

**UNTERSUCHUNGEN ZUR REGULATION
DER IN VITRO SYNTHESE
DER ISOLEUCYL-TRNA-SYNTHETASE
UND
DES RIBOSOMALEN PROTEINS S20
AUS ESCHERICHIA COLI**

**DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES
DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG**

**VORGELEGT VON
REINHARD WIRTH
AUS REGENSBURG**

– REGENSBURG 1980 –

Di' 80/63

230 / W E 5200. W 799

Promotionsgesuch eingereicht am: 31.7.80

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. A. Böck

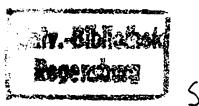
Prüfungsausschuß:

Prof.Dr.W.Tanner

Prof.Dr.A.Böck

Prof.Dr.R.Schmitt

Prof.Dr.M.Sumper



6161174

ABKÜRZUNGEN

CGSC	Coli Genetic Stock Center
DHPR	Dihydrodipicolinsäurereductase
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EDTA	Aethylendiaminetetraessigsäure
IRS	Isoleucyl-tRNA-Synthesetase
mRNA	messenger Ribonucleinsäure
A _x	optische Dichte bei x nm Wellenlänge
PEG	Polyäthylenglycol
ppGpp	Guanosin 5'diphosphat 3'diphosphat
pppGpp	Guanosin 5' triphosphat 3'diphosphat
PPO	Diphenyloxazol
psi	pounds pro inch ²
r -	ribosomal -
RNAP	DNA abhängige RNA Polymerase
SDS	Natriumdodecylsulfat
S20	ribosomales Protein S20
S30	Überstand einer 30.000 g Zentrifugation
S100	Überstand einer 100.000 g Zentrifugation
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	Transfer Ribonucleinsäure

Zur Bezeichnung von ribosomalen Proteinen wurde die von Wittmann et al. [1] vorgeschlagene Nomenklatur verwendet (S: Protein in der kleinen, L: Protein der großen Untereinheit).



INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. MATERIAL UND METHODEN	7
2.1. Verwendete Bakterienstämme und Phagen	7
2.2. Anzuchtbedingungen für Bakterien und Vermehrung der λ Phagen	8
2.3. Präparationen von Zellextrakten	9
2.3.1. Präparation von Extrakten für das in vitro System	9
2.3.2. Andere Präparationsmethoden für Zellextrakte	10
2.4. Präparation von Nucleinsäuren	10
2.4.1. Präparation von λ DNA	10
2.4.2. Präparation von pLC 19-3 DNA	11
2.4.3. Präparation von rRNA	11
2.5. Bereitung des Reaktionsmixes für das in vitro System	12
2.6. Elektrophoretische Methoden und Autoradiographie	13
2.6.1. Zweidimensionale Elektrophoresen zur Auftrennung von r-Proteinen	13
2.6.2. Zweidimensionale Elektrophorese nach O'Farrell	13
2.6.3. Eindimensionale Elektrophorese nach Laemmli	14
2.6.4. Eindimensionale Elektrophorese zur Auftrennung von rRNA	14
2.6.5. Fluorographie und Autoradiographie	14
2.7. Immunologische Methoden	15

2.7.1.	Antiserumpräparation	15
2.7.2.	Doppelimmunpräzipitation von IRS	15
2.7.3.	Einfachimmunpräzipitation	16
2.8.	Bestimmung der IRS Aktivität mittels Aminoacylierungstests	16
2.9.	Präparation des ribosomalen Proteins S20	17
2.10.	Präparation von ppGpp und Identifizierungs-methoden für Nucleotide	17
2.11.	Radioaktivitätsbestimmungen	17
2.11.1	Bestimmung der Gesamtinkorporation von Aminosäuren im in vitro System	17
2.11.2.	Radioaktivitätsbestimmung $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ doppelmarkierter Proben	18
2.11.3.	Bestimmung von ^3H , ^{32}P , ^{35}S in Polyacrylamid-Gelen	19
2.12.	Konzentrationsbestimmungen	19
2.12.1.	Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren	19
2.12.2.	Proteinbestimmungen	20
2.12.3.	Konzentrationsbestimmung von ppGpp	20
2.13.	Chemikalien	20
3.	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	21
3.1.	Bestandteile des in vitro Systems	21
3.2.	Identifizierung der in vitro synthetisierten Genprodukte	22
3.2.1.	Strategie zur Identifizierung der in vitro synthetisierten Produkte	22

3.2.2.	Identifizierung von IRS	24
3.2.3.	Identifizierung des r-Proteins S20	28
3.2.4.	Identifizierung des <u>dapB</u> Genprodukts	29
3.2.5.	Identifizierung der <u>carA</u> und <u>carB</u> Genprodukte	30
3.3.	Abhängigkeit der <i>in vitro</i> Syntheseaktivität des gekoppelten Transkriptions-/Translations-Systems von verschiedenen Faktoren	32
3.3.1.	Zeitabhängigkeit der Syntheseaktivität	32
3.3.2.	Abhängigkeit der Synthese von der DNA und der S30 Extrakt Konzentration	35
3.3.3.	Temperatur- und tRNA-Abhängigkeit der <i>in vitro</i> Synthese	37
3.3.4.	Abhängigkeit der <i>in vitro</i> Synthese von anderen Faktoren	39
3.4.	Charakterisierung des entkoppelten <i>in vitro</i> Systems	41
3.5.	Regulation der <i>in vitro</i> Synthese durch unübliche Nucleotide	44
3.5.1.	Einfluß von ppGpp auf die <i>in vitro</i> Synthese	44
3.5.2.	Einfluß von cAMP auf die <i>in vitro</i> Synthese	48
3.5.3.	Einfluß von cGMP auf die <i>in vitro</i> Synthese	50
3.6.	Versuche, eine mögliche Autoregulation der Synthese von IRS <i>in vitro</i> nachzuweisen	50
3.6.1.	Bisher gefundene Phänomene zur Regulation von Aminoacyl-tRNA-Synthetasen	50
3.6.2.	Zusatz von IRS zum gekoppelten <i>in vitro</i> System	51
3.6.3.	Limitierung des <i>in vitro</i> Systems an IRS durch Zugeabe von Anti IRS Antiserum	53

3.6.4.	Abbau und Synthese von ppGpp im in vitro System	56
3.6.5.	Erzeugung einer stringent Kontrollsituation im in vitro System	59
3.7.	Versuche zur Autoregulation des r-Proteins S20	60
3.7.1.	Hinweise aus früheren Arbeiten auf eine mögliche Autoregulation von r-Proteinen	60
3.7.2.	Zusatz von gereinigtem r-Protein S20 zum ge- koppelten in vitro System	61
3.7.3.	Zusatz von rRNA zum gekoppelten in vitro System	63
3.7.4.	Abbaurate von IRS und S20 im gekoppelten in vitro System	66
3.7.5.	Komplexierung von in vitro synthetisiertem r-Protein S20 an zugesetzte 16S rRNA	68
3.7.6.	Derepression der S20 Synthese durch 16S rRNA im getrennten Transkriptions- und Translations-System	70
3.7.7.	Stabilität von freier rRNA im gekoppelten in vitro System	71
3.7.8.	Syntheseraten von S20 in Gegenwart von 16S rRNA	74
3.7.9.	Synthese von S20 bei gleichzeitiger rRNA Synthese	76
3.8.	Berechnungen	78
4.	SCHLUSSFOLGERUNGEN	79
4.1.	Voraussetzung	79
4.2.	Wirkung von cAMP	80
4.3.	Wirkung von ppGpp	80
4.4.	Regulation von Aminoacyl-tRNA-Synthetasen	81
4.5.	Regulation der Synthese von r-Proteinen	83

5. ZUSAMMENFASSUNG 88

6. LITERATURVERZEICHNIS 90



1. EINLEITUNG

In einer schnell wachsenden Bakterienzelle werden etwa 80 % des benötigen Kohlenstoffs und der Energie für die Proteinbiosynthese verbraucht. Nachdem zumindest für mittlere und hohe Wachstumsraten (μ) die Zahl der Ribosomen proportional zu μ ist [2], wurde 1969 von Maaløe [3] gefordert, daß die vorhandenen Ribosomen stets mit maximaler Kapazität arbeiten; es ist deswegen möglich, daß die Wachstumsrate einer Bakterienzelle über die Syntheserate der Ribosomen bestimmt wird. Der Regulation des Proteinbiosyntheseapparats kommt damit wahrscheinlich eine zentrale Bedeutung für die Regulation des Bakterienwachstums zu.

Der Proteinsyntheseapparat selbst ist komplex aufgebaut; nach einer Definition von Maaløe [4] besteht allein sein "core" aus folgenden Bestandteilen: den Ribosomen, tRNA, DNA-abhängiger RNA Polymerase, Aminoacyl-tRNA-Synthetasen sowie allen Faktoren, die für Initiation, Elongation, Termination und Processing der Transkriptions- und Translationsprodukte nötig sind, einschließlich der Proteine, die im Metabolismus von ppGpp eine Rolle spielen. Da die einzelnen Bestandteile des Proteinbiosyntheseapparats in einem gewissen stöchiometrischen Verhältnis zueinander vorliegen müssen, um die durch die äußeren Bedingungen (z.B. Zusammensetzung des Mediums) gegebene potentielle Proteinbiosynthesekapazität voll auszunützen, ist zu erwarten, daß die Synthese dieser Bestandteile einer komplexen Regulation unterliegt.

Dies ist allein schon deshalb zu fordern, weil kein Zusammenhang besteht zwischen der Zahl der entsprechenden Gene pro Genom und

dem zahlenmäßigen Anteil der jeweiligen Genprodukte im Proteinbiosyntheseapparat:

Jeweils nur eine Genkopie existiert für die verschiedenen tRNA-Spezies, die einzelnen Aminoacyl-tRNA-Synthetasen, die Untereinheiten der RNAP, die r-Proteine und die ribosomalen Faktoren (mit Ausnahme von EFTu, für den zwei Genkopien existieren [5]). Für rRNA wurde dagegen die Existenz von sieben Genkopien nachgewiesen [6, 7].

Ins Ribosom eingebaut werden jeweils eine Kopie der 5S, 16S und 23S rRNA sowie jeweils ein Molekül aller r-Proteine (mit Ausnahme von L7/12, von denen vier Proteine eingebaut werden [8]). Das stöchiometrische Verhältnis von EFTs und EFG zu Ribosomen ist bei verschiedenen Wachstumsraten gleich 1:1 [9], während dieses Verhältnis für EFTu zwischen 8 bis 14 schwanken kann [10], und damit im gleichen Bereich wie das für tRNA liegt [11]. Nach Messungen von Neidhardt et al. [12] wird für verschiedene Wachstumsraten ein konstantes Verhältnis von etwa 1:100:100 für die relativen Mengen an Aminoacyl-tRNA-Synthetasen:tRNA:EFTu aufrechterhalten. Die Regulation von RNAP ist nach Blumenthal und Dennis [13] sehr komplex, bei "normalen Wachstumsbedingungen" wird ein Verhältnis von 5:1 für Ribosomen zu RNAP eingestellt.

Für einzelne Komponenten des Proteinbiosyntheseapparats wurden bisher zwei übergreifende Regulationsphänomene beschrieben:

- 1) "metabolic control" - Diese Art der Regulation ist dadurch definiert, daß der relative Gehalt eines unter metabolischer

Kontrolle stehenden Moleküls linear abhängig ist von der Wachstumsrate μ [14]. Auf Grund der oben angeführten Daten stehen alle Komponenten des Proteinbiosyntheseapparats unter dieser Kontrolle, jedoch zu einem unterschiedlichen Ausmaß.

- 2) "stringent control" - Dieser Art der Regulation ist dadurch gekennzeichnet, daß bei Entzug einer Aminosäure die RNA-Synthese sofort inhibiert wird [15]; der Ausdruck "stringent" Kontrolle wurde 1961 geprägt [16]. Folgende Komponenten des Proteinsyntheseapparats unterliegen diesem Regulationsmechanismus: stabile RNA, und damit also rRNA und tRNA [17]; r-Proteine [18]; EFTu, EFG und EFTs [19, 20, 21]. Für die Aminoacyl-tRNA-Synthetasen wurde bisher eine schwache (wenn überhaupt vorhandene) "stringent" Kontrolle nachgewiesen [20, 21]; die einzelnen Untereinheiten der RNAP scheinen dagegen verschiedenen Regulationsarten zu unterstehen [20, 21].

Über welchen Mechanismus metabolische Kontrolle in der Zelle abläuft, ist bisher nicht bekannt. Für die "stringent" Kontrolle wurde 1969 nachgewiesen [22], daß die Synthese von pppGpp und ppGpp ihr zeitlich vorausgeht. Gute Hinweise, daß diese unüblichen Nucleotide an der "stringent" Kontrolle maßgeblich beteiligt sind, stammen aus in vitro Arbeiten [23, 24]. Danach kann am 70S Ribosom bei Vorhandensein von mRNA und tRNA ppGpp beziehungsweise pppGpp aus ATP und GDP beziehungsweise GTP gebildet werden, wenn unbeladene, jedoch codonspezifische tRNA in der A-site des Ribosoms gebunden ist. Auch in diesem Fall ist jedoch nichts über den Mechanismus der ppGpp Wirkung bekannt. Diskutiert

werden in diesem Zusammenhang vor allem zwei Hypothesen, wonach einmal ppGpp eine Angleichung von verschiedenen konformativen Zuständen der RNAP bewirken soll [25, 26] oder zum anderen über ein ppGpp Rezeptormolekül verschiedene Wechselwirkungen zwischen DNA und RNAP zustandekommen sollen [27]. Ein definitiver Nachweis, daß ppGpp der eigentliche Effektor für die "stringent" Kontrolle ist, steht bis heute noch aus.

Sehr viele der bisher gemachten Aussagen wurden auf Grund von Ergebnissen aus in vivo Versuchen gemacht. Da dabei die Regulation von Zellkomponenten untersucht wird, die für das Wachstum der Zellen unentbehrlich sind, sind solche Versuche a priori limitiert.

Die folgenden Versuchsanstellungen wurden verwendet, um das komplexe Netzwerk von ineinandergreifenden Regulationsmechanismen in vivo zu analysieren:

- Man kann das Wachstum und die Regulation der Synthese (vor allem des zellulären Anteils) des Proteinsyntheseapparats unter "steady state" Bedingungen, zum Beispiel durch Kultur auf verschiedenen C-Quellen untersuchen.
- Eine weitere Möglichkeit besteht darin, die Wachstumsbedingungen in sogenannten "shift" Experimenten plötzlich zu verändern und die Anpassung an einen neuen Gleichgewichtszustand zu studieren. Häufig verwendete Versuchsansätze bestehen in dem Entzug einer essentiellen Aminosäure oder in der Überführung in ein Medium, das rascheres (shift-up) oder langsameres

(shift-down) Wachstum erlaubt.

- Als außerordentlich nützlich für Regulationsstudien haben sich auch konditionale Mutanten erwiesen, in denen die Synthese, oder auch die Regulation der Synthese, einer Komponente des Proteinbiosyntheseapparats unter restriktiven Bedingungen - meist Wachstum bei niedriger oder hoher Temperatur - gestört ist.
- Antibiotika oder Aminosäurenanaloga können eingesetzt werden, um einzelne Reaktionsschritte der Proteinbiosynthese spezifisch zu hemmen, und um die Auswirkung dieses Eingriffs auf die Synthese des Gesamtsystems zu analysieren.
- Eine letzte Möglichkeit schließlich stellt die Untersuchung von Zellen dar, bei denen die Kopiezahl einzelner Gene, oder von Gruppen von Genen, durch die Einführung von F'-Episomen oder von multi-copy Plasmiden vergrößert wird.

Alle bisher genannten Versuchsansätze haben die grundlegende Schwierigkeit, daß über die Interaktion von verschiedenen Regulationsmechanismen sehr häufig pleiotrope Effekte beobachtet werden. Eine Möglichkeit, diese komplexe Situation zu umgehen, bieten *in vitro* Versuche. Mit einem solchen Ansatz ist es möglich, die Regulation der Expression von definierten Genombereichen, speziell von einzelnen Genen, zu untersuchen.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Regulation der Synthese von zwei Komponenten des Proteinbiosyntheseapparats *in vitro* unter-

sucht werden. Diese zwei Komponenten, die Isoleucyl-tRNA-Synthetase und das ribosomale Protein S20, gehören unterschiedlichen Klassen von Bestandteilen des Proteinbiosyntheseapparats an. Da die Strukturgene für diese beiden Proteine eng benachbart auf dem E. coli Chromosom liegen [28], und da in früheren Arbeiten in diesem Labor λ Phagen isoliert wurden, die beide Gene zugleich spezifisch transduzieren [29], war die Möglichkeit gegeben, die Regulation der Synthese beider Proteine in einem gemeinsamen Ansatz zu untersuchen.

Da zu Beginn dieser Arbeit bereits bekannt war, daß der Pool an freien r-Proteinen in der Zelle sehr klein ist [30 - 32] und Gendosiseffekte für r-Proteine (mit wenigen Ausnahmen) [33, 34] nicht beobachtbar sind [33], sollte die Regulation sowohl auf der Transkriptions- als auch der Translationsebene untersucht werden.

Das hier verwendete *in vitro* System entspricht im wesentlichen dem von Zubay 1973 beschriebenen Ansatz [35]. Es wurde vor allem aus zwei Gründen gewählt:

- 1) Es besitzt die höchste Aktivität von allen bisher beschriebenen *in vitro* Proteinsynthesesystemen.
- 2) Es entspricht den *in vivo* Verhältnissen am besten, da der hier verwendete *E. coli* Zellextrakt nicht wie in anderen Systemen teilweise [36] oder vollständig [37] fraktioniert wird, seine relative Zusammensetzung demnach der in der Zelle vorhandenen nahekommt.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Verwendete Bakterienstämme und Phagen

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme und Phagen sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Wenn nicht anders vermerkt, wurde im *in vitro* System S30 Extrakt aus *E. coli* KL19 und DNA aus λ ddapB248 verwendet.

Tabelle 1: Verwendete *E. coli* Stämme und Phagen

Stamm bzw. Phage	Genotyp	Herkunft bzw. Referenz
KL19	prototroph λ^+	[38]
A19	<u>met</u> , <u>rna</u>	Laborstamm
CP78	<u>thi-1</u> , <u>thr-1</u> , <u>leu-6</u> , <u>his-65</u> , <u>arg-46</u> , <u>gal-3</u> , <u>xyl-7</u> , <u>malA1</u> , <u>mtl-2</u> , <u>ara-13</u> , <u>tonA2?</u> , <u>supE44?</u> , λ R	[39]
CP79	wie CP78, zusätzlich <u>rel-2</u>	[39]
NF161	<u>metB1</u> , <u>argA52</u> , <u>spot1</u> , λ R?, λ -	[40]
NF162	<u>metB1</u> , <u>argA52</u> , <u>relA1</u> , <u>spot1</u> , λ R?, λ -	CGSC
64-2	<u>alas3</u> , <u>pheA</u> , <u>pyr</u> , <u>rel-1</u> , λ^+ , <u>tonA22</u> , T_2^R , <u>supS20</u>	[41]
64-2 dap	wie 64-2 jedoch zusätzlich <u>dapB17</u>	[29]
64-2 car	wie 64-2 jedoch zusätzlich <u>pyrA53</u>	[29]
λ "WT"	CI857 S7	[29]
λ ddapB119	CI857 S7 spezifisch transduzierend <u>rpsT</u> , <u>ileS</u> , <u>dapB</u> , <u>pyrA</u>	[29]
λ ddapB248	CI857 S7 spezifisch transduzierend <u>rpsT</u> , <u>ileS</u> , <u>dapB</u> , <u>pyrA</u>	[29]
λ ddapB254	CI857 S7 spezifisch transduzierend <u>rpsT</u> , <u>ileS</u> , <u>dapB</u> , <u>pyrA</u>	[29]
λ ddapB257	CI857 S7 spezifisch transduzierend <u>dapB</u>	[29]
λ ddapB265	CI857 S7 spezifisch transduzierend <u>dapB</u> , <u>pyrA</u>	[29]

2.2. Anzuchtbedingungen für Bakterien und Vermehrung der λ

Phagen

Für die Präparation von S30 Extrakten für das in vitro System wurden die jeweiligen Stämme bei sehr guter Belüftung in 1 l Erlenmeyerkolben gezogen, die je 250 ml eines Mediums folgender Zusammensetzung enthielten: KH_2PO_4 5,6 g/l; K_2HPO_4 29,0 g/l; Hefeextrakt 10,0 g/l; Vitamin B 1 15 mg/l; Glucose 10,0 g/l. Das Wachstum erfolgte im Brutraum bei 34°C und wurde in der exponentiellen Phase ($A_{546} = 0,8$) durch rasches Abkühlen abgebrochen. Die gleichen Bedingungen wurden für die Präparation von nicht radioaktiv markiertem Trägermaterial (70S Ribosomen und S100) verwendet.

Für die Präparation von ^{14}C markiertem S100 Extrakt beziehungsweise von 70S Ribosomen wurde A19 in Minimalmedium (Na_2HPO_4 8,9 g/l; KH_2PO_4 13,6 g/l; CaCl_2 0,014 g/l; MgSO_4 0,25 g/l; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2,0 g/l), das 4 g Glucose und 40 mg L-Methionin/l enthielt, bis zu einer A_{436} von 0,4 bei 37°C angezogen. Anschließend wurde 0,2 μCi ^{14}C -L-Lysin/ml zugegeben und bis zu einer A_{436} 1,2 weiterinkubiert.

Zur Analyse von Ganzzellextrakten auf dem zweidimensionalen Gel-System nach O'Farrell wurden die von Bloch et al. [42] beschriebenen Anzucht- und Markierungsbedingungen verwendet.

Zur Hitzeinduktion von λ Phagen wurden die entsprechenden Wirtsstämme bei 30°C unter starker Belüftung in einem Gyrotory Wasserbadschüttler G 76 in 1 l Erlenmeyerkolben, die je 200 ml LB Medium (10 g Trypton/l; 5 g Hefeextrakt/l; 5 g NaCl/l) enthielten, angezogen. Bei einer A_{546} von 0,7 wurden die Kolben für 30 min

bei 42°C, und anschließend 150 min bei 37°C weitergeschüttelt.

2.3. Präparationen von Zellextrakten

2.3.1. Präparation von Extrakten für das in vitro System

Die Präparation von S30 Extrakten wurde wie in der Referenz [35] beschrieben durchgeführt, jedoch mit folgenden Modifikationen:

- a) der Aufschluß der Zellen erfolgte über zweimalige Passage durch eine French Press Zelle bei 2600 psi;
- b) die anschließende Dialyse wurde nur 4 h lang durchgeführt.

Der S30 Extrakt wurde in kleinen Mengen portioniert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C aufbewahrt.

Zur Präparation von S100 Extrakt wurde der S30 Extrakt nach der Dialyse 2 h bei 100 000 g zentrifugiert, die oberen drei Viertel des Überstandes abgezogen, portioniert und in gleicher Weise eingefroren und gelagert.

Für die Präparation von 70S Ribosomen wurde die bräunliche Deckschicht des Niederschlags der 100 000 g Zentrifugation entfernt und der verbleibende Niederschlag in 0,5 Volumen (des S30 Extrakt Volumens) S30 Dialysepuffer bei 4°C suspendiert. Anschließend wurde erneut 2 h bei 100 000 g zentrifugiert und der Niederschlag in 0,1 Volumen (des S30 Extrakt Volumens) S30 Dialysepuffer suspendiert. Eingefroren und aufbewahrt wurde diese Ribosomenpräparation in gleicher Weise wie der S30 Extrakt.

2.3.2. Andere Präparationsmethoden für Zellextrakte

Zur Präparation von unmarkiertem und ^{14}C markiertem S100 Extrakt beziehungsweise 70S Ribosomen wurden die Zellen in 0,1 Volumen (des Anzuchtvolumens) Puffer A (10 mM Tris-Cl pH 7.5; 10 mM Mg Acetat; 6 mM β -Mercaptoäthanol; 100 mM NH_4Cl) gewaschen, und anschließend in 0,01 Volumen (des Anzuchtvolumens) Puffer A suspendiert, der 5 μg DNase (Reinheitsgrad II)/ml enthielt. Nach zweimaliger Passage durch die French Press Zelle bei 8000 psi wurde das Zelldebris durch eine 30-minütige Zentrifugation bei 30 000 g entfernt und der Überstand einer 2-stündigen Zentrifugation bei 100 000 g unterworfen. Der Überstand dieser Zentrifugation (S100 Extrakt) wurde bei -70°C eingefroren, der Niederschlag (70S Ribosomen) in 0,001 Volumen (des Anzuchtvolumens) Puffer A bei 4°C suspendiert und ebenfalls bei -70°C eingefroren.

2.4. Präparation von Nucleinsäuren

2.4.1. Präparation von λ -DNA

Nach Hitzeinduktion der lysogenen Stämme wurden die Zellen geerntet und pro 1 Anzuchtmittel in 25 ml Lysepuffer (10 mM Tris-Cl pH 7.5; 100 mM KCl; 0,1 mM EDTA) suspendiert. Nach zweifachem Einfrieren (-20°C) und Auftauen wurde das Lysat auf 10 mM MgCl_2 gebracht, 5 μg DNase/ml zugegeben und 15 min bei 37°C inkubiert. Zelldebris wurde durch zweimalige Zentrifugation (10 min bei 20 000 g) entfernt und das Lysat auf CsCl Blockgradienten in

Nitrozellulosebechern für Beckman SW 27 Rotoren aufgelagert. Der Blockgradient bestand aus je 2 ml einer CsCl Lösung in Lyse-puffer der spezifischen Dichte 1,7; 1,5 und 1,3. Nach 2-stündiger Zentrifugation bei 24000 rpm wurden die konzentrierten Phagen mittels Spritze und Kanüle abgesaugt und anschließend mindestens zweimal einer Gleichgewichtszentrifugation (je 18 h im SW 56 Rotor) in CsCl der spezifischen Dichte 1,5 unterworfen. DNA wurde aus den gereinigten Phagen entweder durch mehrfache Phenolextraktion oder durch SDS Extraktion isoliert. Zur SDS Extraktion wurde die Phagensuspension auf 0,5 % SDS gebracht, 5 min bei 65°C inkubiert und anschließend auf 0,4 M KCl eingestellt. Nach 20-minütiger Zentrifugation bei 18 000 g wurde der DNA Überstand abgesaugt und ebenso wie Phenolextrahierte DNA, steril 12 h gegen 10 mM Tris-Azetat pH 8.2 dialysiert. Die Aufbewahrung erfolgte steril über einem Tropfen Chloroform.

2.4.2. Präparation von pLC 19-3 Plasmid DNA

Diese Präparation wurde, genau wie in Referenz [43] beschrieben, durchgeführt.

2.4.3. Präparation von rRNA

Zur Präparation von nicht radioaktiv markierter rRNA wurden 70S Ribosomen, wie in 2.3.2. beschrieben, isoliert und daraus, wie in Referenz [44] angegeben, die rRNA extrahiert.

Die gleiche Extraktions- und Auftrennmethode wurde zur Isolie-

rung von ^{32}P markierter rRNA verwendet, jedoch wurde hier *E. coli* A19 in MOPS Medium [45] angezogen, das ein Zehntel der normalen K_2HPO_4 Konzentration und 1 μCi $^{32}\text{PO}_4^{3-}$ pro ml Medium sowie 40 μg L-Methionin pro ml enthielt.

2.5. Bereitung des Reaktionsmixes für das *in vitro* System

Wie aus Tabelle 2 (siehe 3.1.) ersichtlich ist, wurde das Reaktionsgemisch für das *in vitro* System fünffach konzentriert bereitet. Die einzelnen Komponenten des Gemisches wurden bei -20°C aufbewahrt und waren mit Ausnahme von Phosphoenolpyruvat und PEG 6000, die als Festsubstanzen zugegeben wurden, und dem Aminosäurengemisch, das als Suspension vorlag, filtersterilisiert. Im folgenden ist angegeben die Reihenfolge der Zugabe der Komponenten zum Reaktionsmix und die jeweilige Endkonzentration im *in vitro* System: Tris-Acetat pH 8,2 40 mM; K-Acetat 55 mM, Dithiothreitol 1,4 mM; Ammoniumacetat 27 mM; Magnesiumacetat 15 mM; Gemisch aus 19 L-Aminosäuren (ohne L-Methionin bzw. L-Lysin) je 0,25 mM; fehlende Aminosäure 0,025 mM; *E. coli* tRNA 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Folsäure, FAD, NADP, Pyridoxin je 27 $\mu\text{g}/\text{ml}$; p-Aminobenzoësäure 11 $\mu\text{g}/\text{ml}$; CTP, UTP, GTP je 0,6 mM; ATP 2,2 mM; Phosphoenolpyruvat · Na_3 21 mM; CaCl_2 7 mM; PEG 6000 16 mg/ml. Diese Komponenten wurden bei 0°C nacheinander zugegeben und jeweils vermischt, wobei nach Zugabe von Phosphoenolpyruvat etwa 10 min bis zum vollständigen Lösen dieser Substanz gewartet wurde. PEG 6000 benötigte etwa 45 bis 60 min zum vollständigen Lösen. Die weitere Verwendung des Reaktionsmixes im *in vitro* System ist aus Tabelle

2 ersichtlich.

2.6. Elektrophoretische Methoden und Autoradiographie

2.6.1. Zweidimensionale Elektrophoresen zur Auftrennung von r-Proteinen

Hierzu wurden Proben des *in vitro* Systems mit Puffer B (10 mM Tris-Cl pH 7.5; 10 mM Mg-Azetat; 6 mM EtSH) auf 1 ml aufgefüllt und 7OS Träger-Ribosomen zugegeben. Die weitere Präparation der Proben erfolgte nach [46]. Wurden die Proben einer zweidimensionalen Elektrophorese nach Kaltschmidt und Wittmann [47] unterworfen, so wurden vor der Extraktion der r-Proteine 3 mg 7OS Träger-Ribosomen zugegeben; für die nach Isono et al. [48] modifizierte Methode war diese Menge auf 0,5 mg reduziert.

2.6.2. Zweidimensionale Elektrophorese nach O'Farrell

Hierzu wurden Proben des *in vitro* Systems auf 0,2 ml mit Puffer B aufgefüllt; es wurden 5 µl RNase/DNase Lösung [49] zugegeben und 10 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 0,5 ml Azeton wurden die Proben 60 min bei 0°C belassen und 5 min bei 3 000 g zentrifugiert. Der Niederschlag wurde im Vakuum getrocknet. Anschließend wurden die Proben in 30 µl Lysispuffer [49] aufgenommen und auf der zweidimensionalen Equilibrium oder Nonequilibrium Gelelektrophorese nach O'Farrell [50] aufgetrennt.

2.6.3. Eindimensionale Elektrophorese nach Laemmli

Proben des *in vitro* Systems wurden mit dem zweifachen Volumen des SDS enthaltenden Probenpuffer [51] versetzt und 60 min bei 60°C inkubiert. Die Elektrophorese erfolgte wie in [52] beschrieben.

2.6.4. Eindimensionale Elektrophorese zur Auftrennung von rRNA

Diese Methode wurde, wie von Gegenheimer et al. [53] beschrieben, verwendet.

2.6.5. Fluorographie und Autoradiographie

Sollten von Gelen, auf denen ^3H Lysin markierte Proben aufgetrennt waren, Autoradiogramme hergestellt werden, so wurden diese Gele, um die Exponationszeit zu verkürzen, alternativ nach zwei verschiedenen Methoden vorbehandelt. Entweder wurde die von Laskey und Mitarbeitern [54, 55] beschriebene Fluorographie unter Verwendung von PPO durchgeführt oder es wurde als Szintillator Salicylsäure verwendet. Zur Salicylsäurebehandlung wurde das gefärbte Gel zweimal 30 min gewässert (je 500 ml) und anschließend 30 min in 300 ml einer Lösung geschüttelt, die 1 M an Natrium-salicylat war, und durch Zugabe von Salicylsäure in Festsubstanz auf pH 5.5 gebracht wurde. Sofort nach dieser Behandlung wurden die Gele getrocknet, wobei die Trockenzeit im Vergleich zu unbehandelten Gelen um einen Faktor 1,5 verlängert war.

Autoradiographie wurde auf Kodak X-Omat XR5 Röntgenfilmen durchgeführt, wobei unbehandelte Gele bei Raumtemperatur, fluorographisch behandelte Gele bei -70°C exponiert wurden.

2.7. Immunologische Methoden

2.7.1. Antiserumpräparation

Die Immunisierung von Kaninchen gegen gereinigte IRS wurde, wie in [56] beschrieben, durchgeführt; die Präparation von Anti-IRS Antiserum aus dem Blut solcher Tiere erfolgte nach den in Referenz [57] aufgeführten Angaben.

2.7.2. Doppelimmunpräzipitation von IRS

Zur Doppelimmunpräzipitation wurde zu 50 µl Proben des *in vitro* Systems eine Menge an Anti-IRS Antiserum aus Kaninchen zugegeben, die die Aktivität von 1,25 µg IRS im Aminoacylierungstest zu 50 % hemmt. Nach 60-minütiger Inkubation bei 0°C wurde diejenige Menge Anti-Kaninchen-Immunglobulin Antiserum aus Ziegen zugegeben, die nach 15 h Inkubation bei 0°C optimale Präzipitation erzeugte. Die hierzu nötige Menge an Ziegen Antiserum wurde in Vorversuchen mittels einer Mini-Doppelimmundiffusionsmethode nach Ouchterlony [58] bestimmt. Der Niederschlag wurde dreimal, wie in [59] beschrieben, gewaschen und auf SDS Acrylamidgelen aufgetrennt.

2.7.3. Einfachimmunpräzipitation

Hierzu wurden Proben des in vitro Systems mit Puffer C (50 mM Tris-Cl pH 7.5; 1 % Triton X100; 0,4 M KCl) auf 0,5 ml aufgefüllt und, wie in 3.2.2. beschrieben, IRS zugegeben. Anschließend erfolgte eine zweimalige Ultraschallbehandlung (je 5 sec mit der Microspitze eines Branson B12 Sonifiers; 70W Ausgang) und Zugabe von 50 µl Anti IRS Antiserum aus Kaninchen. Nach 12-stündiger Inkubation bei 4°C wurde der Niederschlag durch Zentrifugation (5 min bei 3 000 g) gesammelt und dreimal in je 0,25 ml Puffer D (50 mM Tris-Cl pH 7.5; 1 % Triton X100; 1 M KCl) sowie einmal in 0,25 ml Puffer E (50 mM Tris-Cl pH 7.5; 0,1 M NaCl) gewaschen. Puffer E wurde quantitativ abgesaugt und der Niederschlag in 50 µl des in 2.6.3 beschriebenen Puffers aufgenommen. Die weitere Behandlung erfolgte nach den in 2.6.3. gemachten Angaben.

2.8. Bestimmung der IRS Aktivität mittels Aminoacylierungstests

Der Aktivitätstest für IRS wurde, wie in [60] beschrieben, durchgeführt, jedoch in einem Endvolumen von 0,25 ml.. Die Konzentration der Bestandteile des Inkubationsansatzes war: Tris-Cl pH 7.5 100 mM; MgCl₂ 10 mM; KCl 10 mM; EtSH 6 mM; ATP 2 mM, E.coli Roh-tRNA 400 µg/0,25 ml; L-¹⁴C Isoleucin 20 µM (10 µCi/µM); variierende Menge gereinigter IRS.

2.9. Präparation des ribosomalen Proteins S20

Die Reinigung des r-Proteins S20 erfolgte wie in [61] beschrieben. Wie eine Analyse auf einem eindimensionalen SDS Gel (15 % in bezug auf Acrylamid) zeigte, war dieses Produkt zu über 95 % rein.

2.10. Präparation von ppGpp und Identifizierungsmethoden für Nucleotide

Die Präparation von ^{32}P markiertem und nicht radioaktiv markiertem ppGpp erfolgte nach den Angaben von Cashel [62]. Identifiziert wurden Nucleotide durch ihr Laufverhalten auf Polyäthylenimin Dünnschicht-Platten (Polygram CEL3OOPEI Fertigfolien von Machery + Nagel) im Vergleich mit authentischen Nucleotiden. Verwendet wurde ein eindimensionales Laufsystem [63] und das in Referenz [64] angegebene zweidimensionale Laufsystem A.

2.11. Radioaktivitätsbestimmungen

2.11.1. Bestimmung der Gesamtinkorporation von Aminosäuren im in vitro System

Zur Bestimmung der Gesamtsynthese (TCA fällbares Material) wurden nach dem Einfrieren (3.1.) geringe Mengen (2 bis 5 μl) aus den Proben entnommen und in 1 ml Rinderserumalbuminlösung (1 mg/ml) pipettiert. Nach Mischen wurden 2 ml 10%ige TCA Lösung zuge-

geben und 10 min bei 0°C inkubiert. Anschließend wurde 20 min bei 100°C inkubiert, 10 min lang bei 0°C abgekühlt und der Niederschlag über Glasfiberfilter abgenutscht. Die Filter wurden zweimal mit je 10 ml kalter 10%iger TCA Lösung und einmal mit 5 ml 70%igem Äthanol gewaschen und getrocknet. Die Radioaktivität dieser Proben wurde in 15 ml 0,5%iger PPO/Toluol Lösung in einem Betaszint BF 5000 Flüssigkeitsszintillationszähler bestimmt.

2.11.2. Radioaktivitätsbestimmung $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ doppelmarkierter Proben

Enthielten Proben die Isotopen ^3H und ^{14}C gemeinsam, so wurden sie in einem Tri Carb Sample Oxidizer 306 (Packard Instruments) zu $^3\text{H}_2\text{O}$ und $^{14}\text{CO}_2$ oxidiert. Proben aus ungetrockneten Gelen wurden hierzu ausgeschnitten und in Filterpapier (ca. 5 x 10 cm) mehrere Stunden bei 70°C getrocknet. Proben aus getrockneten Proben wurden ebenfalls in Filterpapier gewickelt und sofort verbrannt. Das dabei entstandene $^3\text{H}_2\text{O}$ und $^{14}\text{CO}_2$ wurde an die entsprechenden Träger-und Szintillationsflüssigkeiten absorbiert und die radioaktiven Zerfälle im Betaszint BF 5000 Flüssigkeitsszintillationszähler bestimmt.

2.11.3. Bestimmung von ^3H , ^{32}P , ^{35}S in Polyacrylamid-Gelen

Hierzu wurden aus getrockneten Gelen die entsprechenden Bereiche ausgeschnitten und in 0,2 ml H_2O mindestens 5 h lang gequollen. Zum weiteren Quellen der Gele wurden 8 ml eines Gemisches aus

Lipoloma:Lumasolve = 10:1 (Lumac AG) zugegeben und das Gemisch mindestens drei Tage weiterinkubiert. Die Zählung der radioaktiven Zerfälle erfolgte im Flüssigkeitsszintillationsspektrometer BF 5000, sie wurde nach weiterer zweitägiger Inkubation bei Raumtemperatur wiederholt.

2.11.4. Radioaktivitätsbestimmung von ^{32}P markiertem ppGpp

Die Wanderungsposition von ^{32}P markiertem ppGpp auf Polyäthylenimin Dünnschichtfolien wurde durch Autoradiographie ermittelt und die entsprechenden Bereiche der Folien mittels eines Spatels abgeschabt. Dieses Material wurde mit 5 ml Aqualuma (Lumac AG) versetzt und die Proben vor der Zählung mindestens 5 h im dunklen Flüssigkeitsszintillationszähler belassen.

2.12. Konzentrationsbestimmungen

2.12.1. Konzentrationsbestimmungen von Nucleinsäuren

Zur Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren wurde ihre spezifische Absorption bei 260 nm verwendet. Die Lösungen wurden mit Wasser so verdünnt, daß ihre A_{260} zwischen 0,1 bis 0,3 lag. Für DNA Konzentrationsbestimmungen wurde ein Wert von 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pro 1 A_{260} zugrunde gelegt, für RNA Konzentrationsbestimmungen ein Wert von 42 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

2.12.2. Proteinbestimmungen

Proteinkonzentrationen wurden nach der Methode von Lowry et al. [65] bestimmt, wobei als Standard Rinderserumalbumin verwendet wurde.

2.12.3. Konzentrationsbestimmung von ppGpp

Hierzu wurde die spezifische Absorption von ppGpp bei 253 nm benutzt [63]; eine A_{253} von 12 700 für eine 1 M Lösung [63] wurde verwendet.

2.13. Chemikalien und Bezugsquellen

$^{32}\text{PO}_4^{3-}$, L-[^{35}S]-Methionin, L-[U- ^{14}C]-Lysin und L-[4,5 ^3H] Lysin waren von Radiochemical Centre, Amersham. Von Boehringer Mannheim wurden bezogen: RNAP, Rifampicin, FAD und NADP. Alle Nucleotide, Tris-Base, E. coli tRNA und Dithiothreitol wurden bei Sigma gekauft. Die Bezugsquelle für Pyridoxin, Folsäure und Phosphoenol-pyruvat · Na_3 war Calbiochem. Alle anderen verwendeten Chemikalien waren vom Reinheitsgrad p.A.

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

3.1. Bestandteile des in vitro Systems

In Tabelle 2 ist der Ansatz einer Probe für das gekoppelte Transkriptions-/Translations-System angegeben. Inkubation in mit Chromschwefelsäure gewaschenen Gläschen oder in unbenutzten Eppendorf Plastikreaktionsgefäß en (1,5 ml Inhalt) ergab keine Unterschiede der Syntheseaktivität in vitro. Beendet wurde die

Tabelle 2:

Ansatz einer 50 µl Probe des gekoppelten in vitro Systems.
In Versuchsserien wurden jeweils die entsprechenden Mengen der einzelnen Bestandteile in alle Proben gegeben, bevor der nächste Bestandteil zugegeben wurde. Nach Zugabe des S3O Extrakts wurden die Proben durch 5maliges Aufziehen und Auspipettieren von 25 µl mit Hilfe der 25 µl Kapillarpipette "Capillettor" durchmischt und die Inkubation aller Proben gleichzeitig durchstellen in ein Wasserbad der entsprechenden Inkubationstemperatur gestartet.

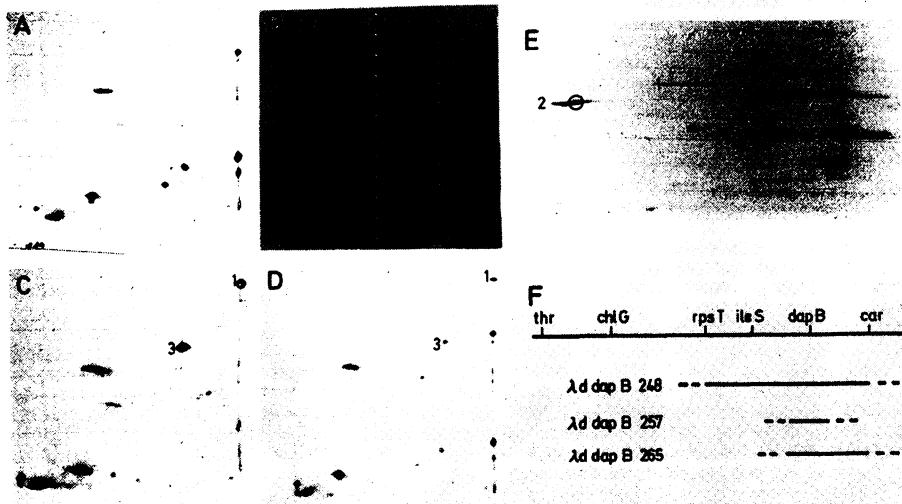
Pipettier- reihenfolge	Bestandteil	Menge
1.	H ₂ O	auf 50 µl Endvolumen
2.	Reaktionsmix	10 µl
3.	radioaktive Aminosäure	entweder 5 µCi ³⁵ S L-Methionin (~ 900 Ci/mmol) oder 10 µCi ³ H L-Lysin (~ 80 Ci/mmol)
4.	DNA	5 µg
5.	zu testende Substanz	siehe einzelne Versuche
6.	S3O Extrakt	300 µg

Synthese durch Abkühlen der Proben auf 0°C (5 min), anschließendes starkes Schütteln für 3 min und Einfrieren bei -20°C. So behandelte Proben zeigten keine Syntheseaktivität mehr. Die von Chu [66] benutzte Methode zum Abbruch der Synthese, nämlich Zusatz von Ribonuklease und anschließende Zentrifugation, hat im Vergleich zu der hier verwendeten zwei Nachteile: a) es werden nur 50 % des *in vitro* synthetisierten Materials erfaßt; b) eine eventuell vorhandene Ungleichverteilung eines *in vitro* Produkts zwischen Überstand und Niederschlag bleibt unberücksichtigt.

3.2. Identifizierung der *in vitro* synthetisierten Genprodukte

3.2.1. Strategie zur Identifizierung der *in vitro* synthetisierten Produkte

Von P. Buckel [29] wurde ein Satz von λ Phagen isoliert, die alle spezifisch dapB und verschiedene, an diesen Genort anschließende Regionen des *E. coli* Chromosoms transduzieren. In Abbildung 1F sind die Genomsegmente, die einige dieser λ Phagen übertragen können, angegeben (nach Buckel [29]). Diese Ergebnisse stammen aus *in vivo* Komplementationsversuchen. Die *in vitro* bei Verwendung von verschiedenen DNA Matrizen synthetisierten Genprodukte ließen sich über einen Vergleich des Spektrums der *in vitro* Produkte mit den Komplementationsdaten identifizieren. Eine eindimensionale Auftrennung im SDS Slabgel (10 % in bezug auf Acrylamid) nach Laemmli [51] war jedoch in



einigen Gelbereichen nicht eindeutig genug. Zur Identifizierung und Messung der Menge der *in vitro* synthetisierten Genprodukte wurden deshalb andere Methoden verwendet.

3.2.2. Identifizierung von IRS

Zur Identifizierung von IRS wurden zwei Immunpräzipitationsmethoden und das zweidimensionale Gelelektrophoresesystem nach O'Farrell [49] verwendet.

Wie Abbildung 2 zeigt, waren im Niederschlag der Doppelimmunpräzipitation zwar mehrere Proteine neben der IRS vorhanden,

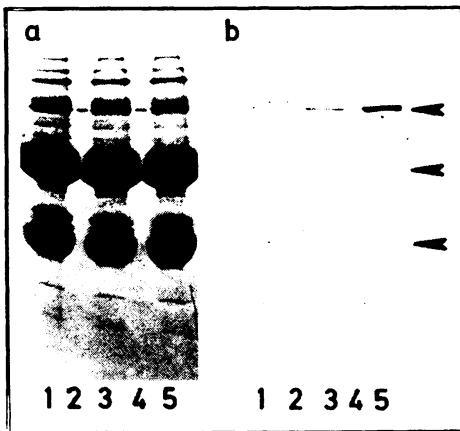


Abbildung 2:
Doppelimmunpräzipitation von *in vitro* synthetisierter IRS.
a) Ausschnitt des gefärbten 10-20 % Gradientengels b) Autoradiogramm von a). Die Proben 2 und 4 enthalten je 0,4 µg gereinigte IRS. Die Proben 1, 3 und 5 zeigen die Immunpräzipitate (ohne Zusatz von ^{14}C markierter IRS) aus *in vitro* Proben, bei denen als DNA Matrize verwendet wurde: (1) λ Wildtyp DNA; (2) λ ddapB254 DNA; (5) wie 3, jedoch mit 0,5 mM ppGpp im Inkubationsansatz. Die Pfeile in b) bezeichnen von unten nach oben die Position folgender Proteine: leichte Kette der Antikörper; schwere Kette der Antikörper; IRS.

radioaktiv markiert war jedoch nur IRS. Die Tatsache, daß bei Verwendung von λ Wildtyp DNA (Abb. 2), λ ddapB257 (nicht dargestellt) oder λ ddapB265 DNA (nicht dargestellt) als Matrize des *in vitro* Systems keine Radioaktivität im Immunpräzipitat feststellbar ist, beweist die Spezifität dieser Methode. Vor der Zugabe des spezifischen Antiserums wurde den Proben ^{14}C markierte IRS in Form von ^{14}C markiertem S100 Extrakt zugesetzt, um eine Bestimmung der Verluste während aller Arbeitsschritte bei der Doppelimmunpräzipitation zu ermöglichen. Es ergab sich, daß die Verluste bis zu 30 % betrugen. Die Doppelimmunpräzipitationsmethode hat den Nachteil, daß - wie schon der Name sagt - zwei verschiedene Antikörper verwendet werden, von denen der eine nicht in unserem Labor isoliert werden konnte. Solche Anti Kaninchen-Immunglobulin Ziegen-Antikörper sind zwar käuflich zu erhalten, jedoch für Verwendung in Serien von Experimenten zu teuer.

Zur Ausfällung von IRS aus *in vitro* Proben mittels der Einfachimmunpräzipitationsmethode mußte IRS entweder in reiner Form (1 $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ Probe) oder als S100 (200 μg S100 Protein/50 μl Probe) zugesetzt werden, um eine genügende Menge an Immunpräzipitat zu erhalten. Auch diese Methode erforderte den Zusatz von ^{14}C markierter IRS zur Bestimmung von Verlusten, die wieder bis zu 30 % betrugen. Abbildung 3 zeigt, daß mit dieser Methode IRS sehr spezifisch ausgefällt werden konnte. Das radioaktiv markierte Material in den Gelbereichen, die die Untereinheiten der Antikörper enthalten, ist wahrscheinlich auf unspezifische Ad-

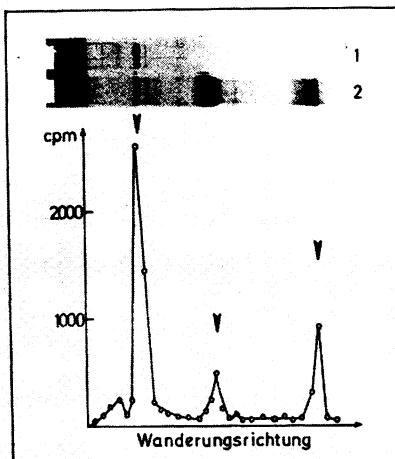


Abbildung 3:

Einfachimmunpräzipitation von *in vitro* synthetisierter IRS. Die Proben 1 und 2 zeigen einen Ausschnitt aus dem gefärbten 7,5 % Gel. Probe 1 enthält 0,4 µg gereinigte IRS, Probe 2 das Immunpräzipitat, wobei kein ^{14}C markierter S100 Extrakt zugesetzt war. Nach Trocknen des Gels wurde Probe 2 in 2 mm breite Gelstücke zerschnitten und die Radioaktivität dieser Fraktionen durch Verbrennen zu $^{3}\text{H}_2\text{O}$ bestimmt. Die Kurve zeigt die erhaltenen Werte. Die Pfeile geben von links nach rechts an: IRS; schwere Kette der Antikörper; leichte Kette der Antikörper.

sorption an das Präzipitat zurückzuführen [67, 68]. Ein weiterer Beweis für die Spezifität der Einfachimmunpräzipiation liegt in folgendem Ergebnis: Wird nach der Inkubation ein Überschuß an nicht radioaktiv markierter, gereinigter und aktiver IRS zu den Proben des *in vitro* Systems zugesetzt, kann die Menge der ausgefällten radioaktiv markierten IRS ausgetriert werden; die Mengenangaben für dieses Experiment sind aus Tabelle 3 ersichtlich.

Tabelle 3:

Einfluß von Zusatz unmarkierter IRS auf die Ausbeute von radioaktiv markierter IRS bei der Einfachimmunpräzipitation.
Alle Proben enthalten jeweils zusätzlich 1 µg IRS/50 µl Probe,
um eine quantitative Präzipitation zu gewährleisten.

Zusatz von IRS nach der Inkubation (µg/50 µl Probe)	Radioaktivität in der IRS Bande %
-	100
0,86	89
8,6	66
86	36
860	20

Der Nachweis für die spezifische in vitro Synthese konnte nicht allein über immunologische Methoden, sondern auch elektrophoretisch erbracht werden. Das zweidimensionale Gelsystem nach O'Farrell kann über 3 000 Proteine auflösen [49], wobei theoretische Berechnungen zeigen, daß mit weniger als 5 % Wahrscheinlichkeit zwei (oder mehr) Proteine in diesem System an exakt die gleiche Stelle wandern [49]. Bei der Auf trennung der in vitro mit λ ddapB248 DNA als Matrize synthetisierten Produkte zeigte sich nach Autoradiographie, daß eines dieser Produkte an eine Position des O'Farrell Equilibrium Gelsystems wandert, die nach Ergebnissen von Neidhardt [12] von gereinigter IRS eingenommen wird. Abbildung 1E zeigt, daß gereinigte IRS und in vitro synthetisierte IRS in diesem Gelsystem identisches Laufverhalten aufweisen, und daß IRS bei Verwendung von λ ddapB248 DNA als

Matrize spezifisch synthetisiert wird.

Es ist also festzustellen, daß gereinigte und in vitro synthetisierte IRS in bezug auf Molekulargewicht, isoelektrischen Punkt und immunologische Eigenschaften keine Unterschiede zeigen.

3.2.3. Identifizierung des r-Proteins S20

Bei Auftrennung der in vitro synthetisierten Genprodukte im eindimensionalen SDS Slabgelsystem nach Laemmli [52] weisen mindestens drei andere Proteine sehr ähnliches Laufverhalten wie S20 auf. Es mußte deswegen zur Auftrennung und Identifizierung von S20 ein System verwendet werden, das nach zwei verschiedenen Parametern trennt. Hierzu ist, wie Abbildung 1 zeigt, das O'Farrell Gelsystem geeignet; das in Abbildung 1B durch 4 gekennzeichnete Produkt zeigt gleiches Laufverhalten wie gereinigtes S20 Protein (Neidhardt, unveröffentlicht). Aus den Autoradiogrammen A - C von Abbildung 1 ist weiterhin zu schließen, daß von den drei hier getesteten λ Phagen nur λ ddapB248 die genetische Information für S20 trägt, ein Befund, der mit den in vivo Komplementationsdaten übereinstimmt.

Buckel konnte nachweisen [29], daß nach Infektion von UV bestrahlten Zellen mit λ ddapB119 S20 in vivo als einziges r-Protein synthetisiert wird. In dieser Arbeit konnte dieses Ergebnis für die in vitro Synthese mit DNA als Matrize aus den

λ Phagen λ ddapB119, λ ddapB248, λ ddapB254 und λ ddapB261

bestätigt werden. Als Trennsystem wurde hierzu verwendet:

a) das von Kaltschmidt und Wittmann entwickelte System [47] und b) das nach Isono [48] modifizierte System. Im Autoradiogramm eines Gels nach Isono, auf dem die Produkte des *in vitro* Systems mit λ ddapB248 DNA als Matrize aufgetrennt wurden, war ein weiteres radioaktives Produkt feststellbar, das jedoch nicht identisch mit einem r-Protein wandert. Sein Laufverhalten entspricht in der ersten Dimension (Trennung nach Ladung) dem von S8, in der zweiten Dimension (Trennung nach Größe) dem von S9. Weder dieses noch irgendein anderes Genprodukt des *in vitro* Systems zeigte eine Vorstufen Produkt-Abhängigkeit mit S20 wie sie früher von Mackie [69, 70] für das r-Protein S20 berichtet wurde.

Das *in vitro* synthetisierte r-Protein S20 ist also in seinem Molekulargewicht und in den isoelektrischen Eigenschaften mit gereinigtem S20 identisch. Wie später gezeigt wird, kann das *in vitro* Produkt mit 16S rRNA komplexieren und entspricht also auch in dieser Eigenschaft dem *in vivo* Produkt.

3.2.4. Identifizierung des dapB Genprodukts

Auf Grund ihrer Selektion können die isolierten " λ dapB" Phagen das *dapB* Strukturgen spezifisch transduzieren. In allen Proben, die als Matrize DNA aus verschiedenen " λ dapB" Phagen enthielten, wurde *in vitro* ein Protein synthetisiert, das nach seinem Laufverhalten im SDS Gel ein größeres Molekulargewicht

als IRS hat (siehe Abbildung 1). Das Molekulargewicht von IRS beträgt nach verschiedenen Bestimmungen 110 000 [71], 112 000 [72] oder 114 000 [73] Dalton; im O'Farrell Gelsystem zeigt IRS jedoch ein Laufverhalten wie ein Protein von 107 000 Dalton Molekulargewicht [12]. Nach Ergebnissen von Tamir [74] hat die Dihydrodipicolinsäure Reduktase (dapB Genprodukt) ein Molekulargewicht von etwa 110 000. Das fragliche *in vitro* Produkt kann also durchaus mit DHPR identisch sein; den Beweis dafür lieferte folgender Versuch:

Vergleicht man die Proteinmuster auf O'Farrell-Gelen von Ganzzellextrakten der *E. coli* Stämme 64-2 und 64-2 dap, so stellt man fest, daß im Stamm 64-2 dap ein Protein fehlt, dessen Wanderungsposition in Abbildung 1E durch den unterbrochenen Kreis gekennzeichnet ist. Da der Stamm 64-2 dap die dapB17 Mutation des Stammes AT999 trägt und somit den Phagen Mu in das dapB Strukturgen integriert hat [75], ist zu erwarten, daß das entsprechende Protein im Stamm 64-2 dap fehlt.

3.2.5. Identifizierung der carA und carB Genprodukte

Der car Genort bei Minute 1 des *E. coli* Chromosoms [28] umfaßt zwei Bereiche, die für je eine Untereinheit der Carbamylphosphatsynthetase codieren [76]. Nach früheren Bestimmungen [77] hat das carA Genprodukt ein Molekulargewicht von 42 000, das carB Genprodukt von 130 000 Dalton, wobei allerdings die Genauigkeit dieser Bestimmungen unklar ist.

Die *in vivo* Komplementationsdaten von Buckel [29] zeigen, daß

λ ddapB257 die car Mutation im Stamm 64-2 car nicht komplementieren kann. Diese car Mutation stammt aus dem Stamm IG714 recA und wurde früher als pyrA53 bezeichnet. Sie wurde schon 1964 beschrieben [78]; ihr Genort liegt danach zwischen thr und leu, eine eingehendere Analyse dieser Mutation erfolgte bis heute jedoch nicht. Die car Mutation im Stamm 64-2 car kann also sowohl in den Strukturgenen carA und/oder carB lokalisiert sein.

Die hier erhaltenen Ergebnisse zeigen, daß bei Verwendung von DNA aus λ ddapB248 und λ ddapB265 als Matrize jeweils zwei Proteine mit einem Molekulargewicht von etwa 45 000 Dalton, beziehungsweise einem Molekulargewicht, das zwischen dem von IRS und DHPR liegt, synthetisiert werden; diese Proteine könnten also den carA und carB Genprodukten entsprechen. Bei Verwendung von DNA aus λ ddapB257 als Matrize des *in vitro* Systems wird zwar das vermutliche carA, nicht jedoch das vermutliche carB Genprodukt synthetisiert. Es liegt also die Vermutung nahe, daß die pyrA53 Mutation im Stamm 64-2 car nur den Genort carB betrifft. Da *in vitro* das carA Genprodukt unabhängig vom carB Genprodukt synthetisiert wird, und carAB ein Operon bilden [79], sollte die Transkriptionsrichtung von carA nach carB gerichtet sein. Unveröffentlichte Ergebnisse (zitiert in [80]) bestätigen diese Vermutung. Eine endgültige Identifizierung der Genprodukte von carA und carB war nicht möglich, da im Proteinmuster von Extrakten aus den *E. coli* Stämmen 64-2 und 64-2 car in den fraglichen Bereichen keine Unterschiede feststellbar waren. Dies mag daran liegen, daß die pyrA53 Mutation zu keiner elek-

trophoretischen Veränderung des Proteins führt.

3.3. Abhängigkeit der in vitro Syntheseaktivität des gekoppelten Transkriptions-/Translations-Systems von verschiedenen Faktoren

Die optimale Syntheseaktivität des in vitro Systems ist eine unabdingbare Voraussetzung, wenn Aussagen über die Regulation bestimmter Genprodukte gemacht werden sollen. Für das Ionenmilieu des in vitro Systems wurde diese Optimierung bereits von Zubay [35] durchgeführt. Im folgenden sind die Ergebnisse der Optimierung von verschiedenen anderen Komponenten und Bedingungen angegeben.

3.3.1. Zeitabhängigkeit der Syntheseaktivität

Aus den Ergebnissen der Abbildung 4 ist ersichtlich, daß die Synthese von IRS, r-Protein S20 und heiß TCA fällbarem Material über 60 min hin ansteigt, und daß von diesem Zeitpunkt an der endogene Abbau im Vergleich zur Neusynthese überwiegt. Als Standardzeit für die in vitro Synthese im gekoppelten System wurde deshalb 45 min gewählt. Diese Zeitabhängigkeit der Synthese veränderte sich nur unwesentlich, wenn die Inkubation bei 30, 34 oder 37°C durchgeführt wurde. Bei sehr langer Inkubation der Proben (> 12 h) war zwar bis zu fünfmal mehr Radioaktivität im heiß TCA fällbaren Material feststellbar, Sterilkontrollen wiesen jedoch darauf hin, daß dieser Effekt auf Wachstum von Mikro-

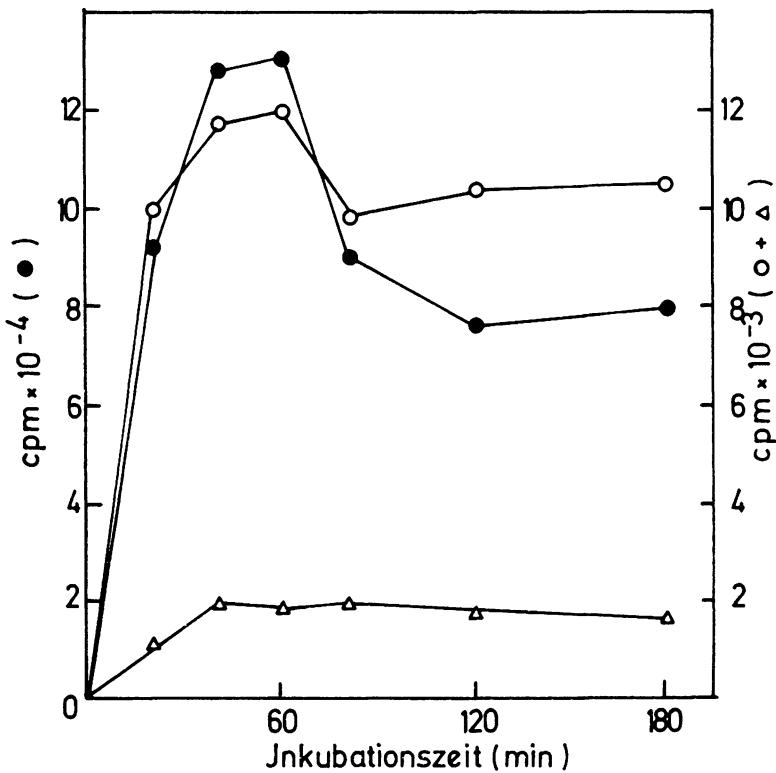


Abbildung 4:
Zeitabhängigkeit der Synthese im gekoppelten *in vitro* System
o: r-Protein S20; Δ: IRS; •: heiß TCA fällbares Material

organismen beruhte.

Da nach Mackie [70] r-Protein S20 aus einer Vorstufe synthetisiert werden soll, die *in vitro* 40 min lang gegenüber dem geöffneten S20 überwiegen soll, wurden auch Kurzzeitabhängigkeiten für die Synthese von S20 durchgeführt. In keinem von drei ver-

schiedenen Ansätzen konnte jedoch eine Vorstufen Produkt-Abhängigkeit für die Bildung des r-Proteins S20 nachgewiesen werden:

1. Werden Proben des *in vitro* Systems vor der S30 Zugabe 3 min bei 34°C vorinkubiert, so ist bereits 2 min nach Zugabe des S30 Extrakts Synthese von S20 feststellbar. Zur Auftrennung der *in vitro* Produkte wurde dazu das zweidimensionale Gel-System nach Kaltschmidt und Wittmann [47] verwendet.
2. Die *in vitro* Produkte aus einem gleichen Versuchsansatz wie unter (1) wurden an 16S rRNA komplexiert und die gebundenen Proteine, wie in [44] beschrieben, isoliert. Die Analyse dieser Produkte auf einem SDS Gradientengel zeigte wiederum keine Verzögerung des Beginns der Synthese von S20 (siehe Abbildung 5).
3. Auch die Analyse der *in vitro* Produkte von kurzzeitig inkubierten Proben auf dem O'Farrell Gelsystem zeigte keine zeitliche Verzögerung und keine Vorstufen Produkt-Abhängigkeit für die S20 Synthese.

Besonders das O'Farrell Gelsystem ist dabei zur Auftrennung von Proteinen, die kleine Ladungs- und Größenunterschiede besitzen, gut geeignet [49]. In diesem System sollte also die Vorstufe von S20, die ja lediglich ein N-Formylmethionin am N-Terminus des gereiften S20 trägt [70], vom gereiften Protein abtrennbar sein. Diese gegensätzlichen Ergebnisse lassen sich möglicherweise damit erklären, daß in dieser und Mackies [70] Arbeit verschiedene *E. coli* Stämme zur Bereitung der S30 Extrakte verwendet werden.

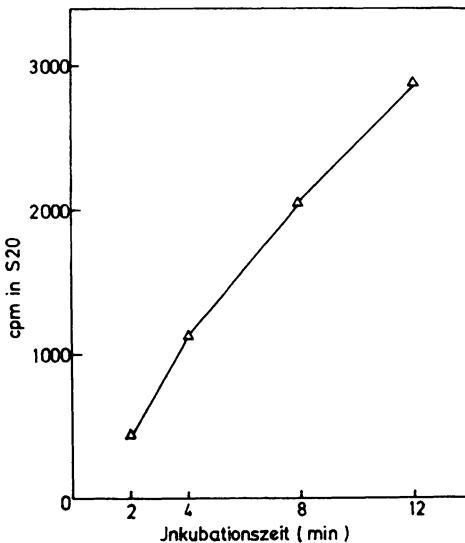


Abbildung 5:

Kurzzeitabhängigkeit der Synthese des r-Proteins S20 im gekoppelten in vitro System.

Angegeben ist die jeweilige Menge an in vitro synthetisiertem Material, das identisches Laufverhalten auf einem 12,5 - 25 % Acrylamid SDS Gel mit gereinigtem S20 zeigt.

3.3.2. Abhängigkeit der Synthese von der DNA und der S30 Extrakt-Konzentration

Das gekoppelte in vitro System ist DNA abhängig; ohne Zusatz von DNA liegt die Gesamtsynthese bei zirka 10 - 30 % verglichen mit Proben, die 100 µg DNA/ml enthielten. Diese Grundaktivität des S30 Extrakts ist auf Kontamination mit chromosomaler DNA zurückzuführen, weil: a) diese Grundaktivität in verschiedenen S30 Präparationen unterschiedlich groß ist und b) die hierbei synthetisierten Produkte identisch sind mit den in

vivo in großer Menge synthetisierten zellulären Produkten (wie EFTu). Die Gesamtsynthese (heiß TCA fällbares Material) und die Synthese von IRS und S2O sind linear abhängig von der eingesetzten DNA Menge in einem Bereich von 0,5 µg/ml bis 200 µg/ml, als Standardkonzentration wurde deshalb 100 µg DNA/ml Inkubationsgemisch verwendet. Dieses Ergebnis läßt bereits vermuten, daß das gekoppelte *in vitro* System zumindest nur schwach RNAP abhängig ist, wie im Abschnitt 3.4. auch bewiesen wird.

Das *in vitro* System ist erwartungsgemäß abhängig von der Menge des eingesetzten S3O Extrakts; aus Tabelle 4 ist diese Abhängigkeit ersichtlich für eine DNA Konzentration von 100 µg/ml. Im Standardtest wurden 6000 µg S3O Protein/ml Inkubationsgemisch verwendet.

Tabelle 4:
Abhängigkeit der Gesamtsyntheseaktivität des gekoppelten *in vitro* Systems von der Menge zugesetzten S3O Proteins.

S3O Protein zugesetzt (µg/ml Inkubationsgemisch)	Syntheseaktivität (%)
6 000	100
3 600	61
1 200	12
600	< 4

3.3.3. Temperatur- und tRNA-Abhängigkeit der in vitro Synthese

Die Temperaturabhängigkeit der Synthese von IRS und S2O zeigt ein klares Maximum bei 34°C (Abb. 6); dies gilt auch für die Gesamtsynthese (nicht dargestellt). Auffallend ist, daß in niedrigen Temperaturbereichen S2O relativ zu IRS in größerer

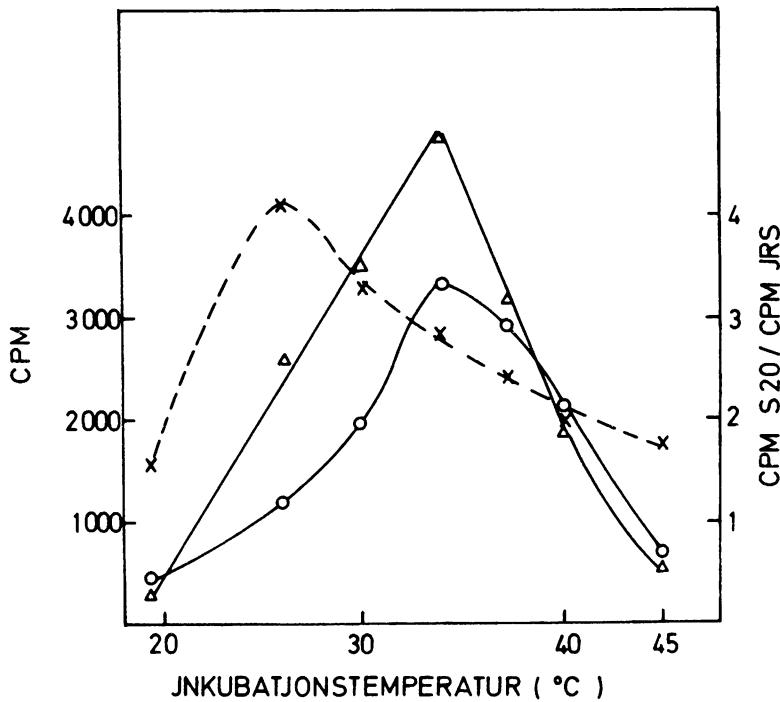


Abbildung 6:
Temperaturabhängigkeit der in vitro Synthese.
Die einzelnen Proben wurden bei 19, 26, 30, 34, 37, 40 und
45°C im Wasserbad inkubiert.

O: IRS; Δ: S2O; X: Verhältnis $\frac{\text{cpm in S2O}}{\text{cpm in IRS}}$

Menge synthetisiert wird. Dieser Befund kann damit erklärt werden, daß die entsprechenden Promotoren eine unterschiedliche "Stärke" haben; Berechnungen [82] und Messungen [83, 84] für andere Systeme machen eine solche Temperaturabhängigkeit auch wahrscheinlich. Für alle weiteren Versuche wurde hier eine Inkubationstemperatur von 34°C gewählt.

Aus Abbildung 7 ist zu entnehmen, daß die Synthese von S20 bei Zusatz von 20 µg tRNA/ml Inkubationsgemisch optimal ist, während dieser Wert für IRS (und heiß TCA fällbarem Material, nicht gezeigt) bei 60 bis 80 µg tRNA/ml liegt.

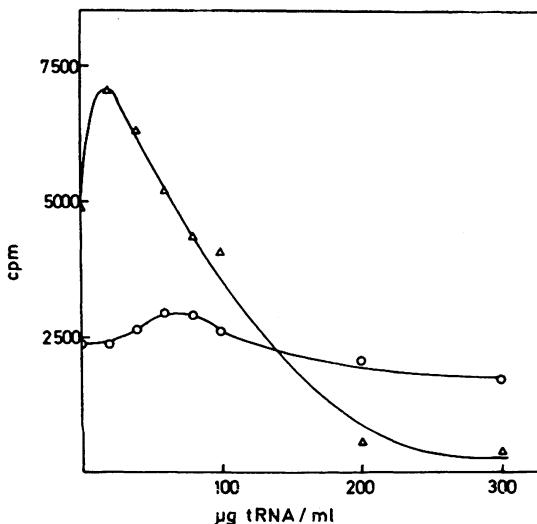


Abbildung 7:
tRNA Abhängigkeit der in vitro Synthese
O: IRS; Δ: S20

Diese Ergebnisse sind also im Widerspruch zu denen von Zubay [35], sind aber auch in gewissem Maße von der jeweiligen tRNA Präparation abhängig. Weshalb die S20 Synthese bei höheren tRNA Konzentrationen stark gehemmt wird, ist unklar; es sei jedoch darauf hingewiesen, daß eine Auftrennung von 200 µg tRNA im 3 % Acrylamid-SDS Gel nach Gegenheimer et al. [53] und anschließende "Färbung" mit Ethidiumbromid keinerlei Hinweise auf eine eventuelle Verunreinigung der tRNA mit rRNA erbrachte. Die weiteren Versuche wurden deshalb bei einer tRNA Konzentration von 50 µg/ml Inkubationsgemisch durchgeführt.

3.3.4. Abhängigkeit der *in vitro* Synthese von anderen Faktoren

Nach Zubay ist für jede S30 Präparation die optimale Mg^{++} Ionen Konzentration für die *in vitro* Synthese zu bestimmen. In dieser Arbeit wurde als optimale Konzentration für verschiedene S30 Präparationen - auch aus verschiedenen *E. coli* Stämmen - jeweils ein Wert von 15 mM gefunden.

Auch für die K^+ Ionen Konzentration ergab sich für alle S30 Präparationen ein identischer optimaler Wert, nämlich 55 mM. Dabei wurde eine lineare und parallele Abhängigkeit für die Synthese von IRS und S20 im Bereich zwischen 5 und 55 mM festgestellt. Da zum *in vitro* System kein "Energie"-regenerierendes System zugegeben wird, muß ATP in hohem Überschub verwendet werden. Im Normalfall wurde 2,2 mM ATP zugesetzt, was, wie Abbildung 8 zeigt, einem etwa 5- bis 10-fachen Überschub an ATP entspricht. Wurde dagegen die Synthese von ^{32}P markiertem ppGpp gemessen,

so wurde die ATP Konzentration auf 0,44 mM reduziert, um einen genügend hohen Einbau von ^{32}P in ppGpp zu erreichen; die Gesamtsynthese des Systems wurde davon jedoch nicht beeinflußt (Abbildung 8).

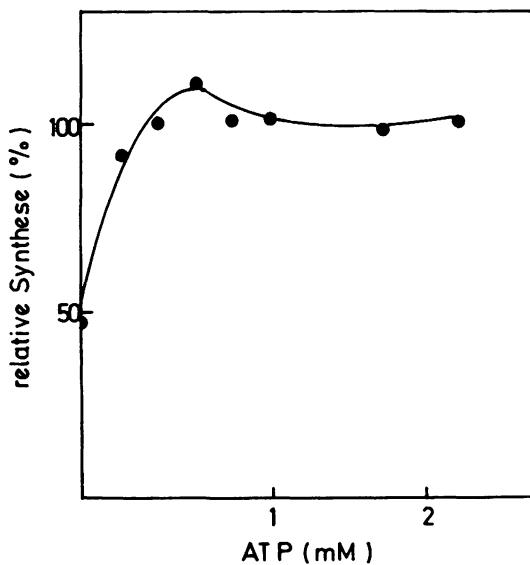


Abbildung 8:
ATP Abhängigkeit der Gesamtsynthese in vitro

3.4. Charakterisierung des entkoppelten in vitro Systems

Zur Analyse, ob mögliche Effektoren auf der Ebene der Transkription oder Translation wirken, wurde das gekoppelte in vitro System in zwei Teilsysteme getrennt, die spezifisch für Transkription beziehungsweise Translation sind. Eine solche Trennung des Systems wäre erreicht, wenn man dem in vitro System zwar S30 Extrakt, jedoch keine Aminosäuren zusetzt, um zunächst nur Transkription zu erlauben. Für den anschließenden Translationsschritt würde dann die Zugabe von Rifampicin zur Hemmung der RNAP, und Zusatz von Aminosäuren zum Start der Translation genügen. Ein solcher Ansatz war jedoch nicht durchführbar, da im in vitro System eine hohe proteolytische Aktivität vorliegt. Werden nämlich die vier Aminosäuren Tryptophan, Isoleucin, Methionin und Lysin nicht zum Inkubationsgemisch gegeben, so ist die Syntheseaktivität dadurch nicht beeinträchtigt.

Das hier verwendete Transkriptionssystem enthielt alle Bestandteile des gekoppelten in vitro Systems, jedoch wurden nicht 6000 µg S30 Protein, sondern 4000 µg S100 Protein pro ml Inkubationsgemisch zugegeben. Wurden nur die oberen drei Viertel des Überstandes nach einer zweistündigen Zentrifugation des S30 Extrakts als S100 Fraktion verwendet, so war die RNAP Abhängigkeit der in vitro Synthese wesentlich stärker ausgeprägt als bei Verwendung des gesamten Überstandes (Tabelle 5). Gleichzeitig war die Leerwertsyntheseaktivität (d.h. ohne Zugabe von Ribosomen) eines solchen Gesamtextrakts wesentlich höher, so

Tabelle 5:

Vergleich der in vitro Synthese im gekoppelten und entkoppelten System.

Die Zugabe erfolgte zu Proben, die alle Bestandteile des gekoppelten Systems außer S30 Extrakt enthielten. Die zugegebenen 70S Ribosomen waren zweimal abzentrifugiert. S100a: nur die oberen drei Viertel des Überstandes einer zweistündigen 100 000 g Zentrifugation verwendet; S100b: gesamter Überstand einer zweistündigen 100 000 g Zentrifugation verwendet; U: Einheiten nach [85].

Zugabe	% Synthese von heiß TCA präzipitierbarem Material
-	6
S30	100
S30 + 0,4 U RNAP	115
S30 + 4 U RNAP	176
S100a	3
70s	2
S100a+ 70s	124
S100a + 70s + 0,4 U RNAP	274
S100a + 70s + 4U RNAP	492
S100b	23
S100b + 70s	131
S100b + 70s + 4 U RNAP	268

daß zu schließen ist, daß im untersten Viertel des S100 Überstandes RNAP und Ribosomen im Vergleich zum restlichen Überstand angereichert sind. Für die weiteren Versuche wurden deswegen nur die oberen drei Viertel des Überstandes als S100 Fraktion verwendet. Die unterschiedliche Gesamtaktivität bei der S100 Extrakte kann dadurch erklärt werden, daß im untersten

Viertel des S100 Überstandes möglicherweise hemmende Bestandteile oder Aktivitäten angereichert sind. Die Transkription wurde beendet durch Zugabe von 2 µg Rifampicin/ml Inkubationsgemisch; bereits 0,2 µg Rifampicin/ml hemmen die Transkription um über 90 %.

Wie Abbildung 9 zeigt, ist die Transkription über mindestens 10 min linear von der Inkubationszeit abhängig. In dieser Arbeit

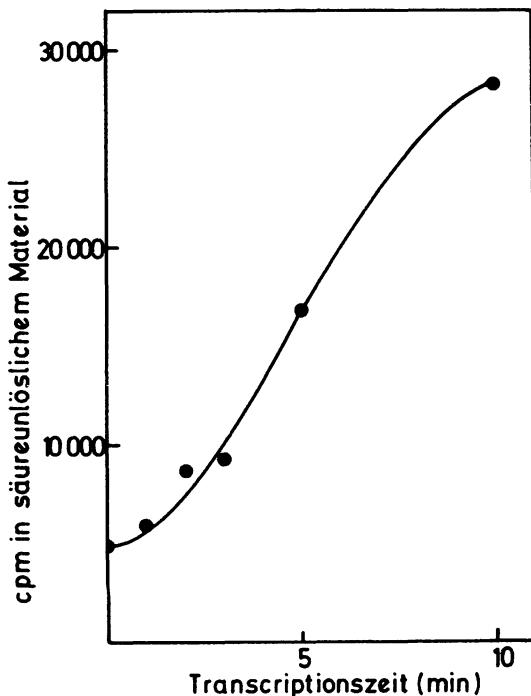


Abbildung 9:
Zeitabhängigkeit der Transkription im entkoppelten System.
Die Transkription wurde nach verschiedenen Zeiten, wie in 3.4.
beschrieben, beendet. Die Translation betrug für alle Proben
45 min.

wurden 5 min Transkriptionszeit für das entkoppelte in vitro System gewählt. Direkt nach Beendigung der Transkription durch den Zusatz von Rifampicin wurde das Translationssystem durch die Zugabe von 1500 µg 70S Ribosomen/ml Inkubationsgemisch gestartet. Rifampicin wurde zwar in Methanol gelöst, die Endkonzentration an Methanol im in vitro System betrug jedoch nur 0.1 %. Konzentrationen von über 0,5 % Methanol erzeugen unspezifische Effekte im in vitro System (nicht gezeigt). Wurden die zugegebenen Ribosomen nicht wie in 2.3.1. beschrieben präpariert, sondern der Niederschlag samt der bräunlichen Deckschicht nach der ersten zweistündigen Zentrifugation bei 100 000 g verwendet, so war a) die Gesamtaktivität des Systems auf 60 % verringert und b) die Leerwertsyntheseaktivität merklich erhöht (34 %). Die Translationsaktivität war über 60 min linear abhängig von der Inkubationszeit, sowohl für eine vorausgegangene Transkriptionszeit von 5 oder 10 min. Im weiteren wurden 45 min Translationszeit im entkoppelten System verwendet. Das Translationssystem ist durch Zusatz von 20 µg Streptomycin/ml Inkubationsgemisch fast vollständig hemmbar, während ein Zusatz von bis zu 200 µg Rifampicin/ml keinen Effekt auf die Translationsaktivität zeigt.

3.5. Regulation der in vitro Synthese durch unübliche Nucleotidide

3.5.1. Einfluß von ppGpp auf die in vitro Synthese

Aus Abbildung 10 geht hervor, daß die Synthese von IRS im gekoppelten in vitro System bei Zusatz von physiologischen Kon-

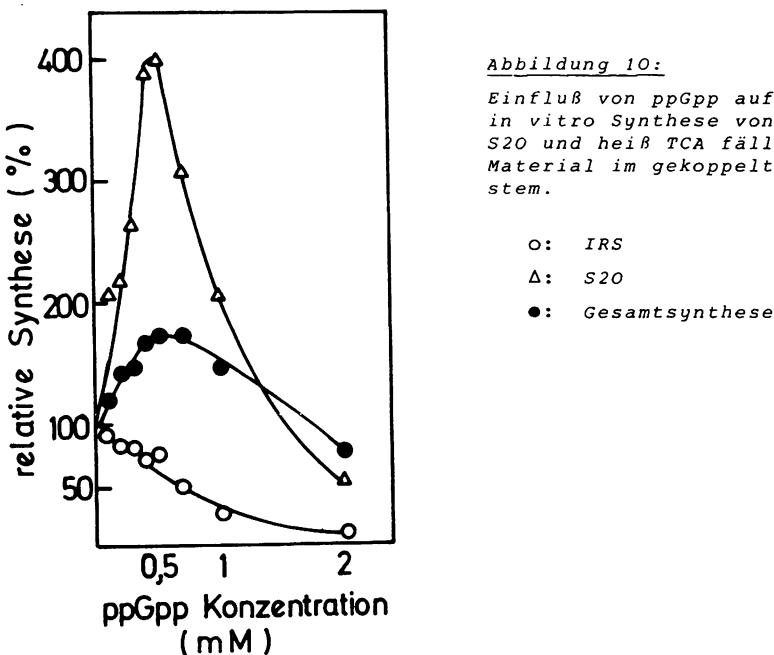


Abbildung 10:

Einfluß von ppGpp auf die *in vitro* Synthese von IRS, S20 und heiß TCA fällbarem Material im gekoppelten System.

- : IRS
- △: S20
- : Gesamtsynthese

zentrationen an ppGpp um den Faktor 4 dereprimiert wird; die Synthese des r-Proteins S20 wird ebenso eindeutig reprimiert. Die Synthese des dapB Genprodukts wird bei 0,2 mM ppGpp leicht dereprimiert (140 %), ist jedoch bei einer Konzentration von 0,4 mM ppGpp bereits auf 40 % Restsynthese reprimiert. Der hauptsächliche regulatorische Effekt von ppGpp liegt (zumindest für IRS und S20) auf der Ebene der Transkription (siehe Abbildung 11).

Der inhibierende Effekt von ppGpp auf die Translation kann nach einem von Gallant [86] vorgeschlagenem Modell für den Wir-

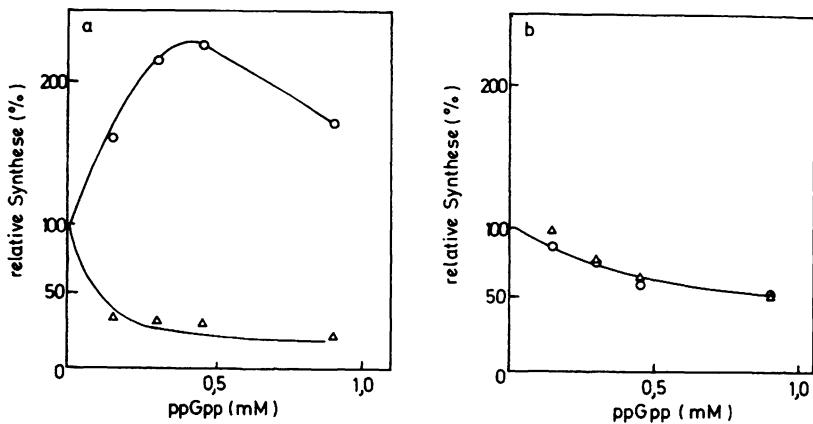


Abbildung 11:

Einfluß von ppGpp auf die *in vitro* Synthese im entkoppelten *in vitro* System.

a: ppGpp wurde ins Transkriptionssystem zugegeben;

b: ppGpp wurde ins Translationssystem zugegeben.

O: IRS; Δ: S20

kungsmechanismus von ppGpp darauf beruhen, daß dieses Nucleotid als GTP-Kompetitor die Aktivität von EFTu und EFG beeinflußt und so im *in vitro* System eine Verlangsamung der Translation bewirkt. Daß ppGpp Einflüsse auf die Translationsrate hat, wurde von O'Farrell [87] in einer sehr eleganten Arbeit nachgewiesen.

Die Repression der Synthese von r-Proteinen durch ppGpp konnte damit bisher in allen untersuchten Fällen (für mehr als 30 r-Proteine) demonstriert werden [88, 89]. Diese *in vitro* gewonnenen Ergebnisse stimmen gut damit überein, daß *in vivo* die Synthese von r-Proteinen der "stringent" Kontrolle unterliegt [90].

Daß ppGpp die Synthese von r-Proteinen auf der Ebene der Transkription beeinflußt, wurde bisher nur für S20 (diese Arbeit) sowie für die Proteine L10 und L12 [88] nachgewiesen. Eine Wirkung von ppGpp auf die Transkription wurde jedoch außerdem aufgezeigt für die *in vitro* Synthese des Elongationsfaktors Tu [66, 68] und der Enzyme des his [91] sowie des trp und des lac Operons [92]. In den beiden letztgenannten Arbeiten wurde eine Derepression beobachtet, was wiederum in gutem Einklang steht mit *in vivo* Daten [93], wonach bei Zusatz von ppGpp zu permeabilisierten *E. coli* Zellen die Synthese von Tryptophanase und β -Galaktosidase auf der Ebene der Transkription stimuliert wird.

Eine durch ppGpp hervorgerufene Derepression der *in vitro* Synthese von Aminoacyl-tRNA-Synthetasen wurde bisher nur für IRS berichtet [94], jedoch kürzlich auch für die Phenylalanyl- und Threonyl-tRNA-Synthetase gefunden (Elhardt und Böck, unveröffentlicht). In vivo ist eine Derepression der Synthese von Aminoacyl-tRNA-Synthetasen beobachtbar, wenn die entsprechende Aminosäure das Wachstum limitiert. Besonders für IRS ist eine solche Regulation nachweisbar [95, 96], während sie für andere Aminoacyl-tRNA-Synthetasen nicht so ausgeprägt zu beobachten ist [97]. Ob sich die intrazelluläre ppGpp Konzentration während solcher teilrestriktiver Wachstumsbedingungen ändert, wurde in den entsprechenden Arbeiten jedoch nicht untersucht.

3.5.2. Einfluß von cAMP auf die in vitro Synthese

Tabelle 6 gibt eine Zusammenfassung der beobachteten Effekte von ppGpp, cAMP und cGMP auf das gekoppelte in vitro System wieder. Diese Ergebnisse wurden bei Verwendung von cAMP und cGMP der Firma Sigma erzielt; cAMP von Boehringer (Mannheim) hemmte in einer Konzentration von 50 µM das in vitro System auf 20 % Restsynthese. Dieser unspezifische Effekt dürfte auf Verunreinigungen der Substanz mit Metallionen zurückzuführen sein [98].

Es fällt auf, daß die von cAMP hervorgerufene Stimulierung der Synthese für die hier angegebenen Proteine etwa gleich groß ist.

Tabelle 6:

Einfluß von ppGpp, cAMP und cGMP auf die in vitro Synthese im gekoppelten System.

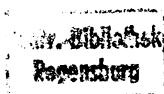
Die getesteten Konzentrationen lagen für die einzelnen Nucleotid zwischen 10 - 2500 µM (ppGpp); 0,005 - 500 µM (cAMP) und 0,00005 - 50 µM (cGMP)

	Zusatz von ppGpp	Zusatz von cAMP	Zusatz von cGMP
Synthese von S20	20 % Restsynthese bei 1 mM	stimuliert auf 160 % bei 50 µM	leichte Hemmung bei 0,5 nM
Synthese von IRS	stimuliert auf 300 - 400 % bei 0,4 mM	stimuliert auf 200 % bei 50 µM	kein Effekt
Synthese von dapB (Dihydridipico-linsäurereductase)	40 % Restsynthese bei 0,4 mM	stimuliert auf 150 % bei 0,5 µM	kein Effekt

Auch die Synthese von drei (nicht identifizierten) λ spezifischen Proteinen wurde um einen Faktor von 1,4 bis 2, und die Gesamtsynthese um einen Faktor von 1,6 stimuliert, jeweils bei einer cAMP Konzentration von 50 μM .

Die intrazellulären cAMP Konzentrationen liegen je nach Wachstumsbedingungen zwischen 0,2 und 10 μM [83, 99]. Die hier in vitro beobachteten Effekte treten demnach bei cAMP Konzentrationen auf, die um eine bis zwei Größenordnungen über den in vivo vorkommenden liegen. Weiterhin sind die hier beobachteten in vitro Effekte wesentlich geringer als die für cAMP regulierten Systeme normalerweise gefundenen (ca. 30fache Stimulierung der β -Galactosidase Synthese [100]; bis zu 12fache Stimulierung der Galaktosidase Synthese [101]).

cAMP scheint also hier einen relativ unspezifisch stimulierenden Effekt auf die Synthese im in vitro System zu haben; ob dieser Effekt im Zusammenhang steht mit der kürzlich berichteten Tatsache, daß cAMP einen Modulator für Polarität darstellen kann [102], wurde nicht untersucht. Die hier erhaltenen Ergebnisse sagen eindeutig aus, daß cAMP nicht benötigt wird für die in vitro Synthese von DHPR, IRS und r-Protein S20; ähnliche Befunde existieren für die r-Proteine L7/12 [88] und L10 und L12 [103].



3.5.3. Einfluß von cGMP auf die in vitro Synthese

Für die drei hier getesteten Proteine hat cGMP nur einen leicht hemmenden Einfluß auf die in vitro Synthese von S20 (siehe Tabelle 6). Auch andere bisher gefundene in vivo und in vitro Ergebnisse lassen noch keine Aussagen über (eine) mögliche Rolle(n) von cGMP zu (siehe kurze Zusammenfassung in [83,104]).

3.6. Versuche, eine mögliche Autoregulation der Synthese von IRS in vitro nachzuweisen

3.6.1. Bisher gefundene Phänomene zur Regulation von Aminoacyl-tRNA-Synthetasen

Die durch Aminoacyl-tRNA-Synthetasen katalysierten Reaktionen sind als Endreaktionen der Aminosäuren-Biosynthesewege und gleichzeitig als einleitende Reaktionen der Proteinbiosynthese aufzufassen. Über die Regulation dieser Enzyme ist bisher sehr wenig bekannt. Als gesichert kann zur Zeit nur angesehen werden, daß die Syntheserate dieser Proteine linear abhängig ist von der Wachstumsrate der Zellen. Eine solche Abhängigkeit wurde erstmals in der Arbeitsgruppe von Neidhardt gefunden und als "metabolic control" bezeichnet [14]. Sie wurde dann für weitere zehn untersuchte Aminoacyl-tRNA-Synthetasen, darunter auch IRS, demonstriert [12]. Ein zweiter Regulationsmechanismus wurde sicher nachgewiesen für die Arginyl- [105], Phenylalanyl- [96] und Isoleucyl-tRNA-Synthetase [95]; hier wird Derepression der Synthese

beobachtet, wenn die entsprechende Aminosäure das Wachstum limitiert.

In einem Übersichtsartikel diskutiert Neidhardt [97] drei mögliche Modelle zur Regulation von Aminoacyl-tRNA-Synthetasen: Eine direkte Kopplung der Synthese von Aminoacyl-tRNA-Synthetasen und Aminosäurenbiosyntheseenzymen, die jedoch unwahrscheinlich zu sein scheint; eine zweite Möglichkeit wäre die Existenz einer multiplen Repressionskontrolle ihrer Synthese. Im dritten Modell wird gefordert, daß eine der im zyklischen Aminoacylierungskreislauf vorkommenden "Formen" der Aminoacyl-tRNA-Synthetasen als Autorepressor für die Synthese wirke. Diskutiert wird dieses Modell für die IRS, für die bereits 1969 [106] ein solcher Aminoacylierungsmechanismus postuliert wurde. Mit Hilfe von *in vitro* Experimenten sollte die Existenz einer solchen Autoregulation nachweisbar sein.

3.6.2. Zusatz von IRS zum gekoppelten *in vitro* System

Nach dem oben beschriebenen Autoregulationsmodell für die Synthese von IRS sollte ein erhöhter Spiegel an IRS oder einer ihrer Formen die Synthese von IRS hemmen. Eine solche Situation kann *in vitro* dadurch simuliert werden, daß dem System gereinigte IRS zugesetzt wird. Wie jedoch Abbildung 12 beweist, beeinflußt der Zusatz von IRS weder die Synthese von IRS noch von S2O. Die hier verwendete IRS Präparation ist im Aminoacylierungstest aktiv; dieselbe Präparation wurde auch für den in Tabelle 3 wiedergegebenen Ansatz verwendet, woraus zu schließen

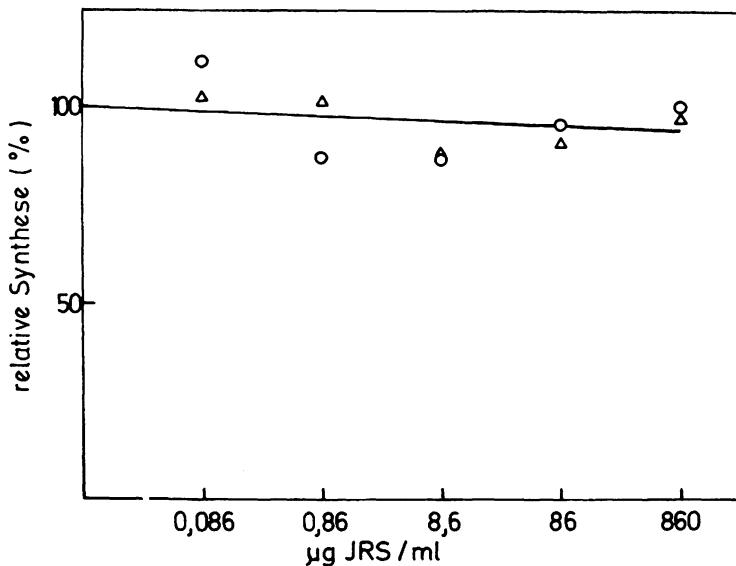


Abbildung 12:

Abhängigkeit der *in vitro* Synthese von IRS und S20 von der Menge an zugesetzter IRS.

O: IRS; Δ: S20

ist, daß sich zugesetzte und synthetisierte IRS zumindest in ihren immunologischen Eigenschaften entsprechen. Die eingesetzten Mengen an IRS umfassen auf jeden Fall die in der Zelle existierenden physiologischen Konzentrationen des Enzyms. Nach Messungen von Neidhardt et al. [12] macht IRS in mit einer Wachstumsrate von $1,03\text{ (h}^{-1}\text{)}$ wachsenden Zellen etwa 0,2 % der Gesamtproteinmenge aus. Dies entspricht im *in vitro* System bei einem Zusatz von 6000 μg S20 Protein/ml einer IRS Menge von 12 μg/ml.

Die Tatsache, daß Zusatz von IRS zum in vitro System die Synthese von IRS nicht beeinflußt, läßt für sich allein genommen jedoch noch keinen Schluß auf das Fehlen von Autoregulation für dieses Enzym zu, da die im S3O Extrakt vorhandene Enzymmenge ausreichen könnte, um eine maximale Repression zu erzeugen. Weiterer Zusatz von IRS würde dann natürlich keinen Regulationseffekt mehr auslösen. Im nächsten Versuch wurde deshalb das in vitro System in bezug auf IRS-Menge beziehungsweise Aktivität limitiert.

3.6.3. Limitierung des in vitro Systems an IRS durch Zugabe von Anti IRS Antiserum

Die Limitierung des in vitro Systems an IRS wurde erzeugt durch Zugabe von Anti IRS Antiserum zu Proben des in vitro Systems vor der Inkubation. Aus Tabelle 7 ist ersichtlich, daß die Limi-

Tabelle 7:
Einfluß von Anti IRS Antiserum auf die Gesamtsynthese im gekoppelten System

Zusatz von Anti IRS Antiserum vor der Inkubation (μ l/Test)	Zusatz von IRS vor der Inkubation (mg/ml)	Gesamtaktivität (%)
-	-	100
1	-	93
5	-	24
10	-	8
5	0,86	45
5	8,6	83

tierung spezifisch für IRS ist, da die Hemmung durch Zugabe von gereinigter IRS zu einem großen Teil revertierbar ist. In Abbildung 13 sind die Ergebnisse von Experimenten dargestellt, bei denen die Aktivität des in vitro Systems limitiert wurde durch Zugabe von Anti IRS Antiserum und zur Kontrolle durch

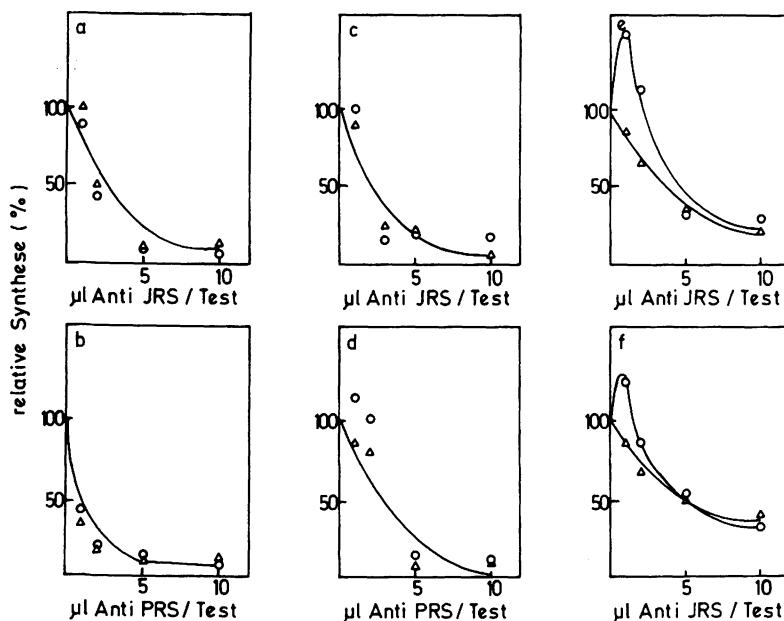


Abbildung 13:

Synthese von IRS und S20 bei Limitierung des in vitro Systems durch Zusatz von Anti Isoleucyl-tRNA-Synthetase oder Anti Phenylalanyl-tRNA-Synthetase Antiserum.

Das Testvolumen betrug jeweils 50 μ l; Anti IRS: Anti Isoleucyl-tRNA-Synthetase Antiserum; Anti PRS: Anti Phenylalanyl-tRNA-Synthetase Antiserum. Die verwendeten S30 Extrakt Präparationen stammten aus folgenden *E. coli* Stämmen: a und b: CP78; c und d: CP79; e: NF161 O: IRS Δ: S20

Anti Phenylalanyl-tRNA-Synthetase Antiserum. Aus Gründen der Klarheit der Darstellung sind in diesen Kurven die jeweiligen Werte für die Gesamtsynthese nicht angegeben, sie sind innerhalb kleiner Fehlergrenzen identisch mit den Werten für S20. Aus den in Abbildung 13 a-d erhaltenen Kurven ist zu ersehen, daß die Hemmung der in vitro Synthese von IRS und S20 in jeweils gleichem Ausmaß geschieht. Würde für die Synthese von IRS ein autoregulatorischer Mechanismus vorliegen, so wäre unter den in 3.6.2. genannten Voraussetzungen zu erwarten, daß die Synthese dieses Proteins stärker gehemmt wird als die von S20.

Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß für die in vitro Synthese von IRS kein Hinweis auf einen autoregulatorischen Mechanismus erhalten werden kann.

Die Beurteilung der in Abbildung 13 dargestellten Ergebnisse trifft jedoch auf eine Schwierigkeit: Limitierung der Proteinsynthese durch Hemmung der IRS sollte zu einer Akkumulation unbeladener tRNA^{Ile} führen, eine Voraussetzung für die Synthese von ppGpp sowohl unter in vivo als auch in vitro Bedingungen [27, 107]. Eine endogene Synthese von ppGpp könnte nun einen möglichen autoregulatorischen Effekt überlagern oder sogar egalisieren. Um dies zu untersuchen, wurden endogene Synthese und Abbau von ppGpp unter den experimentellen Bedingungen der Abbildung 13 untersucht.

3.6.4. Abbau und Synthese von ppGpp im in vitro System

Der Abbau von ppGpp ist, wie das in Abbildung 14 dargestellte Ergebnis beweist, zumindest während der in dieser Arbeit gewählten Inkubationszeit sehr gering. Das hierbei eingesetzte ^{32}P markierte ppGpp ist im in vitro System aktiv, da die Synthese von IRS bei einer Konzentration von 0,2 mM dieser Präparation um den Faktor 1,9 stimuliert wird. Das ^{32}P markierte Material hatte außerdem gleiche Laufeigenschaften wie authentisches ppGpp in einem eindimensionalen und einem zweidimensionalen Dünnschicht Chromatographiesystem. Die Abbaurate war für drei verschiedene ppGpp Konzentrationen (0,05 mM; 0,2 mM;

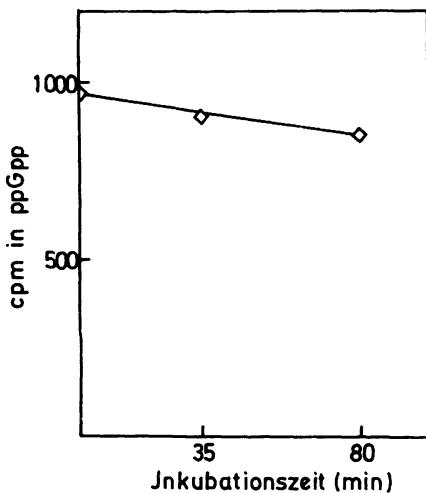


Abbildung 14:

Abbau von ^{32}P markiertem ppGpp (2 mM) im gekoppelten in vitro System.

1 M Ameisensäureextrakte des in vitro Systems wurden über eindimensionale Dünnschichtchromatographie aufgetrennt.

0,5 mM) konstant.

Nach Heinemeyer und Richter [108] existiert in Rohextrakten des *E. coli* Stammes CP78 (und in geringem Maße auch des Stammes CP79) eine ppGpp abbauende Aktivität, die innerhalb von 2 min über 50 % des zugesetzten ppGpp (dort 0,2 mM) abbauen kann. In unserem Fall war diese Aktivität nicht feststellbar, da sie: 1) wärmelabil ist [108] und deshalb während der 80 min Vorinkubation des S30 Extrakte verschwindet; 2) Mn⁺⁺ abhängig ist [109] und deshalb im Zubay System nicht wirksam sein sollte.

Das Fehlen einer Derepression der Synthese von IRS in den in Abbildung 13 a-d gezeigten Versuchen kann auch auf eine zu geringe in vitro Synthese von ppGpp zurückzuführen sein. Um eine solche Synthese zu messen, wurde die ATP Konzentration von 2,2 auf 0,44 mM reduziert und 10 µCi ³²P/50 µl Inkubationsgemisch zugegeben. Bereits nach 5 min Inkubation bei 34°C war Austausch des zugesetzten ³²P mit den verschiedenen Nucleotidphosphaten erfolgt, und synthetisiertes ppGpp nachweisbar. Seine Identität wurde wiederum durch Co-Chromatographie mit authentischer Substanz im ein- und im zweidimensionalem System nachgewiesen.

Da im in vitro System ein sehr rascher Austausch des zugesetzten ³²P mit allen anfangs unmarkierten Nucleotidphosphaten eintritt, war eine Konzentrationsbestimmung des synthetisierten ppGpp nicht möglich. Der in vitro gefundene relative Basalspiegel von ppGpp (Tabelle 8) entspricht den in vivo gefundenen Verhältnissen jedoch relativ gut. Nach Laffler und Gallant [110]

Tabelle 8:

In vitro Synthese von ppGpp durch S30 Extrakte aus verschiedenen E. coli Stämmen.

Die Inkubationszeit betrug 25 min; die angegebenen Werte sind berechnet auf gleiche Mengen (je 6000 µg) S30 Extrakt Protein/ml Inkubationsansatz.

Stamm verwendet für S30 Präparation	relevanter Genotyp	cpm in ppGpp	%
CP 78	rel ⁺	487	100
CP 79	rel ⁻	459	94
NF 161	spot ⁻ rel ⁺	1327	272
NF 162	spot ⁻ rel ⁻	795	163

hat nämlich ein relA⁺spot⁻ Stamm einen vierfach erhöhten Basalspiegel an ppGpp im Vergleich zu einem relA⁺spot⁺ Stamm, während dieses Verhältnis für einen relA⁻spot⁻ Stamm bei 1,8 liegt.

Einen Hinweis, daß die Synthese von ppGpp zu gering ist, um bei Limitierung des in vitro Systems durch die Hemmung der Isoleucyl- oder Phenylalanyl-tRNA-Synthetase eine Derepression der in vitro Synthese von IRS zu verursachen, liefert das Ergebnis der in Abbildung 13 e und f dargestellten Versuche. Die geforderte Derepression der IRS Synthese ist nämlich beobachtbar, wenn ein S30 Extrakt verwendet wird, der erhöhte Basalspiegel an ppGpp synthetisieren kann.

3.6.5. Erzeugung einer stringent Kontrollsituation im in vitro System

Die in vitro Synthese von ppGpp kann bei Limitierung des Systems durch Antikörper-Zugabe um etwa den Faktor 1,5 tatsächlich erhöht werden (siehe Tabelle 9). Eine solche Steigerung ist bei Verwendung eines S30 Extrakts aus CP78 offensichtlich nicht ausreichend um eine meßbare Derepression der Synthese von IRS zu beobachten (Abb. 13). Wird jedoch S30 Extrakt des Stammes NF161 verwendet, so kann der ppGpp Basalspiegel im Vergleich zu Stamm CP78 um einen Faktor von 2,88 erhöht und eine signifikante Derepression der Synthese von IRS (Abb. 13) erreicht werden.

Tabelle 9:

In vitro Synthese von ppGpp bei teilweiser Limitierung des Systems.

*Die Proben wurden 20 min bei 34°C inkubiert; angegeben sind jeweils die Bedingungen, die maximale ppGpp Produktion erbrachten.
a: bei einer EDTA Konzentration von 2 mM ist die Gesamtsynthese (ohne Zusatz von Anti IRS Antiserum) bereits auf 57 % gehemmt.*

Anti IRS Antiserum zugesetzt vor Inkubation (μ l/50 μ l Testvolumen)	Gesamtsynthese (%)	ppGpp Synthese (%)	Stamm verwendet für S30 Präparation
-	100	100	CP78
3	61	142	CP78
-	100	100	NF161
3	54	150	NF161
3 + EDTA (2 mM)	48 ^a	238	NF161

Durch Veränderung eines Parameters - der Konzentration an aktiver IRS - ist damit eine Kontrollsituation erzeugt worden, die zumindest einer schwachen "stringent" Regulation entspricht. Dies ist deshalb zu betonen, weil alle bisher veröffentlichten *in vitro* Experimente, die die stringent Kontrolle simulierten, über Zusatz von ppGpp erfolgten, und den *in vivo* Bedingungen, zumindest was den Beladungsgrad von tRNA angeht, nicht entsprechen.

Wie Tabelle 9 zeigt, kann die *in vitro* Synthese von ppGpp durch Zusatz von EDTA weiter erhöht werden. Die hierzu nötigen EDTA Konzentrationen limitieren die Gesamtsynthese aber bereits auf 57 % und steigern ohne Zusatz von Anti IRS Antiserum die ppGpp Synthese auf 170 %.

3.7. Versuche zur Autoregulation des r-Proteins S20

3.7.1. Hinweise aus früheren Arbeiten auf eine mögliche Autoregulation von r-Proteinen

Seit längerer Zeit ist bekannt, daß der Pool an freien r-Proteinen in der Zelle, verglichen mit der Gesamtmenge an r-Proteinen entweder sehr gering oder überhaupt nicht meßbar ist (siehe z.B. [30-32]). Frühere Arbeiten aus dem Labor von Böck [33] und Takata [34] zeigten weiterhin, daß r-Proteine keinen Gendosis Effekt zeigen, wobei S20, S21, L21 und L27 Ausnahmen darstellen. Vor kurzem wurde nun gefunden, daß für mRNA, die

für r-Proteine codiert, dagegen eindeutig ein Gendosis Effekt existiert [111]. Diese Befunde führten 1979 zur Postulation eines Modells für die Regulation der Synthese von r-Proteinen durch Nomura und Mitarbeiter [112], nämlich daß r-Proteine ihre eigene Synthese, also autoregulatorisch, beeinflussen können. Eine solche Autoregulation sollte durch in vitro Ver- suchen klar nachweisbar sein.

3.7.2. Zusatz von gereinigtem r-Protein S20 zum gekoppelten in vitro System

Bei Zusatz von gereinigtem r-Protein S20 zum in vitro System wird weder die Synthese von IRS noch die Gesamtsynthese (nicht gezeigt) wesentlich beeinflußt. Die Synthese des r-Proteins S20 wird, wie in Abbildung 15 dargestellt ist, auf zirka 65 % Restsynthese unterdrückt, wobei dieser Effekt bei höheren S20 Konzentrationen geringer ist. Diese Repression der S20 Synthese liegt zwar nur knapp über der Fehlergrenze des Systems, wurde jedoch in drei unabhängigen Experimenten beobachtet.

Daß die in vitro Synthese von r-Proteinen durch Zusatz von gereinigten r-Proteinen reprimierbar ist, wurde gleichzeitig auch von zwei anderen Arbeitsgruppen entdeckt [113-115]. Fukuda [114] berichtet, daß die Synthese von L10 und L7/12 auf 40 beziehungsweise 50 % Restsynthese reprimierbar ist. Die aus der Arbeitsgruppe von Nomura stammenden Daten [115] sind nicht quantifiziert, jedoch ist ersichtlich, daß auch in diesem Falle nur eine teilweise Reduktion erfolgt. Es gibt mehrere mögliche Er-

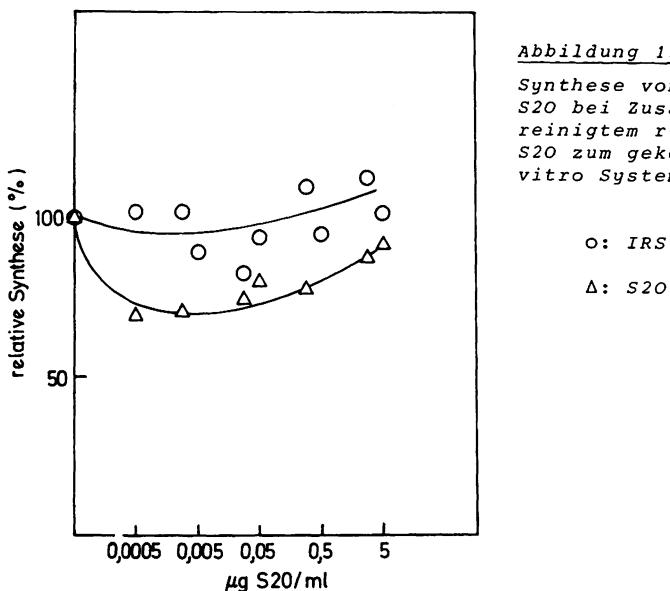


Abbildung 15:

Synthese von IRS und S2O bei Zusatz von gereinigtem r-Protein S2O zum gekoppelten *in vitro* System

○: IRS

△: S2O

- klärungen, warum nur eine partielle Repression beobachtbar ist:
1. Zur Reinigung der entsprechenden r-Proteine wurden in unserer und Nomuras Arbeit [113, 115] denaturierende Bedingungen verwendet; es ist möglich, daß die im Autoregulationsmodell geforderte Bindefähigkeit der r-Proteine an ihre mRNA dadurch beeinträchtigt wird. Tatsächlich hat Fukuda [114] bei Isolierung eines L10-L7/12 Komplexes unter nicht denaturierenden Bedingungen (unveröffentlicht) eine stärkere Repression der Synthese von L10 beziehungsweise L7/12 beobachtet, als sie hier für die Synthese von S2O gefunden wurde.
 2. Wird von einer für r-Proteine codierenden mRNA abgelesen,

so könnte während dieses Vorgangs die Komplexierung der mRNA mit ihrem spezifischen r-Protein zumindest erschwert sein. Dies würde einen gewissen Basalspiegel der Synthese von r-Proteinen erlauben.

3. Andererseits könnte die geforderte Komplexierung von mRNA und r-Protein auf Grund von konformativen Effekten besonders gut während der Translation des entsprechenden r-Proteins erfolgen, so daß Zusatz von komplett translatiertem S20 keinen großen Einfluß auf die Synthese dieses Proteins haben könnte.

Entsprechend dem Autoregulationsmodell sollten r-Proteine mit zwei verschiedenen Substraten komplexieren können: ihrer mRNA und dem jeweiligen Zwischenprodukt des Assembly-Prozesses von Ribosomen. Eine erhöhte Assemblyrate sollte dementsprechend eine Derepression der Synthese von r-Proteinen zur Folge haben. Solche Bedingungen sind im hier vorliegenden *in vitro* System erzeugbar, da das *in vitro* synthetisierte r-Protein S20 an 16S rRNA binden kann und damit ein "Verbrauch" des r-Proteins S20 im Assembly Prozeß simuliert wird.

3.7.3. Zusatz von rRNA zum gekoppelten *in vitro* System

Wie Abbildung 16 beweist, wird die Synthese von S20 durch den Zusatz von 16S rRNA gesteigert, während die Synthese des IRS und die Gesamtsynthese (nicht gezeigt) nicht beeinflußt werden. Dieser Effekt ist spezifisch für 16S rRNA, da weder 5S noch 23S rRNA eine solche Derepression der S20 Synthese hervorrufen (Ab-

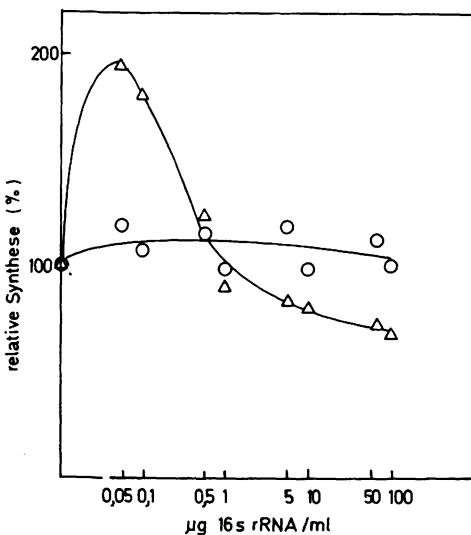


Abbildung 16:

Synthese von IRS und
S2O bei Zusatz von
16S rRNA

○: IRS

△: S2O

bildung 17). Die im gekoppelten *in vitro* System höchste beobachtete Derepression lag bei 240 %, verglichen mit Proben ohne 16S rRNA Zusatz. Diese "Aktivität" der 16S rRNA hängt von der jeweiligen Präparation ab; das Maximum der Derepression lag bei einer Konzentration zwischen 0,05 bis 0,5 μg 16S rRNA pro ml Inkubationsgemisch. Die stimulierende Aktivität von 16S rRNA geht bei längerer Lagerung verloren. Wird frisch präparierte 16S rRNA 20mal eingefroren und wieder aufgetaut, so sinkt die beobachtete Derepression der S2O Synthese von 200 auf 140 %, wobei Agarose SDS Gelelektrophorese von so behandelter 16S rRNA keine Größenunterschiede erkennen lässt.

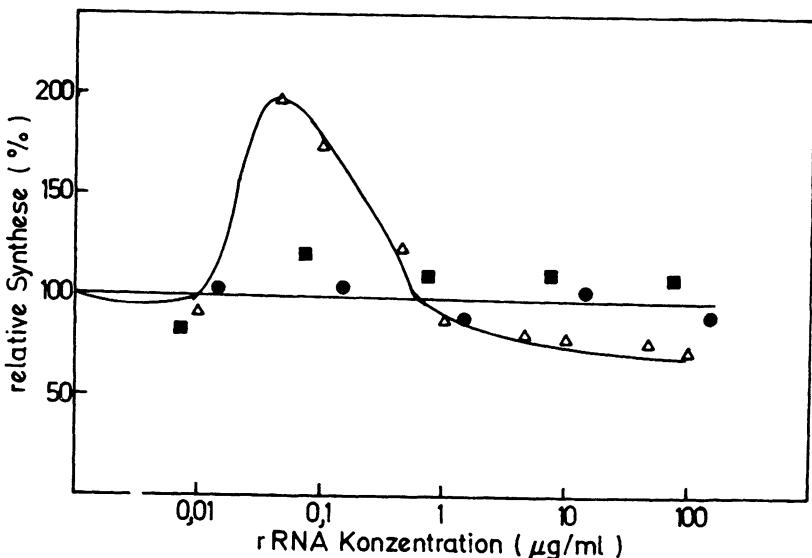


Abbildung 17:

Synthese von S20 bei Zusatz von 5S, 16S und 23S rRNA.
Die Werte geben die S20 Synthese an bei Zusatz von

■: 5S rRNA; Δ: 16S rRNA; ●: 23S rRNA

Die hier geschilderten Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß durch die Zugabe von 16S rRNA zum in vitro System ein Assembly-Prozeß simuliert wird, durch den der autoregulatorische Effekt von S20 auf seine Synthese ausgeschaltet wird.

Damit wäre das von Fallon et al. [112] postulierte Modell für die Regulation der Synthese von r-Proteinen, zumindest für S20, bewiesen, wenn folgende drei Bedingungen erfüllt sind:

1. Der bei Zusatz von 16S rRNA erhöhte Spiegel an S20 muß tat-

sächlich auf Derepression der Synthese und nicht auf einem verminderten Abbau von S2O beruhen.

2. Das *in vitro* synthetisierte S2O muß an die zugesetzte 16S rRNA komplexiert sein.

3. Der Derepressionseffekt muß auf der Ebene der Translation erfolgen.

Diese Voraussetzungen werden in den folgenden Experimenten geprüft.

3.7.4. Abbaurate von IRS und S2O im gekoppelten *in vitro* System

Die Steigerung der S2O-Synthese durch gleichzeitig anwesende 16S rRNA muß nicht notwendigerweise auf einer Derepression der S2O-Bildung beruhen, sondern ließe sich auch dadurch erklären, daß 16S rRNA einen Schutz gegen endogenen Abbau mit sich bringt. Es wurden deshalb die Abbauraten im *in vitro* System von S2O, und zur Kontrolle von IRS, ohne und mit Zusatz von 16S rRNA bestimmt. Hierzu wurden Proben des Transkriptions-/Translations-Systems 45 min bei 34°C inkubiert und dann die weitere Synthese durch Zugabe von Rifampicin (2 µg/ml) und Streptomycin (20 µg/ml) unterbrochen. Die Proben wurden verschieden lang weiterinkubiert und anschließend auf die jeweilig synthetisierte Menge an IRS und S2O analysiert.

Aus Abbildung 18 ist ersichtlich, daß:

1. der Zusatz von 16S rRNA wiederum eine etwa zweifache Stimulation der Synthese von S2O erzeugt und 2. die Abbauraten für IRS und S2O ohne und mit Zusatz von 16S rRNA gleich sind.

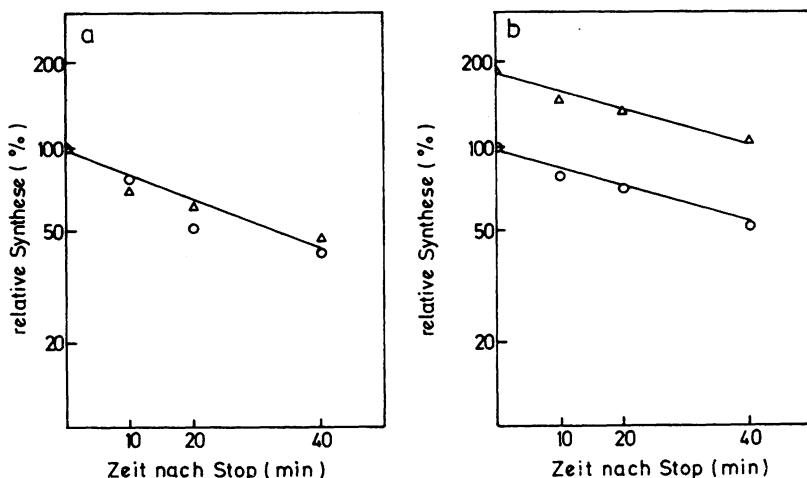


Abbildung 18:

Abbau von vorsynthetisiertem r-Protein S20 (Δ) und von IRS (\circ) im gekoppelten *in vitro* System
a: ohne 16S rRNA; b: mit 0,5 μ g 16S rRNA/ml Inkubationsgemisch (vor Beginn der *in vitro* Synthese zugegeben).

Die hier gefundenen Ergebnisse stimmen gut überein mit Daten von Lindahl et al. [89], wonach *in vitro* nur 10 % der frei vorliegenden r-Proteine innerhalb von 25 min abgebaut werden. Weiterhin zeigten *in vivo* Experimente [116], daß S20 zur Gruppe der sehr stabilen r-Proteine gehört.

Ein Schutz vor endogenem Abbau von S20 im *in vitro* System sollte jedoch erreichbar sein durch Zugabe von relativ hohen Mengen an gereinigtem S20. Solche Bedingungen liegen in dem in Abbildung 15 dargestellten Experiment vor; tatsächlich konnte bei hohen

S₂O Konzentrationen auch eine gesteigerte Ausbeute an radioaktiv markiertem S₂O festgestellt werden.

3.7.5. Komplexierung von in vitro synthetisiertem r-Protein S₂O an zugesetzte 16S rRNA

Zur Bestimmung, ob das in vitro synthetisierte r-Protein S₂O an zugesetzte 16S rRNA bindet, wurden 50 µl Proben des gekoppelten in vitro Systems sofort nach der Inkubation in 2,5 ml Puffer, der 10 mM ans Tris-Cl pH 7,5 und 0,2 mM an MgCl₂ war und 50 µg RNase freie DNase enthielt, gebracht und 15 min bei 34°C inkubiert. Nach anschließender Gradientenzentrifugation wurden aus den die 16S rRNA enthaltenden Fraktionen (siehe Tabelle 10) die Ribonukleoproteinkomplexe isoliert und der Gehalt an S₂O bestimmt. Die auf die Saccharose-Gradienten aufgetragene Menge an 16S rRNA war zu gering, um einer A₂₆₀

Tabelle 10:

Verteilung von in vitro synthetisiertem S₂O in Saccharosegradienten nach der Zentrifugation.
Die Gradienten enthielten einschließlich Probe 36 ml. In Gradienten, auf die 50 µg 16S rRNA aufgelagert wurden, war nach der Zentrifugation 16S rRNA ausschließlich in Fraktion 3 feststellbar.

Fraktion	ml ab Probenoberfläche	Anteil des eingesetzten S ₂ O (%)
1	0 - 5	26
2	6 - 13	25
3	14 - 22	35
4	23 - 36	<2

Messung zugänglich zu sein. Die Sedimentationsposition von 16S rRNA wurde deswegen durch Zentrifugation von 50 µg 16S rRNA in einem Vergleichsgradienten bestimmt. Die entsprechenden Fraktionen wurden von Gradienten, die Material des in vitro Systems enthielten, gesammelt. Die Verteilung des bei Zusatz von 0,5 µg 16S rRNA/ml in vitro synthetisierten S2O in verschiedenen Fraktionen nach der Zentrifugation ist in Tabelle 10 angegeben.

Wie Abbildung 19 zeigt, ist die Menge des so isolierten, in vitro synthetisierten, S2O abhängig von der zugesetzten Menge an 16S rRNA. Dieses Ergebnis zeigt danach, daß das in vitro synthetisierte S2O an die 16S rRNA komplexiert.

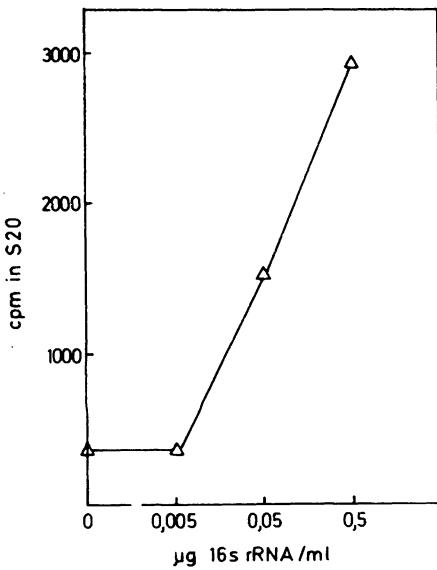


Abbildung 19:
Bindung von in vitro synthetisiertem r-Protein S2O an zugesetzte 16S rRNA

3.7.6. Derepression der S20 Synthese durch 16S rRNA im getrennten Transkriptions- und Translations-System

Um zu untersuchen, ob die Stimulation der Synthese von r-Protein S20 auf der Ebene der Transkription oder Translation einsetzt, wurde 16S rRNA in das oben beschriebene getrennte *in vitro* System eingesetzt. Aus den in Tabelle 11 zusammengestellten Daten geht eindeutig hervor, daß die Steigerung der S20 Synthese auf der Ebene der Translation stattfindet. Zwei Effekte verdienen zusätzlich Beachtung:

1. Wird 16S rRNA nur zum Transkriptionssystem zugesetzt, so

Tabelle 11:
Synthese von S20 und IRS bei Zusatz von 16S rRNA zum gekoppelten und zum getrennten Transkriptions-/Translations in vitro System

Zugabe von 16s rRNA	relative Synthese von S20 (%)	relative Synthese von IRS (%)
keine	100	100
während Transcription	83	96
während Translation	367	127
während Transcription und Translation	184	84
im gekoppelten System	205	112

ist der stimulierende Effekt nicht mehr im darauffolgenden Translationsvorgang wirksam. 2. Wird 16S rRNA nur zum Translationssystem zugegeben, so ist eine um den Faktor 2 höhere Derepression zu beobachten, verglichen mit Ansätzen, in denen die 16S rRNA entweder sowohl dem Transkriptions- und Translations-System oder dem gekoppelten System zugesetzt wird. Die Grundlage dieser Beobachtung ist zur Zeit noch nicht verstanden, jedoch wurden ähnliche Ergebnisse durch die Arbeitsgruppe von Nomura für die Repression der Synthese von r-Proteinen bei Zugabe von gereinigten r-Proteinen erhalten [115].

Die in den Abschnitten 3.7.2. bis 3.7.6. beschriebenen Ergebnisse haben gezeigt, daß: 1. freies S20 seine Synthese zumindest partiell reprimieren kann; 2. durch Komplexierung von S20 an 16S rRNA eine Derepression der Synthese von S20 erzeugt werden kann; 3. diese Derepression auf der Ebene der Translation stattfindet.

Das von Nomura und Mitarbeitern [112] postulierte Modell einer autoregulatorischen Synthesekontrolle ribosomaler Proteine konnte damit durch in vitro Ergebnisse unterstützt werden.

3.7.7. Stabilität von freier rRNA im gekoppelten in vitro System

In Abschnitt 3.7.6. wurde gezeigt, daß der stimulierende Effekt von 16S rRNA nicht mehr im Translationssystem wirksam ist, wenn 16S rRNA zum Beginn des Transkriptionsvorgangs zugegeben wird. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, daß 16S rRNA einem raschen

Abbau unterliegt. Um dies zu untersuchen, wurde die Stabilität von zugesetzter ^{32}P markierter rRNA im in vitro System bestimmt. Wie Abbildung 20 zeigt, wird freie rRNA relativ rasch und abhängig von der jeweils zugesetzten Menge abgebaut.

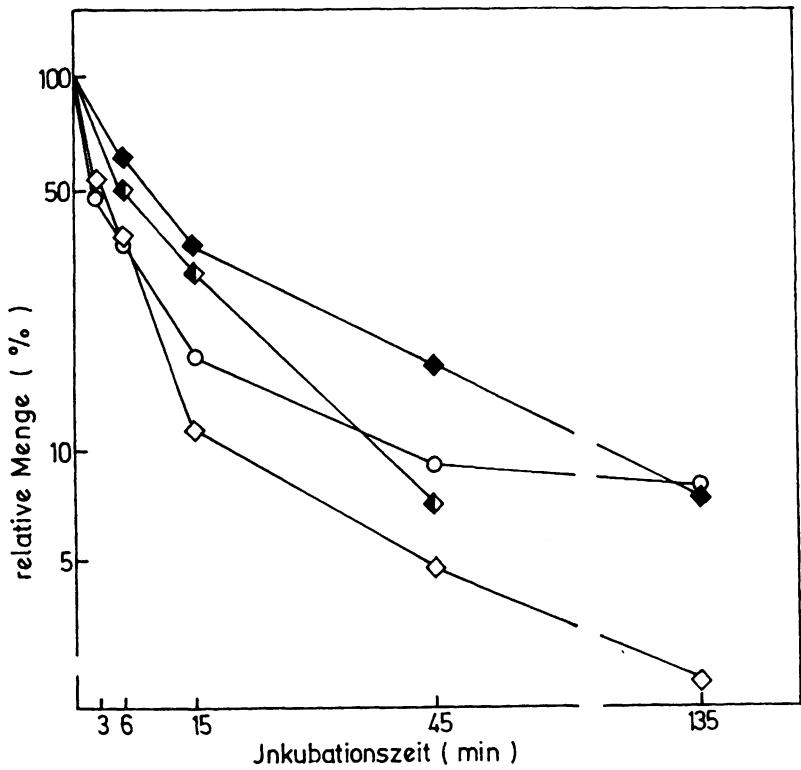


Abbildung 20:

Abbau von 16S und 23S rRNA im gekoppelten in vitro System.
Die Proben enthielten: (○) 0,034 µg ^{32}P markierte 23S rRNA/ml; (◇, ◆ und ♦) je 0,02 µg ^{32}P markierte 16S rRNA/ml; (◆) zusätzlich 0,05 µg 16S rRNA/ml; (♦) zusätzlich 0,5 µg 16S rRNA/ml.

In diesem Experiment waren keine spezifischen Abbauprodukte feststellbar, da bei Auftrennung der Proben auf SDS Polyacrylamidgelen [53] kein radioaktiv markiertes Material auftrat, das eine Produktionsabhängigkeit mit der eingesetzten 16S rRNA erkennen ließ.

Nach 5 min Inkubation im gekoppelten System (entspricht der Inkubationszeit im Transkriptionssystem) zeigt noch zirka 60 % der 16S rRNA unverändertes Laufverhalten im SDS Gel, wenn eine die Derepression der S20 Synthese verursachende Menge (0,5 µg 16S rRNA/ml) zugesetzt wird. Im Translationssystem bewirkt dieses Material jedoch keine Derepression der Synthese von S20 (Tabelle 11). Zwei mögliche Erklärungen hierfür sind:

1. Das nach 5 min Inkubation mit reifer 16S rRNA gleichlaufende Material hat geringfügige konformative Veränderungen im *in vitro* System erfahren, die eine Bindung von S20 beeinträchtigen [117, 118].
2. 16S rRNA könnte die Transkription von S20 spezifischer mRNA inhibieren, die Translations der vorliegenden S20 spezifischen mRNA jedoch aktivieren.

Die zweite Erklärung würde zugleich verständlich machen, weshalb bei Zusatz von 16S rRNA zum Translationssystem eine höhere Derepression der S20 Synthese beobachtet wurde, verglichen mit den Ergebnissen, die bei Zusatz von 16S rRNA zum Transkriptions- und Translations-System oder zum gekoppelten System erzielt werden.

3.7.8. Syntheseraten von S2O in Gegenwart von 16S rRNA

Wenn die in 3.7.7. gemachten Überlegungen stimmen, sollte der stimulierende Effekt von 16S rRNA auf die S2O Synthese besonders ausgeprägt zu Beginn der Inkubation des *in vitro* Systems sein. Es wurde deshalb die Zeitabhängigkeit der Synthese des r-Proteins S2O in Gegenwart von verschiedenen Konzentrationen an 16S rRNA untersucht. Wie Abbildung 21 zeigt, nimmt die Syntheserate von S2O ohne 16S rRNA Zusatz kontinuierlich ab, während sie bei Zusatz verschiedener Mengen an 16S rRNA über längere Zeit proportional steigt, beziehungsweise konstant bleibt. Die Gesamtsyntheserate wird hingegen durch Zusatz von 16S rRNA nicht beeinflußt (nicht dargestellt).

Daß mit längerer Inkubationsdauer die Syntheserate von S2O ständig abnimmt (siehe auch Abb. 4 und 5), ist mit dem in 3.7.2. gefundenen autoregulatorischen Effekt von S2O auf seine Synthese zu erklären. Dieser hemmende Effekt kann - wie hier gezeigt - durch Komplexierung des synthetisierten S2O mit zugesetzter 16S rRNA aufgehoben werden. Wäre bei längerer Inkubationsdauer die verringerte Syntheserate von S2O auf allgemein hemmende Effekte - zum Beispiel Abbau der eingesetzten DNA - rückführbar, so sollte auch die Synthese von IRS und die Gesamtsynthese dieses Verhalten zeigen, was jedoch nicht der Fall ist (siehe Abb. 4).

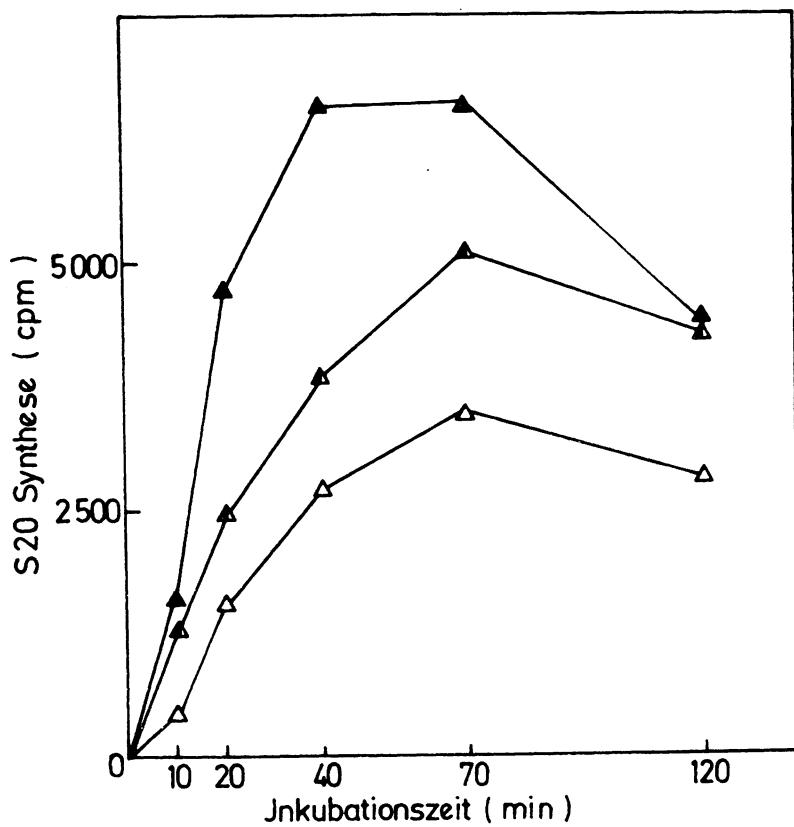


Abbildung 21:

Zeitabhängigkeit der S20 Synthese bei Zusatz von 16S rRNA.

Die Proben enthielten:

(Δ): keine 16S rRNA

(▲): 0,05 µg 16S rRNA/ml

(●): 0,5 µg 16S rRNA/ml

3.7.9. Synthese von S20 bei gleichzeitiger rRNA-Synthese

Durch den Zusatz von 16S rRNA zur Simulierung des Assembly-Prozesses werden die *in vivo* Verhältnisse nicht vollständig wiedergegeben. Es kann zwar bei Verwendung von reifer 16S rRNA eine funktionsfähige 30S Untereinheit *in vitro* assembliert werden [119], die hierzu nötige Energie ist jedoch bei Verwendung von precursor 16S rRNA geringer [120]. In *vivo* scheint der Assembly-Prozeß bereits während der Transkription von rRNA [121, 122], und damit auch an precursor 16S rRNA, zu beginnen.

Sowohl nach dem *in vivo* [121] als auch dem *in vitro* [123] Assembly-Modell für die 30S Untereinheit gehört S20 zu den ersten Bindepoteinen für 16S rRNA und sollte deshalb auch an precursor 16S rRNA binden können. Da jedoch die Reifung von 16S rRNA aus dem primären 30S rRNA Gesamttranskript selbst wieder ein mehrstufiger Prozeß ist [124] wurde dem *in vitro* System rDNA zugesetzt; dies sollte sicherstellen, daß alle Zwischenstufen bis zur gereiften 16S rRNA im *in vitro* System vorliegen. rDNA wurde dem System in Form des Plasmids pLC19-3 zugesetzt, für das früher [125] gezeigt wurde, daß es das vollständige rrnA Operon enthält.

Das Ergebnis eines solchen Experiments ist in Abbildung 22 wiedergegeben. Die so erhaltene 4,5-fache Derepression der S20 Synthese ist spezifisch, da: 1. die Synthese von IRS und DHPR nicht dereprimiert wird und 2. bei Zugabe eines anderen ColE1 Typ Plasmids dieser Effekt nicht auftritt. Die hier im Ver-

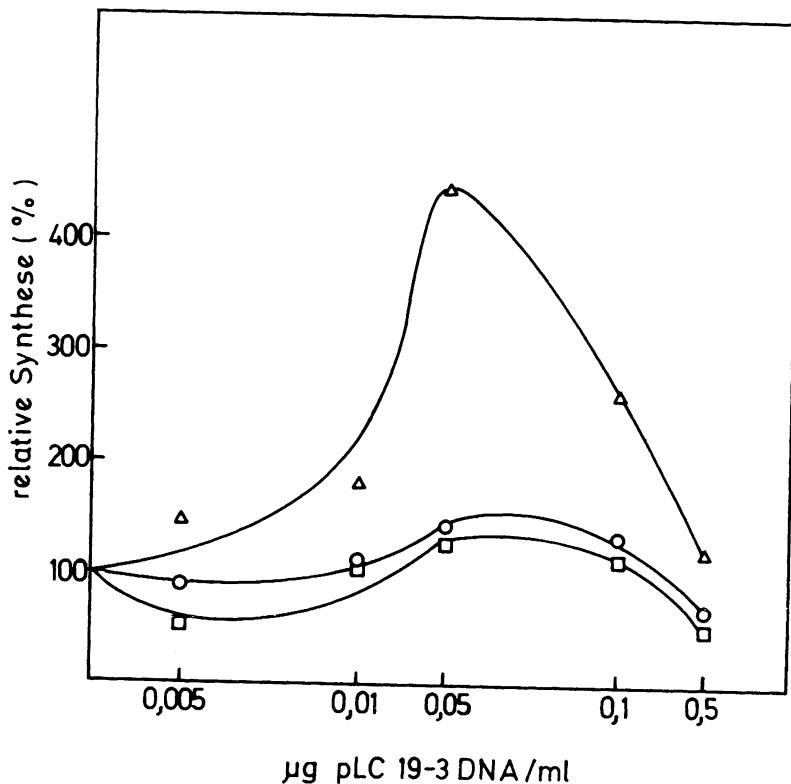


Abbildung 22:

Synthese von IRS, DHPR und S2O bei Zusatz von rDNA zum gekoppelten *in vitro* System

(○): IRS

(△): S2O

(□): DHPR

gleich zu 16S rRNA Zugabe erzielte, über zweifach höhere Steigerung der S20 Synthese, könnte durch zwei Effekte erklärt werden: 1. der Zusatz von rDNA könnte bewirken, daß im vitro System über die gesamte Inkubationsdauer rRNA synthetisiert wird und für S20-Bindung zur Verfügung steht; 2. die im in vitro System synthetisierten 16S rRNA Moleküle könnten eine bessere Bindungsaffinität als gereifte 16S rRNA für S20 besitzen.

3.8. Berechnungen

Nachdem die Aminosäurenzusammensetzung sowohl von IRS [60] als auch von S20 [126] bekannt ist, konnte berechnet werden, daß im in vitro System etwa zehnmal mehr S20 Moleküle als IRS Moleküle synthetisiert werden. Nach Messungen von Neidhardt et al. [12] beträgt dieses Verhältnis in vivo, je nach Wachstumsrate zwischen 7,6 bis 16,1. Die in vivo und in vitro Werte stimmen also ausgezeichnet überein.

Weitere Kalkulationen betreffen die Stimulierung der Synthese von S20 durch Zusatz von 16S rRNA: Unter der Annahme, daß etwa 50 % des in vitro synthetisierten S20 nach den entsprechenden Präparationsschritten wiedergefunden werden, ist für das in Abbildung 16 wiedergegebene Experiment eine maximale Derepression der S20 Synthese bei einem Verhältnis von 1,6 Molekülen zugesetzter 16S rRNA pro Molekül synthetisiertes S20 zu beobachten. Übertragen auf in vivo Verhältnisse würde das bedeuten, daß etwa 30 Moleküle 16S rRNA pro Zelle diese Derepression verursachen könnten (als Zellausmaße wurden dabei $2 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$ angenommen).

4. SCHLUSSFOLGERUNGEN

4.1. Voraussetzung

Die wohl wichtigste Voraussetzung für eine korrekte Interpretation der geschilderten Resultate ist, daß die untersuchten Strukturgene unter der Kontrolle ihres eigenen, bakteriellen Promotors stehen. Dafür wurden folgende Hinweise erhalten:

1. Unter dem Einfluß von ppGpp werden IRS und S2O unterschiedlich reguliert; dies trifft für mindestens drei der λ ddapB Phagen zu [94, und diese Arbeit]. Die Gene für diese Proteine sollten also unter dem regulatorischen Einfluß von verschiedenen Promotoren stehen.
2. Wie im Abschnitt 3.8. gezeigt wurde, stimmt das Verhältnis der in vitro Synthese von S2O zu IRS sehr gut mit den entsprechenden in vivo Daten überein.
3. Wird dem in vitro System ein Extrakt zugesetzt, in dem λ Repressor angereichert ist, so verringert sich die relative Synthese von λ spezifischen Proteinen, während die relativen Synthesen von IRS, S2O, DHPR und des carA Genprodukts ansteigen.
4. Nach Infektion mit λ ddapB119 ist in UV-geschädigten Zellen die Synthese von S2O [29] und einem Protein, das im ein-

dimensionalen SDS-Acrylamidgel identisch mit gereinigter IRS läuft, nachweisbar (Buckel, unveröffentlicht).

4.2. Wirkung von cAMP

Nach Pastan und Adhya [83] kann cAMP in E. coli die Synthese einer Vielzahl von Proteinen beeinflussen, die folgende gemeinsame Eigenschaften besitzen:

1. fast alle katalysieren Reaktionen des katabolischen Stoffwechsels;
2. fast alle sind induzierbar;
3. wachsen die Zellen auf Glucose als C-Quelle, so sind diese Proteine nicht essentiell für das Wachstum.

In dieser Arbeit wurde eine leichte Stimulierung der in vitro Synthese von IRS, S20, DHPR und der Gesamtsynthese bei Zugabe von cAMP festgestellt; der Effekt scheint jedoch auf einer unspezifischen Stimulierung des in vitro Systems zu beruhen. Die Tatsache, daß die hier getesteten Proteine keine der drei oben aufgeführten Eigenschaften besitzen, läßt sich sehr gut mit der Forderung vereinbaren, daß die gefundene Stimulierung unspezifisch ist.

4.3. Wirkung von ppGpp

Die bei Zugabe von ppGpp beobachteten Regulationsphänomene werden als spezifisch angesehen, weil sie sich nicht gleichgerichtet

und parallel wie bei Zusatz von cAMP, sondern in einander entgegengesetzter Weise auf die Synthese von IRS und S2O auswirken. Der Befund, daß ppGpp eine Derepression der Synthese von Aminoacyl-tRNA-Synthetasen verursacht, war überraschend, ist jedoch mit der folgenden Erklärung der physiologischen Wirkung von ppGpp in gutem Einklang. Nach Stephens et al. [91] wirkt ppGpp als "Alarmon" und zeigt einen für die existierende Proteinsynthesekapazität zu hohen intrazellulären Spiegel an unbeladener tRNA an. Unter solchen Bedingungen besteht kein Bedarf für weitere Ribosomensynthese mehr [94]. Durch Derepression der Synthese von Aminosäurebiosynthetaseenzymen und/oder Aminoacyl-tRNA-Synthetasen [94] kann jedoch ein höherer Beladungsgrad von tRNA erreicht werden.

4.4. Regulation von Aminoacyl-tRNA-Synthetasen

Weder bei in vivo Untersuchungen noch in den hier geschilderten in vitro Experimenten wurden Bedingungen gefunden, unter denen die Synthese von Aminoacyl-tRNA-Synthetasen reprimiert wird. Die Rate der Bildung dieser Enzyme scheint in erster Linie von der Stärke der Promotoren ihrer Strukturgene abzuhängen. Zwei regulatorische Signale können diese mehr oder weniger konstitutive Expression jedoch modulieren:

1. In vivo ist es die Anpassung an die Wachstumsrate, die den Enzymspiegel über einen zwei- bis dreifachen Bereich verändert kann. Der dieser metabolischen Kontrolle zugrundeliegende biochemische Mechanismus ist noch unbekannt. ppGpp

oder andere unübliche Guanosinnukleotide scheinen nicht daran beteiligt zu sein, da die intrazelluläre ppGpp Konzentration invers von der Wachstumsrate μ abhängt. Hohe μ Werte entsprechen demnach niederen ppGpp Konzentrationen; unter diesem physiologischen Zustand ist die spezifische Aktivität der Aminosäuren aktivierenden Enzyme jedoch erhöht.

2. In vitro wurde eine Stimulation der Transkription eines Aminoacyl-tRNA-Synthetase Strukturgens - nämlich IRS - durch ppGpp beobachtet. ppGpp häuft sich in vivo unter Aminosäurenmangelbedingungen intrazellulär an, gleichzeitig wird die IRS Synthese dereprimiert. Ob diese beiden Vorgänge kausal zusammenhängen, bedarf jedoch einer weiteren Analyse.

Ein Schema zur Regulation der Synthese von IRS (und S20) zeigt Abbildung 23.

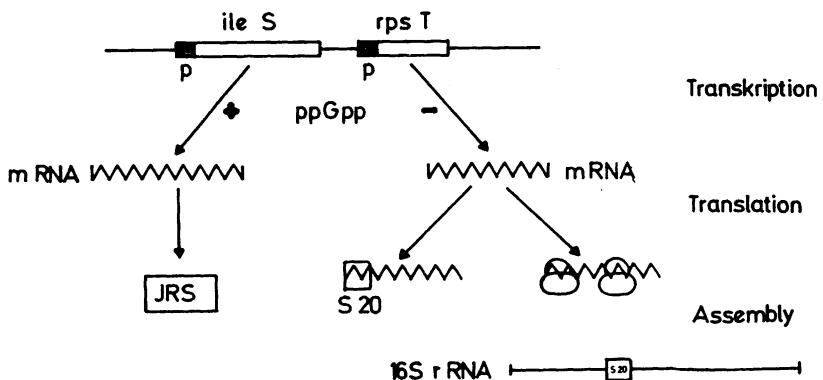


Abbildung 23:

Schema zur Regulation der Synthese von IRS und S20.
Angegeben sind die in dieser Arbeit untersuchten Regulationsphänomene. p: Promotor

Diese im großen und ganzen konstitutive Synthese von Aminoacyl-tRNA-Synthetasen ermöglicht es der Zelle, den Aminoacylierungsgrad von tRNA, auch unter Aminosäuremangelbedingungen, auf einem möglichst hohen Niveau zu halten. Damit wird sichergestellt, daß die vorhandene Proteinsynthesekapazität voll ausgenützt wird und daß eine optimale Genauigkeit der Proteinsynthese erhalten bleibt. Unbeladene tRNA erlaubt nach neueren Untersuchungen nämlich eine Fehllesung von Codonen in der "wobble" Position [127].

Die geschilderten in vitro Experimente zeigen, daß die Bildung von IRS nicht autogen reguliert wird, eine Tatsache, die mit dem Gendosiseffekt in gutem Einklang steht. Eine solche Abhängigkeit des Enzymspiegels von der vorliegenden Genzahl wurde bisher gefunden für Glycyl- [128], Methionyl- [129], Histidyl- [130], Phenylalanyl- [57], Threonyl- [56] und Isoleucyl- [29] tRNA-Synthetase.

4.5. Regulation der Synthese von r-Proteinen

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß die Synthese des ribosomalen Proteins S20 auf der Ebene der Transkription und der Translation beeinflußt werden kann.

Die Transkription des S20 Strukturgens wird durch ppGpp in vitro bis auf 20 % Restaktivität gehemmt. Die Hemmung scheint spezifisch zu sein, da die Expression von ileS und rpsT antiparallel

beeinfluß wird und da der Effekt auf die Translation zu gering ist, um das Ausmaß der Hemmung erklären zu können.

Neu ist vor allem der Befund, daß die Synthese von S20 während des Translationsvorganges beeinflußt werden kann. Der Mechanismus der Hemmung ist noch unverstanden, nach dem von Nomura und Mitarbeitern vorgestelltem Modell [112] sollte mRNA durch Bindung des ribosomalen Proteins inaktiviert werden. Die beschriebenen Daten - vor allem die Tatsachen, daß durch Bindung von neugebildetem S20 an zugesetzte 16S rRNA die Synthese von S20 stimuliert werden kann und daß dieser Mechanismus auf der Ebene der Translation wirksam ist - lassen sich mit einer solchen Vorstellung sehr gut vereinbaren.

Basierend auf den hier erzielten Ergebnissen läßt sich damit das in Abbildung 23 gezeigte Schema zur Regulation von r-Proteinen aufstellen:

- mRNA, die für r-Proteine codiert, wird mehr oder weniger konstitutiv gebildet. Ihre Synthese kann einerseits über die metabolische Kontrolle reguliert werden, wodurch sichergestellt wird, daß genügend Ribosomen für die jeweilige Wachstumsbedingung vorliegen. Unter der Wirkung des "Alarmons" ppGpp [91] kann andererseits die Transkription fast vollkommen abgeschaltet werden.
- Translation in r-Proteine findet nur dann statt, wenn das entsprechende Genprodukt im Assembly-Prozeß "verbraucht"

werden kann. Bei einer zu geringen Assemblyrate wird die mRNA "inaktiviert", möglicherweise über die postulierte Komplexierung von r-Proteinen an ihre mRNA [112].

Dieses Modell erlaubt die folgenden Schlüsse:

1. ppGpp kann die Synthese von r-Proteinen auf zwei verschiedene Weisen hemmen:
 - a) direkt durch Blockierung der Transkription der entsprechenden mRNA;
 - b) indirekt durch Limitierung der rRNA Bildung.
2. Geringe Konzentrationen an freiem r-Protein können starke regulatorische Effekte auf ihre eigene Synthese ausüben.
3. Der Assembly-Prozeß beeinflußt direkt die Ablesung von r-Proteinen. Hiermit ist erklärbar, weshalb der Zusammenbau von 30S und 50S Untereinheit des Ribosoms voneinander abhängig ist. Ergebnisse aus der Arbeitsgruppe von Nomura [131 - 135] zeigen nämlich, daß Gene für ribosomale "L" und "S" Proteine gemeinsam in einer Transkriptionseinheit lokalisiert sind. Die verringerte Einbaurate bereits eines r-Proteins in eine Vorstufe könnte zu einem "Anstau" dieses Proteins führen und somit die Ablesung von polycistronischer mRNA verhindern. Kürzlich veröffentlichte Untersuchungen von Yates et al. [115] haben tatsächlich gezeigt, daß zum Beispiel die in vitro Synthese von L5 und von L24 bei Zusatz von S8 inhibiert werden kann.

4. Die Bildung von Ribosomen könnte primär über die Synthese von rRNA reguliert werden. Veränderte Syntheseraten für rRNA sollten durch den Assembly-Prozeß die Ablesung von r-Proteinen beeinflussen. Ist demnach eine potentiell konstitutive Synthese von r-Proteinen in der Zelle gewährleistet, könnte sich die Regulation der Ribosomenbildung auf rRNA beschränken. Da 5S, 16S und 23S rRNA als gemeinsames Transkript abgelesen werden [6, 7], wäre die Regulation der über 50 Komponenten des Ribosoms damit auf die jeweils zwei Promotoren [136 - 138] der sieben rRNA Transkriptionseinheiten [6, 7] reduziert.

Die Regulation von r-Proteinen könnte diesem Modell nach hierarchisch erfolgen. r-Proteine, für die autoregulatorische Effekte nachgewiesen sind, sollten die Synthese von anderen r-Proteinen beeinflussen können, und damit diesen in einer hierarchischen Ordnung übergeordnet sein. In Tabelle 12 ist eine Zusammenstellung von solchen r-Proteinen gegeben, wobei besonders auffällt, daß sie alle (nach *in vitro* Daten) Bindeproteine für rRNA sind. In einer zweiten Gruppe von r-Proteinen scheint die Synthese nur schwach reguliert zu sein, da für sie Gen-Dosis-Effekte nachgewiesen wurden. Sie werden (nach *in vivo* Ergebnissen) zu Beginn des Assembly-Prozesses in die ribosomalen Vorstufen Partikel eingebaut (Tabelle 12); durch diesen Mechanismus wird sichergestellt, daß immer eine genügende Menge der ersten Assemblyprodukte in der Zelle vorliegt. Damit können diese r-Proteine ebenfalls die Synthese von anderen r-Proteinen beeinflussen.

Tabelle 12:

Zusammenstellung von r-Proteinen, für die bisher Autoregulation beziehungsweise Gen-Dosis-Effekte nachgewiesen wurden.

Die Daten stammen aus folgenden Arbeiten:

- (a) [115]; (b) [113]; (c) Nomura, unveröffentlicht; (d) [114];
(e) [33]; (f) [34]; (g) [123]; (h) Nierhaus, unveröffentlicht;
(i) [121].

r-Protein	Autoregulation in vitro beobachtet	Gendosis gefunden	Bindeprotein für rRNA	in vivo Assembly No ⁱ
S4	+ ^a	-	16S rRNA ^g	13
S8	+ ^a	-	16S rRNA ^g	10
S20	+ ^b	schwach ^e	16S rRNA ^g	4
S21	nicht untersucht	+ ^f	-	3
L1	+ ^a	-	23S rRNA ^h	8
L4	+ ^c	-	23S rRNA ^h	unklar
L10	+ ^d	-	23S rRNA schwach ^h	11
L7/12	+ ^d	-	23S rRNA schwach ^h	23 bzw. 14
L21	nicht untersucht	+ ^f	-	3
L27	nicht untersucht	+ ^f	-	5

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Regulation der weit über 100 Komponenten des bakteriellen Proteinsyntheseapparats erfordert einen komplexen Mechanismus. In der vorliegenden Arbeit sollte die Regulation der Synthese zweier Komponenten dieses Systems, nämlich der Isoleucyl-tRNA-Synthetase und des ribosomalen Proteins S20 in vitro untersucht werden.

Hierzu wurde ein früher beschriebenes [35] in vitro System in bezug auf Inkubationszeit und -temperatur sowie auf tRNA, Mg⁺⁺ und K⁺ Ionengehalt optimiert.

Durch Fraktionierung des verwendeten Zellrohextraktes konnte das in vitro System in zwei Teilsysteme getrennt werden, die spezifisch für Transkription beziehungsweise Translation sind.

Als Matrize des in vitro Systems wurde DNA aus spezifisch transduzierenden λ Phagen [29] verwendet; die synthetisierten Genprodukte wurden mittels verschiedener Methoden (u.a. Immunpräzipitation, zweidimensionale Gelelektrophorese) identifiziert.

Folgende Ergebnisse wurden erhalten:

1. cAMP hat einen unspezifischen stimulierenden Einfluß auf die Synthese aller gemessener Proteine.
2. ppGpp reprimiert die Synthese von S20 und dereprimiert die Synthese von IRS. Diese Effekte treten auf der Ebene der Transkription auf.

3. Für IRS ist keine Autoregulation der Synthese feststellbar.

4. Für S20 war ein schwacher autoregulatorischer Effekt bei Zusatz von S20 nachweisbar.

5. Die Synthese von S20 ist durch Zusatz von 16S rRNA spezifisch stimulierbar. Dieser Effekt tritt auf der Ebene der Translation auf. Das *in vitro* synthetisierte S20 komplexiert an die zugesetzte 16S rRNA.

Dadurch wurde erstmals nachgewiesen, daß der Assembly Prozeß direkt die Synthese von r-Proteinen regulieren kann. Das auf Grund der hier erhaltenen Daten aufgestellte Schema zur Regulation des r-Proteins S20 (Abbildung 23) unterstützt ein von Nomura und Mitarbeitern [112] aufgestelltes Modell zur Regulation von r-Proteinen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Wittmann, H.G., Stöffler, G., Hindennach, I., Kurland, C. G., Randall-Hazelbauer, L., Birge, E.A., Nomura, M., Kalschmidt, E., Mizushima, S., Traut, R.R., Bickle, T.A. (1971) *Molec. gen. Genet.* 111, 327
2. Kjeldgaard, N.O. (1967) *Advanc. Microb. Physiol.* 1, 39
3. Maaløe, O. (1969) *Develop. Biol. Suppl.* 3, 33
4. Maaløe, O. (1979) in *Biological Regulation and Development* (Hrsg. Golberger, R.F.) 1, 487. Plenum Publishing Company
5. Jaskunas, S.R., Lindahl, L., Nomura, M., Burgess, R.R. (1975) *Nature* 257, 458
6. Kenerly, M.E., Morgan, E.A., Post, L., Lindahl, L., Nomura, M. (1977) *J. Bacteriol.* 132, 931
7. Kiss, J., Sain, B., Venetianer, P. (1977) *FEBS Letters* 79, 77
8. Hardy, S.J.S. (1975) *Molec. gen. Genet.* 140, 253
9. Gordon, J., Weissbach, H. (1970) *Biochemistry* 9, 4233
10. Furano, A.V. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 4780
11. Skjold, A.C., Juarez, H., Hedgcoth, C. (1973) *J. Bacteriol.* 115, 177
12. Neidhardt, F.C., Bloch, P.L., Pedersen, S., Reeh, S. (1977) *J. Bacteriol.* 129, 378

13. Blumenthal, R.M., Dennis, P.P. (1980) J. Bacteriol. 142, 201
14. Parker, J., Neidhardt, F.C. (1972) Biochem. Biophys. Res. Commun 49, 495
15. Sands, M.K., Roberts, R.B. (1952) J. Bacteriol. 63, 505
16. Stent, G.S., Brenner, S. (1961) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 47, 2005
17. Pardee, A.B., Prestidge, L.S. (1956) J. Bacteriol. 71, 677
18. Dennis, P.P., Nomura, M. (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 3819
19. Furano, A.V., Wittel, F.P. (1976) J. Biol. Chem. 251, 898
20. Reeh, S., Pedersen, S., Friesen, J.D. (1976) Molec. gen. Genet. 149, 279
21. Blumenthal, R., Lemaux, P.G., Neidhardt, F.C., Dennis, P.P. (1976) Molec. gen. Genet. 149, 291
22. Cashel, M., Gallant, J. (1969) Nature 221, 838
23. Haseltine, W.A., Block, R. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 1564
24. Pedersen, F.S., Lund, E., Kjeldgaard, N.O. (1973) Nature N.B. 243, 13
25. Travers, A. (1976) Molec. geb. Genet. 147, 225
26. Travers, A. (1976) FEBS Letters 69, 195

27. Primakoff, P., Artz, S.W. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 1726
28. Bachmann, B.J., Low, K.B. (1980) Microb. Rev. 44, 1
29. Buckel, P. (1976) Molec. gen. Genet. 149, 225
30. Gausling, K. (1974) Molec. gen. Genet. 129, 61
31. Marvaldi, I., Pichon, I., Delaage, M., Marchis-Mouren, G. (1974) J. Mol. Biol. 84, 83
32. Ulbrich, B., Nierhaus, K.H. (1975) Eur. J. Biochem. 57, 49
33. Geyl, D., Böck, A. (1974) Molec. gen. Genet. 154, 327
34. Takata, R. (1978) Molec. gen. Genet. 160, 151
35. Zubay, G. (1973) Ann. Rev. Genet. 7, 267
36. Kaltschmidt, E., Kahan, L., Nomura, M. (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 446
37. Kung, H.F., Spears, C., Weissbach, H. (1974) J. Biol. Chem. 250, 1556
38. Low, K.B. (1968) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 60, 160
39. Fiil, N., Friesen, J.D. (1968) J. Bacteriol. 95, 729
40. Laffler, T., Gallant, J. (1974) Cell 1, 27
41. Wittmann, H.G., Stöffler, G., Piepersberg, W., Buckel, P., Ruffler, D., Böck, A. (1974) Molec. gen. Genet. 134, 225
42. Bloch, P.L., Phillips, T.A., Neidhardt, F.C. (1980) J. Bacteriol. 141, 1409

43. Sidikaro, J., Nomura, M. (1975) J. Biol. Chem. 250, 1123
44. Muto, A., Ehresmann, C., Fellner, P., Zimmermann, R.A. (1974) J. Mol. Biol. 86, 411
45. Neidhardt, F.C., Bloch, P.L., Smith, D.F. (1974) J. Bacteriol. 109, 736
46. Hardy, S.J.S., Kurland, C.G., Voynow, P., Mora, G. (1969) Biochemistry 8, 2897
47. Kaltschmidt, E., Wittmann, H.G. (1970) Analyt. Biochem. 40, 401
48. Isono, S., Isono, K., Hirota, Y. (1978) Molec. gen. Genet. 165, 15
49. O'Farrell, P.H. (1975) J. Biol. Chem. 250, 4007
50. O'Farrell, P.Z., Goodman, H.M., O'Farrell, P.H. (1977) Cell 12, 1133
51. Laemmli, U.K., Favre, M. (1973) J. Mol. Biol. 80, 575
52. Laemmli, U.K. (1970) Nature 227, 680
53. Gegenheimer, P., Watson, N., Apirion, D. (1977) J. Biol. Chem. 253, 3064
54. Bonner, W.M., Laskey, R.A. (1974) Eur. J. Biochem. 46, 83
55. Laskey, R.A., Mills, A.D. (1975) Eur. J. Biochem. 56, 335
56. Hennecke, H., Böck, A., Thomale, J., Nass, G. (1977) J. Bacteriol. 131, 943

57. Piepersberg, A., Hennecke, H., Engelhard, M., Nass, G., Böck, A. (1975) J. Bacteriol. 124, 1482
58. Ouchterlony, O. (1949) Acta Pathol. Microbiol. Scand. 26, 507
59. Springer, M., Graffe, M., Hennecke, H. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 3970
60. Durekovic, A., Flossdorf, J., Kula, M.R. (1973) Eur. J. Biochem. 36, 528
61. Hindennach, J., Stöffler, G., Wittmann, H.G. (1971) Eur. J. Biochem. 23, 7
62. Cashel, M. (1974) Analyt. Biochem. 57, 100
63. Cashel, M., Kalbacher, B. (1970) J. Biol. Chem. 245, 2309
64. Cashel, M., Lazzarini, R.A., Kalbacher, B. (1969) J. Chromatog. 40, 103
65. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.A., Randall, R.I. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265
66. Chu, F., Miller, D.L., Schulz, T., Weissbach, H., Brot, N. (1976) Biochem. Biophys. Res. Commun. 73, 917
67. Roberts, I.W., Roberts, C.W. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 147
68. Dimitriadis, G.J. (1979) Analyt. Biochem. 98, 445
69. Mackie, G.A. (1977) Biochemistry 16, 1391
70. Mackie, G.A. (1977) Biochemistry 16, 4497

71. Berthelot, F., Yaniv, M. (1970) Eur. J. Biochem. 16, 123
72. Baldwin, A.N., Berg, P. (1966) J. Biol. Chem. 241, 831
73. Arndt, D.J., Berg, P. (1970) J. Biol. Chem. 245, 665
74. Tamir, H. (1971) in Methods in Enzymology XVII B, 134
75. Bukhari, A.I., Taylor, A.L. (1971) J. Bacteriol. 109, 844
76. Mergeay, M., Gigot, D., Beckmann, J., Glansdorff, N., Pierard, A. (1974) Molec. gen. Genet. 133, 299
77. Trotta, P., Burt, M.E., Haschenmeyer, R.A., Meister, A. (1971) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 66, 1027
78. Taylor, A.L., Thomson, M.S. (1964) Genetics 50, 659
79. Gigot, D., Crabeel, M., Feller, A., Lissens, W., Pierard, A., Glansdorff, N. (1978) Arch. Int. Physiol. Biochim. 86, 915
80. Lissens, W., Cunin, R., Kelker, N., Glansdorff, N., Pierard, A. (1980) J. Bacteriol. 141, 58
81. Pierard, A., Glansdorff, N., Mergeay, M., Wiame, I.M. (1965) J. Mol. Biol. 14, 23
82. Chamberlin, M.J. (1974) Ann. Rev. Biochem. 43, 721
83. Pastan, I., Adhya, S. (1976) Bact. Rev. 40, 527
84. Travers, A., Baralle, F.E. (1976) in Control of Ribosome Synthesis (Hrsg. Kjeldgaard, N.C., Maaløe, O.) 241. Munksgaard Kopenhagen

85. Burgess, R.R., Travers, A.A. (1971) Proc. Nucl. Acid Res. 2, 851
86. Gallant, J.A. (1979) Ann. Rev. Genet. 13, 393
87. O'Farrell, P.H. (1978) Cell 14, 545
88. Chu, F., Caldwell, P., Weissbach, H., Brot, N. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5387
89. Lindahl, L., Post, L., Nomura, M. (1976) Cell 9, 439
90. Dennis, P.P., Nomura, M. (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 3819
91. Stephens, I.C., Artz, S.W., Ames, B.N. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 4389
92. Reiness, G., Young, H., Zubay, G., Cashel, M. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 2881
93. Yoshimoto, A., Oki, T., Inui, T. (1978) Arch. Microbiol. 119, 81
94. Wirth, R., Buckel, P., Böck, A. (1977) FEBS Letters 83, 103
95. Nass, G., Neidhardt, F.C. (1967) Biochim. Biophys. Acta 134, 347
96. McGinnis, E., Williams, L.S. (1971) J. Bacteriol. 108, 254
97. Neidhardt, F.C., Parker, J., McKeever, W.G. (1975) Annu. Rev. Microbiol. 29, 215
98. Tornheim, K., Gilbert, T.R., Lowenstein, I.M. (1980) Analyt. Biochem. 103, 87

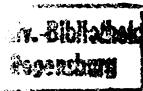
99. Makman, R.S., Sutherland, E.Q. (1965) J. Biol. Chem. 240, 1309
100. Chambers, D.A., Zubay, G. (1969) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63, 118
101. Nissley, S.P., Anderson, W.B., Gottesmann, M.E., Perlman, R.L., Pastan, I. (1971) J. Biol. Chem. 246, 4671
102. Ullmann, A., Joseph, E., Danchin, A. (1979) Proc. Natl. Sci. USA 76, 3194
103. Zaruki-Schulz, T., Jerez, C., Goldberg, G., Kung, H.F., Huang, K.H., Brot, N., Weissbach, H. (1979) Proc. Natl. Sci. USA 76, 6115
104. Cook, W.R., Kalb, W.F., Peace, A.A., Bernlohr, R.W. (1980) J. Bacteriol. 141, 1450
105. Williams, L.S., Neidhardt, F.C. (1969) J. Mol. Biol. 43, 529
106. Yarus, M., Berg, P. (1969) J. Mol. Biol. 42, 171
107. Piepersberg, W., Geyl, D., Buckel, P., Böck, A. (1979) in Regulation of Macromolecular Synthesis by Low Molecular Weight Mediators (Hrsg. Koch, G., Richter, D.) 39 Academic Press
108. Heinemeyer, E.A., Richter, D. (1977) FEBS Letters 84, 357
109. Heinemeyer, E.A., Geis, M., Richter, D. (1978) Eur. J. Biochem. 89, 125
110. Laffler, T., Gallant, J.A. (1974) Cell 3, 47

111. Fallon, A.M., Jinks, C.S., Yamamoto, M., Nomura, M. (1979) J. Bacteriol. 138, 383
112. Fallon, A.M., Jinks, C.S., Strycharz, G.D., Nomura, M. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 3411
113. Wirth, R., Böck, A. (1980) Molec. gen. Genet. 178, 479
114. Fukuda, R. (1980) Molec. gen. Genet. 178, 483
115. Yates, I.L., Arfsten, A.E., Nomura, M. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 1837
116. Dennis, P.P. (1974) Molec. gen. Genet. 134, 39
117. Zimmermann, R.A. (1974) in Ribosomes (Hrsg. Nomura, M., Tissiers, A., Lengeyl, P.) 225 Cold Spring Harbor Laboratory
118. Ehresmann, C., Stiegler, P., Carbon, P., Ungewickell, E., Garrett, R.A. (1980) Eur. J. Biochem. 103, 439
119. Traub, P., Nomura, M. (1968) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 59, 77
120. Mangiarotti, G., Turco, E., Perlo, C., Altruda, F. (1975) Nature 253, 569
121. Cowgill de Narvaez, C., Schauf, H.W. (1978) J. Mol. Biol. 134, 1
122. Mangiarotti, G., Apirion, D., Schlesinger, D., Sileng, L., (1968) Biochemistry 7, 456
123. Nomura, M., Held, W.A. (1974) in Ribosomes (Hrsg. Nomura, M., Tissiers, A., Lengeyl, P.) 193 Cold Spring Harbor Laboratory

124. Apirion, D., Lassar, A.B. (1978) J. Biol. Chem. 253, 1738
125. Ellwood-Kenerly, M., Morgan, E.A., Post, L., Lindahl, L., Nomura, M. (1977) J. Bacteriol. 132, 931
126. Wittmann-Liebold, B., Marzinig, E., Lehmann, A. (1976) FEBS Letters 68, 110
127. Parker, J., Friesen, J.D. (1980) Molec. gen. Genet. 177, 439
128. Folk, W.R., Berg, P. (1971) J. Mol. Biol. 58, 595
129. Cassio, D., Lawrence, F., Lawrence, D.A. (1970) Eur. J. Biochem. 15, 331
130. Wyche, J.-H., Ely, B., Cebula, T.A., Sned, M.C., Hartman, P.E. (1974) J. Bacteriol. 117, 708
131. Jaskunas, S.R., Fallon, A.M., Nomura, M. (1977) J. Biol. Chem. 252, 7323
132. Jaskunas, S.R., Nomura, M. (1977) J. Biol. Chem. 252, 7337
133. Jaskunas, S.R., Fallon, A.M., Nomura, M., Williams, B.G., Blattner, F.R. (1977) J. Biol. Chem. 252, 7355
134. Lindahl, L., Post, L., Zengel, J., Gilbert, S.F., Strycharz, W.A., Nomura, M. (1977) J. Biol. Chem. 252, 7365
135. Lindahl, L., Zengel, J., Nomura, M. (1976) J. Mol. Biol. 106, 837
136. de Boer, H.A., Gilbert, S.F., Nomura, M. (1979) Cell 17, 201

137. Gilbert, S.F., de Boer, H.A., Nomura, M. (1979) Cell 17,
211

138. Young, R.A., Steitz, I.A. (1979) Cell 17, 225



Herrn Professor Dr. A. Böck möchte ich für die Anregung zu dieser Arbeit, für seine vielen hilfreichen Ratschläge und seine große Diskussionsbereitschaft herzlich danken. Ganz besonders danken möchte ich ihm für die sehr intensive wissenschaftliche Förderung, die er mir zuteil werden ließ.

Allen meinen Kollegen möchte ich für zahlreiche Hinweise und Diskussionsbeiträge danken.

Frl. Margit Geier möchte ich besonders herzlich danken für die Drucklegung dieser Arbeit.