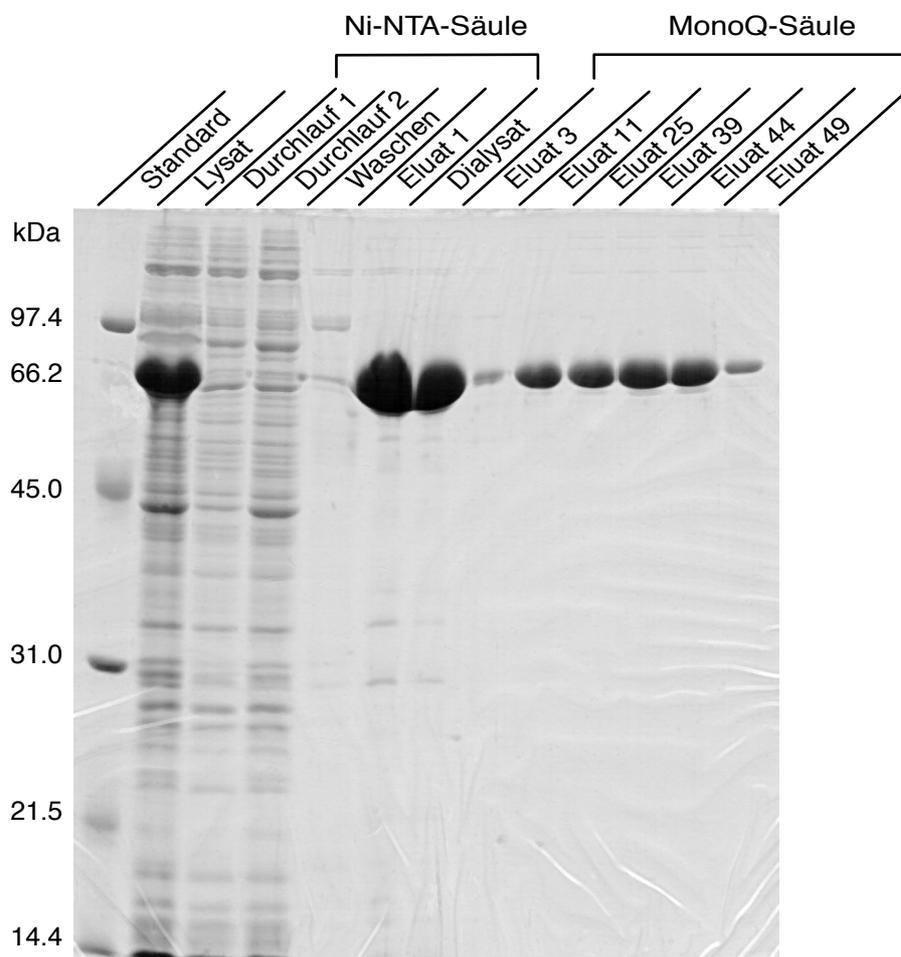


Abb. 3.4 Native Proteinaufreinigung von σ^{54} mit (His)₆-Peptid

Im Lysat erkennt man eine sehr große Menge von überexprimiertem Protein (Abb. 3.2, 180 Minuten nach der Induktion), das vollständig an die Säule gebunden hatte und auch im Waschschrift nicht dissoziierte. Nach Erhöhung der Imidazolkonzentration eluierten große Mengen Protein von der Ni-NTA-Säule. Danach erfolgte eine Aufreinigung mit der MonoQ-Säule. Die Zahlen über den Spuren entsprechen den jeweiligen Fraktionen des Eluats.

1.4 Konzentrationsbestimmung der Proteine

Nach der Elution der Proteine von der MonoQ-Säule bzw. der Dialyse wurde die Absorption der Proteine bei 280 nm gemessen und die Konzentration der verschiedenen Präparationen mittels des entsprechenden Extinktionskoeffizienten berechnet (s. Material und Methoden, 4.2). Die in Tab 3.1 angegebenen Werte für die NtrC-Proteine beziehen sich auf Monomere.

Tab. 3.1 Konzentration der aufgereinigten Proteine

Protein	Glyceringehalt	Konzentration
wt-NtrC	5 %	11.4 μ M
	30 %	8.6 μ M
	50 %	6.0 μ M
NtrC ^{S160F}	50 %	8.6 μ M
NtrC ^{D54E,S160F}	50 %	8.1 μ M
σ^{54}	5 %	22 μ M

Glycerinkonzentrationen von 30-50 % verhindern die Aggregation der NtrC-Mutanten (Weiss *et al.*, 1991). Gleichzeitig sind hohe Glycerinkonzentrationen jedoch für Experimente mit der analytischen Ultrazentrifuge ungeeignet, da sie den Dichteunterschied zwischen Protein und Puffer verringern. Deshalb wurde wt-NtrC auch bei 5 % Glycerin gelagert. Unter diesen Bedingungen war das Protein, wie auch σ^{54} , gut löslich. Nach der Konzentrationsbestimmung wurden die Proteinlösungen mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

1.5 Aktivitätstest der Proteine

Zur Überprüfung der Aktivität der Proteine wurde das superhelikale 3.5 kb Plasmid pJES534 verwendet. Es besitzt zwei NtrC-Bindungsstellen und davon ca. 450 bp entfernt den RNAP- σ^{54} -spezifischen Promotor für das *glnA*-Gen. Während der *in vitro*-Transkription wird ein 155 nt langes, radioaktives RNA-Transkript synthetisiert, das durch Polyacrylamid-Gel-elektrophorese und Autoradiographie sichtbar gemacht werden kann (s. Material und Methoden, 3.10 und 6.2). Die optimale Proteinkonzentration konnte bestimmt werden, indem in Versuchsreihen die Konzentration eines Proteins variiert wurde, während die Konzentration

der anderen Proteine im Überschuß konstant gehalten wurde. Die Transkriptrate der anfänglichen Mischung von RNA-Polymerase-Kernenzym (cRNAP) und σ^{54} im Verhältnis von 1:1 konnte durch weitere Zugabe von σ^{54} noch gesteigert werden. Die optimale Mischung von cRNAP und σ^{54} betrug 1:2.5. Folgende optimalen Konzentrationen für die Transkriptionsexperimente mit 5 nM pJES534 wurden ermittelt:

- RNAP· σ^{54} 50 nM (bezogen auf cRNAP)
- wt-NtrC 40 nM (Monomer)
- NtrC^{S160F} 40 nM (Monomer)
- NtrC^{D54E,S160F} 40 nM (Monomer)

Die zu verwendende Konzentration von Carbamylphosphat wurde durch diese Versuche auf 25 mM festgesetzt.

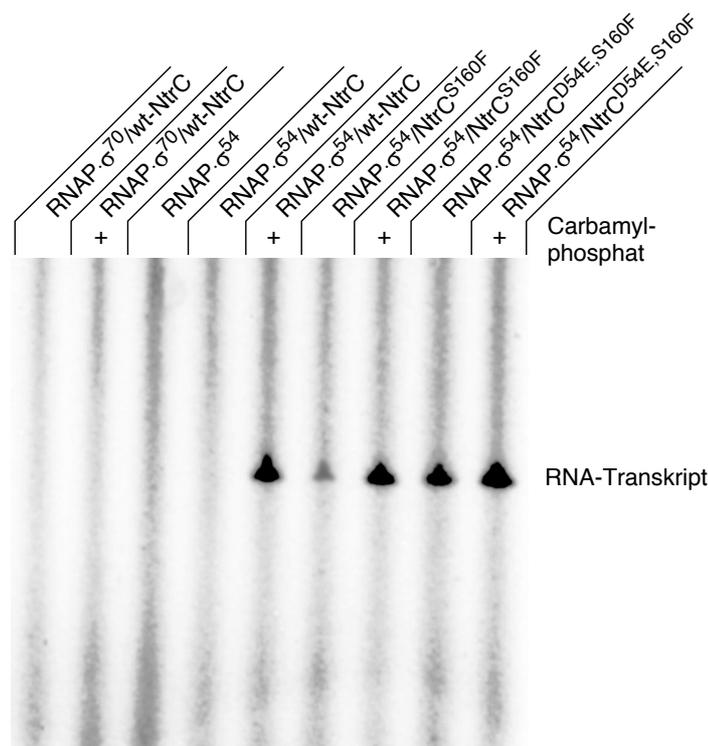


Abb. 3.5 Überprüfung der Aktivität durch *in vitro*-Transkriptionsexperimente

Die hier dargestellten Transkriptionsexperimente wurden, wie in Klose *et al.* (1993) beschrieben, mit dem Plasmid pJES534 durchgeführt. Die Markierung der RNA erfolgte mit α -³²P-CTP. Wie erwartet zeigten die Versuchsansätze mit RNAP· σ^{70} , RNAP· σ^{54} alleine und RNAP· σ^{54} /wt-NtrC kein Transkript. Erst die Zugabe von Carbamylphosphat zu RNAP· σ^{54} /wt-NtrC liefert das 155 nt-Transkript, da wt-NtrC chemisch phosphoryliert werden muß, um aktiv zu sein. Die konstitutiven Mutanten waren schon ohne zusätzliche Phosphorylierung aktiv. Die recht schwache Aktivierungsrate von NtrC^{S160F} läßt sich durch Phosphorylierung deutlich erhöhen. Bei der Doppelmutante NtrC^{D54E,S160F} ist dies nicht mehr möglich, da hier die Phosphorylierungsstelle, das Aspartat an Position 54, gegen ein Glutamat ausgetauscht worden ist.

Abbildung 3.5 zeigt einen Versuch mit allen Proteinen in den ermittelten Konzentrationen. In den entsprechenden Versuchsansätzen wurde das 155 nt lange Transkript mit der erwarteten Aktivität gebildet. Die Aktivität des wt-NtrC wurde allerdings erst durch Zugabe von Carbamylphosphat erreicht, welches mit einem hohen Gruppenübertragungspotential für Phosphat als chemisches Phosphorylierungsmittel diente (Feng *et al.*, 1992). In der Bakterienzelle wird diese Phosphorylierung durch das NtrB-Protein vorgenommen (s. Einleitung). Die beiden konstitutiven Mutanten NtrC^{S160F} und NtrC^{D54E,S160F} besitzen eine gewisse Grundaktivität, so daß sie auch ohne Carbamylphosphat die Transkription aktivieren können. Diese war bei NtrC^{S160F} deutlich niedriger als bei NtrC^{D54E,S160F} (Klose *et al.*, 1993) und läßt sich gegenüber der Doppelmutante noch durch das Phosphorylierungsmittel steigern. Bei NtrC^{D54E,S160F} ist die zu phosphorylierende Aminosäure Aspartat an Position 54 durch Glutamat ersetzt worden und kann nicht mehr phosphoryliert werden. Die Versuchsansätze mit RNAP- σ^{70} ergaben kein Transkript und demonstrieren, daß dieses Polymerase-Holoenzym den *glnAp2*-Promotor nicht erkennt. Es zeigte sich, daß die Aktivität von chemisch durch Carbamylphosphat phosphoryliertem wt-NtrC höher war als die der konstitutiven Mutanten NtrC^{S160F} und NtrC^{D54E,S160F}. Deshalb wurden die weiteren *in vitro*-Transkriptionsexperimente mit wt-NtrC und chemischer Phosphorylierung durchgeführt.

2. Analytische Ultrazentrifugation

Mit der hier beschriebenen Präparation von wt-NtrC untersuchten Karsten Rippe und Norbert Mücke die Multimerisierung von NtrC mittels analytischer Ultrazentrifugation. Eine detaillierte Beschreibung der Experimente ist in Rippe *et al.* (1998) zu finden. In Tab. 3.2 sind die gemessenen Molekulargewichte (M_{exp}) und Sedimentationskoeffizienten ($s_{20,w}$) zusammengefaßt, die sich in guter Übereinstimmung mit den berechneten Werten (M_{ber} , s_{Modell}) befinden. Im folgenden sind die wichtigsten Resultate zusammengefaßt:

(i) Das freie unphosphorylierte wt-NtrC liegt in Lösung als Dimer mit einem gemessenen Molekulargewicht von 102 ± 3 kDa gegenüber dem berechneten Wert von 54 kDa für das NtrC-Monomer vor (untersuchter Konzentrationsbereich 2-8 μM NtrC-Monomer). (ii) Im unphosphorylierten Zustand ist je ein NtrC-Dimer an eine Bindungsstelle gebunden, was aus Untersuchungen mit Oligonukleotid-Duplexen hervorgeht, die sowohl eine als auch zwei

Bindungsstellen besitzen (untersuchter Konzentrationsbereich 50-1000 nM NtrC-Dimer). (iii) Die Bindung von unphosphoryliertem NtrC an ein Oligonukleotid-Duplex mit zwei Bindungsstellen in Abwesenheit von ATP verläuft nicht kooperativ. (iv) Das phosphorylierte Protein bildet am Oligonukleotid-Duplex mit zwei Bindungsstellen (Enhancer-Sequenz) einen spezifischen Komplex, der aus vier Dimeren besteht (untersuchter Konzentrationsbereich 100-1000 nM NtrC-Dimer). (v) Die Bildung des Oktamerkomplexes ist kooperativ. Zusätzlich kann noch ein zweiter DNA-Strang an diesen Komplex binden. (vi) Aus Daten von Sedimentationsläufen der analytischen Ultrazentrifuge wurde ein hydrodynamisches Modell für NtrC entwickelt, in dem das Protein eine V-förmige Struktur einnimmt. Dabei befinden sich die DNA-Bindungsdomänen des Proteins dort, wo sich die beiden Schenkel des V treffen, und die Receiver-Domänen liegen oben (Abb. 4.1). In dieser Anordnung können höher organisierte NtrC-Komplexe stabilisiert werden, indem die phosphorylierten Receiver-Domänen und die zentralen Aktivierungsdomänen verschiedener NtrC-Dimere miteinander interagieren.

Tab. 3.2 Ergebnisse der analytischen Ultrazentrifugation

Probe	M_{exp} (kDa)	M_{ber} (kDa)	$S_{20,w}$ (S)	S_{Modell} (S)	Assoziationszustand
DNA-Duplex ES-1 (eine NtrC-Bindungsstelle)	20±2	20	2.9±0.1	3.0	32 bp DNA-Duplex
DNA-Duplex ES-2 (zwei NtrC-Bindungsstellen)	37±2	37	3.9±0.1	3.7	59 bp DNA-Duplex
NtrC-Protein	102±3	108	5.2±0.2	5.3	NtrC-Dimer
NtrC-Protein, ES-1 DNA	134±8	128	6.3±0.2	6.2	1 NtrC-Dimer + 1 ES-1-Duplex
NtrC-Protein, ES-2 DNA DNA im Überschuß	161±17	145	6.5±0.3	6.4	1 NtrC-Dimer + 1 ES-2-Duplex
NtrC-Protein, ES-2 DNA NtrC im Überschuß	262±12	253	9.0±0.3	9.0	2 NtrC-Dimere + 1 ES-2-Duplex
NtrC-P-Protein, ES-2 DNA DNA im Überschuß	500±25	507	14.4±0.4	15.0	4 NtrC-Dimere + 2 ES-2-Duplexe
NtrC-P-Protein, ES-2 DNA NtrC im Überschuß	451±16	470	12.1±0.4	14.4	4 NtrC-Dimere + 1 ES-2-Duplex

3. Rasterkraftmikroskopie

3.1 Rasterkraftmikroskopieaufnahmen

Bei der Rasterkraftmikroskopie (SFM = *Scanning Force Microscopy* oder AFM = *Atomic Force Microscopy*) wird mit einer Spitze eine Oberfläche, auf der sich die Probe befindet, abgetastet. Durch Messung der Wechselwirkungen zwischen Spitze und Probe entsteht ein topographisches Bild mit molekularer Auflösung (s. Material und Methoden, 5.1). Mit dieser Technik wurde die Bindung der RNAP· σ^{54} an ein 1036 bp langes DNA-Fragment untersucht, welches mit *PvuII* aus dem 3.5 kb Plasmid pJES534 (Porter *et al.*, 1993) herausgeschnitten wurde. Dieses besitzt zwei NtrC-Bindungsstellen und den *glnA*2-Promotor (im folgenden als *glnA*-Promotor bezeichnet), der von einem Ende des Fragments 410 bp (139 nm) und vom anderen Ende 626 bp (213 nm) entfernt ist (Abb. 3.6).

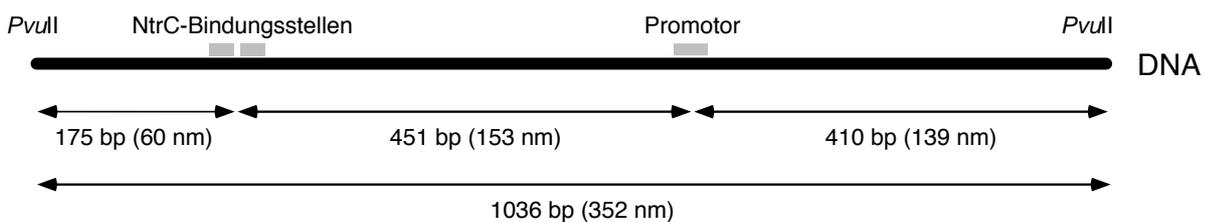


Abb. 3.6 DNA-Fragment für die Rasterkraftmikroskopie

Durch eine Restriktionsspaltung des 3.5 kb Plasmids pJES534 mit *PvuII* ergibt sich ein 1036 bp-Fragment. Es besitzt zwei NtrC-Bindungsstellen, die ca. 450 bp vom *glnA*-Promotor entfernt sind. Die Bindungsstelle für RNAP· σ^{54} befindet sich 2/5 von einem Ende bzw. 3/5 vom anderen Ende des Fragments entfernt.

Die Präparation der Proben nach den drei angegebenen Protokollen (s. Material und Methoden, 5.2) ergab eine gleichmäßige Verteilung der Moleküle auf der Glimmeroberfläche (Abb. 3.7). Die Qualität der Bilder war mit den verwendeten Protokollen sehr gut, so daß die einzelnen Moleküle quantitativ ausgewertet werden konnten. Mit verschiedenen Abtastwinkeln ergaben sich keine unterschiedlichen Bilder derselben Region. Dies zeigt, daß die Moleküle fest an die Glimmeroberfläche gebunden waren und ein Einfluß der Abtastrichtung auf das Meßergebnis ausgeschlossen werden konnte. Mit der Höhenskala in Abb. 3.7 und 3.8 erscheint die Glimmeroberfläche als grauer Untergrund, die DNA-Fragmente erscheinen orange-gelb und die Proteine weiß.

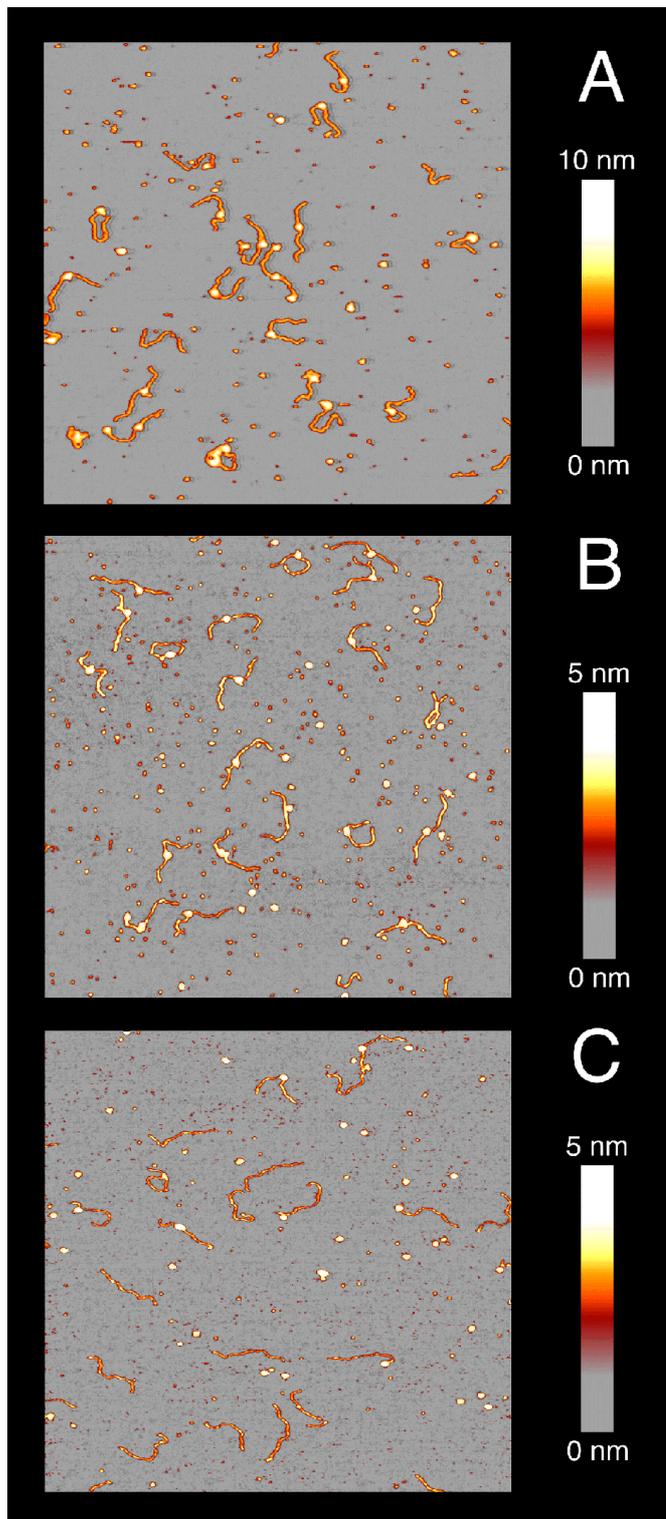


Abb. 3.7 RNAP·σ⁵⁴-DNA-Komplexe
Die 2 μm x 2 μm SFM-Bilder zeigen Proben, die in Flüssigkeit nach Protokoll I (A) und in Luft nach Protokoll II (B) oder III (C) hergestellt wurden (s. Material und Methoden, 5.2). Neben den Komplexen aus RNAP·σ⁵⁴ und DNA lassen sich freie DNA und freie RNAP·σ⁵⁴ erkennen.

In den meisten Komplexen von Abb. 3.7A und B befand sich die RNAP·σ⁵⁴ an der Position, die dem Promotor entspricht, d. h. 2/5 vom einen Ende und 3/5 vom anderen Ende entfernt. Daneben fanden sich auch Moleküle, bei denen die RNAP·σ⁵⁴ an anderen Stellen auf der DNA gebunden hatte. Zusätzlich waren freie DNA, RNAP·σ⁵⁴ und σ⁵⁴ zu erkennen. Abbildung 3.8

zeigt eine Vergrößerung (600 nm x 400 nm) einzelner Komplexe, wie sie für die detailliertere quantitative Auswertung verwendet wurden.

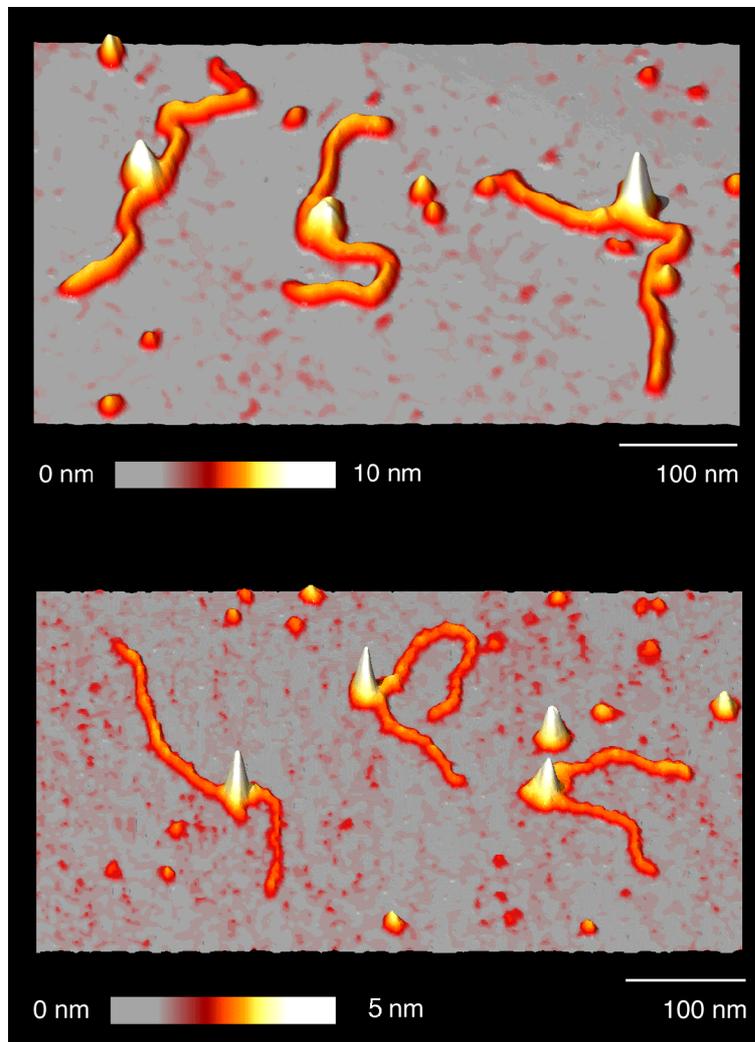


Abb. 3.8 Spezifische RNAP·σ⁵⁴-Komplexe am *glnA*-Promotor

Entsprechend der Position des *glnA*-Promotors haben die RNAP·σ⁵⁴-Moleküle spezifisch 2/5 von einem Ende des Fragments entfernt gebunden. A, Das 600 nm x 400 nm SFM-Bild zeigt Vergrößerungen des geschlossenen Komplexes der RNAP·σ⁵⁴ am Promotor in Flüssigkeit. Die DNA erscheint in Flüssigkeit etwas breiter als in Luft. Dies geht mit einer beobachteten Erhöhung der DNA einher. B, Das 600 nm x 400 nm SFM-Bild zeigt Vergrößerungen des geschlossenen Komplexes der RNAP·σ⁵⁴ am Promotor in Luft.

Beim Vergleich der Bilder fällt auf, daß die DNA in Flüssigkeit höher erscheint (~1.5 nm) als in Luft (~ 0.5 nm, unterschiedliche Höhenskala beachten). Gründe für dieses Phänomen sind die geringeren Kräfte zwischen Probe und Spitze in Flüssigkeit und das Fehlen der Adhäsionskräfte an der Wasser-Luft-Grenzschicht (Bustamante *et al.*, 1993; Bustamante & Rivetti, 1996).

3.2 Position der Bindung der RNAP- σ^{54}

RNAP- σ^{54} kann nicht nur spezifisch an den Promotor binden (geschlossener Komplex), sondern auch unspezifisch an jede andere Stelle des DNA-Fragments (s. Tab. 3.3). Da aber die Konformation des geschlossenen Komplexes am Promotor analysiert werden sollte, mußte zunächst eine Unterscheidung zwischen spezifisch und unspezifisch gebundenen Komplexen getroffen werden. Dazu wurde die relative Position der gebundenen RNAP- σ^{54} bestimmt. In die Auswertung wurden generell nur Moleküle einbezogen, die keinen Kontakt zu einem anderen Molekül aufwiesen und nur eine gebundene RNAP- σ^{54} besaßen.

Die Gesamtlänge des Fragments wurde bestimmt, indem jeweils von der Mitte der RNAP- σ^{54} zu beiden Seiten die Länge der DNA-Abschnitte gemessen und addiert wurden. Dieser Wert entspricht der gemessenen Konturlänge. Die Bindungsposition r ergibt sich nun aus der gemessenen Länge des kürzeren DNA-Abschnitts dividiert durch die gemessene Gesamtlänge des Fragments. Der theoretische Wert der Position der Promotormitte beträgt $r = 0.40$. Die Verteilung der gemessenen Werte für alle drei Präparationsansätze (s. Material und Methoden, 5.2) ist in Abb. 3.9 dargestellt.

Die Histogramme der Messungen in Flüssigkeit (Abb. 3.9A) und Luft mit 1 ml Waschen (Abb. 3.9B) konnten durch eine Gaußverteilung beschrieben werden. Der Mittelwert für die Proben in Flüssigkeit betrug $r = 0.41 \pm 0.03$ und für Proben in Luft mit 1 ml Waschen $r = 0.39 \pm 0.04$. Diese Ergebnisse befanden sich somit in Übereinstimmung mit der berechneten Position des Promotors ($r = 0.40$).

Daher erfolgte die Einteilung in spezifisch oder unspezifisch gebundene Komplexe, indem der Bereich von 0.34 bis 0.46 ($r = 0.40 \pm 0.06$) als spezifisch definiert wurde. Dieser Bereich entspricht dem theoretischen Wert für r und zwei Standardabweichungen der in Flüssigkeit gemessenen Proben (s. Material und Methoden, 5.2). Die zweifache Standardabweichung von 0.06 entspricht dabei einer Standardabweichung für die gemessene DNA-Konturlänge von ca. 20 nm. Dies stimmt in etwa mit der Standardabweichung der gemessenen Konturlänge für die Protein-DNA-Komplexe von 13 bis 28 nm (Tab. 3.6) überein.

Die Einteilung nach dem Kriterium für einen spezifischen Komplex, $r = 0.40 \pm 0.06$, zeigte, daß bei Proben in Flüssigkeit und Luft mit 1 ml Waschen 70 bzw. 68 % der Komplexe spezifisch waren (Tab. 3.3). Eine relativ große Anzahl der unspezifischen Komplexe (13 bzw. 11 % aller Komplexe) hatte die Polymerase am Fragmentende gebunden.

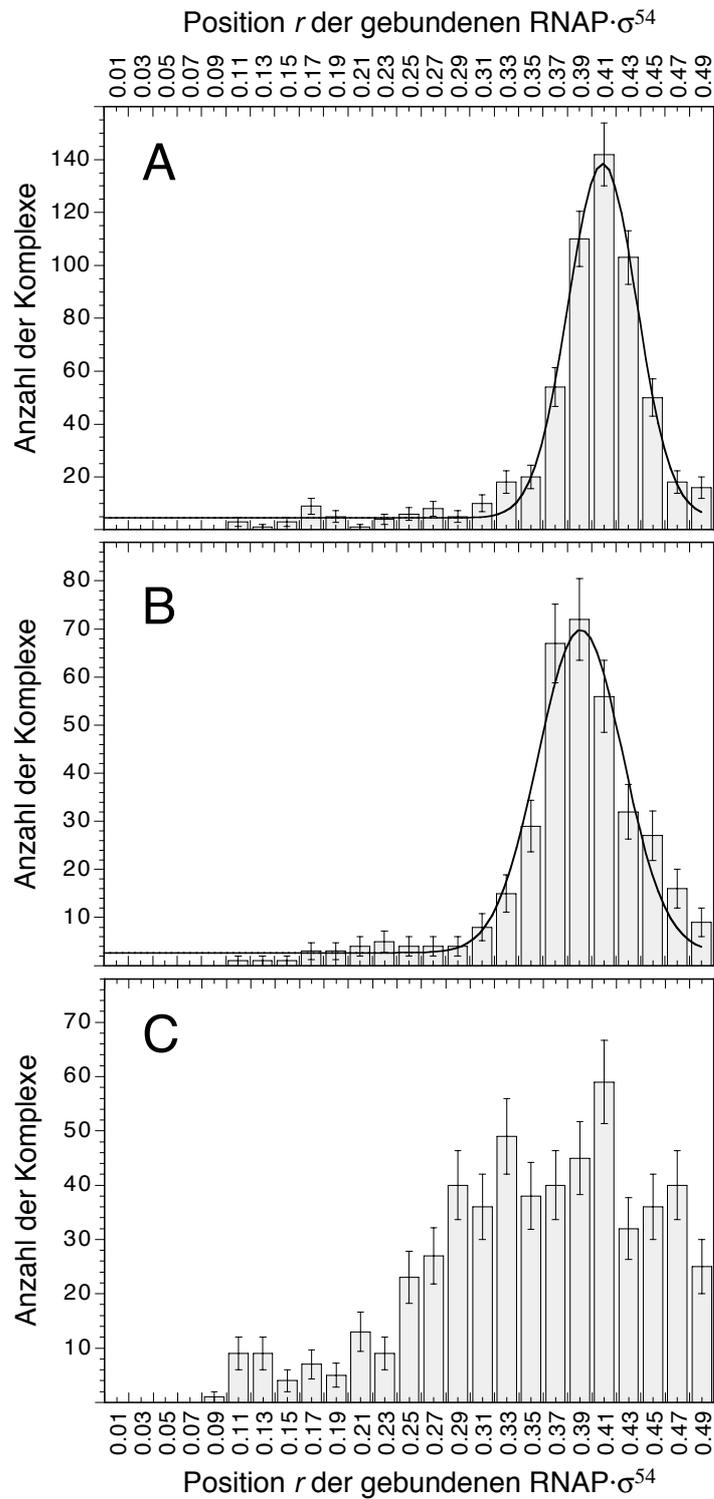


Abb. 3.9 Histogramm der Bindungsposition von RNAP- σ^{54}

A, Position der gebundenen RNAP- σ^{54} in Flüssigkeit (Protokoll I). B, Position der gebundenen RNAP- σ^{54} in Luft (mit 1 ml Waschen, Protokoll II). C, Position der gebundenen RNAP- σ^{54} in Luft (mit 50 ml Waschen, Protokoll III). In dieser Auswertung sind Moleküle mit einer am DNA-Fragmentende gebundenen Polymerase nicht enthalten.

Die Proben in Luft mit 50 ml Waschen zeigten eine breitere Verteilung der Komplexe auf dem DNA-Fragment (Abb. 3.9C). Scheinbar führte intensives Waschen des Glimmers zur Zerstörung der spezifischen Komplexe und erhöhte gleichzeitig die Anzahl der unspezifisch gebundenen RNAP· σ^{54} . Daraus resultierte eine recht gleichmäßige Verteilung der verschiedenen Bindungsorte für RNAP· σ^{54} auf dem DNA-Fragment (Tab. 3.3).

Tab. 3.3 Verteilung der verschiedenen Bindungsorte der RNAP· σ^{54} auf der DNA

	Puffer (%)	Luft (%) 1 ml Waschen	Luft (%) 50 ml Waschen
Promotor	70	68	32
andere DNA-Orte	17	21	38
Fragmentende	13	11	30

Insgesamt wurden in dieser Analyse 1800 Komplexe ausgewertet. Es wurden nur Moleküle berücksichtigt, die eine RNAP· σ^{54} gebunden und keinen Kontakt zu anderen Molekülen hatten.

Ein ähnlicher Effekt konnte für Proben in Flüssigkeit beobachtet werden. Wenn die Flüssigkeitszelle mit mehreren Millilitern Puffer gespült wurde, verringerte sich die Zahl der spezifischen Komplexe ebenfalls.

Für die weiteren Auswertungen wurden nur solche Moleküle verwendet, bei denen sich die eine gebundene RNAP· σ^{54} nicht am Ende des DNA-Fragments befand, da für ein dort gebundenes Protein die Messung des Verbiegungswinkels und der Konturlänge nicht möglich war.

3.3 Konformation des geschlossenen RNAP· σ^{54} -DNA-Komplexes

Die relative Position der RNAP· σ^{54} zum Promotor war eine weitere Information, die aus den Bildern gewonnen werden konnte. Wie in Abb. 3.7 und Abb. 3.8 ersichtlich, befand sich die RNAP· σ^{54} in einigen Komplexen seitlich an der DNA, in anderen Komplexen schien sie rittlings auf der DNA zu sitzen. Bei den Auswertungen ließen sich verschiedene Konformationen der spezifisch gebundenen RNAP· σ^{54} relativ zum Promotor identifizieren, die in Abb. 3.10 dargestellt sind. Die Unterschiede bestanden dabei in der Richtung der DNA-Verbiegung, der

relativen Position der RNAP· σ^{54} zur DNA und der Seite, auf der die Polymerase an die Oberfläche gebunden war.

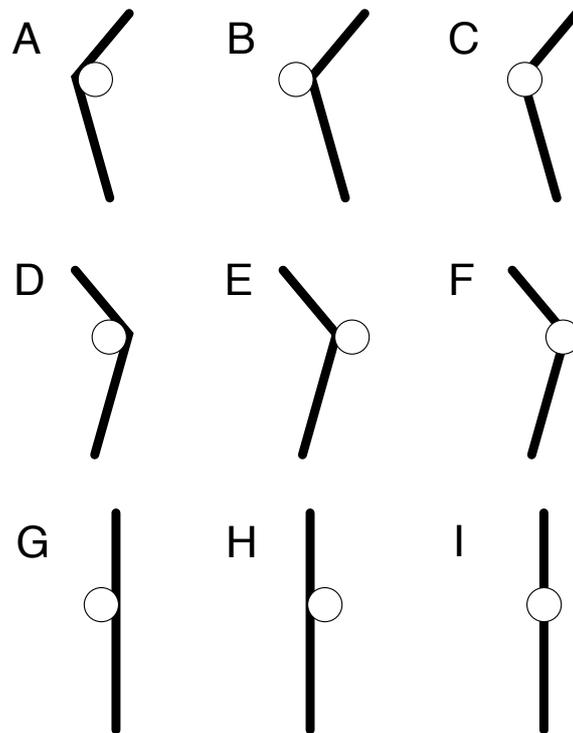


Abb. 3.10 Beobachtete Konformationen des geschlossenen RNAP· σ^{54} -DNA-Komplexes

Für den spezifischen RNAP· σ^{54} -DNA-Komplex wurden neun Konformationen auf den SFM-Bildern gefunden. Die Kriterien zur Unterscheidung der verschiedenen Konformationen war die Seite mit der die Polymerase auf der Glimmeroberfläche gebunden hatte [rechtshändig (A-C), linkshändig (D-F), unbekannt (G-I)], die Position der RNAP· σ^{54} relativ zur DNA [lateral (A, B, D, E, G, H) oder zentral (C, F, I)] und die Richtung der DNA-Verbiegung [von der RNAP· σ^{54} weg (B, E), um die RNAP· σ^{54} herum (A, D), unbekannt (C, F)].

Die drei Komplexe in Abb. 3.8A entsprechen nach dieser Definition dann Abb. 3.10H (linker Komplex), Abb. 3.10D (mittlerer Komplex) und Abb. 3.10E (rechter Komplex). Die Ergebnisse der Auswertung sind in Tab. 3.4 zusammengefasst. Die rechtshändige (Abb. 3.10A-C) und linkshändige (Abb. 3.10D-F) Konformation kamen in fast gleicher Häufigkeit vor (Tab. 3.4), was darauf hinweist, daß keine Seite zur Bindung an die Glimmeroberfläche bevorzugt wurde. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von Hansma *et al.* (1998), die eine bevorzugte Bindung der linkshändigen Konformation (Abb. 3.10D-F) beobachteten. Allerdings wurde in dieser Studie RNAP· σ^{70} mit einem RNA-Polymerase-Kernenzym verwendet, das ein (His)₆-Peptid besaß. In Flüssigkeit waren 2/3 der RNAP· σ^{54} -Proteine an der Seite der DNA

lokalisiert (lateral, Tab. 3.4). Die Richtung der DNA-Verbiegung am Promotor zeigte am häufigsten von der Polymerase weg (Abb. 3.10B und E).

Tab. 3.4 Verteilung der Konformationen im geschlossenen RNAP· σ^{54} -DNA-Komplex

	Puffer (%)	Luft (%)
RNAP·σ^{54}-Bindungsseite		
rechtshändig (Abb. 3.10A-C) ^a	40	47
linkshändig (Abb. 3.10D-F) ^a	49	47
unbekannt (Abb. 3.10G-I)	11	6
Position der RNAP·σ^{54} relativ zur DNA		
zentral (C, F, I)	36	43
lateral (A, B, D, E, G, H)	64	57
Richtung der Krümmung		
von der RNAP· σ^{54} weg (B, E)	41	47
um die RNAP· σ^{54} herum (A, D)	18	8
unbekannt (C, F)	41	45

Die Tabelle zeigt die Resultate der Messungen der verschiedenen Konformationen des spezifischen Komplexes (Abb. 3.10). Es wurden nur RNAP· σ^{54} -DNA-Komplexe in Flüssigkeit und Luft mit 1 ml Waschen analysiert. Die absoluten Zahlen für die neun Konformationen waren: A 67, B 34, C 68, D 11, E 141, F 58, G 4, H 18, I 28 in Flüssigkeit und A 12, B 49, C 50, D 7, E 60, F 42, G 3, H 3, I 8 in Luft. ^a Die Konformationen in Abb. 3.10A bis C und D bis F sind Spiegelbilder und können als Komplexe der gleichen Konformation, aber an unterschiedlicher Seite gebunden betrachtet werden. In Hansma *et al.* (1998) findet sich eine genauere Definition für links- und rechtshändige Komplexe.

3.4 DNA-Verbiegungswinkel der RNAP· σ^{54} -DNA-Komplexe

Ein weiteres strukturelles Merkmal der RNAP· σ^{54} -DNA-Komplexe ist der scheinbare DNA-Verbiegungswinkel, der durch die RNAP· σ^{54} induziert wird. Bei der Auswertung der SFM-Bilder wurde für jeden frei liegenden Komplex der Verbiegungswinkel bestimmt (s. Material und Methoden, 5.2). Die sich daraus ergebende Verteilung gemessener Winkel für die verschiedenen Präparationsansätze ist in Abb. 3.11 dargestellt. Tabelle 3.5 zeigt den Mittelwert mit dem 95%-Vertrauensintervall und der Standardabweichung.

Die Verteilung der Verbiegungswinkel wurde mit zwei verschiedenen Gaußfunktionen berechnet (Gl. 3.1 und 3.2). Dabei ist $\bar{\theta}$ der durchschnittliche DNA-Verbiegungswinkel und σ die Standardabweichung. Die Auswertung erfolgte in der Weise, daß jeweils der Winkel, der klei-

ner als 180° war, gemessen wurde. Nach der Definition ($\theta = 180^\circ - \alpha$) konnte der DNA-Verbiegungswinkel daher keinen negativen Wert annehmen und lag im Bereich von 0° bis 180° .

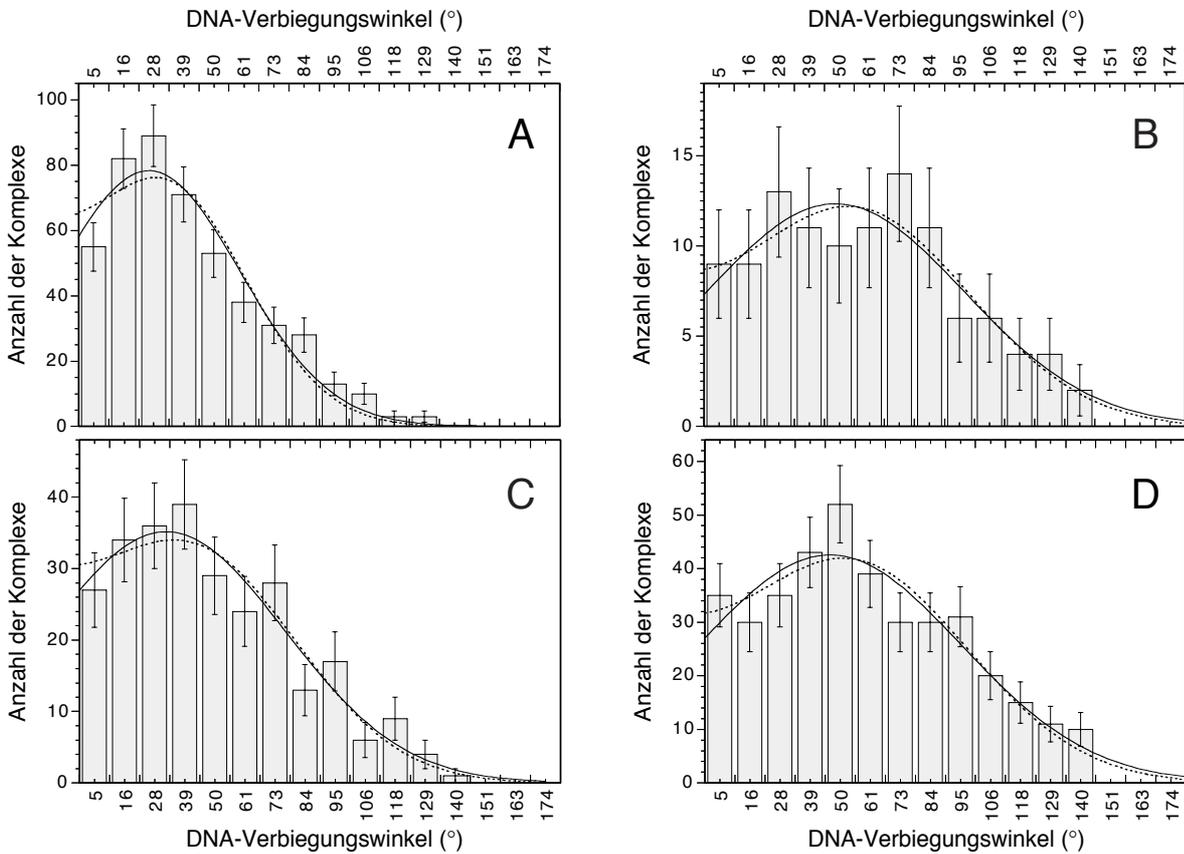


Abb. 3.11 Histogramm der Verbiegungswinkel der RNAP· σ^{54} -DNA-Komplexe

A, Spezifische RNAP· σ^{54} -DNA-Komplexe in Flüssigkeit; B, Unspezifische RNAP· σ^{54} -DNA-Komplexe in Flüssigkeit; C, Spezifische RNAP· σ^{54} -DNA-Komplexe in Luft; D, Unspezifische RNAP· σ^{54} -DNA-Komplexe in Luft. Die durchgezogenen Linien entsprechen einer einzelnen Gaußfunktion (Gl. 3.1), die gestrichelten Linien entsprechen Gl. 3.2.

Dadurch wird die Verteilung bei $\theta = 0$ abgeschnitten [vgl. (Hansma *et al.*, 1998; Le Cam *et al.*, 1994)].

$$g(\theta) = A \cdot \exp\left(-\frac{(\theta - \bar{\theta})^2}{2 \cdot \sigma^2}\right) \quad (3.1)$$

$$g(\theta) = A \cdot \left[\exp\left(-\frac{(\theta - \bar{\theta})^2}{2 \cdot \sigma^2}\right) + \exp\left(-\frac{(\theta + \bar{\theta})^2}{2 \cdot \sigma^2}\right) \right] \quad (3.2)$$

Um diesen Effekt zu berücksichtigen, wurden die Daten zusätzlich an eine Summe aus zwei Gaußfunktionen mit den Mittelwerten $\bar{\theta}$ und $-\bar{\theta}$ angepaßt (Gl. 3.2). Für den Fall, daß die Verbiegung in beide Richtungen (negative und positive Winkelwerte) gleich wahrscheinlich ist, sollten die gemessenen Daten durch Gl. 3.2 besser angepaßt werden als mit Gl. 3.1. Bei Betrachtung der beiden Kurven in Abb. 3.11A-D fällt jedoch auf, daß dies nicht der Fall war. Die Anpassung der Daten an eine einfache Gaußfunktion (Gl. 3.1) war im Rahmen der Meßgenauigkeit gleich gut.

Tab. 3.5 Verbiegungswinkel (°) der RNAP- σ^{54} -DNA-Komplexe und der freien Promotor-DNA

	Puffer	Luft
Spezifische Komplexe		
Mittelwert \pm 95%-Vertrauensintervall ^a	41 \pm 2	50 \pm 4
Mittelwert \pm Standardabweichung der Normalverteilung ^b	26 \pm 34	32 \pm 45
Anzahl ausgewerteter Komplexe	476	267
Unspezifische Komplexe		
Mittelwert \pm 95%-Vertrauensintervall	60 \pm 7	60 \pm 4
Mittelwert \pm Standardabweichung der Normalverteilung	49 \pm 48	46 \pm 49
Anzahl ausgewerteter Komplexe	110	381
freie Promotor-DNA ^c		
Mittelwert \pm 95%-Vertrauensintervall	33 \pm 4	22 \pm 2
Mittelwert \pm Standardabweichung der Normalverteilung	0 \pm 44	0 \pm 27
Anzahl ausgewerteter Komplexe	151	364

^a Mittelwert aller Werte \pm 95%-Vertrauensintervall des Mittelwertes

^b Mittelwert der Normalverteilung \pm Standardabweichung des Mittelwertes

^c Die intrinsische Verbiegung der Promotor-DNA wurde mit einer zirkulären Maske (Material und Methoden, 5.2) gemessen. Die Position des Promotors konnte bestimmt werden, da DNA-Fragmente verwendet wurden, an die NtrC am Enhancer gebunden hatte.

In Tab. 3.5 sind die Ergebnisse der Winkelmessungen zusammengefaßt. Für den DNA-Verbiegungswinkel der spezifisch gebundenen RNAP- σ^{54} ergab sich ein Mittelwert \pm Standardabweichung von 26 \pm 34° in Flüssigkeit und 32 \pm 45° für die Messungen an Luft. Die Verteilung des DNA-Verbiegungswinkels der unspezifischen Komplexe in Flüssigkeit (Abb. 3.11C) und an Luft (Abb. 3.11D) war breiter als die der spezifischen Komplexe (Abb. 3.11A und B). Da die Verteilungen der unspezifischen Komplexe in Luft mit 1 ml und 50 ml Waschen sehr ähnlich waren, wurden sie zu einem Datensatz vereinigt. Mittels eines Wilcoxon-Rangsummen-Tests ($p = 0.0011$) konnte ein signifikanter Unterschied zwischen dem Verbiegungswinkel spezifi-

scher Komplexe in Flüssigkeit und in Luft festgestellt werden, während dies für die unspezifischen Komplexe nicht der Fall war.

Die intrinsische Verbiegung der Promotor-DNA wurde in Abwesenheit der RNAP- σ^{54} bestimmt, indem eine zirkuläre Maske mit der entsprechenden Größe der RNAP- σ^{54} (in Flüssigkeit 35 nm Durchmesser, in Luft 27 nm Durchmesser; s. Material und Methoden, 5.2) über den Promotor gelegt wurde.

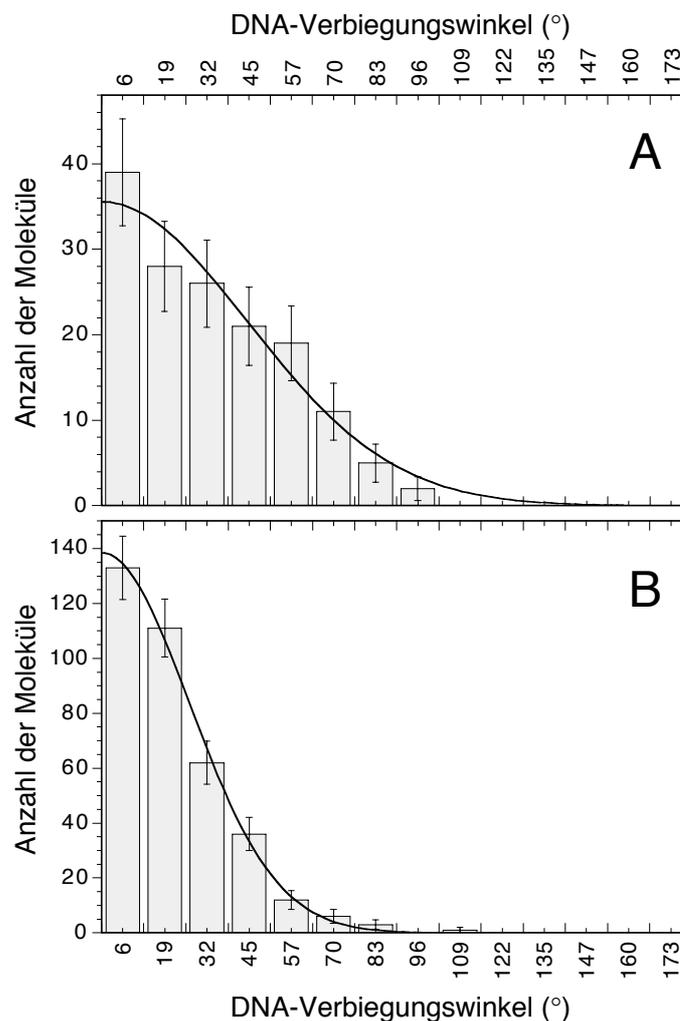


Abb. 3.12 Histogramm des intrinsischen DNA-Verbiegungswinkels am *glnA*-Promotor

Der intrinsische DNA-Verbiegungswinkel am *glnA*-Promotor wurde in Abwesenheit von RNAP- σ^{54} gemessen. Auf die Position des Promotors wurde eine Maske gelegt. A, Messungen in Flüssigkeit mit einer Maske von 35 nm Durchmesser. B, Messungen in Luft mit einer Maske von 27 nm Durchmesser.

Die Promotorregion konnte genau bestimmt werden, da sich am anderen Ende des DNA-Fragments der Enhancer befand, der in diesen Versuchen mit dem Aktivatorprotein NtrC besetzt war. Abbildung 3.12 zeigt die Verteilungen der Verbiegungswinkel, die sich sehr gut an die

Gaußfunktion anpassen ließen und deren Mittelwert bei 0° lag. Dies wurde auch von Rippe *et al.* (1997a) für den gleichen Promotor bei Untersuchungen in Luft gezeigt.

Bei den Untersuchungen in Flüssigkeit war der Enhancer durch wt-NtrC besetzt, in Luft durch die Doppelmutante NtrC^{D54E,S160F}. Daher war es möglich, neben dem intrinsischen Verbiegungswinkel am Promotor, gleichzeitig den durch NtrC induzierten Verbiegungswinkel am Enhancer zu messen. Er betrug in Flüssigkeit $36.9 \pm 34.6^\circ$ und in Luft $20.6 \pm 45.3^\circ$, wobei zu beachten ist, daß hier, im Gegensatz zu den Messungen an RNAP· σ^{54} , nur 150 bzw. 79 Moleküle gemessen wurden. Die Verteilung und die angepaßte Gaußkurve sind in Abb. 3.13 dargestellt.

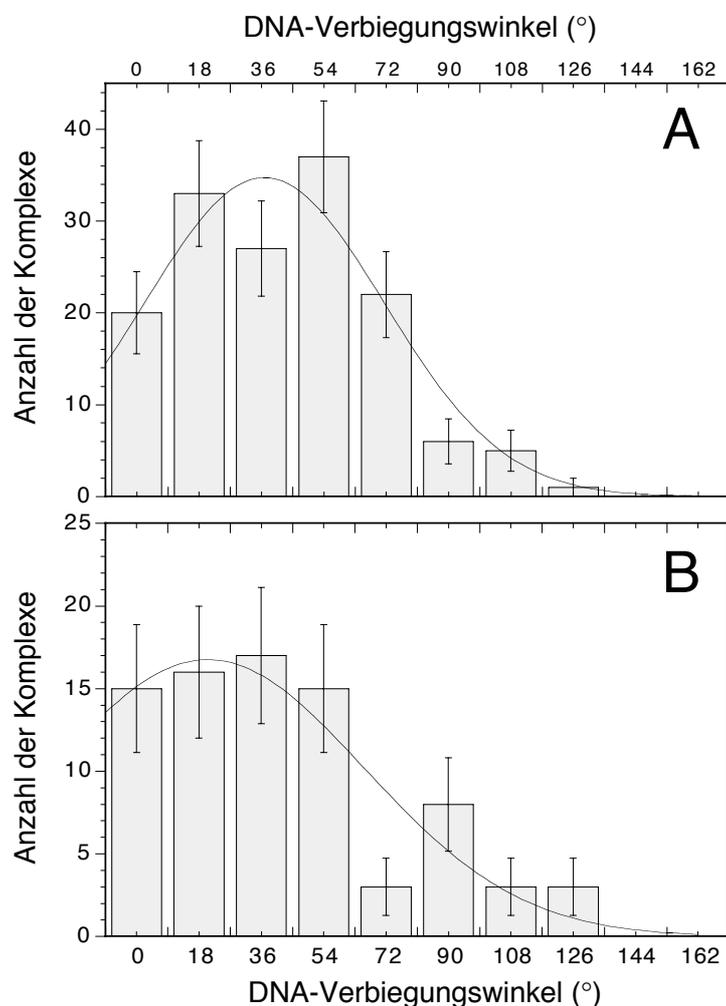


Abb. 3.13 Histogramm der Verbiegungswinkel der NtrC-DNA-Komplexe
A, Verbiegungswinkel am Enhancer mit wt-NtrC in Flüssigkeit. B, Verbiegungswinkel am Enhancer mit NtrC^{D54E,S160F} in Luft.

3.5 DNA-Persistenzlänge

Wie schon mit Elektronenmikroskopie (Théveny *et al.*, 1988), Kryo-Elektronenmikroskopie (Bednar *et al.*, 1995) und SFM (Hansma *et al.*, 1997; Rivetti *et al.*, 1996; Rippe *et al.*, 1997a) gezeigt wurde, kann die DNA-Persistenzlänge aus der Konformation einzelner DNA-Moleküle bestimmt werden.

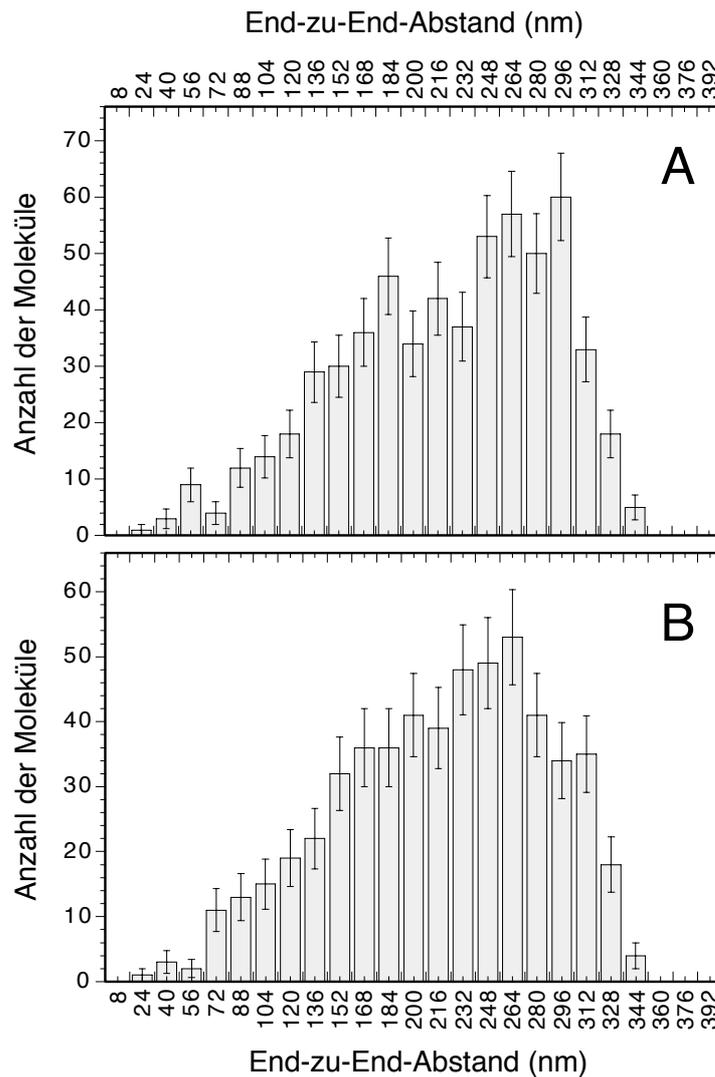


Abb. 3.14 Verteilung der End-zu-End-Abstände der freien DNA

A, Freie DNA in Flüssigkeit. B, Freie DNA in Luft. Aus den mittleren Werten wurde die durchschnittliche DNA-Persistenzlänge bestimmt.

Die Persistenzlänge der freien Promotor-DNA wurde mit dem berechneten mittleren Verbiegungswinkel $\pm 95\%$ -Vertrauensintervall von $33 \pm 4^\circ$ für Messungen in Flüssigkeit und $22 \pm 2^\circ$ für

Experimente in Luft nach Gl. 2.6 bestimmt (Rivetti *et al.*, 1996; Rippe *et al.*, 1997a; s. Material und Methoden, 5.2). Daraus ergab sich für DNA in Flüssigkeit eine Persistenzlänge der Promotor-DNA von 65 ± 10 nm und in Luft von 52 ± 29 nm. In den Grenzen des relativ großen Meßfehlers unterscheidet sich die Promotor-DNA also nicht signifikant von einer DNA-Zufallssequenz, die eine Persistenzlänge von 50 nm (Hagerman, 1988) besitzt.

Zur Bestimmung der durchschnittlichen Persistenzlänge des ganzen DNA-Fragments wurde der End-zu-End-Abstand der freien DNA gemessen. Abbildung 3.14 zeigt die Verteilung der End-zu-End-Abstände in Flüssigkeit (A) und in Luft (B). Unter Verwendung von Gl. 2.6, in die der gemessene mittlere End-zu-End-Abstand eingesetzt wurde (Flüssigkeit 222 nm, Luft 218 nm), ließ sich die Persistenzlänge in zwei Dimensionen berechnen und ergab einen Wert von 47 nm. Hier zeigte sich mit einem Wilcoxon-Rangsummen-Test ($p = 0.0011$) kein signifikanter Unterschied zwischen den Proben in Flüssigkeit und Luft. Das Ergebnis von 47 nm für die Persistenzlänge ist dem von Rivetti *et al.* (1996) ähnlich. Außerdem gab es keinen signifikanten Unterschied der DNA-Flexibilität der Proben in Flüssigkeit und Luft für die verwendeten Protokolle. Die DNA-Persistenzlänge für DNA frei in Lösung wurde schon mit verschiedenen Methoden bestimmt und liegt bei 50 nm (Hagerman, 1988). Es läßt sich also folgern, daß die Interaktionen zwischen DNA und Glimmroberfläche mit dem hier verwendeten Versuchsprotokoll relativ schwach waren, und eine Reäquilibration der DNA auf der Oberfläche möglich war.

3.6 Messung der DNA-Konturlänge

Die Konturlängen der freien DNA und der Protein-DNA-Komplexe lassen sich ebenfalls in einem Histogramm darstellen. Dies ist für die Ergebnisse der Proben in Flüssigkeit (Abb. 3.15) bzw. in Luft (Abb. 3.16) gezeigt. Die Verteilung für die gemessenen Konturlängen der Proben in Luft mit 1 ml und 50 ml Waschen waren identisch und wurden zusammengefaßt analysiert. Es zeigt sich, daß die gemessenen Daten gut einer Normalverteilung folgen, so daß ein *t*-Test möglich war. Die gemessene Länge für freie DNA entsprach einem Abstand zweier Basenpaare von 0.34 ± 0.01 nm in Flüssigkeit und 0.33 ± 0.01 nm in Luft. Dies ist charakteristisch für B-DNA, welche einen Abstand von 0.34 nm/bp hat (Leslie *et al.*, 1980; Saenger, 1984).

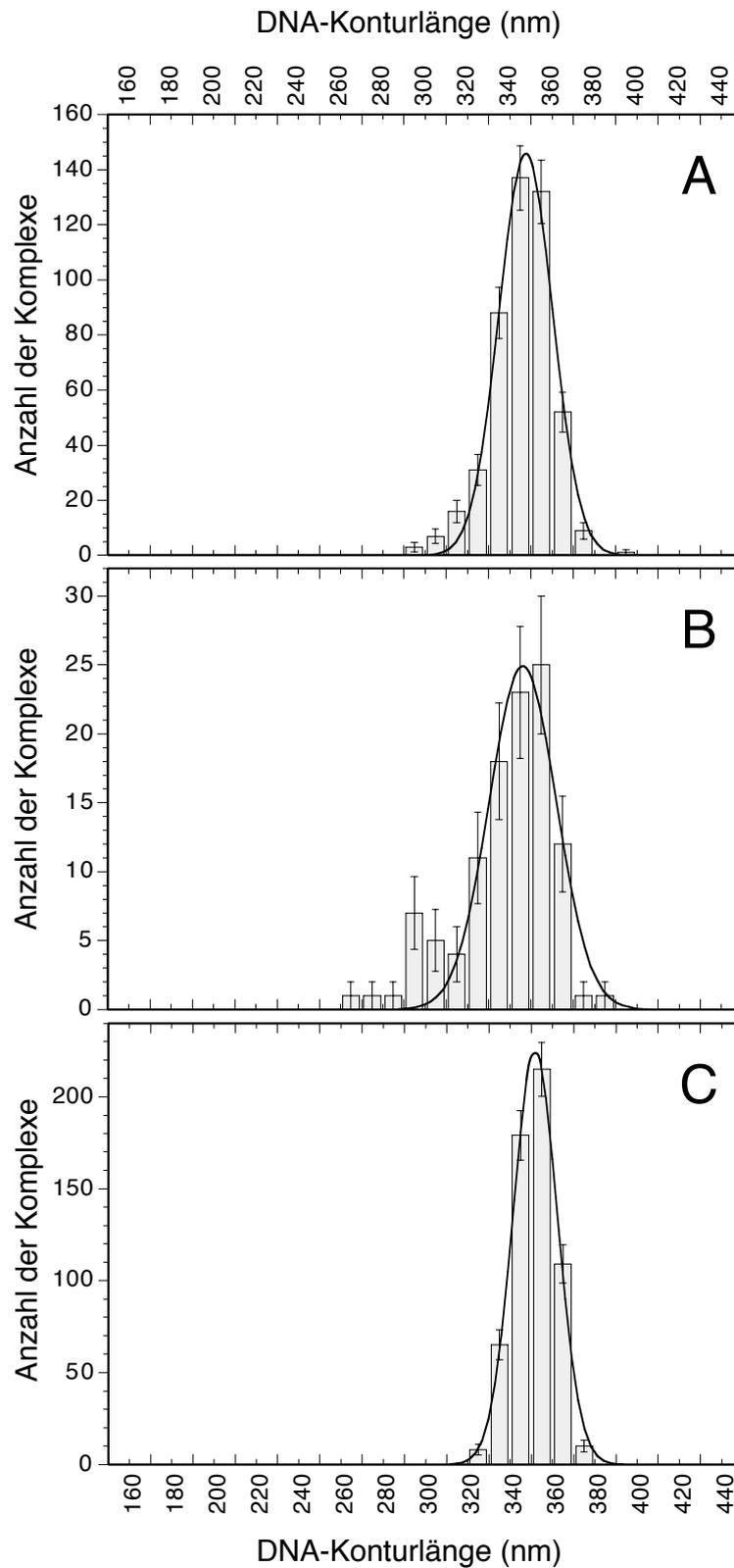


Abb. 3.15 Histogramm der gemessenen Konturlängen der Proben in Flüssigkeit
A, Spezifische RNAP- σ^{54} -DNA-Komplexe. B, Unspezifische RNAP- σ^{54} -DNA-Komplexe. C, Freie DNA.

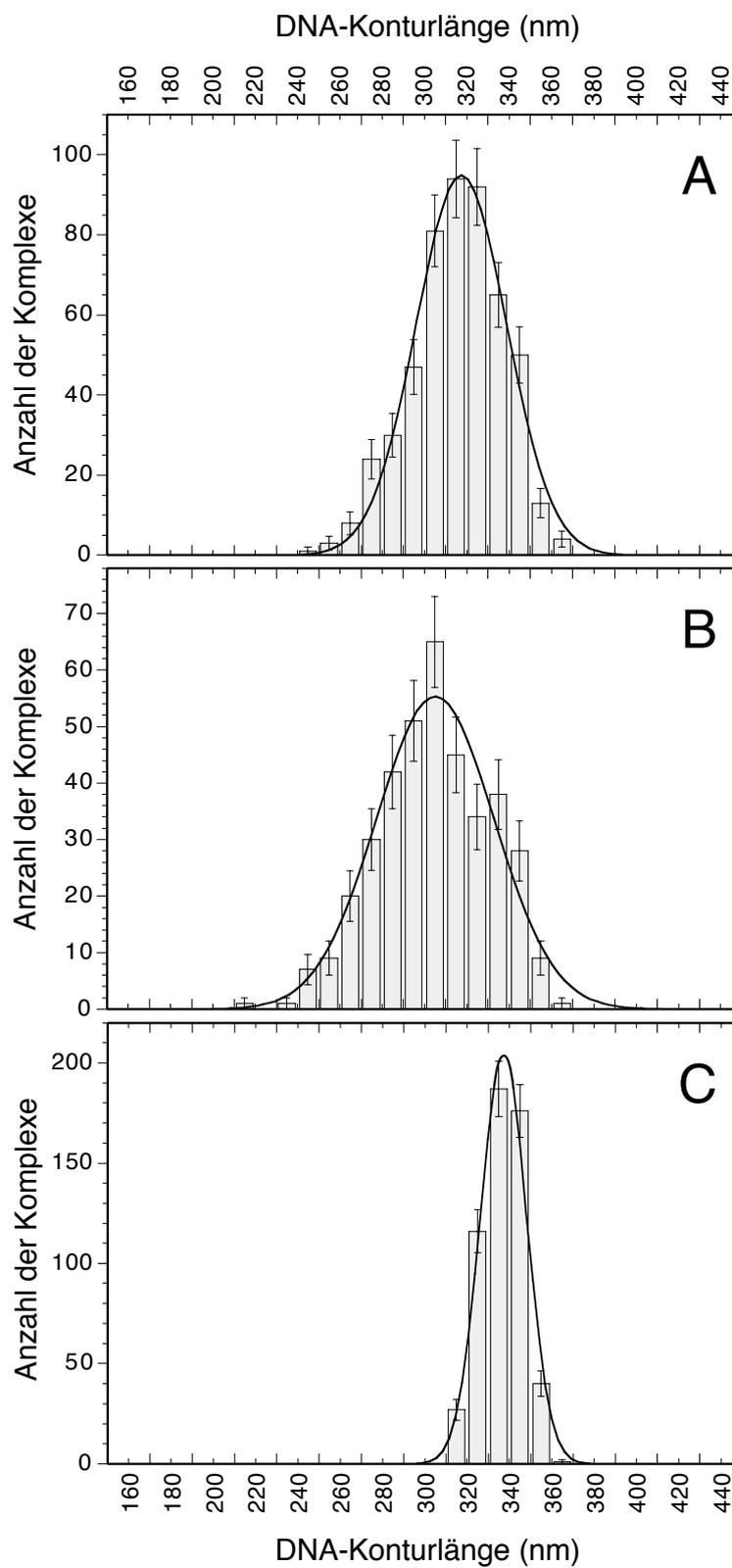


Abb. 3.16 Histogramm der gemessenen Konturlängen der Proben in Luft
A, Spezifische RNAP- σ^{54} -DNA-Komplexe. B, Unspezifische RNAP- σ^{54} -DNA-Komplexe. C, Freie DNA.

Die Verteilung der Konturlängen der Protein-DNA-Komplexe war breiter als die der freien DNA und besaß eine Standardabweichung von 13 bis 28 nm (Tab. 3.6), während die freie DNA eine Standardabweichung von 11 nm hatte. In Flüssigkeit betrug der Mittelwert mit 95%-Vertrauensintervall 350 ± 1 nm für spezifische Komplexe, 343 ± 4 nm für unspezifische Komplexe und 356 ± 1 nm für freie DNA. Dies zeigt, daß die Bindung der RNAP· σ^{54} am Promotor eine nur kleine, aber signifikante Verkürzung der DNA-Konturlänge um 6 nm hervorruft. Bei den unspezifischen Komplexen betrug sie 13 nm. Für die Messungen in Luft (Abb. 3.16) ergab sich bei der freien DNA (Abb. 3.16C) eine gleiche Gaußverteilung wie für freie DNA in Flüssigkeit (Abb. 3.15C), während die Komplexe eine breitere Verteilung im Gegensatz zu den Messungen in Flüssigkeit besaßen. Die scheinbare Konturlänge betrug 320 ± 2 nm für spezifische, 310 ± 3 nm für unspezifische Komplexe und 342 ± 1 nm für freie DNA. In Luft zeigt sich somit eine sehr starke Verkürzung der DNA-Konturlänge von 22 und 32 nm für die Protein-DNA-Komplexe gegenüber der Konturlänge der freien DNA.

Tab. 3.6 Gemessene Konturlänge (nm) der RNAP· σ^{54} -DNA-Komplexe und freier DNA

	Puffer	Luft
Spezifische Komplexe		
Mittelwert \pm 95%-Vertrauensintervall ^a	350 ± 1	320 ± 2
Mittelwert \pm Standardabweichung der Normalverteilung ^b	353 ± 13	323 ± 21
Anzahl ausgewerteter Komplexe	476	512
Unspezifische Komplexe		
Mittelwert \pm 95%-Vertrauensintervall	343 ± 4	310 ± 3
Mittelwert \pm Standardabweichung der Normalverteilung	351 ± 16	310 ± 28
Anzahl ausgewerteter Komplexe	110	381
Freie DNA		
Mittelwert \pm 95%-Vertrauensintervall	356 ± 1	342 ± 1
Mittelwert \pm Standardabweichung der Normalverteilung	357 ± 11	342 ± 11
Abstand der Basenpaare (nm)	0.34 ± 0.01	0.33 ± 0.01
Anzahl ausgewerteter Komplexe	586	547

^a Mittelwert aller Werte \pm 95%-Vertrauensintervall des Mittelwertes

^b Mittelwert der Normalverteilung \pm Standardabweichung des Mittelwertes

4. Transkriptionsexperimente

4.1 Charakterisierung der Transkriptionsplasmide

Für die *in vitro*-Transkriptionsexperimente wurde eine Reihe von Plasmiden mit einem intrinsisch gekrümmten DNA-Stück hergestellt und sequenziert (s. Material und Methoden, 2.2 und 3.9). Mit den ausgewählten Plasmiden wurde eine Maxi-Präparation (s. Material und Methoden, 3.1) durchgeführt. Ein analytisches Agarosegel über den Verlauf der Aufreinigung zeigte stets mehrere Banden, die sich durch eine Verdauung mit Topoisomerase I als Mono- und Dimere charakterisieren ließen. Da für die Transkriptionskinetiken nur Monomere verwendet werden sollten, und eine Trennung von Monomer und Dimer mittels HPLC nicht möglich war, mußten diese durch eine Gelextraktion isoliert werden. Nach Verbesserung des Standardprotokolls (s. Material und Methoden, 3.4) gelang dies mit zufriedenstellender Ausbeute.

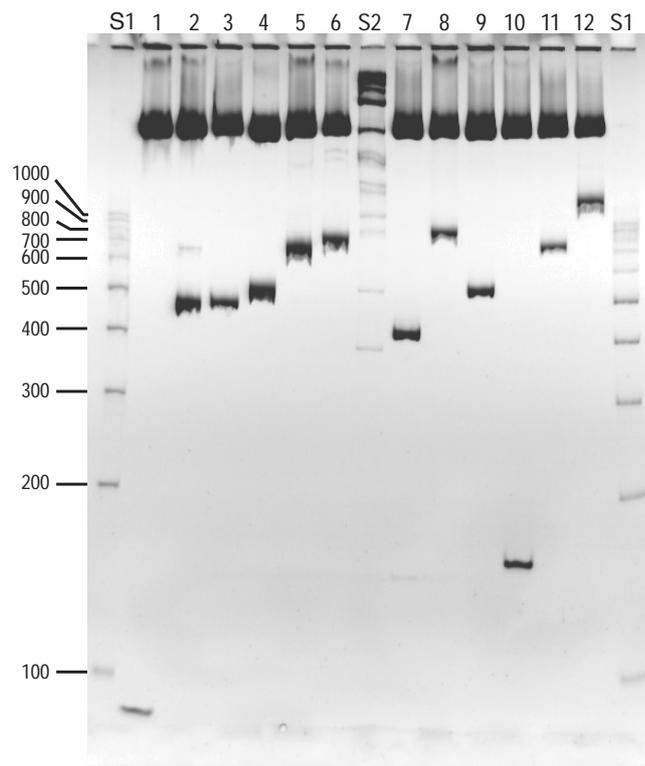


Abb. 3.17 Anomales Laufverhalten der gekrümmten DNA-Fragmente

Ethidiumbromidgefärbtes 8%iges Polyacrylamidgel mit den *Pst*I-verdauten Plasmiden der Transkriptionskinetiken. Für die Restriktionsspaltung wurden je 3 µg Plasmid eingesetzt. Rechts und links befindet sich ein 100 bp-Standard (100-1000 bp, AGS), in der Mitte läuft der BioSizer VI-Standard (AGS). Im Zusammenhang mit Tab. 3.7 kann man das anomale Laufverhalten der gekrümmten DNA-Fragmente gut verdeutlichen. Die Proben der Spuren 1-12 entsprechen folgenden Plasmiden: 1 = pCA119-66; 2 = pCA455-66; 3 = pCA461-66; 4 = pCA538-66; 5 = pCA728-66; 6 = pCA119-666; 7 = pCA293-119; 8 = pCA380-213; 9 = pCS261-202; 10 = pCS119-119; 11 = pCS293-293; 12 = pCS456-451.

Durch eine Restriktionsspaltung mit *Pst*I ließ sich die eingefügte Sequenz mit der DNA-Krümmung herausschneiden. Abbildung 3.17 zeigt die Analyse der Produkte dieser Reaktion auf einem 8%igen nichtdenaturierenden Polyacrylamidgel (s. Material und Methoden, 3.6). Deutlich ist das anomale Laufverhalten von DNA-Fragmenten zu erkennen, die die gekrümmte Sequenz in der Mitte besitzen (Spuren 9-12).

Tab. 3.7 Vergleich der tatsächlichen und scheinbaren Länge der gekrümmten DNA-Fragmente

Plasmid	Position der Krümmung	tatsächliche Länge (bp)	scheinbare Länge (bp)	<i>k</i> -Faktor ^a
pCA119-66	0.64	77	81	1.05
pCA455-66	0.87	413	455	1.10
pCA461-66	0.87	419	460	1.09
pCA538-66	0.89	496	487	0.98
pCA728-66	0.92	686	625	0.91
pCA119-666	0.15	677	644	0.95
pCA293-119	0.71	304	391	1.29
pCA380-213	0.64	485	684	1.41
pCS261-202	0.56	355	495	1.39
pCS119-119	0.50	130	155	1.19
pCS293-293	0.50	478	699	1.46
pCS456-451	0.50	799	1275	1.60

^a *k*-Faktor = scheinbare DNA-Länge im Gel dividiert durch die Sequenzlänge (Diekmann & Langowski, 1995)

Für einen direkten Vergleich sind in Tab. 3.7 die tatsächlichen und scheinbaren Fragmentlängen aufgeführt. Fragmente mit einer Krümmung, die genau in der Mitte liegt, zeigten die Gelanomalie sehr deutlich (pCS261-202, pCS119-119, pCS293-293, pCS456-451). DNA-Fragmente deren Krümmung sehr nah an einem Ende liegt (pCA538-66, pCA728-66, pCA119-666) zeigten hingegen keine Gelanomalie. Sie liefen teilweise sogar etwas schneller als es ihrer durch Vergleich mit einem Standard bestimmten Länge entspricht. Die Abweichung war allerdings nicht sehr groß und läßt sich eventuell auf den Marker zurückführen, der selber leicht gekrümmte Sequenzen enthalten könnte. Mit dem *k*-Faktor (Gl. 3.3) läßt sich

direkt eine Abschätzung über das Verhalten im Gel machen (Diekmann & Langowski, 1995; Koo & Crothers, 1988). Liegt er um 1 stimmen scheinbare und tatsächliche Länge gut überein, liegt er über 1.35 zeigen die DNA-Fragmente eine starke Gelanomalie.

$$k = \frac{\text{scheinbare DNA-Länge im Gel}}{\text{tatsächliche Sequenzlänge}} \quad (3.3)$$

Da das Plasmid pTH8 nicht von pVW7 abstammt, besitzt es nicht die *Pst*I-Restriktionsstellen, der in Tab. 3.7 aufgeführten Plasmide. Um dennoch eine gelelektrophoretische Krümmungsanalyse durchführen zu können, wurde pTH8 mit *Hind*III und *Hinf*I verdaut. Das relevante Fragment ist 215 bp lang und wies im Gel eine scheinbare Länge von 226 bp auf. Daraus resultiert ein *k*-Faktor von 1.05, der dieses Fragment als nicht gekrümmt klassifiziert. Damit konnten die Ergebnisse von Carmona *et al.* (1997) nicht bestätigt werden, die eine DNA-Verbiegung von ca. 65° bei Position -73 zwischen Enhancer und Promotor beschrieben haben.

4.2 Transkriptionskinetiken

Die Transkriptionsaktivierungsrate wurde nach dem angegebenen Protokoll an 14 Plasmiden gemessen (s. Material und Methoden, 6.2). Als interne Kontrolle wurde gleichzeitig mit dem zu untersuchenden Plasmid das Plasmid pVW7-158 in den Reaktionsansatz gegeben.

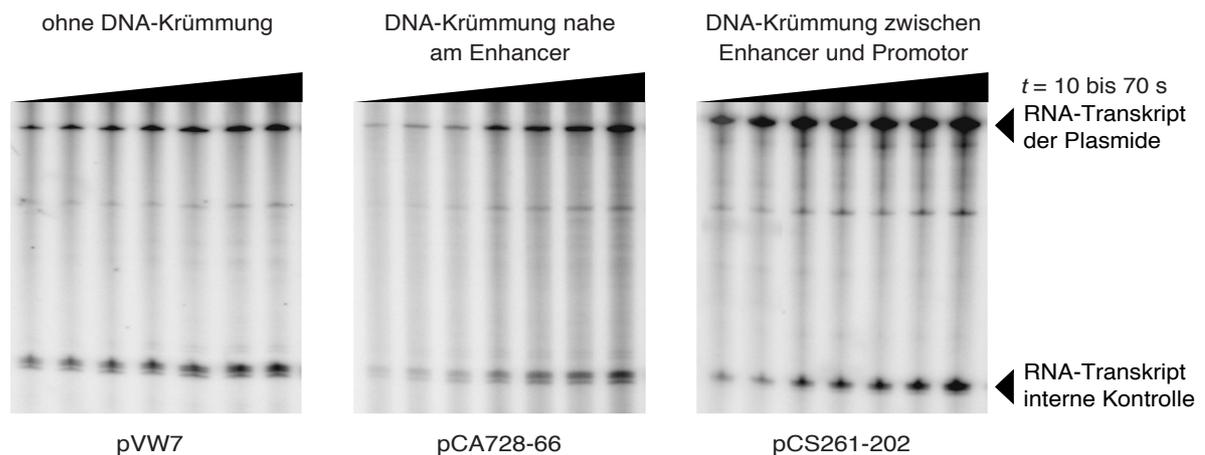


Abb. 3.18 Beispiele für Phosphorimagerbilder der Transkriptionskinetiken

Die Phosphorimagerbilder der 6%igen Harnstoff-Polyacrylamidgele der Transkriptionskinetiken zeigen deutlich die unterschiedlichen radioaktiven Transkriptraten der Plasmide pVW7, pCA728-66 und pCS261-202. Das Transkript der zu untersuchenden Plasmide besitzt eine Länge von 484 Nukleotiden. Das kürzere Transkript (158 nt) wird durch das Kontrollplasmid pVW7-158 synthetisiert. Die Proben wurden 10, 20, 30, 40, 50, 60 und 70 Sekunden nach dem Start der Transkriptionsreaktion entnommen.

Die radioaktiven RNA-Transkripte wurden auf einem 6%igen Harnstoff-Polyacrylamidgel zunächst mittels Autoradiographiefilm analysiert. Nach der Entwicklung des Films, der die Transkriptbanden zeigte, konnte eine qualitative Analyse der Reaktion erfolgen. Sofern kein Abbau aufgrund von Verunreinigungen der Versuchsansätze mit RNase festzustellen war, wurde das Gel für 3 bis 4 Tage in einer Expositionskassette mit einer Phosphorbildplatte inkubiert, die dann im Phosphorimager ausgewertet wurde. Pro Plasmid wurden 5-21 Kinetiken analysiert. Abbildung 3.18 zeigt typische Bilder der Gele nach der Analyse im Phosphorimager. Im zeitlichen Verlauf (10 bis 70 Sekunden von links nach rechts) wurden die Transkriptbanden stärker. Dies ist sowohl für das zu untersuchende Plasmid (484 nt-Transkript; pTH8: 298 nt-Transkript) als auch für das Kontrollplasmid (158 nt-Transkript) zu erkennen. Ein 0-Wert wurde nach den ersten Experimenten nicht mehr genommen, da sich ohne Zugabe von ATP kein Transkript bildete.

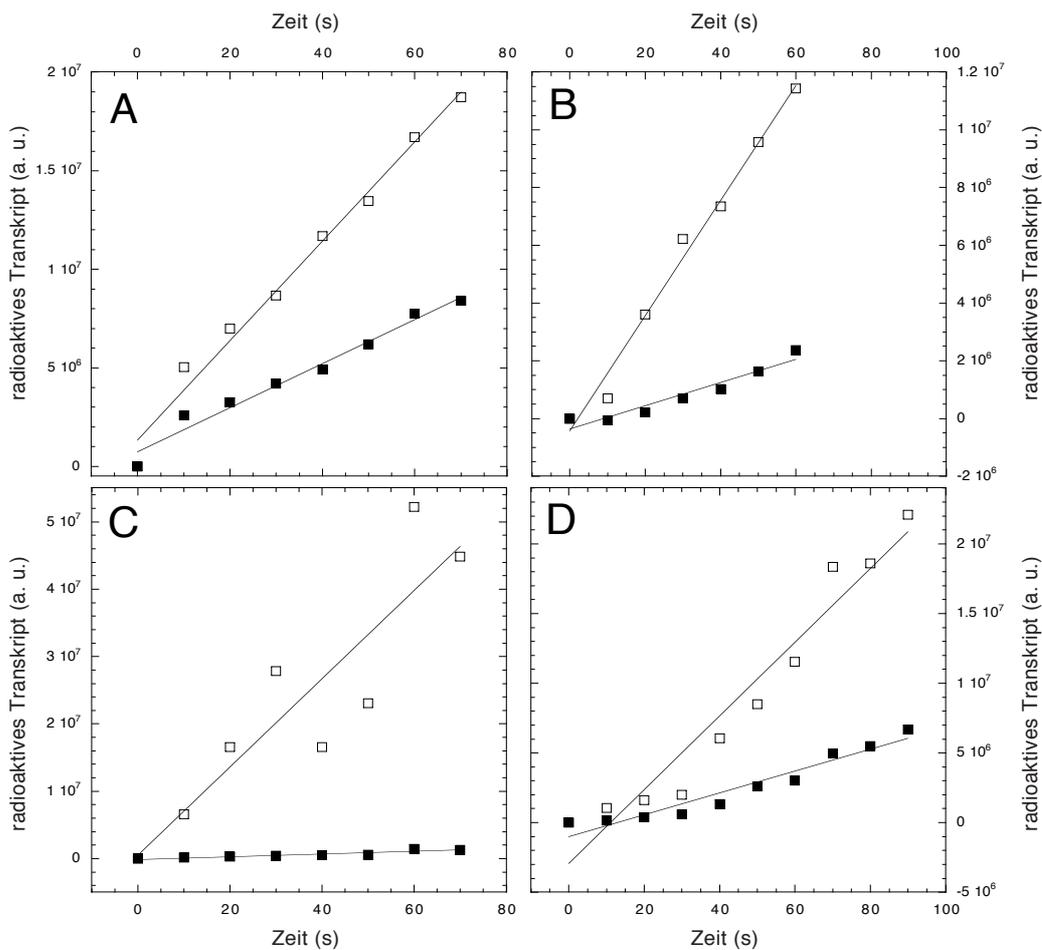


Abb. 3.19 Beispiele für die quantitative Auswertung der Phosphorimagerbilder

Die quantitative Auswertung der Phosphorimagerbilder führt zu einer graphischen Darstellung, in der die Steigung des Graphen der Aktivierungsrate entspricht. \circ = A, pVW7; B, pTH8; C, pCS261-202; D, pCA728-66; \square = A-D, pVW7-158.

Tab. 3.8 Ergebnisse der Transkriptionsexperimente und strukturelle Merkmale der Plasmide

Plasmid	Länge (bp)	Abstand Enhancer Promotor	Helix-phase	Position der Krümmung	Aktivierungsrate±95% ^a	Std. ^b	n ^c
pCA119-666	3992	785	0.76	0.15	1.36±0.46	0.67	8
pCA380-213	3800	593	0.48	0.64	1.43±0.20	0.31	9
pCA119-66	3391	185	0.62	0.64	1.56±0.44	0.50	5
pCA293-119	3619	413	0.33	0.71	1.46±0.34	0.46	7
pCA455-66	3728	521	0.62	0.87	1.11±0.34	0.49	8
pCA461-66	3734	527	0.19	0.87	4.69±1.39	2.25	10
pCA538-66	3811	604	0.52	0.89	0.78±0.19	0.27	8
pCA728-66	4001	794	0.62	0.92	1.45±0.37	0.57	9
pCS119-119	3445	238	0.67	0.50	1.54±0.39	0.66	11
pCS293-293	3793	586	0.81	0.50	1.18±0.36	0.45	6
pCS456-451	4114	907	0.38	0.50	1.52±0.47	0.63	7
pCS261-202	3670	463	0.10	0.56	7.57±1.77	4.14	21
pVW7	3114	109	0.38	0.00	1.00±0.30	0.51	11
pTH8	3576	109	0.38	0.00	3.36±1.19	1.49	6
pVW7/ <i>EcoRI</i> ^d	3114	109	0.38	0.00	0.01±0.00	0.00	4
pTH8/ <i>EcoRI</i> ^d	3576	109	0.38	0.44	0.15±0.05	0.07	8
pCS119-119/ <i>EcoRI</i> ^d	3445	238	0.67	0.50	0.18±0.04	0.05	6
pCS261-202/ <i>EcoRI</i> ^d	3670	463	0.10	0.56	0.12±0.02	0.02	6

^a Aktivierungsrate±95%-Vertrauensintervall

^b Standardabweichung der Aktivierungsrate

^c Anzahl der Experimente

^d mit *EcoRI* linearisierte Plasmide

Nach quantitativer Auswertung der Gele konnten die Daten graphisch dargestellt werden (Abb. 3.19). Dabei ist die Steigung der Graphen proportional zur Aktivierungsrate der Transkription. Die Werte des zu untersuchenden Plasmids und des Kontrollplasmids wurden zueinander ins Verhältnis gesetzt. Anschließend erfolgte die Normalisierung der Werte mit einem Korrekturfaktor, der sich aus der unterschiedlichen Transkriptlänge ergab. Von pVW7 und allen von ihm abstammenden Plasmiden wird ein RNA-Transkript mit 484 Nukleotiden (pTH8: 298 Nukleotide) synthetisiert, wohingegen das Transkript des Kontrollplasmids

pVW7-158 nur aus 158 Nukleotiden besteht. Aus der Transkriptsequenz läßt sich die mögliche Anzahl der eingebauten radioaktiven Cytosinnukleotide berechnen. In das Transkript von pVW7 werden 119 Cytosinnukleotide (pTH8: 76 Cytosinnukleotide), in die Sequenz des Kontrollplasmids 43 Cytosinnukleotide eingebaut. Aus dem Verhältnis dieser Anzahlen ergab sich für pVW7 und Abkömmlinge ein Korrekturfaktor von 2.77 (pTH8: 1.77).

Die aus diesen Berechnungen erhaltene Aktivierungsrate von pVW7 wurde gleich 1 gesetzt, da hier der Abstand zwischen Enhancer und Promotor dem natürlich vorkommenden Abstand von 109 Basenpaaren entspricht und es das Referenzplasmid war, vom dem die anderen abstammen. Der Unterschied der Aktivierungsraten bezog sich damit immer auf den Wert von pVW7. Alle Ergebnisse der Transkriptionskinetiken und strukturelle Merkmale der Plasmide sind in Tab. 3.8 zusammengefaßt. Es fällt auf, daß nur drei der superhelikalen Plasmide eine deutlich erhöhte Aktivierungsrate gegenüber der von pVW7 haben (pCA461-66: 4.69 ± 1.39 , pTH8: 3.36 ± 1.19 , pCS261-202: 7.57 ± 1.77). Die strukturellen Merkmale dieser Plasmide wie Abstand zwischen Enhancer und Promotor, Helixphase und Position der Krümmung zeigen jedoch keine Gemeinsamkeiten auf.

Tab. 3.9 ΔLk und Superhelixdichte (σ) der verwendeten Plasmide

Plasmid	mittleres ΔLk	mittleres σ
pCA119-666	-16	-0.042
pCA380-213	-16	-0.044
pCA119-66	-15	-0.046
pCA293-119	-13	-0.038
pCA455-66	-16	-0.045
pCA461-66	-15	-0.042
pCA538-66	-16	-0.044
pCA728-66	-16	-0.042
pTH8	-17	-0.050
pCS293-293	-14	-0.039
pCS119-119	-15	-0.046
pCS456-451	-14	-0.036
pCS261-202	-15	-0.043
pVW7	-17	-0.057

Die Kontrolle der Superhelixdichte (σ) ergab für alle verwendeten Plasmide ähnliche Werte (Tab. 3.9). Die aus ΔLk und Lk_0 berechneten Werte für die Superhelixdichten der verwendeten Plasmide lagen dabei leicht unter der natürlichen durchschnittlichen Superhelixdichte von $\sigma = -0.06$ für Plasmide in Bakterien (s. Material und Methoden, 3.3; Bates & Maxwell, 1993).

Abstand Enhancer-Promotor

In der Reihe der asymmetrischen Plasmide zeigte nur pCA461-66 eine erhöhte Aktivierungsrate von 4.69 ± 1.39 (Tab. 3.8). Für die anderen Plasmide wurde kein signifikanter Unterschied in ihren Aktivierungsraten beobachtet. Insbesondere zeigte sich kein Einfluß des Abstands Enhancer-Promotor (Abb. 3.20).

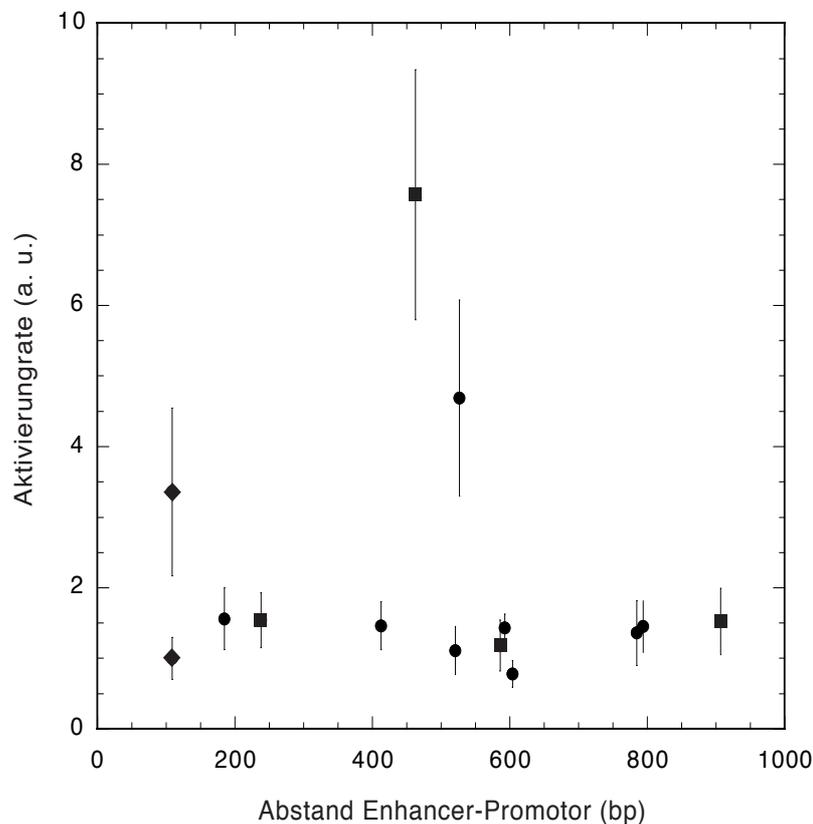


Abb. 3.20 Abhängigkeit der Aktivierungsrate vom Abstand Enhancer-Promotor

Aus der graphischen Darstellung wird deutlich, daß es für die untersuchten Plasmide keine Abhängigkeit des Abstands Enhancer-Promotor gibt. Bis auf die drei Plasmide mit einer Aktivierungsrate über 3.0 liegen die Werte für die übrigen Plasmide alle im Bereich von 0.78 und 1.56. \square = symmetrisches Plasmid, \blacklozenge = asymmetrisches Plasmid, \bullet = Plasmid ohne Krümmung.

Auch bei den genau symmetrisch angeordneten Plasmiden (pCS119-119: 1.54 ± 0.39 , pCS293-293: 1.18 ± 0.36 , pCS456-451: 1.52 ± 0.47) war eine Abhängigkeit vom Abstand Enhancer-Promotor nicht zu erkennen. Abbildung 3.20 zeigt die graphische Darstellung der Aktivierungs-

rate gegen den Abstand Enhancer-Promotor. Bis auf die drei Plasmide mit einer Aktivierungsrate über 3.0 wiesen alle Plasmide eine ähnliche Aktivierungsrate mit Werten von 0.78 ± 0.19 bis 1.56 ± 0.44 auf.

Position der Krümmung

Der Vergleich von pCA538-66 (0.78 ± 0.19) und pCS261-202 (7.57 ± 1.77) läßt darauf schließen, daß die Position der Krümmung die Aktivierungsrate mindestens 10fach erhöhen kann. Für die Gesamtheit der untersuchten Plasmide konnte jedoch keine Abhängigkeit der Aktivierungsrate von der Position der Krümmung festgestellt werden.

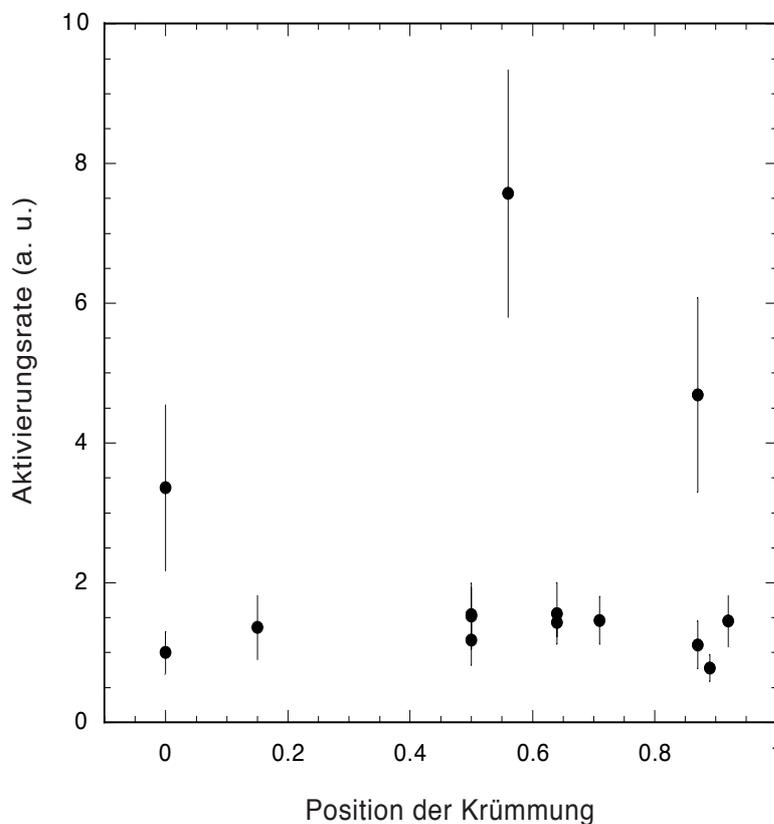


Abb. 3.21 Abhängigkeit der Aktivierungsrate von der Position der Krümmung

Die graphische Darstellung zeigt keine Abhängigkeit der Aktivierungsrate der untersuchten Plasmide von der Position der Krümmung. Bis auf die drei Plasmide mit einer Aktivierungsrate über 3.0 liegen die Werte für die übrigen Plasmide alle im Bereich von 0.78 und 1.56.

Die graphische Darstellung der Abhängigkeit der Aktivierungsrate von der Position der Krümmung (Abb. 3.21) zeigt ein ähnliches Ergebnis wie Abb. 3.20. Auch hier liegen die Werte für die meisten Plasmide in einem ähnlichen Bereich und nur die drei Plasmide mit einer erhöhten Aktivierungsrate treten hervor.

Unterschiede zwischen superhelikalen und linearisierten Plasmiden

Die Aktivierungsraten der linearisierten Plasmide lagen deutlich unter denen der entsprechenden superhelikalen Plasmide (Tab. 3.8 und 3.10). Es zeigte sich, daß eine genau zentrale Krümmung bei linearisierten Plasmiden (pCS119-119/*EcoRI*: 0.18 ± 0.04) gegenüber weniger zentralen Krümmungen (pCS261-202/*EcoRI*: 0.12 ± 0.02) optimal war (Abb. 3.22).

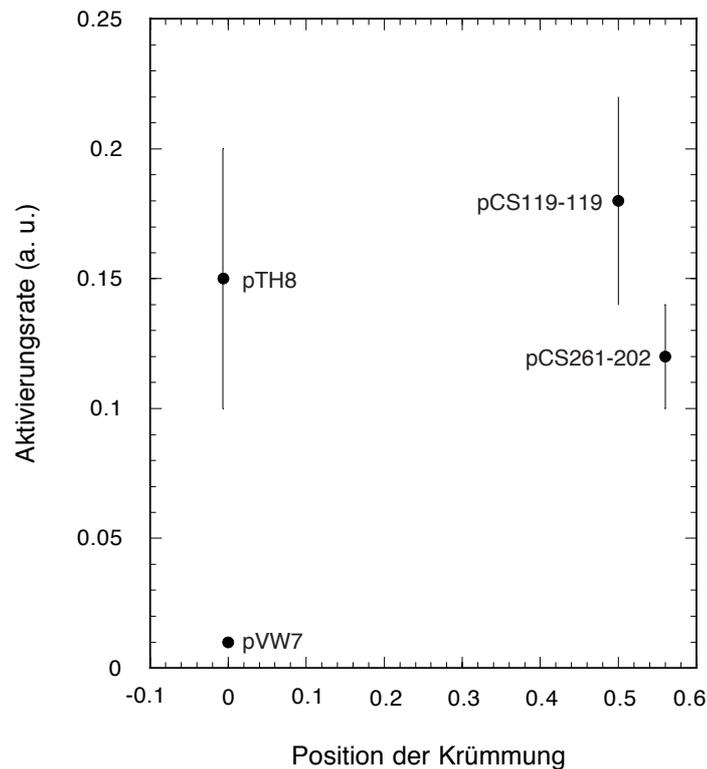


Abb. 3.22 Aktivierungsrate der linearisierten Plasmide

Die graphische Darstellung macht deutlich, daß es für die Aktivierungsrate der linearisierten Plasmide eine Abhängigkeit von der Position der Krümmung gibt. Das Plasmid mit einer ganz zentralen Krümmung (pCS119-119/*EcoRI*) zeigt die höchste Aktivierungsrate. Der Wert für pVW7 ist nur eine Abschätzung, da bei diesen Versuchsbedingungen kein Transkript detektiert werden konnte.

Von diesen zwei Plasmiden besaß jedoch in der superhelikalen Konformation nur pCS261-202 eine stark erhöhte Aktivierungsrate gegenüber pVW7 (Tab. 3.8 und 3.10), während sich pCS119-119 nicht signifikant unterschied. Der aufgezeigte Wert für linearisiertes pVW7 ist eine Abschätzung der oberen Grenze. Die Aktivierungsrate konnte durch die hier durchgeführten Transkriptionskinetiken nicht ermittelt werden, da in dem gegebenen Zeitrahmen von 70 Sekunden kein Transkript detektierbar war. Plasmid pTH8 zeigte sowohl in der linearisierten als auch superhelikalen Form eine erhöhte Aktivierungsrate gegenüber pVW7.

Tab. 3.10 Vergleich der Aktivierungsraten superhelikaler und linearisierter Plasmide

Plasmid	Position der Krümmung	superhelikal	linearisiert	Verhältnis superhelikal/linearisiert	Verhältnis erwartet ^a
pVW7	0.0	1.00±0.30	<0.01	>100	100
pTH8	0.0	3.36±1.19	0.15±0.05	22	100
pCS119-119	0.50	1.54±0.39	0.18±0.04	9	20
pCS261-202	0.56	7.57±1.77	0.12±0.02	63	175

^a Aus den numerischen Simulationen erwartetes Verhältnis der Interaktionswahrscheinlichkeiten zwischen Enhancer und Promotor von superhelikalen und linearisierten Plasmiden (s. Diskussion Tab. 4.1).

Ein direkter Vergleich der Aktivierungsraten von linearisierten und superhelikalen Plasmiden zeigt, daß die Superhelix bei pVW7 und pCS261-202 einen größeren Einfluß hat als bei pTH8 und pCS119-119 (Abb. 3.23).

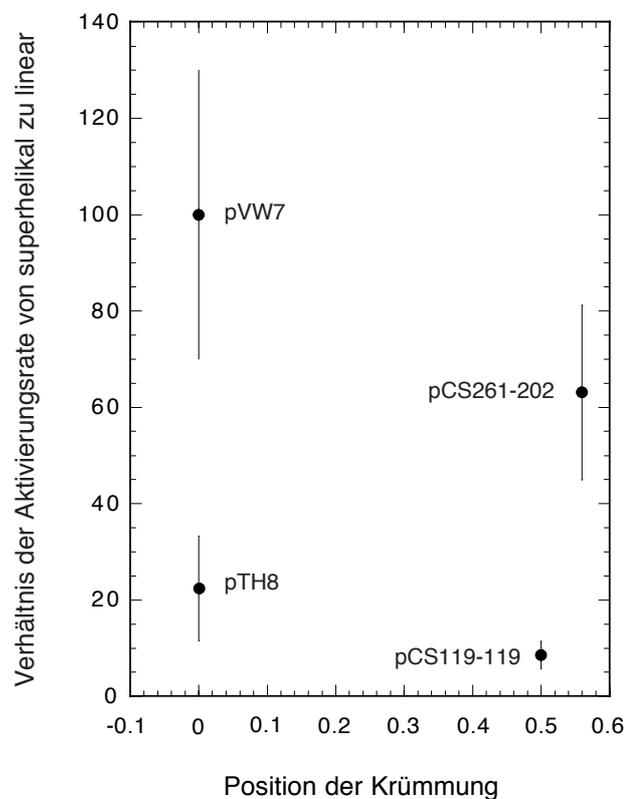


Abb. 3.23 Verhältnis der Aktivierungsrate superhelikaler gegenüber linearisierten Plasmiden
Die graphische Darstellung zeigt für pVW7 und pCS261-202 einen großen Einfluß der Superhelizität auf die Aktivierungsrate der Plasmide. Für pTH8 und pCS119-119 ist dieser Einfluß geringer.

4.3 Analyse der DNA-Krümmung

Die DNA-Sequenz vom Anfang des Enhancers bis zum Ende des Promotors wurde mit dem Computerprogramm *Curvature* auf intrinsische DNA-Krümmung untersucht (Material und Methoden, 6.2). Aus den Ergebnissen ließ sich die Konformation der DNA graphisch darstellen (Abb. 3.24). Die neu konstruierten Plasmide wiesen alle eine starke Krümmung auf, wie sie für den eingefügten gekrümmten Oligonukleotid-Duplex AS5-AS6 erwartet wurde. Das gekrümmte Segment befindet sich in der Darstellung in Abbildung 3.24 jeweils oben.

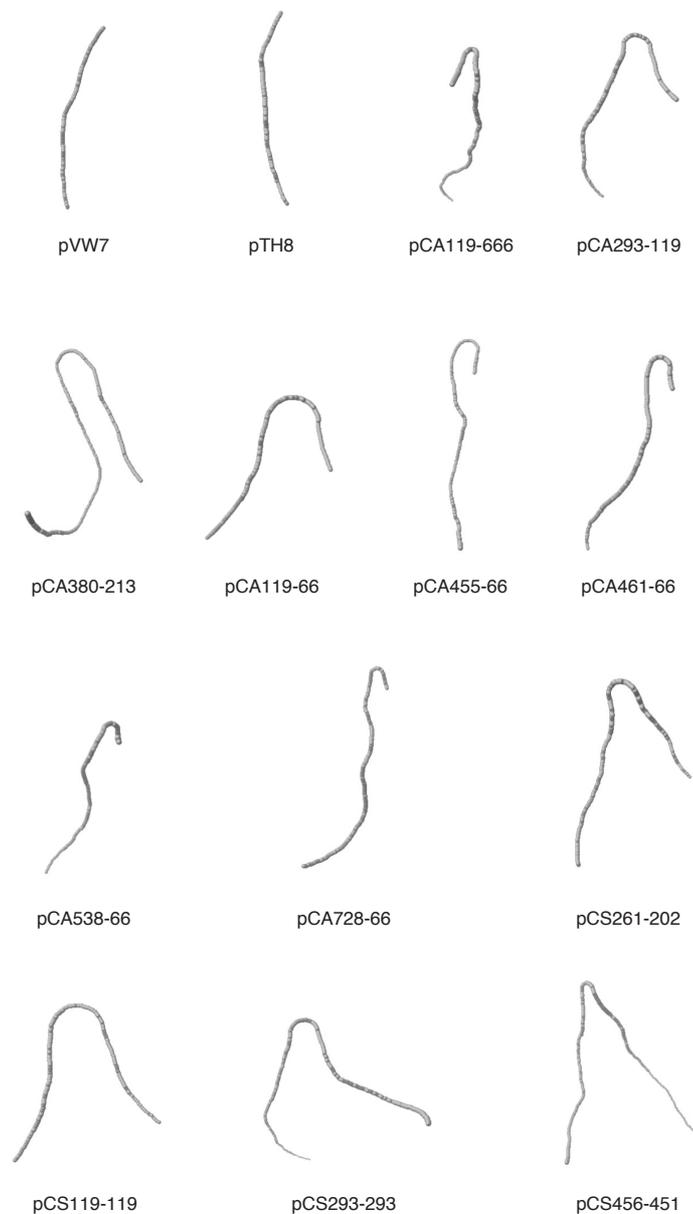


Abb. 3.24 Krümmung der DNA zwischen Enhancer und Promotor

Die Abbildung zeigt den DNA-Bereich der 14 verwendeten Transkriptionsplasmide vom Anfang des Enhancers bis zum Ende des Promotors. Die unterschiedliche Größe der Darstellung der einzelnen DNA-Sequenzen hängt mit ihren unterschiedlichen Längen zusammen.

Zusätzlich sind weitere leichte Verbiegungen im Verlauf der DNA-Sequenz zu erkennen. Diese sind bei jedem Plasmid verschieden, da sie sich aus der entsprechenden Sequenz der unterschiedlichen Fragmente ergaben, die bei der Konstruktion verwendet wurden. Die beiden Plasmide pVW7 und pTH8 wiesen keine Krümmung auf.

Diskussion

Die Regulation der Genexpression in Eukaryoten erfolgt häufig durch Proteine, deren DNA-Bindungsstellen (Enhancer) Tausende von Basenpaaren von ihrem Zielpromotor entfernt liegen. Die Interaktionen von Proteinen am Enhancer und am Promotor kann dabei durch Schleifenbildung der DNA (DNA-Looping) realisiert werden. Allerdings gibt es bisher nur wenige experimentelle Studien, die diesen Mechanismus genau beschreiben. Eine Ursache dafür ist sicher das sehr komplexe Transkriptionssystem der Eukaryoten, welches quantitative Untersuchungen mit definierten Bedingungen schwierig macht. In dieser Arbeit wurde daher ein einfacheres prokaryotisches Promotor-Enhancer-System als Modell für die Transkriptionsaktivierung unter DNA-Looping verwendet. Der *glnAp2*-Promotor (im folgenden nur als *glnA*-Promotor bezeichnet), der zum Gen für die Glutaminsynthetase gehört, wird nur dann von dem RNA-Polymerase-Holoenzym erkannt, wenn dieses mit dem Sigma-Faktor σ^{54} assoziiert ist. An den Enhancer bindet NtrC als Aktivatorprotein, das unter DNA-Looping mit RNAP· σ^{54} interagiert (Reitzer & Magasanik, 1986; Su *et al.*, 1990; Wedel *et al.*, 1990; Gralla & Collado-Vides, 1996; Rippe *et al.*, 1997a). Damit es seinen aktivierten Zustand erreicht, muß NtrC am Asp54 phosphoryliert werden, was in der Bakterienzelle durch die Histidinkinase NtrB geschieht (Chen & Reitzer, 1995; Porter *et al.*, 1993; Weiss *et al.*, 1992). Um das System möglichst einfach zu gestalten, wurde hier das chemische Agens Carbamylphosphat als Phosphodonator anstelle der enzymatischen Phosphorylierung durch NtrB verwendet (Feng *et al.*, 1992). Unter ATP-Hydrolyse wird das Aufschmelzen der Promotor-DNA induziert, und der Einbau der Nukleotide kann beginnen (Sasse-Dwight & Gralla, 1988; Popham *et al.*, 1989).

Für die geplanten Untersuchungen mußten zunächst die Proteine wt-NtrC, NtrC^{S160F}, NtrC^{D54E,S160F} und σ^{54} überexprimiert und aufgereinigt werden. Dabei sollte das Verfahren einfach und effizient sein, um auch die Produktion von Proteinmengen im Bereich mehrerer Milligramm für weitere biophysikalische Messungen zu ermöglichen.

Dann wurde die Bildung des geschlossenen Komplexes von RNAP- σ^{54} am *glnA*-Promotor untersucht. Dazu wurde das Rasterkraftmikroskop (SFM) verwendet, bei dem durch Abtasten einer Oberfläche topographische Bilder erzeugt werden, an denen die Konformation einzelner Komplexe analysiert werden kann. Daß diese Untersuchungen auch in Puffer durchgeführt werden konnten, erwies sich als ein großer Vorteil der rasterkraftmikroskopischen Analysetechnik. Auf diese Weise konnten die Moleküle im nativen hydrierten Zustand vermessen werden. Parallel dazu erfolgten, in Zusammenarbeit mit Karsten Rippe und Norbert Mücke, Experimente zur Multimerisierung des NtrC am Enhancer mit der analytischen Ultrazentrifuge, um so auch die Bildung dieses Proteinkomplexes zu untersuchen. Mit den so charakterisierten Proteinen wurden dann *in vitro*-Transkriptionsexperimente durchgeführt. Das Ziel war es dabei festzustellen, wie eine intrinsische DNA-Krümmung zwischen Enhancer und Promotor die Aktivierungsreaktion beeinflusst.

1. Proteinaufreinigung und -aktivität

Durch Verwendung des T7 RNA-Polymerase-Expressionssystems (Studier, 1990) gelang eine sehr gute Expression der Proteine wt-NtrC, NtrC^{S160F}, NtrC^{D54E,S160F} und σ^{54} . Die Aufreinigung der (His)₆-Peptid-Proteine durch Affinitätschromatographie und anschließender Anionenaustauschchromatographie ergab große Mengen gut gereinigter Proteine. Die Aktivität der Proteine bzw. ihre benötigte Konzentration für eine ausreichende Transkriptmenge konnte in Transkriptionsexperimenten mit verschiedenen Proteinkonzentrationen ermittelt werden. Ein Versuch mit den so bestimmten Konzentrationen zeigte, daß die NtrC-Mutanten auch ohne das Phosphorylierungsagens Carbamylphosphat die Transkription aktivieren können. Bei der Einfachmutante NtrC^{S160F} ist in der Nähe des ATP-Bindemotivs des NtrC-Proteins das Serin an Position 160 gegen ein Phenylalanin ausgetauscht worden. Dadurch entsteht eine Proteinform, die ohne Phosphorylierung eine geringe Transkriptionsaktivität besitzt (Popham *et al.*, 1989; Flashner *et al.*, 1995). Diese läßt sich, wie gezeigt, noch durch Phosphorylierung mit Carbamylphosphat steigern. Bei der Doppelmutante ist zusätzlich noch eine Aminosäure in der regulatorischen Domäne an Position 54 ausgetauscht. Im wt-NtrC wird das dort vorkommende Aspartat phosphoryliert und das Protein geht in die aktive Form über. Der Austausch mit Glutamat läßt eine Phosphorylierung nicht mehr zu, so daß die Aktivierung nicht weiter verstärkt

werden kann. Allerdings besitzt diese Mutante gegenüber der Einfachmutante eine erhöhte Grundaktivität der Transkription, was durch die Mutation D54E hervorgerufen wird (Klose *et al.*, 1993). Das wt-NtrC zeigt Transkriptionsaktivität nur nach Phosphorylierung. Da die Transkriptionsversuche mit dem chemisch phosphorylierten wt-NtrC sehr gute Ergebnisse lieferten, wurden die Kinetiken mit wt-NtrC durchgeführt.

2. Analytische Ultrazentrifugation

Die Komplexe des phosphorylierten NtrC am Enhancer sind zu instabil, um sie mit Gelelektrophorese untersuchen zu können (Porter *et al.*, 1993). Sie lassen sich jedoch mit dem Elektronenmikroskop (Su *et al.*, 1990; Porter *et al.*, 1993; Révet *et al.*, 1995) und dem SFM (Rippe *et al.*, 1997a; Wyman *et al.*, 1997) beobachten. Diese Methoden erlauben allerdings keine genaue quantitative Analyse der nativen Proteinkonformation. Zur Bestimmung des Molekulargewichts und physikalischer Parameter, wie Diffusions- und Sedimentationskoeffizient, eignet sich die analytische Ultrazentrifuge sehr gut.

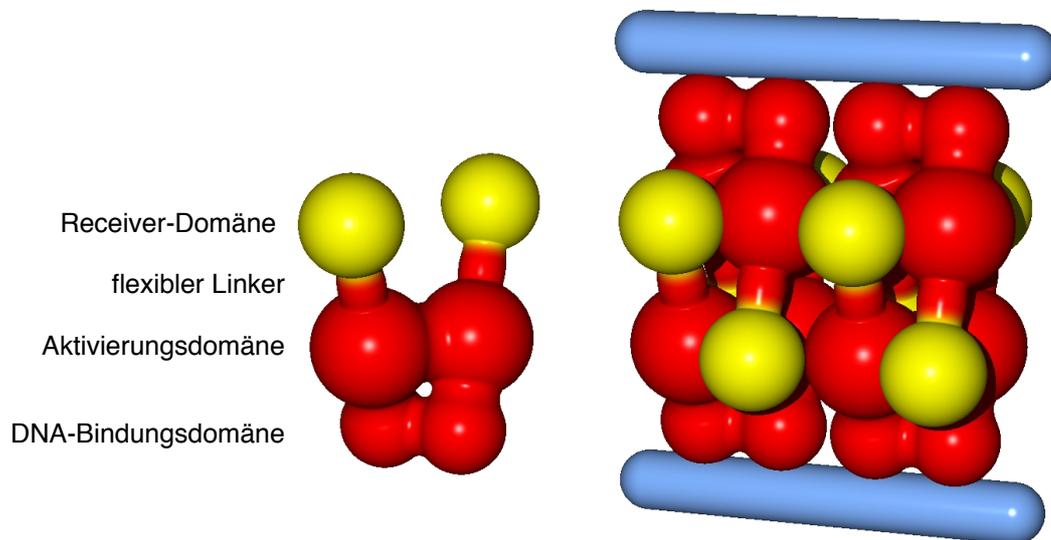


Abb. 4.1 Hydrodynamische Modelle von NtrC

Linke Seite: Ein einzelnes NtrC-Dimer besitzt eine V-förmige Gestalt. Die phosphorylierte Receiver-Domäne ist hell gezeichnet. Rechte Seite: NtrC-P-Oktamerkomplex. Die DNA-Bindung findet an der FIS-homologen C-terminalen Domäne statt. Der Oktamerkomplex kann zwei DNA-Stränge binden. Die einzelnen Domänen sind in dieser Abbildung als Kugeln oder Zylinder dargestellt. Die phosphorylierte N-terminale Domäne ist heller gezeichnet. Abbildung nach Rippe *et al.* (1998).

Bei Untersuchungen mit der analytischen Ultrazentrifuge befinden sich die Proben wie bei SFM-Untersuchungen in Flüssigkeit in ihrem nativen Hydratationszustand (Rippe *et al.*, 1998). Die gemessenen Werte befinden sich in guter Übereinstimmung mit den kalkulierten Werten für die verschiedenen Assoziationszustände des NtrC-Proteins. Durch Phosphorylierung und die DNA-Bindung entsteht ein spezifischer NtrC-Oktamerkomplex am Enhancer, der frei in Lösung nicht entstehen würde. Die Bindung des NtrC an die DNA scheint nicht nur für das DNA-Looping wichtig, sondern auch essentiell für den Zusammenbau und die Stabilisierung eines Protein-Multimerkomplexes mit spezifischer Aktivität zu sein. Ähnliche Ergebnisse wurden in neueren elektronenmikroskopischen Untersuchungen für den λ -Repressor gefunden (Révet *et al.*, 1999).

Aus den Versuchen mit der analytischen Ultrazentrifuge konnte nicht nur das Molekulargewicht verschiedener Assoziationszustände von NtrC bestimmt, sondern zusätzlich noch ein hydrodynamisches Modell erstellt werden (Rippe *et al.*, 1998), das in Abb. 4.1 gezeigt ist. Ein wichtiger Aspekt dieses Modells ist, daß ein zweiter DNA-Strang an den NtrC-Oktamerkomplex binden könnte. Dies wäre für die Stabilisierung des Loop-Intermediats mit RNAP- σ^{54} sehr wichtig.

3. Rasterkraftmikroskopie

Unter Verwendung des Rasterkraftmikroskops wurden in dieser Arbeit Protein-DNA-Komplexe und freie DNA in physiologischen Puffern und in Luft untersucht. Das 1036 bp lange DNA-Fragment besitzt den RNAP- σ^{54} -spezifischen *glnA*-Promotor. Die in Luft und Flüssigkeit erhaltenen Bilder waren von sehr guter Qualität, so daß es möglich war, die Konformation der einzelnen Moleküle zu analysieren und die Auswirkungen unterschiedlicher Probenpräparationen zu vergleichen. Die ermittelte Persistenzlänge von 47 nm in Flüssigkeit und in Luft für das untersuchte DNA-Fragment befindet sich in Übereinstimmung mit dem durch andere Methoden ermittelten Durchschnittswert von 50 nm (Hagerman, 1988). Dies zeigt, daß die Bindung der DNA an die Glimmeroberfläche bei den verwendeten Protokollen relativ schwach ist und eine Reäquilibration der DNA auf der Oberfläche erlaubt (Rivetti *et al.*, 1996). Die Bindung zwischen Glimmer und den Protein-DNA-Komplexen wird hauptsächlich durch die DNA vermittelt. Frisch gespaltener Glimmer ist negativ geladen und Magnesiumionen können

eine Verbindung zwischen der Oberfläche und den negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA herstellen (Bezanilla *et al.*, 1995; Bustamante & Rivetti, 1996). Andere zweiwertige Kationen wie z. B. Ni^{2+} (welches hier in Protokoll I verwendet wurde), Co^{2+} und Zi^{2+} können Mg^{2+} ersetzen und die DNA fester an den Glimmer binden (Hansma & Laney, 1996). Die Anwesenheit zusätzlicher einwertiger Ionen verringert die Bindungsaffinität der DNA zum Glimmer, da sie wahrscheinlich mit den zweiwertigen Ionen konkurrieren (Bezanilla *et al.*, 1995). Die RNAP- σ^{54} kann auch in Abwesenheit von DNA an die Glimmeroberfläche binden. Diese Interaktion wird vermutlich durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen geladenen Aminosäureresten und der Glimmeroberfläche hervorgerufen, wie es schon für Lysozym angenommen wurde (Radmacher *et al.*, 1994). Da die Ladungsdichte des Proteins aber wesentlich geringer als die der DNA ist, sollte das Protein weniger stark an den Glimmer binden.

Millimolare Konzentrationen von Ni^{2+} , welches in Protokoll I verwendet wurde, und Zi^{2+} inhibieren die Transkriptionsaktivität der RNAP- σ^{54} , indem sie mit dem Mg^{2+} konkurrieren, das im katalytischen Zentrum für die Bildung einer neuen Phosphodiesterbindung benötigt wird (Erie *et al.*, 1992; Niyogi & Feldmann, 1981). Für RNAP- σ^{70} -DNA-Komplexe konnte gezeigt werden, daß sie in Gegenwart von 2 mM Zi^{2+} an den Glimmer binden und in einem transkriptionskompetenten Zustand verbleiben (Kasas *et al.*, 1997). Nach Auswaschen der Zi^{2+} -Ionen wurde die Transkriptionsaktivität wiederhergestellt. Hansma *et al.* (1997), die in ihren SFM-Untersuchungen eine RNAP- σ^{70} verwendeten, die in der β' -Untereinheit ein $(\text{His})_6$ -Peptid am C-Terminus besitzt, konnten zeigen, daß die Polymerase bevorzugt in einer linkshändigen Konformation (Definition von links- und rechtshändiger Konformation s. Abb. 3.10) an den Glimmer bindet. Da bei diesen Versuchen kein Ni^{2+} verwendet wurde, ist der Einfluß auf die bevorzugte Konformation des Proteins auf das $(\text{His})_6$ -Peptid zurückzuführen. In neueren Untersuchungen mit dem gleichen $(\text{His})_6$ -RNAP- σ^{70} -Holoenzym wurde der Verbiegungswinkel offener Komplexe gemessen, die in Puffern mit und ohne Ni^{2+} hergestellt worden waren (Rivetti *et al.*, 1999). Dabei zeigte sich, daß der DNA-Verbiegungswinkel in Anwesenheit von Ni^{2+} drastisch abnahm. Das Ni^{2+} bindet während der Probenpräparation an das $(\text{His})_6$ -Peptid. Dadurch kommt es zu einer unterschiedlichen Bindung an den Glimmer verglichen mit der wt-RNA-Polymerase, welche in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde. Da Ni^{2+} die Transkription inhibiert (Niyogi & Feldman, 1981), verharrte die Polymerase in Anwesenheit dieses Ions wahrscheinlich im geschlossenen Komplex. Der Vergleich der Ver-

biegungswinkel fand daher möglicherweise zwischen geschlossenen und offenen Komplexen statt und nicht, wie vermutet, zwischen offenen Komplexen in An- und Abwesenheit von Ni^{2+} .

In der vorliegenden Arbeit wurde die Komplexbildung und Bindung der Proben an den Glimmer in einem Puffer durchgeführt, in dem $\text{RNAP}\cdot\sigma^{54}$ vollkommen transkriptionsaktiv ist (s. Material und Methoden, 6.2). Die Zugabe von Ni^{2+} diente nur der stärkeren Bindung der DNA an den Glimmer, was zu einer Verbesserung der Bildqualität führte (Hansma & Laney, 1996). Außerdem konnte Ni^{2+} ohne sichtbaren Effekt durch Pufferwechsel in der Flüssigkeitsmeßzelle wieder gegen Mg^{2+} ausgetauscht werden. Daher erscheint es unwahrscheinlich, daß Ni^{2+} eine Konformationsänderung der Komplexe herbeiführt, die sich von der in einem Puffer, der nur Mg^{2+} -Ionen enthält, unterscheidet. Weitere Experimente zum Effekt von Ni^{2+} auf die Konformation von RNAP-Komplexen sind jedoch noch notwendig, um diese Frage beantworten zu können. Dazu könnte die Methode von Lyubchenko verwendet werden, bei der die Glimmeroberfläche silanisiert und dadurch positiv geladen wird (Lyubchenko *et al.*, 1992a; Lyubchenko *et al.*, 1992b). Der Einsatz von zweiwertigen Kationen zur Bindung von DNA an die Oberfläche ist dann nicht mehr notwendig.

3.1 DNA-Bindungsstelle von $\text{RNAP}\cdot\sigma^{54}$

Die SFM-Experimente fanden unter Bedingungen statt, die ein Aufschmelzen der Promotor-DNA (offener Komplex) nicht ermöglichen. Daher waren nur $\text{RNAP}\cdot\sigma^{54}$ -DNA-Komplexe zu sehen, die ein spezifisch am *glnA*-Promotor gebundenes Protein (geschlossener Komplex) oder ein unspezifisch an anderen Orten des DNA-Fragments gebundenes Protein besaßen. Für $\text{RNAP}\cdot\sigma^{70}$ konnte schon gezeigt werden, daß das Holoenzym nicht nur spezifisch an die Promotorsequenz, sondern auch an andere Orte der DNA bindet (deHaseth *et al.*, 1978). Feste Bindung an nicht initiiierende Orte ebenso wie Bindung an das Fragmentende wurden ebenfalls beschrieben (Melancon *et al.*, 1982; Melancon *et al.*, 1983). Die verschiedenen Arten der Bindung von *E. coli* RNA-Polymerase konnten hier direkt für $\text{RNAP}\cdot\sigma^{54}$ beobachtet werden. Die Analyse der Bindungsposition ergab, daß unter entsprechenden Bedingungen 70 % der Komplexe ein spezifisch am Promotor gebundenes Protein besaßen. Durch starkes Waschen der Probe konnte das Protein vom Promotor zu anderen Orten auf der DNA bewegt werden. Diese Beobachtung unterstützt die Ansicht, daß RNA-Polymerase an der gebundenen DNA entlanggleiten kann. Dieses Entlanggleiten konnte im SFM für *E. coli* RNA-Polymerase-Kernenzym

von Bustamante *et al.* (1997) direkt beobachtet und für Rhodamin-markiertes RNAP- σ^{70} -Holoenzym durch Fluoreszenzbilder gezeigt werden (Kabata *et al.*, 1993). Zusätzlich wurde auf der Basis von kinetischen Berechnungen und Analysen für die Promotorbesetzung verschiedener DNA-Matrizen geschlossen, daß RNAP- σ^{70} in der Lage ist, auf der DNA entlangzugleiten (Singer & Wu, 1987; Singer & Wu, 1988; Ricchetti *et al.*, 1988). Eine andere Erklärung für den beobachteten Positionswechsel des Proteins während des Waschschriffs wäre ein Ablösen und Wiederbinden der Polymerase. Jedoch scheint die Wahrscheinlichkeit eines solchen Ereignisses sehr klein, so daß der beobachtete Positionswechsel (Abb. 3.9) eher das Entlanggleiten des Proteins an der DNA widerspiegelt. Das Waschen der Glimmeroberfläche mit Wasser vor dem Trocknen wie in Protokoll II und III entfernt alle nicht gebundenen Moleküle. Dies wurde durch einen Versuch demonstriert, bei dem die Kinetik der DNA-Bindung an die Glimmeroberfläche untersucht wurde, indem die Probe nach dem Aufbringen auf den Glimmer zu verschiedenen Zeiten gewaschen wurde (Rivetti *et al.*, 1996). Das Ergebnis zeigt, daß der Bindungsprozeß allein durch die Diffusion kontrolliert wird. Dabei wurde ein DNA-Diffusionskoeffizient von $D = 5.5 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ bestimmt, der in Übereinstimmung mit dem theoretischen Wert von $D = 5.4 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ steht. Wenn also ein signifikanter Anteil von DNA-Molekülen noch während des Waschschriffs an den Glimmer binden könnte, würde dies dem gezeigten Resultat widersprechen. Daher scheint es unwahrscheinlich, daß eine abgelöste RNA-Polymerase wieder an die DNA binden kann, während die Probe gewaschen wird.

3.2 Verbiegungswinkel der RNAP- σ^{54}

Der durchschnittliche Verbiegungswinkel und die Standardabweichung für die spezifischen Komplexe in Flüssigkeit mit einem Wert von $26 \pm 34^\circ$ waren etwas kleiner als die Werte in Luft mit $32 \pm 45^\circ$ (Tab. 3.5). Die unspezifischen Komplexe zeigten eine breitere Verteilung mit einem Verbiegungswinkel von etwa 60° . Dies deutet auf die Koexistenz verschiedener Konformationen hin (Abb. 3.8, Tab. 3.4), wobei kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Protokollen gefunden wurde. Der Waschschriff und das Trocknen der Probe nach dem Aufbringen auf den Glimmer hat demnach einen geringen Einfluß auf den DNA-Verbiegungswinkel. Da die unspezifischen Komplexe einen größeren durchschnittlichen Verbiegungswinkel besaßen und das Waschen den relativen Anteil an unspezifischen Komplexen erhöht, könnte dies möglicherweise indirekt den Wert für die spezifischen Komplexe beeinflussen. Denn

unspezifische Komplexe in der Bindungsregion $r = 0.40 \pm 0.06$, die zur Identifikation der spezifischen Komplexe verwendet wurde, würden zu einem erhöhten Wert für den Winkel der spezifischen Komplexe führen. Allerdings sollte dieser Effekt klein sein. Aus der Grundlinie der Gaußfunktionen in Abb. 3.9 kann der Betrag der unspezifisch gebundenen RNAP· σ^{54} , die in die spezifischen Komplexe mit eingerechnet sind, mit 11 % in Flüssigkeit (Abb. 3.9A) und 15 % in Luft (Abb. 3.9B) abgeschätzt werden.

Die separate Analyse der verschiedenen Komplexkonformationen, in denen die DNA gebogen war (Abb. 3.10A-F), ergab signifikante Unterschiede im Hinblick auf das Ausmaß der Verbiegung. Die folgenden Werte wurden für die Proben in Flüssigkeit bestimmt: Die Komplexe, bei denen die DNA um die Polymerase herum lief (Abb. 3.10A und D, $n = 78$) zeigten einen Verbiegungswinkel \pm Standardabweichung von $39 \pm 28^\circ$. Wenn die DNA von der Polymerase weg gebogen war (Abb. 3.10B und E, $n = 175$), ergab sich ein Verbiegungswinkel von $52 \pm 30^\circ$ und für die Polymerase, die genau auf der DNA sitzt (Abb. 3.10C und F, $n = 126$) $45 \pm 28^\circ$. Die Resultate für die Komplexe in Luft waren denen in Flüssigkeit ähnlich. Somit läßt sich die relativ große Standardabweichung der Verbiegungswinkel der spezifischen Komplexe zum Teil durch die Koexistenz verschiedener Spezies mit unterschiedlichem Verbiegungswinkel erklären. Für einen genauen Vergleich der verschiedenen Konformationen ist der Datensatz jedoch zu klein. Außerdem stellt sich die Frage, inwieweit die verschiedenen beobachteten Konformationen tatsächlich verschiedene Konformationen der freien RNA-Polymerase in Lösung widerspiegeln, oder diese sich nur durch die Bindung an die Oberfläche unterscheiden. Für die Konturlänge ergab sich keine Korrelation zwischen den Komplexkonformationen und den gemessenen Konturlängen.

In einer vorherigen Untersuchung des geschlossenen Komplexes der RNAP· σ^{54} mit dem SFM wurde ein Verbiegungswinkel von $49 \pm 24^\circ$ für Komplexe in Luft bestimmt (Rippe *et al.*, 1997a) im Gegensatz zu dem in dieser Arbeit mit Protokoll II gemessenen $32 \pm 45^\circ$. Zwischen diesen beiden Untersuchungen bestehen einige Unterschiede im Hinblick auf die Versuchsbedingungen. Bei Rippe *et al.* (1997a) war die Salzkonzentration geringer und das DNA-Fragment mit 726 bp kürzer. Außerdem wurden die Proben nach Protokoll II und III in Gegenwart von 0.01 % NP-40 aufgebracht, was die Reproduzierbarkeit verbesserte. Der Einfluß von NP-40 auf den Verbiegungswinkel der Komplexe in Luft wurde jedoch nicht systematisch untersucht. Es wäre allerdings denkbar, daß einige der beobachteten Unterschiede der Verteilung der Verbiegungswinkel zwischen diesen beiden Studien den Einfluß von NP-40 widerspiegeln.

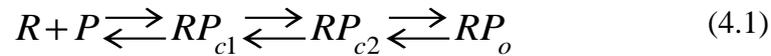
Dennoch scheint es unwahrscheinlich, da die in Flüssigkeit (kein NP-40, Protokoll I) und in Luft (mit NP-40 beim Aufbringen auf den Glimmer, Protokoll II) aufgenommenen Bilder eine sehr ähnliche Verteilung des Verbiegungswinkels zeigten. Es bleibt also unklar, ob der relativ geringe Unterschied in den Versuchsbedingungen für die signifikante Änderung im Verbiegungswinkel der Messungen in Luft mittels SFM verantwortlich ist.

Die Messung der intrinsischen DNA-Verbiegung am Promotor mit Hilfe einer Maske entsprechend der Größe der RNAP- σ^{54} in Flüssigkeit und Luft, ergab das gleiche Ergebnis wie die vorhergehenden Untersuchungen von Rippe *et al.* (1997a). Der gemessene Winkel um 0° zeigt, daß der Promotor keine intrinsische Verbiegung besitzt. Die Maske wurde auf DNA-Fragmente gesetzt, an deren Enhancer NtrC gebunden hatte. Dies ermöglichte die genauere Positionsbestimmung des Promotors. Gleichzeitig konnte dadurch die DNA-Verbiegung am Enhancer gemessen werden. Der gemessene Verbiegungswinkel von $37 \pm 35^\circ$ in Flüssigkeit mit wt-NtrC und $21 \pm 45^\circ$ in Luft mit NtrC^{D54E,S160F} demonstriert, daß NtrC die DNA verbiegt. Dies würde bedeuten, daß wt-NtrC und besonders die Mutante die DNA schwächer verbiegen als durch Gelshift-Experimente vermutet (Fiedler, 1996). Aus diesen Untersuchungen ergab sich ein mittlerer Verbiegungswinkel von 55° . Da jedoch in der vorliegenden Arbeit nur relativ wenige Moleküle gemessen wurden, läßt sich der Wert des Verbiegungswinkels wahrscheinlich noch genauer bestimmen. Dabei könnte gleichzeitig ein möglicher Einfluß der Mutation aufgezeigt werden, wobei sowohl wt-Protein als auch die Mutante mit dem gleichen Versuchsprotokoll untersucht werden müßten. Die aufgezeigten Unterschiede können auch an den sehr verschiedenen Versuchsanordnungen liegen. Mit Elektronenmikroskopie konnte gezeigt werden, daß NtrC sowohl lineare als auch superhelikale DNA verbiegt (Révet *et al.*, 1995). Es wurde sogar vermutet, daß die DNA um das Aktivatorprotein gewickelt wird. Eine DNA-Verbiegung konnte auch mit dem zur C-terminalen Domäne von NtrC homologen Protein FIS (*factor for inversion stimulation*) beobachtet werden (Gille *et al.*, 1991; Kostrewa *et al.*, 1991; Kostrewa *et al.*, 1992; North *et al.*, 1993).

3.3 Messungen der DNA-Konturlänge von RNAP- σ^{54} -DNA-Komplexen

Basierend auf kinetischen, thermodynamischen und *Footprinting*-Untersuchungen (DNA-Schutzuntersuchungen) für *E. coli* RNAP- σ^{70} -Polymerase kann der Transkriptionsinitiationsprozeß wie folgt dargestellt werden (McClure, 1980; Buc & McClure, 1985; Roe *et al.*, 1985;

Spassky *et al.*, 1985; Kovacic, 1987; Cowing *et al.*, 1989; Schickor *et al.*, 1990; Mecsas *et al.*, 1991).



mit $R = \text{RNAP} \cdot \sigma^{70}$ -Holoenzym, $P = \text{Promotor-DNA}$, RP_{c1} = initialer geschlossener Komplex bei einer Temperatur $< 8 \text{ }^\circ\text{C}$, RP_{c2} = intermediärer Komplex zwischen $8 \text{ }^\circ\text{C}$ und $21 \text{ }^\circ\text{C}$, RP_o = offener Komplex, der über $25 \text{ }^\circ\text{C}$ gebildet wird, mit teilweise geschmolzener Promotor-DNA.

Die unterschiedlichen $\text{RNAP} \cdot \sigma^{70}$ -DNA-Konformationen wurden mit DNase I- und Hydroxylradikal-*Footprint* untersucht [z. B. (Cowing *et al.*, 1989; Schickor *et al.*, 1990)]. Aus den Hydroxylradikal-*Footprint*-Versuchen wurde eine Interaktion zwischen dem $\text{RNAP} \cdot \sigma^{70}$ -Holoenzym und der T7 A1 Promotor-DNA bestimmt, die von Position -53 bis -4 ($\approx 17 \text{ nm}$) für RP_{c1} und von -53 bis +21 ($\approx 25 \text{ nm}$) für RP_{c2} reicht (Schickor *et al.*, 1990). Der RP_o -Komplex zeigt eine Besetzung der DNA von -53 bis +21 wie auch für RP_{c2} , und zusätzlich ist die DNA von -7 bis +2 geschmolzen. Das heißt, das $\text{RNAP} \cdot \sigma^{70}$ -Holoenzym deckt im RP_{c2} - und RP_o -Komplex die gleiche, verlängerte DNA-Region ab. Die an den Promotor gebundene $\text{RNAP} \cdot \sigma^{54}$ scheint funktionell äquivalent zur RP_{c1} -Konformation. *Footprinting*-Versuche von $\text{RNAP} \cdot \sigma^{54}$ am *glnA*-Promotor zeigen einen Schutz der DNA in der Region von -34 bis nahe an den Transkriptionsstart an Position -2 ($\approx 10 \text{ nm}$). Im offenen Komplex, welcher RP_o entsprechen sollte, weitet sich die geschützte Region bis +23 aus, d. h. bis zu insgesamt 19 nm (Popham *et al.*, 1989; Tintut *et al.*, 1994). Der Vergleich der *Footprinting*-Muster der beiden Holoenzymformen zeigt, daß bei $\text{RNAP} \cdot \sigma^{54}$ der Kontakt von -53 bis -35 fehlt, was zu einer signifikant kürzeren Interaktionsregion im Promotorbereich von nur 10 nm gegenüber 17 nm bei $\text{RNAP} \cdot \sigma^{70}$ führt.

Die Dimensionen des $\text{RNAP} \cdot \sigma^{70}$ -Holoenzym von $10 \text{ nm} \times 10 \text{ nm} \times 16 \text{ nm}$ wurden durch Elektronenmikroskopie zweidimensionaler Kristalle bestimmt (Darst *et al.*, 1989). Aus diesem Ergebnis schloß man, daß eine Verbiegung der DNA nötig ist, da 74 bp ($= 25 \text{ nm}$) DNA mit RNA-Polymerase im RP_{c2} - oder RP_o -Komplex interagieren können (Darst *et al.*, 1989). Eine etwas verlängerte Konformation eines heparinstabilen $\text{RNAP} \cdot \sigma^{70}$ -Promotor-Komplexes, möglicherweise die RP_o -Form, mit einer maximalen Ausdehnung der Polymerase von $25 \pm 2 \text{ nm}$ wurde durch Neutronenkleinwinkelstreuung ermittelt (Heumann *et al.*, 1988). In SFM-Untersuchungen in Luft von $\text{RNAP} \cdot \sigma^{54}$ im offenen Komplex konnte ein Anstieg des Verbiegungs-

winkels gegenüber dem geschlossenen Komplex gemessen werden, was übereinstimmend mit einer Umhüllung der Polymerase durch die DNA im offenen Komplex wäre (Rippe *et al.*, 1997a). Dieser Anstieg des DNA-Verbiegungswinkels wurde durch eine Verkürzung der scheinbaren Konturlänge von 17 nm begleitet, was die Interpretation unterstützt, daß die RNAP· σ^{54} im offenen Komplex von der DNA umwickelt wird. Ähnlich wurde für die eukaryotische RNA-Polymerase II von Forget *et al.* (1997) und Kim *et al.* (1997) argumentiert. In diesen beiden Untersuchungen wurde im konventionellen Elektronenmikroskop mit ethanol-gewaschenen und luftgetrockneten Proben eine scheinbare Verkürzung der Konturlänge von 50 und 51 bp oder 17 nm gegenüber freier DNA gemessen. Die Experimente wurden mit einem sogenannten Pre-Initiationskomplex durchgeführt, der kompetent für eine Transkriptionsinitiation ist, aber die Promotor-DNA noch nicht geschmolzen hat. Diese Form der RNA-Polymerase II scheint funktionell äquivalent zum intermediären RP_{c2} -Komplex zu sein (Kim *et al.*, 1997).

In der vorliegenden Arbeit wurde nur der geschlossene Komplex der RNAP· σ^{54} am *glnA*-Promotor untersucht, so daß diese Ergebnisse nicht direkt mit intermediären und offenen Polymerasekomplexen verglichen werden können. Die spezifischen Komplexe von RNAP· σ^{54} in Flüssigkeit zeigten nur eine Verkürzung von 6 nm verglichen mit der freien DNA, im Gegensatz zu 22 nm bei den spezifischen Komplexen an Luft (Tab. 3.6). Man kann sich nur schwer vorstellen, wie sich bei einer Protein-DNA-Kontaktregion von ≈ 10 nm (*Footprinting*-Untersuchungen von RNAP· σ^{54}) eine scheinbare DNA-Verkürzung von 22 nm ergeben soll. Selbst unter der Annahme, daß bei den spezifischen Komplexen in Flüssigkeit die gemessene Verkürzung von 6 nm vollständig durch die Art der Auswertung entsteht, würde eine Verkürzung von $22 \text{ nm} - 6 \text{ nm} = 16 \text{ nm}$ verbleiben. Über diesen Bereich müßte die DNA von der RNAP· σ^{54} kontaktiert werden und dementsprechend im *Footprinting* geschützt sein. Da dies nicht der Fall ist, ergibt sich, daß die RNAP· σ^{54} während des Trocknungsprozesses eine künstliche Konformation einnimmt, die eine erhöhte Interaktionsoberfläche gegenüber der nativen hydrierten Form besitzt. Daher ist die starke Verkürzung der gemessenen Konturlänge für die luftgetrockneten Proben wahrscheinlich zum Teil ein Artefakt der Trocknung.

Die Beobachtung, daß die unspezifischen Komplexe in Flüssigkeit eine größere Reduktion der Konturlänge von 13 nm haben, zeigt, daß die RNA-Polymerase verschiedene Konformationen annehmen kann, die unterschiedlich mit der DNA interagieren. Die unspezifischen Komplexe

können durch *Footprint*-Techniken nicht untersucht werden, da sie aus einer Verteilung von Spezies bestehen, die an verschiedene DNA-Orte gebunden haben.

Das Resultat der hier durchgeführten Konturlängenmessungen und der beobachtete Anstieg des durchschnittlichen Verbiegungswinkels auf $60 \pm 7^\circ$ bei unspezifischen Komplexen legt die Vermutung nahe, daß diese Komplexe eine erweiterte Interaktionsfläche haben, ähnlich der des offenen Komplex oder der RP_{c2} -Form der RNAP- σ^{70} .

3.4 Modell für den geschlossenen Komplex von RNAP- σ^{54}

Ungefähr 850 spezifische Komplexe der RNAP- σ^{54} am *glnA*-Promotor wurden auf den SFM-Bildern analysiert. Davon wurden über 400 in Flüssigkeit aufgenommen, d. h. sowohl Protein als auch DNA befanden sich während der ganzen Zeit der Präparation in ihrem nativen Hydrationszustand. Daher kann angenommen werden, daß die charakteristischen Kennzeichen der spezifischen Komplexe der RNAP- σ^{54} in Flüssigkeit besser bewahrt sind, als in anderen SFM- oder EM-Protokollen, die ein Waschen und Trocknen der Probe beinhalten. Die Analyse der RNAP- σ^{54} -DNA-Komplexe erbrachte folgende Ergebnisse: (i) Bei zwei Drittel der Komplexe befand sich das RNA-Polymerase-Holoenzym seitlich des DNA-Fragments. (ii) Das Maximum der Verteilung des Verbiegungswinkels lag bei etwa 30° . (iii) Für 70 % der Komplexe zeigte die DNA-Verbiegung von der Polymerase weg und nur in 30 % der Komplexe war die DNA um das Protein gebogen. (iv) Die Verkürzung der gemessenen Konturlänge von 6 nm gegenüber der freien DNA war relativ gering.

Bei der Bindung der Komplexe an die Glimmroberfläche wird ihre dreidimensionale Konformation in eine zweidimensionale überführt. Informationen der Molekülausrichtung in der dritten Dimension gehen somit verloren. Gleichzeitig spiegeln die erhaltenen Bilder verschiedene Arten der Komplexbindung an die Oberfläche wider. Selbst unter der Annahme, daß die spezifischen Komplexe frei in Lösung nur eine einzige Konformation einnehmen, würde man unterschiedliche zweidimensionale SFM-Bilder für die verschiedenen asymmetrischen Kennzeichen der Struktur erwarten. Daher war es nicht überraschend, daß die SFM-Bilder eine Anzahl unterscheidbarer Konformationen zeigten (Abb. 3.10). Aus diesen Ergebnissen und Überlegungen ergab sich das in Abb. 4.2 dargestellte Modell für die Konformation der DNA im geschlossenen Komplex mit RNAP- σ^{54} . Die strukturellen Kennzeichen, die in den meisten SFM-Bildern beobachtet wurden, sind darin verarbeitet. Diese waren die laterale Position der

Polymerase im Hinblick auf die DNA und der relativ geringe Verbiegungswinkel von etwa 30° , wobei die DNA vom Protein weg zeigt. Zusätzlich ließ die Konturlängenverkürzung von nur 6 nm eine Umwicklung der Polymerase durch die DNA nicht zu. Wäre dies der Fall, müßte eine stärkere scheinbare Verkürzung der DNA-Konturlänge von 20 bis 30 nm erkennbar sein. Dies würde dann gleichzeitig einem ausgedehnteren Protein-DNA-Kontakt entsprechen, der im Widerspruch zu den *Footprint*-Untersuchungen von spezifischen Komplexen mit 10 nm oder 32 bp stehen würden (Popham *et al.*, 1989; Tintut *et al.*, 1994).

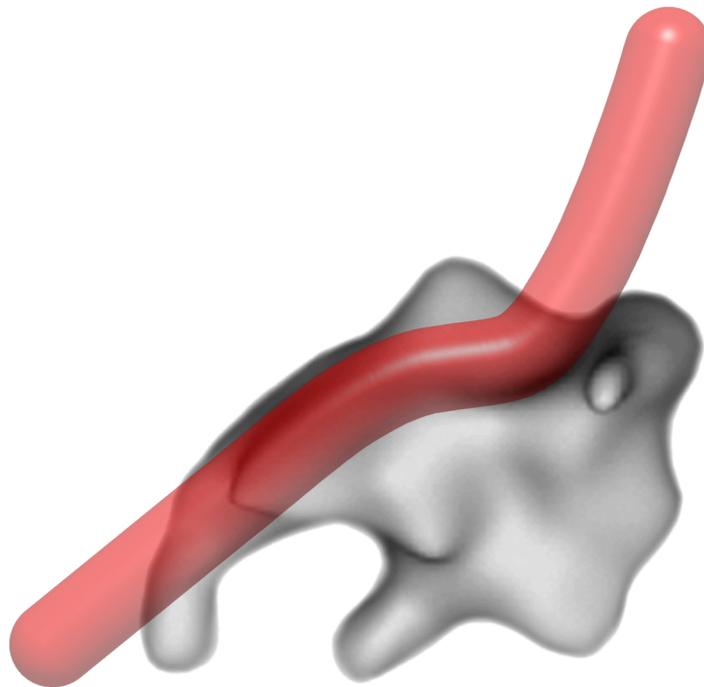


Abb. 4.2 Modell des geschlossenen Komplexes der RNAP- σ^{54}

Der Verlauf der Promotor-DNA, der aus den Ergebnissen der SFM-Untersuchungen in Flüssigkeit hervorgeht, wird dargestellt. Für die Struktur des RNA-Polymerase-Holoenzym wurde die Struktur der *E. coli* RNAP- σ^{70} aus Polyakov *et al.* (1995, Abb. 5c) verwendet. Das Holoenzym besitzt eine ungefähre Größe von $10 \times 10 \times 16$ nm. Die DNA wird als transparenter Schlauch dargestellt. Die angenommene Interaktion der DNA mit der RNA-Polymerase von oben durch die Vertiefung am oberen Teil der fingerähnlichen Struktur stimmt mit einer Abdeckung der DNA von ca. 10 nm überein, wie durch *Footprinting* gezeigt wurde (Popham *et al.*, 1989; Tintut *et al.*, 1994).

Für RNAP- σ^{54} und die Konformation der DNA in einem Komplex mit diesem Protein liegen bisher keine Strukturdaten vor. Deshalb wurde in Abb. 4.2 die RNA-Polymerasestruktur von *E. coli* RNAP- σ^{70} -Holoenzym verwendet, die aus elektronenmikroskopischen Untersuchungen negativ gefärbter, zweidimensionaler Kristalle mit einer Auflösung von ≈ 28 Å abgeleitet ist (Darst *et al.*, 1989). Es besteht also die Möglichkeit, daß es zwischen den Strukturen der

beiden Holoenzyme signifikante Unterschiede gibt. Das Modell soll zeigen, wie sich aus den hier gewonnenen Ergebnissen der SFM-Untersuchungen eine Konformation des geschlossenen Komplexes ergibt. Andere Modelle, die eine Umwicklung der Polymerase durch die DNA nahelegen, wurden für die Konformation der DNA im spezifischen Komplex mit RNAP· σ^{70} in der RP_{c1} - und RP_{c2} -Form vorgeschlagen (z. B. Abb. 6 aus Polyakov *et al.*, 1995). Sie basieren hauptsächlich auf topologischen Untersuchungen von *E. coli* RNAP· σ^{70} am *L8UV5*-Lactose-Promotor, der eine topologische Entwindung von 1.3 bis 1.7 helikalen Windungen ohne erkennbare Strangseparierung zeigte. Diese beobachtete Entwindung wurde der Bildung einer geschlossenen Komplexform zugeordnet, bei der die DNA um die Polymerase gewunden ist (Amouyal & Buc, 1987). Diese Experimente wurden bei 37 °C durchgeführt, und es ist schwierig einzuschätzen, ob die Konformation der RNA-Polymerase an nicht-separierter Promotor-DNA der RP_{c1} - oder RP_{c2} -Konformation entspricht, oder ob eine Mischung aus beiden vorlag. Da, wie oben beschrieben, beide Formen ein anderes *Footprint*-Muster haben, ist dies ein entscheidender Punkt für die Interpretation der Daten. Obwohl es verschiedene Hinweise gibt, daß die DNA teilweise in der RP_{c2} - und RP_{σ} -Konformation um die Polymerase gewunden ist, könnte dies für die RP_{c1} -Form anders sein. Im Hinblick auf die maximale Ausdehnung von 16 nm (Darst *et al.*, 1989) oder 25(±2) nm (Heumann *et al.*, 1988) für RNAP· σ^{70} und einen *Footprint* von 17 nm, scheint es möglich, daß nur geringe oder gar keine Umwicklung der Polymerase durch die DNA in der RP_{c1} -Konformation besteht. Der *Footprint* für die spezifischen Komplexe mit RNAP· σ^{54} beträgt nur 10 nm der Promotor-DNA. Auf der Basis der hier dargestellten Ergebnisse sollte die Struktur der RNAP· σ^{54} im geschlossenen Komplex eher dem Modell in Abb. 4.2 ähnlich sein.

4. Transkriptionsexperimente

Im Gegensatz zu RNAP· σ^{70} bildet RNAP· σ^{54} einen stabilen geschlossenen Komplex am *glnA*-Promotor, so daß die getrennte Untersuchung von Promotorerkennung und Transkriptionsaktivierung möglich ist (Sasse-Dwight & Gralla, 1990). Die Transkriptionskinetiken liefen nach dem in Abb. 4.3 dargestellten Schema ab. Das prokaryotische Modellsystem bestand aus der DNA-Matrize mit Promotorsequenz, der RNAP· σ^{54} und dem Aktivatorprotein NtrC. Die Phosphorylierung von NtrC, die *in vivo* durch NtrB vermittelt wird, konnte hier mit dem che-

mischen Agens Carbamylphosphat durchgeführt werden (Feng *et al.*, 1992). Die Zugabe von ATP zu einem Bindungsansatz startet die Reaktion. In Abständen von 10 Sekunden wurden Aliquots des Bindungsansatzes zu Aliquots eines RNA-Elongationsansatzes mit Nukleotiden gegeben. Nach 10 Minuten wurde die Reaktion gestoppt. Durch diese Kinetik wurde die Rate der Bildung der offenen Komplexe gemessen.

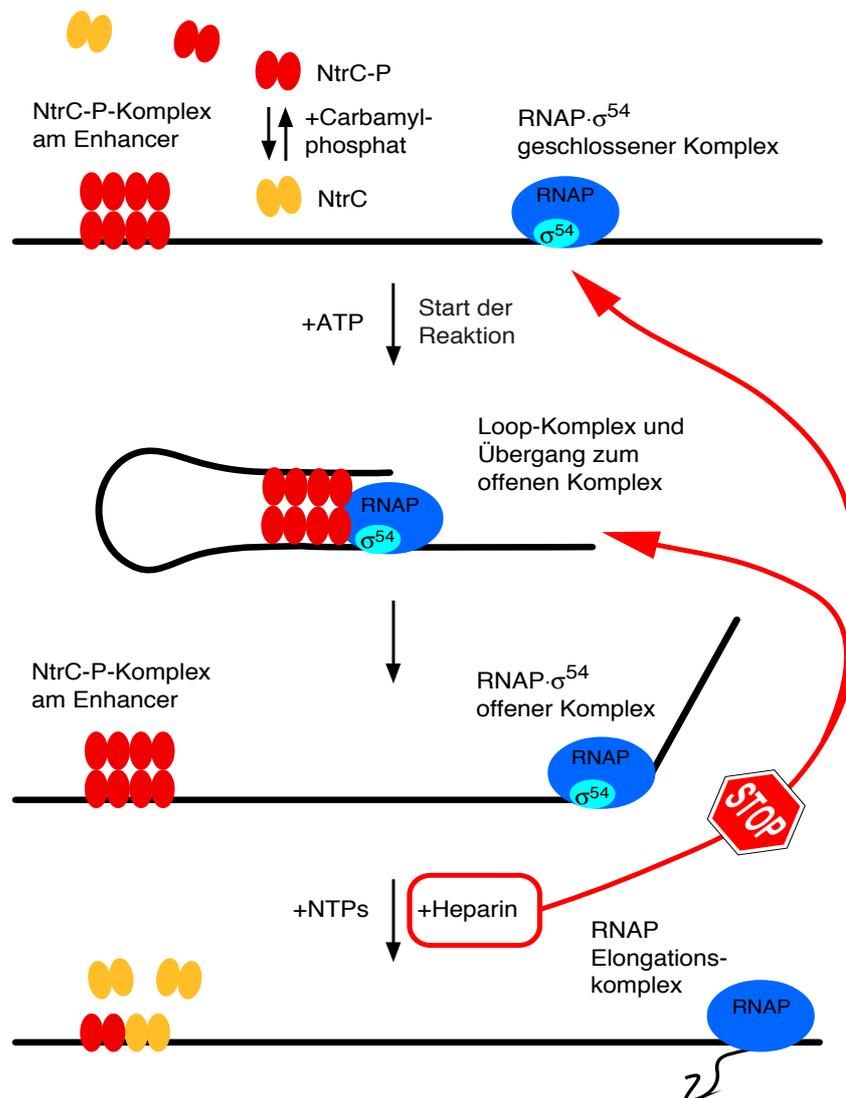


Abb. 4.3 Schematische Darstellung des Ablaufs der *in vitro*-Transkriptionsreaktion. Das durch den chemischen Phosphodonor Carbamylphosphat (Feng *et al.*, 1992) phosphorylierte NtrC bildet einen Oktamerkomplex am Enhancer. Die RNAP- σ^{54} bindet im geschlossenen Komplex an den Promotor. Durch ATP-Hydrolyse kommt es zur Loop-Bildung und dann zum Übergang vom geschlossenen in den offenen Komplex. Die Transkription kann nach Zugabe von Nukleotiden starten und RNA wird synthetisiert. Mit den Nukleotiden wird auch Heparin zur Reaktion gegeben. Es zerstört geschlossene Komplexe und verhindert die Bindung der RNAP- σ^{54} an die DNA. Daher kann in diesem Reaktionsansatz zum Zeitpunkt der Heparinzugabe nur bei schon offenen Komplexen die Transkription einmal ablaufen (*“single round transcription assay”*).

In Versuchen zur Transkriptionsaktivierung von NtrC im Zusammenhang mit IHF (*integration host factor*) (Claverie-Martin & Magasanik, 1992) oder einem Vergleich verschiedener Promotoren auf linearen und superhelikalen DNA-Matrizen (Carmona & Magasanik, 1996), wurde ATP für 20 Minuten zum Ansatz gegeben. Innerhalb dieses Zeitraums entsteht ein Gleichgewicht geschlossener und offener Komplexe. Es kann daher in diesen Studien nur eine Aussage über den Anteil offener Komplexe im Gleichgewichtszustand gemacht werden und nicht über die Kinetik der Reaktion, wie sie in der vorliegenden Arbeit gemessen wurde.

Die Verwendung von Heparin ermöglicht die Durchführung einer "single round transcription", bei der die DNA-Matrize nur einmal abgelesen wird. Heparin ist ein Polyanion, das die Transkription verhindert, indem es die Bindung der Polymerase an die DNA kompetitiv inhibiert. Wird es, wie in Abb. 4.3 gezeigt, nach der Bildung der offenen Komplexe mit den Nukleotiden zum Reaktionsansatz gegeben, werden die vorhandenen Komplexe nur einmal transkribiert. Neue Komplexe können sich nicht bilden und geschlossene Komplexe werden zerstört.

4.1 Transkriptionsplasmide

Das Plasmid pTH8 besitzt die *in vivo*-Sequenz des *glnA*-Promotors: Strangaufwärts vom *glnA*-Promotor befinden sich erst drei schwache (-94 bis -81, -73 bis -60 und -53 bis -37) und anschließend zwei starke (-148 bis -132 und -116 bis -100) NtrC-Bindungsstellen (Hunt & Magasanik, 1985). Der Abstand zwischen der Mitte des Promotors und der Mitte zwischen den beiden starken Bindungsstellen (Enhancer) beträgt 109 bp. Die gleiche Entfernung zwischen Enhancer und Promotor gibt es auch bei Plasmid pVW7 (Weiss *et al.*, 1992). Allerdings besitzt pVW7 nur die zwei starken NtrC-Bindungsstellen an Position -148 bis -132 und -116 bis -100 vom Transkriptionsstart entfernt. Die Sequenz bis zum Promotor ist eine Zufallssequenz. Das Plasmid pVW7 war das Ausgangsplasmid der in dieser Arbeit konstruierten Transkriptionsplasmide, die alle eine intrinsisch gekrümmte DNA-Sequenz besitzen (Abb. 4.4). Sie unterscheiden sich in Hinblick auf die Position der Krümmung und den Abstand zwischen Enhancer und Promotor.

Eine Analyse der gekrümmten DNA-Fragmente, die aus einer *PstI*-Restriktionsspaltung der Plasmide gewonnen wurden, zeigte die erwartete Gelanomalie. Fragmente, bei denen die Krümmung zentral zwischen Enhancer und Promotor liegt, liefen im nativen 8%igen Poly-

acrylamidgel deutlich langsamer als es ihrer Länge entsprechen würde. Hingegen zeigten die Fragmente mit einer Krümmung weiter zu einem Ende hin eine schwächere Gelanomalie. Das Laufverhalten im Gel wurde durch den k -Faktor ausgedrückt (Tab. 3.7; Diekmann & Langowski, 1995). Dieser war für Fragmente aus Plasmiden mit einer symmetrischen Anordnung von Enhancer und Promotor ≥ 1.35 , während der Wert für eine asymmetrische Anordnung zwischen 0.91 und 1.29 lag. Diese Ergebnisse zeigen, daß die drei A5/A6-Blöcke des Oligonukleotid-Duplexes AS5-AS6, die in Phase mit der Helixachse angeordnet sind, wie erwartet eine Konformation mit starker intrinsischer Krümmung einnahmen (Abb. 4.4).

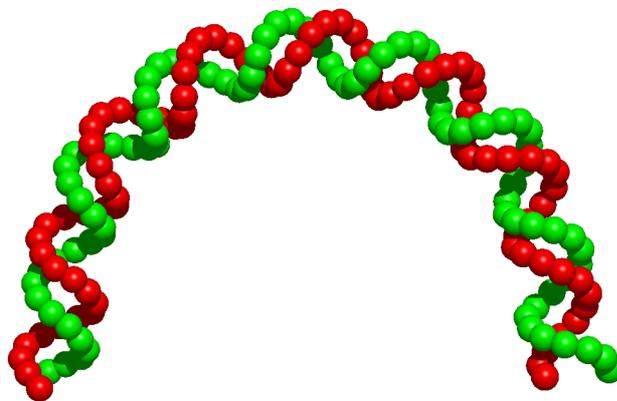


Abb. 4.4 Gekrümmtes Oligonukleotid-Duplex AS5-AS6

Die Krümmung des Oligonukleotid-Duplex wurde nach dem Algorithmus von Bolshoy (Bolshoy *et al.*, 1991) berechnet. Das Phosphatrückgrat wurde mit dem Programm POV-Ray PPC 3.01 visualisiert. Diese Sequenz befindet sich in den neu konstruierten Transkriptionsplasmiden an verschiedenen Stellen zwischen Enhancer und Promotor.

4.2 Transkriptionskinetiken superhelikaler und linearisierter Plasmide

In dem hier untersuchten prokaryotischen System erfordert die Initiation der Transkription die Wechselwirkung zweier Proteinkomplexe. Die Wahrscheinlichkeit dieser Interaktion läßt sich als lokale Konzentration j_M von NtrC am Enhancer in der Umgebung der RNAP- σ^{54} am Promotor ausdrücken. Für den Wert von j_M in Abhängigkeit der DNA-Konformation liegen verschiedene theoretische Untersuchungen für lineare (Rippe *et al.*, 1995; Merlitz *et al.*, 1998) und superhelikale DNA vor (Vologodskii *et al.*, 1992; Klenin *et al.*, 1995). Durch die Transkriptionskinetiken sollte der Einfluß einer eingefügten intrinsischen Krümmung auf die Aktivierung der Transkription untersucht und der Zusammenhang zwischen den experimentellen Daten und den berechneten lokalen Konzentrationen hergestellt werden.

Tab. 4.1 Vergleich der berechneten lokalen Konzentration mit ausgewählten Plasmiden

DNA Konformation	~200 bp		~500 bp		~1000 bp	
	j_{rel}^a (j_M (M))	Aktivierungsrate	j_{rel}^a (j_M (M))	Aktivierungsrate	j_{rel}^a (j_M (M))	Aktivierungsrate
linear	0.01 ($1 \cdot 10^{-8}$)	<0.01 pVW7/ <i>EcoRI</i>	0.10 ($1 \cdot 10^{-7}$)	–	0.08 ($8 \cdot 10^{-8}$)	–
linear mit zentraler Krümmung	3 ($3 \cdot 10^{-6}$)	0.18 ± 0.04 pCS119-119/ <i>EcoRI</i>	0.40 ($4 \cdot 10^{-7}$)	0.12 ± 0.02 pCS261-202/ <i>EcoRI</i>	0.10 ($1 \cdot 10^{-7}$)	–
superhelikal	1 ($1 \cdot 10^{-6}$)	1.00 ± 0.30 pVW7	5 ($5 \cdot 10^{-6}$)	–	5 ($5 \cdot 10^{-6}$)	–
superhelikal mit zentraler Krümmung	100 ($1 \cdot 10^{-4}$)	1.54 ± 0.39 pCS119-119	70 ($7 \cdot 10^{-5}$)	1.18 ± 0.36 pCS293-293	40 ($4 \cdot 10^{-5}$)	1.52 ± 0.47 pCS456-451
superhelikal mit nicht zentraler Krümmung	–	–	1 ($1 \cdot 10^{-6}$)	1.11 ± 0.34 pCA455-66	–	1.45 ± 0.57 pCA728-66

^a j_{rel} ist die relative lokale Konzentration. Der Wert von j_M wurde zum besseren Vergleich so skaliert, daß $j_M = 1 \cdot 10^{-6}$ M einem Wert von $j_{rel} = 1$ entspricht.

Als Ausgangspunkt diente die Annahme, daß eine erhöhte lokale Konzentration auch eine erhöhte Aktivierungsrate der Transkription ergibt. Die nach dem in Abb. 4.3 schematisch dargestellten Ablauf durchgeführten Transkriptionskinetiken ließen sich bis auf wenige Ausnahmen gut auswerten. In Tab. 4.1 sind berechnete lokale Konzentrationen und Aktivierungsraten repräsentativer Plasmide zusammengefaßt.

Vergleich superhelikaler und linearisierter Plasmide

Beim Vergleich von superhelikalen und linearisierten Plasmiden ist generell aus zwei Gründen durch Superhelizität eine Erhöhung der Transkriptionsrate zu erwarten: (i) Im Gegensatz zu linearer DNA werden bei superhelikalen Matrizen die beiden miteinander wechselwirkenden Orte räumlich besser angenähert, wodurch die lokale Konzentration erhöht wird. Diese Vorhersage ergibt sich aus numerischen Simulationen (Tab. 4.1; Klenin *et al.*, 1995; Rippe *et al.*, 1995; Merlitz *et al.*, 1998). (ii) Außerdem ist bekannt, daß Superhelizität die Regulation von Genen und *in vitro*-Transkription beeinflussen kann, indem sie das Aufschmelzen des Promotors erleichtert (Drew *et al.*, 1985; Pruss & Drlica, 1989). Dieser Einfluß ist bei linearer DNA

nicht gegeben und macht den direkten Vergleich von superhelikalen und linearen Matrizen daher problematisch. Für den hier verwendeten *glnA*-Promotor konnte jedoch gezeigt werden, daß er im Gegensatz zum *nifL*-Promotor relativ unabhängig von der Superhelixdichte ist (Ninfa *et al.*, 1987; Dixon *et al.*, 1988; Whitehall *et al.*, 1992). Relaxierte Plasmide zeigten gegenüber superhelikalen ähnliche Aktivierung. Somit ist die Superhelizität in diesem Fall nicht direkt für das Aufschmelzen dieses Promotors verantwortlich, sondern der dominierende Effekt ist die Erhöhung der lokalen Konzentration der beteiligten Proteine. Unter dieser Voraussetzung lassen sich die linearisierten und superhelikalen Plasmide in Bezug auf die Kontaktwahrscheinlichkeit miteinander vergleichen.

Für die linearisierte und superhelikale Form der Plasmide pVW7, pTH8, pCS119-119 und pCS261-202 zeigte sich wie erwartet eine deutliche Erhöhung der Aktivierungsrate für die superhelikalen Plasmide (Tab. 3.10, Tab. 4.1). Allerdings war die durch die Transkriptionsexperimente gemessene Erhöhung nicht so groß, wie es der berechneten lokalen Konzentration entsprechen würde. Nur Plasmid pVW7 zeigte eine Erhöhung um mindestens den Faktor 100, gegenüber einem berechneten Wert von ~ 100 . Für Plasmid pCS119-119 ergab sich entgegen der erwarteten 20fachen Erhöhung der lokalen Konzentration nur eine Zunahme der Aktivierungsrate um den Faktor 9. Bei diesem Plasmid nimmt die Ausbildung der Superhelix nicht so starken Einfluß auf die Aktivierungsrate, da die lokale Konzentration der linearen Matrize durch die Krümmung schon relativ hoch ist. Für pTH8 wurde eine Erhöhung um den Faktor 22 gemessen. In einer Untersuchung von Carmona und Magasanik (1996), in der sich die offenen Komplexe aufgrund der Versuchsanordnung im Gleichgewichtszustand befanden, wurde ein Faktor 7 bestimmt. Das Plasmid pTH8 besitzt die *in vivo*-Anordnung der NtrC-Bindungsstellen. Neben den zwei starken Bindungsstellen, in einer Entfernung von -148 bis -132 und -116 bis -100, gibt es noch drei schwache Bindungsstellen (-94 bis -81, -73 bis -60 und -53 bis -37) (Hunt & Magasanik, 1985). NtrC bindet als Oktamerkomplex an die beiden starken Bindungsstellen. Dieser Komplex könnte stabilisiert werden, indem die zwei der Polymerase näher gelegenen schwachen Bindungsstellen von der anderen Seite an die NtrC-Proteine binden. Es würde sich eine ähnliche Anordnung ergeben, wie sie aus den Untersuchungen der Assoziationszustände des NtrC mittels analytischer Ultrazentrifuge bekannt und in Abb. 4.1 dargestellt sind (Rippe *et al.*, 1998). Für Plasmid pCS261-202 ergab sich eine Erhöhung von 63 (erwartet 175). Es besitzt eine fast zentrale Krümmung und einen Abstand zwischen Enhancer und Promotor von 463 Basenpaaren. Im Fall der linearisierten Form wurde nur eine geringe Aktivie-

rungsrate gemessen, während dieses Plasmid in der superhelikalen Form die größte Aktivierungsrate aller untersuchten Plasmide besaß. Da durch die Krümmungsanalyse keine weiteren Krümmungen gefunden wurde, hat hierbei die Sequenz wahrscheinlich einen entscheidenden Einfluß.

Vergleich linearer DNA mit und ohne Krümmung

Eine weitere Übereinstimmung zwischen Simulationen und Transkriptionsversuchen fand sich für den Vergleich von linearer DNA mit und ohne Krümmung. Für lineare DNA-Fragmente konnte in Simulationen gezeigt werden, daß durch Einfügen einer Krümmung gegenüber ungekrümmter DNA die lokale Konzentration mit zunehmendem Abstand von $1 \cdot 10^{-8}$ M auf $1 \cdot 10^{-7}$ M steigt (Tab. 4.1; Rippe *et al.*, 1995; Merlitz *et al.*, 1998). Die entsprechenden Aktivierungsraten zeigten ebenfalls eine Erhöhung bei Einfügen einer zentralen Krümmung von <0.01 auf 0.18 ± 0.04 , die bei zunehmendem Abstand etwas abfiel (0.12 ± 0.02). Somit wird deutlich, daß bei linearer DNA eine Krümmung einen positiven Einfluß hat, der bei einer zentralen Krümmung (pCS119-119/*EcoRI*: 0.18 ± 0.04) wie erwartet stärker ist als bei einer weniger zentralen Krümmung (pCS261-202/*EcoRI*: 0.12 ± 0.02). Die Krümmung kann auch durch ein Protein wie z. B. IHF (*integration host factor*) induziert werden (Carmona & Magasanik, 1996). Entgegen den Aussagen von Carmona *et al.* (1997) konnte für pTH8 in einer Untersuchung zur Gelanomalie keine signifikante intrinsische Krümmung zwischen Enhancer und Promotor detektiert werden ($k = 1.05$). Trotzdem zeigte pTH8 sowohl in der linearisierten wie in der superhelikalen Form stets eine höhere Aktivierungsrate als pVW7. Dies könnte an der bereits erwähnten nativen Anordnung des *glnA*-Promotors und der fünf NtrC-Bindungsstellen (drei schwache und zwei starke) von pTH8 liegen. Nach Bindung von NtrC an die beiden starken Bindungsstellen könnte der Komplex durch die schwachen Bindungsstellen zusätzlich stabilisiert werden, was die Aktivierung erleichtert und die Rate erhöhen würde. Carmona *et al.* (1997) haben in ihren Untersuchungen die angebliche Krümmungssequenz ersetzt, um ihre Bedeutung zu zeigen. Dabei wurde jedoch die Konsensussequenz der vierten NtrC-Bindungsstelle geändert. Daher kann durch diese Experimente eine biologische Funktion der schwachen Bindungsstellen nicht ausgeschlossen werden.

Vergleich superhelikaler Plasmide mit und ohne Krümmung

Für die superhelikalen Plasmide ergaben sich im Vergleich der numerischen Simulationen und der Transkriptionsexperimente unterschiedliche Ergebnisse. Die Simulationen zeigen bei Ein-

fügen einer zentralen Krümmung zwischen den beiden DNA-Orten eine steigende lokale Konzentration (Klenin *et al.*, 1995), während sie bei einer nicht zentralen Krümmung leicht absinkt (für ca. 500 bp von $7 \cdot 10^{-5}$ M auf $1 \cdot 10^{-6}$ M). Die intrinsische Krümmung sollte sich bevorzugt in der Endschleife eines Plasmids befinden, da dort die energetisch günstigste Position ist (Laundon & Griffith, 1988; Klenin *et al.*, 1995; Wedemann *et al.*, 1998; Pfannschmidt & Langowski, 1998). Dadurch wird die thermische Fluktuation minimiert und eine gewisse strukturelle Ordnung erreicht (Kremer *et al.*, 1993; Diekmann & Langowski, 1995). Sind zwei DNA-Orte symmetrisch im Hinblick auf die Krümmung angeordnet, sollte ihre Kontaktwahrscheinlichkeit höher sein als die von zwei Orten, die asymmetrisch zueinander liegen (Klenin *et al.*, 1995). Abbildung 4.5 zeigt typische Konformationen der Plasmide pVW7, pCA728-66 und pCS261-202 im thermodynamischen Gleichgewicht, die durch eine Brownsche Dynamik-Simulation berechnet wurden (Wedemann *et al.*, 1998).

Die Ergebnisse der Transkriptionskinetiken ergaben jedoch keine systematischen Unterschiede zwischen Plasmiden mit symmetrisch oder asymmetrisch angeordneter Krümmung. Auch innerhalb der Gruppen konnte mit zunehmendem Abstand von Enhancer und Promotor durch Einbau weiterer DNA-Fragmente keine signifikante Veränderung der Aktivierungsrate beobachtet werden.

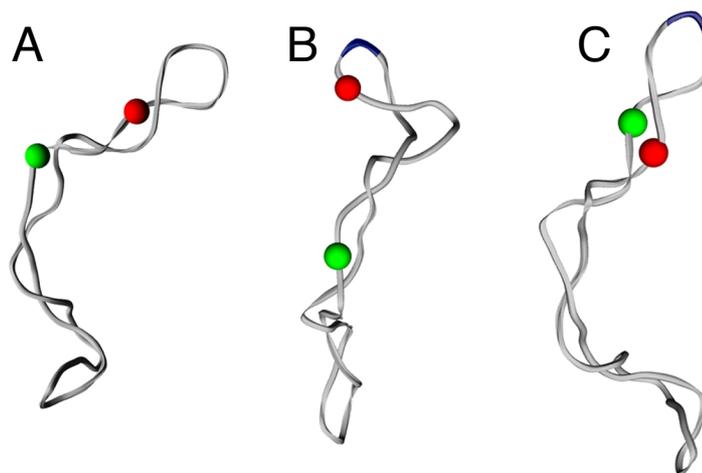


Abb. 4.5 Typische Plasmidkonformationen im thermodynamischen Gleichgewicht

Die Abbildung zeigt typische Konformationen der Plasmide (A) pVW7, (B) pCA728-66 und (C) pCS261-202 im thermodynamischen Gleichgewicht. Die Proteine am Enhancer und Promotor sind als Kugeln dargestellt, die eingefügte Krümmung als dunkler gefärbte DNA.

Für die symmetrisch angeordneten Plasmide war dies von vornherein nicht zu erwarten, da sich die beiden DNA-Orte aufgrund der strukturellen Ordnung gegenüberliegen sollten. Für die asymmetrisch angeordneten Plasmide bestand hingegen die Annahme, daß mit Zunahme des Abstands die räumliche Entfernung auf dem superhelikalen Plasmid zunimmt. Dies sollte zu einer geringeren Kontaktwahrscheinlichkeit von Enhancer und Promotor und einer Verringerung der Aktivierungsrate führen. Ein Grund für die nicht signifikant unterschiedlichen Aktivierungsraten liegt vielleicht darin, daß der jeweils erreichte j_M -Wert schon eine maximale Aktivierungsrate erlaubt, d. h. andere Schritte geschwindigkeitsbestimmend werden.

Für Plasmide *ohne Krümmung*, die ebenfalls den *glnA*-Promotor besaßen, konnte schon gezeigt werden, daß ein Abstand von ~3000 bp zwischen Enhancer und Promotor nur einen geringen Einfluß auf die Produktion des *glnA*-Genprodukts Glutaminsynthetase hat (Reitzer & Magasanik, 1986; Reitzer *et al.*, 1989). Die numerischen Simulationen ergaben ab einem Abstand von 500 bp für superhelikale Plasmide ebenfalls keine große Änderung der lokalen Konzentration für größere Entfernungen mehr.

Plasmide mit erhöhter Aktivierungsrate

Abweichend von diesem Ergebnis zeigten drei Plasmide (pTH8: 3.36 ± 1.19 , pCA461-66: 4.69 ± 1.39 und pCS261-202: 7.57 ± 1.77) eine signifikant erhöhte Aktivierungsrate gegenüber den restlichen Plasmiden. Eine Begründung für diese Tatsache kann aus den bisher vorliegenden Ergebnissen nicht hergeleitet werden. Die Position der Krümmung bei pCA461-66 und pCS261-202 und der Abstand zwischen den beiden DNA-Orten hat, wie geschildert, keinen Einfluß auf die erhöhten Aktivierungsraten. Für das Ergebnis von Plasmid pCA461-66 könnte ein anderes Merkmal superhelikaler Plasmide verantwortlich sein. Plasmid pCA461-66 unterscheidet sich von pCA455-66 laut der gegebenen Nomenklatur nur in 6 Basenpaaren, so daß "Phasing" eine Rolle spielen könnte. Ein solcher Einfluß konnte jedoch bei systematischen Untersuchungen *in vivo* von Reitzer *et al.* (1989) mit Plasmiden *ohne Krümmung* nicht festgestellt werden. Es wurde keine periodische Variation der Expression des *glnA*-Gens durch Versetzen der beiden starken Enhancer um eine halbe oder ganze Helixwindung detektiert. Außerdem ist die Sequenz zwischen Enhancer und Promotor bei beiden Plasmiden (pCA455-66 und pCA461-66) verschieden. Somit liegt die unterschiedliche Aktivierungsrate möglicherweise eher an der Sequenz zwischen Enhancer und Promotor als an der unterschiedlichen Orientierung der Bindungsstellen. Eine Begründung der erhöhten Aktivierungsrate von pTH8

liegt wahrscheinlich in der schon erwähnten nativen Anordnung mit fünf NtrC-Bindungsstellen.

Desweiteren könnte die Bindung der Polymerase an den Promotor und von NtrC an den Enhancer einer Änderung der angenommenen Organisation mit der intrinsischen Krümmung in der Endschleife ergeben. Beide Proteine verbiegen die DNA, wie hier und in anderen Untersuchungen gezeigt wurde (Révet *et al.*, 1995; Fiedler, 1996; Rippe *et al.*, 1997a). Dadurch könnte eine völlig neue räumliche Anordnung innerhalb der Plasmide entstehen, was in den Berechnungen von j_M nicht berücksichtigt wurde. Nicht nur die eingefügte intrinsische DNA-Krümmung definiert wie angenommen die Organisation der Plasmid-Konformation, sondern vielleicht die durch die Proteinbindung induzierte DNA-Verbiegung.

5. Abschließende Bemerkungen und Ausblick

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse liefern wichtige Erkenntnisse zur Transkriptionsaktivierung durch Enhancer. Da ein einfaches prokaryotisches Modellsystem mit genau definierten Proteinkomponenten verwendet wurde, konnte die Konformation des RNAP· σ^{54} -Komplexes am *glnAp2*-Promotors untersucht werden. Außerdem war eine quantitative Analyse der Transkriptionsaktivierungsrate zum Vergleich mit theoretischen Vorhersagen möglich.

Die rasterkraftmikroskopischen Untersuchungen von RNAP· σ^{54} -DNA-Komplexen zeigten, daß mit dem in dieser Arbeit entwickelten Protokoll reproduzierbar gute Bilder in Puffer zu erhalten waren. Die Ergebnisse der Messungen konnten zu einem neuen Modell zum Verlauf der DNA im geschlossenen RNAP· σ^{54} -DNA-Komplex verwendet werden. Mit zusätzlichen Untersuchungen des offenen Komplexes der RNAP· σ^{54} könnte eine Erweiterung des Modells oder die Bestätigung schon älterer Modelle erfolgen, die eine Umwicklung der Polymerase durch die DNA favorisieren. Demgegenüber zeigten Bilder von luftgetrockneten Komplexen verschiedene Artefakte. Die Untersuchungen in Puffer erweisen sich demnach besonders für biologische Makromoleküle als äußerst wichtig, da so der native Hydratationszustand erhalten bleibt. Vermutlich wird diese Beobachtung besonders für die geplante Untersuchung eukaryotischer Transkriptionskomplexe mit dem Rasterkraftmikroskop von Bedeutung sein. Diese bestehen aus Multiproteinkomplexen, die leicht zerfallen (z. B. RNAP II Holoenzym, bei dem

die Transkriptionsfaktoren TFIIB, TFIID, TFIIE und TFIIIF schon an die Polymerase gebunden sind), so daß eine möglichst schonende Probenpräparation entscheidend ist. Außerdem ist es möglich, durch Rasterkraftmikroskopie Konformationsänderungen direkt zu visualisieren, wie es z. B. schon für die direkte Beobachtung der Transkription gezeigt wurde (Kasas *et al.*, 1997). Daneben konnte die Bewegung der DNA auf dem Glimmer (Rippe *et al.*, 1997b) sowie das Entlanggleiten von Proteinen auf der DNA (van Noort *et al.*, 1998) beobachtet werden.

Die DNA wurde, wie gezeigt, sowohl von der Polymerase als auch NtrC gebogen. Zusätzlich könnten noch Komplexe von phosphoryliertem NtrC am Enhancer untersucht werden, um einerseits den DNA-Verbiegungswinkels zu bestimmen und andererseits zu visualisieren, daß der NtrC-P-Oktamerkomplex zwei DNA-Stränge binden kann. Dies wurde schon aufgrund von Untersuchungen mittels Elektronenmikroskopie (Révet *et al.*, 1995) und analytischer Ultrazentrifugation (Rippe *et al.*, 1998) vermutet.

Generell eignet sich das Rasterkraftmikroskop aufgrund Weiterentwicklung der Technik und der Arbeitsprotokolle zur Echt-Zeit-Beobachtung biologischer Vorgänge (z. B. DNA-Spaltung durch Restriktionsenzyme, Transkription). Zu beachten ist dabei, daß die zwischen Probe und Spitze wirkenden Kräfte nicht zu groß sind, damit die Probe nicht beeinflusst wird (Keller, 1998). Außerdem müssen in möglichst kurzer Zeit viele qualitativ gute Bilder an einer Stelle aufgenommen werden.

Mit Transkriptionskinetiken wurde erstmals der Einfluß einer intrinsischen Krümmung auf die Aktivierungsrate der Transkriptionsinitiation untersucht, während in vorhergehenden Versuchen nur das Gleichgewicht der Bildung des offenen Komplexes gemessen wurde (Carmona & Magasanik, 1996; Carmona *et al.*, 1997). Solche Experimente sind wichtig, um die Richtigkeit theoretischer Modelle und Vorhersagen zu testen und ein quantitatives Modell des Aktivierungsmechanismus zu entwickeln. Für die linearisierten Plasmide konnte eine Übereinstimmung mit den numerischen Simulationen gefunden werden, während es für die superhelikalen Plasmide Unterschiede gab. Weitere detaillierte Untersuchungen sollten mit Plasmid pCS261-202 erfolgen, um festzustellen, warum hier die Aktivierungsrate am höchsten war. Außerdem müßte der Einfluß der NtrC- bzw. RNAP- σ^{54} -induzierten Krümmung auf die Superhelixkonformation untersucht werden. Schließlich stellt sich noch die Frage, welche anderen Schritte in der Aktivierungsreaktion geschwindigkeitsbestimmend werden können, wenn die Erhöhung der lokalen Konzentration j_M durch eine geeignete DNA-Konformation keinen Einfluß auf die Aktivierungsrate mehr hat.

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Transkriptionsaktivierung durch einen prokaryotischen Enhancer unter DNA-Looping untersucht. Das experimentelle System bestand aus einer DNA-Sequenz mit dem *glnAp2*-Promotor, dem Aktivatorprotein NtrC und dem RNAP- σ^{54} -Holoenzym.

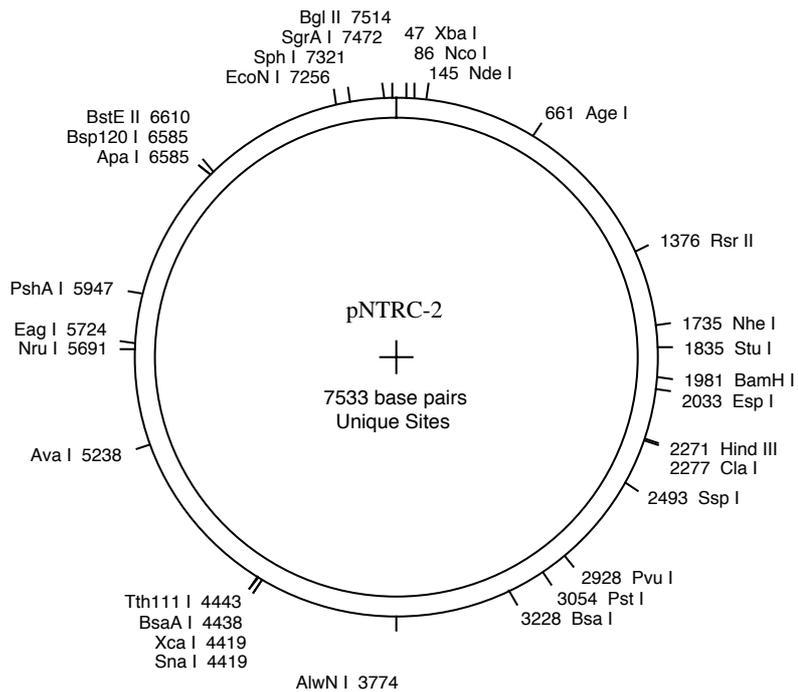
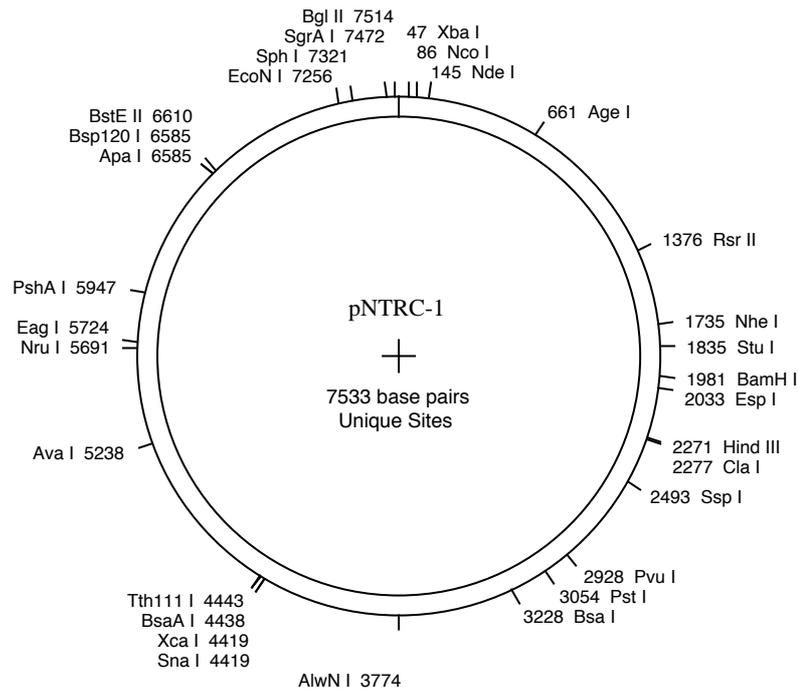
In rasterkraftmikroskopischen Untersuchungen wurde die Bindung der RNA- σ^{54} -Polymerase an den *glnAp2*-Promotor in Puffer und mit luftgetrockneten Proben beobachtet. Die Bilder wurden in Abwesenheit von NtrC aufgenommen, so daß ein Aufschmelzen der Promotor-DNA (Bildung des offenen Komplexes) nicht möglich war. Bei den Messungen in Flüssigkeit wurden die Proben nicht getrocknet und die Moleküle befanden sich in ihrem nativen Hydrationszustand. Dabei ergab sich für die spezifisch gebundene RNAP- σ^{54} (geschlossener Komplex) ein DNA-Verbiegungswinkel von $26\pm 34^\circ$. Die unspezifischen Komplexe zeigten mit $49\pm 48^\circ$ einen höheren Verbiegungswinkel und eine breitere Verteilung, was auf Unterschiede in der Konformation schließen läßt. Bei zwei Dritteln der geschlossenen Komplexe befand sich die RNA-Polymerase seitlich von der DNA, und die Verbiegung der DNA zeigte vom Protein weg. Gleichzeitig wiesen die geschlossenen Komplexe verglichen mit der freien DNA eine Verkürzung der DNA-Konturlänge von nur 6 nm in Flüssigkeit auf. Aus diesen Ergebnissen wurde ein Modell zum Verlauf der DNA im geschlossenen Komplex entwickelt, in dem die Polymerase entgegen der in anderen Arbeiten vorgeschlagenen Konformation nicht von der DNA umwickelt wird. Die Proben in Flüssigkeit wurden mit Proben verglichen, die gewaschen und getrocknet wurden. Dabei wurden zwei Artefakte festgestellt: Einerseits reduziertes Waschen der Proben die Anzahl spezifischer Komplexe am Promotor von 70 % auf 30 %. Dies könnte eine Bestätigung für die Annahme sein, daß die RNA-Polymerase auf der DNA entlanggleiten kann, was hier durch das Waschen induziert wurde. Andererseits zeigten die spezifischen Komplexe bei den getrockneten Proben eine Verkürzung der Konturlänge von 22 nm gegenüber 6 nm bei den Proben in Flüssigkeit. Bei der starken Verkürzung scheint es sich also um ein Artefakt der Trocknung zu handeln.

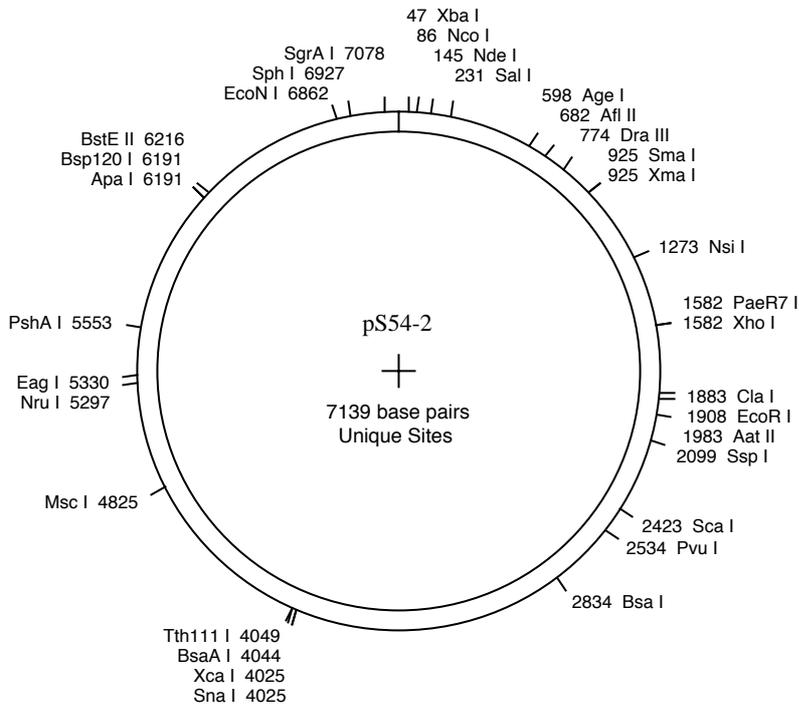
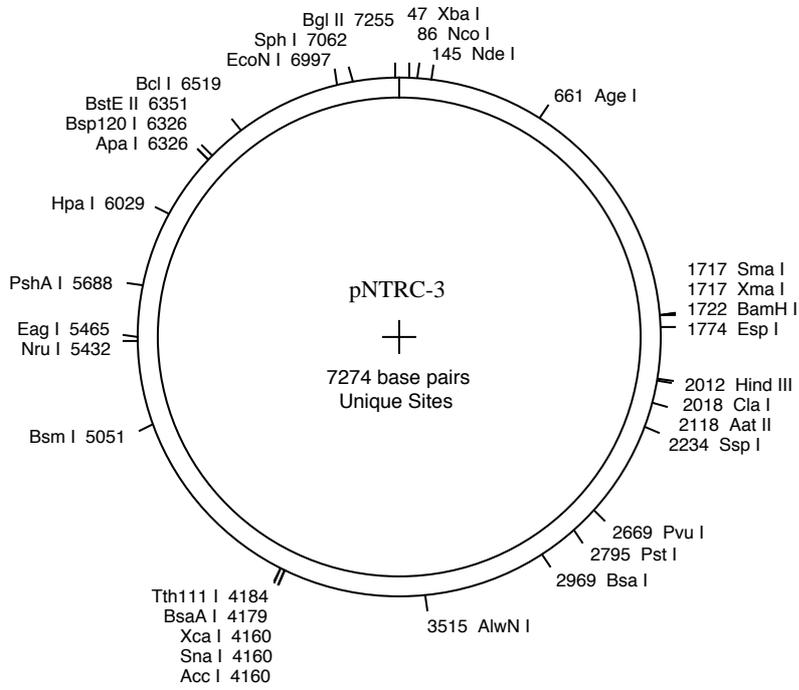
In Transkriptionsexperimenten wurde der Einfluß der DNA-Konformation auf die Aktivierungsrate der Transkription mit verschiedenen superhelikalen und linearisierten Plasmiden untersucht. Die meisten Plasmide besaßen eine intrinsische DNA-Krümmung zwischen Enhancer und Promotor. Sie unterschieden sich hinsichtlich der Position der Krümmung zwi-

schen den beiden DNA-Orten und deren Entfernung zueinander. Die Versuchsanordnung wurde so gewählt, dass nicht die DNA-Bindung der Proteine, sondern die Kinetik der Bildung des offenen Komplexes gemessen wurde. Folgende Ergebnisse wurden erzielt: (i) Für die superhelikalen Plasmide ergaben sich Transkriptionsraten, die sich bis zu einem Faktor von 10 unterschieden. (ii) Verschiedene Abstände zwischen Enhancer und Promotor hatten bei den superhelikalen Plasmiden nur einen sehr kleinen Effekt auf die Aktivierungsrate. (iii) Ein systematischer Unterschied der Aktivierungsrate für Plasmide, die die Krümmung näher am Promotor besitzen und solche, die sie näher am Enhancer haben, konnte nicht festgestellt werden. (iv) Plasmide, die sowohl in der linearisierten als auch superhelikalen Form untersucht wurden, wiesen eine 9-100fache Differenz der Aktivierungsrate auf. Da der *glnAp2*-Promotor relativ insensitive auf die superhelikale Dichte reagiert, spiegeln diese starken Unterschiede in den Aktivierungsraten wahrscheinlich die unterschiedlichen Interaktionswahrscheinlichkeiten wider und entsprachen den Vorhersagen numerischer Simulationen.

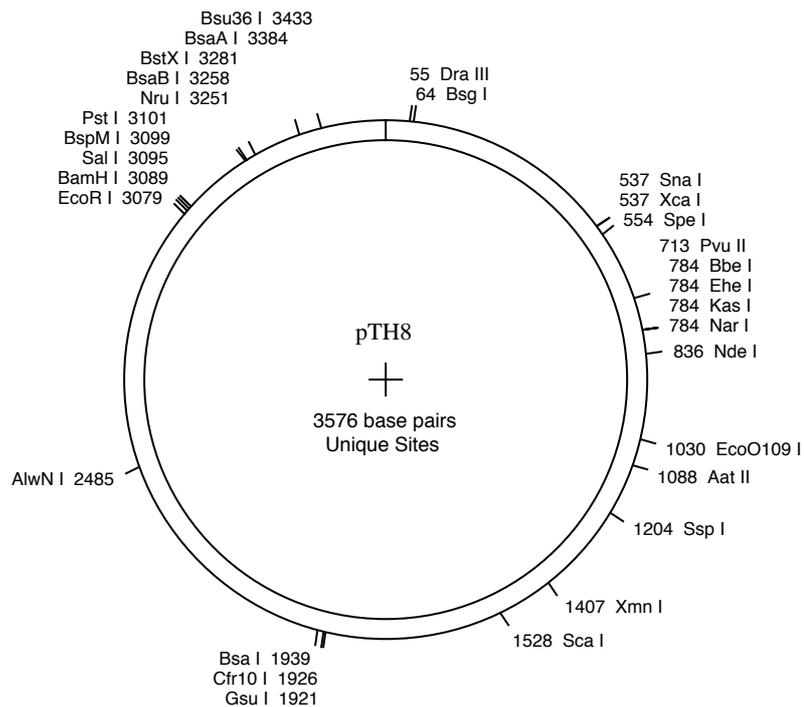
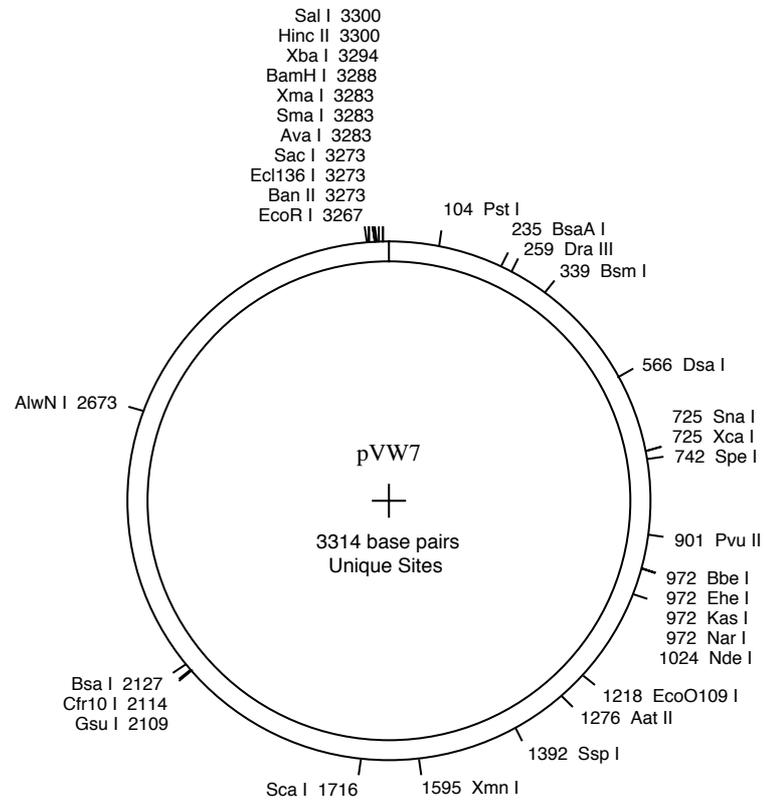
Anhang

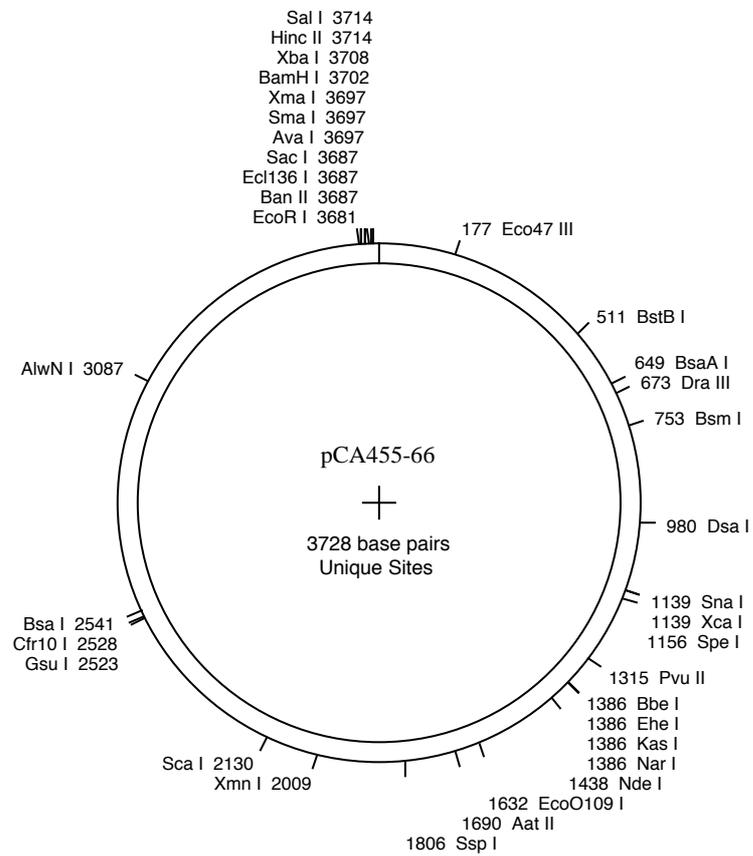
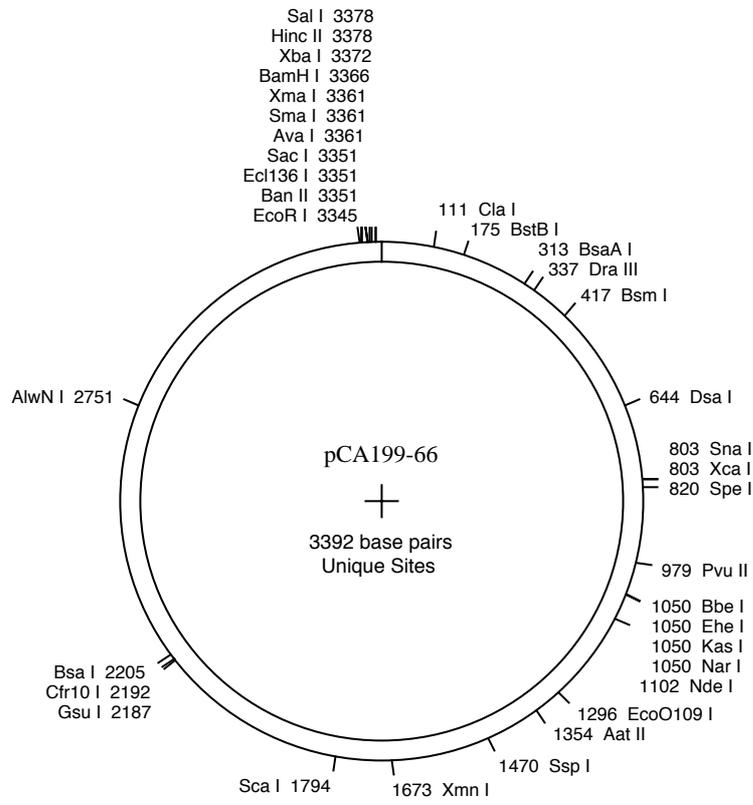
1. Plasmidkarten der Expressionsplasmide

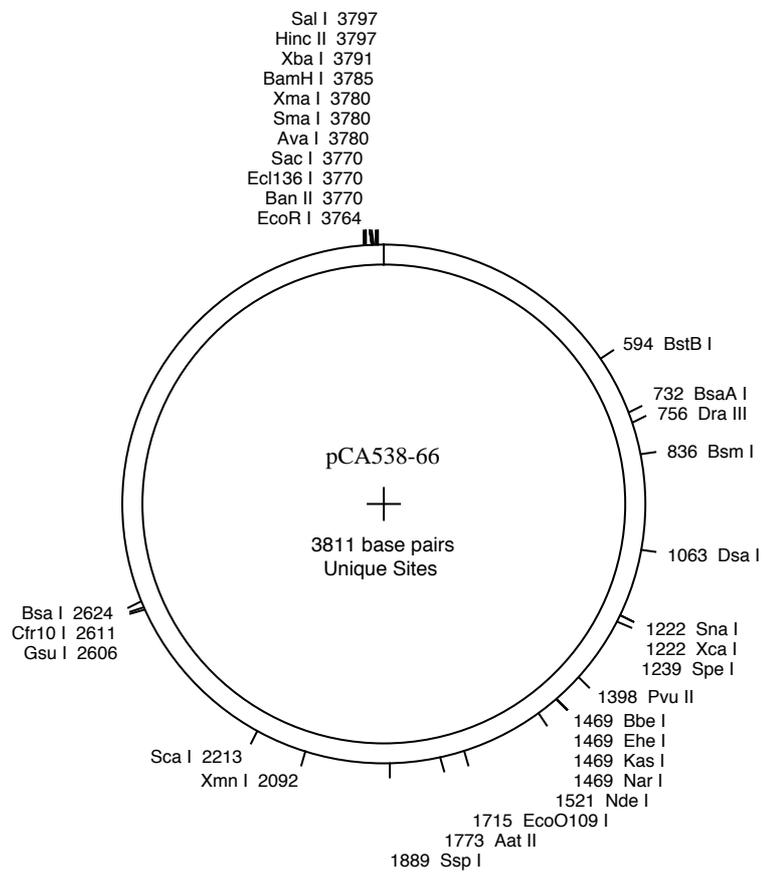
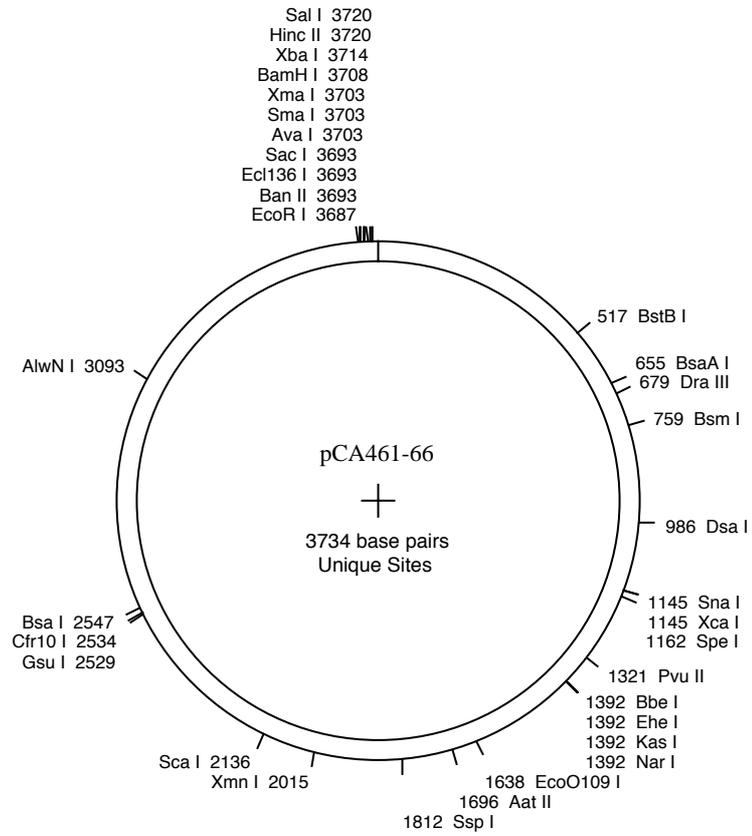


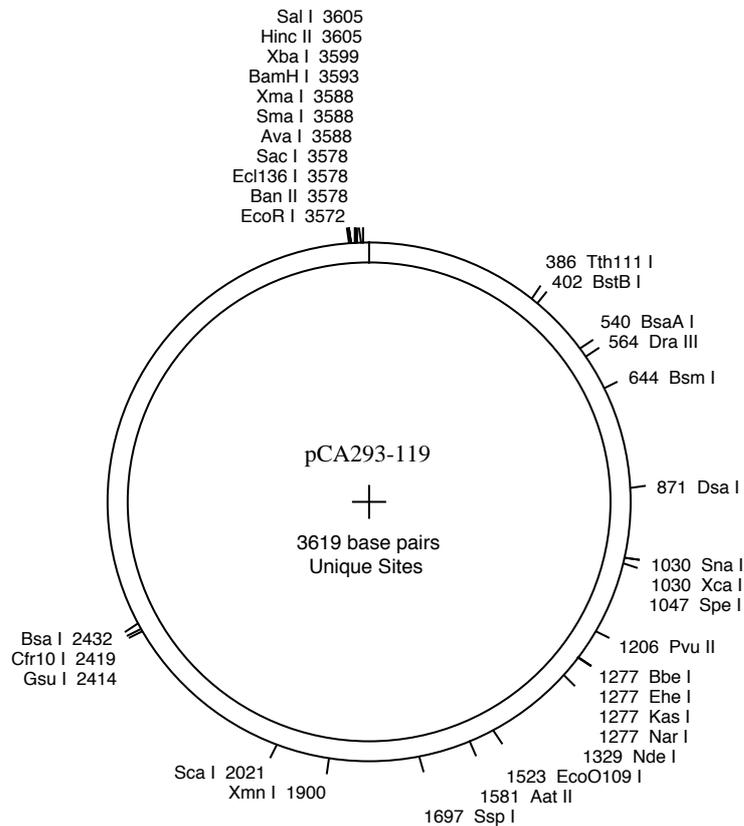
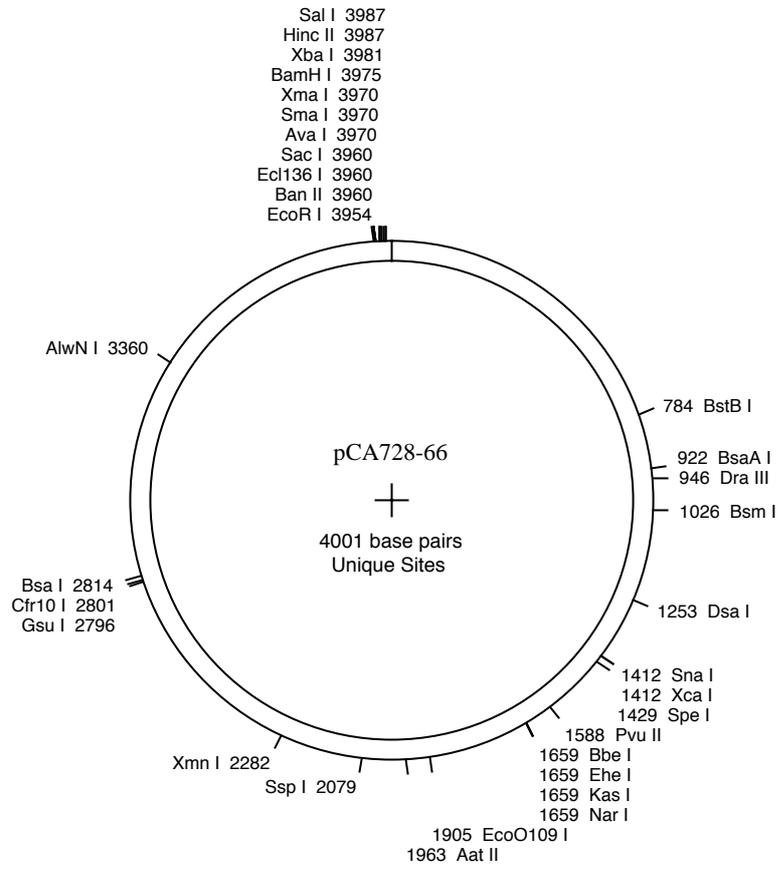


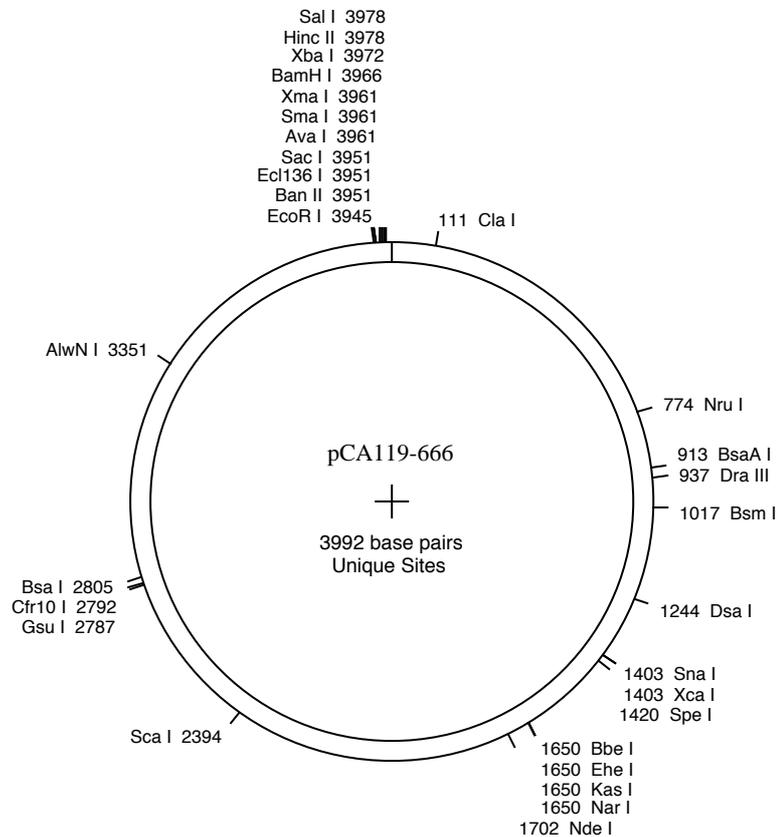
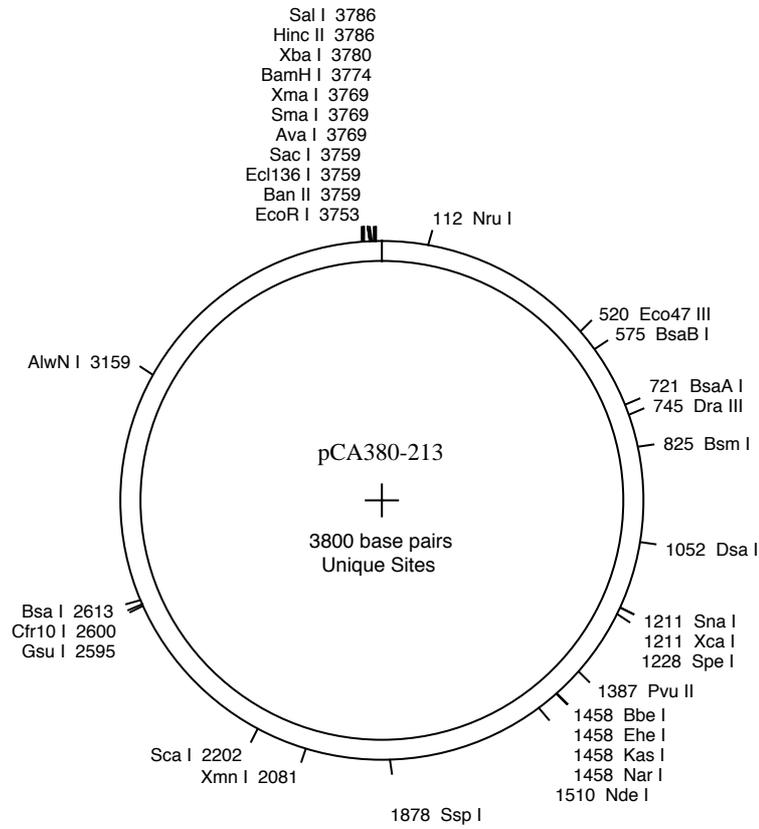
2. Plasmidkarten der Transkriptionplasmide

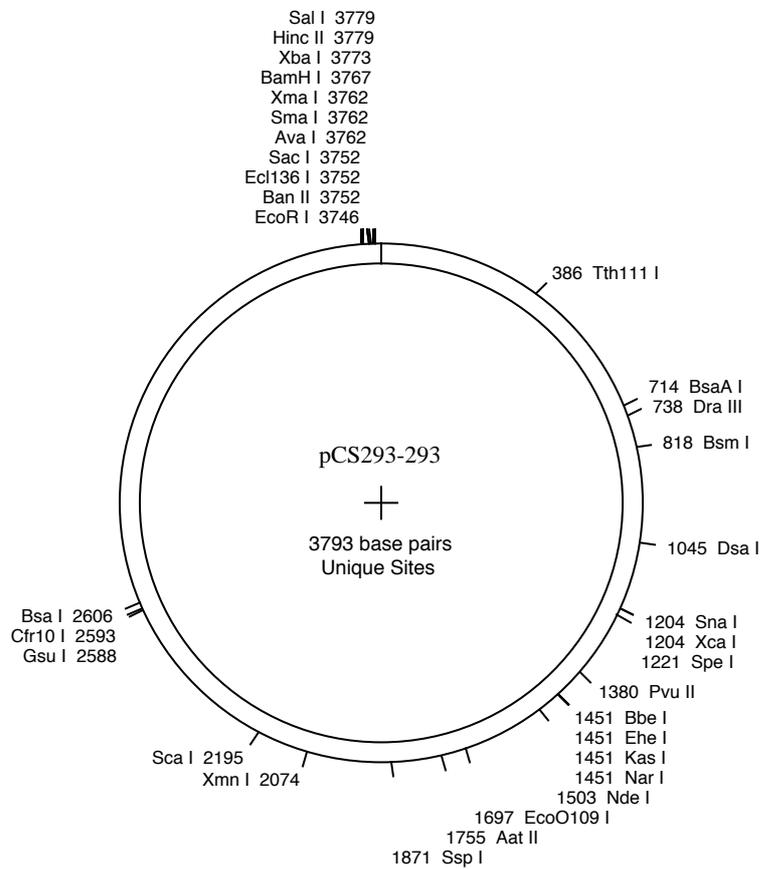
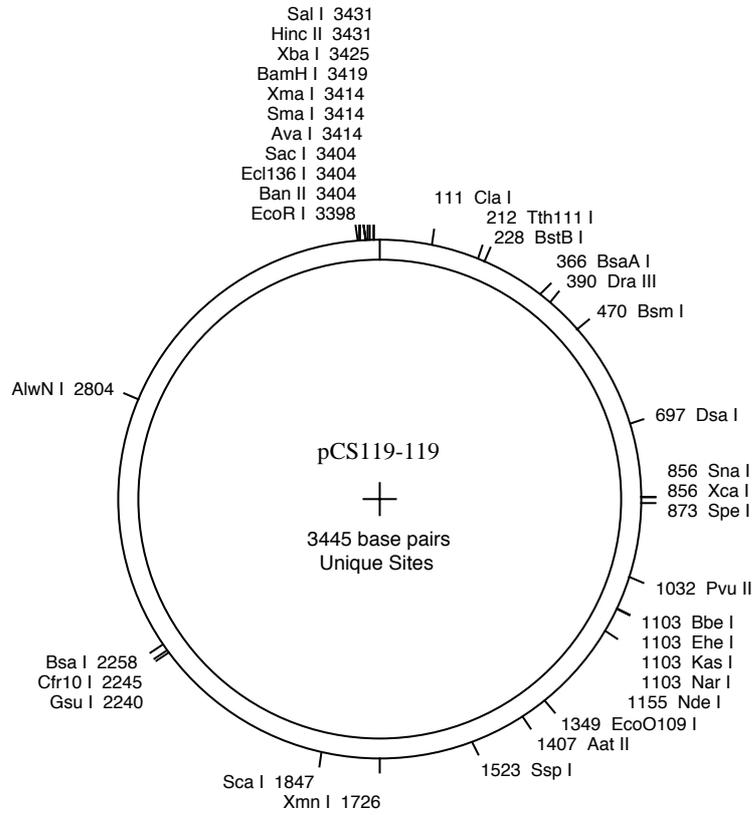


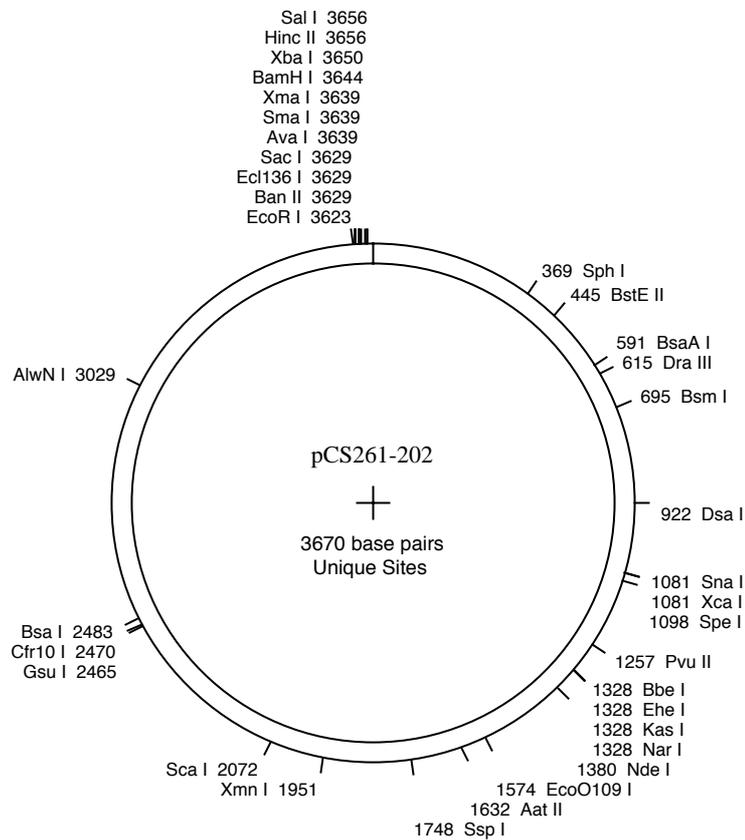
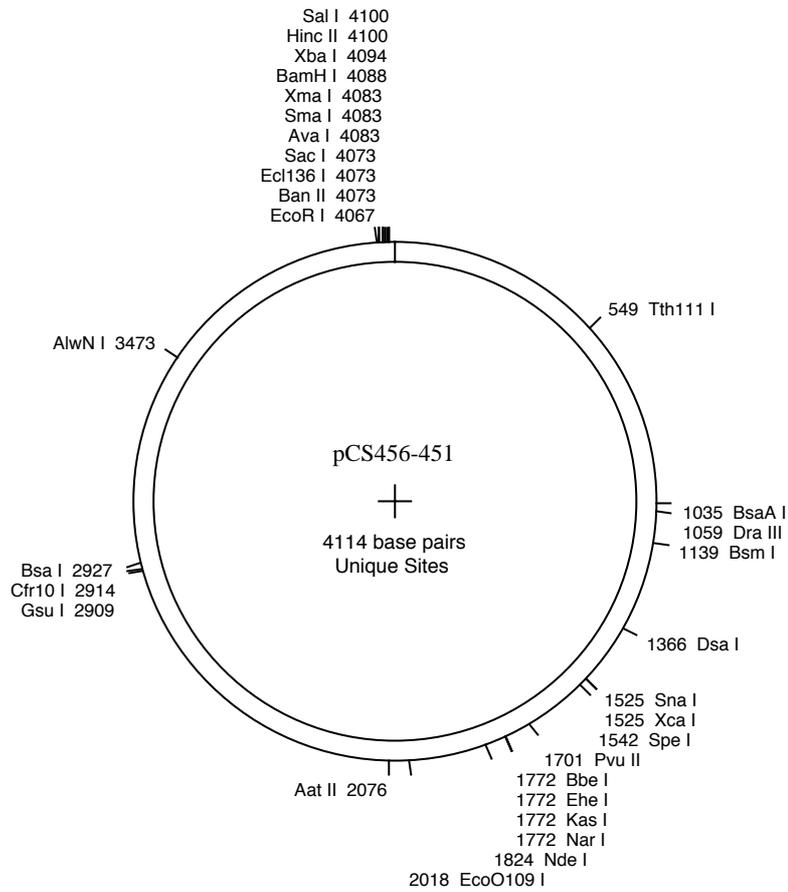


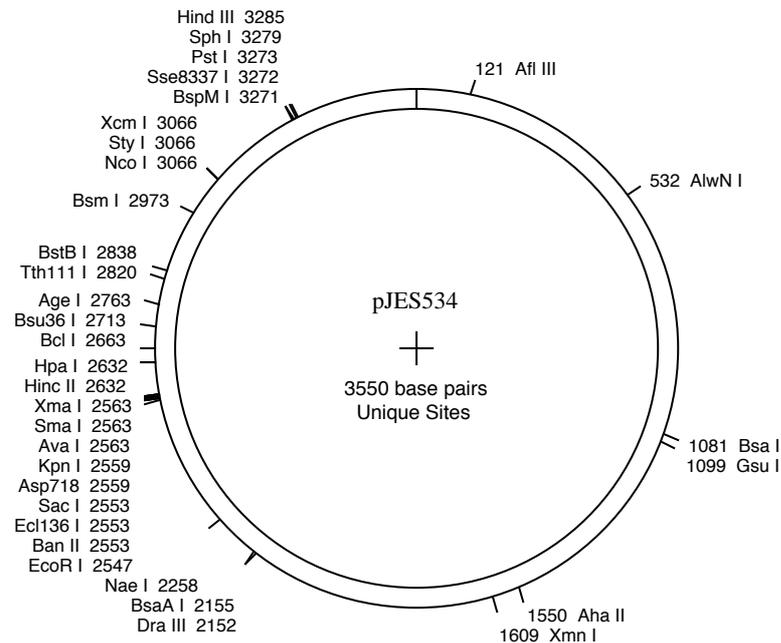












3. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ATP	Adenosintri-phosphat
a. u.	willkürliche Einheiten
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumine</i>)
bp	Basenpaar(e)
Chl	Chloramphenicol
cRNAP	RNA-Polymerase-Kernenzym (<i>core RNA polymerase</i>)
CTP	Cytidintri-phosphat
dA	Desoxyadenosin
dC	Desoxycytidin
dG	Desoxyguanosin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
DNase I	Desoxyribonuklease I
dNTP	Desoxyribonukleosidtri-phosphat (N= Adenin, Guanin, Cytosin oder Thymidin)
dT	Desoxythymidin
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

EM	Elektronenmikroskop
Fa.	Firma
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
G	Guanin (Purinbase) oder Glycin
Gl.	Gleichung
GTP	Guanosintriphosphat
H	Histidin
His	Histidin
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IPTG	Isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosid
kb	Kilobasen (1000 Basen)
kD	Kilodalton
L	Leucin
M	molar (g/mol) oder Methionin
mg	Milligramm
MW	Molekulargewicht
nm	Nanometer (Wellenlänge)
NP-40	Nonidet P40 (Ethylphenolpolyethylenglycoether)
nt	Nukleotid(e)
Ni-NTA	Nickel-Nitrilo-triacetic acid
NTP	Ribonukleosidtriphosphat (N= Adenin, Guanin, Cytosin oder Uracil)
NtrC	nitrogen regulator protein C
NtrC-P	phosphoryliertes NtrC; die aktivierte Form des Proteins
OD _x	optische Dichte bei der Wellenlänge "x" (nm)
Oligonukleotid	Oligodesoxyribonukleotid
P	Prolin
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
pH	- log H ⁺ , negativer Logarithmus der Hydroniumionenkonzentration
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
R	Arginin
RNA	Ribonukleinsäure
RNAP	RNA-Polymerase
RNAP· σ^{54}	RNA-Polymerase· σ^{54} -Holoenzym
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
S	Serin
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SFM	Rasterkraftmikroskop(ie) (scanning force microscope/microscopy)
s. u.	siehe unten
Tab.	Tabelle
TAE	Tris/Acetate/EDTA-Puffer
TBE	Tris/Borat/EDTA-Puffer
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris/EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin

Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TTP	Thymidintriphosphat
U	Enzymeinheit(en) oder Uracil
ü. N.	<u>über Nacht</u>
UV	Ultraviolett
V	Valin
W	Watt
wt	Wildtyp
x	mal
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent

Literaturverzeichnis

- Albright, L. M., Huala, E. & Ausubel, F. M. (1989). Prokaryotic signal transduction mediated by sensor and regulator protein pairs. *Annu. Rev. Genet.* **23**, 311-336.
- Amouyal, M. & Buc, H. (1987). Topological unwinding of strong and weak promoters by RNA polymerase. A comparison between the lac wild-type and the UV5 sites of Escherichia coli. *J. Mol. Biol.* **195**, 795-808.
- Ausubel, F. M. (1984). Regulation of Nitrogen Fixation Genes. *Cell* **37**, 5-6.
- Bates, A. D. & Maxwell, A. (1993). *DNA Topology*, Oxford University Press, Oxford.
- Bednar, J., Furrer, P., Katritch, V., Stasiak, A. Z., Dubochet, J. & Stasiak, A. (1995). Determination of DNA persistence length by cryo-electron microscopy. Separation of the static and dynamic contributions to the apparent persistence length of DNA. *J. Mol. Biol.* **254**, 579-594.
- Bellomy, G. R. & Record, M. T., Jr. (1990). Stable DNA loops in vivo and in vitro: Roles in gene regulation at a distance and in biophysical characterization of DNA. *Progr. Nucl. Aci. Res.* **39**, 81-128.
- Bezania, M., Manne, S., Laney, D. E., Lyubchenko, Y. L. & Hansma, H. G. (1995). Adsorption of DNA to mica, silylated mica, and minerals: characterization by atomic force microscopy. *Langmuir* **11**, 655-659.
- Binnig, G., Quate, C. F. & Gerber, Ch. (1986). Atomic Force Microscope. *Phys. Rev. Lett.* **56**, 930-933.
- Blackwood, E. M. & Kadonaga, J. T. (1998). Going the distance: a current view of enhancer action. *Science* **281**, 61-63.
- Bolshoy, A., McNamara, P., Harrington, R. E. & Trifonov, E. N. (1991). Curved DNA without A-A: experimental estimation of all 16 DNA wedge angles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 2312-2316.
- Buc, H. & McClure, W. R. (1985). Kinetics of open complex formation between Escherichia coli RNA Polymerase and the lac UV5 promoter: evidence for a sequential mechanism involving three steps. *Biochemistry* **24**, 2712-2723.
- Buck, M., Miller, S., Drummond, M. & Dixon, R. (1986). Upstream activator sequences are present in the promoters of nitrogen fixation genes. *Nature* **320**, 374-378.
- Bustamante, C., Keller, D. & Yang, G. (1993). Scanning force microscopy of nucleic acids and nucleoprotein assemblies. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **3**, 363-372.
- Bustamante, C. & Rivetti, C. (1996). Visualizing Protein-Nucleic Acid Interactions on a Large-Scale with the Scanning Force Microscope. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **25**, 395-429.
- Bustamante, C., Rivetti, C. & Keller, D. J. (1997). Scanning force microscopy under aqueous solutions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7**, 709-716.
- Cacchione, S., de Santis, P., Foti, D., Leoni, L., Palleschi, A., Risuleo, G. & Savino, M. (1989). Theoretical prediction of sequence dependent DNA superstructure and their gel electrophoresis behavior. *Biochemistry* **28**, 8706-8713.
- Calladine, C. R., Drew, H. R. & McCall, M. J. (1988). The intrinsic curvature of DNA in solution. *J. Mol. Biol.* **201**, 127-137.
- Cannon, W., Claverie-Martin, F., Austin, S. & Buck, M. (1993). Core RNA polymerase assists binding of the transcription factor σ^{54} to promoter DNA. *Molec. Microbiol.* **8**, 287-298.
- Cannon, W. V., Chaney, M. K., Wang, X.-Y. & Buck, M. (1997). Two domains within σ^N (σ^{54}) cooperate for DNA binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 5006-5011.

- Carmona, M. & Magasanik, B. (1996). Activation of transcription of σ^{54} -dependent promoters on linear templates requires intrinsic or induced bending of the DNA. *J. Mol. Biol.* **261**, 348-356.
- Carmona, M., Claverie-Martin, F. & Magasanik, B. (1997). DNA bending and the initiation of transcription at σ^{54} -dependent bacterial promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 9568-9572.
- Chen, P. & Reitzer, L. J. (1995). Active contribution of two domains to cooperative DNA binding of the enhancer-binding protein nitrogen regulator I (NtrC) of *Escherichia coli*: Stimulation by phosphorylation and the binding of ATP. *J. Bacteriol.* **177**, 2490-2496.
- Claverie-Martin, F. & Magasanik, B. (1991). Role of integration host factor in the regulation of the *glnHp2* promoter of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 1631-1635.
- Claverie-Martin, F. & Magasanik, B. (1992). Positive and negative effects of DNA bending on activation of transcription from a distant site. *J. Mol. Biol.* **227**, 996-1008.
- Collado-Vides, J., Magasanik, B. & Gralla, J. D. (1991). Control site location and transcriptional regulation in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* **55**, 371-394.
- Contreras, A. & Drummond, M. (1987). The effect on the function of the transcriptional activator NTRC from *Klebsiella pneumoniae* of mutations in the DNA recognition helix. *Nucleic Acids Res.* **16**, 4025-4029.
- Cowing, D. W., Mecasas, J., Record, M. T., Jr. & Gross, C. A. (1989). Intermediates in the formation of the open complex by RNA polymerase holoenzyme containing the sigma factor sigma 32 at the *groE* promoter. *J. Mol. Biol.* **210**, 521-530.
- Crothers, D. M., Drak, J., Kahn, J. D. & Levene, S. D. (1992). DNA bending, flexibility, and helical repeat by cyclization kinetics. *Meth. Enzymol.* **212**, 3-29.
- Crothers, D. M. (1993). Architectural elements in nucleoprotein complexes. *Curr. Biol.* **3**, 675-676.
- Darst, S. A., Kubalek, E. W. & Kornberg, R. D. (1989). Three-dimensional structure of *Escherichia coli* RNA polymerase holoenzyme determined by electron microscopy. *Nature* **340**, 730-732.
- deHaseth, P. L., Lohman, T. M., Burgess, R. R. & Record, M. T., Jr. (1978). Nonspecific interactions of *Escherichia coli* RNA polymerase with native and denatured DNA: differences in the binding behavior of core and holoenzyme. *Biochemistry* **17**, 1612-1622.
- Dickerson, R. E. & Drew, H. R. (1981). Structure of a B-DNA Dodecamer: Influence of Base Sequence on Helix Structure. *J. Mol. Biol.* **149**, 761.
- Diekmann, S. & Wang, J. C. (1985). On the sequence determinants and flexibility of the kinetoplast DNA fragment with abnormal gel electrophoretic mobilities. *J. Mol. Biol.* **186**, 1-11.
- Diekmann, S. & Langowski, J. (1995). Supercoiling couples DNA curvature to the overall shape and the internal motion of the DNA molecule in solution. *Theochem* **336**, 227-234.
- Dixon, R., Henderson, N. C. & Austin, S. (1988). DNA supercoiling and aerobic regulation of transcription from the *Klebsiella pneumoniae nifLA* promoter. *Nucleic Acids Res.* **16**, 9933-9946.
- Drew, H. R., Weeks, J. R. & Travers, A. A. (1985). Negative supercoiling induces spontaneous unwinding of a bacterial promoter. *EMBO J.* **4**, 1025-1032.
- Drummond, M., Whitty, P. & Wootton, J. (1986). Sequence and domain relationships of *ntrC* and *nifA* from *Klebsiella pneumoniae*: homologies to other regulatory proteins. *EMBO J.* **5**, 441-447.
- Dunaway, M. & Dröge, P. (1989). Transcription of the *Xenopus* rRNA gene promoter by its enhancer. *Nature* **341**, 657-659.
- Erie, D. A., Yager, T. D. & von Hippel, P. H. (1992). The single-nucleotide addition cycle in transcription: a biophysical and biochemical perspective. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **21**, 379-415.

- Feng, J., Atkinson, M. R., McCleary, W., Stock, J. B., Wanner, B. L. & Ninfa, A. J. (1992). Role of phosphorylated metabolic intermediates in the regulation of glutamine synthetase synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **174**, 6061-6070.
- Fiedler, U. (1996). Der Aktivierungsmechanismus des Responseregulators NtrC. Doktorarbeit, Universität Konstanz.
- Flashner, Y., Weiss, D. S., Keener, J. & Kustu, S. (1995). Constitutive forms of the enhancer-binding protein NtrC: evidence that essential oligomerization determinants lie in the central activation domain. *J. Mol. Biol.* **249**, 700-713.
- Forget, D., Robert, F., Grondin, G., Burton, Z. F., Greenblatt, J. & Coulombe, B. (1997). RAP74 induces promoter contacts by RNA polymerase II upstream and downstream of a DNA bend centered on the TATA box. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 7150-7155.
- Giaever, G. N. & Wang, J. C. (1988). Supercoiling of intracellular DNA can occur in eukaryotic cells. *Cell* **2**, 849-856.
- Gill, S. C. & von Hippel, P. H. (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* **182**, 319-326.
- Gille, H., Egan, J. B., Roth, A. & Messer, W. (1991). The FIS protein binds and bends the origin of chromosomal DNA replication, *oriC*, of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* **19**, 4167-4172.
- Goodman, S. D. & Nash, H. A. (1989). Functional replacement of a protein-induced bend in a DNA recombination site. *Nature* **341**, 1989.
- Goodsell, D. S. & Dickerson, R. E. (1994). Bending and curvature calculations in B-DNA. *Nucleic Acids Res.* **22**, 5497-5503.
- Gralla, J. D. (1991). Transcriptional control - lessons from an *E. coli* promoter data base. *Cell* **66**, 415-418.
- Gralla, J. D. & Collado-Vides, J. (1996). Organization and function of transcription regulatory elements. In *Escherichia coli and Salmonella* (Neidhardt, F. C., Hrsg.), Band 1, S. 1232-1245. 2 Bände. ASM Press, Washington, D. C.
- Greenblatt, J. (1997). RNA polymerase II holoenzyme and transcriptional regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 310-319.
- Guckenberger, R. (1998). Resolution Assessment. In *Procedures in Scanning Probe Microscopies* (Colton, R. J., Engel, A., Frommer, J. E., Gaub, H. E., Gewirth, A. A., Guckenberger, R., Rabe, J., Heckl, W. M. & Parkinson, B., Hrsg.), S. 44-48. Wiley & Sons, Chicester.
- Hagerman, P. J. (1988). Flexibility of DNA. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **17**, 265-286.
- Hagerman, P. J. (1990). Sequence directed curvature of DNA. *Annu. Rev. Biochem.* **59**, 755-781.
- Hagerman, P. J. & Ramadevi, V. A. (1990a). Application of the method of phage T4 DNA ligase catalyzed ring-closure to the study of DNA structure. I. Computational analysis. *J. Mol. Biol.* **212**, 351-362.
- Hagerman, P. J. & Ramadevi, V. A. (1990b). Application of the method of phage T4 DNA ligase catalyzed ring-closure to the study of DNA structure. II. NaCl dependence of DNA flexibility and helical repeat. *J. Mol. Biol.* **212**, 363-376.
- Hampsey, M. & Reinberg, D. (1999). RNA polymerase II as a control panel for multiple coactivator complexes. *Curr. Opin. Gen. Dev.* **9**, 132-139.
- Hansma, H. G., Sinsheimer, R. L., Groppe, J., Bruice, T. C., Elings, V., Gurley, G., Bezanilla, M., Mastromarino, I. A., Hough, P. V. C. & Hansma, P. K. (1993). Recent advances in atomic force microscopy of DNA. *Scanning* **15**, 296-299.
- Hansma, H. G. & Laney, D. E. (1996). DNA binding to mica correlates with cationic radius: assay by atomic force microscopy. *Biophys. J.* **70**, 1933-1939.

- Hansma, H. G., Kim, K. J., Laney, D. E., Garcia, R. A., Argaman, M., Allen, M. J. & Parsons, S. M. (1997). Properties of biomolecules measured from atomic force microscope images: a review. *J. Struct. Biol.* **119**, 99-108.
- Hansma, H. G., Bezanilla, M., Nudler, E., Hansma, P. K., Hoh, J., Kashlev, M., Firouz, N. & Smith, B. L. (1998). Left-handed conformation of histidine-tagged RNA polymerase complexes imaged by atomic force microscopy. *Probe Microscopy* **1**, 117-125.
- Hawcroft, D. M. (1997). The electrophoresis of native and denatured proteins. In *Electrophoresis*, S. 45-65. IRL Press, Oxford University Press, Oxford.
- Heichman, K. A. & Johnson, R. C. (1990). The Hin invertasome: protein-mediated joining of distant recombination sites at the enhancer. *Science* **249**, 511-517.
- Heumann, H., Lederer, H., Baer, G., May, R. P., Kjems, J. K. & Crespi, H. L. (1988). Spatial arrangement of DNA-dependent RNA polymerase of *Escherichia coli* and DNA in the specific complex. A neutron small angle scattering study. *J. Mol. Biol.* **201**, 115-125.
- Hirschman, J., Wong, P. K., Sei, K., Keener, J. & Kustu, S. (1985). Products of nitrogen regulatory genes *ntxA* and *ntxC* of enteric bacteria activate *glnA* transcription in vitro: evidence that the *ntxA* product is a sigma factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 7525-7529.
- Horowitz, D. S. & Wang, J. C. (1984). Torsional Rigidity of DNA and Length Dependence of the Free Energy of DNA Supercoiling. *J. Mol. Biol.* **173**, 75-91.
- Hsieh, M. & Gralla, J. D. (1994). Analysis of the N-terminal leucine heptad and hexad repeats of sigma 54. *J. Mol. Biol.* **239**, 15-24.
- Hsieh, M., Tintut, Y. & Gralla, J. D. (1994). Functional roles for the glutamines within the glutamine-rich region of the transcription factor sigma 54. *J. Biol. Chem.* **269**, 373-378.
- Hunt, T. P. & Magasanik, B. (1985). Transcription of *glnA* by purified *E. coli* components: core RNA polymerase and products of *glnF*, *glnG*, and *glnL*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 8453-8457.
- Jacobson, H. & Stockmayer, W. H. (1950). Intramolecular reaction in polycondensations. I. The theory of linear systems. *J. Chem. Phys.* **18**, 1600-1606.
- Kabata, H., Kurosawa, O., Arai, I., Washizu, M., Margaron, S. A., Glass, R. E. & Shimamoto, N. (1993). Visualization of single molecules of RNA polymerase sliding along DNA. *Science* **262**, 1561-1563.
- Kanaar, R. & Cozzarelli, N. R. (1992). Roles of supercoiled DNA structure in DNA transactions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2**, 369-383.
- Kasas, S., Thomson, N. H., Smith, B. L., Hansma, H. G., Zhu, X., Guthold, M., Bustamante, C., Kool, E. T., Kashlev, M. & Hansma, P. K. (1997). *Escherichia coli* RNA polymerase activity observed using atomic force microscopy. *Biochemistry* **36**, 461-468.
- Keener, J. & Kustu, S. (1988). Protein kinase and phosphoprotein phosphatase activities of nitrogen regulatory proteins NTRB and NTRC of enteric bacteria: roles of the conserved amino-terminal domain of NTRC. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 4976-4980.
- Keller, D. J. & Chou, C. C. (1992). Imaging steep, high structures by scanning force microscopy with electron-beam deposited tips. *Surface Science* **268**, 333-339.
- Keller, D. (1998). Making Movies of Molecular Motions. *Biophys. J.* **74**, 2743-2744.
- Keller, W. (1975). Determination of the number of superhelical turns in simian virus 40 DNA by gel electrophoresis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 4876-4880.
- Kim, T. K., Lagrange, T., Wang, Y. H., Griffith, J. D., Reinberg, D. & Ebright, R. H. (1997). Trajectory of DNA in the RNA polymerase II transcription preinitiation complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 12268-12273.

- Klenin, K. V., Frank-Kamenetskii, M. D. & Langowski, J. (1995). Modulation of intramolecular interactions in superhelical DNA by curved sequences: a Monte Carlo simulation study. *Biophys. J.* **68**, 81-88.
- Klose, K. E., Weiss, D. S. & Kustu, S. (1993). Glutamate at the site of phosphorylation of nitrogen-regulatory protein NTRC mimics aspartyl-phosphate and activates the protein. *J. Mol. Biol.* **232**, 67-78.
- Klose, K. E., North, A. K., Stedman, K. M. & Kustu, S. (1994). The major dimerization determinants of the nitrogen regulatory protein NTRC from enteric bacteria lie in its carboxy-terminal domain. *J. Mol. Biol.* **241**, 233-245.
- Kofoid, E. C. & Parkinson, S. C. (1988). Transmitter and receiver modules in bacterial signaling proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 4981-4985.
- Koo, H.-S. & Crothers, D. M. (1988). Calibration of DNA curvature and a unified description of sequence-directed bending. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 1763-1767.
- Kostrewa, D., Granzin, J., Koch, C., Choe, H. W., Raghunathan, S., Wolf, W., Labahn, J., Kahmann, R. & Saenger, W. (1991). Three-dimensional structure of the E. coli DNA-binding protein FIS. *Nature* **349**, 178-80.
- Kostrewa, D., Granzin, J., Stock, D., Choe, H. W., Labahn, J. & Saenger, W. (1992). Crystal structure of the factor for inversion stimulation FIS at 2.0 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **226**, 209-226.
- Kovacic, R. T. (1987). The 0°C closed complex between Escherichia coli RNA Polymerase and two promoters, T7-A3 and lac UV5. *J. Biol. Chem.* **262**, 13654-13661.
- Kremer, W., Klenin, K., Diekmann, S. & Langowski, J. (1993). DNA curvature influences the internal motions of supercoiled DNA. *EMBO J.* **12**, 4407-4412.
- Kustu, S., Santero, E., Keener, J., Popham, D. & Weiss, D. (1989). Expression of sigma 54 (ntrA)-dependent genes is probably united by a common mechanism. *Microbiol. Rev.* **53**, 367-376.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lange, R. & Hengge-Aronis, R. (1994). 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**, 1600-1612.
- Laundon, C. H. & Griffith, J. D. (1988). Curved helix segments can uniquely orient the topology of supertwisted DNA. *Cell* **52**, 545-549.
- Le Cam, E., Fack, F., Menissier-de Murcia, J., Cognet, J. A., Barbin, A., Sarantoglou, V., Révet, B., Delain, E. & de Murcia, G. (1994). Conformational analysis of a 139 base-pair DNA fragment containing a single-stranded break and its interaction with human poly(ADP-ribose) polymerase. *J. Mol. Biol.* **235**, 1062-1071.
- Leslie, A. G. W., Arnott, S., Chandrasekaran, R. & Ratliff, R. L. (1980). Polymorphism of DNA double helices. *J. Mol. Biol.* **143**, 49-72.
- Lyubchenko, Y. L., Gall, A. A., Shlyakhtenko, L. S., Harrington, R. E., Jacobs, B. L., Oden, P. I. & Lindsay, S. M. (1992a). Atomic force microscopy imaging of double stranded DNA and RNA. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **10**, 589-606.
- Lyubchenko, Y. L., Jacobs, B. L. & Lindsay, S. M. (1992b). Atomic force microscopy of reovirus dsRNA: a routine technique for length measurements. *Nucleic Acids Res.* **20**, 3983-3986.
- McClure, W. R. (1980). Rate-limiting steps in RNA chain initiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 5634-5638.
- Mecsas, J., Cowing, D. W. & Gross, C. A. (1991). Development of RNA polymerase-promoter contacts during open complex formation. *J. Mol. Biol.* **220**, 585-597.

- Melancon, P., Burgess, R. R. & Record, M. T., Jr. (1982). Nitrocellulose filter binding studies of the interactions of Escherichia coli RNA polymerase holoenzyme with deoxyribonucleic acid restriction fragments: evidence for multiple classes of nonpromoter interactions, some of which display promoter-like properties. *Biochemistry* **21**, 4318-4331.
- Melancon, P., Burgess, R. R. & Record, M. T., Jr. (1983). Direct evidence for the preferential binding of Escherichia coli RNA polymerase holoenzyme to the ends of deoxyribonucleic acid restriction fragments. *Biochemistry* **22**, 5169-5176.
- Merlitz, H., Rippe, K., Klenin, K. V. & Langowski, J. (1998). Looping dynamics of linear DNA molecules and the effect of DNA curvature: a study by Brownian dynamics simulation. *Biophys. J.* **74**, 773-779.
- Merrick, M. J. & Gibbins, J. R. (1985). The nucleotide sequence of the nitrogen-regulation gene ntrA of Klebsiella pneumoniae and comparison with conserved features in bacterial RNA polymerase sigma factors. *Nucleic Acids Res.* **13**, 7607-7620.
- Messing, J. (1983). New M13 vectors for cloning. *Meth. Enzymol.* **101**, 20-78.
- Moffatt, B. A. & Studier, F. W. (1987). T7 lysozyme inhibits transcription by T7 RNA polymerase. *Cell* **49**, 221-227.
- Molina-López, J. A., Govantes, F. & Santero, E. (1994). Geometry of the Process of Transcription Activation at the σ^{54} -dependent nifH Promoter of Klebsiella pneumoniae. *J. Biol. Chem.* **269**, 25419-25425.
- Morett, E. & Segovia, L. (1993). The σ^{54} bacterial enhancer-binding protein family: mechanism of action and phylogenetic relationship of their functional domains. *J. Bacteriol.* **175**, 6067-6074.
- Mossing, M. C. & Record, M. T., Jr. (1986). Upstream operators enhance repression of the lac-promoter. *Science* **233**, 889-892.
- Müller, H.-P., Sogo, J. M. & Schaffner, W. (1989). An enhancer stimulates transcription in trans when attached to the promoter via a protein bridge. *Cell* **58**, 767-777.
- Myer, V. E. & Young, R. A. (1998). RNA Polymerase II Holoenzymes and Subcomplexes. *J. Biol. Chem.* **273**, 27757-27760.
- Ninfa, A. J. & Magasanik, B. (1986). Covalent modification of the glnG product, NRI, by the glnL product, NRII, regulates the transcription of the glnALG operon in Escherichia coli. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**, 5909-5913.
- Ninfa, A. J., Reitzer, L. J. & Magasanik, B. (1987). Initiation of transcription at the bacterial glnAp2 promoter by purified E. coli components is facilitated by enhancers. *Cell* **50**, 1039-1046.
- Nixon, B. T., Ronson, C. W. & Ausubel, F. M. (1986). Two-component regulatory systems responsive to environmental stimuli share strongly conserved domains with the nitrogen assimilation regulatory genes ntrB and ntrC. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 7850-7854.
- Niyogi, S. K. & Feldman, R. P. (1981). Effect of several metal ions on misincorporation during transcription. *Nucleic Acids Res.* **9**, 2615-2627.
- Norrande, J., Kempe, T. & Messing, J. (1983). Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis. *Gene* **26**, 101-106.
- North, A. K., Klose, K. E., Stedman, K. M. & Kustu, S. (1993). Prokaryotic enhancer-binding proteins reflect eukaryote-like modularity: the puzzle of nitrogen regulatory protein C. *J. Bacteriol.* **175**, 4267-4273.
- Novagen (1995). pET System Manual, 6. Ausgabe.
- Parekh, B. S. & Hatfield, G. W. (1996). Transcriptional activation by protein-induced DNA bending: evidence for a DNA structural transmission model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 1173-1177.
- Pfannschmidt, C. & Langowski, J. (1998a). Superhelix organization by DNA curvature as measured through site-specific labeling. *J. Mol. Biol.* **275**, 601-611.

- Pfannschmidt, C. (1998b). Lokalisierung gekrümmter Sequenzen in superhelikaler DNA. Doktorarbeit, Universität Heidelberg.
- Polyakov, A., Severinova, E. & Darst, S. A. (1995). Three-dimensional structure of E. coli core RNA polymerase: promoter binding and elongation conformations of the enzyme. *Cell* **83**, 365-373.
- Popham, D. L., Szeto, D., Keener, J. & Kustu, S. (1989). Function of a bacterial activator protein that binds to transcriptional enhancers. *Science* **243**, 629-635.
- Popham, D. L., Keener, J. & Kustu, S. (1991). Purification of the alternative σ factor, σ^{54} , from *Salmonella typhimurium* and characterisation of σ^{54} -holoenzyme. *J. Biol. Chem.* **266**, 19510-19518.
- Porter, S. C., North, A. K., Wedel, A. B. & Kustu, S. (1993). Oligomerization of NTRC at the glnA enhancer is required for transcriptional activation. *Genes & Dev.* **7**, 2258-2273.
- Pruss, G. J. & Drlica, K. (1989). DNA supercoiling and prokaryotic transcription. *Cell* **56**, 521-523.
- Ptashne, M. (1986). Gene regulation by proteins acting nearby and at a distance. *Nature* **322**, 697-701.
- Ptashne, M. & Gann, A. (1997). Transcriptional activation by recruitment. *Nature* **386**, 569-577.
- Pugh, B. F. (1996). Mechanisms of transcription complex assembly. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**, 303-311.
- Puglisi, J. D. & Tinoco, J., I. (1989). Absorbance melting curves of RNA. *Meth. Enzymol.* **180**, 304-325.
- QIAGEN (1995a). QIAGEN Plasmid Handbook.
- QIAGEN (1995b). QIAprep Plasmid Handbook.
- QIAGEN (1997a). QIAquick Spin Handbook.
- QIAGEN (1997b). QIAEX II Handbook.
- Radmacher, M., Fritz, M., Hansma, H. G. & Hansma, P. K. (1994). Direct observation of enzyme activity with the atomic force microscope. *Science* **265**, 1577-1579.
- Rees, W. A., Keller, R. W., Vesenka, G. Y. & Bustamante, C. (1993). Evidence of DNA bending in transcription complexes imaged by scanning force microscopy. *Science* **260**, 1646-1649.
- Reitzer, L. J. & Magasanik, B. (1983). Isolation of the nitrogen assimilation regulator NRI, the product of the glnG gene of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 5554-5558.
- Reitzer, L. J. & Magasanik, B. (1985). Expression of glnA in *Escherichia coli* is regulated at tandem promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 1979-1983.
- Reitzer, L. J. & Magasanik, B. (1986). Transcription of glnA in *E. coli* is stimulated by activator bound to sites far from the promoter. *Cell* **45**, 785-792.
- Reitzer, L. J., Movsas, B. & Magasanik, B. (1989). Activation of glnA transcription by nitrogen regulator I (NRI)-phosphate in *Escherichia coli*: evidence for a long-range physical interaction between NRI-phosphate and RNA polymerase. *J. Bacteriol.* **171**, 5512-5522.
- Reitzer, L. J. (1996). Ammonia Assimilation and the Biosynthesis of Glutamine, Glutamate, Aspartate, Asparagine, L-Alanine, and D-Alanine. In *Escherichia coli and Salmonella* (Neidhardt, F. C., Hrsg.), Band 1, S. 391-407. 2 Bände. ASM Press, Washington, D. C.
- Révet, B., Brahms, S. & Brahms, G. (1995). Binding of the transcription activator NRI (NTRC) to a supercoiled DNA segment imitates association with the natural enhancer: An electron microscopic investigation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 7535-7539.
- Révet, B., von Wilcken-Bergmann, B., Bessert, H., Barker, A. & Müller-Hill, B. (1999). Four dimers of lambda repressor bound to two suitably spaced pairs of lambda operators form octamers and DNA loops over large distances. *Curr. Biol.* **9**, 151-154.

- Ricchetti, M., Metzger, W. & Heumann, H. (1988). One-dimensional diffusion of Escherichia coli DNA-dependent RNA polymerase: a mechanism to facilitate promoter location. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 4610-4614.
- Rice, P. A., Yang, S., Mizuuchi, K. & Nash, H. A. (1996). Crystal structure of an IHF-DNA complex: a protein-induced DNA U-turn. *Cell* **87**, 1295-1306.
- Rippe, K., von Hippel, P. H. & Langowski, J. (1995). Action at a distance: DNA-looping and initiation of transcription. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 500-506.
- Rippe, K., Guthold, M., von Hippel, P. H. & Bustamante, C. (1997a). Transcriptional activation via DNA-looping: Visualization of intermediates in the activation pathway of E. coli RNA polymerase- σ^{54} holoenzyme by scanning force microscopy. *J. Mol. Biol.* **270**, 125-138.
- Rippe, K., Mücke, N. & Langowski, J. (1997b). Molecules in motion: Imaging DNA with the scanning force microscope in aqueous solutions. *Bioforum International* **1**, 42-44.
- Rippe, K., Mücke, N. & Schulz, A. (1998). Association states of E. coli NtrC protein determined by analytical ultracentrifugation. *J. Mol. Biol.* **278**, 915-933.
- Rivetti, C., Guthold, M. & Bustamante, C. (1996). Scanning force microscopy of DNA deposited onto mica: Equilibration vs. molecular kinetic trapping studied by statistical polymer chain analysis. *J. Mol. Biol.* **264**, 919-932.
- Rivetti, C., Guthold, M. & Bustamante, C. (1999). Wrapping of DNA around the E. coli RNA Polymerase Open Promotor Complex. *in preparation*.
- Roe, J. H., Burgess, R. R. & Record, M. T., Jr. (1985). Temperature dependence of the rate constants of the Escherichia coli RNA polymerase-lambda PR promoter interaction. Assignment of the kinetic steps corresponding to protein conformational change and DNA opening. *J. Mol. Biol.* **184**, 441-453.
- Ronson, C. W., Nixon, B. T. & Ausubel, F. M. (1987). Conserved Domains in Bacterial Regulatory Proteins That Respond to Environmental Stimuli. *Cell* **49**, 579-581.
- Saenger, W. (1984). Principles of Nucleic Acid Structure, Springer-Verlag, New York.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- Sasse-Dwight, S. & Gralla, J. D. (1988). Probing the Escherichia coli glnALG upstream activation mechanism in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 8934-8938.
- Sasse-Dwight, S. & Gralla, J. D. (1990). Role of eukaryotic-type functional domains found in the prokaryotic enhancer receptor factor sigma 54. *Cell* **62**, 945-954.
- Satchwell, S. C., Drew, H. R. & Travers, A. A. (1986). Sequence periodicities in chicken nucleosome core DNA. *J. Mol. Biol.* **191**, 659-675.
- Schätz, T. & Langowski, J. (1997). Curvature and sequence analysis of eukaryotic promoters. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **15**, 265-275.
- Schätz, T. (1998). Analyse von DNA-Krümmung in regulatorischen Sequenzen. Doktorarbeit, Universität Heidelberg.
- Schickor, P., Metzger, W., Werel, W., Lederer, H. & Heumann, H. (1990). Topography of intermediates in transcription initiation of E. coli. *EMBO J.* **9**, 2215-2220.
- Schiedner, G., Wessel, R., Scheffner, M. & Stahl, H. (1990). Renaturation and DNA looping promoted by the SV40 large tumor antigen. *EMBO J.* **9**, 2937-2943.
- Schild, C., Claret, F.-X., Wahli, W. & Wolffe, A. P. (1993). A nucleosome-dependent static loop potentiates estrogen-regulated transcription from Xenopus Vitellogenin B1 promoter in vivo. *EMBO J.* **12**, 423-433.

- Schlag, P. J., Capp, M. W. & Record, M. T., Jr. (1995). Inhibition of transcription initiation by lac repressor. *J. Mol. Biol.* **245**, 331-350.
- Shingler, V. (1996). Signal sensing by σ^{54} -dependent regulators: derepression as a control mechanism. *Molec. Microbiol.* **19**, 409-416.
- Shore, D., Langowski, J. & Baldwin, R. L. (1981). DNA flexibility studied by covalent closure of short fragments into circles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 4833-4837.
- Shore, D. & Baldwin, R. L. (1983). Energetics of DNA twisting. I. Relation between twist and cyclization probability. *J. Mol. Biol.* **179**, 957-981.
- Singer, P. & Wu, C. W. (1987). Promoter search by Escherichia coli RNA polymerase on a circular DNA template. *J. Biol. Chem.* **262**, 14178-14189.
- Singer, P. T. & Wu, C. W. (1988). Kinetics of promoter search by Escherichia coli RNA polymerase. Effects of monovalent and divalent cations and temperature. *J. Biol. Chem.* **263**, 4208-4214.
- Singleton, C. K. & Wells, R. D. (1982). Relationship between superhelical density and cruciform formation in plasmid pVH51. *J. Biol. Chem.* **257**, 6292-6295.
- Spassky, A., Kirkegaard, K. & Buc, H. (1985). Changes in the DNA structure of the lac UV5 promoter during formation of an open complex with Escherichia coli RNA Polymerase. *Biochemistry* **24**, 2723-2731.
- Stenzel, T. T., MacAllister, T. & Bastia, D. (1991). Cooperativity at a distance promoted by the combined action of two replication initiator proteins and a DNA bending protein at the replication origin of pSC101. *Genes & Dev.* **5**, 1453-1463.
- Stock, J. B., Ninfa, A. J. & Stock, A. M. (1989). Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. *Microbiol. Rev.* **53**, 450-490.
- Stock, J. B., Stock, A. M. & Mottonen, J. M. (1990). Signal transduction in bacteria. *Nature* **344**, 395-400.
- Studier, F. W. (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Meth. Enzymol.* **185**, 60-89.
- Su, W., Porter, S., Kustu, S. & Echols, H. (1990). DNA-looping and enhancer activity: association between DNA-bound NtrC activator and RNA polymerase at the bacterial glnA promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 5504-5508.
- Théveny, B., Coulaud, D., Le Bret, M. & Révet, B. (1988). DNA sequence and structure. In *Structure & Expression, DNA Bending and Curvature* (Olson, W. K., Sarma, M. H., Sarma, R. H. & Sundaralingam, M., Hrsg.), Band 3, S. 39-55. Adenine Press, Schenectady, New York.
- Tintut, Y., Wong, C., Jiang, Y., Hsieh, M. & Gralla, J. D. (1994). RNA polymerase binding using a strongly acidic hydrophobic-repeat region of σ^{54} . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 2120-2124.
- Trifonov, E. N. & Sussman, J. L. (1980). The pitch of chromatin DNA is reflected in its nucleotide sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 3816-3820.
- USB (1993). Sequenase Quick-Denature Plasmid Sequencing Kit, Handbuch, 1. Ausgabe.
- van Noort, S. J., van der Werf, K. O., Eker, A. P., Wyman, C., de Grooth, B. G., van Hulst, N. F. & Greve, J. (1998). Direct visualization of dynamic protein-DNA interactions with a dedicated atomic force microscope. *Biophys. J.* **74**, 2840-2849.
- Volkman, B. F., Nohaile, M. J., Amy, N. K., Kustu, S. & Wemmer, D. E. (1995). Three-dimensional solution structure of the N-terminal receiver domain of NTRC. *Biochemistry* **34**, 1413-1424.
- Vologodskii, A. V., Levene, S. D., Klenin, K. V., Frank-Kamenetskii, M. D. & Cozzarelli, N. R. (1992). Conformational and thermodynamic properties of supercoiled DNA. *J. Mol. Biol.* **227**, 1224-1243.

- Wang, J. T., Syed, A., Hsieh, M. & Gralla, J. D. (1995). Converting Escherichia coli RNA polymerase into an enhancer-responsive enzyme: role of an NH₂-terminal leucine patch in sigma 54. *Science* **270**, 992-994.
- Wang, J. T. & Gralla, J. D. (1996). The transcription initiation pathway of sigma 54 mutants that bypass the enhancer protein requirement. Implications for the mechanism of activation. *J. Biol. Chem.* **271**, 32707-32713.
- Wedel, A., Weiss, D. S., Popham, D., Dröge, P. & Kustu, S. (1990). A bacterial enhancer functions to tether a transcriptional activator near a promoter. *Science* **248**, 486-490.
- Wedel, A. & Kustu, S. (1995). The bacterial enhancer-binding protein NTRC is a molecular machine: ATP hydrolysis is coupled to transcriptional activation. *Genes & Dev.* **9**, 2042-2052.
- Wedemann, G., Münkel, C., Schoppe, G. & Langowski, J. (1998). Kinetics of structural changes in superhelical DNA. *Phys. Rev. E* **58**, 3537-3546.
- Weiss, D. S., Batut, J., Klose, K. E., Keener, J. & Kustu, S. (1991). The phosphorylated form of the enhancer-binding protein NTRC has an ATPase activity that is essential for activation of transcription. *Cell* **67**, 155-167.
- Weiss, V. & Magasanik, B. (1988). Phosphorylation of nitrogen regulator I (NR_I) of Escherichia coli. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 8919-8923.
- Weiss, V., Claverie-Martin, F. & Magasanik, B. (1992). Phosphorylation of nitrogen regulator I of Escherichia coli induces strong cooperative binding to DNA essential for activation of transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 5088-5092.
- Whitehall, S., Austin, S. & Dixon, R. (1992). DNA Supercoiling Response of the σ^{54} -dependent Klebsiella pneumoniae nifL Promotor in vitro. *J. Mol. Biol.* **225**, 591-607.
- Wong, C., Tintut, Y. & Gralla, J. D. (1994). The domain structure of sigma 54 as determined by analysis of a set of deletion mutants. *J. Mol. Biol.* **236**, 81-90.
- Wootton, J. C. & Drummond, M. H. (1989). The Q-linker: a class of interdomain sequences found in bacterial multidomain regulatory proteins. *Protein Eng.* **2**, 535-543.
- Wu, H. M. & Crothers, D. M. (1984). The locus of sequence-directed and protein-induced DNA bending. *Nature* **308**, 509-513.
- Wyman, C., Rombel, I., North, A. K., Bustamante, C. & Kustu, S. (1997). Unusual oligomerization required for activity of a bacterial enhancer-binding protein. *Science* **275**, 1658-1661.

Stichwortverzeichnis

A

Affinitätschromatographie, 41, 63, 100
 Agarosegele, 29
 Aktivatorprotein, 1, 4, 6, 15, 99
 Aktivierungsdomäne, 69
 Aktivitätsbestimmung, 56, 66
 Analyse der DNA-Krümmung, 60, 97
 Analytische Ultrazentrifugation, 68, 100, 101, 117
 Aspartatrest, 3
 ATPase-Aktivität, 4, 5, 7
 ATP-Bindemotiv, 4
 ATP-Hydrolyse, 5, 7, 99
 Autoradiographie, 59

B

Bakterienstamm
 - Plasmidpräparation, 19
 - Proteinexpression, 18
 Bildanalyse, 53

C

Carbamyolphosphat, 67, 68, 100, 113
 Chloroquinele, 29
 Core-Enzym, 2

D

Datenanalyse, 53
 Dimer, 6
 DNA
 - Schleifenbildung, 7
 - Dephosphorylierung, 37
 - Katenane, 6
 - Krümmung, 12
 - intrinsisch, 12, 100, 114, 121, 122
 - Protein induziert, 12
 - Ligation, 37
 - Looping, 1, 6, 10, 15, 102
 - Persistenzlänge, 10, 56, 82, 102
 - Restriktionsspaltungen, 32
 - Schleifenbildung, 1, 6, 11, 99
 - Sequenziergel (Harnstoff-Polyacrylamidgel), 35
 - Sequenzierreaktion, 34
 - Zyklisierungsexperimente, 10

E

Enhancer, 1, 7
 Expressionstest, 40

F

Fernwechselwirkungen, 1
 FIS-Protein, 5, 107

G

Gelanomalie, 12, 88, 114
 Gelextraktion

- aus Agarosegelen, 31
 - aus Polyacrylamidgelen, 33
 Gelfärbung/Entfärbung, 45
 geschlossener Komplex, 6, 73, 108, 109, 112, 114
 Glimmer, 52, 70, 102, 105, 122
glnALG-Operon, 6, 7
glnAp1, 7
glnAp2, 7, 8, 99, 121
glnLp, 7
 Glutaminsynthetase, 8, 99, 120
 Glycerinkulturen, 25

H

Helix-Turn-Helix-Motiv, 4
 Holoenzym, 2, 99, 104
 HPLC-Aufreinigung, 34
 Hydratationszustand, 102, 110

I

IHF, 12, 114, 118
 Input-Domäne, 3
 Ionenaustauschchromatographie, 43, 64, 100

K

Klenow-Polymerase, 37
 Konsensussequenz, 1
 konstitutive Mutanten, 5
 Konzentrationsbestimmung
 - DNA, 28
 - Proteine, 44, 66

L

lac-Operon, 2
 Linker, 5
 lokale Konzentration, 10, 11, 14, 115

M

Maxipräparation, 27
 Minimalenzym, 2
 Minipräparation, 27
 Modellsystem, 8
 Multimerisierung, 6, 102

N

Nährmedien, 25
 NR_I, 4
 NR_{II}, 4
 NtrB, 4, 99, 112
 NtrC, 4, 6, 15, 61, 99, 112
 NtrC^{D54E}, 5
 NtrC^{D54E,S160F}, 5, 61, 68, 99, 100
 NtrC-P, 4, 6
 NtrC^{S160F}, 5, 61, 68, 99, 100

O

offener Komplex, 5, 7, 108, 114
 Oktamerkomplex, 69, 117, 122
 Oligomerisierung, 4
 Oligonukleotide, 20
 Output-Domäne, 4

P

Phosphorimager-Auswertung, 59, 90
 Plasmid

- Endschleife, 14
- Proteinexpression, 19, 21, 61
- Rasterkraftmikroskopie, 22
- Transkription, 19, 22, 87, 114
- Übersicht, 19

 Plasmidfermentation, 26, 61
 Polyacrylamidgel

- Konservierung, 46
- nichtdenaturierend, 33
- SDS-PAGE, 44, 61

 Promotorsequenz, 6, 104
 Proteinaufreinigung, 41, 63
 Proteinexpression, 39, 61

R

Rasterkraftmikroskop, 6, 100

- Aufbau und Funktionsweise, 46
- Auflösung – Einfluß der Spitzegeometrie, 49
- Interaktion zwischen Spitze und Probe, 48, 70
- SFM-Flüssigkeitszelle, 51

 Rasterkraftmikroskopie, 46, 70, 102, 122

- von RNAP- σ^{54} und DNA, 52
- Analyse der RNAP- σ^{54} -Bindungsstelle, 54, 73, 104
- Aufnahmen, 70
- DNA-Konturlänge, 55, 83
- DNA-Verbiegungswinkel, 54, 105
- Konformation des geschlossenen RNAP- σ^{54} -DNA-Komplexes, 75
- Messung der DNA-Konturlänge, 107
- Modell für den geschlossenen Komplex, 110

 Receiver-Domäne, 3, 69
 regulatorische Domäne, 4

RNAP, 2
 RNAP- σ^{54} , 2, 6, 70, 99, 112
 RNAP- σ^{70} , 2, 112
 RNA-Polymerase II, 2

S

σ^{54} , 2, 15, 61, 99, 100
 σ^{70} , 2
 saure Tasche, 3
 Selektivmedien, 25
 Sigma-Faktor, 2, 6
 Simulationen, 11, 14, 16, 96, 116, 118, 120
 Stickstoffmangel, 3
 Superhelix, 12, 14, 117
 Superhelixdichte, 12, 117

T

Topoisomere

- Herstellung, 39
- Topoisomerase-Reaktion, 38

 Transformation, 25
 Transkriptionsaktivierung, 6, 12, 15, 99, 121
 Transkriptionsexperimente, 56, 87, 100, 112

- Transkriptionskinetiken, 58, 89, 112, 122
 - Abstand Enhancer-Promotor, 93
 - lineare DNA mit und ohne Krümmung, 118
 - Position der Krümmung, 94, 120
 - superhelikale Plasmide mit und ohne Krümmung, 118
 - superhelikale und linearisierte Plasmide, 95, 115, 116
 - Plasmide mit erhöhter Aktivierungsrate, 120

 Transkriptionskomplex, 1
 Transkriptionsreaktion, 58
 Transmitter-Domäne, 3

Z

Zellaufschluß, 41
 zentrale Domäne, 4
 Zweikomponenten-Signaltransduktionssysteme, 3