
**SorY und UpsM, funktionelle Charakterisierung zweier
sRNAs in *Rhodobacter sphaeroides***

Inaugural Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

– Dr. rer. nat. –

vorgelegt von

Lennart Weber

geboren am 23.02.1987 in Antwerpen, Belgien

angefertigt am Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie

Fachbereich Biologie und Chemie

Justus-Liebig-Universität Gießen

Gießen, Februar 2017

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie, Fachbereich Biologie und Chemie der Justus-Liebig-Universität Gießen, in der Zeit vom Oktober 2011 bis Februar 2017 unter der Leitung von Prof. Dr. Gabriele Klug angefertigt.

1. Gutachterin:

Prof. Dr. Gabriele Klug

Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie
Justus-Liebig-Universität Gießen
Heinrich-Buff-Ring 26-32, 35392 Gießen

2. Gutachter:

Apl. Prof. Dr. Elena Evguenieva-Hackenberg

Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie
Justus-Liebig-Universität Gießen
Heinrich-Buff-Ring 26-32, 35392 Gießen

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, die vorgelegte Thesis selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt zu haben, die ich in der Thesis angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Thesis erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der ‚Satzung der Justus-Liebig-Universität zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis‘ niedergelegt sind, eingehalten. Gemäß § 25 Abs. 6 der Allgemeinen Bestimmungen für modularisierte Studiengänge dulde ich eine Überprüfung der Thesis mittels Anti-Plagiatssoftware.

Datum

Unterschrift

1	Einleitung.....	4
1.1	Relevante Prinzipien der Genregulation von Bakterien.....	4
1.1.1	Sigma- und Transkriptionsfaktoren	4
1.1.2	<i>Riboswitches</i> und RNA Thermometer.....	5
1.1.3	mRNA Degradation und Prozessierung zur Regulation der Genexpression	5
1.1.3.1	Der Einfluss von mRNA Halbwertszeiten	5
1.1.3.2	RNA Prozessierung und Abbau	6
1.1.4	Nicht-kodierende kleine RNAs (sRNAs).....	9
1.1.4.1	<i>cis</i> -kodierte asRNAs	10
1.1.4.2	<i>trans</i> -kodierter asRNAs/sRNAs	11
1.1.4.3	Hfq.....	15
1.2	Oxidativer und photooxidativer Stress	16
1.2.1	Oxidativer Stress durch Elektronentransfer auf O ₂	16
1.2.2	Photooxidativer Stress durch Energietransfer auf O ₂	17
1.2.3	Allgemeine Prinzipien der oxidativen Stressvermeidung und Stressantwort	18
1.3	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	20
1.3.1	Der Photosyntheseapparat von <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	20
1.3.2	Regulation der photooxidativen Stressantwort von <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	21
1.4	Zielsetzung der Arbeit.....	23
2	Material und Methoden	24
2.1	Material	24
2.1.1	Bakterienstämme	24
2.1.2	Plasmide	24
2.1.3	Oligonukleotide	26
2.1.4	Antibiotika	27
2.1.5	Radioaktive Nukleotide	28
2.1.6	Enzyme	28
2.1.7	Molekularbiologische Kits, Reagenzien und Größenstandards	28
2.2	Mikrobiologische Methoden	29
2.2.1	Sterilisation.....	29
2.2.2	Kultivierung von <i>Rhodobacter sphaeroides</i> 2.4.1	29
2.2.3	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	29
2.2.4	Bestimmung von RNA Halbwertszeiten	30
2.2.5	Messung der Zelldichte einer Flüssigkultur	30
2.2.6	Herstellung elektrokompetenter <i>E. coli</i> Zellen	30
2.2.7	Elektrotransformation von <i>E. coli</i> (Elektroporation)	30
2.2.8	Biparentale Konjugation von Plasmid-DNA nach <i>R. sphaeroides</i>	31
2.2.9	Expression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	31
2.3	Molekularbiologische Methoden	32
2.3.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	32
2.3.2	Isolierung von chromosomaler DNA aus <i>R. sphaeroides</i>	32
2.3.3	Isolierung von Gesamt-RNA aus Bakterien mittels „Hot-Phenol“-Methode und DNase/TEX Behandlung	32
2.3.4	Fällung und Reinigung von Nukleinsäuren.....	33
2.3.4.1	Ethanolfällung	33
2.3.4.2	Isopropanolfällung.....	34
2.3.4.3	n-Butanolfällung	34
2.3.4.4	Phenol/Chloroform-Extraktion	34
2.3.5	Restriktion von DNA	34
2.3.6	Ligation von DNA	34
2.3.7	Ligation von PCR Produkten in Zwischenvektoren.....	35
2.3.8	Dephosphorylierung von DNA	35
2.3.9	Polymerase Chain Reaction (PCR).....	35
2.3.10	Ortspezifischen Mutagenese PCR	35
2.3.11	Quantifizierung von Nukleinsäuren	36

2.3.12	Sequenzierung von DNA	36
2.3.13	Radioaktive Markierung durch <i>end-labelling</i>	36
2.4	Gelelektrophoresen	37
2.4.1	Agarosegele zur Auftrennung von DNA	37
2.4.2	Extraktion von DNA aus Agarose-Gelen	37
2.4.3	TBE/PAA-Gele zur Auftrennung kurzer DNA-Fragmente	37
2.4.4	Denaturierende TBE/PAA/Urea-Gele zur Auftrennung von RNA	38
2.4.5	Native TBE/PAA-Gele für EMSAs	38
2.4.6	Extraktion von RNA aus denaturierenden TBE/PAA/Urea-Gelen	39
2.4.7	SDS/PAA-Gele zur Auftrennung von Proteinen	39
2.5	RNA Methoden	40
2.5.1	<i>In vitro</i> Transkription	40
2.5.2	3' terminale Biotinylierung von RNA	40
2.5.3	RNA-Degradationsassays	41
2.5.4	Northern Blot Analyse	41
2.5.5	Detektion mittels <i>phosphoimaging</i>	42
2.5.6	5'-RACE	42
2.5.7	Elektrophoretischer Mobilitäts-shift-assay (EMSA)	42
2.5.8	Quantitative real time RT-PCR (qRT-PCR)	43
2.5.9	Transkriptomanalyse (Microarray-Analyse)	43
2.6	Proteinbiochemische Methoden	45
2.6.1	Proteinmengenbestimmung	45
2.6.2	Nachweis von Proteinen durch Silberfärbung	45
2.6.3	Nachweis von Proteinen durch Coomassiefärbung	45
2.6.4	Western Blot Analyse	46
2.6.5	Aufreinigung rekombinanter Proteine mittels Nickel-Affinitätschromatographie	46
2.6.6	Dialyse von Proteinlösungen	47
2.6.7	<i>pulldown</i> von Proteinen mit biotinylierter RNA	47
2.6.8	β -Galaktosidase <i>assay</i> bei <i>Rhodobacter</i>	48
3	Ergebnisse	49
3.1	SorY (¹ O ₂ resistance RNA Y)	49
3.1.1	Das Expressionsmuster von SorY	49
3.1.2	Ziel-mRNA Suche für SorY mittels Transkriptomstudie & Bindevorhersage	51
3.1.3	Das Protein TakP	55
3.1.4	Validierung der <i>takP</i> mRNA als Ziel-mRNA von SorY	55
3.1.5	Nachweis direkter Interaktion von SorY mit der <i>takP</i> mRNA	56
3.1.6	Biologische Funktion der SorY- <i>takP</i> Bindung bzw. Regulation	57
3.2	UpsM (<i>upstream sRNA mraZ</i>)	59
3.2.1	Der UpsM Genort in dRNASeq durch <i>Solexa</i> Sequenzier-Plattform (Illumina)	59
3.2.2	UpsM entsteht in der 5' UTR des <i>dcw</i> Genclusters	61
3.2.3	Die 5' UTR des <i>dcw</i> Genclusters enthält einen sORF	63
3.2.4	Der sORF in der 5' UTR des <i>dcw</i> Genclusters vermittelt keine Antitermination	64
3.2.5	Konservierung der <i>dcw</i> 5' UTR im Hinblick auf Länge, ncRNA und sORF	65
3.2.6	Das Prozessierungsmuster von UpsM	67
3.2.7	Halbwertszeitbestimmung von UpsM	69
3.2.8	Hfq Bindung und Einfluss auf die Prozessierung von UpsM	71
3.2.9	Einfluss verschiedener RNA Abbauenzyme auf die UpsM Prozessierung	72
3.2.10	Expression und Prozessierung von UpsM in <i>E. coli</i>	73
3.2.11	Die UpsM Prozessierung durch RNase E <i>in vivo</i>	75
3.2.12	Die UpsM Prozessierung <i>in vitro</i>	77
3.2.13	Die UpsM Prozessierung <i>in vivo</i> erfolgt in Abhängigkeit von RpoH _{I/II}	78
3.2.14	Überexpression von UpsM	80
3.2.15	Phänotyp einer UpsM Überexpression	81
3.2.16	Ziel-mRNA Suche mittels Transkriptomstudie & Bindevorhersagen	83
3.2.17	UpsM Ziel-mRNA Validierung I	90
3.2.18	Transkriptomstudie von <i>R. sphaeroides</i> Δ <i>hfq</i>	94
3.2.19	Ziel-mRNA Suche mittels Konvergenz aus Transkriptomstudien und RpoH _{I/II} Regulon	96

3.2.20	UpsM Ziel-RNA Validierung II.....	97
4	Diskussion.....	100
4.1	SorY (¹ O ₂ resistance RNA Y).....	100
4.1.1	Eigenschaften und Expressionsmuster von SorY.....	100
4.1.2	Ziel-mRNA Suche und Validierung.....	101
4.1.3	Biologische Funktion der <i>takP</i> Bindung bzw. Regulation durch SorY.....	102
4.2	UpsM (<i>upstream</i> sRNA <i>mraZ</i>).....	107
4.2.1	Charakterisierung des Genlokus von UpsM.....	107
4.2.2	Das Expressionsmuster und die Prozessierung von UpsM durch RNase E in Abhängigkeit von der Interaktion mit Hfq und der Ziel-RNA RSs0827.....	110
4.2.3	Mögliche Mechanismen bzw. Funktionen von UpsM.....	112
5	Zusammenfassung.....	114
6	Summary.....	115
7	Referenzen.....	116
8	Abkürzungsverzeichnis.....	133
9	Anhang.....	134
10	Akademischer Lebenslauf.....	144
11	Danksagung.....	146

1 Einleitung

Organismen sind in ihrem Habitat sich ständig wechselnden Umweltbedingungen ausgesetzt, an die sie sich adaptieren müssen, um zu überleben. Ständig wechselnde abiotische Umweltfaktoren sind beispielweise Nährstoff- und Mineralangebot, Temperatur, Sauerstoffverfügbarkeit, Osmolarität oder Lichteinstrahlung. Die Adaption kann hierbei kurzfristig durch eine spezifische Zellantwort oder über Generationen in Form von genetischen Mutationen bzw. Evolution erfolgen. Besonders einzellige Organismen wie Bakterien sind zum Überleben jedoch auf eine schnelle Zellantwort angewiesen, weil sie im Vergleich zu höheren multizellulären Organismen Ihrer Umgebung unmittelbarer ausgeliefert sind. Die Zellantwort, die bei Bakterien aus der Wahrnehmung eines Umweltstresses resultiert, wird meist als bakterielle Stressantwort bezeichnet. Um die Stressantwort zu verwirklichen und eine Anpassung an eine Umweltbedingung herbeizuführen, muss das Transkriptom und das Proteom bzw. die Proteinbiosynthese in einer Bakterienzelle durch Mechanismen der Genregulation als Reaktion auf einen intra- oder extrazellulären Stimulus angepasst werden. Hin zur Proteinbiosynthese erfolgt, stark vereinfacht gesagt, während der Transkription zunächst die Umwandlung eines Abschnittes der Erbinformation (DNA) in eine *messenger* RNA (mRNA) durch die RNA Polymerase (RNAP). Im Anschluss erfolgt während der Translation die Synthese eines Proteins anhand der mRNA durch die Ribosomen. Die bakterielle Genregulation zur Veränderung der Proteinbiosynthese kann vielschichtig und komplex sein, wobei es transkriptionelle (z.B. bei Initiation und Elongation), und posttranskriptionelle (z.B. bei Translation und RNA Stabilität) Regulationsmechanismen gibt. Häufig führen Kombinationen aus verschiedenen Regulationsmechanismen zu komplexen Regulationsnetzwerken, die eine optimale Anpassung der Genexpression ermöglichen. Im Folgenden werden einige dieser Mechanismen zum Verständnis dieser Arbeit je nach Relevanz in ihren Grundzügen oder ausführlich beschrieben.

1.1 Relevante Prinzipien der Genregulation von Bakterien

1.1.1 Sigma- und Transkriptionsfaktoren

Die Veränderung der bakteriellen Genexpression auf DNA bzw. transkriptioneller Ebene kann durch Sigma (σ) Faktoren und Transkriptionsfaktoren (TFs) vermittelt werden (Browning & Busby, 2016; Browning & Busby, 2004).

σ Faktoren sind Teil des RNAP Holoenzym und erkennen die spezifische DNA Sequenz der Pribnow-Box bzw. der -10- und der -35 Region im Promotorbereich *upstream* eines Gens (Burgess & Anthony, 2001; Pribnow, 1975). Unterschiedliche σ Faktoren erkennen unterschiedliche DNA-Sequenzen und vermitteln der RNAP somit Promotorspezifität. Zusätzlich helfen Sie beim Aufschmelzen des DNA Doppelstrangs und ermöglichen so den Transkriptionsstart, bei dem sie von der RNAP abfallen (Wosten, 1998). Ein *house keeping* σ Faktor stellt die konstitutive Expression von Genen sicher, die für die Aufrechterhaltung des vegetativen Metabolismus notwendig sind. Dieser primäre σ Faktor wird als RpoD (σ^{70}) in gram-negativen und als σ^A in gram-positiven Bakterien bezeichnet (Helmann & Chamberlin, 1988). Neben den primären gibt es im Schnitt sechs weitere alternative σ Faktoren je Bakteriengenom (Staron *et al.*, 2009). Sie werden nur unter bestimmten Stressbedingungen aktiviert, um die Genexpression zugunsten der Stressantwort zu verändern. Meist erfolgt Ihre Expression ebenfalls stressabhängig, beispielweise reguliert durch Ein- und Zweikomponenten Systeme der Signaltransduktion. Zu der Gruppe der alternativen σ Faktoren zählen auch die ECF (*extracytoplasmic function*) Sigmafaktoren, die auf extracytoplasmatische Stimuli reagieren. Die negative Regulation der ECF Sigmafaktoren erfolgt oft über sogenannte

Anti-Sigmafaktoren (Hughes & Mathee, 1998), deren Strategien von der Blockierung der Bindedomäne für die RNA-Polymerase (Campbell *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2002), über Blockierung der Promotor Erkennung durch das RNAP Holoenzym (Adelman *et al.*, 1997) bis hin zur Induktion der frühzeitigen Dissoziation vom Holoenzym reichen (Chadsey *et al.*, 1998). In Anwesenheit eines Stresstimulus kann der Anti-Sigmafaktor durch unterschiedliche Mechanismen inaktiviert werden, um den σ Faktor freizusetzen. Im klassischen Modell erfolgt die Inaktivierung durch proteolytischen Abbau. Anti-Sigmafaktoren können jedoch auch durch spezifische Anti-Anti-Sigmafaktoren reguliert werden (Sevcikova *et al.*, 2010; Homerova *et al.*, 2012), abhängig von der Phosphorylierung durch ein Zweikomponenten System sein oder direkt durch den jeweiligen Stimulus einer Konformationsänderung unterliegen (Paget, 2015). Liegt ein alternativer σ Faktor aktiv vor, ist er typischerweise für die Transkriptionsinitiation einer Vielzahl an Genen mit funktionellem Zusammenhang verantwortlich. Die Gesamtheit dieser Gene wird als Regulon bezeichnet.

Transkriptionsfaktoren (TFs) binden ebenfalls sequenzspezifisch häufig als Di- oder Multimere an Promotorelemente (Browning & Busby, 2016). Ist der TF ein Repressor wird die Transkription vermindert, handelt es sich um einen Aktivator wird die Transkription verstärkt. In *E. coli* wird die Zahl unterschiedlicher TFs auf ca. 300 Proteine geschätzt (Perez-Rueda & Collado-Vides, 2000). Aktivatoren binden DNA meist an der -35 Region des Ziel-Promotors oder *upstream* davon und tragen in der Regel zur Transkriptionsinitiation bei, indem eine Protein-Protein Interaktion mit der RNAP hergestellt wird oder eine Konformationsänderung der Promotorregion die Zugänglichkeit für die RNAP ermöglicht (Rhodius & Busby, 1998; Browning & Busby, 2004). Operatorsequenzen, an die Repressoren binden, sind im Regelfall am Transkriptionsstart (TSS) zu finden, um die RNAP Assoziation und Elongation zu stören (Lloyd *et al.*, 2001).

1.1.2 *Riboswitches* und RNA Thermometer

Neben proteinogenen Faktoren gibt es auch RNA basierte Elemente zur Modulation der bakteriellen Genexpression. Ein sehr einfaches Prinzip liegt den so genannten *riboswitches* und RNA Thermometern zugrunde. In beiden Fällen wird das regulatorische RNA Segment in *cis* als Teil der Protein kodierenden Sequenz transkribiert. Bei *riboswitches* wird die Genexpression durch die Bildung einer alternativen RNA Struktur in der 5' UTR (5'-untranslatierten Regionen) bei Bindung eines Liganden in der Aptamerdomäne beeinflusst (Garst *et al.*, 2011). Als Liganden können hierbei diverse Moleküle wie Zucker, Aminosäuren, Nukleotide oder ungeladene tRNAs dienen. Durch die Konformationsänderung nach der Assoziation des Liganden kann es je nach *riboswitch* sowohl zum Abbruch bzw. Attenuation als auch zur Elongation der Transkription oder Translation von *downstream* gelegenen *open reading frames* (ORF) kommen (Grundy & Henkin, 2004; Henkin & Yanofsky, 2002). RNA Thermometer regulieren die Translationsinitiation von *downstream* ORFs im Unterschied zu klassischen *riboswitches*, indem eine Konformationsänderung nicht durch einen Liganden sondern durch eine Temperaturänderung herbeigeführt wird. RNA Thermometer sind in der Regel in 5' UTRs verschiedener *heat-shock* Proteinen und Virulenzfaktoren zu finden, wobei die Ribosomenbindestelle (RBS) bei geringer Temperatur unzugänglich in einer Haarnadelstruktur liegt. Erst bei einer Temperaturerhöhung wird diese Struktur aufgeschmolzen, was die Ribosomenbindung und Translationsinitiation ermöglicht (Kortmann & Narberhaus, 2012).

1.1.3 mRNA Degradation und Prozessierung zur Regulation der Genexpression

1.1.3.1 Der Einfluss von mRNA Halbwertszeiten

Neben der Transkriptionsrate einer mRNA spielt deren Halbwertszeit eine wichtige Rolle für die

Proteinbiosynthese, da die Translation eines Proteins durch Ribosomen in direkter Abhängigkeit zur Verfügbarkeit der mRNA steht. Vor allem die Halbwertszeit einer RNA kann auf posttranskriptioneller Ebene durch deren Eigenschaften wie Struktur oder Translationsrate, durch die Interaktion mit anderen RNA Spezies oder durch RNA bindende Proteine sowie durch Ribonukleasen (RNasen) reguliert werden. Das heißt die mRNA-Degradation kann als regulierter Vorgang gesehen werden, der es einem Organismus ebenfalls ermöglicht, seine Genexpression gezielt an veränderte Umweltbedingungen anzupassen (Rauhut & Klug, 1999). Dieser Vorgang ist nicht zuletzt aufgrund der fehlenden Kompartimentierung einer Bakterienzelle und der engen Kopplung von Transkription und Translation durch Polysomen schnell möglich. Zusätzlich ist in Bakterien die durchschnittliche Halbwertszeit eines mRNA Moleküls von drei bis acht Minuten relativ kurz (Bernstein *et al.*, 2002), was eine schnelle Veränderung des Transkriptom im Zuge der Anpassung erlaubt (Rauhut & Klug, 1999). Dass die Lebensdauer einer RNA eine wichtige regulatorische Eigenschaft ist, zeigt sich auch anhand von bakteriellen mRNA Spezies, deren Halbwertszeit stark abweichend vom Durchschnittswert nur wenige Sekunden oder gar eine Stunde beträgt. Die Halbwertszeit einer spezifischen mRNA kann sich sogar in Abhängigkeit von den Umweltbedingungen unterscheiden. Ein Beispiel hierfür ist die Sauerstoff abhängige Reduzierung der Halbwertszeit der poly-cistronischen mRNA des *puf*-Operons von *Rhodobacter capsulatus*, das Proteine des Photosyntheseapparates kodiert, die bei aerober Atmung kaum benötigt werden (Klug, 1991). Um die Strukturgene eines Operons differentiell zu exprimieren, können lange polycistronische mRNAs durch ribonukleolytische Spaltung zu einzelnen Segmenten, die unterschiedlich stabil sind, prozessiert werden. Das bereits erwähnte *puf*-Operon von *R. capsulatus* dient hierbei ebenfalls als Beispiel (Rauhut & Klug, 1999). Die Gene *pufB* und *A* in der 5'-Hälfte kodieren pigmentbindende Proteine des Lichtsammelkomplexes I (LHI Komplex) und die Gene *pufL* und *M* in der 3'-Hälfte Proteine des photosynthetischen Reaktionszentrums (RC) (Klug, 1993; Choudhary & Kaplan, 2000). Im Photosyntheseapparat werden die Genprodukte des LHI Komplexes im Vergleich zum RC im Verhältnis 15:1 benötigt. Um diese Stöchiometrie zu ermöglichen, führt ein destabilisierendes RNA Element in der *pufL* Region zur Spaltung der polycistronischen mRNA durch RNase E und unmittelbarer Degradation des 3'-Segmentes (Fritsch *et al.*, 1995). Die längere Lebensdauer des 5' Segmentes, sichergestellt durch intercistronische Haarnadelschleifenstrukturen an 3' und 5' Terminus (Belasco *et al.*, 1985; Heck *et al.*, 1996; Klug *et al.*, 1987), führt in Relation zu einer höheren Synthesemenge der Proteine des LHI Komplexes durch Ribosomen.

1.1.3.2 RNA Prozessierung und Abbau

Wie einleitend erwähnt sind Ribonukleasen (RNasen) an der posttranskriptionellen Regulation von RNA Halbwertszeit beteiligt. In der Zelle ermöglichen sie die funktionelle Prozessierung bzw. Degradation von RNA und die „chemische“ RNA Degradation bzw. den Abbau zum Nukleotid-Recycling, wobei beide Prozesse Kaskade ähnlich eng miteinander verknüpft sind.

RNasen sind Enzyme, die eine hydrolytische oder phosphorolytische Spaltung von Phosphodiester-Bindungen in RNA Molekülen katalysieren. Einige RNasen sind ubiquitär und in fast allen Bakteriengenomen zu finden, während andere weniger stark verbreitet nur in einzelnen phylogenetischen Gruppen vorkommen (Kaberdin *et al.*, 2011). Für den gram-negativen Modellorganismus *Escherichia coli* sind mehr als 20 verschiedene ribonukleolytische Enzyme bekannt (Condon, 2007). Prinzipiell kann nach Endo- und Exoribonukleasen unterschieden werden. Endoribonukleasen katalysieren die interne Spaltung in einem RNA Molekülen, während Exoribonukleasen am 5'- oder 3'-Terminus beginnend, ein RNA-Molekül unter Freisetzung von

Nukleosidmonophosphaten abbauen. Von einer funktionellen Degradation oder Prozessierung wird bei der initialen RNA Spaltung durch Endonukleasen gesprochen, die mit dem Verlust der Translatierbarkeit eines RNA Abschnittes einhergeht und auch als initiales Ereignis beim RNA Abbau betrachtet wird. Dieser Schritt wird in Gram-negativen Bakterien weitestgehend RNase E zugeschrieben (Mackie, 2013). Meist erfolgt der „chemische“ RNA Abbau durch 3´Exoribonukleasen in einer Kaskade direkt im Anschluss, weil Primärtranskripte zunächst durch die Haarnadelstruktur des Rho unabhängigen Transkriptionsterminators geschützt sind. Neben dieser strukturellen Protektion wird eine initiale Spaltung der RNA durch RNase E auch durch eine großflächige Abdeckung durch mehrere aufeinander folgende translatierende Ribosomen, auch Polysom genannt, verhindert. Das heißt eine hohe Translationsrate, beispielsweise wegen einer effizienten Ribosomenbindestelle (*shine-dalgarno sequence*), minimiert die Zugänglichkeit des Substrates für die Endonuklease (Wagner *et al.*, 1994; Jurgens *et al.*, 1998). Hierbei handelt es sich zunächst nur bedingt um eine Regulation der mRNA Degradation, jedoch können nicht kodierende kleine RNAs (siehe 1.1.4.1 und 1.1.4.2), *riboswitches* (siehe 1.1.2) und RNA Bindeproteine sehr wohl die Translationsrate und somit eine initiale RNA Spaltung, beispielsweise durch RNase E, regulieren (Deana & Belasco, 2005; Kaberdin & Blasi, 2006; Vecerek *et al.*, 2005).

Wie erwähnt wird die initiale RNA Spaltung in Gram-negativen Bakterien weitestgehend der Endonuklease RNase E (*rne*) zugeschrieben (Mackie, 2013). In *E. coli* ist dieses Enzym essentiell, weil es zur Reifung der 5S rRNA benötigt wird (Misra & Apirion, 1979). Zusätzlich ist es an der Reifung von tRNAs (Li & Deutscher, 2002) und einiger kleiner nicht-kodierender RNAs beteiligt (Sim *et al.*, 2002; Lin-Chao *et al.*, 1999). Ein Rne Monomer besteht aus einer N-terminalen katalytischen Domäne (McDowall & Cohen, 1996) und einer relativ unstrukturierten C-terminalen Domäne.

An der C-terminalen Domäne assemblieren weitere Proteine zur Bildung eines RNA degradierenden membranständigen Multiproteinkomplexes, das als Degradosom bezeichnet wird und eine besondere Rolle beim RNA Abbau einnimmt (Vanzo *et al.*, 1998; Kaberdin *et al.*, 1998). Das Degradosom von *E. coli* setzt sich neben RNase E aus der Polynukleotid-Phosphorylase (PNPase), der DEAD-Box Helikase Rhlb und dem glykolytische Enzym Enolase zusammen (Carpousis, 2007). Die Komplexbildung bzw. räumliche Nähe der Endoribonuklease RNase E zur Exoribonuklease PNPase führt wahrscheinlich zu einem schnellen und effizienten Abbau von RNA Fragmenten nach initialer Spaltung durch RNase E. Die DEAD-Box RNA-Helikase ermöglicht hierbei die Auftrennung störender helikaler Strukturen unter Verbrauch von ATP (Liou *et al.*, 2002). Der Aufbau des Degradosoms ist in Enterobakterien weitgehend konserviert (Kaberdin *et al.*, 2011), während die Proteinkomponenten in anderen Proteobakterien stark variabel sind. So besteht der Multienzymkomplex von *Rhodobacter capsulatus* hauptsächlich aus RNase E, zwei DEAD-box RNA Helikasen und Rho, während die PNPase nur eine sehr schwache Interaktion mit dem Komplex eingeht (Jager *et al.*, 2001).

Das aktive RNase E Enzym ist ein Tetramer aus vier Rne Monomeren (Mackie, 2013) und hat eine Präferenz für einzelsträngigen, AU-reichen Regionen in unmittelbarer Nachbarschaft zu *hairpin*-Strukturen, die jedoch nicht die Spezifität sondern die Prozessivität beeinflussen (McDowall *et al.*, 1994; McDowall *et al.*, 1995; Cormack & Mackie, 1992). RNA Abschnitte dieser Art, deren Zugänglichkeit besonders entscheidend für die Initiation der RNA Degradation sind, werden auch als destabilisierende Elemente bezeichnet. Zusätzlich zum katalytischen Zentrum besitzt das Enzym eine 5´ Phosphat Sensortasche in der N-terminalen Domäne, in der eine Monophosphatgruppe des 5´ Endes des RNA Substrats binden kann (Callaghan *et al.*, 2005). Diese Bindung führt zu einem positiven allosterischen Effekt auf die katalytische Aktivität der RNase (Jiang & Belasco, 2004; Jourdan & McDowall, 2008). Aus dieser Eigenschaft ergeben sich zwei mögliche RNA

Degradationswege für RNase E. Ein 5' Ende abhängiger Weg (*5' end-dependent pathway*) und der Weg des direkten Eintritts (*direct entry pathway*) (Laalami *et al.*, 2014) (Abbildung 1).

Beim *direct entry pathway* wird das triphosphorylierte 5' Ende von Primärtranskripten nicht von der Sensortasche gebunden. Zur initialen Spaltung kommt es folglich unabhängig vom 5' Ende. Das resultierende 5' Fragment wird dann exonukleolytisch abgebaut, während das entstandene 5' monophosphorylierte 3' Fragment jetzt bindend an die Sensortasche von RNase E erneut bzw. sekundär gespalten wird.

Im Falle des *5' end-dependent pathway* beginnt der Abbauweg mit der Entfernung eines Pyrophosphats vom Primärtranskript durch eine RNA Pyrophosphohydrolase (RppH) (Deana *et al.*, 2008). Das nun monophosphorylierte 5' Ende des Substrats kann dann die Sensortasche der RNase E binden und unterstützt die initiale Spaltung des Substrats *downstream*. Der sekundäre Abbau erfolgt dann wie für den *direct entry pathway* beschrieben. Beide Abbauwege unterliegen diversen Regulationsmechanismen. Im Hinblick auf diese Arbeit ist besonders wichtig, dass, nicht zuletzt wegen der Interaktion mit dem RNA Chaperon Hfq (siehe 1.1.4.3), die Aktivität von RNase E als auch die Zugänglichkeit der Substrate von kleinen nicht-kodierenden RNAs beeinflusst werden kann (siehe 1.1.4).

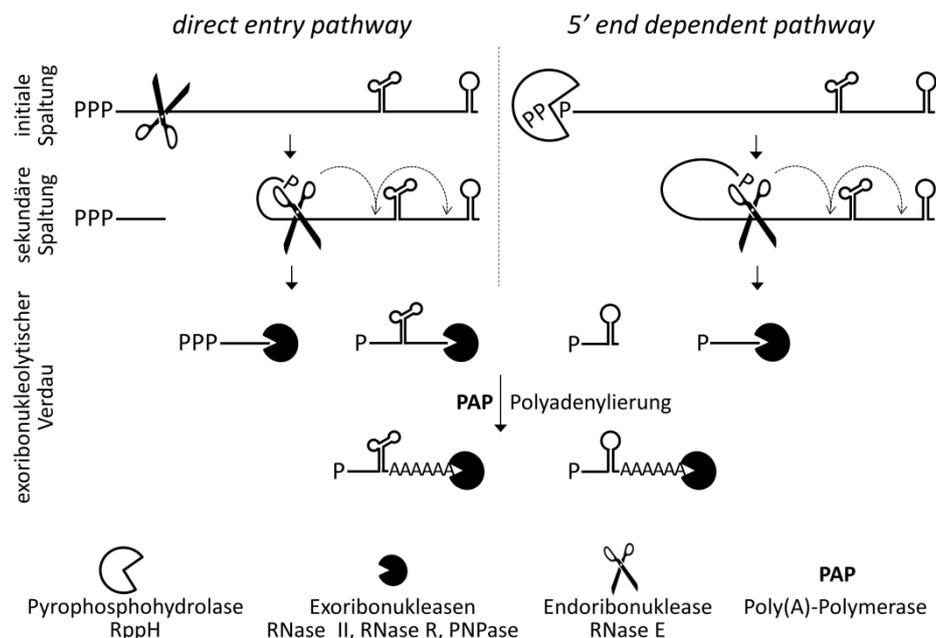


Abbildung 1: RNA Degradationswege in *E.coli* bei initialer RNase E Spaltung. Beim *direct entry pathway* erfolgt die initiale Spaltung durch die Endoribonuklease RNase E unabhängig vom 5' Ende des RNA Substrates. Das resultierende 5' Fragment wird exonukleolytisch abgebaut. Das entstandene 3' Fragment bindet durch das 5' Monophosphat aktivierend an die Sensortasche von RNase E und induziert sekundäre Spaltungen *downstream*. Im Falle des *5' end-dependent pathway* beginnt der Abbauweg mit der Entfernung eines Pyrophosphats vom Primärtranskript durch eine RNA Pyrophosphohydrolase (RppH), sodass ein monophosphoryliertes 5' Ende vorliegt. Nach initialer und sekundärer endoribonukleolytischer Spaltung erfolgt der RNA Abbau zu Nucleosidmonophosphaten ausgehend von den 3'-Enden durch die Exoribonukleasen RNase II, RNase R und PNPase. Stabilisierende Sekundärstrukturen unterbrechen den exonukleolytischen Abbau und werden dann durch die Poly(A)-Polymerase polyadenyliert, damit die 3' Enden wieder von Exonukleasen angreifbar sind.

Neben RNase E ist RNase III (*rnc*), aktiv als Homodimer (Li & Nicholson, 1996), eine weitere Endoribonuklease, die ubiquitär in Bakterien vorliegt (Lamontagne *et al.*, 2001). Für dieses Enzym ist es ebenfalls schwierig, eine genaue Substratspezifität zuzuordnen, jedoch ist RNase III die einzige bakterielle dsRNA spezifische Endoribonuklease, die in helikalen RNA-Strukturen schneidet (Conrad *et al.*, 1998). Eine Spaltung durch RNase III kann prinzipiell natürlich ebenfalls den RNA Abbau

einleiten, allerdings wird die biologische Relevanz des Enzyms vor allem der Reifung von tRNA Vorläufern und ribosomaler RNA zugeschrieben (Babitzke *et al.*, 1993; Evguenieva-Hackenberg & Klug, 2000). Zusätzlich nimmt RNase III eine ähnlich wichtige Rolle bei der posttranskriptionellen Genregulation, nicht zuletzt im Zuge der Stressantwort, ein. Hierbei ist RNase III aufgrund der Substratspezifität zur initialen Spaltung von doppelsträngigen Duplexen aus nicht-kodierenden kleinen RNAs und deren Ziel-mRNAs in der Lage, was unmittelbar zum RNA Abbau führt (Afonyushkin *et al.*, 2005; Huntzinger *et al.*, 2005; Vogel *et al.*, 2004).

Der „chemische“ RNA Abbau zu Nukleosidmonophosphaten nach obligatorischer initialer Spaltung durch eine Endoribonuklease erfolgt in *E. coli* durch die Exoribonukleasen RNase II, RNase R und PNPase ausgehend von 3'-Enden der resultierenden ungeschützten 5' Fragmente, weil ursprüngliche 3'-Enden von Primärtranskripten meist durch die Haarnadelstruktur eines Rho unabhängigen Transkriptionsterminators geschützt sind (Abbildung 1). Somit können Exoribonukleasen das Substrat hier nicht binden. Alle drei Exoribonukleasen weisen *in vitro* unterschiedliche Substratspezifitäten auf, scheinen *in vivo* jedoch redundant zu fungieren. Gemein haben alle Exonukleasen, dass deren Abbau durch Sekundärstrukturen verlangsamt oder unterbunden wird. Dies ist die entscheidende Voraussetzung für den selektiven Abbau von polycistronischen mRNAs und die damit verbundene Regulation der Genexpression, wie eingangs für das *puf* Operon beschrieben (1.1.3.1). Letztendlich erfolgt der Abbau derartiger Strukturen mit Hilfe der Poly(A)-Polymerase (PAP1), die zunächst unmittelbar *downstream* der störenden Strukturen Poly(A)-Schwänze synthetisiert. Zusätzlich kann auch die PNPase im Extremfall bzw. bei geringer intrazellulärer Konzentration von anorganischem Phosphat die Polymerisation von RNA katalysieren (Mohanty & Kushner, 2002). Diese einzelsträngigen RNA Abschnitte ermöglichen die erneute Bindung von RNase R oder PNPase am 3'-Ende und somit eine Rückkehr zur exoribonukleolytischen Degradation zu Nukleosidmonophosphaten (Regnier & Hajnsdorf, 2009).

1.1.4 Nicht-kodierende kleine RNAs (sRNAs)

Historisch gesehen wurde RNA ursprünglich nur eine Funktion als informationstragendes Intermediat zwischen DNA und Protein oder eine Funktion bei der Proteinbiosynthese als tRNA oder rRNA zugeschrieben. Das Konzept von RNA als Regulator wurde erstmals beiläufig bei der Beschreibung des Operon Modells 1961 postuliert (Jacob & Monod, 1961), im Anschluss jedoch für zwei Jahrzehnte vergessen, während die Genregulation durch Proteine immer besser charakterisiert wurde. Erst in den 80er Jahren wurde die ursprüngliche Annahme von Jacob und Monod durch die Entdeckung der katalytischen RNA M1 des Ribozyms RNase P (Kruger *et al.*, 1982; Guerrier-Takada *et al.*, 1983) und durch die Erstbeschreibung zweier nicht-kodierender kleinen RNAs (RNAI und RNAII) bestätigt, die Plasmid-kodiert durch *antisense* Basenpaarung aneinander die Kopienzahl von Plasmiden in *E. coli* regulieren (Stougaard *et al.*, 1981; Tomizawa *et al.*, 1981). Ebenfalls anhand von *E. coli* wurde kurze Zeit später das erste Beispiel für eine chromosomal kodierte kleine RNA (MicF), die durch Basenpaarung die Translation und Stabilität einer mRNA (*ompF*) in *trans* negativ reguliert, inklusive des Mechanismus publiziert (Mizuno *et al.*, 1984). Dieses Beispiel markiert mehr oder weniger den Beginn des Forschungsfeldes zur posttranskriptionellen Genregulation in Bakterien durch nicht-kodierende kleine RNAs, die jetzt als sRNAs oder asRNAs bezeichnet werden. Allerdings führte die sRNA Forschung in den nächsten beiden Jahrzehnten ein Nischendasein mit nur gelegentlichen Veröffentlichungen. Erst ab 2001 führte die Anwendung neuer Technologien zur explosionsartigen genomweiten Identifikation vieler sRNAs durch bioinformatische Vorhersagen, Microarray Studien und *shotgun cloning* größenfraktionierter RNA (Argaman *et al.*, 2001; Rivas *et al.*, 2001; Wassarman

et al., 2001; Vogel *et al.*, 2003), zuletzt begünstigt durch die später aufkommenden *high throughput* RNA Sequenzierungsmethoden (Sittka *et al.*, 2008; Sharma *et al.*, 2010; Sharma & Vogel, 2014). Heute wissen wir, dass in allen Bakterien meist hunderte sRNAs zu finden sind, die eine Ebene der Genregulation darstellen. Definitionsgemäß sind diese Transkripte im Regelfall zwischen 50 und 300 Nukleotide lang und können grob in zwei Gruppen unterteilt werden: I) *cis*-kodierte *antisense* RNAs/asRNAs und II) *trans*-kodierte asRNAs/sRNAs.

1.1.4.1 *cis*-kodierte asRNAs

Cis-kodierte asRNAs werden auf dem Gegenstrang ihres Zielgens, also perfekt komplementär zur ihrer einzigen Ziel-mRNA transkribiert, an die Sie bei Induktion zum Zwecke der Regulation perfekt basenpaarend binden können (Georg & Hess, 2011). In diesem Fall kann die Doppelstrangbildung dazu führen, dass eine Spaltungsstelle für eine doppelstrangspezifische Endoribonuklease wie RNase III entsteht und die Stabilität der Ziel-RNA herabgesetzt wird. Ein prominentes Beispiel hierfür ist die asRNA OOP des λ Phagen, die komplementär zur λ cII Repressor mRNA ist und bei Überexpression die initiale RNase III Spaltung ermöglicht, um die Zelllyse zu induzieren (Krinke & Wulff, 1990). Umgekehrt kann der Duplex aber auch die Spaltungsstelle einer Einzelstrang spezifischen Endoribonuklease wie RNase E maskieren und somit stabilisierend wirken (Stazic *et al.*, 2011). In anderen Fällen ermöglicht der asRNA-mRNA Duplex die gezielte Spaltung einer polycistronischen mRNA, was für die *cis*-kodierte asRNA GadY und die *gadXW* mRNA in *E. coli* gezeigt wurde (Opdyke *et al.*, 2004). Oder die Duplexbildung induziert sogar die Transkriptionstermination innerhalb eines Operon, wie im Falle der asRNA RNA β in *Vibrio anguillarum* (Stork *et al.*, 2007). Beide Regulationsmechanismen ermöglichen eine unterschiedlich starke Expression der verschiedenen Strukturgene. Relativ ähnlich zu den meisten *trans*-kodierten sRNAs blockiert die *cis*-kodierte asRNA SymR, die komplementär zur 5' UTR von *symE* ist, bei Induktion durch die Duplexbildung die RBS der mRNA. Primär führt dies zu einer geringeren SymE Translationsrate und dadurch verursacht, also sekundär, auch zu einer geringeren mRNA Stabilität (Kawano *et al.*, 2007). Weitaus weniger gut verstanden ist die transkriptionelle Regulation, die von *antisense* Transkripten ohne direkte Basenpaarung ausgeht. Diese Mechanismen werden allgemein als transkriptionelle Interferenz bezeichnet und basieren im Grunde auf der proximalen Position der Promotoren, an denen divergente Transkription stattfindet. Bei der transkriptionellen Interferenz kann nach drei Mechanismen unterschieden werden: Dem Kollisionsmodell, der Promotor Okklusion und der *sitting duck* Interferenz (Shearwin *et al.*, 2005; Sneppen *et al.*, 2005). Beim *ubiG-mccAB* Operon und der asRNA *mccA* in *Clostridium acetobutylicum* sollen die divergent elongierenden RNA Polymerasen laut Kollisionsmodell aufeinandertreffen, wobei eine oder beide RNAs freigesetzt bzw. terminiert werden. Diese Beobachtung kann bei alleiniger ektopischer Expression der asRNA nicht gemacht werden (Andre *et al.*, 2008). Vermutlich geschieht dies nicht wegen einer direkten sterischen Interaktion der Elongationskomplexe, sondern möglicherweise aufgrund des positiven Supercoils der DNA vor den Polymerasen (Crampton *et al.*, 2006). Beim Okklusions Modell wird davon ausgegangen, dass langsam elongierende oder pausierende RNA Polymerasen, die Bildung des Initiationskomplexes an einem schwachen Promotor auf dem Gegenstrang verhindern. Als mögliches Beispiel werden hierbei die divergenten λ Phagen Promotoren P_R und P_{RE} angeführt (Palmer *et al.*, 2009). Beim *sitting duck* Modell entfernt eine elongierende RNA Polymerase bei Kollision eine andere RNA Polymerase, die an einem schwachen divergenten Promotor im offenen Komplex gebunden ist. Dieser Mechanismus scheint auf den lytische Phase Promotor pR und lysogenen Promoter pL des Bakteriophagen 186 zuzutreffen (Callen *et al.*, 2004; Sneppen *et al.*, 2005).

1.1.4.2 *trans*-kodierter asRNAs/sRNAs

Im Vergleich zu *cis*-kodierten asRNAs sind die Genorte *trans*-kodierter asRNAs/sRNAs in *trans* lokalisiert bzw. räumlich von Genen der Zielmoleküle getrennt. Bei den Zielmolekülen handelt es sich bis auf wenige Ausnahmen um mRNAs, deren Translationsrate oder Stabilität bei Basenpaarung mit der sRNA beeinflusst wird. Aufgrund der unabhängigen Positionen im Chromosom binden *trans*-kodierte sRNAs nicht, wie *cis*-kodierte asRNAs perfekt komplementär, sondern imperfekt. Die Binderegionen sind hierbei relativ kurze Bereiche mit ca. 5 – 20 Basenpaarungen. Da diese Interaktionen relativ schwach sind, wird die Komplexbildung vor allem in gram-negativen Bakterien vom abundanten RNA Chaperon Hfq gefördert (1.1.4.3).

Die Biogenese von *trans*-kodierten sRNAs kann vielfältig ablaufen. Ihre Transkription wird meist durch einen eigenen Promotor gesteuert, Rho unabhängig durch starke Terminatoren beendet und findet typischerweise in intergenischen Regionen (IGR) statt, also zwischen zwei Genen/ORFs. Viele *trans*-kodierte sRNAs werden aber auch in gleicher Orientierung innerhalb eines proteinkodierenden Gens oder Operons transkribiert. Erst kürzlich sind 3' UTRs als Reservoir für sRNAs in den Fokus gerückt (Chao *et al.*, 2012). Hierbei erfolgt die Reifung durch endoribonukleolytische Prozessierung *upstream* des Terminators einer mRNA. Gemein haben solche Transkripte, dass sie Teil des Hfq Netzwerks sind (Chao *et al.*, 2012; Miyakoshi *et al.*, 2015b) und eine Funktion in *trans* haben können (Chao & Vogel, 2016; Miyakoshi *et al.*, 2015c; Kim *et al.*, 2014). Weitaus seltener sind sRNAs die einer 5' UTR einer mRNA entsprechen (diskutiert in Abschnitt 4.2.1). Ihre Transkription wird vom Promotor eines proteinkodierenden Gens gesteuert und ihre Reifung erfolgt durch eine vorzeitige Termination oder ebenfalls durch endoribonukleolytische Prozessierung. Die Expression der meisten sRNAs erfolgt nicht konstitutiv, sondern wird im Rahmen von Stressantworten induziert.

Die Induktion führt zu einer Veränderung der Genexpression, um zur Anpassung an veränderte Umweltbedingung beizutragen. Insofern ersetzen sRNAs entweder TFs und alternative Sigmafaktoren oder stellen eine zusätzliche posttranskriptionelle Ebene der Genregulation dar. In einigen Fällen ist das Zusammenspiel ein komplexes Netzwerk. Besonders häufig ist beispielweise die gegenseitige Regulation von sRNA und TF/Sigmafaktor in Form von gemischten *feedback loops* (siehe *OmrA-ompR*, *RybB-σE*) (Guillier & Gottesman, 2008; Thompson *et al.*, 2007) oder kohärenten/inkohärenten *feedforward loops* (siehe *PrrA-PcrZ-bchN*; *CRP-Spot42-galk*) (Alon, 2007; Mank *et al.*, 2013; Beisel & Storz, 2011). Wird außerdem ein TF/Sigmafaktor postranskriptionell durch eine sRNA reguliert, beeinflusst die sRNA indirekt auch das dazugehörige und weiterführende Regulons. Die sRNAs *OxyS*, *DsrA*, *RprA* und *OxyR* werden in *E. coli* und *Salmonella* beispielweise von unterschiedlichen TFs induziert, regulieren jedoch alle *rpoS* (σ^S) posttranskriptionell. Gleichzeitig sind diverse sRNAs und TFs im σ^S Regulon vorhanden, die wiederum die Expression einer eigenen Untergruppe an Genen beeinflussen (Levi-Meyrueis *et al.*, 2014). Deshalb werden die meisten regulierten Gene während der Stressantwort auch durch sRNA beeinflusst sind (Holmqvist *et al.*, 2012). Zusätzlich zeigen sich bei gut untersuchten Bakterien Überschneidungen im regulatorischen Netzwerk, weil auch sRNAs wie Sigmafaktoren überlappende Regulons bzw. gleiche Ziel-mRNAs haben können, jedoch durch unterschiedliche Umweltreize induziert werden und davon abhängig unterschiedliche Phänotypen hervorrufen. Die *csgD* mRNA wird beispielsweise durch die Bindung der fünf sRNAs *McaS*, *RprA*, *GcvB*, *OmrA/B* negativ reguliert, um die Biofilmbildung zu unterstützen, wobei die Signale Glukosemangel, osmotischer Stress, Membranstress und stationäre Phase je nur eine der sRNAs induzieren (Mandin & Guillier, 2013; De Lay & Gottesman, 2012).

Trans-Kodierte sRNAs sind in vielerlei Hinsicht multifunktionell. Einerseits kann eine sRNA diverse Ziel-RNA Spezies haben und in diverse regulatorische Netzwerke eingreifen, zum anderen sind die

Mechanismen zur Regulation der Zielgenexpression vielfältig (Abbildung 2). Für ein besseres Verständnis sind die meisten Mechanismen in den folgenden Absätzen erklärt:

Translationsinhibition durch das Blockieren der Ribosomenbindestelle (RBS) (Abbildung 2A): Der Großteil der sRNAs bindet seine Ziel-mRNAs in der 5' UTR nahe oder an der RBS. Häufig überlappt die Region direkter Basenpaarung die Shine Dalgarno Sequenz (SD) und/oder das Startkodon, wie im Falle der sRNA-mRNA *SgrS-ptsG* (Kawamoto *et al.*, 2006), *MicA-ompA* (Udekwu *et al.*, 2005) *DapZ/oppA* oder *GcvB/oppA* (Chao *et al.*, 2012). Prinzipiell ist bei diesem Mechanismus jedoch auch eine Basenpaarung innerhalb der 55 nt, die die 30S ribosomale Untereinheit binden (Huttenhofer & Noller, 1994), bis hin zum fünften Kodon des ORFs möglich (Bouvier *et al.*, 2008a). Das verhindert den Eintritt der 30S ribosomalen Untereinheit sterisch und somit auch die Translation der mRNA. Manche sRNA-mRNA Duplexe, wie *OxyS/fhlA* in *E. coli* oder *RNAIII/coa* in *S. aureus*, werden zusätzlich durch eine zweite Binderegion weiter *downstream* in der Protein kodierenden Sequenz (CDS) stabilisiert (Altuvia *et al.*, 1998; Chevalier *et al.*, 2010).

Translationsinhibition durch das Blockieren einer Ribosomen *standby site* oder eines *enhancer* Elements (Abbildung 2B): Manche sRNAs binden mRNAs weit *upstream* der RBS und inhibieren deren Translation trotzdem. Hier ist es nicht die RBS, sondern ein anderes regulatorisches Element, dessen Zugänglichkeit bei sRNA Bindung gestört wird. Im Falle von *IstR1-tisB*, ist die RBS unzugänglich in einer transienten aber stabilen Sekundärstruktur lokalisiert. Ca. 100 Nukleotide *upstream* liegt eine Ribosomen *standby site*, die zur Assoziation an die 30S ribosomale Untereinheit fähig ist. Bei gelegentlicher Aufschmelzung der stabilen Sekundärstruktur kommt es zur Translationsinitiation des Antitoxins, was durch das Blockieren der Ribosomen *standby site* durch Basenpaarung der sRNA *IstR1* verhindert werden kann (Darfeuille *et al.*, 2007; Wagner & Unoson, 2012). Ein anderes Beispiel ist *GcvB*, eine sRNA, die A/G reiche Sequenzen zur Bindung an C/A reiche *enhancer* Elemente weit *upstream* von SDs nutzt (Sharma *et al.*, 2007).

Indirekte Translationsinhibition durch das Blockieren der RBS eines *leader* ORFs (Abbildung 2C): Die Translation eines ORFs, dessen RBS aufgrund einer Sekundärstruktur zunächst nicht zugänglich ist, kann in manchen Fällen durch räumliche Kopplung der Translation eines kleinen *upstream* ORFs (uORF oder sORF), häufig auch als *leader* Peptid bezeichnet, ermöglicht werden. Falls die RBS des *leader* Peptids durch sRNA Bindung jedoch ebenfalls geblockt wird, hat dies eine indirekte Translationsinhibition des ORFs zur Folge. *RyhB* ist die erste chromosomale *trans*-kodierte sRNA, für die dieser Mechanismus beschrieben wurde. Vereinfacht inhibiert sie die Translation des Eisenaufnahmeregulators *Fur* indirekt durch eine direkte Inhibition der Translation des *upstream* ORF von *fur* (Vecerek *et al.*, 2007).

Aktivierung der Translation (Abbildung 2D): Die sRNA basierte Aktivierung der Translation einer mRNA ist ebenfalls ein weit verbreiteter Mechanismus, der erstmals für die sRNA *DsrA* und die *rpoS* mRNA beobachtet wurde. Hierbei enthält die Ziel-mRNA typischerweise eine längere, hoch strukturierte 5' UTR. In dieser ist die RBS unzugänglich in einer Stammschleifenstruktur maskiert, die auch als *fold-back* Struktur bezeichnet wird, da sie bei sRNA bzw. *DsrA* Bindung entfaltet wird und die RBS freigibt (Majdalani *et al.*, 1998).

Veränderung der Ziel-mRNA Stabilität/Degradation als sekundärer Effekt (Abbildung 2E): Wie in Absatz 1.1.3.2 ausgeführt ist die Stabilität/Degradation einer mRNA abhängig von der Translationsrate, weil das Transkript im Polysom geschützt ist. Wird zunächst nur die Translationsrate einer mRNA durch eine sRNA moduliert, kommt es deshalb in der Regel auch zu einer Veränderung der mRNA Stabilität, was hier als sekundärer Effekt bezeichnet wird. Bei der Inhibition oder

Aktivierung der Translation einer mRNA ist deshalb von einer Destabilisierung oder Stabilisierung auszugehen. Deutlich wird dieser sekundäre Effekt im *SgrS-ptsG* System. *SgrS* führt sowohl zur Translationsinhibition als auch zur Hfq- und RNase E abhängigen Degradation der *ptsG* mRNA (Vanderpool & Gottesman, 2004). In einem Stamm mit inaktivierter RNase E und somit inaktivierter *ptsG* mRNA Degradation kommt es trotzdem zur gleichen Translationsrepression wie im Wildtyp (Morita *et al.*, 2006). Das heißt im Hinblick auf die Regulation ist vor allem die Repression ausschlaggebend und die Degradation als zweitrangiger Nebeneffekt zu sehen. Im Vergleich hierzu ist für andere Systeme eine kombinatorische Wirkung von primärer Translationsmodulation und kausaler Veränderung der Stabilität natürlich zwingend für eine effiziente mRNA Regulation erforderlich.

Veränderung der mRNA Stabilität als primäre Funktion (Abbildung 2F): Die Bedeutung der Regulation von mRNA Stabilitäten und die initialen Schritte der RNA Degradation wurden bereits in Absatz 1.1.3.1 und 1.1.3.2 beschrieben. Viele sRNAs haben Binderegion in der kodierenden Sequenz von mRNAs weit *downstream* von der RBS. Somit haben Sie keinen direkten Effekt auf die Translationsinitiation und modulieren primär die mRNA Degradation ähnlich wie cis-kodierte asRNAs (siehe 1.1.4.1). Die Bildung eines sRNA-mRNA Duplexes kann beispielsweise ein Substrat für eine doppelstrangspezifische Endoribonuklease wie RNase III schaffen, die Spaltungsstelle einer Einzelstrang spezifischen Endoribonuklease wie RNase E maskieren oder eine solche Spaltungsstelle durch strukturelle Neuordnung proximal zum Duplex schaffen. Je nach Mechanismus wird also die Stabilität der mRNA in der Zelle positiv oder negativ beeinflusst, was sich dementsprechend positiv oder negativ auf die Proteinausbeute auswirkt.

Zusätzlich zum Generieren einer Spaltungsstelle durch strukturelle Neuordnung proximal zum Duplex kann eine sRNA auch direkt die Aktivität von RNase E fördern. Wie in Absatz 1.1.3.2 ausgeführt besitzt RNase E abseits des katalytischen Zentrums eine Sensortasche für 5' Monophosphate. Bei Bindung des 5' Monophosphats eines RNA Substrates kommt es zu einem positiven allosterischen Effekt auf die katalytische Aktivität der RNase (Jiang & Belasco, 2004; Jourdan & McDowall, 2008). Die *ompD* mRNA in *E. coli* kann diesen allosterischen Effekt alleine nicht auslösen, da sie mit einem 5' Triphosphat vorliegt. Bildet die sRNA MicC jedoch einen tertiären Komplex mit der *ompD* mRNA und Hfq, ist es die sRNA, die monophosphoryliert an die Sensortasche bindet, und die initiale endonukleolytische Spaltung der mRNA im katalytischen Zentrum durch Auslösen des allosterischen Effekts induziert (Bandyra *et al.*, 2012).

Neben der Aktivierung von RNase E wird aufgrund der Interaktion von RNase E mit Hfq vermutet, dass Hfq abhängige sRNA-mRNA Duplexe eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung der mRNA zum Degradosom spielen (Prevost *et al.*, 2011).

Induzieren transkriptioneller Polarität innerhalb eines Operons (Abbildung 2G): Bei cotranskriptioneller Bindung der sRNA ChiX an die RBS von *chiP* in *Salmonella* wird die Ribosomenbindung an die entstehende mRNA des bicystronischen *chiPQ* Operons verhindert. Dies hat zur Folge, dass *downstream* lokalisierte *rut* Bindestellen (*Rho utilization sites*), die sonst von Ribosomen maskiert sind, zugänglich vorliegen. Bindet deshalb der Terminationsfaktor Rho kommt es zur vorzeitigen Transkriptionstermination bzw. transkriptioneller Polarität und keiner vollständigen Transkription des Strukturgens *chiQ* (Bossi *et al.*, 2012).

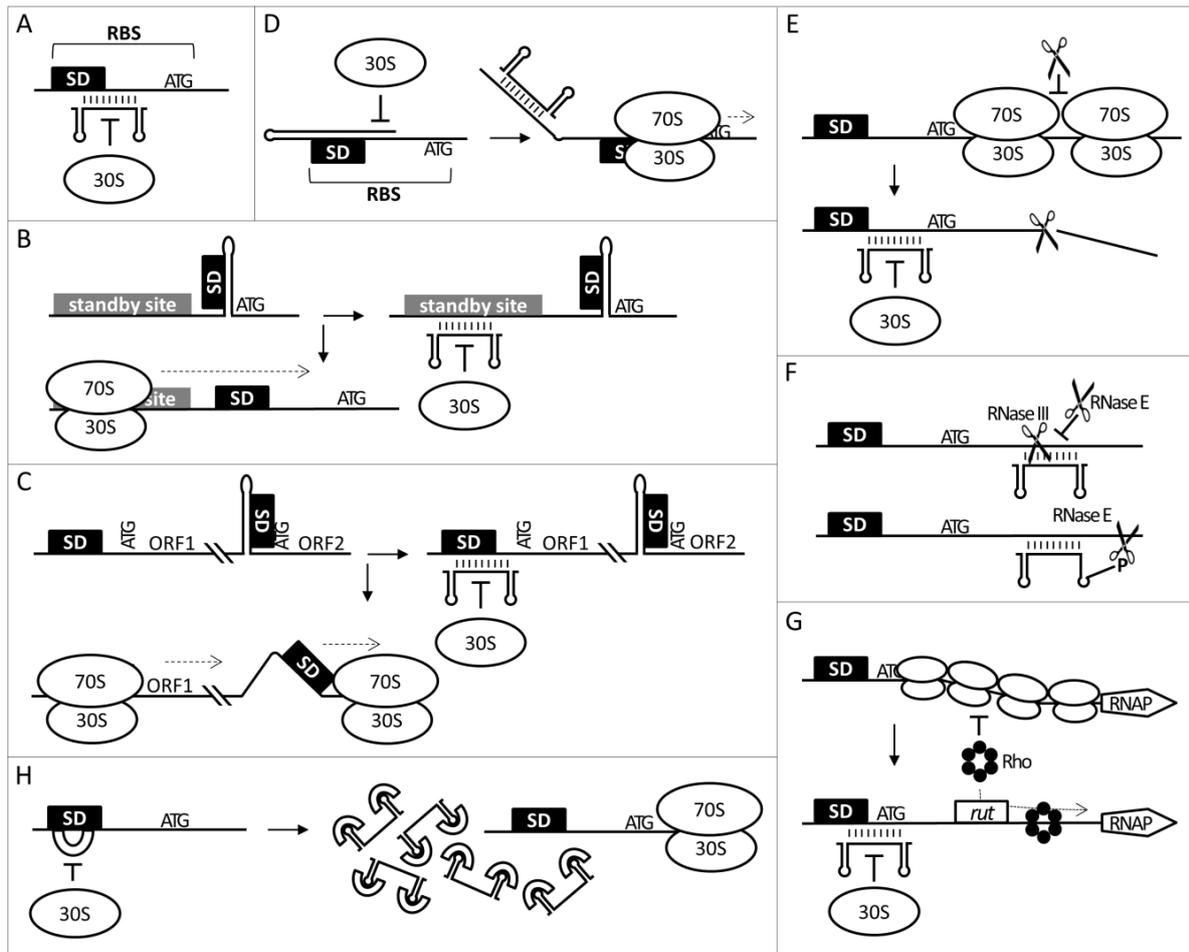


Abbildung 2: Mechanismen auf denen die Regulation durch *trans*-kodierte sRNAs basiert. A: Translationsinhibition durch das Blockieren der Ribosomenbindestelle, B: Translationsinhibition durch das Blockieren einer Ribosomen *standby site* oder eines *enhancer* Elements, C: Indirekte Translationsinhibition durch das Blockieren der RBS eines *leader ORFs*, D: Aktivierung der Translation, E: Veränderung der Ziel-mRNA Stabilität/Degradation als sekundärer Effekt, F: Veränderung mRNA Stabilität als primäre Funktion, G: Induzieren transkriptioneller Polarität innerhalb eines Operons, H: Bindung von Proteinen und Titrationseffekte.

Weitere Erklärungen und Beispiele sind in gleicher Chronologie dem Text zu entnehmen. Das RNA Chaperon Hfq ist in dieser Abbildung nicht berücksichtigt. Abkürzungen und Erklärungen: SD (Shine Dalgarno Sequenz), ATG (Startcodon), RBS (Ribosomenbindestelle), 30S (kleine ribosomale Untereinheit), 70S (große ribosomale Untereinheit), ORF (*open reading frame*), RNAP (RNA Polymerase), *rut* (Rho utilization sites), Rho (Rho-Faktor terminiert Transkription), RNase E (Einzelstrang spezifische Endoribonuklease), RNase III (Doppelstrang spezifische Endoribonuklease).

Bindung von Proteinen und Titrationseffekte (Abbildung 2H): sRNAs, die abseits von den gängigen Interaktionspartnern Hfq oder RNase E Proteine binden, werden häufig als eigene Gruppe neben den *cis*- und *trans*- kodierte asRNAs/sRNAs betrachtet, weil ihre regulatorische Funktion nicht auf Basenpaarung mit einer anderen RNA beruht. Die Funktion proteinbindender sRNAs ist häufig das Imitieren anderer RNA oder DNA Bereiche und das damit verbundene Titrieren von RNA oder DNA bindenden Proteinen, die ihre eigene Funktion somit nicht mehr ausreichend wahrnehmen können. Selbstverständlich können auch sRNAs, die keine Proteine binden, durch Konkurrenz um gleiche Binderegionen Titrationseffekte aufeinander haben.

Die ubiquitäre Familie der proteinbindenden CsrB/RsmZ sRNAs ist ein prominentes Beispiel. Die sRNA nutzt repetitive kurze Sequenzmotive, um große Mengen des Proteins CsrA/RsmE (*carbon storage regulator*) zu binden und dabei zu inaktivieren. Das führt zu einer indirekten Hochregulation von CsrA/RsmE reprimierten Genen und pleiotropen Phänotypen (Romeo *et al.*, 2013).

Ein anderes Beispiel sind die sRNAs GlmY und GlmZ, die konsekutiv die mRNA *glmS* (Glucosamin-6-Phosphat Synthase) regulieren (Urban & Vogel, 2008). GlmZ wirkt bei *glmS* Bindung translationsaktivierend, wird aber zunächst bei hohen Glucosamin-6-Phosphat Konzentrationen zur Inaktivierung durch das Adapterprotein RapZ und RNase E prozessiert. Tritt Glucosamin-6-Phosphat Mangel ein wird die GlmY Expression induziert. GlmY besitzt keine *glmS* Binderegion, imitiert aber die RapZ Aptamerregion von GlmZ und titriert das inaktivierende Adapterprotein. Das heißt es werden weniger GlmZ Transkripte prozessiert und es kommt zur Aktivierung der Translation der *glmS* mRNA (Reichenbach *et al.*, 2008; Gopel *et al.*, 2014).

Ein weiterer besonderer Fall ist die ubiquitäre hochabundante 6S RNA, von der gezeigt wurde, dass sie einen stabilen Komplex mit der *housekeeping* RNA Polymerase (σ^{70} RNAP) eingehen kann. Das ist möglich, weil die 6S Sekundärstruktur mit einem zentralen *bulge* flankiert von Helices einen offenen Promotor imitiert (Wassarman & Storz, 2000). 6S RNA akkumuliert in der stationären Phase und favorisiert somit die Transkription durch σ^5 RNAP (Wassarman, 2007).

1.1.4.3 Hfq

Hfq, das zunächst als ein *E. coli* host Faktor für die Q β Phagenreplikation beschrieben wurde, ist ein hoch abundantes homohexameres RNA Chaperon. Strukturell ist das Protein verwandt mit der eukaryotischen Sm/Lsm Proteinfamilie, die ein RNA bindendes Sm Motiv als gemeinsames Merkmal aufweist (Mura *et al.*, 2013). Die meisten Enterobakterien benötigen Hfq vor allem zur posttranskriptionellen Genregulation durch *trans*-kodierte sRNAs. Die Assoziation an das Protein führt zu einer Stabilisierung dieser Transkripte in der Zelle. Besonders wichtig ist jedoch die Eigenschaft, dass Hfq die imperfekte Basenpaarung zwischen *trans*-kodierten sRNAs und den jeweiligen Ziel-mRNAs vermittelt und dabei auch zur Entfaltung von RNA Strukturen beiträgt (Sauer, 2013). Weitere Funktionen basieren auf der Interaktion von Hfq mit anderen Proteinen wie RNase E, was die Rekrutierung von sRNA-mRNA Duplexen bzw. mRNAs, im Falle von RNase E zur initialen endoribonukleolytischen RNA Spaltung (1.1.4.2), ermöglicht. *hfq* Deletionsstämme zeigen pleiotrope Phänotypen wie ausbleibende Stressantworten, fehlende Virulenz und Wachstumsdefekte (Kakoschke *et al.*, 2014; Sittka *et al.*, 2007; Berghoff *et al.*, 2011), was die zentrale Rolle des Proteins in der sRNA basierten Genregulation reflektiert (Vogel & Luisi, 2011).

Das Hfq Hexamer hat die Form eines Donuts. Distal bindet das Hexamer bis zu 18 Nukleotide aus A-reichen Sequenzen der Form AAYAYAA (Y: Pyrimidine) oder mit (ARN)x-Motiven (R: Purine), die häufig in 5' UTRs von mRNAs zu finden sind (Link *et al.*, 2009; Lorenz *et al.*, 2010). Proximal werden kürzere A/U-reiche Sequenzen und besonders 3'-OH Enden gebunden (Schumacher *et al.*, 2002; Holmqvist *et al.*, 2016; Sauer & Weichenrieder, 2011). Folglich ist die sRNA Bindung mit Terminator flankiert von einer U-reichen Sequenz proximal am wahrscheinlichsten und erklärt auch den Schutz der sRNA vor exoribonukleolytischen Verdau (Ishikawa *et al.*, 2012; Otaka *et al.*, 2011). Zusätzlich wurde diskutiert, dass die laterale Oberfläche des Hexamers durch Assoziation von sRNAs, mit deren eher mittigen Regionen, Beihilfe bei der sRNA Bindung leistet (Sauer *et al.*, 2012). Ebenfalls belegt ist, dass bei distaler Ziel-mRNA und proximaler sRNA Bindung an der lateralen Oberfläche das *alignment* und Hybridisieren einzelsträngiger Regionen von sRNA und mRNA stattfindet (Panja *et al.*, 2013).

Zuletzt sei erwähnt, dass sRNA basierte Genregulation eine generelle Eigenschaft bei Prokaryoten ist, während manche Gram-negativen Bakterien kein Hfq kodieren. In Gram-positiven Bakterien ist weniger abundantes Hfq mit anderen biochemischen Eigenschaften in der Regel nicht an sRNA Mechanismen beteiligt. Zusätzlich wurden diverse andere Proteine mit redundanter Funktion zu Hfq, aber weitaus geringerer Auswirkung auf sRNA Stabilität oder Wirkung, beschrieben. Beispiele sind

1.2.2 Photooxidativer Stress durch Energietransfer auf O₂

Im Falle eines Energietransfers auf Triplett-Sauerstoff entsteht Singulett-Sauerstoff (¹O₂), indem es zu einer *spin*-Umkehr eines der Elektronen im π*-Orbital kommt, wodurch die Valenzelektronen entgegen der *Hundschen* Regel einen antiparallelen *spin* aufweisen und sich somit kompensieren (Ziegelhoffer & Donohue, 2009) (Abbildung 4). Bei Singulett-Sauerstoff handelt es sich um eine äußerst reaktive Sauerstoffspezies, weil das im Triplett-Sauerstoff besetzte 2pz-Orbital nun frei ist und Elektronen aufnehmen kann, ohne den *spin* eines Elektrons verändern zu müssen. Beim photooxidativen Stress ist Singulett-Sauerstoff die hauptsächliche reaktive Sauerstoffspezies. Photooxidativer Stress ist als lichtabhängige Bildung von ROS definiert und spielt vor allem für Photosynthese betreibenden Organismen eine große Rolle. Weil Triplett-Sauerstoff Lichtenergie nur sehr schwach absorbiert, erfolgt die Bildung von Singulett-Sauerstoff durch Energietransfer in Anwesenheit so genannter Photosensibilisatoren. Photosensibilisatoren sind Moleküle, die durch Lichtenergie in einen angeregten Zustand versetzt werden können und durch Resonanztransfer Energie auf Triplett-Sauerstoff übertragen, wobei große Mengen an Singulett-Sauerstoff entstehen und der angeregte Photosensibilisator zurück in seinen Grundzustand fällt (Foote, 1968; Schmidt, 2006). Solche Photosensibilisatoren liegen in photosynthetischen Organismen natürlicherweise in großen Mengen in Form der zu den Photosynthesepigmenten gehörenden Chlorophyllen oder Bakteriochlorophyllen vor. Folglich führt für diese Organismen die gleichzeitige Anwesenheit von Licht und Sauerstoff unweigerlich zu photooxidativem Stress durch Singulett-Sauerstoff (Krieger-Liszkay, 2005; Krieger-Liszkay *et al.*, 2008; Ziegelhoffer & Donohue, 2009; Arellano *et al.*, 2007).

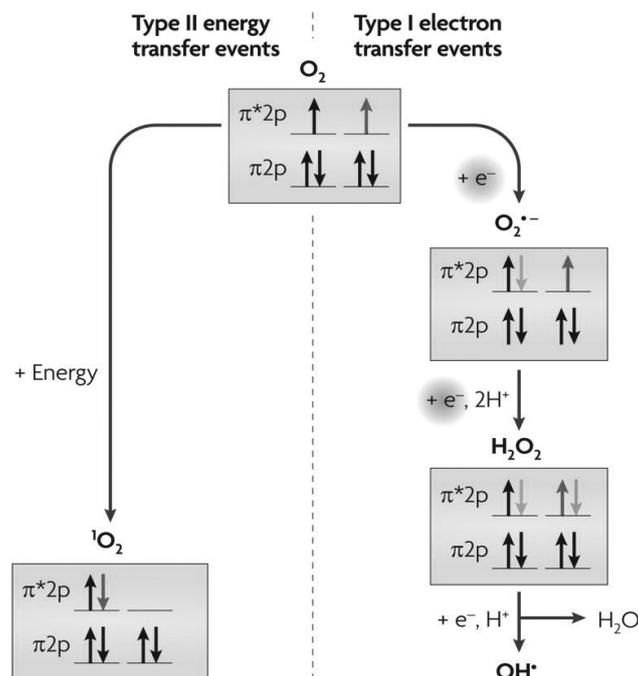


Abbildung 4: Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Auf der linken Seite ist die Entstehung von Singulett-Sauerstoff durch einen Energietransfer zu sehen. Auf der rechten Seite ist die Entstehung von ROS durch Elektronentransfer abgebildet. π-Orbitale und deren Elektronenbesetzung inklusive *spin* sind in den grauen Boxen dargestellt. (Ziegelhoffer und Donohue, 2009)

Bereits 1987 wurde gezeigt, dass beispielsweise Bakteriochlorophyll *a* (BChl*a*) sowie Bakteriopeophytin zum Resonanztransfer auf Triplett-Sauerstoff fähig sind (Borland *et al.*, 1987). Des Weiteren gibt es künstliche Photosensibilisatoren wie beispielsweise Methyleneblau (Briviba *et al.*,

1997). Der Vollständigkeit halber sei erwähnt, dass Singulett-Sauerstoff auch Licht unabhängig bei Enzym katalysierten Prozessen beispielsweise von Peroxidasen oder Lipoxygenasen entstehen kann (Davies, 2003).

Singulett-Sauerstoff kann mit allen Makromolekülen der Zelle, wie DNA, RNA, Lipiden und Kohlenhydraten reagieren (Davies, 2005), wobei die Lipidperoxidation beispielweise die Zellintegrität gefährdet (Girotti & Kriska, 2004). Hauptsächlich reagiert Singulett-Sauerstoff jedoch mit Proteinen bzw. den Seitenketten von Tryptophan, Histidin und Tyrosin unter Bildung von organischen Endo- oder Hydroperoxiden oder den Seitenketten von Cystein und Methionin unter der Bildung von Disulfidbrücken und Methioninsulfoxid (Vogt, 1995; Davies, 2003; Davies, 2004). In DNA bzw. RNA sind Desoxyguanosin bzw. Guanosin am anfälligsten für die Oxidation durch Singulett-Sauerstoff, wobei 8-Hydroxydesoxyguanosin bzw. 8-Hydroxyguanosin entsteht (Cadet *et al.*, 2010; Cadet *et al.*, 2006), was zu Läsionen oder Leserastermutationen führen könnte (Epe, 1991). Besonders hervorzuheben ist auch, dass Singulett-Sauerstoff möglicherweise mit Antioxidantien wie dem Tripeptid Glutathion, Thioredoxin oder Glutaredoxin reagiert, obwohl gerade diese für die Aufrechterhaltung des Redoxgleichgewichts in der Zelle zuständig sind, weil sie ein wichtiges NADPH abhängiges Reduktionsmittel darstellen (Carmel-Harel & Storz, 2000). Folglich könnte der oxidative Stress durch die Depletion von Reduktionsmitteln zusätzlich gesteigert werden.

1.2.3 Allgemeine Prinzipien der oxidativen Stressvermeidung und Stressantwort

Da die Regulation der photooxidativen Stressantwort von *Rhodobacter sphaeroides* ausführlich in Absatz 1.3.2 geschildert wird, werden hier einige allgemeine Aspekte betrachtet, die illustrieren sollen, wie sich Bakterien vor oxidativem Stress schützen können. Dies umfasst Strategien, I) zur Vermeidung von reaktiven Sauerstoffspezies II) zur Entgiftung von reaktiven Sauerstoffspezies und III) zur Reparatur von oxidativen Schäden durch kleine Moleküle und Enzyme, aber auch IV) die Regulation der Expression solcher Enzyme durch TFs, alternative Sigmafaktoren oder sRNAs. Die folgenden Absätze enthalten Beispiele für I-IV.

Um eine starke durch Strahlung verursachte Entwicklung von ROS zu vermeiden, verfolgt das Cyanobakterium *Oscillatoria terebriformis* beispielsweise die Strategie einer Vertikalbewegung ins Sediment (Richardson & Castenholz, 1987). *Rhodobacter sphaeroides* wirkt im Zuge von photooxidativem Stress der Pigmentsynthese entgegen (Mank *et al.*, 2013). Das Tiefseebakterium *Pseudoalteromonas sp.* SM9913 formt einen Biofilm bei hohen Sauerstoffkonzentrationen (Qin *et al.*, 2011) und bei *Pseudomonas aeruginosa* wird der Lebensstil in einem Biofilm durch ROS OxyR abhängig unterstützt, um Metabolismus und ROS Produktion zu reduzieren, aber auch um spätere Dispersion als Evasionsstrategie zu fördern (Wei *et al.*, 2012; Gambino & Cappitelli, 2016).

Um die Entgiftung von ROS vorzunehmen, besitzen Zellen einige Enzyme und antioxidative Moleküle. Diese werden bei normalen Wachstumsbedingungen zumeist in geringem Maße exprimiert, um das Redoxgleichgewicht aufrecht zu erhalten. Im Zuge von oxidativem Stress wird die Expression induziert, um das Redoxgleichgewicht wieder herzustellen. Die wichtigsten Enzyme bei der Entgiftung sind die Peroxidasen/Katalasen und Superoxid-Dismutasen (SOD). *E. coli* besitzt beispielsweise drei Superoxid-Dismutasen, die unterschiedlich reguliert und exprimiert werden. Eine Kupfer/Zink-enthaltende periplasmatische SOD (*sodC*) und zwei intrazelluläre SOD, die Eisen oder Mangan enthalten (*sobB*, *sodA*) (Moody & Hassan, 1984; Fridovich, 1995; Gort *et al.*, 1999). Alle katalysieren die Bildung von Wasserstoffperoxid und Sauerstoff aus Superoxidradikalen. Peroxidasen hingegen katalysieren die Bildung von Wasser und Sauerstoff aus Wasserstoffperoxid (Halliwell, 2006). *E. coli* besitzt zwei solcher Katalasen. Die Hydroperoxidase I (HPI; *katG*) spielt eine größere

Rolle während des aeroben Wachstums (Triggs-Raine *et al.*, 1988), während die Expression der Hydroperoxidase II (HPII; *katE*) vor allem in der stationären Phase induziert wird (von Ossowski *et al.*, 1991; Schellhorn, 1995). Bei Organismen, die Photosynthese betreiben, können Schutzpigmente, insbesondere Carotinoide, den Anregungszustand von Bakteriochlorophyllen *quenchen* oder mit $^1\text{O}_2$ reagieren und somit photooxidativen Stress unterbinden (Cogdell *et al.*, 2000). Außerdem eignen sich die Vitamine A, C und E als Radikalfänger. Ein weiterer entgiftender Stoff ist das Tripeptid Glutathion (L- γ -glutamyl-L-cysteinylglycin oder GSH), welches entweder direkt mit Singulett-Sauerstoff reagiert (Devasagayam *et al.*, 1991) oder als Kofaktor im Glutaredoxin-System benötigt wird (Zhang *et al.*, 2005).

An der Reparatur von oxidativen Schäden sind in *E. coli* unter anderem das Glutaredoxin-System und das Thioredoxin-System beteiligt. Reduziertes Glutaredoxin (GRX; *grxABC*) und Thioredoxin (TRX; *trxA*) sind in der Lage oxidierte Substrate, meist Disulfidbrücken, wieder in ihren reduzierten Zustand zu überführen (Ritz & Beckwith, 2001). Hierbei werden GRX und TRX selbst oxidiert, wobei zwei Cysteinreste eine Disulfidbrücke ausbilden. GRX und TRX können nun wieder aktiviert bzw. reduziert werden, um erneut ein oxidiertes Substrat zu reduzieren. Die Reduktion von TRX erfolgt enzymatisch durch das homodimere Flavoprotein Thioredoxin Reduktase (*trxB*), das ein Elektron von NADPH mittels FAD (Flavin-Adenin-Dinukleotid) überträgt. Um GRX zu reaktivieren, reduziert das Enzym Glutathion Reduktase (*gor*) ebenfalls NADPH abhängig zunächst das Tripeptid Glutathion, welches als Elektronendonator für GRX fungiert. Beide Systeme spiegeln die besondere Rolle von NADPH als Antioxidans bei der Aufrechterhaltung des Redox-Gleichgewichts wider (Brumaghim *et al.*, 2003; Grose *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2007). Weitere Enzyme wie Exonuklease III (*xthA*), DNA-Polymerase I (*polA*), Endonuklease IV (*nfo*) und RecA tragen in *E. coli* zur Reparatur von DNA Schäden bei. Oxidiertes Methionin bzw. Methioninsulfoxid wird durch die Methioninsulfoxid Reduktase (*msrA*) reduziert. Die Chaperon-Expression wird in Gegenwart von ROS induziert und Ferro-/Flavodoxine (Fed/Fld) als Elektronendonoren vermitteln Resistenz gegenüber oxidativem Stress (Coba de la Pena *et al.*, 2013), wahrscheinlich indem sie den reduzierten Status von Fe-S Clustern aufrechterhalten (Zheng & Storz, 2000).

Die Regulation der Expression oben genannter Enzyme/Moleküle wird durch TFs, alternative Sigmafaktoren (siehe auch 1.1.1) oder sRNAs (siehe auch 1.1.4) reguliert, damit sich ein Organismus bei auftretendem oxidativen Stress auch dauerhaft schützen kann. Wichtige Regulatoren in Enterobakterien sind beispielsweise OxyR, erstmals in H_2O_2 hyper-resistenten *Salmonella* Mutanten identifiziert (Christman *et al.*, 1985), und in *E. coli* das SoxRS System. OxyR fungiert zunächst als Redoxsensor, der Peroxid abhängig oxidiert wird, wobei Disulfidbrückenbindungen ausgebildet werden. In dieser Form bindet OxyR als Regulator DNA Elemente und induziert die Expression einiger Gene reduzierender Proteine, zu denen die Hydroperoxidase I (HPI; *katG*), Glutaredoxin I (GRX; *grxA*) und die Glutathion Reduktase (*gorA*) gehören (Storz *et al.*, 1990). Dies stellt einen Mechanismus der Autoregulation dar, weil die Disulfid reduzierenden Proteine, insbesondere GRX, für die Inaktivierung von oxidiertem OxyR verantwortlich sind (Aslund *et al.*, 1999; Zheng *et al.*, 1998). Ein weiteres Gen, das in *E. coli* unter Kontrolle von OxyR steht, ist das des Eisenaufnahmeregulators FUR, der unter anderem die Expression der Superoxid-Dismutase SodA induziert. Dies zeigt außerdem, dass eine stringente Kontrolle des Eisenmetabolismus eine zentrale Rolle bei der oxidativen Stressantwort einnimmt (Touati, 2000; Varghese *et al.*, 2003). SoxR wird am 2Fe-2S Cluster durch O_2^- oxidiert und aktiviert dann die Transkription des Regulators SoxS der AraC Proteinfamilie (Ding *et al.*, 1996). Zu Proteinen, deren Gene im SoxS Regulon zu finden sind, gehören die Superoxid-Dismutasen SodB, die Endonuklease IV (*nfo*) und Flavodoxine A (*fldA*). Ein größeres Regulon wird in *E. coli* vom alternativen

Sigmafaktor RpoS kontrolliert. Der Sigmafaktor wird im Zuge der allgemeinen Stressantwort sowie oxidativem Stress induziert. RpoS aktiviert die Expression der Proteine Hydroperoxidase II (HPII; *katE*), Exonuklease III (*xthA*) und SodC und zeigt mit den Genen *katG* und *gorA* eine Überschneidung mit dem OxyR Regulon (Loewen *et al.*, 1998). Zusätzlich zu TFs und alternativen Sigmafaktoren werden einige der hier diskutierten Gene durch sRNAs reguliert. In *E. coli* vermittelt die sRNA OxyS bei oxidativem Stress Resistenz durch Beeinflussung der Translation von FhIA und des Sigmafaktors der stationären Phase RpoS (Altuvia *et al.*, 1997; Gonzalez-Flecha & Demple, 1999). Ein anderes Beispiel ist die sRNA RyhB. Da unter anderem aufgrund der Fentonreaktion eine stringente Steuerung der Eisenverfügbarkeit in Gegenwart von ROS vorteilhaft ist, reguliert RyhB die Expression von Fur aber auch die der Superoxid-Dismutasen SodB (Masse & Gottesman, 2002).

1.3 *Rhodobacter sphaeroides*

Das 0,2 - 0,5 µm lange, stäbchenförmige, lateral begeißelte, gram-negative Bakterium *Rhodobacter sphaeroides* wird der α 3-Untergruppe der Proteobakterien zugeordnet und gehört der Familie der *Rhodobacteraceae* an (Woese *et al.*, 1984; Imhoff, 2006). Es kann aus lichtdurchfluteten, stehenden und fließenden Gewässern aber auch aus Kapillarwasser von Bodenproben isoliert werden. Das 4,6 Megabasenpaare große Genom des Organismus setzt sich aus zwei Chromosomen und fünf Plasmiden zusammen (Choudhary *et al.*, 2004; Suwanto & Kaplan, 1989a; Suwanto & Kaplan, 1989b) und zeichnet sich durch einen hohen GC-Gehalt von 65-69 % aus. Zur Energiegewinnung bieten sich *R. sphaeroides* eine große Anzahl verschiedener Stoffwechselwege. Welcher dieser Stoffwechselwege durchgeführt wird, ist abhängig von den abiotischen Umweltfaktoren. Wenn Sauerstoff vorhanden ist, wird die aerobe Atmung bevorzugt. Ohne Sauerstoff und in Anwesenheit von Licht betreibt das Bakterium anoxygene Photosynthese. Unter anaeroben Bedingungen, der Abwesenheit von Licht und in Gegenwart alternativer Elektronenakzeptoren zu Sauerstoff wird anaerobe Atmung durchgeführt. Fehlt auch ein alternativer Elektronenakzeptor kommt es zur Gärung (Imhoff, 2006). Zusätzlich kann *R. sphaeroides* atmosphärisches CO₂ und N₂ fixieren (Madigan, 1995; Tabita, 1995).

R. sphaeroides und der nahe Verwandte *Rhodobacter capsulatus* sind weit verbreitete Modellorganismen, um die Genregulation beim Übergang von aerober Atmung zu anoxygener Photosynthese zu untersuchen. Hierbei spielt die Regulation der Photosynthesegene des *puf* und *puc* Operons eine besondere Rolle (siehe auch 1.1.3.1). Beide Organismen wurden außerdem als Beispiel der α -Proteobakterien hinsichtlich der RNA Degradation untersucht, wobei RNase III, RNase J, Degradosom ähnliche Komplexe und die Prozessierung der 23S rRNA charakterisiert wurden. Da bei der Photosynthese lichtabhängig große Mengen ¹O₂ als Nebenprodukt erzeugt werden, dienen beide Bakterien auch zur Untersuchung der photooxidativen Stressantwort.

1.3.1 Der Photosyntheseapparat von *Rhodobacter sphaeroides*

Rhodobacter sphaeroides ist zur anoxygenen Photosynthese fähig. Hierbei hängt die Expression des Photosyntheseapparates vom Sauerstoffpartialdruck und Lichteinstrahlung ab. Ist der Sauerstoffpartialdruck hoch, führt *R. sphaeroides* eine aerobe Atmung durch, wobei die Expression von Proteinen des Photosyntheseapparates gering ist und das Bakterium somit eine helle rote Färbung aufweist. Ist der Sauerstoffpartialdruck jedoch gering, bildet das Bakterium verstärkt Photosyntheseapparate und nimmt somit eine dunkelrote Färbung an. Der Photosyntheseapparat besteht aus drei unterschiedlichen Protein-Pigment Komplexen. LHI (*light-harvesting complex I*) und LHII (*light-harvesting complex II*) stellen hierbei die Antennenpigmentkomplexe dar, die die

Lichtenergie absorbieren und weiterleiten. Bei den enthaltenen bzw. nicht kovalent gebundenen Pigmenten handelt es sich um Bakteriochlorophyll *a* (BChl*a*) und Carotinoide, die für den dunkelroten Phänotyp bei geringem Sauerstoffpartialdruck verantwortlich sind. Der dritte Komplex ist das Reaktionszentrum (RC), in dem die Umwandlung der weitergegebenen Energie stattfindet. Kodiert sind die Gene zu Bildung des Photosyntheseapparates in den polycistronischen *puf* und *puc* Operonen (siehe auch 1.1.3.1). Die Regulation der Gene erfolgt unter anderem durch das PrrB/PrrA Zweikomponentensystem (Eraso & Kaplan, 1994). Das Protein PrrB stellt dabei die membrangebundene Sensorkinase dar, die bei fallendem Sauerstoffpartialdruck das expressionsinitiierende Regulatorprotein PrrA phosphoryliert und somit aktiviert. Die Autophosphorylierungsrate der Sensorkinase PrrB wird durch den Oxidationsstatus der Elektronentransportkette der aeroben Atmung bestimmt, wobei die Elektronenübertragung auf PrrB die Autophosphorylierung hemmt. Des Weiteren werden die Gene über das AppA/PpsR System reguliert. PpsR ist hierbei, ein an den *puf* und *puc* Promotor bindender Repressor, der durch den Antirepressor AppA bei niedrigem Sauerstoffpartialdruck oder bei semiaeroben Bedingungen und Dunkelheit gebunden und inaktiviert wird (Gomelsky & Kaplan, 1997).

1.3.2 Regulation der photooxidativen Stressantwort von *Rhodobacter sphaeroides*

Ein großer Stressfaktor und Nachteil bei der Durchführung der Photosynthese ist der photooxidative Stress durch die lichtabhängige Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (siehe 1.2.2), insbesondere von Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) am BChl*a* des RC von *Rhodobacter sphaeroides* (Ziegelhoffer & Donohue, 2009; Arellano *et al.*, 2007; Uchoa *et al.*, 2008). Die photooxidative Stressantwort beginnt in erster Linie durch die Aktivierung des alternativen ECF Sigmafaktors σ^E (RpoE) (Newman *et al.*, 1999). σ^E liegt inaktiv mit seinem Anti-Sigmafaktor ChrR der ZAS (Zn²⁺ anti-sigma Faktor) Subfamilie als Komplex in der Stöchiometrie 1:1 in der Zelle vor (Newman *et al.*, 2001). Bei $^1\text{O}_2$ -Stress dissoziiert ChrR und freies σ^E kann durch Bindung an die RNA Polymerase die Expression von Zielgenen induzieren (Anthony *et al.*, 2004; Anthony *et al.*, 2005). Die Dissoziation des Anti-Sigmafaktors ChrR wird durch dessen proteolytischen Abbau ermöglicht, wobei die Effizienz des Abbaus in der Gegenwart von $^1\text{O}_2$ abhängig von den Proteinen RSP_1090 und RSP_1091 und den Proteasen RSP_3242 (DegS Homolog) and RSP_2710 (RseP Homolog) ist (Nam *et al.*, 2013; Nuss *et al.*, 2013). Freies σ^E induziert neben der eigenen die Expression von nur ca. 20 Zielgenen. Zu diesen gehört das Gen von RpoH_{II}, der ein weiterer alternativer Sigmafaktor der σ^{32} Familie ist (Nuss *et al.*, 2009). Somit werden Gene mit RpoH_{II} abhängigem Promotor bei $^1\text{O}_2$ Stress nach Aktivierung der RpoE-RpoH_{II} Sigmafaktorkaskade exprimiert. Im Unterschied hierzu wird die Expression des orthologen alternativen Sigmafaktors RpoH_I bei $^1\text{O}_2$ -Stress RpoE unabhängig induziert. Zusätzlich ist RpoH_I abhängige Genexpression besonders stark unter Hitzestress zu beobachten (Green & Donohue, 2006; Karls *et al.*, 1998) und eine effiziente Aktivierung von RpoE kann auch durch organische Peroxide erfolgen (Nuss *et al.*, 2013). RpoH_I und RpoH_{II} weisen im Übrigen überlappende Regulons auf (Nuss *et al.*, 2010). Das heißt viele Gene werden sowohl RpoH_I als auch RpoH_{II} abhängig exprimiert. Das RpoH_{II} Regulon umfasst etwas mehr als 100 Gene, während ca. 180 Gene einen RpoH_I/RpoH_{II} abhängigen Promotor aufweisen Gene (Nuss *et al.*, 2010; Nuss *et al.*, 2009). Proteomstudien haben außerdem gezeigt, dass photooxidativer Stress zu einer veränderten Abundanz von ca. 60 weiteren Proteinen führt, die weder durch RpoE noch RpoH_{I/II} reguliert werden (Glaeser *et al.*, 2007; Nuss *et al.*, 2010; Nuss *et al.*, 2009; Berghoff *et al.*, 2013). Möglicherweise ist dies auf den *outer membrane* Transkriptionsregulator OmpR (RSP_0847) eines Zwei-Komponentensystems zurückzuführen, wenn $^1\text{O}_2$ Proteine der äußeren Membran schädigt (Nuss *et al.*, 2010; Glaeser *et al.*, 2007). Die

Veränderung von Proteinabundanz im Zuge von $^1\text{O}_2$ Stress könnte jedoch auch auf posttranskriptioneller Regulationsebene durch sRNAs ermöglicht werden (siehe 1.1.4). Deshalb wurden sRNAs mittels Transkriptomanalyse bzw. differenzieller RNA Sequenzierung (dRNASeq) identifiziert, die eine veränderte Abundanz oder Prozessierung in Gegenwart von $^1\text{O}_2$ aufweisen (Berghoff *et al.*, 2009). Ersteres gilt beispielweise für die RpoH_{I/II} abhängige sRNA SorY (RSs_1543) und letzteres trifft auf die sRNA UpsM (RSs_0682) zu. Beide wurden in dieser Arbeit näher charakterisiert (Adnan *et al.*, 2015; Weber *et al.*, 2016). Bei weiteren sRNAs, die an der photooxidativen Stressantwort beteiligt sind, handelt es sich um PcrZ (Mank *et al.*, 2012) und die RpoH_{I/II} abhängigen sRNAs CcsR1-4 (RSs_0680) (Billenkamp *et al.*, 2015) und SorX (RSs_2461) (Peng *et al.*, 2016). PcrZ wirkt der Expression von Photosyntheseogenen bei fallendem Sauerstoffpartialdruck und somit der Bakteriochlorophyll *a* (BChl*a*) abhängigen Entstehung von $^1\text{O}_2$ entgegen (Mank *et al.*, 2012). Die sRNAs CcsR1-4 regulieren den Transkriptionsfaktor FlhR, den Aktivator des Glutathion abhängigen Methanol/Formaldehyde Metabolismus, negativ, wodurch antioxidatives Glutathion in der Zelle akkumuliert (Billenkamp *et al.*, 2015). SorX führt durch negative Regulation des PotABCD Transporters zu einer geringeren Spermidin Aufnahme, was zu einer höheren Resistenz gegenüber organischem Hydroperoxid führt (Peng *et al.*, 2016).

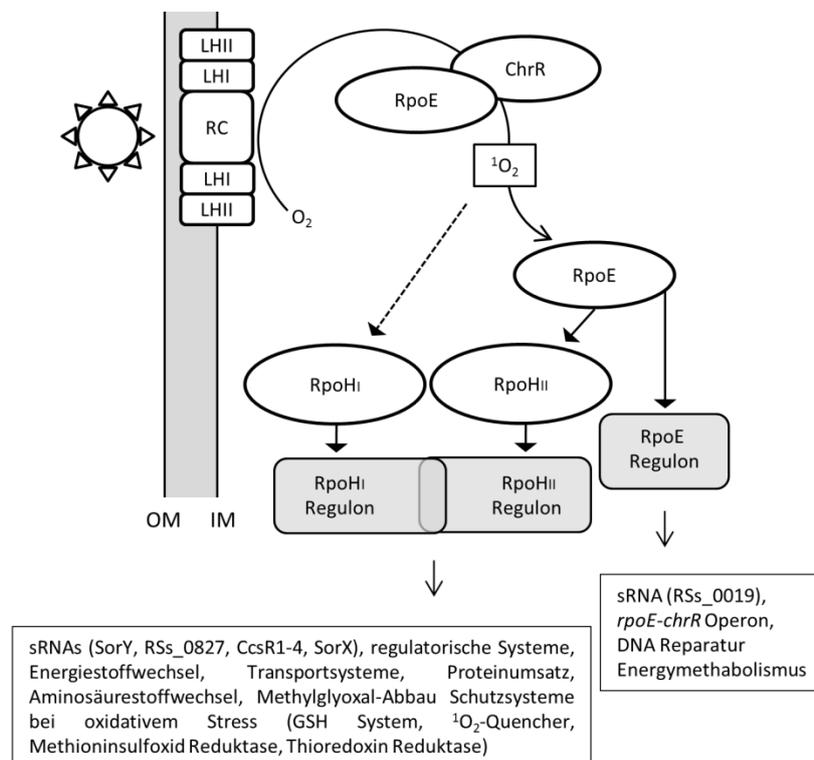


Abbildung 5: Aktivierung alternativer Sigmafaktoren von *Rhodobacter sphaeroides* bei photooxidativem Stress.

Rhodobacter sphaeroides ist in Anwesenheit von Licht und Sauerstoff in erhöhtem Maße photooxidativem Stress durch toxischen Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) ausgesetzt. $^1\text{O}_2$ entsteht hierbei, wenn Bakteriochlorophyll *a* im Reaktionszentrum (RC) des Photosyntheseapparates durch Lichtenergie in einen angeregten Zustand versetzt wird und durch Resonanztransfer Energie auf Triplett-Sauerstoff überträgt. $^1\text{O}_2$ führt zur Aktivierung von RpoE durch Dissoziation vom Antisigmafaktor ChrR. Aktives RpoE induziert Zielgenexpression sowie die Expression des alternativen Sigmafaktors RpoHII. Die Expression des alternativen Sigmafaktors RpoHI wird RpoE unabhängig induziert. Das RpoHI und RpoHII Regulon enthalten gemeinsame Gene. Abkürzungen: OM (äußere Membran), IM (innere Membran), LH (Lichtsammelkomplex).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Vorangehende Arbeiten beschäftigten sich bereits eingehend mit der Regulation der photooxidativen Stressantwort von *Rhodobacter sphaeroides*. Hierbei lag der Fokus zunächst auf der transkriptionellen Genregulation, die hauptsächlich durch alternative Sigmafaktoren vermittelt wird und bereits beschrieben wurde (siehe 1.3.2). Zum vollständigen Verständnis der Stressantwort ist es wichtig, auch die posttranskriptionelle Genregulation durch sRNAs zu betrachten. Um diese Lücke zu schließen, wurden die *trans*-kodierte sRNAs SorY (RSs_1543) und UpsM (RSs_0682) in dieser Arbeit unter Verwendung mikrobiologischer, molekularbiologischer und biochemischer Methoden untersucht. Beide sRNAs sollten eine Rolle bei der photooxidativen Stressantwort spielen, weil SorY durch $^1\text{O}_2$ induziert wird und UpsM $^1\text{O}_2$ abhängig prozessiert wird. Zur Charakterisierung werden UpsM und SorY abhängige Phänotypen gesucht und das Expressionsverhalten von UpsM und SorY bzw. das Prozessierungsverhalten von UpsM in Abhängigkeit diverser Stressbedingungen und Proteinfaktoren analysiert. Zur Einordnung der biologischen Funktion müssen zunächst Ziel-RNAs beider Transkripte identifiziert werden, wobei unter anderem globale Transkriptomanalysen mittels Microarrays durchgeführt werden. Nach Validierung der Regulation der Ziel-RNAs kann deren Relevanz für die photooxidative Stressantwort betrachtet und allgemein gültige Strategien abgeleitet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

In diesem Abschnitt sind in dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme, Plasmide, Oligonukleotide, Antibiotika, Enzyme und molekularbiologische Kits aufgelistet. Weitere Chemikalien oder Geräte sind im Methodenteil angegeben.

2.1.1 Bakterienstämme

Stamm	Verwendung/Beschreibung	Herkunft
<i>E. coli</i>		
BL21 (DE3)	Überexpression rekombinanter Proteine / <i>F</i> , <i>ompT</i> , <i>gal dcm</i> λ (DE3), <i>hsdS</i> ($r_B^- m_B^-$)	NEB
JM 109	Klonierungsarbeiten und Plasmidreplikation / <i>e14</i> ($McrA^-$), <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> ($r_K^- m_K^+$), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , Δ (<i>lac-proAB</i>), [<i>F'</i> , <i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>lacI^q</i> Δ M15]	NEB
S17-1	Donorstamm bei biparentaler Konjugation von <i>R. sphaeroides</i> / <i>recA</i> , <i>pro</i> , <i>hsdR</i> , RP4 ⁻² - (<i>Tc::Mu</i>)(<i>Km::Tn7</i>); <i>Tp^r</i> , <i>Str^r</i> , <i>Sp^r</i>	(Simon <i>et al.</i> , 1986)
N3431	Isolierung chr. DNA als PCR <i>template</i> / <i>Hfr</i> (<i>PO1</i>), <i>lacZ43</i> (<i>Fs</i>), λ^- , <i>rne-3071</i> (<i>ts</i>), <i>relA1</i> , <i>spoT1</i> , <i>thiE1</i>	(Apirion, 1978; Goldblum & Apirion, 1981)
<i>R. sphaeroides</i>		
2.4.1a	Wildtyp	(van Niel, 1944)
2.4.1b	Wildtyp	(DSMZ)
Δ <i>hfq</i>	Δ (<i>hfq::</i> Ω <i>Sp</i>)	(Glaeser <i>et al.</i> , 2007)
Δ <i>rnj</i>	Δ (<i>rnj::Km</i>)	(Rische & Klug, 2012)
Δ <i>rnc</i>	Δ (<i>rnc::Km</i>)	diese Arbeit
Δ <i>rnr</i>	Δ (<i>rnc::Km</i>)	unveröffentlicht
Δ <i>rppH</i>	Δ (<i>rppH::Km</i>)	unveröffentlicht
<i>rne</i> ^{E.c.ts}	Δ (<i>rne::rne</i> ^{E.c.ts} , <i>Sp</i>)	diese Arbeit
Δ <i>chrR</i>	Δ (<i>chrR::Tp</i>)	(Newman <i>et al.</i> , 1999)
Δ <i>rpoHI</i>	Δ (<i>rpoHI::Km</i>)	(Nuss <i>et al.</i> , 2010)
Δ <i>rpoHII</i>	Δ (<i>rpoHII::</i> Ω <i>Sp</i>)	(Nuss <i>et al.</i> , 2009)
Δ <i>rpoHI/II</i>	Δ (<i>rpoHI::Km</i>) Δ (<i>rpoHII::</i> Ω <i>Sp</i>)	(Nuss <i>et al.</i> , 2010)
Δ 1409	Δ (<i>RSP_1409::Km</i>)	unveröffentlicht
Δ 0827	Δ (<i>RSs_0827::</i> Ω <i>Sp</i>)	(Kiebel, 2013)

2.1.2 Plasmide

Bei den aufgeführten Plasmiden handelt es sich um Ausgangs- und Endvektoren. Aus Zwischenschritten resultierende Plasmide werden im Verlauf der Arbeit beschrieben.

Plasmid	Verwendung/Beschreibung	Herkunft
pDrive	Klonierungsvektor, <i>Ap^r</i> , <i>Km^r</i>	Qiagen
pJET1.2	Klonierungsvektor, <i>Ap^r</i>	Thermo Scientific
pBBR1-TT- <i>MSC5</i> - <i>Ptac</i>	dient der ko-Expression von Proteinen oder sRNAs in <i>E. coli</i> ausgehend von einem konstitutivem <i>tac</i> Promotor , <i>Gm^r</i>	(GK., 2005)

pUC4K	Km ^r Kasette ohne Terminatoren	(Vieira & Messing, 1982)
pHP45ΩSp	Sp ^r Kasette mit Terminatoren	
pRne529N	pET16b Derivat zur rekombinanten Expression der katalytischen RNase E Domäne, Ap ^r	(Callaghan <i>et al.</i> , 2003)
pPHU281	<i>suicide</i> Vektor zur Herstellung von Deletionsmutanten in <i>R. sphaeroides</i> mittels homologer Rekombination, Tc ^r	(Hubner <i>et al.</i> , 1991)
pBBR1MCS2	<i>broad host range</i> Vektor für Proteobakterien, dient der ko-Expression oder Komplementation von Proteinen oder sRNAs in <i>R. sphaeroides</i> , Km ^r	(Kovach <i>et al.</i> , 1995)
pPHU235	<i>lacZ</i> Reporterplasmid ohne Promotor und RBS, Tc	(Hubner <i>et al.</i> , 1991)
pPHU4352	pPHU235 Derivat mit 16S rRNA Promotor	(Mank <i>et al.</i> , 2012)
pRKhfqFLAG	pRK415 Derivat, das den <i>hfq</i> Genort flankiert von 411 <i>upstream</i> bp und einer 3xFLAG-tag Sequenz enthält, die das stop codon ersetzt.	(Berghoff <i>et al.</i> , 2011)
pBBRSorYi	pBBR1MCS2 Derivat zur Überexpression der sRNA SorY ausgehend vom nativen Promotor	(Adnan <i>et al.</i> , 2015)
pPHUmraZUpsM	pPHU235 Derivat mit Genabschnitt von Position -376 bis +33 ausgehend von <i>mraZ</i>	diese Arbeit
pPHUmraZ188up	pPHU235 Derivat mit Genabschnitt von Position -177 bis +33 ausgehend von <i>mraZ</i>	diese Arbeit
pPHUmraZ67up	pPHU235 Derivat mit Genabschnitt von Position -67 bis +33 ausgehend von <i>mraZ</i>	diese Arbeit
pPHUORF	pPHU235 Derivat mit Genabschnitt von Position -193 bis +9 ausgehend von sORF	diese Arbeit
pBBRUpsMORFx2	pBBR1MCS2 Derivat zur Überexpression der sRNA UpsM und sORF; enthält zwei Kopien des Genabschnittes von Position -864 bis -13 ausgehend von <i>mraZ</i>	diese Arbeit
pBBR_0827	pBBR1MCS2 Derivat zur Überexpression der sRNA RSs_0827; enthält eine Kopien des Genabschnittes mit eigenem Promotor	(Kiebel, 2013)
pPHUsitA	pPHU4352 Derivat mit Genabschnitt von Position -51 bis +652 ausgehend von <i>sitA</i>	diese Arbeit
pPHUsitC	pPHU4352 Derivat mit Genabschnitt von Position -154 bis +273 ausgehend von <i>sitC</i>	diese Arbeit
pPHUsitD	pPHU4352 Derivat mit Genabschnitt von Position -95 bis +640 ausgehend von <i>sitD</i>	diese Arbeit
pPHU1243	pPHU4352 Derivat mit Genabschnitt von Position -92 bis +343 ausgehend von RSP_1243	diese Arbeit
pPHU2766	pPHU4352 Derivat mit Genabschnitt von Position -35 bis +175 ausgehend von RSP_2766	diese Arbeit
pPHU3056	pPHU4352 Derivat mit Genabschnitt von Position -59 bis +109 ausgehend von RSP_3056	diese Arbeit
pPHUhemB	pPHU4352 Derivat mit Genabschnitt von Position -68 bis +97 ausgehend von <i>hemB</i>	diese Arbeit
pPHUmurD	pPHU4352 Derivat mit Genabschnitt von Position -52 bis +121 ausgehend von <i>hemB</i>	diese Arbeit
pPHUmraZ	pPHU4352 Derivat mit Genabschnitt von Position -177 bis +33 ausgehend von <i>mraZ</i>	diese Arbeit

pPHU5UTR	pPHU4352 Derivat mit Genabschnitt entsprechend der 5'UTR von Position -268 bis +33 ausgehend von <i>mraZ</i>	diese Arbeit
pPHU5UTRmut	pPHU5UTR Derivat mit mutiertem Startcodon von sORF (ATG→ACG)	diese Arbeit
p0682	pBBR1-TT-MSC5-Ptac Derivat zur konstitutiven Expression der sRNA UpsM in <i>E. coli</i>	diese Arbeit

2.1.3 Oligonukleotide

Oligonukleotide werden von der Firma Eurofins/MWG/Operon (Heidelberg) bezogen. In den Sequenzen sind Überhänge unterstrichen. Substituierte Basen sind kursiv dargestellt. Zusätzlich sind bei Verwendung generierte Restriktionsschnittstellen, Verwendungszweck oder Referenzen angegeben.

Oligonukleotid	Sequenz (5'→3')	Beschreibung
<i>Klonierungen</i>		
rnc_ko_up_f	CAACGGACAGGAAATCCCGCAGG	EcoRI
rnc_ko_up_r	CTCGCGGAACGGATCCCGGATC	BamHI
rnc_ko_down_f	CTCGCGGGATCCAGGCGAG	BamHI
rnc_ko_down_r	CCAGCGGCGAAGCTTCTCGACC	HindIII
MraZ_rep_f	CAGGTTGTGCGGATCCAACCTG	BamHI
MraZ67up_rep_f	<u>GGATCC</u> TTTCGTTCCGGGGTGC	BamHI
MraZ188up_rep_f	<u>GGATCC</u> AATGACAGATCCGGCG	BamHI
MraZ_rep_r	CTTGGCGTCAAGCTTCTGGTTG	HindIII
0682ORF3_rep_r	<u>AAGCTT</u> ATCTGTCATTGGATGAAAGCGGG	HindIII
KpnI_IGR0682_f	<u>GGTACC</u> GAGCCACCTTCTCCCATGGC	KpnI
IGR0682_Hind_r	<u>AAGCTT</u> CACTGTCGGTGCCGTTT	HindIII
Hind_IGR0682_f	<u>AAGCTT</u> IGAGCCACCTTCTCCCATGGC	HindIII
IGR0682_EcoRV_r	<u>GATATC</u> TTCAGTCTCCGGTGCCGTTT	EcoRV
sitA_rep_f	<u>GGATCCT</u> TGAAGTTTTCGGAATGCCTC	BamHI
sitA_rep_r	<u>AAGCTT</u> GCCGACCTGATCGGTGTTT	HindIII
sitC_rep_f	CTCGAGGCGGCCTTCGGC	XhoI
sitC_rep_r	<u>AAGCTT</u> GAGCCCGCTGCGGCC	HindIII
sitD_rep_f	CTGCAGACGCGCTCTTCTCTG	PstI
sitD_rep_r	<u>AAGCTT</u> CAGGAAGGCGATGGCTCCC	HindIII
RSP1243_rep_f	<u>TCTAGAT</u> GTAATCGTTTGAGAGTCC	XbaI
RSP1243_rep_r	<u>AAGCTT</u> CTCGAGATAATAGGTGAGCCG	HindIII
hemB_rep_f	<u>GGATCC</u> ATGGCAGGCACAAGG	BamHI
hemB_rep_r	<u>AAGCTT</u> GGTCAGCGTATATTCTGCGTG	HindIII
RSP3056_rep_f	<u>GGATCC</u> ATGAAGCCAGGTTTCCC	BamHI
RSP3056_rep_r	<u>AAGCTT</u> GGGATCGAGCGAGAAGGC	HindIII
murD_rep_f	<u>GGATCC</u> CCGCATCCGCTCCATTC	BamHI
murD_rep_r	<u>AAGCTT</u> GTGTCGCCACAGGAGCGGC	HindIII
RSP2766_rep_f	<u>GGATCCT</u> GAGCCTGCCCTTCTCTG	BamHI
RSP2766_rep_r	<u>AAGCTT</u> GGCGAACTCGCCGAAG	HindIII
MraZ_rep_f2	ATCCAATGACGGATCCGGCGC	BamHI
Xba0682MraZ_f	<u>TCTAGAC</u> GAGATGAGAACGGGACAGTGAAC	XbaI
0682T87C_f	CATCCAACGACAGATCCGGCGCGCATGC	Mutagenese PCR
0682T87C_r	GATCTGTCTGGATGAAAGCGGGTGCC	Mutagenese PCR
PstI0682_f	<u>CTGCAGC</u> GAGATGAGAACGGGACAGTGAAC	PstI
Hind0682down_r	<u>AAGCTT</u> CACTGTCGGTGCCGTTT	HindIII
R.s.rneUP_f	<u>AGTACT</u> CGGATCTCTATTACCGGCTCG	Scal
R.s.rneUP_r	CATATGATTCCATGGCACCCG	NdeI
R.s.rneDOWN_f	<u>GGTACC</u> GCTGATCTCCAGAGATTGACAC	KpnI
R.s.rneDOWN_r	<u>GAATTCT</u> GCAATTGGACAGGAAGAAGG	EcoRI
E.c.rne_fw	<u>CATATG</u> AAAAGAAATGTTAATCAACGCAAC	NdeI
E.c.rne_rev	<u>TCTAGAA</u> ACTGGGTATGTTTGTCTGCC	XbaI

qRT-PCR

sitA	AGGATGTGCCGTGCGGTGA	
sitB	TGTAGCCTGCCGCATTGG	(Peuser <i>et al.</i> , 2011)
0682A	CGAGATGAGAACGGGACAG	
0682B	ATCGCTGGGTGTCCAAC	Diese Arbeit
0682_2095A	CAGTGGCAGCCGCTCGAT	
0682_2095B	GCGCCTTGCGTCAACCT	Diese Arbeit
2095A	AGAGGCGAATACAACCAG	
2095B	TAGCATTGACGTAGGAG	Diese Arbeit
16SA	CCTGGAAGTGCCTTTGAAAC	
16SB	GCGGAATGCTTAATCCGTTA	(Hermanns, 2015)
rpoZA	ATCGCGGAAGAGACCCAGAG	
rpoZB	GAGCAGCGCCATCTGATCCT	(Gomelsky <i>et al.</i> , 2003)

T7 Templates

T7_2591_f	TAATACGACTCACTATAGGTTGCCCGCCAAGGGAAC	
T7_2591_r	TCCCGAAACATGTCCCATC	(Adnan <i>et al.</i> , 2015)
T7_takP_f	TAATACGACTCACTATAGGCGCTGAGCCGGCGGACAG	
T7_takP_r	CCACGGCGGCCTTGGTGATG	Diese Arbeit
T7_sorY_f	TAATACGACTCACTATAGGGAAGCGGGTGATCGAGAGGG	
T7_sorY_rB	AAAAAAAAAGCCGAGCAGAAGCTC	Diese Arbeit
T7_PcrZ_f	TAATACGACTCACTATAGGGCACGCCGGAGTGGTAAC	
T7_PcrZ_r	GCAGCGAAGGATGCCCGACAG	(Mank <i>et al.</i> , 2012)
T7_0682_fB	TAATACGACTCACTATAGGGCGAGATGAGAACGGGACAGTG	
T7_0682_rB	GAAAGCGGGGATCGAGCGG	Diese Arbeit
T7_0827_f	TAATACGACTCACTATAGCCGTTCTACCTTCACTGTC	
T7_0827_r	AAAAAAAAAGCGCCCTGAC	Diese Arbeit

Oligonukleotidsonden

p-5S	CTTGAGACGCAGTACCATTG	(Berghoff <i>et al.</i> , 2009)
p-1543	ATGAAGCGGACGAGAGAACCCTC	(Nuss <i>et al.</i> , 2010)
p-0682	CGCGCCGGATCTGTCATTGGATG	(Berghoff <i>et al.</i> , 2009)
p-pcrZ	GCAGTCGCCGATACTCGTTACC	(Mank <i>et al.</i> , 2012)
p-0680a	CGTCGCCGCTGCTGCTACAGGTC	(Berghoff <i>et al.</i> , 2009)

5'-RACE

Oligo dT-anchor Primer	GACCACGCGTATCGATGTCGACTTTTTTTTTTTTTTTT (V=A,C or G)	
PCR anchor Primer	GACCACGCGTATCGATGTCGAC	Roche

2.1.4 Antibiotika

Medienzusätze wie Antibiotika werden sterilfiltriert (0,22 µm Sterilfilter, Nalgene) und nach Bedarf in den angegebenen Konzentrationen verwendet.

Zusatz	Abk.	Stammlösung [mg/ml]	Endkonzentration [µg/ml]	
			<i>E. coli</i>	<i>R. sphaeroides</i>
Ampicillin (Roth)	Ap	100 in ddH ₂ O	200	-
Kanamycin (Serva)	Km	10 in ddH ₂ O	25	25
Tetrazyklin (Roth)	Tc	10 in 75% EtOH	20	2
Spectinomycin (Roth)	Sp	ddH ₂ O	10	10
Gentamycin (Serva)	Gm	4 in ddH ₂ O	10	10
Trimethoprim (Serva)	Tp	25 in DMF	50	50
Rifampizin (Serva)	Rif	50 in MetOH		200
IPTG (Roth)		50 in ddH ₂ O	100	100
X-Gal (Serva)		ddH ₂ O	100	100

2.1.5 Radioaktive Nukleotide

Nuklid	Konzentration (Ci/mmol)	Hersteller
[γ -P ³²]-ATP	3000	Hartmann Analytic
[α -P ³²]-UTP	3000	Hartmann Analytic

2.1.6 Enzyme

Bezeichnung	Hersteller
AMV Reverse Transkriptase	Promega
<i>Antarctic</i> -Phosphatase (5 U/ μ l)	NEB
DNase I (1 u/ μ l)	Promega
DNase I (120-301 u/ μ l)	Invitrogen
Lysozym	Boehringer
Phusion DNA Polymerase	Invitrogen
Restriktionsendonukleasen	Fermentas
RNase A	Qiagen
RNasin RNase Inhibitor (40 U/ μ l)	Fermentas
T4 DNA Ligase (5 u/ μ l)	NEB/Fermentas
T4 Polynukleotid-Kinase	Fermentas
T7 RNA Polymerase	NEB
Taq DNA Polymerase	Qiagen
Terminator 5'- <i>Phosphate-Dependent Exonuclease</i>	Epicentre

2.1.7 Molekularbiologische Kits, Reagenzien und Größenstandards

Bezeichnung	Hersteller
<i>Gene Expression Hybridization Kit</i>	Agilent
<i>Gene Expression Wash Buffer Kit</i>	Agilent
<i>One Step RT PCR Kit</i>	Agilent
QIAEXII Gel-extraction Kit	Qiagen
QIAGEN PCR Cloning Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
RNeasy MiniElute Cleanup Kit	Qiagen
ULS™ Labeling Kit for Agilent arrays (Cy3)	Kreatech
ULS™ Labeling Kit for Agilent arrays (Cy5)	Kreatech
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	Qiagen
<i>Lumi-Light Western Blotting Substrate</i>	Roche
Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Fluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich
Ponceau S ready-to-use	Sigma-Aldrich
Ribonukleosidtriphosphate (NTPs)	Qiagen
Röntgenfilm Entwickler-und Fixier-Lösung	ADEFO
Roti®-NanoQuant (Bradford Reagenz)	Roth
GeneRuler 1 kb plus DNA ladder	Thermo Scientific
GeneRuler ultra low range DNA ladder	Thermo Scientific
low range Silver Stain SDS-PAGE Standard (Protein)	Bio-Rad
prestained broad-range Marker (Protein)	NEB

2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.1 Sterilisation

Medien und Lösungen werden zur Sterilisation 20 min bei 121°C und 1 bar Überdruck autoklaviert. Hitzeempfindliche Substanzen werden sterilfiltriert (Sterilfilter mit 0,2 µm Porengröße, Roth). Die Sterilisation von Glaswaren erfolgt 3 h bei 180°C.

2.2.2 Kultivierung von *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1

In dieser Arbeit wird *R. sphaeroides* bei 32°C in RÄ-Medium (Remes *et al.*, 2014) kultiviert. Agarplatten werden hergestellt, indem RÄ-Medium vor dem Autoklavieren mit 1,6 % (w/v) Bacto Agar (Difco, Heidelberg) versetzt wird. Zur Erzeugung von Einzelkolonien wird Zellmaterial mit einer Impföse auf RÄ-Agarplatten mittels Drei-Strich-Technik ausgestrichen oder Verdünnungen einer Flüssigkultur werden mit einem Drigalskispatel oder Glaskugeln ausplattiert.

Flüssigkulturen wurden sowohl unter mikroaeroben als auch unter aeroben, anaeroben und phototrophen Bedingungen kultiviert. Unter mikroaeroben Bedingungen wird der Erlenmeyerkolben zu 80 % seines Nennvolumens befüllt und bei 140 rpm geschüttelt, um einen Sauerstoffgehalt von etwa 1 mg/l (etwa 30 µM) zu erreichen. Flüssigkulturen mit hohem Sauerstoffpartialdruck bzw. aeroben Bedingungen werden entweder in Meplatflaschen unter Begasung oder in einem nur zu 20 % befüllten Erlenmeyerkolben mit Schikanen unter Schütteln bei 140 rpm kultiviert. Zur Erzeugung von Singulett-Sauerstoff werden Kulturen unter aeroben Bedingungen in Meplatflaschen in Anwesenheit von 0,2 µM Methylenblau und 800 Wm⁻² Weißlicht unter Begasung mit einer Aquarienpumpe wachsen gelassen. Kontroll- als auch Hauptkulturen wurden hierbei zu Beginn des Experiments mit Methylenblau für eine Verdopplungszeit von OD₆₆₀ 0,2 bis 0,4 in Alufolie eingeschlagen bzw. in Dunkelheit inkubiert. Die Inkubation im Licht findet im Anschluss statt, nachdem bei Hauptkulturen zur Erzeugung von Singulett-Sauerstoff die Alufolie entfernt wurde. Für anaerobes und phototropes Wachstum werden Meplatflaschen zu 100 % mit inokuliertem RÄ-Medium gefüllt und luftdicht verschlossen. Anaerobe Kulturen werden nach Zugabe von 60 mM DMSO als Elektronenakzeptor im Dunkeln inkubiert, während phototrophe Kulturen mit 60 Wm⁻² Weißlicht bestrahlt werden. Flüssigkulturen können entweder mit einer sterilen Glaspipette bzw. sterilen Impföse aus Vorkulturen bzw. von Einzelkolonien auf Agarplatten inokuliert werden. Es ist zwingend notwendig, dass entsprechende Vorkulturen für alle Experimente zum Zeitpunkt des Verdünnens noch nicht die stationäre Phase erreicht haben, also maximal eine OD₆₆₀ von 0,8 aufweisen. Durch Zugabe entsprechender Antibiotika (2.1.4) können resistente Stämme selektiert werden.

2.2.3 Kultivierung von *Escherichia coli*

Flüssigkulturen von *E. coli* werden unter aeroben Bedingungen bei 37°C inkubiert. Hierzu werden Erlenmeyerkolben zu ca. 25 % oder Reagenzgläser mit 3 ml inokuliertem Standard I Medium (2,5 % Standard Nährmedium (w/v)) befüllt und bei 180 rpm geschüttelt. Zur Erzeugung von Einzelkolonien wird Zellmaterial mit einer Impföse auf Standard I Agarplatten (2,5 % Standard Nähragar (w/v)) mittels Drei-Strich-Technik ausgestrichen oder Verdünnungen einer Flüssigkultur werden mit einem Drigalskispatel oder Glaskugeln ausplattiert. Durch Zugabe entsprechender Antibiotika (2.1.4) zu Flüssigkulturen oder auf 50°C abgekühlten Standard I Agar können resistente Stämme selektiert werden. Um Singulett-Sauerstoff zu generieren, wird das Minimalmedium M9 (Sambrook, 2001) verwendet, wobei Kulturen unter subletalen Bedingungen bzw. der Anwesenheit von 15 µM MB und

800 Wm⁻² Weißlicht in Meplatflaschen bei konstanter Begasung inkubiert werden.

2.2.4 Bestimmung von RNA Halbwertszeiten

Bei der Bestimmung von RNA Stabilitäten werden mikroaerob gewachsene Übernachtkulturen von *R. sphaeroides* in 400 ml RÄ-Medium in einem 500 ml Kolben auf eine OD₆₆₀ von 0,2 verdünnt und bis zu einer OD₆₆₀ von 0,4 weiter mikroaerob inkubiert. Dann werden 15 ml Kultur entnommen und direkt auf Eiswasser überführt, wobei auch Eis in das Zentrifugationstube vorgelegt werden sollte, um eine schnelles Abkühlen zu gewährleisten. Direkt im Anschluss wird Rifampicin (final 0,2 mg/ml) zur Kultur gegeben, um die Transkription in den Zellen zu stoppen. Weitere Proben werden wie bereits beschrieben zu definierten Zeitpunkten entnommen. Gesamt-RNA wird aus allen Proben mittels „Hot-Phenol“-Methode isoliert (2.3.3) und im Anschluss dazu genutzt, spezifische Transkripte mittels Northern Blot (2.5.4) nachzuweisen. Quantifizierte Signale kleiner RNA Spezies werden jeweils auf das Signal der 5S rRNA normalisiert, um Ladeunterschiede auszugleichen. Dies ist deshalb möglich, weil die 5S rRNA eine sehr stabiles Transkript ist. Die Abnahme der Signale wird zuletzt graphisch bzw. halblogarithmisch dargestellt, wobei anhand der Exponentialfunktion der Ausgleichsgerade durch die initiale Abbauphase die Halbwertszeit einer RNA berechnet werden kann.

2.2.5 Messung der Zelldichte einer Flüssigkultur

Die Zelldichte einer Bakterienkultur (OD) wird photometrisch (Photometer Specord 50, Analytik Jena) bei einer Wellenlänge von 600 nm für *E. coli* bzw. bei einer Wellenlänge von 660 nm für *R. sphaeroides* bestimmt. Die optische Dichte (OD) beschreibt hierbei die durch Streuung an Partikeln vermittelte Abschwächung von Licht beim Durchgang durch ein Medium. Rechnerisch wird dieser Wert durch den negativen Logarithmus aus dem Quotienten von einfallender und ausfallender Lichtintensität ermittelt. Bei der Messung dient das Medium als Blindwert. Alle Bakteriensuspensionen ab einer OD von 0,7 wurden mit dem entsprechenden Wachstumsmedium verdünnt und dann gemessen.

2.2.6 Herstellung elektrokompenter *E. coli* Zellen

Elektrokompente Bakterienzellen sind solche, die DNA im Verlauf der Elektroporation aus der Umgebung aufnehmen können. Hierbei ist es essentiell, dass die für die Elektroporation verwendete Bakteriensuspension mehrfach mit ddH₂O gewaschen wird, weil Salzionen bei der Elektroporation zu einem Kurzschluss und somit Zelltod führen können. Zur Herstellung der Bakteriensuspension wird 1 l *E. coli* Übernachtkultur 1:1000 verdünnt und nach Erreichen einer OD₆₀₀ zwischen 0,6 und 1,0 zunächst für 20 min auf Eis gekühlt. Im Anschluss werden die Zellen sedimentiert (4.000 g, 15 min, 4°C) und das so erzeugte Zellpellet erst in 500 ml und dann in 250 ml kaltem, sterilem Wasser (Roth) mit zwischenzeitlichem Resuspendieren und Sedimentieren (4.000 g, 10 min, 4°C) gewaschen. Der letzte Waschschrift erfolgt in 20 ml 10 %igem kaltem Glycerin. Das so gewaschene Zellpellet wird in 3 ml 10 %igem Glycerin resuspendiert, in 60 µl Aliquots aufgeteilt und in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C bis Verwendung gelagert.

2.2.7 Elektrotransformation von *E. coli* (Elektroporation)

Bei der Elektroporation werden Zellen, die zuvor im Zuge mehrerer Waschschriffe von Salzen befreit wurden, für eine kurze Zeit einer elektrischen Spannung ausgesetzt, wodurch sich die Durchlässigkeit der Cytoplasmamembran für Fremd-DNA erhöht. Auf diese Weise gelangt die bei der Elektrotransformation eingesetzte DNA in die Zellen. Das vorherige Waschen der Zellen ist

notwendig, da vorhandene Salze die Leitfähigkeit erhöhen und deshalb zu Kurzschlüssen während der Elektroporation führen können. Die Fremd-DNA sollte aus gleichem Grund wie die Bakteriensuspension zur Vermeidung von Kurzschlüssen möglichst salzfrei sein.

Für einen typischen Elektrotransformationsansatz werden 40 µl kompetenter *E. coli* JM109 Zellen mit 20-50 ng der zu transformierenden DNA durch vorsichtiges Resuspendieren gemischt. Dieser Transformationsansatz wird anschließend blasenfrei in eine gekühlte Elektroporationsküvette gegeben und die Zellen werden im *E. coli*-Pulser mit einer Spannung von 2,1 kV für ~ 5 ms transformiert. Danach werden die Zellen sofort in 0,5 ml St-I-Medium zur Resistenzausbildung aufgenommen und für eine Stunde bei 37°C auf dem Schüttler bei 180 rpm inkubiert. Zuletzt wird der Ansatz gegebenenfalls verdünnt und auf St-I-Agar, welcher mit entsprechenden Antibiotika versetzt ist, ausplattiert. Die Inkubation erfolgt über Nacht bei 37°C.

2.2.8 Biparentale Konjugation von Plasmid-DNA nach *R. sphaeroides*

Um Fremd-DNA in den Akzeptor Stamm *R. sphaeroides* einzubringen, wird die di- und triparentale Konjugation genutzt, da das Bakterium nur sehr schlecht auf Elektrotransformation oder andere gängige Transformationsmethoden anspricht. Bei der biparentalen Konjugation wird der *E. coli*-Stamm S17-1 als Donor-Stamm genutzt. Dieser enthält das bei der Konjugation zu übertragende Plasmid mit der *mob*-Region (*mobility*) zur Linearisierung des zu übertragenden Plasmids, sowie chromosomal kodiert die *tra*-Gene (*transfer*) zur Ausbildung der sogenannten F-Pili (*fertile*), über die der Zellkontakt hergestellt wird. Für die Konjugation wird das Zellpellet von 1 ml exponentiell wachsender *Rhodobacter sphaeroides* Kultur in 100 µl RÄ Medium aufgenommen und mit *E. coli* S17-1 Zellmaterial, welches mittels Impföse von einer über Nacht inkubierten Agar-Platte entnommen wird, resuspendiert. Der resultierende Konjugationsansatz wird auf sterile Nitrocellulosefilter aufliegend, auf PY-Agarplatten getropft und mindestens für 4-5 Stunden bei 32°C inkubiert. Anschließend werden die Zellen mit 1 ml RÄ-Medium in 2 ml Reaktionsgefäßen von den Nitrocellulosefiltern gewaschen und in adäquaten Verdünnungen auf RÄ Agarplatten mit entsprechenden Selektionszusätzen ausplattiert.

PY (<i>peptone yeast</i>) Medium (pH 7)	10 g Trypton; 0,5 g Hefeextrakt; 1 ml CaCl ₂ (1M); 1 ml MgCl ₂ (1M); 2,4 ml FeSO ₄ (0,5%); ddH ₂ O ad 1L
PY Agarplatten	16 g Bacto Agar (1,6 %); PY Medium ad 1L

2.2.9 Expression rekombinanter Proteine in *E. coli*

In dieser Arbeit wird die katalytische Untereinheit der RNase E von *E. coli* rekombinant exprimiert unter Verwendung des Plasmids pRne529N (Callaghan *et al.*, 2003), welches ein pET16b (Novagen) Derivat ist. Die Expression der für die ersten 529 Aminosäuren der RNase und N-terminalen hexa-Histidin-tag kodierenden Sequenz findet hierbei ausgehend von einem T7 Promotor unter Kontrolle eines *lac* Operators in BL21 Zellen statt. Bei der Überexpression wird eine mit einer Einzelkolonie inokulierte Übernachtskultur dazu verwendet, 500 ml Standard I Medium 1-2 %ig anzupflanzen. Beide Kulturen enthalten entsprechende Antibiotika, um den Selektionsdruck aufrecht zu erhalten. Die Induktion der Expression erfolgt beim Erreichen einer OD600 von 0,5 mit 1 mM IPTG. Nach anschließender Inkubation von 2 Stunden werden die Zellen geerntet (8.000 g, 15 min, 4°C) und bis zur Aufarbeitung bei -20°C gelagert.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Eine Plasmid-Minipräparation dient der Gewinnung von Plasmid DNA aus Bakterien im kleinen Maßstab, wobei das Prinzip einer alkalischen Lyse angewendet wird (Birnboim & Doly, 1979). Zuerst werden hierzu 2 ml einer Bakterienkultur in der stationären Phase 5 min bei 6000 rpm zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand verworfen und das Zellpellet in 200 µl kalter Lösung I resuspendiert. Hierzu werden zur Lyse 200 µl Lösung II gegeben, worauf das Reaktionsgefäß 5- bis 10-mal invertiert und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wird. Dann werden 200 µl kühle Lösung III hinzugegeben, erneut alles 5- bis 10-mal invertiert und das Reaktionsgefäß 15 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wird 10 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert, wobei SDS, Zelltrümmer sowie chromosomale DNA in Form von weißen Flocken sedimentieren. Der Plasmid DNA enthaltende Überstand (ca. 450 µl) wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und erneut zentrifugiert. Dann werden 400 µl des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Plasmid DNA mittels Standard Ethanol- oder Isopropanolfällung pelletiert. Zuletzt wird das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen, in der *SpeedVac* getrocknet und in 50 µl ddH₂O aufgenommen.

Lsg. 1 (autoklavieren, 4°C)	50 mM Glucose; 25 mM Tris (pH 8,0); 10 mM EDTA (pH 8,0)
Lsg. 2 (Raumtemperatur, frisch ansetzen)	200 mM NaOH; 1 % SDS (w/v)
Lsg. 3 (autoklavieren, 4 °C)	3 M Kaliumacetat; 2 M Essigsäure

2.3.2 Isolierung von chromosomaler DNA aus *R. sphaeroides*

Zur Isolierung chromosomaler DNA aus Bakterien kann die CTAB-Methode angewandt werden. Hierbei werden 20 ml Bakterienkultur (OD₆₆₀ 0,8) sedimentiert (6.000 g, 5 min). Das resultierende Zellpellet wird in 567 µl TE-Puffer resuspendiert. Zusätzlich werden 30 µl 10 % SDS und 12 µl Proteinase K (20 mg/ml) zugegeben. Anschließend wird der Ansatz vermischt und bei 37°C eine Stunde zum Zwecke der Zelllyse und des Proteinverdaus inkubiert. Nach dieser Inkubation werden 100 µl 5 M NaCl zugegeben, und der Ansatz gut durchmischt. Dann erfolgt die Zugabe von 80 µl CTAB/NaCl-Lösung, wonach erneut vermischt und bei 65°C 10 Minuten inkubiert wird. Im Anschluss wird der Probe 750 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) zugesetzt, durch Invertieren gemischt und 5 Minuten in einer Tischzentrifuge bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der wässrige Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die chromosomale DNA durch Phenol/Chloroform Extraktion (2.3.4.4) und Isopropanolfällung (2.3.4.2) gereinigt.

TE-Puffer (pH 7,5):	10 mM Tris; 1 mM EDTA
CTAB/NaCl-Lösung:	10 % CTAB (w/v; Sigma-Aldrich, Seelze); 0,7 M NaCl

2.3.3 Isolierung von Gesamt-RNA aus Bakterien mittels „Hot-Phenol“-Methode und DNase/TEX Behandlung

Bei der „Hot-Phenol“-Methode (Janzon *et al.*, 1986) wird Gesamt-RNA aus Bakterien isoliert. Im Falle von *Rhodobacter sphaeroides* wird das auf Eis geerntete Zellpellet von 20 ml Kultur (OD₆₆₀ 0,4 - 0,8) in 200 µl gekühltem Resuspensionspuffer aufgenommen. Nach Zugabe von 200 µl Lysepuffer und kurzem Vortexen erfolgt eine Inkubation bei 65°C für 90 Sekunden, um die Zellen zu lysieren und Proteine zu denaturieren. Dann werden 400 µl auf 65°C erwärmtes, wassergesättigtes Phenol

zugegeben, stark gevortext und die Proben weitere 3 Minuten bei 65°C inkubiert, wobei sich Proteine in der unpolaren Phenolfraction und Nukleinsäuren in der wässrigen Phase sammeln. Im Anschluss werden die Proben umgehend in flüssigem Stickstoff schockgefroren, um eventuelle RNase-Aktivität zu unterbinden und eine verbesserte Phasentrennung zu erreichen, wenn die Proben nun bei 13.000 rpm 10 Minuten in der Tischzentrifuge zentrifugiert werden. Die obere wässrige Phase wird in ein RNase freies 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die untere Phenolphase wird verworfen. Um eine maximale Reinheit der RNA zu erhalten, wird die Behandlung mit 65°C warmen Phenol zweimal wiederholt. Danach werden die Proben mit einem Volumenanteil Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) gemischt und 5 Minuten bei 13.000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert, um Phenolreste auszuwaschen. Zuletzt wird die wässrige Phase wieder in ein neues Reaktionsgefäß überführt, um die darin enthaltenen Nukleinsäuren mittels Ethanolfällung (2.3.4.1) zu reinigen.

Durch das Arbeiten im pH-Bereich 4,5 wird eher RNA als DNA isoliert. Trotzdem kann es hierbei zu leichten DNA Kontaminationen kommen, die im Falle anschließender qRT-PCR oder Transkriptomanalyse mittels eines einstündigen DNase I (Invitrogen) Verdaus bei 37°C beseitigt werden können. Für einen folgenden *Northern-Blot* Analyse gegen sRNAs ist dies jedoch nicht nötig. RNA aus DNase I Verdaus kann im Anschluss entweder durch Phenol/Chloroform Extraktion (2.3.4.4) und Isopropanolfällung (2.3.4.2) oder mittels RNeasy MiniElute Cleanup Kit (Qiagen) gereinigt werden. Um den Erfolg der DNase I Behandlung zu garantieren, erfolgt eine *Taq* PCR gegen das Gen *gloB*. Hierbei wird 1 µl einer 20 ng/µl Verdünnung der RNA in einen 10 µl Reaktionsansatz eingesetzt. Eventuell vorhandene Amplifikate zuzüglich Positiv- und Negativkontrolle werden dann mittels 10 % TBE/PAA Gel (2.4.3) und Ethidiumbromid Färbung überprüft.

Für eine enzymatische Behandlung mit Terminator-5'-Phosphate-Dependent Exonuklease (TEX; Epicentre) erfolgte die Inkubation des 80 µl Reaktionsansatzes für 1,5 Stunden bei 30°C. Der Reaktionsstop erfolgte durch die Zugabe von 70 µl FU Mix und 2 µl EDTA (200 mM; pH 8).

Resuspensionspuffer	300 mM Saccharose; 10 mM Natriumacetat (pH 4,5)
Lysepuffer	2 % SDS; 10 mM Natriumacetat (pH 4,5)
DNase I Verdaus	30 µg Gesamt RNA; 12 µl 10x Puffer; 1 µl DNase I (301 U/µl); ddH ₂ O <i>ad</i> 120 µl
TEX Behandlung	4 µg Gesamt RNA; 8 µl 10x Puffer A; 2 µl Ribolock; 4 µl TEX (Epicentre; 1 U/µl); ddH ₂ O <i>ad</i> 80 µl

2.3.4 Fällung und Reinigung von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren werden gefällt, um sie von Salzen und anderen Verunreinigungen zu befreien oder um sie in geringeren Flüssigkeitsvolumen zu lösen. Hierzu macht man sich die chemischen bzw. physikalischen Eigenschaften der Nukleinsäuren zu nutzen, die aufgrund negativ geladener Phosphatgruppen einen polaren Charakter und somit ein gutes Lösungsverhalten in Wasser aufweisen. Bei Zugabe von unpolaren Lösungsmitteln, insbesondere bei zusätzlicher Zugabe von monovalenten Kationen, die die negative Ladung der Phosphatgruppen aufheben, wird die Löslichkeit vermindert. Präzipitiert werden so vor allem langkettige Nukleinsäuren, während Nukleotide und Oligonukleotide dazu tendieren, in Lösung zu bleiben.

2.3.4.1 Ethanolfällung

Bei der Standard Ethanolfällung werden zu einer DNA-haltigen Lösung 0,1 Volumenteile

3 M Natriumacetat (pH 5,2, RNA pH 4,5) und 2,5 Volumenteile an vorgekühltem 98 % Ethanol gegeben. Der Ansatz wird für 2 Stunden bei -20°C, für ca. eine Stunde bei -80°C oder für 5 Minuten in flüssigem Stickstoff inkubiert und anschließend mindestens 20 Minuten bei 4°C und 13.000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig entfernt und das Pellet in eiskaltem 70 % Ethanol gewaschen. Zuletzt wird das Pellet getrocknet und in einer angemessenen Menge destilliertem Wasser resuspendiert.

2.3.4.2 Isopropanolfällung

Bei der Isopropanolfällung werden zu einer DNA-haltigen Lösung 0,1 Volumenteile 3 M Natriumacetat (pH 5,2, RNA pH 4,5) und 0,7 Volumenteile an Isopropanol zugegeben. Anschließend wird wie bei der Ethanol-fällung verfahren.

2.3.4.3 n-Butanolfällung

Bei der n-Butanolfällung können beispielweise aus Ligationsansätzen Salzkontaminationen besonders zeitsparend entfernen werden. Hierzu wird die Lösung mit Reinstwasser auf ein finales Volumen von 50 µl aufgefüllt und mit 500 µl n-Butanol versetzt. Der Ansatz wird 5 Sekunden gevortext und 10 Minuten bei 13000 rpm abzentrifugiert. Zuletzt wird der Überstand vorsichtig abgenommen, das Pellet getrocknet und in einer angemessenen Menge destilliertem Wasser resuspendiert.

2.3.4.4 Phenol/Chloroform-Extraktion

Mit Proteinen kontaminierte Nukleinsäurelösungen können mittels Phenol/Chloroform-Extraktion gereinigt werden. Hierbei wird ein Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) zur Lösung gegeben, stark gemischt und zur Phasentrennung für 20 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Im Anschluss enthält die Inter- und organische Phase die denaturierten Proteine. Die obere wässrige Phase enthält Nukleinsäuren. Der wässrige Überstand wird abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Danach werden die Proben mit einem Volumenanteil Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) gemischt und 5 Minuten bei 13.000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert, um Phenolreste auszuwaschen. In der wässrigen Phase enthaltene DNA oder RNA kann nun mittels Ethanol oder Isopropanol gefällt werden.

2.3.5 Restriktion von DNA

Bei der Restriktion von DNA können Typ II-Restriktionsendonukleasen genutzt werden, die palindromische Sequenzen von 4 bis 8 Basenpaaren erkennen. An diesen Sequenzen katalysieren die Enzyme die hydrolytische Spaltung von dsDNA, wobei je nach Restriktionsenzym *blunt ends* oder *sticky ends*, also doppelsträngige Fragmente mit 5'- oder 3'-Überhängen an den Enden, entstehen. Dies spielt bei Klonierungen eine wichtige Rolle, da DNA-Fragmente, welche mit gleichen Endonukleasen geschnitten wurden, anschließend ligiert werden können. In dieser Arbeit wurden Restriktionsenzyme der Firma Thermo Scientific benutzt. Hierbei werden Puffer und Enzymmenge für Einzel- und Doppelrestriktionen entsprechend der Empfehlungen eingesetzt.

2.3.6 Ligation von DNA

Die kovalente Verknüpfung zweier DNA-Fragmente wird durch Phosphodiester-Bindungen zwischen freien 3'-Hydroxyl-Enden und freien 5'-Phosphatenden realisiert. Katalysiert wird diese ATP abhängige Reaktion durch DNA-Ligase des Phagen T4 (Thermo Scientific). Ligationsansätze werden nach Herstellerangaben angesetzt. Das optimale Verhältnis von Vektor zu Insert beträgt 1:3. Die

Ligation erfolgt entweder bei 15°C über Nacht oder bei Raumtemperatur für 2 Stunden. Das Enzym ist im Anschluss durch 10 Minuten Hitze bei 65°C inaktivierbar. Anschließend kann der Ligationsansatz direkt für eine Transformation genutzt oder vorab beispielweise mittels n-Butanolfällung aufgereinigt werden.

2.3.7 Ligation von PCR Produkten in Zwischenvektoren

Statt bei Klonierungen ein PCR Produkt zu schneiden, um es anschließend mit dem linearisierten Endvektor zu ligieren, kann dieses auch ohne Restriktion mit einem linearisierten Zwischen- bzw. Klonierungsvektor ligiert werden. Solche auch in dieser Arbeit verwendeten Klonierungsvektoren sind pDrive (QIAGEN PCR Cloning Kit) und pJet2.1 (CloneJET™ PCR Cloning Kit, Thermo Scientific). Die Wahl des Vektors ist abhängig von der verwendeten Polymerase. Der linearisierte pDrive Vektor besitzt U-Überhänge und eignet sich optimal, um mit Amplifikaten der Taq DNA Polymerase ligiert zu werden, da diese freie A-Überhänge aufweisen. Amplifikate einer Polymerase mit Exonukleaseaktivität weisen stumpfe Enden auf und eignen sich deshalb zur Ligation mit pJet2.1, der ebenfalls stumpfe Enden besitzt. In beiden Fällen wird sowohl die Ligation, als auch die Selektion später transformierter Bakterien nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.3.8 Dephosphorylierung von DNA

Damit Plasmid DNA aufgrund der terminalen 5'Phosphatgruppen nach Restriktionen in Ligationsansätzen nicht religiert, kann sie dephosphoryliert werden. Hierzu wird das Enzym *Antarctic-Phosphatase* (NEB) nach Hersteller Angaben verwendet.

2.3.9 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Durch die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) besteht die Möglichkeit, DNA Fragmente, ausgehend von einer kleinen Menge DNA, zu vervielfältigen. Hierzu werden die Template-DNA, welche das zu amplifizierende Fragment enthält, ein Oligonukleotidpaar (die sogenannten Primer), dNTPs, eine hitzestabile DNA-Polymerase und ein Thermocycler (S1000TmThermal Cycler, Biorad) benötigt. Die Reaktion läuft ab, indem zuerst durch eine hohe Temperatur die Basenpaarungen geschmolzen werden. Weil das Template nun denaturiert bzw. einzelsträngig vorliegt, können die Primer beim Abkühlen des Reaktionsansatzes an ihre Zielsequenz gegenläufig und komplementär binden, wenn ihre spezifische *annealing*-Temperatur erreicht wird. Anschließend wird die DNA-Polymerase spezifische extension-Temperatur eingestellt und so lange gehalten, wie die DNA-Polymerase zur Synthese des gewünschten Fragmentes benötigt. Ist dies geschehen, beginnt der Zyklus mit einer erneuten Denaturierung wieder von vorn. Im Regelfall wiederholt sich dieser Zyklus ca. 30-mal, was mit einer exponentiellen Zunahme an Amplifikaten einhergeht. In dieser Arbeit werden die Polymerasen Phusion (Thermo Scientific) und Taq (Qiagen) nach Herstellerangaben verwendet.

2.3.10 Ortspezifischen Mutagenese PCR

Um einen spezifischen Basenaustausch innerhalb eines optimalerweise in einem kleinen Plasmid vorliegenden DNA Fragmentes vorzunehmen, kann die *rolling circle* Mutagenese angewandt werden. Hierzu wird ausgehend von einem gegenläufig ausgerichteten Primerpaar, welches teilweise komplementär zueinander ist und die veränderte Nukleotidsequenz beinhaltet, das komplette Plasmid mittels Phusion Polymerase (Thermo Scientific) amplifiziert. Das resultierende Amplifikat ist ein weitgehend einzelsträngiges Plasmid, das durch die Komplementarität der Primer einen kurzen doppelsträngigen Abschnitt aufweist. Der komplementäre Bereich an den 5' Enden der Primer sollte

ca. 15-20 nt betragen und den Basenaustausch mittig enthalten, wohingegen die 3' Enden der Primer ca. 10 – 12 nt lang sein sollten. Um im Anschluss an die PCR das methylierte Templateplasmid zu entfernen, wird ein DpnI Verdau (Thermo Scientific) durchgeführt, weil dieses Restriktionsenzym lediglich methylierte DNA schneidet. Das Amplifikat wird durch Gelextraktion (2.4.2) aufgereinigt und im Anschluss zu einer Elektrotransformation (2.2.7) von kompetenten *E. coli* Zellen genutzt. In den Zellen wird das Plasmid vervollständigt, geschlossen und kann mittels Plasmidisolierung (2.3.1) zurückgewonnen werden.

2.3.11 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Durch die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 und 280 nm kann die Konzentration und Reinheit von DNA photometrisch (*NanoDrop*, PeqLab) bestimmt werden. Das Lösungsmittel dient zur Blindwertbestimmung. Eine Absorption von 1 bei 260 nm entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml dsDNA bzw. 40 µg RNA. Das Verhältnis des Absorptionsquotienten bei 260 nm (DNA) und 280 nm (Protein) gibt Aufschluss über die Reinheit der DNA (Sambrook, 2001). Grundlage hierfür ist, dass Nukleinsäuren elektromagnetische Strahlung mit einem Maximum bei 260 nm absorbieren, während aromatische Aminosäuren mit einem Maximum bei 280 nm absorbieren.

2.3.12 Sequenzierung von DNA

In dieser Arbeit werden Sequenzierungen vom institutsinternen Sequenzierlabor des Interdisziplinären Forschungszentrums (IFZ) der Universität Gießen durchgeführt. Es wird ein Kapillarsequenziergerät (Genetic Analyzer 310) der Firma ABI genutzt, welches mittels der Kettenabbruch-Methode nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977) sequenziert. Hierbei werden vier Reaktionen mit DNA Polymerase, dem Template, einem Primer, und den vier Desoxynukleotiden (dNTPs) angesetzt. Jeder Reaktionsansatz enthält einen der vier fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotide (ddNTPs). Die Reaktionen laufen ähnlich einer PCR ab. Die DNA-Polymerase verknüpft die dNTPs anhand des Templates in 5'→3'-Richtung, wobei die Kettenverlängerung durch nukleophile Angriffe der endständigen 3'-OH-Gruppen der DNA-Ketten auf die Phosphorsäuregruppe der anzufügenden dNTPs erreicht wird. Wird ein ddNTP in einen Strang eingebaut, kann durch die fehlende 3'-OH-Gruppe nicht weiter synthetisiert werden und es kommt zum Kettenabbruch. Das Produkt der vier Reaktionen sind viele unterschiedlich lange DNA Ketten, welche je nach Reaktionsansatz ein spezifisches fluoreszenzmarkiertes ddNTP als letztes angefügt haben. Werden die Ansätze separat bzw. parallel mittels Kapillargelelektrophorese aufgetrennt, kann die Sequenz insbesondere anhand der Fluoreszenzmarkierung abgelesen werden.

2.3.13 Radioaktive Markierung durch *end-labelling*

Um sRNA und rRNAs in der auf eine Nylonmembran übertragenen Gesamt-RNA spezifisch detektieren zu können, werden radioaktiv markierte Oligonukleotidsonden genutzt. Die radioaktive Markierung von Oligonukleotiden mit [³²P]γ-ATP mittels *end-labeling* wird durch die T4 Polynukleotidkinase (T4 PNK) katalysiert, die radioaktiv markierte γ-Phosphatgruppen auf die dephosphorylierten 5'-Enden der zu markierenden Oligonukleotide überträgt. Der *end-labeling* Ansatz wird für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wird die Reaktion mittels 40 µl STE-Puffer gestoppt. Um nicht gebundenes [³²P]γ-ATP aus dem Ansatz zu entfernen, wird dieser dann über ein microspin G25-Säulchen (GE Healthcare) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Um ein geeignetes Volumen

an radioaktiv markierter Oligonukleotidsonde für Folgeexperimente zu ermitteln, können zuletzt die Zerfälle pro Minute in einer Scintillationsmessung bestimmt werden.

<i>end-labeling</i> Ansatz	2 µl Oligo (10 pmol/µl); 3 µl ddH ₂ O; 1 µl T4 PNK Puffer A (10x); 1 µl T4 Polynukleotidkinase (1 U/µl); 3 µl [³² P]γ-ATP
STE-Puffer	100 mM NaCl; 20 mM Tris (pH 7,5); 10 mM EDTA

2.4 Gelelektrophoresen

2.4.1 Agarosegele zur Auftrennung von DNA

DNA-Fragmente ab ca. 200 bp können über TAE- oder TBE-Agarosegele aufgetrennt werden. Die Auftrennung erfolgt, weil Nukleinsäuren aufgrund ihres negativ geladenen Zucker-Phosphat-Rückgrats in einem elektrischen Feld von Kathode zu Anode wandern. Die Gelmatrix stellt hierbei einen Widerstand dar, sodass sich die Laufgeschwindigkeit der Fragmente antiproportional zu deren Größe verhält. Die Gelmatrix wird hergestellt, indem 0,75-2,5 % LE-Agarose (w/v) unter Aufkochen in einer Mikrowelle in 1x TAE- oder TBE-Puffer gelöst wird. Mit der Lösung wird das Gel in einem Flachbettschlitten mit eingesetztem Kamm für die Geltaschen gegossen. Die aufzutragenden Proben werden mit Ladepuffer versetzt, der das Absinken der Proben in die Geltaschen gewährleistet. Für den ca. einstündigen Lauf wird eine Spannung von ca. 80 mA angelegt. Ist der Gellauf beendet, werden die DNA-Fragmente in einem Ethidiumbromid-Bad (2 µg/µl) angefärbt. Ethidiumbromid interkaliert hierbei in die dsDNA. Wird dieser Komplex mit UV Licht angeregt, kommt es zur Fluoreszenzemission, welche mit einer DCC-Kamera aufgenommen wird.

10x TAE Puffer	10 mM EDTA; 400 mM Essigsäure; 400 mM Tris
10x TBE Puffer (pH 8,3)	890 mM Borat; 25 mM EDTA; 890 mM Tris
DNA Ladepuffer	4 M Harnstoff; 50 mM EDTA; 0,1 % Bromphenolblau (w/v); 50 % Saccharose (w/v); 0,1 % Xylencyanol (w/v)

2.4.2 Extraktion von DNA aus Agarose-Gelen

Für die Extraktion der DNA aus PCR-Ansätzen oder Restriktionen, wird diese zunächst über ein präparatives Agarosegel aufgetrennt. Anschließend wird das Gel so geschnitten, dass ein schmaler Streifen mit dem Größenstandard und einem kurzen Stück der Spur der zu extrahierenden DNA mit Ethidiumbromid angefärbt werden kann. Anhand dieses Gelstreifens kann eine Maske gefertigt werden, die die Laufhöhe des gewünschten DNA Fragmentes anzeigt. Mit Hilfe dieser Maske wird der Gelbereich mit der gewünschten DNA aus dem ungefärbten Teil des präparativen Gels herausgeschnitten. Anschließend wird die DNA mittels *QIAEX II Gel extraction Kit* oder *QIAquick PCR Purification Kit* (beide Qiagen) nach den Vorgaben der Herstellerprotokolle aus dem Gelabschnitt extrahiert. Alternativ kann der zerkleinerte Gelabschnitt über eine selbst gefertigte Glaswollematrix bei 13000 rpm 2 min zentrifugiert werden. Hierbei werden Nukleinsäuren gelöst in Flüssigkeit aus dem Gelstreifen in einem Reaktionsgefäß aufgefangen und anschließend mit Phenol/Chloroform extrahiert (2.3.4.4) und Ethanol gefällt (2.3.4.1).

2.4.3 TBE/PAA-Gele zur Auftrennung kurzer DNA-Fragmente

Zum Nachweis kleiner DNA-Fragmente ≤ 500bp oder von Fragmenten, die in geringer Konzentration vorliegen, eignet sich eine TBE-Polyacrylamidgelelektrophorese besser als eine herkömmliche Agarosegelelektrophorese. Die Polymerisation des Geles setzt nach der Zugabe von APS und TEMED

ein, weshalb diese zuletzt zugegeben werden sollten. Die Auftrennung erfolgt bei maximal 80 V in 1x TBE-Puffer bis die Lauffront die gewünschte Höhe erreicht hat. Anschließend werden die DNA-Fragmente in einem Ethidiumbromid-Bad wie bereits beschrieben angefärbt. Die Zusammensetzung eines TBE/PAA-Geles ist im Folgenden gezeigt.

TBE/PAA-Gel (10 %)	1,5 ml Acrylamid (40 %); 0,6 ml TBE (10x); 3,9 ml ddH ₂ O; 24 µl APS (10 %); 6 µl TEMED
--------------------	---

2.4.4 Denaturierende TBE/PAA/Urea-Gele zur Auftrennung von RNA

Bei der Polyacrylamid-Harnstoffgelelektrophorese wird RNA aufgetrennt. Dies geschieht unter denaturierenden Bedingungen mittels Harnstoff, damit Sekundärstrukturen der RNA gelöst und möglicherweise vorhandene RNasen inaktiviert werden. Die Zusammensetzung einer Gellösung und Ladepuffer ist im Folgenden gezeigt.

TBE/PAA/Urea-Gel (10%)	16,8 g Harnstoff (final 7 M); 10 ml Acrylamid (40 %); 4 ml TBE (10x); 120 µl APS (10 %); 20 µl TEMED; <i>ad</i> 40 ml ddH ₂ O
FU-Mix	6 M Harnstoff; 80 % Formamid; 10 % TBE (10x); 0,1 % Bromphenolblau; 0,1 % Xylencyanol

Vor dem Gießen der Gele werden zunächst entsprechende *spacer* und Glasplatten gründlich gereinigt, wobei die Ohrenplatten regelmäßig silanisiert werden sollten. Zu ladende Proben werden vor dem Auftragen mit mindestens 0,7 % Volumenanteilen Ladepuffer bzw. FU-Mix für 10 min bei 65°C denaturiert, anschließend auf Eis abgekühlt und kurz anzentrifugiert. Um scharfe Banden zu erhalten, sollten kurz vor dem Auftragen die Probentaschen zusätzlich gründlich mit 1x TBE-Laufpuffer gespült werden, um diese von Harnstoff zu befreien. In dieser Arbeit werden je nach Anschlussverwendung unterschiedliche TBE/PAA/Urea-Gelelektrophoresen durchgeführt.

Verwendung	Maße (BxLxH)	RNA Menge	Gellauf
Qualitätskontrolle bzw. EtBr Färbung	18 x 18 cm x 0,8 mm	1 µg ges. RNA	250 V; ~ 3 h
Northern Blots bzw. Elektroblot		5-10 µg ges. RNA	250 V; ~ 3 h
Degradationsassays bzw. Trocknen	18 x 18 cm x 0,4 mm	1500 cpm <i>in vitro</i> Transkript	500 V; ~ 1 h
Gelextraktion		max. Probenvolumen	250 V; ~ 2 h

2.4.5 Native TBE/PAA-Gele für EMSAs

Zur Analyse von elektrophoretischen Mobilitäts-*shift-assays* (EMSA) werden 6 %ige Polyacrylamid Gele mit 0,25x TBE in den Maßen 20 cm x 20 cm x 0,4 mm gegossen. Der Gellauf erfolgt ebenfalls in 0,25x TBE Puffer für 2 h bei 150 V und 4°C. Vor dem Auftragen der Proben werden die Gele für 1 h bei 100 V Spannung laufen gelassen. 10 µl Bindereaktionen werden vor dem Auftragen auf Eis vorsichtig mit 3 µl nativem Ladepuffer versetzt. Nach dem Gellauf werden Gele auf Whatmanpapier übertragen, auf einem Vakuumtrockner bei 80°C für 1 h bis 1,5 h getrocknet und Signale mittels *phosphoimaging* (2.5.5) visualisiert.

TBE/PAA-Gel (6%)	6 ml Acrylamid (40 %); 1 ml TBE (10x); 120 µl APS (10 %); 20 µl TEMED; <i>ad</i> 40 ml ddH ₂ O
Nativer Ladepuffer	50 % Glycerol (v/v), 0,5x TBE, 0.1 % Bromphenolblau

2.4.6 Extraktion von RNA aus denaturierenden TBE/PAA/Urea-Gelen

In vitro Transkripte werden mittels präparativer TBE/PAA/Urea-Gele sowohl von Template als auch von nicht inkorporierten Nukleotiden gereinigt. Hierzu werden nicht radioaktiv markierte Transkripte nach dem Gellauf kurz mit Ethidiumbromid gefärbt, während Gele mit radioaktiven Transkripten nach Abnehmen der Ohrenplatte zweilagig in Frischhaltefolie eingewickelt werden, um so einen Röntgenfilm zu exponieren. Der entwickelte Röntgenfilm kann dann als Maske beim Ausschneiden des gewünschten Transkriptes verwendet werden. Ausgeschnittene Gelstreifen werden im Anschluss zerkleinert, in Stickstoff eingefroren und über Nacht bei 4°C in 250 µl RNA-Elutionspuffer bei stetiger Rotation inkubiert. Das Eluat kann nach kurzer Zentrifugation in ein neues Reaktionsgefäß gegeben werden. Es ist zu empfehlen, den Elutionsschritt mindestens einmal bei RT für 3 - 5 h zu wiederholen. Zuletzt wird das Eluat einer Phenol/Chloroform-Extraktion (2.3.4.4) unterzogen und die RNA mittels Isopropanol gefällt (2.3.4.2).

RNA-Elutionspuffer (pH 4,5) 300 mM Natriumacetat; 1 mM EDTA; 2,5 % Phenol (v/v);
0,1 % SDS (w/v)

2.4.7 SDS/PAA-Gele zur Auftrennung von Proteinen

Proteine können mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) elektrophoretisch aufgetrennt werden. Hierbei werden Proteinproben vor dem Beladen des Gels mit SDS (*sodiumdodecylsulfate*) enthaltenden Ladepuffer aufgeköcht. Durch Anlagerung von SDS verbleiben die Proteine im denaturierten Zustand und erhalten zusätzlich aufgrund der negativen SDS-Moleküle eine starke negative Ladung. Durch diese starke negative Ladung ist die tatsächliche Eigenladung der Proteine bei der Auftrennung in der Gelmatrix, in welcher die Proteine der Größe nach aufgetrennt werden, zu vernachlässigen. Deshalb ist eine Auftrennung, bei der sich die Laufgeschwindigkeit der Proteine durch das Gel antiproportional zum Molekulargewicht verhält, unabhängig von der Eigenladung, möglich. In dieser Arbeit werden diskontinuierliche SDS-PAGEs verwendet (Laemmli, 1970). Diese bestehen aus Sammel- und Trenngel. Das Sammelgel weist einen geringeren Vernetzungsgrad als das Trenngel auf, was zusätzlich zu dem pH von 6,8 dazu führt, dass sich die Proteine an der Grenze beider Komponenten sammeln und als schärfere Bande in das Trenngel eintreten. In dem angesprochenen pH-Wert liegen die meisten Glycin Moleküle als Zwitterion vor, sind also nicht bzw. nur schlecht in der Lage, den Strom weiterzuleiten (Folgeionen), während die Chlorid-Ionen (Leitionen) vorauslaufen. Hierdurch entsteht ein Abschnitt erhöhter elektrischer Feldstärke, in dem sich die SDS umhüllten Proteine anordnen und zur Wanderung an die Trenngelfront angetrieben werden. Die Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel sind im Folgenden gezeigt.

SDS-Auftragspuffer (4x)	1x Sammelgelpuffer; 4 % SDS (w/v); Glyzerin 15 % (v/v); β-Mercaptoethanol 20 % (v/v) 0,05 % Bromphenolblau (w/v)
Trenngel (12 %)	9 ml Acrylamid (40 %); 7,5 ml Trenngelpuffer; 300 µl SDS (10 %); 300 µl APS (10 %); 15 µl TEMED; ad 30 ml ddH ₂ O
Sammelgel (5 %)	1 ml Acrylamid (40 %); 1 ml Sammelgelpuffer; 80 µl SDS (10 %); 80 µl APS (10 %); 8 µl TEMED; ad 8 ml ddH ₂ O
Trenngelpuffer (4x)	1,5 M Tris (pH 8,8); 0,4 % SDS (w/v)
Sammelgelpuffer (4x)	1 M Tris (pH 6,8); 0,4 % SDS (w/v)
Laemmli Puffer (10x)	1,92 M Glycin; 250 mM Tris; 1 % SDS (w/v)

2.5 RNA Methoden

2.5.1 *In vitro* Transkription

In dieser Arbeit werden RNA Transkripte für Degradationsstudien, Gel Retardations-assays und anschließender Biotinylierung *in vitro* synthetisiert. Hierbei werden immer die T7-RNA-Polymerase (New England Biolabs) und doppelsträngige PCR Produkte als Template verwendet, wobei der T7 spezifische Promoter unmittelbar vor der *sense* Sequenz der gewünschten RNA liegt. *In vitro* Transkripte werden „kalt“ oder intern radioaktiv mit [α -P³²]-UTP (3000 Ci/mmol; 10 μ Ci/ μ l; Hartmann Analytic) markiert, wie im Folgenden gezeigt generiert.

intern markierte <i>in vitro</i> Transkripte			„kalte“ <i>in vitro</i> Transkripte		
x	μ l	template (100 nM)	x	μ l	template (100 nM)
2,5	μ l	10 x T7 RNA-Pol. Puffer	2,5	μ l	10 x T7 RNA-Pol. Puffer
2	μ l	MgCl ₂ (40 mM)	2	μ l	MgCl ₂ (40 mM)
1	μ l	DTT (100 mM)	1	μ l	DTT (100 mM)
2	μ l	low U-Mix (25;25;25;5 mM)	2	μ l	NTPs (total 100 mM)
0,5	μ l	RNasin (40 U/ μ l)	0,5	μ l	RNasin (40 U/ μ l)
3	μ l	[α -P ³²]-UTP	1,5	μ l	T7 RNA-Pol. (50 U / μ l)
1,5	μ l	T7 RNA-Pol. (50 U/ μ l)	ad 25	μ l	ddH ₂ O
ad 25	μ l	ddH ₂ O			

Die *in vitro* Transkription erfolgt 5 h bei 37°C. Ansätze werden im Anschluss einem DNase I (RQ1 RNase-Free DNase (1 U/ μ l); Promega) Verdau unterzogen und entweder mittels präparativen TBE/PAA/Urea-Gelen (2.4.4) oder Phenol/Chloroform-Extraktion (2.3.4.4) gereinigt. Die Quantifizierung radioaktiv markierter RNA kann mit Hilfe eines Szintillations-Zählers (LS 6500 Beckman Coulter) durch Messung der Tscherenkow-Strahlung durchgeführt werden, wobei die spezifische Aktivität intern markierter RNA über die Einbaurate des eingesetzten [α -P³²]-UTP errechnet wird. Zusätzlich kann der Zerfall des markierten Nukleotides berücksichtigt werden.

2.5.2 3' terminale Biotinylierung von RNA

In dieser Arbeit werden UpsM *in vitro* Transkripte für *pulldown* Experimente am 3' Ende bzw. an der 3' terminalen Ribose chemisch mit Biotin markiert. Der Reaktionsmechanismus basiert hierbei auf einer initialen Oxidation der cis-Diolgruppe durch Periodat zu einer reaktiven Dialdehydgruppe. Das Dialdehyd dient als Substrat für einen nucleophilen Angriff durch eine Aminogruppe eines Hydrazidderivates wie dem verwendeten Biotinamidohexansäure-hydrazid (Sigma Aldrich). In einem finalen Schritt wird das Reaktionsprodukt der chemischen Synthese zu Gunsten der Stabilität mit Natriumborhydrid (Sigma Aldrich) reduziert. Im Einzelnen wird die Reaktion wie folgt angesetzt: Bis zu 20 nmol gereinigtes *in vitro* Transkript gelöst in 20 μ l ddH₂O wird mit 180 μ l KIO₄ (50 mM; pH 7,0) versetzt und 1 Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln stehen gelassen. Im Anschluss wird die Oxidation abgestoppt, indem die RNA nach Zugabe von 200 μ l Ethylenglycol (50 %) mittels Ethanolfällung (2.3.4.1) präzipitiert wird. Das resultierende RNA Pellet wird in 100 μ l Biotinamidohexansäure-hydrazid (10 mM) aufgenommen und zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Dann erfolgt der Reduzierungsschritt für 30 min bei 4°C nach Zugabe von 100 μ l NaBH₄ (0,2 M) und 200 μ l Tris-Puffer (1 M, pH 8,2). Die Lösung wird nun wieder einer Ethanolfällung (2.3.4.1) unterzogen. Die biotinylierte RNA wird hiernach je nach Wunsch in 20 bis 100 μ l Wasser aufgenommen. Im Anschluss sind weitere Aufreinigungsschritte mittels Gel, Sephadexsäulen (Sephadex G-50; GE-Healthcare) oder Phenol/Chloroform Extraktion denkbar. Biotinylierungseffizienz bzw. Synthesemenge sollte zuletzt

mittels Streptavidin *shift* bzw. Gel überprüft werden. Hierzu wird das Transkript jeweils in einer Bindungsreaktion mit einem Überschuss oder ohne Streptavidin (Sigma-Aldrich) 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Beide Bindungsansätze werden mittels nativer 1 %igen TBE-Agarosegelelektrophorese (2.4.1) analysiert, wobei die Biotinylierungseffizienz anhand des *shifts* und die RNA Menge anhand einer mitgeführten tRNA (Roche) Verdünnungsreihe evaluiert werden kann.

Strep. Bindungsansatz	1 µl RNA-Biotin; 0,5 µl Bindepuffer; 2 µl Streptavidin; 1,5 µl ddH ₂ O
10x Bindepuffer	100 mM Tris (pH 7,4); 25 mM MgCl ₂ ; 1 M NaCl

2.5.3 RNA-Degradationsassays

RNA-Degradationsassays dienen in dieser Arbeit dazu, die rekombinant aufgereinigte katalytische RNase E Domäne bzw. RNaseE529-hexa-His hinsichtlich ihrer ribonukleolytischen Aktivität mit der sRNA UpsM als Substrat zu untersuchen. Die eingesetzte Menge an heißem Substrat entspricht hierbei 800 - 1500 cpm und die des Proteins ca. 1 µg. Reaktionen finden stets in Rne-Puffer und in einem Reaktionsvolumen von 10 µl statt. Die Ansätze werden bei 37°C inkubiert und durch Zugabe von einem Volumen FU-Mix gestoppt. Unmittelbar vor dem Laden der Proben auf denaturierende TBE/PAA/UREA-Gele werden die Ansätze für 5 min bei 65°C denaturiert und kurz abzentrifugiert.

Rne-Puffer	20 mM Tris (pH 7,9); 500 mM NaCl; 10 mM MgCl ₂ ; 0,5 mM EDTA; 10 mM DTT; 5% Glycerin (v/v)
------------	---

2.5.4 Northern Blot Analyse

Northern Blot Analysen werden in dieser Arbeit verwendet, um sRNAs der Länge 60 – 300 nt zu detektieren. Zunächst wird hierbei Gesamt-RNA aus Zellen mittels TBE/PAA/Urea-Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend in einem Spannungsfeld mittels Elektrobplot auf eine Nylonmembran übertragen. Dort wird die RNA durch UV-Licht fixiert. Die Detektion und Quantifizierung einzelner Transkripte ist anschließend durch die Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden möglich. In dieser Arbeit werden hierzu ausschließlich radioaktiv endmarkierte DNA-Oligonukleotid-Sonden verwendet.

Beim *semidry Blot* werden zuerst 6 Whatman Papiere und eine Nylonmembran auf Gelgröße zugeschnitten und in TBE-Puffer getränkt. Drei der Whatman Papiere werden dann aufeinander gestapelt auf die Anodenplatte des ElektroBlotter (PqLab) gelegt. Hierauf werden zuerst die Membran, dann das Polyacrylamid-Harnstoffgel und zuletzt 3 weitere Whatman Papiere luftblasenfrei abgelegt. Anschließend wird die Kathodenplatte auf der Anodenplatte befestigt. Der RNA-Transfer erfolgt bei 250 mA für 2-3 Stunden. Die RNA wird anschließend durch *crosslinken* mittels UV-Licht an die Membran gebunden (2x auto crosslink Funktion des UV-Stratalinkers von Stratagene).

Prähybridisierungen und Hybridisierungen mit ca. 10⁶ cpm DNA-Oligonukleotid-Sonde über Nacht erfolgt im *Church low stringency* Puffer System (Church & Gilbert, 1984) bei 42°C. Je nach Hintergrundstahlung kann dann gewaschen werden (0,01 % SDS (w/v); 5x SSC). Ist an den äußeren Rändern der Membran nur ein sehr schwaches Signal mit Geiger-Müller-Zählrohr zu detektieren, wird die Membran in Plastikfolie eingeschweißt und zur Detektion der Signale mittels *phosphoimaging* (2.5.5) vorangeschritten.

Nach der Detektion eines Signals von der Nylonmembran kann diese nach dem *stripping* für die Hybridisierung mit weiteren Sonden genutzt werden, was vor allem für die zusätzliche Erfassung eines internen Standards, zum Zwecke der Normalisierung der geladenen RNA Mengen in

unterschiedlichen Spuren wichtig ist. Gebundene Sonden werden hierbei bei 95 °C unter Schütteln in einer 0,1 % SDS-Lösung entfernt.

20x SSC Puffer (pH 7,0) 3 M NaCl; 300 mM *tri*-Natriumcitrat

2.5.5 Detektion mittels *phosphoimaging*

Signale von radioaktiv markierten Membranen oder getrocknete Gele, die radioaktive Substrate enthalten, können mittels *phosphoimaging* visualisiert werden. Hierfür werden die Proben auf einem *phosphoimaging screen* exponiert, dessen Matrix durch radioaktive Strahlung anregbare BaFBrEu-Kristalle enthält. Das Ablesen des *phosphoimaging screens* erfolgt im Personal Molecular Imager® FX mit Hilfe eines HeNe-Lasers ($\lambda = 600$ nm) durch Detektion von geänderten Ladungszuständen in Form von photo-stimulierter Lumineszenz. Die ausgelesenen Signale können mit der Software Quantity One (Biorad) quantifiziert werden, wobei die gemessene Lumineszenz beispielweise als direktes Maß für die Menge an gebundenen Sonden genutzt werden kann.

2.5.6 5'-RACE

Bei der 5'-RACE (rapid amplification of cDNA ends) zur Verifizierung von 5' Enden von RNA, wird zunächst in einer reversen Transkription, ausgehend von einem *antisense* Primer einzelsträngige cDNA (complementary DNA) synthetisiert, die komplementär zur zu untersuchenden RNA ist. Diese cDNAs werden dann durch terminale Nukleotidyltransferase und dATP mit einem poly(A)-Ende versehen. Im Anschluss kann die cDNA in einer PCR-Reaktion mit einem sense-Primer, bestehend aus einer oligo(dT)- und Anker-Sequenz, und dem zu Beginn verwendeten *antisense* Primer vervielfältigt werden. Um im Anschluss nur spezifische Produkte zur Sequenzierung zu subklonieren, wird eine zweite PCR mit *sense*- und einem weiteren *antisense* Primer durchgeführt. Im Einzelnen wird hierbei wie folgt vorgegangen: Bei der cDNA Synthese werden zuerst ca. 4 µg DNA-freie gesamt RNA für 5 min in Anwesenheit von 1,25 µl Primer1 (10 pmol/µl) bei 70°C inkubiert und auf Eis abgekühlt. Das resultierende Hybrid wird in den cDNA Synthese Ansatz eingesetzt.

cDNA Synthese 10,5 µl RNA/Primer1-Hybrid; 4 µl 5x AMV RTase Puffer; 2 µl dNTPs (10 mM);
2 µl AMV RTase (40 U/µl); 0,2 µl RNasin; ddH₂O *ad* 20 µl

Die cDNA Synthese erfolgt nach AMV RTase (Promega) Herstellerangaben. Die cDNA wird dann mittels *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche) gereinigt und in die poly(A)-Synthese eingesetzt.

Poly(A)-Synthese 19 µl cDNA; 5,5 µl 5x TdT Puffer; 2,5 µl dATP (2 mM)

Dieser Ansatz wird 3 min bei 94°C erhitzt, auf Eis abgekühlt und nach Zugabe von 1 µl TdT (20 U/µl; Fermentas) erst 30 min bei 37°C dann 10 min bei 70°C inkubiert. Das Reaktionsprodukt kann dann 1:10 verdünnt in eine PCR Reaktion mit Taq Polymerase (Invitrogen) nach Herstellerangaben eingesetzt werden, wobei der oligo(dT)-Anker Primer (0,25 µM), der *antisense* Primer1 (0,75 µM) und MgCl₂ (1,5 mM) verwendet wird. Wie oben erklärt, wird das Amplifikat erneut 1:10 verdünnt und unter Verwendung von Anker Primer und *antisense* Primer2 (beide 0,25 µM) amplifiziert. Zur Analyse der 5' Enden werden die PCR Produkte zur Sequenzierung subkloniert. Hierbei wird das *PCR cloning kit* (Qiagen) verwendet.

2.5.7 Elektrophoretischer Mobilitäts-shift-assay (EMSA)

Elektrophoretische Mobilitäts-shift-assays werden in dieser Arbeit angewandt, um das Bindevverhalten zweier RNA Spezies aneinander zu analysieren. Hierbei kommt es durch die

Komplexbildung in einem nativen TBE/PAA-Gel (2.4.5) zu einem veränderten Laufverhalten, im Vergleich zu ungebundenen Nukleinsäuren. Man spricht daher von einem "shift". RNA wird hierzu zunächst *in vitro* transkribiert, wobei eine RNA Spezies intern radioaktiv mit [α -P³²]-UTP (3000 Ci/mmol; 10 μ Ci/ μ l; Hartmann Analytic) markiert wird (2.5.1). Alle Transkripte werden im Anschluss DNase behandelt und über denaturierende TBE/PAA/Urea-Gele aufgereinigt (2.4.4). Im Anschluss werden geeignete Mengen beider RNA Spezies (150 – 15000 fmol) in Aliquots getrennt voneinander 5 min bei 90°C denaturiert, auf Eis abgekühlt, mit *structure* Puffer versetzt und zum Renaturieren der RNA 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Erst jetzt werden die unterschiedlichen Transkripte für die einzelnen 10 μ l Bindereaktionen miteinander gemischt und 20 bis 30 min bei 32°C inkubiert. Zu Gunsten von Komplexen sollten die Ansätze zuletzt rapide abgekühlt werden, bevor sie mit Ladebuffer versetzt auf ein natives TBE/PAA-Gel geladen werden (2.4.5).

structure Puffer (5x) 50 mM Tris (pH 7); 500 mM KCl; 50 mM MgCl₂

2.5.8 Quantitative real time RT-PCR (qRT-PCR)

Die qRT-PCR stellt eine Möglichkeit dar, Genexpression quantitativ zu analysieren. Hierbei wird zunächst mit Hilfe einer reversen Transkriptase (RT) ein cDNA-Transkript einer spezifischen mRNA erzeugt. Diese cDNA wiederum dient im Folgenden als Template für eine PCR Reaktion. Um die Amplifikation des *templates* in Echtzeit (*real time*) zu beobachten, enthalten Reaktionsansätze neben Puffer, Enzym, dNTPs und Primer den Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green, der in gebildete doppelsträngige DNA interkaliert. Somit nimmt die Fluoreszenz mit zunehmender Menge an dsDNA zu. Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green absorbiert Licht bei einer Wellenlänge von 494 nm und emittiert Licht bei einer Wellenlänge von 521 nm. Anhand des Amplifikationszykluses bei dem die gemessene Fluoreszenz einen definierten Schwellenwert überschreitet, kann in Relation zu einem internen Standard die vorliegende RNA Menge beurteilt werden. In dieser Arbeit wird das Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green qRT-PCR Master Mix Kit (Agilent) verwendet. Hierbei handelt es sich um ein *one step* Kit, bei dem die reverse Transkription der mRNA und die Amplifikation der cDNA mittels PCR in einem Schritt erfolgt. Reaktionen werden nach Herstellerangaben in einem Volumen von 10 μ l angesetzt. Üblicherweise beträgt die Konzentration der eingesetzten RNA 20 ng/ μ l. Bei abundanten RNA Spezies wird eine 0,2 ng/ μ l Verdünnung verwendet. Die relative Expression der Zielgene, normalisiert auf ein unverändertes Referenzgen (*rpoZ* bei 2 ng/ μ l; 16S rRNA [RSP_4392] bei 0,2 ng/ μ l) erfolgt mit Hilfe des effizienzkorrigierten Quantifizierungsmodells nach Pfaffl (Pfaffl, 2001). Im Falle des unkonventionellen Vergleiches mehrerer Primerpaare, statt RNA Proben, untereinander wurde mit idealen primer Effizienzen von 2,0 und Nennern von 1 gearbeitet. Nach Umformung ergibt sich aus Pfaffl somit die Formel: $\text{Ratio} = 2^{\Delta Cq(16S - A)}$. Hierbei ist A Cq von Primerpaar pUpsM, pUpsM_marZ or pmraZ.

real time qRT-PCR 5 μ l 2x SYBR Green qRT-PCR master mix; 0,5 μ l sense Primer (10 μ M),
Reaktionsansatz 0,5 μ l *antisense* Primer (10 μ M), 0,1 μ l DTT (100 mM), 0,5 μ l RT/RNase
block, ad 10 μ l ddH₂O

2.5.9 Transkriptomanalyse (Microarray-Analyse)

Während dieser Arbeit werden verschiedene, vergleichende Transkriptomstudien via Microarray Analyse von *R. sphaeroides* Stämmen angefertigt. Hierbei werden individuell angefertigte Chips der Firma Agilent verwendet. Jeder Chip enthält mindestens 3 *antisense* Oligosonden pro Gen von je 60 Nukleotiden Länge. Sonden werden hierbei so gewählt (*GE probe design*), dass sie sich innerhalb der Gensequenzen nicht überlappen (*best distribution methodology*). Bei den Genen handelt es sich,

basierend auf dem über das Joint Genome Institute veröffentlicht Genom (NCBI project ID: 56), um 4304 proteinkodierende und 79 tRNAs/rRNAs. Zusätzlich sind Sonden gegen 144 ncRNAs, bekannt durch Hfq *pull-down* Experimente und 454 *pyrosequencing* (Berghoff *et al.*, 2009; Berghoff *et al.*, 2011), vorhanden. Freie Bereiche der 15744 Oligos fassenden Glaträger werden mit Kontrollsonden der Firma Agilent (insgesamt 536) und statistisch auf das Genom verteilten Sonden aufgefüllt. Um belastbare Daten zu generieren, wird in dieser Arbeit immer ein Array Duplikat mit unabhängigen RNA Pools hybridisiert, wobei jeder RNA Pool wiederum Gesamt-RNA der beiden, zu vergleichenden, Stämme in biologischen Triplikaten enthält. Es müssen also zunächst 12 Proben DNase I verdaute Gesamt-RNA bzw. 6 Proben je Stamm isoliert werden (2.3.3). Zum Entfernen der DNase aus den Proben werden diese mit dem RNeasy MiniElute Cleanup Kit weitgehend nach Herstellerangaben (Qiagen) gereinigt. Um hierbei keine RNAs unter einer Größe von 100 nt abzureichern, wird das 1,5 fache Volumen 96 % Ethanol zu RNA Lösung und RLT-Puffer gegeben. Anschließend ist nach Messung der RNA Konzentration (2.3.11) eine Qualitätskontrolle der RNA mittels TBE/PAA/Urea Gel (2.4.4) zu empfehlen. Die Markierung der jeweiligen RNA eines Stammes erfolgt mit Cy3 (Mutante) oder Cy5 (Wildtyp) mit Hilfe des ULS™ Labeling Kit for Agilent arrays (Kreatech), welches den Fluoreszenzfarbstoff in einer chemischen Reaktion an das N7 von Guaninen koppelt. In der Labeling Reaktion werden 2 µg RNA je Array und Stamm aus einem Pool eingesetzt, der ein biologisches Triplikate enthält. Cy3 und Cy5 gehören zu der Stoffgruppe der Cyanide. Cy3 absorbiert Licht bei etwa 550 nm und emittiert grün-gelb Fluoreszenz bei etwa 570 nm. Cy5 absorbiert Licht einer Wellenlänge von etwa 650 nm und emittiert rot bei etwa 670 nm. Die Reinigung der markierten RNA von nicht gebundenem Farbstoff wird nach den Angaben des Herstellers mittels KREApure Säulchen (Kreatech) durchgeführt. Für die spätere Hybridisierung des *arrays* ist nicht nur RNA Menge sondern auch die Markierungseffizienz ausschlaggebend. Deshalb werden sowohl RNA Konzentration, als auch Cy3 und Cy5 Signale photometrisch am NanoDrop überprüft. Die hieraus berechnete Markierungseffizienz sollte für die weitere Verwendung zwischen 2 und 3,6 % liegen. Im Folgenden wird die RNA in 50 bis 200 Nukleotid lange Stücke fragmentiert, um eine höhere Hybridisierungseffizienz an die Sonden des Arrays zu gewährleisten. Hierbei wird auch zum ersten Mal je 500 ng RNA aus Cy3 und Cy5 markierten Pools miteinander vermischt. Fragmentierungen erfolgen für genau 30 min bei genau 65°C nach Angaben des Herstellers (Two-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis, Agilent). Anschließend werden 25 µl Hybridisierungsbuffer zugegeben. 40 µl der resultierenden Ansätze werden in eines der acht Kompartimente eines *casket slides* luftbasenfrei und mittig überführt. Auf den *slide* wird dann der Glaträger mit den chips mit der aktiven Seite nach unten ebenfalls luftblasenfrei aufgelegt. Beides wird in einen Schlitten eingespannt und die Arrays werden 17 Stunden bei 65°C in einem von Agilent vorgesehenen Ofen hybridisiert. Nach der Hybridisierung müssen die *arrays* von ungebundener RNA freigewaschen werden. Hierzu wird der Hybridisierungsschlitten geöffnet, die aufeinander liegenden Glaträger werden in eine Gasschale mit 400 ml Waschlösung I und Magnetrührer überführt und dort voneinander gelöst. Der *casket slide* wird entfernt, während der Glaträger mit den chips für 1 min im Puffer inkubiert wird. Anschließend wird der Glaträger ein weiteres Mal in Puffer II gewaschen. Der *chip*-Glaträger sollte nach Abtropfen der Waschlösung, aufgrund der Sauerstoffempfindlichkeit der Farbstoffe, zügig in einem zugehörigen Agilent DNAmicroarray Scanner (3 µm Auflösung) ausgelesen werden. Resultierende Aufnahmen des *chips* im .tif-Format werden anhand der Feature Extraction Software (Agilent) im Hinblick auf Fluoreszenzwerte einzelner Sonden ausgewertet. Entsprechende Zahlenwerte werden im .txt-Format ausgegeben. Im Zuge der finalen Microarray Auswertung bzw. Normalisierung wird eine Multiarray Analyse mit dem Bio-conductor package Limma für R durchgeführt. Programmierte Normalisierungsschritte sind genauer im Ergebnisteil erklärt.

Markierungsreaktion	2 µg RNA; 2 µl Cy3 bzw. Cy5; 2 µl Labelling buffer (10x); ddH ₂ O <i>ad</i> 20 µ
Fragmentierungsreaktion	500 ng Cy3-RNA; 500 ng Cy5-RNA; 5 µl Blocking Agent; 1 µl Fragmentierungspuffer (25x); ddH ₂ O <i>ad</i> 25 µl

$$\text{Markierungseffizienz (\%)} = \frac{340 \times (\text{cy3 bzw. cy5})}{\text{ng RNA} \times 1000} \times 100$$

2.6 Proteinbiochemische Methoden

2.6.1 Proteinmengenbestimmung

Um Proteinkonzentrationen von Zelllysaten oder Konzentrationen von aufgereinigtem Protein zu bestimmen, kann der Bradford-Test (Bradford, 1976) angewendet werden. Hierbei interagiert der eingesetzte Farbstoff mit den aromatischen Aminosäureresten der Proteine, was eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 470 nm zu 595 nm verursacht. Diese Verschiebung kann photometrisch gemessen werden. Konzentrationsbestimmungen werden mit Roti®-Nanoquant Reagenz nach Herstellerangaben durchgeführt. Als Referenzprotein für die zu erstellende Eichgerade wird BSA (*bovine serum albumin*, Serva) eingesetzt. Alternativ wird die Proteinkonzentration von aufgereinigten Proteinen mittels einer auf dem gleichen Gel aufgetragenen BSA Verdünnungsreihe abgeschätzt.

2.6.2 Nachweis von Proteinen durch Silberfärbung

Die bräunliche Silberfärbung von Proteinen in einem Gel, die auf der Reduktion von Silberionen durch Formaldehyd basiert, ist eine sehr sensitive Nachweismethode, bei der bis zu 1 ng eines Proteins sichtbar angefärbt werden kann. Hierzu wird das Gel mindestens eine Stunde in Fixierlösung geschwenkt. Dann wird die Lösung abgegossen und das Gel dreimal 20 Minuten mit 50 % Ethanol gewaschen. Gleichzeitig werden Lösung 1, 2 und 3 hergestellt. Nach Ablauf der 20 Minuten wird das 50 %ige Ethanol verworfen und das Gel 1 min in Lösung 1 geschwenkt. Das Gel wird hiernach dreimal 20 Sekunden mit ddH₂O gewaschen. Anschließend erfolgt eine 20 minütige Inkubation unter Schütteln in Lösung 2. Bevor mit Lösung 3 bis zur gewünschten Bandenstärke entwickelt werden kann, wird Lösung 2 verworfen und erneut 3 Mal mit ddH₂O gewaschen. Die Reaktion wird durch direkte Zugabe eines Schusses Essigsäure gestoppt.

Fixierlösung	12 % Essigsäure (v/v); 50 % Methanol (v/v); 0,05 % Formaldehyd (v/v)
Lösung 1	0,1 g Na ₂ S ₂ O ₃ × 5H ₂ O (Merck); ddH ₂ O <i>ad</i> 500 ml
Lösung 2	0,4 g AgNO ₃ ; 188 µl Formaldehyd; ddH ₂ O <i>ad</i> 250 ml
Lösung 3	15 g Na ₂ CO ₃ (Merck); 125 µl Formaldehyd; 5 ml Lösung 1; ddH ₂ O <i>ad</i> 250 ml

2.6.3 Nachweis von Proteinen durch Coomassiefärbung

Die Coomassiefärbung, bei der ein Triphenylmethanfarbstoff zugegeben wird, der sich im sauren Milieu an basische Reste von Aminosäuren anlagert, ist weniger sensitiv als die Silberfärbung, jedoch sind die angefärbten Proteine besser für eine Massenspektromie oder für die Herstellung von Antikörpern nutzbar. Das Gel wird hierbei für eine Stunde, auch zum Fixieren, in Färbelösung und dann mehrfach in Entfärbelösung inkubiert.

Färbelösung	0,1 % Coomassie R-250 (w/v); 10 % Essigsäure (v/v); 50 % Methanol (v/v)
Entfärbelösung	10 % Essigsäure (v/v)

2.6.4 Western Blot Analyse

Mittels *Western Blot* können geringe Mengen Protein in einem Proteingemisch immunologisch nachgewiesen werden. Hierzu werden die Proteinproben zuerst per SDS-PAGE (2.4.7) elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend erfolgt durch den Elektroblot bzw. *semidry-blot* der Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran durch ein Spannungsfeld. Hierzu werden beim *semidry Blot* zuerst 6 Whatman Papiere und eine Nitrozellulosemembran auf Gelgröße zugeschnitten und in Transferpuffer getränkt. Drei der Whatman Papiere werden dann aufeinandergestapelt auf die Anodenplatte des ElektroBlotter (*PerfectBlue™ Semi-dry*, peqlab) gelegt. Hierauf werden zuerst die Membran, dann das Sammelgel der SDS-PAGE und zuletzt drei weitere Whatman Papiere luftblasenfrei abgelegt. Anschließend wird die Kathodenplatte auf der Anodenplatte befestigt. Der Proteintransfer erfolgt 1 bis 1,5 Stunden bei 1 mA / cm² Membranfläche. Die Fixierung erfolgt, indem die Membran in 50 ml Ponceau S Lösung (Sigma-Aldrich) ca. 10 Minuten inkubiert wird. Hierbei werden Proteinbanden in rot sichtbar und können als Ladekontrolle dokumentiert werden. Anschließend wird Ponceau S verworfen, die Membran mit ddH₂O gewaschen und durch Zugabe geringer Mengen NaOH-Lösung entfärbt. Die Absättigung, welche unspezifische Bindungen bei einem immunologischen Nachweis verhindern soll, erfolgt unmittelbar darauf durch Inkubation in 200 ml Blocklösung bei 4°C für mindestens 1 Stunde. Zuletzt wird die Blocklösung durch Waschen in TBS Puffer entfernt. Zum immunologischen Nachweis wird ein Antikörper hybridisiert, der spezifisch für ein Antigen auf dem nachzuweisenden Protein ist. Entweder ist dieser primäre Antikörper mit einem Enzym konjugiert, welches bei Zugabe dessen Substrates durch Chemolumineszenz dunkle Banden auf einem Röntgenfilm verursacht, oder es wird zusätzlich ein sekundärer Antikörper hinzugegeben, welcher an den Primären bindet und mit einem solchen Enzym konjugiert ist. In dieser Arbeit werden nur monoclonale Peroxidase-gekoppelte α -hexa-His Antikörper (Sigma-Aldrich) oder α -tri-FLAG Antikörper (Sigma-Aldrich) verwendet. 1 μ l dieser Antikörper wird hierbei 1:10.000 in TBS Puffer verdünnt mit der Membran 1-2 Stunden inkubiert und im Anschluss verworfen. Ungebundener Antikörper wird dann in mehreren Waschschritten mit TBS Puffer entfernt. Anschließend wird die Membran zurück in einer Glasschüssel mit einem Gemisch aus 700 μ l Luminol *enhancer* (Roche) und 700 μ l Luminol Peroxidasesubstrat (Roche) vollständig benetzt. Die Membran wird nun in Folie eingeschlagen und unter Lichtausschluss auf einen Röntgenfilm gelegt. Nach gewünschter Belichtungszeit wird der Röntgenfilm in Entwickler- und anschließend in Fixierlösung geschwenkt. Das gesuchte Protein ist letztendlich über, durch Chemilumineszenz verursachte, dunkle Banden zu detektieren.

Transferpuffer	25 mM Tris (pH 7,9); 192 mM Glycin; 20 % (v/v) Methanol (frisch zugegeben)
TBS	10 mM Tris (pH 7,5); 150 mM NaCl
Blocklösung	5 % Milchpulver (w/v) in TBS

2.6.5 Aufreinigung rekombinanter Proteine mittels Nickel-Affinitätschromatographie

Mittels Affinitätschromatographie lassen sich Proteine aufgrund ihrer Wechselwirkung mit einem Liganden, welcher an eine chromatographische Matrix gebunden ist, aus einem Proteingemisch heraus isolieren. Ein Beispiel hierfür sind Proteine mit *His-tag*, also mit sechs aufeinanderfolgenden Histidinresten am N- oder C-Terminus. Der *His-tag* weist eine negative Ladung auf und bindet deshalb an seinen Liganden, welcher in diesem Fall das Ni²⁺-Ion ist. Die Bindung kann, nachdem

ungebundene Proteine von der Matrix bzw. Ni-NTA-Säule gewaschen wurden, bei der Elution durch einen sauren pH-Wert, Metallionenkomplexbildner (z.B. EDTA) oder Imidazol aufgehoben werden. Im Falle von Proteinen mit FLAG-*tag* handelt es sich bei dem Liganden beispielweise um den α -FLAG M2 (monoclonal, Maus) Antikörper, welche covalent an Agarose-*beads* gebunden sind.

Generell kann zur Aufreinigung eines Proteins mit *hexa*-His-*tag* das Zellpellet einer *E. coli* Kultur, nach rekombinanter Proteinexpression (2.2.9) in geeignetem Lysepuffer, einem Zellaufschluss unterzogen werden. Dieser erfolgt mit Hilfe des Ultraschallgerätes Sonopuls GM 70 in Intervallen von 3-6x30 Sekunden bei 70 % (*Power*: 70 %, *Cycle*: 70 %). Dann wird ein zellfreies Lysat durch Zentrifugation hergestellt (1 h, 13.000 rpm, 4°C). Die anschließende Nickel-Affinitätschromatographie kann dann gemäß der Herstellerangaben (The QIAexpressionist, Juni 2003, Qiagen) durchgeführt werden. Im Falle der Aufreinigung von RNaseE529-hexa-His ist aus Aktivitätsgründen ein Aufschluss mittels Druck in der *french press* zu empfehlen. Des Weiteren wird eine, für das Protein optimierte, Aufreinigung durchgeführt (Callaghan *et al.*, 2003). Hierbei eluiert RNaseE529-hexa-His ab einer Imidazolkonzentration von 125 mM.

2.6.6 Dialyse von Proteinlösungen

Für entsprechende Folgeanwendungen ist es häufig nötig die Pufferbedingungen von aufgereinigten Proteinen zu verändern. So sind beispielsweise hohe Imidazolkonzentrationen nach der Elution von Ni-NTA-Säulen ungeeignet für anschließende Experimente. Eine Möglichkeit zum Pufferaustausch ist die Dialyse. Dies wird in dieser Arbeit mit aufgereinigter RNaseE529-hexa-His durchgeführt, um die katalytische Aktivität des Proteins zu begünstigen. Hierbei wird das aufgereinigte Protein in einen Dialyseschlauch mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa überführt und im 100-fachen Volumen Rne-Puffer über Nacht bei 4°C inkubiert. Am Folgetag wird ein weiterer Pufferaustausch für 4 h vorgenommen. Zuletzt wird die Proteinkonzentration und Reinheit überprüft und die umgepufferte Proteinlösung in geeigneten Aliquots bei -80°C eingefroren.

Rne-Puffer 20 mM Tris (pH 7,9); 500 mM NaCl; 10 mM MgCl₂; 0,5 mM EDTA; 10 mM DTT;
 5% Glycerin (v/v)

2.6.7 *pulldown* von Proteinen mit biotinylierter RNA

Bei diesem Experiment macht man sich einer der stärksten bekannten nichtkovalenten Bindungen in der Biologie von Biotin an Streptavidin, einem ursprünglich aus dem Bakterium *Streptomyces avidinii* bekannten Protein, zu Nutzen. Zunächst muss das Streptavidin Agarose Granulat (Thermo Scientific) vor der Verwendung geblockt werden, um unspezifische Bindungen zu minimieren. Hierzu wird die gewünschte Menge sedimentiert (2500 g; 2 min; 4°C), zweimal in gekühltem Waschpuffer gewaschen und im Anschluss über Nacht bei 4°C in 1 ml Blocklösung unter kontinuierlicher Rotation inkubiert. Am Folgetag wird je *pulldown* ein Volumen, das 20 μ l Granulat entspricht, entnommen und in einem neuen Reaktionsgefäß, wie bereits beschrieben, in 1 ml Waschpuffer gewaschen. Das verbleibende Streptavidin Agarose Granulat wird zur Bindung dann in 200 μ l Waschpuffer mit 2 μ l Ribolock und mindestens 40 pmol biotinylierter RNA für zwei Stunden bei 4°C unter Rotation inkubiert. Im Anschluss wird erneut zweimal mit gekühltem Puffer gewaschen, um ungebundene Transkripte zu verwerfen. Parallel zur Bindereaktion sollte das zellfreie Lysat hergestellt werden. Hierzu werden 400 ml *Rhodobacter sphaeroides* Kultur mit einer OD₆₆₀ von 0,6 bei 4°C pelletiert. Das Zellpellet wird zum Zellaufschluss in 4 ml kaltem Waschpuffer in ein 12 ml Greiner Reaktionsgefäß überführt bzw. gewaschen. Im Anschluss werden die Zellen in 3,6 ml Waschpuffer mit 1,8 μ l Ribolock (Thermo Scientific) und 1,8 μ l PMSF (100 mM) sonifiziert. Nach einer einstündigen Zentrifugation bei

3 Ergebnisse

Vorangehende Arbeiten zu dieser Arbeit beschäftigten sich bereits eingehend mit der Regulation der Stressantwort von *Rhodobacter sphaeroides* auf Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) (reviewed in (Dufour *et al.*, 2008; Glaeser *et al.*, 2011)). Der Fokus lag zunächst auf der transkriptionellen Genregulation, die hauptsächlich durch alternative Sigmafaktoren vermittelt wird. Um die Stressantwort jedoch vollständig zu verstehen, ist es wichtig, auch die posttranskriptionelle Genregulation zu untersuchen, die beispielweise durch sRNAs vermittelt wird. Zu diesem Zwecke wurden sRNAs mittels Transkriptomanalyse bzw. differenzieller RNA Sequenzierung (dRNASeq) identifiziert, die eine veränderte Abundanz oder Prozessierung in Gegenwart von $^1\text{O}_2$ aufweisen (Berghoff *et al.*, 2009). Ersteres gilt beispielweise für die sRNA SorY (RSs_1543) und letzteres trifft auf die sRNA UpsM (RSs_0682) zu. Vor Beginn dieser Arbeit wurden beide sRNAs bereits als Hfq bindend identifiziert, weil sie mittels Hfq-FLAG co-immunopräzipitiert werden konnten (Berghoff *et al.*, 2011). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Expression von SorY abhängig von den alternativen Sigmafaktoren RpoHI/II ist (Nuss *et al.*, 2010). In den folgenden Abschnitten werden beide sRNAs genauer charakterisiert.

3.1 SorY ($^1\text{O}_2$ resistance RNA Y)

Die Charakterisierung der sRNA SorY erfolgte in enger Zusammenarbeit mit Dr. Fazal Adnan und führte im Jahre 2015 zu einer gemeinsamen Publikation (Adnan *et al.*, 2015). Alle Experimente, die auf diesem Projekt durchgeführt wurden, sind im Detail der Veröffentlichung zu entnehmen. In dieser Arbeit sind nur solche Ergebnisse ausführlich gezeigt, die ausschließlich von mir alleine generiert wurden. Bei allen anderen, in der Publikation gezeigten, Ergebnissen entfielen Teile der experimentelle Planung, Datenauswertung und Darstellung auf mich.

3.1.1 Das Expressionsmuster von SorY

Bei SorY handelt es sich um eine typische Hfq abhängige sRNA, die in *trans* bzw. in der intergenischen Region zwischen RSP_2950 und *purL* (RSP_2951) auf dem Plusstrang von Chromosom 1 transkribiert wird. Abbildung 6A zeigt die mit *RNAfold* (Gruber *et al.*, 2008) vorhergesagte Sekundärstruktur der 83 nt langen sRNA dargestellt mit *VARNA* (Darty *et al.*, 2009; Berghoff *et al.*, 2009). Stromaufwärts des Lokus ist die Konsensussequenz TTG-N19-CTAAAT eines typischen RpoHI/II abhängigen Promotors zu finden (Nuss *et al.*, 2010). Die transkriptionelle Abhängigkeit von gerade diesen alternativen Sigmafaktoren konnte bereits zuvor mittels Northern Blot gezeigt werden (Nuss *et al.*, 2010). Die Termination der Transkription erfolgt durch einen mit TransTermHP (Kingsford *et al.*, 2007) vorhergesagten Rho unabhängigen Terminator (Abbildung 6B) und das 3'Ende der sRNA endet mit einem poly(U)-Schwanz. Aufgrund des RpoHI/II

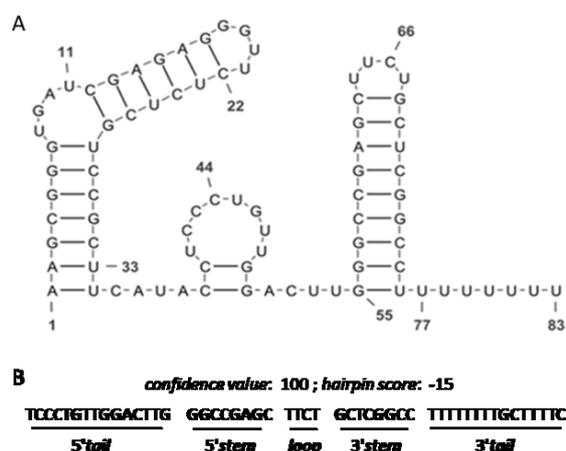


Abbildung 6: (A) Vorhergesagte Sekundärstruktur von SorY (83nt). Die Vorhersage wurde mit *RNAfold* gemacht und mittels *VARNA* dargestellt. (B) Rho unabhängiger Terminator von SorY. Die entsprechende Vorhersage wurde mit dem *webtool TransTermHP* durchgeführt.

abhängigen Promotors ist zu erwarten, dass der Genlokus unter verschiedensten Stressbedingungen eine induzierte Expression aufweist. Zur Bestätigung dieser Erwartung wurden Northern Blots durchgeführt. Hierzu wurden *R. sphaeroides* 2.4.1 Wildtyp Kulturen auf eine OD₆₆₀ von 0,2 verdünnt, mit 0,2 µM MB (Methylenblau) versetzt und nach aerobem Wachstum ab einer OD₆₆₀ von 0,4 800 Wm⁻² Weißlicht ausgesetzt, um ¹O₂-Stress zu erzeugen. Des Weiteren wurden Kulturen ohne Belichtung bei Erreichen von OD₆₆₀ 0,4 mit 300 µM tBOOH (tert-Butylhydroperoxid), 1 mM H₂O₂ und 250 µM Paraquat (erzeugt Superoxid, O₂⁻) versetzt, um die Induktion von SorY in Gegenwart anderer reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) zu überprüfen. Probenentnahmen zur Isolierung von Gesamt-RNA mittels *Hot-Phenol* Methode erfolgten vor Belichtung bzw. Reagenzienzugabe (t₀) und 10 min danach (t₁₀). Um SorY zu detektieren, wurden 10 µg Gesamt-RNA je Probe für die Northern Blot Analyse verwendet. Durch *end-labeling* radioaktiv markierte DNA Oligosonden wurden dazu verwendet, SorY und die 5S rRNA als interne Ladekontrolle mittels *phosphoimaging* zu detektieren. Das resultierende Ergebnis ist in Abbildung 7 zu sehen. Der FC (*fold change*) von SorY zeigt die Veränderung der Transkriptmenge nach Quantifizierung der Signale mit der Software *Quantity One* und Normalisierung anhand der Ladekontrolle. Die Quantifizierung zeigt deutlich, dass SorY tatsächlich unter verschiedenen Stressbedingungen durch ROS induziert wird, jedoch bewegt sich diese Induktion in einem schwachen Bereich in Gegenwart von O₂⁻ (x1,3) und in einem mittleren Bereich für H₂O₂ und tBOOH (x1,7 bzw. x1,9). Am stärksten wird die Expression von SorY in der Gegenwart von ¹O₂ induziert. Hier ist nach 10 min die 3,5 fache Transkriptmenge zu sehen.

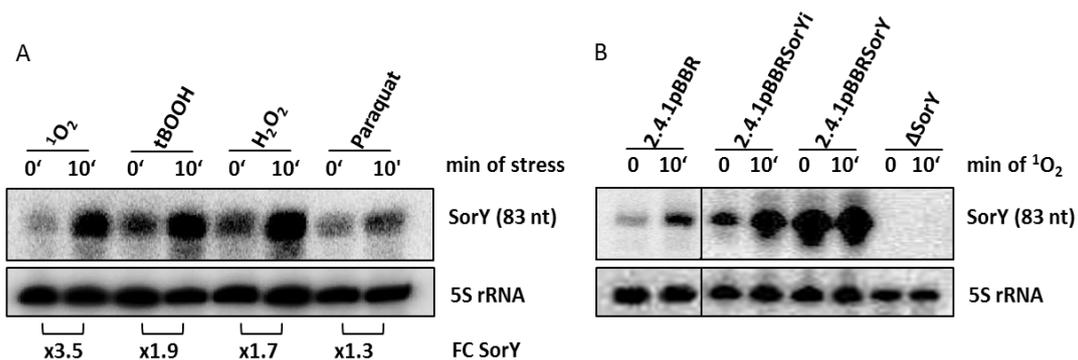


Abbildung 7: Northern blots zur Detektion von SorY im Vergleich zur 5S rRNA Ladekontrolle. (A) Induktion von SorY unter verschiedenen Stressbedingungen in *R. sphaeroides*. Der FC (*fold change*) von SorY zeigt die Veränderung der Transkriptmenge nach Quantifizierung der Signale mit der Software *Quantity One* und Normalisierung anhand der Ladekontrolle. Nach Entnahme der t₀ Proben wurden folgende Reagenzien in den angegebenen Endkonzentrationen zu aerob gewachsenen Kulturen gegeben, bevor 10 min nach Zugabe (t₁₀) eine weitere Probe entnommen wurde: 0,2 µM MB in der Anwesenheit von 800 Wm⁻² Weißlicht, 300 µM tBOOH, 1 mM H₂O₂ und 250 µM Paraquat. (B) Veränderte Transkriptmengen von SorY vor und nach ¹O₂-Stress in *R. sphaeroides* mit Leervektorkontrolle (2.4.1pBBR), mit induzierbarer ektopischer Überexpression von SorY (2.4.1pBBRSorYi), mit konstitutiver ektopischer Überexpression von SorY (2.4.1pBBRSorY) und in der Deletionsmutante (2.4.1ΔSorY).

Der Northern Blot in Abbildung 7B zeigt die SorY Expression verschiedener *R. sphaeroides* 2.4.1 a Stämme vor und nach ¹O₂-Stress, die im Verlauf dieses Projektes generiert wurden. Hierbei handelt es sich um einen Stamm mit Leervektorkontrolle (2.4.1pBBR), mit induzierbarer ektopischer Überexpression von SorY (2.4.1pBBRSorYi), mit konstitutiver ektopischer Überexpression von SorY (2.4.1pBBRSorY) und mit einer Deletion von SorY (2.4.1ΔSorY). Alle Überexpressionsplasmide basieren auf dem Vektor pBBR1MCS2, wobei eine konstitutive Expression durch Verwendung eines starken 16S rRNA (RSP_4352) Promotors gewährleistet wird. Induzierbar wird die Expression durch Verwendung des nativen RpoHI/II Promotors. Alle Einzelheiten zur Konstruktion der Plasmide oder der Deletionsmutante sind bereits publiziert (Adnan *et al.*, 2015). Der Northern Blot zeigt, dass der Kontrollstamm das gleiche Expressionsmuster wie der Wildtyp Stamm in Abbildungsteil A aufweist.

Die induzierbare Überexpression zeigt schon zum Zeitpunkt t_0 (vor Stress) ein erhöhtes SorY Level, was daran liegt, dass es sich hier nicht um einen *single*-aber *multi-copy* Plasmid handelt und der Promotor eine gewisse Grundaktivität aufweist. Wie zu erwarten, ist die konstitutive Überexpression schon ohne Induktion durch $^1\text{O}_2$ -Stress sehr stark. Hier ist nur ein geringer Unterschied beim Transkriptlevel im Vergleich zum Zeitpunkt t_{10} (nach Stress) zu erkennen, da die Induktion am chromosomalen Locus kaum ins Gewicht fällt.

Um die sRNA weiter zu charakterisieren, wurde deren Stabilität überprüft, weil nicht nur die Expression von Transkripten sondern auch deren Stabilität darüber entscheidet, wie lange und in welcher Menge sie in der Zelle vorliegen. Hierzu wurden *R. sphaeroides* 2.4.1 Kulturen 10 Minuten aerob unter $^1\text{O}_2$ -Stress inkubiert. Nach Entnahme der t_0 Probe wurde die Transkription durch Zugabe von Rifampicin gestoppt. Weitere Probenentnahmen erfolgten nach definierten Zeiträumen. Die Isolierung von Gesamt-RNA erfolgte durch die *Hot-Phenol* Methode. Die Detektion der Transkripte mittels Northern Blots wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Signale der 5S rRNA dienten als interne Ladekontrolle. Das Ergebnis ist in Abbildung 8 dargestellt. Es zeigt sich, dass SorY ein extrem stabiles Transkript ist und selbst 120 Minuten nach Rifampicin Zugabe in fast unveränderter Menge vorliegt. Eine Halbwertszeit für SorY ist nach Normalisierung anhand der Signale der 5S rRNA nicht zu ermitteln, weil Signale der 5S rRNA schneller abnehmen, als die von SorY. Zur Kontrolle der experimentellen Durchführung wurde auch die sRNA UpsM besondert, für die eine typische Abnahme des Signals in Proben nach Transkriptionsstop vorliegt.

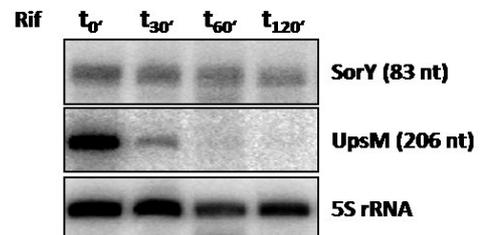


Abbildung 8: Visualisierung der SorY Stabilität mittels Northern blot. Detektion von SorY und der Positivkontrolle UpsM (206 nt) in 15 µg Gesamt-RNA aufgetrennt auf einem 10%igen TBE/PAA/UREA-Gel. Signale der 5S rRNA dienen als interne Ladekontrolle. Die Transkription wurde durch Zugabe von Rifampicin bei Zeitpunkt t_0 bzw. nach 10 min $^1\text{O}_2$ -Stress gestoppt. Weiter Probenentnahmen erfolgten zu den angegebenen Zeitpunkten.

3.1.2 Ziel-mRNA Suche für SorY mittels Transkriptomstudie & Bindevorhersage

Die Funktion kanonischer in *trans* kodierter sRNAs wie SorY ist in der Regel die Regulation einer oder mehrerer Ziel-mRNAs durch Basenpaarung. Hierbei wird meist die Stabilität oder die Translationsrate dieser Ziel-mRNAs beeinflusst, wobei eine Änderung der Translationsrate auch Auswirkungen auf die Stabilität einer mRNA hat. Um eine solche Ziel-mRNA von SorY zu identifizieren, wurde zunächst eine vergleichende Transkriptomstudie via Microarray Analyse durchgeführt. Hierbei wurden die *R. sphaeroides* Stämme 2.4.1pBBR (Leervektorkontrolle; Cy5) und 2.4.1pBBRSorYi (induzierbare Überexpression; Cy3) nach 10 min $^1\text{O}_2$ -Stress miteinander verglichen. Dies bietet sich an, weil aufgrund des Expressionsprofils von SorY unter dieser Bedingung eine Funktion zu erwarten ist. Außerdem bietet die Verwendung einer induzierbaren Überexpression die Möglichkeit einer Pulsexpression, was sekundäre Regulationseffekte minimieren sollte. Um belastbare Daten zu generieren, wurde in dieser Arbeit immer ein Array Duplikat mit unabhängigen RNA Pools hybridisiert, wobei jeder RNA Pool wiederum Gesamt-RNA der beiden zu vergleichenden Stämme in biologischen Triplikaten enthält. Das heißt, es müssen wie in den Methoden beschrieben, zunächst 12 Proben DNase I verdauete Gesamt-RNA bzw. 6 Proben je Stamm isoliert werden. Im Anschluss erfolgen verschiedene Kontrollen. Zum einen wird das Expressionslevel von SorY in den Proben mittels Northern Blot, wie bereits beschrieben, detektiert, um die experimentelle Durchführung zu überprüfen. Wie erwartet ist hier nach 10 min $^1\text{O}_2$ -Stress eine geringere SorY Menge in der

Leervektorkontrolle als im Überexpressionsstamm zu erkennen (Abbildung 9A). Zum anderen wird die RNA Integrität überprüft, indem 1 μg Gesamt-RNA auf einem 10 %igen TBE/PAA/UREA-Gel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt wird. Hierbei ist die RNA Integrität anhand der Banden der großen ribosomalen RNA Spezies (14S rRNA und 16S rRNA) zu erkennen, da diese bei Proben mit geringer Qualität schneller Degradationen aufweisen als die kleinen ribosomalen RNA Spezies. Anhand der klaren Banden für 14S und 16S rRNA (Abbildung 9B) ist die RNA Qualität hier als gut zu bewerten.

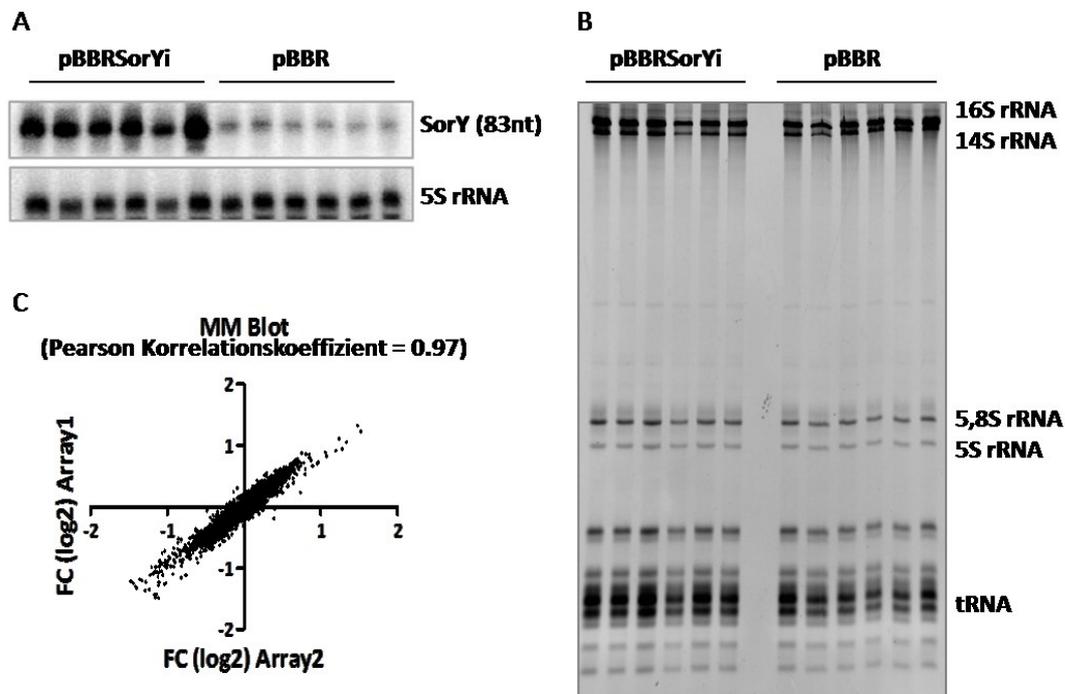


Abbildung 9: Qualitätskontrollen zur vergleichenden Transkriptomstudie 2.4.1pBBR vs. 2.4.1pBBRSorYi. (A) Northern blots zur Detektion von SorY nach 10 min $^1\text{O}_2$ -Stress im Vergleich zur 5S rRNA Ladekontrolle in je 6 biologisch unabhängigen Kulturen beider Stämme. (B) 1 μg Gesamt-RNA je Probe aufgetrennt auf einem 10 %igem TBE/PAA/UREA-Gel und gefärbt mit Ethidiumbromid zur Beurteilung der RNA Integrität. (C) Korrelation zwischen den Microarrays des Duplikates nach Normalisierung dargestellt als MM Blot und berechnet als Pearson Korrelationskoeffizient. Jeder Punkt im Graph entspricht einer Sonde bzw. resultiert aus den logarithmierten Verhältnissen [FC (log2)] von Cy3 zu Cy5 in Array1 (y-Achse) und Array2 (x-Achse).

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Transkriptomanalysen handelt es sich um *two-colour* (Cy3 und Cy5) Microarrays, wobei individuell angefertigte Chips der Firma Agilent verwendet wurden. Jeder *chip* enthält mindestens 3 *antisense* Oligosonden pro Gen von je 60 Nukleotiden Länge mit der Ausnahme von nur 1 bis 3 *antisense* Oligosonden für einige sehr kleine Transkripte bzw. sRNAs. Die Sonden wurden hierbei so gewählt (*GE probe design*), dass sie sich innerhalb der Gensequenzen nicht überlappen (*best distribution methodology*). Genauere Spezifikationen, beispielsweise bezüglich der Anzahl der Sonden und Details zur experimentellen Durchführung der Transkriptomanalyse sind dem Methodenteil dieser Arbeit zu entnehmen.

Die aus dem Experiment resultierenden Aufnahmen der *chips* im .tif-Format wurden anhand der Feature Extraction Software (Agilent) im Hinblick auf Fluoreszenzwerte einzelner Sonden ausgewertet. Entsprechende Zahlenwerte wurden im .txt-Format ausgegeben und stellen Rohdaten dar, die zunächst normalisiert werden müssen. Im Zuge der Normalisierung wurde eine Multiarray Analyse mit dem Bio-conductor package Limma für R durchgeführt (GK., 2005). Hierbei werden zuerst MA-Plots vor LOWESS-Normalisierung zu den Arrays erstellt (Abbildung 10 linke Seite), wobei der M-Wert das logarithmierte Verhältnis der Intensitäten von Cy3 und Cy5 und der A-Wert der

Mittelwert aus der logarithmierten Summe der Intensitäten von Cy3 und Cy5 für jede Sonde ist (siehe Formeln).

$$M = \log_2 \left(\frac{Cy5}{Cy3} \right) \quad A = 0,5 (\log_2 Cy5 + \log_2 Cy3)$$

Im nächsten Normalisierungsschritt wurden technische Fehler minimiert, die beispielsweise auf unterschiedliche *labeling* Effizienzen, Unterschiede bei der Hybridisierung oder Scanartefakte zurückzuführen sind. Dies geschah durch die Bereinigung der Hintergrundsignale (Ritchie *et al.*, 2007) und anschließend durch eine LOWESS (*locally weighted scatterplot smoothing*) *within* Normalisierung (Smyth & Speed, 2003). Auf der Basis der angeglichenen Fluoreszenzen wurden erneut, wie bereits beschrieben, MA-Plots erstellt (Abbildung 10 rechte Seite).

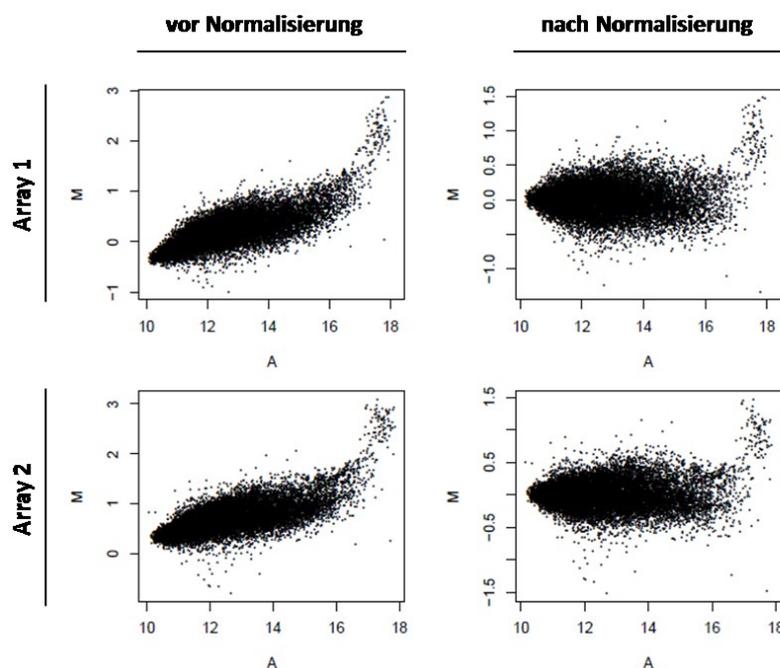


Abbildung 10: MA-Plots für das Arrayduplikat vor und nach Normalisierung. Normalisierung erfolgte wie ausführlich im Text beschrieben durch eine Bereinigung gegen den Hintergrund und anschließender Normalisierung nach LOWESS. Aufgetragen sind M-Wert (logarithmierte Verhältnis der Fluoreszenzen von Cy3 und Cy5) gegen A-Wert (Mittelwert aus der logarithmierten Summe der Fluoreszenzen von Cy3 und Cy5) für jede Sonde.

Ein M-Wert, oder allgemein gesprochen ein Regulationswert, von 0 entspricht keiner Veränderung der Fluoreszenzwerte zwischen Cy3 und Cy5 bzw. zwischen 2.4.1pBBRSorYi und 2.4.1pBBR. Dies ist für die meisten Gene zu erwarten. Das heißt, bei einer funktionierenden Normalisierung sollten die Datenpunkte im MA-Plot in einer horizontalen Wolke entlang der Nulllinie der Y-Achse liegen. Dieser Effekt ist eindeutig anhand der vorliegenden Plots zu erkennen (Abbildung 10). Vor Normalisierung zeigt Array 1 eine Verschiebung in den negativen und Array 2 eine Verschiebung in den positiven Wertebereich (linke Seite). Beide Verschiebungen sind nach Normalisierung bereinigt (rechte Seite). Des Weiteren ist zu beachten, dass die statistische Zuverlässigkeit der M-Werte auch von den A-Werten abhängig ist. Desto höher der A-Wert, also die Gesamt-Fluoreszenz an einer Sonde, desto höher ist die Signifikanz von M im Vergleich zur Hintergrundfluoreszenz.

Als weitere Qualitätskontrolle wurden die M-Werte der Replikate in einem MM-Plot gegeneinander Aufgetragen. Dieser Scatterplot (Abbildung 9C) spiegelt die Übereinstimmung beider Versuchsdurchläufe wider. Bei perfekten Replikaten sollte ein direkter, linearer Zusammenhang bestehen, wie er in Abbildung 9C zu erkennen ist. Dies lässt sich auch durch den Pearson

Korrelationskoeffizient als dimensionsloses Maß für den Grad des linearen Zusammenhangs zwischen zwei mindestens intervallskalierten Merkmalen ausdrücken. In diesem Fall beträgt der Koeffizient 0,97, wobei ein Wert von 1 oder -1 rechnerisch einem perfekten linearen Zusammenhang entsprechen würde.

Da, wie bereits beschrieben, M-Werte mit geringen A-Werten statistisch unzuverlässig sind, wurden bei der folgenden Datenaufbereitung zunächst Sonden herausgefiltert, deren A-Werte den Schwellenwert ≥ 12 nicht überschreiten, weil dieser Wert von unspezifischen Sonden auf den Arrays erreicht wurde. Verbleibende Sonden bzw. M-Werte wurden je Gen miteinander verrechnet und zwischen den Replikaten gemittelt. Auf diese Weise konnten zwischen beiden Stämmen logarithmierte Verhältnisse (FC (log2)) für 3976 der 4527 Gene ermittelt werden. Im Anschluss wurden Schwellenwerte für regulierte Gene eingeführt, wobei Gene mit logarithmiertem Verhältnis $> 0,6$ oder $< -0,6$ als reguliert betrachtet wurden. Hieraus resultieren 10 hoch- und 7 runter regulierte Gene, deren mRNAs potentiell durch SorY reguliert werden könnten (Tabelle 1). Um den Kreis dieser Ziel-mRNAs weiter einzuengen, wurden Interaktionen von SorY mit den 17 mRNAs bioinformatisch vorhergesagt. Hierzu wurde das *web tool* IntaRNA verwendet (Busch *et al.*, 2008). Mittels der Energie basierten Herangehensweise des Programms werden Binderegion von s- und mRNA und die zugehörige freie Energie bei Paarung der Transkripte berechnet. Vereinfacht gesagt wird dieser Wert ermittelt, indem die Energie, die zum Entfalten der Binderegion beider Moleküle benötigt wird, von der bei Basenpaarung frei werdenden Energie abgezogen wird. Das heißt desto negativer die freie Energie, desto wahrscheinlicher ist die Interaktion. Weil sich für jede Ziel-mRNA eine SorY-Binderegion vorhersagen lässt, wurde auch hier ein Schwellenwert (freie Energie ≤ -10 kcal/mol) gesetzt, der den Kreis auf 7 potentielle Interaktionen reduziert hat. Die zugehörigen Energie Werte sowie Binderegionen von s- und mRNA sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: SorY Ziel-mRNA Vorhersage. Aufgeführt sind alle 17 Gene, die die Selektionskriterien (A-Wert ≥ 12 und logarithmiertes Verhältnis (log2 FC) > 0.6 oder < -0.6) der vergleichenden Transkriptomanalyse zwischen 2.4.1pBBRSorYi und 2.4.1pBBR erfüllen. Nach einer Interaktionsvorhersage (*web tool* IntaRNA) erfüllen 7 Gene (in fett) das Kriterium Energie ≤ -10 kcal/mol. Positionen der Binderegionen, im Falle der mRNA ausgehend vom Translationsstart, sind ganz rechts gezeigt.

RSP no.	Gene	Beschreibung	Ratio [log2FC]	Energie [kcal/mol]	Position SorY	Position mRNA
RSP_2400		ABC putrescine transporter, ATPase subunit	-0.76	-11.39	35 -- 51	-13 -- 2
RSP_0097	<i>takP</i>	TRAP-T family transporter, DctP subunit bind prot	-0.65	-17.61	39 -- 75	-44 -- -7
RSP_2401		put. 6-aminohexanoate-cyclic-dimer hydrolase	-0.65			
RSP_0437	<i>sufC</i>	Suf C, ATPase	-0.65	-12.66	42 -- 52	558 -- 568
RSP_0843		Conserved protein containing sulfotransfer	-0.62			
RSP_0432		hypothetical protein	-0.61	-12.43	3 -- 35	-10 -- 28
RSP_0433		hypothetical protein	-0.61			
RSP_3881	<i>flgF</i>	possible flagellar basal-body ROD protein FLGF	0.62	-17.50	38 -- 55	100 -- 116
RSP_2579	<i>cycB</i>	cytochrome c553i	0.65			
RSP_7367		AbrB protein (AidB regulator)	0.67			
RSP_3945		Carbohydrate kinase, PfkB	0.67			
RSP_3449		put. allophanate hydrolase subunit 2	0.74			
RSP_2632	<i>argI</i>	Arginase	0.82			
RSP_2580	<i>xoxJ</i>	putative methanol oxidation protein	0.83			
RSP_2577	<i>cycl</i>	isocytochrome c2	1.04			
RSP_2578	<i>xoxF</i>	putative pqq dehydrogenase protein (EC:1.1.99.8)	1.11	-12.56	3 -- 50	128 -- 165
RSP_2576	<i>adhI</i>	Alcohol dehydrogenase class III (EC:1.2.1.1)	1.15	-10.01	37 -- 50	-16 -- -2

Kanonische in *trans* kodierte sRNAs wie SorY regulieren ihre Ziel-mRNAs in der Regel in negativer Weise durch Basenpaarung an der Ribosomenbindestelle bzw. am Translationsstart. Dies trifft auf die mRNAs der Gene RSP_0432, RSP_0097 (*takP*) und RSP_2400 zu. Laut Interaktionsvorhersage bzw. einer berechneten freien Energie von -17.61 kcal/mol ist es für SorY eindeutig am günstigsten, an das RSP_0097 Transkript zu binden. Zusätzlich ist RSP_0097 mit einem log2FC von -0,65 außer RSP_2400 das am stärksten negativ regulierte Gen. Beides deutet darauf hin, dass RSP_0097 direkt durch SorY reguliert wird.

3.1.3 Das Protein TakP

RSP_0097 kodiert das extrazytoplasmatische Substratbindeprotein eines TRAP Transporters. Das Protein wurde zunächst unter dem Namen SmoM als putatives Sorbitol/Mannitol Bindeprotein annotiert. Später wurde es in der Literatur jedoch in TakP umbenannt, weil eine Beteiligung am Transport von α -Ketosäuren vorgeschlagen wurde (Gonin *et al.*, 2007). Zwei Homologe von TakP, DctP2 und DctP3 wurden zuvor in *R. capsulatus* beschrieben, die ebenfalls Bindeproteine von TRAP Transportern sind. Führt man mit der Aminosäuresequenz von TakP eine *protein-protein* BLAST (*basic local alignment search tool*) Suchanfrage innerhalb *Rhodobacter capsulatus* SB1003 durch, werden beide Proteine als Homologe identifiziert. Tabelle 2 gibt die wesentlichen Ergebnisparameter wieder. TakP weist eine sehr hohe Aminosäureübereinstimmung von 81 % mit DctP2 und eine relativ hohe Übereinstimmung mit DctP3 (45 %) auf. Bezogen auf die Aminosäureeigenschaften liegt die Identität bei 89 und 61 %. Für das Protein DctP2 wurden hohe Bindungsaffinitäten an α -Ketosäuren *in vitro* ermittelt (Thomas *et al.*, 2006). Für DctP3 konnte hingegen *in vivo* eine Beteiligung an der Aufnahme von den C4-Dicarbonsäuren Malat, Succinat und Fumarat gezeigt werden (Forward *et al.*, 1997; Shaw *et al.*, 1991).

Tabelle 2: Ähnlichkeit des Proteins RSP_0097 zu den bereits charakterisierten Paralogen in *Rhodobacter capsulatus*. Die gezeigten Parameter entsprechen einer BLAST Analyse und sind auf die Aminosäuresequenz von RSP_0097 (TakP) bezogen.

Protein	Beschreibung	Sequenzidentität	Positive	Lücken
DctP2 (RCAP_rcc02417)	dicarboxylate TRAP transporter binding protein	294/365 (81 %)	328/365 (89 %)	0/365 (0 %)
DctP3 (RCAP_rcc03024)	C4-dicarboxylate TRAP transporter binding protein	22/49 (45 %)	30/49 (61 %)	6/49 (12 %)

3.1.4 Validierung der *takP* mRNA als Ziel-mRNA von SorY

Um die Vermutung, dass die sRNA SorY die *takP* mRNA reguliert, weiter zu festigen, wurden verschiedene Experimente zur Validierung der Interaktion durchgeführt. Hierbei entfiel die experimentelle Durchführung hauptsächlich auf Dr. Fazal Adnan, weshalb sowohl Experimente als auch Ergebnisse in diesem Absatz nur schriftlich zusammengefasst wurden. Details sind in der entsprechenden Publikation oder Dissertation von Dr. Fazal Adnan nachzulesen (Adnan *et al.*, 2015). Zunächst wurde der im Microarray ermittelte negative Effekt von SorY auf das mRNA Level von *takP* mittels qRT-PCR bestätigt, wobei ebenfalls Gesamt-RNA aus Wildtyp im Verhältnis zum SorY Überexpressionsstamm nach 10 min $^1\text{O}_2$ -Stress verwendet wurde. Des Weiteren wurde der entgegengesetzte Effekt nach 10 min $^1\text{O}_2$ -Stress gemessen, wenn der WT, statt mit Überexpressionsstamm, mit dem Deletionsstamm ΔSorY verglichen wurde. Auch das ist zu erwarten, weil im Deletionsstamm keinerlei SorY Transkripte vorliegen, die das *takP* mRNA Level herunter

regulieren, während SorY im WT induziert wird und negativ reguliert. Hieraus resultiert im Verhältnis ein höherer *takP*-mRNA Level in der Deletionsmutante.

Weil sich SorY bei direkter Interaktion negativ auf die mRNA Stabilität von *takP* auswirken muss, wurde die Halbwertszeit der mRNA in Ab- und Anwesenheit von SorY Überexpression bestimmt. Entsprechend der Vermutung beträgt die Halbwertszeit der *takP* mRNA $1,6 \pm 0,08$ min im Kontrollstamm und $1,0 \pm 0,12$ min im Überexpressionsstamm.

Zuletzt wurde ein *lacZ* basiertes Reporterplasmid konstruiert. Das Plasmid enthält stromabwärts eines konstitutiven 16S rRNA Promotors die *takP* 5' UTR mit RBS, die auch der SorY Bindestelle entspricht. Zusätzlich ist der Beginn des *takP* Genortes translationell an *lacZ* fusioniert. Im Anschluss wurde die Reporteraktivität *in vivo* bzw. *R. sphaeroides* 2.4.1 mittels β -Galaktosidase assays in Gegenwart unterschiedlicher SorY Level bestimmt. Hierbei zeigt sich, dass die β -Galaktosidaseaktivität im SorY Überexpressionsstamm, im Vergleich zum Kontrollstamm, um 50 % reduziert ist. Diese Regulation geht jedoch verloren, wenn entweder einzelne Basen der Binderegion in *takP* auf dem Reporterplasmid oder der Binderegion in SorY auf dem Überexpressionsplasmid ausgetauscht werden. Dies ist ein starker Hinweis für eine direkte Interaktion zwischen SorY und *takP* mRNA. Zusätzlich führt die Verwendung des Reporterplasids sowohl im Deletionsstamm Δ SorY als auch Δ hfq zu einer um 50 % erhöhten β -Galaktosidaseaktivität im Vergleich zum Wildtyp, weil in Δ SorY keine sRNA Transkripte zur negativen Regulation vorliegen und in Δ hfq, das zur Duplexbildung zwischen SorY und *takP* mRNA nötige RNA Chaperon fehlt.

3.1.5 Nachweis direkter Interaktion von SorY mit der *takP* mRNA

Die in Absatz 3.2.16 und 3.2.17 gezeigten Ergebnisse weisen stark darauf hin, dass die sRNA SorY an die *takP* RNA bindet und deren Stabilität damit negativ beeinflusst. Um eine direkte Interaktion zu beweisen, wurden elektrophoretische Mobilitäts-shift-assays (EMSA) durchgeführt. Hierzu wurden zunächst PCR Produkte generiert (siehe Primerliste), die aufgrund einer T7 RNA Polymerase Promotorsequenz als Templates in *in vitro* Transkriptionen eingesetzt werden können. Die Promotorsequenz wird durch den jeweiligen *forward* Primer an das 5' Ende der Amplifikate angehängt. In den anschließenden *in vitro* Transkriptionen wurden Transkripte für die sRNA SorY (86 nt), die Kontroll-sRNA PcrZ (136 nt) und die Kontroll-mRNA von Gen RSP_2591 (177 nt) „kalt“ synthetisiert. Transkripte für die mRNA des Gens *takP* wurden im Zuge der Synthese intern mit radioaktivem $[\alpha\text{-P}^{32}]$ -UTP markiert. *In vitro* Transkripte der sRNAs entsprechen im Wesentlichen denen *in vivo*. Von den mRNAs wurde hingegen nur die 5' UTR mit potentieller Bindestelle und der Beginn der kodierenden Sequenz synthetisiert. Nach DNase Verdau wurden gereinigte Transkripte im Anschluss

wie beschrieben (siehe 2.5.7) miteinander inkubiert und nach Komplexbildung auf einem nativen Gel aufgetrennt und mittels *phosphoimaging* visualisiert. Der Mobilitäts-shift-assay (EMSA) zeigt die Bindungsreaktionen von 150 fmol $[\alpha\text{-P}^{32}]$ -UTP markiertem *takP* mRNA Fragment (15 nM; 83 nt) mit aufsteigender Konzentration „kalter“ sRNA SorY. Das heißt, die sRNA wurde äquimolar und in

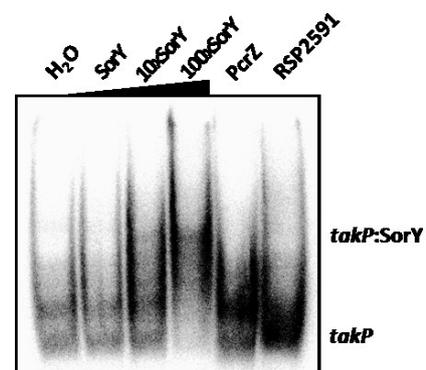


Abbildung 11 : Bindung von SorY an *takP* mRNA *in vitro*. Gezeigt ist ein Mobilitäts-shift-assay (EMSA) von 150 fmol $[\alpha\text{-P}^{32}]$ -UTP markiertem *takP* mRNA Fragment (15 nM; 83 nt) bei 32°C 20 min inkubiert mit aufsteigender Konzentration „kalter“ sRNA SorY (15 nM, 150 nM und 1,5 μ M). Als Kontrolle wurde das *takP* Fragment alleine oder mit 100x Überschuss der sRNA PcrZ (1,5 μ M) bzw. des mRNA Fragmentes von RSP_2591 (1,5 μ M) inkubiert. Die Auftrennung erfolgte mittels nativem TBE(0,25x)/PAA(6%)-Gel.

10 fachem als auch in 100 fachem Überschuss eingesetzt. Hierbei ist eindeutig zu erkennen, dass bereits bei 10 fachem Überschuss *takP*:SorY Komplexe im Gel bestehen bleiben und ein deutlich höheres Laufverhalten (*shift*) als freie markierte *takP* mRNA Fragmente aufweisen. Dieser Effekt wird bei 100 fachem Überschuss noch deutlicher. Die Kontrollen, bei denen *takP* mRNA Fragmente alleine oder mit 100 fachem Überschuss der sRNA PcrZ bzw. des mRNA Fragmentes von RSP_2591 inkubiert wurden, zeigen keine Komplexbildung (*shift*). Das vorliegende Ergebnis ist ein starker Hinweis auf eine direkte Interaktion zwischen SorY und *takP* mRNA, während die Kontrollen ausschließen, dass SorY mit sich selbst oder einer anderen mRNA Komplexe bildet.

3.1.6 Biologische Funktion der SorY-*takP* Bindung bzw. Regulation

Die Frage, die sich nun stellt ist, warum SorY in *R. sphaeroides* während $^1\text{O}_2$ -Stress induziert wird (siehe 3.1.1) und im Zuge dessen die TakP Translation negativ beeinflusst, indem SorY direkt an die *takP* mRNA bindet (siehe 3.2.17 und 3.1.5)? Um das zu beantworten, wurde ein SorY vermittelter Phänotyp mittels Hemmhofstest dokumentiert. Hierbei entfiel abermals die experimentelle Durchführung hauptsächlich auf Dr. Fazal Adnan, weshalb sowohl Experimente als auch Ergebnisse in diesem Absatz nur schriftlich zusammengefasst wurden. Details sind in der entsprechenden Publikation oder Dissertation von Dr. Fazal Adnan nachzulesen (Adnan *et al.*, 2015).

Hemmhoftests eignen sich, um die Empfindlichkeit von Bakterien gegenüber toxischen Substanzen zu überprüfen. In diesem Fall wurden in MB getränkte Filterpapierscheibchen mittig auf Agarplatten, auf denen unterschiedliche, zu überprüfende *R. sphaeroides* Stämme ausplattiert worden waren, aufgelegt. Die Platten wurden dann zum Generieren von $^1\text{O}_2$ im Licht inkubiert. Der Durchmesser klarer Bereiche bzw. der entstehenden Hemmhöfe um die Filterpapiere kann als Maß für die Resistenz des jeweiligen *R. sphaeroides* Stammes gewertet werden, wobei gilt, desto kleiner der Hemmhof desto höher die Resistenz.

Bei Überexpression von SorY ist eine Steigerung der Resistenz und bei Deletion von SorY eine verminderte Resistenz gegenüber den Kontrollstämmen zu beobachten. Dies zeigt, dass SorY eine messbare Rolle bei der photooxidativen Stressantwort spielt. Wird die sRNA in Stämmen überexprimiert, in denen das RNA Chaperon Hfq deletiert ist, sind keine Unterschiede bezüglich der Resistenz gegenüber $^1\text{O}_2$ im Vergleich zum Kontrollstamm ohne Überexpression zu messen. Das bedeutet, dass die SorY vermittelte Resistenz Hfq abhängig ist. Wahrscheinlich kann die sRNA *in vivo* in Abwesenheit von Hfq keinen Duplex mit ihrer Ziel-mRNA ausbilden, um diese zu regulieren. Vergleicht man eine *takP* Deletionsmutante (Pierru *et al.*, 2006) mit dem Wildtyp, kann ebenfalls eine verminderte Resistenz gegenüber $^1\text{O}_2$ beobachtet werden. Das heißt, dass eine negative Regulation von *takP* durch SorY den gleichen Phänotyp wie eine Deletion von *takP* verursacht. Überexprimiert man nun SorY im *takP* Deletionsstamm, ist keine Veränderung der Resistenz gegenüber $^1\text{O}_2$ mehr erkennbar, was bedeutet, dass SorY bei Fehlen der Ziel-mRNA keinen phänotypischen Effekt mehr hat. Anders gesagt zeigt dies, dass die Interaktion von SorY mit der *takP* mRNA die primäre Regulation ist, die unter den beschriebenen experimentellen Bedingungen zu einem Phänotyp führt.

Wie bereits gezeigt (3) ist ein TakP Paralog in *R. capsulatus* an der Aufnahme von den C4-Dicarbonsäuren Malat, Succinat und Fumarat beteiligt (Forward *et al.*, 1997; Shaw *et al.*, 1991). Lactat wurde als Substrat in den gleichen Studien ausgeschlossen. Während dieser Arbeit wurde Minimalmedium zur Kultivierung von *R. sphaeroides* verwendet, das nur Malat als einzige Kohlenstoffquelle enthält. Wären die eben beschriebenen Phänotypen also auf einen verringerten Malat Import durch TakP im Zuge der negativen Regulation der *takP* mRNA zurückzuführen, dann müssten die Phänotypen bei Substitution der Kohlenstoffquelle Malat durch Laktat verloren gehen.

Aus diesem Grund wurden alle bisher durchgeführten Hemmhoftests auf Laktat Medium ohne Malat wiederholt. Hierbei ließen sich tatsächlich keine phänotypischen Unterschiede zwischen den *R. sphaeroides* Stämmen feststellen, was eine Rolle von TakP bei der Malataufnahme untermauert.

3.2 UpsM (*upstream sRNA mraZ*)

In einer vorangehenden Arbeit zu dieser Dissertation wurde die sRNA UpsM (*upstream sRNA mraZ*; RSs_0682) bereits durch differenzielle RNA Sequenzierung (dRNASeq) mittels der 454 Sequenzier-Plattform und Northern Blot detektiert. Beide Experimente zeigen, dass es sich hierbei um die abundanteste sRNA in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 handelt (Berghoff *et al.*, 2009). Gleiches gilt bei Betrachtung der Gruppe der an Hfq assoziierten sRNAs. Von den mittels Hfq-FLAG coimmunopräzipitierten sRNAs, entspricht der Anteil von UpsM Transkripten über 60 % (Berghoff *et al.*, 2011). Die sRNA endet 62 nt vor der Protein kodierenden Sequenz des Genes *mraZ* (RSP_2095) auf dem Plusstrang von Chromosom 1, hat eine Länge von 206 nt und eine Prozessierungsstelle nach 76 Nukleotiden. Die Prozessierung findet unter normalen Wachstumsbedingungen auf einem basalen Level kontinuierlich statt. In der Gegenwart von $^{18}\text{O}_2$, scheint es jedoch so, als würde die Prozessierung konditionell induziert, was zu einer deutlichen Akkumulation eines stabilen 130 nt langen 3' Fragmentes führt. Eine Induktion des Primärtranskriptlevels konnte bisher unter keiner Wachstumsbedingung festgestellt werden.

3.2.1 Der UpsM Genort in dRNASeq durch *Solexa* Sequenzier-Plattform (Illumina)

Neben der ursprünglichen differenziellen RNA Sequenzierung (dRNASeq) mittels der 454 Sequenzier Plattform steht der Arbeitsgruppe mittlerweile ein dRNASeq Datensatz zur Verfügung, bei dem die *Solexa* Sequenzier-Plattform (Illumina) zum Auslesen der cDNA-Bibliotheken verwendet wurde. Die Sequenzierte RNA resultiert hierbei aus microaerob und exponentiell wachsenden *R. sphaeroides* 2.4.1 Kulturen, wobei die Hälfte der Ausgangs-RNA zunächst einer TEX (Terminator-5'-Phosphat-abhängige Exonuklease) Behandlung unterzogen wurde. Das Enzym verdaut RNA nur, wenn ein 5'-Monophosphat vorliegt, wie es beispielsweise für Prozessierungsprodukte der Fall ist. Primärtranskripte sind durch ein 5'-Triphosphat vor TEX geschützt. Folglich liegen Primärtranskripte bei der differenziellen RNA Sequenzierung in der cDNA Bibliothek von TEX behandelte RNA angereichert gegenüber der cDNA Bibliothek von unbehandelter RNA vor. Dieses Prinzip macht man sich beim *mapping* von Transkriptionsstarts (TSS) zu Nutzen. Die Präparation der cDNA Bibliotheken und deren Sequenzierung wurde extern (*vertis* Biotechnologie AG) durchgeführt. Die anschließende Amplifikation und Sequenzierung erfolgte entsprechend den Anforderungen für die *Solexa* Sequenzier-Plattform (Illumina). Die bioinformatische Aufarbeitung bezüglich *mapping* und Normalisierung der Sequenz-Rohdaten wurde von Konrad Förstner (Institut für Molekulare Infektionsbiologie, Uni Würzburg) übernommen. Zur Visualisierung der RNASeq Daten wurde der *Integrated Genome Browser* (IGB) verwendet.

Weil bei der neueren Sequenzierung mittels *Solexa* Plattform eine wesentlich höhere „Sequenziertiefe“ erreicht werden konnte, wurde der UpsM Genort hier erneut abgebildet (Abbildung 12). Durch Ansicht sequenzierter *reads* bei hoher Skalierung ist die Prozessierungsstelle innerhalb UpsM zu erkennen und mit einem roten Pfeil gekennzeichnet. Des Weiteren ist durch TEX Behandlung eine Anreicherung von UpsM erfolgt, was UpsM als Primärtranskript ausweist. Das klare 5'-Ende aller UpsM-*reads* bestätigt den bereits bekannten TSS.

Überraschend bzw. auffällig ist jedoch, dass selbst bei kleinerer Skalierung das Folgende *mraZ* keinen eindeutigen TSS aufweist. *mraZ* ist das erste Gen des *dcw* (*division and cell wall*) Genclusters bzw. Operons. Die aus dem Operon resultierende polycistronische mRNA sollte eine hohe Abundanz aufweisen, da die kodierten Proteine essentiell für das Wachstum sind. Trotzdem ist kein Transkriptionsstart zu erkennen. Bei *E. coli* liegt dieser TSS beispielsweise 38 nt vor *mraZ*. Würde ein TSS bei *R. sphaeroides* im gleichen Abstand vorliegen, wäre dieser eindeutig im 62 nt langen

intergenischen Bereich (IGR) zwischen UpsM Terminator und *mraZ* zu erkennen. Das ist jedoch nicht der Fall. Deshalb stellt sich die Frage, ob bei *R. sphaeroides* der Promotor und TSS von UpsM und von der polycistronischen mRNA des *dcw* Genclusters die Gleichen sind. Dies würde voraussetzen, dass der Terminator von UpsM bei der Transkription gelegentlich überlesen werden kann, ohne dass die Transkription gestoppt wird, was man als *read through* bezeichnet. Dies würde bedeuten, dass *dcw* Transkripte eine ungewöhnlich lange 5' UTR von 268 nt besitzen. Da *upstream* des UpsM Terminators ein Startkodon (ATG) und dahinter ein Stopkodon (TGA) liegt (Abbildung 12), wäre bei *read through* ein möglicher kleiner offener Leserahmen (sORF) vorhanden, der ein Peptid von 56 Aminosäuren (AS) kodieren würde.

Zusammenfassend ermöglichen die Solexa Daten also einen besseren Einblick in die transkriptionelle Organisation des UpsM-*mraZ* Lokus. Hieraus resultiert die Fragestellung, ob UpsM wie publiziert eine alleinstehende (orphan) IGR kodierte sRNA ist oder ob UpsM durch Transkriptionstermination in der 5' UTR des *dcw* Genclusters generiert wird.

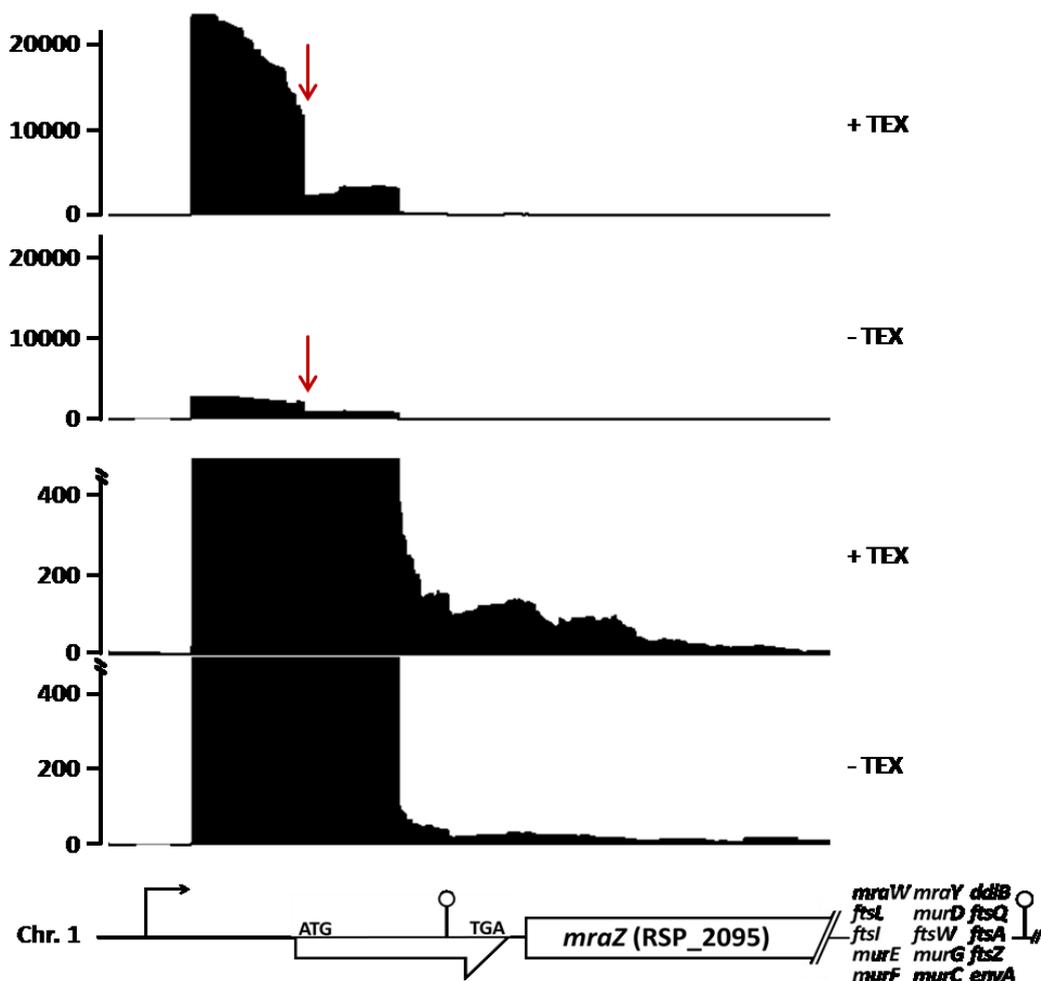


Abbildung 12: Auf dRNASeq basierende IGB (*Integrated Genome Browser*) Ansicht des UpsM und *mraZ* Genortes. Reads des gleichen Datensatzes sind oben auf einer Skala von 0 bis 25000 und unten vergrößert auf einer Skala von 0 bis 500 dargestellt. +TEX zeigt Sequenzierte cDNA Bibliotheken von TEX behandelter RNA bzw. angereicherten Primärtranskripten an. Der rote Pfeil entspricht der Prozessierungsstelle in UpsM. Die Sequenzierte RNA resultiert aus microaerob und exponentiell gewachsenen *R. sphaeroides* 2.4.1 Kulturen. Ganz unten ist der UpsM und *mraZ* Genort schematisch dargestellt. Die Transkription der sRNA erfolgt vom eingezeichneten Promotor (→) und wird am stromabwärts liegenden Terminator beendet. Zusätzlich sind das Startkodon (ATG) und Stopkodon (TGA) eines möglichen offenen Leserahmens kenntlich gemacht. Stromabwärts von UpsM und Leserahmen schließt sich das Folgende *mraZ* an, welches das erste Gen des *dcw* (*division and cell wall*) Genclusters (16 Gene, *mraZ* bis *envA*) darstellt.

3.2.2 UpsM entsteht in der 5' UTR des *dcw* Genclusters

Die in diesem Abschnitt gezeigten Reporterassays, 5'-RACE und RT-PCRs dienen der Beantwortung der Frage, ob UpsM wie publiziert eine alleinstehende (*orphan*) in einer IGR kodierte sRNA ist oder ob UpsM durch Transkriptionstermination in der 5' UTR des *dcw* Genclusters generiert wird.

Wenn letzteres der Fall ist, wäre der Promotor von UpsM auch für die Transkription von *mraZ* verantwortlich. Im Umkehrschluss bedeutet das, dass zwischen UpsM und *mraZ* kein weiterer *mraZ*-exklusiver Promotor lokalisiert sein dürfte. Um das zu überprüfen, wurden *lacZ* basierte Reporterassays durchgeführt. Hierzu wurde das Plasmid pPHU235 verwendet, welches translationelle Fusionen an LacZ erlaubt. Das Ausgangsplasmid enthält außerdem weder Promotor noch RBS und ist deshalb geeignet, um *upstream* Regionen von *mraZ* auf Promotoren zu testen. Die inserierten Fragmente führten zu einer translationellen Fusion von MraZ mit 33 N-terminalen AS an LacZ. Zusätzlich enthalten die Fragmente *upstream* Bereiche unterschiedlicher Länge. Der *upstream* Bereich auf Plasmid pPHUmraZUpsM umfasst 376 nt bzw. den kompletten UpsM Lokus inklusive UpsM-Promotor. Das entsprechende Fragment wurde mit den Primern MraZ_rep_f und MraZ_rep_r amplifiziert. Um Inserts für Plasmid pPHUmraZ188up und pPHUmraZ67up zu generieren,

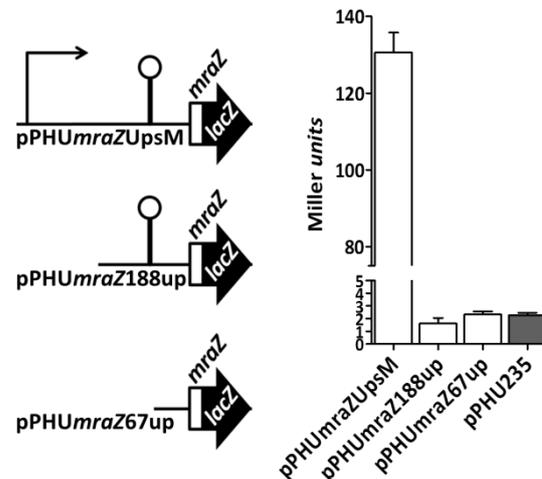


Abbildung 13: β -Galactosidase Reporter assays mit translationeller Fusion von MraZ mit 33 N-terminalen AS an LacZ und *upstream* Regionen unterschiedlicher Länge. Der *upstream* Bereich auf Plasmid pPHUmraZUpsM umfasst 376 nt bzw. den kompletten UpsM Lokus inklusive UpsM-Promotor. Vergleichsplasmide enthalten verkürzte *upstream* Regionen von 188 nt und 67 nt Länge ausgehend von *mraZ*. pPHU235 entspricht der Leervektorkontrolle. Miller units und Standardabweichungen resultieren aus biologischen Triplikaten mit technischen Duplikaten.

wurden die *forward* Primer MraZ188up_rep_f und MraZ67up_rep_f verwendet. Beide Plasmide enthalten verkürzte *upstream* Regionen von 188 nt bzw. 67 nt Länge ausgehend von *mraZ* (Abbildung 13). *R. sphaeroides* 2.4.1b mit jeweils einem Plasmid oder Leervektor wurde mikroaerob in biologischen Triplikaten kultiviert. Die Probenentnahme für β -Galaktosidase assays erfolgte in technischen Duplikaten während des exponentiellen Wachstums bei OD₆₆₀ 0,4. Die ermittelten Miller units von ca. 2 für die Reporterplasmide pPHUmraZ188up und pPHUmraZ67up entsprechen denen der Leervektorkontrolle pPHU235, weil in den entsprechenden Stämmen nur Hintergrundaktivität gemessen wurde. Dieses Ergebnis zeigt, dass von den verkürzten *upstream* Regionen von *mraZ* keine Transkription ausgeht. Das heißt, es liegt kein *mraZ*-exklusiver Promotor kurz vor bzw. nach dem UpsM Terminator. Eine deutlich höhere β -Galaktosidaseaktivität von ca. 130 Miller units zeigt sich hingegen in Kulturen mit Plasmid pPHUmraZUpsM. Daraus lässt sich folgern, dass erstens die *mraZ* Expression unter Kontrolle des UpsM Promotors steht, und zweitens, dass der UpsM Terminator überlesen werden kann.

Wenn also die *mraZ* Transkription unter Kontrolle des UpsM Promotors steht und durch das Überlesen des UpsM Terminators ermöglicht wird, dann liegen polycistronische *dcw* mRNAs mit langer 5' UTR in der Zelle vor, deren 5'Ende dem von UpsM entspricht (Abbildung 14). Um das 5' Ende einer solchen mRNA nachzuweisen, wurde eine 5'-RACE (*rapid amplification of cDNA ends*) durchgeführt. Der *antisense* Primer 2095_0682B, der zur cDNA Synthese in der reversen Transkription und zum Amplifizieren der cDNA verwendet wurde, bindet nur im MraZ kodierenden

Bereich dieser mRNA. In einem weiteren Amplifikationsdurchlauf wurde Primer 0682B verwendet. Das PCR Produkt wurde auf einem TBE/PAA-Gel mittels Ethidiumbromid Färbung visualisiert und zur genauen Bestimmung der 5' Enden subkloniert und sequenziert (Abbildung 14). Fünf von zehn sequenzierten Klonen bzw. 5'-Enden von *mraZ* stimmen mit dem 5'-Ende von UpsM überein. Weitere fünf 5'-Enden sind scheinbar willkürlich verteilt und spiegeln wahrscheinlich keinen TSS sondern Abbauprodukte oder Abbrüche bei der cDNA Synthese wider. Die Bestätigung des 5'-Endes von UpsM trotz cDNA Synthese ausgehend von *mraZ* zeigt, dass *mraZ* Transkription vom UpsM Promotor ausgeht, wobei durch Überlesen des UpsM Terminators eine polycistronische *dcw* mRNA mit langer 5' UTR generiert wird (Abbildung 14). Des Weiteren wird die mRNA nicht wie UpsM prozessiert, weil für die mRNA nicht das gleiche 5'-Ende wie für das Prozessierungsprodukt von UpsM nachgewiesen wurde.

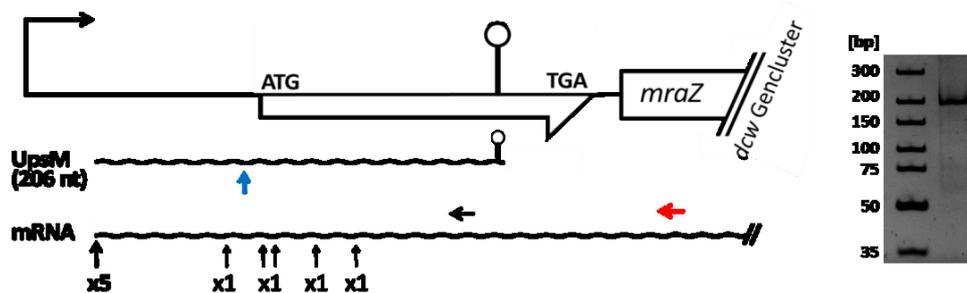


Abbildung 14: Bestimmung des 5'-Endes der *mraZ* mRNA mittels 5'-RACE. cDNA Synthese und erste Amplifikation der cDNA erfolgte mit Primer 2095_0682B (roter Pfeil). Für einen weiteren Amplifikationsdurchlauf wurde Primer 0682B (schwarzer Pfeil) verwendet. Das entsprechende PCR Produkt wurde auf einem TBE/PAA-Gel (10%) mittels Ethidiumbromid Färbung visualisiert (rechts) und zur genauen Bestimmung der 5'-Enden nach Subklonierung sequenziert. Identifizierte 5'-Enden und deren Häufigkeit sind angegeben. Des Weiteren ist die mittels 5'-RACE verifizierte Prozessierungsstelle in UpsM eingezeichnet (blauer Pfeil) (Berghoff *et al.*, 2009).

Um experimentell weiter abzusichern, dass der UpsM Terminator überlesen werden kann, und um ein Gefühl dafür zu bekommen, wie häufig dies geschieht, wurden RT-PCRs und qRT-PCRs durchgeführt. Hierzu wurden die Primerpaare 0682A/0682B, 0682_2095A/0682_2095B und 2095A/2095B verwendet. Das Primerpaar 0682 (UpsM) amplifiziert ein 155 bp langes Fragment von UpsM und das Primerpaar 2095 (*mraZ*) ein 153 bp langes Fragment des *mraZ* kodierenden Bereiches. Das Primerpaar 0682_2095 (UpsM_*mraZ*) generiert ein Amplifikat von 143 bp, wobei der *forward* Primer im UpsM Lokus *upstream* des Terminators und der *reverse* Primer *downstream* des Terminators im *mraZ* Lokus bindet. Folglich lässt sich mit Primerpaar 0682_2095 der *read-through* nachweisen. RT-PCRs wurden mit DNA freier gesamt-RNA (0,2 ng/ μ l) aus exponentiell und mikroaerob wachsenden *R. sphaeroides* 2.4.1 Kulturen durchgeführt. Als Kontrolle wurden PCRs ohne vorgeschaltete reverse Transkription (RT) durchgeführt. Bei DNA freien Proben ist hier kein Produkt zu erwarten. Amplifizierte cDNAs wurden auf einem 10% TBE/PAA-Gel aufgetragen und mit Ethidiumbromid gefärbt (Abbildung 15 links). Mit jedem Primerpaar lässt sich ein Produkt in der erwarteten Größe erzeugen. Im Hinblick auf das Primerpaar 0682_2095 bedeutet dies, dass aus *read-throughs* resultierende cDNA amplifiziert wurde. Allerdings gibt es deutliche Unterschiede bei den Bandenstärken. Offensichtlich liegt die sRNA UpsM in höherer Abundanz vor als polycistronische *dcw* mRNAs. Dies ist zum einen damit zu erklären, dass 0682 Primer auch *dcw* mRNAs amplifizieren, weil die UpsM Sequenz in deren 5' UTR enthalten ist. Zum anderen ist davon auszugehen, dass die Transkription regelmäßig am Terminator von UpsM gestoppt wird und somit nur die sRNA exprimiert wird. Des Weiteren ist zu erkennen, dass weniger Produkt bei Primerpaar 0682_2095 im Vergleich zu 2095 vorliegt, obwohl beide Primerpaare an die gleichen mRNAs bzw. cDNAs hybridieren müssten.

Dies ist ein starker Hinweis auf eine geringere mRNA Stabilität in der 5' UTR von *mraZ* als im kodierenden bzw. durch Ribosomen geschützten Bereich der mRNA.

Um die Häufigkeit von Termination und *read-through* abzuschätzen, wurde eine quantitative RT-PCR durchgeführt. Normalerweise werden qRT-PCRs nur miteinander verglichen, wenn sie mit dem gleichen Primerpaar durchgeführt wurden. Weil die Produktgrößen aber für alle drei Primerpaare eine ähnliche Größe aufweisen und der verwendete Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green gleichmäßig in gebildete doppelsträngige DNA interkaliert, wurden anhand der Amplifikationszyklen, bei denen die Fluoreszenz den Schwellenwert überschreitet, relative Mengenaussagen gemacht. In Abbildung 15 (rechts) sind die Transkriptlevel relativ zur Produktmenge von Primerpaar 0682_2095 (UpsM_ *mraZ*) dargestellt. Wie in der RT-PCR wurde eine höhere bzw. ca. 7-fache Transkriptmenge bei Verwendung von 2095 (*mraZ*) im Vergleich zu 0682_2095 (UpsM_ *mraZ*) Primern gemessen, obwohl beide Primerpaare die gleichen mRNAs detektieren müssten. Dies bestätigt die Annahme, dass die 5' UTR von *mraZ* eine geringere Stabilität als der kodierende mRNA Abschnitt aufweist. Die Häufigkeit,

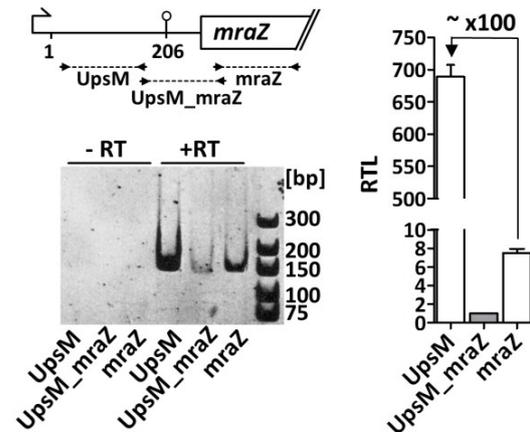


Abbildung 15: Nachweis des Überlesens des UpsM Terminators mittels RT-PCR und qRT-PCR zum Abschätzen der Häufigkeit von Termination und *read-through*. Es wurde Gesamt-RNA (0,2 ng/ μ l) aus exponentiell und mikroaerob gewachsenen *R. sphaeroides* 2.4.1 Kulturen und die Primerpaare 0682A/B (UpsM), 2095A/B (*mraZ*) und 0682_2095A/B (UpsM_ *mraZ*) verwendet. Links: Amplifikate der RT-PCRs auf einem 10% TBE/PAA-Gel aufgetragen und mit Ethidiumbromid gefärbt. Als Kontrolle wurden PCRs ohne reverse Transkription (-RT) durchgeführt. Rechts: In qRT-PCR ermittelte Transkriptmengen relativ zum Transkriptlevel das mit Primerpaar 0682_2095A/B bestimmt wurde.

in der der Terminator von UpsM bei der Transkription überlesen wird, ist anhand des relativen Transkriptlevels (RTL) von UpsM und *mraZ* zu ermitteln. Für UpsM liegt dieser Wert bei ca. 700 und für *mraZ* bei ca. 7. Das bedeutet, der UpsM Terminator wird bei 100 Transkriptionseignissen ungefähr einmal überlesen.

Zusammenfassend zeigen die in diesem Abschnitt beschriebenen Experimente aus Reporterassays, 5'-*RACE* und RT-PCRs, dass UpsM nicht wie publiziert eine alleinstehende (*orphan*) IGR kodierte sRNA ist, sondern ausgehend vom Promotor des *dcw* Genclusters transkribiert wird und durch Transkriptionstermination an einem eigenen Terminator in der 5' UTR des *dcw* Genclusters generiert wird.

3.2.3 Die 5' UTR des *dcw* Genclusters enthält einen sORF

Es wurde gezeigt, dass *mraZ*, das erste Gen des *dcw* Genclusters, ausgehend vom UpsM Promotor transkribiert wird. Auf diese Weise wird eine polycistronische mRNA mit einer ungewöhnlich langen 5' UTR von 268 nt generiert. In dieser 5' UTR ist ein möglicher sORF enthalten. Das zugehörige Startkodon (ATG) ist *upstream* und das Stopkodon (TGA) *downstream* des UpsM Terminators lokalisiert (Abbildung 12). Das resultierende Peptid hätte eine Länge von 56 Aminosäuren (AS). Um zu kontrollieren, ob dieser sORF *in vivo* translatiert wird, wurden *lacZ* basierte Reporterassays durchgeführt, wobei das Ausgangsplasmid pPHU235 verwendet wurde, welches translationelle Fusionen an LacZ erlaubt. Wie bereits beschrieben enthält das Plasmid weder Promotor noch RBS und eignet sich somit, um den *upstream* Bereich des sORF auf Translationsinitiation *bzw.* eine funktionelle *Shine-Dalgarno*-Sequenz zu überprüfen. Das mit den Primern *MraZ_rep_f* und

0682ORF3_rep_r amplifizierte Insert führt nach Ligation in pPHU235 zu einer translationellen Fusion von 3 N-terminalen AS des ORFs an LacZ. Zusätzlich umfasst das inserierte Fragment 193 *upstream* gelegene Nukleotide inklusive UpsM-Promotor und TSS. Das resultierende Plasmid pPHUORF und Kontrollplasmide pPHU235 und pPHU4352 wurden durch Konjugation in *R. sphaeroides* 2.4.1b eingebracht. Im Anschluss wurden Klone mikroaerob in biologischen Triplikaten kultiviert. Die Probenentnahme für β -Galaktosidase *assays* erfolgte in technischen Duplikaten während exponentiellen Wachstums bei OD₆₆₀ 0,4. Mit Kontrollplasmid pPHU235, welches weder einen Promotor noch eine RBS *upstream* von *lacZ* enthält, wurden Miller *units* zwischen 0,5 und 1,5 ermittelt. Als weitere Kontrolle wurde das Plasmid pPHU4352 verwendet, welches zwar keine RBS aber einen starken konstitutiven 16S rRNA Promotor hat und zu Miller *units* zwischen 1 und 2 führt. In Gegenwart von pPHUORF wurde eine signifikant höhere β -Galaktosidaseaktivität von über 20 Miller *units* gemessen, was im Vergleich zu den Kontrollplasmiden deutlich zeigt, dass die *upstream* Region des ORFs Ribosomenbindung und Translationsinitiation am Startkodon vermittelt. Das 56 AS lange Peptid wird also mit großer Wahrscheinlichkeit *in vivo* exprimiert.

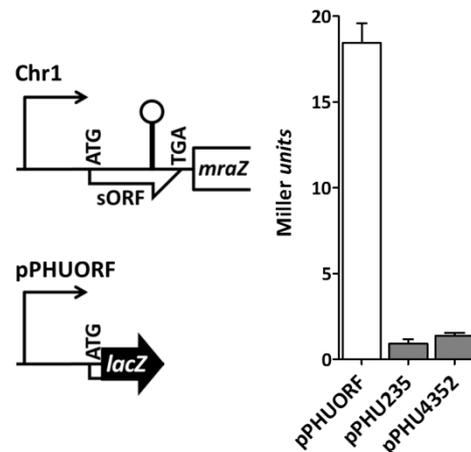


Abbildung 16: β -Galactosidase Reporter assays mit translationeller Fusion von sORF mit 3 N-terminalen AS an LacZ. Der *upstream* Bereich des ORF auf Plasmid pPHUORF umfasst 193 nt bzw. UpsM Promotor und TSS. Plasmid pPHU235 entspricht einer Leervektorkontrolle, während pPHU4352 einen starken 16S rRNA Promotor aber keine RBS enthält. Miller *units* und Standardabweichungen resultieren aus biologischen Triplikaten mit technischen Duplikaten.

3.2.4 Der sORF in der 5' UTR des *dcw* Genclusters vermittelt keine Antitermination

Ein Regulationsprinzip der Transkription bei Prokaryoten ist die transkriptionelle Attenuation. Hierunter versteht man die Möglichkeit zum vorzeitigen Abbrechen der Transkription an einem intrinsischen Terminator, der hier auch als Attenuator bezeichnet wird und häufig in *leader* Sequenzen bzw. zu Beginn eines Operons zu finden ist. Die Attenuation durch Ausbildung einer Terminatorstruktur der mRNA kann jedoch bei gleichzeitigem voranschreitenden der Translation durch ablesende Ribosomen in räumlicher Nähe unterbunden werden. Diese zeitliche und räumliche Kopplung von Transkription und Translation ist auch für den Terminator in der langen 5' UTR des *dcw* Genclusters von *R. sphaeroides* denkbar. Wie im Abschnitt zuvor demonstriert, wird hier ein ORF translatiert, dessen kodierende mRNA Sequenz ebenfalls einen Terminator ausbilden kann. Im Falle von Attenuation der Transkription wird die sRNA UpsM generiert. Im Falle der Translation des ORFs könnte die Ausbildung des Terminators verhindert werden, was zum Voranschreiten

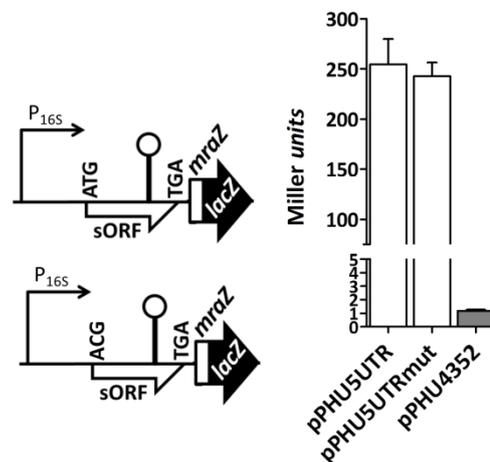


Abbildung 17: β -Galactosidase Reporter assays mit translationeller Fusion von MraZ mit 33 N-terminalen AS an LacZ und nativer als auch mutierter 5' UTR unter transkriptioneller Kontrolle eines konstitutiven 16S rRNA Promotors. Bei der Mutation handelt es sich um einen Basenaustausch im Startcodon von sORF von ATG zu ACG. Plasmid pPHU4352 entspricht einer Leervektor-kontrolle. Miller *units* und Standardabweichungen resultieren aus biologischen Triplikaten mit technischen Duplikaten.

der Transkription bzw. der Genexpression des *dcw* Genclusters inklusive *mraZ* führen würde. Die hier aufgeworfene Frage ist also, ob die Translation von sORF einen direkten regulatorischen Einfluss auf die Häufigkeit von Termination und *read-through* in der 5' UTR von *mraZ* hat. Um diese Hypothese zu testen, wurden zwei Reporterplasmide für *lacZ* basierte *assays* konstruiert. Beim Ausgangsplasmid handelt es sich hierbei um pPHU4352, das eine konstitutive Expression ausgehend von einem starken 16S rRNA Promotor und die translationelle Fusion eines Proteins an LacZ ermöglicht. Das inserierte Fragment, amplifiziert mit dem Primerpaar Xba0682MraZ_f/MraZ_rep_r und in einem Zwischenschritt subkloniert in pJet1.2, führt zu einer translationellen Fusion von MraZ mit 33 N-terminalen AS an LacZ. Das führt zur konstitutiven Transkription der nativen, *upstream* gelegenen, 268 nt langen 5' UTR. Das generierte Plasmid wird hier als pPHU5UTR bezeichnet. Parallel wurde das subklonierte Fragment in pJet1.2 einer Mutagenese-PCR mit den Primern 0682T87C_f und 0682T87C_r unterzogen und anschließend ebenfalls in pPHU4352 inseriert. Hieraus resultiert das Plasmid pPHU5UTRmut, welches statt des Startkodons ATG des sORF in der 5' UTR durch Basenaustausch ein ACG kodiert (Abbildung 17). Beide Plasmide und Levektor wurden durch Konjugation in *R. sphaeroides* 2.4.1b eingebracht. Klone wurden mikroaerob in biologischen Triplikaten kultiviert. Die Probenentnahme für β -Galaktosidase *assays* erfolgte in technischen Duplikaten während exponentiellen Wachstums bei OD₆₆₀ 0,4. Würde nun die Translation des sORF einen direkten regulatorischen Einfluss auf die Häufigkeit von Termination und *read-through* in der 5' UTR von *mraZ* haben, müsste man unterschiedliche β -Galaktosidase Aktivitäten zwischen pPHU5UTR und pPHU5UTRmut messen, weil aufgrund des mutierten Startkodons in pPHU5UTRmut keine Translation des sORF möglich ist. Die ermittelten Miller *units* für beide Stämme von ca. 250 zeigen jedoch keinen signifikanten Unterschied (Abbildung 17). Unter den experimentellen Bedingungen konnte deshalb kein Hinweis auf eine Regulation durch räumliche Kopplung von Transkription und Translation gefunden werden.

3.2.5 Konservierung der *dcw* 5' UTR im Hinblick auf Länge, ncRNA und sORF

Die Absätze 3.2.1 bis 3.2.3 demonstrieren, dass in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 upstream von *mraZ* eine 268 nt lange 5' UTR zu finden ist, die 84 nt upstream von *mraZ* einen intrinsischen Terminator enthält. Das ist aus zwei Gründen erstaunlich. Zum einen, weil das *dcw* Gencluster (16 Gene insgesamt) bezüglich seiner Genregulation und Genabfolge vor allem unter gram-negativen und stäbchenförmigen Bakterien als hoch konserviert publiziert wurde (Tamames, 2001; Tamames *et al.*, 2001; Mingorance *et al.*, 2004). Und zum anderen, weil bisher keine lange *dcw leader* 5' UTR für ein solches gram-negatives und stäbchenförmiges Bakterium beschrieben wurde, obwohl die *dcw* Gene im Rahmen der Zellteilungsforschung im Fokus stehen. In *E. coli* wird die Transkription früher *dcw* Gene (16 Gene insgesamt) beispielsweise durch den Promotor *mraZ1p* ermöglicht, wobei polycistronische Transkripte mit einer durchschnittlich langen 5' UTR von 38 Nukleotiden upstream von *mraZ* entstehen (Vicente *et al.*, 1998).

Mit bioinformatischer Unterstützung der Arbeitsgruppe Lechner (Pharmazeutische Chemie, Marburg) haben wir deshalb untersucht, in welchen Bakterienspezies eine *R. sphaeroides* 2.4.1 ähnliche 5' UTR (lang bzw. kein exklusiver *mraZ* TSS und intrinsischer Terminator) oder eine *E. coli* ähnliche 5' UTR (kurz bzw. exklusiver *mraZ* TSS und kein intrinsischer Terminator) vorliegt, wobei der Bereich bis Position -300 *upstream* von *mraZ* betrachtet wurde. Hierzu wurden öffentlich zugängliche RNA Seq Datensätze der NCBI SRA database (Leinonen *et al.*, 2011) mit ausreichender Qualität für eine spätere TSS *mapping* verwendet. Im Detail wurden Sequenzen der Rohdaten mit *Trimmomatic* (Bolger *et al.*, 2014) getrimmt (Qualitätsschwelle 25, in einem *sliding window* der Größe 3, *read*

Länge >14 nt) und mit den Standardparametern durch *segemehl* (Hoffmann *et al.*, 2009) gegen die entsprechenden Genome *gemappt*. Zusätzlich wurden Terminatoren mittels TransTermHP (Kingsford *et al.*, 2007) vorhergesagt, wobei deren MFE (*minimum free energy*) laut RNAfold (Lorenz *et al.*, 2011) kleiner -10 kcal/mol sein musste. Die Ergebnisse sind schematisch in

Abbildung 18 und ausführlich in Anhang 1 gezeigt.

Anhand der Analyse zeigt sich ein klarer Unterschied zwischen Spezies der *Rhodobacteraceae* (Familie) und anderen Bakterien. Unter *Rhodobacteraceae* ist wie bei *Rhodobacter sphaeroides* immer eine lange 5' UTR > 220 nt zu finden, die einen starken intrinsischen Terminator und keinen zusätzlichen TSS unmittelbar upstream von *mraZ* aufweist. Außerhalb der Familie der *Rhodobacteraceae* sind die TSS näher an *mraZ* gelegen und führen zu 5' UTRs ≤ 70 nt, in denen keine Terminatoren zu finden sind. *Sinorhizobium meliloti* stellt eine Ausnahme dar, weil hier eine 5' UTR mittlerer Länge (170 nt) vorhergesagt wurde. Ein sORF innerhalb der UTRs ist nur bei *Rhodobacter sphaeroides* zu finden.

Zusammenfassend zeigt sich eine starke Konservierung der *dcw* 5' UTRs im Hinblick auf Länge und intrinsischem Terminator, der eine sRNA generiert, in der Familie der *Rhodobacteraceae*.

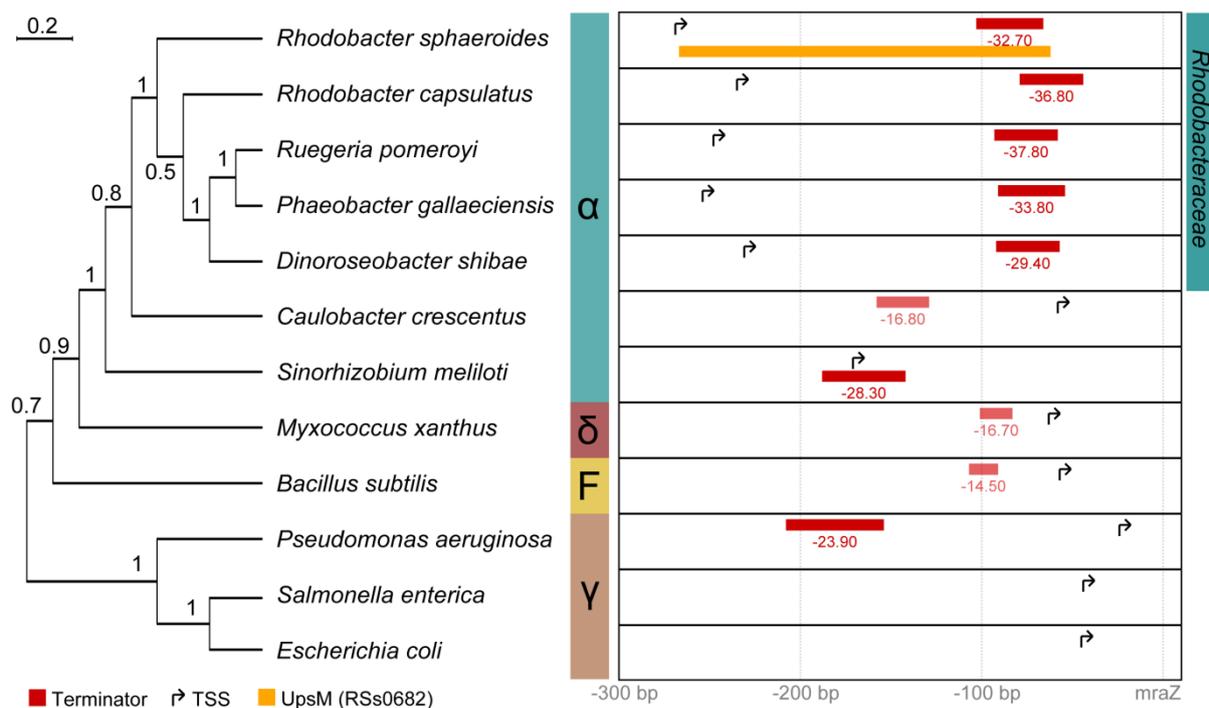


Abbildung 18: Schematische Darstellung der upstream Regionen von *mraZ* in verschiedenen Bakterienspezies. Zur Analyse der Region bis Position -300 ausgehend von *mraZ* wurden öffentlich zugängliche RNA Seq Datensätze der NCBI SRA database (Leinonen *et al.*, 2011) mit ausreichender Qualität für eine TSS *mapping* verwendet (Pfeile). Terminatoren (rot) wurden mittels TransTermHP (Kingsford *et al.*, 2007) vorhergesagt und sind angedeutet, wenn deren MFE (minimum free energy) laut RNAfold (Lorenz *et al.*, 2011) kleiner -10 kcal/mol ist. Basierend auf einem clustalOmega (Sievers *et al.*, 2011) Alignment der Genabschnitte wurde der phylogenetische Baum mit clustalx (Larkin *et al.*, 2007) erstellt. Publiziert in Weber *et al.*, 2016.

3.2.6 Das Prozessierungsmuster von UpsM

Abschnitte 3.2.1 und 3.2.2 zeigen deutlich, dass UpsM durch Transkriptionstermination an einem intrinsischen Terminator (Abbildung 19B) in der 5' UTR des *dcw* Genclusters generiert wird. Wie einleitend erklärt, ist UpsM 206 nt lang und wird nach 76 Nukleotiden prozessiert (Abbildung 19A). Die durch *RNAfold* (Gruber *et al.*, 2008) vorhergesagte Sekundärstruktur zeigt, dass die Prozessierung zwischen einem ungepaartem Cytosin und einem Uracil an einem internen *loop* minimaler Größe von nur einem Ribonukleotidpaar stattfindet, was auf RNase III hinweist (siehe 3.2.9). Die Prozessierung erfolgt *in vivo* unter normalen Wachstumsbedingungen kontinuierlich auf einem basalem Level. In der Gegenwart von $^1\text{O}_2$ wird die Prozessierung jedoch konditionell induziert, was zu einer deutlichen Akkumulation eines stabilen 130 nt langen 3' Fragmentes führt (Abbildung 20A). In diesem Abschnitt wird nun überprüft, ob die Prozessierung auch unter anderen Stressbedingungen induziert werden kann. Hierzu wurden Northern Blots durchgeführt, wobei *R. sphaeroides* 2.4.1 Wildtyp Kulturen in

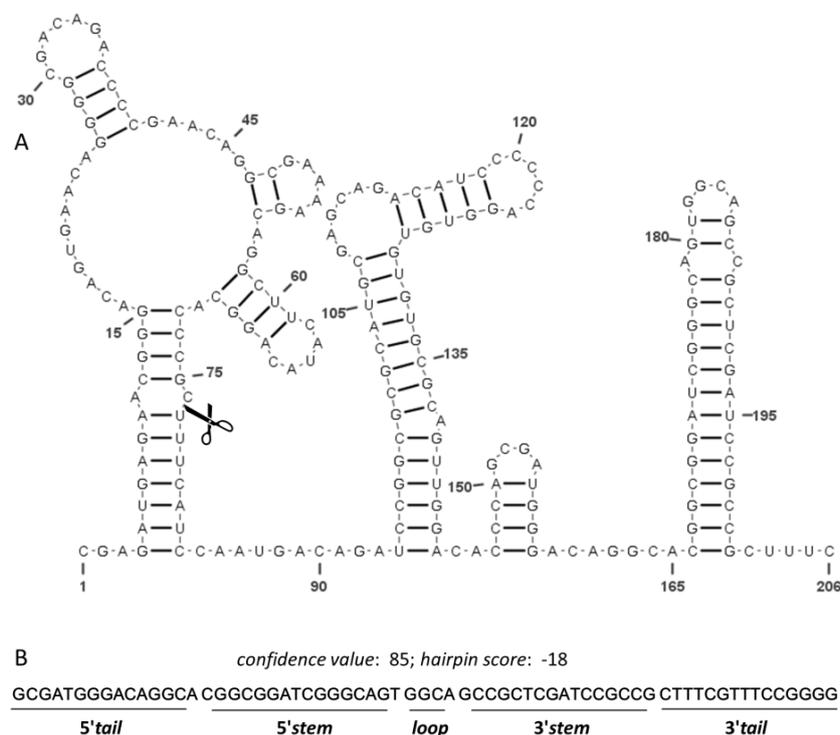


Abbildung 19: (A) Vorhergesagte Sekundärstruktur von UpsM (206nt). Die Vorhersage wurde mit *RNAfold* gemacht und mittels *VARNA* dargestellt. Die Schere symbolisiert die Prozessierungsstelle in der sRNA. **(B) Rho unabhängiger Terminator von UpsM.** Die entsprechende Vorhersage wurde mit dem *webtool TransTermHP* durchgeführt.

der exponentiellen Wachstumsphase zunächst auf eine OD_{660} von 0,2 verdünnt wurden. Ab einer OD_{660} von 0,4 wurden den Kulturen Reagenzien zugefügt, die entsprechende Stressbedingungen verursachen. Falls reaktive Sauerstoffspezies (ROS) generierende Substanzen getestet wurden, erfolgte die Inkubation unter aeroben Bedingungen, ansonsten wurde microaerob kultiviert. Probenentnahmen zur Isolation von Gesamt-RNA mittels *Hot-Phenol* Methode erfolgten vor (t_0) und nach Reagenzienzugabe (Zeitpunkte wie in Abbildung 20). Phototrophes und anaerobes Wachstum erfolgte direkt nach Verdünnung. Im Falle von Hitzestress wurden Kulturen nach Erreichen von OD_{660} 0,4 bei 42°C weiter inkubiert. Zum Testen von stationären Kulturen erfolgte die Probenentnahme 48 h nach Verdünnung. Für den *out-growth (lag)* wurden diese Kulturen auf OD_{660} 0,2 mit frischem Medium rückverdünnt. Um UpsM durch DNA Oligosonden zu detektieren, wurden 5 μg Gesamt-RNA je Probe für die Northern Blot Analyse verwendet. Signale der 5S rRNA

dienten als interne Ladekontrolle. Anhand der Northern blots (Abbildung 20) ist zu erkennen, dass das UpsM (130 nt) Prozessierungsprodukt am deutlichsten und schnellsten während $^1\text{O}_2$ -Stress akkumuliert. Die Akkumulation ist jedoch nicht exklusiv unter dieser Bedingung zu beobachten.

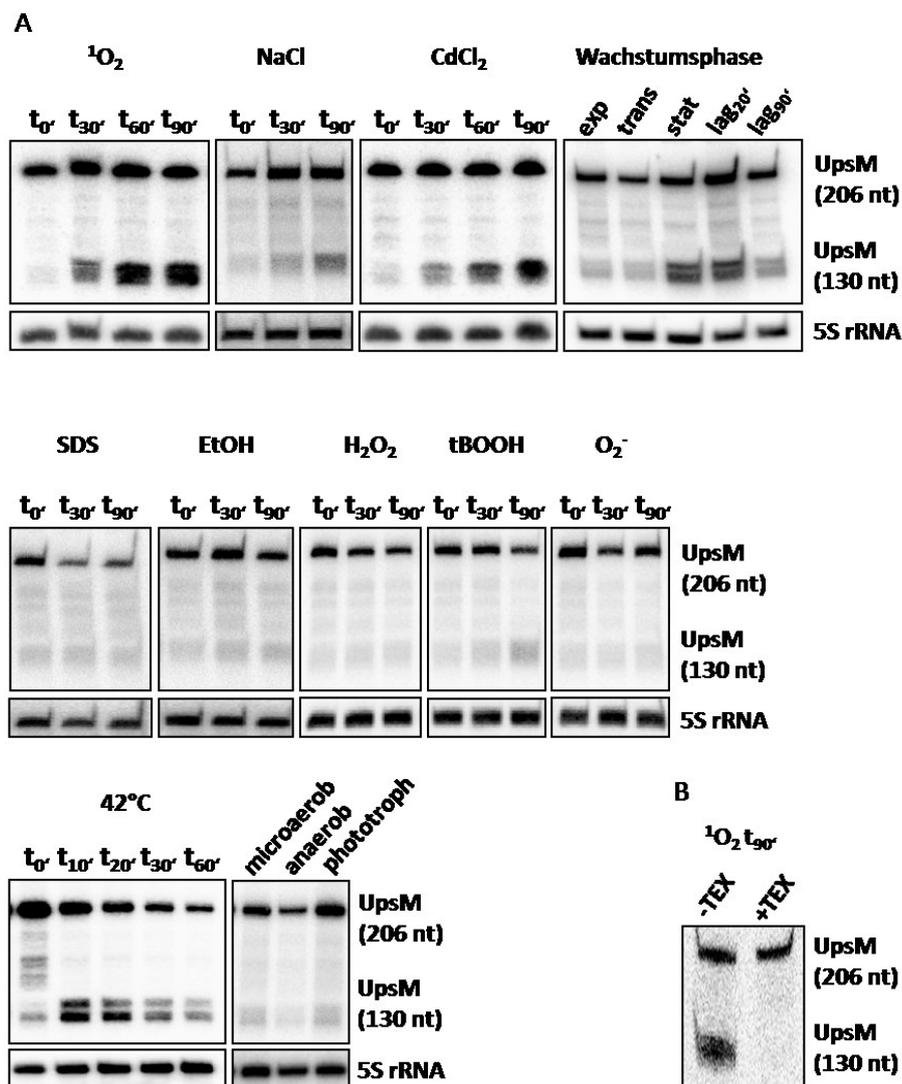


Abbildung 20: (A) Northern blots zur Visualisierung der Prozessierung von UpsM unter verschiedenen Stressbedingungen. Detektion des UpsM-Primärtranskriptes (206 nt) und des UpsM-Prozessierungsproduktes (130 nt) in 5 µg Gesamt-RNA aufgetrennt auf 10%igen TBE/PAA/UREA-Gelen. Nach Entnahme von t₀' Proben wurden folgende Reagenzien zum Generieren folgender Stressbedingungen in den angegebenen Endkonzentrationen zu exponentiellen *R. sphaeroides* 2.4.1b Kulturen gegeben: 0.2 µM Methylenblau in der Gegenwart von 800 Wm⁻² Weißlicht ($^1\text{O}_2$), 500 mM NaCl (osmotischer Druck), 10 µM CdCl₂ (Schwermetall-Stress), 0.005 % SDS mit 1mM EDTA (Membranintegrität), 2.5 % Ethanol (Membranintegrität), 300 µM tBOOH (oxidativer Stress), 1mM H₂O₂ (oxidativer Stress) und 250 µM Paraquat (oxidativer Stress durch O₂⁻). Für Hitzestress wurden Kulturen bei 42°C inkubiert. Zum Testen von stationären Kulturen erfolgte die Probenentnahme 48 h nach Verdünnung auf OD₆₆₀ 0,2. Für lag Phasen wurden diese Kulturen mit frischem Medium rückverdünnt. Zusätzlich wurden anaerobe und phototrophe Kulturen im exponentielle Wachstum getestet. Signale der 5S rRNA dienen als interne Ladekontrolle. **(B) Northern blot zur Visualisierung der Prozessierung von UpsM in TEX behandelter gesamt RNA.** Detektion des UpsM-Primärtranskriptes (206 nt) und des UpsM-Prozessierungsproduktes (130 nt) nach 90 min $^1\text{O}_2$ -Stress in 4 µg TEX behandelte Gesamt-RNA aufgetrennt mittels 10%igen TBE/PAA/UREA-Gel. Als Kontrolle wurde unbehandelte RNA geladen.

Auch unter osmotischem Druck durch NaCl und in Gegenwart hoher Konzentrationen des Schwermetalls CdCl₂ wird das 3' Fragment von UpsM mit der Zeit angereichert. Zusätzlich liegen

erhöhte Mengen während der stationären Wachstumsphase vor. Bei Verdünnung der stationären Kultur bzw. Wiedereintritt in das exponentielle Wachstum ist spätestens nach 90 Minuten nur noch ein basales UpsM (130 nt) Level nachzuweisen. Hitzestress bei 42°C verursacht ebenfalls eine rapide Anreicherung des Prozessierungsproduktes, die hier nach 10 Minuten gezeigt ist, wobei im Unterschied zu $^1\text{O}_2$ -, NaCl- und CdCl₂-Stress die Anreicherung bei 42°C mit einer deutlichen Mengenabnahme des Primärtranskriptes einhergeht. Diese Abnahme setzt sich bis Ende des Experimentes bzw. bis zu 60 min Hitzestress kontinuierlich fort. Nach der initialen Anreicherung bei 10 Minuten ist eine ähnlich kontinuierliche Abnahme auch für das Transkriptlevel des Prozessierungsproduktes zu erkennen. Sowohl das schnelle Entstehen des Prozessierungsproduktes als auch die Abnahme von UpsM (206 nt) und UpsM (130 nt) sind wahrscheinlich auf eine erhöhte RNase Aktivität und/oder Strukturveränderungen bei 42°C zurückzuführen.

Keine Induktion der Prozessierung ist durch SDS/EDTA und EtOH vermittelten Membranstress zu beobachten. Auch ROS-Stress durch H₂O₂, organisches Peroxid tBOOH oder Superoxid erzeugende Paraquat führt zu keinem deutlichen Anstieg der Prozessierungshäufigkeit.

Generell ist das Expressionslevel des Primärtranskriptes von UpsM in der Zelle fast immer gleich und völlig unabhängig von jeglichen getesteten Stressbedingungen. Dies scheint jedoch nicht der Fall zu sein, wenn mikroaerobes- oder aerobes Wachstum mit phototrophem Wachstum verglichen wird. Erfolgt eine Quantifizierung der Signale mit der Software *Quantity One* und Normalisierung anhand der Ladekontrolle, erhält man bei Vergleich zu mikroaeroben Bedingungen eine größere bzw. die 2,1 fache UpsM Menge bei phototrophen Wachstum. Unter aneroben Bedingungen ist der Unterschied hingegen gering (0,85 fache UpsM Menge). Unterschiede bezüglich des Prozessierungsmusters sind bei Veränderung der Wachstumsbedingung nicht zu dokumentieren.

Um abzusichern, dass es sich bei UpsM (130) um ein Prozessierungsprodukt und kein weiteres Primärtranskript handelt, wurde außerdem ein Northern blot zur Visualisierung der Prozessierung von UpsM in TEX behandelte gesamt-RNA nach 90 Minuten $^1\text{O}_2$ -Stress durchgeführt (Abbildung 20B). Als Kontrolle wurde die gleiche RNA ohne TEX Behandlung geladen. Das Enzym TEX (Terminator-5'-Phosphat-abhängige Exonuklease) verdaut RNA nur, wenn ein 5' Monophosphat vorliegt, wie es beispielsweise für Prozessierungsprodukte der Fall ist. Primärtranskripte sind durch ein 5'-triphosphat vor TEX geschützt. Da UpsM (130 nt) also nach TEX Behandlung nicht mehr detektiert werden kann, muss es sich hierbei um ein 5'-monophosphoryliertes Prozessierungsprodukt handeln.

3.2.7 Halbwertszeitbestimmung von UpsM

Um die sRNA UpsM und deren Prozessierungsprodukt weiter zu charakterisieren, wurden deren Halbwertszeiten berechnet. Dies ist wichtig, weil nicht nur die Expression der Transkripte sondern auch deren Stabilität darüber entscheidet, wie lange und in welcher Menge sie in der Zelle vorliegen. Hierzu wurden *R. sphaeroides* 2.4.1b Kulturen für 90 Minuten aerob unter $^1\text{O}_2$ -Stress inkubiert. Nach Entnahme der t₀ Probe wurde die Transkription durch Zugabe von Rifampicin gestoppt. Weitere Probenentnahmen fanden nach definierten Zeiträumen statt. Die Isolierung von Gesamt-RNA erfolgte durch die *Hot-Phenol* Methode. Um UpsM (206 nt und 130 nt) durch *end-labeling* radioaktiv markierte DNA Oligosonden zu detektieren, wurden 10 µg Gesamt-RNA je Probe für die Northern Blot Analyse verwendet (Abbildung 21A). Signale der 5S rRNA dienten als interne Ladekontrolle. Signalintensitäten wurden mit der Software *Quantity One* gemessen und anhand der Ladekontrollen normalisiert. Dies ist möglich, weil die 5S rRNA eine sehr stabile RNA Spezies ist. Die Abnahme der Signale wurde zuletzt graphisch bzw. halblogarithmisch dargestellt, wobei anhand der

Exponentialfunktion der Ausgleichsgerade durch die initiale Abbauphase die Halbwertszeit der RNA berechnet wurde (Abbildung 21A). Hierbei ließen sich deutliche Unterschiede zwischen Primärtranskript ($t_{1/2} = 2,6 \pm 0,28$ min) und Prozessierungsprodukt ($t_{1/2} = 11,26 \pm 2,75$ min) feststellen. Das Prozessierungsprodukt ist anfangs wesentlich stabiler. Dies könnte die Akkumulation des Prozessierungsproduktes (siehe 3.2.6) gegenüber dem Primärtranskript, beispielsweise während $^{1}O_2$ -Stress, begünstigen.

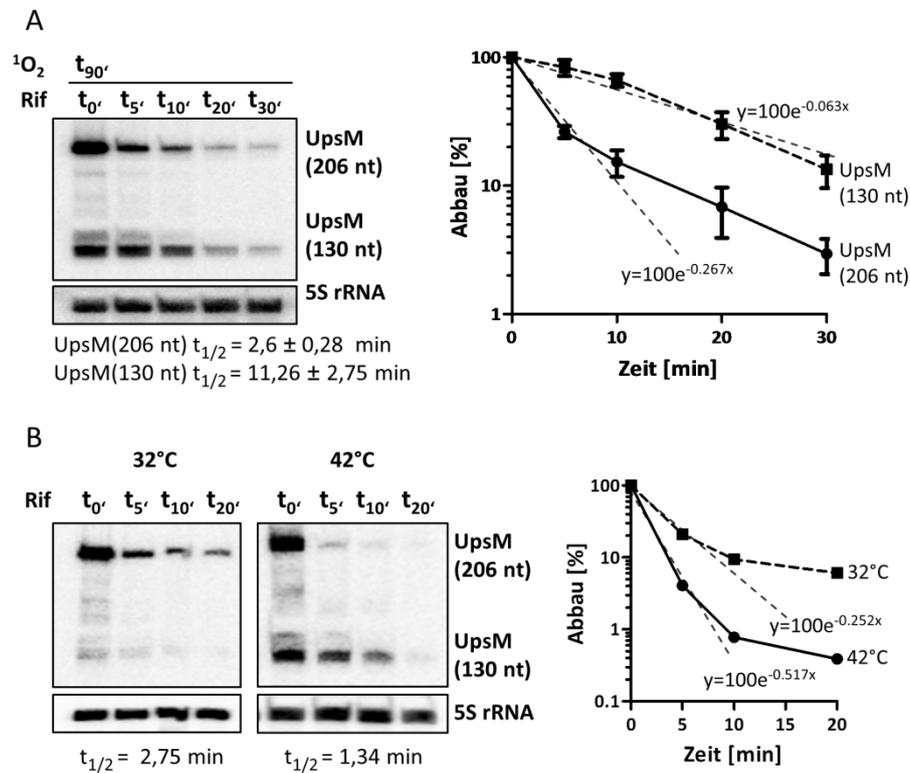


Abbildung 21: Ermittlung von Halbwertszeiten für UpsM mittels Northern blot. Links ist exemplarisch die Detektion des UpsM-Primärtranskriptes (206 nt) und des UpsM-Prozessierungsproduktes (130 nt) in 10 μ g Gesamt-RNA aufgetrennt auf 10%igen TBE/PAA/UREA-Gelen gezeigt. Signale der 5S rRNA dienen als interne Ladekontrolle. Die Transkription wurde durch Zugabe von Rifampicin bei Zeitpunkt t_0' gestoppt. Weitere Probenentnahmen erfolgten zu den angegebenen Zeitpunkten. UpsM Signalintensitäten wurden gemessen und anhand der Ladekontrollen normalisiert. Rechts sind die prozentualen Abbauraten halblogarithmisch gegen die Zeit dargestellt. Anhand der Exponentialfunktion der Ausgleichsgeraden durch die initiale Abbauphase wurden Halbwertszeiten berechnet. (A) Halbwertszeit von Primärtranskript (206 nt) und Prozessierungsprodukt (130 nt) nach 90 minütiger aerober Kultivierung unter $^{1}O_2$ -Stress. Halbwertszeiten und Standardabweichungen resultieren aus biologischen Triplikaten. (B) Stabilitätsvergleich von UpsM (206 nt) während Hitzestress (42°C) und Wachstum beim Temperaturoptimum (32°C) unter microaeroben Bedingungen. Für Hitzestress wurde die Kultur bereits 10 min vor Rifampicinzugabe bei 42°C inkubiert. Die berechnete Halbwertszeit resultiert aus einem Einzelexperiment.

Weil ein geringeres bzw. schneller abnehmendes Transkriptlevel für UpsM (206 nt) unter Hitzestress beobachtet wurde (3.2.6), wurde die Halbwertszeit für das Primärtranskript auch unter dieser Bedingung ermittelt. Hierzu wurde eine *R. sphaeroides* 2.4.1b Kultur für 10 Minuten microaerob bei 42°C inkubiert. Dann erfolgte die Entnahme der t_0' Probe und die Zugabe von Rifampicin. Weitere Proben wurden nach definierten Zeiträumen entnommen, während die Kultur weiter bei 42°C inkubiert wurde. Als direkter Vergleich dienten Proben, die einer Kultur mit 32°C Inkubationstemperatur entstammen. Die Auswertung des Experiments erfolgte wie oben beschrieben. Die ermittelte Halbwertszeit für das Primärtranskript bei 42°C liegt bei 1,34 Minuten, während dieser Wert bei 2,75 Minuten liegt, wenn die Kultur beim Temperaturoptimum von 32°C inkubiert wurde. Die deutlich geringere Stabilität während Hitzestress bestätigt die oben getätigte Annahme, dass sowohl das schnelle Entstehen des Prozessierungsproduktes als auch die Abnahme

von UpsM (206 nt) und UpsM (130 nt) bei 42°C (Abbildung 20) auf erhöhte Aktivität von RNasen und/oder Strukturveränderungen zurückzuführen sind, die die Prozessierung begünstigen. Somit ist eine aktive Transkriptionsrepression von UpsM bei Hitzstress sehr unwahrscheinlich.

3.2.8 Hfq Bindung und Einfluss auf die Prozessierung von UpsM

In einer vorangehenden Arbeit zu dieser Dissertation wurde bereits demonstriert, dass UpsM und dessen Prozessierungsprodukt an Hfq binden. Hfq ist ein weit verbreitetes monohexameres RNA Bindeprotein der Sm-like Superfamilie (Sun *et al.*, 2002) und erfüllt die Funktionen eines RNA Chaperons. Genauer gesagt vermittelt das Protein die Duplexbildung zwischen sRNA und mRNA trotz imperfekter Basenpaarung (Papenfort & Vogel, 2009) und schützt sRNAs vor Nukleasenabbau, insbesondere vor initialer RNase E Spaltung (Folichon *et al.*, 2003; Moll *et al.*, 2003). In *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 wurden Hfq bindende sRNAs mittels Hfq-FLAG coimmunopräzipitiert und quantifiziert. Der größte Anteil identifizierter sRNAs von über 60 % entspricht hierbei UpsM Transkripten (Berghoff *et al.*, 2011).

Um die Coimmunopräzipitation zu bestätigen und weil es sich bei der Interaktion von UpsM und Hfq um ein geeignetes Model handelt, wurde die 3' terminale Biotinylierung von RNA *in vitro* und deren Verwendung in *pulldown* Experimenten etabliert. Hierzu wurden 40 pmol gereinigtes UpsM *in vitro* Transkript an der 3' terminalen Ribose chemisch markiert. Die Biotinylierungseffizienz wurde mittels Streptavidin-*shift* in einem Ethidiumbromid gefärbtem TBE Agarosegel überprüft, nachdem ca. 2 pmol Transkript in einer Bindungsreaktion mit einem Überschuss oder ohne Streptavidin inkubiert wurde (Abbildung 22A). Das Biotin an den 3' Enden führt zur Komplexbildung mit Streptavidin und somit zu einem deutlich höheren Laufverhalten im Gel, als dies für Transkripte ohne Biotin oder ohne Streptavidin der Fall wäre. In Abbildung 22A ist ein fast vollständiger *shift* zu erkennen, was auf eine Markierungseffizienz von über 90 % schließen lässt. Die verbleibende Transkriptmenge wurde im Zuge des *pulldowns* zunächst an geblockte Streptavidin Agarose gebunden und dann mit zellfreiem Extrakt der komplementierten Deletionsmutante *R. sphaeroides* 2.4.1 Δ hfq (pRKhfqFLAG) inkubiert. Nach mehreren Waschrissen erfolgte die Elution von gebundenem Hfq-FLAG durch die Zugabe von SDS-Ladepuffer und anschließende Hitzedenaturierung. Zuletzt wurden Hfq-FLAG Monomere (~ 12 kDa) auf einem Western blot mittels monoklonalem Peroxidase-gekoppelten FLAG-Antikörper nachgewiesen (Abbildung 22B). Das resultierende Signal, das im Kontrollexperiment mit Transkripten ohne Biotin nicht zu sehen ist, bestätigt die Bindung von Hfq an UpsM *in vivo*. Zusätzlich zeigt es, dass die Methode prinzipiell auf Fragestellungen dieser Art anwendbar ist.

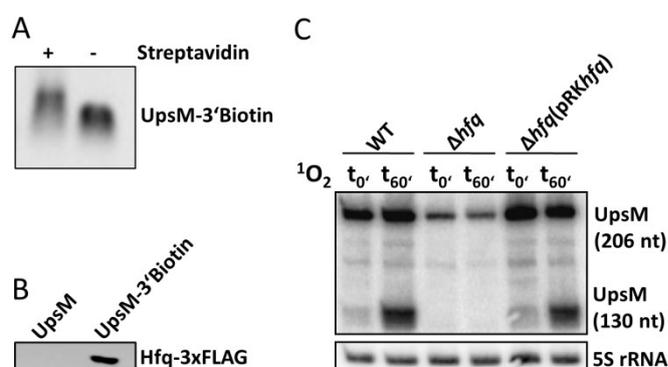


Abbildung 22: (A und B) Hfq-FLAG *pulldown* mittels biotinylierten UpsM Transkripten. (A) Kontrolle der Biotinylierungseffizienz anhand eines Streptavidin *shift* in einem Ethidiumbromid gefärbten TBE Agarosegel. (B) Detektion von Hfq-FLAG monomeren (~ 12 kDa) auf einer Western blot Membran durch monoklonalen Peroxidase-gekoppelten FLAG-Antikörper. Die Auftrennung des Eluats erfolgte mittels 16 %iger SDS-PAGE (C) **Northern blot zur Visualisierung von UpsM Primärtranskript und Prozessierung in Abwesenheit von Hfq.** Spezifische Transkripte wurden in 5 µg Gesamt-RNA der Deletionsmutante *R. sphaeroides* 2.4.1 Δ hfq im Vergleich zum Wiltyp und Komplementation vor und nach ¹O₂-Stress detektiert. Die Auftrennung erfolgte durch ein 10 %iges TBE/PAA/UREA-Gel. Signale der 5S rRNA dienen als interne Ladekontrolle.

Neben der Bindung von Hfq an UpsM konnten Northern Blots zeigen, dass die Prozessierung von UpsM in Abwesenheit des RNA Chaperons trotz $^1\text{O}_2$ -Stress nicht mehr induziert werden kann (Abbildung 22C). Hierzu wurde die Deletionsmutante *R. sphaeroides* 2.4.1 Δhfq mit dem Wildtyp verglichen. Zusätzlich ist der Abbildung zu entnehmen, dass das UpsM Primärtranskript in geringerer Menge in der Mutante vorliegt. Wahrscheinlich ist dies auf eine geringere Transkriptstabilität ohne Hfq Bindung zurückzuführen. Wird die Deletionsmutante durch ektoische Hfq Expression komplementiert, ist sowohl das Primärtranskriptlevel als auch das Prozessierungsmuster nach $^1\text{O}_2$ -Stress wie im Wildtyp.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass es sich bei UpsM um eine Hfq abhängige sRNA handelt, wobei sogar die induzierbare Prozessierung des Transkriptes nur in Anwesenheit des Proteins möglich ist. Dies wirft die Frage auf, ob UpsM nur bei einer Hfq vermittelten Duplexbildung mit einer Ziel-mRNA, die bei $^1\text{O}_2$ -Stress exprimiert wird, gespalten werden kann.

3.2.9 Einfluss verschiedener RNA Abbauenzyme auf die UpsM Prozessierung

Ein Ziel dieser Arbeit war es, die Endoribonuklease zu identifizieren, welche an der Prozessierung von UpsM beteiligt ist. Bei der vorhergesagten Sekundärstruktur (Abbildung 19A) liegt die Prozessierungsstelle zwischen einem ungepaarten Cytosin und einem Uracil an einem internen *loop* minimaler Größe von nur einem Ribonukleotidpaar in einer helikalen Struktur. Dies entspricht am ehesten einer RNase III (*rnc*) Schnittstelle. Zwar ist es schwierig, verschiedenen Nukleasen genaue Substratspezifitäten zuzuordnen, jedoch ist RNase III die einzige bakterielle dsRNA spezifische Endoribonuklease die in helikalen RNA-Strukturen schneidet (Conrad *et al.*, 1998). Aus diesem Grund wurde eine Δrnc Deletionsmutante von *R. sphaeroides* 2.4.1b generiert. Hierzu wurden zunächst *upstream* und *downstream* Fragmente von *rnc* mit den Primerpaaren *rnc_ko_up_f/rnc_ko_up_r* bzw. *rnc_ko_down_f/ rnc_ko_down_r* amplifiziert und mit einer mittigen Km-Resistenzkassette aus pUC4K in das Suizid-Plasmid pPHU281 ligiert. Das resultierende pPHU-Plasmid inseriert die Km-Kassette durch homologe Rekombination mit Hilfe der *upstream* und *downstream* Bereiche des *rnc* Gens nach Konjugation in das Genom von *R. sphaeroides*. Das Plasmid selbst besitzt eine Tc-Resistenz und kann in *Rhodobacter* nicht replizieren. Deshalb können Klone auf Kanamycin selektiert und anschließend auf Absterben in Gegenwart von Tetracyclin getestet werden, um zu zeigen, dass das *rnc* Gen bei einem *double crossover* durch die Km-Kassette ersetzt wurde und kein *single crossover* zur Insertion des Plasmids in das Genom geführt hat. Zur Verifizierung selektierter Klone wurde zusätzlich 1 μg Gesamt-RNA auf einem 10 %igen PAA/TBE/UREA-Gel aufgetrennt und abundante ribosomale RNA Spezies wurden mittels Ethidiumbromid Färbung visualisiert (Abbildung 23). In *Rhodobacter sphaeroides* und anderen α -Proteobakterien wird die maturierte 23S rRNA weiteren Prozessierungsschritten unterzogen, wobei die initiale Spaltung zur Reifung von 16S rRNA, 14S rRNA und 5,8S rRNA von RNase III ausgeführt wird (Evguenieva-Hackenberg & Klug, 2000). Die Gesamt-RNA aus *R. sphaeroides* 2.4.1b Δrnc bestätigt die Deletion, weil hier im Gegensatz zum Wildtyp eine intakte 23S rRNA aber keine 14S und 5.8S rRNA zu erkennen ist.

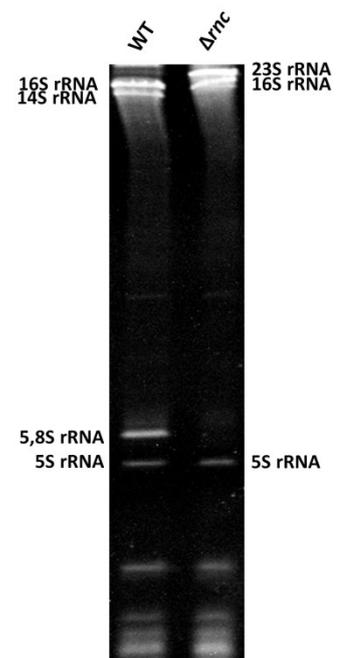


Abbildung 23: Verifizierung einer *rnc* Deletion. Zu sehen ist 1 μg Ethidiumbromid gefärbte Gesamt-RNA des Stammes *R. sphaeroides* 2.4.1b Δrnc im Vergleich zum Wildtyp. Die Auftrennung erfolgte mit einem 10 %igen PAA/TBE/UREA-Gel.

Um nun zu überprüfen, ob die Prozessierung von UpsM RNase III abhängig ist, wurden Northern Blots durchgeführt. Hierbei wurden *R. sphaeroides* 2.4.1b Δrnc und Wildtyp Kulturen in der exponentiellen Wachstumsphase zunächst auf eine OD₆₆₀ von 0,2 verdünnt. Nach einer Verdopplung bei aeroben Wachstumsbedingungen wurde die Prozessierung durch 90 minütigen ¹O₂-Stress induziert. Proben zur RNA Isolierung wurden vor (t₀) und nach Stress (t₉₀) entnommen. Die Northern Blot Analyse erfolgte wie bereits beschrieben (3.2.6). Anhand der Signale der linken Membran in Abbildung 24 ist zu erkennen, dass sich das induzierte Prozessierungsmuster von UpsM jedoch nicht zwischen *rnc* Deletionsmutante und WT unterscheidet. Folglich ist die Spaltung des Transkripts RNase III unabhängig.

Aufgrund dieser Unabhängigkeit von RNase III wurden weitere Deletionsmutanten von Genen, die am RNA Abbau beteiligt sind, auf gleiche Weise überprüft. Bei RNase J (*rnj*) handelt es sich um eine Exoribonuklease, die RNA in 5'-3' Orientierung degradiert (Rische & Klug, 2012; Rische-Grahl *et al.*, 2014). RNase R (*rnr*) ist eine 3'-Exoribonukleasen und die RNA-Phospho-Hydrolase RppH (*rppH*) gehört zur Proteinfamilie der Nudix-Phosphohydrolasen und entfernt das γ - und β -Phosphat am 5'-Ende eines Primärtranskriptes und schafft somit ein bevorzugtes RNase E Substrat (Belasco, 2010). Zusammenfassend ist jedoch zu sagen, dass keines dieser Enzyme an der Prozessierung von UpsM beteiligt ist, weil die Prozessierung weiterhin wie im Wildtyp induziert wird (Abbildung 24). Die Ergebnisse lassen also darauf schließen, dass eine andere RNase an der Spaltung von UpsM beteiligt ist.

Hierfür kommt nun, vor allem nachdem RNase III ausgeschlossen wurde, am ehesten die Endoribonuklease RNase E (*rne*) in Frage. Die initiale Spaltung von RNA wird in gram-negativen Bakterien weitestgehend RNase E zugeschrieben, weshalb das Protein essentiell für das Überleben dieser Bakterien ist. Aus diesem Grund konnte nicht einfach eine Deletionsmutante generiert und wie in diesem Absatz beschrieben vorgegangen werden.

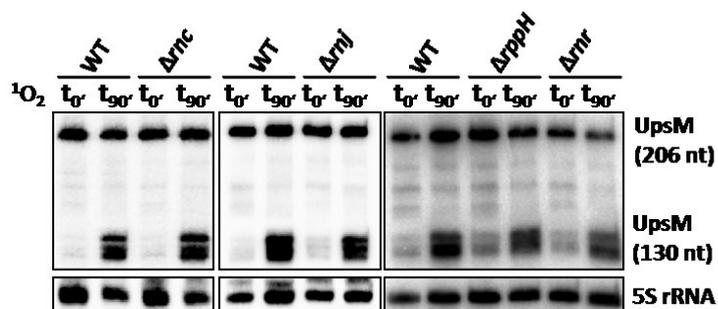


Abbildung 24: Northern blots zur Visualisierung der Prozessierung von UpsM in verschiedenen *R. sphaeroides* Deletionsmutanten, die den RNA Abbau betreffen. Detektion des UpsM-Primärtranskriptes (206 nt) und des UpsM-Prozessierungsproduktes (130 nt) in 5 μ g Gesamt-RNA aufgetrennt auf 10 %igen TBE/PAA/UREA-Gelen. Nach Entnahme von t₀ Proben wurde in Kulturen durch Zugabe von 0.2 μ M Methylenblau in Gegenwart von 800 Wm⁻² Weißlicht ¹O₂-Stress erzeugt. Eine weitere Probenentnahme erfolgte nach 90 min. Signale der 5S rRNA dienen als interne Ladekontrolle.

3.2.10 Expression und Prozessierung von UpsM in *E. coli*

Wie im vorangehenden Abschnitt diskutiert, ist nach Ausschluss anderer Enzyme eine Spaltung von UpsM durch die Endoribonuklease RNase E sehr wahrscheinlich. Um dies zu überprüfen, lässt sich jedoch keine *R. sphaeroides* Deletionsmutante generieren, weil das Protein essentiell ist. Eine Alternative ist, die sRNA in *E. coli* N3431 zu exprimieren. Dieser *E. coli* Stamm trägt die *rne-3071(ts)* Mutation und exprimiert eine termosensitive (ts) RNase E Variante, die aufgrund eines Aminosäureaustausches keine katalytische Aktivität bei einer subletalen Wachstumstemperatur von 42°C aufweist (Apririon, 1978; Goldblum & Apririon, 1981). Zur Expression der sRNA in *E. coli* wurde das Plasmid p0682 generiert, indem die sRNA Sequenz inklusive des Promotors mit dem Primerpaar

PstI0682_f/Hind0682down_r amplifiziert und in das Plasmid pBBR1-TT-MSC5-Ptac (Binnenkade *et al.*, 2014) inseriert wurde. In diesem Vektor steht die Expression von UpsM unter Kontrolle eines sehr starken konstitutiven *tac* Promotors, bei dem es sich um einen Hybrid aus *trp* und *lac* Promotor handelt (de Boer *et al.*, 1983). Zur Untersuchung der Prozessierung der sRNA in *E. coli* musste zunächst mittels Northern Blots überprüft werden, ob die sRNA überhaupt stabil exprimiert wird und ob eine vergleichbare Prozessierung durch Hitze- oder $^1\text{O}_2$ -Stress induzierbar ist. Um Ersteres zu zeigen, wurde der Stamm *E. coli* JM109 (pB0682) und *E. coli* JM109 als Kontrolle in Minimalmedium M9 inkubiert. Probenentnahme zur RNA Isolierung erfolgte während des exponentiellen Wachstums. UpsM wurde in 15 μg *E. coli* Gesamt-RNA je Probe detektiert (Abbildung 25A). Als Marker bzw. Größenstandard wurden parallel 5 μg Gesamt-RNA von *R. sphaeroides* Kulturen nach $^1\text{O}_2$ -Stress

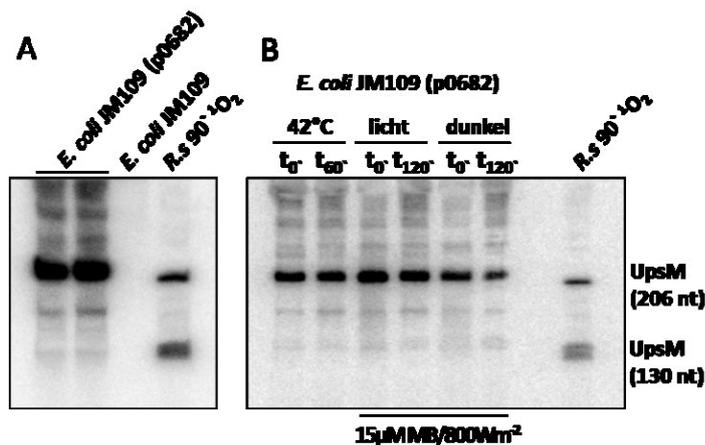


Abbildung 25: Northern blots zur Visualisierung des Primärtranskriptes und Prozessierungsproduktes von UpsM in *E. coli* (p0682). Detektion in 15 μg *E. coli* Gesamt-RNA aufgetrennt auf 10%igen TBE/PAA/UREA-Gelen. Als Größenstandard wurden 5 μg Gesamt-RNA von *R. sphaeroides* Kulturen nach $^1\text{O}_2$ -Stress geladen. (A) Detektion ohne Stressbedingungen im Vergleich zur Negativkontrolle (*E. coli* JM 109). (B) Detektion vor (t_0) und nach 60 Minuten Hitze- bzw. 120 Minuten $^1\text{O}_2$ -Stress.

geladen, weshalb in dieser Spur das bekannte UpsM Primärtranskript (206 nt) und Prozessierungsprodukt (130 nt) zu sehen ist. In *E. coli* JM109 (pB0682) Gesamt-RNA ist ebenfalls das heterolog exprimierte Primärtranskript, das aufgrund von 4 zusätzlichen Nukleotiden am 5'Ende etwas höher verläuft, zu detektieren. Allerdings ist keine deutliche Prozessierung in *E. coli* nachzuweisen. Im Kontrollstamm, der als Negativkontrolle dient, ist nichts zu detektieren. Um die Prozessierung durch Hitze- oder $^1\text{O}_2$ -Stress zu induzieren, erfolgte die Probenentnahme für RNA Isolierungen während des exponentiellen Wachstums in M9 Medium vor (t_0) und nach 60 Minuten Hitze- bzw. 120 Minuten $^1\text{O}_2$ -Stress. Hitzestressbedingungen wurden durch einen Temperatur-*shift* auf 42°C hergestellt. Im Falle von $^1\text{O}_2$ -Stress mussten zunächst subletale Bedingungen ermittelt werden (nicht gezeigt), die durch 15 μM Methylenblau bei 800 Wm^{-2} Weißlicht hergestellt werden können. Relativ zu *R. sphaeroides* ist *E. coli* somit deutlich resistenter gegen $^1\text{O}_2$. Die Detektion der Transkripte wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Als Marker bzw. Größenstandard wurde erneut Gesamt-RNA von *R. sphaeroides* Kulturen nach $^1\text{O}_2$ -Stress geladen (Abbildung 25B). In *E. coli* Gesamt-RNA ist wieder das heterolog exprimierte Primärtranskript zu erkennen. Allerdings ist trotz Stressbedingungen kein vergleichbares 3'Fragment bzw. Prozessierungsprodukt von UpsM für *E. coli* nachzuweisen. Aus diesem Grund sind angedachte Experimente im Stamm *E. coli* N3431 bzw. in Gegenwart einer thermosensitiven RNase E Variante nicht durchführbar. Die fehlende Induzierbarkeit der Prozessierung von UpsM in *E. coli*, ist zusätzlich ein Hinweis darauf, dass die Prozessierung in *R. sphaeroides* abhängig von der Duplexbildung der sRNA mit einer Ziel-mRNA ist, wobei diese nur in *R. sphaeroides* unter Stressbedingungen exprimiert wird.

3.2.11 Die UpsM Prozessierung durch RNase E *in vivo*

Absatz 3.2.10 zeigt, dass die Prozessierung von UpsM in *E. coli* in Gegenwart einer thermosensitiven RNase E nicht zu untersuchen ist. Um also einen Nachweis *in vivo* zu führen, müsste eine *R. sphaeroides* Mutante mit thermosensitiver (*ts*) RNase E generiert werden. Anhand von Proteinalignments mit bekannten *ts* Varianten ist jedoch nicht zu erkennen, welche AS in dem essentiellen Enzym von *R. sphaeroides* ausgetauscht werden müssten. Eine andere Möglichkeit zum Generieren einer *ts* Mutante wäre der klassische Weg über ungerichtete Mutagenesen und zeitaufwändige Selektionszyklen bei Hitzestress. Deshalb, und weil keine einfache Deletion der essentiellen RNase E möglich ist, wurde hier die native proteinkodierende *rne* Sequenz im Genom von *R. sphaeroides* durch die proteinkodierende *rne*-3071(*ts*) Sequenz aus *E. coli* N3431 mit einem Resistenzgen zur Selektion ersetzt (Abbildung 26A). Hierzu wurden zunächst *upstream* und *downstream* Fragmente von *rne*^{*R.s.*} zur homologen Rekombination mit den Primerpaaren R.s.rneUP_f/R.s.rneUP_r bzw. R.s.rneDOWN_f/R.s.rneDOWN_r amplifiziert. Mit Primerpaar E.c.rne_fw/E.c.rne_rev wurde der *rne*^{*E.c.ts*} Genort vervielfältigt. Durch die Verwendung einer angehängten NdeI Erkennungssequenz am 3' Ende des *upstream* Fragmentes und am 5' Ende der *rne*^{*E.c.ts*} kodierenden Sequenz bleibt im Endplasmid als auch nach Rekombination im Genom von *R. sphaeroides* sowohl das native ATG von *rne*^{*R.s.*} als auch der Abstand zu nativem Promotor und RBS erhalten. Lediglich an der unerheblichen Position -1 findet ein Basenaustausch (A→T) statt (Abbildung 26A). Weitere Klonierungsschritte sind dem Anhang 2 zu entnehmen. Der resultierende pPHU-Vektor inseriert *rne*^{*E.c.ts*} und Sp-Kassette durch homologe Rekombination nach Konjugation in den *rne*^{*R.s.*} Genort. Das Plasmid selbst besitzt eine Tc-Resistenz und kann in *Rhodobacter* nicht replizieren. Deshalb können Klone auf Spectinomycin selektiert und anschließend auf Absterben in

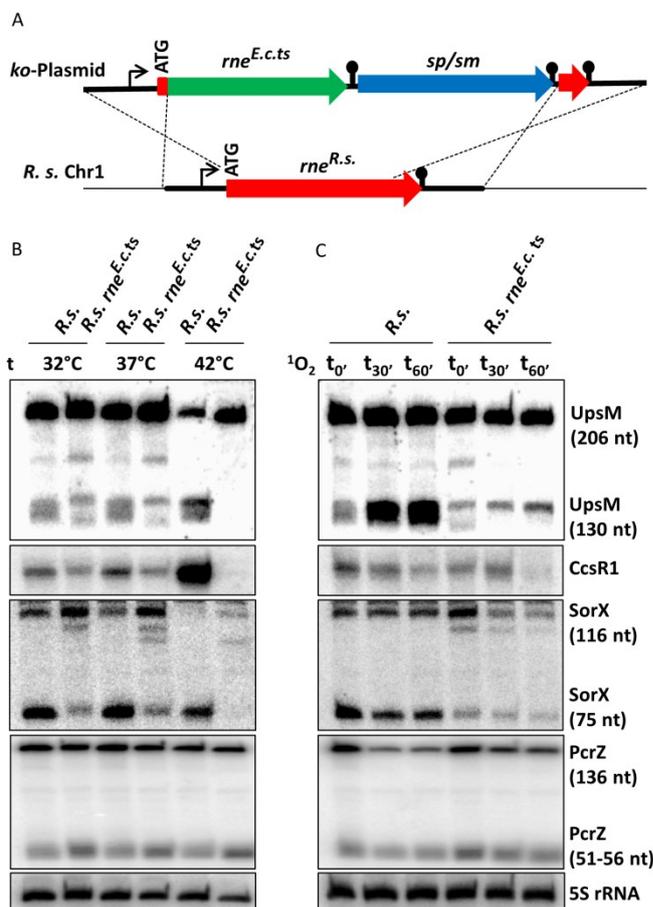


Abbildung 26: Prozessierung durch RNase E *in vivo*. (A) Schematische Darstellung von Suizidvektor und dessen homologe Rekombination mit dem *rne* Genort von *R. sphaeroides*. Die resultierende Insertionsdeletionsmutante *R. sphaeroides rne*^{*E.c.ts*} enthält statt der nativen *rne* kodierenden Region die *rne*-3071(*ts*) Sequenz von *E. coli* N3431 mit einem Sp Resistenzgen zur Selektion. Sowohl das native ATG von *rne*^{*R.s.*}, als auch der Abstand zu nativem Promotor und RBS bleiben nach Rekombination erhalten. (B,C) Northern Blot zur Detektion gereifter und prozessierter sRNAs in 10 µg Gesamt-RNA aus Mutante und Wildtyp aufgetrennt auf 10 %igen TBE/PAA/UREA-Gelen. Signale der 5S rRNA dienen als interne Ladekontrolle. (B) Probenentnahmen von Kultur zur Isolierung von RNA erfolgte nach einer Verdopplung bei 32°C und anschließender 30 minütiger Kultivierung bei 32°C, 37°C oder 42°C. (C) Nach Entnahme von *t*₀ Proben wurde in Kulturen durch Zugabe von 0,2 µM Methylenblau in der Gegenwart von 800 Wm⁻² Weißlicht ¹O₂-Stress erzeugt. Weitere Probenentnahmen erfolgten nach 30 und 60 min.

Gegenwart von Tetracyclin getestet werden, um zu zeigen, dass ein *double crossover* und kein *single crossover* bzw. Insertion des Plasmids in das Genom stattgefunden hat. Selektierter Klone wurden mittels PCR verifiziert (nicht gezeigt). Des Weiteren ist die Deletionsinsertionsmutante *Rhodobacter sphaeroides rne^{E.c.ts}* eindeutig anhand einer geringeren Pigmentierung im Vergleich zum parental Wildtyp zu identifizieren. Dies ist sowohl in Ganzzell- als auch zellfreien Spektren und bei Bakteriochlorophyllmessungen von mikroaeroben Kulturen im exponentiellen Wachstum zu beobachten (Anhang 3ABC). Vor allem bei phototrophen Kulturen führt dies zu einem deutlichen Wachstumsdefizit (Anhang 3D).

Zur Visualisierung der UpsM Prozessierung mittels Northern Blots bzw. zur Probennahme wurden Kulturen von Mutante und Wildtyp nach einer Verdopplung bei 32°C für 30 Minuten bei einer Temperatur von 32°C, 37°C oder 42°C weiter inkubiert, wobei 42°C RNase E (*ts*) der Mutante inaktivieren sollte. RNA Isolierung und Detektion von UpsM in 10 µg Gesamt-RNA je Probe wurde wie bereits beschrieben durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 26B dargestellt. Zusätzlich wurden Mutante und Wildtyp in einem weiteren Experiment ¹O₂-Stress ausgesetzt, um die Induktion der Prozessierung nach 30 und 60 Minuten zu zeigen. Dieses Ergebnis ist in Abbildung 26C zusammengestellt. UpsM weist in der Mutante sowohl bei 32°C als auch bei 37°C eine leicht veränderte basale Prozessierung auf. Wie bereits gezeigt, ist das Primärtranskript im Wildtyp bei Hitzestress stark destabilisiert (3.2.6 und Abbildung 21), weshalb das Prozessierungsprodukt schneller generiert wird. Diese Beobachtung unterscheidet sich jedoch grundsätzlich von der Mutante. Hier bleibt das Primärtranskript in Gegenwart der temperaturinaktivierten RNase E (*ts*) stabil bzw. die Transkriptmenge hoch und es ist gar kein Prozessierungsprodukt zu erkennen. Unter ¹O₂-Stress bei einer Wachstumstemperatur von 32°C ist selbst ohne Temperaturinaktivierung der RNase zu erkennen, dass die Prozessierung nicht mehr wie im Wildtyp induziert wird. Die beschriebenen deutlichen Unterschiede zwischen Wildtyp und *Rhodobacter sphaeroides rne^{E.c.ts}* zeigen eindeutig, dass UpsM *in vivo* von RNase E gespalten wird. Prozessierungsunterschiede, die schon bei 32°C zu beobachten sind, lassen sich wahrscheinlich auf eine etwas unterschiedliche Substratspezifität und Aktivität der RNase von *E. coli* zurückführen. Zusätzlich ist eine fehlerhafte Assemblierung des Degradosom Proteinkomplexes von *R. sphaeroides* an der C-terminalen Domäne von RNase E^{E.c.ts} denkbar. Oben wurde bereits gezeigt, dass die Spaltung von UpsM auch Hfq abhängig ist (3.2.8). Das RNA Chaperon könnte ebenfalls ein Interaktionspartner der C-terminalen Domäne der RNase sein (Ikeda *et al.*, 2011a) und folglich bei verminderter Assoziation an die *E. coli* Variante Veränderungen bei der Spaltung hervorrufen. Dies wäre besonders plausibel, wenn die Prozessierung bei ¹O₂-Stress durch eine Hfq vermittelte Bindung an eine Ziel-mRNA induziert wird.

Weil innerhalb der Arbeitsgruppe auch mit anderen sRNAs gearbeitet wird, deren Reifung und Prozessierung bisher nicht aufgeklärt wurde, wurden diese Transkripte ebenfalls beprobt. CcsR1 wird in einem *repeat* mit 3 homologen sRNAs und einem proteinkodierenden Genabschnitt cotranskribiert (Billenkamp *et al.*, 2015). Das heißt die sRNA Homologe müssen zur Reifung aus einem polycistronischen Vorläufertranskript prozessiert werden. Anhand beider Northern Blots ist erstmals *in vivo* zu beobachten, wie dieser Prozess durch RNase E ermöglicht wird. Das wird bei 42°C besonders deutlich, weil die CcsR1-4 Reifung im Wildtyp unter Hitzestress stark induziert wird und in der Mutante bei 42°C bzw. inaktiver RNase E völlig unterbunden ist. SorX (RSs_2461) wird ebenfalls mit einem proteinkodierenden Genabschnitt cotranskribiert und muss zur Reifung aus einem polycistronischen Vorläufertranskript prozessiert werden. Hierbei entsteht zunächst das SorX (116 nt) Primärtranskript. Experimente bei 32°C und 37°C zeigen, dass dieser Reifungsschritt in Gegenwart von RNase E^{E.c.ts} etwas effizienter abläuft als im Wildtyp. Im Anschluss wird das

Primärtranskript gespalten und es entsteht SorX (75 nt). Dieser Prozessierungsschritt verläuft deutlich weniger effizient in Gegenwart von RNase E^{E.c.ts} und kommt bei 42°C bzw. Inaktivierung der RNase E komplett zum Erliegen. Für die sRNA PcrZ sind kaum Unterschiede zwischen Mutante und Wildtyp zu erkennen. Das könnte einerseits bedeuten, dass dieses Transkript RNase E unabhängig geschnitten wird, oder mögliche Unterschiede bei der Prozessierung sind aufgrund der sehr hohen Halbwertszeiten der PcrZ Produkte in diesen Experimenten lediglich nicht nachweisbar (Ergebnisse Nils Mank, nicht publiziert). Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass alle untersuchten sRNAs außer PcrZ im Hinblick auf Reifung oder Prozessierung von RNase E abhängig sind.

3.2.12 Die UpsM Prozessierung *in vitro*

Bisher konnte gezeigt werden, dass die Prozessierung von UpsM durch RNase E realisiert (3.2.11) wird und abhängig von der Anwesenheit von Hfq ist (3.2.8). Fraglich ist jedoch, warum die Prozessierung nur konditionell, beispielweise bei ¹O₂-Stress induziert wird (3.2.6), weil sowohl Hfq als auch RNase E konstitutiv in der Zelle exprimiert werden. Möglicherweise wird die sRNA nur gespalten, wenn sie Hfq abhängig mit einer Ziel-mRNA einen Duplex bildet, wobei die Ziel-mRNA nur unter den jeweiligen Stressbedingungen, die zur Akkumulation des 3' Fragmentes führen, exprimiert werden dürfte. Eine zweite mögliche Erklärung wäre eine durch ¹O₂ erzeugte Basenmodifikation im Transkript, die die Prozessierung unterstützt. In DNA bzw. RNA sind Desoxyguanosin bzw. Guanosin am anfälligsten für die Oxidation durch ¹O₂, wobei 8-Hydroxydesoxyguanosin bzw. 8-Hydroxyguanosin entsteht. In UpsM befindet sich an Position 75 (Abbildung 19) ein Guanosin in direkter Nähe zur Prozessierungsstelle. Dass die Oxidation dieses Nukleosids einen direkten Einfluss auf die Prozessierung hat, ist aus verschiedenen Gründen sehr unwahrscheinlich. Ersten wäre nicht erklärbar, warum eine erhöhte Prozessierung auch unter Hitze-, CdCl₂-, NaCl-Stress und in der stationären Phase stattfindet und zweitens entspricht eine Ziel-mRNA abhängige Prozessierung eher den Erwartungen an eine kanonische sRNA, deren Spaltung konditionell ist und von Hfq und RNase E abhängt. Außerdem konnte die Spaltung von UpsM in *E. coli* nicht durch ¹O₂ induziert werden (3.2.10).

Weil es jedoch keinen bekannten Fall gibt, bei dem ein 8-Hydroxyguanosin zu einer Verbesserung der Prozessierbarkeit eines Transkriptes durch Hfq und RNase E führt, wurde diese Theorie experimentell *in vitro* überprüft. Hierzu wurden intern mit [α -P³²]-UTP radioaktiv markierte *in vitro* Transkripte von UpsM hinsichtlich ihrer Degradation durch RNase E in Abhängigkeit von Hfq und Oxidationszustand überprüft. Das für *in vitro* Transkriptionen verwendete Template wurde mit dem Primerpaar T7_0682_fB/T7_0682_rB generiert. Zusätzlich wurde die katalytische Untereinheit der RNase E von *E. coli* rekombinant durch Verwendung des Plasmids pRne529N (Callaghan *et al.*, 2003) exprimiert. Die IPTG induzierbare Expression der für die ersten 529 Aminosäuren der RNase und N-terminalen hexa-Histidin-tag kodierenden Sequenz findet hierbei ausgehend von einem T7 Promotor unter Kontrolle eines *lac* Operators in BL21 Zellen statt. Hfq Hexamere, ebenfalls rekombinant mittels N-terminalen hexa-Histidin-tag aufgereinigt, wurden von Dr. Fabian Billenkamp zur Verfügung gestellt. Nativ aufgereinigte Proteine wurden gegen den Reaktionspuffer dialysiert und mittels Coomassie Färbung in einer SDS-PAGE hinsichtlich Ihrer Reinheit und Konzentration überprüft (Abbildung 27 rechts). Hfq Hexamere sind trotz denaturierender Bedingungen der SDS-PAGE nachzuweisen, was ein bekanntes Phänomen und durch die hohe Stabilität des Komplexes zu erklären ist (Abbildung 27 rechts). Hierbei zeigt dies sehr schön, dass funktionelle Hexamere isoliert wurden. Im Degradationsassay wurden neben unterschiedlichen Proteinmengen auch unterschiedlich stark oxidiertes Substrat eingesetzt. Hierzu wurden die intern radioaktiv markierten

in vitro Transkripte von UpsM (~350 fmol/Reaktion) vorab für 30 Minuten in Gegenwart des Photosensitisers Rose Bengal (0,2 µM) mit 0 (dark), 200 oder 1000 Wm⁻² Weißlicht bestrahlt. 10 µl Reaktionsansätze wurden bei 37°C für 0, 15 und 30 Minuten inkubiert und durch Zugabe von denaturierendem Ladepuffer gestoppt. Die Proben Auftrennung erfolgte auf einem denaturierenden TBE/PAA/UREA-Gel. Zuletzt wurden die Signale des getrockneten Geles mittels *phosphoimaging* sichtbar gemacht (Abbildung 27). Die resultierende Abbildung zeigt keine Degradation in den Spuren der Negativkontrolle ohne RNase E. In Reaktionen mit Enzym findet Degradation statt. Allerdings sind keine Unterschiede in Abhängigkeit vom Oxidationszustand des Substrates zu erkennen. Lediglich in Abwesenheit von Hfq wurde unter Umständen minimal mehr Substrat umgesetzt. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass kein Hinweis auf eine Verbesserung der Prozessierbarkeit von UpsM *in vitro* durch oxidiertes Substrat bzw. 8-Hydroxyguanosin gefunden wurde.

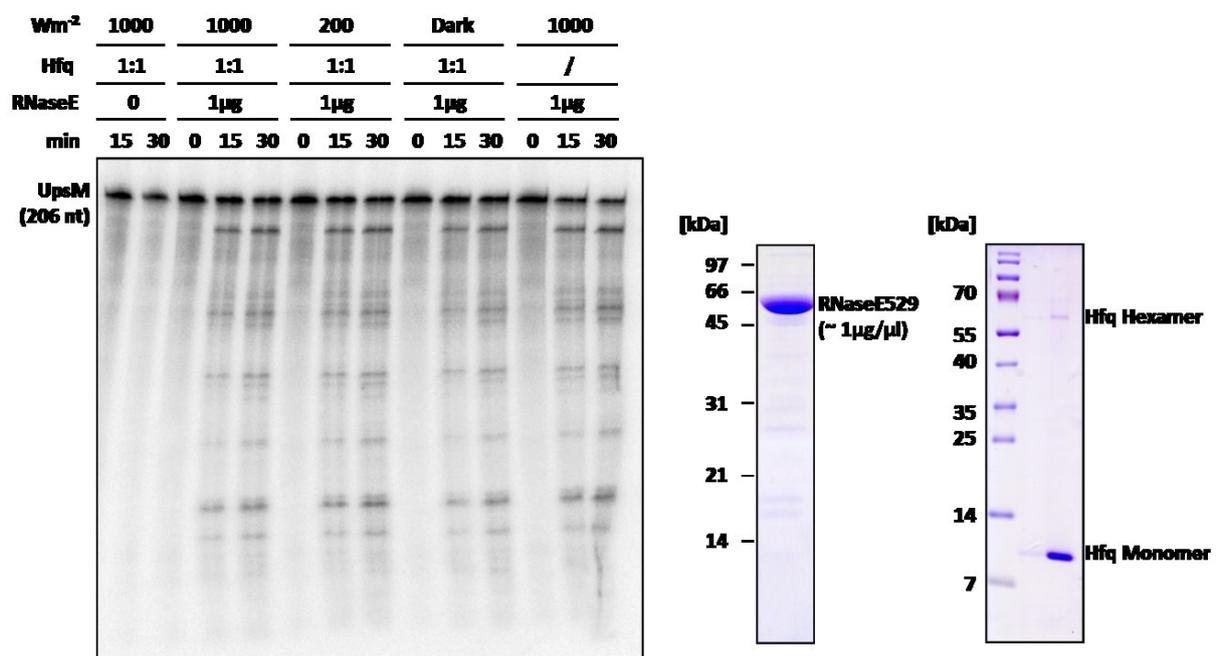


Abbildung 27: *In vitro* Degradationsassay von UpsM mit der katalytischen Untereinheit der RNase E von *E. coli*. Die Inkubation der Reaktionsansätze (10 µl) erfolgte bei 37°C für 0, 15 und 30 Minuten. Es wurden je 350 fmol intern mit [α -P32]-UTP radioaktiv markierte Transkripte von UpsM als Substrat verwendet. Substrat wurde vorab in Gegenwart von 0,2 µM Rose Bengal und Licht (200 und 1000 Wm⁻²) 30 Minuten oxidiert. Als Negativkontrolle erfolgte die Inkubation bei Dunkelheit. 1 µg RNase E 529 entspricht ~15 pmol Monomer bzw. ~4 pmol aktivem Tetramer. Hfq Hexamer wurden in equimolarer Menge zum Substrat eingesetzt. Rechts: Kontrollfärbung nativ aufgereinigter und dialysierter Proteine durch Coomassie nach Auftrennung mittels SDS-PAGE (12 %ig bzw. 15 %ig).

3.2.13 Die UpsM Prozessierung *in vivo* erfolgt in Abhängigkeit von RpoH_{I/II}

Nach Absatz 3.2.12 ist weiterhin fraglich, warum die Prozessierung von UpsM nur konditionell beispielweise bei ¹O₂-Stress induziert wird (3.2.6), weil sowohl Hfq als auch RNase E konstitutiv in der Zelle exprimiert werden. Bei einer kanonischen sRNA würde man von einer Ziel-mRNA abhängigen Prozessierung ausgehen, deren Spaltung durch RNase E nur möglich ist, wenn sie Hfq abhängig mit einer Ziel-mRNA einen Duplex bildet. In diesem Fall wäre davon auszugehen, dass die entsprechende Ziel-mRNA nur unter Bedingungen exprimiert wird, unter denen auch erhöhte UpsM Prozessierung zu beobachten ist. Um Ziel-mRNA abhängige Spaltung der sRNA zu demonstrieren und um den Kreis potentieller Ziel-mRNAs einzuengen, wurden mit der Bachelor Studentin Kristin Grüllich im Rahmen Ihrer Bachelorarbeit diverse Transkriptionsaktivator- & Transkriptionsrepressormutaten bzw.

Deletionsstämmen von *R. sphaeroides* auf eine veränderte UpsM Prozessierung getestet. Vollständige Ergebnisse sind Ihrer Bachelorarbeit zu entnehmen (Grüllich, 2015). Die Kultivierung der Deletionsstämmen, Probenentnahmen vor und nach $^1\text{O}_2$ -Stress und die Detektion der sRNA mittels Northern Blot erfolgte wie bereits beschrieben. Theoretisch wird eine Ziel-mRNA, die durch einen Repressor reprimiert wird, bei Deletion des Repressors unter regulären Wachstumsbedingungen exprimiert und könnte somit auch ohne $^1\text{O}_2$ -Stress zu erhöhter Prozessierung von UpsM führen. Dies ist im Deletionsstamm ΔchrR zu beobachten. Sowohl unter regulären microaeroben als auch aeroben Wachstumsbedingungen akkumuliert das 3' Fragment im Verhältnis zum Wildtyp stärker. Bei ChrR handelt es sich nur um einen Transkriptionsrepressor im weitesten Sinne. Das Protein ist der Antisigmafaktor des alternativen Sigmafaktors RpoE. In Gegenwart von $^1\text{O}_2$ wird der Antisigmafaktor ChrR proteolytisch abgebaut, was zur Aktivierung von RpoE führt (Abbildung 28 rechts). Im Stamm ΔchrR ist RpoE also aufgrund des fehlenden Antisigmafaktors konstant aktiv. Wenn in diesem Stamm eine erhöhte Ziel-mRNA abhängige Prozessierung ohne $^1\text{O}_2$ zu beobachten ist, müsste die Ziel-mRNA folglich im RpoE Regulon zu finden sein. Um dies zu bestätigen, wurde UpsM in Gesamt-RNA aus dem *rpoE* Deletionsstamm TF18 detektiert. Wird die Ziel-mRNA-Transkription durch einen Aktivator wie RpoE induziert, wäre bei Deletion des Aktivators keine Induktion der Prozessierung von UpsM unter $^1\text{O}_2$ -Stress zu beobachten. In Abbildung 28 (links) wurde jedoch die gleiche Menge Prozessierungsprodukt bei *rpoE* Deletion wie im Wildtyp nachgewiesen. Deshalb ist auszuschließen, dass die gesuchte mRNA direkt RpoE abhängig transkribiert wird.

RpoE ist nur der erste alternative Sigmafaktor einer Sigmafaktorkaskade. Die Expression von weit mehr Genen wird durch den alternativen Sigmafaktor RpoH_{II} aktiviert, wobei die Expression von RpoH_{II} durch RpoE aktiviert wird. Die im Stamm ΔchrR gemachten Beobachtungen könnten deshalb auch darauf schließen lassen, dass die gesuchte Ziel-mRNA im RpoH_{II} Regulon zu finden ist. In diesem Fall wäre keine $^1\text{O}_2$ induzierte Prozessierung im Deletionsstamm ΔrpoH_{II} nachzuweisen. Der Northern Blot in Abbildung 28 zeigt jedoch eine deutliche Akkumulation des 3' Fragmentes von UpsM. Neben RpoE und RpoH_{II} wird der alternative Sigmafaktor RpoH_I durch $^1\text{O}_2$ aktiviert. Im Unterschied zu RpoH_{II} geschieht dies aber unabhängig von RpoE. Auch im RpoH_I Deletionsstamm liegt das Prozessierungsprodukt von UpsM nach 90 Minuten $^1\text{O}_2$ -Stress angereichert vor. Allerdings überlappen RpoH_I und RpoH_{II} Regulon. Das bedeutet, Gene mit RpoH_{I/II} abhängigem Promotor

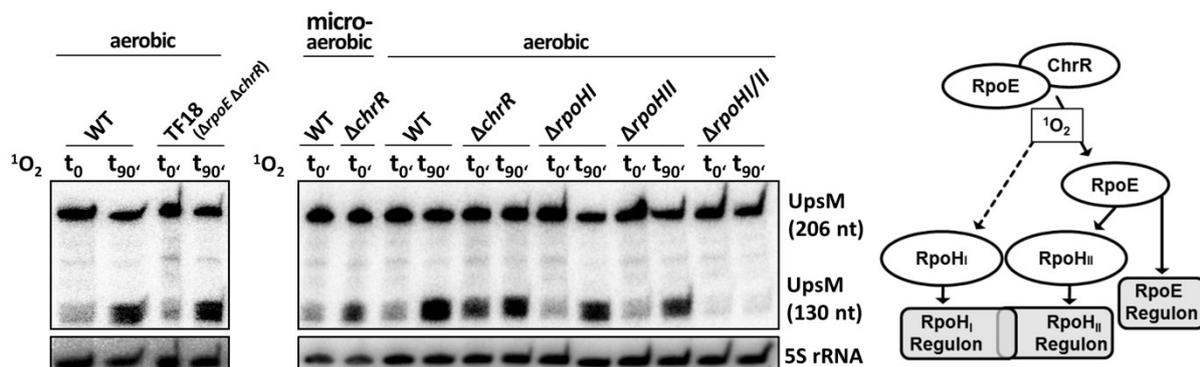


Abbildung 28: Northern blots zur Visualisierung der Prozessierung von UpsM in verschiedenen *R. sphaeroides* Deletionsmutanten (links). Detektion des UpsM-Primärtranskriptes (206 nt) und des UpsM-Prozessierungsproduktes (130 nt) in 5 μg Gesamt-RNA aufgetrennt auf 10%igen TBE/PAA/UREA-Gelen. Nach Entnahme von t_0 Proben wurde in Kulturen durch Zugabe von 0.2 μM Metylenblau in der Gegenwart von 800 Wm^{-2} Weißlicht $^1\text{O}_2$ -Stress erzeugt. Eine weitere Probenentnahme erfolgte nach 90 min. Signale der 5S rRNA dienen als interne Ladekontrolle. **Schematische Darstellung der Aktivierung alternativer Sigmafaktoren bei photooxidativem Stress (rechts).** $^1\text{O}_2$ führt zur Aktivierung von RpoE durch Dissoziation vom Antisigmafaktor ChrR. Aktives RpoE induziert Zielgenexpression sowie die Expression des alternativen Sigmafaktors RpoH_I. Expression des alternativen Sigmafaktors RpoH_I wird RpoE unabhängig induziert. RpoH_I und RpoH_{II} Regulon enthalten gemeinsame Gene.

werden weiterhin exprimiert, wenn nur einer der Sigmafaktoren deletiert ist. Deshalb wurde auch eine Doppelmutante mit *rpoH_I* und *rpoH_{II}* Deletion getestet. Hierbei zeigt sich anhand des Northern Blots ein eindeutiges Fehlen jeglicher Prozessierung von UpsM trotz $^1\text{O}_2$ -Stress. Zusammenfassend wurde also gezeigt, dass UpsM *in vivo* erst bei Duplexbildung mit einer Ziel-mRNA gespalten werden kann, wobei die Ziel-mRNA Transkription eindeutig unter Kontrolle eines RpoH_{I/II} Promotors steht. Deshalb kann bei *rpoH_I* und *rpoH_{II}* Deletion keine UpsM Spaltung induziert werden. Außerdem erklärt sich nun auch das erhöhte 3'Fragmentlevel in Δ *chrR* trotz regulärer Wachstumsbedingungen. In diesem Deletionsstamm liegt RpoE konstitutiv aktiv vor, was zur Induktion von RpoH_{II} und somit Expression der Ziel-mRNA führt.

3.2.14 Überexpression von UpsM

Neben der hinreichend untersuchten Prozessierung von UpsM gilt es vor allem aufzuklären, welche mRNAs durch die sRNA reguliert werden und welche biologische Funktion das Transkript erfüllt. Um sich diesen Fragestellungen anzunähern, wurden zunächst Stämme mit verändertem UpsM Transkriptlevel generiert. Hierbei liefen jegliche Versuche einen Deletionsstamm zu erzeugen ins Leere, was wahrscheinlich durch die bereits beschriebene Komplexität des Genortes zu erklären ist (siehe 3.2.1 bis 3.2.3). Stattdessen wurde bei diesem Projekt ein Plasmid zur konstitutiven ektopischen Überexpression von UpsM verwendet. Zur Plasmidkonstruktion wurde zunächst der UpsM und sORF kodierende Genabschnitt inklusive des nativen Promotors zweimal mit den Primerpaaren KpnI_IGR0682_f/IGR0682_Hind_r und Hind_IGR0682_f/IGR0682_EcoRV_r amplifiziert. Beide Fragmente wurden subkloniert und mit dem geöffneten Leervektor pBBR1MCS2 ligiert. Die Strategie ist somit eine UpsM Überexpression durch zwei Kopien des Genortes auf einem *multi-copy* Plasmid zu erreichen (Abbildung 29 links), wobei es auch zur Überexpression des sORF kommen könnte. Der Plasmidtransfer von pBBRUpsMORFx2 oder Leervektor zu *R. sphaeroides* 2.4.1b erfolgte mittels biparentaler Konjugation. Die erzeugten Stämme mit Überexpressionsplasmid oder Leervektor wurden hinsichtlich ihrer UpsM Expression durch Northern Blot Analyse überprüft. Hierzu erfolgte die Kultivierung der Stämme, Probenentnahme nach 60 Minuten $^1\text{O}_2$ -Stress, um auch die Prozessierung zu beobachten, und die Detektion der sRNA wie bereits beschrieben. Anhand von Abbildung 29 ist eine stark erhöhte UpsM Primärtranskriptlevel im Überexpressionsstamm *R. sphaeroides* 2.4.1b (pBBRUpsMORFx2) im Vergleich zum Kontrollstamm nachzuweisen. Interessanterweise zeigte sich hierbei auch, dass eine erhöhte Menge an Primärtranskript nicht automatisch zu einer erhöhten Menge an Prozessierungsprodukt führt. Offensichtlich ist die Spaltung von UpsM Transkripten also durch einen anderen Faktor als der vorliegende Substratmenge limitiert. Dies könnte die Verfügbarkeit von Hfq und RNase E Proteinen in der Zelle sein. Aufgrund deren sehr

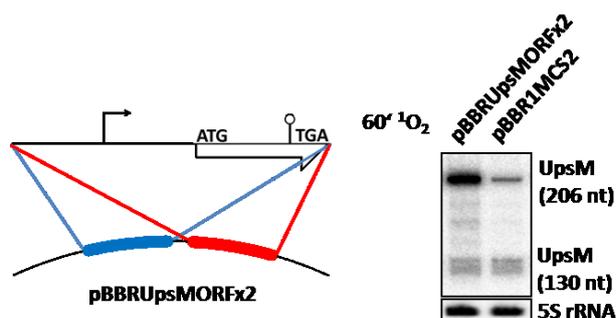


Abbildung 29: Überexpression von UpsM. Links: Schematische Darstellung des Überexpressionsplasmids pBBRUpsMORFx2, das zwei Kopien des UpsM und sORF kodierenden Genabschnittes inklusive des nativen Promotors enthält. Rechts: Northern Blot Detektion des UpsM-Primärtranskripts (206 nt) und des UpsM-Prozessierungsproduktes (130 nt) in 5 µg Gesamt-RNA, aufgetrennt auf einem 10%igen TBE/PAA/UREA-Gel zur Verifizierung der Überexpression in Stamm *R. sphaeroides* 2.4.1b (pBBRUpsMORFx2) im Vergleich zum Stamm mit Leervektorkontrolle. Signale der 5S rRNA dienen als interne Ladekontrolle.

hohen Abundanz ist jedoch wahrscheinlicher, dass es sich bei der unbekanntem Ziel-mRNA aus dem RpoH_{I/II} Regulon um den limitierenden Faktor handelt.

3.2.15 Phänotyp einer UpsM Überexpression

Um einen möglichen Phänotyp durch UpsM und sORF Überexpression von Plasmid pBBRUpsMORFx2 zu beobachten, wurden Wachstumskurven unter aeroben, mikroaeroben, anaeroben und phototrophen Bedingungen im Vergleich zum Kontrollstamm mit Leervektor in biologischen Triplikaten angefertigt. Hierzu wurden mikroaerob inkubierte Kulturen im exponentiellen Wachstum zum animpfen auf OD₆₆₀ 0,2 bzw. OD₆₆₀ 0,02 für anaerobes Wachstum verwendet. Mehrere Tage wachsende Kulturen (anaerob und phototroph) wurden in Anwesenheit von Kanamycin inkubiert, um den Selektionsdruck aufrecht zu halten. Dokumentierte optische Dichten der Kulturen *R. sphaeroides* 2.4.1b (pBBRUpsMORFx2) und *R. sphaeroides* 2.4.1b (pBBR1MCS2) sind semilogarithmisch mit Standardabweichungen zu jedem Messpunkt in Abbildung 30 gezeigt. Die Effekte ähneln sich bei aerober, mikroaerober und anaerober Kultivierung. In allen drei Kurven ist eine minimale aber signifikante negative Beeinträchtigung des Wachstums durch die Überexpression zu sehen. Dieser sehr geringe Unterschied konnte zu den meisten Messpunkten deswegen signifikant dokumentiert werden, weil die biologischen Triplikate ausnahmslos äußerst gleichmäßig gewachsen sind. Bei

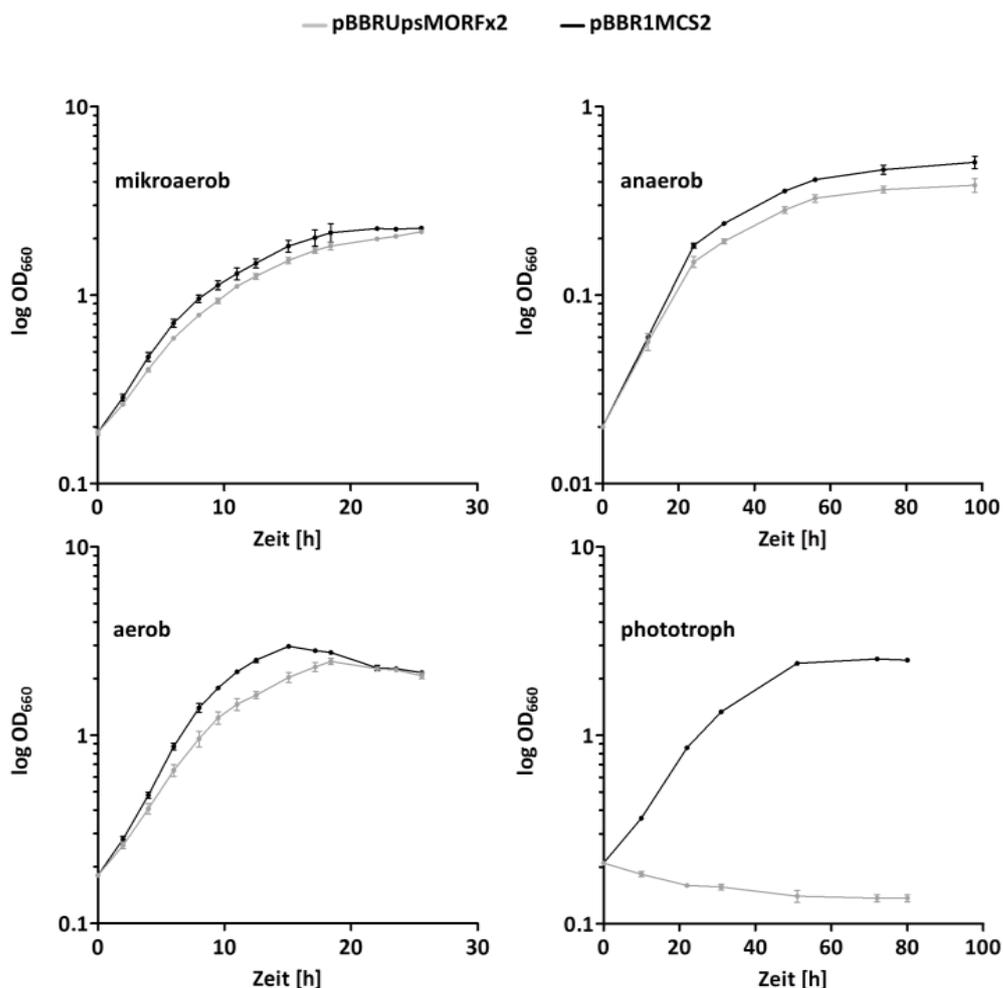


Abbildung 30: Semilogarithmisch dargestellte Wachstumskurven unter aeroben, mikroaeroben, anaeroben und phototrophen Bedingungen mit Überexpressionsstamm *R. sphaeroides* 2.4.1b (pBBRUpsMORFx2) (grau) im Vergleich zum Kontrollstamm mit Leervektor (schwarz) in biologischen Triplikaten. Kurven resultieren aus den Mittelwerten. Standardabweichungen zu jedem Messpunkt sind eingezeichnet. Messungen der optischen Dichte erfolgte bei einer Wellenlänge von 660 nm.

phototropher Kultivierung ist die negative Beeinträchtigung durch UpsM und sORF Überexpression extrem deutlich. Zellen mit Plasmid pBBRUpsMORFx2 teilen sich hier offensichtlich nicht mehr, während der Stamm mit Leervektor Wildtyp-ähnliches Wachstum zeigt.

Da die optische Dichte des Überexpressionsstammes bei phototrophem Wachstum relativ konstant bleibt, ist fraglich, ob die Zellen sterben und lysieren. Um dies zu kontrollieren, wurde während der Wachstumskurve zum Zeitpunkt 40 Stunden Proben aus allen Kulturen entnommen, um *spot assays* anzufertigen (Abbildung 31A). Entnommene Kultur der Leervektorkontrolle wurde hierzu auf die optische Dichte des Überexpressionsstammes rückverdünnt, was eine gleiche Zellzahl in den Proben herstellen sollte. Anschließend wurden die Proben sequenziell verdünnt. Von den in Abbildung 31 C gezeigten Verdünnungsstufen wurden je 15 µl Kultur auf eine RÄ Agarplatte getropft. Die Platte wurde 4 Tage bei 32°C inkubiert und dann auf einem Durchlichtscanner dokumentiert (Abbildung 31C). Folgende Beobachtungen konnten gemacht werden. Durch die Rückverdünnung der Kultur *R. sphaeroides* 2.4.1b (pBBRUpsMORFx2) wurde in Relation zum Kontrollstamm sehr ähnliche bis gleiche *colony forming units* bzw. Lebendzellzahlen in den jeweiligen Verdünnungsstufen generiert. Das bedeutet, dass Zellen des Überexpressionsstammes bei phototrophem Wachstum keineswegs sterben, sondern sich lediglich nicht mehr teilen bzw. dormant vorliegen. Ein zweiter Phänotyp, der in diesem und anderen Experimenten beobachtet werden konnte, ist die geringere Größe von Kolonien des Stammes *R. sphaeroides* 2.4.1b (pBBRUpsMORFx2) im Relation zum Kontrollstamm. Offensichtlich führt die Überexpression von UpsM und sORF also auch auf Festmedium zu einem langsamerem Wachstum.

Phänotypen des Stammes *R. sphaeroides* 2.4.1b (pBBRUpsMORFx2) im Hinblick auf oxidativen Stress konnten im übrigen nicht beobachtet werden (Zoemisch, 2013).

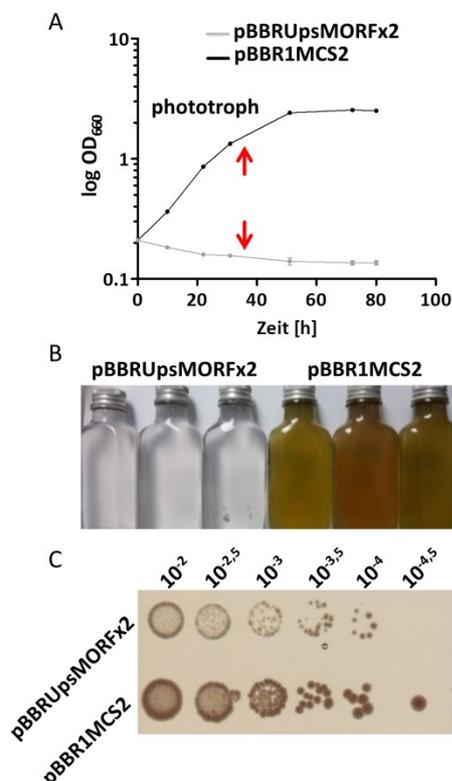


Abbildung 31: Phänotyp der Überexpression von UpsM und sORF unter phototrophen Bedingungen und *spot assay* für einen relativen Vergleich der Lebendzellzahl zum Kontrollstamm. (A) Semilogarithmisch dargestellte Wachstumskurven unter phototrophen Bedingungen mit Überexpressionsstamm *R. sphaeroides* 2.4.1b (pBBRUpsMORFx2) (grau) im Vergleich zum Kontrollstamm mit Leervektor (schwarz) in biologischen Triplikaten. Kurven resultieren aus den Mittelwerten. Standardabweichungen zu jedem Messpunkt sind eingezeichnet. Messungen der optischen Dichte erfolgte bei einer Wellenlänge von 660 nm. Nach 40 Stunden Wachstum (Rote Pfeile) wurden Bilder von den Kulturen gemacht (B) und Proben für *spot assays* entnommen (C). Entnommene Proben wurden auf die gleiche OD und dann sequenziell verdünnt. Je gezeigter Verdünnungsstufe wurden 15 µl Kultur auf eine RÄ Agarplatte getropft und für 4 Tage bei 32°C inkubiert. Exemplarisch ist hier ein *spot assay* abgebildet.

3.2.16 Ziel-mRNA Suche mittels Transkriptomstudie & Bindevorhersagen

Die Funktion *trans* kodierter sRNAs wie UpsM ist in der Regel die Regulation einer oder mehrerer Ziel-mRNAs durch Basenpaarung. Hierbei wird in der Regel die Stabilität oder die Translationsrate dieser Ziel-mRNAs beeinflusst, wobei eine Änderung der Translationsrate auch Auswirkungen auf die Stabilität einer mRNA hat. Um eine oder mehrere Ziel-mRNAs von UpsM zu identifizieren, wurden zunächst zwei vergleichende Transkriptomstudien via Microarray Analyse angefertigt. Hierbei wurden die Stämme *R. sphaeroides* 2.4.1b (pBBR1MCS2) (Leervektorkontrolle; Cy5) und *R. sphaeroides* 2.4.1b (pBBRUpsMORFx2) (Überexpression von UpsM und sORF; Cy3) ohne Stressbedingungen und nach 90 min $^1\text{O}_2$ -Stress miteinander verglichen. Die zusätzliche Transkriptomanalyse nach 90 min $^1\text{O}_2$ -Stress wurde durchgeführt, weil das UpsM (130 nt) Prozessierungsprodukt unter dieser Bedingung in den Zellen akkumuliert und zusätzlich zum Primärtranskript weitere Ziel-mRNAs regulieren könnte. Im Überexpressionsstamm liegt nach $^1\text{O}_2$ -Stress aufgrund einer Limitierung bei der Spaltung zwar keine erhöhte Menge des Prozessierungsproduktes im Verhältnis zum Kontrollstamm vor (Abbildung 29), allerdings konnte Marcel Volk im Rahmen seiner Bachelorarbeit mit Hfq-FLAG Coimmunopräzipitationen zeigen, dass das 3'Fragment von UpsM im Überexpressionstamm im Vergleich zum Kontrollstamm wesentlich stärker an Hfq akkumuliert (Volk, 2014). Da die Assoziation an Hfq und nicht die eigentliche Transkriptmenge für die meisten *trans* kodierten sRNAs über Ihre Funktionalität entscheidet, könnte eine Transkriptomstudie nach 90 min $^1\text{O}_2$ -Stress also wertvolle Einblicke in eventuelle Funktionen des Prozessierungsproduktes liefern.

Um Ausreißer zu vermeiden, wurde für beide Transkriptomstudien ein Arrayduplikat mit unabhängigen RNA Pools hybridisiert, wobei jeder RNA Pool Gesamt-RNA der beiden, zu vergleichenden, Stämme in biologischen Triplikaten enthält. Deshalb müssen für jede der beiden Analysen (t_0 und t_{90} $^1\text{O}_2$), wie in den Methoden beschrieben, zunächst 12 Proben DNase I verdaute Gesamt-RNA bzw. 6 Proben je Stamm isoliert werden. Im Anschluss erfolgen diverse Kontrollen. Zunächst wurde das Primärtranskriptlevel und das Prozessierungsprodukt von UpsM in allen Proben mittels Northern Blot, wie bereits beschrieben, detektiert, um die experimentelle Durchführung zu überprüfen. Wie erwartet ist hier für alle „ungestressten“ Proben nur ein basales Prozessierungsproduktlevel und eine erhöhte Menge an Primärtranskript im Überexpressionsstamm zu erkennen (Abbildung 32 oben links). Nach 90 Minuten $^1\text{O}_2$ -Stress liegt das Prozessierungsprodukt in Relation akkumuliert vor (Abbildung 32 oben rechts). Parallel wurde die RNA Integrität überprüft, indem 1 μg Gesamt-RNA auf einem 10 %igen TBE/PAA/UREA-Gel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt wurde. Hierbei ist die RNA Integrität anhand der Banden der großen ribosomalen RNA Spezies (14S rRNA und 16S rRNA) zu erkennen, da diese bei Proben mit geringer Qualität schneller degradieren als kleine ribosomale RNAs. Anhand der klaren Ausprägung von 14S und 16S rRNA Banden ist die RNA Qualität in allen Proben als gut zu bewerten (Abbildung 32 oben).

Die Transkriptomanalysen in dieser Arbeit wurden mittels *two-colour* (Cy3 und Cy5) Microarrays durchgeführt, wobei individuell angefertigte Chips der Firma Agilent verwendet wurden. Genaue Spezifikationen bezüglich der Auswahl und Anzahl von Sonden wurden bereits erklärt (3.1.2). Die genaue experimentelle Durchführung der Transkriptomanalyse ist im Material und Methoden Teil beschrieben. Die aus dem Experiment resultierenden Aufnahmen des *chips* im .tif-Format wurden anhand der Feature Extraction Software (Agilent) im Hinblick auf Fluoreszenzwerte einzelner Sonden ausgewertet. Entsprechende Zahlenwerte wurden im .txt-Format ausgegeben und stellen Rohdaten dar, die zunächst normalisiert wurden. Wie bereits ausführlich beschrieben und erklärt (3.1.2) wurde im Zuge der Normalisierung zuerst eine Multiarray Analyse mit dem Bio-conductor package Limma

für R, eine Hintergrundbereinigung (Ritchie *et al.*, 2007) und dann eine LOWESS (*locally weighted scatterplot smoothing*) within Normalisierung durchgeführt (Smyth & Speed, 2003). Zur Kontrolle der Normalisierung wurden MA-Plots vor und nach LOWESS-Normalisierung erstellt (Anhang 4 und Anhang 5), wobei der M-Wert das logarithmierte Verhältnis der Intensitäten von Cy3 und Cy5 und der A-Wert der Mittelwert aus der logarithmierten Summe der Intensitäten von Cy3 und Cy5 für jede Sonde ist (siehe Formeln in 3.1.2). Ein M-Wert, oder allgemein gesprochen Regulationswert, von 0 entspricht keiner Veränderung der Fluoreszenzwerte zwischen Cy3 und Cy5 bzw. zwischen *R. sphaeroides* 2.4.1b (pBBRUpsMORFx2) und *R. sphaeroides* 2.4.1b (pBBR1MCS2). Weil dies für die meisten Gene zu erwarten ist, drückt sich eine funktionierende Normalisierung dadurch aus, dass die horizontale Datenwolke der MA-Plots nach Normalisierung gleichmäßiger entlang der Nulllinie der Y-Achse verlaufen sollte. Dieser Effekt ist eindeutig für alle im Anhang beiliegenden MA-Plots zu beobachten. Als weitere Qualitätskontrolle wurden die M-Werte der Replikate in einem MM-Plot gegeneinander aufgetragen (Abbildung 32 unten). Dieser Scatter Plot spiegelt die Übereinstimmung des biologisch unabhängigen Duplikates wider. Bei perfekten Replikaten sollte ein direkter, linearer Zusammenhang bestehen. Ein solcher linearer Zusammenhang liegt sowohl für das Duplikat zu 0 Minuten als auch 90 Minuten $^1\text{O}_2$ -Stress vor, wobei die Datenpunkte für die Microarrays zum Zeitpunkt t_{90} etwas mehr streuen. Mathematisch lässt sich die Übereinstimmung der Duplikate durch den Pearson Korrelationskoeffizienten als dimensionsloses Maß für den Grad des linearen Zusammenhangs zwischen zwei mindestens intervallskalierten Merkmalen ausdrücken. In diesem Fall beträgt der Koeffizient 0,97 (t_0) und 0,95 (t_{90}). Da ein Wert von 1 oder -1 rechnerisch einem perfekten linearen Zusammenhang entspricht, gibt es also eine sehr hohe Übereinstimmung zwischen den Replikaten.

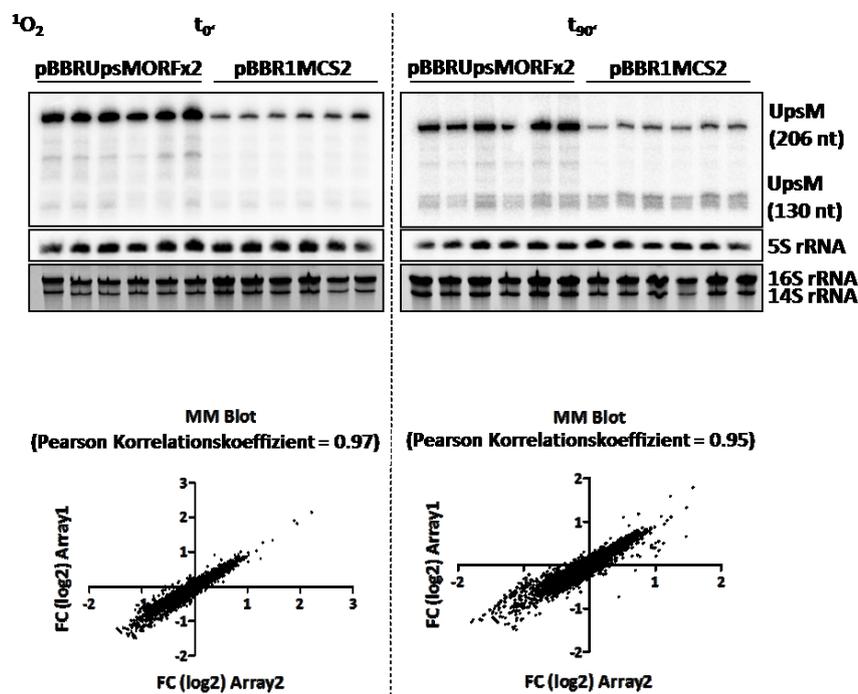


Abbildung 32: Qualitätskontrollen für vergleichenden Transkriptomstudien *R. sphaeroides* 2.4.1b (pBBRUpsMORFx2) vs. *R. sphaeroides* 2.4.1b (pBBR1MCS2) ohne (links) und nach 90 min $^1\text{O}_2$ -Stress (rechts). Oben: Northern blots zur Detektion von UpsM nach 0 und 90 min $^1\text{O}_2$ -Stress im Vergleich zur 5S rRNA Ladekontrolle in beiden Stämmen. 1 μg Gesamt-RNA je Probe wurde zusätzlich auf einem 10 %igem TBE/PAA/UREA-Gel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid zur Beurteilung der RNA Integrität anhand von 14S und 16S rRNA gefärbt. Unten: Korrelationen zwischen den Microarrays der Duplikate nach Normalisierung dargestellt als MM Blots und berechnet als Pearson Korrelationskoeffizienten. Jeder Punkt in den Graphen entspricht einer Sonde bzw. resultiert aus den logarithmierten Verhältnissen [FC (log2)] von Cy3 zu Cy5 in Array1 (y-Achse) und Array2 (x-Achse).

Je höher der A-Wert, also die Gesamt-Fluoreszenz an einer Sonde, desto höher ist die Signifikanz von M im Vergleich zur Hintergrundfluoreszenz. Das heißt M-Werte mit geringen A-Werten sind statistisch unzuverlässig. Deshalb wurden in der weiteren Datenbearbeitung zunächst Sonden herausgefiltert deren A-Werte den Schwellenwert ≥ 12 nicht überschreiten, da dieser auch bei unspezifischen Sonden zu messen war. Verbleibende Sonden bzw. M-Werte wurden je Gen miteinander verrechnet und zwischen den Replikaten gemittelt. Auf diese Weise konnten zwischen beiden Stämmen logarithmierte Verhältnisse (FC (log2)) für 3606 (t_0) bzw. 3634 (t_{90}) der 4527 Gene ermittelt werden (Abbildung 33). Dann wurden Schwellenwerte für regulierte Gene eingeführt, wobei Gene mit logarithmiertem Verhältnis $> 0,6$ oder $< -0,6$ als hoch- oder runterreguliert betrachtet wurden. Des Weiteren wurden nur proteinkodierende Gene berücksichtigt. Aus der Transkriptomanalyse zum Zeitpunkt t_0 resultieren so 34 hoch- und 26 runterregulierte und aus der Transkriptomanalyse zum Zeitpunkt t_{90} 13 negativ und 27 positiv regulierte mRNAs (Abbildung 33), wobei jegliche dieser Regulationen auf Transkriptlevel durch UpsM oder sORF vermittelt werden könnten. Um den Kreis potentieller Ziel-mRNAs, die direkt durch UpsM Bindung reguliert werden weiter einzuengen, wurden Interaktionen von UpsM mit den regulierten mRNAs bioinformatisch vorhergesagt. Hierzu wurde das *web tool* IntaRNA (Busch *et al.*, 2008) wie bereits beschrieben verwendet (3.1.2). Das Programm ermittelt Binderegion von s- und mRNA und die zugehörige frei werdende Energie bei Paarung der Transkripte. Vereinfacht gesagt wird dieser Wert ermittelt, indem die Energie, die zum Entfalten der Binderegion beider Moleküle benötigt wird, von der bei Basenpaarung frei werdenden, Energie abgezogen wird. Je negativer also die freie Energie, desto wahrscheinlicher ist die Interaktion. Mit dem Webtool lässt sich für jede Ziel-mRNA eine Binderegion vorhersagen. Deshalb wurde erneut ein Schwellenwert (freie Energie ≤ -12 kcal/mol) gesetzt. Hierdurch bleiben bei der Datenanalyse für t_0 21 hoch- und runterregulierte mRNAs (Abbildung 33 und Tabelle 3), die an UpsM (206 nt) binden könnten. Bei der Analyse des t_{90} Datensatzes wurden alle mRNAs berücksichtigt, die den Schwellenwert entweder bei Hybridisierung mit UpsM (206 nt) oder mit dem Prozessierungsprodukt UpsM (130 nt) überschreiten. Damit verbleiben 31 potentielle Ziel-mRNAs (Abbildung 33 und Tabelle 4).

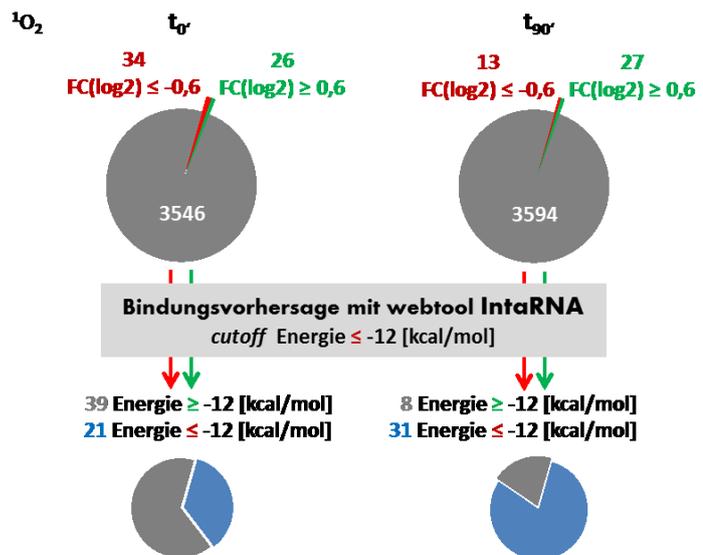


Abbildung 33: Schematische Darstellung der Auswertung der Transkriptomstudien *R. sphaeroides* 2.4.1b (pBBR1MCS2) vs. *R. sphaeroides* 2.4.1b (pBBR1MCS2) ohne (links) und nach 90 min $^{1}O_2$ -Stress (rechts). Oben: Anteil hoch- (grün) und runterregulierter (rot) mRNAs an der Gesamtheit aller ermittelten Regulationen nach Einführung von Schwellenwerten ($A \geq 12$; $FC(\log_2) \geq 0,6$ oder $\leq -0,6$). Unten: Anteil potentieller Ziel-mRNAs von UpsM (blau) an der Gesamtheit regulierter mRNAs nach IntaRNA Bindungsvorhersage und Einführung eines Schwellenwertes (freie Energie ≤ -12 kcal/mol).

eingeführt, wobei Gene mit logarithmiertem Verhältnis $> 0,6$ oder $< -0,6$ als hoch- oder runterreguliert betrachtet wurden. Des Weiteren wurden nur proteinkodierende Gene berücksichtigt. Aus der Transkriptomanalyse zum Zeitpunkt t_0 resultieren so 34 hoch- und 26 runterregulierte und aus der Transkriptomanalyse zum Zeitpunkt t_{90} 13 negativ und 27 positiv regulierte mRNAs (Abbildung 33), wobei jegliche dieser Regulationen auf Transkriptlevel durch UpsM oder sORF vermittelt werden könnten. Um den Kreis potentieller Ziel-mRNAs, die direkt durch UpsM Bindung reguliert werden weiter einzuengen, wurden Interaktionen von UpsM mit den regulierten mRNAs bioinformatisch vorhergesagt. Hierzu wurde das *web tool* IntaRNA (Busch *et al.*, 2008) wie bereits beschrieben verwendet (3.1.2). Das Programm ermittelt Binderegion von s- und mRNA und die zugehörige frei werdende Energie bei Paarung der Transkripte. Vereinfacht gesagt wird dieser Wert ermittelt, indem die Energie, die zum Entfalten der Binderegion beider Moleküle benötigt wird, von der bei Basenpaarung frei werdenden, Energie abgezogen wird. Je negativer also die freie Energie, desto wahrscheinlicher ist die Interaktion. Mit dem Webtool lässt sich für jede Ziel-mRNA eine Binderegion vorhersagen. Deshalb wurde erneut ein Schwellenwert (freie Energie ≤ -12 kcal/mol) gesetzt. Hierdurch bleiben bei der Datenanalyse für t_0 21 hoch- und runterregulierte mRNAs (Abbildung 33 und Tabelle 3), die an UpsM (206 nt) binden könnten. Bei der Analyse des t_{90} Datensatzes wurden alle mRNAs berücksichtigt, die den Schwellenwert entweder bei Hybridisierung mit UpsM (206 nt) oder mit dem Prozessierungsprodukt UpsM (130 nt) überschreiten. Damit verbleiben 31 potentielle Ziel-mRNAs (Abbildung 33 und Tabelle 4).

Vorhersage. Aufgeführt sind alle Gene, die die Selektion in *R. rubrum* (RUPsMORFx2) und *R. sphaeroides* 2.4.1b (pBBR1M02) unter $^{18}O_2$ -Stress (t_0) ohne IntaRNA (Energie ≤ -12 kcal/mol) erfüllen. Positionen der mRNA ausgehend vom Translationsstart, sind ganz rechts zeigt.

RSP no.	Beschreibung	Gen	Ratio [log2 FC]	Energie [kcal/mol]	Position UpsM (206 nt)	Position mRNA
RSP_3622	hypothetical protein		-0.766	-14.491	117 -- 125	90 -- 98
RSP_1951	hypothetical protein		-0.713	-12.815	53 -- 70	-38 -- 21
RSP_2283	30S ribosomal protein S4	rpsD	-0.691	-13.233	91 -- 107	483 -- 499
RSP_2131	Ribonuclease E(EC:3.1.-)	rne	-0.631	-13.807	92 -- 103	1475 -- 1485
RSP_1038	ATP synthase subunit A(EC:3.6.3.14)	atpB	-0.628	-12.336	179 -- 187	324 -- 332
RSP_1724	Ribosomal protein L29	rmlC	-0.609	-15.537	97 -- 108	127 -- 138
RSP_0448	EF-Tu; elongation factor Tu		-0.607	-15.867	21 -- 39	537 -- 555
RSP_3620	Cold-shock DNA-binding protein		-0.606	-13.709	43 -- 57	-97 -- -81
RSP_1149	Glutamate synthase (beta subunit)	gdh	-0.604	-15.312	88 -- 103	284 -- 298
RSP_0099	TRAP-T family sorbitol/mannitol transporter, DctQ (4TMs) subunit		-0.604	-13.544	110 -- 129	-76 -- -57
RSP_6090	hypothetical protein		0.622	-12.065	41 -- 70	23 -- 43
RSP_4054	Aldo/keto reductase		0.624	-12.242	92 -- 123	1178 -- 1206
RSP_2012	NUDIX hydrolase, MutT		0.629	-15.337	86 -- 103	116 -- 133
RSP_3203	transcriptional regulator, AraC family		0.648	-12.003	46 -- 70	549 -- 576
RSP_2641	hypothetical protein		0.690	-12.009	19 -- 70	145 -- 198
RSP_1438	ABC Fe hydroxamate (ferrichrome) transporter, inner membrane subunits		0.695	-12.600	19 -- 38	1798 -- 1821
RSP_3056	TonB dependent-iron siderophore receptor		0.697	-12.550	28 -- 70	136 -- 174
RSP_2292	hypothetical protein		0.717	-18.470	17 -- 39	338 -- 362
RSP_2557	putative asparagine synthetase(EC:6.3.5.4)	asnB	0.761	-12.306	118 -- 123	966 -- 971
RSP_1016	small heat shock protein		0.884	-12.020	155 -- 164	-98 -- -90
RSP_1243	transcriptional regulator, LacI family		0.993	-15.698	87 -- 164	73 -- 51

RNA Vorhersage. Aufgeführt sind alle Gene des 2.4.1b (pBBR1MCS2) nach 90 min ¹⁸O₂-NA (Energie ≤ -12 kcal/mol) erfüllen. Positionen

RSP no.	Beschreibung	Gen	Ratio [log ₂ FC]	Energie [kcal/mol]	Position UpsM (206 nt)	Position mRNA	Energie [kcal/mol]	Position UpsM (130 nt)	Position mRNA
RSP_0908	ABC Mn2+/Fe2+ transporter, inner membrane subunit SitD	sitD	1.65	-15.772	100 -- 137	442 -- 481	-14.857	16 -- 61	442 -- 487
RSP_0906	ABC Mn2+/Fe2+ transporter, inner membrane subunit SitC	sitC	1.44	-14.078	17 -- 40	78 -- 101	-12.906	34 -- 49	70 -- 87
RSP_0904	ABC Mn2+/Fe2+ transporter, periplasmic substrate-binding protein SitA	sitA	1.41	-13.775	92 -- 103	519 -- 531	-17.930	16 -- 27	519 -- 531
RSP_1409	Beta-Ig-H3/Fasciilin		0.86	-10.620	90 -- 103	402 -- 414	-14.993	14 -- 27	402 -- 414
RSP_0905	ABC Mn2+/Fe2+ transporter, ATPase subunit SitB	sitB	0.88	-9.431	180 -- 188	850 -- 858	-12.833	11 -- 25	640 -- 655
RSP_2358	possible phage phi-C31 gp36-like protein / Major capsid protein, HK97 family		0.89	-12.409	46 -- 70	96 -- 120	-15.278	16 -- 27	539 -- 552
RSP_1517	Histone-like protein of HNS family	spbA	0.89	-10.333	119 -- 123	-30 -- -26	-13.333	16 -- 25	-70 -- -60
RSP_1613	TRAP-T family transporter, DctP subunit		0.85	-13.179	46 -- 70	311 -- 333	-13.743	12 -- 33	-3 -- 23
RSP_2346	Cold-shock DNA-binding domain protein		0.85	-10.677	16 -- 24	75 -- 83	-13.893	11 -- 25	161 -- 178
RSP_0097	TRAP-T family sorbitol/mannitol transporter, periplasmic binding protein, SmoM	smoM	0.85	-10.903	180 -- 187	278 -- 285	-12.543	11 -- 25	229 -- 242
RSP_1258	putative hydrolase		0.85	-12.284	44 -- 70	233 -- 254	-14.605	12 -- 25	3 -- 16
RSP_3377	Glutathione S-transferase family protein		0.85	-10.438	46 -- 70	199 -- 219	-14.869	12 -- 27	482 -- 497
RSP_4227	hypothetical protein		0.85	-12.264	27 -- 49	156 -- 181	-13.305	21 -- 27	174 -- 180
RSP_6090	hypothetical protein		0.85	-12.065	41 -- 70	23 -- 43	-15.617	11 -- 27	399 -- 412
RSP_2932	Histidine utilization repressor, gntR family	hutC	0.84	-15.842	89 -- 103	672 -- 685	-20.597	13 -- 27	672 -- 685
RSP_3157	ABC transporter, inner membrane subunit		0.84	-12.103	87 -- 103	218 -- 232	-16.636	11 -- 27	218 -- 232
RSP_3142	acetate permease	actP	0.83	-12.174	46 -- 70	1360 -- 1386	-14.454	12 -- 25	1411 -- 1424
RSP_2336	hypothetical protein		0.83	-11.030	110 -- 124	-10 -- -7	-13.198	11 -- 25	707 -- 721
RSP_7183	Translation initiation factor 2, gamma subunit, GTPase	efu-2	0.83	-9.943	116 -- 123	480 -- 488	-13.935	14 -- 27	109 -- 121
RSP_3862	transcriptional regulator, LysR family		0.83	-13.366	110 -- 123	-89 -- -75	-15.228	18 -- 25	873 -- 880
RSP_3203	transcriptional regulator, AraC family		0.83	-12.003	46 -- 70	549 -- 576	-14.275	32 -- 51	860 -- 879
RSP_2012	NUDIX hydrolase, MutT		0.83	-15.337	86 -- 103	116 -- 133	-19.993	10 -- 27	116 -- 133
RSP_3056	TonB dependent-iron siderophore receptor		0.83	-12.550	28 -- 70	136 -- 174	-13.695	18 -- 27	683 -- 692
RSP_3278	Von Willebrand domain containing protein		0.83	-13.026	115 -- 122	791 -- 798	-16.960	15 -- 25	238 -- 248
RSP_1438	ABC Fe hydroxamate (ferrichrome) transporter, fused inner membrane subunits		0.83	-12.600	19 -- 38	1798 -- 1821	-14.115	14 -- 27	784 -- 795
RSP_3764	hypothetical protein		0.83	-9.881	46 -- 70	1408 -- 1427	-12.152	32 -- 52	1068 -- 1089
RSP_3566	dimethylglycine dehydrogenase		0.83	-15.928	87 -- 101	504 -- 520	-20.171	11 -- 25	504 -- 520
RSP_2641	hypothetical protein		0.83	-12.009	19 -- 70	145 -- 198	-10.819	75 -- 88	188 -- 198
RSP_3303	Putative methyl accepting chemotaxis protein, McpG	mcpG	0.83	-10.380	88 -- 98	1207 -- 1217	-13.407	11 -- 27	1426 -- 1440
RSP_1016	small heat shock protein		0.83	-12.020	155 -- 164	-98 -- -90	-11.637	79 -- 88	98 -- 90
RSP_1243	transcriptional regulator, LacI family		0.88	-15.698	87 -- 164	73 -- 151	-15.429	12 -- 88	73 -- 150

Nach genauer Sichtung der Daten in Tabelle 3 und Tabelle 4 sind diverse „Top“-Kandidaten für eine Regulation durch UpsM Bindung auszumachen, die später weiter validiert werden (3.2.17). Zum einen handelt es sich hierbei um die mRNA des Proteins RSP_1243, die in beiden Transkriptomanalysen am stärksten durch UpsM Überexpression hochreguliert wird und zusätzlich, bedingt durch freie Energie und Nähe zum Translationsstart, eine der realistischsten Binderegionen aufweist. RSP_1243 ist ein uncharakterisiertes Protein, welches laut Annotation ein Transkriptionsregulator bzw. Repressor der Lacl Familie ist. Ein weiterer „Top“-Kandidat ist die polycistronische mRNA des *sit* Operons. Das Operon wird durch Fur/Mur reguliert und kodiert einen Mn^{2+}/Fe^{2+} ABC Transporter bestehend aus zwei integralen Membranproteinen SitC und SitD, der cytoplasmatischen ATP-bindenden Domäne SitB und dem periplasmatischen Substratbindeprotein SitA (Peuser *et al.*, 2011). Die mRNA Regionen aller Strukturgene weisen vorhergesagte Binderegionen für UpsM und dessen Prozessierungsprodukt mit hohen Energiewerten aus (siehe Anhang 6). Zusätzlich ist die mRNA des Operons das am stärksten negativ regulierte Transkript in der Microarrayanalyse nach 90 min 1O_2 -Stress. In der Transkriptomanalyse ohne 1O_2 -Stress (t_0) war die mRNA nicht zu erfassen, weil deren Expression erst unter Stressbedingungen kontinuierlich induziert wird (Berghoff *et al.*, 2013). Denkbar wäre, dass diese Induktion ab einer gewissen Grenze physiologisch unnötig ist und somit durch UpsM abgeschwächt wird.

Neben den gezeigten manuellen Bindevorhersagen von UpsM an potentielle Ziel-mRNAs, die in den Transkriptomanalysen ermittelt wurden, wurden zusätzlich genomweite Bindevorhersagen mit den *web tools* IntaRNA (Busch *et al.*, 2008) und TargetRNA2 (Kery *et al.*, 2014) durchgeführt. Der Grund hierfür ist zum einen, dass schwach exprimierte RNAs in der Microarray Analyse nicht erfasst werden. Zum anderen können deutliche Regulationen nur für Ziel-mRNAs ermittelt werden, die durch UpsM Bindung eine veränderte Stabilität aufweisen. Energiewerte für Bindungen zwischen mRNA und sRNA werden von TargetRNA2 prinzipiell wie für IntaRNA beschrieben berechnet, außer, dass TargetRNA2 Bindungssequenzen favorisiert, die auch in anderen Genomen existieren. Nach den genomweiten Analysen wurde jeweils nur unter den 100 wahrscheinlichsten Interaktionspartnern von UpsM (206 nt) nach Überschneidungen gesucht, wobei auffällt, dass die Programme sehr unterschiedliche Ziel-mRNAs vorschlagen. Lediglich 10 Transkripte werden von beiden *tools* in den „top 100“ gelistet (Abbildung 34). Zusätzlich wurde nach Überschneidungen zwischen regulierten Genen der Transkriptomanalysen (t_0 und t_{90}) und den 100 Genen der bioinformatischen Analysen gesucht. Die entsprechenden Ergebnisse sind in einem Mengendiagramm zusammengefasst (Abbildung 34). In Tabelle 5 sind zusätzlich alle Informationen für Gene aufgelistet, die in beiden informatischen Vorhersagen oder mindestens einer Vorhersage und Transkriptomstudie zu finden sind. Sowohl in der Abbildung, als auch in der Tabelle sind selektierte potentielle Ziel-mRNAs von UpsM, die später validiert werden (3.2.17), hervorgehoben, wobei der Fokus vor allem auf

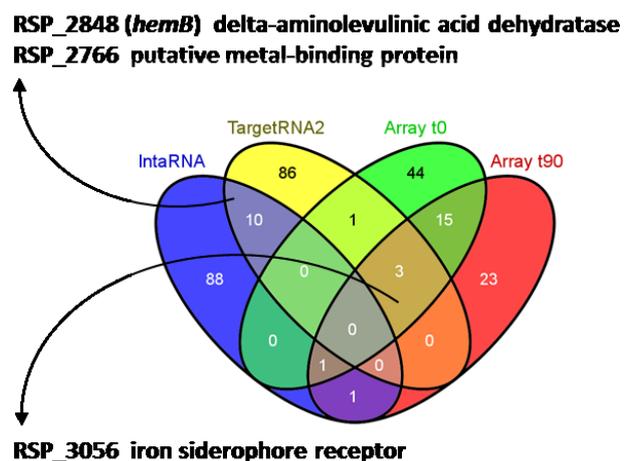


Abbildung 34: Mengendiagramm zur Darstellung der Übereinstimmung zwischen genomweiter IntaRNA und TargetRNA2 Bindungsvorhersagen von UpsM und den Transkriptomstudien *R. sphaeroides* 2.4.1b (pBBRUpsMORFx2) vs. *R. sphaeroides* 2.4.1b (pBBR1MCS2) ohne und nach 90 min 1O_2 -Stress. mRNAs der hervorgehobenen Proteine wurden für weitere Bindungvalidierungen an UpsM selektiert.

Transkripten lag, die von TargetRNA2 favorisiert werden. Dies sind die mRNAs der Proteine HemB, RSP_2766 und RSP_3056. HemB ist eine Porphobilinogensynthase und an der Synthese von Porphobilinogen, einer Häm Vorstufe, in der Porphyrinsynthese beteiligt. RSP_2766 ist ein putatives Metall bindendes Protein unbekannter Funktion und RSP_3056 ist ein *TonB* abhängiger Siderophorrezeptor und könnte somit am Transport von Siderophoren in das Periplasma beteiligt sein.

Genomweiten UpsM Ziel-mRNA Vorhersagen der web-Tools werden nur für Reaktionspartner berücksichtigt. Aufgelistet sind Gene, die in mindestens einer der Vorhersagen und einer der Trajektorien (CS1, CS2) zu finden sind. Positionen der Binderegionen sind für weitere Bindungsvalidierungen an UpsM selektiert. Der

RSP no.	Gen	Beschreibung	Energie [kcal/mol]		Position		Energie [kcal/mol]		Position		Ratio 10' [log2 FC]	Ratio 190' [log2 FC]
			targetRNA2	targetRNA2	UpsM (206 nt)	targetRNA2	targetRNA2	UpsM (206 nt)	targetRNA2	targetRNA2		
RSP_3056	TonB dependent-iron siderophore receptor		-21.66	-21.66	25 -- 36	25 -- 36	-15.71	-15.71	28 -- 58	41 -- 70	0.69	0.67
RSP_3303	Putative methyl accepting chemotaxis protein, McpG		-13.51	-13.51	167 -- 181	167 -- 181	-13.7	-13.7	39 -- 71	157 -- 184	0.96	0.83
RSP_2641	hypothetical protein		-14.4	-14.4	173 -- 185	173 -- 185	-18.32	-18.32	8 -- 75	96 -- 164	0.69	0.75
RSP_3178	3-hydroxydecanoyl-ACP dehydratase		-14.95	-14.95	67 -- 76	67 -- 76	-16.91	-16.91	-46 -- 22	46 -- 69	-0.62	
RSP_2012	NUDIX hydrolase, MutT		-14.46	-14.46			-16.75	-16.75	-35 -- 13	17 -- 41	0.63	
RSP_3278	Von Willebrand domain containing protein		-14.46	-14.46			-16.28	-16.28	-24 -- 16	156 -- 164		
RSP_3305	putative ubiquinol-cytochrome-c reductase assembly prot		-14.46	-14.46	40 -- 59	40 -- 59	-15	-15	-2 -- 45	156 -- 184		0.71
RSP_0354	hypothetical protein		-14.46	-14.46	161 -- 178	161 -- 178	-14.81	-14.81	-73 -- 65	156 -- 164		
RSP_0308	Urease, beta subunit		-13.36	-13.36	166 -- 182	166 -- 182	-14.72	-14.72	-74 -- 59	176 -- 190		
RSP_2032	putative hypothetical Gifsy-1 prophage protein		-13.36	-13.36	25 -- 36	25 -- 36	-14.46	-14.46	-35 -- 15	44 -- 70		
RSP_2748	possible transcriptional regulator, CopG family		-12.74	-12.74	151 -- 165	151 -- 165	-14.14	-14.14	-4 -- 24	44 -- 70		
RSP_2848	delta-aminolevulinic acid dehydratase		-23.61	-23.61	165 -- 184	165 -- 184	-19.31	-19.31				
RSP_3065	Putative transporter, Major facilitator superfamily (MFS)		-13.81	-13.81	150 -- 170	150 -- 170	-14.28	-14.28				
RSP_0015	ABC spermidine/putrescine transporter, ATPase subunit		-12.79	-12.79	175 -- 188	175 -- 188	-14.14	-14.14				
RSP_2766	Uncharacterized metal-binding protein		-19.31	-19.31	162 -- 180	162 -- 180	-14.14	-14.14				
RSP_3577	putative gas vesicle synthesis protein		-14.14	-14.14	19 -- 34	19 -- 34						

Bei jeder Vorhersage wurden nur die 100 wahrscheinlichsten Studien von *R. sphaeroides* 2.4.1b (pBBRUpsMORF2) vs. TargetRNA2 ausgehend von den Vorhersagen gezeigt.

3.2.17 UpsM Ziel-mRNA Validierung I

Um die Annahme zu überprüfen, dass die sRNA UpsM eine der selektierten mRNAs aus Abschnitt 3.2.16 durch direkte Bindung reguliert, wurden *lacZ* basierte Reporterplasmide konstruiert. Beim Ausgangsplasmid handelt es sich hierbei um pPHU4352, das eine konstitutive Expression ausgehend von einem starken 16s rRNA Promotor und die translationelle Fusion eines Proteins an LacZ ermöglicht. Zwischen Promotor und *lacZ* wurden Genabschnitte der Ziel-mRNAs kloniert, die den jeweiligen 5' UTRs mit RBS und Teilen der proteinkodierenden Sequenz entsprechen und die vorhergesagte Binderegion von UpsM enthalten. Die Primerpaare zum Amplifizieren dieser Fragmente sind im Material- und Methodenteil aufgelistet und nach dem Muster [Gen]_rep_f/[Gen]_rep_r benannt. Die genauen Positionen von UpsM Binderegionen sind den Tabellen Tabelle 3, Tabelle 4 und Tabelle 5 zu entnehmen. Aufgrund diverser Bindestellen in der polycistronischen *sit* mRNA wurde außerdem eine schematische Darstellung von Bindestellen und klonierten Fragmenten im Anhang beigefügt (Anhang 6). Fertige Plasmide wurden mittels biparentaler Konjugation in den UpsM Überexpressionstamm *R. sphaeroides* 2.4.1b (pBBRUpsMORFx2) und den Kontrollstamm *R. sphaeroides* 2.4.1b (pBBR1MCS2) übertragen. Resultierende Klone wurden mikroaerob in biologischen Triplikaten kultiviert. Die Probenentnahme für β -Galaktosidase assays erfolgte in technischen Duplikaten während exponentiellen Wachstums bei OD₆₆₀ 0,4. Da die Reporterplasmide Transkripte mit potentieller UpsM Binderegion exprimieren, ist in Gegenwart von einem höheren UpsM Level im Überexpressionstamm eine andere Reporteraktivität im Vergleich zum Kontrollstamm mit Leervektor zu erwarten, wenn UpsM tatsächlich bindet. In anderen Worten, Regulation durch UpsM Bindung würde sich durch eine veränderte β -Galaktosidaseaktivität ausdrücken, die hier in Form von Miller *units* dargestellt ist.

In Abbildung 35: sind die Ergebnisse für Ziel-mRNAs dargestellt, die anhand von Transkriptom- und IntaRNA-Analyse selektiert wurden. Hierbei handelt es sich um die mRNA des Proteins RSP_1243, das ein uncharakterisiertes Protein ist, welches laut Annotation ein Transkriptionsregulator bzw. Repressor der LacI Familie ist und die polycistronische mRNA des *sit* Operons, welches die Strukturgene eines Mn²⁺/Fe²⁺ ABC Transporters kodiert. Die Verwendung entsprechender Reporterplasmide pPHU1243, pPHU*sitA*, pPHU*sitC* und pPHU*sitD* führen je nach An- oder Abwesenheit von UpsM Überexpression zu keiner signifikanten Veränderung der Reporteraktivität. Im Fall von pPHU*sitC* enthält das klonierte Fragment zusätzlich zur Bindestelle in der 5' Region des SitC kodierenden mRNA Bereiches, auch die vorhergesagte Bindestelle in der 3'Region des SitB kodierenden mRNA Bereiches, der direkt *upstream* von *sitC* liegt (siehe Anhang 6). Für pPHU*sitC* und pPHU*sitD* wurden im Schnitt, wenn auch nicht signifikant, etwas höhere Miller *units* für den Überexpressionstamm errechnet. Diese Tendenz spiegelt nicht die Annahme wider, dass UpsM das *sit* Transkript negativ reguliert. Zusammenfassend konnte für keines der überprüften Transkripte eine UpsM Bindung bzw. Regulation nachgewiesen werden.

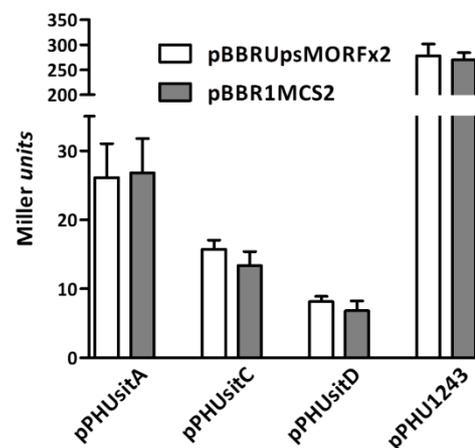


Abbildung 35: *In vivo* β -Galactosidase Reporter assays zum Nachweis von UpsM Bindung an das *sitABCD* und RSP_1243 Transkripte. Die Reporteraktivität wurde in *R. sphaeroides* 2.4.1b (pBBRUpsMORFx2) und dem Kontrollstamm *R. sphaeroides* 2.4.1b (pBBR1MCS2) bestimmt. Miller *units* und Standardabweichungen resultieren aus biologischen Triplikaten mit technischen Duplikaten. Signifikanzen zur jeweiligen Kontrolle sind jeweils $p > 0,01$.

In Abbildung 36A sind die Ergebnisse für Ziel-mRNAs gezeigt, die anhand genomweiter bioinformatischer UpsM Bindungsvorhersagen der *web tools* IntaRNA und targetRNA2 selektiert wurden. Hierbei handelt es sich um die mRNAs der Proteine HemB, RSP_2766 und RSP_3056. HemB ist eine Porphobilinogensynthase und an der Synthese von Porphobilinogen, einer Häm Vorstufe, in der Porphyrinsynthese beteiligt. RSP_2766 ist ein putatives Metall-bindendes Protein und RSP_3056 ein *TonB* abhängiger Siderophorrezeptor. Die entsprechenden Reporterplasmide pPHU*hemB*, pPHU2766 und pPHU3056 wurden wie oben beschrieben verwendet. Die ermittelten β -Galaktosidaseaktivitäten in Überexpressionsstamm und Vergleichsstamm weisen erneut keinen signifikanten Unterschied zueinander auf. Somit konnte keine Regulation der mRNAs von *hemB*, RSP_2766 und RSP_3056 durch UpsM demonstriert werden.

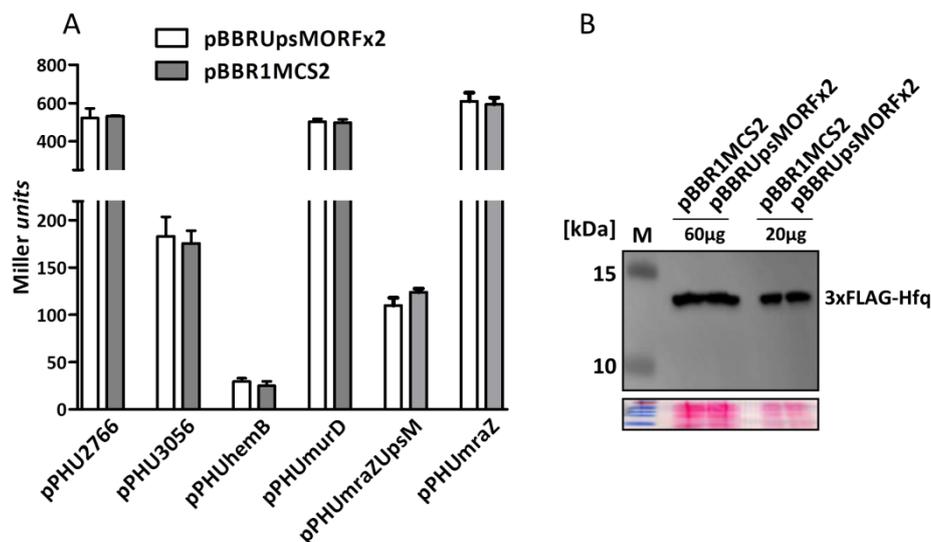


Abbildung 36: (A) In vivo β -Galactosidase Reporter assays zum Nachweis von UpsM Bindung an die Transkripte von RSP_2766, RSP_3056, HemB, MurD und UpsM bzw MraZ. Die Reporteraktivität wurde in *R. sphaeroides* 2.4.1b (pBBRUpsMORFx2) und dem Kontrollstamm *R. sphaeroides* 2.4.1b (pBBR1MCS2) bestimmt. Miller units und Standardabweichungen resultieren aus biologischen Triplikaten mit technischen Duplikaten. Signifikanzen zur jeweiligen Kontrolle sind jeweils $p > 0,01$. **(B) Western Blot Analyse von ektopischer Hfq-FLAG Expression zum Nachweis von Regulation durch UpsM.** Es wurden 60 μ g und 20 μ g zellfreies Proteinextrakt der Stämme *R. sphaeroides* 2.4.1 Δ *hfq* (pRK*hfq*FLAG; pBBR1MCS2) und *R. sphaeroides* 2.4.1 Δ *hfq* (pRK*hfq*FLAG; pBBRUpsMORFx2) verglichen. Zur Detektion wurden Peroxidase gekoppelte anti-FLAG Antikörper verwendet. Ponceau Färbung dient als Ladekontrolle.

Weil bisher für kein Transkript eine Interaktion mit UpsM bestätigt werden konnte, wurden weitere Ziel-mRNAs getestet (Abbildung 36). Die Auswahl erfolgte hierbei aufgrund von genetischem oder funktionellem Kontext zu der sRNA. Ein häufiges strukturelles Prinzip in bakteriellen Operons ist beispielsweise, dass das erste Strukturgen einen Regulator kodiert, der Einfluss auf Transkription und Translation der Folgegene nimmt. Weil UpsM in der 5' UTR des *dcw* Genclusters kodiert ist (3.2.1 und 3.2.2), könnte man UpsM im weitesten Sinne auch als erstes Strukturgen in einem Operon betrachten. Aus diesem Grund wurde überprüft, ob UpsM einen regulatorischen Einfluss auf seinen eigenen Promotor, die Expression des Folgegens *mraZ* oder des neunten Strukturgens *murD* hat.

Der *murD* mRNA Abschnitt wurde hierbei ausgewählt, weil wenige Basen *upstream* die wahrscheinlichste UpsM Binderegion auf der polycistronischen *dcw* mRNA lokalisiert ist (TargetRNA2: Energie -10,78; Position -31 -- -16). Das Plasmid pPHU*murD* wurde nach den anfangs beschriebenen Kriterien konstruiert und ebenfalls für Reporterassays in An- und Abwesenheit einer UpsM Überexpression verwendet, wobei anhand ermittelter Miller units erneut kein Unterschied festzustellen ist.

Für das erste proteinkodierende Strukturgen *mraZ* wurde innerhalb der nativen 5' UTR, wo auch das Gen der sRNA lokalisiert ist, nach der günstigsten Binderegion für UpsM gesucht. Diese umfasst die Positionen - 80 bis - 67 ausgehend vom translationellen Startcodon und die Positionen 179 – 165 der sRNA (targetRNA2: Energie - 8,40). Somit würde die UpsM Bindung in der sORF kodierenden Sequenz bzw. dort stattfinden, wo sich während der Transkription der Terminator von UpsM ausbildet oder, wie bereits gezeigt, *read throughs* zugelassen werden (3.2.2). Genau genommen handelt es sich exakt um den 5'*stem* von UpsM der mit dem 3'*stem* der selben Stammschleifenstruktur in der 5' UTR von *mraZ* hybridisiert (Abbildung 19). In Abschnitt 3.2.4 wurde bereits widerlegt, dass die Translation von sORF durch ablesende Ribosomen in räumlicher Nähe zum UpsM Terminator in der *dcw* 5' UTR die Ausbildung der RNA Terminatorstruktur unterbindet und somit *read throughs* begünstigt. Dieses Prinzip der Antitermination, welches beispielweise für das *trp* Operon von *E. coli* beschrieben ist, beruht auf der räumlichen Kopplung von Transkription und translatierenden Ribosomen. Vor allem in gram-positiven Bakterien sind jedoch auch Antiterminationsmechanismen beschrieben, die auf RNA-RNA Bindung basieren. Hierbei binden ungeladene tRNAs in 5' UTRs und führen zur Ausbildung einer Antiterminatorstruktur, die gegenüber der Terminatorstruktur favorisiert wird und der RNA Polymerase den *read through* ermöglicht. Aufgrund der bereits beschriebenen Bindevorhersage von UpsM mit der Terminatorstruktur in der *dcw* 5' UTR ist dieses Prinzip auch hier denkbar, wobei die sRNA durch Hybridisierung an den 3'*stem* ebenfalls die Ausbildung des Terminators verhindern könnte und der RNA Polymerase so den *read through* ermöglicht. Zum Überprüfen dieser Hypothese wurden die Reporterplasmide pPHU*mraZ*UpsM und pPHU*mraZ* verwendet. pPHU*mraZ*UpsM basiert auf Ausgangsplasmid pPHU235, welches translationelle Fusionen an LacZ erlaubt, aber weder Promotor noch RBS enthält. Das inserierte Fragment führt zu einer translationellen Fusion von *MraZ* mit 33 N-terminalen AS an LacZ und enthält einen *upstream* Bereich von 376 nt Länge bzw. den kompletten UpsM Lokus inklusive UpsM-Promotor (Abbildung 13). Das entsprechende Fragment wurde mit den Primern *MraZ_rep_f* und *MraZ_rep_r* amplifiziert. pPHU*mraZ* basiert auf dem Ausgangsplasmid pPHU4352, das im Unterschied zu pPHU235 einen starken 16S rRNA Promotor enthält, und somit konstitutive Expression und translationelle Fusion eines Proteins an LacZ ermöglicht. Das inserierte Fragment führt ebenfalls zu einer translationellen Fusion von *MraZ* mit 33 N-terminalen AS an LacZ und enthält einen *upstream* Bereich von 177 nt Länge. D.h. im *upstream* Bereich ist ca. die Hälfte der UpsM kodierenden Sequenz inklusive Terminator und IGR zwischen sRNA und *mraZ* aber kein Promotor enthalten. Amplifikate wurden mit den Primern *MraZ_rep_f2* und *MraZ_rep_r* erzeugt. Beide Plasmide wurden mittels biparentaler Konjugation in den UpsM Überexpressionstamm *R. sphaeroides* 2.4.1b (pBBRUpsMORFx2) und den Kontrollstamm *R. sphaeroides* 2.4.1b (pBBR1MCS2) übertragen. Resultierende Klone wurden mikroaerob in biologischen Triplikaten kultiviert. Die Probenentnahme für β -Galaktosidase *assays* erfolgte in technischen Duplikaten während exponentiellen Wachstums bei OD₆₆₀ 0,4. Die ermittelten Miller *units* zeigen keinen signifikanten Unterschied ($p > 0,01$) zwischen den beiden Stämmen, womit kein RNA-RNA Bindung vermittelte Antitermination nachgewiesen werden konnte, da sonst eine erhöhte *lacZ* Expression im Überexpressionstamm vorliegen würde.

Zuletzt wurde aufgrund des funktionellen Zusammenhangs zwischen UpsM und Hfq auch die mRNA des RNA Chaperons auf Regulation durch die sRNA getestet (targetRNA2: Energie -9,8; Position -4 -- 11). Dies erfolgte durch die Detektion von ektopisch exprimiertem Hfq-FLAG, welches ausgehend von der nativen Promotorregion transkribiert wird, mittels Western Blot. Hierzu wurde der Leervektor pBBR1MCS2 oder das Überexpressionsplasmid pBBRUpsMORFx2 mittels biparentaler Konjugation in den Stamm *R. sphaeroides* 2.4.1 Δ *hfq* (pRKhfqFLAG) übertragen. Resultierende Klone wurden

mikroaerob kultiviert. Die Probenentnahme erfolgte während exponentiellen Wachstums bei OD_{660} 0,4. Die folgende Western Blot Analyse wurde mit 60 μ g und 20 μ g zellfreiem Proteinextrakt durchgeführt. Zur Detektion wurden Peroxidase gekoppelte anti-FLAG Antikörper verwendet. Ponceau Färbung diente als Ladekontrolle. Bei positiver oder negativer Regulation der Hfq mRNA durch UpsM wäre bei Überexpression der sRNA ein höheres oder geringeres Proteinlevel nachzuweisen. Dies ist nicht der Fall (Abbildung 36B). Somit ist auch für Hfq keine Regulation durch UpsM zu zeigen.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass sich mit keinem der durchgeführten Reporter assays Regulationen durch UpsM und sORF Überexpression demonstrieren ließen. Möglicherweise wurden also mRNAs überprüft, die keine Interaktionspartner von UpsM sind. Eine andere Erklärung wäre die hohe Abundanz der sRNA, die bereits im Kontrollstamm mit Leervektorkontrolle vorliegt. Unter Umständen macht also eine zusätzliche ektopische Überexpression der sRNA keinen regulatorischen Unterschied aus, weil die sRNA im Verhältnis zur Ziel-mRNA im Kontrollstamm bereits im Überschuss vorhanden ist. Ein UpsM Deletionsstamm für Vergleiche zum Wildtyp, konnte wie schon erwähnt nicht erzeugt werden. Außerdem könnten Regulationen der Transkriptomstudie auch auf Effekte des sORF zurückzuführen sein, der mit kloniert wurde.

Neben Reporterassays könnte auch die Ziel-mRNA abhängige Prozessierung von UpsM als Indikator für eine Interaktion angesehen werden. Eine solche Ziel-mRNA müsste unter ähnlichen Bedingungen in der Zelle exprimiert werden unter denen auch das Spaltungsprodukt von UpsM akkumuliert. Dies trifft bei den oben getesteten mRNAs besonders auf *sit* Transkripte zu, deren Expression durch 1O_2 -Stress induziert wird und die mit anhaltendem 1O_2 -Stress kontinuierlich akkumulieren (Berghoff *et al.*, 2013). Gegen eine Ziel-mRNA abhängige Prozessierung von UpsM durch die *sit* mRNA spricht jedoch, dass diese Ziel-mRNA bereits dem RpoHI/II Regulon zugeordnet werden konnte (3.2.13) und bisher keine RpoHI/II abhängige Expression der *sit* Genen gezeigt wurde. Trotzdem ist die mRNA des Operons die am stärksten negativ regulierte bei UpsM Überexpression in der Microarrayanalyse nach 90 min 1O_2 -Stress und weist diverse starke Binderegionen auf (Tabelle 4). Außerdem wäre es physiologisch plausibel, wenn das stetige Steigen des *sitABCD* Transkriptlevels in Gegenwart von 1O_2 ab einer gewissen Grenze unnötig ist und somit durch UpsM abgeschwächt wird. Die Fur/Mur regulierte *sitABCD* Expression in *R. sphaeroides* ist gut untersucht und wird unter Manganmangel noch deutlich stärker induziert als bei 1O_2 -Stress (Peuser *et al.*, 2011). Für den Fall, dass *sit* Transkript wäre als Ziel-mRNA an der Prozessierung von UpsM beteiligt, müsste diese auch unter Manganmangel (Mn-) mittels Northern Blot Analyse zu zeigen sein. Hierzu wurden 40 ml RÄ Medium ohne Mangan mit 100 μ l einer Ausgangskultur von *R. sphaeroides* 2.4.1b angeimpft, die in regulärem RÄ Medium gewachsen ist. Ausgehend von dieser Kultur erfolgten zwei weitere Rückverdünnungen je zum Ende exponentieller Wachstumsphasen durch Übertragung von 100 μ l Bakterienkultur in

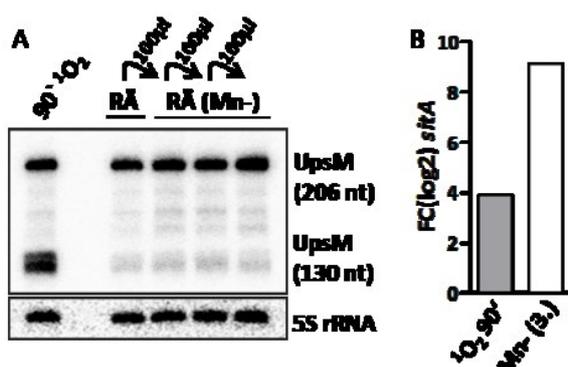


Abbildung 37: Northern blots zur Visualisierung der Prozessierung von UpsM unter Manganmangelbedingungen. Detektion des UpsM-Primärtranskriptes (206 nt) und des UpsM-Prozessierungsproduktes (130 nt) in 5 μ g Gesamt-RNA aufgetrennt auf 10%igen TBE/PAA/UREA-Gelen. Die linke Spur zeigt Signale nach 90 min 1O_2 -Stress zum Vergleich. Signale der 5S rRNA dienen als interne Ladekontrolle. (B) qRT-PCR gegen *sitA* Transkripte. Quantifiziert wurde die Anreicherung des Transkripts nach 90 Minuten 1O_2 -Stress oder nach drei Verdünnungsschritten in Medium ohne Mangan.

frisches Medium ohne Mangan, um die Metallkonzentration stark zu verdünnen. Probenentnahmen aus allen Kulturen, Isolierung von Gesamt-RNA und die Northern Blot Detektion von UpsM erfolgte wie bereits beschrieben. Das Ergebnis ist Abbildung 37 zu entnehmen. Mit zunehmendem Manganmangel ist im Unterschied zur Kontrollspur (90 Minuten $^1\text{O}_2$ -Stress) keine Akkumulation des Prozessierungsproduktes von UpsM zu erkennen (Abbildung 37A), obwohl qRT-PCRs gegen *sitA* nur ein 16 fach erhöhtes Transkriptlevel nach 90 Minuten $^1\text{O}_2$ -Stress aber ein ca. 500 fach erhöhtes Transkriptlevel nach drei Verdünnungsschritten in Medium ohne Mangan zeigen (Abbildung 37B).

3.2.18 Transkriptomstudie von *R. sphaeroides* Δhfq

Hfq ist ein weit verbreitetes monohexameres RNA Chaperon der Sm-like Superfamilie (Sun *et al.*, 2002). Das Protein vermittelt vor allem die Duplexbildung zwischen sRNA und mRNA trotz imperfekter Basenpaarung und schützt sRNAs aber auch mRNAs vor Nukleaseabbau (siehe auch 1.1.4.3). Somit ist Hfq ein globaler Regulator der Genexpression auf RNA Ebene. In dieser Arbeit konnte bereits eine stark negative Auswirkung auf das UpsM Primärtranskriptlevel durch *hfq* Deletion gezeigt werden (3.2.8). Zusätzlich wurde demonstriert, dass UpsM nur in der Anwesenheit des RNA Chaperons an mindestens eine Ziel-mRNA aus dem RpoH_{I/III} Regulon hybridisiert und infolgedessen RNase E abhängig prozessiert wird (3.2.8, 3.2.11 und 3.2.13). Weil bisher jedoch keine Ziel-mRNA identifiziert werden konnte, wurden zur Eingrenzung möglicher Kandidaten die Transkriptomstudien von Deletionsstamm *R. sphaeroides* 2.4.1 Δhfq (Cy3) und parentalem Wildtyp (Cy5) nach 10 min $^1\text{O}_2$ -Stress verglichen. Die Transkriptomstudien erfolgten via Microarray Analyse als Duplikat, wie ausführlich in Abschnitt 3.1.2 und 3.2.16 beschrieben. Wie zuvor erfolgte zunächst eine Qualitätskontrolle anhand klar ausgeprägter ribosomalen RNA Spezies (14S rRNA und 16S rRNA) (Abbildung 38A).

Die aus dem Experiment resultierenden Aufnahmen wurden mit der Feature Extraction Software (Agilent) im Hinblick auf Fluoreszenzwerte einzelner Sonden ausgewertet. Anschließend erfolgte die Normalisierung der Rohdaten mit Multiarray Analyse und LOWESS *within* Normalisierung (ausführlich

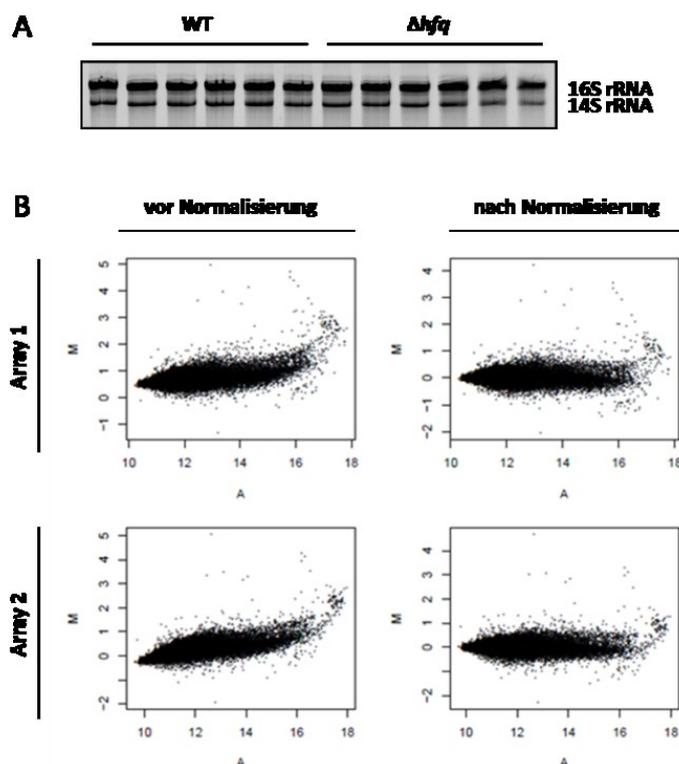


Abbildung 38: Qualitätskontrollen für die vergleichenden Transkriptomstudien von *R. sphaeroides* 2.4.1 Δhfq vs. parentalem Wildtyp nach 10 min $^1\text{O}_2$ -Stress. (A) 1 μg Gesamt-RNA je Probe wurde auf einem 10 %igem TBE/PAA/UREA-Gel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid zur Beurteilung der RNA Integrität anhand von 14S und 16S rRNA gefärbt. Unten: MA-Plots für das Arrayduplikat vor und nach Normalisierung. Normalisierung erfolgte durch Bereinigung gegen den Hintergrund und anschließender Normalisierung nach LOWESS. Aufgetragen sind M-Wert (logarithmiertes Verhältnis der Fluoreszenzen von Cy3 und Cy5) gegen A-Wert (Mittelwert aus der logarithmierten Summe der Fluoreszenzen von Cy3 und Cy5) für jede Sonde.

in 3.1.2 beschrieben). MA-Plots vor und nach LOWESS-Normalisierung sind in Abbildung 38B gezeigt. Der M-Werte ist das logarithmierte Verhältnis der Intensitäten von Cy3 und Cy5 und der A-Wert der Mittelwert aus der logarithmierten Summe der Intensitäten von Cy3 und Cy5 (siehe Formeln in Abschnitt 3.1.2). Ein M-Wert von 0 entspricht keiner Regulation bzw. keiner Veränderung der Fluoreszenzwerte zwischen Cy3 (*R. sphaeroides* 2.4.1 Δhfq) und Cy5 (Wildtyp). Dies ist für die meisten Gene zu erwarten und drückt sich im MA-Plot durch eine horizontal verlaufende Datenwolke entlang der Nulllinie der Y-Achse aus. Das ist bereits vor Normalisierung schon annähernd der Fall, wobei es in Array 1 eine leichte Verschiebung in den positiven Wertebereich gibt, die nach Normalisierung behoben werden konnte (Abbildung 38B). Extreme Verschiebungen, aufgrund des globalen Regulationscharakters von Hfq waren nicht zu beobachten.

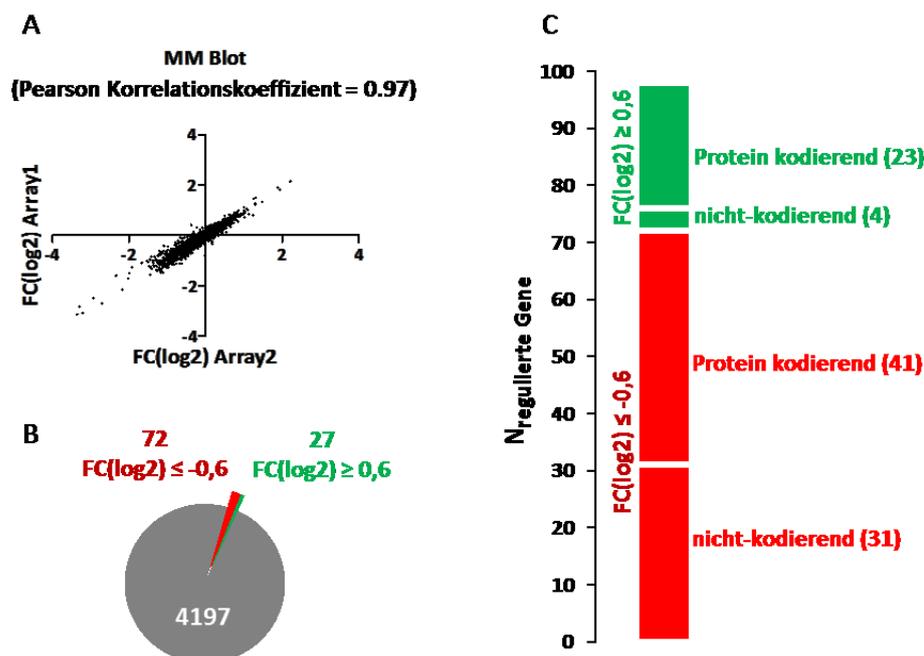


Abbildung 39: Auswertung der Transkriptomstudie von *R. sphaeroides* 2.4.1 Δhfq vs. Wildtyp nach 10 min 1O_2 -Stress. (A) Korrelationen zwischen den Arrays des Duplikats nach Normalisierung dargestellt als MM Blots und berechnet als Pearson Korrelationskoeffizienten. Jeder Punkt in dem Graphen entspricht einer Sonde bzw. resultiert aus den logarithmierten Verhältnissen [FC (log₂)] von Cy3 zu Cy5 in Array1 (y-Achse) und Array2 (x-Achse). (B) Anteil hoch- (grün) und runterregulierter (rot) Transkripte an der Gesamtheit aller ermittelten Regulationen nach Einführung von Schwellenwerten ($A \geq 11$; FC(log₂) $\geq 0,6$ oder $\leq -0,6$). (C) Anteil Protein kodierender und nicht kodierender Transkripte unter den regulierten Genen.

Wie in Abschnitt 3.1.2 und 3.2.16 wurden MM Blots erstellt, um die Übereinstimmung zwischen den biologisch unabhängigen Replikaten zu visualisieren (Abbildung 39A). Es liegt ein starker linearer Zusammenhang für das Duplikat vor, der sich durch einen Pearson Korrelationskoeffizient von 0,97 beziffern lässt.

Zur weiteren Datenbearbeitung wurden wie zuvor Sonden mit schlechter Gesamt-Fluoreszenz (A-Werte ≥ 11 ; entspricht der Hintergrund-Fluoreszenz) herausgefiltert. Verbleibende Sonden bzw. M-Werte wurden je Gen miteinander verrechnet und zwischen den Replikaten gemittelt. So konnten zwischen beiden Stämmen logarithmierte Verhältnisse (FC (log₂)) für 4296 Gene ermittelt werden, von denen nach Einführung eines Schwellenwerte für Regulation (logarithmiertes Verhältnis $> 0,6$ oder $< -0,6$) in Δhfq 27 als hoch- und 72 als runterreguliert betrachtet werden können (Abbildung 39B), wobei keine tRNAs berücksichtigt wurden. Diese Verteilung macht durchaus Sinn, weil sich die Abwesenheit von *hfq* natürlich auch durch eine geringere Stabilität vieler Transkripte in der Zelle bemerkbar macht. Dies gilt insbesondere für ncRNAs (trans kodierte sRNAs und *antisense* RNAs) von

denen 44 runter- und nur 4 hochreguliert sind. In anderen Worten zeigt das Experiment eindeutig die große Wichtigkeit des RNA Chaperons für nicht-kodierende Transkripte in *R. sphaeroides*. Weil die Funktion kanonischer in *trans* kodierter sRNAs in der Regel die negative Regulation einer oder mehrerer Ziel-mRNAs durch Hfq vermittelte Basenpaarung ist, müssten diese mRNAs bei *hfq* Deletion hochreguliert vorliegen. Aus diesem Grund ist der Datensatz auch für andere auf sRNAs ausgerichtete Projekte der Arbeitsgruppe wertvoll. Dies kann anhand des Gens *pqqA* (RSP_6132) belegt werden, welches nachweislich direkt oder indirekt negativ durch die Hfq abhängigen *trans* kodierten sRNAs CcsR1–4 reguliert wird (Billenkamp *et al.*, 2015) und hier in Δhfq im Verhältnis zum WT hochreguliert vorliegt. Alle regulierten Gene dieser Transkriptomstudie sind in im Anhang aufgelistet (Anhang 7).

3.2.19 Ziel-mRNA Suche mittels Konvergenz aus Transkriptomstudien und RpoH_{I/II} Regulon

In dieser Arbeit konnte bisher keine Ziel-mRNA von UpsM identifiziert werden. Stattdessen wurde demonstriert, dass die sRNA nur in der Anwesenheit des RNA Chaperons Hfq beispielweise bei ¹O₂-Stress und in der stationären Wachstumsphase an mindestens eine Ziel-mRNA aus dem RpoH_{I/II} Regulon hybridisiert und infolgedessen RNase E abhängig prozessiert wird (3.2.8, 3.2.11 und 3.2.13). Aus diesem Grund wurde nach Übereinstimmungen zwischen Genen des RpoH_{I/II} Regulons mit proteinkodierenden Transkripten gesucht, die durch Hfq (Anhang 7) oder UpsM (Tabelle 3 Tabelle 4) reguliert werden und gleichzeitig in der stationären Wachstumsphase hochreguliert vorliegen (siehe Anhang 8). Die Transkriptomstudie exponentiellen Wachstums vs. stationäre Wachstumsphase wurde von Dr. Rische-Grahl durchgeführt und von mir ausgewertet. Bei Transkripten, die in der stationären Wachstumsphase reguliert sind, wurden nur hochregulierte berücksichtigt, weil dies Grundvoraussetzung für eine Induktion der Ziel-mRNA abhängigen Prozessierung von UpsM ist. Das RpoH_{I/II} Regulon wurde bereits in mehreren Veröffentlichungen beschrieben (Dufour *et al.*, 2012; Nuss *et al.*, 2009; Nuss *et al.*, 2010). Übereinstimmungen in den 4 Gruppen sind durch das Mengendiagramm in Abbildung 40 gezeigt. Transkripte die in mindestens 3 der 4 Gruppen vorkommen, sind in der Abbildung hervorgehoben. Hierbei handelt es sich um die mRNAs des kleinen Hitze-Stress Proteins (sHSP) RSP_1016, des hypothetischen Proteins RSP_2641 und des uncharakterisierten Proteins RSP_1409, welches eine Fasciclin Domäne (FAS1) enthält. Diese Domäne findet sich häufig bei humanen oder pflanzlichen Oberflächenproteinen wieder, die Zelladhäsion vermitteln.

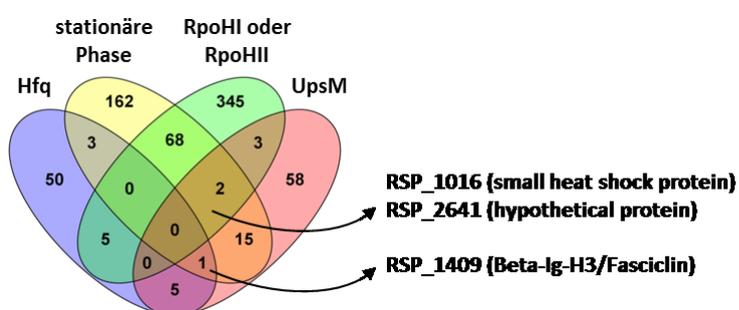


Abbildung 40: Mengendiagramm zur Darstellung der Übereinstimmung zwischen Genen des RpoH_{I/II} Regulons und Transkripten die durch Hfq oder UpsM reguliert bzw. in der stationären Wachstumsphase hochreguliert vorliegen. mRNAs, die drei der vier abgeglichenen Gruppen angehören, sind hervorgehoben.

Zusammenfassend ist anhand dieser Analyse zu sagen, dass die mRNAs der Genprodukte RSP_1016 (IntaRNA: Energie -12,02; Position -98 -- -90), RSP_2641 (IntaRNA: Energie -12,00; Position 145 -- 198) und RSP_1409 (IntaRNA: Energie -10,62; Position 402 -- 414) vielversprechende potentielle Interaktionspartner von UpsM sind, auch wenn die vorhergesagten Binderegionen weder ideale Energiewerte haben, noch nahe der RBS oder des Translationsstarts positioniert sind, wie es in der

Regel für sRNAs angenommen wird. Ebenfalls entspricht dieser Annahme nicht, dass die Transkripte RSP_1016 und RSP_2641 durch UpsM Überexpression positiv reguliert werden.

Neben den hier diskutierten potentiellen Ziel-mRNAs von UpsM treffen die Eigenschaften RpoH_{III}- und Hfq- Abhängigkeit als auch Induktion während der stationären Phase auch auf einige nicht kodierende RNAs bzw. sRNAs zu. Hierzu sind zum Beispiel SorY, SorX (Peng *et al.*, 2016), CcsR1-4 4 (Billenkamp *et al.*, 2015) und RSs0827 zu zählen. Die direkte Bindung zweier sRNAs aneinander und eine damit einhergehende Prozessierung wäre durchaus denkbar, würde aber eine große Ausnahme in der Literatur darstellen. Am ehesten würde die sRNA RSs0827 als potentielles Ziel-Transkript für UpsM in Frage kommen, weil sich die Induktion der Expression dieser sRNA sowohl bezüglich der Bedingungen als auch der zeitlichen Abfolge mit der Induktion der Prozessierung von UpsM deckt. Zusätzlich wurde mittels IntaRNA eine freie Energie von -17,61 kcal/mol für die Bindung von UpsM an RSs0827 vorhergesagt. Somit ist diese Interaktion, im Vergleich zu den bisher aufgrund von experimentellen Hinweisen überprüften Interaktionen, günstiger.

3.2.20 UpsM Ziel-RNA Validierung II

Anhand der Analyse in 3.2.19 wurde das Transkript des Proteins RSP_1409 und RSs0827 als potentielle Ziel-RNAs identifiziert, die bei Hybridisierung an UpsM zur Hfq abhängigen Prozessierung der sRNA durch RNase E führen. Zur Validierung der Interaktion mit der RSP_1409 mRNA wurde die Spaltung von UpsM nach 90 min ¹O₂-Stress im Deletionsstamm *R. sphaeroides* 2.4.1 Δ1409 im Vergleich zum parentalen Wildtyp mittels Northern Blot visualisiert. Probenentnahmen vor und nach ¹O₂-Stress, Isolierung von Gesamt-RNA und die Northern Blot Detektion von UpsM erfolgte hierbei wie bereits beschrieben. Das entsprechende Ergebnis ist in Abbildung 41 dargestellt. Weil der für die Binderegion kodierende chromosomale Genabschnitt in Δ1409 komplett deletiert ist, wäre hier in Gegenwart von ¹O₂ keine Akkumulation des 3'Fragmentes zu erwarten, wenn es sich tatsächlich um das Transkript handelt, welches die Prozessierung vermittelt. Die Northern Blot Analyse zeigt jedoch eine deutliche Akkumulation des Prozessierungsproduktes im Deletionsstamm. Somit handelt es sich bei der mRNA von RSP_1409 nicht um das gesuchte Transkript.

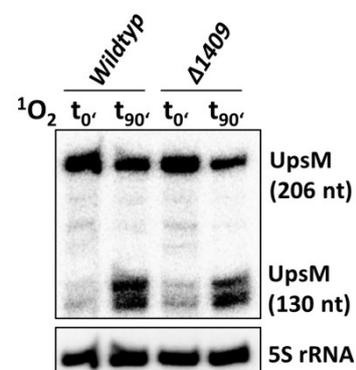


Abbildung 41: Northern blot zur Visualisierung der Prozessierung von UpsM nach 90 min ¹O₂ im Deletionsstamm *R. sphaeroides* 2.4.1 Δ1409 im Vergleich zum parentalen Wildtyp. Detektion des UpsM-Primärtranskriptes (206 nt) und des UpsM-Prozessierungsproduktes (130 nt) in 5 µg Gesamt-RNA aufgetrennt auf 10 %igen TBE/PAA/UREA-Gelen. Signale der 5S rRNA dienen als interne Ladekontrolle.

Der Nachweis für eine Interaktion zwischen UpsM und RSs0827 wurde auf ähnliche Weise durchgeführt. Zunächst ist in Abbildung 42A die mit IntaRNA vorhergesagte und sehr günstige Interaktion zwischen beiden Transkripten im Detail gezeigt. Hierbei bindet RSs0827 in der Region des ersten *stemloop* von UpsM (siehe auch Abbildung 19A) von Position 9 bis 23. Bei Hybridisierung beider sRNAs könnte es zur Auflösung dieser Struktur kommen, wobei die Prozessierungsstelle in UpsM folglich als Einzelstrang vorläge und für RNase E zugänglich wäre.

Zur Validierung der Interaktion *in vivo* wurde die Spaltung von UpsM nach 30 min ¹O₂-Stress im Deletionsstamm *R. sphaeroides* 2.4.1 Δ0827 und im Überexpressionsstamm *R. sphaeroides* (pBBR_0827) im Vergleich zum parentalen Wildtyp und einem Stamm mit Leervektorkontrolle mittels Northern Blot visualisiert (Abbildung 42 B). Im Wildtyp und im Kontrollstamm zeigt sich erst nach 30 min ¹O₂ Stress ein erhöhtes Level an RSs0827 Transkripten als auch eine Akkumulation des

3' Fragmentes bzw. Prozessierungsproduktes von UpsM. Im Überexpressionsstamm liegt bereits ohne Stressbedingungen eine große Menge RSs0827 vor. Dies geht mit einer starken Akkumulation von UpsM (130 nt) einher, was normalerweise nur unter Stressbedingungen zu beobachten ist. Am augenscheinlichsten wird der kausale Zusammenhang zwischen RSs0827 Transkriptlevel und UpsM Prozessierung jedoch im RSs0827 Deletionsstamm. Hier wird RSs0827 nicht expremiert, was dazu führt, dass selbst unter $^1\text{O}_2$ -Stress keine Akkumulation der prozessierten UpsM sRNA stattfindet. Diese Ergebnisse weist stark darauf hin, dass die sRNA UpsM und RSs0827 *in vivo* binden und UpsM erst in der Folge durch RNase E gespalten werden kann.

Um eine direkte Interaktion zu beweisen, wurden elektrophoretische Mobilitäts-*shift-assays* (EMSA) durchgeführt. Hierzu wurden zunächst PCR Produkte generiert (siehe Primerliste), die aufgrund einer T7 RNA Polymerase Promotorsequenz als Templates in *in vitro* Transkriptionen eingesetzt werden können. In den anschließenden *in vitro* Transkriptionen wurden Transkripte für die sRNA UpsM (206), die Kontroll-sRNA PcrZ (136 nt) „kalt“ synthetisiert. RSs0827 Transkripte wurden im Zuge der Synthese intern mit radioaktivem $[\alpha\text{-P}^{32}]$ -UTP markiert. DNase verdaut und gereinigte Transkripte wurden im Anschluss von Katrin Müller wie beschrieben (siehe 2.5.7) miteinander inkubiert und nach Komplexbildung auf einem nativen Gel aufgetrennt und mittels *phosphoimaging* visualisiert (Abbildung 42C). Der Mobilitäts-*shift-assay* (EMSA) zeigt die Bindungsreaktionen von 150 fmol $[\alpha\text{-P}^{32}]$ -UTP markierter RSs0827 (15 nM; 72 nt) mit aufsteigender Konzentration „kalter“ sRNA UpsM. Das heißt, UpsM wurde äquimolar und in 10 fachem als auch in 100 fachem Überschuss eingesetzt. Hierbei ist eindeutig zu erkennen, dass bereits bei äquimolarem Verhältnis UpsM:RSs0827 Komplexe im Gel bestehen bleiben und ein deutlich höheres Laufverhalten (*shift*) als freies RSs0827 aufweisen.

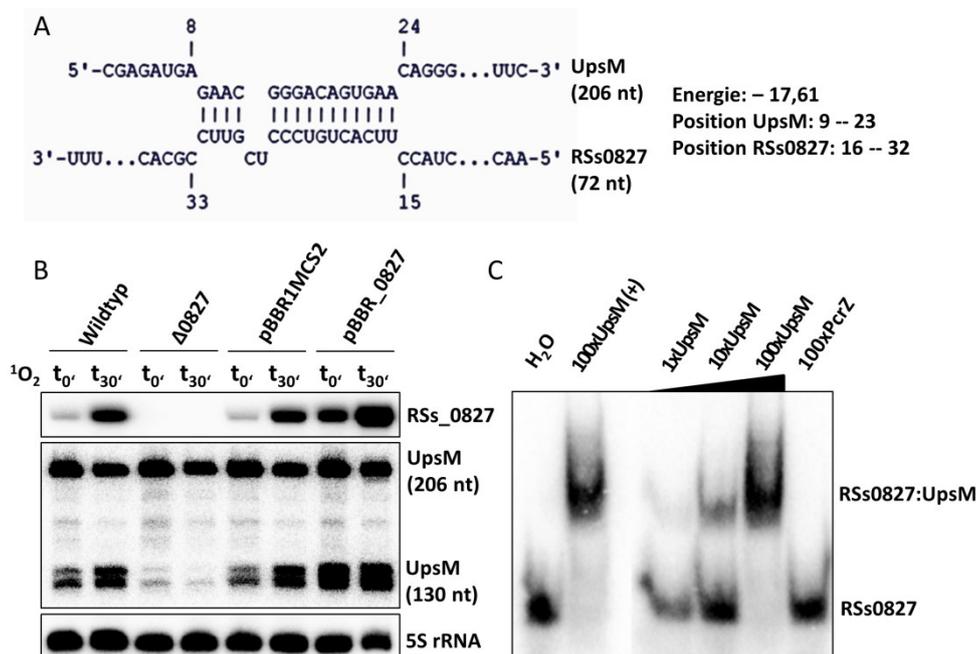


Abbildung 42: Validierung von RSs0827 als Ziel-RNA von UpsM. A) Mittels des *webtools* IntaRNA vorhergesagte Bindung zwischen UpsM und RSs0827 B) Northern blot zur Visualisierung der sRNA RSs0827 und der Prozessierung von UpsM nach 30 min $^1\text{O}_2$ im Deletionsstamm *R. sphaeroides* 2.4.1 Δ RSs0827 und im RSs0827 Überexpressionsstamm (pBBR_0827) im Vergleich zum parentalen Wildtyp und Wildtyp mit Leervektor (pBBR1MCS2). Die Detektion von RSs0827, UpsM-Primärtranskript (206 nt) und UpsM-Prozessierungsprodukt (130 nt) erfolgte in 10 μg Gesamt-RNA aufgetrennt auf 10 %igen TBE/PAA/UREA-Gelen. Signale der 5S rRNA dienen als interne Ladekontrolle. C) Interaktion von UpsM und RSs0827 *in vitro*. Auch gezeigt in der Dissertation von Kathrin Müller. Abgebildet ist ein Mobilitäts-*shift-assay* (EMSA) von 150 fmol $[\alpha\text{-P}^{32}]$ -UTP markierter sRNA RSs0827 (15 nM; 72 nt) bei 32°C 20 min inkubiert mit aufsteigender Konzentration „kalter“ sRNA UpsM (15 nM, 150 nM und 1,5 μM). Als Kontrolle wurde RSs0827 alleine (H₂O) oder mit 100x Überschuss der sRNA PcrZ (1,5 μM) inkubiert. Die Auftrennung erfolgte mittels nativem TBE(0,25x)/PAA(6%)-Gel. Spur zwei zeigt eine weitere Positivkontrolle bei der die Komplexbildung von UpsM und RSs0827 (1:100) zu beobachten ist, nachdem beide Transkripte zusammen renaturieren durften.

Dieser Effekt wird bei 10 fachem und 100 fachem Überschuss noch deutlicher. Die Kontrollen, bei denen RSs0827 alleine oder mit 100 fachem Überschuss der sRNA PcrZ inkubiert wurde, zeigen keine Komplexbildung (*shift*). In einer weiteren Positivkontrolle ist die Komplexbildung von UpsM und RSs0827 (100:1) zu beobachten, nachdem beide Transkripte zusammen renaturieren durften.

Der vorliegende Northern Blot zeigt einen kausalen Zusammenhang zwischen UpsM Prozessierung und RSs0827 *in vivo*, während der EMSA eine Interaktion beider Transkripte *in vitro* beweist. Gestützt durch eine ideale Interaktionsvorhersage, ist somit davon auszugehen, dass es sich bei RSs0827 um eine Ziel-RNA von UpsM handelt.

4 Diskussion

Mikroorganismen wie *Rhodobacter sphaeroides*, die Photosynthese betreiben, sind in Anwesenheit von Licht und Sauerstoff in erhöhtem Maße photooxidativem Stress durch toxischen Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) ausgesetzt. $^1\text{O}_2$ entsteht hierbei, wenn Bakteriochlorophylle durch Lichtenergie in einen angeregten Zustand versetzt werden und durch Resonanztransfer Energie auf Triplett-Sauerstoff übertragen. Die reaktive Sauerstoffspezies kann mit Makromolekülen wie beispielsweise Proteinen, Lipiden und Nukleinsäuren reagieren und letztendlich zum Zelltod führen. Im Zuge der zellulären Stressantwort von *Rhodobacter sphaeroides* auf $^1\text{O}_2$ wird die Genexpression auf transkriptioneller Ebene hauptsächlich durch alternative Sigmafaktoren reguliert. Um die Stressantwort jedoch vollständig zu verstehen, ist es wichtig, auch die posttranskriptionelle Genregulation zu untersuchen, die beispielweise durch sRNAs vermittelt wird. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit die sRNAs SorY (RSs_1543) und UpsM (RSs_0682) genauer charakterisiert.

4.1 SorY ($^1\text{O}_2$ resistance RNA Y)

4.1.1 Eigenschaften und Expressionsmuster von SorY

SorY wurde ursprünglich als eine sRNA beschrieben, deren Expression in der Anwesenheit von $^1\text{O}_2$ induziert wird (Berghoff *et al.*, 2009). Die Transkription erfolgt hierbei ausgehend von einem RpoH_{I/II} abhängigen Promotor (Nuss *et al.*, 2010). RpoH_I und RpoH_{II} sind alternative Sigmafaktoren mit überlappendem Regulon und beide sind maßgeblich an der Stressantwort beteiligt (Nuss *et al.*, 2010). Hierbei erfolgt die Aktivierung beider Faktoren unterschiedlich. Als Reaktion auf $^1\text{O}_2$ wird zunächst der alternative Sigmafaktor RpoE (σ^E) aktiviert (Newman *et al.*, 1999). σ^E liegt inaktiv mit seinem Anti-Sigmafaktor ChrR als Komplex in der Stöchiometrie 1:1 in der Zelle vor (Newman *et al.*, 2001). Bei $^1\text{O}_2$ -Stress dissoziiert ChrR und freies σ^E kann durch Bindung an die RNA Polymerase die Expression von Zielgenen induzieren (Anthony *et al.*, 2004; Anthony *et al.*, 2005). Die Dissoziation des Anti-Sigmafaktors ChrR wird durch dessen proteolytischen Abbau ermöglicht, wobei die Effizienz des Abbaus in der Gegenwart von $^1\text{O}_2$ abhängig von den Proteinen RSP_1090 und RSP_1091 und den Proteasen RSP_3242 (DegS Homolog) and RSP_2710 (RseP Homolog) ist (Nam *et al.*, 2013; Nuss *et al.*, 2013). Freies σ^E induziert neben der eigenen- und der Zielgenexpression auch die Expression von RpoH_{II} (Nuss *et al.*, 2009). Somit werden Gene mit RpoH_{II} abhängigem Promotor bei $^1\text{O}_2$ -Stress nach Aktivierung der RpoE-RpoH_{II} Sigmafaktorkaskade exprimiert. Im Unterschied hierzu wird die Expression des alternativen Sigmafaktors RpoH_I bei $^1\text{O}_2$ -Stress RpoE unabhängig induziert. Zusätzlich ist RpoH_I abhängige Genexpression besonders stark unter Hitzestress zu beobachten (Green & Donohue, 2006; Karls *et al.*, 1998) und eine effiziente Aktivierung von RpoE kann auch durch organische Peroxide erfolgen (Nuss *et al.*, 2013). Weil die SorY Transkription von einem RpoH_{I/II} abhängigen Promotor ausgeht, ist es nicht überraschend, dass neben der stärksten Induktion unter $^1\text{O}_2$ -Stress ebenfalls sehr deutlich erhöhte Transkriptlevel unter Hitze- und organischem Peroxidstress gezeigt werden konnten (Adnan *et al.*, 2015). Das deckt sich mit dem Expressionsverhalten anderer sRNAs mit RpoH_{I/II} Promotor in *Rhodobacter sphaeroides*. Diese sind beispielweise CcsR1-4 (Billenkamp *et al.*, 2015), SorX (Peng *et al.*, 2016) und RSs0827 (unveröffentlicht). Zusätzlich zeigen Expressionsprofile dieser sRNAs auch schwächere Induktionen unter vielen anderen Stressbedingungen. Für SorY wurde das durch NaCl, in Gegenwart hoher Konzentrationen von CdCl₂ und bei ROS-Stress durch H₂O₂ oder Superoxid demonstriert (Adnan *et al.*, 2015). Der Effekt durch

nicht-redoxreaktive Schwermetalle wie CdCl_2 könnte hierbei durch Bindung von Cd an Thiolgruppen bzw. die Depletion des antioxidativen Tripeptids Glutathion und somit erhöhter ROS Belastung erklärt werden (Cuypers *et al.*, 2010). Zusammenfassend könnte dem RpoH_{I/II} Regulon eine zusätzliche untergeordnete Rolle bei diversen Stressantworten zugeschrieben werden. Lediglich unter Membranstress, hervorgerufen durch Ethanol, Polymyxin-B und SDS, ließ sich keine Induktion von SorY beobachten (Adnan *et al.*, 2015), was sich ebenfalls mit den RpoH_{I/II} abhängigen sRNAs SorX und R_{Ss0827} deckt (Peng *et al.*, 2016; Späth, 2014).

Neben einem RpoH_{I/II} abhängigen Expressionsprofil weist SorY (83 nt) weitere Eigenschaften einer prototypischen in *trans* kodierten sRNA auf (3.1.1). Solche sRNAs sind 50 bis 400 Basen lang und werden in intergenischen Regionen bzw. zwischen zwei Protein-kodierenden Genen transkribiert (Storz *et al.*, 2004). Des Weiteren sind sie, wie SorY (Berghoff *et al.*, 2011), in der Regel an das RNA Chaperon Hfq assoziiert. Diese Interaktion schützt die sRNA in der Zelle vor ribonukleolytischem Abbau und vermittelt imperfekte Basenpaarung mit Ziel-mRNAs (Vogel & Luisi, 2011). Weitere prototypische Merkmale von SorY sind deren Strukturelemente bzw. eine GC-reiche Haarnadelstruktur gefolgt von einem poly(U)-Schwanz am 3'Ende des Moleküls und das hieraus resultierende Rho-unabhängige Terminationsprinzip (Platt, 1986), das bei sRNAs vorherrschend ist (Vogel & Luisi, 2011). Diese Strukturelemente sind bei *trans* kodierten sRNAs auch deshalb überrepräsentiert (Sittka *et al.*, 2008), weil sie ideale Interaktionsdomänen für Hfq darstellen (Otake *et al.*, 2011; Sauer & Weichenrieder, 2011; Ishikawa *et al.*, 2012).

4.1.2 Ziel-mRNA Suche und Validierung

Um die Rolle, die SorY in der photooxidativen Stressantwort einnimmt, zu verstehen, wurden zunächst *R. sphaeroides* Stämme mit verändertem SorY Transkriptlevel erfolgreich generiert (3.1.1). Hierbei handelt es sich um einen Stamm mit induzierbarer ektopischer Überexpression von SorY (2.4.1pBBRSorYi), mit konstitutiver ektopischer Überexpression von SorY (2.4.1pBBRSorY) und mit einer Deletion von SorY (2.4.1ΔSorY). Die Funktion einer kanonischen in *trans* kodierten sRNA wie SorY ist in der Regel die Regulation einer oder mehrerer Ziel-mRNAs durch Basenpaarung (Storz *et al.*, 2005). Bei Paarung wird meist die Stabilität oder die Translationsrate dieser Ziel-mRNAs beeinflusst, wobei eine Änderung der Translationsrate auch Auswirkungen auf die Stabilität einer mRNA haben kann (Deana & Belasco, 2005). Weil die Identifikation von Ziel-mRNAs unumgänglich ist, um SorY eine spezifische biologische Funktion zuzuordnen, wurde eine vergleichende Transkriptomstudie via Microarray Analyse durchgeführt (3.1.2). Hierbei wurden die Stämme 2.4.1pBBR und 2.4.1pBBRSorYi nach 10 min ¹O₂-Stress miteinander verglichen, weil für SorY unter dieser Bedingung aufgrund maximaler Induktion eine Funktion zu erwarten ist. Außerdem bietet die Verwendung der induzierbaren Überexpression die Möglichkeit zur Pulsexpression, was sekundäre Regulationseffekte minimiert. In der Transkriptomstudie konnten zwischen beiden Stämmen logarithmierte Verhältnisse (FC (log₂)) für 3976 von 4527 Genen ermittelt werden. Im Anschluss wurden Schwellenwerte für regulierte Gene eingeführt. Hieraus resultieren 10 hoch- und 7 runter regulierte Gene, deren mRNAs potentiell durch SorY reguliert werden könnten (Tabelle 1). Um den Kreis direkter Interaktionspartner von SorY weiter einzuengen, wurden Interaktionen von SorY mit den 17 mRNAs bioinformatisch vorhergesagt (3.1.2). Prototypische in *trans* kodierte sRNAs wie SorY regulieren ihre Ziel-mRNAs in der Regel in negativer Weise durch Basenpaarung an der Ribosomenbindestelle bzw. am Translationsstart (Aiba, 2007) oder direkter Umgebung (Bouvier *et al.*, 2008b). Dies trifft auf die mRNAs der Gene RSP_0432, RSP_0097 (*takP*) und RSP_2400 zu, wobei es für SorY energetisch am einfachsten ist, an das RSP_0097 Transkript zu binden.

Die Validierung von *takP* als direkte Ziel-mRNA von SorY erfolgte in Abschnitt 3.1.4 und 3.1.5 mittels qRT-PCRs, Halbwertszeitbestimmungen von *takP*, Reporterassays und elektrophoretischen Mobilitäts-*shift-assays*. Mittels qRT-PCRs wurde der negative Effekt der SorY Überexpression auf das mRNA Level von *takP* bestätigt. Außerdem wurde der entgegengesetzte Effekt nach 10 min ¹O₂-Stress gemessen, wenn der WT, statt mit Überexpressionsstamm, mit dem Deletionsstamm ΔSorY verglichen wurde. Das ist zu erwarten, weil im Deletionsstamm keinerlei SorY Transkripte vorliegen, die das *takP* mRNA Level herunter regulieren, während SorY im WT induziert wird und *takP* negativ reguliert. Hieraus resultiert im Verhältnis ein höheres *takP*-mRNA Level in der Deletionsmutante. Weil eine negative Regulation des *takP* Transkriptlevels durch SorY bestätigt wurde, ist davon auszugehen, dass sich SorY bei direkter Interaktion negativ auf die mRNA Stabilität von *takP* auswirkt. Diese Annahme konnte experimentell bestätigt werden, indem die Halbwertszeit der *takP*-mRNA ermittelt wurde, die bei SorY Überexpression deutlich vermindert ist. Ob dieser Effekt auf die Rekrutierung von Ribonukleasen oder eine geringere Anzahl schützender Ribosomen auf der mRNA zurückzuführen ist, wurde nicht weiter untersucht.

Zusätzlich wurde die Interaktion *in vivo* durch Verwendung *lacZ* basierter *takP* Reporterplasmide gezeigt. Hierbei führte die Überexpression von SorY zu einer Verminderung der Reporteraktivität um ca. 50 %. Der Austausch einzelner Basen in der Binderegion von *takP* auf dem Reporterplasmid oder in der Binderegion in SorY auf dem Überexpressionsplasmid führte zu einem nahezu vollständigen Verlust dieses Effekts, was ein starker Hinweis für eine direkte Interaktion zwischen SorY und *takP* mRNA ist. Der entgegengesetzte Effekt bzw. eine um 50 % erhöhte Reporteraktivität wurde bei der Deletion von SorY oder *hfq* ermittelt. Das entspricht den Erwartungen, weil hier keine SorY Transkripte zur negativen Regulation vorliegen oder, weil das RNA Chaperon fehlt, das *in vivo* zur Duplexbildung zwischen SorY und *takP* mRNA benötigt wird.

In vitro wurde die direkte Interaktion zwischen SorY und *takP* mRNA durch elektrophoretische Mobilitäts-*shift-assays* demonstriert. Hierbei war ein dosisabhängiger *shift* bzw. Duplex von SorY mit *takP* Transkripten zu beobachten. Interessanterweise ist diese Komplexbildung *in vitro* sogar in Abwesenheit von Hfq möglich, was eine bekannte Beobachtung für diverse Hfq abhängige sRNA in diesen Interaktionsstudien ist (Overloper *et al.*, 2014; Billenkamp *et al.*, 2015).

Zusammenfassend zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass SorY in der Zelle Hfq abhängig an *takP* mRNAs bindet und deren Translation bzw. Stabilität negativ beeinflusst.

4.1.3 Biologische Funktion der *takP* Bindung bzw. Regulation durch SorY

Die Überexpression von SorY führt in Hemmhof *assays* zu einer höheren Resistenz der Zellen gegenüber ¹O₂, während eine Deletion der sRNA zu einer höheren Sensitivität führt. Folglich ist es durchaus vorteilhaft, wenn SorY bei ¹O₂-Stress stark induziert wird. Für einen *takP* Deletionsstamm wurde der gleiche Phänotyp wie für den SorY Überexpressionsstamm bzw. eine Resistenzsteigerung beobachtet. Das bedeutet, dass Zellen mit geringerem *takP* Transkriptlevel, entweder hervorgerufen durch Deletion der mRNA oder durch SorY „*knock down*“ der mRNA, bei ¹O₂-Stress besser überleben können. Dies deckt sich mit einer früheren Transkriptomstudie, in der bereits eine zweifache Runterregulation des *takP* Transkriptlevels im Wildtyp als Reaktion auf ¹O₂ gezeigt wurde (Berghoff *et al.*, 2013).

Die Überexpression von SorY im *takP* oder *hfq* Deletionsstamm führt zu keiner Veränderung der Resistenz. Dies entspricht den Erwartungen, da hier entweder keine Ziel-mRNAs vorliegen oder, weil das RNA Chaperon fehlt, das *in vivo* zur Duplexbildung zwischen SorY und *takP* mRNA benötigt wird. Da die Überexpression von SorY im *takP* Deletionsstamm keinen Einfluss mehr auf den Phänotyp hat,

lässt sich außerdem schlussfolgern, dass es sich bei der negativen Regulation von *takP* durch SorY um die exklusive Interaktion handelt, die unter diesen experimentellen Bedingungen zur Verbesserung der Resistenz gegenüber $^1\text{O}_2$ führt.

Bei den vorliegenden Ergebnissen stellte sich die Frage, warum sich eine negative Regulation von *takP* Transkripten positiv auf die Stressresistenz von *R. sphaeroides* auswirkt. TakP wurde erstmals in der Literatur beschrieben, weil eine Tn5 Insertion in *takP* von *R. sphaeroides* zu einer erhöhten Resistenz gegenüber Selenit (SeO_3^{2-}) führt (Pierru *et al.*, 2006). Selenium ist in geringen Konzentrationen essentiell für die Synthese von Selenocystein, welches in vielen Reaktionszentren prokaryotischer und eukaryotischer Enzyme zu finden ist (Stadtman, 1991). Der toxische Charakter von Selenit bei hohen Konzentrationen kann durch die hohe Reaktivität der Anionen des Salzes mit Thiolgruppen erklärt werden. Besonders bei der Reaktion mit Glutathion zu Selenodiglutathion werden reaktive Sauerstoffspezies (ROS) wie Superoxid und H_2O_2 freigesetzt (Seko *et al.*, 1987; Ganther, 1968). Proteomstudien von *R. sphaeroides* zeigen außerdem eine Akkumulation verschiedener ROS detoxifizierender Enzyme als Reaktion auf Selenit Stress (Bebien *et al.*, 2001). Zusammenfassend wird also gefolgert, dass die Zytotoxizität von hohen Selenit Konzentrationen direkt mit dessen Wirkung als Prooxidant zusammenhängt. In Folgestudien wurde gezeigt, dass TakP *in vitro* α -Ketosäuren bindet und eine entsprechende Struktur des Proteins mit Pyruvat wurde aufgeklärt (Gonin *et al.*, 2007). Da in dieser Arbeit verwendetes Flüssigmedium jedoch kein Pyruvat enthält, konnte ausgeschlossen werden, dass die höhere Resistenz des *takP* Deletions- und SorY Überexpressionsstammes auf einen veränderten Pyruvat Import zurückzuführen ist. Zwei Homologe von TakP, DctP2 und DctP3, wurden zuvor in *R. capsulatus* beschrieben und sind ebenfalls Bindeproteine von TRAP Transportern. TakP weist eine sehr hohe Aminosäureübereinstimmung von 81 % mit DctP2 und eine relativ hohe Übereinstimmung mit DctP3 (45 %) auf. Bezogen auf die Aminosäureeigenschaften liegt die Identität bei 89 und 61 %. Für das Protein DctP2 wurden hohe Bindungsaffinitäten an α -Ketosäuren *in vitro* ermittelt (Thomas *et al.*, 2006). Für DctP3 konnte hingegen *in vivo* eine Beteiligung an der Aufnahme von den C4-Dicarbonsäuren Malat, Succinat und Fumarat gezeigt werden (Forward *et al.*, 1997; Shaw *et al.*, 1991). Deshalb und, weil das in dieser Arbeit verwendete Medium Malat als alleinige Kohlenstoffquelle enthält, wurde angenommen, dass die beobachteten Phänotypen aus einer Veränderung der Malat Aufnahme resultieren. Um diese Hypothese zu testen, wurden alle Hemmhof *assays* auf Medium wiederholt, das statt Malat Laktat in equimolarer Konzentration als alleinige Kohlenstoffquelle enthält. Es wurde Laktat verwendet, weil dieses für das TakP Homolog DctP3 von *R. capsulatus* als natürlicher Ligand ausgeschlossen wurde (Forward *et al.*, 1997; Shaw *et al.*, 1991). Im Allgemeinen zeigte sich ein verlangsamtes Wachstum und eine höhere $^1\text{O}_2$ Resistenz auf Laktat Medium im Vergleich zum Malat Medium. Beim Vergleich der Hemmhof *assays* auf Laktat Medium wurden keinerlei Resistenzveränderungen durch SorY Überexpression oder *takP* Deletion ermittelt. Durch dieses Ergebnis kann indirekt gefolgert werden, dass die negative Regulation der TakP Synthese durch SorY zu einem verminderten Malat Import und damit erhöhten $^1\text{O}_2$ Resistenz führt. Malat ist ein Intermediat des Citratzyklus (TCA Zyklus). Eine stringente Regulation der Aufnahme der Dicarbonsäure und des Kohlenstoffmetabolismus im Allgemeinen könnte vorteilhaft sein, weil hohe intrazelluläre Malatkonzentrationen überflüssig und bei oxidativem Stress sogar schädlich sein könnten. So wurde in den letzten Jahren für diverse Bakterienspezies publiziert, wie oxidativer Stress die Stoffwechselforgänge im zentralen Kohlenstoffmetabolismus beeinflusst. In *E. coli* werden beispielweise glykolytische Enzyme wie die Fructose-1,6-Bisphosphat-Aldolase (FDA) und die Glucose-6-phosphat-Isomerase (GPI/PGI) hochreguliert und für *P. fluorescens* wurde eine Hochregulation der NADPH produzierenden Enzyme Glucose-6-P-Dehydrogenase (G6PD; in *R.s.* Gen *zwf*) und Isocitrat-Dehydrogenase gezeigt, während

die meisten NADH produzierenden Enzyme im TCA Zyklus und der NADH Level negativ reguliert sind (Singh *et al.*, 2007; Blanchard *et al.*, 2007). Zusätzlich wurde eine Akkumulation an Malat und Pyruvat in Menadion bzw. ROS gestressten Zellen beobachtet (Singh *et al.*, 2008). Folglich findet in Anwesenheit von ROS vor allem eine Umlenkung des Stoffflusses von der Glykolyse hin zum Pentosephosphatweg (PPP) und Entner-Doudoroff-Weg (ED) statt, während der Stofffluss im TCA Zyklus reduziert wird und über den Glyoxylatzyklus umgangen wird (Baxter *et al.*, 2007; Rui *et al.*, 2010; Valdivia-Gonzalez *et al.*, 2012; Bignucolo *et al.*, 2013; Crimmins *et al.*, 2009; Rungrassamee *et al.*, 2008). Diese Stoffwechselverschiebung führt zu einer geringeren NADH Gewinnung in Glykolyse und TCA Zyklus. NADH ist ein Prooxidant bzw. fördert während der Zellatmung bei der ATP Produktion via oxidativer Phosphorylierung oxidativen Stress durch die Übertragung von Elektronen auf Sauerstoff. Gleichzeitig findet im ED und PPP eine Zunahme der NADPH Produktion statt (Baxter *et al.*, 2007; Rui *et al.*, 2010; Valdivia-Gonzalez *et al.*, 2012; Bignucolo *et al.*, 2013; Crimmins *et al.*, 2009; Rungrassamee *et al.*, 2008). Im Unterschied zu NADH ist NADPH ein Antioxidant und spielt eine wichtige Rolle bei der oxidativen Stressantwort bzw. Aufrechterhaltung reduzierender Bedingungen in der Zelle (Brumaghim *et al.*, 2003; Grose *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2007). So findet die Regeneration bzw. Reduktion von Thioedoxinen und Glutaredoxinen durch Thioedoxin- und Glutaredoxin-Reduktasen NADPH abhängig statt (Ritz & Beckwith, 2001). Auch andere ROS entgiftende Enzyme wie Katalasen benötigen NADPH als essentiellen Kofaktor (Hillar *et al.*, 1994; Kirkman & Gaetani, 1984). Zusätzlich reagiert fast ausschließlich NADH mit Fe(III), das in Anwesenheit von H₂O₂ in der Fenton Reaktion gebildet wird. Hierbei kommt es zu einer rapiden intrazellulären Depletion des NADH *pools*, was die Wichtigkeit von NADPH als hauptsächliches Nicotinamideninukleotid-Reduktionsmittel bei oxidativem Stress unterstreicht (Brumaghim *et al.*, 2003), da dieses nicht mit Fe(III) reagiert. Durch NADH Depletion und Hochregulation des NADPH/NADH Syntheseverhältnisses ist in *E. coli* 15 min nach H₂O₂ Stress beispielweise eine 90 fache Steigerung der NADPH Menge im Verhältnis zu NADH zu beobachten (Brumaghim *et al.*, 2003).

Eine Umlenkung des Stoffflusses von der Glykolyse hin zum Pentosephosphatweg (PPP) und Entner-Doudoroff-Weg (ED) und ein verringerter Stofffluss im TCA Zyklus wurde im Speziellen als Stressantwort auf ¹O₂ weder für *R. sphaeroides* noch einen anderen Organismus beschrieben. Aus diesem Grund haben wir frühere Transkriptomstudien von *R. sphaeroides* nach ¹O₂ Stress in Bezug auf Gene des zentralen Kohlenstoffmetabolismus erneut ausgewertet. Eine vollständige Aufführung aller analysierten Transkripte ist in Anhang 9 zu finden. Unsere Daten zeigen eine reduzierte Expression der Gene Succinyl-CoA Synthetase (*sucC*, *sucD*) and Fumarat-Hydratase (*fumC*) des TCA Zyklus, was auf einen verminderten Stofffluss bzw. verminderte Produktion des Prooxidant NADH hindeutet. Gegenteiliges ist für einige Gene des ED und PPP zu beobachten, Stoffwechselwege die in Anwesenheit von ¹O₂ offensichtlich erhöhte Aktivität aufweisen. Hier sind die Gene der Glucose-6-P-Dehydrogenase (*zwf*), 6-Phosphogluconolactonase (*pgl*), 2-Keto-3-deoxy-phosphogluconat-Aldolase (*eda*) induziert. Zusätzlich sind die Gene der Glucose-6-phosphat-Isomerase (*pgi*), Fructose-1,6-bisphosphatase (*glpX*) und Fructose-bisphosphate-Aldolase (*fbaB*) zur Synthese von Glucose-6-phosphat in der Gluconeogenese induziert (Glaeser *et al.*, 2007; Berghoff *et al.*, 2013; Imam *et al.*, 2013). Das könnte die Menge an Glucose-6-phosphat in der Zelle steigern, weil dieses als Ausgangsprodukt für ED und PPP und somit zur Synthese des Antioxidant NADPH dient.

In einer weiteren Analyse wurden die eben genannten Gene durch vorangegangene Proteomstudien, Vorhersagen von Promotormotifen und Chip-Seq Experimenten unter dem Gesichtspunkt ihrer Regulation betrachtet. Hierbei zeigte sich interessanterweise, dass alle hochregulierten Gene des ED, PPP und der Gluconeogenese mit der Ausnahme von *glpX* Teil des RpoH_{II} Regulons sind bzw. wie SorY RpoH_{II} abhängig induziert werden (Nuss *et al.*, 2009; Dufour *et al.*, 2012). Zusätzlich ist die negative

Regulation der Gene *sucC* und *sucD* (TCA-Zyklus) ebenfalls abhängig von diesem alternativen Sigmafaktor (Nuss *et al.*, 2009).

Die durch RpoHIII und SorY vermittelte Stressantwort auf $^1\text{O}_2$ von *R. sphaeroides* in Bezug auf den zentralen Kohlenstoffwechsel lässt sich also wie im folgenden Modell zusammenfassen (Abbildung 43): Als Reaktion auf $^1\text{O}_2$ wird zunächst der alternative Sigmafaktor RpoE (σE) durch Abspaltung des Anti-Sigmafaktor ChrR aktiviert (Newman *et al.*, 1999; Anthony *et al.*, 2004; Anthony *et al.*, 2005). Freies σE induziert neben der eigenen- und der Zielgenexpression auch die Expression von RpoHIII (Nuss *et al.*, 2009). Somit wird die Expression von Genen mit RpoHIII abhängigem Promotor nach Aktivierung der RpoE-RpoHIII Sigmafaktorkaskade ebenfalls induziert. Hierzu gehören die Gene *zwf*, *pgl* und *eda* um, den Stofffluss in der Glycolyse zu mindern bzw. in PPP und ED zu erhöhen, wodurch die Produktion von antioxidativem NADPH im Verhältnis zu prooxidativem NADH erhöht wird. Dies wird ebenfalls durch die RpoHIII abhängige Induktion der Gene *pgi* und *fbaB* zur Stärkung der Gluconeogenese unterstützt. Gleichzeitig wird der Stofffluss des TCA-Zyklus durch eine RpoHIII vermittelte Runterregulation der Gene *sucC* und *sucD* reduziert, weil hier ebenfalls große Mengen an prooxidativem NADH entstehen. Zusätzlich induziert RpoHIII die Expression der sRNA SorY, um den TCA-Zyklus posttranskriptionell zu schwächen. Dies geschieht, indem SorY mittels direkter negativer Regulation der TakP Translation die Aufnahme von Malat verringert, welches ein Intermediat des TCA-Zyklus darstellt.

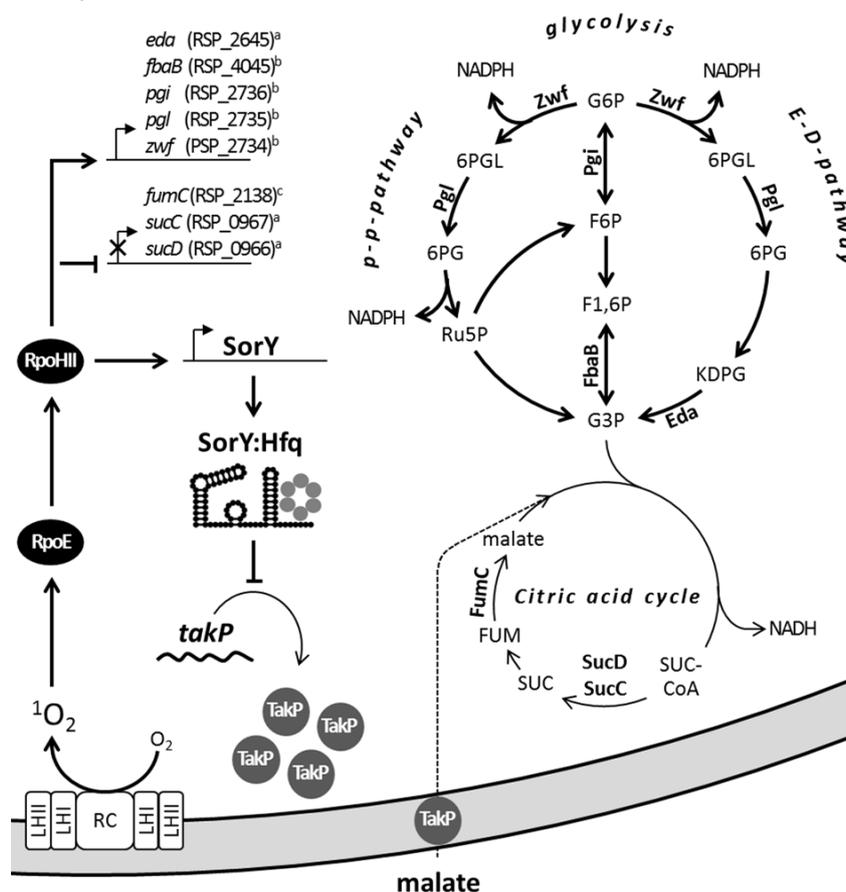


Abbildung 43: Zusammenfassendes Modell zur sRNA SorY. Wenn *Rhodobacter sphaeroides* $^1\text{O}_2$ Stress ausgesetzt ist, wird der alternative Sigmafaktor RpoE und in der Folge der alternative Sigmafaktor RpoHIII aktiviert, um die Stressantwort zu regulieren. RpoHIII induziert u.a. die Transkription von Genen die für Enzyme aus dem Pentose Phosphat Weg (PPP), Entner-Doudoroff Weg (ED) und der Gluconeogenese kodieren, weil diese Stoffwechselwege das antioxidative NADPH generieren. Gleichzeitig ist RpoHIII indirekt an der Repression von Genen bzw. Enzymen aus dem TCA Zyklus beteiligt, weil hier große Mengen prooxidatives NADH entstehen. Um diese Stoffwechselverschiebung zu unterstützen induziert RpoHIII auch die Expression der sRNA SorY. SorY reguliert die Synthese des Malat-Transporters TakP negativ, um die

Malat Aufnahme in die Zelle und somit die Verfügbarkeit des Intermediates des TCA Zyklus zu limitieren. Dies stellt eine bisher unbekannt Funktion einer sRNA in der oxidativen Stressantwort dar. Abkürzungen: G6P - Glucose 6-phosphat, F6P - Fructose 6-phosphat, F1,6P - Fructose1,6-bisphosphat, G3P - Glycerinaldehyd 3-phosphat, 6PGL - Phosphoglucono- δ -lacton, 6PG - 6-Phosphogluconat, KDPG - 2-Keto-3-deoxy-6-phosphogluconat, Ru5P - Ribulose 5-P, SUC-CoA - Succinyl CoA, SUC - Succinat, RC - Reaktionszentrum, LH - Licht Sammelkomplex, ^a RpoHIII Regulon beschrieben von Nuss *et al.* (2009) oder ^b Dufour *et al.* (2012), ^c RpoHIII abhängige negative oder ^d positive Regulation bei $^1\text{O}_2$ (Berghoff *et al.*, 2013; Glaeser *et al.*, 2007). Angefertigt für Adnan, Weber & Klug, 2015.

Bei weiteren beschriebenen sRNAs, die an der oxidativen Stressantwort in *R. sphaeroides* beteiligt sind, handelt es sich um PcrZ (Mank *et al.*, 2012), CcsR1-4 (Billenkamp *et al.*, 2015) und SorX (Peng *et al.*, 2016). PcrZ wirkt der Expression von photosynthese Genen bei fallendem Sauerstoffpartialdruck und somit der Bacteriochlorophyll *a* (BChl *a*) abhängigen Entstehung von $^1\text{O}_2$ entgegen. Die sRNAs CcsR1-4 regulieren den Transkriptionsfaktor FlhR, den Aktivator des Glutathion abhängigen Methanol/Formaldehyd Metabolismus, negativ, wodurch antioxidatives Glutathion in der Zelle akkumuliert. SorX führt durch Regulation des PotABCD Transporters zu einer geringeren Spermidin Aufnahme, die zu einer höheren Resistenz gegenüber organischem Hydroperoxid führt. Hierbei sind CcsR1-4 und SorX wie SorY RpoH_{1/11} induzierte sRNAs. In Enterobakterien wurden weitere sRNAs im Zusammenhang mit ROS beschrieben. Die sRNA OxyS vermittelt Resistenz durch Beeinflussung der Translation von FhIA und des Sigmafaktors der stationären Phase RpoS (Altuvia *et al.*, 1997; Gonzalez-Flecha & Demple, 1999). Aufgrund der Fentonreaktion ist eine stringente Steuerung der Eisenverfügbarkeit in Gegenwart von ROS ebenfalls vorteilhaft (Touati, 2000; Varghese *et al.*, 2003) und wird in *E. coli* durch die sRNA RyhB (Masse & Gottesman, 2002) vorgenommen. Gleiches gilt für RyhB Homologe beispielsweise von *Pseudomonas aeruginosa* (Wilderman *et al.*, 2004) and *Erwinia chrysanthemi* (Boughammoura *et al.*, 2008). Eine andere Strategie von Enterobakterien gegen ROS ist die Veränderung der Zusammensetzung der äußeren Zellmembran. Dabei sind sRNAs wie MicF, MicC and CyaR beteiligt (Vogel & Papenfort, 2006; Blanchard *et al.*, 2007; Papenfort *et al.*, 2009). SorY repräsentiert jedoch die erste sRNA, die durch metabolische Einflussnahme im zentralen Kohlenstoffwechsel Resistenz gegenüber $^1\text{O}_2$ verleiht. Weiterhin zeigt dieser Mechanismus anschaulich die Wichtigkeit der Kombination bzw. direkter Verknüpfung von transkriptioneller und posttranskriptioneller Genregulation im Zuge einer bakteriellen Stressantwort.

4.2 UpsM (*upstream sRNA mraZ*)

In der Erstbeschreibung der sRNA UpsM (*upstream sRNA mraZ*) unter der Bezeichnung RSs_0682 wurde das Transkript als prototypische sRNA in der intergenischen Region (IGR) vor *mraZ* (RSP_2095) auf dem Plusstrang von Chromosom 1 annotiert, indem die sRNA zunächst durch differenzielle RNA Sequenzierung (dRNASeq) mittels der 454 Sequenzier-Plattform sequenziert und dann auf Northern Blot nachgewiesen wurde (Berghoff *et al.*, 2009). Beides zeigte, dass es sich hierbei um die abundanteste sRNA in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 handelt (Berghoff *et al.*, 2009). Unter den mittels Hfq-FLAG coimmunopräzipitierten sRNAs, entspricht der Anteil von UpsM Transkripten sogar über 60 % (Berghoff *et al.*, 2011).

Zusätzlich wurde demonstriert, dass die sRNA in Anwesenheit von $^1\text{O}_2$ prozessiert wird und mit anhaltendem $^1\text{O}_2$ -Stress ein stabiles 3' Fragment (130 nt) akkumuliert. In dieser Arbeit wurde sowohl die Expression, die Prozessierung und der Genlokus der sRNA genauer charakterisiert als auch nach einer Ziel-RNA von UpsM gesucht.

4.2.1 Charakterisierung des Genlokus von UpsM

Im Zuge dieser Arbeit wurde gegenüber der ursprünglichen 454 Sequenzierung durch neuere differenzielle RNA Sequenzierungen (dRNASeq) mittels *Solexa* Sequenzier-Plattform (Illumina) zum Auslesen der cDNA-Bibliotheken eine wesentlich höhere „Sequenzierentiefe“ erreicht. Trotzdem konnte kein klarer Transkriptionsstart (TSS) exklusiv für das stromabwärts gelegene Gen von UpsM *mraZ* identifiziert werden. *MraZ* ist das erste Gen des *dcw* (*division and cell wall*) Genclusters bzw. Operons (16 Gene). Die aus dem Operon resultierende polycistronische mRNA sollte eine hohe Abundanz aufweisen, da die kodierten Proteine essentiell für das Wachstum sind. Da trotzdem kein TSS zu erkennen war, wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Transkription von *mraZ* abhängig vom UpsM Promotor ist. Dies setzt voraus, dass der Terminator von UpsM bei der Transkription gelegentlich überlesen werden kann, ohne, dass die Transkription gestoppt wird, was man als *read through* bezeichnet. Hieraus ergaben sich folgende Schlussfolgerungen:

I.) *mraZ*, das erste *dcw* Gen hat eine ungewöhnlich lange 5' UTR von 268 Nukleotiden. Dies wurde von keinen anderen Bakterienspezies bisher berichtet, obwohl das Gencluster in Bezug auf Organisation und Regulation besonders unter gram-negativen als stark konserviert angesehen wird.

II.) UpsM ist nicht, wie publiziert, eine prototypische sRNA mit intergenischem Genort. Stattdessen wird die sRNA durch Transkriptionstermination in der 5' UTR von *mraZ* generiert und gehört somit zu der Gruppe 5' UTR entstammenden ncRNAs.

III.) Der Terminator in der 5' UTR von *mraZ* kann überlesen werden, um die *dcw*-Gen Transkription zu gewährleisten. Das hierbei entstehende Transkript enthält eine lange 5' UTR mit einem Start- und Stopcodon in passendem Leseraster bzw. ein sORF (*small open reading frame*), der wie ein *leader* Peptid translatiert wird.

Diese Annahmen konnten mittels 5'RACE, Reporterkonstrukten mit unterschiedlich langen Fragmenten der *mraZ* 5' UTR bestätigt werden. Zusätzlich wurde eine ungefähre Quantifizierung der *read through* Häufigkeit am UpsM Terminator vorgenommen, die darauf hinweist, dass der Terminator einmal in 100 Transkriptionsdurchgängen überlesen wird. Gemessen an der hohen Abundanz von UpsM würde dies zu einer erheblichen Menge an polycistronischen *dcw* mRNAs führen. Zusammenfassend konnte also gezeigt werden, dass die *dcw* Gene keinen eigenen *upstream* Promotor haben, sondern unter Kontrolle des UpsM Promotors stehen, der polycistronische *dcw* Transkripte mit langer 5' UTR ermöglicht. Bei UpsM handelt es sich somit nicht um eine *orphan* IGR lokalisierte sRNA, sondern um eine 5' UTR entstammende sRNA.

Dass in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 *upstream* von *mraZ* eine solch lange 5' UTR zu finden ist, die zusätzlich einen Terminator enthält, ist durchaus ungewöhnlich. Das *dcw* Gencluster wird in der Literatur neben dem Gencluster für ribosomale Proteine und neben dem *atp* Operon nämlich als das am stärksten konservierte in bakteriellen Genomen beschrieben (Tamames, 2001; Tamames *et al.*, 2001; Mingorance *et al.*, 2004). Hierbei wird davon ausgegangen, dass die Konservierung regulatorischer Mechanismen als auch der Genanzahl und Abfolge eine effiziente Koordinierung von Wachstum und Zellteilung sicherstellt (*genomic channeling hypothesis*) (Mingorance *et al.*, 2004). Am intensiv untersuchten Beispiel des *dcw* Genclusters des stäbchenförmigen und gram-negativen Bakteriums *E. coli* zeigt sich, dass die Regulationsmechanismen (interne Promotoren, unterschiedliche Transkriptstabilitäten, Proteinverhältnisse usw.) innerhalb der Genregion zahlreich und noch nicht völlig aufgeklärt sind. In *E. coli* befindet sich der erste Promotor des Genclusters (*mraZ1p*) jedoch unmittelbar *upstream* von *mraZ*. Dieser Promotor ermöglicht die Transkription polycistronischer *dcw* mRNAs, die eine kurze 5' UTR von 38 nt Länge enthalten und bis zum letzten Genlokus *envA* reichen können (de la Fuente *et al.*, 2001; Vicente *et al.*, 1998; Eraso *et al.*, 2014). Weil sich eine solch kurze *mraZ/dcw* 5' UTR stark von *R. sphaeroides* unterscheidet haben wir anhand öffentlich zugänglicher RNA Seq Datensätze untersucht, in welchen Bakterienspezies eine *R. sphaeroides* ähnliche 5' UTR (lang bzw. kein exklusiver *mraZ* TSS und intrinsischer Terminator) oder eine *E. coli* ähnliche 5' UTR (kurz bzw. exklusiver *mraZ* TSS und kein intrinsischer Terminator) vorliegt (3.2.5). Anhand der Analyse zeigt sich ein klarer Unterschied zwischen Spezies der *Rhodobacteraceae* (Familie) und anderen Bakterien. Unter *Rhodobacteraceae* ist wie bei *Rhodobacter sphaeroides* immer eine lange 5' UTR > 220 nt zu finden, die einen starken intrinsischen Terminator und keinen zusätzlichen TSS unmittelbar upstream von *mraZ* aufweist. Außerhalb der Familie der *Rhodobacteraceae* sind die TSS näher an *mraZ* gelegen und führen zu 5' UTRs ≤ 70 nt, in denen keine Terminatoren zu finden sind. Ein sORF innerhalb der UTRs ist nur bei *Rhodobacter sphaeroides* zu finden. Es liegt also eine starke Konservierung der *dcw* 5' UTRs im Hinblick auf Länge und intrinsischem Terminator, der eine ncRNA oder sRNA generiert, in der Familie der *Rhodobacteraceae* vor.

In den letzten Jahren wurden viele UTR entstammende sRNAs in anderen Bakteriengenomen identifiziert. Hierbei zeigt sich eindeutig der Trend, dass fast ausschließlich 3' UTRs als Reservoir solcher sRNAs dienen. Gemeinsame Eigenschaften 3' UTR entstammender sRNAs sind, dass sie Teil des Hfq Netzwerks sind (Chao *et al.*, 2012; Miyakoshi *et al.*, 2015b) und, falls beschrieben, eine Funktion in *trans* haben (Chao & Vogel, 2016; Miyakoshi *et al.*, 2015c; Kim *et al.*, 2014). Hierzu sind auch die sRNAs CcsR1-4 (Billenkamp *et al.*, 2015) und SorX (Peng *et al.*, 2016) von *R. sphaeroides* zu zählen.

Im Vergleich hierzu wurden 5' UTR- oder *riboswitch* entstammende sRNAs nur gelegentlich und im Allgemeinen ohne eine nachgewiesene Funktion in *trans* beschrieben. Eine Handvoll Transkripte, die aus prozessierten 5' UTRs hervorgehen, wurden in einer Transkriptomstudie von *Yersinia pseudotuberculosis* vorhergesagt (Nuss *et al.*, 2015). Mittels Northern blot Analyse wurden im Falle von *E. coli* nicht kodierende *leader* Sequenzen der Gene *ybjM*, *ynaE*, *ydfK*, *mdtJ*, *typA*, *yhil*, and *dinQ* detektiert, die durch vorzeitige Termination in 5' UTRs generiert werden (Raghavan *et al.*, 2011). Unter diesen co-immunopräzipitieren die von *ynaE*, *ydfK* and *ybjM* stammenden ncRNAs mit Hfq in einer Folgestudie, was auf eine Funktion in *trans* hinweist (Bilusic *et al.*, 2014). Hierbei wurde zusätzlich eine ncRNA beschrieben, die der 5' UTR der *adhE* mRNA entspricht und durch RNase III reift (Bilusic *et al.*, 2014). Durch ein Klonierung basiertes Screening nach ncRNAs in *E. coli* wurden später einige 5' UTR Transkripte entdeckt, die mit *riboswitches* übereinstimmen. Hierunter waren

L-Box, THI Box und RFN Box Elemente, welche an der Regulation von mRNA- oder Proteinsynthese durch Attenuation oder Zugänglichkeit der RBS beteiligt sind (Kawano *et al.*, 2005). Anhaltspunkte für eine Funktion dieser RNA Fragmente in *trans*, beispielsweise durch eine Interaktion mit Hfq, gibt es jedoch nicht. In *Vibrio cholerae* wurden kürzlich 14 sRNAs beschrieben, die ebenfalls 5' UTRs von Genen darstellen könnten. Eine, Vcr043, zeigt eine stark Hfq abhängige Stabilität und könnte somit eine Funktion in *trans* haben (Papenfort *et al.*, 2015). Das einzig bekannte Beispiel einer *dual function* (Funktion in *cis* und *trans*) 5' UTR, die als *riboswitch* fungiert und bei Attenuation eine sRNA mit experimentell validierter regulatorischer Funktion in *trans* generiert, ist in *Listeria monocytogenes* zu finden. Hier werden SreA und SreB, zwei S-Adenosylmethionin (SAM) *riboswitches*, zusammen mit Ihren downstream Genen transkribiert. Diese kodieren für Proteine, die am Methionin- und Cystein-Transport und -Metabolismus beteiligt sind. Durch Bindung des Liganden SAM wird die Transkription in der 5' UTR attenuiert und kurze SreA und SreB sRNAs entstehen. SreA und SreB kontrollieren anschließend die Expression des Virulenzfaktors PrfA und zwar, wie eine *trans* kodierte sRNA, durch Bindung in der 5' Region der mRNA (Loh *et al.*, 2009). Zum damaligen Zeitpunkt sind die Autoren davon ausgegangen, dass SreA/SreB nur das erste Beispiel einer neuen Klasse von *riboswitch* entstammenden sRNAs ist. Unerwarteter Weise wurde während der letzten 8 Jahre jedoch kein weiteres Beispiel veröffentlicht.

Bei der UpsM/*mraZ* 5' UTR handelt es sich jedoch um einen ähnlichen Fall, weil UpsM mit den *downstream* gelegenen Genen transkribiert werden kann, aber durch einen intrinsischen Terminator auch als stabile sRNA entsteht, die zweifelsfrei Funktionen in *trans* erfüllt, da sie nur in Anwesenheit von Hfq Ziel-RNA abhängig prozessiert wird. Folglich ist die Funktion der sRNA in *trans* gezeigt, wohingegen klare Beweise fehlen, dass die 5' UTR von *mraZ* auch als *riboswitch* fungiert. Trotzdem lässt die prominente Position *upstream* der *dcw* Gene und die Konserviertheit unter Spezies der *Rhodobacteracea* darauf schließen, dass ein Regulationsmechanismus zu Grunde liegt. Zusätzlich zeigt die Sekundärstrukturvorhersage von UpsM eine *riboswitch* typische Kombination aus zweitem (Position 94- 144) und dritten (Position 147- 158) *stemloop* als Aptamerregion und darauf folgenden Terminator (Position 166- 201) (Garst *et al.*, 2011). Wenn die Sekundärstrukturvorhersage unter der Voraussetzung durchgeführt wird, dass sich der Terminator nicht formt, kommt es zu einer alternativen Faltung mit ca. 20% Energieverlust, bei der Teile des zweiten *stemloop* mit der Terminatorregion interagieren (hier nicht gezeigt). Diese alternative Faltung könnte Liganden abhängig sein und würde zur Antitermination bzw. *dcw*-Gen Transkription führen. Basierend auf dieser Analyse stellt die 5' UTR von *mraZ* einen potentiellen *riboswitch* dar.

Die regulatorischen Eigenschaften der 5' UTR könnten jedoch noch komplexer sein, da Reporterfusionen auf die Translation eines sORF hinweisen. Dieser sORF überspannt den intrinsischen Terminator von UpsM innerhalb der UTR. Solche sORFs sind häufig *cis*-regulatorische Elemente, die auch als *leader* Peptide oder uORFs (proupurt open reading frame) in Eukaryoten bezeichnet werden und meist an transkriptioneller oder translationaler Attenuation beteiligt sind (Lovett & Rogers, 1996; Henkin & Yanofsky, 2002). Bei dem Regulationsprinzip der transkriptionellen Attenuation in Prokaryoten wird die Transkription an einem intrinsischen Terminator bzw. Attenuator gestoppt, der häufig in *leader* Sequenzen bzw. zu Beginn eines Operons zu finden ist. Die Attenuation durch Ausbildung einer Terminatorstruktur der mRNA kann jedoch bei gleichzeitigem Voranschreiten der Translation durch ablesende Ribosomen in räumlicher Nähe unterbunden werden, wie es für das *trp* Operon beschrieben wurde (Santangelo & Artsimovitch, 2011). Diese zeitliche und räumliche Kopplung von Transkription und Translation ist auch für den UpsM Terminator in der langen 5' UTR des *dcw* Genclusters von *R. sphaeroides* denkbar. Allerdings konnte durch Mutationsstudien kein Hinweis hierauf gefunden werden (3.2.4).

4.2.2 Das Expressionsmuster und die Prozessierung von UpsM durch RNase E in Abhängigkeit von der Interaktion mit Hfq und der Ziel-RNA RSs0827

Die Expression und Prozessierung von UpsM wurde mittels Northern Blot Analyse unter diversen Stressbedingungen untersucht. Hierbei zeigt sich, dass die UpsM Expression bzw. Primärtranskriptmenge stressunabhängig ist (3.2.6). Lediglich bei phototrophen Wachstum konnte eine zweifache Menge an UpsM Transkripten detektiert werden. Hitzestress verursacht zwar eine stetige Abnahme des Primärtranskriptes jedoch auch eine rapide Anreicherung des Prozessierungsproduktes. Folglich ist die Abnahme von UpsM (206 nt) durch eine geringe Stabilität bzw. höhere RNase Aktivität und nicht durch eine Transkriptionsrepression bei Hitzestress zu erklären, was durch das Ermitteln von Halbwertszeiten belegt werden konnte (Abbildung 21).

Die Prozessierung von UpsM (206 nt) erfolgt nicht nur unter $^1\text{O}_2$ -Stress sondern auch unter Hitze-, NaCl- und CdCl_2 -Stress und in der stationären Wachstumsphase. Der Effekt durch das nicht-redoxreaktive Schwermetall CdCl_2 könnte hierbei durch Bindung von Cd an Thiolgruppen bzw. die Depletion des antioxidativen Tripeptids Glutathion und somit erhöhter ROS Belastung erklärt werden (Cuypers *et al.*, 2010). Keine Induktion der Prozessierung ist durch SDS/EDTA und EtOH vermittelten Membranstress zu beobachten. Auch ROS Stress durch H_2O_2 , organisches Peroxid tBOOH oder Superoxid erzeugendes Paraquat führt zu keinem deutlichen Anstieg der Prozessierungshäufigkeit (3.2.6).

Im Folgenden galt es aufzuklären, welche weiteren Faktoren und RNasen an der Prozessierung von UpsM beteiligt sind. Hierbei wurde zunächst gezeigt, dass es sich bei UpsM um eine Hfq abhängige sRNA handelt, wobei sogar die induzierbare Prozessierung des Transkriptes nur in Anwesenheit des RNA Chaperons möglich ist (3.2.8). Dies ließ vermuten das UpsM nur bei einer Hfq vermittelten Duplexbildung mit einer Ziel-RNA, die beispielweise bei $^1\text{O}_2$ -Stress exprimiert wird, gespalten werden kann.

Bei der beteiligten Ribonuklease wurde zunächst vermutet, dass UpsM von RNase III (*rnc*) gespalten wird. Zwar ist es schwierig, verschiedenen Nukleasen genaue Substratspezifitäten zuzuordnen, jedoch ist RNase III die einzige bakterielle dsRNA spezifische Endoribonuklease die in helikalen RNA-Strukturen, wie an der Prozessierungsstelle von UpsM vorhergesagt (Abbildung 19A), schneidet (Conrad *et al.*, 1998). Die generierte *rnc* Deletionsmutante, zeigte jedoch keine Veränderung bei der UpsM Prozessierung. Deshalb wurden weitere Deletionsmutanten von Genen überprüft, die am RNA Abbau beteiligt sind. Bei RNase J (*rnj*) handelt es sich um eine Exoribonuklease, die RNA in 5'-3' Orientierung degradiert (Rische & Klug, 2012; Rische-Grahl *et al.*, 2014). RNase R (*rnr*) ist eine 3'-5' Exoribonukleasen und die RNA-Phospho-Hydrolase RppH (*rppH*) gehört zur Proteinfamilie der Nudix-Phosphohydrolasen und entfernt das γ - und β -Phosphat am 5'-Ende einer RNA und schafft somit ein bevorzugtes RNase E Substrat (Belasco, 2010). Zusammenfassend wurde jedoch gezeigt, dass keiner dieser Enzyme die Prozessierung von UpsM beeinflusst (3.2.9). Die Ergebnisse ließen also darauf schließen, dass eine andere RNase an der Spaltung von UpsM beteiligt sein muss, wobei am ehesten die Endoribonuklease RNase E (*rne*) in Frage kam. Die initiale Spaltung von RNA wird in gram-negativen Bakterien weitestgehend RNase E zugeschrieben, weshalb das Gen essentiell für das Überleben dieser Bakterien ist und eine einfache Deletion somit unmöglich ist (siehe 1.1.3.2). Absatz 3.2.10 zeigte, dass die Prozessierung von UpsM bei heterologer Expression in *E. coli* in Gegenwart einer thermosensitiven RNase E nicht zu untersuchen ist (3.2.10). Um also einen Nachweis *in vivo* zu führen, müsste eine *R. sphaeroides* Mutante mit thermosensitiver (*ts*) RNase E generiert werden. Hierzu wurde die native proteinkodierende *rne* Sequenz im Genom von *R. sphaeroides* durch die proteinkodierende *rne*-3071(*ts*) Sequenz aus *E. coli* N3431 (Apirion, 1978; Goldblum & Apririon,

1981) mit einem Resistenzgen zur Selektion ersetzt (3.2.11). Im Stamm *R. sphaeroides rne^{E.c.ts}* ist nach Hitzeinaktivierung von RNase E kein UpsM (130 nt) mehr zu detektieren. Auch unter ¹O₂-Stress ist bei einer Wachstumstemperatur von 32°C selbst ohne Inaktivierung der RNase durch Hitzestress zu erkennen, dass die Prozessierung von UpsM nicht mehr wie im Wildtyp induziert wird. Das lässt sich wahrscheinlich auf eine etwas andere Substratspezifität und Aktivität der RNase von *E. coli* zurückführen. Zusätzlich ist eine fehlerhafte Assemblierung des Degradosom Proteinkomplexes von *R. sphaeroides* an der C-terminalen Domäne von RNase E^{E.c.ts} denkbar. Das RNA Chaperon Hfq könnte ebenfalls ein Interaktionspartner der C-terminalen Domäne der RNase sein (Ikeda *et al.*, 2011a) und folglich bei verminderter Assoziation an die *E. coli* Variante Veränderungen bei der Spaltung hervorrufen. Dies wäre besonders plausibel, wenn die Prozessierung bei ¹O₂-Stress durch eine Hfq vermittelte Bindung an eine Ziel-RNA induziert wird. Zusätzlich wurde mittels der Deletionsmutante eine Beteiligung von RNase E an der Reifung der sRNAs CcsR1-4 und SorX, die jeweils mit einem proteinkodierenden Genabschnitt auf einer polycistronischen Vorläufer mRNA cotranskribiert werden (Billenkamp *et al.*, 2015; Peng *et al.*, 2016), demonstriert.

Nachdem die UpsM Spaltung als Hfq und RNase E abhängig charakterisiert werden konnte, war weiterhin fraglich, warum die Prozessierung nur konditionell unter einigen Stressbedingungen zu beobachten ist, weil davon auszugehen ist, dass sowohl Hfq als auch RNase E in ausreichender Menge in der Zelle exprimiert werden müsste. Die naheliegenste Erklärung bei einer kanonischen sRNA wäre eine Ziel-mRNA abhängige Prozessierung von UpsM. Das heißt eine Spaltung durch RNase E ist nur bei einer Strukturveränderung möglich, wenn die sRNA Hfq abhängig mit einer Ziel-RNA einen Duplex bildet. In diesem Fall wäre davon auszugehen, dass die entsprechende Ziel-mRNA nur unter Bedingungen exprimiert wird, unter denen auch erhöhte UpsM Prozessierung zu beobachten ist. Deshalb wurden diverse Mutanten von Transkriptionsfaktoren hinsichtlich der Induktion der UpsM Prozessierung untersucht (Grüllich, 2015), wobei in der Doppeldeletionsmutante der Sigmafaktoren RpoH_I und RpoH_{II} kein Spaltungsprodukt von UpsM detektiert werden konnte (3.2.13). Somit wird die Hfq und RNase E abhängige Prozessierung von UpsM bei Bindung an eine RNA induziert, die wiederum unter Kontrolle eines RpoH_{I/II} abhängigen Promotors steht. Weiterhin decken sich die Bedingungen, unter denen die UpsM Spaltung induziert wird, mit Bedingungen, unter denen eine Induktion des RpoH_{I/II} Regulons erfolgt, welches besonders stark bei der Stressantwort auf ¹O₂ Stress (Berghoff *et al.*, 2009; Berghoff *et al.*, 2011; Nuss *et al.*, 2010), Hitzestress (Nuss *et al.*, 2009) und in der stationären Wachstumsphase (bisher nicht publiziert) aktiviert wird.

Folglich wurde, nachdem Transkriptionsstudien mit einem UpsM Überexpressionstamm nicht zur Identifikation einer direkten Ziel-RNA von UpsM geführt haben (3.2.16 und 3.2.17), versucht potentielle Ziel-Transkripte auf einem anderen Weg auszumachen. Hierbei wurden Transkripte, die Hfq- und RpoH_{I/II}-abhängig sind und deshalb eine Ziel-RNA abhängige Prozessierung von UpsM hervorrufen könnten berücksichtigt (3.2.19). Durch diese Herangehensweise konnte gezeigt werden, dass UpsM an eine Ziel-sRNA bindet, statt typischerweise an eine Ziel-mRNA (3.2.20). Bei dieser sRNA handelt es sich um die Hfq bindende sRNA RSs0827 aus dem RpoH_{I/II} Regulon. RSs0827 wird somit unter diversen Stressbedingungen induziert (Hitze-, ¹O₂-, CdCl₂- Stress, stationären Wachstumsphase), wobei der stetige Anstieg des Transkriptlevels dieser sRNA unter diesen Bedingungen spiegelbildlich zu der stetigen Akkumulation des Prozessierungsproduktes von UpsM ist. Die Interaktion ist *in silico* auf überzeugende Hybridisierungsvorhersagen, *in vivo* auf den kausalen Zusammenhang zwischen RSs0827 Level in verschiedenen Mutanten und UpsM Prozessierung als auch *in vitro* auf einen direkten Interaktionsnachweis gestützt (3.2.20). Die Hfq vermittelte Bindung von RSs0827 erfolgt in der Region des ersten *stemloop* von UpsM (siehe auch Abbildung 19A). Bei der Hybridisierung beider sRNAs kommt es wahrscheinlich zur Auflösung dieser

Struktur, wonach die Prozessierungsstelle in UpsM folglich als Einzelstrang vorliegt und für die Einzelstrang spezifische RNase E zugänglich wäre (Abbildung 44).

Dass eine sRNA wie UpsM während der Basenpaarung mit einer Ziel-mRNA einer Strukturveränderung unterliegt und in der Folge endonukleolytisch durch RNase E geschnitten wird, ist ein weit verbreiteter Mechanismus, der erstmals für die sRNA RyhB in *E. coli* beschrieben wurde. RyhB bindet ebenfalls Hfq abhängig an die Ziel-mRNA *sodB* und wird anschließend durch RNase E degradiert (Masse *et al.*, 2003). Hierbei wurde ebenfalls diskutiert, ob eine Interaktion von Hfq mit RNase E einer effizienten Rekrutierung der Ribonuklease zum sRNA-mRNA Duplex dient (Ikeda *et al.*, 2011b).

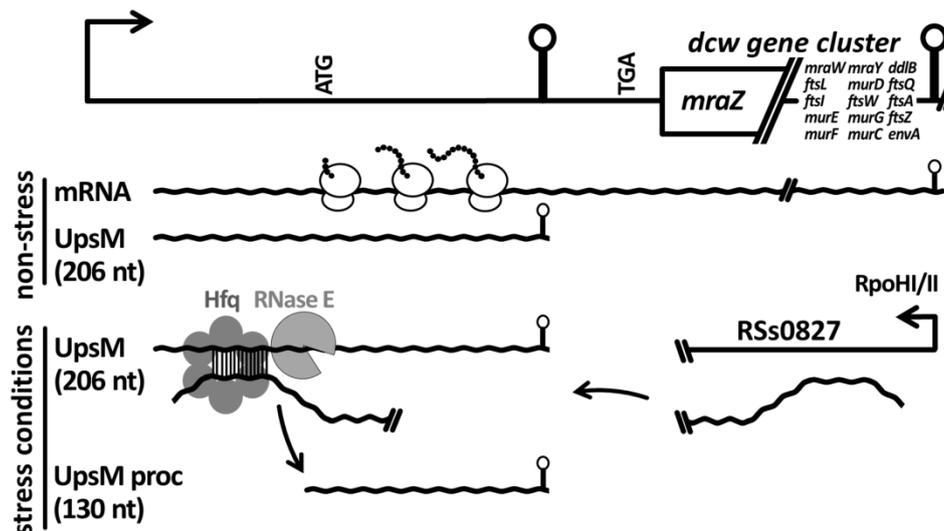


Abbildung 44: Zusammenfassung der Ergebnisse bezüglich des Genortes und Prozessierung der sRNA UpsM. Die Transkription von *mraZ*, erstes Gen des *dcw* (division and cell wall) Genclusters, erfolgt in *Rhodobacter sphaeroides* ausgehend von einem Transkriptionsstart 268 nt upstream des Gens. D.h. polycistronische *mraZ/dcw* mRNAs enthalten zunächst eine lange 5' UTR, die einen sORF und einen intrinsischen Terminator enthält. Im Falle der Terminator stoppt die Transkription, entsteht die sRNA UpsM (206 nt) statt der *dcw* mRNA. Unter diversen Stressbedingungen wird die sRNA RSs0827 RpoHI/II abhängig exprimiert und bindet Hfq abhängig als Ziel-RNA an UpsM. In der Folge kann UpsM endonukleolytisch durch RNase E geschnitten werden, wodurch das Prozessierungsprodukt UpsM (130 nt) akkumuliert.

4.2.3 Mögliche Mechanismen bzw. Funktionen von UpsM

Dass RSs0827 mit UpsM offensichtlich einen Duplex ausbildet, muss im übrigen nicht automatisch bedeuten, dass RSs0827 auch an die 5' UTR des *dcw* Operons bzw. *mraZ* bindet. Möglich wäre dies zwar, jedoch finden sich keine experimentellen Hinweise darauf, weil in der 5'RACE ausgehend von *mraZ* mit RNA von ¹O₂ gestressten Kulturen keine 5' Enden analog zum Prozessierungsprodukt von UpsM identifiziert werden konnten. Außerdem ist die Interaktion beider sRNAs offensichtlich von der Affinität zu Hfq abhängig. Die Assoziation an Hfq unterliegt wiederum Sequenz- und strukturellen Kriterien (siehe 1.1.4.3), die eher von UpsM als von der *dcw* 5' UTR erfüllt werden.

Bezüglich der bewiesenen Interaktion von UpsM und RSs0827 ist anzumerken, dass ncRNA-ncRNA Bindungen unabhängig im Genom kodierter Transkripte kaum bekannt sind. In einer kürzlich publizierten Arbeit wurden in enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) 55 sRNAs mittels Hfq-RNA crosslink identifiziert, die in Bakteriophagen entstammenden Regionen des Genoms kodiert sind. AgvB, eine dieser sRNAs, fungiert als Antagonist der *trans*-kodierten sRNA GcvB, indem die Sequenz der GcvB Ziel-mRNA imitiert wird (Tree *et al.*, 2014). Das heißt die AgvB titriert GcvB weg von den eigentlichen mRNA Substraten, was in rektalem Rindermukus zu einem Wachstumsvorteil führt. Die Autoren nennen AgvB deshalb auch bakteriophagenkodierte „anti-sRNA“. In einer anderen

Studie wurde ein ähnlicher Effekt von SroC auf GcvB beschrieben, wobei es sich bei SroC um ein stabiles Degradationsprodukt der polycistronischen *gltIJKL* mRNA handelt (Miyakoshi *et al.*, 2015a). Ein weiteres Beispiel bei dem nicht-kodierende Transkripte, deren Gene unabhängig voneinander im Genom lokalisiert sind, aneinander binden, wurde 2015 veröffentlicht. Während der rRNA und tRNA Reifung werden externe und interne Spacer (ETS/ITS) Sequenzen aus Vorläufern geschnitten, die bis zu diesem Zeitpunkt als nicht funktionell betrachtet wurden. Allerdings scheinen die sRNAs RyhB und RybB stabile Duplexe mit der 3'ETS des polycistronischen *glyW-cysT-leuZ* tRNA Vorläufers einzugehen, wobei die ETS eine Schwammfunktion innehat und wahrscheinlich Effekte der reprimierten sRNAs unterbindet, die auf transkriptionelles Rauschen zurückzuführen sind (Lalaouna *et al.*, 2015). Von den hier beschriebenen bzw. aus der Literatur bekannten Fällen, bei denen unabhängig chromosomal lokalisierte ncRNAs aneinander binden, hebt sich UpsM-RSs0827 ab, da es sich hierbei weder um Degradationsprodukte noch um Phagen kodierte Transkripte handelt. Das heißt, die UpsM-RSs0827 Bindung wäre die Erste, die für zwei chromosomal *trans*-kodierte sRNAs gezeigt wurde, die Primärtranskripte darstellen. Zusätzlich wäre das Beispiel das erste abseits der Enterobakterien. Fraglich bleibt jedoch, ob eine der sRNAs, ähnlich wie AgvB, SroC und *cysT*-3'ETS, eine Schwammfunktion zum Titrieren des Bindungspartners innehat.

Zusätzlich besteht die Möglichkeit, dass RSs0827 zur Aktivierung der sRNA UpsM beiträgt, falls das stabile 3' Fragment (130 nt) von UpsM das Transkript mit der biologischen Funktion ist. Auch das wäre einzigartig, weil bisher keine sRNA bekannt ist, die eine andere durch direkte Basenpaarung aktiviert. Die sRNA unabhängige Prozessierung von sRNAs, um diese biologisch zu aktivieren, wurde hingegen schon beschrieben. Beim prominentesten Beispiel handelt es sich wohl um die sRNA MicX von *Vibrio cholerae*. MicX reguliert, analog zu den *E. coli* sRNAs MicA, MicC und MicF, die Expression eines OMP (*outer membrane protein*) negativ. Hierzu muss das Primär- bzw. Vorläufertranskript von MicX RNase E und Hfq abhängig gespalten werden. Das verbleibende 3' Fragment stellt die stabilere und biologisch aktive Form der sRNA MicX dar (Davis & Waldor, 2007).

Letztendlich ist anhand der experimentellen Daten nicht genau zu klären, ob es sich bei der Interaktion von UpsM und RSs0827, um einen Schwamm- oder Aktivierungsmechanismus von UpsM handelt. Diese Frage lässt sich nicht eindeutig beantworten, weil bisher keine weiteren Ziel-mRNAs für beide sRNAs bekannt sind. Somit lässt sich auch die biologische Funktion von UpsM nicht klären.

5 Zusammenfassung

Das Bakterium *Rhodobacter sphaeroides* kann anoxygene Photosynthese betreiben und ist in Gegenwart von Licht und Sauerstoff der Bakteriochlorophyll *a* abhängigen Bildung von Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) bzw. photooxidativem Stress ausgesetzt. Bisherige Arbeiten beschäftigten sich eingehend mit der Regulation der photooxidativen Stressantwort. Hierbei lag der Fokus zunächst auf der transkriptionellen Genregulation, die hauptsächlich durch alternative Sigmafaktoren (RpoE, RpoH_{I/II}) vermittelt wird und bereits beschrieben wurde. Zum vollständigen Verständnis der Stressantwort ist es wichtig, auch die posttranskriptionelle Genregulation durch sRNAs zu betrachten. Um diese Lücke zu schließen, wurden die *trans*-kodierte sRNAs SorY (RSs_1543) und UpsM (RSs_0682) in dieser Arbeit untersucht.

SorY (*single oxygen resistance RNA Y*) wird unter diversen Stressbedingungen RpoH_{I/II} abhängig exprimiert und vermittelt Resistenz gegen $^1\text{O}_2$. Durch Transkriptomanalysen, Mutationsanalysen *in vivo* und Interaktionsstudien *in vitro* wurde die *takP* mRNA als Ziel-RNA von SorY identifiziert. Das *takP* Gen (RSP_0097) kodiert ein extrazytoplasmatisches Substratbindende Protein eines TRAP Transporters, der an der Malat Aufnahme beteiligt ist. Im Zuge der photooxidativen Stressantwort wird SorY RpoH_{I/II} abhängig induziert, reguliert die Expression von TakP negativ und mindert somit die Malat Aufnahme. Gleichzeitig induziert RpoH_{II} unter anderem die Transkription von Genen die Enzyme aus dem Pentose Phosphat Weg (PPP), Entner–Doudoroff Weg (ED) und der Gluconeogenese kodieren, weil diese Stoffwechselwege antioxidatives NADPH generieren. SorY unterstützt diese Stoffwechselverschiebung zugunsten der NADPH Produktion durch Limitierung der Malat Aufnahme, weil Malat ein Intermediat des TCA Zykluses darstellt, indem große Mengen prooxidatives NADH entstehen. Dies stellt eine neue biologische Funktion einer sRNA in der photooxidativen Stressantwort dar.

UpsM (*upstream sRNA of mraZ*) ist die abundanteste sRNA von *R. sphaeroides*. In der Gegenwart von $^1\text{O}_2$ wird die Prozessierung des Transkriptes zu einem stabilen 3' Fragment konditionell induziert. Durch diverse Deletionsstämme konnte gezeigt werden, dass die Prozessierung im Zuge einer Hfq abhängigen Duplexbildung mit der sRNA RSs_0827 durch RNase E stattfindet. Die biologische Funktion der UpsM-RSs0827 Bindung konnte bisher nicht aufgeklärt werden, obwohl diverse Transkriptomstudien und phänotypische Untersuchungen mit einer UpsM Überexpression durchgeführt wurden. Mechanistisch stellt die Bindung jedoch das erste bekannte Beispiel einer sRNA-sRNA Interaktion dar, bei der keine der Transkripte einen Phagen- oder Prozessierungsursprung hat.

Bei UpsM handelt es sich außerdem nicht, wie zunächst angenommen, um eine alleinstehende (*orphan*) IGR kodierte sRNA. Stattdessen entsteht die sRNA durch Transkriptionstermination an einem intrinsischen Terminator in einer außergewöhnlich langen 5' UTR (268 nt) von *mraZ*, die auch einen sORF enthält. *mraZ* ist das erste Gen des *dcw* (*division and cell wall*) Genclusters / Operons (16 Gene). *Dcw* Gene, deren Regulation und Position zueinander sind unter gram-negativen und stäbchenförmigen Bakterien stark konserviert und besonders in *E. coli* gut beschrieben. Trotzdem gibt es keine Bakterienspezies für die eine lange *dcw* 5' UTR mit intrinsischem Terminator bekannt wäre. Durch die Analyse von RNA Seq Daten konnte gezeigt werden, dass lange 5' UTRs *upstream* von *mraZ* nicht nur bei *R. sphaeroides* sondern generell in der Familie der *Rhodobacteraceae* zu finden sind. Zusätzlich sind Hinweise darauf zu finden, dass es sich bei der *dcw* 5' UTR von *R. sphaeroides* um einen *riboswitch* handeln könnte. Falls dies der Fall ist, wäre UpsM erst das zweite Beispiel einer *riboswitch* entstammenden sRNA mit nachgewiesener Funktion in *trans*.

6 Summary

Exposure to oxygen and light generates photooxidative stress by the bacteriochlorophyll *a* mediated formation of singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) in the facultative photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. The regulation of the photooxidative stress response on the transcriptional level mediated by alternative sigma factors (RpoE, RpoH_{I/II}) is well understood. However sRNAs regulating on a posttranscriptional level to favor the stress response were not investigated that intensively. For a more complete elucidation of regulatory features during photooxidative stress the role of the *trans*-encoded sRNAs SorY (RSs_1543) und UpsM (RSs_0682) was characterized during this work.

SorY (singlet oxygen resistance RNA Y) is an sRNA, which is induced under several stress conditions in RpoH_{I/II} dependent manner and confers increased resistance against $^1\text{O}_2$. The *takP* mRNA was identified to be its target mRNA. *takP* (RSP_0097) encodes a TRAP-T transporter involved in malate uptake. During photooxidative stress SorY, induced by RpoH_{I/II}, regulates the TakP expression negatively and consequently limits malate uptake. Simultaneously enzymes for pentose phosphate pathway, Entner–Doudoroff pathway and gluconeogenesis are induced by RpoH_{II} to enhance production of the antioxidant NADPH. SorY contributes to this metabolic shift by limiting malate flux into the tricarboxylic acid cycle (TCA cycle), which produces large amounts of prooxidative NADH. This reflects a novel biological function of an sRNA in oxidative stress responses.

UpsM (upstream sRNA of *mraZ*) is the most abundant sRNA of *R. sphaeroides*. Processing of UpsM to a stable 3' fragment is conditionally induced in the presence of $^1\text{O}_2$. Several mutant strains revealed that RNase E facilitates this cleavage in the course of Hfq dependent duplex formation with the sRNA RSs_0827. It is not possible to speculate about the biological role of UpsM so far, since further mRNA target of UpsM or RSs_0827 remain unknown. However, UpsM and RSs0827 may represent the first example of an sRNA-sRNA interaction apart from rarely known examples of sRNAs, that are of phage origin or derive from processing.

Furthermore, UpsM is not an *orphan* sRNA encoded in an IGR as initially assumed, but derives from transcriptional termination at an intrinsic terminator in an unexpected long 5' UTR of *mraZ*, which also encodes a sORF. *MraZ* is the first gene of the *dcw* (*division and cell wall*) gene clusters / operon. *Dcw* genes were intensively investigated. Their regulation and their relative order within the cluster are said to be outstandingly conserved among rod shaped and gram-negative bacteria. However a long 5' UTR has never been reported. Analysis of RNA seq data revealed the presence of such a long *dcw* 5' UTR with intrinsic terminator not only in *R. sphaeroides* but the whole family of *Rhodobacteraceae*, raising the question for its regulatory function. Therefore UpsM might represent the second described case of a *trans* acting sRNA derived from a riboswitch.

7 Referenzen

- Adelman, K., G. Orsini, A. Kolb, L. Graziani & E.N. Brody, (1997) The interaction between the AsiA protein of bacteriophage T4 and the sigma70 subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. *The Journal of biological chemistry* 272: 27435-27443.
- Adnan, F., L. Weber & G. Klug, (2015) The sRNA SorY confers resistance during photooxidative stress by affecting a metabolite transporter in *Rhodobacter sphaeroides*. *RNA biology* 12: 569-577.
- Afonyushkin, T., B. Vecerek, I. Moll, U. Blasi & V.R. Kaberdin, (2005) Both RNase E and RNase III control the stability of *sodB* mRNA upon translational inhibition by the small regulatory RNA RyhB. *Nucleic acids research* 33: 1678-1689.
- Aiba, H., (2007) Mechanism of RNA silencing by Hfq-binding small RNAs. *Current opinion in microbiology* 10: 134-139.
- Alon, U., (2007) Network motifs: theory and experimental approaches. *Nature reviews. Genetics* 8: 450-461.
- Altuvia, S., D. Weinstein-Fischer, A. Zhang, L. Postow & G. Storz, (1997) A small, stable RNA induced by oxidative stress: role as a pleiotropic regulator and antimutator. *Cell* 90: 43-53.
- Altuvia, S., A. Zhang, L. Argaman, A. Tiwari & G. Storz, (1998) The *Escherichia coli* OxyS regulatory RNA represses *fhlA* translation by blocking ribosome binding. *The EMBO journal* 17: 6069-6075.
- Andre, G., S. Even, H. Putzer, P. Burguiere, C. Croux, A. Danchin, I. Martin-Verstraete & O. Soutourina, (2008) S-box and T-box riboswitches and antisense RNA control a sulfur metabolic operon of *Clostridium acetobutylicum*. *Nucleic acids research* 36: 5955-5969.
- Anthony, J.R., J.D. Newman & T.J. Donohue, (2004) Interactions between the *Rhodobacter sphaeroides* ECF sigma factor, sigma(E), and its anti-sigma factor, ChrR. *Journal of molecular biology* 341: 345-360.
- Anthony, J.R., K.L. Warczak & T.J. Donohue, (2005) A transcriptional response to singlet oxygen, a toxic byproduct of photosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 6502-6507.
- Apirion, D., (1978) Isolation, genetic mapping and some characterization of a mutation in *Escherichia coli* that affects the processing of ribonucleic acid. *Genetics* 90: 659-671.
- Arellano, J.B., Y.A. Yousef, T.B. Melo, S.B. Mohamad, R.J. Cogdell & K.R. Naqvi, (2007) Formation and geminate quenching of singlet oxygen in purple bacterial reaction center. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology* 87: 105-112.
- Argaman, L., R. Hershberg, J. Vogel, G. Bejerano, E.G. Wagner, H. Margalit & S. Altuvia, (2001) Novel small RNA-encoding genes in the intergenic regions of *Escherichia coli*. *Current biology : CB* 11: 941-950.
- Aslund, F., M. Zheng, J. Beckwith & G. Storz, (1999) Regulation of the OxyR transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol-disulfide status. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 6161-6165.
- Babitzke, P., L. Granger, J. Olszewski & S.R. Kushner, (1993) Analysis of mRNA decay and rRNA processing in *Escherichia coli* multiple mutants carrying a deletion in RNase III. *Journal of bacteriology* 175: 229-239.
- Bandyra, K.J., N. Said, V. Pfeiffer, M.W. Gorna, J. Vogel & B.F. Luisi, (2012) The seed region of a small RNA drives the controlled destruction of the target mRNA by the endoribonuclease RNase E. *Molecular cell* 47: 943-953.
- Baxter, C.J., H. Redestig, N. Schauer, D. Reipsilber, K.R. Patil, J. Nielsen, J. Selbig, J. Liu, A.R. Fernie & L.J. Sweetlove, (2007) The metabolic response of heterotrophic *Arabidopsis* cells to oxidative stress. *Plant physiology* 143: 312-325.
- Bebien, M., J.P. Chauvin, J.M. Adriano, S. Grosse & A. Vermeoglio, (2001) Effect of selenite on growth and protein synthesis in the phototrophic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *Applied and environmental microbiology* 67: 4440-4447.

- Beisel, C.L. & G. Storz, (2011) The base-pairing RNA spot 42 participates in a multioutput feedforward loop to help enact catabolite repression in *Escherichia coli*. *Molecular cell* 41: 286-297.
- Belasco, J.G., (2010) All things must pass: contrasts and commonalities in eukaryotic and bacterial mRNA decay. *Nature reviews. Molecular cell biology* 11: 467-478.
- Belasco, J.G., J.T. Beatty, C.W. Adams, A. von Gabain & S.N. Cohen, (1985) Differential expression of photosynthesis genes in *R. capsulata* results from segmental differences in stability within the polycistronic *rxsA* transcript. *Cell* 40: 171-181.
- Berghoff, B.A., J. Glaeser, C.M. Sharma, J. Vogel & G. Klug, (2009) Photooxidative stress-induced and abundant small RNAs in *Rhodobacter sphaeroides*. *Molecular microbiology* 74: 1497-1512.
- Berghoff, B.A., J. Glaeser, C.M. Sharma, M. Zobawa, F. Lottspeich, J. Vogel & G. Klug, (2011) Contribution of Hfq to photooxidative stress resistance and global regulation in *Rhodobacter sphaeroides*. *Molecular microbiology* 80: 1479-1495.
- Berghoff, B.A., A. Konzer, N.N. Mank, M. Looso, T. Rische, K.U. Forstner, M. Kruger & G. Klug, (2013) Integrative "omics"-approach discovers dynamic and regulatory features of bacterial stress responses. *PLoS genetics* 9: e1003576.
- Bernstein, J.A., A.B. Khodursky, P.H. Lin, S. Lin-Chao & S.N. Cohen, (2002) Global analysis of mRNA decay and abundance in *Escherichia coli* at single-gene resolution using two-color fluorescent DNA microarrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 9697-9702.
- Bignucolo, A., V.P. Appanna, S.C. Thomas, C. Auger, S. Han, A. Omri & V.D. Appanna, (2013) Hydrogen peroxide stress provokes a metabolic reprogramming in *Pseudomonas fluorescens*: enhanced production of pyruvate. *Journal of biotechnology* 167: 309-315.
- Billenkamp, F., T. Peng, B.A. Berghoff & G. Klug, (2015) A cluster of four homologous small RNAs modulates C1 metabolism and the pyruvate dehydrogenase complex in *Rhodobacter sphaeroides* under various stress conditions. *Journal of bacteriology* 197: 1839-1852.
- Bilusic, I., N. Popitsch, P. Rescheneder, R. Schroeder & M. Lybecker, (2014) Revisiting the coding potential of the *E. coli* genome through Hfq co-immunoprecipitation. *RNA biology* 11: 641-654.
- Binnenkade, L., L. Teichmann & K.M. Thormann, (2014) Iron triggers lambda So prophage induction and release of extracellular DNA in *Shewanella oneidensis* MR-1 biofilms. *Applied and environmental microbiology* 80: 5304-5316.
- Birnboim, H.C. & J. Doly, (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7: 1513-1523.
- Blanchard, J.L., W.Y. Wholey, E.M. Conlon & P.J. Pomposiello, (2007) Rapid changes in gene expression dynamics in response to superoxide reveal SoxRS-dependent and independent transcriptional networks. *PloS one* 2: e1186.
- Bolger, A.M., M. Lohse & B. Usadel, (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30: 2114-2120.
- Borland, C.F., D.J. McGarvey, T.G. Truscott, R.J. Codgell & E.J. Land, (1987) Photophysical studies of bacteriochlorophyll *a* and bacteriopheophytin *a* — singlet oxygen generation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 1: 93-101.
- Bossi, L., A. Schwartz, B. Guillemardet, M. Boudvillain & N. Figueroa-Bossi, (2012) A role for Rho-dependent polarity in gene regulation by a noncoding small RNA. *Genes & development* 26: 1864-1873.
- Boughammoura, A., B.F. Matzanke, L. Bottger, S. Reverchon, E. Lesuisse, D. Expert & T. Franza, (2008) Differential role of ferritins in iron metabolism and virulence of the plant-pathogenic bacterium *Erwinia chrysanthemi* 3937. *Journal of bacteriology* 190: 1518-1530.
- Bouvier, M., C.M. Sharma, F. Mika, K.H. Nierhaus & J. Vogel, (2008a) Small RNA binding to 5' mRNA coding region inhibits translational initiation. *Molecular cell* 32: 827-837.
- Bouvier, M., C.M. Sharma, F. Mika, K.H. Nierhaus & J. Vogel, (2008b) Small RNA Binding to 5' mRNA Coding Region Inhibits Translational Initiation. *Molecular cell* 32: 827-837.

- Bradford, M.M., (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72: 248-254.
- Briviba, K., L.O. Klotz & H. Sies, (1997) Toxic and signaling effects of photochemically or chemically generated singlet oxygen in biological systems. *Biological chemistry* 378: 1259-1265.
- Browning, D.F. & S.J. Busby, (2004) The regulation of bacterial transcription initiation. *Nature reviews. Microbiology* 2: 57-65.
- Browning, D.F. & S.J. Busby, (2016) Local and global regulation of transcription initiation in bacteria. *Nature reviews. Microbiology* 14: 638-650.
- Brumaghim, J.L., Y. Li, E. Henle & S. Linn, (2003) Effects of hydrogen peroxide upon nicotinamide nucleotide metabolism in *Escherichia coli* - Changes in enzyme levels and nicotinamide nucleotide pools and studies of the oxidation of NAD(P)H by Fe(III). *Journal of Biological Chemistry* 278: 42495-42504.
- Burgess, R.R. & L. Anthony, (2001) How sigma docks to RNA polymerase and what sigma does. *Current opinion in microbiology* 4: 126-131.
- Busch, A., A.S. Richter & R. Backofen, (2008) IntaRNA: efficient prediction of bacterial sRNA targets incorporating target site accessibility and seed regions. *Bioinformatics* 24: 2849-2856.
- Cadet, J., T. Douki & J.L. Ravanat, (2010) Oxidatively generated base damage to cellular DNA. *Free radical biology & medicine* 49: 9-21.
- Cadet, J., J.L. Ravanat, G.R. Martinez, M.H. Medeiros & P. Di Mascio, (2006) Singlet oxygen oxidation of isolated and cellular DNA: product formation and mechanistic insights. *Photochemistry and photobiology* 82: 1219-1225.
- Callaghan, A.J., J.G. Grossmann, Y.U. Redko, L.L. Ilag, M.C. Moncrieffe, M.F. Symmons, C.V. Robinson, K.J. McDowall & B.F. Luisi, (2003) Quaternary structure and catalytic activity of the *Escherichia coli* ribonuclease E amino-terminal catalytic domain. *Biochemistry* 42: 13848-13855.
- Callaghan, A.J., M.J. Marcaida, J.A. Stead, K.J. McDowall, W.G. Scott & B.F. Luisi, (2005) Structure of *Escherichia coli* RNase E catalytic domain and implications for RNA turnover. *Nature* 437: 1187-1191.
- Callen, B.P., K.E. Shearwin & J.B. Egan, (2004) Transcriptional interference between convergent promoters caused by elongation over the promoter. *Molecular cell* 14: 647-656.
- Campbell, E.A., J.L. Tupy, T.M. Gruber, S. Wang, M.M. Sharp, C.A. Gross & S.A. Darst, (2003) Crystal structure of *Escherichia coli* sigmaE with the cytoplasmic domain of its anti-sigma RseA. *Molecular cell* 11: 1067-1078.
- Carmel-Harel, O. & G. Storz, (2000) Roles of the glutathione- and thioredoxin-dependent reduction systems in the *Escherichia coli* and *saccharomyces cerevisiae* responses to oxidative stress. *Annual review of microbiology* 54: 439-461.
- Carpousis, A.J., (2007) The RNA degradosome of *Escherichia coli*: an mRNA-degrading machine assembled on RNase E. *Annual review of microbiology* 61: 71-87.
- Chadsey, M.S., J.E. Karlinsey & K.T. Hughes, (1998) The flagellar anti-sigma factor FlgM actively dissociates *Salmonella typhimurium* sigma28 RNA polymerase holoenzyme. *Genes & development* 12: 3123-3136.
- Chao, Y., K. Papenfort, R. Reinhardt, C.M. Sharma & J. Vogel, (2012) An atlas of Hfq-bound transcripts reveals 3' UTRs as a genomic reservoir of regulatory small RNAs. *The EMBO journal* 31: 4005-4019.
- Chao, Y. & J. Vogel, (2016) A 3' UTR-Derived Small RNA Provides the Regulatory Noncoding Arm of the Inner Membrane Stress Response. *Molecular cell* 61: 352-363.
- Chaulk, S.G., M.N. Smith Frieday, D.C. Arthur, D.E. Culham, R.A. Edwards, P. Soo, L.S. Frost, R.A. Keates, J.N. Glover & J.M. Wood, (2011) ProQ is an RNA chaperone that controls ProP levels in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 50: 3095-3106.
- Chevalier, C., S. Boisset, C. Romilly, B. Masquida, P. Fechter, T. Geissmann, F. Vandenesch & P. Romby, (2010) *Staphylococcus aureus* RNAIII binds to two distant regions of coa mRNA to arrest translation and promote mRNA degradation. *PLoS pathogens* 6: e1000809.

- Choudhary, M., Y.X. Fu, C. Mackenzie & S. Kaplan, (2004) DNA sequence duplication in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1: evidence of an ancient partnership between chromosomes I and II. *Journal of bacteriology* 186: 2019-2027.
- Choudhary, M. & S. Kaplan, (2000) DNA sequence analysis of the photosynthesis region of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *Nucleic acids research* 28: 862-867.
- Christman, M.F., R.W. Morgan, F.S. Jacobson & B.N. Ames, (1985) Positive control of a regulon for defenses against oxidative stress and some heat-shock proteins in *Salmonella typhimurium*. *Cell* 41: 753-762.
- Church, G.M. & W. Gilbert, (1984) Genomic sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81: 1991-1995.
- Coba de la Pena, T., F.J. Redondo, M.F. Fillat, M.M. Lucas & J.J. Pueyo, (2013) Flavodoxin overexpression confers tolerance to oxidative stress in beneficial soil bacteria and improves survival in the presence of the herbicides paraquat and atrazine. *Journal of applied microbiology* 115: 236-246.
- Cogdell, R.J., T.D. Howard, R. Bittl, E. Schlodder, I. Geisenheimer & W. Lubitz, (2000) How carotenoids protect bacterial photosynthesis. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 355: 1345-1349.
- Condon, C., (2007) Maturation and degradation of RNA in bacteria. *Current opinion in microbiology* 10: 271-278.
- Conrad, C., R. Rauhut & G. Klug, (1998) Different cleavage specificities of RNases III from *Rhodobacter capsulatus* and *Escherichia coli*. *Nucleic acids research* 26: 4446-4453.
- Cormack, R.S. & G.A. Mackie, (1992) Structural requirements for the processing of *Escherichia coli* 5S ribosomal RNA by RNase E *in vitro*. *Journal of molecular biology* 228: 1078-1090.
- Crampton, N., W.A. Bonass, J. Kirkham, C. Rivetti & N.H. Thomson, (2006) Collision events between RNA polymerases in convergent transcription studied by atomic force microscopy. *Nucleic acids research* 34: 5416-5425.
- Crimmins, G.T., M.W. Schelle, A.A. Herskovits, P.P. Ni, B.C. Kline, N. Meyer-Morse, A.T. Iavarone & D.A. Portnoy, (2009) *Listeria monocytogenes* 6-Phosphogluconolactonase mutants induce increased activation of a host cytosolic surveillance pathway. *Infection and immunity* 77: 3014-3022.
- Cuypers, A., M. Plusquin, T. Remans, M. Jozefczak, E. Keunen, H. Gielen, K. Opdenakker, A.R. Nair, E. Munters, T.J. Artois, T. Nawrot, J. Vangronsveld & K. Smeets, (2010) Cadmium stress: an oxidative challenge. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine* 23: 927-940.
- Darfeuille, F., C. Unoson, J. Vogel & E.G. Wagner, (2007) An antisense RNA inhibits translation by competing with standby ribosomes. *Molecular cell* 26: 381-392.
- Darty, K., A. Denise & Y. Ponty, (2009) VARNA: Interactive drawing and editing of the RNA secondary structure. *Bioinformatics* 25: 1974-1975.
- Davies, M.J., (2003) Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochemical and biophysical research communications* 305: 761-770.
- Davies, M.J., (2004) Reactive species formed on proteins exposed to singlet oxygen. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* 3: 17-25.
- Davies, M.J., (2005) The oxidative environment and protein damage. *Biochimica et biophysica acta* 1703: 93-109.
- Davies, M.J., (2016) Protein oxidation and peroxidation. *The Biochemical journal* 473: 805-825.
- Davis, B.M. & M.K. Waldor, (2007) RNase E-dependent processing stabilizes MicX, a *Vibrio cholerae* sRNA. *Molecular microbiology* 65: 373-385.
- de Boer, H.A., L.J. Comstock & M. Vasser, (1983) The *tac* promoter: a functional hybrid derived from the *trp* and *lac* promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80: 21-25.

- de la Fuente, A., P. Palacios & M. Vicente, (2001) Transcription of the *Escherichia coli* *dcw* cluster: evidence for distal upstream transcripts being involved in the expression of the downstream *ftsZ* gene. *Biochimie* 83: 109-115.
- De Lay, N. & S. Gottesman, (2012) A complex network of small non-coding RNAs regulate motility in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* 86: 524-538.
- Deana, A. & J.G. Belasco, (2005) Lost in translation: the influence of ribosomes on bacterial mRNA decay. *Genes & development* 19: 2526-2533.
- Deana, A., H. Celesnik & J.G. Belasco, (2008) The bacterial enzyme RppH triggers messenger RNA degradation by 5' pyrophosphate removal. *Nature* 451: 355-358.
- Devasagayam, T.P., A.R. Sundquist, P. Di Mascio, S. Kaiser & H. Sies, (1991) Activity of thiols as singlet molecular oxygen quenchers. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology* 9: 105-116.
- Ding, H., E. Hidalgo & B. Dimple, (1996) The redox state of the [2Fe-2S] clusters in SoxR protein regulates its activity as a transcription factor. *The Journal of biological chemistry* 271: 33173-33175.
- Dizdaroglu, M., (1992) Measurement of radiation-induced damage to DNA at the molecular level. *International journal of radiation biology* 61: 175-183.
- Dufour, Y.S., S. Imam, B.M. Koo, H.A. Green & T.J. Donohue, (2012) Convergence of the transcriptional responses to heat shock and singlet oxygen stresses. *PLoS genetics* 8: e1002929.
- Dufour, Y.S., R. Landick & T.J. Donohue, (2008) Organization and evolution of the biological response to singlet oxygen stress. *Journal of molecular biology* 383: 713-730.
- Epe, B., (1991) Genotoxicity of singlet oxygen. *Chemico-biological interactions* 80: 239-260.
- Eraso, J.M. & S. Kaplan, (1994) PrrA, a putative response regulator involved in oxygen regulation of photosynthesis gene expression in *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of bacteriology* 176: 32-43.
- Eraso, J.M., L.M. Markillie, H.D. Mitchell, R.C. Taylor, G. Orr & W. Margolin, (2014) The Highly Conserved MraZ Protein Is a Transcriptional Regulator in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 196: 2053-2066.
- Evguenieva-Hackenberg, E. & G. Klug, (2000) RNase III processing of intervening sequences found in helix 9 of 23S rRNA in the alpha subclass of *Proteobacteria*. *Journal of bacteriology* 182: 4719-4729.
- Fang, F.C., (2004) Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nature reviews. Microbiology* 2: 820-832.
- Folichon, M., V. Arluison, O. Pellegrini, E. Huntzinger, P. Regnier & E. Hajnsdorf, (2003) The poly(A) binding protein Hfq protects RNA from RNase E and exoribonucleolytic degradation. *Nucleic acids research* 31: 7302-7310.
- Foote, C.S., (1968) Mechanisms of photosensitized oxidation. There are several different types of photosensitized oxidation which may be important in biological systems. *Science* 162: 963-970.
- Forward, J.A., M.C. Behrendt, N.R. Wyborn, R. Cross & D.J. Kelly, (1997) TRAP transporters: a new family of periplasmic solute transport systems encoded by the *dctPQM* genes of *Rhodobacter capsulatus* and by homologs in diverse gram-negative bacteria. *Journal of bacteriology* 179: 5482-5493.
- Fridovich, I., (1995) Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annual review of biochemistry* 64: 97-112.
- Fritsch, J., R. Rothfuchs, R. Rauhut & G. Klug, (1995) Identification of an mRNA element promoting rate-limiting cleavage of the polycistronic *puf* mRNA in *Rhodobacter capsulatus* by an enzyme similar to RNase E. *Molecular microbiology* 15: 1017-1029.
- Gambino, M. & F. Cappitelli, (2016) Mini-review: Biofilm responses to oxidative stress. *Biofouling* 32: 167-178.

- Ganther, H.E., (1968) Selenotrisulfides. Formation by the reaction of thiols with selenious acid. *Biochemistry* 7: 2898-2905.
- Garst, A.D., A.L. Edwards & R.T. Batey, (2011) Riboswitches: structures and mechanisms. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3.
- Georg, J. & W.R. Hess, (2011) *cis*-antisense RNA, another level of gene regulation in bacteria. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 75: 286-300.
- Girotti, A.W. & T. Kriska, (2004) Role of lipid hydroperoxides in photo-oxidative stress signaling. *Antioxidants & redox signaling* 6: 301-310.
- GK., S., (2005) Limma: Linear models for microarray data. In: Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor. *Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor*.
- Glaeser, J., A.M. Nuss, B.A. Berghoff & G. Klug, (2011) Singlet oxygen stress in microorganisms. *Advances in microbial physiology* 58: 141-173.
- Glaeser, J., M. Zobawa, F. Lottspeich & G. Klug, (2007) Protein synthesis patterns reveal a complex regulatory response to singlet oxygen in *Rhodobacter*. *Journal of proteome research* 6: 2460-2471.
- Goldblum, K. & D. Apririon, (1981) Inactivation of the ribonucleic acid-processing enzyme ribonuclease E blocks cell division. *Journal of bacteriology* 146: 128-132.
- Gomelsky, L., J. Sram, O.V. Moskvina, I.M. Horne, H.N. Dodd, J.M. Pemberton, A.G. McEwan, S. Kaplan & M. Gomelsky, (2003) Identification and *in vivo* characterization of PpaA, a regulator of photosystem formation in *Rhodobacter sphaeroides*. *Microbiology* 149: 377-388.
- Gomelsky, M. & S. Kaplan, (1997) Molecular genetic analysis suggesting interactions between AppA and PpsR in regulation of photosynthesis gene expression in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *Journal of bacteriology* 179: 128-134.
- Gonin, S., P. Arnoux, B. Pierru, J. Lavergne, B. Alonso, M. Sabaty & D. Pignol, (2007) Crystal structures of an Extracytoplasmic Solute Receptor from a TRAP transporter in its open and closed forms reveal a helix-swapped dimer requiring a cation for alpha-keto acid binding. *BMC structural biology* 7: 11.
- Gonzalez-Flecha, B. & B. Dimple, (1999) Role for the *oxyS* gene in regulation of intracellular hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 181: 3833-3836.
- Gopel, Y., M.A. Khan & B. Gorke, (2014) Menage a trois: post-transcriptional control of the key enzyme for cell envelope synthesis by a base-pairing small RNA, an RNase adaptor protein, and a small RNA mimic. *RNA biology* 11: 433-442.
- Gort, A.S., D.M. Ferber & J.A. Imlay, (1999) The regulation and role of the periplasmic copper, zinc superoxide dismutase of *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* 32: 179-191.
- Green, H.A. & T.J. Donohue, (2006) Activity of *Rhodobacter sphaeroides* RpoH(II), a second member of the heat shock sigma factor family. *Journal of bacteriology* 188: 5712-5721.
- Grose, J.H., L. Joss, S.F. Velick & J.R. Roth, (2006) Evidence that feedback inhibition of NAD kinase controls responses to oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 7601-7606.
- Gruber, A.R., R. Lorenz, S.H. Bernhart, R. Neubock & I.L. Hofacker, (2008) The Vienna RNA websuite. *Nucleic acids research* 36: W70-74.
- Grüllich, K., (2015) Funktionelle Charakterisierung der hoch abundanten sRNA in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *Bachelorarbeit Justus-Liebig-Universität Gießen*.
- Grundy, F.J. & T.M. Henkin, (2004) Regulation of gene expression by effectors that bind to RNA. *Current opinion in microbiology* 7: 126-131.
- Guerrier-Takada, C., K. Gardiner, T. Marsh, N. Pace & S. Altman, (1983) The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell* 35: 849-857.
- Guillier, M. & S. Gottesman, (2008) The 5' end of two redundant sRNAs is involved in the regulation of multiple targets, including their own regulator. *Nucleic acids research* 36: 6781-6794.
- Halliwell, B., (2006) Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant physiology* 141: 312-322.

- Halliwell, B. & J.M. Gutteridge, (1992) Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. An update. *FEBS letters* 307: 108-112.
- Heck, C., R. Rothfuchs, A. Jager, R. Rauhut & G. Klug, (1996) Effect of the *pufQ-pufB* intercistronic region on *puf* mRNA stability in *Rhodobacter capsulatus*. *Molecular microbiology* 20: 1165-1178.
- Helmann, J.D. & M.J. Chamberlin, (1988) Structure and function of bacterial sigma factors. *Annual review of biochemistry* 57: 839-872.
- Henkin, T.M. & C. Yanofsky, (2002) Regulation by transcription attenuation in bacteria: how RNA provides instructions for transcription termination/antitermination decisions. *Bioessays* 24: 700-707.
- Hermanns, Y.N., (2015) Die Auswirkung von Umwelteinflüssen auf die mRNA Stabilitäten in *Rhodobacter sphaeroides*. *Dissertation Justus-Liebig-Universität Gießen*.
- Hillar, A., P. Nicholls, J. Switala & P.C. Loewen, (1994) NADPH binding and control of catalase compound II formation: comparison of bovine, yeast, and *Escherichia coli* enzymes. *The Biochemical journal* 300 (Pt 2): 531-539.
- Hoffmann, S., C. Otto, S. Kurtz, C.M. Sharma, P. Khaitovich, J. Vogel, P.F. Stadler & J. Hackermuller, (2009) Fast mapping of short sequences with mismatches, insertions and deletions using index structures. *PLoS computational biology* 5: e1000502.
- Holmqvist, E., C. Unoson, J. Reimegard & E.G. Wagner, (2012) A mixed double negative feedback loop between the sRNA MicF and the global regulator Lrp. *Molecular microbiology* 84: 414-427.
- Holmqvist, E., P.R. Wright, L. Li, T. Bischler, L. Barquist, R. Reinhardt, R. Backofen & J. Vogel, (2016) Global RNA recognition patterns of post-transcriptional regulators Hfq and CsrA revealed by UV crosslinking *in vivo*. *The EMBO journal* 35: 991-1011.
- Homerova, D., B. Sevcikova, B. Rezuchova & J. Kormanec, (2012) Regulation of an alternative sigma factor sigma14 by a partner switching mechanism with an anti-sigma factor Prs1 and an anti-anti-sigma factor Arsl in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Gene* 492: 71-80.
- Hubner, P., J.C. Willison, P.M. Vignais & T.A. Bickle, (1991) Expression of regulatory *nif* genes in *Rhodobacter capsulatus*. *Journal of bacteriology* 173: 2993-2999.
- Hughes, K.T. & K. Mathee, (1998) The anti-sigma factors. *Annual review of microbiology* 52: 231-286.
- Huntzinger, E., S. Boisset, C. Saveanu, Y. Benito, T. Geissmann, A. Namane, G. Lina, J. Etienne, B. Ehresmann, C. Ehresmann, A. Jacquier, F. Vandenesch & P. Romby, (2005) *Staphylococcus aureus* RNAIII and the endoribonuclease III coordinately regulate *spa* gene expression. *The EMBO journal* 24: 824-835.
- Hutchinson, F., (1985) Chemical changes induced in DNA by ionizing radiation. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* 32: 115-154.
- Huttenhofer, A. & H.F. Noller, (1994) Footprinting mRNA-ribosome complexes with chemical probes. *The EMBO journal* 13: 3892-3901.
- Ikeda, Y., M. Yagi, T. Morita & H. Aiba, (2011a) Hfq binding at RhlB-recognition region of RNase E is crucial for the rapid degradation of target mRNAs mediated by sRNAs in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* 79: 419-432.
- Ikeda, Y., M. Yagi, T. Morita & H. Aiba, (2011b) Hfq binding at RhlB-recognition region of RNase E is crucial for the rapid degradation of target mRNAs mediated by sRNAs in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* 79: 419-432.
- Imam, S., D.R. Noguera & T.J. Donohue, (2013) Global insights into energetic and metabolic networks in *Rhodobacter sphaeroides*. *BMC systems biology* 7: 89.
- Imhoff, J.F., (2006) The Phototrophic Alpha-Proteobacteria. In: *The Prokaryotes: Volume 5: Proteobacteria: Alpha and Beta Subclasses*. M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer & E. Stackebrandt (eds). New York, NY: Springer New York, pp. 41-64.
- Imlay, J.A., (2003) Pathways of oxidative damage. *Annual review of microbiology* 57: 395-418.
- Imlay, J.A., (2006) Iron-sulphur clusters and the problem with oxygen. *Molecular microbiology* 59: 1073-1082.

- Ishikawa, H., H. Otaka, K. Maki, T. Morita & H. Aiba, (2012) The functional Hfq-binding module of bacterial sRNAs consists of a double or single hairpin preceded by a U-rich sequence and followed by a 3' poly(U) tail. *Rna* 18: 1062-1074.
- Jacob, F. & J. Monod, (1961) Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *Journal of molecular biology* 3: 318-356.
- Jager, S., O. Fuhrmann, C. Heck, M. Hebermehl, E. Schiltz, R. Rauhut & G. Klug, (2001) An mRNA degrading complex in *Rhodobacter capsulatus*. *Nucleic acids research* 29: 4581-4588.
- Janzon, L., S. Löfdahl & S. Arvidson, (1986) Evidence for a coordinate transcriptional control of alpha-toxin and protein a synthesis in *Staphylococcus aureus*. *FEMS microbiology letters* 33: 193-198.
- Jiang, X. & J.G. Belasco, (2004) Catalytic activation of multimeric RNase E and RNase G by 5'-monophosphorylated RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 9211-9216.
- Jourdan, S.S. & K.J. McDowall, (2008) Sensing of 5' monophosphate by *Escherichia coli* RNase G can significantly enhance association with RNA and stimulate the decay of functional mRNA transcripts *in vivo*. *Molecular microbiology* 67: 102-115.
- Jurgen, B., T. Schweder & M. Hecker, (1998) The stability of mRNA from the *gsiB* gene of *Bacillus subtilis* is dependent on the presence of a strong ribosome binding site. *Molecular & general genetics : MGG* 258: 538-545.
- Kaberdin, V.R. & U. Blasi, (2006) Translation initiation and the fate of bacterial mRNAs. *FEMS microbiology reviews* 30: 967-979.
- Kaberdin, V.R., A. Miczak, J.S. Jakobsen, S. Lin-Chao, K.J. McDowall & A. von Gabain, (1998) The endoribonucleolytic N-terminal half of *Escherichia coli* RNase E is evolutionarily conserved in *Synechocystis sp.* and other bacteria but not the C-terminal half, which is sufficient for degradosome assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 11637-11642.
- Kaberdin, V.R., D. Singh & S. Lin-Chao, (2011) Composition and conservation of the mRNA-degrading machinery in bacteria. *Journal of biomedical science* 18: 23.
- Kakoschke, T., S. Kakoschke, G. Magistro, S. Schubert, M. Borath, J. Heesemann & O. Rossier, (2014) The RNA chaperone Hfq impacts growth, metabolism and production of virulence factors in *Yersinia enterocolitica*. *PloS one* 9: e86113.
- Karls, R.K., J. Brooks, P. Rossmessl, J. Luedke & T.J. Donohue, (1998) Metabolic roles of a *Rhodobacter sphaeroides* member of the sigma32 family. *Journal of bacteriology* 180: 10-19.
- Kawamoto, H., Y. Koide, T. Morita & H. Aiba, (2006) Base-pairing requirement for RNA silencing by a bacterial small RNA and acceleration of duplex formation by Hfq. *Molecular microbiology* 61: 1013-1022.
- Kawano, M., L. Aravind & G. Storz, (2007) An antisense RNA controls synthesis of an SOS-induced toxin evolved from an antitoxin. *Molecular microbiology* 64: 738-754.
- Kawano, M., A.A. Reynolds, J. Miranda-Rios & G. Storz, (2005) Detection of 5'- and 3'-UTR-derived small RNAs and cis-encoded antisense RNAs in *Escherichia coli*. *Nucleic acids research* 33: 1040-1050.
- Kery, M.B., M. Feldman, J. Livny & B. Tjaden, (2014) TargetRNA2: identifying targets of small regulatory RNAs in bacteria. *Nucleic acids research* 42: W124-129.
- Kiebel, J.N., (2013) Funktionsanalyse der sRNA RSs0827 im Eisenstoffwechsel von *Rhodobacter sphaeroides*. *Bachelorarbeit Justus-Liebig-Universität Gießen*.
- Kim, H.M., J.H. Shin, Y.B. Cho & J.H. Roe, (2014) Inverse regulation of Fe- and Ni-containing SOD genes by a Fur family regulator Nur through small RNA processed from 3'UTR of the *sodF* mRNA. *Nucleic acids research* 42: 2003-2014.
- Kingsford, C.L., K. Ayanbule & S.L. Salzberg, (2007) Rapid, accurate, computational discovery of Rho-independent transcription terminators illuminates their relationship to DNA uptake. *Genome biology* 8: R22.

- Kirkman, H.N. & G.F. Gaetani, (1984) Catalase: a tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81: 4343-4347.
- Klug, G., (1991) Endonucleolytic degradation of *puf* mRNA in *Rhodobacter capsulatus* is influenced by oxygen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88: 1765-1769.
- Klug, G., (1993) The role of mRNA degradation in the regulated expression of bacterial photosynthesis genes. *Molecular microbiology* 9: 1-7.
- Klug, G., C.W. Adams, J. Belasco, B. Doerge & S.N. Cohen, (1987) Biological consequences of segmental alterations in mRNA stability: effects of deletion of the intercistronic hairpin loop region of the *Rhodobacter capsulatus puf* operon. *The EMBO journal* 6: 3515-3520.
- Korshunov, S. & J.A. Imlay, (2006) Detection and quantification of superoxide formed within the periplasm of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 188: 6326-6334.
- Kortmann, J. & F. Narberhaus, (2012) Bacterial RNA thermometers: molecular zippers and switches. *Nature reviews. Microbiology* 10: 255-265.
- Kovach, M.E., P.H. Elzer, D.S. Hill, G.T. Robertson, M.A. Farris, R.M. Roop, 2nd & K.M. Peterson, (1995) Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* 166: 175-176.
- Krieger-Liszkay, A., (2005) Singlet oxygen production in photosynthesis. *Journal of experimental botany* 56: 337-346.
- Krieger-Liszkay, A., C. Fufezan & A. Trebst, (2008) Singlet oxygen production in photosystem II and related protection mechanism. *Photosynthesis research* 98: 551-564.
- Krinke, L. & D.L. Wulff, (1990) RNase III-dependent hydrolysis of λ cII-O gene mRNA mediated by λ OOP antisense RNA. *Genes & development* 4: 2223-2233.
- Kruger, K., P.J. Grabowski, A.J. Zaug, J. Sands, D.E. Gottschling & T.R. Cech, (1982) Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymena. *Cell* 31: 147-157.
- Laalami, S., L. Zig & H. Putzer, (2014) Initiation of mRNA decay in bacteria. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 71: 1799-1828.
- Laemmli, U.K., (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lalaouna, D., M.C. Carrier, S. Semsey, J.S. Brouard, J. Wang, J.T. Wade & E. Masse, (2015) A 3' external transcribed spacer in a tRNA transcript acts as a sponge for small RNAs to prevent transcriptional noise. *Molecular cell* 58: 393-405.
- Lamontagne, B., S. Larose, J. Boulanger & S.A. Elela, (2001) The RNase III family: a conserved structure and expanding functions in eukaryotic dsRNA metabolism. *Current issues in molecular biology* 3: 71-78.
- Larkin, M.A., G. Blackshields, N.P. Brown, R. Chenna, P.A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I.M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J.D. Thompson, T.J. Gibson & D.G. Higgins, (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947-2948.
- Leinonen, R., H. Sugawara, M. Shumway & C. International Nucleotide Sequence Database, (2011) The sequence read archive. *Nucleic acids research* 39: D19-21.
- Levi-Meyrueis, C., V. Monteil, O. Sismeiro, M.A. Dillies, M. Monot, B. Jagla, J.Y. Coppee, B. Dupuy & F. Norel, (2014) Expanding the RpoS/sigmaS-network by RNA sequencing and identification of sigmaS-controlled small RNAs in *Salmonella*. *PLoS one* 9: e96918.
- Li, H. & A.W. Nicholson, (1996) Defining the enzyme binding domain of a ribonuclease III processing signal. Ethylation interference and hydroxyl radical footprinting using catalytically inactive RNase III mutants. *The EMBO journal* 15: 1421-1433.
- Li, W., C.E. Stevenson, N. Burton, P. Jakimowicz, M.S. Paget, M.J. Buttner, D.M. Lawson & C. Kleanthous, (2002) Identification and structure of the anti-sigma factor-binding domain of the disulphide-stress regulated sigma factor sigma(R) from *Streptomyces coelicolor*. *Journal of molecular biology* 323: 225-236.

- Li, Z. & M.P. Deutscher, (2002) RNase E plays an essential role in the maturation of *Escherichia coli* tRNA precursors. *Rna* 8: 97-109.
- Lin-Chao, S., C.L. Wei & Y.T. Lin, (1999) RNase E is required for the maturation of *ssrA* RNA and normal *ssrA* RNA peptide-tagging activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 12406-12411.
- Link, T.M., P. Valentin-Hansen & R.G. Brennan, (2009) Structure of *Escherichia coli* Hfq bound to polyriboadenylate RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 19292-19297.
- Liou, G.G., H.Y. Chang, C.S. Lin & S. Lin-Chao, (2002) DEAD box RhlB RNA helicase physically associates with exoribonuclease PNPase to degrade double-stranded RNA independent of the degradosome-assembling region of RNase E. *The Journal of biological chemistry* 277: 41157-41162.
- Lloyd, G., P. Landini & S. Busby, (2001) Activation and repression of transcription initiation in bacteria. *Essays in biochemistry* 37: 17-31.
- Loewen, P.C., B. Hu, J. Strutinsky & R. Sparling, (1998) Regulation in the *rpoS* regulon of *Escherichia coli*. *Canadian journal of microbiology* 44: 707-717.
- Loh, E., O. Dussurget, J. Gripenland, K. Vaitkevicius, T. Tiensuu, P. Mandin, F. Repoila, C. Buchrieser, P. Cossart & J. Johansson, (2009) A trans-acting riboswitch controls expression of the virulence regulator PrfA in *Listeria monocytogenes*. *Cell* 139: 770-779.
- Lopes, S., A. Jurisicova, J.G. Sun & R.F. Casper, (1998) Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Human reproduction* 13: 896-900.
- Lorenz, C., T. Gesell, B. Zimmermann, U. Schoeberl, I. Bilusic, L. Rajkowitsch, C. Waldsich, A. von Haeseler & R. Schroeder, (2010) Genomic SELEX for Hfq-binding RNAs identifies genomic aptamers predominantly in antisense transcripts. *Nucleic acids research* 38: 3794-3808.
- Lorenz, R., S.H. Bernhart, C. Honer Zu Siederdisen, H. Tafer, C. Flamm, P.F. Stadler & I.L. Hofacker, (2011) ViennaRNA Package 2.0. *Algorithms for molecular biology : AMB* 6: 26.
- Lovett, P.S. & E.J. Rogers, (1996) Ribosome regulation by the nascent peptide. *Microbiological reviews* 60: 366-385.
- Lushchak, V.I., (2001) Oxidative stress and mechanisms of protection against it in bacteria. *Biochemistry. Biokhimiia* 66: 476-489.
- Mackie, G.A., (2013) RNase E: at the interface of bacterial RNA processing and decay. *Nature reviews. Microbiology* 11: 45-57.
- Madigan, M.T., (1995) Microbiology of Nitrogen Fixation by Anoxygenic Photosynthetic Bacteria. In: *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria*. R.E. Blankenship, M.T. Madigan & C.E. Bauer (eds). Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 915-928.
- Majdalani, N., C. Cunning, D. Sledjeski, T. Elliott & S. Gottesman, (1998) DsrA RNA regulates translation of RpoS message by an anti-antisense mechanism, independent of its action as an antisilencer of transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 12462-12467.
- Mandin, P. & M. Guillier, (2013) Expanding control in bacteria: interplay between small RNAs and transcriptional regulators to control gene expression. *Current opinion in microbiology* 16: 125-132.
- Mank, N.N., B.A. Berghoff, Y.N. Hermanns & G. Klug, (2012) Regulation of bacterial photosynthesis genes by the small noncoding RNA PcrZ. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109: 16306-16311.
- Mank, N.N., B.A. Berghoff & G. Klug, (2013) A mixed incoherent feed-forward loop contributes to the regulation of bacterial photosynthesis genes. *RNA biology* 10: 347-352.
- Masse, E., F.E. Escorcía & S. Gottesman, (2003) Coupled degradation of a small regulatory RNA and its mRNA targets in *Escherichia coli*. *Genes & development* 17: 2374-2383.
- Masse, E. & S. Gottesman, (2002) A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 4620-4625.

- Massey, V., S. Strickland, S.G. Mayhew, L.G. Howell, P.C. Engel, R.G. Matthews, M. Schuman & P.A. Sullivan, (1969) The production of superoxide anion radicals in the reaction of reduced flavins and flavoproteins with molecular oxygen. *Biochemical and biophysical research communications* 36: 891-897.
- McDowall, K.J. & S.N. Cohen, (1996) The N-terminal domain of the rne gene product has RNase E activity and is non-overlapping with the arginine-rich RNA-binding site. *Journal of molecular biology* 255: 349-355.
- McDowall, K.J., V.R. Kaberdin, S.W. Wu, S.N. Cohen & S. Lin-Chao, (1995) Site-specific RNase E cleavage of oligonucleotides and inhibition by stem-loops. *Nature* 374: 287-290.
- McDowall, K.J., S. Lin-Chao & S.N. Cohen, (1994) A+U content rather than a particular nucleotide order determines the specificity of RNase E cleavage. *The Journal of biological chemistry* 269: 10790-10796.
- Miller, J.H., (1972) *Experiments in molecular genetics*, p. xvi, 466 p. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Mingorance, J., J. Tamames & M. Vicente, (2004) Genomic channeling in bacterial cell division. *Journal of molecular recognition : JMR* 17: 481-487.
- Misra, T.K. & D. Apirion, (1979) RNase E, an RNA processing enzyme from *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry* 254: 11154-11159.
- Miyakoshi, M., Y. Chao & J. Vogel, (2015a) Cross talk between ABC transporter mRNAs via a target mRNA-derived sponge of the GcvB small RNA. *The EMBO journal* 34: 1478-1492.
- Miyakoshi, M., Y. Chao & J. Vogel, (2015b) Regulatory small RNAs from the 3' regions of bacterial mRNAs. *Current opinion in microbiology* 24: 132-139.
- Miyakoshi, M., Y.J. Chao & J. Vogel, (2015c) Cross talk between ABC transporter mRNAs via a target mRNA-derived sponge of the GcvB small RNA. *The EMBO journal* 34: 1478-1492.
- Mizuno, T., M.Y. Chou & M. Inouye, (1984) A unique mechanism regulating gene expression: translational inhibition by a complementary RNA transcript (micRNA). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81: 1966-1970.
- Mohanty, B.K. & S.R. Kushner, (2002) Polyadenylation of *Escherichia coli* transcripts plays an integral role in regulating intracellular levels of polynucleotide phosphorylase and RNase E. *Molecular microbiology* 45: 1315-1324.
- Moll, I., T. Afonyushkin, O. Vytvytska, V.R. Kaberdin & U. Blasi, (2003) Coincident Hfq binding and RNase E cleavage sites on mRNA and small regulatory RNAs. *Rna* 9: 1308-1314.
- Moody, C.S. & H.M. Hassan, (1984) Anaerobic biosynthesis of the manganese-containing superoxide dismutase in *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry* 259: 12821-12825.
- Morita, T., Y. Mochizuki & H. Aiba, (2006) Translational repression is sufficient for gene silencing by bacterial small noncoding RNAs in the absence of mRNA destruction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 4858-4863.
- Mura, C., P.S. Randolph, J. Patterson & A.E. Cozen, (2013) Archaeal and eukaryotic homologs of Hfq: A structural and evolutionary perspective on Sm function. *RNA biology* 10: 636-651.
- Nam, T.W., E.C. Ziegelhoffer, R.A. Lemke & T.J. Donohue, (2013) Proteins needed to activate a transcriptional response to the reactive oxygen species singlet oxygen. *mBio* 4: e00541-00512.
- Newman, J.D., J.R. Anthony & T.J. Donohue, (2001) The importance of zinc-binding to the function of *Rhodobacter sphaeroides* ChrR as an anti-sigma factor. *Journal of molecular biology* 313: 485-499.
- Newman, J.D., M.J. Falkowski, B.A. Schilke, L.C. Anthony & T.J. Donohue, (1999) The *Rhodobacter sphaeroides* ECF sigma factor, sigma(E), and the target promoters *cycA* P3 and *rpoE* P1. *Journal of molecular biology* 294: 307-320.
- Nuss, A.M., F. Adnan, L. Weber, B.A. Berghoff, J. Glaeser & G. Klug, (2013) DegS and RseP homologous proteases are involved in singlet oxygen dependent activation of RpoE in *Rhodobacter sphaeroides*. *PLoS one* 8: e79520.

- Nuss, A.M., J. Glaeser, B.A. Berghoff & G. Klug, (2010) Overlapping alternative sigma factor regulons in the response to singlet oxygen in *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of bacteriology* 192: 2613-2623.
- Nuss, A.M., J. Glaeser & G. Klug, (2009) RpoH(II) activates oxidative-stress defense systems and is controlled by RpoE in the singlet oxygen-dependent response in *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of bacteriology* 191: 220-230.
- Nuss, A.M., A.K. Heroven, B. Waldmann, J. Reinkensmeier, M. Jarek, M. Beckstette & P. Dersch, (2015) Transcriptomic profiling of *Yersinia pseudotuberculosis* reveals reprogramming of the Crp regulon by temperature and uncovers Crp as a master regulator of small RNAs. *PLoS genetics* 11: e1005087.
- Opdyke, J.A., J.G. Kang & G. Storz, (2004) GadY, a small-RNA regulator of acid response genes in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 186: 6698-6705.
- Otaka, H., H. Ishikawa, T. Morita & H. Aiba, (2011) PolyU tail of Roh-independent terminator of bacterial small RNAs is essential for Hfq action. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: 13059-13064.
- Overloper, A., A. Kraus, R. Gurski, P.R. Wright, J. Georg, W.R. Hess & F. Narberhaus, (2014) Two separate modules of the conserved regulatory RNA AbcR1 address multiple target mRNAs in and outside of the translation initiation region. *RNA biology* 11: 624-640.
- Paget, M.S., (2015) Bacterial Sigma Factors and Anti-Sigma Factors: Structure, Function and Distribution. *Biomolecules* 5: 1245-1265.
- Palmer, A.C., A. Ahlgren-Berg, J.B. Egan, I.B. Dodd & K.E. Shearwin, (2009) Potent transcriptional interference by pausing of RNA polymerases over a downstream promoter. *Molecular cell* 34: 545-555.
- Pandey, S.P., B.K. Minesinger, J. Kumar & G.C. Walker, (2011) A highly conserved protein of unknown function in *Sinorhizobium meliloti* affects sRNA regulation similar to Hfq. *Nucleic acids research* 39: 4691-4708.
- Pandey, S.P., J.A. Winkler, H. Li, D.M. Camacho, J.J. Collins & G.C. Walker, (2014) Central role for RNase YbeY in Hfq-dependent and Hfq-independent small-RNA regulation in bacteria. *BMC genomics* 15: 121.
- Panja, S., D.J. Schu & S.A. Woodson, (2013) Conserved arginines on the rim of Hfq catalyze base pair formation and exchange. *Nucleic acids research* 41: 7536-7546.
- Papenfort, K., K.U. Forstner, J.P. Cong, C.M. Sharma & B.L. Bassler, (2015) Differential RNA-seq of *Vibrio cholerae* identifies the VqmR small RNA as a regulator of biofilm formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112: E766-775.
- Papenfort, K., N. Said, T. Welsink, S. Lucchini, J.C. Hinton & J. Vogel, (2009) Specific and pleiotropic patterns of mRNA regulation by ArcZ, a conserved, Hfq-dependent small RNA. *Molecular microbiology* 74: 139-158.
- Papenfort, K. & J. Vogel, (2009) Multiple target regulation by small noncoding RNAs rewires gene expression at the post-transcriptional level. *Research in microbiology* 160: 278-287.
- Peng, T., B.A. Berghoff, J.I. Oh, L. Weber, J. Schirmer, J. Schwarz, J. Glaeser & G. Klug, (2016) Regulation of a polyamine transporter by the conserved 3' UTR-derived sRNA SorX confers resistance to singlet oxygen and organic hydroperoxides in *Rhodobacter sphaeroides*. *RNA biology*: 1-12.
- Perez-Rueda, E. & J. Collado-Vides, (2000) The repertoire of DNA-binding transcriptional regulators in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic acids research* 28: 1838-1847.
- Peuser, V., S. Metz & G. Klug, (2011) Response of the photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* to iron limitation and the role of a Fur orthologue in this response. *Environmental microbiology reports* 3: 397-404.
- Pfaffl, M.W., (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research* 29: e45.

- Pierru, B., S. Grosse, D. Pignol & M. Sabaty, (2006) Genetic and biochemical evidence for the involvement of a molybdenum-dependent enzyme in one of the selenite reduction pathways of *Rhodobacter sphaeroides* f. sp. *denitrificans* IL106. *Applied and environmental microbiology* 72: 3147-3153.
- Platt, T., (1986) Transcription termination and the regulation of gene expression. *Annual review of biochemistry* 55: 339-372.
- Prevost, K., G. Desnoyers, J.F. Jacques, F. Lavoie & E. Masse, (2011) Small RNA-induced mRNA degradation achieved through both translation block and activated cleavage. *Genes & development* 25: 385-396.
- Pribnow, D., (1975) Bacteriophage T7 early promoters: nucleotide sequences of two RNA polymerase binding sites. *Journal of molecular biology* 99: 419-443.
- Qin, Q.L., Y. Li, Y.J. Zhang, Z.M. Zhou, W.X. Zhang, X.L. Chen, X.Y. Zhang, B.C. Zhou, L. Wang & Y.Z. Zhang, (2011) Comparative genomics reveals a deep-sea sediment-adapted life style of *Pseudoalteromonas* sp. SM9913. *The ISME journal* 5: 274-284.
- Raghavan, R., E.A. Groisman & H. Ochman, (2011) Genome-wide detection of novel regulatory RNAs in *E. coli*. *Genome research* 21: 1487-1497.
- Rauhut, R. & G. Klug, (1999) mRNA degradation in bacteria. *FEMS microbiology reviews* 23: 353-370.
- Regnier, P. & E. Hajnsdorf, (2009) Poly(A)-assisted RNA decay and modulators of RNA stability. *Progress in molecular biology and translational science* 85: 137-185.
- Reichenbach, B., A. Maes, F. Kalamorz, E. Hajnsdorf & B. Gorke, (2008) The small RNA GlmY acts upstream of the sRNA GlmZ in the activation of *glmS* expression and is subject to regulation by polyadenylation in *Escherichia coli*. *Nucleic acids research* 36: 2570-2580.
- Remes, B., B.A. Berghoff, K.U. Forstner & G. Klug, (2014) Role of oxygen and the OxyR protein in the response to iron limitation in *Rhodobacter sphaeroides*. *BMC genomics* 15: 794.
- Rhodius, V.A. & S.J. Busby, (1998) Positive activation of gene expression. *Current opinion in microbiology* 1: 152-159.
- Richardson, L.L. & R.W. Castenholz, (1987) Diel Vertical Movements of the Cyanobacterium *Oscillatoria terebriformis* in a Sulfide-Rich Hot Spring Microbial Mat. *Applied and environmental microbiology* 53: 2142-2150.
- Rische-Grahl, T., L. Weber, B. Remes, K.U. Forstner & G. Klug, (2014) RNase J is required for processing of a small number of RNAs in *Rhodobacter sphaeroides*. *RNA biology* 11: 855-864.
- Rische, T. & G. Klug, (2012) The ordered processing of intervening sequences in 23S rRNA of *Rhodobacter sphaeroides* requires RNase J. *RNA biology* 9: 343-350.
- Ritchie, M.E., J. Silver, A. Oshlack, M. Holmes, D. Diyagama, A. Holloway & G.K. Smyth, (2007) A comparison of background correction methods for two-colour microarrays. *Bioinformatics* 23: 2700-2707.
- Ritz, D. & J. Beckwith, (2001) Roles of thiol-redox pathways in bacteria. *Annual review of microbiology* 55: 21-48.
- Rivas, E., R.J. Klein, T.A. Jones & S.R. Eddy, (2001) Computational identification of noncoding RNAs in *E. coli* by comparative genomics. *Current biology : CB* 11: 1369-1373.
- Romeo, T., C.A. Vakulskas & P. Babitzke, (2013) Post-transcriptional regulation on a global scale: form and function of Csr/Rsm systems. *Environmental microbiology* 15: 313-324.
- Rui, B., T. Shen, H. Zhou, J. Liu, J. Chen, X. Pan, H. Liu, J. Wu, H. Zheng & Y. Shi, (2010) A systematic investigation of *Escherichia coli* central carbon metabolism in response to superoxide stress. *BMC systems biology* 4: 122.
- Rungrassamee, W., X. Liu & P.J. Pomposiello, (2008) Activation of glucose transport under oxidative stress in *Escherichia coli*. *Archives of microbiology* 190: 41-49.
- Sambrook, J.a.R., D. W. , (2001) Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory*.
- Sanger, F., S. Nicklen & A.R. Coulson, (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74: 5463-5467.

- Santangelo, T.J. & I. Artsimovitch, (2011) Termination and antitermination: RNA polymerase runs a stop sign. *Nature reviews. Microbiology* 9: 319-329.
- Sauer, E., (2013) Structure and RNA-binding properties of the bacterial LSm protein Hfq. *RNA biology* 10: 610-618.
- Sauer, E., S. Schmidt & O. Weichenrieder, (2012) Small RNA binding to the lateral surface of Hfq hexamers and structural rearrangements upon mRNA target recognition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109: 9396-9401.
- Sauer, E. & O. Weichenrieder, (2011) Structural basis for RNA 3'-end recognition by Hfq. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: 13065-13070.
- Schellhorn, H.E., (1995) Regulation of hydroperoxidase (catalase) expression in *Escherichia coli*. *FEMS microbiology letters* 131: 113-119.
- Schmidt, R., (2006) Photosensitized generation of singlet oxygen. *Photochemistry and photobiology* 82: 1161-1177.
- Schumacher, M.A., R.F. Pearson, T. Moller, P. Valentin-Hansen & R.G. Brennan, (2002) Structures of the pleiotropic translational regulator Hfq and an Hfq-RNA complex: a bacterial Sm-like protein. *The EMBO journal* 21: 3546-3556.
- Seko, Y., Y. Saitoh & N. Imura, (1987) Active Oxygen Generation by the Reaction of Selenite with Reduced Glutathione *In vitro*. *J Pharm Sci* 76: S135-S135.
- Sevcikova, B., B. Rezuchova, D. Homerova & J. Kormanec, (2010) The anti-anti-sigma factor BldG is involved in activation of the stress response sigma factor sigma(H) in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of bacteriology* 192: 5674-5681.
- Sharma, C.M., F. Darfeuille, T.H. Plantinga & J. Vogel, (2007) A small RNA regulates multiple ABC transporter mRNAs by targeting C/A-rich elements inside and upstream of ribosome-binding sites. *Genes & development* 21: 2804-2817.
- Sharma, C.M., S. Hoffmann, F. Darfeuille, J. Reignier, S. Findeiss, A. Sittka, S. Chabas, K. Reiche, J. Hackermuller, R. Reinhardt, P.F. Stadler & J. Vogel, (2010) The primary transcriptome of the major human pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 464: 250-255.
- Sharma, C.M. & J. Vogel, (2014) Differential RNA-seq: the approach behind and the biological insight gained. *Current opinion in microbiology* 19: 97-105.
- Shaw, J.G., M.J. Hamblin & D.J. Kelly, (1991) Purification, characterization and nucleotide sequence of the periplasmic C4-dicarboxylate-binding protein (DctP) from *Rhodobacter capsulatus*. *Molecular microbiology* 5: 3055-3062.
- Shearwin, K.E., B.P. Callen & J.B. Egan, (2005) Transcriptional interference--a crash course. *Trends in genetics : TIG* 21: 339-345.
- Sievers, F., A. Wilm, D. Dineen, T.J. Gibson, K. Karplus, W. Li, R. Lopez, H. McWilliam, M. Remmert, J. Soding, J.D. Thompson & D.G. Higgins, (2011) Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular systems biology* 7: 539.
- Sim, S., K.S. Kim & Y. Lee, (2002) 3'-end processing of precursor M1 RNA by the N-terminal half of RNase E. *FEBS letters* 529: 225-231.
- Simon, R., M. O'Connell, M. Labes & A. Puhler, (1986) Plasmid vectors for the genetic analysis and manipulation of rhizobia and other gram-negative bacteria. *Methods in enzymology* 118: 640-659.
- Singh, R., J. Lemire, R.J. Mailloux & V.D. Appanna, (2008) A Novel Strategy Involved in Anti-Oxidative Defense: The Conversion of NADH into NADPH by a Metabolic Network. *PLoS one* 3: e2682.
- Singh, R., R.J. Mailloux, S. Puiseux-Dao & V.D. Appanna, (2007) Oxidative stress evokes a metabolic adaptation that favors increased NADPH synthesis and decreased NADH production in *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of bacteriology* 189: 6665-6675.
- Sittka, A., S. Lucchini, K. Papenfort, C.M. Sharma, K. Rolle, T.T. Binnewies, J.C. Hinton & J. Vogel, (2008) Deep sequencing analysis of small noncoding RNA and mRNA targets of the global post-transcriptional regulator, Hfq. *PLoS genetics* 4: e1000163.
- Sittka, A., V. Pfeiffer, K. Tedin & J. Vogel, (2007) The RNA chaperone Hfq is essential for the virulence of *Salmonella typhimurium*. *Molecular microbiology* 63: 193-217.

- Smaldone, G.T., H. Antelmann, A. Gaballa & J.D. Helmann, (2012) The FsrA sRNA and FbpB protein mediate the iron-dependent induction of the *Bacillus subtilis* *lutABC* iron-sulfur-containing oxidases. *Journal of bacteriology* 194: 2586-2593.
- Smirnov, A., K.U. Forstner, E. Holmqvist, A. Otto, R. Gunster, D. Becher, R. Reinhardt & J. Vogel, (2016) Grad-seq guides the discovery of ProQ as a major small RNA-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113: 11591-11596.
- Smyth, G.K. & T. Speed, (2003) Normalization of cDNA microarray data. *Methods* 31: 265-273.
- Sneppen, K., I.B. Dodd, K.E. Shearwin, A.C. Palmer, R.A. Schubert, B.P. Callen & J.B. Egan, (2005) A mathematical model for transcriptional interference by RNA polymerase traffic in *Escherichia coli*. *Journal of molecular biology* 346: 399-409.
- Späth, M., (2014) Analysis of RSs0827. *Bachelorarbeit Justus-Liebig-Universität Gießen*.
- Stadtman, T.C., (1991) Biosynthesis and function of selenocysteine-containing enzymes. *The Journal of biological chemistry* 266: 16257-16260.
- Staron, A., H.J. Sofia, S. Dietrich, L.E. Ulrich, H. Liesegang & T. Mascher, (2009) The third pillar of bacterial signal transduction: classification of the extracytoplasmic function (ECF) sigma factor protein family. *Molecular microbiology* 74: 557-581.
- Stazic, D., D. Lindell & C. Steglich, (2011) Antisense RNA protects mRNA from RNase E degradation by RNA-RNA duplex formation during phage infection. *Nucleic acids research* 39: 4890-4899.
- Stork, M., M. Di Lorenzo, T.J. Welch & J.H. Crosa, (2007) Transcription termination within the iron transport-biosynthesis operon of *Vibrio anguillarum* requires an antisense RNA. *Journal of bacteriology* 189: 3479-3488.
- Storz, G., S. Altuvia & K.M. Wassarman, (2005) An abundance of RNA regulators. *Annual review of biochemistry* 74: 199-217.
- Storz, G., J.A. Opdyke & A. Zhang, (2004) Controlling mRNA stability and translation with small, noncoding RNAs. *Current opinion in microbiology* 7: 140-144.
- Storz, G., L.A. Tartaglia & B.N. Ames, (1990) The OxyR regulon. *Antonie van Leeuwenhoek* 58: 157-161.
- Stougaard, P., S. Molin & K. Nordstrom, (1981) RNAs involved in copy-number control and incompatibility of plasmid R1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78: 6008-6012.
- Sun, X., I. Zhulin & R.M. Wartell, (2002) Predicted structure and phyletic distribution of the RNA-binding protein Hfq. *Nucleic acids research* 30: 3662-3671.
- Suwanto, A. & S. Kaplan, (1989a) Physical and genetic mapping of the *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 genome: genome size, fragment identification, and gene localization. *Journal of bacteriology* 171: 5840-5849.
- Suwanto, A. & S. Kaplan, (1989b) Physical and genetic mapping of the *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 genome: presence of two unique circular chromosomes. *Journal of bacteriology* 171: 5850-5859.
- Tabita, F.R., (1995) The Biochemistry and Metabolic Regulation of Carbon Metabolism and CO₂ Fixation in Purple Bacteria. In: Anoxygenic Photosynthetic Bacteria. R.E. Blankenship, M.T. Madigan & C.E. Bauer (eds). Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 885-914.
- Tamames, J., (2001) Evolution of gene order conservation in prokaryotes. *Genome biology* 2: RESEARCH0020.
- Tamames, J., M. Gonzalez-Moreno, J. Mingorance, A. Valencia & M. Vicente, (2001) Bringing gene order into bacterial shape. *Trends in genetics : TIG* 17: 124-126.
- Thomas, G.H., T. Southworth, M.R. Leon-Kempis, A. Leech & D.J. Kelly, (2006) Novel ligands for the extracellular solute receptors of two bacterial TRAP transporters. *Microbiology* 152: 187-198.
- Thompson, K.M., V.A. Rhodius & S. Gottesman, (2007) SigmaE regulates and is regulated by a small RNA in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 189: 4243-4256.

- Tomizawa, J., T. Itoh, G. Selzer & T. Som, (1981) Inhibition of ColE1 RNA primer formation by a plasmid-specified small RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78: 1421-1425.
- Touati, D., (2000) Iron and oxidative stress in bacteria. *Archives of biochemistry and biophysics* 373: 1-6.
- Tree, J.J., S. Granneman, S.P. McAteer, D. Tollervey & D.L. Gally, (2014) Identification of bacteriophage-encoded anti-sRNAs in pathogenic *Escherichia coli*. *Molecular cell* 55: 199-213.
- Triggs-Raine, B.L., B.W. Doble, M.R. Mulvey, P.A. Sorby & P.C. Loewen, (1988) Nucleotide sequence of *katG*, encoding catalase HPI of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 170: 4415-4419.
- Uchoa, A.F., P.P. Knox, R. Turchielle, N. Seifullina & M.S. Baptista, (2008) Singlet oxygen generation in the reaction centers of *Rhodobacter sphaeroides*. *European biophysics journal : EBJ* 37: 843-850.
- Udekwi, K.I., F. Darfeuille, J. Vogel, J. Reimegard, E. Holmqvist & E.G. Wagner, (2005) Hfq-dependent regulation of OmpA synthesis is mediated by an antisense RNA. *Genes & development* 19: 2355-2366.
- Urban, J.H. & J. Vogel, (2008) Two seemingly homologous noncoding RNAs act hierarchically to activate *glmS* mRNA translation. *PLoS biology* 6: e64.
- Valdivia-Gonzalez, M., J.M. Perez-Donoso & C.C. Vasquez, (2012) Effect of tellurite-mediated oxidative stress on the *Escherichia coli* glycolytic pathway. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine* 25: 451-458.
- van Niel, C.B., (1944) The Culture, General Physiology, Morphology, and Classification of the Non-Sulfur Purple and Brown Bacteria. *Bacteriological reviews* 8: 1-118.
- Vanderpool, C.K. & S. Gottesman, (2004) Involvement of a novel transcriptional activator and small RNA in post-transcriptional regulation of the glucose phosphoenolpyruvate phosphotransferase system. *Molecular microbiology* 54: 1076-1089.
- Vanzo, N.F., Y.S. Li, B. Py, E. Blum, C.F. Higgins, L.C. Raynal, H.M. Krisch & A.J. Carpousis, (1998) Ribonuclease E organizes the protein interactions in the *Escherichia coli* RNA degradosome. *Genes & development* 12: 2770-2781.
- Varghese, S., Y. Tang & J.A. Imlay, (2003) Contrasting sensitivities of *Escherichia coli* aconitases A and B to oxidation and iron depletion. *Journal of bacteriology* 185: 221-230.
- Vecerek, B., I. Moll & U. Blasi, (2005) Translational autocontrol of the *Escherichia coli* *hfq* RNA chaperone gene. *Rna* 11: 976-984.
- Vecerek, B., I. Moll & U. Blasi, (2007) Control of Fur synthesis by the non-coding RNA RyhB and iron-responsive decoding. *The EMBO journal* 26: 965-975.
- Vicente, M., M.J. Gomez & J.A. Ayala, (1998) Regulation of transcription of cell division genes in the *Escherichia coli* *dcw* cluster. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 54: 317-324.
- Vieira, J. & J. Messing, (1982) The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* 19: 259-268.
- Vogel, J., L. Argaman, E.G. Wagner & S. Altuvia, (2004) The small RNA IstR inhibits synthesis of an SOS-induced toxic peptide. *Current biology : CB* 14: 2271-2276.
- Vogel, J., V. Bartels, T.H. Tang, G. Churakov, J.G. Slagter-Jager, A. Huttenhofer & E.G. Wagner, (2003) RNomics in *Escherichia coli* detects new sRNA species and indicates parallel transcriptional output in bacteria. *Nucleic acids research* 31: 6435-6443.
- Vogel, J. & B.F. Luisi, (2011) Hfq and its constellation of RNA. *Nature reviews. Microbiology* 9: 578-589.
- Vogel, J. & K. Papenfort, (2006) Small non-coding RNAs and the bacterial outer membrane. *Current opinion in microbiology* 9: 605-611.
- Vogt, W., (1995) Oxidation of methionyl residues in proteins: tools, targets, and reversal. *Free radical biology & medicine* 18: 93-105.
- Volk, M., (2014) Funktionelle Charakterisierung der hoch abundanten sRNA RSs0682 in *Rhodobacter sphaeroides*. *Bachelorarbeit Justus-Liebig-Universität Gießen*.

- von Ossowski, I., M.R. Mulvey, P.A. Leco, A. Borys & P.C. Loewen, (1991) Nucleotide sequence of *Escherichia coli katE*, which encodes catalase HPII. *Journal of bacteriology* 173: 514-520.
- Wagner, E.G. & C. Unoson, (2012) The toxin-antitoxin system *tisB-istR1*: Expression, regulation, and biological role in persister phenotypes. *RNA biology* 9: 1513-1519.
- Wagner, L.A., R.F. Gesteland, T.J. Dayhuff & R.B. Weiss, (1994) An efficient Shine-Dalgarno sequence but not translation is necessary for *lacZ* mRNA stability in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 176: 1683-1688.
- Wassarman, K.M., (2007) 6S RNA: a regulator of transcription. *Molecular microbiology* 65: 1425-1431.
- Wassarman, K.M., F. Repoila, C. Rosenow, G. Storz & S. Gottesman, (2001) Identification of novel small RNAs using comparative genomics and microarrays. *Genes & development* 15: 1637-1651.
- Wassarman, K.M. & G. Storz, (2000) 6S RNA regulates E. coli RNA polymerase activity. *Cell* 101: 613-623.
- Weber, L., C. Thoelken, M. Volk, B. Remes, M. Lechner & G. Klug, (2016) The Conserved *Dcw* Gene Cluster of *R. sphaeroides* Is Preceded by an Uncommonly Extended 5' Leader Featuring the sRNA UpsM. *PLoS one* 11: e0165694.
- Wei, Q., P.N. Minh, A. Dotsch, F. Hildebrand, W. Panmanee, A. Elfarash, S. Schulz, S. Plaisance, D. Charlier, D. Hassett, S. Haussler & P. Cornelis, (2012) Global regulation of gene expression by OxyR in an important human opportunistic pathogen. *Nucleic acids research* 40: 4320-4333.
- Wilderman, P.J., N.A. Sowa, D.J. FitzGerald, P.C. FitzGerald, S. Gottesman, U.A. Ochsner & M.L. Vasil, (2004) Identification of tandem duplicate regulatory small RNAs in *Pseudomonas aeruginosa* involved in iron homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 9792-9797.
- Woese, C.R., E. Stackebrandt, W.G. Weisburg, B.J. Paster, M.T. Madigan, V.J. Fowler, C.M. Hahn, P. Blanz, R. Gupta, K.H. Nealson & G.E. Fox, (1984) The phylogeny of purple bacteria: the alpha subdivision. *Systematic and applied microbiology* 5: 315-326.
- Wosten, M.M., (1998) Eubacterial sigma-factors. *FEMS microbiology reviews* 22: 127-150.
- Zhang, H., H.J. Forman & J. Choi, (2005) Gamma-glutamyl transpeptidase in glutathione biosynthesis. *Methods in enzymology* 401: 468-483.
- Zheng, M., F. Aslund & G. Storz, (1998) Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation. *Science* 279: 1718-1721.
- Zheng, M. & G. Storz, (2000) Redox sensing by prokaryotic transcription factors. *Biochemical pharmacology* 59: 1-6.
- Ziegelhoffer, E.C. & T.J. Donohue, (2009) Bacterial responses to photo-oxidative stress. *Nature reviews. Microbiology* 7: 856-863.
- Zoemisch, C., (2013) Charakterisierung verschiedener *Rhodobacter sphaeroides* Mutanten im Hinblick auf photooxidativen Stress. *Diplomarbeit Justus-Liebig-Universität Gießen*.

8 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent	mRNA	<i>messenger RNA</i>
&	und	n	nano
°C	Grad Celsius	NADH	red.Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
μ	micro	NADPH	red.Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosp.
<i>ad</i>	auffüllen auf	ncRNA	<i>non-coding RNA</i>
APS	Ammoniumpersulfat	nt	Nukleotide
ATP	Adenosintriphosphat	OD	optische Dichte
bp	Basenpaare	ORF	<i>open reading frame</i>
BSA	Bovines Serum Albumin	p	pico
bzw.	beziehungsweise	PAA	Polyacrylamid
ca.	circa	PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
cDNA	<i>complementary DNA</i>	PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
Ci	Curie	PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
cm	Zentimeter	PNK	Polynukleotidkinase
cpm	<i>counts per minute</i>	PY	<i>peptone-yeast</i>
CTP	Cytosintriphosphat	RÄ	Rhodobacter-Äpfelsäure
Cy3	Carbocyanin 3	rel.	relativ/e
Cy5	Carbocyanin 5	RNA	Ribonukleinsäure
Da	Dalton	RNase	Ribonuklease
dATP	Desoxyriboadenintriphosphat	ROS	<i>reactive oxygen species</i>
dCTP	Desoxyribocytidintriphosphat	<i>rpm</i>	<i>revolution per minute</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure	rRNA	ribosomale RNA
DNase	Desoxyribonuklease	RT	Raumtemperatur
dNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat	RT	reverse Transkriptase
ds	doppelsträngig	SDS	Natriumdodecylsulfat
DTT	Dithiothreitol	sec	Sekunde
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	sRNA	<i>small RNA</i>
<i>et al.</i>	<i>et altera</i> (und andere)	ss	einzelsträngig
EtOH	Ethanol	St I	Standard I Medium
f	femto	TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
g	Gramm	TAP	Tobacco Acid Pyrophosphatase
<i>g</i>	<i>gravity</i>	TBE	Tris-Borat- EDTA-Puffer
GMP	Guanosinmonophosphat	TEMED	Tetramethyldiamin
GTP	Guanosintriphosphat	Tris	Trishydroxymethylaminomethan
h	Stunde	tRNA	<i>transfer RNA</i>
His	Histidin	u	<i>units</i>
IGR	<i>inter genic region</i>	UTP	Uridintriphosphat
IPTG	Isopropylthiogalaktosid	UTR	<i>untranslated region</i>
kb	Kilobasen	UV	ultraviolett
kDa	Kilodalton	UZ	Ultrazentrifugation
l	Liter	V	Volt
m	Meter/Milli	v/v	Volumen/Volumenverhältnis
M	Molar	W	Watt
mA	Milliampere	w/v	Gewichts/Volumenverhältnis
MCS	<i>multiple cloning site</i>	WT	Wildtyp
min	Minute	x	mal
mol	Basiseinheit der Stoffmenge		

9 Anhang

Anhang 1: RNA Seq Darstellung der *upstream* Regionen von *mraZ* in verschiedenen Bakterienspezies. Zur Analyse der Region bis Position -300 ausgehend von *mraZ* (TSS roter Strich) wurden öffentlich zugängliche RNA Seq Datensätze der NCBI SRA database (Leinonen *et al.*, 2011) mit ausreichender Qualität für eine TSS *mapping* verwendet. Hierauf basierend wurde Abbildung 18 erstellt und die in Absatz 3.2.5 beschriebenen Analysen durchgeführt. Genom IDs sind an der y Achse gezeigt. Herkunft der Daten bzw. Acession Nummern sind rechts zu finden. Zum Vergrößern kann die publizierte Abbildung eingesehen werden (Weber *et al.*, 2016).

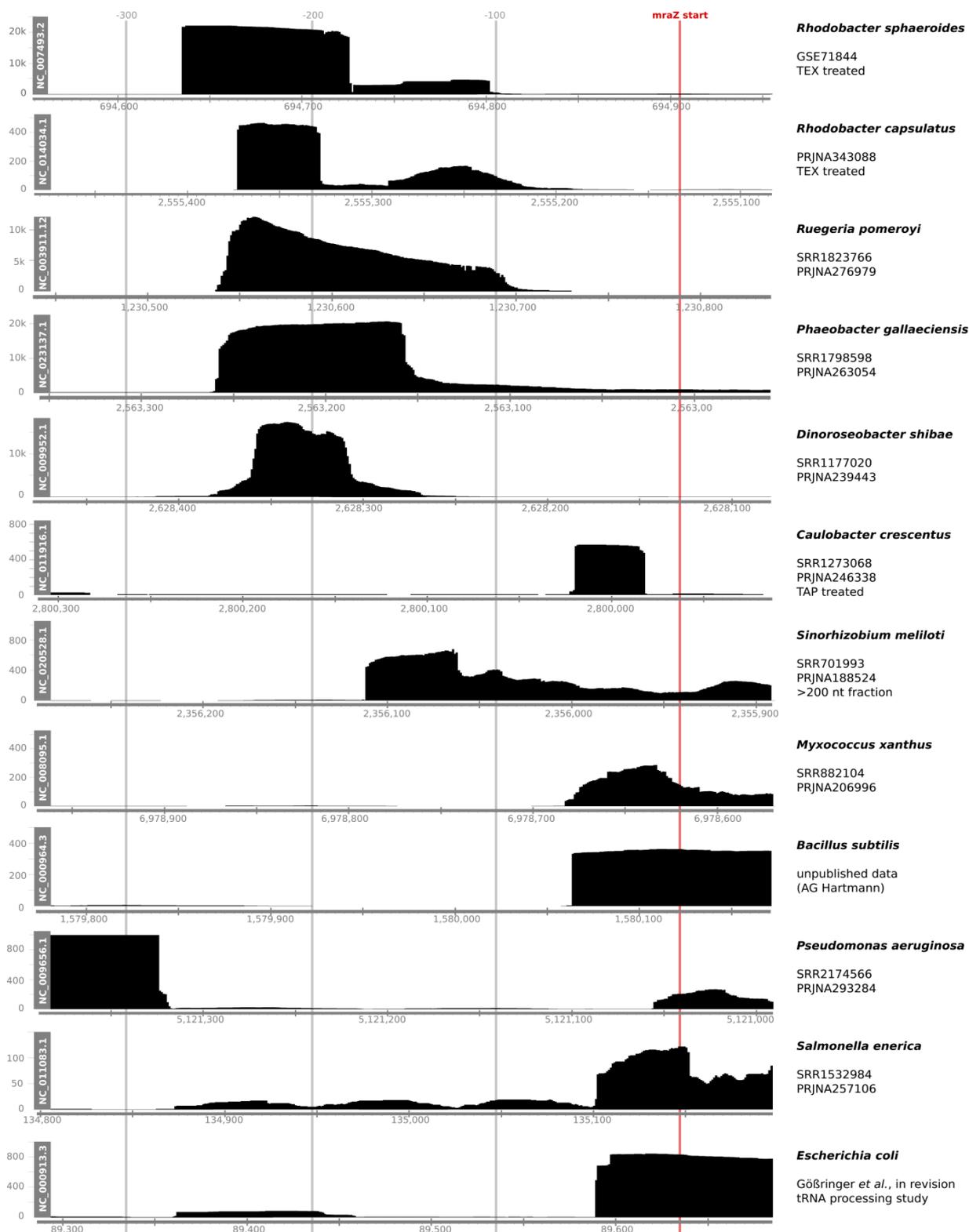
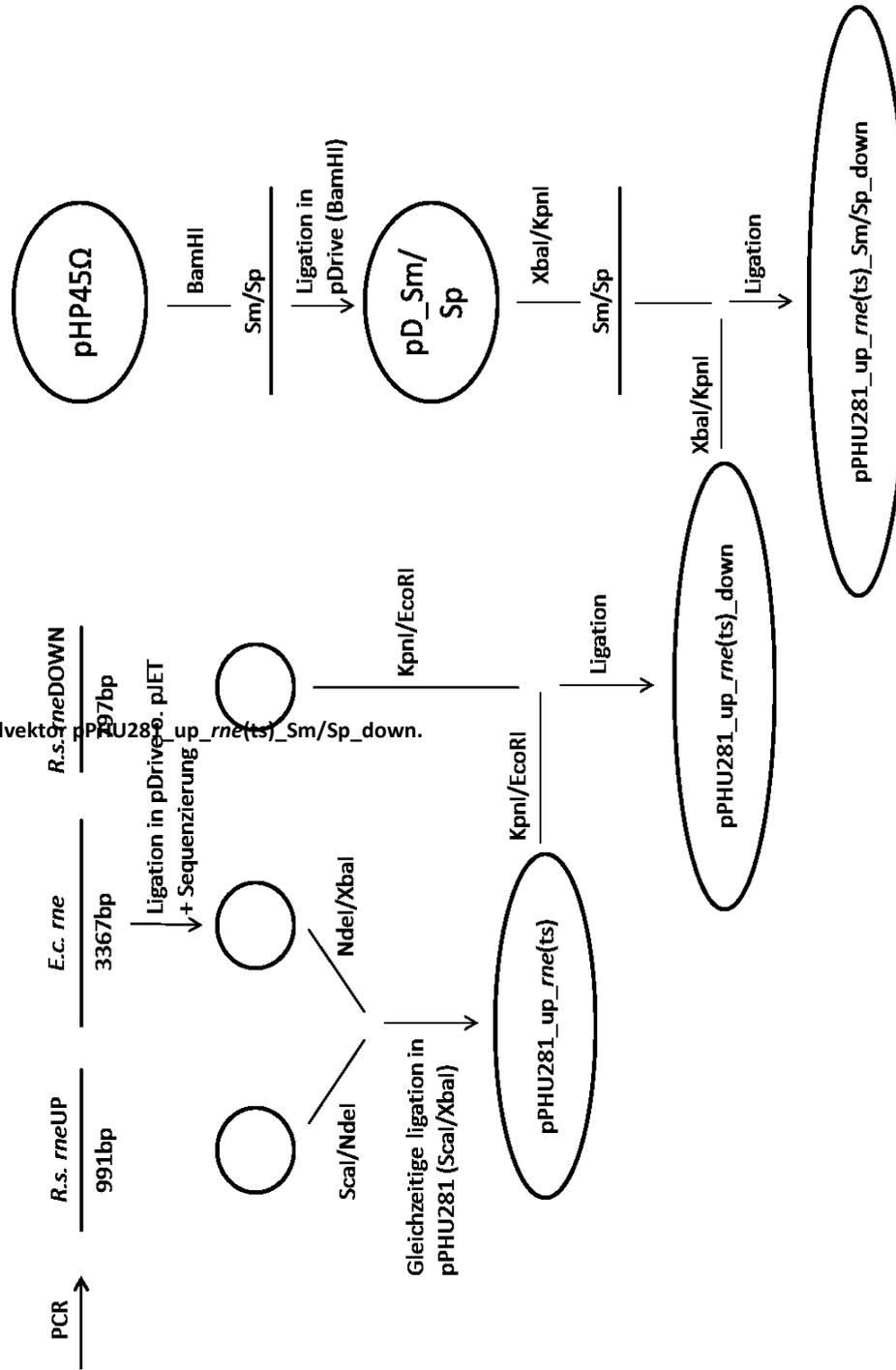
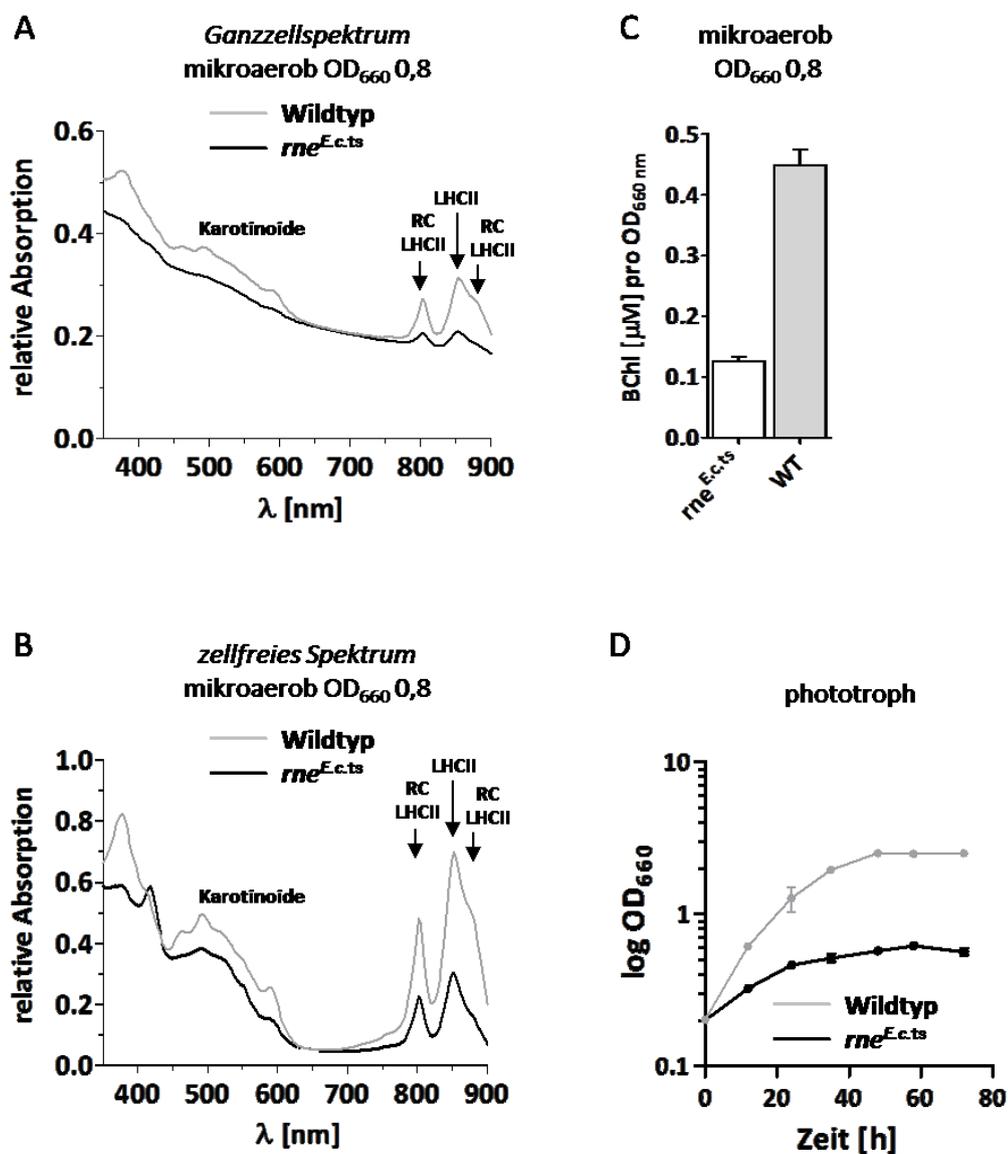


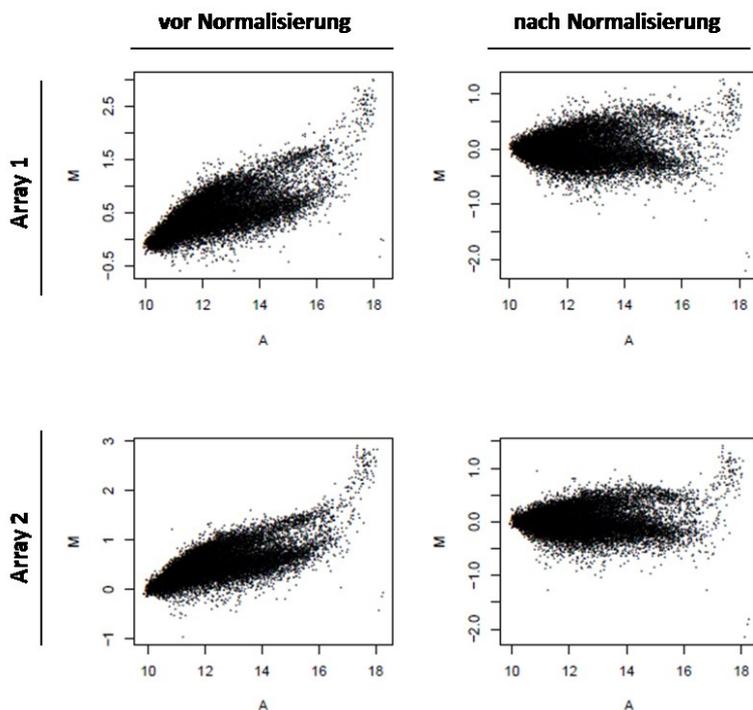
Abbildung der Klonierungsschritte für Suizidvektor pPHU281_up_rne(ts)_Sm/Sp_down.



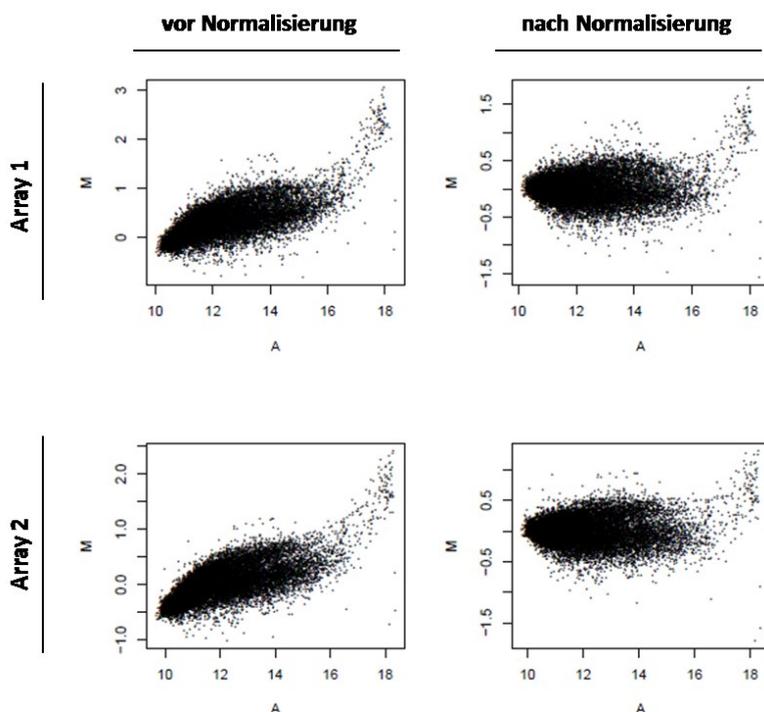
Anhang 3: Verminderte Ausbildung photosynthetischer Komplexe bei *R. sphaeroides* 2.4.1 *rne^{E.c.ts}* Kulturen im Vergleich zu Kulturen des parentalen Wildtyps. Für Ganzzellspektren (A), zellfrei Spektren (B) und Bakteriochlorophyllmessungen (C) wurden mikroaerobe Kulturen im exponentiellen Wachstum (OD_{660} 0,8) verwendet. Die Standardabweichung bei Bakteriochlorophyllmessungen resultiert aus biologischen Triplikaten. (D) Phototrophes Wachstum von *R. sphaeroides* 2.4.1 *rne^{E.c.ts}* Kulturen im Vergleich zu Kulturen des parentalen Wildtyps in biologischen Triplikaten. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen zu jedem Messpunkt.



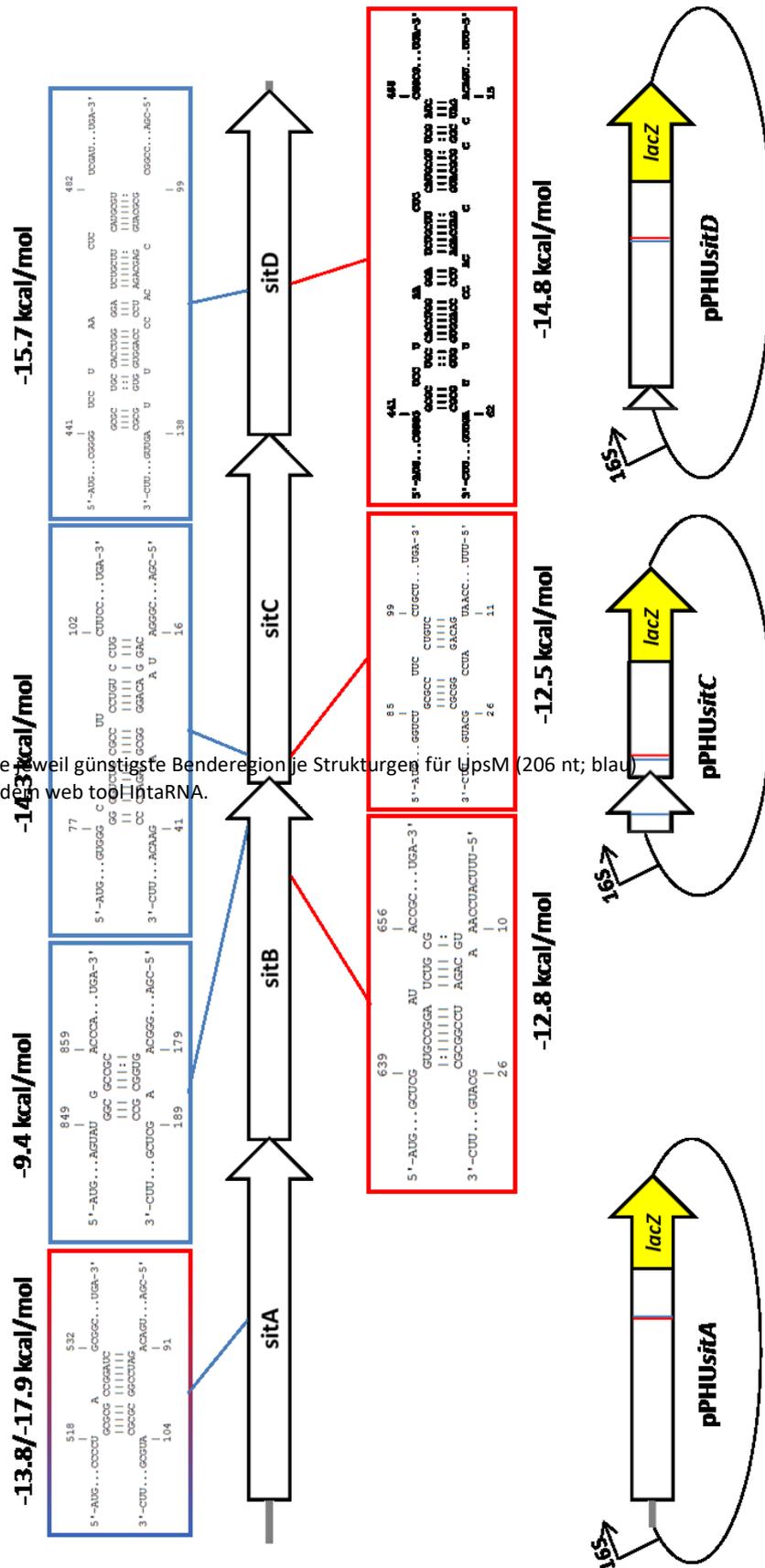
Anhang 4: MA-Plots für das Arrayduplikat *R. sphaeroides* 2.4.1b (pBBR1MCS2) vs. *R. sphaeroides* 2.4.1b (pBBRUpsMORFx2) zu 0 Minuten $^1\text{O}_2$ -Stress vor und nach Normalisierung. Normalisierung erfolgte wie ausführlich beschrieben durch eine Bereinigung gegen den Hintergrund und anschließender Normalisierung nach LOWESS. Aufgetragen sind M-Wert (logarithmierte Verhältnis der Fluoreszenzen von Cy3 und Cy5) gegen A-Wert (Mittelwert aus der logarithmierten Summe der Fluoreszenzen von Cy3 und Cy5) für jede Sonde.



Anhang 5: MA-Plots für das Arrayduplikat *R. sphaeroides* 2.4.1b (pBBR1MCS2) vs. *R. sphaeroides* 2.4.1b (pBBRUpsMORFx2) zu 90 Minuten $^1\text{O}_2$ -Stress vor und nach Normalisierung. Normalisierung erfolgte wie ausführlich beschrieben durch eine Bereinigung gegen den Hintergrund und anschließender Normalisierung nach LOWESS. Aufgetragen sind M-Wert (logarithmierte Verhältnis der Fluoreszenzen von Cy3 und Cy5) gegen A-Wert (Mittelwert aus der logarithmierten Summe der Fluoreszenzen von Cy3 und Cy5) für jede Sonde.



und verwendeter *sit* Reporterplasmide. Die zwei günstigste Benderegion je Struktur für ePSM (206 nt; blau) ergeben. Die Bindevorhersagen basieren auf dem web tool tRNA.



Anhang 7: Aufgeführt sind alle regulierten Gene, die den Selektionskriterien der vergleichenden Transkriptomanalyse zwischen *R. sphaeroides* 2.4.1 und *R. sphaeroides* 2.4.1 Δ hfq nach 10 min $^1\text{O}_2$ -Stress (A-Wert ≥ 11 und logarithmiertes Verhältnis ($\log_2 \text{FC}$) ≥ 0.6 oder ≤ -0.6) entsprechen.

RSP no.	Beschreibung	Gen	Ratio [log ₂ FC]
IGR_0682	ncRNA		-3.24
IGR_0042	ncRNA		-3.14
IGR_2750	ncRNA		-3.05
3'RSP0019	ncRNA		-2.71
IGR_1543	ncRNA		-2.69
RSP_2843	RNA-binding protein Hfq	hfq	-2.17
IGR_1386	ncRNA		-1.92
IGR_1368	ncRNA		-1.85
IGR_0680a	ncRNA		-1.73
IGR_0243	ncRNA		-1.56
IGR_0552	ncRNA		-1.30
IGR_0510	ncRNA		-1.27
RSP_2844	Putative GTP-binding protein		-1.26
IGR_1740	ncRNA		-1.24
IGR_0680b	ncRNA		-1.22
IGR_0351	ncRNA		-1.17
IG-RSP0254/55	ncRNA		-1.15
IGR_0680c	ncRNA		-1.07
RSP_0258	LHI alpha, Light-harvesting B875 protein	pufA	-1.07
RSP_0040	putative flagellar protein FlIS	flIS	-1.01
RSP_1941	phosphoadenosine phosphosulfate reductase	cysH	-0.99
RSP_1939	NADPH-ferredoxin reductase		-0.97
IGR_2363	ncRNA		-0.97
IGR_0939	ncRNA		-0.96
RSP_6108	LHI beta, Light-harvesting B875 subunit	pufB	-0.95
IGR_2378	ncRNA		-0.95
RSP_6109	Transcriptional regulatory protein pufK	pufK	-0.94
IGR_0827	ncRNA		-0.93
RSP_2283	30S ribosomal protein S4	rpsD	-0.91
IGR_2863	ncRNA		-0.90
RSP_0557	hypothetical protein		-0.86
IGR_0504	ncRNA		-0.84
IGR_0940	ncRNA		-0.84
RSP_0329	GAF sensor diguanylate cyclase (GGDEF)		-0.83
IGR_0261	ncRNA		-0.81
RSP_3571	ABC zinc transporter, periplasmic binding protein	znuA	-0.79
IGR_0635	ncRNA		-0.77
RSP_3698	ABC sulfate/thiosulfate transporter, inner membrane subunit	cysT	-0.77
RSP_0132	ABC D-methionine uptake transporter, substrate-binding protein	metQ	-0.75
IGR_2461	ncRNA		-0.73
RSP_1940	hypothetical protein		-0.73
RSP_3699	ABC sulfate/thiosulfate transporter, inner membrane subunit	cysW	-0.72
RSP_0862	isopropylmalate isomerase small subunit(EC:4.2.1.33)	leuD	-0.72
RSP_2311	chaperonin GroEL	groEL	-0.72
RSP_3667	transcriptional regulator, AraC family with Parallel beta-helix repeat		-0.72
IGR_1309	ncRNA		-0.72
IGR_2430	ncRNA		-0.71
RSP_2095	Putative MraZ protein		-0.71
RSP_6022	hypothetical protein		-0.70
IGR_1624	ncRNA		-0.70
RSP_1865	ketol-acid reductoisomerase(EC:1.1.1.86)		-0.69
RSP_0196	ATP-dependent protease ATP-binding subunit	clpX	-0.69
IGR_1204	ncRNA		-0.67
IGR_2955	ncRNA		-0.67

RSP_3178	3-hydroxydecanoyl-ACP dehydratase(EC:4.2.1.60)	fabA	-0.67
RSP_3697	ABC sulfate/thiosulfate transporter, periplasmic binding protein	cysP	-0.67
RSP_0147	Glutamine synthetase class-I(EC:6.3.1.2)	glnA	-0.67
RSP_2299	ATP synthase subunit B(EC:3.6.3.14)	atpD	-0.66
RSP_6089	hypothetical protein		-0.66
RSP_3179	probable Ferric-uptake regulator	fur	-0.65
RSP_1859	pyruvate phosphate dikinase	ppdK	-0.65
RSP_1877	Cytochrome c oxidase, aa3 type, subunit I(EC:1.9.3.1)	coxI	-0.64
RSP_1352	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase		-0.63
RSP_2297	ATP synthase subunit A(EC:3.6.3.14)	atpA	-0.63
RSP_3727	hypothetical protein		-0.63
RSP_0371	ABC basic amino acid transporter, ATPase subunit		-0.62
RSP_3622	hypothetical protein		-0.62
RSP_0863	isopropylmalate isomerase large subunit(EC:4.2.1.33)	leuC	-0.61
RSP_6025	hypothetical protein		-0.61
RSP_2506	Isovaleryl-CoA dehydrogenase(EC:1.3.99.10)	ivdH	-0.61
RSP_6139	hypothetical protein		-0.60
RSP_2541	twin-arginine translocation system protein, TatC	tatC	-0.60
RSP_3308	possible transporter, DME family, DMT superfamily		0.61
RSP_7367	AbrB protein (AidB regulator)		0.62
RSP_2320	TRAP-T family transporter, periplasmic binding protein		0.63
RSP_2663	ABC sugar (glycerol) transporter, periplasmic binding protein		0.64
RSP_1063	Putative Cyclic-diGMP cyclase/phosphodiesterase		0.66
RSP_6221	hypothetical protein		0.67
asRSP3018_No1	ncRNA		0.67
RSP_3966	ABC branched chain amino acid transporter, inner membrane subunit		0.68
RSP_1749	ABC glutamate/glutamine/aspartate/asparagine transporter, inner membrane subunit	bztC	0.68
RSP_0161	Spermidine/putrescine-binding periplasmic protein		0.69
3'RSP3584	ncRNA		0.71
RSP_3484	hypothetical protein		0.71
RSP_1414	hypothetical protein		0.72
RSP_1882	ABC polyamine/opine transporter, ATPase subunit		0.72
3'RSP3594	ncRNA		0.72
RSP_1884	ABC polyamine/opine transporter, inner membrane subunit		0.73
RSsh1	ncRNA		0.77
RSP_3881	possible flagellar basal-body ROD protein FLGF	flgF	0.78
RSP_1045	tRNA (guanine-N1-)-methyltransferase(EC:2.1.1.31)	trmD	0.81
RSP_1740	Ribosomal protein L17	rplQ	0.87
RSP_3866	conserved hypothetical protein		1.00
RSP_1409	Beta-Ig-H3/Fasciclin		1.06
RSP_1043	50S ribosomal protein L31	rpmE	1.06
RSP_0179	ABC-type nitrate/sulfonate/bicarbonate transport systems		1.07
RSP_1044	50S ribosomal protein L19	rplS	1.26
RSP_1883	ABC polyamine/opine transporter, periplasmic substrate-binding protein		1.35
RSP_6132	putative coenzyme PQQ synthesis protein A	pqqA	1.41

Anhang 8: Übereinstimmungen zwischen Genen des RpoH_{I/II} Regulons (Berghoff et al., 2013), Transkripten die durch Hfq (Abschnitt 3.2.18) oder UpsM (Abschnitt 3.2.16) reguliert werden könnten bzw. in der stationären Wachstumsphase hochreguliert vorliegen.

Hfq & Stat Phase	Hfq & RpoH _{I/II}	UpsM & RpoH _{I/II}	Stat Phase & UpsM	Hfq & UpsM	Stat Phase & RpoH _{I/II}	Hfq, UspM & Stat Phase	UspM, Stat Phase & RpoH _{I/II}
RSP_1063	RSP_0557	RSP_0966	RSP_0620	RSP_2283	RSP_0152	RSP_1409	RSP_1016
RSP_3866	RSP_2541	RSP_1258	RSP_0904	RSP_3178	RSP_0238		RSP_2641
RSP_6132	RSP_1882	RSP_2718	RSP_0905	RSP_2299	RSP_0361		
	RSP_1884		RSP_0906	RSP_3622	RSP_0408		
	RSP_1883		RSP_1119	RSP_3484	RSP_0472		
			RSP_1438		RSP_0474		
			RSP_2292		RSP_0554		
			RSP_2557		RSP_0559		
			RSP_3056		RSP_0570		
			RSP_3303		RSP_0601		
			RSP_3764		RSP_0847		
			RSP_6054		RSP_0870		
			RSP_6092		RSP_0999		
			RSP_6142		RSP_1076		
			RSP_7183		RSP_1104		
					RSP_1173		
					RSP_1194		
					RSP_1207		
					RSP_1238		
					RSP_1406		
					RSP_1408		
					RSP_1410		
					RSP_1421		
					RSP_1497		
					RSP_1531		
					RSP_1549		
					RSP_1563		
					RSP_1572		
					RSP_1573		
					RSP_1581		
					RSP_1742		
					RSP_1825		
					RSP_1840		
					RSP_1948		
					RSP_1949		
					RSP_2121		
					RSP_2125		
					RSP_2214		
					RSP_2261		
					RSP_2265		
					RSP_2375		
					RSP_2387		
					RSP_2388		
					RSP_2410		
					RSP_2414		
					RSP_2617		
					RSP_2625		
					RSP_2631		
					RSP_2638		
					RSP_2640		
					RSP_2658		
					RSP_2685		
					RSP_2763		
					RSP_2764		
					RSP_2806		
					RSP_2897		
					RSP_2945		
					RSP_2966		
					RSP_3067		
					RSP_3089		
					RSP_3272		
					RSP_3378		
					RSP_3601		
					RSP_3602		
					RSP_3810		
					RSP_3957		
					RSP_4199		
					RSP_6236		

Anhang 9: Transkriptom Analyse der zentralen Stoffwechselwege von *R. sphaeroides*. Microarray basierte Expressionsveränderungen nach 7, 45 and 90 min $^{1}\text{O}_2$ Stress im Vergleich zu Bedingungen ohne Stress berechnet von Berghoff *et al.* 2013. Hoch- oder runter reguliert Gene (\log_2 fold change ≥ 0.6 or ≤ -0.6) sind fett gedruckt.

Glycolytic enzymes under $^{1}\text{O}_2$ stress condition (\log_2 FC)

RSP No.	7 min	45 min	90 min	Gene name	Description
RSP_2334	-0.05	0.02	-0.01	<i>pfkB</i>	carbohydrate kinase, PfkB(EC:2.7.1.11)
RSP_3266	-0.26	-0.30	-0.20	<i>fbpb</i>	Fructose-1,6-bisphosphatase (EC:3.1.3.11)
RSP_0404	-0.13	-0.29	-0.32		fructose - 1,6 - bisphosphatase, GlpX-like
RSP_1285	-0.30	-0.05	-0.09	<i>cbbF1</i>	Fructose-1,6-bisphosphatase I(EC:3.1.3.11)
RSP_3014	0.15	0.08	0.12		Putative aldolase protein(EC:4.1.2.-)
RSP_3270	-0.07	0.07	0.04	<i>cfxB</i>	Fructose-bisphosphate aldolase II(EC:4.1.2.13)
RSP_4045	0.17	0.83	0.52	<i>fabA</i>	fructose-bisphosphate aldolase
RSP_1283	0.02	0.00	0.00	<i>cfxA</i>	Fructose-bisphosphate aldolase I
RSP_1947	0.22	0.08	0.02	<i>cbbJ</i>	Triosephosphate isomerase(EC:5.3.1.1)
RSP_3269	0.22	0.29	0.32	<i>gapB</i>	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(EC:1.2.1.12)
RSP_2959	0.52	0.53	0.52	<i>gapB</i>	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(EC:1.2.1.12)
RSP_4211	0.44	0.41	0.36	<i>gapA-1</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, type I(EC:1.2.1.12)
RSP_4044	-0.24	0.07	-0.07	<i>pgk</i>	Phosphoglycerate kinase(EC:2.7.2.3)
RSP_0934	0.11	-0.12	-0.19	<i>gpml</i>	phosphoglyceromutase(EC:5.4.2.1)
RSP_2491	-0.09	-0.35	-0.35	<i>eno</i>	Enolase(EC:4.2.1.11)
RSP_2736	0.44	0.61	0.78	<i>pgi</i>	glucose-6-phosphate isomerase
RSP_2875	0.08	0.12	0.08	<i>glk</i>	putative glucokinase(EC:2.7.1.2)
RSP_1766	-0.06	0.07	0.14	<i>pykA</i>	pyruvate kinase
RSP_1848	0.03	-0.11	0.02		pyruvate kinase

Enzymes of the TCA cycle under $^{1}\text{O}_2$ stress condition (\log_2 FC)

RSP_0966	-0.20	-0.61	-0.69	<i>sucD</i>	succinyl-CoA synthetase subunit alpha
RSP_0967	-0.56	-0.92	-0.95	<i>sucC</i>	succinyl-CoA synthetase subunit beta
RSP_2138	-0.31	-0.56	-0.61	<i>fumC</i>	fumarate lyases(EC:4.2.1.2)
RSP_1994	-0.47	-0.34	-0.29	<i>gltA</i>	Citrate synthase(EC:2.3.3.1)
RSP_1806	-0.27	-0.35	-0.36		aconitate hydratase(EC:4.2.1.3)
RSP_1559	-0.44	-0.56	-0.48	<i>icd</i>	isocitrate dehydrogenase(EC:1.1.1.42)
RSP_0446	-0.38	-0.49	-0.52		isocitrate dehydrogenase(EC:1.1.1.42)
RSP_3147	0.04	-0.04	0.00	<i>sdhA</i>	putative succinate dehydrogenase/fumarate reductase, flavoprotein subunit
RSP_3148	-0.02	0.00	0.00		Putative succinate dehydrogenase cytochrome b-556 subunit
RSP_3149	-0.09	0.46	0.24		putative succinate dehydrogenase membrane anchor
RSP_3150	-0.09	0.00	0.00	<i>frdB</i>	Succinate dehydrogenase/fumarate deductase Fe-S protein subunit
RSP_0974	-0.05	0.03	-0.05		Succinate dehydrogenase cytochrome b-556 subunit
RSP_0975	-0.13	-0.01	-0.15		putative succinate dehydrogenase, hydrophobic membrane anchor protein
RSP_0976	-0.21	-0.38	-0.35	<i>sdhA</i>	succinate dehydrogenase(EC:1.3.5.1,EC:1.3.99.1)
RSP_0979	-0.40	-0.31	-0.32	<i>sdhB</i>	succinate dehydrogenase catalytic subunit(EC:1.3.5.1,EC:1.3.99.1)
RSP_0968	-0.37	-0.39	-0.52	<i>mdh</i>	malate dehydrogenase(EC:1.1.1.37)
RSP_1994	-0.47	-0.34	-0.29	<i>gltA</i>	Citrate synthase(EC:2.3.3.1)
RSP_1806	-0.27	-0.35	-0.36		aconitate hydratase(EC:4.2.1.3)

Enzymes of the Pentose Phosphate pathway (PPP) under $^{1}\text{O}_2$ stress condition (\log_2 FC)

(oxidative branch)

RSP_2734	0.51	1.05	1.22	<i>zwf</i>	glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase
RSP_2735	0.59	0.99	1.22	<i>pgl</i>	6-phosphogluconolactonase

(non-oxidative branch)

RSP_2864	-0.28	-0.09	0.11	<i>cbbE</i>	Pentose-5-phosphate-3-epimerase(EC:5.1.3.1)
RSP_0359	-0.07	-0.36	-0.29	<i>cbbI</i>	Ribose-5-phosphate isomerase(EC:5.3.1.6)
RSP_3268	-0.07	-0.02	-0.06	<i>tklB</i>	Transketolase(EC:2.2.1.1)
RSP_2956	-0.33	-0.27	-0.29	<i>tktA</i>	Transketolase(EC:2.2.1.1)
RSP_0561	-0.15	-0.22	-0.18		Transaldolase

Gluconeogenic enzymes under ¹O₂ stress condition (log₂ FC)

RSP_0968	-0.37	-0.39	-0.52	<i>mdh</i>	malate dehydrogenase(EC:1.1.1.37)
RSP_4045	0.17	0.83	0.52	<i>fbaB</i>	fructose-bisphosphate aldolase
RSP_1680	0.14	0.16	-0.26	<i>pckA</i>	phosphoenolpyruvate carboxykinase(EC:4.1.1.49)
RSP_2491	-0.09	-0.35	-0.35	<i>eno</i>	Enolase(EC:4.2.1.11)
RSP_2736	0.44	0.61	0.78	<i>pgi</i>	glucose-6-phosphate isomerase
RSP_4044	-0.24	-0.07	-0.07	<i>pgk</i>	phosphoglycerate kinase(EC:2.7.2.3)
RSP_3269	-0.22	-0.29	-0.32	<i>gapB</i>	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(EC:1.2.1.12)
RSP_2645	0.09	0.55	0.92	<i>eda</i>	2-keto-3-deoxy-phosphogluconate aldolase
RSP_4211	0.44	0.41	0.36	<i>gapA-1</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, type I(EC:1.2.1.12)
RSP_3014	0.15	0.08	0.12		putative aldolase protein (EC:4.1.2)
RSP_3270	-0.07	0.07	0.04	<i>cfxB</i>	Fructose-bisphosphate aldolase II(EC:4.1.2.13)
RSP_1283	-0.02	0.00	0.00	<i>cfxA</i>	Fructose-bisphosphate aldolase I
RSP_1947	0.22	0.08	0.02	<i>cbbJ</i>	Triosephosphate isomerase(EC:5.3.1.1)
RSP_3266	-0.26	-0.30	-0.20	<i>fbpB</i>	Fructose-1,6-bisphosphatase (EC:3.1.3.11)
RSP_0404	-0.13	-0.29	-0.32		fructose - 1,6 - bisphosphatase, GlpX-like
RSP_1285	-0.30	-0.05	-0.09	<i>cbbF1</i>	Fructose-1,6-bisphosphatase I(EC:3.1.3.11)
RSP_0934	0.11	-0.12	-0.19	<i>gpmI</i>	phosphoglyceromutase(EC:5.4.2.1)
RSP_2959	-0.52	-0.53	-0.52	<i>gapB</i>	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(EC:1.2.1.12)
RSP_1217	-0.03	-0.23	-0.17		phosphate acetyltransferase

10 Akademischer Lebenslauf

Persönliche Daten

Akademische und schulische Ausbildung

Publikationen (Erstautorenschaften)

Weber L, Thoelken C, Volk M, Remes B, Lechner M, Klug G (2016) The conserved *dcw* gene cluster of *R. sphaeroides* is preceded by an uncommonly extended 5' leader featuring the sRNA UpsM. PLoS One. 11(11):e0165694.

Adnan F, Weber L, Klug G (2015) The sRNA SorY confers resistance during photooxidative stress by affecting a metabolite transporter in *Rhodobacter sphaeroides*. RNA Biol. 12:569-77.

Publikationen (Coautorenschaften)

Koch A, Biedenkopf D, Furch A, Weber L, Abdellatef E, Linicus L, Johannsmeier J, Jelonek L, Goesmann A, Cardoza V, McMillan J, Mentzel T, Kogel KH (2016) An RNAi-based control of *Fusarium graminearum* infections through spraying of long dsRNAs involves a plant passage and is controlled by the fungal silencing machinery. PLoS Pathog. 12(10):e1005901.

Peng T, Berghoff BA, Oh JJ, Weber L, Schirmer J, Schwarz J, Glaeser J, Klug G (2016) Regulation of a polyamine transporter by the conserved 3' UTR-derived sRNA SorX confers resistance to singlet oxygen and organic hydroperoxides in *Rhodobacter sphaeroides*. RNA Biol. 13:988-999.

Rische-Grahl T, Weber L, Remes B, Förstner KU, Klug G (2014) RNase J is required for processing of a small number of RNAs in *Rhodobacter sphaeroides*. RNA Biol. 11:855-64.

Koch A, Kumar N, Weber L, Keller H, Imani J, Kogel KH (2013) Host-induced gene silencing of cytochrome P450 lanosterol C14 α -demethylase-encoding genes confers strong resistance to *Fusarium* species. Proc Natl Acad Sci USA. 110:19324-9.

Nuss AM, Adnan F, Weber L, Berghoff BA, Glaeser J, Klug G (2013) DegS and RseP homologous proteases are involved in singlet oxygen dependent activation of RpoE in *Rhodobacter sphaeroides*. PLoS One. 8(11):e79520.

Publikationen (Coautorenschaften in Revision)

Remes B, Rische-Grahl T, Förstner K, Yu SH, Weber L, Jäger A, Peuser V, Klug G (in revision) An RpoHI-dependent response promotes outgrowth after extended stationary phase in the alpha-proteobacterium *Rhodobacter sphaeroides*. FEBS.

Elkina D, Weber L, Lechner M, Burenina O, Kubareva E, Hartmann RK, Klug G (in revision) 6S RNA in the photosynthetic α -proteobacterium *Rhodobacter sphaeroides*: expression profile, pRNA synthesis and deletion phenotype. RNA Biol.

11 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich zunächst bei meiner Erstgutachterin und Chefin **Prof. Dr. Gabriele Klug**, für das wissenschaftliche Zuhause während der letzten Jahre bedanken. Für die immer offene Tür, die kontroversen Diskussionen, die Hilfe beim Schreiben von Manuskripten und alle die anderen Dinge, die ich von Ihr lernen konnte (Umgang mit Reviewern, Labororganisation, usw.), bin ich sehr dankbar. Ich werde die Frage „Lennart, haben wir eigentlich schon mal...?“ vermissen.

Apl. Prof. Dr. Elena Evguenieva-Hackenberg danke ich für die bereitwillige Übernahme der Zweitkorrektur dieser Arbeit. Außerdem für Ihr immer offenes Ohr plus Ratschläge, Anteilnahme und Motivation, wenn es mal schwieriger wurde.

Für die direkte Zusammenarbeit möchte ich mich bedanken bei:

Marcus Lechner und **Clemens Thölken**, für den bioinformatischen Support bei UpsM. Danke, dass Ihr euch Zeit für mein Projekt genommen habt.

Adnan Fazal, für die enge Zusammenarbeit bei SorY, von der wir sicher beide profitieren konnten.

Aline Koch, dass Sie mich an Ihrem Projekt teilhaben lassen. Ich hoffe in Zukunft hast du mit Olli genauso viel Glück.

Daria Elkina, für die schöne gemeinsame Zeit in L233, bei der ich dich hoffentlich gut mit deiner 6S RNA unterstützen konnte.

Oliver Rossbach, **Christian Preußner** und **Henrik Koch** für ständigen wissenschaftlichen Austausch und euren Input beim Exosom CLIP.

Susann Gauernack, für frische *Sulfolobus* Kulturen und Ihre präzise Pipettierkraft bei den CLIP Co-IPs.

Kerstin Habertzettl, für Ihr glorreiches Durchhaltevermögen bei RNase E Klonierungen. Ich war wirklich froh deine Hilfe zu haben.

Andrea Weisert, für $\Delta 6S$ plus entsprechende qRT-PCRs und Lebensweisheiten z.B. über Männer.

Katrin Müller, die in meinen letzten Tagen einen wunderschönen EMSA mit meinen UpsM Transkripten gemacht hat. Das war wirklich Weltklasse von dir.

Den Studenten **CZ**, **JL**, **KG** und **MV** für Ihre Mitarbeit, wobei vor allem mein Freund **Marcel** mit außergewöhnlichem Engagement zu Werke gegangen ist. Ich hoffe du wirst glücklich in Braunschweig und machst eine große Karriere.

Angelika Balzer und **Carmen Haas**, die meist schneller als die Feuerwehr Bestellungen erledigt, Stämme ausgestrichen oder Medien gezaubert haben.

Außerdem möchte ich mich bei allen anderen Institutsmitarbeitern für die tolle Atmosphäre auf der Arbeit bedanken. **VP**, **SF**, **SM**, **BB**, **CW**, **HL**, **NM**, **YH**, **FB** und **AN**, die mir den Einstieg erleichtert haben. Natürlich **Andreas Jaeger** mit dem ich nach langer Elternzeit wieder das Labor teilen durfte. Du hast mir echt das Ohr abgekaut! **AZ** für Einblicke in Ihre Traumwelten und gelegentliche Ausflüge mit Ihren Öko-Leuten. **CR**, **Katrin „neu“** als auch den Thormännern **Florian** und **Anna** für Belebung von Institut und Freizeit.

Unter anderem aufgrund meiner Mitgliedschaft im IRTG, durfte ich mir einen relativ großen institutsübergreifenden Freundeskreis aufbauen (**Korn&Sprite Gruppe**). Aus Platzmangel kann ich nicht jeden von euch aufzählen, der an der Uni und vor allem in der Freizeit an unseren Treffen teilgenommen hat, um wissenschaftliches auszutauschen, feiern zu gehen oder beides zu kombinieren. Ihr habt mir meine Promotion in vielerlei Hinsicht erleichtert. All Ihr **Niepmann-** und **Ping Mädels**, **Bindereif-Jungs**, **Twins**, usw. und alle die später dazu kamen, ich hoffe wir bleiben in Kontakt und sehen uns weiter in großer Runde.

Ich möchte besonders bei den Folgenden langjährigen Kollegen und Freunden bedanken:

Yannik Hermanns, aber ruf mich nie wieder an, wenn du Umziehst. **Henrik Koch**, der ewig Hilfsbereite (auch bei Yanniks Umzug) mit „grobem Unfug“ und „gib Ihm“ im „Nassbirnen“-Kopf.

Julia Hahn, die den Laden immer aufgemischt hat und immer für jeden Scheiß zu haben war...bis...naja bis Uwe eben kam. Und **Carina Rauscher** dafür, dass Sie seit Uwe die Rolle von Julia Hahn im Freundeskreis übernimmt.

Bork Berghoff, für fachlichen sRNA Austausch auf der Arbeit und im Klimbim. Damit meine ich natürlich vor der „Alter, was geeehht“-Phase.

Tom Rische-Grahl, für das Überlassen deiner RNase J Revision. Mich freut es, dass wir immer noch alle unsere wissenschaftlichen und privaten Probleme offen miteinander besprechen können. Außerdem möchte Julia, dass ich mich auch für das ständige Überlassen deiner drei Kinder bedanke.

Bernhard Remes, mein Dreh- und Angelpunkt während unserer gemeinsamen JLU Zeit. Ich weiß nicht, wie häufig ich es schon gesagt habe, aber ich hätte mich nur schwer in Gießen einleben können, wenn wir uns damals nicht über den Weg gelaufen wären. Wir kannten uns nach der ersten Master-Woche besser in Gi aus, als jeder anderer unserer Kommilitonen...und damit meine ich nicht, wo das Prüfungsamt oder der Kursraum ist. Ich kann hier nicht aufzählen, was wir alles erlebt haben (Freibad & Zoo bei Mondschein, Groundhopping, Frisbee auf dem Roten Platz, geschlossene Veranstaltung für Gastronomen, usw.). Das meiste war bestimmt nicht erlaubt, stand aber auf der Bucketlist... jetzt können wir vernünftig und in Würde altern. Folgendes werden aber die Konstanten sein: Die Frauen soll mal einer Verstehen!?! & die SGE bleibt besser als der FCK!!!

Bei meiner **Familie** möchte ich mich außerdem für die rege Anteilnahme während meiner Promotion und den bedingungslosen Rückhalt im Leben bedanken. **Elmar** und **Suane**, bei denen ich mich entschuldigen möchte, falls ich mich zu selten gemeldet habe, wenn es stressig war. **Opa** und **Oma**, die sich immer um mich sorgen und mir in meinen ärmlichen Studienzeiten auch mal den ein oder anderen Luxus ermöglicht haben. Meiner kleinen Schwester **Corinna**, der ich häufig „auf den Sack“ gehe, und **Matze**, die nach Ihrer Steuerberaterprüfung endlich wieder mehr Zeit für gemeinsame Abende haben. Der größte Dank gebührt jedoch meinen Löwen-**Eltern**, ohne deren aufopferungsvolles Engagement ich überhaupt nie so weit gekommen wäre. Und das trifft in meinem Fall sicher mehr zu, als bei den meisten anderen, die das in ihrer Danksagung behaupten.

Zuletzt möchte ich mich natürlich bei meiner treuen und liebevollen Freundin „Mitbewohnerin“ **Julia** bedanken, die mir bei der Korrektur dieser Arbeit geholfen hat und es absolut verdient hat Ihre Dissertation eine Woche vor mir eingereicht zu haben, weil Sie es schon so lange (wie lange genau? ...ähm...seit Deutschland gegen Italien bei der WM rausgeflogen ist) mit einem Schlitzohr wie mir aushält. Ich entschuldige mich trotzdem bei allen Freunden von mir, die Ihre Wetten gegen dich verloren haben. Du bist mein stabilisierendes Hfq (siehe Abschnitt 1.1.4.3). Ich bin froh, dass ich damals nach Gießen gekommen bin, sonst hätte ich dich nicht gefunden.