

– Posttranskriptionelle Genregulation in α -Proteobakterien –

**Neue Aspekte zu der kleinen RNA StsR und dem DUF1127 Protein CcaF1 in
*Rhodobacter sphaeroides***

Inaugural Dissertation

zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften
– Dr. rer. nat. –

vorgelegt von

Julian Walter Grützner

angefertigt am Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie
Fachbereich Biologie und Chemie
Justus-Liebig-Universität Gießen
Gießen, November 2021

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie, Fachbereich 08 Biologie und Chemie der Justus-Liebig-Universität Gießen, in der Zeit von November 2017 bis November 2021 unter der Leitung von Prof. Dr. Gabriele Klug angefertigt

- | | |
|-----------------|---|
| 1. Gutachterin: | Prof. Dr. Gabriele Klug
Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie
Justus-Liebig-Universität Gießen |
| 2. Gutachter: | Prof. Dr. Roland K. Hartmann
Institut für Pharmazeutische Chemie
Philipps-Universität Marburg |

Selbständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt zu haben, die ich in der Dissertation 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 Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Julian W. Grützner

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	9
1.1	Genregulation in Bakterien	9
1.2	RNA-Regulatoren.....	10
1.2.1	Attenuation	12
1.2.2	RNA-Modifikationen.....	13
1.2.3	<i>Riboswitch</i> und RNA-Thermometer.....	13
1.2.4	Regulatorische RNAs (sRNAs) in Bakterien.....	14
1.2.4.1	<i>Cis</i> -kodierte antisense sRNAs	14
1.2.4.2	<i>Trans</i> -kodierte sRNAs	16
1.2.4.3	Protein-bindende sRNAs	19
1.3	RNA-Bindeproteine in Bakterien	20
1.3.1	Regulation der Transkription.....	21
1.3.2	Regulation der Translation	22
1.3.2.1	RNA-Chaperone Hfq und ProQ.....	22
1.4	RNA-Prozessierung und -Degradation zur Regulation der Genexpression	24
1.4.1	RNase E als zentrales Enzym des RNA-Abbaus.....	25
1.4.2	RNA-Prozessierung und -Degradation.....	28
1.5	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	30
1.5.1	Expression und Prozessierung der <i>puf</i> mRNA in <i>Rhodobacter</i>	31
1.5.2	Stress-Regulation in <i>R. sphaeroides</i> durch alternative σ -Faktoren und sRNAs.....	33
1.6	Zielsetzung.....	35
2	Material und Methoden.....	37
2.1	Material	37
2.1.1	Bakterienstämme	37
2.1.2	Plasmide	38
2.1.3	Oligonukleotide	39
2.1.4	Labormaterial	44
2.1.5	Allgemeine Puffer und Lösungen	46
2.2	Mikrobiologische Methoden	47
2.2.1	Sterilisation.....	47
2.2.2	Kultivierung von <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	47
2.2.2.1	Mikroaerobes Wachstum von <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	49
2.2.2.2	Aerobes Wachstum von <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	49

2.2.2.3	Phototrophes Wachstum von <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	49
2.2.3	Stress-Experimente mit <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	49
2.2.4	Wachstumsanalyse von <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	50
2.2.5	Bestimmung der RNA-Halbwertszeiten in <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	50
2.2.6	Hemmhoftest von <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	50
2.2.7	Bestimmung der Überlebenszellzahl von <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	51
2.2.8	Biparentale Konjugation von Plasmid-DNA nach <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	51
2.2.9	UV-crosslink	52
2.2.10	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	52
2.2.10.1	Aerobes Wachstum von <i>Escherichia coli</i>	53
2.2.11	Herstellen von elektrokompetenten Zellen	53
2.2.12	Elektrotransformation von <i>Escherichia coli</i>	53
2.2.13	Expression von rekombinanten Proteinen in <i>Escherichia coli</i>	53
2.2.14	Bestimmung der Zelldichte einer Flüssigkultur	54
2.2.15	Herstellung von Dauerkulturen	54
2.2.16	Zellernte	54
2.3	Molekularbiologische Methoden	54
2.3.1	Amplifikation von DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	54
2.3.2	Quantifizierung von Nukleinsäure.....	55
2.3.3	Restriktion von DNA	56
2.3.4	Ligation von DNA	56
2.3.5	Isolierung von DNA.....	56
2.3.5.1	Isolierung von Plasmid DNA aus Bakterien	56
2.3.5.2	Isolierung von chromosomaler DNA aus Bakterien	57
2.3.6	Fällung von Nukleinsäuren	58
2.3.6.1	Ethanol-Fällung.....	58
2.3.6.2	Isopropanol-Fällung.....	58
2.3.6.3	n-Butanol-Fällung	58
2.4	Gelelektrophoretische Methoden.....	59
2.4.1	TAE-Agarosegele zur Auftrennung von langen DNA-Fragmenten	59
2.4.1.1	Extraktion von DNA aus TAE-Agarosegelen.....	59
2.4.2	TBE-Polyacrylamidgele zur Auftrennung von kurzen DNA-Fragmenten.....	59
2.4.2.1	Extraktion von DNA aus TBE-Polyacrylamidgelen	60
2.4.3	Denaturierende TBE-Polyacrylamid-Harnstoffgele zur Auftrennung von RNA.....	60
2.4.3.1	Denaturierende TBE-Polyacrylamid-Harnstoffgele	60
2.4.3.2	Denaturierende TBE-Polyacrylamid-Harnstoffgele für RNA-Degradations-Experimente	61

2.4.4	Native TBE-Polyacrylamidgele für RNA- <i>shift-assays</i> (EMSA)	62
2.4.5	Sequenziergel für <i>structure probing</i> Reaktionen	62
2.4.6	Denaturierende Formaldehyd-Agarosegele zur Auftrennung von RNA.....	63
2.4.6.1	Denaturierende Formaldehyd-Agarosegele für Northern Blots	63
2.4.7	SDS-Polyacrylamidgele zur Auftrennung von Proteinen	64
2.5	RNA-biochemische Methoden	66
2.5.1	RNA-Isolierung.....	66
2.5.1.1	RNA-Isolierung mit heißem Phenol	66
2.5.1.2	RNA-Isolierung mit Trizol.....	67
2.5.1.3	DNase-Verdau.....	67
2.5.2	Northern Blot Analyse	67
2.5.2.1	Northern Blot Analyse von kleinen RNAs	67
2.5.2.2	Northern Blot Analyse von großen RNAs	68
2.5.2.3	Hybridisierung der Northern Blot Membran.....	68
2.5.2.4	Waschen der Northern Blot Membran	69
2.5.2.5	Ablösen von radioaktiv markierten Sonden von der Membran.....	69
2.5.3	Radioaktive Markierung von Nukleinsäure	70
2.5.3.1	Radioaktive Markierung von DNA-Oligonukleotiden	70
2.5.3.2	Radioaktive Markierung von PCR-Produkten	70
2.5.4	Quantitative <i>real time</i> RT-PCR (qRT-PCR).....	71
2.5.5	<i>In vitro</i> Transkription	71
2.5.6	EMSA (<i>electrophoretic mobility shift assay</i>).....	72
2.5.7	RNA-Strukturanalyse (<i>structure probing</i>)	73
2.5.8	<i>In vitro</i> RNA-Degradationsexperimente	75
2.5.9	iCLIP (<i>individual nucleotide resolution cross-linking and immunoprecipitation</i>)	76
2.5.9.1	Herstellung des Zelllysats	76
2.5.9.2	Partieller DNase- und RNase-Verdau	76
2.5.9.3	Co-Immunopräzipitation (CoIP).....	77
2.5.9.4	<i>On-Bead</i> Dephosphorylierung und 3' RNA-Linker-Ligation.....	77
2.5.9.5	<i>On-Bead</i> PNK-Behandlung.....	78
2.5.9.6	SDS-PAGE und Western Blot	79
2.5.9.7	RNA-Isolierung.....	79
2.5.9.8	Reverse Transkription.....	80
2.5.9.9	Zweite 3' DNA-Linker-Ligation.....	81
2.5.9.10	Erste cDNA-Amplifikation mittels PCR.....	81
2.5.9.11	Zweite cDNA-Amplifikation mittels PCR.....	82

2.5.9.12	Präparative cDNA-Amplifikation mittels PCR	83
2.5.10	Detektion mittels <i>phosphoimaging</i>	84
2.5.11	Transkriptom Analyse mittels RNA-Sequenzierung (RNASeq)	84
2.6	Proteinbiochemische Methoden.....	84
2.6.1	Aufreinigung rekombinanter Proteine	84
2.6.1.1	Aufreinigung der RNaseE529-His ₆	85
2.6.1.2	Aufreinigung von CcaF1.....	85
2.6.2	Proteinbestimmung mittels Bradford-Reagenz.....	86
2.6.3	Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen	86
2.6.3.1	Coomassie-Färbung	86
2.6.3.2	Silber-Färbung	87
2.6.4	Western Blot Analyse	88
2.6.5	Co-Immunopräzipitation (CoIP) von Protein.....	88
2.6.5.1	Co-Immunopräzipitation (CoIP) für RNASeq	89
2.6.5.2	Co-Immunopräzipitation (CoIP) für Massenspektrometrie.....	89
3	Ergebnisse	90
3.1	Die kleinen regulatorischen RNAs StsR (<i>small RNA targets small RNA</i>) und UpsM	90
3.1.1	Phänotypische Charakterisierung der StsR Deletionsmutante (Δ StsR).....	92
3.1.2	Untersuchungen zur Interaktion zwischen den sRNAs StsR und UpsM.....	98
3.1.3	<i>In vitro</i> Untersuchungen zur Interaktion der sRNA StsR und UpsM.....	105
3.1.4	Einfluss von StsR auf UpsM und das <i>dcw</i> Gencluster in der stationären Phase.....	111
3.1.5	UpsM beeinflusst die Expression der <i>dcw</i> Gene in <i>trans</i> durch eine Interaktion mit <i>mraY</i> und <i>ftsW</i>	114
3.2	Die DUF1127 Proteine CcaF1 (<i>conserved CcsR associated factor</i>) und RSP_0557	118
3.2.1	Charakterisierung des DUF1127 Proteins CcaF1	120
3.2.2	Der Einfluss von CcaF1 auf das Transkriptom von <i>R. sphaeroides</i>	129
3.2.3	Identifizierung von CcaF1-Interaktionspartnern	134
3.2.4	Nachweis einer direkten Interaktion zwischen CcaF1 und CcsR RNAs	140
3.2.5	CcaF1 beeinflusst die Stabilität von CcsR1 und anderer RNA-Transkripter	145
3.2.6	Identifizierung eines Bindemotivs von CcaF1 mittels iCLIP.....	149
3.2.7	DUF1127 Protein RSP_0557	155
4	Diskussion	159
4.1	Die kleinen regulatorischen RNAs StsR und UpsM.....	159
4.1.1	Charakterisierung der sRNA StsR.....	159
4.1.2	Die Prozessierung von UpsM wird über StsR reguliert.....	160

4.1.3	Effekt von StsR auf das Wachstum von <i>R. sphaeroides</i>	163
4.2	Die DUF1127 Proteine CcaF1 (<i>conserved CcsR associated factor</i>) und RSP_0557	167
4.2.1	Das DUF1127 Protein CcaF1 ist als RNA-bindendes Protein an der RNA-„Reifung“ beteiligt	168
5	Zusammenfassung	173
6	Summary	174
7	Verzeichnis	175
7.1	Literaturverzeichnis	175
7.2	Abkürzungsverzeichnis	199
7.3	Abbildungsverzeichnis	200
7.4	Tabellenverzeichnis	202
8	Anhang	204
8.1	Anhang sRNA StsR	204
8.2	Anhang DUF1127 Proteine CcaF1 und RSP_0557	205
9	Akademischer Lebenslauf	208
10	Danksagung	210

1 Einleitung

Alle Organismen benötigen in ihren Lebensräumen Strategien, um die Einflüsse der Umwelt wahrzunehmen, darauf zu reagieren und sich zu adaptieren (López-Maury *et al.*, 2008). Vor allem Mikroorganismen müssen in der Lage sein, die schnell wechselnden Bedingungen (Signale) in der Umwelt zu erfassen und darauf zu reagieren (Matin *et al.*, 1989; Kolter *et al.*, 1993; Boor, 2006), da sie in ihrer Motilität begrenzt sind. Verändernde Bedingungen in der Umwelt können sowohl abiotischen als auch biotischen Ursprungs sein. Zu den abiotischen Faktoren, auf die eine Zelle reagieren muss, zählen unter anderem Änderungen der Temperatur, des pH-Werts, des Sauerstoffgehalts oder der Lichtverhältnisse, während zu den biotischen Faktoren die Konkurrenz zwischen anderen Mikroorganismen um Platz und Nährstoffe gehören.

1.1 Genregulation in Bakterien

Mikroorganismen besitzen unterschiedliche Moleküle, um die Signale zu erfassen. Eine Form der Signalwahrnehmung erfolgt durch Rezeptormoleküle. Diese bestehen aus einer Sensor-Domäne, die das Signal wahrnimmt, und einer Effektor-Domäne, die das erkannte Signal in eine Zellantwort umwandelt. Durch einen extra- oder intrazellulären Stimulus kommt es in dem Molekül zu einer Konformationsänderung, die die Effektor-Domäne aktiviert. Die aktive Effektor-Domäne führt anschließend zu der entsprechenden Zellantwort. Eine weitere Möglichkeit, um Umweltreize zu erfassen und in eine Zellantwort umzuwandeln, sind Zwei-Komponenten-Systeme (Nixon *et al.*, 1986; Galperin, 2006, 2010, 2018). Dieses System besteht aus zwei Proteinen, der Histidin-Kinase und dem Antwortregulator. Die Wahrnehmung extra- oder intrazellulärer Reize führt zu einer Phosphorylierung der Histidin-Kinase durch den Verbrauch von ATP. Diese Phosphatgruppe wird anschließend auf den Antwortregulator übertragen und aktiviert diesen. Der aktivierte Antwortregulator kann nun eine nachgeschaltete Signalkaskade starten oder selber als Transkriptionsfaktor in der Zelle wirken. Über das Zwei-Komponenten-System können Umweltsignale erfasst und über eine Signalkaskade in eine Zellantwort umgewandelt werden (Appleby *et al.*, 1996; Stock *et al.*, 2000; Gao & Stock, 2009; Zschiedrich *et al.*, 2016).

Die Antwort auf die wahrgenommenen Umweltreize kann sich auf die Genexpression in der Bakterienzelle auswirken. Dabei spielt die Regulation der Transkription und Translation eine zentrale Rolle in der bakteriellen Genexpression, wobei es in Prokaryoten im Gegensatz zu den Eukaryoten keine direkte räumliche und zeitliche Trennung zwischen der Transkription und der Translation gibt (Grundy & Henkin, 2006; Martin & Koonin, 2006). In Bakterien ist für die meisten Gene die Erkennung des Promotors und die Initiierung der Transkription durch die RNA-Polymerase der wichtigste regulatorische Schritt auf der Ebene der Transkription (Browning & Busby, 2004). Die RNA-Polymerase, die für die DNA-abhängige RNA-Synthese notwendig ist, besteht aus den großen β - und β' -Untereinheiten, zwei α -Untereinheiten und der kleinen ω -Untereinheit (Ishihama, 2000; Gruber & Gross, 2003). Für die Erkennung einer spezifischen Promotorsequenz wird zusätzlich eine σ -Untereinheit (σ -Faktor) benötigt, die zusammen mit dem Kernenzym (*core enzyme*) den vollständigen Proteinkomplex (Holoenzym) ausbildet (Feklistov *et al.*, 2014). Bakterien können für die Erkennung

unterschiedlichen Promotorsequenzen mehrere verschiedene σ -Faktoren besitzen, die in vier Gruppen (Gruppe I-IV) eingeteilt werden können. Neben dem sogenannten *housekeeping* σ -Faktoren (Gruppe I) (Helmann & Chamberlin, 1988; Lonetto *et al.*, 1992), die die RNA-Polymerase zu den meisten Promotoren für essentielle Gene rekrutiert, besitzen fast alle Bakterien weitere Gruppen von σ -Faktoren (Gruppe II-IV). Zu der Gruppe II gehören σ -Faktoren, die paralog zu dem *housekeeping* σ -Faktor, jedoch nicht essentiell für die Zelle sind. Die dritte und vierte Gruppe (III & IV) beinhaltet alternative σ -Faktoren, die die RNA-Polymerase zu speziellen Promotorsequenzen für Stress-induzierte Gene leitet (Helmann & Chamberlin, 1988). Alternative σ -Faktoren der Gruppe III können an einer Anpassung gegenüber Hitzestress, der Ausbildung von Flagellen oder der Sporulation beteiligt sein (Helmann & Chamberlin, 1988; Staroń *et al.*, 2009). Die Aktivität der alternativen σ -Faktoren ist durch verschiedene Mechanismen reguliert, wozu kovalente Modifikationen, subzelluläre Lokalisierung, Syntheserate oder proteolytische Abbaurate gehören. σ -Faktoren der vierten Gruppe (IV) nehmen eine Sonderstellung ein und werden als sogenannte ECF (*extracytoplasmic function*) σ -Faktoren bezeichnet (Lonetto *et al.*, 2019). Die Gruppe IV stellt die umfangreichste und vielfältigste Gruppe der alternativen σ -Faktoren dar und wird über extrazelluläre Stimuli reguliert. Die Aktivität der ECF σ -Faktoren erfolgt über einen sogenannten Anti- σ -Faktor (Paget, 2015), der an den σ -Faktor bindet und diesen inaktiviert. Über einen extrazellulären Reiz kann der Anti- σ -Faktor dissoziieren, proteolytisch abgebaut oder durch einen sogenannten Anti-Anti- σ -Faktor gebunden werden, sodass der ECF σ -Faktor aktiv wird. Weitere Möglichkeiten zur Aktivierung der ECF σ -Faktoren sind Zwei-Komponenten-Systeme (Merighi *et al.*, 2003) oder Phosphorylierungen (Bayer-Santos *et al.*, 2018). Durch den Austausch des *housekeeping* σ -Faktors gegen einen alternativen σ -Faktor in dem Holoenzym gelingt der Bakterienzelle eine schnelle Änderung der Genexpression als Reaktion auf umweltbedingte Einflüsse (Jishage *et al.*, 1996).

Neben den σ -Faktoren spielen auch andere Transkriptionsfaktoren eine wichtige Rolle bei der Genexpression in Bakterien. Sie können als Aktivatoren oder Repressoren an verschiedene Bereiche der Promotorsequenz binden und dadurch die Expression von Genen steuern. Aktivatoren können entweder an einen Operator vor der Promotorsequenz oder an die -35 bzw. -10 Regionen des Promotors binden (Dove *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2012). Durch eine Interaktion mit der RNA-Polymerase oder durch eine Änderung der DNA-Struktur wird die Transkriptionsinitiation der RNA-Polymerase verstärkt (Browning & Busby, 2004). Repressoren binden hingegen so an den Promotor, dass die RNA-Polymerase die Promotorsequenz nicht mehr erkennen kann und die Bindung der RNA-Polymerase unterbunden wird (Browning & Busby, 2004).

1.2 RNA-Regulatoren

Die Genexpression wird in Bakterien nicht nur durch die Transkription, sondern auch durch die Translation reguliert, die anders als in Eukaryoten räumlich und zeitlich nicht von der Transkription getrennt ist. Dies bedeutet, dass die mRNA in Bakterien schon während des Vorgangs der Transkription in das entsprechende Protein translatiert werden kann. Die Translation beginnt meistens mit der Erkennung der sogenannten Shine-Dalgarno-Sequenz in der mRNA durch die kleine ribosomale Untereinheit (30S). Die Shine-Dalgarno-Sequenz ist eine 4-9 Nukleotide lange, Purin-reiche Sequenz, die wenige Nukleotide vor dem Start-Codon des mRNA-Transkripts liegt und auch als Ribosomen-

Bindestelle (*ribosome-binding-site*; RBS) bezeichnet wird (Shine & Dalgarno, 1974). Durch die Bindung der großen ribosomalen Untereinheit (50S) an die kleine ribosomale Untereinheit, die schon an die mRNA gebunden ist, wird die Translation initiiert (Milón & Rodnina, 2012; Rodnina, 2018). Über die Schritte der Elongation und Termination wird die mRNA in das entsprechende Protein translatiert (Dever & Green, 2012). Neben der Transkriptions- und Translationsrate spielen auch verschiedene RNA-Regulatoren eine wichtige Rolle bei der Transkription und der anschließende Translation von RNA-Transkripten.

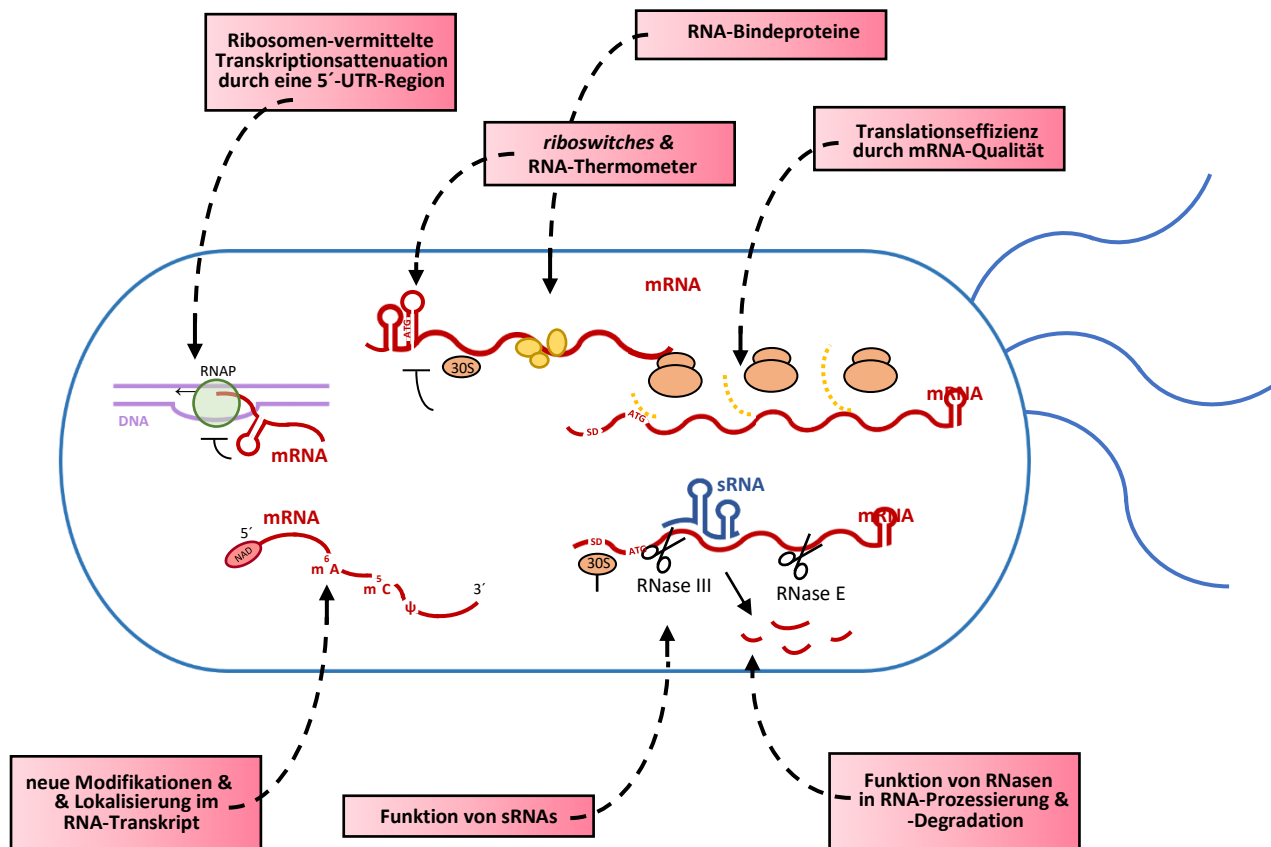


Abbildung 1: Wirkungsweise regulatorischer RNA-Elemente in Bakterien. Bakterien besitzen eine Vielzahl an regulatorischen RNA-Elementen. Mittels neuer Methoden in der RNA-Biochemie können die verschiedenen Aspekte, wie RNA-Synthese, -Modifikationen, -Sekundärstrukturen, -Degradation und Translationseffizienz detailliert charakterisiert werden (modifiziert nach Hör *et al.*, 2018).

RNA-Regulatoren können während der Transkription durch entsprechende Modifikationen von Nukleotiden oder ausgebildete Sekundärstrukturen eine Funktion des RNA-Transkripts steuern. Ein Prozess, bei dem eine ausgebildete RNA-Sekundärstruktur einen direkten Einfluss auf die noch laufende Transkription nimmt, ist die Attenuation (Abschnitt 1.2.1). Die Attenuation von RNA-Transkripten hängt dabei vom *status quo* verschiedener Effektormoleküle in der Zelle ab, zu denen unter anderem RNA-Transkripte, Proteine oder Metabolite gehören (Yanofsky, 1981; Henkin & Yanofsky, 2002). Nach der Transkription können einzelne Nukleotide im RNA-Transkript durch unterschiedliche Mechanismen modifiziert werden, die die Stabilität und Translationsrate beeinflussen können (Abschnitt 1.2.2) (Helm & Motorin, 2017). Sogenannte *riboswitches* und RNA-

Thermometer gehören ebenfalls zu den RNA-Regulatoren, die durch Ausbildung von Sekundärstrukturen im 5' untranslatierten Bereich (*untranslated region*; UTR) oder in der RBS einen Einfluss auf die Translation ausüben (Abschnitt 1.2.3). Auch die Bildung weiterer Sekundärstrukturen in verschiedenen Bereichen des RNA-Transkripts kann einen stabilisierenden oder destabilisierenden Effekt auf das Transkript haben. Haarnadelschleifen (*stem-loops*) stabilisieren RNA-Transkripte in der Regel, während unstrukturiertere RNA-Abschnitte den Abbau des Transkripts fördern (Rauhut & Klug, 1999). Unstrukturierte Abschnitte in einem Transkript machen die RNA für Ribonuklease (RNasen) zugänglich, die die Degradation der RNA initiieren (Abschnitt 1.4). Aber auch eine Interaktion der mRNA mit anderen RNA-Spezies (sRNAs) (Abschnitt 1.2.4) oder RNA-bindenden Proteinen kann die Translation und die Stabilität von RNA-Transkripten auf der posttranskriptionellen Ebene regulieren (Abschnitt 1.3).

1.2.1 Attenuation

Die Attenuation ist ein Mechanismus in Bakterien, bei dem eine ausgebildete RNA-Sekundärstruktur einen direkten Einfluss auf die noch laufende Transkription und Translation nimmt. Bei dem Vorgang der Attenuation erfolgt eine vorzeitige Termination, wenn eine Transkription und Translation der nachfolgenden Gene nicht notwendig sind. Dabei bildet sich eine RNA-Struktur zwischen dem Promotor und dem kodierenden Bereich aus, der zu einer vorzeitigen Termination der Transkription führt (Henkin & Yanofsky, 2002). Das am meisten untersuchte Model für die Attenuation ist das Tryptophan-Operon in *Escherichia coli* (*E. coli*), welches Gene der Tryptophan-Synthese kodiert (Lee & Yanofsky, 1977; Oxender *et al.*, 1979; Roesser & Yanofsky, 1988). Während der Transkription wird eine *Leader*-Sequenz transkribiert, die zwei Tryptophan-Codons besitzt. Bei einer niedrigen zellulären Tryptophan-Konzentration verweilt das Ribosom an der Position der beiden Trp-Codons in der *Leader*-Sequenz, da in der Zelle nur wenige mit Tryptophan beladene tRNAs vorhanden sind, sodass es zu einer Verzögerung der Translation kommt. Dies begünstigt die Ausbildung einer alternativen Haarnadelschleife (Anti-Terminator), die eine vollständige Transkription der Tryptophan-Gene ermöglicht. Bei einer hohen Konzentration von Tryptophan in der Zelle und dementsprechend auch einer hohen Anzahl spezifischer, mit Tryptophan beladener tRNAs werden die Aminosäuren schneller in die *Leader*-Sequenz eingebaut. Es kommt dadurch zur Ausbildung einer sogenannten Attenuator oder Terminator Haarnadelschleife am Anfang der mRNA, die die Termination der Transkription induziert. Durch den Mechanismus der Attenuation kann die Transkription und Translation von Enzymen für aufwendige Biosynthesen, zu denen unter anderem Aminosäuren oder Pigmentmoleküle gehören, direkt über deren Konzentration in der Zelle reguliert werden. Aber nicht nur Aminosäuren und Metabolite können die Transkription über den Mechanismus der Attenuation beeinflussen, sondern auch Proteine oder RNA-Moleküle (Lee & Yanofsky, 1977; Oxender *et al.*, 1979; Roesser & Yanofsky, 1988; Vitreschak *et al.*, 2008; Gutiérrez-Preciado *et al.*, 2009; Naville & Gautheret, 2010).

1.2.2 RNA-Modifikationen

Modifikationen von Nukleotiden in einem RNA-Molekül sind in Prokaryoten ein neu entdecktes Feld der RNA-Regulation. Während in bakteriellen tRNAs und rRNAs ungefähr 60 Modifikationen nachgewiesen und bekannt sind (Marbaniang & Vogel, 2016; Helm & Motorin, 2017; Roundtree *et al.*, 2017), sind in mRNA-Transkripten in *E. coli* und *Pseudomonas aeruginosa* bisher nur m⁶A Methylierungen identifiziert worden (Deng *et al.*, 2015). Im Gegensatz zu Eukaryoten kommen die m⁶A Methylierungen dabei nicht am Stopp-Codon oder im 3' untranslatierten Bereich vor, sondern vor allem verstärkt im offenen Leseraster (*open reading frame*; ORF) (Dominissini *et al.*, 2012). Über die Funktion und Auswirkung von RNA-Modifikationen auf die einzelne RNA-Transkripte und ihre Translation ist in Bakterien jedoch wenig bekannt.

Neben den internen Modifikationen von RNA-Transkripten wurden in *E. coli* 5'-NAD (Nicotinamidadenindinukleotid) und 5'-CoA (Coenzym A) „Cap-Strukturen“ identifiziert, die von den bisher bekannten 5' Tri- und Monophosphaten abweichen (Cahová *et al.*, 2015; Jäschke *et al.*, 2016). Diese neuen Cap-Strukturen kommen vor allem in sRNAs und mRNAs vor, jedoch nicht in tRNAs und rRNAs. Anders als in Eukaryoten wird das 5' Ende bzw. die Cap-Struktur nicht nach der RNA-Transkription enzymatisch angefügt, sondern wird über die RNA-Polymerase während der Transkription über ein nicht kanonisches Nukleotid in das RNA-Transkript eingebaut (Bird *et al.*, 2016; Höfer *et al.*, 2016a; Winz *et al.*, 2017). Die 5'-NAD Modifikation scheint in 25 % aller RNA-Spezies vorzukommen, eine eindeutige Funktion konnte dieser neuartigen Cap-Struktur jedoch in Prokaryoten bisher nicht zugeschrieben werden. Allerdings ist bekannt, dass die Cap-Struktur von der Phosphohydrolase NudC entfernt wird (Cahová *et al.*, 2015; Höfer *et al.*, 2016b; Höfer *et al.*, 2016a; Winz *et al.*, 2017).

1.2.3 Riboswitch und RNA-Thermometer

Die Genexpression kann in Bakterien in ganz unterschiedlichen Bereichen einer mRNA reguliert werden. Die 5' untranslatierte Region (UTR) wird in einem RNA-Transkript in einer Vielzahl von Mechanismen genutzt, um die Expression der nachgeschalteten Gene oder sogar des gesamten Operons zu regulieren. Die 5' UTR kann eine Interaktion mit regulatorischen Molekülen eingehen oder durch eine Temperaturänderung ihre Konformation ändern, wodurch die Genexpression entweder auf der Ebene der Transkription, Translation oder der RNA-Degradation beeinflusst wird (Vitreschak *et al.*, 2004; Henkin, 2008). Eine RNA-Struktur, die durch Bindung eines Liganden die Genexpression reguliert, wird als *riboswitch* bezeichnet (Breaker, 2011; McCown *et al.*, 2017). *Riboswitches* können in einer sogenannten Adapter-Domäne, die in der 5' UTR des RNA-Transkripts liegt, als Liganden Koenzyme, Ionen, Aminosäuren oder Nukleotide binden. Durch die Bindung des Liganden wird die Struktur des *riboswitches* verändert, sodass entweder die Transkription terminiert oder die Initiation der Translation blockiert wird, indem die Ribosomen nicht an der RBS binden können (Barrick & Breaker, 2007). Bei einem RNA-Thermometer wird die Translation nicht durch die Bindung eines Liganden beeinflusst, sondern die ausgebildete Sekundärstruktur in der 5' UTR wird abhängig von der Temperatur verändert (Klinkert & Narberhaus, 2009). Bei niedrigen Temperaturen ist die RBS durch die Ausbildung einer Haarnadelschleife für Ribosomen unzugänglich. Bei steigenden Temperaturen

werden die Basenpaarungen in der Haarnadelschleife aufgehoben und die RBS wird für Ribosomen zugänglich. Solche RNA-Thermometer sind häufig in mRNA-Transkripten für *heat-shock* Proteine oder Virulenzfaktoren zu finden (Narberhaus, 1999; Konkel & Tilly, 2000).

1.2.4 Regulatorische RNAs (sRNAs) in Bakterien

Die Anwendung von *Microarray* Analysen und *high-throughput* Sequenzierungen ermöglichten in den letzten zwei Jahrzehnten die Identifizierung einer großen Anzahl kleiner regulatorischer RNAs (*small RNA*; sRNA) in Bakterien (Sharma *et al.*, 2010; Sharma & Vogel, 2014), die wichtige Elemente in der Anpassung an sich ändernde Umweltbedingungen sind (Gottesman, 2005; Papenfort & Vogel, 2009; Waters & Storz, 2009; Gottesman & Storz, 2011; Storz *et al.*, 2011). sRNAs sind post-transkriptionelle RNA-Regulatoren, die eine Länge von 50-500 Nukleotiden besitzen und unterschiedliche Funktionen ausüben. Dazu gehören die Anpassung an Stressbedingungen, die Synthese von Virulenzfaktoren, die Bildung von Biofilmen oder das Quorum Sensing System (Papenfort & Vogel, 2009; Wagner & Romby, 2015). Regulatorische RNAs können in ihrer Funktion auf Proteine oder auf mRNA-Transkripte wirken, wobei die Gruppe der Protein-bindenden sRNAs die kleinere ist (Holmqvist & Vogel, 2018). Zusätzlich können sRNA anhand der Lokalisierung der kodierenden Sequenz im bakteriellen Genom in zwei Gruppen unterteilt werden: 1. *cis*-kodierte antisense RNAs und 2. *trans*-kodierte RNAs. Beide Arten von sRNAs können mit einem oder mehreren RNA-Transkripten interagieren und sind in Bakterien Teil komplexer, regulatorischer Netzwerke.

1.2.4.1 *Cis*-kodierte antisense sRNAs

Cis-kodierte antisense sRNAs werden durch einen eigenen Promotor von dem DNA-Strang transkribiert, der komplementär ist zu jenem, von dem die Ziel-mRNA abgelesen wird (Brantl, 2002, 2007; Thomason & Storz, 2010; Georg & Hess, 2011). Sie besitzen daher in den Überlappungsbereichen eine vollständige Komplementarität zur Ziel-mRNA, weshalb sie für ihre Bindung nicht auf RNA-Chaperone wie zum Beispiel Hfq oder ProQ, angewiesen sind (Brantl, 2002; Franze de Fernandez *et al.*, 1968; Møller *et al.*, 2002; Smirnov *et al.*, 2016; Olejniczak & Storz, 2017). Nur in wenigen Fällen ist bekannt, dass *cis*-kodierte sRNA eine Bindung über Hfq mit ihrer Ziel-mRNA eingehen (Ellis *et al.*, 2015; Reuscher & Klug, 2021). Die Mehrzahl von *cis*-kodierten sRNAs wurde auf Plasmiden, in Bakteriophagen und in Transposons identifiziert (Tomizawa *et al.*, 1981; Brantl, 2002), jedoch mittlerweile auch verstärkt im bakteriellen Chromosom. Die Hauptfunktion der bisher identifizierten *cis*-kodierten sRNAs ist die Regulation fundamentaler Prozessen in Bakterien, zu denen die Initiation der Replikation, die bakterielle Konjugation, die Transposition, die mRNA Degradation und die Initiation der Translation zählen (Brantl, 2007).

In den meisten Fällen binden *cis*-kodierten sRNAs an die Shine-Dalgarno Sequenz (SD) oder die 5' UTR der Ziel-mRNA. Durch Basenpaarungen mit der Ziel-mRNA wird die Initiation der Translation durch die 30S Untereinheit des Ribosoms inhibiert. Ein solcher Mechanismus ist zum Beispiel für die *cis*-kodierte sRNA FinP und die entsprechenden Ziel-mRNA *traJ* in *E. coli* beschrieben. Durch die Bindung der sRNA an die RBS wird die Translation von *traJ* verhindert. *traJ* ist ein Gen, welches einen Aktivator für die

Konjugation der Plasmide F und R1 kodiert (Jerome *et al.*, 1999; Gubbins *et al.*, 2003). Diese Studien zeigen außerdem, dass die Stabilität der *traJ* mRNA zwar von dem RNA-Chaperon Hfq-abhängig ist, die Interaktion zwischen der sRNA FinP und der mRNA *traJ* hingegen nicht (Arthur *et al.*, 2003; Will & Frost, 2006).

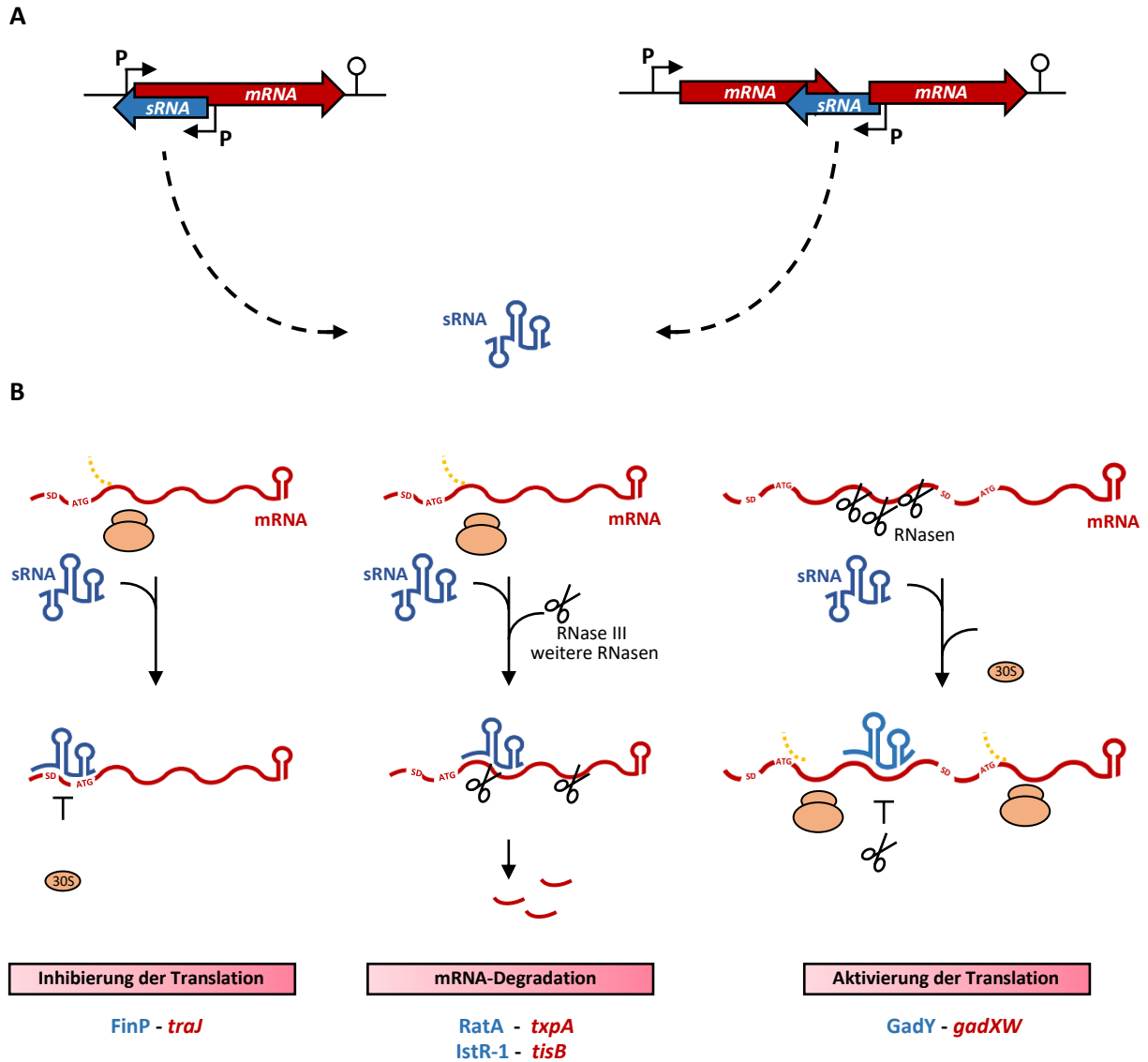


Abbildung 2: Funktion *cis*-kodierter sRNAs. (A) *Cis*-kodierte antisense sRNAs werden vom Gegenstrang des Ziel-mRNA-kodierenden DNA-Strangs abgelesen (modifiziert nach Waters & Storz, 2009). (B) Wirkmechanismen *cis*-kodierter antisense sRNAs auf Ziel-mRNAs mit entsprechenden Beispielen (modifiziert nach Brantl, 2002).

Cis-kodierte sRNA können unter anderem über eine Interaktion mit der Ziel-RNA die Degradation des mRNA-Transkripts durch verschiedene RNasen induzieren. Die Funktion *cis*-kodierter sRNAs ist vor allem bei Toxin-Antitoxin-Systemen beschrieben worden. Toxin-Antitoxin-Systeme der Klasse I werden unter verschiedenen Stressbedingungen induziert und verlangsamen bzw. stoppen das Wachstum der Zellen, wodurch die Bildung von Persisterzellen gefördert wird (Gerdes & Wagner, 2007; Brantl, 2012). Bei der Klasse I der Toxin-Antitoxin-Systeme besteht das Toxin aus einem Protein und das Antitoxin aus einer sRNA, die auf dem komplementären DNA-Strang zum Toxin kodiert ist. Die Translation der

mRNA in das Toxin wird durch die Bindung der Antitoxin sRNA inhibiert und die mRNA degradiert. Ein Beispiel für ein *cis*-kodiertes Antitoxin ist das RatA/*txpA* Toxin-Antitoxin-System aus *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*). Durch die Bindung und die Ausbildung einer Duplex-Struktur aus sRNA und mRNA wird die Translation inhibiert und die Degradation der mRNA durch die RNase III gefördert (Silvaggi *et al.*, 2005; Brantl & Müller, 2019). Das IstR-1/*tisB* Toxin-Antitoxin-System in *E. coli* folgt einem sehr ähnlichen Mechanismus. Jedoch ist die IstR-1 sRNA in diesem Toxin-Antitoxin-System keine typische *cis*-kodierte sRNA, da sie nicht genau komplementär zur Bindungsregion an der Toxin mRNA kodiert ist. Die sRNA IstR-1 wird in *E. coli* konstitutiv exprimiert und geht eine Interaktion mit der 5' UTR der *tisB* mRNA ein, wodurch es ähnlich wie in *B. subtilis* zu einer RNase III-abhängigen Prozessierung und Degradation der Toxin mRNA kommt. Unter Stressbedingungen (SOS-Antwort) wird die Expression von *tisB* verstärkt induziert, sodass IstR-1 austitriert wird und die *tisB* mRNA in das Toxin TisB Protein translatiert werden kann. Das Toxin TisB lässt die Bakterien anschließend in den Zustand einer Persisterzelle übergehen, indem es die Polarisierung der Membran aufhebt (Edelmann & Berghoff, 2019; Edelmann *et al.*, 2021).

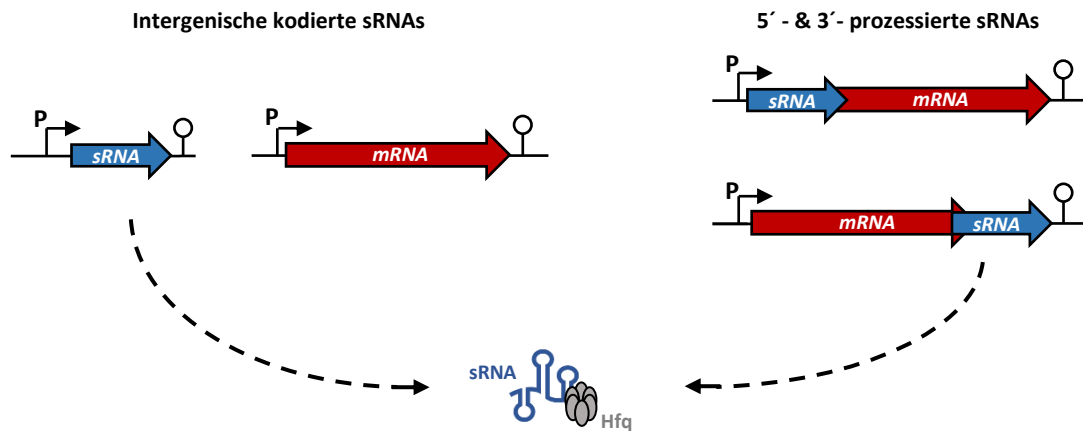
Cis-kodierte sRNAs können jedoch auch die Translation der entsprechenden Ziel-mRNA fördern, indem sie die Stabilität des RNA-Transkripts positiv beeinflussen. In *E. coli* konnte die *cis*-kodierte antisense RNA GadY identifiziert werden, die das mRNA-Transkript von *gadX* stabilisiert und somit die Translation fördert. GadY ist eine *cis*-kodierte antisense RNA, die im intercistronischen Bereich von *gadX* und *gadW* lokalisiert ist. Durch die Bindung von GadY an die *gadX* mRNA wird die Prozessierung eines längeren *gadXW* mRNA-Transkripts stimuliert, sodass die stabileren monocistronischen mRNAs für *gadX* und *gadW* entstehen (Opdyke *et al.*, 2004; Tramonti *et al.*, 2008; Opdyke *et al.*, 2011).

1.2.4.2 *Trans*-kodierte sRNAs

Im Vergleich zu *cis*-kodierten sRNAs oder antisense RNAs sind *trans*-kodierte sRNAs nicht auf dem komplementären DNA-Strang zu ihrer Ziel-mRNA kodiert, sondern in einem anderen Bereich des Genoms (Gottesman, 2005). *Trans*-kodierte sRNAs sind meistens in intergenischen Regionen (*intergenic region*; IRG) lokalisiert und können einen eigenen Promotor am 5' Ende und einen Rho-unabhängigen Terminator am 3' Ende besitzen. Eine weitere Möglichkeit zur Generierung *trans*-kodierter sRNAs ist ihre RNase-abhängige Freisetzung aus einem polycistronischen Transkript. Dabei stellen sRNAs, die aus der 3' UTR prozessiert werden, die größte Gruppe der *trans*-kodierten sRNAs dar (Kawano, 2005). Durch ihre Kodierung in intergenischen Bereichen des Genoms besitzen *trans*-kodierte sRNAs, im Gegensatz zu den *cis*-kodierten sRNAs, keine perfekte Komplementarität zu ihrer Ziel-mRNA. Diese Eigenschaft der *trans*-kodierten sRNAs erlaubt es ihnen, eine Vielzahl an RNA-Transkripten zu binden und somit eine globalere regulatorische Funktion in der Zelle auszuüben. Ein Großteil der *trans*-kodierten sRNAs wirken regulatorisch negativ auf die Ziel-mRNA, z.B. durch Inhibierung der Translation, über einen verstärkten Abbau der mRNA oder beides (Gottesman, 2005; Aiba, 2007). In wenigen Ausnahmen kann eine Interaktion der sRNA mit der Ziel-mRNA auch einen positiven Effekt auf die Translation haben (Chen *et al.*, 2002). Bei *trans*-kodierten sRNAs beschränkt sich der Interaktionsbereich zwischen sRNA und Ziel-mRNA auf 5-20 Nukleotide und kann durch nicht perfekte Komplementarität zusätzlich geschwächt sein. Deshalb sind *trans*-wirkende sRNAs in gram-negativen Bakterien oft auf die RNA-bindenden Proteine (RNA-Chaperone) Hfq oder ProQ angewiesen,

welche die Stabilität der sRNA fördern und die Basenpaarungen zwischen der mRNA und der sRNA vermitteln (Franze de Fernandez *et al.*, 1968; Smirnov *et al.*, 2016; Olejniczak & Storz, 2017).

A



B

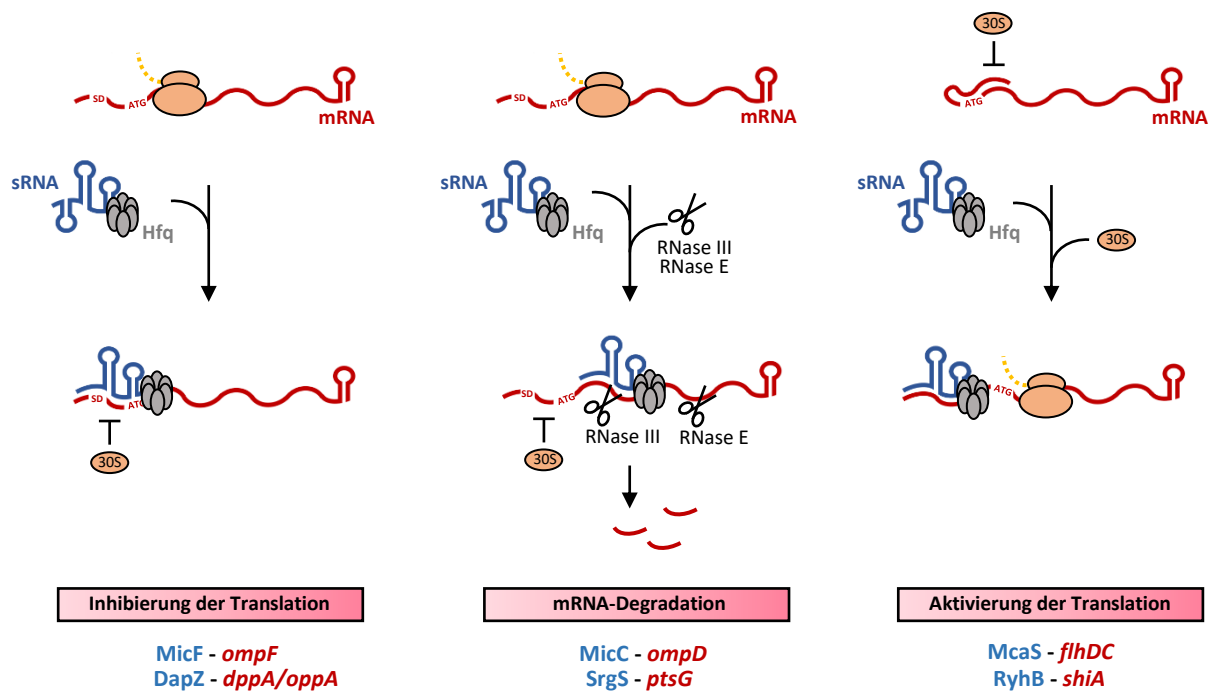


Abbildung 3: Funktion *trans*-kodierter sRNAs. (A) *Trans*-kodierte sRNAs können in intergenischen Regionen (*intergenic region*; IRG) kodiert sein oder durch RNasen aus einem polycistronischen Transkript prozessiert werden (modifiziert nach Hör *et al.*, 2020). (B) Wirkmechanismen *trans*-kodierten sRNAs auf Ziel-mRNAs mit entsprechenden Beispielen (modifiziert nach Waters & Storz, 2009).

Der Wirkmechanismus *trans*-kodierter sRNAs auf entsprechende Ziel-mRNAs kann sehr divers sein. In den meisten Fällen inhibieren sie die Translation der Ziel-mRNA, indem sie, ähnlich wie die *cis*-kodierten antisense sRNAs (Abschnitt 1.2.4.2), an die Shine-Dalgarno Sequenz oder die 5' UTR der Ziel-mRNA binden. Durch die Bindung kann die RBS verdeckt werden, sodass die 30S Untereinheit des Ribosoms diese nicht mehr erkennen kann und die Initiation der Translation verhindert wird. Dieser Wirkmechanismus ist unter anderem für die sRNA-mRNA MicF-*ompF* (Mizuno *et al.*, 1984) und DapZ-*dppA/oppA* (Chao *et al.*, 2012) beschrieben. MicF ist eine 174 Nukleotid lange, intergenisch kodierte

sRNA in *E. coli*, die erstmal 1984 entdeckt und beschrieben wurde. Die sRNA MicF inhibiert durch eine Interaktion mit der 5' UTR der *ompF* mRNA deren Translation in das *outer membrane* Protein OmpF (Mizuno *et al.*, 1984; Montzka Wassarman, 1999). Ein anderes Beispiel ist DapZ aus dem pathogenen Bakterium *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*). Diese sRNA ist in der 3' Region des Gens *dapB* kodiert und wird unabhängig von *dapB* exprimiert (Chao *et al.*, 2012). Durch eine Interaktion mit den 5' UTRs der *dppA* und *oppA* mRNAs wird die Translation eines ABC Transporters inhibiert. In diesem Fall reguliert die sRNA DapZ mehr als eine Ziel-mRNA (Chao *et al.*, 2012).

Die Interaktion mit einer sRNA kann auch zu einer Veränderung in der Stabilität der entsprechenden Ziel-mRNA führen und als initialer Schritt der RNA-Degradation angesehen werden, der ähnlich wie bei einer *cis*-kodierten sRNA verläuft. Bei diesem Mechanismus unterscheidet man zwei Möglichkeiten der Stabilitätsveränderung, einen primären und einen sekundären Mechanismus. Im Fall des primären Mechanismus bindet die sRNA nicht an die Shine-Dalgarno Sequenz oder der 5' UTR der Ziel-mRNA, sondern *downstream* der RBS in der kodierenden Sequenz der mRNA. Dementsprechend hat die sRNA keinen direkten, inhibierenden Effekt auf die Translation, sondern fördert die Prozessierung und Degradation der mRNA. Die Basenpaarung zwischen sRNA und mRNA dient als initialer Angriffspunkt für die Doppelstrang-spezifische Endoribonuklease III (RNase III; Court *et al.*, 2013; Lim *et al.*, 2015; Agüero-Chapin *et al.*, 2016) und leitet somit den primären Schritt des mRNA-Abbaus ein. Die initiale Prozessierungsstelle in einem mRNA-Transkript kann daraufhin als erneuter Angriffspunkt für weitere Endoribonukleasen, wie zum Beispiel die Endoribonuklease E (RNase E), oder für Exoribonukleasen, wie die Polynukleotid-Phosphorylase (PNPase), genutzt werden. Die RNase E besitzt eine 5' Monophosphat Sensorregion, die das entstandene monophosphorylierte 5' Ende des RNA-Moleküls erkennt und das Enzym aktiviert (Abschnitt 1.4.1), sodass das mRNA-Transkript weiter prozessiert und degradiert wird. Die Interaktion einer sRNA mit dem kodierenden Bereich des mRNA-Transkripts kann jedoch auch den entgegengesetzten Effekt auf das RNA-Molekül haben, indem die Prozessierungsstelle einer Endoribonuklease maskiert und dadurch die mRNA stabilisiert wird. MicC ist eine *trans*-kodierte sRNA, die in *S. typhimurium* die Ziel-mRNA *ompD* ebenfalls in der kodierenden Sequenz bindet. Über einen Interaktionsbereich von 12 Nukleotiden wird eine RNase E-abhängige Prozessierung des *ompD* Transkripts initiiert und die mRNA anschließend abgebaut. Dies war das erste Beispiel für einen Mechanismus, bei dem eine sRNA nicht die Translationsinitiation inhibiert, sondern eine Prozessierung des mRNA-Transkripts auslöst (Pfeiffer *et al.*, 2009). Die sRNA MicC hat somit einen negativen Effekt auf die Stabilität der *ompD* mRNA. Einen entgegengesetzten Effekt hat die sRNA SrgS auf die mRNA *yigL*. Durch die sRNA-Interaktion wird das mRNA-Transkript vor einer Prozessierung durch die RNase E geschützt, sodass die mRNA in das Protein YigL translatiert wird, das die Homöostase des Glucose-Haushalts in *S. typhimurium* reguliert (Papenfort *et al.*, 2013).

Die Bindung einer sRNA an die Ziel-mRNA kann auch die Translation stimulieren. Zum Teil können die 5' UTRs von mRNAs komplexe Sekundärstrukturen annehmen, sodass die RBS für die 30S Untereinheit des Ribosoms maskiert wird. Die Bindung der sRNA in der hochstrukturierten 5' UTR kann entsprechend eine Strukturveränderung hervorrufen, sodass die RBS für die 30S Untereinheit zugänglich und die Translation initiiert wird (Waters & Storz, 2009). Eine der ersten sRNAs, die diesen Effekt zeigte, war die sRNA RyhB. RyhB ist eine sRNA, die in *E. coli* unter Eisen-limitierenden Bedingungen 20 mRNAs reguliert, die Eisen-Ionen als Co-Faktoren verwenden (Massé & Arguin, 2005).

Es zeigte sich jedoch, dass RyhB nicht nur die Translation inhibiert, sondern auch die Translation von *shiA* fördert. *shiA* kodiert eine Permease für Shikimat, eine Verbindung, die an der Siderophor-Synthese beteiligt ist (Prévost *et al.*, 2007). Eine weitere sRNA, die einen positiven Effekt auf die Translation besitzt, ist McaS. McaS fungiert in *E. coli* und *Salmonella* spp. als Regulator für die Motilität, indem sie beim Übergang von der exponentiellen in die stationäre Phase die Synthese des Flagellensystems aktiviert. Die Bindung der sRNA McaS an die *Leader*-Sequenz des *flhDC* Operons löst die Sekundärstruktur in der 5' UTR, sodass es zu einer erhöhten Translation der mRNA in die Proteine FlhD und FlhC kommt (Thomason *et al.*, 2012; Andreassen *et al.*, 2018).

1.2.4.3 Protein-bindende sRNAs

Typischerweise regulieren sRNAs durch die Ausbildung einer Duplexstruktur mit der entsprechenden Ziel-mRNA die Translation. Jedoch wurden in Bakterien auch sRNA identifiziert, die mit Proteinen interagieren und darüber indirekt die Transkription oder Translation beeinflussen.

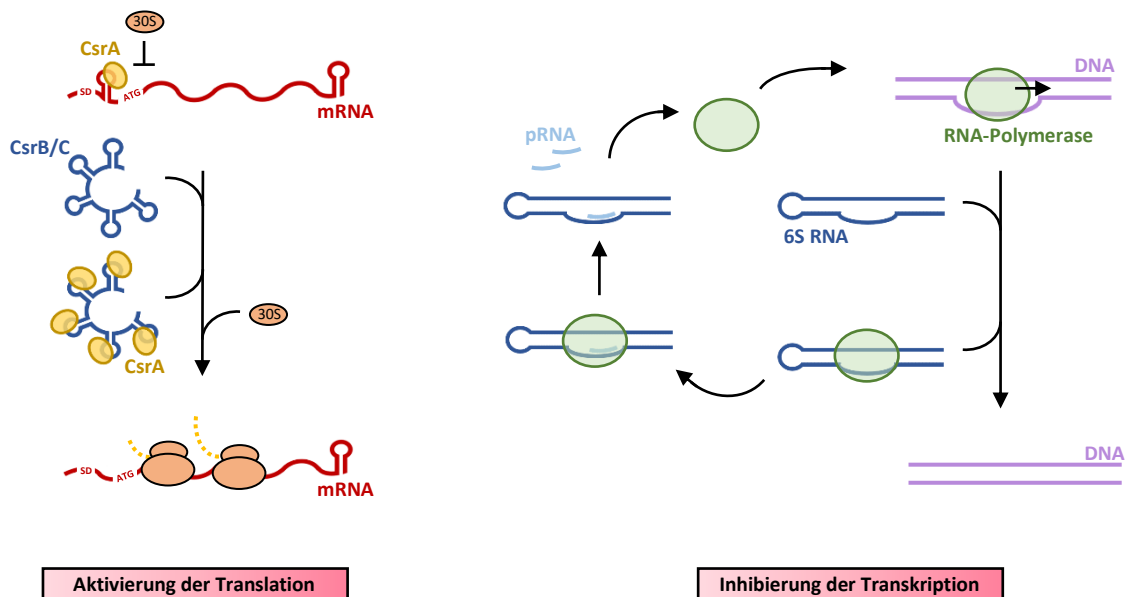


Abbildung 4: Funktionen Protein-bindender sRNAs. CsrB/C und die 6S RNA sind Protein-bindende sRNAs, die die Translation aktivieren oder die Transkription inhibieren können (modifiziert nach Waters & Storz, 2009).

Eine nicht kodierende RNA, die die Aktivität eines Proteins über dessen Bindung reguliert, ist in *E. coli*, *Erwinia* und *Yersinia* CsrB/RsmB (Liu *et al.*, 1997; Heroven *et al.*, 2012). Die RNAs CsrB/RsmB enthalten mehrere Bindungsstellen für das RNA-Bindeprotein CsrA/RsmA, das die Translation seiner Ziel-RNAs inhibiert. CsrA/RsmB reguliert posttranskriptionell die Expression von Genen der Glycogen-Biosynthese sowie die Expression extrazellulärer Enzyme und verschiedener Transkriptionsfaktoren, indem es die Bindung des Ribosoms an die mRNA verhindert oder deren Stabilität verringert. Durch Bindung von CsrA/RsmA an die nicht kodierende RNA CsrB/RsmB wird die mRNA für die Translation freigegeben (Romeo, 1998; Babitzke & Romeo, 2007).

Die 6S RNA ist eine der ersten sRNAs, die in *E. coli* identifiziert wurden (Brownlee, 1971). Sie ist eine nicht kodierende RNA, die mittlerweile in fast allen phylogenetischen Zweigen der Bakterien gefunden wurde (Wehner *et al.*, 2014; Steuten *et al.*, 2014). Die 6S RNA wird in *E. coli* vor allem beim Übergang von der exponentiellen in die stationäre Wachstumsphase exprimiert und besitzt eine konservierte Sekundärstruktur, die einer offenen DNA-Promotorstruktur ähnelt. Durch diese charakteristische Sekundärstruktur interagiert die RNA-Polymerase mit dem gebundenen *housekeeping* σ -Faktor (*core enzyme*) an der 6S RNA, jedoch nicht die RNA-Polymerase mit einem gebundenen alternativen σ -Faktor (Trotochaud & Wassarman, 2004, 2005; Wassarman, 2007). Dadurch wird die Transkription von vielen Genen, die in der exponentiellen Phase exprimiert werden, inhibiert und Gene für die stationäre Phase exprimiert. Nach Verlassen der stationären Phase kann die 6S RNA als Matrize für sogenannte *product* RNAs (pRNA) genutzt werden. Diese 14-20 Nukleotid lange pRNAs führen zu einer Strukturveränderung des 6S RNA-Polymerase Komplexes, sodass die RNA-Polymerase wieder freigesetzt wird (Cavanagh *et al.*, 2012; Hoch *et al.*, 2015). Die 6S RNA ist in der Gruppe der Bakterien sehr konserviert, sodass die meisten eine oder mehrere Gene der 6S RNA besitzen. *B. subtilis* kodiert zwei 6S RNA Paraloge (6S-1 und 6S-2), die beim Übergang von der exponentiellen in die stationäre Wachstumsphase und an der Sporulation beteiligt sind (Cavanagh & Wassarman, 2013; Li *et al.*, 2020; Thüring *et al.*, 2021). In dem phototrophen Bakterium *Rhodobacter sphaeroides* (*R. sphaeroides*) spielt die 6S RNA eine wichtige Rolle bei der Toleranz gegenüber Salzstress (Elkina *et al.*, 2017) und in Cyanobakterien an der Regeneration vom Stickstoffmangel (Heilmann *et al.*, 2017; Evguenieva-Hackenberg, 2021).

1.3 RNA-Bindeproteine in Bakterien

RNA-Bindeproteine (*RNA-binding proteins*; RBPs) haben eine Funktion in fast allen zellulären Prozessen und kommen in allen lebenden Organismen vor (Holmqvist & Vogel, 2018; Babitzke *et al.*, 2019; Ng Kwan Lim *et al.*, 2021). In Bakterien sind RBPs hauptsächlich ribosomalen Proteine und machen ungefähr 30 % aller 180 annotierten RBPs aus (Smirnov *et al.*, 2016), während in Eukaryoten nur ungefähr 10 % der 1.500 annotierten RBPs ribosomale Proteine sind (Hentze *et al.*, 2018). RBPs können in dem Ribosom eine strukturgebende Funktion besitzen, während andere RBPs auch an der Transkription, der RNA-Modifikation, der Translation, der RNA-Prozessierung oder dem -Abbau beteiligt sein können (Holmqvist & Vogel, 2018).

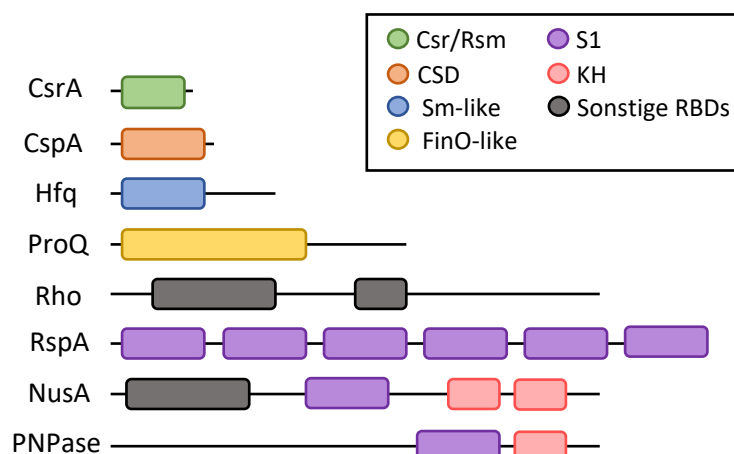


Abbildung 5 Übersicht über RNA-Bindedomänen (RNA-binding-domain; RBD). Gezeigt ist eine Auswahl gut charakterisierter und bekannter RBPs in variabler Länge (Anzahl an Aminosäuren) und Anzahl an RNA-Bindedomänen gezeigt (modifiziert nach Holmqvist & Vogel, 2018).

Die Erkennung des entsprechenden RNA-Transkripts wird über eine sogenannte RNA-Bindedomäne (*RNA-binding-domain*; RBD) in dem RBP vermittelt. Die RBD erkennen eine kurze, spezifische Sequenz oder Struktur in dem RNA-Molekül, wobei die Interaktion zwischen Protein und RNA-Molekül über die Base, den Zucker oder das Phosphat-Rückgrat durch Wasserstoffbrückenbindungen oder van-der-Waals Kräfte vermittelt wird (Teplova *et al.*, 2011; Corley *et al.*, 2020). Zu den klassischen RNA-Bindedomänen in Bakterien gehören die S1-Domäne (Hajnsdorf & Boni, 2012), die *cold-shock*-Domäne (CSD) (Chaikam & Karlson, 2010), die Sm oder Sm-like Domäne (Updegrove *et al.*, 2016), die K Homologe (KH) Domäne (Nicastro *et al.*, 2015), das RNA *recognition motif* (RRM) (Koonin & Makarova, 2013) und die doppelsträngige RNA-Bindedomäne (dsRBD) (Masliah *et al.*, 2013). Die Größe und die Anzahl der RBDs kann sich dabei je nach RBP unterscheiden (Abbildung 5). Auch in ihrer spezifischen Erkennungssequenz und -struktur unterscheiden sich die einzelnen RBDs voneinander. Einige RBPs besitzen nur eine einzelne RBD, während andere mehrere Kopien der gleichen oder verschiedene Domänen besitzen (Abbildung 5; Helder *et al.*, 2016).

Wie schon erwähnt, können RBPs an unterschiedlichen zellulären Funktionen beteiligt sein. In diesem Abschnitt werden einige wichtige Vertreter der RBPs aus Prokaryoten im Kontext unterschiedlicher zellulärer Prozesse beschrieben. Hinsichtlich ihres Einflusses auf regulatorische RNAs (sRNAs) werden die RBPs Hfq und ProQ in dem Abschnitt 1.3.2.1 näher beschrieben.

1.3.1 Regulation der Transkription

RNA-Bindeproteine (RBP), die die Transkription regulieren, steuern entweder die Freisetzung der RNA-Polymerase oder verhindern eine vorzeitige Termination der Transkription. Eins der bekanntesten Proteine, welches ein RBP ist und die Termination der Transkription reguliert, ist Rho. Das Protein bildet einen homohexameren Ringkomplex aus, der zwei RNA-Bindestellen in jedem Monomer besitzt. Rho ist ein essentielles Protein in Bakterien und terminiert in *E. coli* über 25 % aller Operons (Cardinale *et al.*, 2008; Ray-Soni *et al.*, 2016). Die Termination durch Rho wird über die Erkennung einer sogenannten *rut* Sequenz (*Rho utilization*) in dem RNA-Transkript initiiert. Wie jedoch die genaue Erkennung und Termination von Rho vonstattengeht, ist noch nicht bekannt (Mitra *et al.*, 2017). Man geht davon aus, dass durch Rho eine Strukturveränderung in der *rut* Sequenz induziert wird, die die RNA-DNA Bindung in der RNA-Polymerase destabilisiert und so die RNA-Polymerase freisetzt. NusA ist dabei ein Antagonist zu Rho und fungiert auf ähnlicher Weise in Gram-positiven Bakterien (Qayyum *et al.*, 2016; Mondal *et al.*, 2016).

Einen entgegengesetzten Effekt zur Termination der Transkription rufen sogenannte *cold-shock* Proteine (CSPs) hervor, indem sie über die *cold-shock* Domäne (CSD) als Antiterminator fungieren (Holmqvist & Vogel, 2018). CSPs sind kleine Proteine von nur ungefähr 70-80 Aminosäuren, die ubiquitär in Prokaryoten und Eukaryoten vorkommen (Amir *et al.*, 2018). Während der Transkription können sich vor allem bei niedrigen Temperaturen Sekundärstrukturen in dem RNA-Molekül ausbilden, die die Transkription verlangsamen oder terminieren. Durch die Bindung von CSP an eine solche Sekundärstruktur wird diese aufgehoben und somit die Transkription weitergeführt oder

beschleunigt (Chaikam & Karlson, 2010). Einer der bekanntesten Vertreter RNA-bindender *cold-shock* Proteine ist CspA, welches die Transkription nach einem Kälteschock in der Zelle fördert (Bae *et al.*, 2000). In *Salmonella enterica* und *Staphylococcus aureus* wird durch CspA die Stabilität einiger RNA-Transkripte sowie die Aktivität der Virulenz reguliert (Michaux *et al.*, 2017; Caballero *et al.*, 2018).

1.3.2 Regulation der Translation

Im Gegensatz zu RBPs, die die Transkription beeinflussen, haben die meisten RBPs einen Effekt auf Ebene der Translation. Durch die Bindung von RBPs an die mRNA kann die RBS verdeckt oder strukturell verändert werden, sodass die Initiation der Translation durch die 30S Untereinheit des Ribosoms verhindert wird. Außerdem können einige RBPs, wie zum Beispiel Hfq oder ProQ, sRNAs zur mRNA rekrutieren oder ihre Stabilität beeinflussen.

RBPs mit einer Csr/Rsm Domäne sind innerhalb der Bakterien hoch konserviert, obwohl sie teilweise keine homologen Aktivitäten oder Bindungspartner besitzen (Zere *et al.*, 2015). Die Csr/Rsm Proteine besitzen eine singuläre RBD, die ungefähr 7 kDa groß ist (Holmqvist & Vogel, 2018). Das am besten untersuchte Protein mit einer Csr/Rsm-Domäne ist CsrA, welches zuerst in *E. coli* identifiziert wurde und in der 5' UTR von *glgC* bindet (Romeo *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 1995). Über die Bindung des Proteins an die 5' UTR des mRNA-Transkripts wird die Translation inhibiert und somit die Produktion von Glykogen reguliert (Liu & Romeo, 1997; Baker *et al.*, 2002). Heute weiß man, das RBP mit einer Csr/Rsm-Domäne in verschiedenen Gram-negativen Bakterien an die 5' UTR von über hundert verschiedenen mRNA-Molekülen binden können und darüber die Translation beeinflussen (Holmqvist *et al.*, 2016; Potts *et al.*, 2017).

Weitere Proteine, die die Translation direkt oder indirekt beeinflussen, sind Hfq und ProQ. Beides sind RBPs, die vor allem regulatorische, *trans*-kodierte RNAs binden und die Bildung von sRNA-mRNA Duplex-Strukturen fördern.

1.3.2.1 RNA-Chaperone Hfq und ProQ

Regulatorische RNAs beeinflussen die bakterielle Physiologie durch die Kontrolle der mRNA-Transkription, -Translation und -Stabilität auf unterschiedlichste Weise. Ein großes Feld der regulatorischen RNAs nehmen mittlerweile die sRNAs ein, deren Mechanismus im Abschnitt 1.2.4 genauer beschrieben wurde. In Bakterien sind sRNAs oft mit RBPs assoziiert, die zum einen die Stabilität der sRNAs aber auch ihre regulatorische Effizienz bestimmen (Quendera *et al.*, 2020). Zu den RBPs, die sich in den letzten Jahrzehnten als Schlüssel zum Verständnis sRNA-vermittelter Funktionen erwiesen haben, gehören Hfq und ProQ (Franze de Fernandez *et al.*, 1968; Møller *et al.*, 2002; Olejniczak & Storz, 2017; Hör *et al.*, 2020).

Das RBP Hfq wurde 1960 in *E. coli* als essentieller Faktor des Bakteriophagen Q β identifiziert (Hfq; *host factor of the RNA bacteriophage Q β*) (Franze de Fernandez *et al.*, 1968) und später als Nukleinsäure-bindendes Protein mit einer starken Präferenz für AU-reiche, einzelsträngige RNAs beschrieben (Franze de Fernandez *et al.*, 1972; Hori & Yanazaki, 1974; Carmichael *et al.*, 1975; Haseh & Uhlenbeck,

1980). Mittlerweile ist bekannt, dass Hfq eine globale Funktion in bakteriellen Zellen ausübt und ein Schlüsselprotein des RNA-Metabolismus ist (Vogel & Luisi, 2011). In Gram-negativen Bakterien vermittelt Hfq die Komplexbildung von *trans*-kodierter sRNA und Ziel-mRNA, was auch Nicht-Watson-Crick-Basenpaarungen einschließt (Quendera *et al.*, 2020). Außerdem kann Hfq mit weiteren Proteinen assoziiert sein, die vor allem am RNA-Abbau beteiligt sind. Dazu gehören unter anderem die RNase E, die PNPase und die Poly(A) Polymerase (Le Derout *et al.*, 2003; Mohanty *et al.*, 2004; Morita *et al.*, 2005). In Gram-positiven Bakterien ist das Substratspektrum von Hfq erweitert. In dieser Gruppe der Bakterien kann Hfq auch mit rRNAs, tRNAs und DNA-Molekülen interagieren (Andrade & Arraiano, 2008; Lee & Feig, 2008; Cech *et al.*, 2016).

Das Protein Hfq ist strukturell sehr ähnlich zu den eukaryotischen und archaealen Sm- oder Sm-like-Proteinen (Sm/LSm) und gehört deshalb auch der Sm/LSm-Proteinfamilie an. In Eukaryoten spielen Sm/LSm-Proteine eine zentrale Rolle im Mechanismus des mRNA-*splicings* und dienen als Chaperon für kleinere RNAs, wie zum Beispiel tRNA-Vorläufer und rRNA-Transkripte (Wilusz & Wilusz, 2005; Mura *et al.*, 2013). Prokaryotische Hfq-Proteine umfassen 65-100 Aminosäuren pro Monomer, die eine α -Helix und fünf β -Stränge ausbilden. Sechs Monomere bilden einen hexameren Ringkomplex. Untersuchungen zur Substratinteraktion des Hfq-Hexamers zeigten, dass Hfq die entsprechenden RNA-Moleküle an unterschiedlichen Bereichen der Proteinstruktur bindet. Diese Bereiche werden in die proximale und distale Seite eingeteilt (Link *et al.*, 2009). Die proximale Oberfläche des Proteins präferiert einzelsträngige, Uracil-reiche Abschnitte des RNA-Transkripts (Mikulecky *et al.*, 2004), die besonders in sRNAs mit Rho-unabhängigen Terminatoren zu finden sind (Otaka *et al.*, 2011; Ishikawa *et al.*, 2012). Die distale Oberfläche des Hexamers bevorzugt hingegen RNA-Transkripte mit Oligo(A)-Motiven wie ARN, ARNN (R = Purin; N = A, C, G oder U) oder AAYAAYAA (Y = Pyrimidin) (Link *et al.*, 2009; Lorenz *et al.*, 2010). Zu diesen RNA-Transkripten gehören überwiegend mRNAs. Dennoch sollte die proximale Oberfläche nicht direkt als „sRNA-bindender Bereich“ und die distale Oberfläche nicht als „mRNA bindender Bereich“ bezeichnet werden, da sRNAs durchaus mit beiden Bereichen des Hfq-Hexamers interagieren können (Fender *et al.*, 2010). Die sRNAs, die an Hfq binden, werden je nach Interaktionsbereich (proximal oder distal) in zwei unterschiedliche Klassen eingeteilt. Die Klasse I der sRNAs bindet proximal an das Protein und interagiert mit einer mRNA, die distal gebunden ist. Bei der Klasse II bindet die sRNA distal oder proximal an den Komplex und interagiert mit einer mRNA, die nur am Rand des Hfq-Hexamers gebunden ist (Panja *et al.*, 2013; Schu *et al.*, 2015).

Ein weiteres RBP, das eine wichtige Funktion im RNA-Metabolismus einiger Bakterien ausübt und in den letzten Jahren verstärkt charakterisiert wurde, ist ProQ (Smirnov *et al.*, 2016; Smirnov *et al.*, 2017b). Der erste Hinweis, dass ProQ ein RBP sein könnte, ergab sich aus der Kristallstruktur des Proteins FinO (Fertilitätsinhibitor O), die optimal zu der N-terminalen Struktur von ProQ passt (Olejniczak & Storz, 2017). *In vivo* Untersuchungen zu den RNA-bindenden Eigenschaften bzw. dem Interaktom von ProQ (Co-Immunopräzipitationen) zeigten, dass das Protein mit mehr als 50 verschiedenen sRNAs oder mRNAs interagiert (Holmqvist *et al.*, 2018). Im Gegensatz zu Hfq und CsrA (Präferenz für die 5'-proximalen Bereiche von RNA-Transkripten) bindet ProQ in *S. enterica* und *E. coli* präferenziell doppelsträngige RNA-Strukturen ohne Sequenzspezifität im 3'-Endbereich (Holmqvist *et al.*, 2018; Holmqvist *et al.*, 2020). Dies sind vor allem RNA-Transkripte des Typ I Toxin-Antitoxin-Systems, zu dem auch IstR-1/*tisB* gehören (Arthur *et al.*, 2011). Das Interaktom von ProQ zeigt zudem

keine oder nur geringe Ähnlichkeiten zu dem RBP von Hfq, infolgedessen ProQ als neues RBP klassifiziert wurde (Smirnov *et al.*, 2016; Smirnov *et al.*, 2017b).

1.4 RNA-Prozessierung und -Degradation zur Regulation der Genexpression

Neben der Transkriptionsrate einer mRNA spielen vor allem der RNA-Abbau bzw. die Stabilität eines RNA-Transkripts wichtige Rollen im RNA-Stoffwechsel bakterieller Zellen. RNA-Prozessierung und -Abbau sind dabei nicht nur wichtig für das „Recyclen“ von RNA-Transkripten und Oligonukleotiden, sondern auch für die Anpassung der Zelle an wechselnde Umwelt- und Wachstumsbedingungen. Somit kann der RNA-Abbau einen wichtigen Beitrag auf der Ebene der posttranskriptionellen Genregulation leisten. Die Stabilität eines mRNA-Transkripts und dessen Verfügbarkeit für die Translation kann durch verschiedene Faktoren bestimmt werden: 1. Sequenz und strukturelle Eigenschaften des RNA-Transkripts, 2. RNA-Bindeproteine und zellspezifische Ribonukleasen und 3. regulatorische RNA-Elemente (Evgenieva-Hackenberg & Klug, 2011).

Die Stabilität eines RNA-Transkripts beeinflusst dabei maßgeblich seine Translationsrate. In Eukaryoten kann die Halbwertszeit einer mRNA mehreren Stunden bis Tage betragen, während sie bei Prokaryoten meist nur bei wenigen Minuten liegt (Rauhut & Klug, 1999; Bernstein *et al.*, 2002). Je stabiler ein RNA-Molekül ist, desto öfters kann dieses für die Translation verwendet werden. In Bakterien sind die mRNAs oft polycistronisch und besitzen im Gegensatz zu Eukaryoten keine komplexen posttranskriptionellen Modifikationen, wie zum Beispiel die Cap-Struktur am 5' Ende oder der Poly(A)-Bereich (200 nt) am 3' Ende, die die mRNA stabilisieren (Jackson *et al.*, 2010). Die mRNA-Transkripte in Bakterien haben meistens als stabilisierende Elemente nur ein Triphosphat am 5' Ende und eine Rho-unabhängige Terminations-Haarnadelschleife am 3' Ende. Darüber hinaus können prokaryotische mRNAs jedoch weitere Haarnadelschleifen im Transkript besitzen, die die RNA vor einem ribonukleolytischen Abbau schützen (O'Hara *et al.*, 1995; Rauhut & Klug, 1999; Régnier & Arraiano, 2000). Poly(A)-Bereiche in prokaryotischen RNA-Transkripten haben im Gegensatz zu eukaryotischen mRNAs einen destabilisierenden Effekt auf das RNA-Molekül (Dreyfus & Régnier, 2002). Für den Abbau eines RNA-Moleküls sind sowohl in Pro- als auch Eukaryoten Ribonukleasen verantwortlich.

Ribonukleasen (RNasen) spielen eine entscheidende Rolle im RNA-Metabolismus und kommen in allen Lebensformen vor. Sie katalysieren die Prozessierung bzw. den Abbau von RNA-Molekülen, indem sie die Phosphodiester-Bindung zwischen zwei Nukleotiden in einem RNA-Molekül hydrolytisch oder phosphorolytisch spalten (Kaberdin *et al.*, 2011). Bei der hydrolytischen Spaltung eines RNA-Moleküls fungiert eine aktivierte 2'-OH-Gruppe einer Ribose oder ein aktiviertes Wassermolekül als Nukleophil, während bei der phosphorolytischen Spaltung Orthophosphat die Rolle des Nukleophils übernimmt. RNasen, die diese Reaktionen katalysieren, lassen sich zusätzlich in Endo- und Exoribonukleasen unterteilen. Endoribonukleasen fördern eine interne Spaltung des RNA-Moleküls durch eine hydrolytische Reaktion. Exoribonukleasen hingegen katalysieren durch phosphorolytische Spaltung den Abbau von RNA-Molekülen vom 5' oder 3' Ende her, wobei Nukleosiddiphosphate als Produkte freigesetzt werden (Belasco, 2010; Mackie, 2013). Die Anzahl von RNasen kann sich je nach Art des Bakteriums unterscheiden, wobei einige RNasen ubiquitär in fast allen Bakterien vorkommen, während andere nur in bestimmten Gruppen von Bakterien zu finden sind.

1.4.1 RNase E als zentrales Enzym des RNA-Abbaus

In dem Gram-negativen Bakterium *E. coli* sind 21 unterschiedliche Endo- und Exoribonukleasen identifiziert worden, von denen jedoch nur drei essentiell für das Bakterium sind. Zu den essentiellen RNasen gehören die RNase P, die als Ribozym die maturen 5' Enden von tRNAs generiert (Esakova & Krasilnikov, 2010), die Oligo-RNase, die in der späten Phase des RNA-Abbaus die entstandenen Oligonukleotide in einzelne Mononukleotide umwandelt (Ghosh & Deutscher, 1999), und die RNase E, die eine zentrale Funktion in der rRNA-Reifung und im mRNA-Abbau besitzt (Misra & Apirion, 1979; Garrey & Mackie, 2011; Mackie, 2013). In Gram-positiven Bakterien, zu denen *B. subtilis* gehört, besteht bezüglich der Funktion der unterschiedlichen RNasen noch Klärungsbedarf. *B. subtilis* besitzt 18 unterschiedliche Endo- und Exoribonukleasen, von denen fünf essentiell sind. Die RNase Y übernimmt dabei eine ähnliche Funktion wie die RNase E in Gram-negativen Bakterien (Mäder *et al.*, 2008; Lehnik-Habrink *et al.*, 2011; Durand *et al.*, 2012).

Die RNase E wurde in *E. coli* als Enzym identifiziert, das die Prozessierung bzw. Reifung der 5S rRNA durchführt (Ghora & Apirion, 1978; Misra & Apirion, 1979). Heute ist bekannt, dass die RNase E auch an der Prozessierung der 16S rRNA und vieler tRNA-Vorläufer sowie an der Degradation von mRNA- und sRNA-Transkripten beteiligt ist (Ghora & Apirion, 1978; Misra & Apirion, 1979). Die RNase E ist in Gram-negativen Bakterien ubiquitär und nimmt demzufolge eine zentrale Rolle im RNA-Abbau ein (Miczak *et al.*, 1996).

Das katalytisch aktive Enzym der RNase E bildet ein Tetramer aus vier einzelnen Rne Molekülen, welches die Hauptkomponente eines Membran-assoziierten, multimeren Proteinkomplexes, ist (Carpousis, 2007; Górna *et al.*, 2012). Ein Rne Monomer besitzt 1061 Aminosäuren und lässt sich funktionell in zwei Bereiche einteilen: den globulären, N-terminalen Bereich (Aminosäuren 1-529) und den unstrukturierten, C-terminalen Bereich (Aminosäuren 530-1061) (Callaghan *et al.*, 2005a; Mackie, 2013). Der N-terminale Bereich ist endonukleolytisch aktiv und hydrolysiert RNA-Moleküle (Liou *et al.*, 2001; Khemici *et al.*, 2008). Er lässt sich nochmal in eine große (Aminosäuren 1-400) und eine kleine (Aminosäuren 415-529) Domäne unterteilen. Über den N-terminalen Bereich wird die Interaktion zwischen zwei Rne Monomeren ausgebildet, die über ein Zink-Ion stabilisiert wird. Das Dimer interagiert wiederum über die kleine Domäne mit einem weiteren Dimer, was zur Bildung des tetrameren Proteinkomplex führt (Callaghan *et al.*, 2005b; Mackie, 2013). Außerdem bilden die Aminosäuren Arg169, Thr170 und Val128 im N-terminale Bereich des Enzyms einen 5' Phosphat Sensor, der ein Monophosphat am 5' Ende des RNA-Moleküls erkennen und binden kann (Jiang *et al.*, 2000; Garrey *et al.*, 2009). Die katalytische Aktivität der RNase E wird über die DNase I-ähnliche Domäne im N-terminalen Bereich des Enzyms vermittelt (Callaghan *et al.*, 2005a).

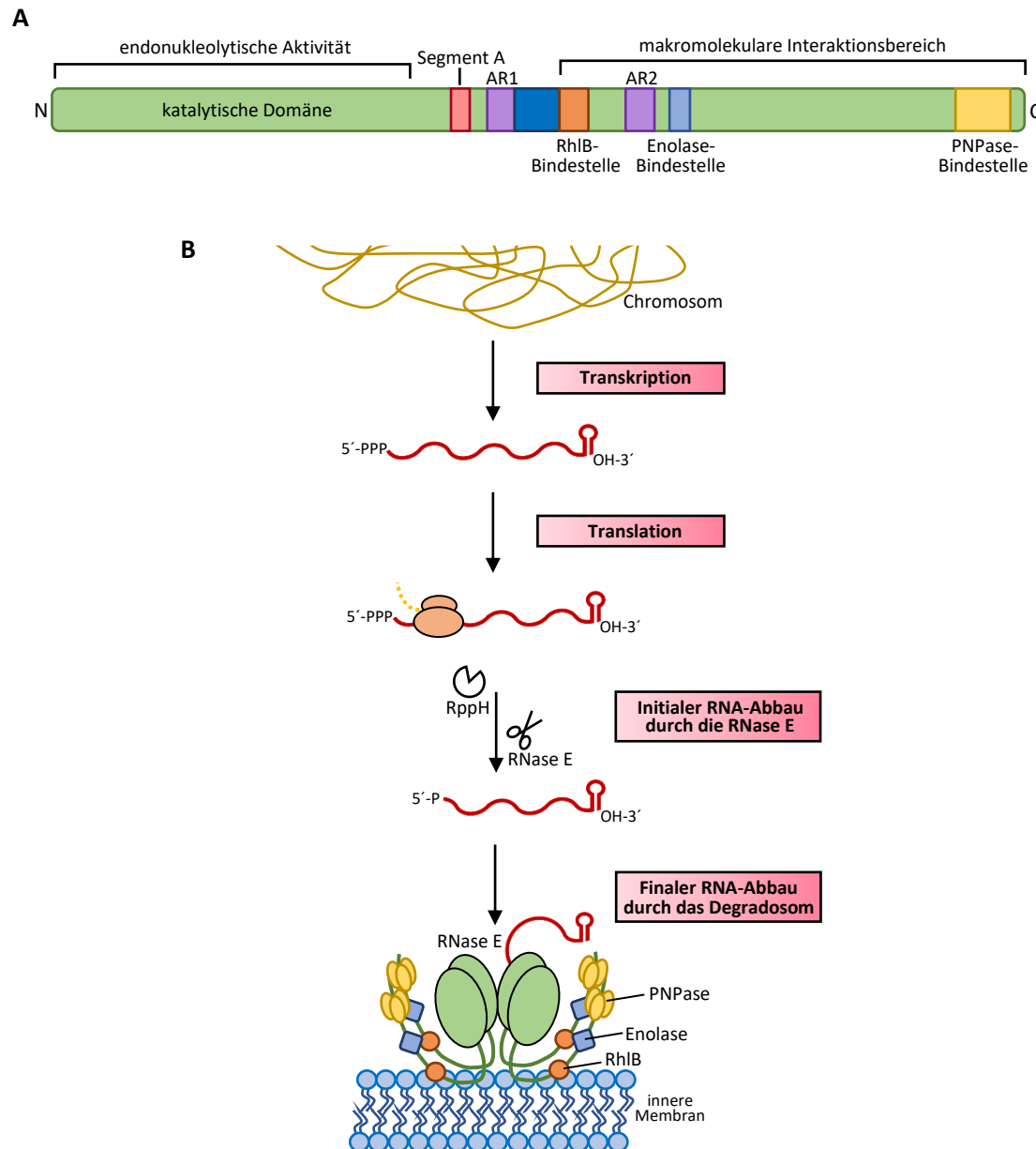


Abbildung 6: Aufbau und Funktion der RNase E. (A) Die Primärstruktur der RNase E besteht aus einer katalytisch aktiven Domäne (Aminosäuren 1-529), die für den Abbau der RNA-Transkripte notwendig ist, und einem makromolekularen Interaktionsbereich (Aminosäuren 530-1061). Der makromolekulare Interaktionsbereich besitzt Bindungsstellen für verschiedene Proteine: Segment A (Membran-bindende Domäne), AR1 und AR2 (Arginin-reiche Bereiche, die möglicherweise für eine RNA-Bindung notwendig sind), RhIB-Bindestelle (Helikase), Enolase-Bindestelle und Polynukleotid-Phosphorylase-Bindestelle (PNPase). (B) mRNA-Transkripte werden transkribiert und im Zytosol translatiert. Interne und externe Einflüsse können den Abbau von RNA-Transkripten durch die RNA-Pyrophosphohydrolase (RppH) und die Endoribonuklease E (RNase E) initialisieren. Die RNA-Fragmente können anschließend weiter durch das Degradosom, bestehend aus der RNase E, RhIB, der Enolase und der Polynukleotid-Phosphorylase (PNPase), in Oligo- und Mononukleotide abgebaut werden (modifiziert nach Mackie, 2013).

Das katalytisch aktive Enzym der RNase E bildet ein Tetramer aus vier einzelnen Rne Molekülen, welches die Hauptkomponente eines Membran-assoziierten, multimeren Proteinkomplexes, ist

(Carpousis, 2007; Górna *et al.*, 2012). Ein Rne Monomer besitzt 1061 Aminosäuren und lässt sich funktionell in zwei Bereiche einteilen: den globulären, N-terminalen Bereich (Aminosäuren 1-529) und den unstrukturierten, C-terminalen Bereich (Aminosäuren 530-1061) (Callaghan *et al.*, 2005a; Mackie, 2013). Der N-terminale Bereich ist endonukleolytisch aktiv und hydrolysiert RNA-Moleküle (Liou *et al.*, 2001; Khemici *et al.*, 2008). Er lässt sich nochmal in eine große (Aminosäuren 1-400) und eine kleine (Aminosäuren 415-529) Domäne unterteilen. Über den N-terminalen Bereich wird die Interaktion zwischen zwei Rne Monomeren ausgebildet, die über ein Zink-Ion stabilisiert wird. Das Dimer interagiert wiederum über die kleine Domäne mit einem weiteren Dimer, was zur Bildung des tetrameren Proteinkomplex führt (Callaghan *et al.*, 2005b; Mackie, 2013). Außerdem bilden die Aminosäuren Arg169, Thr170 und Val128 im N-terminale Bereich des Enzyms einen 5' Phosphat Sensor, der ein Monophosphat am 5' Ende des RNA-Moleküls erkennen und binden kann (Jiang *et al.*, 2000; Garrey *et al.*, 2009). Die katalytische Aktivität der RNase E wird über die DNase I-ähnliche Domäne im N-terminalen Bereich des Enzyms vermittelt (Callaghan *et al.*, 2005a).

Es hat sich gezeigt, dass die RNase E eine Präferenz für einzelsträngige, AU-reiche Bereiche besitzt, die in Nachbarschaft zu einer Haarnadelschleife liegen. Durch die Spaltung der Phosphodiester-Bindung eines RNA-Transkripts entsteht ein 5' Monophosphat in dem RNA-Molekül, welches erneut von dem 5' Phosphat-Sensorbereich der RNase E erkannt werden kann (McDowall *et al.*, 1995). Der C-terminale Bereich des Enzyms ist hingegen unstrukturiert und dient vor allem der Interaktion mit anderen Enzymen und der inneren Membran der Zelle. Die AR1- und AR2-Bereiche sind sehr Arginin-reich und ermöglichen die Interaktion des Proteins mit dem RNA-Molekül. Außerdem besitzt der C-terminale Bereich Regionen, die die zur Interaktionen mit der katalytisch aktiven DEAD-Box Helikase Rhlb, dem glykolytische Enzym Enolase und der Polynukleotid-Phosphorylase (PNPase) vermitteln (Miczak *et al.*, 1996; Py *et al.*, 1996). Der entstehende multimere Proteinkomplex wird als Degradosom bezeichnet und besitzt eine Schlüsselrolle im RNA-Metabolismus. Die DEAD-Box Helikase Rhlb sorgt unter ATP-Verbrauch für die Entwindung helikaler RNA-Strukturen, die bei RNA:RNA-Interaktionen entstehen (Liou *et al.*, 2002). Die PNPase ist eine 3' Exoribonuklease, die entweder ein RNA-Moleküle phosphorolytisch spaltet oder Polynukleotide an das 3' Ende eines RNA-Transkripts synthetisiert (Carpousis, 2007; Briani *et al.*, 2016). Die Funktion der Enolase im Degradosom ist nicht genau bekannt, allerdings wurden Effekte des Proteins auf den Abbau spezifischer RNA-Transkripte beobachtet (Górna *et al.*, 2012). Der Aufbau des Degradosoms über die RNase E ist in der Gruppe der Proteobakterien stark konserviert, wobei die Zusammensetzung der einzelnen Komponenten des Proteinkomplexes unterschiedlich sein kann (Kaberdin *et al.*, 2011). In *Rhodobacter capsulatus* (*R. capsulatus*) ist das Degradosom neben der RNase E als zentrales Enzym aus zwei DEAD-box RNA-Helikasen und dem Terminations-Faktor Rho aufgebaut (Jäger *et al.*, 2001). In *Caulobacter crescentus* besteht das Degradosom aus der RNase E, der RNA Helikase, der PNPase und der Aconitase (Hardwick *et al.*, 2011) und in *Pseudomonas syringae* aus der RNase E, der RNA-Helikase und der RNase R (Purusharth *et al.*, 2005).

Die cytosolische Konzentration und die Aktivität der RNase E unterliegen in einer Bakterienzelle komplexen Regulationsmechanismen. Die Konzentration der RNase E wird über die eigene mRNA (*rne*) reguliert, die als Sensor für eine Akkumulation des Enzyms dient. Wenn zuviel der RNase E vorhanden ist, wird die *rne* mRNA bevorzugt von der RNase E abgebaut und begrenzt somit ihre eigene Translation

(Jain & Belasco, 1995). Die Aktivität der RNase E kann jedoch nur indirekt durch RBPs oder sRNA beeinflusst werden (Mackie, 2013). Die Bindung von RBPs oder sRNAs an einer RNA verändert die Struktur des Transkripts, sodass die Spaltung des RNA-Moleküls durch die RNase E beschleunigt oder erschwert wird (Massé *et al.*, 2003; Morita *et al.*, 2005).

1.4.2 RNA-Prozessierung und -Degradation

In Prokaryoten werden rRNAs und tRNAs in mehreren Schritten aus Vorläufertranskripten zu funktionsfähigen („reifen“) RNA-Molekülen prozessiert. Ihr Abbau verläuft ebenfalls in mehreren Schritten. mRNAs und sRNAs durchlaufen hingegen weniger Maturierungsschritte und werden für ihre Inaktivierung direkt abgebaut (Deutscher, 2003, 2006). Die Ribonukleasen, die an der Prozessierung von rRNAs und tRNAs und an der Degradation von mRNAs und sRNAs beteiligt sind, sind jedoch in den meisten Fällen die gleichen und erfüllen somit wichtige Funktionen in dem komplexen Netzwerk der Genregulation. Der Abbau von RNA-Molekülen kann durch interne oder externe Einflüsse gesteuert werden, sodass es zu einer Veränderung der Genexpression und des resultierenden Proteoms kommt. Ein RNA-Transkript muss für den Abbau initial gespalten werden, damit es für die entsprechenden Exoribonukleasen zugänglich wird. Wie schon im vorhergehenden Abschnitt beschrieben, nimmt die RNase E in *E. coli* und anderen Gram-negativen Bakterien eine zentrale Funktion im RNA-Metabolismus ein. Für den initialen Abbau von RNA-Transkripten durch die RNase E sind mehrere mögliche RNA-Degradationswege beschrieben. Ein Mechanismus verläuft über die Erkennung einer 5′ Monophosphatgruppe in dem Ziel-Transkript (*5′ end-dependent pathway*), während der zweite Mechanismus unabhängig von einem 5′ Monophosphat ist (*direct entry pathway*; Laalami *et al.*, 2014).

In dem *5′ end-dependent pathway* ist die starke Präferenz der RNase E für ein 5′ monophosphoryliertes RNA-Substrat ausschlaggebend, um den Abbau von mRNA-Transkripten einzuleiten (Mackie, 1998; Jiang *et al.*, 2000). Das zunächst in einem RNA-Primärtranskript vorhandene 5′ Triphosphat wird durch die Abspaltung eines Pyrophosphats (PPi) in ein 5′ Monophosphat umgewandelt, katalysiert durch die RNA-Pyrophosphohydrolase (RppH), die mit eukaryotischen *Decapping*-Enzymen verwandt ist (Deana *et al.*, 2008). Das monophosphorylierte 5′ Ende des RNA-Moleküls kann nun über den Sensorbereich der RNase E gebunden werden, um eine Spaltung des Transkripts weiter *downstream* zu initiieren. Das Enzym RppH hat somit einen Einfluss auf die Stabilität von RNA-Transkripten (Deana *et al.*, 2008). Bei dem *direct entry pathway*, der sowohl im Kontext des mRNA-Abbaus als auch bei der tRNA-Prozessierung nachgewiesen wurde, ist der initiale Prozessierungsschritt in einem RNA-Transkript unabhängig von dem Enzym RppH und der Struktur des 5′ Endes der RNA (Mackie, 2013). Dieser Mechanismus wird wirksam, wenn das 5′ Ende eines RNA-Transkripts eine stabile Haarnadelschleife ausbildet. Dadurch wird die katalytische Aktivität des Enzyms RppH inhibiert, sodass die RNase E über den *direct entry pathway* agiert (Bouvet & Belasco, 1992; Baker & Mackie, 2003). Alternativ können auch andere RNasen den RNA-Abbau einleiten, wie zum Beispiel die RNase III über spezifische Erkennungsmerkmale in der RNA-Sequenz. Die RNase III kommt ubiquitär in allen Bakterien vor und ist die einzige bakterielle RNase, die doppelsträngige RNA schneidet (Conrad *et al.*, 1998; Lamontagne *et al.*, 2001).

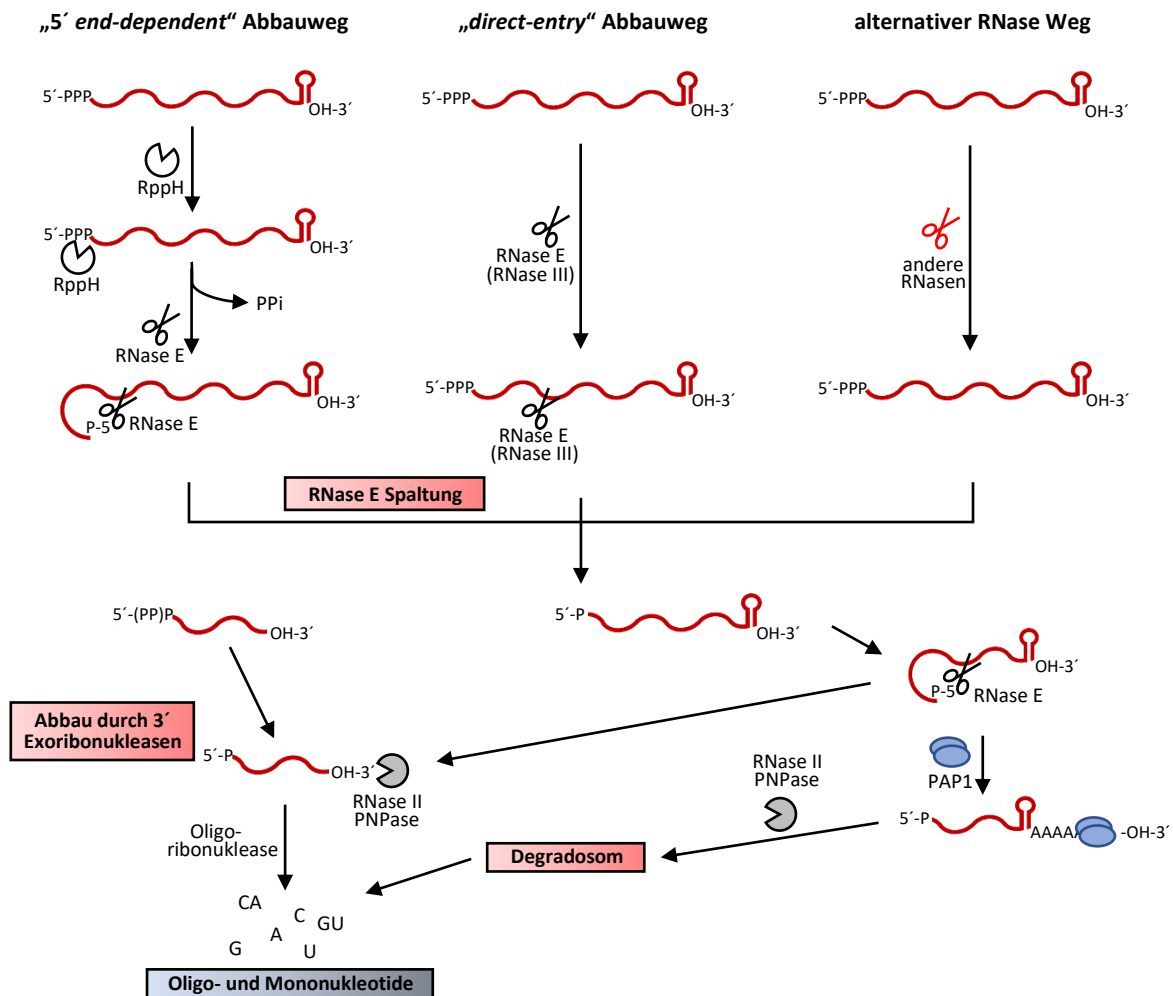


Abbildung 7: mRNA-Abbau in *E. coli* nach initialer Spaltung durch RNase E. Der RNA-Abbau in *E. coli* kann über mehrere Wege initiiert werden. Bei dem „5' end-dependent“ Abbauweg wird in einem ersten Schritt ein Pyrophosphat (PPi) durch die RNA-Pyrophosphohydrolase (RppH) vom RNA-Transkript entfernt, sodass ein Monophosphat am 5' Ende entsteht. Das Monophosphat am 5' Ende des RNA-Transkripts dient anschließend als Signal für eine initiale Spaltung durch RNase E. Bei dem „direct-entry“ Abbauweg verläuft die initiale Spaltung der RNase E (auch durch die RNase III möglich) unabhängig von dem 5' Monophosphat. Nach der initialen Spaltung der RNase E können die RNA-Fragmente weiter durch die RNase E prozessiert werden und vom 3' Ende her exoribonukleolytisch durch die RNase II oder PNPase in Oligo- und Mononukleotide abgebaut werden. RNA-Transkripte mit stabilisierenden Sekundärstrukturen am 3' Ende werden durch die Poly(A)-Polymerase 1 (PAP1) in einem weiteren Schritt zuerst polyadenyliert, damit sie für Exoribonukleasen wieder zugänglich werden und schließlich über das Degradosom abgebaut werden können (modifiziert nach Mackie, 2013).

Wie vorher beschrieben wird ein RNA-Transkript durch einen Rho-unabhängigen Terminator am 3' Ende vor dem Abbau durch Exoribonukleasen geschützt. Die initiale Prozessierung des RNA-Transkripts durch RNase E oder RNase III erzeugt ein neues 3' Ende, das nicht mehr durch eine Haarnadelstruktur stabilisiert wird. Das so destabilisierte 3' Ende kann in *E. coli* von der Exoribonuklease II (RNase II) oder der Polynukleotid-Phosphorylase (PNPase) als Angriffspunkt für den ribonukleotyischen Abbau genutzt werden. Die entstehenden Abbauprodukte sind 5' Mononukleotide im Fall der RNase II und 5' Dinukleotide im Fall der PNPase (Deutscher & Reuven, 1991). Das bei Spaltung durch RNase E oder

RNase III entstehende 5' Monophosphat-Ende kann nun wiederum durch den Sensorbereich der RNase E wahrgenommen werden und eine weitere Spaltung des RNA-Transkripts weiter *downstream* induzieren (Mackie, 1998; Jiang *et al.*, 2000). Dabei entstehen wiederum neue 3' Enden, die für einen exoribonukleolytische Abbau zur Verfügung stehen. Weitere Sekundärstrukturen in einem polycistronischen mRNA-Transkript können den Abbau durch Exoribonukleasen jedoch verlangsamen oder sogar verhindern (Mackie & Genereaux, 1993). Der RNA-Abbau im Bereich solcher Sekundärstrukturen und Haarnadelschleifen geschieht mit Hilfe der Poly(A)-Polymerase (PAP1), die an das 3' Ende eine Poly(A)-Sequenz synthetisiert (Khemici & Carpousis, 2004). Diese Poly(A)-Extensionen dienen dann zur erneuten Bindung der Exoribonukleasen RNase II und PNPase bzw. des Degradosoms, sodass der ribonukleolytische Abbau weiter fortgesetzt werden kann (Coburn *et al.*, 1999). Die entstandenen Oligonukleotide können dann weiter zu Mononukleotiden abgebaut werden, die wiederum in den Nukleotid-Pool der Zelle eingespeist werden (Ghosh & Deutscher, 1999).

1.5 *Rhodobacter sphaeroides*

Rhodobacter sphaeroides, in dieser Arbeit als Modelorganismus verwendet, ist ein 2,0-2,5 µm langes, stäbchenförmiges und lateral begeißeltes Bakterium (Dworkin *et al.*, 2006; Imhoff, 2006), das aus stehenden und fließenden Gewässern aber auch aus Bodenproben isoliert werden kann (Suresh *et al.*, 2020). Das Bakterium ist Gram-negativ und wurde als Schwefel-freies Purpurbakterium einer Untergruppe der α -Proteobakterien zugeordnet (Woese *et al.*, 1984). Auf der Grundlage neuerer phylogenetischer Untersuchungen zur Klassifikation von α -Proteobakterien bildet *Rhodobacter sphaeroides* eine neue Unterklasse und wurde in *Cereibacter sphaeroides* umbenannt (Hördt *et al.*, 2020). Dennoch wird das Bakterium im Rahmen dieser Arbeit als *Rhodobacter sphaeroides* bezeichnet. Die genetische Information (4,6 MBp) verteilt sich in *R. sphaeroides* auf zwei Chromosomen und fünf Plasmide mit einem durchschnittlichen GC-Gehalt von 69% (Suwanto & Kaplan, 1989; Mackenzie *et al.*, 2001; Choudhary *et al.*, 2007).

Für die Energiegewinnung nutzt *R. sphaeroides* eine Vielzahl verschiedener Stoffwechselwege, deren Aktivitäten an die vorhandenen Umweltbedingungen angepasst werden. Wenn Sauerstoff in der Umgebung verfügbar ist, wird dieser bevorzugt für eine aerobe Atmung verwendet. Die Expression der Gene für den Aufbau des Photosyntheseapparates wird unter diesen Bedingungen reprimiert, infolgedessen das Bakterium eine hellrote Färbung annimmt. Wenn in der Umwelt nur wenig (mikroaerob) oder kein Sauerstoff (anaerob) vorhanden, jedoch Licht verfügbar ist, stellt *R. sphaeroides* seinen Stoffwechsel auf eine anoxygene Photosynthese um, indem es die Expression der Gene für den Photosyntheseapparat induziert. Der Photosyntheseapparat setzt sich in *R. sphaeroides* aus drei Protein-Komplexen zusammen, zu denen der Lichtsammelkomplex I (*light-harvesting complex* I; LHI), der Lichtsammelkomplex II (*light-harvesting complex* II; LHII) und das Reaktionszentrum (*reaction center*; RC) gehören (Verméglio & Joliot, 1999). Zur Absorption der Lichtenergie sind an den Antennenkomplexen Pigmentmoleküle wie das Bakteriochlorophyll a (BChla) und die Carotinoide adhärirt, die dem Bakterium seine dunkelrote bis bräunliche Färbung verleihen (Qian *et al.*, 2005; Qian *et al.*, 2013). Wenn *R. sphaeroides* weder Sauerstoff noch Licht für seinen Stoffwechsel zur Verfügung stehen, jedoch ein geeigneter externer Elektronenakzeptor, dann wird eine anaerobe

Atmung zur Energiegewinnung durchgeführt. Ist jedoch auch kein alternativer Elektronenakzeptor verfügbar, so wird ATP durch Gärung gewonnen (Boone *et al.*, 2001). Neben diesen verschiedenen Möglichkeiten der Energiegewinnung kann *R. sphaeroides* zusätzlich Kohlenstoffdioxid (CO₂) und Stickstoff (N₂) aus der Atmosphäre für den Aufbau organischer Verbindungen assimilieren (Qian & Tabita, 1996).

1.5.1 Expression und Prozessierung der *puf* mRNA in *Rhodobacter*

Wie schon im Abschnitt zuvor beschrieben, besitzt *R. sphaeroides* eine große metabolische Flexibilität für die Energiegewinnung. Die Expression der Gene für den jeweiligen Stoffwechselweg muss daher genau reguliert werden. Die Ausbildung des Photosyntheseapparates für die anoxygene Photosynthese ist einer der am besten untersuchten Prozesse in dem Bakterium *Rhodobacter*. Sobald der Sauerstoffpartialdruck in der Umgebung des Bakteriums abfällt, werden die Gene für den Photosyntheseapparat induziert. Dies wird unter anderem durch das Zwei-Komponenten-System PrrB/PrrA reguliert. PrrB ist eine Membran-gebundene Sensorkinase, die den Redoxstatus über den Elektronenfluss in der Elektronentransportkette der aeroben Atmung wahrnimmt. Bei fallendem Sauerstoffpartialdruck und dementsprechend niedrigem Elektronenfluss in der Membran wird die Sensorkinase PrrB autophosphoryliert. Die Phosphat-Gruppe kann anschließend auf den Antwortregulator PrrA übertragen werden und aktiviert diesen. PrrA als aktiver Antwortregulator kann nun direkt die Expression der Gene des *puf*- und *puc*-Operons als Transkriptionsfaktor aktivieren (Eraso & Kaplan, 1994). Das *puf*-Operon kodiert dabei Gene für den Lichtsammelkomplex I (Donohue *et al.*, 1988), während das *puc*-Operon Gene für den Lichtsammelkomplex II kodiert (Lee *et al.*, 1993). Außerdem aktiviert der Antwortregulator PrrA die Expression von *appA*. AppA ist ein Antirepressor, der den Repressor PpsR bindet und eine verstärkte Expression der Photosynthesegene bewirkt (Gomelsky & Kaplan, 1997; Gomelsky *et al.*, 2008). Neben dem Aktivator AppA gibt es noch FnrL und PpaA, die über den Redoxstatus der Zelle aktiviert werden und einen positiven Effekt auf die Expression der Gene für die Ausbildung des Photosyntheseapparates haben (Zeilstra-Ryalls & Kaplan, 1995; Gomelsky *et al.*, 2003).

Für die Ausbildung des Photosyntheseapparates werden ca. 15 Untereinheiten des Lichtsammelkomplex I (LHI) pro Reaktionszentrum benötigt (Klug *et al.*, 1987). Um diese Stöchiometrie von 15:1 zu gewährleisten, wird die Expression des *puf*-Operons nicht nur über die Transkription, sondern auch über eine posttranskriptionelle Prozessierung der polycistronischen *puf*-mRNA reguliert. Die Prozessierung der *puf*-mRNA wurde zuerst detailliert in *R. capsulatus*, einem engen Verwandten von *R. sphaeroides*, untersucht. Da das *puf*-Operon in beiden Organismen ähnlich aufgebaut ist, können einige Studien zur posttranskriptionellen Prozessierung des *puf*-Operons aus *R. capsulatus* auf *R. sphaeroides* übertragen werden. Der entsprechende Kenntnisstand ist in diesem Abschnitt zusammengefasst. Das *puf*-Operon besteht in beiden Organismen aus den Genen *pufQKBALMX+PcrX*, die an der Ausbildung des Lichtsammelkomplexes I beteiligt sind. Die Gene *pufB* und *pufA* kodieren dabei die Pigment-bindenden Proteine des Lichtsammelkomplexes I, während die Gene *pufL* und *pufM* die Pigment-bindenden Untereinheiten des Reaktionszentrums (Donohue *et al.*, 1988) und *pufX* ein Komplex-bildendes Protein kodieren (Barz *et al.*, 1995). *pufQ* ist hingegen nicht

direkt an der Ausbildung der Lichtsammelkomplexes I beteiligt, sondern reguliert den Efflux von Porphyrin (Chidgey *et al.*, 2017). Neben den bekannten Genen wurde zusätzlich das Gen *pufK* identifiziert, welches zwischen *pufQ* und *pufBA* liegt. Welche Funktion dieses Gen in der Assemblierung des Lichtsammelkomplexes spielt, ist jedoch bisher nicht bekannt.

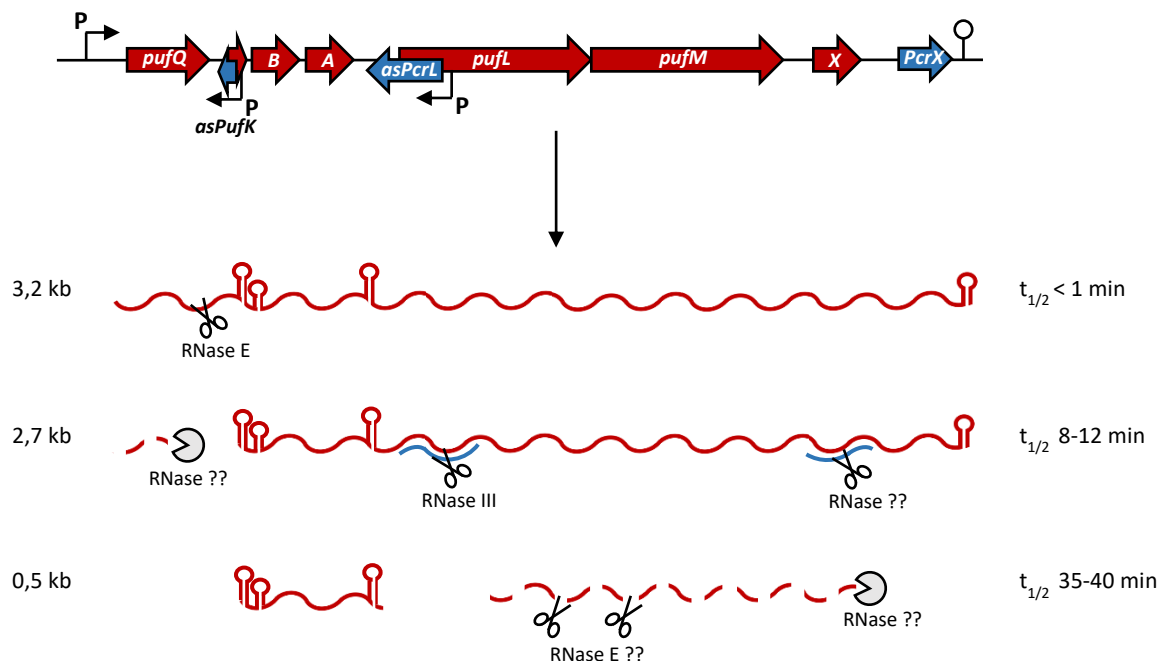


Abbildung 8: Modell für die posttranskriptionelle Regulation der *puf* mRNA. Der Kenntnisstand zur posttranskriptionellen Regulation der *puf* mRNA in *R. capsulatus* und *R. sphaeroides* ist in dieser Abbildung zusammengefasst, da beide Organismen nah miteinander verwandt sind und das *puf* Operon beider Bakterien die gleichen Gene beinhaltet. Das *puf* Operon besteht aus den Genen *pufQKBALMX* und *PcrX*. Die initiale Prozessierung wird von der RNase E in der kodierenden Sequenz von *pufQ* durchgeführt. Weitere Prozessierungen werden in *R. sphaeroides* abhängig von den sRNAs *asPcrL* und *PcrX* initiiert, während der Mechanismus für *R. capsulatus* nicht genau geklärt ist. Die mRNA von *pufBA* wird durch stabilisierende Haarnadelschleifen am 5' und 3' Ende vor weiterer Degradation geschützt. Die verschiedenen Halbwertszeiten der entstehenden mRNA-Spezies sorgen für unterschiedliche Translationseffizienzen, sodass eine Stöchiometrie von 15:1 für den Komplex aus Lichtsammelkomplex I (kodiert durch *pufBA*) und Reaktionszentrum (kodiert durch *pufLM*) gewährleistet wird (kb: Kilobasen; $t_{1/2}$: Halbwertszeit; modifiziert nach Reuscher & Klug, 2021)

Das *puf* Operon ist ein sehr gutes Beispiel für die posttranskriptionelle Regulation einer polycistronischen mRNA, die eine Kombination aus stabilisierenden und destabilisierenden RNA-Strukturen enthält und sRNA-abhängig in unterschiedliche mRNA-Spezies prozessiert wird, dahingehend optimiert, dass eine Stöchiometrie von 15:1 für den Komplex aus Lichtsammelkomplex I (LHI) und Reaktionszentrum gewährleistet wird. Das primäre Transkript des *puf* Operons, bestehend aus den Genen *pufQKBALMX*+*PcrX*, ist 3,2 kb lang und besitzt eine Halbwertszeit von weniger als einer Minute. Der erste Schritt in der Prozessierung des Primärtranskripts erfolgt in *R. capsulatus* durch die RNase E im Leseraster von *pufQ*, sodass eine mRNA bestehend aus den Genen *pufKBALMX*+*PcrX* entsteht (Heck *et al.*, 2000). Dieses Prozessierungsprodukt ist wesentlich stabiler und besitzt eine Halbwertszeit von 8-10 Minuten unter mikroaeroben Bedingungen (Klug, 1991). Die Halbwertszeit der

pufKBALMX+PcrX mRNA unterscheidet sich dabei nur geringfügig zwischen *R. sphaeroides* und *R. capsulatus*. Ein weiterer Prozessierungsschritt findet zwischen den Genen *pufBA* und *pufLM* statt, der in *R. capsulatus* ebenfalls durch RNase E katalysiert wird (Fritsch *et al.*, 1995). In *R. sphaeroides* wird diese Prozessierung durch die antisense RNA asPufL (*antisense* RNA *pufL*) und die RNase III bewerkstelligt (Reuscher & Klug, 2021). Die antisense RNA asPufL ist im 5' Bereich von *pufL* auf dem komplementären DNA-Strang kodiert, wodurch sie mit der *pufL* mRNA basenpaaren kann, und besitzt einen eigenen PrrA-, AppA- und FnrL-abhängigen Promotor. Durch eine Interaktion der sRNA asPcrL mit *pufL* wird in *R. sphaeroides* eine RNase III-Schnittstelle generiert, die zur Entstehung verkürzter mRNAs für *pufBA* und *pufLMX*+PcrX führt (Reuscher & Klug, 2021). Das entstandene monophosphorylierte 5' Ende des *pufLMX*+PcrX-Fragments kann anschließend über die RNase E weiter prozessiert und degradiert werden, jedoch ist dieser Mechanismus noch nicht genau geklärt. Eine zusätzliche Prozessierung des *pufBALMX*-Transkripts erfolgt am 3' Ende mittels einer weiteren sRNA. Die sRNA PcrX (*photosynthesis controlling* sRNA X) ist in der 3' UTR des *puf* Operon kodiert und interagiert mit der *pufX* mRNA aus dem *puf*-Operon (Eisenhardt *et al.*, 2018). Durch die Interaktion zwischen PcrX und *pufX* entsteht eine Prozessierungsstelle, die möglicherweise zu einem Abbau des *pufLMX* Fragments durch 3'-Exoribonukleasen führt (Eisenhardt *et al.*, 2018). Die resultierende *pufBA* mRNA besitzt in *R. capsulatus* und *R. sphaeroides* eine Lebensdauer von ungefähr 35-40 Minuten (Belasco *et al.*, 1985). Diese erhöhte Halbwertszeit wird durch stabilisierende intercistronische Haarnadelschleifen am 5' und 3' Ende gewährleistet und führt zu einer höheren Translationseffizienz der *pufBA* mRNA. Durch die unterschiedlichen Stabilitäten von *pufBA* und *pufLM* wird die Stöchiometrie von 15:1 für den Komplex aus Lichtsammelkomplex I (kodiert durch *pufBA*) und Reaktionszentrum (kodiert durch *pufLM*) gewährleistet.

Eine weitere sRNA ist PcrZ (*photosynthesis controlling* sRNA Z), die ebenfalls an der Regulation der Gene für den Photosyntheseapparat beteiligt ist. Diese sRNA ist nicht wie asPufL und PcrX im *puf*-Operon kodiert, sondern im intercistronischen Bereich der Gene *RSP_0819* und *RSP_6134*, d.h. sie wirkt in *trans* auf die Photosynthese-Gene. Die Synthese von PcrZ wird über die Transkriptionsfaktoren PrrA, AppA und FnrL reguliert und beeinflusst die Expression der *puf* und *puc* Operons sowie der Gene *bchN*, *crtA*, *crtD* und *appA*. Dabei bindet die sRNA PcrZ die mRNAs für *bchN* und *puc2A* direkt, während ihr Effekt auf die anderen Gene womöglich indirekter Natur ist (Mank *et al.*, 2012).

1.5.2 Stress-Regulation in *R. sphaeroides* durch alternative σ -Faktoren und sRNAs

R. sphaeroides ist ein Bakterium, das bei Abwesenheit von Sauerstoff und Anwesenheit von Licht seinen Energiestoffwechsel auf eine anoxygene Photosynthese umstellen kann. Ein Problem, dem viele photosynthetisch aktive Organismen ausgesetzt sind, ist die Entstehung von photooxidativem Stress. Als photooxidativer Stress wird die Licht-abhängige Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*; ROS) durch das gleichzeitige Vorhandensein von Photosensibilisatoren und Sauerstoff bezeichnet (Zeilstra-Ryalls & Kaplan, 2004). Vor allem Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) wird unter photooxidativen Stressbedingungen gebildet. Singulett-Sauerstoff entsteht durch einen

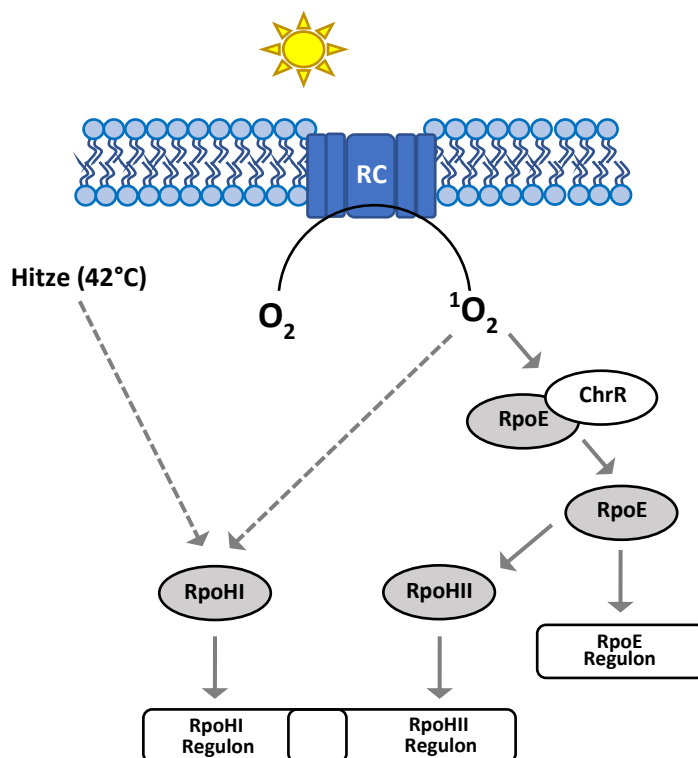


Abbildung 9: Regulation der photooxidativen Stressantwort in *R. sphaeroides* über die alternativen σ -Faktoren RpoE, RpoH1 und RpoH2.

Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) entsteht durch die Energieübertragung des Bakteriochlorophylls am Reaktionszentrum (RC) auf Triplett-Sauerstoff (O_2). $^1\text{O}_2$ aktiviert RpoE, indem es die Dissoziation des Antisigmafaktors ChrR bewirkt. RpoE seinerseits induziert die Expression des RpoE-Regulons, zudem auch der alternative σ -Faktor RpoH2 gehört. Die Expression von RpoH1 wird ebenfalls über $^1\text{O}_2$ induziert, ist aber unabhängig von RpoE. Die RpoH1- und RpoH2-Regulons enthalten z.T. gemeinsame Gene (modifiziert nach Glaeser *et al.*, 2011)

34

photooxidativen aber auch anderen physiologischen Stress führt. Die Bildung von $^1\text{O}_2$ am Bakteriochlorophyll *a* (BChl*a*) des Reaktionszentrums (RC) in *R. sphaeroides* (Ziegelhoffer & Donohue, 2009) führt zur Aktivierung des alternativen ECF σ -Faktors RpoE (σ^E), der unter normalen Wachstumsbedingungen an den Anti- σ -Faktor ChrR gebunden und inaktiv ist (Newman *et al.*, 1999; Anthony *et al.*, 2004). Photooxidativer-Stress in der Zelle führt dazu, dass der Anti- σ -Faktor ChrR durch eine proteolytische Spaltung, an der die Proteine RSP_1090 und RSP_1091 und die Proteasen RSP_3242 und RSP_2710 beteiligt sind, von dem σ -Faktor RpoE dissoziiert und diesen dadurch aktiviert (Nuss *et al.*, 2013). Der alternative σ -Faktor RpoE induziert in der Folge die Expression seines Regulons von nur ungefähr 15-20 Genen, zu denen unter anderem *rpoE* und *chrR* selbst, aber auch *rpoHII* als weiterer alternativer σ -Faktor sowie die Photolyase *phrA* gehören. RpoHII ist ein alternativer σ -Faktor, der ein weitaus größeres Regulon mit ungefähr 145 Genen aktiviert (Nuss *et al.*, 2009). Ein weiterer alternativer σ -Faktor ist RpoHI, der in Hinblick auf Singulett-Sauerstoffstress unabhängig von RpoE induziert wird. RpoHI ist ein σ -Faktor, der vor allem unter Hitzestress aktiviert wird und in seinem Regulon die Expression von ungefähr 175 Genen induziert (Green & Donohue, 2006). Die alternativen σ -Faktoren RpoE, RpoHI und RpoHII induzieren neben Protein-kodierenden Genen auch eine Vielzahl von sRNAs (Glaeser *et al.*, 2011).

Für *R. sphaeroides* sind in RNASeq-Studien unter Singulett-Sauerstoffstress 20 sRNAs identifiziert und später charakterisiert worden, die an der allgemeinen und spezifischen Stressantwort gegen $^1\text{O}_2$ beteiligt sind (Berghoff *et al.*, 2009; Berghoff *et al.*, 2011). SorY (*singlet oxygen resistance* RNA Y; RSs1543) ist eine sRNA, die einen RpoHI/II-abhängigen Promotor besitzt und durch die Interaktion mit der *takP* mRNA den Import von Malat inhibiert und so den Tricarbonsäurezyklus herunterreguliert. Dadurch kommt es zu einem Anstieg von NADPH, das eine Schutzfunktion für die Zelle unter Singulett-Sauerstoffstress besitzt (Adnan *et al.*, 2015). SorX (*singlet oxygen resistance* RNA X; RSs2461) ist hingegen eine sRNA, die über *potA* den Spermidin-Import in die Zelle reduziert (Peng *et al.*, 2016). Weitere sRNAs, die über den Transkriptionsfaktors *flhR* den intrazellulären Glutathion-Spiegel regulieren, sind CcsR1-4 (*conserved CCUCCUCCC motif stress-induced* RNAs 1-4; RSs0680a-d). Der Anstieg des Glutathion-Levels führt zu einem antioxidativen Effekt in der Zelle. Zusätzlich wird durch die sRNAs CcsR1-4 der Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex herunterreguliert, wodurch es zu einem reduzierten Elektronentransport unter aeroben Bedingungen kommt (Billenkamp *et al.*, 2015). Auch die sRNA StsR (*small RNA targets small* RNA), deren Regulations-Mechanismus in dieser Arbeit behandelt wird, besitzt einen RpoHI/II-abhängigen Promotor und wird unter verschiedenen Stressbedingungen exprimiert. Durch ihre Interaktion mit der sRNA UpsM bzw. der 5' UTR von *mraZ* reguliert StsR die Zellteilung von *R. sphaeroides* (Weber *et al.*, 2016; Grützner *et al.*, 2021b).

1.6 Zielsetzung

Schwerpunkt vorhergehender sowie aktueller Studien war und ist die transkriptionelle und posttranskriptionelle Genregulation in Hinblick auf die photooxidative Stressantwort und die Anpassung an verschiedenen Wachstumsphasen des phototrophen Bakteriums *R. sphaeroides*. Im Verlauf unserer Arbeiten wurden komplexe regulatorische Netzwerke unter Beteiligung von σ -Faktoren, regulatorischen RNAs (sRNAs), RBPs und Ribonukleasen identifiziert, die für eine gezielte

Stressantwort sorgen. Dennoch blieben z.B. die biologischen Funktionen der *trans*-kodierten sRNAs StsR (*small RNA targets small RNA*; RSs0827) und der sRNA UpsM (*upstream sRNA mraZ*; RSs0682) in diesem Kontext weitgehend unverstanden. Die sRNA StsR ist im intergenischen Bereich zwischen der tRNA/rRNA Methyltransferase (*RSP_2239*) und dem CoA-Bindeprotein (*RSP_2240*) lokalisiert, während UpsM durch eine Termination in der 5' UTR des *dcw* Genclusters generiert wird. Frühere Northern Blot-Analysen von Dr. Lennart Weber und Dr. Bernhard Remes zur Stress-abhängigen Expression der sRNA StsR und zur Prozessierung der sRNA UpsM zeigten, dass ein möglicher Zusammenhang zwischen der Expression von StsR und der Prozessierung von UpsM besteht. Im Rahmen dieser Arbeit sollte mittels mikrobiologischer Methoden der physiologische Effekt der StsR-abhängigen Prozessierung von UpsM auf die einzelne Zelle bzw. die Zellpopulation (Wachstum und Zellteilung) untersucht werden. Außerdem sollte anhand RNA-biochemischer Methoden der molekulare Mechanismus, der die Prozessierung von UpsM auslöst, analysiert und geklärt werden.

Durch Transkriptom-Analysen wurden in bakteriellen Genomen neben vielen regulatorischen RNAs auch eine große Anzahl an kurzen, offenen Leserastern identifiziert. Es blieb jedoch lange unklar, ob diese kurzen Leseraster auch tatsächlich translatiert werden. Mit neueren molekularbiologischen Methoden (*ribosome profiling*) konnte dann gezeigt werden, dass diese kurzen Leseraster tatsächlich kleine Proteine kodieren, die an einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt sind. Viele dieser Proteine besitzen eine DUF (*domain of unknown function*)-Domäne und damit eine noch unbekannte physiologische Funktion für die Zelle. Vorherige Studien von Dr. Fabian Billenkamp und Dr. Katrin Eisenhardt zeigten, dass das Bakterium *R. sphaeroides* vier offene Leseraster besitzt, die kleine Proteine aus der sogenannten DUF1127-Proteinfamilie kodieren. Bioinformatische Analysen wiesen darauf hin, dass die DUF1127-Domäne eine hohe Homologie zu der RNA-Bindedomäne der sogenannten Smaug-Proteine aus *Drosophila melanogaster* aufweisen. Da die Smaug-Proteine an der posttranskriptionellen Genregulation in *D. melanogaster* beteiligt sind, wird eine ähnliche Funktion der DUF1127-Proteine in *R. sphaeroides* vermutet. Mittels molekularbiologischer Methoden sollte eine RNA-bindende Funktion der DUF1127-Domäne nachgewiesen werden und diese als neue RNA-bindende Domäne in Bakterien charakterisiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Bakterienstämme

In den nachfolgenden Tabellen sind alle in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme aufgelistet.

Tabelle 1: Bakterienstämme

Stamm	Verwendung/Beschreibung	Herkunft
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>*		
2.4.1	Wildtyp	(van Niel, 1944)
KD131	Wildtyp	(Lim <i>et al.</i> , 2009)
2.4.1 Δ stsR	Δ (RSs0827:: Ω Sp)	(Masterthesis Kiebel, 2013)
2.4.1 Δ rpoHI	Δ (rpoHI::Km)	(Nuss <i>et al.</i> , 2010)
2.4.1 Δ rpoHII	Δ (rpoHII::Km)	(Glaeser <i>et al.</i> , 2007)
2.4.1 Δ rpoHI/II	Δ (rpoHI::Km) Δ (rpoHII:: Ω Sp)	(Nuss <i>et al.</i> , 2010)
2.4.1 Δ hfq	Δ (hfq:: Ω Sp)	(Glaeser <i>et al.</i> , 2007)
2.4.1 $rne^{E. coli(ts)}$	Δ (rne::rneE.c.ts;Sp)	(Weber <i>et al.</i> , 2016)
<i>Rhodobacter capsulatus</i>		
SB1003	Wildtyp	(van Niel, 1944)
<i>Escherichia coli</i>		
JM109	Klonierungsarbeiten und Plasmidreplikation / e14 ⁻ (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>), [F', <i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>lacI</i> ^q Z Δ M15]	NEB
S17-1	Donorstamm bei biparentaler Konjugation von <i>R. sphaeroides</i> / <i>recA</i> , <i>pro</i> , <i>hsdR</i> , <i>RP4</i> ⁻² - (Tc::Mu)(Km::Tn7); Tp ^r , Str ^r , Sp ^r	(Simon <i>et al.</i> , 1986)
BL21 (DE3)	Überexpression rekombinanter Proteine / F, <i>ompT</i> , <i>gal dcm</i> λ (DE3), <i>hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻)	NEB
DH5 α		NEB
<i>Sinorhizobium meliloti</i>		
1021	Wildtyp	(Meade <i>et al.</i> , 1982)
<i>Sinorhizobium fredii</i>		
HH103	Wildtyp	(Rodriguez-Navarro <i>et al.</i> , 1996)

*Durch neuste phylogenetische Untersuchungen zur Klassifikation von α -Proteobakterien bildet *Rhodobacter sphaeroides* eine neue Unterklasse und wurde in *Cereibacter sphaeroides* umbenannt (Hördt *et al.*, 2020). Dennoch wird der Modelorganismus in den nachfolgenden Untersuchungen dieser Arbeit als *Rhodobacter sphaeroides* bezeichnet.

2.1.2 Plasmide

In den nachfolgenden Tabellen sind alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmide nach den entsprechenden Projekten aufgelistet.

Tabelle 2: Plasmide

Plasmid	Verwendung / Beschreibung	Herkunft
Allgemeine Plasmide		
pJET1.2	Klonierungsvektor, Ap ^r	Thermo Scientific
pDrive	Klonierungsvektor, Ap ^r , Km ^r	Quiagen
pBBR1MCS-2	<i>Broad-host-range</i> Klonierungsvektor, Km ^r	(Kovach <i>et al.</i> , 1995)
pRK4352	<i>Broad-host-range</i> Klonierungsvektor mit RSP_4352 (16S rRNA) Promotor, Tc ^r	(Mank <i>et al.</i> , 2012)
pQE30	Überexpressionsvektor His-Tag, Ap ^r	Quiagen
pET24c	Überexpressionsvektor, Km ^r	Novagen
Plasmide für das Projekt StsR		
pBBRStsR	pBBR1MCS2 Derivat zur Überexpression der sRNA StsR ausgehend vom nativen Promotor; Km ^r	(Masterthesis Kiebel, 2013; Grützner <i>et al.</i> , 2021b)
pBBRStsR_BR	pBBR1MCS2 Derivat zur Überexpression der Binderegion sRNA StsR zu UpsM ausgehend vom nativen Promotor; Km ^r	Diese Arbeit
pBBRStsR_mut	pBBR1MCS2 Derivat zur Überexpression der mutierten sRNA StsR ausgehend vom nativen Promotor; Km ^r	Diese Arbeit
pRKhfq	pRK4352 Derivat mit dem Gen <i>hfq</i> ; Tc ^r	(Berghoff <i>et al.</i> , 2011)
pRKhfq_3xFLAG	pRK4352 Derivat mit dem Gen <i>hfq</i> und einer 3xFLAG-tag Sequenz am 3' Ende; Tc ^r	(Berghoff <i>et al.</i> , 2011)
pDT7_UpsM206_nt	pDrive Derivat mit 206 Nukleotiden von der sRNA UpsM und dem T7 Promotor; Ap ^r , Km ^r	Diese Arbeit
pDT7_UpsM76_nt	pDrive Derivat mit den ersten 76 Nukleotiden von der sRNA UpsM und dem T7 Promotor; Ap ^r , Km ^r	Diese Arbeit
pDT7_UpsM30_nt	pDrive Derivat mit ersten 30 Nukleotiden von der sRNA UpsM und dem T7 Promotor; Ap ^r , Km ^r	Diese Arbeit
pDT7_StsR	pDrive Derivat mit der sRNA StsR und dem T7 Promotor; Ap ^r , Km ^r	Diese Arbeit
pDT7_mraY	pDrive Derivat mit mraY (93 Nukleotide Interaktionsbereich zu StsR) und dem T7 Promotor; Ap ^r , Km ^r	Diese Arbeit
pDT7_ftsW	pDrive Derivat mit mraY (124 Nukleotide; Interaktionsbereich zu StsR) und dem T7 Promotor; Ap ^r , Km ^r	Diese Arbeit
pBBRUpsM130_nt	pBBR1MCS2 Derivat zur Überexpression der letzten 130 Nukleotide der sRNA UpsM ausgehend vom nativen Promotor; Km ^r	Diese Arbeit
Plasmide für das Projekt CcaF1		
pRKCcsR1-4	pRK4352 Derivat zur Überexpression der sRNAs CcsR1-4; Tc ^r	(Billenkamp <i>et al.</i> , 2015)
pRKccaF1_CcsR1-4	pRK4352 Derivat zur Überexpression des Gens <i>ccaF1</i> (RSP_6037) und der sRNAs CcsR1-4; Tc ^r	(Billenkamp <i>et al.</i> , 2015)

pRKccaF1	pRK4352 Derivat zur Überexpression des Gens <i>ccaF1</i> (RSP_6037); Tc ^r	Diese Arbeit
pRKccaF1mut_CcsR1-4	pRK4352 Derivat zur Überexpression des Gens <i>ccaF1</i> (RSP_6037) mit einer Mutation des Start-Codons zu einem Stopp-Codon und der sRNAs CcsR1-4; Tc ^r	(Billenkamp <i>et al.</i> , 2015)
pRKccaF1	pRK4352 Derivat zur Überexpression des Gens <i>ccaF1</i> (RSP_0402); Tc ^r	Diese Arbeit
pRKccaF1_CcsR1-4	pRK4352 Derivat zur Überexpression des Gens <i>ccaF1</i> (RSP_0402) und der sRNAs CcsR1-4; Tc ^r	Diese Arbeit
pBE::P _{ccaF1_100bp} :eCFP	pBE4352::eCFP Dreivat mit 100 Nukleotiden <i>upstream</i> des <i>ccaF1</i> (RSP_6037) Promotors fusioniert an eCFP; Km ^r	(Peng <i>et al.</i> , 2016)
pBE::P _{ccaF1_200bp} :eCFP	pBE4352::eCFP Dreivat mit 200 Nukleotiden <i>upstream</i> des <i>ccaF1</i> (RSP_6037) Promotors fusioniert an eCFP; Km ^r	(Peng <i>et al.</i> , 2016)
pRKccaF1_3xFLAG	pRK4352 Derivat mit dem Gen <i>ccaF1</i> und einer 3xFLAG-tag Sequenz am 5' Ende; Tc ^r	Diese Arbeit
pET24cHis ₆ -MBP-TEV-ccaF1	pET24c Derivat mit dem Gen <i>ccaF1</i> und einer His ₆ -MBP-TEV Sequenz am 5' Ende; Km ^r	Diese Arbeit
pRKRSP_0557_3xFLAG	pRK4352 Derivat zur Überexpression des Gens <i>RSP_0557</i> und einer 3xFLAG-tag Sequenz am 5' Ende Tc ^r	Diese Arbeit

Ap^r: Ampicillin Resistenz; Km^r: Kanamycin Resistenz; Tc^r: Tetracyclin Resistenz

2.1.3 Oligonukleotide

In den nachfolgenden Tabellen sind alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide nach den entsprechenden Projekten aufgelistet.

Tabelle 3: Oligonukleotide für das Projekt StsR

Oligonukleotide	Sequenz (5´-3´)	Beschreibung
Klonierung		
StsR_BR_f	CTGCAGTTCACTGTCCCTCGTTCCG	Diese Arbeit
StsR_BR_r	GGTACCAAAAAAAGCGCCCTGACCG	
StsR_mut_f	GTTCTACCAAGTCTGTCCCTCGT	Diese Arbeit
StsR_mut_f	GGGACAGACTTGGTAGAACGGG	
qRT-PCR		
rpoZ_A	ATCGCGGAAGAGACCCAGAG	(Gomelsky <i>et al.</i> , 2003)
rpoZ_B	GAGCAGCGCCATCTGATCCT	
upsM_A	CGAGATGAGAACGGGACAG	(Weber <i>et al.</i> , 2016)
upsM_B	ATCGCTGGGTGTCCAAC	
upsM_mraZ_A	CAGTGGCAGCCGCTCGAT	(Weber <i>et al.</i> , 2016)
upsM_mraZ_B	GCGCCTTGGCGTCAACCT	
mraZ_A	AGAGGCGAATACAACCAG	(Weber <i>et al.</i> , 2016)
mraZ_B	TAGCATTGACGTAGGAG	
murG_A	GGTGAACCGGCTGTTTGC	Diese Arbeit
murG_B	GAGGCTCATCGGATAGTCG	
ftsZ_A	CATCACCGTGTTCCGGTGA	Diese Arbeit

ftsZ_B	AGATCTCCTCGATCGTCTC		
mraW_A	TCCATGCAGCTCGATCTGG	Diese Arbeit	
mraW_B	GCTCCTCGCCATAATGATAG		
ftsL_A	AGGCGCTCAAGGATGTCT	Diese Arbeit	
ftsL_B	CAGACGGTCGAAGTTCAG		
murF_A	GCTCGATCTCACCATCG	Diese Arbeit	
murF_A	CGAGTTCGAGCATGTCTG		
mraY_A	GGTTCTTCGTGCCCTTC	Diese Arbeit	
mraY_B	AGCGCGGAGCTGAAGAT		
envA_A	AGCGAAATTCACCGGCG	Diese Arbeit	
envA_B	CTCGATCAGCGCATTGT		
sinI_A	TAGGGCATCGCGTAATCACGCATGG	Diese Arbeit	
sinI_B	GGTGCTGGCTGCGACCGTT		
gloB_A	GAACAATTACGCCTTCTC		
gloB_B	CATCAGCTGGTAGCTCTC		
T7 in vitro Transkription			
T7_UpsM206_f	TAATACGACTCACTATAGGGCGAGATGAGAA CGGGACAGTG	(Weber <i>et al.</i> , 2016)	
T7_UpsM206_r	GAAAGCGGCGGATCGAGCGG		
T7_UpsM130nt_f	TAATACGACTCACTATAGTTTCATCCAATGAC AGAT	Diese Arbeit	
T7_UpsM130nt_r	GAAAGCGGCGGATCGAGCGG		
T7_UpsM76nt_f	TAATACGACTCACTATAGCGAGATGAGAACG GGACAGT	Diese Arbeit	
T7_UpsM76nt_r	GGCTTCATACAGGCACCCGC		
T7_StsR_f	TAATACGACTCACTATAGCCGTTCTAC CTTCACTGTC	(Dissertation 2016)	Müller,
T7_StsR_r	AAAAAAAAAGCGCCCTGAC		
T7_ftsW_f	TAATACGACTCACTATAGGGGAGACTA CAACTCGTCCGAGCACT	Diese Arbeit	
T7_ftsW_r	ACCCACGCCGAAGAAGCCGC		
T7_mraY_f	TAATACGACTCACTATAGGGGAGAGC CGCGCTCGCGGCCATCGC	Diese Arbeit	
T7_mraY_r	ATTGATGAGCGCATCCTTGA	Diese Arbeit	
T7_StsRmut_f	TAATACGACTCACTATAGGTTCTACCA AGTCTGTCCCTCGT	Diese Arbeit	
T7_StsRmut_r	AAAAAAAAAGCGCCCTGAC		
T7_UpsMmut_f	TAATACGACTCACTATAGGGGAGATAGCTCA CGAGATGAGAACGGGACAGACTTCAGGGGCGA	Diese Arbeit	
T7_UpsMmut_r	GAAAGCGGCGGATCGAGCGGC		
T7_mraYmut_f	TAATACGACTCACTATAGGGGAGACCATCGCGGCC GCCTGGAGCGTACCGCCGGATCTGACGCTCC AGCTCGCCAT	Diese Arbeit	
T7_mraYmut_r	ATTGATGAGCGCATCCTTGA		
T7_ftsWmut_f	TAATACGACTCACTATAGGGGAGACTACAACTC GTCCGAGCACTTCGCGCGCCGCTAGGACGGCT TCCTGAACCCC	Diese Arbeit	
T7_ftsWmut_r	ACCCACGCCGAAGAAGCCGC		
Northern Blot Sonden			
p0827	GGACAGTGAAGGTAGAACGG	(Peuser <i>et al.</i> , 2012)	
pUpsM	CGCGCCGGATCTGTCTATTGGATG	(Berghoff <i>et al.</i> , 2009)	
p5S	CTTGAGACGCAGTACCATTG	(Berghoff <i>et al.</i> , 2009)	

Diese Arbeit
Diese Arbeit

SPR_A	GGTTGGCGCGGGCAGG	Diese Arbeit
SRP_B	AGAGGCTGGACATCGAC	
tRNAGly_A	CGGGCGTAGCTCAGGGG	Diese Arbeit
tRNAGly_A	CGGGCGATGAGATTCTG	
PcrZ_A	GGAGTGGTAACGAGTATCCGGC	Diese Arbeit
PcrZ_B	GACCACGCGTATCGAGTCGA	
catA_A	GCGGTGCGCTTTTCTACGGT	Diese Arbeit
catA_B	CAGGTTGGTGC GCGGGTGGCGC	
sitA_A	AGGATGTGCCGTCGGTGA	(Peuser <i>et al.</i> , 2011)
sitA_B	TGTAGCCTGCCGATTGG	
pufBA_A	ATCACC GCGAGGAGGACAG	Diese Arbeit
pufBA_B	ACATCTGGCGTCCGTGGTTC	
pucBA_A	CGAAGCCGAACAAGTTCA	Diese Arbeit
pucBA_B	TTCACCACGAGCCAGATT	
bchH_A	ATCCCTCCATCGTGAAGCTCAC	Diese Arbeit
bchH_B	TAGCGGACCATCTGCTCGAGGT	
pnp_A	TTCCTTCTCGGCCTATGC	Diese Arbeit
pnp_B	AGGCGATCTTGATCACGC	
mraZ_A	ACCGCTCTACGTCGAAT	Diese Arbeit
mraZ_B	TCGTCGAGCTCCATGTTA	
gloB_A	GAACAATTACGCTTCTC	
gloB_B	CATCAGCTGGTAGCTCTC	

T7 *in vitro* Transkription

T7_CcsR1_f	TAATACGACTCACTATATTGTTTCCTGCGAGGTCCCA C	Diese Arbeit
T7_CcsR1_r	AAAGGACGGCGACACCAG	
T7_CcsR1_f	TAATACGACTCACTATATTGTTTCCTGCGAGGTCCCA C	Diese Arbeit
T7_CcsR4_r	TTGGAATTCCTCATCGGCCGCTAGAATC	

Northern Blot Sonden

pCcsR1	CGTCGCCGCTGCTGCTACAGGTC	(Billenkamp <i>et al.</i> , 2015)
pCcsR1 (73nt)	AAGGACGGCGACACCAGGGAGGAGGA GGCGTCGCCGCTGCTGCTACAGGTCCCGGGAGGAG GTGGGACCTC	
pCcsR2 (80nt)	TGGTGCAGCGACCCAGGGAGGAGGA GGGGGCCG CTGCGGTTCCGATCGGCCAGGGAGGA GGAGAGGCCGTTTCAAGAGG	(Billenkamp <i>et al.</i> , 2015)
pCcsR3 (88nt)	GGGGGCGACGGCTCCAGGGAGGAGGGAGC CGCCGCTTGGTCATCGGCACCGCGGGAGGAGGTGC AGTGCCGAAGTCCAGTGGGCA	(Billenkamp <i>et al.</i> , 2015)
pPcrZ	GCAGTCGCCGATACTCGTTACC	(Mank <i>et al.</i> , 2012)
pUpsM	CGCGCCGGATCTGTCTTGGATG	(Weber <i>et al.</i> , 2016)
ptRNA-Gly	GAGCCTATCGGGATCGAAC	Diese Arbeit
ptmRNA	GAACGTTTACGCAGCCAG	(Berghoff <i>et al.</i> , 2009)
pSRP	TACGGCTGCTTCTTCCGGACCT	Diese Arbeit
p6SrRNA	GGTATCTGGCGACCACCTGAGTC	(Elkina <i>et al.</i> , 2017)
pRNaseP	CGGGCTGAGACGTCCCTGCGGCG	Diese Arbeit
pCcsR1-4_f	TTTCTGCGAGGTCCAC	Diese Arbeit
pCcsR1-4_r	CTCATCGGCCGCTAGAATC	Diese Arbeit
p6037-CcsR1-4_f	TTGGGATCCTTCTGCGAGGTG	Diese Arbeit
p6037-CcsR1-4_f	TTGGAATTCCTCATCGGCCGCTA	Diese Arbeit
ppufBA_f	ACATCTGGCGTCCGTGGTTC	Diese Arbeit
ppufBA_r	ATCACC GCGAGGAGGAACAG	Diese Arbeit
ppucBA_f	GCCGAAGAAGTTCATAAGCAA	Diese Arbeit

ppucBA_r	CAGCCGAGCCTTGGTAGTAG	Diese Arbeit
psitA	TGTAGCCTGCCGATTGG	Diese Arbeit
p5S	CTTGAGACGCAGTACCATTG	(Berghoff <i>et al.</i> , 2009)
pCcsR1Smel	GGACCGGCGGGCGTCATAAAGG	Diese Arbeit
pCcsR1Sfre	GAATGATTGGCAACCGGGAGG	Diese Arbeit
pCcsR1Rcap	CTCAGGGAGGAGGAGAGAG	Diese Arbeit
p5SRhiz	CTGGCAGCGACCTACTCTCCC	Diese Arbeit
p14S	CTTAGATGTTTCAGTTCCC	(Berghoff <i>et al.</i> , 2009)
iCLIP		
RNA Oliga „L3-App“	/rApp/AGATCGGAAGAGCGGTTCAG/ddC/	(Buchbender <i>et al.</i> , 2020)
RT Oligonukleotid	GGATCCTGAACCGCT	(Buchbender <i>et al.</i> , 2020)
L01clip2.0	/5Phos/NNNNATCACGNNNNNAGATCGGAAGA GCGTCGTG/3ddC/	(Buchbender <i>et al.</i> , 2020)
L02clip2.0	/5Phos/NNNNCGATGTNNNNNAGATCGGA AGAGCGTCGTG/3ddC/	
L03clip2.0	/5Phos/NNNNTTAGGCNNNNNAGATCGGAA GAGCGTCGTG/3ddC/	
L04clip2.0	/5Phos/NNNNTGACCANNNNNAGATCGGAA GAGCGTCGTG/3ddC/	
L05clip2.0	/5Phos/NNNNACAGTGNNNNNAGATCGGAA GAGCGTCGTG/3ddC/	
L06clip2.0	/5Phos/NNNNGCCAATNNNNNAGATCGGAA GAGCGTCGTG/3ddC/	
L07clip2.0	/5Phos/NNNNCAGATCNNNNNAGATCGGAA GAGCGTCGTG/3ddC/	
L08clip2.0	/5Phos/NNNNACTTGANNNNNAGATCGGAA GAGCGTCGTG/3ddC/	
L09clip2.0	/5Phos/NNNNGATCAGNNNNNAGATCGGAA GAGCGTCGTG/3ddC/	
L10clip2.0	/5Phos/NNNNTAGCTTNNNNNAGATCGGAA GAGCGTCGTG/3ddC/	
L11clip2.0	/5Phos/NNNNATGAGCNNNNNAGATCGGAA GAGCGTCGTG/3ddC/	
L12clip2.0	/5Phos/NNNNCTTGANNNNNAGATCGGAA GAGCGTCGTG/3ddC/	
L13clip2.0	/5Phos/NNNNAGTCAANNNNNAGATCGGAA GAGCGTCGTG/3ddC/	
L14clip2.0	/5Phos/NNNNAGTTCCNNNNNAGATCGGAA GAGCGTCGTG/3ddC/	
L15clip2.0	/5Phos/NNNNATGTCANNNNNAGATCGGAA GAGCGTCGTG/3ddC/	
P5Solexa_s	ACACGACGCTCTTCCGATCT	(Buchbender <i>et al.</i> , 2020)
P3Solexa_s	CTGAACCGCTCTTCCGATCT	
P5Solexa	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTT TCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT	(Buchbender <i>et al.</i> , 2020)
P3Solexa	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCGGTCTC GGCATTCTGCTGAACCGCTCTTCCGATCT	

2.1.4 Labormaterial

In den nachfolgenden Tabellen sind alle in dieser Arbeit verwendeten Laborgeräte, molekularbiologische Kits, Enzyme und Antibiotika nach alphabetischer Reihenfolge aufgelistet.

Tabelle 5: Laborgeräte und -material

Geräte	Hersteller
Laborgeräte	Hersteller
Elektroblotter, <i>Perfect Blue 'Semi-dry' Blotter</i>	VWR PeqLab
Elektroporationspulser, MicroPulser™	BioRad
Geltrockner, Stab Gel Dryer GD5040	Scie-Plas
Heizblock	VWR PeqLab
<i>Imaging Screen</i>	BioRad
Kühlzentrifuge, Heraeus Fresco 17	Thermo Scientific
NanoDrop 1000	PeqLab
Phosphoimager, <i>Personal Phospho Imager FX</i>	BioRad
PCR-Cycler, T100™ Thermal Cycler	BioRad
qRT-PCR-Maschine, CFX Connect	BioRad
Rotationsofen, <i>PerfectBlot</i>	PeqLab
<i>Screen Eraser K</i>	BioRad
Sonifizierer, Sonoplus	Bandlin
Speedvac, Concentrator plus	Eppendorf
Szintillationszähler, Mini 900 Ratemeter	Thermo Scientific
Spektralphotometer Specord 50Plus	Analytik Jena
Ultrazentrifuge, Optima™ TLX Ultracentrifuge	Beckman Coulter
UV-Tisch, UVT-20 M/W	Herolab
Vakuumblotter	Appligene
Vakuumpumpe für Geltrockner, <i>Diaphragm Pump</i>	Vacuubrand GmbH
Vortexer, Vortex Genie 2™	Scientific Industries
Wasserbad	GFL
Wasserbadschüttler G76	New Brunswick Scientific
Zentrifuge, Heraeus Fresco 17 <i>centrifuge</i>	Thermo Scientific
Labormaterial	Hersteller
Elektroporationsküvette	Bridge
Nylonmembran, Roti®-Nylon plus, 0,45 µm	Roth
Rotilabo®-Spritzenfilter, 0,22 µm	Roth
PCR Tubes 0,2 ml	VWR PeqLab
Polystyrolküvette 10 x 4 x 45 mm	Sarstedt
qRT-PCR Tubes, 0,2 ml <i>Low Profile Thin-walled 8 Tube Strips</i>	Thermo Scientific
qRT-PCR Tubes, <i>Optical clear flat 8 Cap Strips</i>	Thermo Scientific
Safelock Eppli, SafeSeal Gefäß 1,5 ml	Sarstedt
Safelock Eppli, SafeSeal Gefäß 2,0 ml	Sarstedt
Whatman Papier	Albet LabSience
Größenstandards für Gelelektrophoresen	
GeneRuler 1 kb Plus	Thermo Scientific
GeneRuler 100 bp Plus	Thermo Scientific
PeqGOLD Protein Marker IV	VWR PeqLab
RiboRuler <i>Low Range</i>	Thermo Scientific

Radioaktive Nukleotide

[$\gamma^{32}\text{P}$] ATP; 3000 Ci/mmol	Hartmann Analytik
[$\alpha^{32}\text{P}$] CTP; 3000 Ci/mmol	Hartmann Analytik
[$\alpha^{32}\text{P}$] UTP; 3000 Ci/mmol	Hartmann Analytik
[$\alpha^{32}\text{P}$] ATP; 3000 Ci/mmol	Hartmann Analytik

Molekularbiologische Kits

<i>Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green qPCR</i>	Agilent
<i>Illustra™ MicroSpin™ G-25 Columns</i>	GE Healthcare
<i>innuPREP DOUBLEpure</i>	Analytic Jena
<i>Lumi-Light PLUS Western Blotting</i>	Roche
<i>MEGashortscript™ T7 Transkriptionskit</i>	Thermo Scientific
<i>Prime-a-Gene® Labeling System</i>	Promega
<i>Sequenase Quick Denature Plasmid DNA Kit</i>	Thermo Scientific
<i>TURBO DNA-free™ Kit</i>	Invitrogen

Enzyme

AMV Reverse Transkriptase (2 U/μl)	Promega
Lysozym (1 mg/ml)	Boehringer
Phusion DNA Polymerase (2 U/μl)	Thermo Scientific
Proteinase K (20 mg/ml)	Promega
RNase A (100 mg/ml)	Thermo Scientific
RNase I (10 U/μl)	Thermo Scientific
RNaseOUT	Thermo Scientific
RiboLock (40 U/μl)	Thermo Scientific
SuperScript III Reverse Transkriptase (200 U/μl)	Thermo Scientific
T4 DNA-Ligase (5 U/μl)	NEB
T4 RNA-Ligase (10 U/μl)	NEB
T4 Polynukleotid-Kinase (10 U/μl)	Thermo Scientific
T7 RNA-Polymerase (5 U/μl)	NEB
Taq DNA-Polymerase (1 U/μl)	Quiagen

Tabelle 6: Antibiotika

Antibiotikum	Hersteller	Endkonzentration <i>E. coli</i> [μg/ml]	Endkonzentration <i>R. sphaeroides</i> [μg/ml]
Ampicillin	Roth	20	-
Gentamycin	Roth	10	10
Kanamycin	Roth	25	25
Rifampicin	Serva	-	274,5
Spektionmycin	Sigma Aldrich	10	15
Streptomycin	Serva	10	25
Tetracyclin	Serva	10	1-2

2.1.5 Allgemeine Puffer und Lösungen

In den nachfolgenden Tabellen sind in dieser Arbeit verwendeten Standardpuffer und -lösungen aufgelistet.

Tabelle 7: Allgemeine Puffer und Lösungen

Komponente	Menge / [Konzentration]	
Zusammensetzung für 1 l 10x TAE-Puffer		
Tris	48,4 g	[400 mM]
Essigsäure	11,4 ml	[200 mM]
EDTA	3,7 g	[10 mM]
ddH ₂ O	ad 1 l	
Zusammensetzung für 1 l 10x TBE-Puffer		
Tris	121,1 g	[1 M]
Borsäure	61,8 g	[1 M]
EDTA	7,4 g	[20 mM]
ddH ₂ O	ad 1 l	
Zusammensetzung für 1 l 10x PBS-Puffer		
KH ₂ PO ₄	2,4 g	[14,7 mM]
Na ₂ HPO ₄	14,4 g	[43 mM]
KCl	2 g	[27 mM]
NaCl	80 g	[1,37 M]
ddH ₂ O	ad 1 l	
Zusammensetzung 1 l 20x SSC-Lösung		
Natriumcitrat-Dihydrat	77,42g	[0,3 M]
5 M NaCl	175,2 g	[3 M]
ddH ₂ O	ad 1 l	
Zusammensetzung für 10x MOPS-Puffer		
MOPS	41,9 g	[200 mM]
EDTA	3,72 g	[10 mM]
Natriumacetat-Tetrahydrat	8,2 g	[50 mM]
DEPC-H ₂ O	ad 1 l	
Zusammensetzung für 1 l 10x Laemmli-Puffer		
Tris	30 g	[0,19 M]
Glycin	144 g	[1,9 M]
SDS	10 g	[1 %]
ddH ₂ O	ad 1 l	
	→ pH-Wert auf 8,8 einstellen	
Zusammensetzung für 1 M Tris HCl-Lösung		
Tris	12,1 g	[1 M]
ddH ₂ O	ad 100 ml	
	→ gewünschter pH-Wert mit HCl	

Zusammensetzung für 2,5 M EDTA-Lösung

EDTA	73,06 g	[2,5 M]
ddH ₂ O	ad 100 ml	

Zusammensetzung für 3 M Natriumacetat (pH 4,5)

Natriumacetat	24,6 g	[3 M]
ddH ₂ O	ad 100 ml	
	→ pH-Wert 4,5	

Zusammensetzung für DEPC-H₂O

DEPC	1 ml	[0,1 %]
H ₂ O	ad 1 l	
	→ autoklavieren	

2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.1 Sterilisation

Hitzebeständige Lösungen und Kulturmedien werden für 20 min bei 121 °C und 1 bar Überdruck sterilisiert. Hitzeempfindliche Lösungen und Substanzen werden zur Sterilisation filtriert (Filter 0,2 µm Porengröße).

2.2.2 Kultivierung von *Rhodobacter sphaeroides*

Zur Kultivierung von *R. sphaeroides* wird in dieser Arbeit *Rhodobacter*-Äpfelsäure (RÄ)-Minimalmedium verwendet (Tabelle 8) (Remes *et al.*, 2014). Zu einem Liter autoklavierten RÄ-Medium werden vor der Verwendung 8 ml steril-filtrierte Vitaminlösung (Tabelle 8) und 20 ml autoklavierte Phosphatlösung (Tabelle 8) hinzugegeben. Zusätzlich können Antibiotika (Tabelle 6) als Selektionsmarker für verschiedene Bakterienstämme zu dem autoklavierten Medium hinzugefügt werden.

Für die Kultivierung von *R. sphaeroides* auf Agarplatten wird RÄ-Medium vor dem Autoklavieren mit 1,6 % (w/v) Bacto-Agar versetzt (Tabelle 8). Für Einzelkolonien wird entweder Zellmaterial steril mit einer Impföse ausgestrichen oder Verdünnungen einer Flüssigkultur mit einem Drigalskispatel ausplattiert. Die RÄ-Agarplatten werden anschließend bei 32 °C für 48 h in Dunkelheit inkubiert. Zum Animpfen von *R. sphaeroides* in Flüssigmedium wird entweder eine einzelne Kolonie von einer Agarplatte steril mit einer Impföse in das Medium überführt oder 1-2 ml einer bereits angewachsenen Flüssigkultur in frisches, supplementiertes Medium inokuliert.

Tabelle 8. Zusammensetzung für *Rhodobacter*-Äpfelsäure (RÄ)-Minimalmedium

Komponente	Menge
Zusammensetzung für 1 l RÄ-Minimalmedium	
Äpfelsäure	3,0 g
Ammoniumsulfat	1,2 g
Magnesiumsulfat-7Hydrat	0,2 g
Calciumchlorid-Dihydrat	0,07 g
Spurenelementlösung	1,5 ml
ddH ₂ O	ad 1 l
	→ autoklavieren
Vitaminlösung	8 ml
Phosphatlösung	20 ml
Zusammensetzung für 1 l Vitaminlösung	
Nicotinsäure	0,2 g
Nictinamid	0,2 g
Thiamin-Hydrochlorid	0,4 g
Biotin	0,008 g
ddH ₂ O	ad 1 l
	→ sterilfiltrieren
Zusammensetzung für 1 l Phosphatlösung	
Dikaliumhydrogenphosphat	45 g
Kaliumdihydrogenphosphat	30 g
ddH ₂ O	ad 1 l
	→ autoklavieren
Zusammensetzung für 500 ml Spurenelementlösung	
Mangan(II)-chlorid Tetrahydrat	10 mg
Zinkchlorid	2,5 mg
Lithiumchlorid	2,5 mg
Kaliumbromid	1,25 mg
Kaliumiodid	1,25 mg
Kupfersulfat	0,075 mg
Natriummolybdat Dihydrat	0,5 mg
Cobalt(II)-chlorid Hexahydrat	2,5 mg
Zinn(II)-chlorid Dihydrat	0,25 mg
Bariumchlorid	0,25 mg
Aluminiumchlorid	0,5 mg
Boran	5 mg
EDTA	10 mg
Eisen(III)-citrat	250 mg
ddH ₂ O	ad 500 ml
	→ autoklavieren
Zusammensetzung für 500 ml RÄ-Agarplatten	
Bacto-Agar	8 g [1,6 % w/v]
RÄ-Minimalmedium	ad 500 ml
	→ autoklavieren

2.2.2.1 Mikroaerobes Wachstum von *Rhodobacter sphaeroides*

Für das Wachstum unter mikroaeroben Bedingungen werden zu 80 % mit Medium gefüllte Erlenmeyerkolben verwendet. Dieser Füllstand des Erlenmeyerkolbens führt zu einem Sauerstoffgehalt von 0,5-1 mg/l in der Kultur. Die angeimpften Kulturen werden bei 32 °C und 140 rpm in Dunkelheit inkubiert.

2.2.2.2 Aerobes Wachstum von *Rhodobacter sphaeroides*

Für das Wachstum unter aeroben Bedingungen werden zu 25 % mit Medium gefüllte Schikanekolben verwendet. Dieser Füllstand und die Schikanen des Kolbens gewährleisten einen Sauerstoffgehalt von 5-6 mg/l in der Kultur. Die angeimpften Kulturen werden wie bei einem mikroaeroben Wachstum bei 32 °C und 180 rpm im Dunkeln inkubiert.

Weiterhin kann *R. sphaeroides* für photooxidative Stress-Experimente unter aeroben Bedingungen kultiviert werden (2.2.2.4). Dazu werden 60 ml Kultur in einer 100 ml Meplatflasche unter 32 °C und Begasung (O₂) kultiviert. Die Begasung der Meplatflaschen führt ebenfalls zu einer Sauerstoffkonzentration von 5-6 mg/l.

2.2.2.3 Phototrophes Wachstum von *Rhodobacter sphaeroides*

Für die Kultivierung von *Rhodobacter* unter phototrophen Bedingungen werden Meplatflaschen zu 100 % mit Medium gefüllt, luftdicht verschlossen und mit 60 W/m² Weißlicht bestrahlt. Die Kultivierung findet bei 32 °C statt.

2.2.3 Stress-Experimente mit *Rhodobacter sphaeroides*

Um das Transkriptlevel verschiedener RNAs und deren Rolle in der zellulären Stressantwort in *R. sphaeroides* zu untersuchen, wird deren Expression durch verschiedene Stressoren induziert. Hierzu werden verschiedene Stress-Experimente durchgeführt.

Für Experimente unter mikroaeroben Bedingungen (2.2.2.1) wird eine Übernachtskultur auf eine optische Dichte (OD₆₆₀) von 0,2 ohne Zugabe von Antibiotikum verdünnt. Die Zellen wachsen bei 32 °C und 140 rpm in Dunkelheit auf eine OD₆₆₀ von 0,4 bis 0,6, damit sie sich in der exponentiellen Wachstumsphase befinden. Anschließend wird der Stressor in der entsprechenden Konzentration zu der Flüssigkultur gegeben. Um Hitzestress in den Zellen auszulösen, können die mikroaeroben Flüssigkulturen, nachdem sie die exponentielle Wachstumsphase erreicht haben, weiter bei 42 °C inkubiert werden. Die Zellen werden nach einer gewählten Inkubationszeit unter den entsprechenden Bedingungen geerntet (2.2.16).

Für das Wachstum von *R. sphaeroides* unter photooxidativem Stress werden die Bakterien unter aeroben Bedingungen in Meplatflaschen (2.2.2.2) in Anwesenheit von 0,2 µM Methylenblau bei 32 °C im Dunkeln kultiviert, bis sie eine OD₆₆₀ von 0,4 bis 0,6 erreichen. Zur Erzeugung von Singulett-Sauerstoff (¹O₂) werden die Kulturen nach dem Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase mit 800

W/m² Weißlicht inkubiert. Die Zellen werden nach einer entsprechend gewählten Inkubationszeit geerntet (2.2.16).

Die Zellpellets können nach der Ernte bei -20 °C bis zur RNA-Isolierung (2.5.1) gelagert werden.

2.2.4 Wachstumsanalyse von *Rhodobacter sphaeroides*

Um das Wachstum von einem oder mehreren *R. sphaeroides* Stämmen miteinander zu vergleichen, wird eine Wachstumsanalyse durchgeführt. Hierzu werden die als biologische Triplikate angeimpften Übernachtskulturen auf eine optische Dichte (OD₆₆₀) von 0,1 oder 0,2 ohne Zugabe von Antibiotikum verdünnt. Das Wachstum wird unter den entsprechend gewählten Bedingungen durch das Messen der OD₆₆₀ alle 90 Minuten beobachtet. Das entnommene Proben-Volumen zur Messung wird durch frisches RÄ-Medium ersetzt.

2.2.5 Bestimmung der RNA-Halbwertszeiten in *Rhodobacter sphaeroides*

Zur Bestimmung der RNA-Halbwertszeit in *R. sphaeroides* werden Übernachtskulturen auf eine OD₆₆₀ von 0,2 verdünnt und unter mikroaeroben Bedingungen (2.2.2.1) inkubiert. In diesem Fall werden 500 ml Erlenmeyerkolben verwendet, die zu 80 % mit RÄ-Medium gefüllt werden. Die Zellen wachsen bei 32 °C und 140 rpm in Dunkelheit auf eine OD₆₆₀ von 0,4 bis 0,6, damit sie sich in der exponentiellen Wachstumsphase befinden. Von der Flüssigkultur werden 15 ml unmittelbar vor der Rifampicin-Zugabe auf Eis geerntet. Diese Probe stellt die t = 0 Probe dar. Anschließend wird Rifampicin (gelöst in ddH₂O und 3,2 % 5N NaOH) mit einer finalen Konzentration von 0,2 mg/ml zur Kultur zugegeben und es werden erneut 15 ml zu definierten Zeitpunkten entnommen. Rifampicin ist ein Antibiotikum, welches die DNA-abhängige RNA-Polymerase von Bakterien hemmt. Somit wird die Neusynthese von RNA-Transkripten unterbunden und der zelluläre Abbau der RNA-Transkripte, die sogenannte RNA-Halbwertszeit, kann mittels Northern Blot (2.5.2) oder quantitativer *real-time* RT PCR (2.5.4) bestimmen werden.

2.2.6 Hemmhoftest von *Rhodobacter sphaeroides*

Um den Einfluss von verschiedenen Stressoren auf das Wachstum von *R. sphaeroides* zu untersuchen, kann ein Hemmhoftest durchgeführt werden. Dafür werden 15 ml supplementierter RÄ-Agar in eine Petrischale gegossen. Die auf ihre Stressresistenz zu untersuchenden Kulturen wachsen unter mikroaeroben Bedingungen (2.2.2.1), bis sie die exponentielle Wachstumsphase erreicht haben. Nachdem der Agar abgekühlt und ausgehärtet ist, werden 5 ml warmer Softagar (1:1 RÄ-Agar/RÄ-Flüssigmedium) mit 200 µl Zellsuspension (eingestellt auf eine OD₆₆₀ von 0,4) gemischt und auf die untere RÄ-Agar Schicht gegeben. Es werden 5 µl der zu testenden Chemikalie auf ein 0,5 mm großes, mit UV-Licht sterilisiertes Whatman-Papier pipettiert und mittig auf die Softagar Schicht platziert. Die Platten werden anschließend für 48-72 Stunden bei 32 °C in Dunkelheit inkubiert. Zur Bestimmung der Stressresistenz wird der Durchmesser des Hemmhofs gemessen.

2.2.7 Bestimmung der Überlebenszellzahl von *Rhodobacter sphaeroides*

Um die Auswirkung von verschiedenen Chemikalien auf das Überleben von *R. sphaeroides* zu testen, kann die sogenannte Überlebenszellzahl bestimmt werden. Dazu werden die zu untersuchenden Stämme unter mikroaeroben Bedingungen kultiviert (2.2.2.1), bis sie die exponentielle Wachstumsphase erreicht haben. Der Stressor wird dann in der entsprechenden Konzentration zu der Flüssigkultur dazu gegeben und die Kulturen werden für einen gewählten Zeitraum inkubiert. Danach werden 100 µl der Flüssigkultur in verschiedenen Verdünnungen auf RÄ-Agarplatten mittels Drigalskispatel plattiert. Die Platten werden für 48 Stunden bei 32 °C im Dunkeln inkubiert, bis einzelne Kolonien deutlich erkennbar sind. Die Kolonienzahl einer unbehandelten Kultur (ohne Chemikalie) dient als Kontrolle und wird als 100 % Überlebensrate festgelegt. Die Koloniezahlen der behandelten Kulturen (mit Chemikalie) werden auf die Kontrolle normalisiert, sodass eine Überlebensrate in Prozent ermittelt wird.

2.2.8 Biparentale Konjugation von Plasmid-DNA nach *Rhodobacter sphaeroides*

Um Fremd-DNA, wie zum Beispiel Plasmide, in *R. sphaeroides* einzubringen, wird in dieser Arbeit eine biparentale Konjugation verwendet. In diesem Fall wird der *E. coli* Stamm S17-1 bei der biparentalen Konjugation als Donor-Stamm genutzt. Der *E. coli* S17-1 Donor-Stamm trägt das zu übertragende Plasmid mit der *mob*-Region (*mobility*) und die chromosomal kodierten *tra*-Gene (*transfer*). Die *mob*-Gene dienen dabei zur Linearisierung des zu übertragenden Plasmids und die *tra*-Gene für die Ausbildung der F-Pili, über die der Zell-Zell-Kontakt zwischen Donor- und Akzeptor-Zelle hergestellt wird.

Für die Konjugation werden 1,5 ml einer exponentiell gewachsenen *R. sphaeroides* Kultur mittels Zentrifugation (5.000 rpm, 5 min, Raumtemperatur) pelletiert, in 100 µl RÄ-Medium aufgenommen und mit Zellmaterial des *E. coli* S17-1 Donor-Stamms vermischt. Das Gemisch aus Donor- und Akzeptor-Zellen wird steril auf Nitrocellulose-Filter, welche auf PY-Agarplatten (Tabelle 9) liegen, getropft. Der Konjugationsansatz wird anschließend für mindestens 4 h bei 32 °C inkubiert. Danach werden die Zellen mit 1 ml RÄ-Medium in einem Reaktionsgefäß von dem Filter gewaschen und in geeigneten Verdünnungen auf RÄ-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum als Selektionsmarker plattiert.

Tabelle 9: Zusammensetzung für PY (*peptone-yeast*)-Medium

Komponente	Menge
Zusammensetzung für 1 l PY-Medium	
Pepton	10 g
Hefeextrakt	0,5 g
CaCl ₂ [1 M]	1 ml
MgCl ₂ [1 M]	1 ml
0,5 % FeSO ₄	2,4 ml
ddH ₂ O	ad 1 l
	→ autoklavieren

Zusammensetzung für 500 ml PY-Agarplatten

Bacto-Agar	8 g [1,6 % w/v]
PY-Medium	ad 500 ml
	→ autoklavieren

2.2.9 UV-crosslink

Zur Isolierung von RNA-Protein-Komplexen für die darauffolgende iCLIP Methode muss zuvor die RNA irreversibel durch einen UV-crosslink an das entsprechende RNA-Bindeprotein vernetzt werden. Dafür werden *R. sphaeroides* Zellen in 400 ml bei 32 °C und 140 rpm unter mikroaeroben Bedingungen (2.2.2.1) auf eine OD₆₆₀ von 0,6 angezogen. Die Zellen werden anschließend für 10 min bei 8.000 rpm und 4 °C zentrifugiert (2.2.16). Nach der Zentrifugation werden die Zellen einmal mit 40 ml 1x PBS gewaschen und erneut für 10 min bei 8.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die Zellen werden anschließend in 20 ml 1x PBS aufgenommen und 4x bei 300 mJ/cm² mit UV-Licht bestrahlt. Der UV-crosslink findet in sterilen Petrischalen statt, die sich im Eiswasser befinden. Nach jeder Bestrahlung werden die Zellen gründlich resuspendiert. Nach dem UV-crosslink werden die Zellen erneut abzentrifugiert und bei -20 °C gelagert.

2.2.10 Kultivierung von *Escherichia coli*

Zur Kultivierung von *E. coli* wird in dieser Arbeit Standard I-Medium (Tabelle 11) verwendet. Als Selektionsmarker können nach dem Autoklavieren zusätzliche Antibiotika hinzugefügt werden. Für die Kultivierung von *E. coli* auf Agarplatten wird Standard I-Medium vor dem Autoklavieren mit 1,6 % (w/v) Bacto-Agar (Tabelle 10) versetzt. Für Einzelkolonien werden Verdünnungen einer Flüssigkultur mit einem Drigalskispatel ausplattiert. Die Platten werden anschließend bei 37 °C für 12 h inkubiert. Zum Animpfen von *E. coli* in Flüssigmedium wird eine einzelne Kolonie von einer Agarplatte steril mit einer Impföse in das Medium überführt.

Tabelle 10: Zusammensetzung für Standard I-Medium

Komponente	Menge
Zusammensetzung für 1 l Standard I-Medium	
Pepton	15 g
Hefeextrakt	3 g
NaCl	6 g
Glukose	1 g
ddH ₂ O	ad 1 l
	→ autoklavieren
Zusammensetzung für 500 ml Standard I-Agarplatten	
Bacto-Agar	8 g [1,6 % w/v]
Standard I-Medium	ad 500 ml
	→ autoklavieren

2.2.10.1 Aerobes Wachstum von *Escherichia coli*

Flüssigkulturen von *E. coli* werden unter aeroben Wachstumsbedingungen kultiviert. Dazu werden Erlenmeyerkolben zu 25 % mit Standard I-Medium gefüllt und bei 180 rpm und 37 °C inkubiert.

2.2.11 Herstellen von elektrokompenten Zellen

Für die Herstellung von elektrokompenten Zellen wird der entsprechende *E. coli*-Stamm unter aeroben Bedingungen (2.2.10.1) bei 37°C und 180 rpm inkubiert, bis diese eine OD₆₀₀ von 0,8 erreicht haben. Vor der ersten Zentrifugation (5.000 rpm und 4 °C) werden die Zellen für 30 Minuten auf Eis abgekühlt. Anschließend werden die Zellen in 1 l destillierten Wasser resuspendiert und erneut zentrifugiert (5.000 rpm und 4 °C). Dieser Schritt wird ein weiteres Mal wiederholt, bevor sie in 20 ml 10 % Glycerol resuspendiert werden. Nachdem die Zellen mit Glycerol resuspendiert wurden, werden sie erneut zentrifugiert (5.000 rpm und 4 °C) und in 3 ml 10 % Glycerol aufgenommen. Diese einzelnen Schritte dienen zur Entfernung von Salzen, die während der Elektrotransformation störend sein können. Dann werden die resuspendierten Zellen in 50 µl Aliquots aufgeteilt, in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

2.2.12 Elektrotransformation von *Escherichia coli*

Bei der Elektrotransformation, oder auch Elektroporation genannt, werden Zellen einer geringen elektrischen Spannung ausgesetzt, wodurch die Durchlässigkeit der Zellmembran zunimmt und Fremd-DNA in die Zelle aufgenommen werden kann.

Für die Elektrotransformation werden 50 µl kompetenter *E. coli* JM109 oder S17-1 Zellen (2.2.11) mit 100 ng Plasmid-DNA (2.3.6.3) vorsichtig gemischt und blasenfrei in eine gekühlte Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation findet bei 2,5 kV für ca. 5 ms statt. Die Suspension aus Zellen und Plasmid-DNA wird nach der Elektroporation in 500 µl Standard I-Medium (Tabelle 11) aufgenommen und bei 37 °C und 180 rpm für ca. 1 h inkubiert, damit sich die Zellen regenerieren und die Resistenz ausgebildet wird. Danach werden die Zellen in verschiedenen Verdünnungen (10^{-2} oder 10^{-3}) auf Standard I-Agarplatten (Tabelle 11) mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und für 12 h bei 37 °C inkubiert.

2.2.13 Expression von rekombinanten Proteinen in *Escherichia coli*

Zu untersuchende Proteine können über ein induzierbares Plasmidsystem rekombinant in *E. coli* Zellen hergestellt werden. Dieses System hat den Vorteil, dass dadurch schnell große Mengen an Protein generiert wird und diese spezifisch über eine Affinitätschromatographie aufreinigen werden können. Für die Expression von rekombinanten Proteinen aus *E. coli* wird eine Einzelkolonie steril in einen zu 25 % mit Standard I-Medium (Tabelle 11) und dem entsprechenden Antibiotikum versetzten Erlenmeyerkolben als Vorkultur überführt und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Von der Vorkultur wird anschließend 1 l Standard I-Medium (Tabelle 11) mit dem entsprechenden Antibiotikum 1%ig inokuliert. Die Zellen wachsen danach bei 37 °C und 180 rpm auf eine OD₆₀₀ von 0,8. Die

Expression erfolgt durch Zugabe eines Induktors entweder über 3 h bei gleichbleibenden Bedingungen oder über Nacht bei 16 °C. Nach der Inkubation werden die Zellen auf Eis geerntet (2.2.16).

2.2.14 Bestimmung der Zelldichte einer Flüssigkultur

Die Zelldichte einer Flüssigkultur, auch optische Dichte (OD) genannt, wird photometrisch gemessen. Dabei werden Flüssigkulturen von *E. coli* bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) und Flüssigkulturen von *R. sphaeroides* bei einer Wellenlänge von 660 nm (OD_{660}) gemessen. Die OD beschreibt dabei die Streuung von Licht an Partikeln beim Durchgang einer Suspension und wird nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz berechnet. Bakterienkulturen ab einer OD von 0,8 werden mit dem entsprechenden Medium verdünnt gemessen.

2.2.15 Herstellung von Dauerkulturen

Bakterienkulturen können nach einer Aufnahme in Glycerin langfristig bei -80 °C aufbewahrt werden. Die Kultur kann dann je nach Bedarf erneut auf den entsprechenden Agar-Platten ausgestrichen und für neue Experimente genutzt werden. Für die Herstellung von Dauerkulturen werden 4 ml Zellkultur, welche sich in der exponentiellen Phase befinden, mittels Zentrifugation für 5 Minuten bei 8.000 rpm und Raumtemperatur geerntet. Das Zellpellet wird anschließend einmal mit dem entsprechenden Kulturmedium gewaschen, um mögliche Reste des Antibiotikums zu entfernen. Das Zellpellet wird dann in 750 µl Medium aufgenommen und mit 250 µl 80 % Glycerin (autoklaviert) versetzt. Die Zellen können so bei -80 °C dauerhaft gelagert werden.

2.2.16 Zellernte

Die entnommene Flüssigkultur wird auf Eis mittels Zentrifugation geerntet. Dabei werden die Zellen bei 4 °C und 9.000 rpm für 10 min zentrifugiert. Die Zellpellets können anschließend direkt für weitere Schritte verwendet oder bei -20 °C aufbewahrt werden.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Amplifikation von DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion, oder auch *polymerase chain reaction* (PCR) genannt, kann genutzt werden, um DNA-Fragmente, ausgehend von einer geringen Menge an DNA, zu vervielfältigen. Für eine PCR sind die wichtigsten Komponenten eine thermostabile DNA-Polymerase, eine geeignete DNA-Matrize (Template) und zwei Oligonukleotide (Primer), die entsprechend komplementär zu dem 5'- und 3'-Ende des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts sind. In einem ersten Schritt wird dafür die Basenpaarung der Template DNA bei einer Temperatur von 95-98 °C aufgelöst. Da nun das Template einzelsträngig vorliegt, können beim Abkühlen des Reaktionsansatzes die Primer komplementär an der Zielsequenz binden. Anschließend elongiert die DNA-Polymerase ausgehend vom 5'-Ende des Primers

in Richtung 3'-Ende, bis das gewünschte Fragment amplifiziert ist. Diese Reaktionsverläufe werden ca. 35-mal wiederholt. Die Methode zur Vervielfältigung der DNA mittels PCR wird für verschiedenste Zwecke verwendet, die aber alle auf dem oben beschriebenen Prinzip basieren.

In dieser Arbeit werden die Taq-Polymerase (Qiagen) und Phusion-Polymerase (Thermo Scientific) für die Amplifikation von DNA verwendet.

Tabelle 11: Zusammensetzung für einen 10 µl PCR-Reaktionsansatz

Komponente	Phusion-PCR Menge	Taq-PCR Menge
H ₂ O	6,3 µl	6,4 µl
Primer <i>forward</i> [10 µM]	0,2 µl	0,5 µl
Primer <i>reverse</i> [10 µM]	0,2 µl	0,5 µl
dNTPs [jedes 2,5 mM]	0,2 µl	0,4 µl
5x GC-Puffer	2 µl	-
10x Taq-Puffer	-	1 µl
Phusion-Polymerase (Thermo Scientific)	0,1 µl	-
Taq-Polymerase (Qiagen)	-	0,2 µl
DNA-Template*	1 µl	1 µl

* DNA-Template: chromosomal [100 ng/µl]; Plasmid [30 ng/µl]; negative Kontrolle: ddH₂O

Tabelle 12: Standard PCR Programm

	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	98 °C (Phusion-Polymerase)	3 min
	95 °C (Taq-Polymerase)	5 min
Denaturierung	98 °C (Phusion-Polymerase)	10 sec
	95 °C (Taq-Polymerase)	30 sec
<i>Annealing</i>	Primer-spezifische Temperatur	30 sec
Elongation	72 °C (Phusion-Polymerase)	2 kb/min
	72 °C (Taq-Polymerase)	1 kb/min
Finale Elongation	72 °C	5 min

34x Zyklen

Zur Überprüfung der PCR Qualität können 5-10 µl des Reaktionsansatzes auf ein TAE-Agarosegel (2.4.1) oder TBE-Polyacrylamidgel (2.4.2) aufgetragen werden.

2.3.2 Quantifizierung von Nukleinsäure

Die Konzentration der Nukleinsäure, DNA oder RNA, wird photometrisch (NanoDrop) durch die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 und 280 nm bestimmt. Eine Absorption von 1 bei 260 nm entspricht einer Konzentration von 50 ng/µl doppelsträngiger DNA bzw. von 40 ng/µl RNA. Dabei gibt das Verhältnis des Absorptionsquotienten bei 260 nm (DNA) und 280 nm (Protein) Aufschluss über die Reinheit der Nukleinsäure. Das Verhältnis von reiner DNA beträgt 1,8, während es bei reiner RNA 2,0 beträgt.

2.3.3 Restriktion von DNA

Bei der Restriktion von DNA-Fragmenten können Typ II-Restriktionsendonukleasen verwendet werden, die palindromische Sequenzen von 4 bis 8 Basenpaaren erkennen. Das Restriktionsenzym katalysiert an diesen spezifischen Sequenzen eine hydrolytische Spaltung der dsDNA (doppelsträngige DNA), wodurch je nach Restriktionsenzym *blunt ends*, das heißt dsDNA-Fragmente ohne Überhänge an den Enden, oder *sticky ends*, das heißt dsDNA-Fragmente mit 5'- oder 3'-Überhängen an den Enden, entstehen. DNA-Fragmente, welche mit gleichen Restriktionsenzymen geschnitten wurden, können anschließend zusammen ligiert werden (2.3.4). In dieser Arbeit werden hauptsächlich FastDigest™ (Thermo Scientific) Restriktionsenzyme nach Herstellerangaben verwendet.

2.3.4 Ligation von DNA

Die Verknüpfung von zwei DNA-Fragmenten kann über die DNA-Ligase erfolgen. Bei dieser Reaktion katalysiert die DNA-Ligase eine Phosphodiester-Bindung zwischen einem freien 3'-Hydroxyl-Ende mit einem freien 5'-Phosphat-Ende unter Verbrauch von ATP.

In dieser Arbeit werden Ligationen verwendet, um DNA-Fragmente mit einem Vektor zu ligieren. PCR-Produkte werden für eine Klonierung in diesem Fall zuerst in einen Zwischen- bzw. Klonierungsvektor, welche der pDrive (Qiagen PCR Cloning Kit) oder pJET2.1 (CloneJET™ PCR Cloning Kit, Thermo Scientific) sein können, ligiert. Die entsprechenden Zwischenvektoren hängen davon ab, mit welcher DNA-Polymerase das PCR-Produkt hergestellt wurde. PCR-Produkte, die mittels Phusion-Polymerase (Thermo Scientific) erstellt wurden, weisen *blunt ends* auf und werden mit dem pJET2.1 Vektor ligiert. PCR-Produkte, die mittels Taq-Polymerase (Qiagen) angefertigt wurden, weisen *sticky ends* auf und werden mit dem pDrive Vektor ligiert. Dabei werden die Ligationen in den Zwischenvektor nach Herstellerangaben durchgeführt. Das Verhältnis von Vektor zu Insert beträgt 1:3 bei der Ligation von Restriktionsprodukten in den Endvektor.

2.3.5 Isolierung von DNA

2.3.5.1 Isolierung von Plasmid DNA aus Bakterien

Zur Isolierung von Plasmid DNA aus Bakterien wird das Prinzip der alkalischen Lyse angewandt. Dazu werden 2 ml Bakterienkultur aus der stationären Phase für 5 min bei Raumtemperatur und 8.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird nach der Zentrifugation verworfen und das Zellpellet in 100 µl Lösung I (Tabelle 13) resuspendiert. Für die Zellyse werden anschließend 200 µl Lösung II zu den resuspendierten Zellen gegeben, 5-10 mal invertiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Denaturierung der bakteriellen Proteine und der chromosomalen DNA werden 150 µl Lösung III dazu gegeben, erneut 5-10 mal invertiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend werden die Zellfragmente mittels Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4 °C für 10 min von dem Überstand, in dem sich die Plasmid DNA befindet, getrennt. Der Überstand wird in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und erneut zentrifugiert, sodass keine weiteren Zellbestandteile im Lysat sind. Die Plasmid DNA wird danach mittels 96 % Ethanol gefällt.

Tabelle 13: Zusammensetzung für Lösung I, II und III

Komponente	Menge / [Konzentration]	
Zusammensetzung für 100 ml Lösung I		
Glukose	0,9 g	[50 mM]
1 M Tris pH 8,0 (Tabelle 7)	2,5 ml	[25 mM]
2,5 M EDTA (Tabelle 7)	400 µl	[10 mM]
ddH ₂ O	ad 100 ml	
	→ autoklavieren; bei 4 °C lagern	
	→ Zugabe von 4 µl/ml RNase A (100 mg/ml)	
Zusammensetzung für 20 ml Lösung II		
1 N NaOH	4 ml	[0,2 N]
20 % SDS-Lösung	1 ml	[1 %]
ddH ₂ O	ad 20 ml	
	→ frisch ansetzen	
Zusammensetzung für 100 ml Lösung III		
Kaliumacetat	29,4 g	[3 M]
ddH ₂ O	ad 100 ml	
	→ pH-Wert auf 6,5 mit Essigsäure einstellen	
	→ autoklavieren; bei 4 °C lagern	

2.3.5.2 Isolierung von chromosomaler DNA aus Bakterien

Für die Isolierung von chromosomaler DNA aus Bakterien kann die CTAB (Cetremoniumbromid)-Methode verwendet werden. Dafür werden 20 ml Bakterienkultur aus der exponentiellen Phase mittels Zentrifugation bei 8.000 rpm und Raumtemperatur geerntet. Daraufhin wird das Zellpellet mit 700 µl TE-Puffer (Tris/EDTA-Puffer; Tabelle 14) resuspendiert und mit 30 µl 10 % SDS und 12 µl Proteinase K (20 mg/ml) versetzt. Für die Zelllyse und den Proteinverdau wird der Ansatz durch Pipettieren vermischt und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Danach werden 130 µl 5 M NaCl und 110 µl CTAB-Reagenz (Tabelle 14) zugegeben, gut vermischt und für 10 min bei 65 °C inkubiert. Im Anschluss wird zu dem Reaktionsansatz 750 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) zugegeben, durch Invertieren gemischt und 5 Minuten bei 13.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Die wässrige Phase wird nach der Zentrifugation in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die chromosomale DNA durch Phenol/Chloroform-Extraktion und Isopropanol-Fällung aufgereinigt.

Tabelle 14: Zusammensetzung für TE-Puffer und CTAB-Lösung

Komponente	Menge / [Konzentration]	
Zusammensetzung für 100 ml TE-Puffer		
1 M Tris HCl pH 8,0 (Tabelle 7)	1 ml	[10 mM]
2,5 M EDTA (Tabelle 7)	40 µl	[1 mM]
ddH ₂ O	ad 100 ml	

Zusammensetzung für 100 ml CTAB-Lösung in 0,7 M NaCl (w/v)

NaCl	4,1 ml	[0,7 M]
Cetremoniumbromid	10 g	[10 %]
ddH ₂ O	<i>ad</i> 100 ml	

2.3.6 Fällung von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren, wie zum Beispiel DNA oder RNA, werden gefällt, um mögliche Verunreinigungen von Salzen zu entfernen, oder die Nukleinsäure in einem geeigneten Volumen aufzunehmen. Dabei macht man sich die physikalischen bzw. chemischen Eigenschaften der Nukleinsäure zu nutzen. Durch die Zugabe von unpolaren Lösungsmitteln, wie zum Beispiel Ethanol oder Isopropanol, wird die negative Ladung der Phosphatgruppen in der Nukleinsäure aufgehoben und somit die Löslichkeit vermindert. Langkettige Nukleinsäuren präzipitieren, während einzelne Nukleotide in Lösung bleiben.

2.3.6.1 Ethanol-Fällung

Bei der Fällung mit Ethanol wird die Nukleinsäure-haltige Lösung mit 0,1 Volumenteilen 3 M Natriumacetat (pH 5,2 bei DNA und pH 4,5 bei RNA) und 2,5 Volumenteilen 96 %igen Ethanol (kalt) versetzt. Die Fällung kann für mehrere Stunden bei -20 °C, für eine Stunde bei -80 °C oder für 20 min in flüssigen Stickstoff stattfinden. Für die Präzipitation der Nukleinsäure werden die Ansätze anschließend für mindestens 30 min bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird nach der Zentrifugation verworfen und das Pellet mit 70 %igen Ethanol gewaschen. Schließlich wird das Präzipitat aus Nukleinsäure getrocknet und in einem geeigneten Volumen DNase- und RNase-freiem Wasser aufgenommen.

2.3.6.2 Isopropanol-Fällung

Bei der Fällung mit Isopropanol wird die Nukleinsäure-haltige Lösung mit 0,1 Volumenteilen Natriumacetat (3 M; pH 4,5 für RNA und pH 5,2 für DNA) und 0,7 Volumenteilen Isopropanol versetzt. Anschließend wird mit der Nukleinsäure genauso verfahren wie bei der Ethanol-Fällung (2.3.6.1).

2.3.6.3 n-Butanol-Fällung

Eine Fällung mit n-Butanol kann verwendet werden, um Ligationsansätze vor der Transformation (2.2.12) von störenden Salzen zu reinigen. Dafür wird der Reaktionsansatz auf ein Volumen von 50 µl mit DNase- und RNase-freiem Wasser aufgefüllt, mit 500 µl n-Butanol versetzt und gevortext. Der Ligationsansatz wird anschließend mittels Zentrifugation bei 13.000 rpm und Raumtemperatur für 10 min präzipitiert. Nach der Zentrifugation wird das Pellet getrocknet, in DNase- und RNase-freiem Wasser aufgenommen und für die Elektrottransformation verwendet (2.2.12).

2.4 Gelelektrophoretische Methoden

Zur Analyse von Nukleinsäuren oder Proteinen werden in dieser Arbeit verschiedene gelelektrophoretische Methoden verwendet. Die Auftrennung der negativ geladenen Moleküle, DNA, RNA oder Proteine, erfolgt dabei in einem elektrischen Feld, wodurch die Moleküle in einem entsprechenden ionischen Pufferlösung von der Kathode zur Anode wandern. Dabei ist das Laufverhalten der Moleküle in einer Gelmatrix antiproportional zu ihrer Größe.

2.4.1 TAE-Agarosegele zur Auftrennung von langen DNA-Fragmenten

Zur Auftrennung von PCR-Produkten oder Restriktionsansätzen ab einer Größe von 400 bp können 1 – 1,5 %ige (w/v) TAE- (Tris/Acetat/EDTA) Agarosegele verwendet werden. Die abgewogene Agarose wird zur Herstellung eines Agarosegels dafür in 1x TAE-Puffer (Tabelle 7) unter Aufkochen in einer Mikrowelle gelöst und in einen Gelschlitten mit eingesetztem Kamm für die Probestaschen gegossen. Nach dem Aushärten des Gels wird der Kamm entfernt, das Gel in der mit 1x TAE gefüllten Gelkammer platziert und die mit 1x Ladepuffer (Tabelle 15) versetzten DNA-Proben geladen. Der Gellauf findet bei 120 V für ca. 30-45 min statt. Nach dem Lauf kann das Gel zur Analyse für 15 min in Ethidiumbromid-Lösung (2 mg/ml) gefärbt werden. Das Ethidiumbromid interkaliert dabei in doppelsträngige DNA und fluoresziert, wenn es mit UV-Licht angeregt wird. Die mit Hilfe von das Ethidiumbromid gefärbte DNA kann nun mittels UV-Transilluminator (UVT-20 M/W, HeroLab) fotografiert werden.

Tabelle 15: Zusammensetzung für 10 ml 10x Ladepuffer

Komponente	Menge / [Konzentration]	
Glycerin	6 ml	[60 %]
Bromphenolblau	10 mg	[0,1 %]
Xylenyanol	10 mg	[0,1 %]
ddH ₂ O	ad 10 ml	

2.4.1.1 Extraktion von DNA aus TAE-Agarosegelen

Damit PCR-Produkte und Restriktionsansätze in weiteren Schritten verwendet werden können, müssen diese nach der Gelelektrophorese aus dem Agarosegel extrahiert werden. Dafür wird das gewünschte DNA-Fragment unter Bestrahlung von UV-Licht aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit Hilfe des *InnuPREP DOUBLEpure Kits* (Analytic Jena) nach Anweisungen des Herstellers aus dem Gel gelöst.

2.4.2 TBE-Polyacrylamidgele zur Auftrennung von kurzen DNA-Fragmenten

Zur Auftrennung von PCR-Produkten oder Restriktionsansätzen mit einer Größe von unter 400 bp kann ein 10 %iges TBE-Polyacrylamidgel (Tabelle 16) verwendet werden. Dabei bildet das Polyacrylamid eine feinere Gelmatrix als die Agarose aus, wodurch kleinere DNA-Fragmente besser aufgetrennt werden.

Die Lösungen für das Gel werden gemischt und zur Polymerisation zwischen zwei Glasplatten in ein Minigelsystem gegossen. Nach der Polymerisation wird das Gel vertikal in der mit 1x TBE-Puffer gefüllten Gelkammer platziert und die mit 1x Ladepuffer (Tabelle 15) versetzten DNA-Proben werden geladen. Der Gellauf findet bei 150 V für ca. 1,5 h statt. Zur Analyse kann das Gel ähnlich wie ein Agarosegel (2.4.1) mit Ethidiumbromid gefärbt werden.

Tabelle 16: Zusammensetzung für 10 %iges TBE-Polyacrylamidgel

Komponente	Menge
10x TBE-Puffer (Tabelle 7)	0,6 ml
Acrylamidlösung (40 %)	1,5 ml
ddH ₂ O	3,9 ml
APS (10 % w/v)	24 µl
TEMED	6 µl

2.4.2.1 Extraktion von DNA aus TBE-Polyacrylamidgelen

Für eine Extraktion von DNA aus einem TBE-Polyacrylamidgel wird das gewünschte DNA-Fragment unter Bestrahlung von UV-Licht ähnlich wie bei einem Agarosegel ausgeschnitten. Das Gel-Stück wird anschließend mit einer Pipettenspitze in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß zerkleinert und mit 300 µl Diffusionspuffer (Tabelle 17) überschichtet. Die Extraktion von DNA aus einem TBE-Polyacrylamidgel findet über den Mechanismus der Diffusion für 12 bei 37 °C statt. Anschließend werden die 300 µl Diffusionspuffer in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit Isopropanol gefällt (2.3.6.2).

Tabelle 17: Zusammensetzung für 80 ml Diffusionspuffer

Komponente	Menge / [Konzentration]
Magnesiumacetat	0,11 g [10 mM]
Ammoniumacetat	3,1 g [500 mM]
EDTA	0,32 g [1 mM]
ddH ₂ O	ad 80 ml

2.4.3 Denaturierende TBE-Polyacrylamid-Harnstoffgele zur Auftrennung von RNA

In dieser Arbeit werden verschiedene denaturierende TBE-Polyacrylamid-Harnstoffgele zur Analyse von RNA verwendet.

2.4.3.1 Denaturierende TBE-Polyacrylamid-Harnstoffgele

In dieser Arbeit wird häufig ein 10 %iges TBE-Polyacrylamid-Harnstoffgel (Tabelle 18) mit einer Größe von 18 x 18 cm und einer *Spacer* Dicke von 1 mm genutzt. Vor dem Zusammenbau der Glasplatten werden diese gründlich gereinigt und die Ohrenplatte silanisiert (BlueSlick; Serva). Nach dem Gießen der Gelmischung zwischen die Glasplatten polymerisiert das Gel für ca. 1 h bei Raumtemperatur. Nach

der Polymerisation wird das Gel in die Gelapparatur eingespannt. Die RNA-Proben werden vor dem Laden auf das Gel mit 0,7x Formamid-Harnstoff-Mix (Tabelle 19) versetzt und für 10 min bei 65 °C denaturiert. Der Gellauf findet für 2,5 h bei 300 V in 1x TBE-Puffer (Tabelle 7) statt. Das Gel kann anschließend für einen Northern Blot verwendet, oder zur Qualitätskontrolle der RNA in Ethidiumbromid gefärbt werden.

Tabelle 18: Zusammensetzung für 10 %iges TBE-Polyacrylamid-Harnstoffgel

Komponente	Menge
Harnstoff	16,8 g
10x TBE-Puffer (Tabelle 7)	4 ml
Acrylamidlösung (40 %)	10 ml
ddH ₂ O	ad 40 ml
APS (10 % w/v)	120 µl
TEMED	20 µl

Tabelle 19: Zusammensetzung für Formamid-Harnstoff-Mix

Komponente	Menge / [Konzentration]
Harnstoff	3,6 g [6 M]
10x TBE-Puffer (Tabelle 7)	1 ml [10 %]
Deionisiertes Formamid	8 ml [80 %]
Bromphenolblau	10 mg [0,1 %]
Xylencyanol	10 mg [0,1 %]
ddH ₂ O	ad 10 ml

2.4.3.2 Denaturierende TBE-Polyacrylamid-Harnstoffgele für RNA-Degradations-Experimente

Für ein RNA-Degradations-Experiment wird ein 6 %iges TBE-Polyacrylamid-Harnstoffgel (Tabelle 20) mit einer Größe von 18 x 18 cm und einer *Spacer* Dicke von 0,3 mm genutzt. Das Gel wird genauso wie in 2.4.3.1 beschrieben hergestellt. Die RNA-Proben aus dem Degradations-Experiment werden vor dem Beladen auf das Gel mit 0,7x Formamid-Harnstoff-Mix (Tabelle 19) versetzt und für 10 min bei 65 °C denaturiert. Der Gellauf findet für 1,5 h bei 300 V in 1x TBE-Puffer (Tabelle 7) statt. Nach Beendigung der Elektrophorese wird das Gel auf Whatman-Papier übertragen und für 2 Stunden bei 80 °C auf einem Vakuum-Trockner getrocknet. Die Detektion und Visualisierung der radioaktiven Proben geschieht über einen Phosphoimager (2.5.10).

Tabelle 20: Zusammensetzung für 6 %iges TBE-Polyacrylamid-Harnstoffgel

Komponente	Menge
Harnstoff	8,4 g
10x TBE-Puffer	2 ml
Acrylamidlösung (40 %)	3 ml
ddH ₂ O	ad 20 ml
APS (10 % w/v)	60 µl
TEMED	10 µl

2.4.4 Native TBE-Polyacrylamidgele für RNA-*shift-assays* (EMSA)

Zur Analyse von RNA-Mobilitäts-*shift-assays* (EMSAs) werden 6 %ige TBE-Polyacrylamidgele (Tabelle 21) mit 0,25x TBE-Puffer und einer *Spacer* Dicke von 0,3 mm genutzt. In diesem Fall wird jedoch kein Harnstoff in dem Gel verwendet, damit der ausgebildete RNA-RNA- oder RNA-Protein-Komplex nicht denaturiert wird. Das Gel wird genauso wie in 2.4.3.1 beschrieben hergestellt. Die Proben werden mit einem nativen RNA-Ladepuffer (Tabelle 21) versetzt und direkt auf das Gel geladen. Der Gellauf findet für 3 h bei 200 V in 0,25x TBE-Puffer (Tabelle 7) und 4 °C (Kühlraum) statt. Nach dem Gellauf wird das Gel auf Whatman-Papier übertragen und für 2 Stunden bei 80 °C auf einem Vakuum-Trockner getrocknet. Die Detektion und Visualisierung der Signale geschieht über einen *phosphoimaging* (2.5.10).

Tabelle 21: Zusammensetzung für 6 %iges TBE-Polyacrylamidgele

Komponente	Menge
10x TBE-Puffer (Tabelle 7)	0,5 ml
Acrylamidlösung (40 %)	3 ml
ddH ₂ O	ad 20 ml
APS (10 % w/v)	60 µl
TEMED	10 µl

Tabelle 22: Zusammensetzung für nativen RNA-Ladepuffer

Komponente	Menge / [Konzentration]
10x TBE-Puffer (Tabelle 7)	5 µl [0,5 %]
Glycerol	500 µl [50 %]
Bromphenolblau	1 mg [0,1 %]
ddH ₂ O	ad 1 ml

2.4.5 Sequenziergel für *structure probing* Reaktionen

Für die Auftrennung der *structure probing* Reaktionen (2.5.7) werden 8 %ige Sequenziergele mit einer Größe von 40 x 20 cm und einer *spacer* Dicke von 0,3 mm verwendet. Die Glasplatten werden vor dem Gießen des Gels gründlich gereinigt und die Ohrenplatte silanisiert (BlueSlick; Serva). Um eine saubere Auftrennung und Reproduzierbarkeit der Experimente zu gewährleisten, werden in diesem Fall die vorgefertigten *Rothiphorese* Sequenziergel Mischungen (Roth) verwendet (Tabelle 23). Das Gel polymerisiert für 2 h bei Raumtemperatur. Nach der Polymerisierung erhält das Gel eine Vorlaufzeit von ca. 1 h bei 2000 V, damit eine optimale Temperatur von 50 °C in dem Gel erreicht wird. Zur besseren Wärmeverteilung in dem Gel wird eine Metallplatte an den Glasplatten befestigt. Die Proben aus der *structure probing* Reaktion (2.5.7) werden vor dem Laden auf das Gel mit 0,7x Formamid-Harnstoff-Mix (Tabelle 19) versetzt und für 10 min bei 65 °C denaturiert. Der Gellauf erfolgt anschließend bei 2000 V für ca. 2,5 h. Anschließend wird das Gel auf Whatman-Papier übertragen und für 2 Stunden bei 80 °C auf einem Vakuum-Trockner getrocknet. Die Detektion und Visualisierung der Signale geschieht über einen Phosphoimager (2.5.10).

Tabelle 23: Zusammensetzung für 8 %iges Sequenziergel

Komponente	Menge
Rotiphorese®Sequenziergel Konzentrat	12,8 ml
Rotiphorese®Sequenziergel Verdünner	23,2 ml
Rotiphorese®Sequenziergel Puffer	4 ml
APS (10 % w/v)	300 µl
TEMED	30 µl

2.4.6 Denaturierende Formaldehyd-Agarosegele zur Auftrennung von RNA

In dieser Arbeit werden neben denaturierenden TBE-Polyacrylamid-Harnstoffgelen auch Formaldehyd-Agarosegele zur Analyse von RNA verwendet. Während TBE-Polyacrylamid-Harnstoffgele für die Auftrennung von kleinen RNA-Molekülen besser geeignet sind, dienen Formaldehyd-Agarosegele zur Untersuchung von großen RNA-Fragmenten, wie zum Beispiel mRNAs.

2.4.6.1 Denaturierende Formaldehyd-Agarosegele für Northern Blots

Für die Auftrennung von größeren RNA-Fragmenten wird ein 1 %iges Formaldehyd-Agarosegel (Tabelle 24) verwendet. Vor dem Zusammenbau der Gelkammer und des Gelschlittens wird alles gründlich mit 1 M NaOH und DEPC-Wasser gereinigt, um Kontaminationen mit RNasen zu vermeiden. Zur Herstellung des Gels wird die abgewogene Agarose in DEPC-Wasser (Tabelle 7) unter aufkochen in einer Mikrowelle gelöst. Nachdem die Agarose-Mischung für ca. 10 min abgekühlt ist, wird 10x MOPS-Puffer (Tabelle 7) und Formaldehyd dazugegeben und die Mischung in den Gelschlitten mit eingesetztem Kamm gegossen. Nach Aushärten des Gels wird der Kamm entfernt und das Gel in der Gelkammer mit 1x MOPS-Puffer platziert. Während dieser Zeit werden 10 µg der zu untersuchenden RNA in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mittels *SpeedVac* getrocknet. Anschließend wird die getrocknete RNA in 9 µl RNA-Probenpuffer (Tabelle 25) aufgenommen und mit 1 µl RNA-Ladepuffer (Tabelle 26) versetzt. Um Sekundärstrukturen in der RNA zu lösen, wird die RNA für 10 min bei 65 °C vor dem Laden aufs Gel denaturiert. Der Gellauf erfolgt anschließend bei 125 V für ca. 3 h. Das Gel kann anschließend für einen Northern Blot verwendet werden oder zur Qualitätskontrolle der RNA in Ethidiumbromid gefärbt werden.

Tabelle 24: Zusammensetzung für 1 %iges Formaldehyd-Agarosegel

Komponente	Menge / [Konzentration]
Agarose	1,1 g [1 %]
DEPC-H ₂ O	80 ml
	→ aufkochen
Formaldehyd [37 %]	20 ml [6,7 %]
10x MOPS-Puffer	11 ml

Tabelle 25: Zusammensetzung für RNA-Probenpuffer

Komponente	Menge / [Konzentration]	
10x MOPS	50 µl	[1x]
Formamid	250 µl	[50 %]
Formaldehyd	89 µl	[8,5 %]
DEPC-H ₂ O	111 µl	

Tabelle 26: Zusammensetzung für 10x RNA-Ladepuffer

Komponente	Menge / [Konzentration]	
Glycerin	6 ml	[60 %]
EDTA	0,4 µl	[0,1 mM]
Bromphenolblau	10 mg	[0,1 %]
DEPC-H ₂ O	ad 10 ml	

2.4.7 SDS-Polyacrylamidgele zur Auftrennung von Proteinen

Ähnlich wie bei Nukleinsäuren können auch Proteine zur Analyse in einer Gelelektrophorese aufgetrennt werden. Die Proteine müssen, bevor sie in einem elektrischen Feld aufgetrennt werden, mit SDS (Sodiumdodecylsulfat) enthaltenen Ladepuffer aufgekocht werden. Bei diesem Vorgang werden die Proteine denaturiert und erhalten durch die SDS-Moleküle eine starke negative Ladung. Durch diese starke negative Ladung ist die Eigenladung des Proteins irrelevant und die Auftrennung der Proteine in einem elektrischen Feld erfolgt antiproportional zum Molekulargewicht. In dieser Arbeit werden diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophoresen (SDS-PAGE) bestehend aus einem Sammel- und Trenngel verwendet. Das Sammelgel besitzt im Unterschied zum Trenngel einen geringeren Prozentsatz an Acrylamid (4 %) und einen niedrigeren pH-Wert (6,8), wodurch die Proteine beim Übergang von Sammel- zu Trenngel komprimiert werden und als schärfere Bande in das Trenngel übergehen.

Für ein SDS-Polyacrylamidgel wird in diesem Fall das Minigelsystem von Hoefer verwendet. Nach dem Einspannen der Glasplatten in die Apparatur wird, bis ungefähr 2/3 der Höhe der Glasplatten erreicht ist, die Trenngel-Mischung zwischen die Platten gegossen. Die Konzentration an Polyacrylamid in dem Trenngel hängt davon ab, wie groß die zu untersuchenden Proteine sind. Für eine saubere Auftrennung eines Proteingemisches wird dafür in den meisten Fällen ein 12 %iges Trenngel verwendet (Tabelle 27). Damit zwischen Trenn- und Sammelgel eine klare Kante entsteht und das Trenngel ohne Sauerstoffzufuhr polymerisieren kann, wird das Trenngel mit 96 % Ethanol überschichtet. Nach der Polymerisierung des Trenngels wird das Ethanol entfernt und das Sammelgel (Tabelle 27) gegossen. Der Kamm für die späteren Probenfächer wird in die noch flüssige Sammelgel-Mischung gesteckt. Nach der Polymerisation des Sammelgels kann der Kamm entfernt und das fertige Gel in der Gelkammer platziert werden. Die Proteinproben werden vor dem Laden auf das Gel mit 4x SDS-Ladepuffer (Tabelle 29) versetzt und für 10 Minuten bei 96 °C erhitzt, sodass die Proteine denaturiert und mit SDS-Molekülen versetzt vorliegen. Der Gellauf findet für 1 h bei 200 V in 1x Laemmli-Puffer (Tabelle 7) statt. Nach dem Gellauf kann das Gel zur Visualisierung der Proteinbanden mit

Coomassielösung (2.6.3.1) oder Silbernitrat (2.6.3.2) gefärbt werden oder zur weiteren Analyse der Proteine für einen *Western Blot* (2.6.3) verwendet werden.

Tabelle 27: Zusammensetzung für Trenngel und Sammelgel

Komponente	Menge
Zusammensetzung für 12 %iges Trenngel	
4x Trenngelpuffer (Tabelle 28)	2,5 ml
Acrylamidlösung (40 %)	3 ml
ddH ₂ O	4,4 ml
APS (10 % w/v)	100 µl
TEMED	10 µl
Zusammensetzung für 4%iges Sammelgel	
4x Sammelgelpuffer (Tabelle 28)	1,2 ml
Acrylamidlösung (40 %)	0,4 ml
ddH ₂ O	3,35 ml
APS (10 % w/v)	50 µl
TEMED	50 µl

Tabelle 28: Zusammensetzung für Trenngel- und Sammelgelpuffer

Komponente	Menge / [Konzentration]	
Zusammensetzung für 4x Trenngelpuffer		
Tris-HCl pH 8,8 (Tabelle 7)	45,5 g	[1,5 M]
SDS	1 g	[0,4 %]
Zusammensetzung für 4x Sammelgelpuffer		
Tris-HCl pH 6,8 (Tabelle 7)	15,14 g	[0,5 M]
SDS	1 g	[0,4 %]

Tabelle 29: Zusammensetzung für 4x SDS-Ladepuffer

Komponente	Menge
Glycerin	15 % (v/v)
Bromphenolblau	0,03 % (w/v)
Mercaptoethanol	20 % (v/v)
4x Sammelgelpuffer	25 % (v/v)
SDS	4 % (w/v)
ddH ₂ O	ad 100 %

2.5 RNA-biochemische Methoden

2.5.1 RNA-Isolierung

Für die Isolierung von Gesamt-RNA aus Bakterienzellen werden in dieser Arbeit zwei unterschiedliche Methoden verwendet. Beide Methoden basieren auf der Isolierung der RNA mittels sauren Phenols, wodurch sich Proteine aus dem Zelllysate mit dem unpolaren, sauren Phenol zu einer organischen Phase verbinden und sich die RNA in einer wässrigen Phase sammelt. Dadurch wird die RNA von den restlichen Zellbestandteilen getrennt.

Eine Methode zur Isolierung der Gesamt-RNA aus den Zellen geschieht mit heißem Phenol (Scherrer & Darnell, 1962) und dient zur Gewinnung von großen Mengen an RNA (2.5.1.1). Dabei werden verstärkt größere RNAs, wie tRNAs, rRNAs und mRNAs, angereichert, die anschließend für Analysen mittels Northern Blot oder des Transkriptoms verwendet werden. Außerdem kann die Gesamt-RNA aus den Zellen über TRIzol isoliert werden. Bei dieser schnelleren Methode werden zumeist RNAs angereichert, die kleiner als tRNAs sind (Damm *et al.*, 2015).

2.5.1.1 RNA-Isolierung mit heißem Phenol

Für die Isolierung der Gesamt-RNA wird das Zellpellet nach der Zellernte (2.2.16) in 200 µl kalten Resuspensionspuffer (Tabelle 30) aufgenommen. Nach der Zugabe von 200 µl Lysispuffer (Tabelle 30) und kurzem vortexen erfolgt die Zellyse für 90 sec bei 65 °C. Anschließend werden 400 µl auf 65 °C vorgewärmtes Phenol, welches mit Wasser gesättigt ist, zu den lysierten Zellen gegeben, gevortext und die Proben für 3 min bei 65 °C inkubiert. In diesem Schritt denaturieren alle Proteine in dem Zelllysate und verbinden sich mit dem unpolaren, sauren Phenol, während sich die Nukleinsäure in der wässrigen Phase ansammelt. Nach der Inkubation bei 65 °C werden die Proben in flüssigem Stickstoff gefroren, um die Aktivität von RNase zu vermeiden und eine bessere Phasentrennung im darauffolgenden Zentrifugationsschritt (15 min bei 13.000 rpm und Raumtemperatur) zu erhalten. Nach der Zentrifugation wird die wässrige Phase, in der sich nun die RNA befindet, in ein RNase-freies 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die organische Phase mit den denaturierten Proteinen und dem Phenol werden verworfen. Diese Schritte werden zweimal wiederholt, um eine möglichst hohe RNA-Reinheit zu erhalten. Nachfolgend werden die Proben mit 400 µl Chloroform:Isoamylalkohol (Verhältnis von 24:1) versetzt, gevortext und erneut bei 13.000 rpm und Raumtemperatur für 5 min zentrifugiert, damit potenzielle Phenolreste entfernt werden. Die wässrige Phase, in der sich die RNA befindet, wird in ein RNase-freies 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mittels 3 M Natriumacetat-Lösung (Tabelle 7) und Ethanol gefällt (2.3.6.1).

Tabelle 30: Zusammensetzung für Resuspensions- und Lysispuffer

Komponente	Menge / [Konzentration]	
Zusammensetzung für 80 ml Resuspensionspuffer		
Saccharose	8,22 g	[0,3 M]
3 M Natriumacetat pH 4,5	270 µl	[0,01 M]
ddH ₂ O	ad 80 ml	
	→ autoklavieren	

Zusammensetzung für 80 ml Lysispuffer

20 % SDS	8 ml	[2 %]
3 M Natriumacetat pH 4,5	270 µl	[0,01 M]
ddH ₂ O	ad 80 ml	
	→ autoklavieren	

2.5.1.2 RNA-Isolierung mit Trizol

Für die Isolierung der Gesamt-RNA wird das Zellpellet nach der Zellernte (2.2.16) in 1 ml peqGOLD TriFast (Trizol) resuspendiert und für 5 min auf Eis inkubiert. In diesem Schritt werden die Zellen durch das Guanidiniumthiocyanat und dem sauren Phenol in der Trizol Reagenz lysiert und die Proteine in dem Zelllysate denaturiert. Die RNA reichert sich entsprechend wieder in der wässrigen Phase an. Durch die Zugabe von 200 µl Chloroform und einem anschließenden Zentrifugationsschritt (15 min bei 13.000 rpm und Raumtemperatur) tritt erneut eine Phasentrennung auf, bei der sich die RNA in der wässrigen Phase befindet. Die wässrige Phase wird in ein RNase-freies 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mittels Ethanol gefällt (2.3.6.1).

2.5.1.3 DNase-Verdau

Obwohl bei der RNA-Isolierung mit Phenol oder Trizol in einem sauren Milieu bei pH 4,5 gearbeitet wird, wodurch mehr RNA als DNA angereichert wird, kann es zu DNA-Kontaminationen kommen. Diese DNA-Kontaminationen können bei nachfolgender Verwendung, wie zum Beispiel einer quantitativen *real time* RT-PCR oder einer Transkriptomanalyse (2.5.11) stören. Deshalb wird ein DNase-Verdau mittels TURBO-DNase (Thermo Scientific) durchgeführt. Für den Verdau werden 10 µg Gesamt-RNA aus der RNA-Isolierung (2.5.1.1) verwendet und die Reaktion gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt (Tabelle 31). Nach dem DNase-Verdau wird die RNA erneut mit Ethanol gefällt (2.3.6.1).

Tabelle 31: Reaktionsansatz für DNase-Verdau

Komponente	Menge
RNA	10 µg
10x DNase-Puffer (Thermo Scientific)	5 µl
TURBO-DNase (Thermo Scientific)	1 µl

2.5.2 Northern Blot Analyse

2.5.2.1 Northern Blot Analyse von kleinen RNAs

Bevor die RNA auf eine Membran übertragen werden kann, muss die Gesamt-RNA in einer Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt werden. Um kleine RNAs, wie zum Beispiel sRNAs mit einer Länge von 50-300 nt aufzutrennen, wird ein Polyacrylamid-Harnstoffgel (2.4.3.1) verwendet. Die Übertragung der RNA auf eine Nylon-Membran erfolgt anschließend über einen *semidry* Blot. Dazu werden sechs Whatman-Papiere und eine Nylon-Membran auf die Größe des Gels zugeschnitten und

mit 1x TBE-Puffer befeuchtet. Bei dem *semidry* Blot werden zuerst drei feuchte Whatman-Papiere gestapelt auf die Anoden-Platte gelegt. Auf die Papiere wird anschließend die befeuchtete Membran und dann das zurecht geschnittene Gel platziert. Auf das Gel werden erneut drei Lagen feuchtes Whatman-Papier gestapelt. Danach wird die Kathodenplatte mit der Anodenplatte befestigt. Der Transfer der RNA auf die Membran erfolgt beim *semidry* Blot über ein elektrisches Feld bei 250 mA für ca. 2,5 h. Nach dem *Blotten* wird die RNA mittels UV-*crosslink* fest auf der Membran gebunden.

2.5.2.2 Northern Blot Analyse von großen RNAs

Um größere RNA-Moleküle, wie zum Beispiel mRNAs, mittels Northern Blot zu untersuchen, wird die Gesamt-RNA in einem Formaldehyd-Agarosegel (2.4.6.1) aufgetrennt. Bevor jedoch die RNA aus dem Gel auf die Membran übertragen wird, muss das Gel nach der Elektrophorese für jeweils 30 min in Denaturierungspuffer (Tabelle 32) und Neutralisierungspuffer (Tabelle 32) geschwenkt werden. Die Übertragung der RNA aus dem Gel auf die Membran wird in diesem Fall mittels Vakuums erzeugt. Dazu wird ein Whatman-Papier, welches ca. 1 cm größer, und eine Nylon-Membran, welche genau so groß wie die Maske des Vakuum Blotter ist, angefertigt. Auf den Vakuum Blotter wird zuerst das mit 10x SSC angefeuchtete Whatman-Papier und dann die Maske mit der Membran gelegt. Auf die Membran und die Maske wird nun das Agarosegel mittig platziert, sodass das Gel mit den Rändern die Maske überlappt. Das Gel wird anschließend mit 10x SSC überschichtet und die RNA mittels Vakuums von 150 mbar für 1 h auf die Membran übertragen. Nach dem *Blotten* wird die RNA mittels UV-*crosslink* fest auf der Membran gebunden.

Tabelle 32: Zusammensetzung für Denaturierungs- und Neutralisierungspuffer

Komponente	Menge / [Konzentration]	
Zusammensetzung für 250 ml Denaturierungspuffer		
1 M NaOH	12,5 ml	[0,05 M]
5 M NaCl	7,5 ml	[0,15 M]
DEPC-H ₂ O	ad 250 ml	
Zusammensetzung für 250 ml Neutralisierungspuffer		
1 M Tris pH 7,5	25 ml	[0,1 M]
5 M NaCl	7,5 ml	[0,15 M]
DEPC-H ₂ O	ad 250 ml	

2.5.2.3 Hybridisierung der Northern Blot Membran

Um eine spezifische RNA auf einer Northern Blot Membran nachweisen zu können, wird die Membran mit einer komplementären, radioaktiv markierten Sonde hybridisiert (2.5.3). Dabei bindet die Sonde, welche ein Oligo-Nukleotid oder ein PCR Produkt ist, komplementär an der entsprechenden RNA. Je nachdem, welche Sonde für die Detektion verwendet wird, muss die Membran mit dem entsprechenden Puffer-System hybridisiert werden. Um kleine RNAs, wie sRNAs, zu detektieren, wird das Church- und Gilbert- Puffersystem (Church & Gilbert, 1984) verwendet (Tabelle 33). Dafür wird die

Membran für 1 h bei 42 °C in 30 ml Church-Puffer in einem Rotationsofen prähybridisiert. Anschließend werden 5-10 µl (ca. 10⁶ cpm) der radioaktiv markierten Sonde zu dem Hybridisierungspuffer gegeben. Die Hybridisierung findet über Nacht unter Rotation bei 42 °C statt.

Tabelle 33: Zusammensetzung 300 ml Church-Puffer

Komponente	Menge / [Konzentration]	
BSA	3 g	[1 %]
1 M NaP-Puffer pH7,2	150 ml	[0,5 M]
250 mM EDTA	1,2 ml	[1 mM]
20 % SDS	105 ml	[7 %]
DEPC-H ₂ O	ad 300 ml	

2.5.2.4 Waschen der Northern Blot Membran

Nach der Hybridisierung der Membran mit der radioaktiv markierten Sonde wird die überschüssige, nicht gebundene Sonde durch Waschen der Membran entfernt. Dazu wird die Membran mehrere Male bei 42 °C im Rotationsofen mit Waschpuffer (Tabelle 34) inkubiert. Sobald keine Hintergrundstrahlung an den Rändern der Membran feststellbar ist, kann die Membran in eine Plastikfolie eingeschweißt werden und für die Detektion der Signale geschieht über *phosphoimaging* (2.5.10).

Tabelle 34: Zusammensetzung 1 l Waschpuffer

Komponente	Menge
20x SSC (Tabelle 7)	250 ml
20 % SDS	0,5 ml
ddH ₂ O	ad 1 l

2.5.2.5 Ablösen von radioaktiv markierten Sonden von der Membran

Zum Ablösen der gebundenen Sonde von der Membran kann diese für 30 min in *Stripping*-Lösung (Tabelle 35) bei 95 °C aufgekocht werden. Im Anschluss kann die Membran mit weiteren Sonden hybridisiert werden.

Tabelle 35: Zusammensetzung 1 l *Stripping*-Lösung

Komponente	Menge
20x SSC (Tabelle 7)	250 ml
20 % SDS	5 ml
ddH ₂ O	ad 1 l

2.5.3 Radioaktive Markierung von Nukleinsäure

Nukleinsäuren, in diesem Fall DNA-Oligonukleotide oder PCR Produkte, können radioaktiv markiert werden, um eine spezifische RNA auf einer Northern Blot Membran nachzuweisen. Dabei ist die DNA-Sonde komplementär zur Ziel-RNA und bindet in einem entsprechenden Puffersystem an dieser. Für den Nachweis von kleinen RNAs werden hauptsächlich radioaktiv markierte DNA-Oligonukleotide, während für größere RNAs vor allem markierte PCR Produkte verwendet werden.

2.5.3.1 Radioaktive Markierung von DNA-Oligonukleotiden

Einzelsträngige Oligonukleotide (10 mM) können mit Hilfe der Polynukleotidkinase (Thermo Scientific) radioaktiv markiert werden. Das Enzym katalysiert dabei den Transfer eines radioaktiven Phosphats ($\gamma^{32}\text{P}$ Phosphats) an das 5'-Hydroxylende der DNA. Diese Reaktion findet in einem 10 μl Reaktionsansatz (Tabelle 36) unter 37 °C für eine Stunde statt und wird durch die Zugabe von 40 μl STE-Puffer (Natrium/Tris/EDTA-Puffer; Tabelle 37) abgestoppt. Nach Beendigung der Reaktion wird das radioaktiv markierte Oligonukleotid über ein Illustra™ MicroSpin™ G25-Säulchen nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Dabei wird freies Enzym und überschüssiges $[\gamma^{32}\text{P}]\text{dATP}$ entfernt. Das radioaktiv markierte Oligonukleotid kann anschließend bei -20 °C gelagert werden.

Tabelle 36: Reaktionsansatz für 10 μl

Komponente	Menge / [Konzentration]	
Oligonukleotid [10 μM]	2 μl	[2 μM]
T4 Polynukleotidkinase [10 U/ μl]	1 μl	[1 U/ μl]
10x Puffer A	1 μl	[1x]
$[\gamma^{32}\text{P}]\text{dATP}$ [10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$]	3 μl	[3 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$]
ddH ₂ O	3 μl	

Tabelle 37: Zusammensetzung STE-Puffer

Komponente	Menge / [Konzentration]	
5 M NaCl	2 ml	[100 mM]
1 M Tris HCl pH 8,0 (Tabelle 7)	1 ml	[10 mM]
250 mM EDTA (Tabelle 7)	400 μl	[1 mM]
ddH ₂ O	ad 100 ml	

2.5.3.2 Radioaktive Markierung von PCR-Produkten

Doppelsträngige PCR-Produkte (25 ng) werden durch ein *random priming* radioaktiv markiert. Dafür wird das Prime-a-Gene Kit (Promega) nach Angaben des Herstellers verwendet. Das radioaktiv markierte PCR-Produkt wird anschließend über ein Illustra™ MicroSpin™ G50-Säulchen nach Angaben des Herstellers aufgereinigt und kann bei -20° C gelagert werden.

2.5.4 Quantitative *real time* RT-PCR (qRT-PCR)

Die quantitative *real time* RT-PCR (qRT-PCR) ist eine Methode um die Expression von verschiedenen Genen quantitativ zu analysieren. In einem initialen Reaktionsschritt wird die gesamte RNA mit Hilfe der reversen Transkriptase (RT) in cDNA (*complementary* DNA) transkribiert und dient anschließend als Vorlage (*template*) für eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Dabei kann die Amplifikation der PCR-Produkte mit spezifischen Oligonukleotiden in Echtzeit (*real time*) durch die Fluoreszenzmessung des Farbstoffs SYBR Green, der in doppelsträngige DNA interkaliert, nachverfolgt werden. Anhand des Amplifikationszykluses, bei dem die gemessene Fluoreszenz einen definierten Schwellenwert überschreitet, kann in Relation zu einem Standard die vorliegende RNA-Menge berechnet werden. In dieser Arbeit wird das Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green qRT-PCR Master Mix Kit (Agilent) verwendet. In diesem Kit werden die reverse Transkription der gesamten RNA in cDNA und die anschließende PCR in einem Schritt durchgeführt. Die Reaktionen werden nach Angaben des Herstellers in einem 10 µl Reaktionsansatz (Tabelle 38) durchgeführt. Die Konzentration der eingesetzten RNA, die keine Kontaminationen von DNA erhalten sollte (2.5.1.3), beträgt in einem Reaktionsansatz 40 ng und für abundante RNA-Spezies 4 ng. Die relative Expression R der zu untersuchenden Gene wird auf ein unverändertes Referenzgen (*rpoZ* oder 16S rRNA) oder einer *spike-in* RNA (*sinI* *in vitro* Transkript) normalisiert und über die Quantifizierungsformel nach (Pfaffl, 2001) errechnet.

Tabelle 38: Reaktionsansatz für 10 µl

Komponente	Menge
2x Master Mix	5 µl
Primer <i>sense</i> [10 µM]	0,5 µl
Primer <i>antisense</i> [10 µM]	0,5 µl
DTT [100 mM]	0,1 µl
Reverse Transkriptase	0,4 µl
DNA-freie RNA [20 ng/µl]	2 µl
DNase/RNase-freies H ₂ O	1,5 µl

2.5.5 *In vitro* Transkription

Eine *in vitro* Transkription wird verwendet, um gezielt RNA-Moleküle aus einer linearen DNA-Matrize (*template*) zu synthetisieren. Dafür muss ein geeigneter Phagenpromotor, in diesem Fall von T7-Phagen (Sequenz: TAATACGACTCACTATA), an das 5'-Ende der DNA-Matrize angefügt werden. Das Anfügen des T7-Promotors kann dabei über die verwendeten Primer zur Matrizenvervielfältigung mittels PCR geschehen. Durch die Zugabe von rNTP's, der T7-Phagen RNA-Polymerase und dem entsprechenden Puffer kann nun die RNA von dem DNA-*template* synthetisiert werden.

In dieser Arbeit werden synthetisierte RNA-Transkripte für EMSAs (*electrophoretic mobility shift assays*), *structure probing* Experimente und RNA-Degradations-Experiment verwendet. Hierfür kann die *in vitro* Transkription entweder nicht radioaktiv („kalt“) durchgeführt werden (Tabelle 39), oder für verschiedene Versuche intern mit radioaktivem [α P³²]-UTP (3.000 Ci/mmol; 10 µCi/µl; Hartmann

Analytic) markiert werden (Tabelle 39). Für die *in vitro* Transkription werden 100 nM aufgereinigte DNA-Matrize in einem 25 µl Reaktionsansatz verwendet. Nach einer Inkubation bei 37 °C für 5-7 h wird 1 µl TURBO DNase (Invitrogen) dazu gegeben und für weitere 20 min inkubiert. Durch diesen Schritt wird das vorhandene DNA-*template* abgebaut. Um die synthetisierte RNA von den restlichen Bestandteilen des Reaktionsansatzes zu reinigen, wird eine Phenol/Chloroform-Extraktion durchgeführt. Dazu wird der 25 µl Reaktionsansatz auf 200 µl mit DNase/RNase-freiem Wasser (Roth) aufgefüllt, 200 µl Phenol dazu gegeben und gevortext. Die wässrige Phase wird nach der Zentrifugation (15 min bei 13.000 rpm und Raumtemperatur) in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 200 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) versetzt, gevortext und erneut zentrifugiert. Die wässrige Phase wird in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mittels Ethanol (2.3.6.1) und 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (Tabelle 7) gefällt. Die Qualität der *in vitro* Transkription kann mit einem RNA-Gel (2.4.3.1) und anschließendem *phosphoimaging* (2.5.10) überprüft werden.

Tabelle 39: Reaktionsansatz *in vitro* Transkription

Komponente	Menge
Reaktionsansatz für 25 µl „kalter“ <i>in vitro</i> Transkription	
DNA- <i>template</i>	[100 nM] x
MgCl ₂	[200 mM] 2 µl
DTT	[100 mM] 2 µl
RiboLock	[40 U/µl] 0,8 µl
rNTP's	[jedes 25 mM] 2,5 µl
10x T7 RNA-Polymerase Puffer	2,5 µl
T7 RNA-Polymerase	[50 U/µl] 1,5 µl
DNase/RNase-freies H ₂ O	ad 25 µl
Reaktionsansatz für 25 µl „heiße“ <i>in vitro</i> Transkription	
DNA- <i>template</i>	[100 nM] x
MgCl ₂	[200 mM] 2 µl
DTT	[100 mM] 2 µl
RiboLock	[40 U/µl] 0,8 µl
rNTP's	[low U-Mix]* 2,5 µl
10x T7 RNA-Polymerase Puffer	2,5 µl
T7 RNA-Polymerase	[50 U/µl] 1,5 µl
[α ³² P]-UTP	[10 µCi/µl] 3,0 µl
DNase/RNase-freies H ₂ O	ad 25 µl
* 25 mM ATP/CTP/TTP und 5 mM UTP	

2.5.6 EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*)

Für eine experimentelle Bestimmung einer Nukleinsäure- (RNA-RNA) oder einer Protein-Nukleinsäure-Interaktion (Protein-DNA oder Protein-RNA) kann ein EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*) verwendet werden. Der EMSA beruht auf einem antiproportionalen Laufverhalten von Molekülen oder Molekülkomplexen in einem Gel. Im Vergleich zu einer ungebundenen Nukleinsäure tritt bei einer Interaktion von zwei unterschiedlichen Molekülen eine Laufverschiebung (*band shift*) auf, sodass der

sich gebildete Komplex ein langsames Laufverhalten in einem Gel aufweist.

In dieser Arbeit werden EMSAs genutzt, um die Bindung von zwei unterschiedlichen RNA-Molekülen oder einem Protein zu einer RNA nachzuweisen. Um eine RNA-RNA Interaktion zweier RNA-Spezies nachzuweisen, wird die RNA zunächst *in vitro* transkribiert. Dabei wird eine RNA-Spezies intern radioaktiv markiert, während die zweite RNA-Spezies nicht radioaktiv markiert wird („kalt“). In dem ersten Schritt des *shift assays* werden beide RNA-Spezies in geeignete Konzentrationen in Aliquots getrennt voneinander 5 min bei 90 °C denaturiert und auf Eis für 2 min abgekühlt. Anschließend wird 1 µl 10x Strukturpuffer (Tabelle 40) für die Renaturierung dazu gegeben und die RNA für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im nächsten Schritt werden die unterschiedlichen Transkripte (zweite RNA in aufsteigenden Konzentrationen) für einen einzigen 10 µl Reaktionsansatz zusammengefügt und 30 min bei 32 °C inkubiert, sodass eine Komplexbildung zwischen beiden Molekülen stattfindet. Um die Interaktion einer RNA mit einem Protein nachzuweisen, wird die RNA intern radioaktiv mittels *in vitro* Transkription markiert (2.5.5). Damit ein Komplex aus RNA und Protein entstehen kann, wird die RNA zunächst ohne Protein für 5 min bei 90 °C denaturiert und für 2 min auf Eis abgekühlt. Nach der Renaturierung der RNA für 10 min bei Raumtemperatur wird das zu untersuchende Protein in geeigneten, aufsteigenden Konzentrationen zur RNA in einem Gesamt-Volumen von 10 µl gegeben. Die Ansätze werden für die Komplexbildung anschließend für 30 min bei 32 °C inkubiert. Nach der Komplexbildung zwischen RNA-RNA und RNA-Protein werden die Proben auf Eis gestellt, mit nativen RNA-Probenpuffer (Tabelle 41) versetzt und auf ein natives Polyacrylamidgel (2.4.4) aufgetragen.

Tabelle 40: Zusammensetzung für 10 ml 10x Strukturpuffer

Komponente	Menge / [Konzentration]	
1 M Tris HCl pH 7,0	1 ml	[100 mM]
KCl	0,75 g	[1 M]
1 M MgCl ₂	1 ml	[100 mM]
DNase/RNase-freies H ₂ O	ad 10 ml	

Tabelle 41: Zusammensetzung für nativen RNA-Probenpuffer

Komponente	Menge / [Konzentration]	
10x TBE-Puffer (Tabelle 7)	5 µl	[0,5 %]
Glycerol	500 µl	[50 %]
Bromphenolblau	1 mg	[0,1 %]
DNase/RNase-freies H ₂ O	ad 1 ml	

2.5.7 RNA-Strukturanalyse (*structure probing*)

Die Eigenschaften und Funktionen eines RNA-Moleküls *in vivo* oder *in vitro* hängt häufig von dessen Watson-Crick Basenpaarungen und dessen Tertiärstruktur ab. Chemische und enzymatische Reagenzien (Nukleasen) können dabei verwendet werden, um experimentell den einzelsträngigen oder doppelsträngigen Charakter der RNA zu identifizieren. Das Ziel der RNA-Strukturanalyse (*structure probing*) besteht darin, zu bestimmen, welche Nukleotide für chemische Reagenzien oder Nukleasen zugänglich sind und eine Modifikation bzw. Spaltung der RNA auslösen. Chemische

Reagenzien, wie zum Beispiel Dimethylsulfat (DMS) oder 1-Cyclohexyl-(2-Morpholinoethyl) Carbodiimide-metho-p-Toluene (CMCT), besitzen aufgrund ihrer geringen Molekülgröße einen einfachen Zugang zu allen Bereichen der RNA-Tertiärstruktur und führen zu einer guten Struktur-Analyse. Enzymatische Reagenzien, wie zum Beispiel Nukleasen, haben eine geringere Auflösung in der Struktur Analyse, besitzen aber eine genaue Sequenzspezifität. Die Kombination aus experimentellen Analysen, chemische oder enzymatische Modifikationen, und Computer-basierten Algorithmen führt über die Methode des *RNA structure probings* oder *RNA footprintings* zu einer exakten Aussage der Struktur des RNA-Moleküls.

In dieser Arbeit wird die Methode des *structure probing* für die Analyse einer sRNA-Struktur und in Kombination eines sRNA-sRNA Komplexes verwendet. Um eine möglichst große Aussage über die Struktur der RNA zu erhalten, wird eine Kombination aus chemischen und enzymatischen Reaktionen durchgeführt. Die *in vitro* synthetisierten RNAs (2.5.5) werden in einem ersten Schritt getrennt voneinander für 1 min bei 90 °C denaturiert und anschließend für 5 min auf Eis abgekühlt. Danach werden beide RNAs in einem Reaktionsgefäß zusammengefügt und mit 5x AN-Puffer (Tabelle 42) für DMS *probing* und enzymatischem *probing* oder 5x BN-Puffer (Tabelle 42) für CMCT *probing* für 20 min bei Raumtemperatur renaturiert. Zusätzlich wird 1 µl tRNA (2 mg/ml in H₂O, Ambion) zu den RNAs hinzugefügt. Für die chemische Modifikation wird DMS (1:5, 1:10 oder 1:20 mit 20 % Ethanol verdünnt) oder CMCT (10, 20 oder 40 mg/ml in H₂O gelöst) zu der RNA zugegeben. Für enzymatische Modifikationen wird die Ribonuklease T1 (1 U/µl in entsprechendem Puffer verdünnt; Thermo Scientific) oder S1 (1, 0,5, 0,1 U/µl in entsprechendem Puffer verdünnt; Thermo Scientific) zu der RNA zugegeben. Sowohl die chemischen, als auch die enzymatischen Modifikationen finden für 5 min bei Raumtemperatur statt und werden anschließend mit 10 x Vol. 96 % Ethanol und 1/10x Vol. Natriumacetat (pH 5,2) über Nacht bei -20 °C präzipitiert. Die Modifikationen werden in nachfolgenden Schritten mittels Primer-Extension analysiert. Dazu wird die präzipitierte RNA in 4 µl H₂O aufgenommen und mit 2 µl am 5' radioaktiv markierten Oligonukleotiden (2.5.3.1) versetzt. Die Proben werden für die Hybridisierung der RNA mit dem Oligonukleotid für 2 min auf 90 °C erhitzt und langsam (5 min bei 70 °C, 10 min bei 50 °C, 5 min bei 37 °C und 10 min bei Raumtemperatur) abgekühlt. Die nachfolgende cDNA-Synthese findet in einem finalen Volumen von 20 µl mit 1 x SuperScript® III RTase Puffer mit der SuperScript® III RTase (170 U; Invitrogen), RNaseOUT (20 U; Invitrogen) und 1 mM dNTP für 50 min bei 42 °C und 60 min bei 55 °C statt. Nach der Primer-Extension wird die cDNA mit 10x Vol. 96 % Ethanol und 1/10x Vol. Natriumacetat (pH 5,2) über Nacht bei -20°C präzipitiert. Die cDNA wird für den letzten Schritt in 6 µl RNase A (1:50 in DEPC-H₂O verdünnt; Invitrogen) aufgenommen und für 20 min bei 37 °C inkubiert. Danach werden 3 µl Proteinase K (1:10 verdünnt in DEPC-H₂O; Invitrogen) zugegeben und für 15 min bei 55 °C inkubiert. Die Proben können nun mit 10 µl Formamid-Harnstoff-Mix (Tabelle 19) gemischt, für 5 min bei 95 °C aufgekocht und auf ein 8 %iges Sequenzier-Gel aufgetragen werden (2.4.5).

Tabelle 42: Zusammensetzung für AN- und BN-Puffer

Komponente	Menge / [Konzentration]	
Zusammensetzung für 5x AN-Puffer		
Dimethylarinsäure	34,5 mg	[250 mM]
KCl	22,5 mg	[300 mM]
MgCl ₂	2,5 mg	[25 mM]
DNase/RNase-freies H ₂ O	ad 1 ml	
Zusammensetzung für 5x BN-Puffer		
Natriumborat	50 mg	[250 mM]
KCl	22,5 mg	[300 mM]
MgCl ₂	2,5 mg	[25 mM]
DNase/RNase-freies H ₂ O	ad 1 ml	

2.5.8 *In vitro* RNA-Degradationsexperimente

In vitro RNA-Degradationsexperimente werden in dieser Arbeit verwendet, um die Prozessierung der sRNA UpsM durch die rekombinant aufgereinigte katalytische RNase E Domäne bzw. RNaseE529-hexa-His (2.2.11) in Abhängigkeit von der sRNA StsR zu testen. Für die Reaktion werden 15 nM intern radioaktiv markiertes *in vitro* Transkript der sRNA UpsM und nicht markiertes StsR (2.5.5) in einer Ratio von 1:5 separat voneinander für 1 min bei 90 °C denaturiert und für 5 min auf Eis abgekühlt. Beide RNAs werden nun in ein Reaktionsgefäß in einem Gesamt-Volumen von 8 µl zusammengeführt und die Bildung eines sRNA-sRNA Komplexes für 30 min bei 32 °C initiiert. Es werden 1 µl 5x RNase E-Puffer (Tabelle 43) und 1 µl der aufgereinigten katalytischen RNase E Domäne (0,5 µM) zu dem Reaktionsansatz für ein Gesamt-Volumen von 10 µl hinzugegeben. Nach Zugabe der katalytischen RNase E Domäne werden die Reaktionen für die sRNA-Prozessierung für 0, 1, 2 oder 3 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wird anschließend durch die Zugabe von 10 µl Formamid-Harnstoff-Mix (Tabelle 19) gestoppt. Die Proben werden vor dem beladen auf ein 6 %iges denaturierendes TBE-Polyacrylamid-Harnstoffgel (2.4.3.2) für 5 min bei 95 °C aufgeköcht.

Tabelle 43: Zusammensetzung für 5x RNase E-Puffer

Komponente	Menge / [Konzentration]	
1 M Tris HCl pH 7,9 (Tabelle 7)	20 µl	[20 mM]
5 M NaCl	100 µl	[500 mM]
500 mM MgCl ₂	20 µl	[10 mM]
250 mM EDTA (Tabelle 7)	2 µl	[0,5 mM]
100 mM DTT	100 µl	[10 mM]
DNase/RNase-freies H ₂ O	ad 1 ml	

2.5.9 iCLIP (*individual nucleotide resolution cross-linking and immunoprecipitation*)

Zentrale Regulatoren in Zellen sind RNA-Bindeproteine, die spezifische RNA-Sequenzen und -Strukturen erkennen. Um *in vivo* die Interaktion zwischen einem Protein und einer RNA nachzuweisen, kann die Methode des iCLIPs verwendet werden. Diese Methode erlaubt es, dabei die Nukleotidsequenz der RNA zu bestimmen, welche mit dem entsprechenden RNA-Bindeprotein interagiert. In dieser Arbeit wird das Protokoll des iCLIP2 verwendet, welches auf der Methode von Buchbender *et al.* 2019 basiert und auf das Protein CcaF1 aus *R. sphaeroides* angepasst ist.

2.5.9.1 Herstellung des Zelllysats

Zur Herstellung des Zelllysats werden die Zellen nach dem UV-crosslink (2.2.10) in 1,5 ml Lysispuffer (Tabelle 44) aufgenommen und resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgt durch 5x Sonifizieren für 2 min (ohne Pause) bei Power 65. Nach dem Sonifizieren werden 100 µl 10 % Nonidet P-40 und 10 µl 10 % SDS-Lösung zugegeben und auf Eis für 10 min inkubiert. Während der Inkubation werden die Proben alle 3 min gevortext. Die Zellfragmente werden in einem ersten Schritt durch eine Zentrifugation bei 13.000 rpm für 30 min (4 °C) und in einem zweiten Schritt mittels Ultrazentrifugation bei 53.000 rpm für 1 h (4 °C) von dem Zelllysats getrennt.

Tabelle 44: Zusammensetzung für Lysispuffer

Komponente	Menge / [Konzentration]	
1 M Tris HCl pH 7,4 (Tabelle 7)	1,5 ml	[50 mM]
5 M NaCl	900 µl	[150 mM]
500 mM EDTA (Tabelle 7)	300 µl	[5 mM]
100 mM PMSF	500 µl	[1 mM]
DNase/RNase-freies H ₂ O	ad 50 ml	

2.5.9.2 Partieller DNase- und RNase-Verdau

In einem nächsten Schritt wird ein partieller DNase- und RNase-Verdau durchgeführt. Dafür werden die 2 ml Zelllysats einer Probe nach der Ultrazentrifugation zu je 1 ml gesplittet (2.5.9.1). Das Zelllysats wird nun wieder mit 1 ml RQ1-Puffer (Tabelle 45) auf ein Gesamt-Volumen von 2 ml aufgefüllt. Zu jeder Probe mit dem Gesamt-Volumen von 2 ml wird nun 2 µl TURBO-DNase (Invitrogen) hinzugegeben. Eine der beiden Proben wird gesplittet und anschließend mit einer hohen und niedrigen RNase-Konzentration inkubiert.

Hohe RNase-Konzentration: 10 µl RNase A zu 2 ml Zellextrakt (1:200)

Niedrige RNase-Konzentration: 2 µl RNase I zu 2 ml Zellextrakt (1:1000)

Der partielle DNase- und RNase-Verdau findet für 3 min bei 37 °C und 800 rpm auf dem Thermoschüttler statt. Anschließend werden die Proben für 5 min auf Eis gestellt und die Proben für 10 min bei 16.400 rpm und 4 °C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wird das Zelllysats in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und für die nachfolgende Immunopräzipitation verwendet.

Tabelle 45: Zusammensetzung für RQ1-Puffer

Komponente	Menge / [Konzentration]	
1 M Tris HCl pH 8 (Tabelle 7)	2 ml	[40 mM]
100 mM MgSO ₄	5 ml	[10 mM]
100 mM Ca ₂ Cl	500 µl	[1 mM]

2.5.9.3 Co-Immunopräzipitation (CoIP)

Um die RNA zu isolieren, die an dem zu untersuchenden Protein gebunden ist, wird eine CoIP durchgeführt. Dazu wird das Zelllysate nach dem partiellen DNase- und RNase-Verdau (2.5.9.2) mit 50 µl magnetischen Dyna-Beads Protein G (Invitrogen) versetzt, an dem monoklonale anti-FLAG M2 Antikörper (Sigma) gekoppelt sind. Die Immunopräzipitation findet daraufhin für 2 h bei 4 °C unter ständiger Rotation (Tumbler) statt. Nach der Immunopräzipitation werden die Dyna-Beads, an die nun der zu untersuchende Protein-RNA-Komplex über einen 3xFLAG gebunden hat, viermal mit kaltem TBS1000-T-Puffer (Tabelle 46) und zweimal mit kaltem PNK-Puffer (Tabelle 46) gewaschen. Dabei werden die Dyna-Beads nach dem dritten Waschschrift mit TBS1000-T in ein frisches, RNase freies Reaktionsgefäß überführt. Die Dyna-Beads können nach den Waschschriften direkt für eine Dephosphorylierung und eine Linker Ligation verwendet werden.

Tabelle 46: Zusammensetzung für Puffer für die CoIP

Komponente	Menge / [Konzentration]	
Zusammensetzung für TBS1000-T-Puffer		
1 M Tris HCl pH 7,4	1,5 ml	[50 mM]
5 M NaCl	10 ml	[1000 mM]
Tween20	25 µl	[0,05 %]
DNase/RNase-freies H ₂ O	ad 50 ml	
Zusammensetzung für PNK-Puffer		
1 M Tris HCl pH 7,5	3,5 ml	[70 mM]
5 M MgCl ₂	500 µl	[10 mM]
10 % Nodidet P40	250 µl	[0,05 %]
DNase/RNase-freies H ₂ O	ad 50 ml	

2.5.9.4 On-Bead Dephosphorylierung und 3' RNA-Linker-Ligation

Nachdem die Dyna-Beads zweimal mit kaltem PNK-Puffer gewaschen wurden, wird eine Dephosphorylierung mit anschließender 3' RNA-Linker-Ligation der an den Dyna-Beads gebundenen RNA durchgeführt. Dafür werden die Dyna-Beads direkt nach dem letzten PNK-Waschschrift der CoIP (2.5.9.3) in 20 µl Phosphatase-Mix (Tabelle 47) aufgenommen und für 20 min bei 37 °C und 1.000 rpm auf dem Thermoschüttler inkubiert. Nach der Dephosphorylierung werden die Dyna-Beads zweimal mit kaltem TBS400-T-Puffer (Tabelle 48) gewaschen, wobei nach dem zweiten Waschschrift die Dyna-Beads in ein frisches, RNase freies Reaktionsgefäß überführt werden. Es folgt ein zweimaliger

Waschschrift mit kaltem PNK-Puffer. Nach dem letzten Waschschrift können die Dyna-Beads direkt in 20 µl 1x 3' RNA-Linker-Ligations-Mix (Tabelle 47) aufgenommen werden. Die 3' RNA-Linker-Ligation findet über Nacht bei 16 °C und 1.000 rpm auf dem Thermoschüttler statt. Nach der Linker-Ligation werden die Dyna-Beads erneut 2x mit kaltem PNK-Puffer gewaschen und können schließlich direkt für die PNK-Behandlung verwendet werden (2.5.9.5).

Tabelle 47: Zusammensetzung für 1x Phosphatase- und 3' RNA-Linker-Ligation-Mix

Komponente	Menge
Zusammensetzung für 1x Phosphatase-Mix	
5x PNK dePPL Puffer (Tabelle 48)	4 µl
T4 PNK Enzym (Thermo Scientific)	0,5 µl
RNaseOUT (Invitrogen)	0,5 µl
DEPC-H ₂ O	15 µl
Zusammensetzung für 1x 3' RNA-Linker-Ligation-Mix	
RNA Oliga „L3-App“	1 µl
/rApp/AGATCGGAAGAGCGGTTCAG/ddC/	
10x T4 RNA Ligase Puffer	2 µl
T4 RNA-Ligase	1 µl
RNaseOUT	0,5 µl
PEG400	4 µl
DEPC-H ₂ O	11,5 µl

Tabelle 48: Zusammensetzung für PNK dePPL- und TBS400-T-Puffer

Komponente	Menge / [Konzentration]	
Zusammensetzung für 5x PNK dePPL		
1 M Tris HCl pH 6,5	35 µl	[350 mM]
1 M MgCl ₂	5 µl	[50 mM]
100 mM DTT	5 µl	[5 mM]
DNase/RNase-freies H ₂ O	ad 100 µl	
Zusammensetzung für TBS400-T-Puffer		
1 M Tris HCl pH 7,4	1,5 ml	[50 mM]
5 M NaCl	4 ml	[400 mM]
Tween20	25 µl	[0,05 %]
DNase/RNase-freies H ₂ O	ad 50 ml	

2.5.9.5 On-Bead PNK-Behandlung

Nach der Linker-Ligation (2.5.9.4) werden die Dyna-Beads weitere 2x mit 1 ml kaltem PNK-Puffer gewaschen und der Überstand verworfen. Anschließend können die Dyna-Beads direkt für die PNK-Behandlung verwendet werden. Dazu werden sie in 20 µl 1x PNK Mix (Tabelle 49) aufgenommen, damit die an den Dyna-Beads gebundene RNA radioaktiv markiert wird. Die überschüssigen radioaktiven

Nukleotide werden nach der Inkubation von 30 min bei 37 °C und 1.000 rpm auf dem Thermoschüttler durch zweimaliges Waschen mit 1 ml kaltem PNK-Puffer entfernt. Die Dyna-Beads können nach der radioaktiven Markierung für das SDS-Gel und den Transfer auf eine Nitrocellulose Membran verwendet werden.

Tabelle 49: Zusammensetzung für 1x PNK Mix

Komponente	Menge
10x PNK-Puffer	2 µl
T4 PNK Enzym	1 µl
[$\gamma^{32}\text{P}$]dATP [10 µCi/µl]	1 µl
RNaseOUT	0,5 µl
DEPC-H ₂ O	15,5 µl

2.5.9.6 SDS-PAGE und Western Blot

Der RNA-Protein-Komplex, bei dem nun die RNA radioaktiv markiert ist, wird im nächsten Schritt in einem SDS-Gel aufgetrennt. Dafür werden die Dyna-Beads in 20 µl 2x LDS-Ladepuffer (Tabelle 50; Thermo Scientific) aufgenommen und für 10 min bei 70 °C aufgekocht. Der Überstand, welcher die RNA gebundenen Protein-Komplexe enthält, wird auf eine SDS-PAGE aufgetragen. Für eine saubere Reproduzierbarkeit der iCLIP Experimente werden in diesem Fall gekaufte NuPAGE Gele (12 % NuPAGE™ Bis-Tris, 10-well; Thermo Scientific) verwendet. Der Gellauf findet in 1x NuPAGE™ MOPS-SDS Laufpuffer (Thermo Scientific) für 2 h bei 200 V statt. Nach dem Gellauf werden die RNA-Protein-Komplexe mittels Western Blot Methode auf eine Nitrocellulose Membran übertragen. Der Western Blot findet für 2 h bei 30 V in 1x NuPAGE™ Transferpuffer (Thermo Scientific) statt. Die Signale werden anschließend mittels Phosphoimager (2.5.10) oder Röntgenfilm detektiert und visualisiert.

Tabelle 50: Zusammensetzung für 2x LDS-Ladepuffer

Komponente	Menge
4x LDS-Ladepuffer (Thermo Scientific)	10 µl
10x reduzierender Puffer (Thermo Scientific)	2 µl
DNase/RNase-freies H ₂ O	8 µl

2.5.9.7 RNA-Isolierung

Nach dem Übertragen des RNA-Protein-Komplex auf die Nitrocellulose Membran mittels Western Blot wird der Bereich, der für sein untersuchtes Protein interessant ist, aus der Membran mit Hilfe eines Skalpell ausgeschnitten und in kleine Stücke zerteilt. Die Membranstücke werden in einem 2 ml Reaktionsgefäß mit 400 µl PK-Puffer (Tabelle 51) und 20 µl Proteinase K (20 mg/ml; Roth) überschichtet. Der RNA-Protein-Komplex wird durch eine Inkubation bei 37 °C für 20 min und 1.000 rpm auf dem Thermoschüttler von der Membran gelöst und die isolierten RNA-Bindeproteine

verdaut. In einem zweiten Schritt werden weitere 400 µl PK-Puffer mit 7 M Harnstoff (Tabelle 51) dazu gegeben und für weitere 20 min bei 55 °C und 1.000 rpm auf dem Thermoschüttler inkubiert. Die gelöste RNA wird anschließend durch die Zugabe von 800 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (Verhältnis 25:24:1; Roth), einer Inkubation von 5 min bei 30 °C und 1.000 rpm auf dem Thermoschüttler und einer Zentrifugation von 5 min bei 13.000 rpm von den restlichen Bestandteilen getrennt. Die wässrige Phase, in der sich die gelöste RNA befindet, wird in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit 1 µl GlycoBlue (Ambion), 80 µl 3 M Natriumacetat mit einem pH von 5,5 und 616 µl kaltem Isopropanol über Nacht bei -80 °C gefällt. Schließlich wird die RNA durch eine Zentrifugation für 45 min bei 4 °C und 13.000 rpm gefällt. Das getrocknete RNA Pellet wird danach in 12 µl DNase- und RNase- freiem Wasser (Roth) aufgenommen.

Tabelle 51: Zusammensetzung für PK-Puffer und PK-Puffer mit 7 M Harnstoff

Komponente	Menge / [Konzentration]
1 M Tris HCl pH 7,4	1,5 ml [100 mM]
5 M NaCl	150 µ [50 mM]
500 mM EDTA	300 µl [10 mM]
10 % SDS	1,5 ml [1 %]
(+ Harnstoff)	6,306 g [7 M]
DNase/RNase-freies H ₂ O	ad 15 ml

2.5.9.8 Reverse Transkription

In den nächsten Schritten wird die isolierte RNA mit Hilfe der reversen Transkriptase (RT) in cDNA (*complementary* DNA) transkribiert und dient im Anschluss als Matrize (*template*) für weitere Amplifikationsschritte mittels PCR.

Für die reverse Transkription wird die gelöste RNA (12 µl) mit 1 µl dNTPs (10 mM) und 1 µl RT Oligonukleotid (0,5 pmol/µl) gemischt. Die Anlagerung des Oligonukleotids an die RNA findet bei 70 °C für 5 min statt. Nach diesem ersten Inkubationsschritt werden 6 µl reverse Transkriptions (RT) Mix (Tabelle 52) zugegeben. Die reverse Transkription findet für 5 min bei 25 °C, für 20 min bei 42 °C und für 40 min bei 50 °C statt. Anschließend werden 1,65 µl 1 M NaOH zugegeben und die Reaktionen für 20 min bei 98 °C inkubiert. Durch die Zugabe von 20 µl 1 M HEPES-NaOH pH 7,3 wird die Radioaktivität eliminiert und die Proben können für die weiteren Amplifikationsschritte verwendet werden.

Tabelle 52: Zusammensetzung für 6 µl reverse Transkriptions (RT)-Mix

Komponente	Menge
5x RT-Puffer	4 µl
100 mM DTT	1 µl
Superscripts III (200 U/µl)	0,5 µl
RNaseOUT (40 U/µl)	0,5 µl

Nach der reversen Transkription wird die synthetisierte cDNA mittels MyONE Silane *Beads* (Thermo Scientific) nach dem Protokoll von Buchbender *et al.* 2019 aufgereinigt, um störende Oligonukleotide zu entfernen. Die cDNA wird für die weiterführenden Reaktionen in 5 µl H₂O aufgenommen.

2.5.9.9 Zweite 3' DNA-Linker-Ligation

In den nächsten Schritten wird ein weiterer Oligonukleotid-Linker an die cDNA angefügt, damit die einzelnen Proben später bei der Sequenzierung und der Auswertung voneinander unterschieden werden können. Für jede einzelne Probe wird deshalb nur ein entsprechender Oligonukleotid-Linker verwendet.

Die cDNA wird nach der MyONE Silena *Bead* Aufreinigung in 5 µl H₂O aufgenommen (2.5.9.8). Zu diesen 5 µl werden nun 2 µl L#clip2.0 Oligonukleotid-Linker und 1 µl 100 % DMSO dazugegeben, sodass ein Volumen von 8 µl vorliegt. Nach einer Inkubation von 2 min bei 75 °C und einem Abkühlen auf Eis werden 12 µl 1x 3' cDNA-Linker-Ligation-Mix (Tabelle 53) zugegeben und durch Pipettieren gemischt. Anschließend wird noch einmal 1 µl RNA-Ligase zu jeder Probe zugegeben, sodass ein Gesamtvolumen von 21 µl erhält. Danach findet die Ligation über Nacht bei Raumtemperatur und 1.100 rpm auf dem Thermoschüttler statt.

Tabelle 53: Zusammensetzung für 1x 3' cDNA-Linker-Ligation-Mix

Komponente	Menge
10x RNA-Ligase Puffer (NEB)	2 µl
100 mM ATP	0,2 µl
50 % PEG8000	9 µl
RNA-Ligase (NEB)	0,5 µl
DNase/RNase-freies H ₂ O	0,3 µl

Nach der 3' cDNA-Linker-Ligation wird die cDNA mittels MyONE Silane *Beads* (Thermo Scientific) nach dem Protokoll von Buchbender *et al.* 2019 aufgereinigt, um störende Oligonukleotide zu entfernen. Die cDNA wird für die weiterführenden Reaktionen in 23 µl H₂O aufgenommen.

2.5.9.10 Erste cDNA-Amplifikation mittels PCR

Nach der zweiten 3' DNA-Linker Ligation folgt in den nächsten Schritten die Amplifikation der cDNA mittels PCR. Dazu werden 22,5 µl der aufgereinigten cDNA nach der 3' DNA-Linker Ligation für die erste Amplifikation der cDNA (Tabelle 54) verwendet. Für diese Amplifikation werden die Primer P5Solexa_s und P3Solexa_s verwendet.

Tabelle 54: Zusammensetzung für cDNA-Amplifikation (50 µl)

Komponente	Menge
cDNA	22,5 µl
P5Solexa_s/P3Solexa_s Mix	2,5 µl
Phusion Polymerase (Thermo Scientific)	0,5 µl
5x HF Puffer (Thermo Scientific)	10 µl
dNTPs (jedes 10 mM)	1 µl
DNase/RNase-freies H ₂ O	13,5 µl

Tabelle 55: PCR-Reaktion

Temperatur	Zeit
98 °C	30 sec
98 °C	10 sec
65 °C	30 sec
72 °C	30 sec
	6 Zyklen
72 °C	3 min
16 °C	∞

Um überschüssige Oligonukleotid-Dimere zu entfernen, wird nach der PCR die amplifizierte DNA mittels ProNex Chemikalie (Promega) aufgereinigt. Die Aufreinigung findet wie in Buchbender *et al.* 2019 beschrieben statt. Die DNA wird nach der ProNex Aufreinigung in 23 µl Elutionspuffer aufgenommen.

2.5.9.11 Zweite cDNA-Amplifikation mittels PCR

In einer weiteren Amplifikation der cDNA werden nun die Anzahl der Zyklen für die entsprechende präparative PCR bestimmt, sodass eine optimale Amplifikation der DNA stattfindet und eine möglichst gleiche Konzentration in cDNA in allen Proben resultiert. Für alle weiteren cDNA-Amplifikationen werden die Primer P5Solexa und P3Solexa verwendet.

Tabelle 56: Zusammensetzung für cDNA-Amplifikation (10 µl)

Komponente	Menge
cDNA	1 µl
P5Solexa/P3Solexa Mix	0,5 µl
Phusion Polymerase (Thermo Scientific)	0,1 µl
5x HF Puffer (Thermo Scientific)	2 µl
dNTPs (jedes 10 mM)	0,2 µl
DNase/RNase-freies H ₂ O	6,2 µl

Tabelle 57: PCR-Reaktion

Temperatur	Zeit
98 °C	30 sec
98 °C	10 sec
65 °C	30 sec
72 °C	30 sec
	10-15 Zyklen
72 °C	3 min
16 °C	∞

Die Optimierung der PCR kann mittels 7 %iges Polyacrylamidgel überprüft werden (2.4.2).

2.5.9.12 Präparative cDNA-Amplifikation mittels PCR

Nachdem in den vorherigen PCR Schritten eine optimale Anzahl an PCR-Zyklen identifiziert wurde, kann nun die präparative PCR durchgeführt werden. Für präparative cDNA-Amplifikationen werden die Primer P5Solexa und P3Solexa verwendet. Danach können die resultierenden Proben für die Sequenzierung verwendet werden.

Tabelle 58: Zusammensetzung für cDNA-Amplifikation (40 µl)

Komponente	Menge
cDNA	10 µl
:P5Solexa/P3Solexa Mix	2 µl
Phusion Polymerase (Thermo Scientific)	0,4 µl
5x HF Puffer (Thermo Scientific)	8 µl
dNTPs (jedes 10 mM)	0,8 µl
DNase/RNase-freies H ₂ O	19,6 µl

Tabelle 59: PCR-Reaktion

Temperatur	Zeit
98 °C	30 sec
98 °C	10 sec
65 °C	30 sec
72 °C	30 sec
	30 Zyklen
72 °C	3 min
16 °C	∞

Um überschüssige Oligonukleotid-Dimere zu entfernen, wird nach der PCR die amplifizierte DNA mittels ProNex Chemikalie (Promega) aufgereinigt. Die Aufreinigung erfolgt wie in Buchbender *et al.* 2019 beschrieben. Die DNA wird nach der ProNex Aufreinigung in 20 µl Elutionspuffer aufgenommen. Die Qualität der Aufreinigung kann anschließend mit Proben vor und nach der ProNex Behandlung

mittels 7 %iges Polyacrylamidgel überprüft werden (2.4.2). Die Proben werden anschließend für die Sequenzierung an die Core Unit SysMed der Universität Würzburg gesendet.

2.5.10 Detektion mittels *phosphoimaging*

Signale von radioaktiv markierten Membranen (Northern Blot) oder getrockneten Gelen, die radioaktive Produkte enthalten (EMSA, *structure probing*, *in vitro* Degradations-Experiment), können mittels *phosphoimaging* analysiert werden. Dafür werden die Membranen oder Gele auf einem *phosphoimaging* Screen exponiert. Der Screen enthält BaFBrEu-Kristalle, die durch die Energie der radioaktiven Strahlung angeregt werden und ihren Ladungszustand ändern. Diese Ladungsänderung kann über einen HeNe-Laser detektiert werden. Die entsprechenden Signale können anschließend über die Software *Quantity One* (Bio-Rad) analysiert werden.

2.5.11 Transkriptom Analyse mittels RNA-Sequenzierung (RNASeq)

Bei der Methode des RNASeq kann die Abfolge der Nukleotid der Gesamt-RNA mit dem sogenannten *Next-Generation-Sequencing* bestimmt werden. Die resultierenden Ergebnisse der RNASeq können dabei Aufschluss über die Expression von bestimmten Genen unter verschiedenen Bedingungen oder Mutanten geben. Durch die präzise Sequenzierung des *Next-Generation-Sequencing* können jedoch auch neue offene Leseraster (*open-reading frame*; ORF) und somit neue Gene identifiziert werden. Der Vorteil der RNASeq ist eine höhere Auflösung und Reproduktion mit geringerem Hintergrundrauschen der einzelnen Replikate (Wang *et al.*, 2009; Wilhelm & Landry, 2009; Garber *et al.*, 2011).

In dieser Arbeit wird die Methode der RNASeq genutzt, um den Einfluss des Proteins CcaF1 in einer Überexpression auf das gesamte Transkriptom zu untersuchen. Dafür wird *R. sphaeroides* 2.4.1 mit dem entsprechenden Überexpressionsplasmid pRKccaF1 (Tabelle 8) oder dem Leervektor (pRK4352) in biologischen Triplikaten unter mikroaeroben Wachstumsbedingungen angezogen und nach dem Erreichen der exponentiellen Phase (OD₆₆₀) geerntet (2.2.2.1). Die gesamte RNA wird für die spätere Transkriptom Analyse zunächst mit heißem Phenol isoliert (2.5.1.1) und einer DNase-Behandlung unterzogen, um mögliche DNA-Kontaminationen (2.5.1.3) zu entfernen. Nach einer Test-PCR der RNA-Proben wird zusätzlich eine qualitative Analyse der Gesamt-RNA auf einem denaturierenden TBE-Polyacrylamid-Harnstoffgel (2.4.3.1) durchgeführt. Zeigen sich in allen Proben weder DNA-Kontaminationen noch RNA-Degradation, können die Proben für die Sequenzierung verwendet werden. In dieser Arbeit wird die Sequenzierung durch die Core Unit SysMed der Universität Würzburg durchgeführt.

2.6 Proteinbiochemische Methoden

2.6.1 Aufreinigung rekombinanter Proteine

Rekombinant exprimierte Proteine lassen sich sehr gut mittels Affinitätschromatographie aus einem Proteingemisch bzw. Zelllysats aufgrund ihrer Wechselwirkungen zu einem Liganden isolieren, der an

einer Matrix immobilisiert ist. In den meisten Fällen wird ein His-tag, also sechs aufeinanderfolgende Histidin-Reste am C- oder N-Terminus des Proteins, für die Aufreinigung genutzt. Über die negative Ladung des His-tags kann das Protein an den positiv geladenen Ni²⁺-Ionen (Ligand) binden, die an einer Matrix immobilisiert sind, während andere Proteine keine oder nur eine geringe Bindung an dem Liganden aufweisen. Die Bindung des gewünschten Proteins an dem Liganden kann anschließend über die Verwendung von Imidazol, Metallionenkomplexbildner (z.B. EDTA) im Puffer oder durch die Änderung des pH-Werts wieder aufgelöst werden und das Protein eluiert.

2.6.1.1 Aufreinigung der RNaseE529-His₆

Die RNaseE529-His₆ wird wie in 2.2.13 beschrieben in *E. coli* BL21 mit einer finalen Konzentration von 1 mM IPTG (Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid) für 3 h bei 37 °C und 180 rpm überexprimiert. Das Zellpellet wird für die Aufreinigung in 50 ml Lysispuffer (Tabelle 60) und mit einer Spatelspitze Lysozym resuspendiert. Für einen schonenderen Aufschluss der Zellen wird in diesem Fall das *french-press* Verfahren verwendet. Die entstandenen Zellfragmente werden mittels Zentrifugation bei 15.000 rpm für 30 min bei 4 °C und Filtrieren vom Lysat getrennt. Für die Aufreinigung des Proteins wird das filtrierte Zelllysate auf eine 5 ml HisTrap HP (GE Healthcare) Säule an dem Äkta PURE25 System (GE Healthcare) geladen, die zuvor mit Lysispuffer equilibriert wurde. Die Säule wird mit 10 Säulen-Volumen Waschpuffer (Lysispuffer mit 50 mM Imidazol) gewaschen und das Protein anschließend über einen linearen Gradienten von 3 Säulen-Volumen (10-100 %) mit Elutionspuffer eluiert (Lysispuffer mit 500 mM Imidazol) (Callaghan *et al.*, 2005a). Die Elutions-Fractionen werden danach mittels SDS-PAGE (2.4.7) analysiert. Da die RNaseE529-His₆ nach der Affinitätschromatographie relativ sauber war, muss keine zusätzliche Größenausschlusschromatographie durchgeführt werden.

Tabelle 60: Zusammensetzung RNaseE529-His₆ Lysispuffer

Komponente	Menge / [Konzentration]
Tris HCl pH 7,5	2,4 g [20 mM]
NaCl	29,22 g [500 mM]
ddH ₂ O	ad 1 l

2.6.1.2 Aufreinigung von CcaF1

Das Protein CcaF1 wird wie in 2.2.13 beschrieben in *E. coli* BL21 durch die Zugabe von Laktose-monohydrat (12.5 g/l) über 16 h bei 16 °C und 180 rpm überexprimiert. Das Zellpellet wird für die Aufreinigung in 50 ml Lysispuffer (Tabelle 61) und mit einer Spatelspitze Lysozym resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgt über das Verfahren des Sonifizierens (5x 30 sec mit Power 70). Die entstandenen Zellfragmente werden anschließend mittels Zentrifugation bei 20.000 rpm für 30 min bei 4 °C und Filtrieren vom Lysat getrennt. Für den ersten Aufreinigungsschritt des Proteins wird das filtrierte Zelllysate auf eine 5 ml HisTrap HP (GE Healthcare) Säule an dem Äkta PURE25 System geladen, die zuvor mit Lysispuffer equilibriert wurde. Die Säule wird ebenfalls mit 10 Säulen-Volumen Waschpuffer (Lysispuffer mit 50 mM Imidazol) gewaschen und das Protein anschließend über einen linearen

Gradienten von 3 Säulen-Volumen (10-100 %) mit Elutionspuffer eluiert (Lysispuffer mit 600 mM Imidazol). Die Elutions-Fraktionen werden danach mittels SDS-PAGE (2.4.7) analysiert. In eine zweiten Aufreinigungsschritt werden die entsprechenden Elutions-Fraktionen zusammengeführt und 500 µl auf eine Superdex 10/300 GL Größenausschlusssäule (GE Healthcare) geladen, die zuvor mit SEC-Puffer (*size-exclusion-buffer*; Tabelle 61) equilibriert wurde. Die Elutions-Fraktionen werden danach mittels SDS-PAGE (2.4.7) analysiert.

Tabelle 61: Zusammensetzung Lysispuffer und SEC-Puffer

Komponente	Menge / [Konzentration]	
Zusammensetzung 1 l Lysispuffer		
Tris HCl pH 8	6 g	[50 mM]
NaCl	29,22 g	[500 mM]
KCl	3,7 g	[50 mM]
MgCl ₂ x6H ₂ O	2,0 g	[10 mM]
Imidazol	1,36 g	[20 mM]
DTT	0,154 g	[1 mM]
Tween20	0,02 %	
ddH ₂ O	ad 1 l	
Zusammensetzung 1 l SEC-Puffer		
Tris HCl pH 8	6 g	[50 mM]
NaCl	29,22 g	[500 mM]
KCl	3,7 g	[50 mM]
DTT	0,154 g	[1 mM]
ddH ₂ O	ad 1 l	

2.6.2 Proteinbestimmung mittels Bradford-Reagenz

Die Bestimmung der Proteinkonzentration eines Zelllysats oder eines aufgereinigten Proteins wird in dieser Arbeit mittels Bradford-Reagenz durchgeführt. Die dabei durchgeführte Reaktion basiert auf der Interaktion des eingesetzten Farbstoffs mit aromatischen Aminosäureresten von Proteinen, was zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 470 nm zu 595 nm führt. Diese Verschiebung kann photometrisch gemessen werden. Anhand einer Eichgerade, die mit einem Referenzprotein (Bovines Serumalbumin; BSA) erstellt wird, kann anschließend die Konzentration des Zelllysats oder des aufgereinigten Proteins bestimmt werden. Für die Durchführung des Bradford-Tests wird die Reagenz Roti®-Nanoquant (Roth) nach den Herstellerangaben verwendet.

2.6.3 Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen

2.6.3.1 Coomassie-Färbung

Der Nachweis von Proteinbanden in einem SDS-Polyacrylamidgel mittels Coomassie-Färbung ist eine der häufigsten Methoden in der Proteinbiochemie. Dabei lagert sich der Triphenylmethanfarbstoff (Coomassie) in einem sauren Milieu an basische Aminosäurereste an, sodass die Proteinbanden in

einem Gel sichtbar werden. In dieser Arbeit wird die Roti®-Blue Reagenz (Roth) nach Herstellerangaben verwendet. Das Gel kann dabei für mehrere Stunden oder über Nacht unter schwenken gefärbt werden und mit ddH₂O entfärbt werden.

2.6.3.2 Silber-Färbung

Eine weitere Methode, um Proteine in einem SDS-Polyacrylamidgel sichtbar zu machen, ist die Silber-Färbung. Dafür wird das Gel nach der Gelelektrophorese für mindestens eine Stunde in Fixierlösung (Tabelle 62) geschwenkt. Nach der Inkubation in der Fixierlösung wird diese abgegossen und das Gel 3x mit 50 % Ethanol für jeweils 20 min gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wird das Ethanol verworfen und das Gel für eine Minute unter Schwenken in Lösung 1 (Tabelle 62) inkubiert. Danach wird das Gel 3x für 20 sec mit ddH₂O gewaschen und anschließend für 20 min unter schwenken mit Lösung 2 (Tabelle 62) inkubiert. Nach der Inkubation mit Lösung 2 wird diese verworfen und das Gel erneut 3x für 20 sec mit ddH₂O gewaschen. Durch die Zugabe von Lösung 3 (Tabelle 62) tritt nun die Färbereaktion ein. Diese findet solange statt, bis alle Proteinbanden eine intensive Färbung angenommen haben. Die Färbereaktion wird durch die Zugabe von 100 %iger Essigsäure gestoppt.

Tabelle 62: Zusammensetzung Fixierlösung

Komponente	Menge
Zusammensetzung 100 ml Fixierlösung	
Methanol	50 %
Essigsäure (100 %ige)	12 %
Formaldehyd	0,05 % (frisch dazu geben)
ddH ₂ O	ad 100 %
Zusammensetzung für 500 ml Lösung 1	
Na ₂ S ₂ O ₃ x 5H ₂ O	0,1 g
ddH ₂ O	ad 500 ml
Zusammensetzung für 250 ml Lösung 2	
AgNO ₃	0,5 g
Formaldehyd	188 µl (frisch dazu geben)
ddH ₂ O	ad 250 ml
Zusammensetzung für 250 ml Lösung 3	
Na ₂ CO ₃	15 g
Formaldehyd	125 µl (frisch dazu geben)
Lösung 1	5 ml
ddH ₂ O	ad 250 ml

2.6.4 Western Blot Analyse

Bei der Western Blot Analyse werden die Proteine, entweder aus einer Gesamt-Zelllysate oder aus einer Protein-Aufreinigung, zuerst in einer Gelelektrophorese antiproportional zur Größe aufgetrennt (2.4.7) und anschließend durch ein elektrisches Feld in einem *semidry* Blot auf eine PVDF Membran übertragen. Dazu werden sechs Whatman-Papiere und eine PVDF-Membran auf Größe des Gels zugeschnitten und mit Transferpuffer (Tabelle 63) befeuchtet. Drei von den sechs feuchten Whatman-Papieren werden auf die Anodenplatte gestapelt. Auf die Papiere wird anschließend die mit Methanol aktivierte PVDF-Membran und dann das zurecht geschnittene Gel platziert. Auf das Gel werden erneut drei Lagen feuchtes Whatman-Papier gestapelt und die Kathodenplatte mit der Anodenplatte befestigt. Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgt beim *semidry* Blot über ein elektrisches Feld bei 15 mA für ca. eine Stunde. Nach dem Transfer der Proteine wird die Membran mittels Milchpulverlösung (5 % Milchpulver gelöst in 1x PBS-Tween20 0,1 %) für mindestens 30 min unter Schwenken bei 4 °C abgesättigt. Zum immunologischen Nachweis der geblotteten Proteine wird die Membran mit einem Antikörper hybridisiert, der spezifisch für ein Antigen des nachzuweisenden Proteins ist. In dieser Arbeit wird ein monoklonaler Peroxidase-gekoppelte Anti-FLAG M2 Antikörper (Sigma-Aldrich) in einer Verdünnung von 1:1000 (in 5 % Milchpulverlösung verdünnt) verwendet. Die Bindung des Antikörpers an dem entsprechenden Antigen, welches in diesem Fall das zu untersuchende Protein ist, findet unter Schwenken bei 4 °C über Nacht statt. Die Antikörperlösung kann nach der Inkubation bei -20 °C gelagert werden und bis zu 10x wiederverwendet werden. Ungebundene Antikörper werden durch mehrmaliges Waschen der Membran mit 1x PBS-Lösung (Tabelle 7) entfernt. Schließlich findet die Detektion der Proteine über das SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate Kit (Thermo Scientific) nach Herstellerangaben statt.

Tabelle 63: Zusammensetzung für 1l 1x Transferpuffer

Komponente	Menge / [Konzentration]
Tris	3,02 g [25 mM]
Glycin	14,26 g [190 mM]
Methanol	200 ml [20 %]
ddH ₂ O	ad 1l

2.6.5 Co-Immunopräzipitation (CoIP) von Protein

Um Interaktionen zwischen Protein und RNA oder Protein und Protein *in vivo* zu untersuchen, kann eine CoIP durchgeführt werden. Dabei ist das zu untersuchende Protein mit einem bestimmten Protein-*tag* fusioniert, sodass man das gewünschte Protein aus dem Zellextrakt aufreinigen kann. In dieser Arbeit wird eine CoIP mit dem Protein CcaF1 durchgeführt, welches mit einem 3xFLAG-*tag* fusioniert ist, um mögliche RNA- oder Protein-Interaktionspartner zu identifizieren. Für die CoIP werden 200 ml *R. sphaeroides* Zellen, die das entsprechende Plasmid pRKCcaF1FLAG besitzen, in der exponentiellen Phase mittels Zentrifugation geerntet (2.2.16). Der Zellaufschluss erfolgt durch 5x Sonifizieren für 2 min (ohne Pause) bei Power 70. Die Zellfragmente werden anschließend durch eine Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4 °C für 30 min von dem Zelllysate getrennt. Nach diesem ersten

Zentrifugationsschritt wird noch ein weiterer Schritt mittels Ultrazentrifugation durchgeführt. Das Zelllysate wird dabei für 1 h bei 53.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Für die CoIP wird das Zelllysate mit 50 µl magnetischen Dyna-Beads Protein G (Invitrogen), an dem monoklonale anti-FLAG M2 Antikörper (Sigma Aldrich) gekoppelt sind, versetzt. Im Anschluss findet die Immunopräzipitation für 2 h bei 4 °C unter ständiger Rotation (Tumbler) statt. Nach der Immunopräzipitation werden die Dyna-Beads, an die nun der zu untersuchende Protein-RNA- oder Protein-Protein-Komplex über einen 3xFLAG gebunden haben, dreimal mit kaltem TBS-T-Puffer (Tabelle 46) gewaschen.

2.6.5.1 Co-Immunopräzipitation (CoIP) für RNASeq

Um die an das Protein gebundene RNA zu analysieren, wird eine CoIP mit anschließender RNASeq durchgeführt. Dafür wird der Protein-RNA-Komplex wie oben beschrieben aus dem Zelllysate isoliert. Die Dyna-Beads werden nach dem letzten Waschschriff in 400 µl TBS-T-Puffer aufgenommen und mit 400 µl Phenol versetzt, welches mit Wasser gesättigt ist. Durch das Phenol und das Vortexen werden die Proteine denaturiert und verbinden sich mit dem unpolaren, sauren Phenol zu einer organischen Phase, während sich die RNA in einer wässrigen Phase ansammelt. Für eine gute Phasentrennung werden die Proben bei 13.000 rpm und Raumtemperatur für 15 min zentrifugiert. Die wässrige Phase, in der sich die RNA befindet, wird nach der Zentrifugation in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Dann werden die Proben mit 400 µl Chloroform:Isoamylalkohol (Verhältnis von 24:1) versetzt, gevortext und erneut bei 13.000 rpm und Raumtemperatur für 5 min zentrifugiert, damit potenzielle Phenolreste entfernt werden. Die wässrige Phase wird erneut in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die RNA mittels Ethanol gefällt (2.3.6.1). Die von dem Protein-RNA-Komplex isolierte RNA wird anschließend über die Methode der RNASeq (2.5.11) analysiert.

2.6.5.2 Co-Immunopräzipitation (CoIP) für Massenspektrometrie

Um mögliche Protein-Protein-Interaktionen zu untersuchen, wird eine CoIP mit nachfolgender Massenspektrometrie durchgeführt. Dafür wird der Protein-RNA-Komplex wie oben beschrieben aus dem Zelllysate isoliert. Die Dyna-Beads werden nach dem letzten Waschschriff ohne Puffer bei -20 °C gelagert und können anschließend für die Orbitrap Massenspektrometrie verwendet werden. Die Analysen der Massenspektrometrie werden in dieser Arbeit in der Proteomanalytik der AG Günter Lochnit (Universität Gießen, Institut für Biochemie) durchgeführt.

3 Ergebnisse

An der posttranskriptionellen Genregulation in Bakterien sind regulatorische RNAs (sRNAs), RNA-Bindeproteine und Ribonukleasen beteiligt, die ein komplexes Netzwerk ausbilden und so die Anpassung der Genexpression auf sich ändernde Umweltbedingungen ermöglichen. In dieser Arbeit wurden in Hinblick auf die Adaption unter verschiedenen Stress- und Nährstoff-limitierenden Bedingungen (stationäre Phase) die sRNAs RSs0827 und UpsM untersucht, die eine zentrale regulatorische Funktion bei der Zellteilung des phototrophen Bakteriums *R. sphaeroides* ausüben (Grützner *et al.*, 2021b). Zusätzlich wurde die physiologische Bedeutung der bisher nicht charakterisierten DUF1127-Proteine RSP_6037 und RSP_0557 für die posttranskriptionelle Genregulation in *R. sphaeroides* analysiert (Grützner *et al.*, 2021a). Die Ergebnisse aus beiden Teilen zeigen neue Erkenntnisse über die Anpassungsmöglichkeiten von Bakterien und verdeutlichen die Komplexität der Genregulation in *R. sphaeroides*.

3.1 Die kleinen regulatorischen RNAs StsR (small RNA targets small RNA) und UpsM

In *R. sphaeroides* wurde die 72 Nukleotide lange sRNA RSs0827 erstmals bei Vergleichen der RNA-Transkript-Spiegel (RNASeq) unter Eisen-limitierenden Bedingungen (Peuser *et al.*, 2012) auf dem Chromosom 1 zwischen den Genen *RSP_2239* (tRNA/rRNA Methyltransferase) und *RSP_2240* (CoA-Bindeprotein) identifiziert (Abbildung 10 A). Dabei zeigte die sRNA RSs0827 unter Eisen-limitierenden Bedingungen erhöhte zelluläre Spiegel im Vergleich zu normalen Bedingungen (Peuser *et al.*, 2012). Aufgrund ihrer Expression unter Eisen-limitierenden Bedingungen und der Tatsache, dass unter dieser Bedingung das intrazelluläre ROS-Level stark ansteigt, wurde ihr eine Funktion in der Eisen-Homöostase und der ROS-Abwehr zugeordnet (Peuser *et al.*, 2012). Neuere Analysen zeigten, dass die Spiegel der sRNA RSs0827 auch in der späten stationären Phase stark erhöht sind (Remes *et al.*, 2017). Diese Erkenntnisse machten die sRNA RSs0827 für weitere Studien in *R. sphaeroides* interessant. Vergleichende Transkriptom-Analysen (RNASeq) zwischen dem *R. sphaeroides* Wildtyp und einer Δ RSs0827-Deletionsmutante in der exponentiellen Wachstumsphase ergaben, dass die RNA-Transkripte von 76 Genen in der Mutante verringerte Spiegel (Log2 FC Ratio < -0,6) und die Transkripte von 17 Genen erhöhte Spiegel (Log2 FC Ratio von > 0,6) aufweisen (Dissertation Dr. Katrin Müller). Weitere Untersuchungen zeigten, dass die sRNA RSs0827 eine Interaktion mit der mRNA von *rpoE* eingeht und ihre Stabilität beeinflusst (Eisenhardt *et al.*, 2021). RpoE ist ein alternativer ECF σ -Faktor, der eine wichtige Funktion in der Anpassung an Singulett-Sauerstoffstress in *R. sphaeroides* besitzt (Newman *et al.*, 1999; Anthony *et al.*, 2004). Jedoch konnte bis auf die Interaktion mit *rpoE* keine weitere Funktion bzw. Interaktion der *trans*-kodierte sRNA RSs0827 mit anderen Ziel-mRNAs experimentell gezeigt werden, sodass die Funktion der sRNA RSs0827 weitgehend unklar blieb.

UpsM (*u*pstream *s*RNA *m*raZ; RSs0682) ist eine 206 Nukleotide lange sRNA, die in der 5' UTR (*u*ntranslated *r*egion) von *mraZ*, dem ersten Gen des *dcw* (*d*ivision and *c*ell *w*all) Genclusters, lokalisiert ist. Die Expression der sRNA UpsM wird über einen konstitutiven Promotor und einen Rho-unabhängigen Terminator gesteuert (Abbildung 10 B). Dieser Terminator wird bei ungefähr 100 Transkriptionen einmal überlesen (*read-through*), sodass eine basale Transkription der *dcw* Gene stattfindet (Weber *et al.*, 2016). In der Publikation von Weber *et al.* 2016 konnte gezeigt werden, dass

UpsM in Gegenwart einer 206 Nukleotid (206 nt) langen sRNA durch die Endoribonuklease E (RNase E) zu einem 130 Nukleotide (130 nt) langen 3' Fragment prozessiert wird. Der genaue Mechanismus der Prozessierung bzw. die Funktion des stabilen 3' Prozessierungsfragments waren zum Zeitpunkt der zitierten Publikation noch unbekannt (Weber *et al.*, 2016).

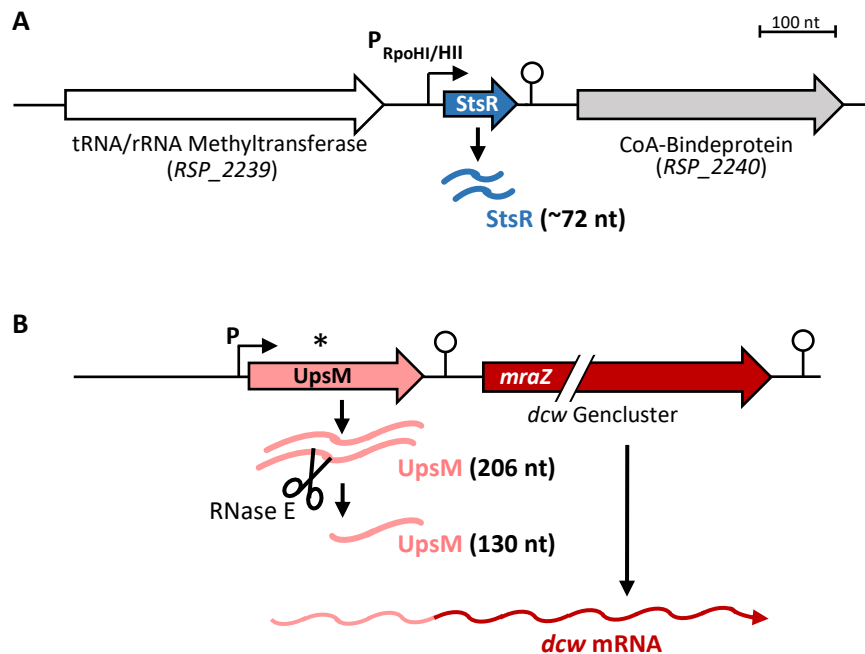


Abbildung 10: Gen-Loci der sRNAs StsR und UpsM in *R. sphaeroides*. (A) StsR ist im intercistronischen Bereich der Gene für eine tRNA/rRNA Methyltransferase (RSP_2239) und ein CoA-Bindeprotein (RSP_2240) lokalisiert. Am 5' Ende befindet sich eine RpoHI/II-abhängige Promotorsequenz (Pfeil) und am 3' Ende ein Rho-unabhängiger Terminator (Haarnadelstruktur). (B) UpsM ist in der 5' UTR (*untranslated region*) von *mraZ* lokalisiert, dem ersten Gen des *dcw* (*division and cell wall*) Genclusters. UpsM und *dcw* Gencluster besitzen am 5' Ende einen konstitutiven Promotor (Pfeil). Zwischen UpsM und *mraZ* befindet sich ein Rho-unabhängiger Terminator, der einen *read-through* und somit die Transkription des *dcw* Genclusters zulässt. Die transkribierte sRNA UpsM wird unter verschiedenen Bedingungen durch die RNase E (Schere) zu einem stabilen, 130 Nukleotide langen RNA-Fragment prozessiert (*: Prozessierungsstelle; modifiziert nach Weber *et al.*, 2016; Grützner *et al.*, 2021b).

In dieser Arbeit konnte durch *in vivo* und *in vitro* Experimente gezeigt werden, dass die sRNA RSs0827 mit dem 5' Ende der sRNA UpsM (sRNA-sRNA) und dem 5' Ende der UTR des *dcw* Genclusters (sRNA-mRNA) interagiert. Diese Interaktion führt zu einer Strukturveränderung und einer RNase E-abhängigen Prozessierung, wodurch die Expression der nachfolgenden Gene des *dcw* Genclusters und die damit verbundene Zellteilung von *R. sphaeroides* unter verschiedenen Stress- und Wachstumsbedingungen reguliert wird. Aufgrund der neu identifizierten Interaktion zweier sRNAs wurde RSs0827 in StsR (*s*mall *R*NA *t*argets *s*mall *R*NA) umbenannt (Grützner *et al.*, 2021b).

3.1.1 Phänotypische Charakterisierung der StsR Deletionsmutante (Δ StsR)

Obwohl vergleichende Transkriptom-Analysen zwischen *R. sphaeroides* Wildtyp und der StsR-Deletionsmutante (Δ StsR) durchgeführt wurden (Dissertation Dr. Katrin Müller), gab es keine eindeutigen Hinweise auf die Funktion dieser sRNA. Da die sRNA StsR eine starke Abundanz in der stationären Phase aufweist und bekannt ist, dass der Eintritt in die stationäre Phase und der anschließende Austritt durch die Zufuhr neuer Nährstoffe (*outgrowth* Phase) in einer bakteriellen Kultur sehr genau reguliert werden (Finkel, 2006; Navarro Llorens *et al.*, 2010; Remes *et al.*, 2017), wurde eine phänotypische Charakterisierung mittels Wachstumskurven und Bestimmung der Überlebensrate (*survival assay*) durchgeführt (Abbildung 11). Für die Wachstumskurven wurden der *R. sphaeroides* Wildtyp und die Δ StsR-Mutante unter mikroaeroben Bedingungen in biologischen Triplikaten kultiviert. Dazu wurden Übernachtskulturen (mikroaerob inkubierte Kulturen aus der exponentiellen Wachstumsphase) auf eine OD₆₆₀ von 0,1 mit RÄ-Medium verdünnt und erneut bei 32 °C inkubiert. Das Wachstum beider Stämme wurde anschließend für 48 bzw. 72 Stunden durch Messen der optischen Dichte verfolgt. Jeweils nach 48 und 72 Stunden wurden die stationären Kulturen erneut auf eine OD₆₆₀ von 0,1 mit frischem RÄ-Medium verdünnt, um die Reaktion der Zellen auf das Vorhandensein neuer Nährstoffe (*outgrowth*) zu dokumentieren (Abbildung 11 A). Außerdem wurden die Überlebensraten von *R. sphaeroides* Wildtyp und Δ StsR-Mutante zu ausgewählten Zeitpunkten entlang der Wachstumskurve bestimmt, da die reine Messung der optischen Dichte keinen Aufschluss über das Verhältnis lebender zu toter Zellen gibt bzw. eine Veränderung der Bakterien in ihrer Zelllänge die Korrelation zwischen optischer Dichte und Zellzahl verfälschen kann. Dafür wurden Proben aus der wachsenden Kultur entnommen und in biologischen Triplikaten und technischen Duplikaten in geeigneten Verdünnungen auf RÄ-Agar plattiert. Die Platten wurden anschließend bei 32 °C inkubiert und die Anzahl der Kolonien bestimmt (Abbildung 11 B).

Die Wachstumskurven von *R. sphaeroides* Wildtyp und Δ StsR-Mutante zeigten einen deutlichen Unterschied zwischen den beiden Stämmen (Abbildung 11 A). Während der Wildtyp nach ca. 20 Stunden mit einer OD₆₆₀ von ungefähr 1,6 in die stationäre Phase eintrat, blieb die Mutante länger in der exponentiellen Wachstumsphase und erreicht eine OD₆₆₀ von ungefähr 2,5 beim Übergang in die stationäre Phase. Ein noch größerer Unterschied zwischen beiden Stämmen war in der *outgrowth* Phase nach 48 bzw. 72 Stunden zu erkennen. Die Δ StsR-Mutante zeigte im Vergleich zum Wildtyp keine oder nur eine sehr kurze Lag-Phase, trat also unmittelbar in ein neues exponentielles Wachstum ein. Die Lag-Phase des Wildtyps erstreckte sich hingegen über mehrerer Stunden (Abbildung 11 A). Der im stationären Wachstum und *outgrowth* erkennbare Phänotyp der Mutante zeigte auf der Ebene der Überlebensrate noch eine deutlichere Ausprägung. In der exponentiellen Phase besitzen Wildtyp und Δ StsR-Mutante eine ähnliche Überlebensrate (Abbildung 11 B). In der stationären und *outgrowth* Phase nach jeweils 48 bzw. 72 Stunden zeigte die Deletionsmutante jedoch eine 20 – 30 fach höhere Überlebensrate als der Wildtyp (Abbildung 11 B). Um diesen charakteristischen Phänotyp aus der Wachstumsanalyse und der Überlebensrate eindeutig auf das Fehlen der sRNA StsR im *knockout*-Stamm zurückführen zu können, wurde der Δ StsR-Deletionsstamm durch eine Plasmid-basierte Überexpression von StsR unter eigenem Promotor (pBBRStsR) komplementiert. Auch hier wurde das Wachstum von Wildtyp- und Komplementationstamm (Δ StsR pBBRStsR) über 48 bzw. 72 Stunden unter mikroaeroben Bedingungen verfolgt. Dabei zeigte der Komplementationstamm (Δ StsR

pBBRStsR) wieder ein ähnliches Wachstumsverhalten wie der Wildtyp (Abbildung 11 C). Wurde jedoch die sRNA StsR über ein Plasmid im *R. sphaeroides* Wildtyp überexprimiert (WT pBBRStsR), so war die optische Dichte beim Übergang in die stationäre Phase deutlich verringert (Abbildung 11 D). Diese Kontrollen zeigen, dass der beobachtete Effekt der Deletionsmutante in der stationären und *outgrowth* Phase auf das Fehlen der kleinen RNA StsR zurückzuführen ist. Eine Überexpression von StsR scheint hingegen die Abnahme der optischen Dichte in der stationären Phase zu verstärken.

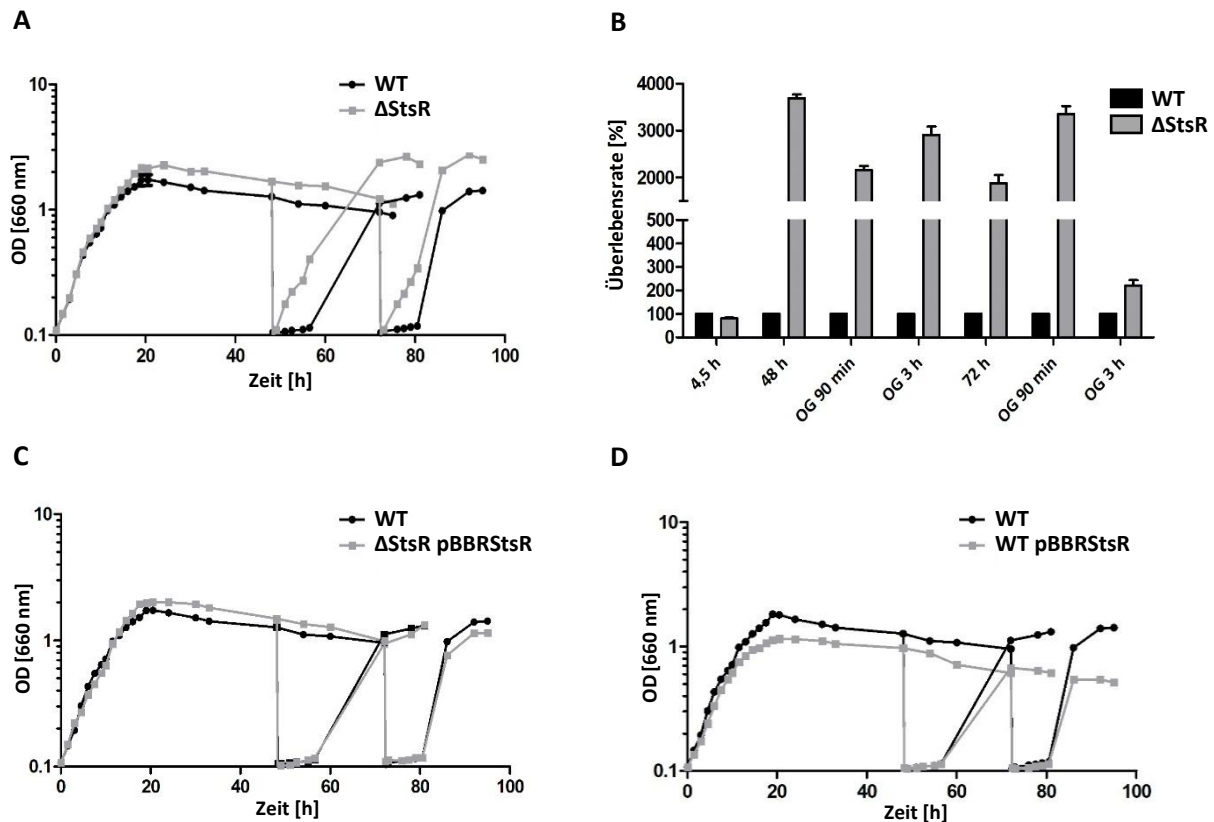


Abbildung 11: Einfluss der sRNA StsR auf das Wachstum und die Überlebensrate von *R. sphaeroides*. (A) Analyse des Wachstums von *R. sphaeroides* Wildtyp (schwarz) und *R. sphaeroides* mit einer Deletion der sRNA StsR (ΔStsR; grau) unter mikroaeroben Bedingungen. Die Messung der optischen Dichte erfolgte bei einer Wellenlänge von 660 nm in biologischen Triplikaten und der Mittelwert mit Standardabweichung wurde halblogarithmisch über die Zeit [h] aufgetragen. Nach jeweils 48 und 72 Stunden wurden die Kulturen auf eine OD₆₆₀ 0,1 mit frischem Medium verdünnt und das Wachstum erneut über 24 Stunden beobachtet. (B) Analyse der Überlebensrate von *R. sphaeroides* Wildtyp (schwarz) und ΔStsR-Mutante (ΔStsR; grau). Zu den gewählten Zeitpunkten (OG; *outgrowth*) wurden den Wachstumskulturen (Abbildung 11 A) Proben entnommen und in geeigneten Verdünnungen auf RÄ-Agar plattiert. Die Bestimmung der Überlebensrate erfolgte durch das Auszählen der Kolonien. Die Experimente wurden in biologischen Triplikaten und technischen Duplikaten durchgeführt und die Mittelwerte sowie Standardabweichungen bestimmt. Die Überlebensrate von *R. sphaeroides* Wildtyp (schwarz) wurde auf 100 % gesetzt und die Überlebensrate der ΔStsR-Mutante (grau) entsprechend darauf bezogen. (C) Analyse des Wachstums von *R. sphaeroides* Wildtyp (schwarz) und ΔStsR-Mutante, die durch StsR (ΔStsR pBBRStsR; grau) unter eigenem Promotor auf dem Plasmid pBBR_MCS1 komplementiert wurde. Die Messung der optischen Dichte unter mikroaeroben Bedingungen erfolgte in biologischen Triplikaten wie in (A) beschrieben. (D) Analyse des Wachstums von *R. sphaeroides* Wildtyp (schwarz) sowie von Wildtyp-Zellen, die StsR (WT pBBRStsR; grau) unter Kontrolle des eigenen Promotors plasmidal (Plasmid pBBR_MCS1) überexprimieren. Die Messung der optischen Dichte unter mikroaeroben Bedingungen erfolgte in biologischen Triplikaten wie in (A) beschrieben (modifiziert nach Grützner *et al.*, 2021b).

Um den Effekt der sRNA StsR auf das Wachstum genauer beschreiben zu können, wurde zusätzlich die Zellmorphologie und -länge in der exponentiellen, stationären und *outgrowth* Phase mikroskopisch analysiert (Abbildung 12).

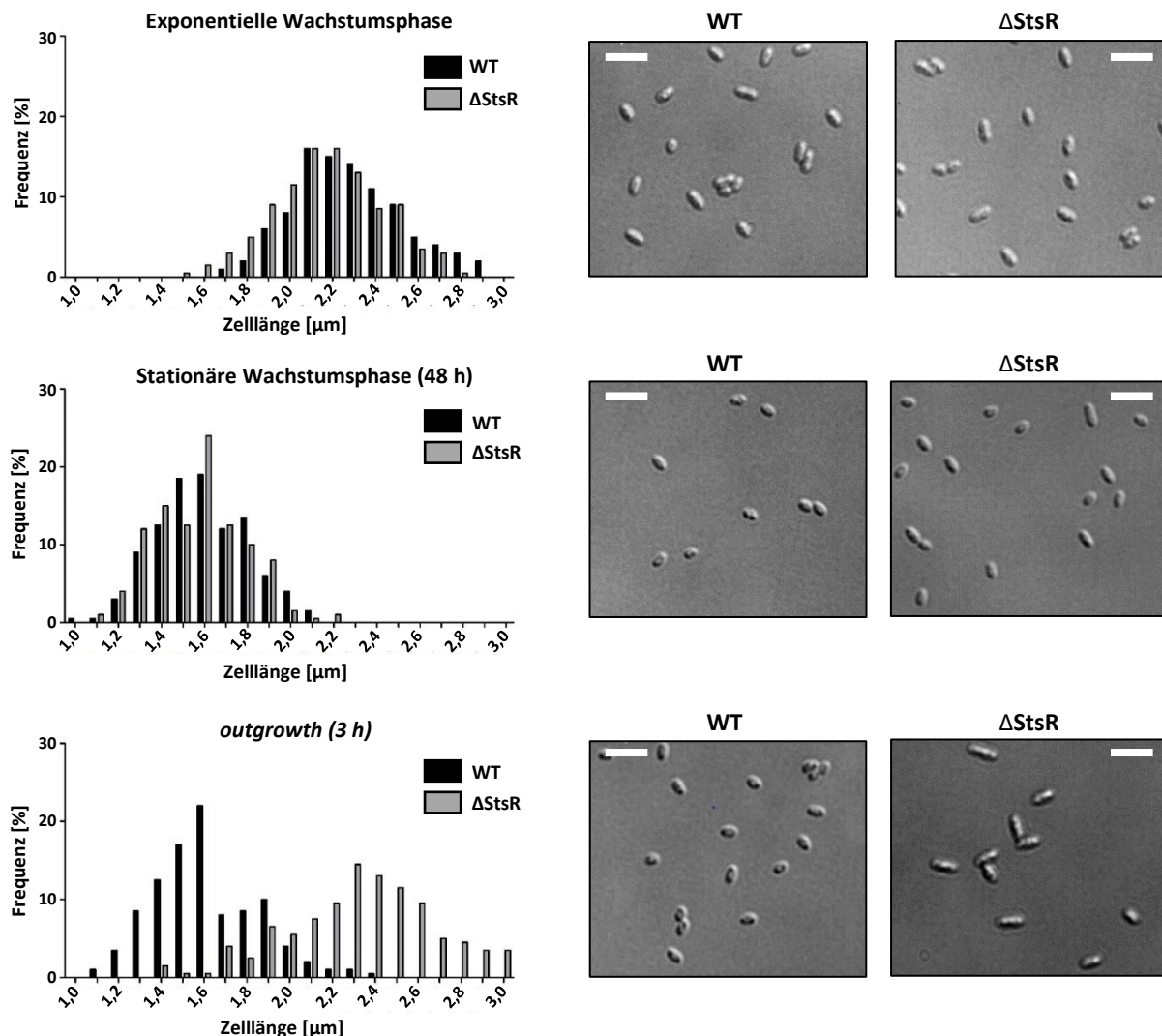


Abbildung 12: Einfluss der sRNA StsR auf die Zellteilung in *R. sphaeroides*. Links: Verteilung (Frequenz [%]) der Zelllängen von *R. sphaeroides* Wildtyp (schwarz) und *R. sphaeroides* Δ StsR-Mutante (grau) in der exponentiellen, stationären (48 h) und *outgrowth* Phase (3 h). Die Längen von 300 einzelnen Zellen in jeder Wachstumsphase wurden anhand mikroskopischer Aufnahmen (rechts) mit dem Programm Fiji (Schindelin *et al.*, 2012) gemessen und entsprechend grafisch dargestellt. Rechts: Mikroskopische Aufnahmen (Phasenkontrast-Mikroskop) von *R. sphaeroides* Wildtyp und *R. sphaeroides* Δ StsR in der exponentiellen, stationären (48 h) und *outgrowth* Phase. Die weißen Balken entsprechen einer Länge von 5 μ m (modifiziert nach Grützner *et al.*, 2021b).

In der exponentiellen Wachstumsphase weisen sowohl der *R. sphaeroides* Wildtyp als auch die Δ StsR-Deletionsmutante eine ähnliche Zellmorphologie und -länge von ungefähr 2,0-2,4 μ m auf. Die Zellen sind elongiert und zeigen typische Charakteristika sich teilender und wachsender Zellen (Westfall & Levin, 2017). Diese ähnliche Zellmorphologie von Wildtyp und Deletionsstamm in der exponentiellen Phase (Abbildung 12) spiegelt sich auch in den Wachstumskurven (Abbildung 11A) und der

Überlebensrate (Abbildung 11B, 4,5 h) wider, in der sich beide *R. sphaeroides* Stämme gleich verhalten. In der stationären Phase nach 48 Stunden unter gleichbleibenden Bedingungen verändert sich die Zellmorphologie sowohl beim Wildtyp als auch bei der Mutante (Abbildung 12). Die Zellen werden kleiner und abgerundeter, was auch in früheren Untersuchungen zur Zellmorphologie in der stationären Phase beobachtet wurde (Nyström, 2004). Werden die Zellen nach 48 Stunden mit frischem Medium versetzt und das Wachstum für 3 Stunden unter gleichbleibenden Bedingungen fortgesetzt, so ist eine deutliche Änderung der Zellmorphologie und Zelllänge in den mikroskopischen Aufnahmen erkennbar (Abbildung 12, *outgrowth*). Während der Wildtyp eine Zelllänge (1,5-1,6 μm) und Morphologie wie in der stationären Phase aufweist, so zeigt die Deletionmutante eine Zelllänge ähnlich der in der exponentiellen Phase (2,4-2,6 μm). Die Beobachtung, dass die Deletion der sRNA nach 3 Stunden im *outgrowth* eine verlängerte Zellmorphologie und maßgebliche Charakteristika einer sich teilenden Zellpopulation aufweist, passt zu den Ergebnissen der Wachstumskurven und der Überlebensraten (Abbildung 11 A und B). Die Ergebnisse implizieren dementsprechend einen Effekt der kleinen RNA StsR auf die Regulation der Zellteilung in stationärer und *outgrowth* Phase.

Neben dem Wachstumsverhalten, der Überlebensraten und der Zellmorphologie wurde zusätzlich die Absorption der Pigment-bindenden untersucht. Da in *R. sphaeroides* alle Zellpigmente an Pigment-bindenden Proteinen gekoppelt sind, gibt die Messung der Gesamt-Zellspektren einen Einblick in die Bildung der Photosynthesekomplexe.

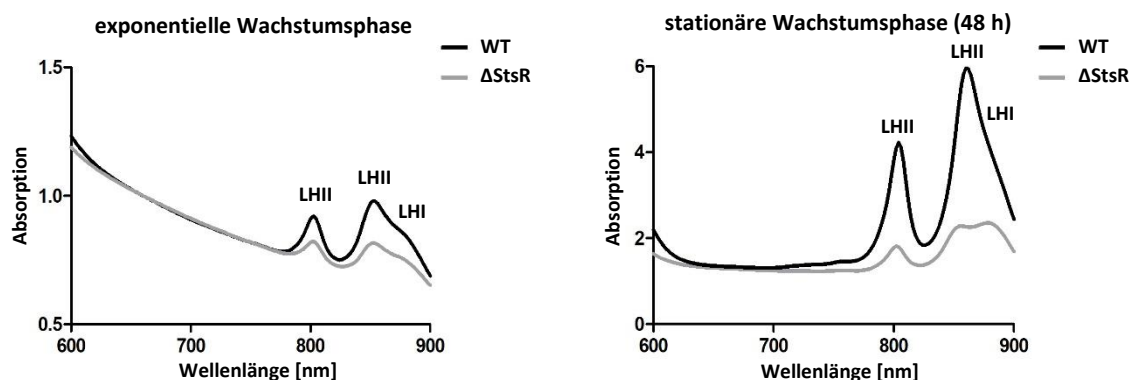


Abbildung 13: Einfluss der sRNA StsR auf die Bildung der Photosynthesekomplexe. Für die Messung der Gesamt-Zellspektren wurden *R. sphaeroides* Wildtyp (schwarz) und *R. sphaeroides* ΔStsR -Mutante (grau) über Nacht unter aeroben und am darauffolgenden Tag unter mikroaeroben Bedingungen kultiviert. Die Absorption wurde anschließend in der exponentiellen (6 h) und stationären (48 h) Phase gemessen. Die Absorptionswerte wurden auf die OD_{660} (als Maß für die Zelldichte) normiert und die gemessenen Absorptionsmaxima den Pigment-bindenden Proteinkomplexen (LHI: Lichtsammelkomplex I; LHII: Lichtsammelkomplex II) zugeordnet (modifiziert nach Eisenhardt *et al.*, 2021).

Für die Bestimmung der Absorption der Pigment-bindenden Proteine wurden Wildtyp und ΔStsR -Mutante über Nacht unter aeroben Bedingungen kultiviert. Die Sauerstoffkonzentration betrug dabei 5-6 mg/l in der Kultur, weshalb die Expression der Gene für die Ausbildung des Photosyntheseapparates inhibiert wird. Am darauffolgenden Tag wurden die Kulturen in mikroaerobe

Wachstumsbedingungen überführt, sodass der Sauerstoffgehalt auf 0,5-1 mg/l gesenkt wurde. Dies führt dazu, dass die Expression der Gene für die Ausbildung des Photosyntheseapparates induziert wird und *R. sphaeroides* seine dunkelrote Färbung annimmt. Somit kann man durch Veränderung der Sauerstoffkonzentration die Ausbildung des Photosyntheseapparates anhand der Messung der Absorptionsspektren verfolgen. Die Kulturen wurden anschließend für 6 Stunden (exponentielle Phase) bzw. 48 Stunden (stationäre Phase) unter mikroaeroben Bedingungen inkubiert. Die Messung der Gesamt-Zellspektren zeigte für den *R. sphaeroides* Wildtyp charakteristische Absorptionen des Lichtsammelkomplexes II (LHII) mit spezifischen Absorptionsmaxima von 800 nm und 855 nm. Außerdem war ein definiertes Absorptionsmaximum für den Lichtsammelkomplex I (LHI) bei einer Wellenlänge von 875 nm erkennbar. Die Deletion der sRNA (Δ StsR) korrelierte hingegen bei der Messung des Gesamt-Zellspektrums sowohl in der exponentiellen als auch in der stationären Phase mit einer Verringerung der Absorption für die Lichtsammelkomplexe II (LHII) und I (LHI). Jedoch kann anhand eines einfachen Zellspektrums keine Aussage getroffen werden, ob es sich dabei um einen direkten (*antisense*) Effekt der sRNA StsR auf die Gene zur Ausbildung der Lichtsammelkomplexe handelt oder ob der beobachtete Effekt indirekter Natur ist.

Um die sRNA StsR und deren Expression näher zu charakterisieren, wurde der Genlokus dieser sRNA in ausgewählten Mitgliedern der *Rhodobacteraceae*-Familie bioinformatisch analysiert. Dabei zeigte sich, dass die Gene für die sRNA StsR in allen untersuchten Stämmen einen Rho-unabhängigen Terminator am 3' Ende kodieren. Jedoch konnten nur bei *R. sphaeroides*, *R. capsulatus* und *Jannaschia sp.* CCS1 RpoHI/II-abhängige Promotor-Konsensussequenzen für die -35 (TTG) und -10 (CCATGT) Region identifiziert werden (Abbildung Anhang 1). Um die Expression der sRNA StsR auf die alternativen σ -Faktoren RpoHI/II zurückführen zu können und sie damit als eine Stress- und Wachstumsphasen-abhängig exprimierte sRNA zu identifizieren, wurden Northern Blot-Analysen mit dem *R. sphaeroides* Wildtyp und entsprechenden RpoHI (Δ *rpoHI*), RpoHII (Δ *rpoHII*) oder RpoHI/II (Δ *rpoHI/II*) Deletionsstämmen durchgeführt. Die Bakterienkulturen wurden dafür entweder unter Singulett-Sauerstoffstress ($^1\text{O}_2$) oder Hitzestress (42 °C) kultiviert und die Gesamt-RNA isoliert. Die anschließenden Northern Blot-Analysen zeigten, dass StsR im *R. sphaeroides* Wildtyp ohne Stress nicht exprimiert wird (t=0) und ihre Abundanz sowohl unter Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) als auch unter Hitzestress nach 30 und 60 Minuten zunimmt (Abbildung 14 A). Im Fall der Deletion von *rpoHI* (Δ *rpoHI*) wird StsR nur unter Singulett-Sauerstoffstress exprimiert. RpoHI ist ein alternativer σ -Faktor, der hauptsächlich unter Hitzestress aktiviert wird (Abbildung 14 B; Nuss *et al.*, 2009; Nuss *et al.*, 2010). Im Fall der Deletion von *rpoHII* (Δ *rpoHII*) wird StsR unter Singulett-Sauerstoffstress schwächer exprimiert als im Wildtyp, d.h. RpoHI kann hier nur eine partielle StsR-Expression gewährleisten (Abbildung 14 B). RpoHII ist ein alternativer σ -Faktor, der über das RpoE-Regulon aktiviert wird (Nuss *et al.*, 2009; Nuss *et al.*, 2010). Singulett-Sauerstoffstress führt in *R. sphaeroides* zur Dissoziation bzw. zum proteolytischen Abbau des Anti- σ -Faktors ChrR von RpoE (alternativer σ -Faktor) und zur Expression des RpoE-abhängigen Regulons (Abbildung 14 B), zu dem auch *rpoHII* gehört. Da jedoch die Regulons von RpoHI und RpoHII überlappen, wurde auch eine Deletion beider alternativer σ -Faktoren, *rpoHI* und *rpoHII* (Δ *rpoHI/II*), getestet. In der Doppelmutante wird StsR weder unter Singulett-Sauerstoff noch

unter Hitzestress exprimiert (Abbildung 14 A), was die strikte Abhängigkeit der StsR-Expression von RpoHI/II dokumentiert.

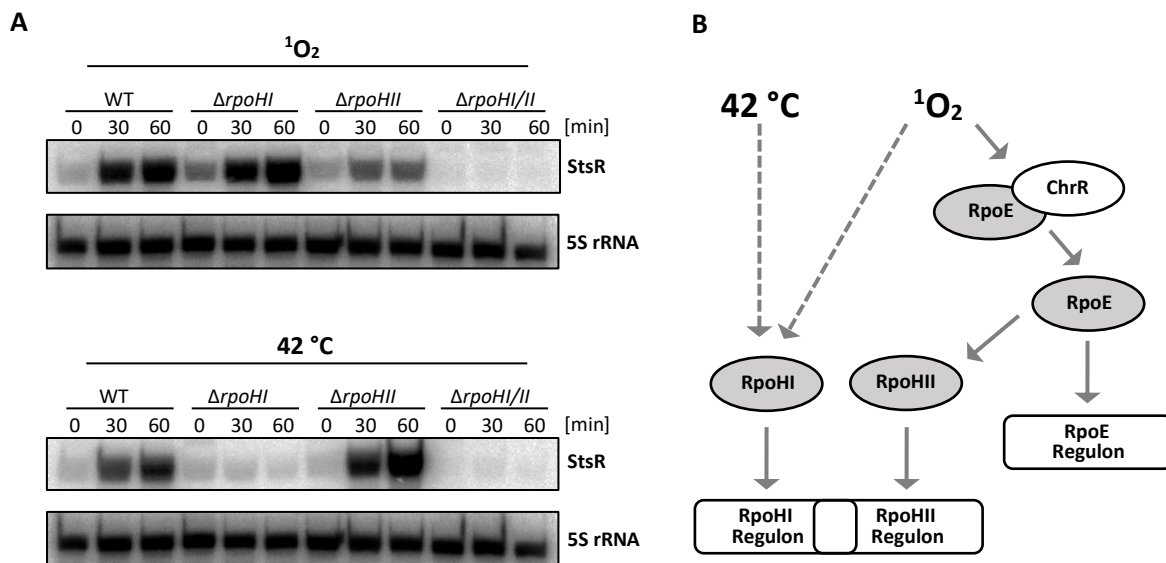


Abbildung 14: RpoHI/RpoHII-abhängige Expression der sRNA StsR. (A) Northern Blot-Analyse zur Visualisierung der RpoHI/RpoHII-abhängigen Expression der sRNA StsR. Nach Entnahme der 0 min-Proben (ohne Stress) wurden die Kulturen durch Zugabe von $0,2 \mu\text{M}$ Methylblau und Erzeugung von 800 W/m^2 Weißlicht Singulett-Sauerstoffstress ($^1\text{O}_2$) bzw. durch eine Temperaturerhöhung (Hitzestress, 42°C) unter Stress gesetzt. $7,5 \mu\text{g}$ Gesamt-RNA wurden auf einem 10 %igen denaturierenden TBE-Polyacrylamid-Harnstoffgel aufgetrennt und die sRNA StsR über ein sequenzspezifisches, radioaktiv markiertes Oligonukleotid nachgewiesen. Die 5S rRNA diente als Ladekontrolle. (B) Schematische Darstellung der Aktivierung der alternativen σ -Faktoren RpoE und RpoHI/RpoHII bei Hitze (42°C) und photooxidativen ($^1\text{O}_2$) Stress. Hitze führt zur Aktivierung des alternativen σ -Faktors RpoHI. Singulett-Sauerstoff führt zum proteolytischen Abbau des Anti- σ -Faktors ChrR und dadurch zur Aktivierung von RpoE. Aktives RpoE induziert die Expression seines Regulons, zu dem unter anderem auch der alternative σ -Faktor RpoHII gehört (modifiziert nach Glaeser *et al.*, 2011; Grützner *et al.*, 2021b).

Die Ergebnisse in diesem Abschnitt zeigen, dass die sRNA StsR Stress-abhängig exprimiert wird und Teil des RpoHI/II-Regulons in *R. sphaeroides* ist. Außerdem lässt sich anhand der Wachstumskurven, der Überlebensraten und der Zellmorphologie eine Verbindung zwischen der sRNA StsR und der Regulation des Zellwachstum bzw. der Zellteilung von *R. sphaeroides* vermuten.

3.1.2 Untersuchungen zur Interaktion zwischen den sRNAs StsR und UpsM

Die Identifizierung möglicher Interaktionspartner einer *trans*-kodierten sRNA gestaltet sich, wie auch im Fall der sRNA StsR, als schwierig, da nur sehr begrenzte Komplementaritäten zu möglichen Ziel-RNAs zu erwarten sind (Massé *et al.*, 2003; Sittka *et al.*, 2008). Da StsR auf Grundlage der Ergebnisse aus der phänotypischen Charakterisierung (3.1.1) einen Einfluss auf die Zellteilung von *R. sphaeroides* hat und erste dementsprechende Indizien bereits in der Dissertation von Dr. Lennart Weber erkennbar waren, wurde die mögliche Interaktion mit einer RNA aus dem *dcw* Gencluster untersucht.

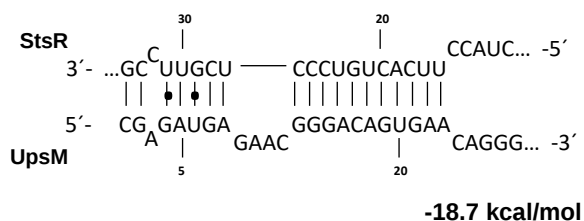


Abbildung 15: Interaktionsbereiche zwischen StsR und UpsM. Der vorhergesagte Interaktionsbereich von StsR liegt am 5' Ende von UpsM (Positionen 1-23). Der Interaktionsbereich und die freie Hybridisierungsenergie wurden mit dem Web-basierten Programm IntaRNA (Mann *et al.*, 2017) vorhergesagt.

Bioinformatische Analysen zur Interaktion von StsR mit dem *dcw* Gencluster unter Verwendung des Programms IntaRNA (Mann *et al.* 2017) deuteten auf eine mögliche Bindung von StsR an die sRNA UpsM (Weber *et al.*, 2016). Wie schon in Abschnitt 3.1 beschrieben, ist UpsM eine weitere sRNA in *R. sphaeroides*, die in der exponentiellen Wachstumsphase am abundantesten ist (Berghoff *et al.*, 2011). Bioinformatisch wurde eine Hybridisierungsenergie von -18,7 kcal/mol (Abbildung 15) für die Interaktion beider sRNAs vorhergesagt, wobei StsR mit dem 5' Ende von UpsM (Nukleotide 1-23) basenpaart (Abbildung 15).

Wie aus verschiedenen Publikationen bekannt führt die Bindung einer *trans*-kodierten sRNA an ihre Ziel-RNA in den meisten Fällen zu einer über die eigentliche Basenpaarung hinausgehenden Strukturänderung in der Ziel-RNA, die die Rekrutierung von RNase E sowie die Prozessierung bzw. Degradation der Ziel-RNA zur Folge hat (Gottesman, 2005; Prévost *et al.*, 2011). In Weber *et al.* 2016 konnte gezeigt werden, dass das 206 nt lange Primärtranskript der sRNA UpsM unter verschiedenen Stress- und Wachstumsbedingungen durch RNase E gespalten wird, wodurch ein 130 nt langes 3' Fragment entsteht. Da die Prozessierung bzw. Degradation der Ziel-RNA ein typischer Mechanismus einer *trans*-kodierten sRNA ist, wurde mittels Northern Blot-Analysen die Prozessierung der Ziel-RNA UpsM in Abhängigkeit von der Expression der *trans*-kodierten sRNA StsR untersucht. Dafür wurde der *R. sphaeroides* Wildtyp unter mikroaeroben Bedingungen kultiviert und für 90 min mit verschiedenen Chemikalien, die Salzstress oder oxidativen Stress auslösen, inkubiert (Abbildung 16 A links). Zusätzlich wurden *R. sphaeroides* Wildtyp-Zellen in verschiedenen Wachstumsphasen (Abbildung 16 A, Mitte) und unter verschiedenen Wachstumsbedingungen (Abbildung 16 A, rechts) kultiviert. Anschließend wurde Gesamt-RNA aus den Zellen isoliert und für Northern Blot-Analysen auf eine Nylon-Membran übertragen. Die sRNAs StsR und UpsM (206 nt), sowie das UpsM-Prozessierungsprodukt (130 nt)

wurden mittels spezifischer, radioaktiv markierter Oligonukleotidsonden auf der Membran nachgewiesen.

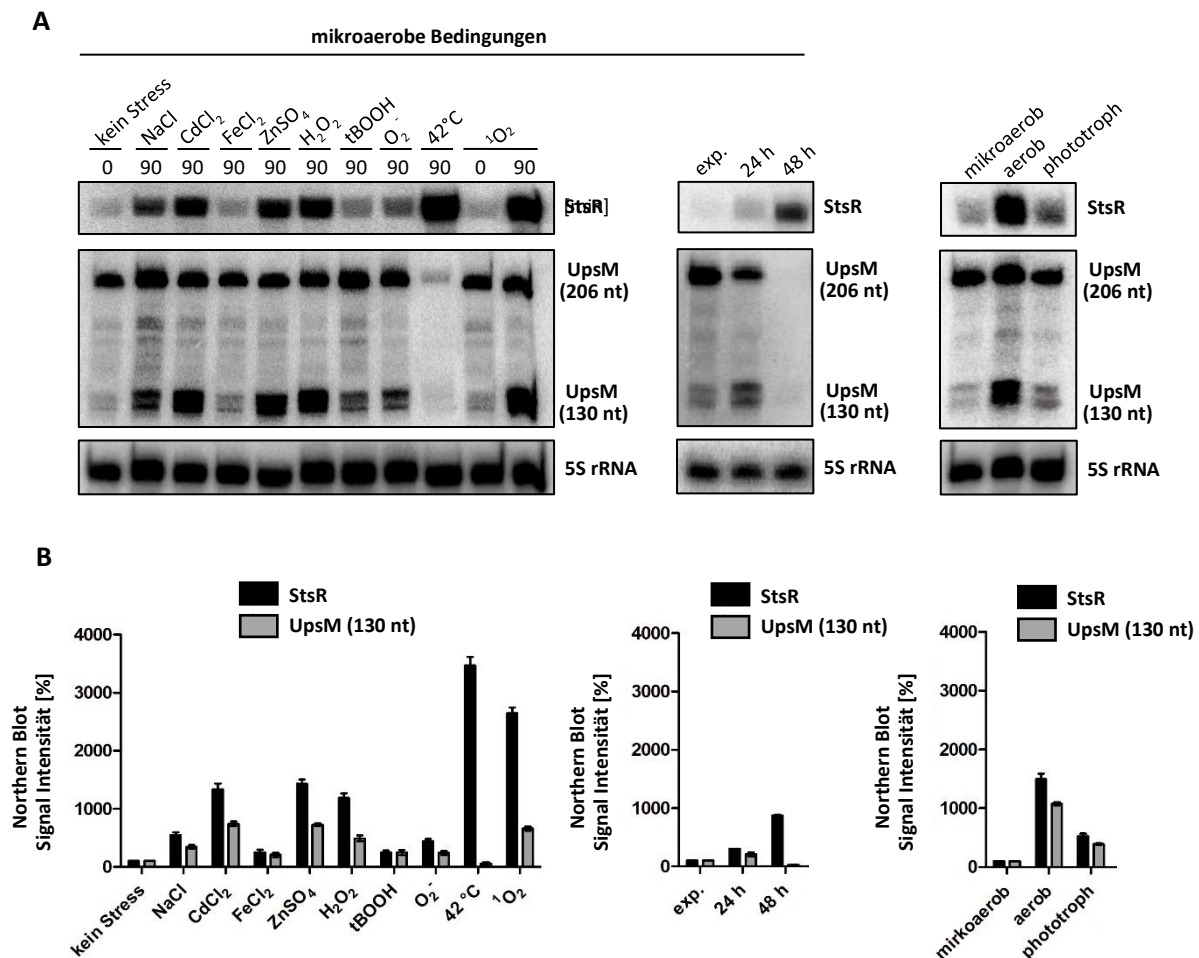


Abbildung 16: StsR-abhängige Prozessierung von UpsM unter verschiedenen Bedingungen. (A) Northern Blot-Analyse zur Visualisierung der StsR-abhängigen Prozessierung von UpsM unter verschiedenen Stress- und Wachstumsbedingungen. *R. sphaeroides* Wildtyp-Zellen wurden entweder in der exponentiellen Phase für 90 min unter mikroaeroben Bedingungen und in Gegenwart verschiedener Stressfaktoren (250 mM NaCl, 10 μ M CdCl₂, 100 μ M FeCl₂, 100 μ M ZnSO₄, 1 mM H₂O₂, 300 μ M tBOOH und 250 μ M Paraquat (O₂⁻) oder 42 °C inkubiert (linker Abbildungsteil), oder vergleichend in der exponentiellen Phase (6 h), nach 24 bzw. 48 h (mittlerer Abbildungsteil) bzw. unter mikroaeroben (6 h), aeroben (6 h) und phototrophen (6 h) Bedingungen (rechter Abbildungsteil) analysiert. 7,5 μ g Gesamt-RNA wurden auf einem 10 %igen denaturierenden TBE-Polyacrylamid-Harnstoffgel aufgetrennt. Die sRNAs StsR und UpsM (206 nt) sowie das UpsM-Prozessierungsprodukt (130 nt) wurden mittels spezifischer, radioaktiv markierter Oligonukleotid-Sonden nachgewiesen. 5S rRNA diente als Ladekontrolle. (B) Vergleich der relativen Signalstärke von StsR sowie des UpsM-Prozessierungsprodukts (130 nt). Die Signalintensität in Abwesenheit von Stress bzw. in der exponentiellen Phase wurde auf 100 % gesetzt, die Signalintensitäten von StsR und UpsM (130 nt) unter den jeweiligen Bedingungen wurde darauf bezogen. Die Balken zeigen den Mittelwert und die Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten (modifiziert nach Grützner *et al.*, 2021b).

Die Northern Blot-Analyse zeigt in Abwesenheit zellulären Stresses (t=0) keine Anreicherung des UpsM-Prozessierungsprodukts (130 nt), während Eisenchlorid (FeCl₂), Hydroperoxid (tBOOH) und Superoxid (O₂⁻) eine leichte und Natriumchlorid (NaCl), Cadmiumchlorid (CdCl₂), Zinksulfat (ZnSO₄), Wasserstoffperoxid (H₂O₂) und Singulett-Sauerstoff (¹O₂) eine starke Anreicherung des

Prozessierungsprodukts verursachen (Abbildung 16 A links). Die Prozessierung des UpsM-Primärtranskripts korreliert dabei mit der Abundanz der sRNA StsR. Je stärker die sRNA StsR unter der jeweiligen Stressbedingung exprimiert wird, desto stärker ist das Prozessierungsfragment von UpsM (130 nt) im Northern Blot nachweisbar. Diese Ergebnisse werden zusätzlich durch die Quantifizierung der StsR-Expression und UpsM-Prozessierung bestätigt (Abbildung 16 B, links). Die Prozessierung von UpsM unter Hitzestress (42 °C) stellt jedoch eine Ausnahme dar. Obwohl StsR bei 42 °C am stärksten exprimiert wird, ist weder das Primärtranskript (206 nt) noch das Prozessierungsfragment (130 nt) von UpsM deutlich nachweisbar. Dies wurde schon in der Dissertation von Dr. Lennart Weber beobachtet und liegt womöglich an einer temperaturbedingten erhöhten RNase-Aktivität oder Destabilisierung der UpsM-Struktur. Beim Übergang von der exponentiellen zur stationären Wachstumsphase, der für die Zellen auch eine Art von Stress aufgrund verknappter Nährstoffquellen und Anreicherung von Sekundärmetaboliten darstellt, ist ebenfalls eine Korrelation zwischen der Expression von StsR und der Prozessierung von UpsM erkennbar (Abbildung 16 A und B, Mitte, 24 h). Das nach 48 Stunden jedoch weder das UpsM-Primärtranskript noch das Prozessierungsfragment nachweisbar ist, zeigt eine starke Abhängigkeit der UpsM-Prozessierung von der sRNA StsR in der stationären Phase und wird im Abschnitt 3.1.4 näher beschrieben. Unter aeroben und phototrophen Wachstumsbedingungen ist ebenfalls ein erhöhter StsR-Spiegel mit einer Anreicherung des UpsM-Prozessierungsprodukts korreliert (Abb. 16 A und B, rechte Abbildungsteile). Dabei sind die Expression von StsR und die Prozessierung von UpsM unter aeroben Bedingungen am stärksten ausgeprägt. Unter diesen Bedingungen stellt *R. sphaeroides* den Stoffwechsel auf eine aerobe Atmung um, wodurch sich die Gefahr der Entstehung von ROS erhöht, die die Zelle schädigen und daher die Aktivierung verschiedener Schutzmechanismen erfordert. Wie in dem Northern Blot in Abbildung 16A (links) gezeigt, führen auch ROS zu einer verstärkten Expression von StsR und Anreicherung des UpsM-Prozessierungsprodukts.

In den Northern Blot-Analysen der Abbildung 16 ist auffällig, dass trotz starker Akkumulation des Prozessierungsprodukts von UpsM (130 nt) keine deutliche Abnahme des Primärtranskripts (206 nt) erkennbar ist. In den meisten Fällen einer sRNA-abhängigen Prozessierung ist auch eine Verringerung der Ziel-RNA sichtbar. Dies scheint bei UpsM jedoch teilweise nicht der Fall zu sein. Um zu klären, was diesem Effekt zugrundeliegt, wurde die Aktivität des konstitutiven UpsM-Promotors mit einer transkriptioneller Fusion an das Gen für das Fluoreszenzprotein mVenus unter verschiedenen Stressbedingungen untersucht (Abbildung 17).

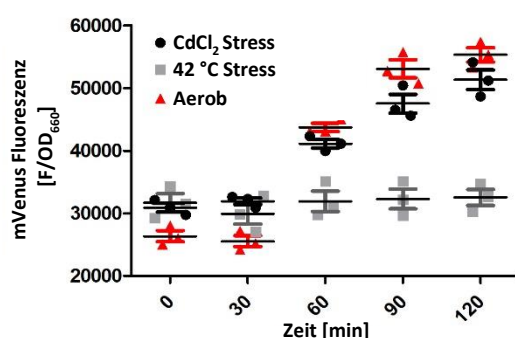


Abbildung 17: Promotoraktivität von UpsM unter ausgewählten Bedingungen. Die Promotorregion von UpsM wurde in dem Vektor pPHU281 mit dem Gen für das Fluoreszenzprotein mVenus fusioniert. Die Promotoraktivität wurde anschließend exemplarisch unter CdCl₂-Stress, Hitzestress und unter aeroben Bedingungen mittels Fluoreszenzmessung (Anregungswellenlänge 515 nm; Emissionswellenlänge 548 nm) ermittelt. Die Fluoreszenz wurde dabei auf die optische Dichte bei 660 nm normalisiert (modifiziert nach Grützner *et al.*, 2021b).

Die Fluoreszenzmessungen zeigen dabei, dass die Promotoraktivität unter verschiedenen Stressbedingungen ansteigt. Eine verstärkte Promotoraktivität würde erklären, weshalb trotz Prozessierung das Level des Primärtranskripts (206 nt) gleichbleibt oder sich nur geringfügig ändert. Gleichzeitig ist erkennbar, dass die Promotoraktivität von UpsM unter Hitzestress (42 °C) nicht ansteigt. Dies könnte auch das verringerte Signal von UpsM (206 nt) bei 42 °C in der Northern Blot-Analyse in Abbildung 16 A (links) erklären. Der genaue Grund für eine verstärkte bzw. gleichbleibende Promotoraktivität wurde in dieser Arbeit nicht weiter untersucht.

Um den direkten Zusammenhang von UpsM-Prozessierung und Abundanz der sRNA StsR zu bestätigen, wurde der Expressions- und Prozessierungsverlauf beider sRNAs unter Singulett-Sauerstoffstress ($^1\text{O}_2$) im *R. sphaeroides* Wildtyp und der ΔStsR -Mutante vergleichend analysiert (Abbildung 18). Nach Entnahme von Zellkultur-Proben zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die Gesamt-RNA aus den Zellproben isoliert und für die Northern Blot-Analyse auf eine Membran übertragen. Die entsprechenden sRNAs wurden mit radioaktiv markierten Oligonukleotid-Sonden hybridisiert und anschließend durch *phosphorimaging* nachgewiesen.

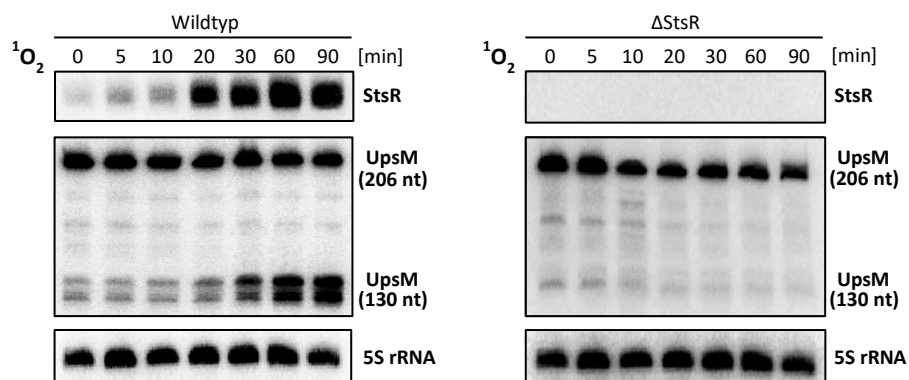


Abbildung 18: Expression von StsR und Prozessierung von UpsM über die Zeit unter Singulett-Sauerstoffstress ($^1\text{O}_2$). Northern Blot-Analyse von *R. sphaeroides* Wildtyp und ΔStsR -Mutante unter Singulett-Sauerstoffstress ($^1\text{O}_2$). Nach Entnahme der 0' Proben wurden in den Kulturen durch Zugabe von 0,2 μM Methylenblau und Bestrahlung mit Weißlicht (800 W/m²) Singulett-Sauerstoffstress ($^1\text{O}_2$) induziert. Anschließend wurden Zellkultur-Proben zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen und die Gesamt-RNA aus diesen Proben isoliert. 7,5 μg der Gesamt-RNA wurden in einem 10 %igen denaturierenden TBE-Polyacrylamid-Harnstoffgel aufgetrennt. Die sRNAs StsR und UpsM (206 nt) sowie das UpsM-Prozessierungsprodukt (130 nt) wurden mittels spezifischer, radioaktiv markierter Oligonukleotid-Sonden nachgewiesen. 5S rRNA diente als Ladekontrolle (modifiziert nach Grützner *et al.*, 2021b).

In der Northern Blot-Analyse ist für den Wildtyp über die 90-minütige Inkubationszeit eine steigende Expression der sRNA StsR sowie eine zeitlich etwas versetzte Akkumulation des UpsM-Prozessierungsfragments erkennbar (Abbildung 18 links). In der Deletionmutante (ΔStsR) ist hingegen keine Expression von StsR und keine Prozessierung von UpsM erkennbar (Abbildung 18 rechts). Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass die UpsM RNA StsR-abhängig prozessiert wird.

Um die StsR-abhängige Prozessierung von UpsM auf eine Bindung zwischen beiden sRNAs zurückführen zu können, wurden Konstrukte zur Plasmid-basierten Überexpression von StsR-Varianten unter Kontrolle des nativen StsR-Promotors hergestellt. Dafür wurde zum einen die gesamte Sequenz von StsR (72 nt) und zum anderen nur 28 nt, die die Bindungsregion für UpsM beinhalten (Abbildung 19 A oben), in den Vektor pBBRMCS-2 kloniert. Außerdem wurde ein Plasmid-Derivat hergestellt, bei dem die StsR-Sequenz an vier Nukleotiden in der vermuteten Bindungsregion zu UpsM mutiert ist (Abbildung 19 A unten). Die genannten Plasmide wurden in den Δ StsR-Stamm konjugiert und die resultierenden Derivat-Stämme mit den entsprechenden Kontrollstämmen (Wildtyp, Δ StsR und Δ StsR pBBR) unter Singulett-Sauerstoffstress ($^1\text{O}_2$) inkubiert. Die Gesamt-RNA wurde über das Verfahren der Phenol-Extraktion isoliert und mittels Northern Blot analysiert (Abbildung 19 B).

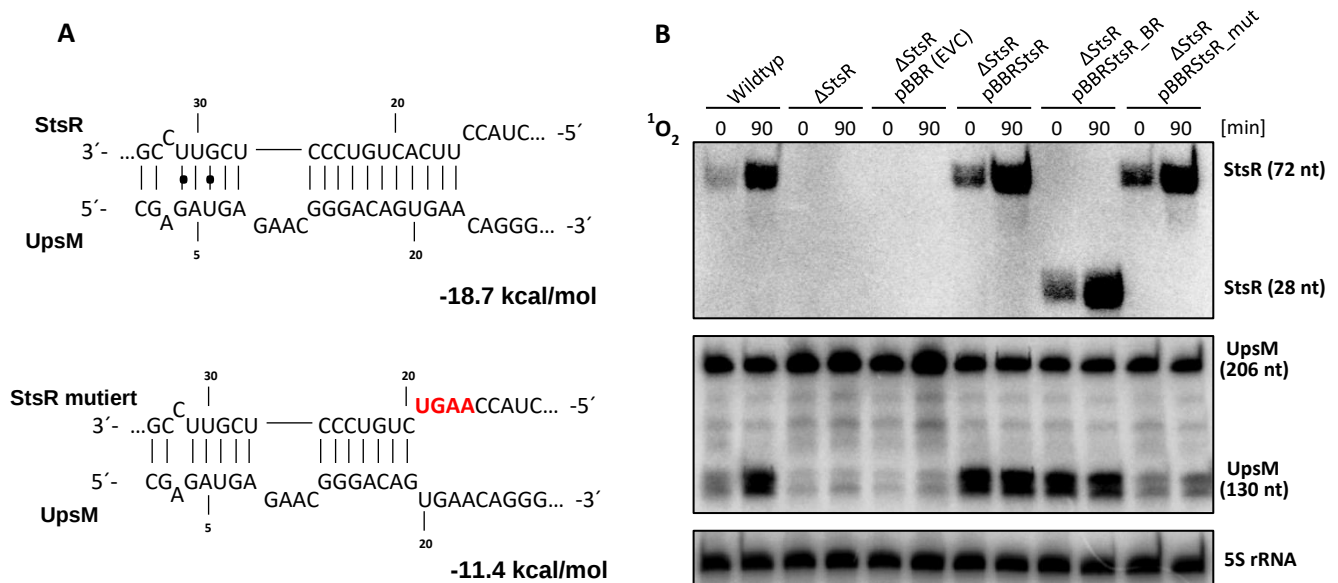


Abbildung 19: StsR-abhängige Prozessierung von UpsM. (A) Der vorhergesagte Interaktionsbereich zwischen StsR und UpsM RNA ist im oberen Teil dargestellt. Darunter ist der Interaktionsbereich für eine StsR-Mutante gezeigt, bei der vier Nukleotide (rot dargestellt) in diesem Bereich mutiert sind. Der Interaktionsbereich und die freie Hybridisierungsenergie wurden mit dem Web-basierten Programm IntaRNA (Mann *et al.*, 2017) vorhergesagt. (B) Northern Blot-Analyse zur StsR-abhängigen Prozessierung von UpsM. Die Stämme *R. sphaeroides* Wildtyp, Δ StsR und Δ StsR mit einer Leervektorkontrolle (EVC; pBBR) wurden als Kontrollen verwendet. Außerdem wurden die Stämme Δ StsR pBBRStsR (Überexpression der Vollängen StsR RNA [72 nt] vom Plasmid pBBR_MCS2), Δ StsR pBBRStsR_BR (Überexpression der 28 nt langen UpsM-Bindungsregion von StsR; siehe Abbildung 19 A oben) und Δ StsR pBBRStsR_mut (Überexpression der StsR-Mutante, gezeigt in Abbildung 19 A unten) in die Untersuchung einbezogen. Die genannten Stämme wurden mit (90 min) und ohne (0 min) Singulett-Sauerstoffstress ($^1\text{O}_2$) inkubiert. Jeweils 7,5 μg Gesamt-RNA wurden auf einem 10 %igen denaturierenden TBE-Polyacrylamid-Harnstoffgel aufgetrennt. Die sRNAs StsR und UpsM (206 nt) sowie das UpsM-Prozessierungsprodukt (130 nt) wurden mittels spezifischer radioaktiver Sonden nachgewiesen. 5S rRNA diente als Ladekontrolle (modifiziert nach Grützner *et al.*, 2021b).

Die Überexpression der Vollängen StsR RNA (pBBRStsR) im Δ StsR-Stamm zeigt im Gegensatz zu den StsR-Deletionsstämmen [Δ StsR und Δ StsR pBBR (EVC)] ohne (0 min) Singulett-Sauerstoffstress ($^1\text{O}_2$) eine Prozessierung von UpsM, die durch Singulett-Sauerstoffstress ($^1\text{O}_2$; 90 min) verstärkt wird. Eine deutliche Akkumulation des 3' Prozessierungsprodukts von UpsM (130 nt) ist im Northern Blot auch detektierbar, wenn nur die 28 nt lange UpsM-Bindungsregion (Abbildung 19 A oben) von StsR

überexprimiert wird (Abbildung 19 B). Wird hingegen die mutierte StsR RNA im Δ StsR-Stamm überexprimiert, die eine Mutation von vier Nukleotiden in der UpsM-Bindungsregion besitzt (pBBRStsR_mut; Abbildung 19 A unten), so ist die Akkumulation des 3' Prozessierungsprodukts von UpsM im Vergleich zum Stamm Δ StsR pBBRStsR Stamm deutlich reduziert (Abbildung 19 B). Dieser Unterschied lässt sich auf eine verringerte Bindung oder instabilere Komplexbildung zwischen beiden sRNAs zurückzuführen, wenn die Basenpaarung durch die 4 Mutationen geschwächt wird. Dies korreliert mit der geringeren freien Energie (-11,4 statt -18,7 kcal/mol), die vom Programm IntaRNA (Mann *et al.*, 2017) für die Interaktion der mutierten StsR RNA mit UpsM vorhergesagt wird. Die Ergebnisse der Abbildung 19 unterstützen die Annahme, dass die sRNA StsR mit UpsM basenpaart und daher ursächlich die Prozessierung von UpsM induziert. Das Ergebnis macht einen kausalen Zusammenhang zwischen der Expression von StsR und der Prozessierung von UpsM *in vivo* wahrscheinlich. Um die direkte Interaktion von StsR zu UpsM auf molekularer Ebene zu verstehen und die dabei beteiligten Faktoren näher zu bestimmen, wurden zusätzliche *in vitro* Experimente wie z.B. *electrophoretic mobility shift assays* (EMSAs), Degradations-Experimente und Strukturanalysen (*structure probing*) durchgeführt. Diese Ergebnisse sind im Abschnitt 3.1.3 genauer beschrieben.

Wie in Berghoff *et al.* 2011 beschrieben ist, ist UpsM eine Hfq-abhängige sRNA, die in der exponentiellen Wachstumsphase 60 % aller Hfq-gebundenen RNAs in *R. sphaeroides* ausmacht (Berghoff *et al.*, 2011). Hfq ist ein hexameres RNA-Bindeprotein, das als RNA-Chaperon fungiert (Aiba, 2007; Quendera *et al.*, 2020). Dabei begünstigt Hfq oft die Duplexbildung bei begrenzter Basen-Komplementarität zwischen einer *trans*-kodierte sRNA und ihrer Ziel-RNA (Papenfert & Vogel, 2009). Außerdem kann Hfq sRNAs vor einem ribonukleolytischen Abbau schützen, oder in anderen Fällen die RNase E-abhängige Degradation einer sRNA-mRNA Duplex fördern (Prévost *et al.*, 2011).

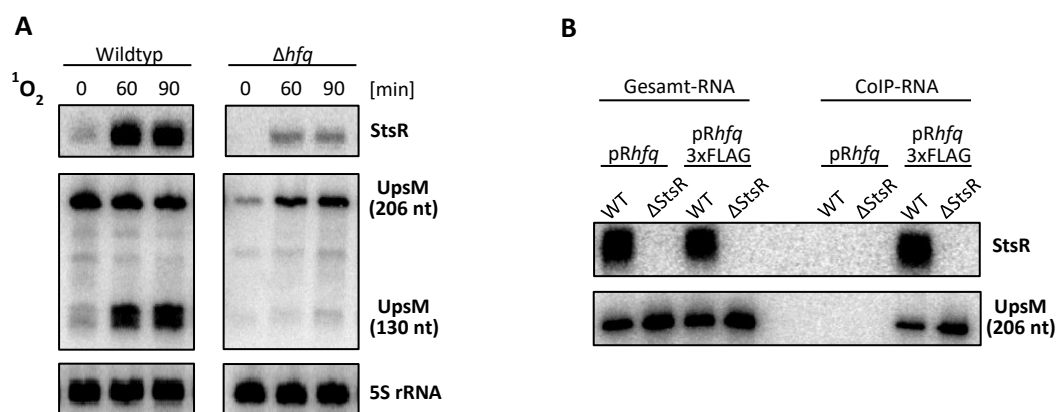


Abbildung 20: Die Interaktion von StsR und UpsM ist abhängig von dem RNA-Chaperon Hfq. (A) Northern Blot-Analyse zur Hfq-Abhängigkeit der Interaktion der sRNAs StsR und UpsM. *R. sphaeroides* Wildtyp und Δ hfq-Mutante wurden in Abwesenheit (0 min) bzw. für 60 oder 90 min in Gegenwart von Singulett-Sauerstoffstress ($^1\text{O}_2$) inkubiert. Jeweils 7,5 μ g Gesamt-RNA wurden auf einem 10%igen denaturierenden TBE-Polyacrylamid-Harnstoffgel aufgetrennt. Die sRNAs StsR und UpsM (206 nt) sowie das UpsM-Prozessierungsprodukt (130 nt) wurden mittels spezifischer, radioaktiv markierter Oligonukleotid-Sonden nachgewiesen. 5S rRNA diente als Ladekontrolle. (B) Northern Blot-Analyse von StsR und UpsM nach CoIP mit Hfq3xFLAG. Jeweils 7,5 μ g Gesamt-RNA und die gesamte Menge der RNA aus der CoIP wurden auf einem 10%igen denaturierenden TBE-Polyacrylamid-Harnstoffgel aufgetrennt. Die sRNAs StsR und UpsM (206 nt) wurden mittels spezifischer, radioaktiv markierter Oligonukleotid-Sonden nachgewiesen (modifiziert nach Grützner *et al.*, 2021b).

Der skizzierte Kenntnisstand legte nahe, dass die sRNA StsR ebenfalls Hfq-abhängig ist und die Interaktion mit UpsM über das RNA-Chaperon Hfq vermittelt wird. Um dies zu untersuchen, wurden die StsR- und UpsM-Spiegel im *R. sphaeroides* Wildtyp und einer davon abgeleiteten Δhfq -Mutante unter Singulett-Sauerstoffstress (1O_2) analysiert (Abbildung 20 A). Im Wildtyp ist eine starke Anreicherung der sRNAs StsR und UpsM nach 60 bzw. 90 Minuten Singulett-Sauerstoffstress (1O_2) nachweisbar. In der Δhfq -Mutante sind die StsR- und UpsM-Spiegel hingegen deutlich geringer, was für eine Abhängigkeit beider sRNAs von dem RNA-Chaperon Hfq spricht (Abbildung 20 A). Um eine direkte Interaktion zwischen StsR und Hfq nachzuweisen, wurde eine Co-Immunopräzipitation (CoIP) mit Hfq3xFLAG (pRhfq3xFLAG) bzw. mit Hfq ohne 3xFLAG (pRhfq) als Kontrolle unter Singulett-Sauerstoffstress (1O_2) durchgeführt (Abbildung 20 B). Anhand der CoIP konnte gezeigt werden, dass sowohl die sRNA UpsM als auch StsR an Hfq binden. Ob jedoch auch die Interaktion der beiden sRNAs von Hfq vermittelt wird, kann auf Grundlage dieser Daten nicht geklärt werden.

Um die Prozessierung der sRNA UpsM in Abhängigkeit von StsR weiter zu charakterisieren, wurden die Halbwertszeiten des UpsM-Primärtranskripts ermittelt. Die Bestimmung der Halbwertszeit kann entsprechend Aufschluss über die Stabilität einer RNA geben, da nicht nur die Expression, sondern auch der Abbau eine wichtige Rolle im zellulären Funktionszyklus einer RNAs spielt. Zu diesem Zweck wurden der *R. sphaeroides* Wildtyp und die $\Delta StsR$ -Mutante für 90 min Singulett-Sauerstoffstress (1O_2) ausgesetzt, um hohe Spiegel von StsR und UpsM (Primärtranskript und Prozessierungsprodukt) zu induzieren. Anschließend wurde die Transkription durch die Zugabe von Rifampicin gestoppt (Abbildung 21) und Zellkultur-Proben zu ausgewählten Zeitpunkten entnommen. Rifampicin ist ein Antibiotikum, das die Reinitiation der Transkription durch die bakterielle DNA-abhängige RNA-Polymerase inhibiert. Unter diesen Bedingungen werden also keine neuen RNA-Transkripte synthetisiert, sodass die Geschwindigkeit des RNA-Abbaus durch Zell-eigene Ribonukleasen dokumentiert werden kann. Nach der Probenentnahme wurden die Gesamt-RNAs aus den Zellen mit heißem Phenol isoliert und für eine Northern Blot-Analyse verwendet. Die Intensität der Signale von UpsM (206 nt) wurden mittels *phosphorimaging* detektiert, mit dem Programm Quantity One (Bio-Rad) quantifiziert und auf die Signale der 5S rRNA-Ladekontrolle normalisiert. Die normalisierten Werte wurden anschließend halblogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen (Abbildung 21 B) und anhand der Exponentialfunktion der Ausgleichsgerade wurde die Halbwertszeit für UpsM (206 nt) rechnerisch ermittelt.

Die berechneten Halbwertszeiten des UpsM-Primärtranskripts (206 nt) sind für den Wildtyp und die $\Delta StsR$ -Mutante sehr ähnlich. Im Wildtyp beträgt sie $7,4 \pm 0,9$ min und in der $\Delta StsR$ -Mutante $5,9 \pm 0,6$ min.

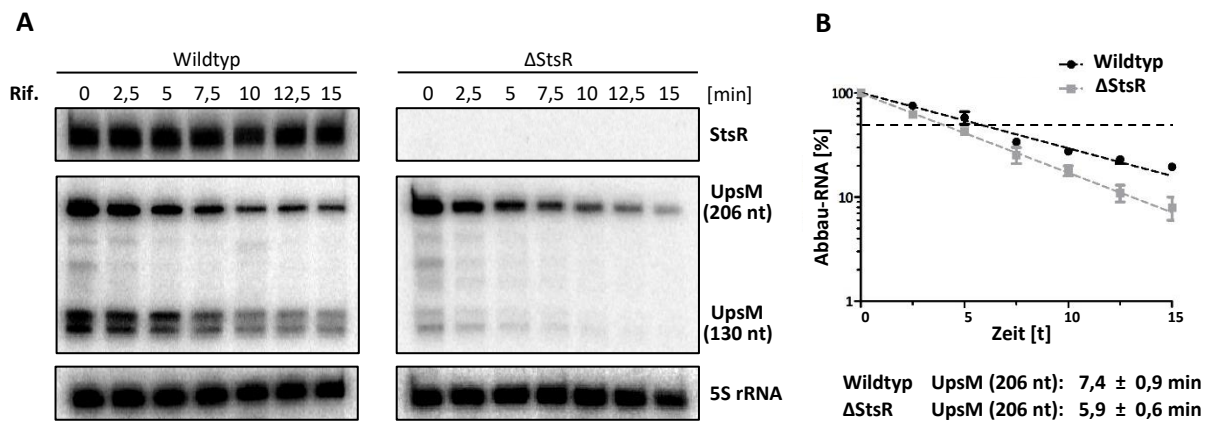


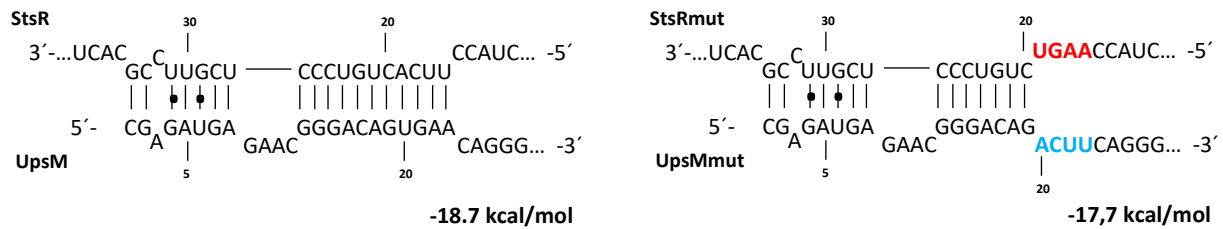
Abbildung 21: Analyse der Halbwertszeit von UpsM in Abhängigkeit von StsR. (A) Northern Blot-Analyse zur Bestimmung der Halbwertszeit von UpsM in Abhängigkeit von StsR. *R. sphaeroides* Wildtyp und ΔStsR-Mutante wurden 90 min unter Singulett-Sauerstoffstress ($^1\text{O}_2$) kultiviert. Die Transkription wurde durch die Zugabe von Rifampicin (Rif.) nach der Entnahme eines Aliquots zum Zeitpunkt $t=0$ gestoppt. Zellkultur-Proben wurden anschließend an ausgewählten Zeitpunkten entnommen. Jeweils 7,5 μg Gesamt-RNA wurden auf einem 10 %igen denaturierenden TBE-Polyacrylamid-Harnstoffgel aufgetrennt. Die sRNAs StsR und UpsM (206 nt) sowie das UpsM-Prozessierungsprodukt (130 nt) wurden mittels spezifischer, radioaktiv markierter Oligonukleotid-Sonden nachgewiesen. 5S rRNA diente als Ladekontrolle. (B) Die prozentuale Abbaurate [%] von UpsM (206 nt) in Kulturen des *R. sphaeroides* Wildtyps und der ΔStsR-Mutante wurde auf der Grundlage biologischer Triplikate bestimmt, auf die Ladekontrolle 5S rRNA normalisiert und halblogarithmisch gegen die Zeit [t] dargestellt. Die Halbwertszeit von UpsM (206 nt) wurde anhand der Exponentialfunktion der Ausgleichsgerade berechnet.

3.1.3 *In vitro* Untersuchungen zur Interaktion der sRNA StsR und UpsM

Auf Grundlage der in Abschnitt 3.1.2 beschriebenen *in vivo* Untersuchungen war eine über das RNA-Chaperon Hfq vermittelte Interaktion der *trans*-kodierten sRNA StsR mit der Ziel-RNA UpsM wahrscheinlich. Das Programm IntaRNA (Mann *et al.*, 2017) sagt eine Basenpaarung von StsR mit dem 5' Ende von UpsM vorher (Abbildung 15). Eine Bindung von StsR am 5' Ende könnte dementsprechend zu einer Strukturveränderung in UpsM führen, wodurch die Prozessierungsstelle für die Endoribonuklease E (RNase E) zugänglich wird und die Prozessierung des UpsM-Primärtranskripts (206 nt) ermöglicht wird. Um diese Hypothese näher zu untersuchen, wurden *in vitro* Experimente wie *electrophoretic mobility shift assays* (EMSAs), Strukturanalysen (*structure probing*) und Degradations-Experiment, durchgeführt. Diese Ergebnisse werden in dem nachfolgenden Abschnitt näher beschrieben.

Um eine direkte Interaktion beider sRNAs auch experimentell nachzuweisen, wurden EMSAs mit unterschiedlichen *in vitro* Transkripten durchgeführt. Der Trenneffekt beruht dabei auf dem Größen- und Struktur-abhängigen Laufverhalten von Molekülen und Molekülkomplexen in einer Gelmatrix. Im Vergleich zu einer ungebundenen bzw. freien Nukleinsäure tritt bei einer Interaktion zweier unterschiedliche Moleküle, in diesem Fall StsR und UpsM, eine Laufverschiebung (*band shift*) auf, d.h. der gebildete Komplex läuft im Gel langsamer als die ungebundenen sRNAs.

A



B

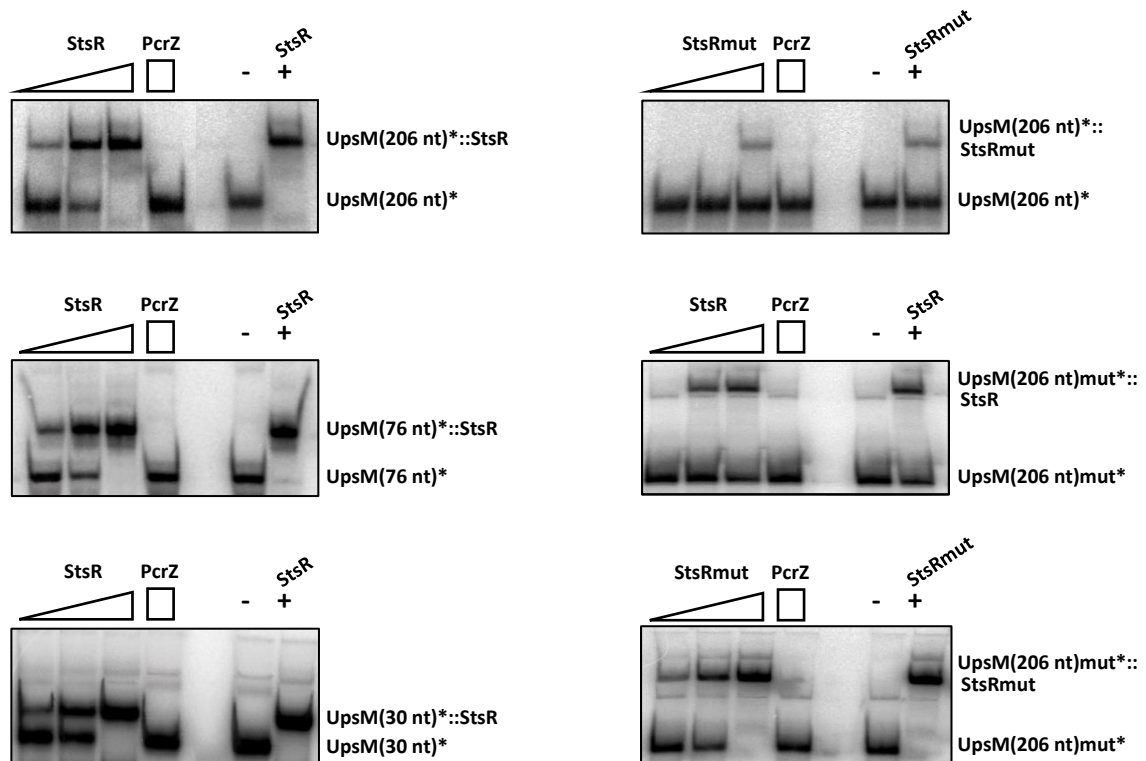


Abbildung 22: Analyse der *in vitro* Interaktion von StsR und UpsM mittels *electrophoretic mobility shift assay* (EMSA). (A) Der vorhergesagte Interaktionsbereich zwischen StsR und UpsM ist links dargestellt. Rechts ist der Interaktionsbereich mit komplementären Mutationen von jeweils vier Nukleotiden in StsR und UpsM (StsR: rot; UpsM: blau) gezeigt. Der Interaktionsbereich und die freie Hybridisierungsenergie wurden mittels IntaRNA (Mann *et al.*, 2017) ermittelt. (B) Auf der linken Seite sind EMSAs mit verschiedenen langen UpsM *in vitro* Transkripten (206 nt*, 76 nt* oder 30 nt*) von oben nach unten abgebildet. Die EMSAs mit dem mutierten StsR *in vitro* Transkript (StsRmut), dem mutierten UpsM *in vitro* Transkript (UpsM(206 nt)mut*) oder beiden mutierten *in vitro* Transkripten sind auf der rechten Seite von oben nach unten dargestellt. Für jeden EMSA wurden die verschiedenen, mit α - 32 P-UTP intern markierten UpsM* (15 nM) *in vitro* Transkripte mit aufsteigenden Konzentrationen nicht radioaktiv markierter sRNA StsR (1:1 [15 nM], 1:10 [150 nM], 1:100 [1,5 μ M]) für 20 min bei 32 °C zwecks Duplexbildung inkubiert. Als Negativ-Kontrolle wurden die jeweiligen Transkripte von UpsM* nur mit H₂O (-) oder mit einem 100-fachen Überschuss der sRNA PcrZ (1,5 μ M) inkubiert. Als Positiv-Kontrolle wurde das jeweilige UpsM* *in vitro* Transkript im Verhältnis 1:100 [1,5 μ M] mit dem jeweiligen StsR *in vitro* Transkript (+) inkubiert, nachdem beide RNAs vorher gemeinsam renaturiert worden waren. Die Auftrennung erfolgte in einem nativen 6 %igen TBE-Polyacrylamidgel und die Detektion mittels *phosphorimaging* (modifiziert nach Grützner *et al.*, 2021b).

Um die Interaktionsstelle von StsR am 5' Ende von UpsM einzugrenzen, wurden für den EMSA verschieden lange, intern mit α - 32 P-UTP markierte (*) *in vitro* Transkripte von UpsM verwendet. Dafür

wurde zum einen ein *in vitro* Transkript mit 206 Nukleotiden (UpsM(206 nt)*), welches der gesamten Sequenz von UpsM entspricht, und zum anderen *in vitro* Transkripte mit 76 Nukleotiden (UpsM(76 nt)*) bzw. 30 Nukleotiden (UpsM(30 nt)*) synthetisiert, die den ersten 5'-proximalen 76 bzw. 30 Nukleotiden von UpsM entsprachen. Die verschieden langen Transkripte von UpsM wurden mit aufsteigenden Konzentrationen nicht radioaktiv markierter sRNA StsR im Verhältnis von 1:1 (15 nM), 1:10 (150 nM) und 1:100 (1,5 µM) zwecks Komplexbildung inkubiert (Abbildung 22 B links). Sowohl das gesamte UpsM Transkript (UpsM(206 nt)*) als auch die verkürzten Transkripte UpsM(76 nt)* und UpsM(30 nt)* zeigten schon in einem äquimolaren Verhältnis von UpsM und StsR (1:1) eine Laufverschiebung (*shift*) und damit eine Interaktion beider sRNAs (Abbildung 22 B links). Der Gelretardationseffekt wurde bei steigender Konzentration an StsR (1:10 oder 1:100) deutlich verstärkt. Die negativen Kontrollen, bei der UpsM entweder mit einem 100-fachen Überschuss der sRNA PcrZ (Mank *et al.*, 2012) oder mit H₂O (-) inkubiert wurde, zeigten im Gel keinen *shift* bzw. keine Komplexbildung (Abbildung 22 B links). Somit lässt sich der Interaktionsbereich zwischen StsR und UpsM auf das 5' Ende von UpsM festlegen, wie es von dem Programm IntaRNA (Mann *et al.*, 2017) vorhergesagt wurde.

In der Northern Blot-Analyse der Abbildung 19 B wurde gezeigt, dass *in vivo* der Austausch von vier Nukleotiden in der UpsM-Bindungsregion von StsR zu einer Verringerung der Prozessierung von UpsM führt. Um diese verringerte Prozessierung von UpsM auf eine verminderte Interaktion zwischen StsR und UpsM zurückzuführen und den Interaktionsbereich zwischen UpsM und StsR zu charakterisieren, wurden weitere EMSAs durchgeführt. Dazu wurde das 206 nt lange, radioaktiv markierte UpsM *in vitro* Transkript (UpsM(206 nt)*) mit einem mutierten, nicht markierten Transkript von StsR (StsRmut; die mutierte StsR-Sequenz ist in Abbildung 22 A rechts rot markiert) oder ein radioaktiv markiertes, mutiertes Transkript von UpsM (UpsM(206 nt)mut*); die Sequenz ist in Abbildung 22 A rechts blau markiert) mit einem nicht mutierten Transkript von StsR inkubiert (Abbildung 22 B rechts). In beiden Gelen war trotz steigender Konzentrationen des nicht markierten RNA-Transkripts (1:1; 1:10; oder 1:100) eine weniger effiziente Laufverschiebung zu erkennen, was auf eine schwächere Interaktion der Transkripte hindeutet (Abbildung 22 B rechts). Als Kontrolle wurde zusätzlich ein EMSA mit dem mutierten *in vitro* Transkript von UpsM (UpsM(206 nt)mut*) und dem mutierten *in vitro* Transkript von StsR (StsRmut) durchgeführt; in diesem Fall wurde die Basenpaarung durch kompensatorische Mutationen wiederhergestellt (Abbildung 22 B rechts unten). In dem Gel ist zu erkennen, dass die Kombination der beiden kompensatorisch mutierten Transkripte die Komplexbildung wieder stabilisiert bzw. effizienter macht.

Die EMSAs unterstützen die vorhergesagte Basenpaarung der beiden sRNAs, zeigen jedoch lediglich eine Interaktion der beiden sRNAs, aber keine Prozessierung von UpsM, die von der Interaktion mit StsR und der Katalyse durch Endoribonuklease E (RNase E) abhängig ist. Um eine StsR-abhängige Prozessierung zu beweisen, wurde ein Degradations-Experiment mit der katalytischen Untereinheit der RNase E aus *E. coli* (Callaghan *et al.*, 2003; Callaghan *et al.*, 2005a) durchgeführt. Die katalytische Untereinheit der RNase E besitzt in diesem Fall 529 Aminosäuren (529 aa) und wurde in *E. coli* BL21 von dem Vektor pQE30 überexprimiert sowie anschließend mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt (Abbildung 23 A) (Callaghan *et al.*, 2003; Redko *et al.*, 2003; Callaghan *et al.*, 2005b). Für das Degradations-Experiment wurden 15 nM *in vitro* transkribierte und intern radioaktiv markierte

UpsM* RNA (206 nt) mit nicht markiertem StsR-Transkript in Verhältnis 1:5 (75 nM StsR) für 20 min bei 32 °C inkubiert, um eine Komplexbildung der beiden sRNAs zu ermöglichen. Um die Prozessierung zu induzieren, wurden nach der Komplexbildung 50 nM der katalytischen Untereinheit der RNase E aus *E. coli* hinzugegeben. Anschließend wurde der Reaktionsansatz über einen Zeitraum von 3 min bei 37 °C inkubiert, mit einem Formamid-Harnstoff-Mix abgestoppt und auf einem 6 %igen Polyacrylamid-Harnstoffgel aufgetrennt. Als Negativ-Kontrolle wurden 15 nM intern 32 P-markiertes UpsM*-Transkript nur mit der katalytischen Untereinheit der RNase E (ohne StsR) inkubiert.

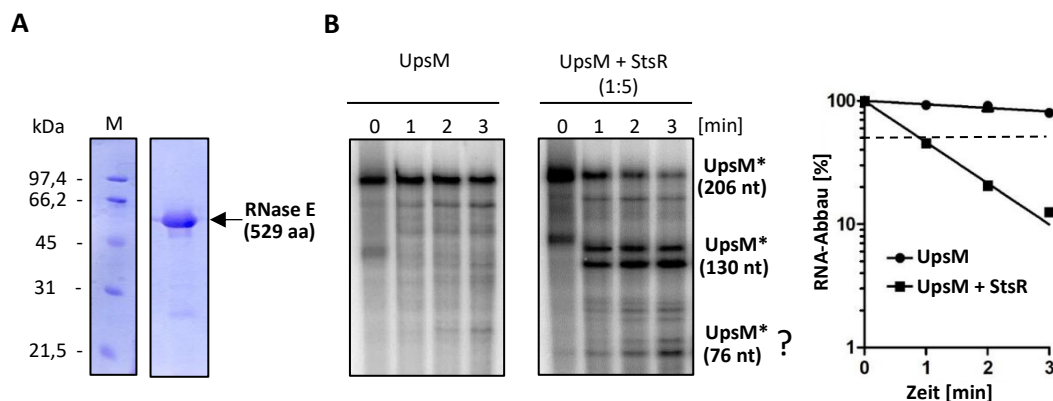


Abbildung 23: In vitro Prozessierung von UpsM in Abhängigkeit von StsR. (A) SDS-PAGE (12 %) der aufgereinigten katalytischen Untereinheit der RNase E (Callaghan *et al.*, 2003; Redko *et al.*, 2003) aus *E. coli*. (B) Links ist das *in vitro* Degradations-Experiment von UpsM mit der RNase E gezeigt. 15 nM intern radioaktiv markiertes UpsM *in vitro* Transkript (UpsM*) wurden als Kontrolle mit 50 nM der katalytischen RNase E Untereinheit (Abbildung 23 A) über den Zeitraum von 3 min bei 37 °C inkubiert. Zusätzlich wurde die Prozessierung von UpsM durch die RNase E in Abhängigkeit der sRNA StsR durchgeführt. Intern radioaktiv markierte UpsM RNA (UpsM*, 15 nM) wurde zunächst für eine Komplexbildung mit kalten StsR *in vitro* Transkript im Verhältnis 1:5 [75 nM] für 20 min bei 32 °C inkubiert. Anschließend wurden 50 nM der katalytischen Untereinheit der RNase E (Abbildung 23 A) hinzugegeben. Die Proben wurden auf ein 6 %iges Polyacrylamid-Harnstoffgel aufgetragen und mittels *phosphorimaging* analysiert. Rechts ist der prozentuale Abbau [%] der UpsM* RNA (206 nt), über biologische Triplikate gemittelt, halblogarithmisch gegen die Zeit [t] dargestellt (modifiziert nach Grützner *et al.*, 2021b).

Die Inkubation von UpsM* mit StsR (1:5) zeigte eine deutliche Abnahme von UpsM* (206 nt) und parallel eine Zunahme der beiden spezifischen Prozessierungsprodukte, während in Abwesenheit von StsR keine substanzielle Prozessierung bzw. Degradation von UpsM* innerhalb der 3-minütigen Inkubation nachweisbar war. Bei dem definierten Prozessierungsprodukt, welches bei der Inkubation von UpsM und StsR entsteht, sollte es sich um das 130 nt lange 3' Fragment von UpsM handeln, das auch hier wie in den Northern Blots als Doppelbande auftritt (Abbildung 23 B). Das bei der Spaltung entstehende 76 nt lange 5' Fragment, das in den Northern Blots sehr wahrscheinlich aufgrund eines schnellen zellulären Abbaus nicht detektierbar ist, könnte bei dem in Abbildung 23 B gezeigten Degradations-Experiment am unteren Rand des Gels erkennbar sein. Das Degradations-Experiment (Abbildung 23 B) zeigte also eindeutig, dass die Prozessierung von UpsM auch *in vitro* von der sRNA StsR und dem Enzym RNase E abhängig ist. Außerdem macht das Ergebnis deutlich, dass neben StsR und RNase E keine weiteren Faktoren für die Prozessierung von UpsM erforderlich sind. Ob die Interaktion der beiden sRNAs *in vivo* jedoch durch das RNA-Chaperon Hfq vermittelt wird, kann auch anhand dieses Experiments nicht geklärt werden.

In früheren *in vivo* Experimenten (Weber *et al.* 2016) wurde die RNase E-Schnittstelle in UpsM an Position 77-79 lokalisiert (Abbildung 24 A), also auf Grundlage der Strukturvorhersage durch Mfold (Zuker, 2003) in einer basengeparten Region am 5' Ende von UpsM (Zuker, 2003). RNase E ist jedoch eine Endoribonuklease, die einzelsträngige Bereiche in einem RNA-Molekül präferiert. Daher sollte der Prozessierungsbereich in der freien UpsM RNA für das Enzym unzugänglich sein (Abbildung 24 A). Das Programm IntaRNA (Mann *et al.*, 2017) sagt vorher, dass die StsR RNA mit den 5'-terminalen Positionen 1-23 von UpsM interagiert (Abbildung 24 A, schwarze Linie). Diese Basenpaarung zwischen StsR und UpsM könnte daher zu einer Entwindung der genannten helikalen Struktur in UpsM führen, wodurch die Prozessierungsstelle in der UpsM RNA ungepaart und somit für die RNase E zugänglich vorliegen würde (Abbildung 24 A). Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die Methode des *structure probing* angewandt. Dabei können chemische und enzymatische Reagenzien (Nukleasen) verwendet werden, um experimentell die einzel- und doppelsträngigen Sequenzbereiche eines RNA-Moleküls zu identifizieren. Die Ergebnisse solcher experimenteller Analysen in Korrelation mit den mathematisch basierten Algorithmen aus der RNA-Strukturvorhersage ermöglichen genauere Aussagen zur Struktur eines RNA-Moleküls in Lösung.

Für die experimentelle Analyse der UpsM-Struktur wurde ein *in vitro* Transkript von UpsM mit unterschiedlichen Konzentrationen der Einzelstrang-spezifischen Nuklease S1 (1 U; 0,5 U oder 0,1 U) in An- und Abwesenheit von StsR inkubiert. Liegt ein Sequenzabschnitt in UpsM als Einzelstrang vor, so kann die Nuklease S1 in dieser Region die RNA spalten. Über eine Primer-Extension (cDNA-Synthese) mit einem radioaktiv markierten Oligonukleotid können die entstehenden Spaltstellen nachgewiesen und kartiert werden, da an diesen Positionen Abbruchprodukte bei der cDNA-Synthese entstehen. Um die Spaltstellen der Sequenz zuordnen zu können, wurde parallel eine limitierte Nuklease T1-Spaltung durchgeführt. RNase T1 schneidet RNAs spezifisch 3' von einzelsträngigen Guaninen. In den Ergebnissen des *structure probing* (Abbildung 24 B) ist zu erkennen, dass die UpsM RNA in Abwesenheit von StsR (Spuren 3-5) ein anderes Bandenmuster liefert als in Gegenwart von StsR (Abbildung 24 B; 5-facher molarer StsR-Überschuss, Spuren 6-8; 10-facher StsR-Überschuss, Spuren 9-11). Daraus lässt sich schließen, dass die Komplexbildung von UpsM und StsR die Struktur von UpsM verändert, wodurch bestimmte Bereiche der UpsM RNA verstärkt einzelsträngig vorliegen. Deutlich mehr Banden sowie stärkere Banden-Intensitäten sind bei einem 10-fachen molaren Überschuss von StsR relativ zu UpsM (Spuren 9-11 versus 6-8) erkennbar (Abbildung 24 B). Es treten deutlich sichtbare Banden an den Positionen 77, 79, 80, 81, 82, 83 und 84 auf (Spuren 9-11; rot markiert), die in Abwesenheit von StsR deutlich schwächer sind (Spuren 3-5). Das lässt den Schluss zu, dass der Bereich der Nukleotide 77-84 der UpsM RNA in Abwesenheit von StsR doppelsträngigen Charakter besitzt und in Anwesenheit von StsR eher einzelsträngige Konformationen annimmt. Die genannten Nukleotide liegen genau in der Region der RNase E-Schnittstelle. Das Ergebnis des *structure probing* lieferte somit den finalen Beweis, dass es bei einer Interaktion zwischen UpsM und StsR tatsächlich zu einer Strukturveränderung kommt, die die RNase E-Schnittstelle freilegt (Abbildung 24).

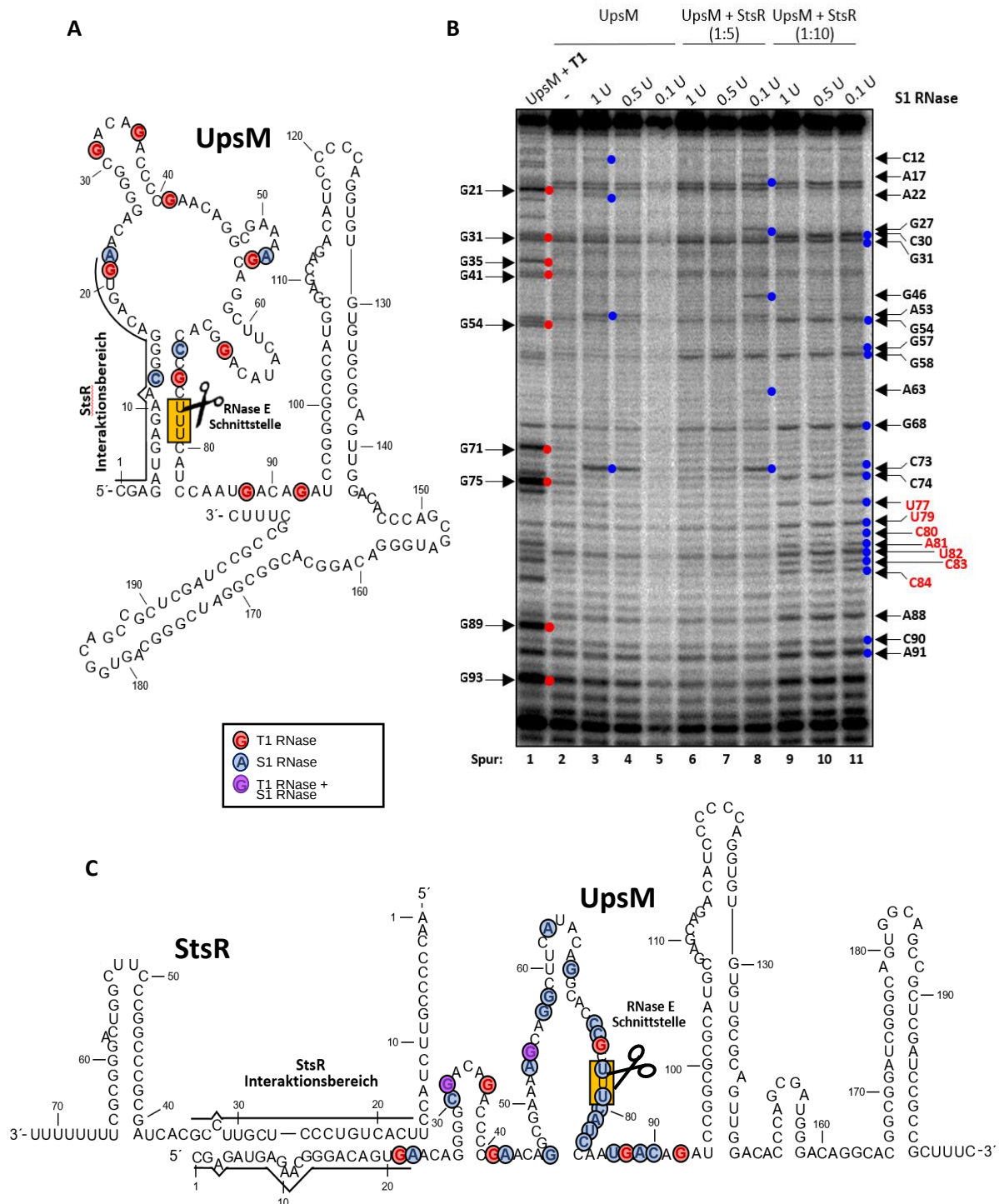


Abbildung 24: Strukturänderung der sRNA UpsM durch die Interaktion mit der sRNA StsR. (A) Die Abbildung zeigt die *in silico* (Mfold) vorhergesagte und *in vitro* (structure probing) partiell bestätigte Struktur der UpsM RNA. (B) Abbildung B zeigt das structure probing Experiment. Die *in vitro* transkribierte UpsM RNA allein [600 nM], UpsM und StsR RNA in einem molaren Verhältnis von 1:5 [600 nM UpsM und 3000 nM StsR] oder UpsM und StsR RNA in einem molaren Verhältnis von 1:10 [600 nM UpsM und 6000 nM StsR] wurden jeweils mit Nuklease S1 inkubiert. Der Nachweis der RNA-Spaltungen erfolgte über Primer-Extension (cdNA-Synthese). Die Proben wurden auf ein 8 %iges Sequenziergel aufgetragen und die Produkte der cdNA-Synthese mittels *phosphorimaging* detektiert. (C) Die Abbildung zeigt die *in silico* (Mfold) vorhergesagte Struktur des UpsM-StsR-Komplexes sowie die mittels structure probing kartierten Schnittstellen. Rot unterlegte Nukleotide: RNase T1-Schnittstellen; blau unterlegte Nukleotide: Nuklease S1-Schnittstellen; violett: Positionen, die von beiden Nukleasen gespalten werden (modifiziert nach Grützner *et al.*, 2021b).

3.1.4 Einfluss von StsR auf UpsM und das *dcw* Gencluster in der stationären Phase

Unter Laborbedingungen zeigt eine bakterielle Kultur die typischen Wachstumsphasen, bestehend aus exponentieller Phase, Übergangsphase und stationärer Phase. Die stationäre Wachstumsphase wird erreicht, wenn das Kulturmedium kaum mehr Nährstoffe enthält, infolgedessen die optische Dichte der Kultur weitgehend konstant bleibt, d. h. genauso viele Zellen absterben wie entstehen. In der Natur sind exponentiell wachsende Bakterien selten zu finden, da Mikroorganismen den größten Teil ihrer Lebenszeit aufgrund von Nährstoff-limitierenden Bedingungen in der stationären Phase verbringen. In der stationären Phase sind Mikroorganismen nicht nur Nährstofflimitierungen, sondern auch anderen Stressfaktoren ausgesetzt (Kolter *et al.*, 1993; Filloux, 2012), wie z. B. hohe Konzentrationen anorganischer Säuren, osmotischer und oxidativer Stress oder Änderungen des pH-Werts (Ferenci, 2001; Gefen *et al.*, 2014). Die Zellteilung von Mikroorganismen muss daher unter verschiedenen Stressbedingungen und beim Übergang von der exponentiellen zur stationären Wachstumsphase sehr gut reguliert sein (Goodrich-Blair *et al.*, 1996; Berthoumieux *et al.*, 2013).

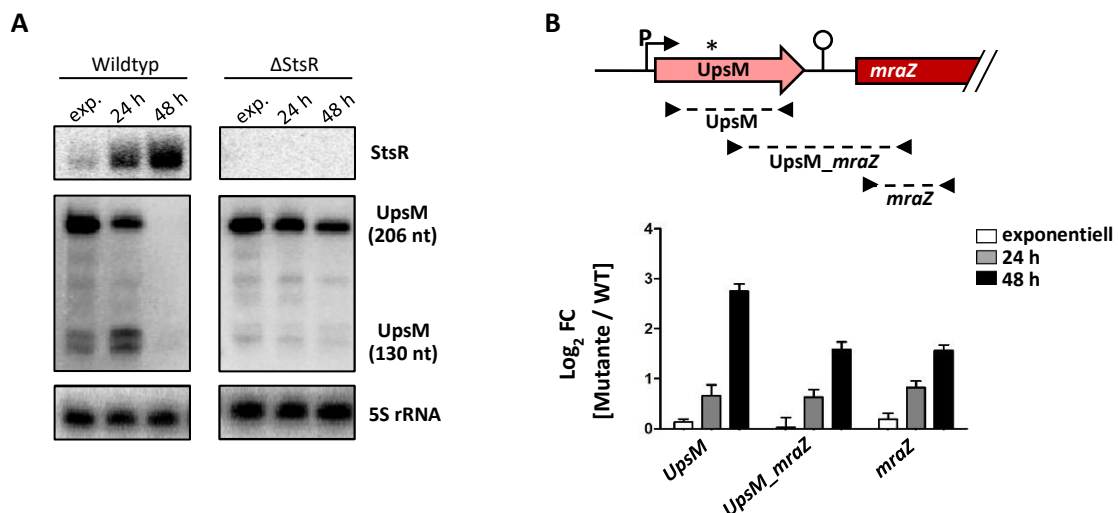


Abbildung 25: Wachstumsphasen-abhängige Expression von UpsM, StsR und *mraZ*. (A) Northern Blot-Analyse zur Wachstumsphasen-abhängigen Expression (exponentielle Wachstumsphase [exp.], 24 h und 48 h) von UpsM und StsR in *R. sphaeroides* Wildtyp und *R. sphaeroides* mit einer Deletion der sRNA StsR (Δ StsR) unter mikroaeroben Bedingungen. Jeweils 7,5 μ g Gesamt-RNA wurden auf einem 10 %igen denaturierenden TBE-Polyacrylamid-Harnstoffgel aufgetrennt. Die sRNAs StsR und UpsM (206 nt) sowie das UpsM-Prozessierungsprodukt (130 nt) wurden mittels spezifischer, radioaktiv markierter Oligonukleotid-Sonden nachgewiesen. 5S rRNA diente als Ladekontrolle. (B) Im oberen Teil der Abbildung sind schematisch der chromosomale UpsM-*mraZ* Lokus sowie die Positionen der Primer (Pfeilköpfe) für die qRT-PCR dargestellt. Im unteren Teil der Abbildung sind die mittels qRT-PCR quantifizierten zellulären Spiegel von UpsM, *read-through* Transkript (Durchlesen des UpsM-Terminators) und *mraZ* in der Δ StsR-Mutante im Vergleich zum Wildtyp in der exponentiellen (exp.) und stationären Wachstumsphase (24 h und 48 h) dargestellt. Die Veränderungen der relativen Expression (Log₂ FC) wurden auf Grundlage biologischer Triplikate und technischer Duplikate quantifiziert und auf *sinI* normalisiert, eine *spike-in* RNA von gleichbleibender Qualität und Konzentration (modifiziert nach Grützner *et al.*, 2021b).

Die sRNA StsR zeigte in Northern Blot- und RNASeq-Analysen (Remes *et al.*, 2017) ihre stärkste Expression unter verschiedenen Stress- sowie spätstationären und aeroben Wachstumsbedingungen

(Abbildung 16 und Abbildung Anhang 2). Wie schon in den Ergebnissen der Abschnitte 3.1.1 und 3.1.2 beschrieben, wurde aufgrund der Interaktion beider sRNAs ein Zusammenhang zwischen der Expression der sRNA StsR und der Regulation der Zellteilung von *R. sphaeroides* vermutet. Dabei könnte die sRNA StsR über die Interaktion mit UpsM einen Einfluss auf die *downstream* liegenden *dcw* Gene besitzen. Um die Expression und den Einfluss von StsR auf UpsM in der stationären Phase zu untersuchen, wurde ein Wachstumsexperiment mit *R. sphaeroides* Wildtyp und Δ StsR-Mutante über 48 Stunden durchgeführt. In der exponentiellen Phase sowie nach 24 und 48 h wurden Proben entnommen und die Gesamt-RNA mittels Phenol-Extraktion isoliert. Die RNA wurde anschließend für eine Northern Blot-Analyse (Abbildung 25 A) sowie quantitative *real-time* RT-PCR-Experimente (qRT-PCR); Abbildung 25 B) verwendet.

In der Northern Blot-Analyse ist zu erkennen, dass die Abundanz der sRNA StsR im *R. sphaeroides* Wildtyp über einen Zeitraum von 48 Stunden zunimmt, was mit früheren RNASeq-Analysen in Einklang steht (Remes *et al.*, 2017). UpsM hingegen zeigt in der exponentiellen Wachstumsphase die stärkste Abundanz, die nach 24 Stunden abnimmt. Nach 48 Stunden sind sowohl das Primärtranskript (206 nt) als auch das Prozessierungsfragment (130 nt) im Northern Blot nicht mehr nachweisbar. In dem StsR-Deletionsstamm (Δ StsR) ist jedoch das UpsM-Primärtranskript (206 nt) auch nach 48 Stunden noch detektierbar. Dieses Ergebnis zeigt deutlich, dass die sRNA StsR eine wichtige Bedeutung für die Prozessierung und den Abbau von UpsM in der stationären Phase besitzt (Abbildung 25 A).

Die Expression der sRNA UpsM wird über einen konstitutiven Promotor am 5' Ende und einen Terminator am 3' Ende reguliert. Die Terminatorstruktur erlaubt in 1 % aller Transkriptionsereignisse einen *read-through* und eine Expression der *downstream* kodierten *dcw* Gene (Weber *et al.*, 2016). Um den Einfluss der sRNA StsR auf den *read-through* und die Expression der nachfolgenden *dcw* Gene zu untersuchen, wurde die qRT-PCR mit RNA aus der exponentiellen und der stationären Phase (24 h und 48 h) mit Primern durchgeführt, die spezifisch für UpsM, UpsM_*mraZ* oder *mraZ* sind (Abbildung 25 B oben). Die qRT-PCR zeigte, dass sich die UpsM-Spiegel in der exponentiellen Wachstumsphase nicht wesentlich zwischen Wildtyp und Δ StsR-Mutante unterscheiden (Log2 FC 0,15). Nach 24 Stunden wurde jedoch ein Log2 FC von 0,75 und nach 48 Stunden von 2,85 ermittelt (Abbildung 25). Dies bestätigt, dass sich in der Δ StsR-Mutante deutlich höhere UpsM-Spiegel anreichern, was in Einklang mit den Northern Blot-Ergebnissen der Abbildung 25 A steht. Für die Transkripte UpsM_*mraZ* bzw. *mraZ* verhält es sich ähnlich. (Abbildung 25 B). In beiden Fällen wird nach 24 h ein Log2 FC von ungefähr 0,8 bzw. nach 48 Stunden von 1,5 erreicht. Die qRT-PCR zeigte somit, dass in der stationären Phase (24 bzw. 48 h) sowohl die Spiegel von UpsM als auch von UpsM_*mraZ* bzw. *mraZ* in der Δ StsR-Mutante gegenüber dem Wildtyp deutlich erhöht sind (Abbildung 25 B). Dies bedeutet, dass StsR sowohl die Abundanz von UpsM als auch die der UpsM-*mraZ* *read-through* bzw. *mraZ* Transkripte in der stationären Phase reguliert.

Zur Klärung der Frage, ob eine StsR-abhängige Prozessierung nicht nur in der UpsM RNA, sondern auch in der 5'-UTR des *read-through* mRNA-Transkripts stattfindet, wurde Gesamt-RNA aus Wildtyp- und Δ StsR-Zellen isoliert, die nicht (0') oder für 90 min (90') Singulett-Sauerstoffstress ($^1\text{O}_2$) ausgesetzt waren. Den Einfluss von StsR auf die 5'-UTR des *read-through* mRNA-Transkripts wurde anschließend

mit einer RT-PCR und Primern überprüft, die an das 5' Ende von UpsM (vor der Prozessierungsstelle) und im *mraZ* Leseraster binden (Abbildung 26 oben). Zur besseren Visualisierung wurden die Proben nach der RT-PCR auf ein 10 % Polyacrylamidgel aufgetragen und mit Ethidiumbromid gefärbt (Abbildung 26 unten). Dabei ist deutlich zu erkennen, dass nach 90 min Singulett-Sauerstoffstress ($^1\text{O}_2$) das Level des *read-through* mRNA-Transkripts im Wildtyp deutlich niedriger ist als in der ΔStsR -Mutante (Abbildung 26 unten), während letztere nach 90 min Singulett-Sauerstoffstress etwa gleiche *read-through* Transkript-Spiegel wie in Abwesenheit von Singulett-Sauerstoffstress aufweist. Somit hat die sRNA StsR auch einen destabilisierenden Effekt auf die 5' UTR des *read-through* mRNA-Transkripts. Ob dieser Effekt auch durch eine Strukturveränderung der 5' UTR und RNase E-abhängigen Prozessierung verursacht wird, konnte auf Grundlage dieser Daten nicht abschließend geklärt werden.

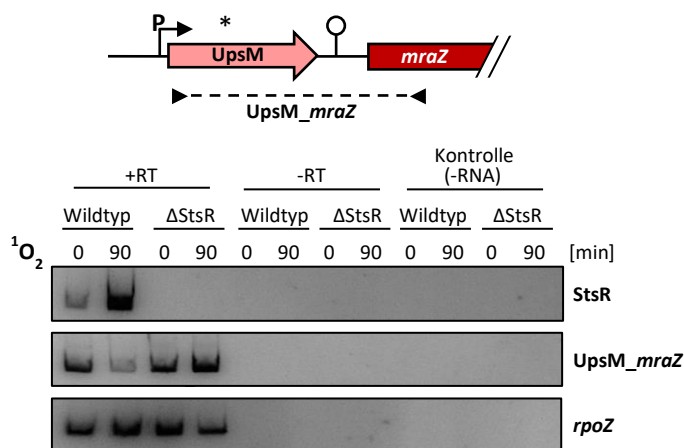


Abbildung 26: sRNA StsR beeinflusst die Menge des *read-through* Transkripts. Im oberen Teil sind der UpsM_*mraZ* Lokus sowie die Bindungsregionen der Primer für die RT-PCR dargestellt. Unten sind die qRT-PCR-Produkte mit Primerpaaren für StsR, UpsM_*mraZ* und *rpoZ* (Kontrolle) dargestellt. Die Gesamt-RNA wurde isoliert, nachdem Zellen des *R. sphaeroides* Wildtyps sowie der ΔStsR -Mutante keinem (0 min) bzw. 90-minütigem (90 min) Singulett-Sauerstoffstress ($^1\text{O}_2$) ausgesetzt worden waren. Die RT-PCR wurde anschließend mit (+) und ohne (-) reverse Transkriptase (RT) und in einer weiteren Kontrolle ohne RNA (-RNA) durchgeführt. Die Proben wurden auf ein 10 %iges Polyacrylamidgel aufgetragen und mit Ethidiumbromid gefärbt (modifiziert nach Grützner *et al.*, 2021b).

Die RNA-Spiegel ausgewählter Gene des *dcw* Genclusters wurde zusätzlich mittels qRT-PCR für den *R. sphaeroides* Wildtyp und die ΔStsR -Mutante analysiert, sodass weitere Informationen zu Effekten der StsR RNA auf das *dcw* Gencluster gewonnen werden konnten (Abbildung 27). Dafür wurden Zellen aus der exponentiellen, stationären (48 h) und *outgrowth* Phase (90 min) geerntet und die Gesamt-RNA isoliert. Das Fehlen der sRNA StsR in dem Deletionsstamm führte dabei vor allem in der *outgrowth* Phase zu signifikant erhöhten mRNA-Transkript-Spiegeln der *dcw* Gene (Abbildung 27). Eine erhöhte Expression der *dcw* Gene in der *outgrowth* Phase würde die in Abschnitt 3.1.1 beschriebenen Phänotypen des StsR-Deletionsstamms bestätigen. Die Ergebnisse zeigen, dass das Fehlen der sRNA StsR in dem ΔStsR -Stamm zu erhöhten zellulären Mengen an UpsM RNA und *read-through* Transkripten der *dcw* Gene führt. Es erklärt auch das veränderte Wachstumsverhalten der *R. sphaeroides* ΔStsR -Mutante in der stationären und *outgrowth* Phase, das sich in den Wachstumskurven (Abbildung 11 A), den relativen Überlebensraten (Abbildung 11 B) sowie in der Zellmorphologie (Abbildung 12) manifestiert. Es entsteht ein Gesamtbild, nach dem die sRNA StsR über die Induktion der Prozessierung in der UpsM RNA bzw. im 5' UTR des *read-through* Transkripts des *dcw* Genclusters eine Schlüsselrolle in der Regulation der Zellteilung von *R. sphaeroides* spielt.

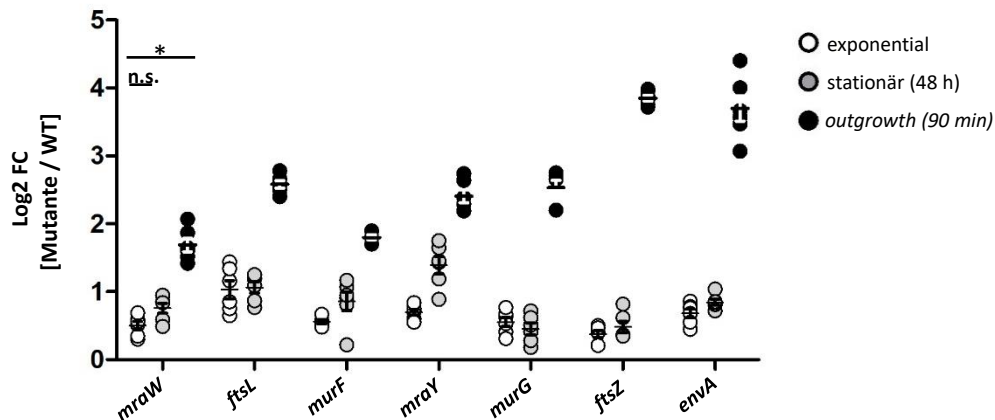


Abbildung 27: Veränderungen in der Expression von Genen des *dcw* Genclusters in verschiedenen Wachstumsphasen. Die Expressionsveränderungen ausgewählter Gene des *dcw* Genclusters (*mraW*, *ftsL*, *murF*, *mraY*, *murG*, *ftsZ* und *envA*) wurden für den Wildtyp und die Δ StsR-Mutante mittels qRT-PCR quantifiziert. Die beiden Stämme wurden unter mikroaeroben Bedingungen in der exponentiellen Phase, in der stationären Phase (48 h) und 90 min nach einem *outgrowth* (nach 48 h mit frischem Medium verdünnt und für 90 min unter gleichbleibenden Bedingungen kultiviert) geerntet. Die Gesamt-RNA wurde isoliert und nach einem DNase-Verdau für die qRT-PCR verwendet. Die Veränderungen der relativen Expressionen (Log2 FC) sind auf *sinI*, eine *spike-in* RNA, normalisiert. Die Punkte illustrieren die einzelnen Messwerte und ihre Verteilung in biologischen Triplikaten und technischen Duplikaten. Die Signifikanz wurde mittels t-Test berechnet und ist exemplarisch für *mraW* in der Abbildung dargestellt (* signifikant ($p \leq 0,05$); n.s. nicht signifikant ($p \geq 0,05$); modifiziert nach Grützner *et al.*, 2021b).

3.1.5 UpsM beeinflusst die Expression der *dcw* Gene in *trans* durch eine Interaktion mit *mraY* und *ftsW*

In den bisher gezeigten Northern Blots ist zu erkennen, dass das UpsM-Primärtranskript (206 nt) prozessiert wird und ein stabiles 130 nt langes 3' Fragment von UpsM nachweisbar ist, wohingegen das entstehende 5' Fragment aufgrund einer schnellen Degradation nicht detektierbar ist. Somit ergab sich die Frage, ob das prozessierte 3' Fragment von UpsM die funktionelle Form von UpsM ist und möglicherweise in *trans* auf andere RNA-Transkripte wirkt. Es wurde deshalb erneut eine IntaRNA-Suche (Mann *et al.*, 2017) nach Ziel-RNAs des UpsM 3' Fragment (130 nt) im *dcw* Gencluster durchgeführt. Diese Suche ergab eine mögliche Interaktion des 3' Fragments mit den mRNAs von *ftsW* und *mraY* (Abbildung 28 A und B links).

A

ftsW

5'- ...ACUUC GCGCGCCGGAUC GACGG... -3'

3'- ...GCGUA CGCGCGGCCUAG ACAGU... -5'

UpsM 130 nt

-14.5 kcal/mol

ftsWmut

5'- ...ACUUC GCGCGCCG CUAGGACGG... -3'

3'- ...GCGUA CGCGCGGC CUAGACAGU... -5'

UpsM 130 nt

-8.6 kcal/mol

B

mraY

5'- ...GCCGC G C 485 475 465 ACGCU... -3'

3'- ...CUACA G AGCGUA CGC GCGGCCUAGAC AGUAA... -5'

UpsM 130 nt

-14.3 kcal/mol

mraYmut

5'- ...GCCGC G AGCGUAC 485 475 465 ACGCU... -3'

3'- ...CUACA GAGCGUACGC GCGGCCUAGAC AGUAA... -5'

UpsM 130 nt

-10.8 kcal/mol

Figure 10 shows the thermodynamic stability of the UpsM(130 nt) RNA hairpins. Panel A displays the *ftsW* and *ftsWmut* hairpins. The *ftsW* hairpin has a free energy of -14.5 kcal/mol, while the *ftsWmut* hairpin has a free energy of -8.6 kcal/mol. Panel B displays the *mraY* and *mraYmut* hairpins. The *mraY* hairpin has a free energy of -14.3 kcal/mol, while the *mraYmut* hairpin has a free energy of -10.8 kcal/mol. The mutations in the *ftsW* and *mraY* hairpins are highlighted in green and yellow, respectively. The thermodynamic stability of the hairpins was determined by circular dichroism (CD) spectroscopy.

115

Um eine mögliche Interaktion und damit eine Funktion von UpsM in *trans* nachzuweisen, wurde ein EMSA mit dem 3' Fragment von UpsM (UpsM(130 nt)*) und den vorhergesagten Ziel-mRNAs *ftsW* bzw. *mraY* durchgeführt. Dafür wurde intern ³²P-markierte UpsM(130 nt)* RNA (15 nM) mit aufsteigenden Konzentrationen an nicht radioaktiv markierten *in vitro* Transkripten von *ftsW* und *mraY* im Verhältnis von 1:1 (15 nM), 1:10 (150 nM) und 1:100 (1,5 µM) für 30 min bei 32 °C zwecks Komplexbildung inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf ein 6 %iges natives Polyacrylamidgel aufgetragen und mittels *phosphorimaging* analysiert (Abbildung 28 A und B, Gel-Bilder jeweils oben rechts). In beiden Gelen ist ein deutlicher *shift* von UpsM(130 nt)* und damit eine konzentrationsabhängige Komplexbildung zwischen dem UpsM 3' Fragment und den *ftsW* bzw. *mraY* RNAs zu erkennen. Dies bestätigt in beiden Fällen die vorhergesagte RNA:RNA-Interaktion. Zusätzlich wurden EMSAs mit UpsM(130 nt)* und in der putativen Bindungsregion mutierten Sequenzvarianten der *ftsW* (*ftsW*mut) und *mraY* (*mraY*mut) RNAs durchgeführt. Diese Gele zeigten im Vergleich zu den nicht mutierten Sequenzen von *ftsW* und *mraY* erst bei höheren Konzentrationen einen *shift* des RNA:RNA-Komplexes, was eine durch die Mutationen abgeschwächte Interaktion impliziert (Abbildung 28 A und B, Gelbilder jeweils rechts unten). Als weitere Kontrolle wurde ein UpsM-Transkript eingesetzt, das die 76 5'-terminalen Nukleotide des UpsM-Primärtranskripts repräsentiert (Abbildung Anhang 3). Diese Bindungs-Experimente zeigten keinen *shift*, was die UpsM 3' Fragment-spezifischen Interaktionen mit den *ftsW* und *mraY* RNAs bestätigt.

Um den Effekt der sRNA StsR auf die Expression von *ftsW* und *mraY* *in vivo* zu testen, wurden von Jonas Kretz und Dr. Matthew McIntosh transkriptionelle Fusionen von *ftsW* und *mraY* an *mVenus* hergestellt. Dabei wurden die kodierenden Regionen dieser Gene mit ihren nativen Ribosomen-Bindungsstellen zwischen einen konstitutiven Promotor und das *mVenus*-Reporter-Leseraster kloniert (pPPtrp_ *ftsW*::*mVenus* und pPPtrp_ *mraY*::*mVenus*). Die entsprechenden Plasmid-Konstrukte wurden in den *R. sphaeroides* Wildtyp- und den ΔStsR-Stamm konjugiert. Die Fluoreszenz der *mVenus*-Reportergene wurde anschließend bei einer Anregungswellenlänge von 515 nm und einer Emissionswellenlänge von 548 nm in der exponentiellen und stationären (48 h) Wachstumsphase gemessen. Die Fluoreszenzmessung in der exponentiellen Phase ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp und ΔStsR-Mutante (Grützner *et al.*, 2021b). In der stationären Phase hingegen war die Fluoreszenz in dem ΔStsR-Stamm (ΔStsR) um das 2-3 fache höher als im Wildtyp (Grützner *et al.*, 2021b), was für eine relative Destabilisierung der mRNA des *mVenus*-Reportergens im *R. sphaeroides* Wildtyp spricht. Das Ergebnis impliziert einen negativen Regulationseffekt von StsR auf *mraY* und *ftsW*, bei dem StsR in der stationären Phase die Prozessierung von UpsM vermittelt und das 3' Fragment von UpsM über eine Interaktion mit *mraY* und *ftsW* deren Expression abschwächt. Somit bestätigen diese Ergebnisse, dass die sRNA StsR die Expression der *downstream* gelegenen Gene des *dcw* Genclusters auf zwei Ebenen in der stationären Phase abschwächt, zum einen durch Reduktion der UpsM-*dcw read-through* Transkripte und zum anderen durch ihren Beitrag zur Generierung des UpsM 3' Fragments, das seinerseits die Expression der Gene *mraY* und *ftsW* des *dcw* Genclusters abschwächt.

Um die Ergebnisse der Reporter-Assays zu bestätigen, wurde das 3' Fragment von UpsM (130 nt) über den Vektor pBBR-MCS2 [Plasmid pBBRUpsM(130 nt)] in *R. sphaeroides* Wildtyp-Zellen überexprimiert. Der Überexpressions-Stamm und der originale Wildtyp-Stamm wurden unter mikroaeroben Bedingungen kultiviert, in der exponentiellen Phase geerntet und die Gesamt-RNA mittels Phenol-Extraktion isoliert. Die mRNA-Spiegel von *ftsW* und *mraY* in den beiden Stämmen wurden mittels qRT-PCR analysiert. Wie die Ergebnisse in Abbildung 29 zeigen, verringert eine Überexpression des UpsM 3' Fragments die mRNA-Spiegel von *ftsW* um den Log2 FC (*fold change*) von -2,3 und von *mraY* um den Log2 FC von -3,6. Die Gene *ftsZ* und *envA* aus dem *dcw* Gencluster zeigten dagegen keine substanziellen Änderungen.

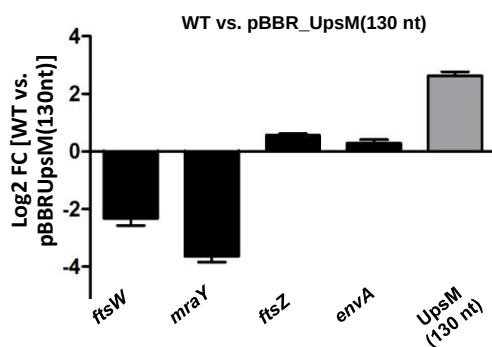


Abbildung 29: Die Überexpression des UpsM 3' Fragments [UpsM(130 nt)] reduziert die Spiegel der *ftsW* und *mraZ* mRNAs. Die Veränderung der mRNA-Spiegel von *ftsW* und *mraY* wurde für den *R. sphaeroides* Wildtyp und einen Derivat-Stamm, der das 130 nt lange UpsM 3' Fragments plasmidal [pBBR_UpsM(130 nt)] überexprimiert mittels qRT-PCR quantifiziert. Die Gesamt-RNA wurde nach Kultivierung unter mikroaeroben Bedingungen isoliert und nach DNase-Behandlung für die qRT-PCR verwendet. Die Veränderung der relativen Expression (Log2 FC) der jeweiligen Gene ist auf *sinI*, eine *spike-in* RNA, normalisiert. Die Balken zeigen den Mittelwert und die Standardabweichung auf der Grundlage biologischer Triplikate und technischer Duplikate (modifiziert nach Grützner *et al.*, 2021b).

Die Ergebnisse bestätigen die Annahme, dass die sRNA StsR indirekt Einfluss auf die Expression von *ftsW* und *mraY* nimmt. Die sRNA StsR, die in der stationären Phase besonders stark exprimiert wird, löst die Prozessierung des UpsM-Primärtranskripts (206 nt) zu einem 130 nt langen 3' Fragment aus. Das 130 nt lange, stabile Prozessierungsfragment kann anschließend mit den mRNAs von *ftsW* und *mraY* interagieren und deren Expression negativ beeinflussen. Der genaue Mechanismus, wie das UpsM 3' Fragment die Expression der beiden Gene herunterreguliert, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht im Detail geklärt werden.

3.2 Die DUF1127 Proteine CcaF1 (*conserved CcsR associated factor*) und RSP_0557

Mittels Transkriptom-Analysen (RNASeq und *ribosome profiling*) wurden in bakteriellen Genomen eine Vielzahl kurzer offener Leseraster (ORFs; *open reading frames*) identifiziert, die für kleine Proteine kodieren und in der Vergangenheit aufgrund ihrer geringen Größe nicht annotiert wurden (Hobbs *et al.*, 2011; Storz *et al.*, 2014). Diese neu identifizierten Proteine können unterschiedlichen Proteinfamilien angehören und eine Vielfalt an physiologischen und zellulären Funktionen besitzen (Andrews & Rothnagel, 2014; Storz *et al.*, 2014; Orr *et al.*, 2020). In der Pfam Datenbank sind mittlerweile ca. 18.000 unterschiedliche Proteinfamilien gelistet, von denen ca. 4.500 noch keine Funktion zugeordnet werden konnte (El-Gebali *et al.*, 2019). Ein Großteil jener Proteine, für die noch keine zelluläre Funktion beschrieben wurde, besitzen eine DUF (*domain of unknown function*) Domäne (Goodacre *et al.*, 2013). In dieser Arbeit wurden zwei solcher Proteine mit unbekannter Funktion aus *R. sphaeroides* untersucht, und zwar RSP_6037 und RSP_0557 aus der DUF1127-Proteinfamilie.

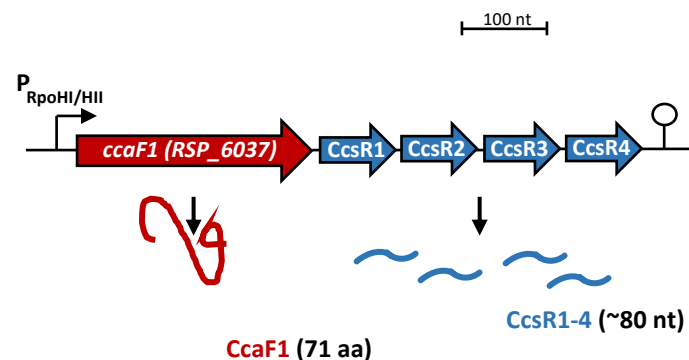


Abbildung 30: Schematische Darstellung des CIN1 Lokus von *R. sphaeroides*, der das DUF1127 Protein *ccaF1* (RSP_6037) und vier *CcsR* RNAs kodiert. Das Gen für das DUF1127 Proteins *ccaF1* (RSP_6037) ist rot markiert, während die kodierenden sequenzen für die sRNAs *CcsR1-4* in Blau dargestellt sind. Am 5' Ende des Protein/sRNA-Operons befindet sich eine RpoHI/II-abhängige Promotorsequenz, der Pfeil markiert den Transkriptionsstart; am 3' Ende des Operons ist ein Rho-unabhängiger Terminator (Haarnadelstruktur) kodiert (modifiziert nach Billenkamp *et al.*, 2015).

Das DUF1127 Protein RSP_6037 wird im Gegensatz zu den anderen DUF1127 Proteinen in *R. sphaeroides* in einem Operon mit vier sogenannten „Cuckoo“ RNAs *CcsR1-4* exprimiert (Abbildung 30; Billenkamp *et al.*, 2015; Reinkensmeier & Giegerich, 2015). Diese sRNAs besitzen in *R. sphaeroides* zwei Haarnadelschleifen, die jeweils das ungepaarte Anti-Shine-Dalgarno-Motiv „5'-CCUCCUCCC“ in den Schleifen aufweisen und eine wichtige Funktion in der Stressantwort von *R. sphaeroides* ausüben (Billenkamp *et al.*, 2015). Die genomische Anordnung aus Proteingen mit einer DUF1127 Domäne und „Cuckoo“ RNA-Genen wurde von Reinkensmeier und Giegerich (2015) als CIN1 (*conserved intergenic neighborhood 1*) Lokus bezeichnet. Da die meistens ORFs, die eine DUF1127 Domäne besitzen, einen CIN1 Lokus aus DUF1127 Protein und „Cuckoo“ RNA(s) bilden, wurde das Protein RSP_6037 und die entsprechenden Orthologe als CcaF1 (*conserved CcsR associated factor*) bezeichnet (Abbildung 30). Um den CIN1 Lokus und dessen Konservierung in der Gruppe der α -Proteobakterien näher zu charakterisieren, wurde von Dr. Fabian Billenkamp eine taxonomische Analyse des *ccaF1*-*CcsR* Operons durchgeführt (Sneath & Sokal, 1973). Die Analyse ergab, dass *Brucellaceae* (blau) zwei

unterschiedliche *ccaf1*-CcsR-Loci kodieren, die typischerweise aus dem *ccafF* Gen und einer einzelnen CcsR RNA in der 3'-UTR bestehen. Bei den *Rhizobiaceae* (hellgrün), *Rhodobacteraceae* (rot) und *Phylobacteraceae* (dunkelgrün) gibt es einen ähnlichen Locus, der eine oder mehrere CcsR-Kopien in der 3'-UTR von *ccaf* kodiert. *Sinorhizobium* hingegen nimmt eine Sonderstellung in dem Stammbaum ein, da die CcsR RNAs in der 5'-UTR von *ccafF* lokalisiert sind und zwei *ccaf* Gene hintereinander liegen (Abbildung 31).



Abbildung 31: Phylogenetischer Baum der konservierten Regionen von *ccaf1* aus verschiedenen α -Proteobakterien. Dargestellt ist ein phylogenetischer Stammbaum des *ccaf1*-CcsR Locus. Er wurde von Dr. Fabian Billenkamp mit der UPGMA-Methode (Sneath & Sokal, 1973) erstellt. Dieser phylogenetische Baum des *ccaf1*-CcsR Locus korreliert mit dem phylogenetischen Baum der 16S rRNA (nicht gezeigt). (fett: mehr als eine CcsR RNA, #: *Rhodobacter*-Typ mit 5'*ccaf1*-CcsR1-n-3', § *Sinorhizobium*-Typ 5'-CcsR1-n-*ccaf1*-*ccaf2*-3', §

seltener *ccaf1*-Typ 5'-CcsR1-n-*ccaf1*-CcsR1-3' [n: beliebige Anzahl], blau: *Brucellaceae*, dunkelgrün: *Phylobacteraceae*, hellgrün: *Rhizobiaceae*, rot: *Rhodobacteraceae*; modifiziert nach Grützner *et al.*, 2021a).

Neben dem *ccaf1* (*RSP_6037*) Gen besitzt *R. sphaeroides* drei weitere Gene in seinem Genom, die ein Protein mit einer sogenannten DUF1127 Domäne kodieren. Dazu gehört unter anderem das Gen *RSP_0557*, welches ebenfalls im Zuge dieser Arbeit sowie in den Master-Arbeiten von Silvan Löbsack und Anna Latz in Hinblick seine Funktion in *R. sphaeroides* untersucht wurde. Das Gen für *RSP_0557* wird im Gegensatz zu *ccaf1* nicht mit den CcsR RNAs co-transkribiert und gehört dementsprechend auch nicht zu dem von Reinkensmeier und Giegerich (2015) beschriebenen CIN1 Lokus. *RSP_0557* ist im intercistronischen Bereich der Gene *RSP_0556* (*RuvC*; *Holliday junction* Endonuklease) und *RSP_0558* (ribosomale L11 Methyltransferase) auf dem Chromosom 1 lokalisiert und kodiert 70 Aminosäuren (Abbildung 32). Das Protein RSP_0557 wurde erstmalig im Zusammenhang mit der sRNA Pos19 (*photooxidative stress induced* sRNA 19) charakterisiert (Müller *et al.*, 2016). Aus vorangegangenen Experimenten war bekannt, dass das Gen *RSP_0557* einen RpoHI/II-abhängigen Promotor am 5' Ende und einen Rho-unabhängigen Terminator am 3' Ende besitzt.

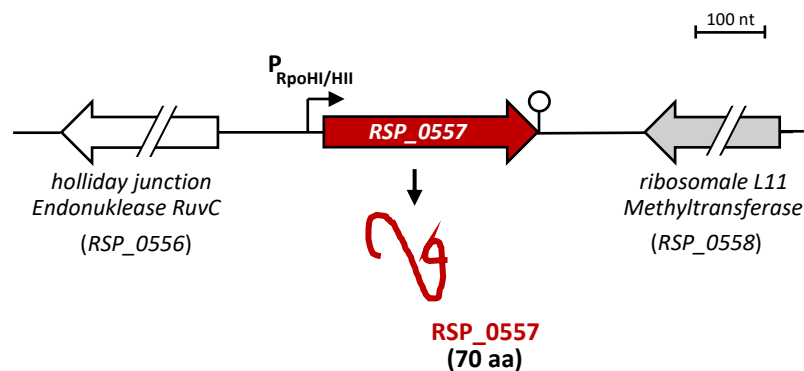


Abbildung 32: Schematische Darstellung der chromosomalen Lokus von *RSP_0557*. Genomische Organisation des Gens für das DUF1127 Protein *RSP_0557* von *R. sphaeroides*. Am 5' Ende des Gens befindet sich eine RpoHI/II-abhängige Promotorsequenz (Pfeil) und am 3' Ende ist ein Rho-unabhängiger Terminator (Haarnadelstruktur) kodiert.

3.2.1 Charakterisierung des DUF1127 Proteins CcaF1

Proteine mit einer DUF1127 Domäne sind Arginin-reiche Proteine, die weniger als 100 Aminosäuren besitzen. Zudem bestehen sie in den meisten Fällen aus einer einzigen Proteine-Domäne (Kraus *et al.*, 2020), wobei die DUF1127 Domäne in der Regel 45-50 Aminosäuren umfasst. In der InterPro Datenbank sind mittlerweile mehr als 17.000 Proteine mit einer DUF1127 Domäne in über 4.000 Bakterienspezies gelistet, wovon die DUF1127 Proteine zumeist in α - (67 %) und γ -Proteobakterien (30 %) vorkommen (Mitchell *et al.*, 2019; Kraus *et al.*, 2020). Das Protein CcaF1 (*RSP_6037*) aus *R. sphaeroides* besitzt 71 Aminosäuren, während die DUF1127 Domäne aus nur 33 Aminosäuren besteht und sich am C-Terminus des Proteins befindet (Abbildung 34 A). Eine Faltungsvorhersage von *R. sphaeroides* CcaF1 mit dem Webserver PHYRE2 (Kelley *et al.*, 2015) ergab eine 70 %ige Homologie zu der RNA-Bindedomäne des Smaug Proteins aus *Drosophila melanogaster* (Dahanukar & Wharton, 1996; Smibert *et al.*, 1996; Dahanukar *et al.*, 1999; Smibert *et al.*, 1999). Diese Konservierung der

DUF1127 Domäne und ihre Homologie zum Smaug Protein aus *D. melanogaster* gilt auch für andere α -Proteobakterien (Abbildung 33). Es ist bekannt, dass das Smaug Protein in *D. melanogaster* die Translation der sogenannten *nos* mRNAs inhibieren und den mRNA-Abbau in der Embryonalentwicklung fördern (Green *et al.*, 2002; Benoit *et al.*, 2009). Bei der Strukturvorhersage der DUF1127 Proteine zeigte sich außerdem eine hohe Ähnlichkeit zu der SAM (*sterile alpha motif*) Domäne. SAM Domänen sind an einer Protein-Protein-Interaktion beteiligt und kommen in eukaryotischen und einigen prokaryotischen Proteinen vor (Schultz *et al.*, 1997; Green *et al.*, 2003). Studien in *D. melanogaster* haben gezeigt, dass die RNA-Bindedomäne des Smaug Proteins auch eine SAM Sub-Domäne besitzt, die ebenfalls mit RNA-Molekülen interagiert (Kim & Bowie, 2003). Es kann also davon ausgegangen werden, dass die DUF1127 Domäne in Prokaryoten ebenfalls eine RNA-bindende Funktion aufweist oder eine Interaktion mit anderen Proteinen eingeht.

<i>D. melanogaster</i>	SMAUG		TYEMLLITEDFQSVGVTKGASHKLALC-
<i>R. sphaeroides</i> 2.4.1	CcaF1	71 aa	TVRELNSLTTRERADLGIHRSMITRIAME-
<i>R. capsulatus</i> SB1003	CcaF1	67 aa	TLAELRSLSNRENDLGMHRSMLTRIALE-
<i>S. meliloti</i> 1021	CcaF1	47 aa	TCNELGRMSDREITDLGIGRADIPYVAR--
<i>S. fredii</i> HH103	CcaF1	66 aa	TCSELGRMSDRENDLGIGRSDIPYVARQA
<i>R. sphaeroides</i> KD131	CcaF1	50 aa	TVRELNSLTTRERADLGIHRSMITRIAM--
<i>R. sphaeroides</i> ATCC17029	CcaF1	71 aa	TVRELNSLTTRERADLGIHRSMITRIAME-
<i>R. spaheroides</i> WS8N	CcaF1	71 aa	TVRELNSLTTRERADLGIHRSMITRIAM--
<i>R. denitrificans</i> OCh114	CcaF1	78 aa	SLSELRLSDRELEDLGMSTRYVLKDIAMQ-
<i>P. denitrificans</i> PD1222	CcaF1	99 aa	TLRELGEISNRDLADLGLNRGNIRSVAYE-
<i>A. vitis</i> S4	CcaF1	48 aa	TVSELGRMTSREIQDLGIERSDIRRVARA-
<i>A. melitensis</i> 16M	CcaF1	40 aa	TVNELNQSLSTRENDLGISRADIPFVARQA
<i>Jannaschia</i> sp. CCS1	CcaF1	124 aa	TLNELQDLASREADLGINPSMIQRIALE-
<i>L. vestfoldensis</i> SKA53	CcaF1	71 aa	TLNELQSLSNRDLADLGLSRSLRGIAFE-
<i>Sulfitobacter</i> sp. EE-36	CcaF1	70 aa	TFNELSSLNRENDLGMGRSQIRGIALE-
<i>S. stellata</i> E-37	CcaF1	72 aa	TFRELSSLNREADLGLGRSEIRRVAYQ-
<i>R. leguminosarum</i> WSM1325	CcaF1	49 aa	TITELGRMTNREHDLGIDRSDIHRVAR--
<i>Ruegeria</i> sp. TM1040	CcaF1	74 aa	TLNELRELSNREADLGLSRSMILKGIAMLE-
<i>R. pomeroyi</i> DSS-3	CcaF1	75 aa	TVNELSALSGREADLGLHRSSMIKRALQ-
<i>P. gallaeciensis</i> DSM17395	CcaF1	73 aa	TMNELSTLSGREADLGLSRSMILRSVAYE-

Abbildung 33: Konservierte Aminosäuresequenz zwischen der RNA-Bindedomäne der Smaug Proteine aus *D. melanogaster* und der DUF1127 Domäne aus verschiedenen α -Proteobakterien. In der Abbildung ist ein Aminosäuresequenz-Alignment (*amino acid*; aa) der RNA-Bindedomäne des Smaug Proteins von *D. melanogaster* mit der DUF1127 Domäne von CcaF1 Proteinen aus verschiedenen α -Proteobakterien gezeigt. Die zwischen Smaug Domäne und bakteriellen DUF1127 Domänen absolut konservierten Aminosäuren sind dunkelrot unterlegt und zu mindestens 75% konservierte Aminosäuren sind hellrot unterlegt (modifiziert nach Grützner *et al.*, 2021a).

Anhand von Northern Blot- und RNASeq-Analysen konnte gezeigt werden, dass die Prozessierung des *ccaF1*-CcsR1-4 Vorläufertranskripts in die *ccaF1* mRNA sowie die einzelnen CcsR RNAs von der Endoribonuklease E (RNase E) abhängig ist (Billenkamp *et al.*, 2015; Förstner *et al.*, 2018; Spanka *et al.*, 2021). Da an der Prozessierung von RNA-Transkripten meistens weitere Proteine als stabilisierende oder destabilisierende Faktoren beteiligt sind und ein funktioneller Zusammenhang zwischen CcaF1 (RSP_6037) und CcsR RNAs naheliegend war, wurde der Einfluss des DUF1127 Proteins CcaF1 auf den Metabolismus der CcsR RNAs untersucht.

A

R. sphaeroides 2.4.1 CcaF1 (RSP_6037)

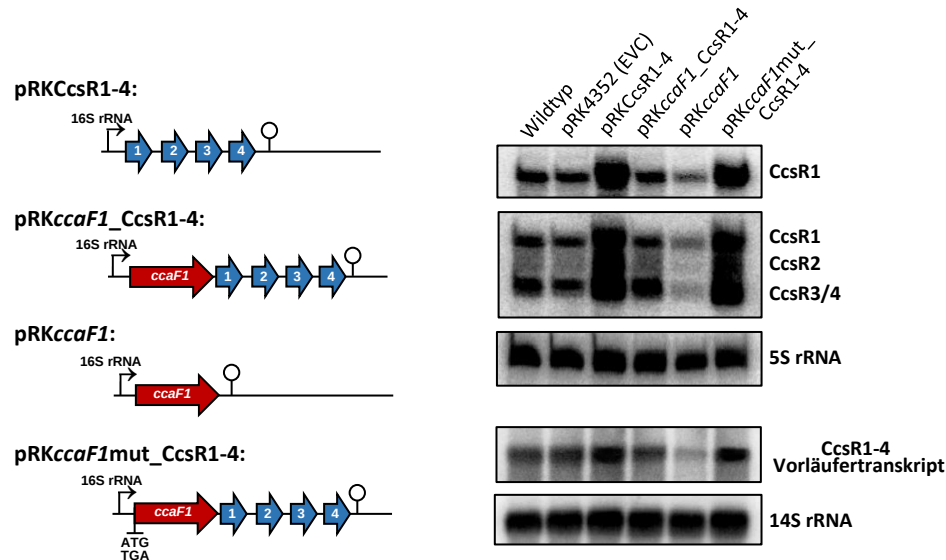
DUF1127

NT - MAYANTTRIGHHGLGDRVSALVASVKL**ALAQRRIYRQTVREINSLTTRELSDLGIHRSMITRIAMEAAYGL** - CT*R. sphaeroides* KD131 CcaF1 (RSPKD131_0402)

DUF1127

NT - MASVKL**ALAQRRIYRQTVREINSLTTRELSDLGIHRSMITRIAMEAAYGL** - CT

B



C

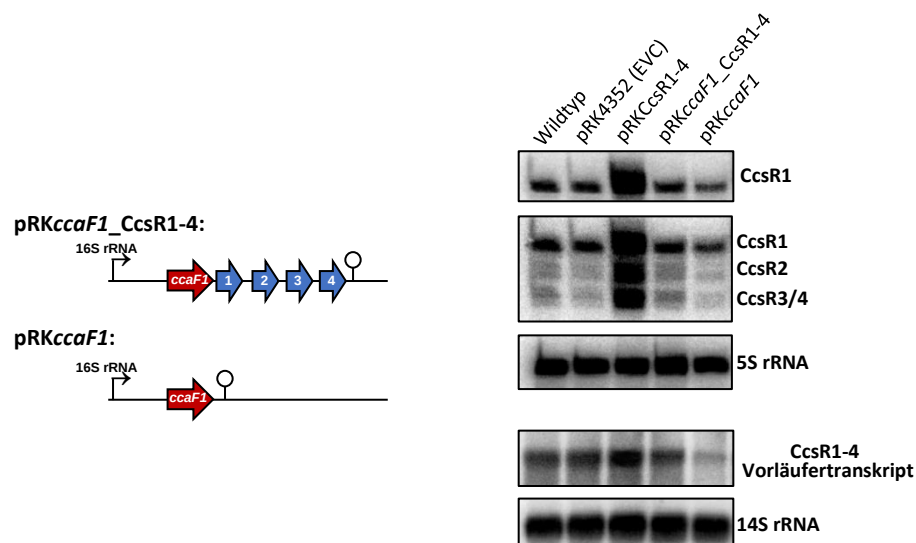


Abbildung 34: Einfluss des DUF1127 Proteins CcaF1 auf die zellulären Spiegel der CcsR RNAs. (A) Gezeigt ist die Aminosäuresequenz des DUF1127 Proteins CcaF1 aus *R. sphaeroides* 2.4.1 (RSP_6037) und des homologen Proteins aus *R. sphaeroides* KD131 (RSPKD131_0402). Die zwischen beiden Proteinen konservierte DUF1127 Domäne ist durch Fettdruck hervorgehoben. (B und C) Die verwendeten Plasmid-Konstrukte sind auf der linken Seite dargestellt, wobei die *ccaF1* Gene aus *R. sphaeroides* 2.4.1 (71 aa) und *R. sphaeroides* KD131 (50 aa) in Rot und die entsprechenden sRNAs CcsR1-4 in Blau dargestellt sind. Auf der rechten Seite sind die Northern Blot-Analysen des *R. sphaeroides* Wildtyps und der *R. sphaeroides* Stämme mit den entsprechenden Überexpressionplasmiden gezeigt; die Gesamt-RNA wurde aus Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase isoliert. Jeweils 7,5 µg der Gesamt-RNAs pro Spur wurden in 10 %igen Agarosegelen (untere Gele) aufgetrennt. Die sRNAs CcsR1, CcsR2, CcsR3/4 und CcsR1-4 wurden mit spezifischen, radioaktiv markierten Oligonukleotid-Sonden detektiert. 5S und 14S rRNA dienten als Ladekontrollen (modifiziert nach Grützner *et al.*, 2021a).

Da für *R. sphaeroides* das *ccaF1*-CcsR1-4 Operon essentiell ist und dementsprechend keine Deletion möglich war, wurden für weitere Untersuchungen Überexpressionsstämme mit unterschiedlichen Plasmid-basierten Derivaten des Operons aus *R. sphaeroides* 2.4.1 hergestellt (Abbildung 34 B links). Die Überexpression erfolgte konstitutiv über den 16S rRNA Promotor des Vektors pRK4352 (Mank *et al.*, 2012). Zusätzlich wurden Überexpressionsplasmide mit dem homologen Gen *ccaF1* (50 Aminosäuren) und dem sRNA Cluster CcsR1-4 aus *R. sphaeroides* KD131 kloniert, der ein naher Verwandter von *R. sphaeroides* 2.4.1 ist (Abbildung 34 C links). Die entsprechenden Plasmide wurden in *R. sphaeroides* 2.4.1 konjugiert und die Transkript-Spiegel der einzelnen CcsR RNAs und des CcsR1-4 Vorläufertranskripts mittels Northern Blot-Analyse in exponentiell, unter mikroaeroben Bedingungen gewachsenen Kulturen analysiert (Abbildung 34 B und C, rechts). Die sRNAs CcsR1, CcsR2, CcsR3/4 sowie das Vorläufertranskript CcsR1-4 wurden mit spezifischen, radioaktiv markierten Oligonukleotid-Sonden detektiert. Die ribosomalen RNA Spezies 5S und 14S dienten als Ladekontrollen, da diese konstitutiv und weitgehend unabhängig von den experimentellen Bedingungen in jeder Zelle exprimiert werden.

Die Northern Blot-Analyse zeigte, dass die Expression des CcsR1-4 sRNA-Clusters über den 16S rRNA Promotor (pRKCcsR1-4) zu erhöhten zellulären Spiegeln der einzelnen CcsR sRNAs (Abbildung 34 B, oberer Northern Blot) sowie des CcsR1-4 Vorläufertranskripts führt (Abbildung 34 B, unterer Northern Blot). Die Überexpression des *ccaF1* Gens zusammen mit den sRNAs CcsR1-4 (pRKccaF1_CcsR1-4) verursachte hingegen keinen substanziellen Anstieg der Mengen an CcsR RNAs und Vorläufertranskript. Wurde das *ccaF1* Gen allein über den 16S rRNA Promotor (pRKccaF1) überexprimiert, so nahmen die Spiegel der vom Chromosom exprimierten CcsR RNAs ab. Im Fall der Überexpression des *ccaF1* Gens zusammen mit den CcsR RNAs im Kontext eines Konstrukts, bei dem das ATG-Startcodon des *ccaF1* Gens gegen ein TGA-Stoppcodon ausgetauscht wurde (pRKccaF1mut_CcsR1-4), war ein ähnlicher Effekt wie bei der Überexpression des CcsR RNA-Clusters allein (pRKCcsR1-4) zu erkennen, d.h. es waren erhöhte Spiegel der einzelnen CcsR RNAs und des Vorläufertranskripts nachweisbar. Die gezeigten Northern Blots dokumentierten, dass die zellulären CcsR RNA-Spiegel direkt oder indirekt von dem Protein CcaF1 beeinflusst werden (Abbildung 34 B).

Das Protein CcaF1 aus *R. sphaeroides* 2.4.1 besitzt 71 Aminosäuren, wobei die DUF1127 Domäne aus 33 Aminosäuren besteht und am C-Terminus liegt; zusätzlich besitzt das Protein CcaF1 weitere 27 Aminosäuren am N-Terminus (Abbildung 34 A). Das homologe CcaF1 Protein aus *R. sphaeroides* KD131 umfasst hingegen nur 50 Aminosäuren mit nur 6 zusätzlichen Aminosäuren am N-Terminus. Ansonsten ist die Aminosäuresequenz der beiden homologen CcaF1-Proteine identisch (Abbildung 34 A). Bei einer Überexpression des Proteins CcaF1 aus *R. sphaeroides* KD131 (50 Aminosäuren) in *R. sphaeroides* 2.4.1 zeigte sich ebenfalls eine moderate Verringerung der einzelnen CcsR-Spiegel (Abbildung 34 C, oberer Northern Blot) sowie eine relativ starke Reduktion des CcsR1-4 Vorläufertranskripts (Abbildung 34 C, unterer Northern Blot). Dies bestätigt die Annahme, dass die 33 Aminosäuren der DUF1127 Domäne der CcaF1-Proteine einen entscheidenden Effekt auf die veränderten CcsR RNA-Spiegel haben.

In einer früheren Studie konnte gezeigt werden, dass das RNA-Chaperon Hfq einen Einfluss auf die Transkript-Spiegel der sRNAs CcsR1-4 hat (Billenkamp *et al.*, 2015). Wie bereits erwähnt ist Hfq ein RNA-Chaperon, das eine zentrale Rolle in der sRNA-vermittelten Genregulation spielt (Quendera *et al.*, 2020). Dabei kann Hfq trotz begrenzter Basen-Komplementarität die Duplexbildung zwischen einer sRNA und der entsprechenden mRNA vermitteln und die sRNA vor einem ribonukleolytischen Abbau schützen (Andrade & Arraiano, 2008; Lee & Feig, 2008; Cech *et al.*, 2016). Um zu testen, ob das RNA-Chaperon Hfq die Funktion des Proteins CcaF1 beeinflusst, wurden verschiedene Überexpressionplasmide (Abbildung 35 links) in einen *R. sphaeroides* Stamm mit einer Deletion des Gens *hfq* (Δhfq) konjugiert. Die so veränderten Δhfq Derivatstämme wurden anschließend unter mikroaeroben Bedingungen kultiviert und in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet. Die Gesamt-RNA wurde mittels Phenol-Extraktion isoliert und die RNA-Spiegel der sRNAs CcsR1, CcsR2, CcsR3/4 und des CcsR1-4 Vorläufertranskripts mittels Northern Blot-Analyse untersucht. Hier lässt sich feststellen, dass die CcsR RNA-Signale für den Δhfq Stamm allgemein schwächer waren als für den Wildtyp, jedoch ähnlich wie für den Wildtyp (Abbildung 34 B) führt die Überexpression des *ccaF1*-Gens zusammen mit den sRNAs CcsR1-4 (pRK*ccaF1*_CcsR1-4) zu keiner nennenswerten Verringerung der CcsR1-4 sRNA-Spiegel. Die Überexpression des *ccaF1*-Gens allein (pRK*ccaF1*) hatte in dem Δhfq Stammbhintergrund jedoch nur einen geringen Einfluss auf die CcsR RNA-Spiegel (Abbildung 35). Die Ergebnisse deuten auf eine wichtige Funktion von Hfq in der CcaF1-abhängigen Regulation der CcsR RNA-Spiegel, allerdings blieben die molekularen Ursachen auf Grundlage der gezeigten Northern Blots unklar.

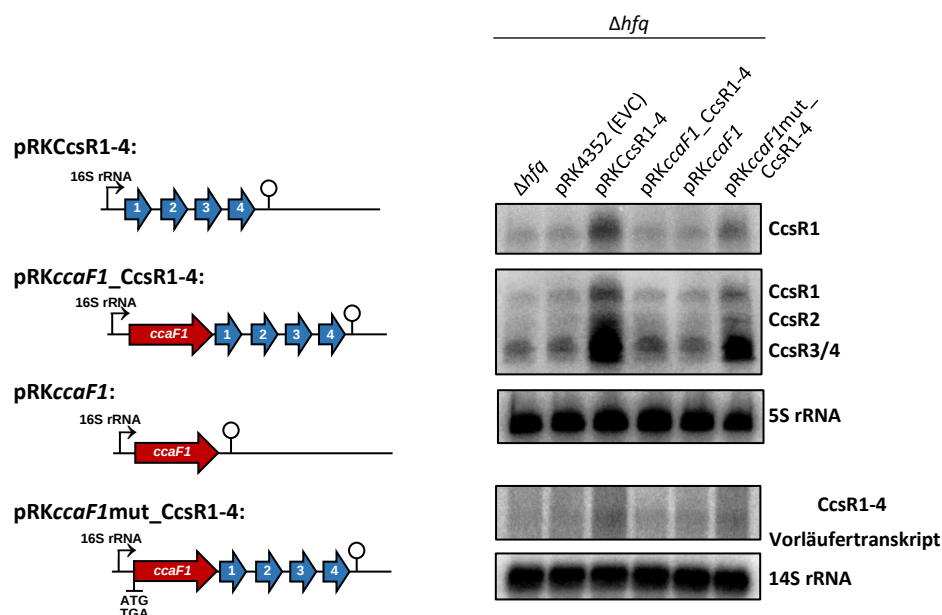


Abbildung 35: Einfluss von Hfq und DUF1127 Protein CcaF1 auf die CcsR RNA-Spiegel. Auf der linken Seite ist ein Überblick über die Plasmid-Konstrukte gezeigt, die in den *R. sphaeroides* Stamm Δhfq konjugiert wurden. Das Gen *ccaF1* aus *R. sphaeroides* 2.4.1 (71 Aminosäuren) ist in Rot und die sRNAs CcsR1-4 sind in Blau dargestellt. Auf der rechten Seite ist die Northern Blot-Analyse von *R. sphaeroides* Wildtyp und *R. sphaeroides* mit den entsprechenden Überexpressionsplasmiden in der exponentiellen Wachstumsphase gezeigt. Jeweils 7,5 μ g Gesamt-RNA pro Spur wurden in einem 10%igen denaturierenden TBE-Polyacrylamid-Harnstoffgel (obere Gele) oder 10 μ g Gesamt-RNA pro Spur in einem 1% Formaldehyd-Agarosegel (untere Gele) aufgetrennt. Die sRNAs CcsR1, CcsR2, CcsR3/4 und CcsR1-4 wurden mit spezifischen, radioaktiv markierten Oligonukleotid-Sonden nachgewiesen. Die 5S und 14S rRNAs dienten als Ladekontrollen (modifiziert nach Grützner *et al.*, 2021a).

Um auszuschließen, dass eine Überexpression von CcaF1 die Promotoraktivität des eigenen Gens und dadurch die CcsR RNA-Spiegel beeinflusst, wurde die Promotoraktivität mit und ohne gleichzeitige Überexpression von CcaF1 gemessen. Dazu wurden 100 Basenpaare *upstream* des *ccaF1*-Transkriptionsstarts transkriptionell mit dem Fluoreszenzprotein eCFP fusioniert (pBE::P_{ccaF1_100bp}:eCFP; Peng *et al.*, 2016) und dieses Plasmid zusammen mit dem Plasmid pRK*ccaf1* in *R. sphaeroides* konjugiert (Abbildung 36). Anschließend wurde die Fluoreszenz und damit Aktivität des nativen *ccaF1* Promotors in der exponentiellen Phase unter mikroaeroben Bedingungen bei einer Anregungs-Wellenlänge von 434 nm und einer Emissions-Wellenlänge von 477 nm gemessen. Zusätzlich wurde die Fluoreszenz unter Hitzestress (42 °C) gemessen, da eine besonders starke Expression der CcsR1 RNAs unter Hitzestress beobachtet wurde (Abbildung Anhang 4). Als Kontrolle diente die Messung der Autofluoreszenz der Leervektorkontrolle (pRK4352(ECV)) ohne eine Promotor:eCFP Fusion, die auf 100 % gesetzt wurde. In der exponentiellen Wachstumsphase wurde ein Fluoreszenzanstieg von 20-35 % im Vergleich zur Kontrolle gemessen. Dies entspricht der basalen Promotoraktivität bei einer Wachstumstemperatur von 32 °C. Unter Hitzestress stieg die gemessene Fluoreszenz um 70-90 % an, was einer verstärkten Promotoraktivität bei 42 °C entspricht (Abbildung 36). Da zwischen der Leervektorkontrolle (pRK4352 (ECV)) und dem *ccaF1* Überexpressionsstamm (pRK*ccaf1*) kein signifikanter Unterschied in der Fluoreszenz beobachtet werden konnte, kann also ein Einfluss des Proteins CcaF1 auf die Promotoraktivität des eigenen Operons ausgeschlossen werden. Dies legt im Umkehrschluss nahe, dass das Protein CcaF1 einen möglichen Einfluss auf die RNA-Prozessierung und -Degradation der CcsR RNAs ausübt, was sich auf Grundlage der Northern Blots in Abbildung 34 bereits vermuten ließ.

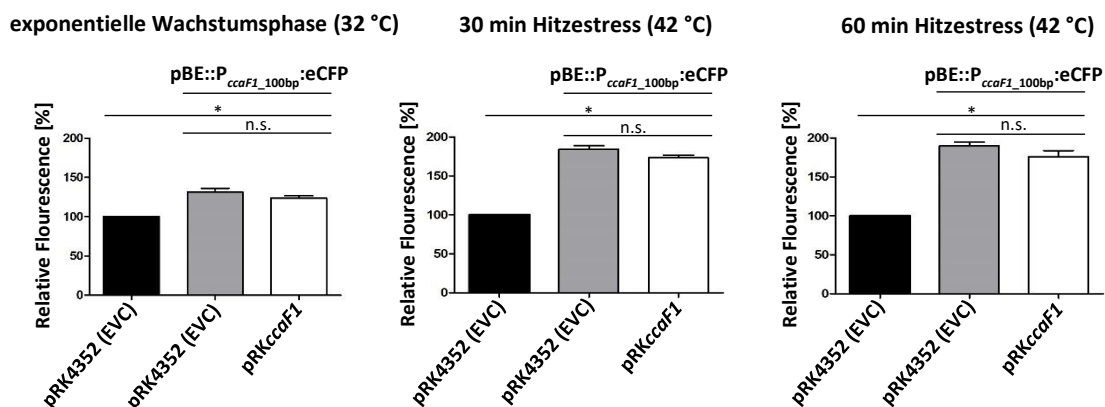


Abbildung 36: Promotoraktivität des *ccaF1*-CcsR1-4 Operons. 100 Basenpaare (bp) *upstream* des Transkriptionsstarts des Gens *ccaF1* wurden mit dem Fluoreszenzprotein eCFP fusioniert (pBE::P_{ccaF1_100bp}:eCFP; Peng *et al.*, 2016) und zusammen mit dem Plasmid pRK*ccaf1* in *R. sphaeroides* konjugiert. Die Fluoreszenz wurde in der exponentiellen Wachstumsphase unter Standardbedingungen (32 °C) sowie unter Hitzestress (42 °C) gemessen (Anregung 434 nm; Emission 477 nm) und auf die optische Dichte normalisiert. Die Autofluoreszenz der Leervektorkontrolle ohne Promotor:eCFP Fusion wurde auf 100 % gesetzt und die Fluoreszenzwerte der Promotor:eCFP Fusion entsprechend angepasst. Das Experiment wurde in biologischen Triplikaten und technischen Duplikaten durchgeführt. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung. Die Signifikanz wurde mittels t-Test berechnet (* signifikant ($p \leq 0,05$); n.s. nicht signifikant ($p \geq 0,05$); modifiziert nach Grützner *et al.*, 2021a).

Aus der Literatur ist bekannt, dass die Endoribonuklease E (RNase E) in vielen Bakterien an der Prozessierung und damit Freisetzung zahlreicher sRNAs aus 5' oder 3' UTRs beteiligt ist (Massé *et al.*, 2003; Morita *et al.*, 2005; Deutscher, 2006). Northern Blot-Analysen und RNASeq-Daten zeigten, dass die Prozessierung des *ccaF1*-CcsR1-4 Vorläufertranskripts in die *ccaF1* mRNA und die einzelnen CcsR sRNAs von der RNase E abhängig ist (Abbildung Anhang 5), während die Polynukleotidphosphorylase (PNPase) für die Degradation der sRNAs und des Vorläufertranskripts verantwortlich ist (Billenkamp *et al.*, 2015; Förstner *et al.*, 2018; Spanka *et al.*, 2021). Die RNase E präferiert in *R. sphaeroides* vor allem AU-reiche, einzelsträngige Abschnitte als Erkennungssequenz (Förstner *et al.*, 2018). Für die sRNA CcsR1 liegt die Prozessierungsstelle am 5' Ende in der Sequenz 5'-GUUUC, für CcsR2 in der Sequenz 5'-CUCUUC, für CcsR3 in der Sequenz 5'-ACUUC und für CcsR4 in der Sequenz 5'-ACUUC. Um die Funktion und den Einfluss der RNase E und des DUF1127 Proteins CcaF1 auf die Prozessierung des *ccaF1*-CcsR1-4 Vorläufertranskripts genauer zu untersuchen, wurden Northern Blot-Analysen mit *R. sphaeroides* Wildtyp, einer Mutante mit thermosensitiver heterologer RNase E Substitution (*rne*^{*E.coli(ts)*}) und Wildtyp-Zellen, die CcaF1 (pRK*ccaF1*) überexprimieren, durchgeführt. Das Wachstum der Zellen erfolgte unter Standardbedingungen bei 32 °C sowie bei Hitzestress (42 °C), jeweils unter mikroaeroben Bedingungen. Die Gesamt-RNAs wurden für die Northern Blot-Analysen mit heißem Phenol aus den Zellen isoliert. Für die Detektion der *ccaF1*-CcsR1-4 und CcsR1-4 Vorläufertranskripte wurden spezifische, radioaktiv markierte PCR-Produkte verwendet, die komplementär zu den entsprechenden Transkripten waren.

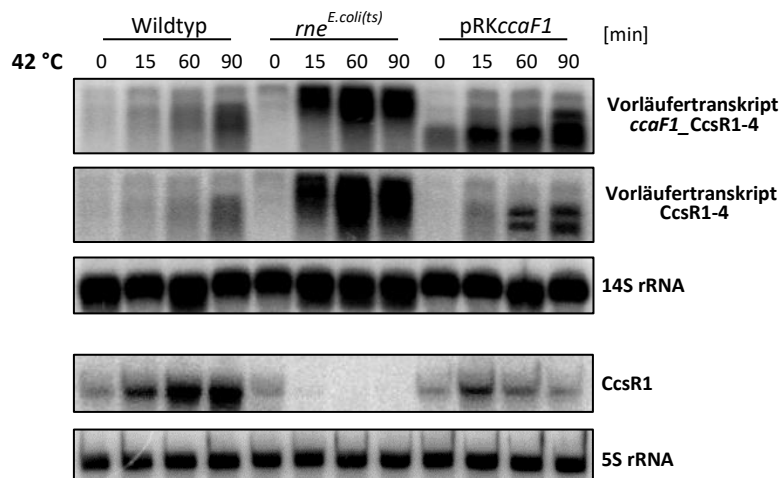


Abbildung 37: Einfluss von RNase E und CcaF1 auf die Prozessierung der CcsR RNAs. Northern Blot-Analyse der *ccaF1*-CcsR1-4 und CcsR1-4 Vorläufertranskripte sowie der CcsR1 RNA in *R. sphaeroides* Wildtyp, der thermosensitiven RNase E Substitutionsmutante (*rne*^{*E.coli(ts)*}) und in Wildtyp-Zellen, die das CcaF1 plasmidständig (pRK*ccaF1*) überexprimieren. Die entsprechenden Kulturen wurden nur bei 32 °C (t = 0 min) oder in Gegenwart Hitzestress (42 °C) bis zu 90 min lang inkubiert; die hitzestressierten Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet und die Gesamt-RNA isoliert. Jeweils 10 µg Gesamt-RNA pro Spur wurden in einem 1 % Formaldehyd-Agarosegel (obere Gele) bzw. 7,5 µg Gesamt-RNA pro Spur in einem denaturierenden TBE-Polyacrylamid-Harnstoffgel aufgetrennt (untere Gele). Zum Nachweis des *ccaF1*-CcsR1-4 und CcsR1-4 Vorläufertranskripts wurden spezifische, radioaktiv markierte PCR-Sonden und für die sRNA CcsR1 eine radioaktiv markierte Oligonukleotid-Sonde verwendet. Die 5S und 14S rRNAs dienten als Ladekontrolle (modifiziert nach Grützner *et al.*, 2021a).

Im *R. sphaeroides* Wildtyp ist über die Zeit unter Hitzestress (42 °C) eine Anreicherung der *ccaF1*-CcsR1-4 und CcsR1-4 Vorläufertranskripte zu erkennen (Abbildung 37), was die verstärkte Promotoraktivität und Expression des Operons unter Hitzestress bestätigt (Abbildung 36). Gleichzeitig erkennt man, dass es auch zu einer Anreicherung der CcsR1 RNA kommt, was für eine Prozessierung bzw. „Reifung“ des Vorläufertranskripts in die einzelnen sRNAs spricht. In der thermosensitiven RNase E Substitutionsmutante (*rne*^{*E.coli(ts)*}) ist eine verstärkte Anreicherung der *ccaF1*_CcsR1-4 und CcsR1-4 Vorläufertranskripte detektierbar, jedoch keine Akkumulation der sRNA CcsR1. Dies dokumentiert, dass die Prozessierung der Primärtranskripte RNase E-abhängig ist, da in der Mutante mit thermosensitiver RNase E-Substitution bei 42 °C weder eine Prozessierung der Vorläufertranskripte noch eine Freisetzung der einzelnen sRNAs stattfindet. Im Fall der Überexpression des DUF1127 Proteins CcaF1 (*pRKccaF1*) ist das Erscheinungsbild intermediär zwischen Wildtyp und Substitutionsmutante. So sind die Spiegel der Vorläufertranskripte gegenüber dem Wildtyp erhöht (allerdings geringer als bei der Substitutionsmutante) und die sRNA CcsR1 ist detektierbar, allerdings mit geringerer Signalstärke als im Wildtyp. Somit hat nicht nur die RNase E, sondern auch das DUF1127 Protein CcaF1 einen Einfluss auf die Prozessierung und Freisetzung der CcsR RNAs aus dem *ccaF1*_CcsR1-4 Primärtranskript. Das kleine CcaF1 Protein könnte dabei über eine Interaktion mit dem RNA-Molekül oder mit der RNase E die Prozessierung beeinflussen. Der genaue Mechanismus bzw. das Zusammenspiel von RNase E und CcaF1 erfordert jedoch weitere Untersuchungen.

In den Northern Blots konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression des CcsR1-4 Clusters (*pRKCcsR1-4*) zu einem erhöhten RNA-Spiegel der einzelnen CcsR sRNAs führt (Abbildung 34 B). Die Überexpression des Proteins CcaF1 (*pRKccaF1*) hingegen führt zu einem verringerten CcsR RNA-Spiegel und zu einer Anreicherung der Vorläufertranskripte (Abbildung 34 B und 37). In Billenkamp *et al.* 2015 konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression der CcsR RNAs (*pRKCcaR1-4*) in *R. sphaeroides* zu einer höheren Resistenz gegenüber verschiedenen Stressbedingungen führt. Die sRNAs regulieren über eine direkte Bindung an die mRNA von *flhR*, die für ein Transkriptionsregulator kodiert, den C1-Metabolismus. Um zu testen, welchen Einfluss das DUF1127 Protein CcaF1 auf die Stressresistenz von *R. sphaeroides* hat, wurden verschiedene physiologische Experimente durchgeführt (Abbildung 38). Eine Wachstumsanalyse unter mikroaeroben Bedingungen bei 32 °C offenbarte, dass die Überexpression des CcsR1-4 RNA-Clusters (*pRKCcsR1-4*) in der exponentiellen Phase zu einer längeren Verdopplungszeit von 5,5 h gegenüber 3,5 h für den Wildtyp führt (Abbildung 38 A). Die Überexpression des gesamten Operons (*pRKccaF1*_CcsR1-4) bzw. des Proteins CcaF1 (*pRKccaF1*) resultierte hingegen in einer ähnlichen Verdopplungszeit wie für den Wildtyp und die Leervektorkontrolle (3,9 bzw. 3,4 h). Allerdings führte die Überexpression des Proteins CcaF1 (*pRKccaF1*) zu einer verlängerten Lag-Phase von über 7 Stunden (Abbildung 38 A). Obwohl sich die einzelnen Überexpressionsstämme in ihrer Lag-Phase und Verdopplungszeit mehr oder minder unterschieden, erreichten sie jedoch alle die stationäre Phase nach ca. 20 Stunden bei ähnlichen optischen Dichten (Abbildung 38 A).

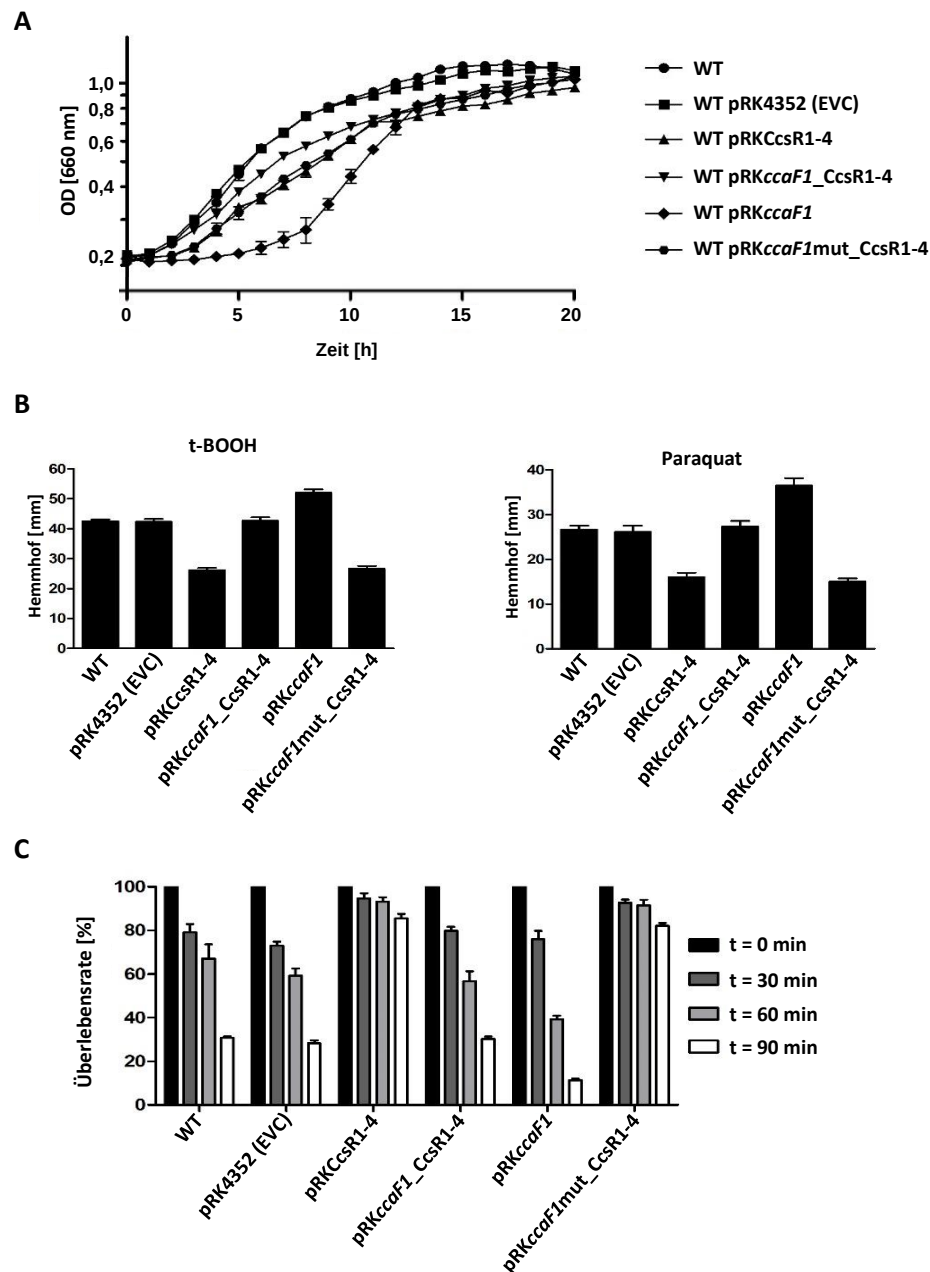


Abbildung 38: Einfluss des DUF1127 Proteins CcaF1 auf das Wachstum und die Stressresistenz von *R. sphaeroides*. (A) Analyse des Wachstums des *R. sphaeroides* Wildtyps und der Derivatstämme mit den entsprechenden Überexpressionsplasmiden (Siehe Abbildung 34) bei 32 °C und unter mikroaeroben Bedingungen. Die Messung der optischen Dichte (OD) erfolgte bei einer Wellenlänge von 660 nm in biologischen Triplikaten. Der Mittelwert mit der Standardabweichung ist halblogarithmisch gegenüber der Zeit [h] aufgetragen. (B) Analyse der Stressresistenz der in (A) verwendeten Stämme anhand von Hemmhoftests in Gegenwart eines organischen Peroxids (700 mM t-BOOH) bzw. eines Superoxids (300 mM Paraquat). Die Diagramme zeigen die Mittelwerte mit Standardabweichung, basierend auf biologischen Triplikaten und technischen Duplikaten. (C) Analyse der Überlebensrate der verschiedenen *R. sphaeroides* Stämme unter organischem Peroxidstress (300 mM t-BOOH). Die Überlebensrate ohne Zugabe des Stressors (t = 0 min) wurde auf 100 % gesetzt und die Überlebensrate nach den entsprechenden Stressexpositionszeiten anhand der *colony forming units* (CFU) berechnet. Das Experiment wurde in biologischen Triplikaten und technischen Duplikaten durchgeführt; dargestellt sind die Mittelwerte und ihre Standardabweichungen (modifiziert nach Grützner *et al.*, 2021a).

Zur Untersuchung der Stressresistenz wurden Hemmhoftests und Analysen der Überlebensrate für die Überexpressionsstämme *R. sphaeroides* pRKcCsR1-4, pRKccaF1_CcsR1-4, pRKccaF1 und pRKccaF1mut_CcsR1-4 im Vergleich zum *R. sphaeroides* Wildtyp und der Leervektorkontrolle [pRK4352 (EVC)] unter organischem Peroxidstress (t-BOOH) und Superoxidstress (Paraquat) durchgeführt (Abbildung 38 B und C). Die Überexpression des CcsR1-4 sRNA-Clusters (pRKcCsR1-4) und die Überexpression des gesamten Operons mit einer Mutation des *ccaF1* Start-Codons zu einem Stopp-Codon (pRKccaF1mut_CcsR1-4) resultierte sowohl in einer verstärkten Stressresistenz im Hemmhoftest (Abbildung 38 B) als auch in einer erhöhten Überlebensrate relativ zum *R. sphaeroides* Wildtyp mit und ohne Leervektor (Abbildung 38 C). Vergleicht man diese Ergebnisse mit den Northern Blots der Abbildung 34 B, so erkennt man, dass es eine Korrelation zwischen der erhöhten Stressresistenz und den erhöhten Spiegeln der sRNAs CcsR1-4 gibt. Eine Überexpression der sRNAs führt folglich zu einer höheren Stresstoleranz. Die Überexpression des Proteins CcaF1 (pRKccaF1) zeigt im Hemmhoftest und in den ermittelten Überlebensraten hingegen eine verringerte Stressresistenz bzw. eine verringerte Überlebensrate (Abbildung 38 B und C). Dies korreliert mit der Northern Blot-Analyse in Abbildung 34 B, die reduzierte CcsR1-4 RNA-Spiegel bei Überexpression von CcaF1 zeitigte.

Die Ergebnisse aus den verschiedenen Northern Blot-Analysen demonstrieren, dass das DUF1127 Protein CcaF1 bei Überexpression (pRKccaF1) einen Einfluss auf die Prozessierung des *ccaF1_CcsR1-4* Vorläufertranskript hat, wobei es zu einer Verringerung der CcsR RNA-Spiegel kommt (Abbildung 34 und 37). Daraus resultiert eine niedrigere Resistenz von *R. sphaeroides* gegenüber oxidativem Stress (Abbildung 38 B und C) und womöglich eine verlängerte Lag-Phase in der Wachstumskurve (Abbildung 38 A). Jedoch geben die Northern Blots und die physiologischen Untersuchungen keinen eindeutigen Hinweis, ob das Protein CcaF1 mit den sRNAs oder dem Vorläufertranskript direkt als RNA-bindendes Protein interagiert, oder ob es sich dabei um einen indirekten Effekt handelt.

3.2.2 Der Einfluss von CcaF1 auf das Transkriptom von *R. sphaeroides*

Im vorherigen Abschnitt konnte gezeigt werden, dass das DUF1127 Protein CcaF1 einen Einfluss auf die Prozessierung und „Reifung“ des *ccaF1_CcsR* Vorläufertranskript besitzt und darüber die Stressresistenz beeinflusst. Da regulatorische Proteine meistens mehrere Funktionen in einer Zelle besitzen, wurde der Effekt des Proteins CcaF1 nicht nur auf die sRNAs CcsR1-4 untersucht, sondern auch auf das gesamte Transkriptom von *R. sphaeroides*. Dafür wurden eine RNA-Hochdurchsatzsequenzierung (RNASeq) und anschließende DESeq2 Analyse mit Gesamt-RNA-Präparationen aus *R. sphaeroides* Zellen durchgeführt, die das Plasmid pRKccaF1 bzw. die Leervektorkontrolle [pRK4352 (EVC)] tragen. Für die RNASeq wurden die beiden Stämme in biologischen Triplikaten unter mikroaeroben Wachstumsbedingungen kultiviert und nach dem Erreichen der exponentiellen Phase ($OD_{660} = 0,6$) geerntet. Die Gesamt-RNA wurde mit heißem Phenol isoliert und anschließend einer DNase-Behandlung unterzogen, um mögliche DNA-Kontaminationen zu entfernen. Bevor die Proben zur Sequenzierung verwendet wurden, wurde die Qualität der Gesamt-RNA auf einem denaturierenden TBE-Polyacrylamid-Harnstoffgel überprüft (Abbildung Anhang 6). Die großen ribosomalen RNAs (16S rRNA und 14S rRNA) zeigten dabei keinerlei Degradation und wurden daher in die RNA-Sequenzierung gegeben (Core Unit SysMed, Universität Würzburg). Die Auswertung

der Daten (Tabelle 64 und 65; Abbildung 39 A-C) wurde in Zuge dieses Projekts von Daniel-Timon Spanka durchgeführt und ist im Detail in Grützner *et al.* 2021 beschrieben.

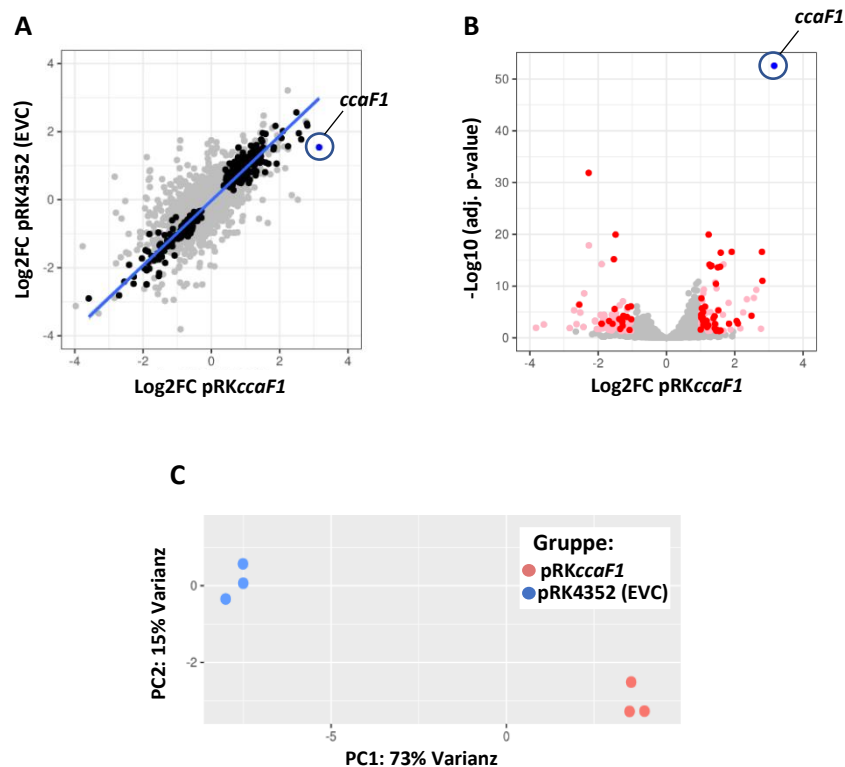


Abbildung 39: Einfluss des Proteins CcaF1 auf das Transkriptom von *R. sphaeroides*. (A) Die Korrelation aller Gene aus der DESeq2-Analyse von *R. sphaeroides* pRKccaF1 und *R. sphaeroides* pRK4352 (EVC) wurde mittels MM Plot dargestellt. Der Korrelationskoeffizient ist nach Pearson berechnet (Schober *et al.*, 2018). Jeder Punkt entspricht dabei einem Gen aus der DESeq2 Analyse. (B) Volcano Plot für den Vergleich der RNASeq-Daten der beiden Stämme. Gene mit signifikanter Veränderung der Abundanz sind rot (angepasster p-Wert $\leq 0,05$, $\log_2FC \leq -1$ oder ≥ 1 , *basemean* > 100) und rosa (angepasster p-Wert $\leq 0,05$, $\log_2FC \leq -1$ oder ≥ 1 , *basemean* ≤ 100) dargestellt. Graue Punkte: angepasster p-Wert $> 0,05$. (C) Scatter Plot für die Gruppierung der biologischen Triplikate [*R. sphaeroides* pRK4352 (EVC) und pRKccaF1; modifiziert nach Grützner *et al.*, 2021a].

Die Korrelation aller Gene aus der DESeq2-Analyse von *R. sphaeroides* pRK4352 (EVC) und *R. sphaeroides* pRKccaF1 wurde in einem MM-Plot dargestellt (Abbildung 39 A). Da sich die einzelnen Replikate der beiden Stämme unterschieden, entstand keine perfekte Korrelation zwischen beiden Stämmen, sondern eine leichte Streuung der Datenpunkte. Der Volcano Plot in der Abbildung 39 B vergleicht die statistische Signifikanz in Form des p-Werts (*p-value*; $\leq 0,05$) mit der Veränderung der *read*-Zahlen ($\log_2FC$; *fold change*). Für die Erstellung des Volcano Plots wurden nur Gene berücksichtigt, deren *basemean* zusätzlich bei ≥ 100 lag. Der *basemean* beschreibt, dass in der finalen Auswertung nur Gene verwendet werden, die im Durchschnitt aller *reads* in beiden Stämmen mehr als 100 *reads* aufwiesen. Außerdem wurde die Obergrenze (*cut-off* Wert) für den $\log_2FC$ auf ≤ -1 bzw. $\geq +1$ mit einem p-Wert von $\leq 0,05$ gewählt, um potenziell falsch-positive Gene auszuschließen. Mit diesen gesetzten Parametern wurden nur noch 1487 von 4411 *R. sphaeroides* Genen in die Datenauswertung einbezogen. Die Reproduzierbarkeit der biologischen Triplikate wurde anhand eines

Scatter Plots dargestellt, der eine hohe Reproduzierbarkeit zwischen den einzelnen Proben zeigt (Abbildung 39 C).

Tabelle 64: Veränderung der mRNA-Spiegel (Log2FC-Ratio $\geq +1$) entsprechend der DESeq2-Analyse von *R. sphaeroides* pRK4352 (EVC) und *R. sphaeroides* pRKccaF1.

Lokus	Gen	Funktion	Log2FC
RSP_6037	<i>ccaF1</i>	hypotetisches Protein	3,16
RSP_3387		TRAP-T Transporter	2,81
RSP_2115	<i>envA</i>	UDP-3-O-acyl N-Acetylglucosamin-Deacetylase	2,8
RSP_3509	<i>expE1</i>	Hemolysin-Typ Calcium-binde Region	2,49
RSP_4255		Mechanosensitive (MS) Inonenkanalprotein	2,09
RSP_3095		RNA-Polymerase $\sigma 70$ -Factor	2,05
NA		3' Ende RSP_3595	1,91
RSP_3094		putative Transmembran Anti- σ - Factor	1,83
RSP_0904	<i>sitA</i>	ABC Mn ²⁺ Transporter	1,59
RSP_1468		DNA-Methyltransferase	1,59
RSP_4139	<i>parA</i>	<i>parA like</i> -Protein	1,57
RSP_7535		NA	1,54
RSP_2402		putative TonB-abhängige Vitamin B12 <i>outer membrane</i> Rezeptor	1,52
RSP_2360		putative HK97 <i>family</i> Protein	1,5
RSP_0906	<i>sitC</i>	ABC Mn ²⁺ Transporter	1,49
RSP_0905	<i>sitB</i>	ABC Mn ²⁺ Transporter	1,46
RSP_7578		NA	1,45
RSP_2086		Putative antibiotische Monooxygenase	1,42
RSP_7545		NA	1,41
RSP_3093		vorhergesagtes Membranprotein	1,41
RSP_1909		Secretin	1,38
RSP_2809		ABC Transporter	1,32
RSP_1182		putative <i>outer membrane</i> Protein	1,3
RSP_3328		hypothetical protein	1,26
NA		RSspA01	1,23
RSP_1494		putative aspartate aminotransferase	1,23
RSP_3092		hypotetisches Protein	1,19
NA		SorX; RSs2461	1,17
RSP_2110	<i>murB</i>	UDP-N-Acetylenolpyruvoylglucosamin Reduktase/Dehydrogenase	1,15
NA		NA	1,13
RSP_0019		hypotetisches Protein	1,09
RSP_2827	<i>cobN</i>	Kobaltochelataase	1,08
RSP_0126		hypotetisches Protein	1,07
RSP_6098		hypotetisches Protein	1,07
RSP_2218		hypotetisches Protein	1,06
RSP_3808		hypotetisches Protein	1,02
RSP_7680		NA	1,04
RSP_3865		Transkriptionsregulator	1,04
RSP_3071		putative Hydroxypyruvat Reduktase/Glyceratekinase	1,03
RSP_3072	<i>sndH</i>	putative L-Sorbose Dehydrogenase	1,02
RSP_3574	<i>hutH</i>	putative Histidin Ammoniaklyase	1,01
RSP_1807		hypotetisches Protein	1,0

Tabelle 65: Veränderung der mRNA-Spiegel (Log2FC-Ratio ≤ -1) entsprechend der DESeq2-Analyse von *R. sphaeroides* pRK4352 (EVC) und *R. sphaeroides* pRKccaF1.

Lokus	Gen	Funktion	Log2FC
RSP_2207	<i>deoD</i>	Purine-Nukleoside-Phosphorylase	-2,6
RSP_3620		<i>cold-shock</i> DNA-Bindeprotein	-2,3
RSP_4347		rRNA	-1,9
RSP_4294		rRNA	-1,9
RSP_1844		hypotetisches Protein	-1,7
RSP_6085		hypotetisches Protein	-1,6
RSP_1952		<i>cold-shock</i> DNA-Bindeprotein	-1,5
RSP_0718	<i>rpsU</i>	30S ribosomales Protein S21	-1,5
RSP_3621		<i>cold-shock</i> DNA-Bindeprotein	-1,5
RSP_7191		hypotetisches Protein	-1,4
RSP_4352		rRNA	-1,4
RSP_2913		ABC Fe ³⁺ Siderophore-Transporter	-1,3
RSP_2736	<i>pgi</i>	Glucose-6-Phosphat-Isomerase	-1,3
RSP_6235		hypotetisches Protein	-1,3
NA	NA	RSs0058	-1,3
RSP_1140	<i>ilvE1</i>	Verzweigt-kettige Aminosäuren Aminotransferase	-1,2
RSP_1883		ABC Polyamine/Opine Transporter	-1,1
RSP_4285		hypotetisches Protein	-1,1
RSP_1884		ABC Polyamine/Opine Transporter	-1
RSP_7363		hypotetisches Protein	-1

Die DESeq2 Analyse zeigte, dass die *read*-Zahlen von 42 Genen in *R. sphaeroides* pRKccaF1 im Vergleich zu *R. sphaeroides* pRK4352 mit einem Log2FC von $\geq +1$ erhöht sind (Tabelle 64). Die mRNA für das Gen *ccaF1* (RSP_6037) besitzt mit 3,2 den größten Log2FC in der DESeq2 Analyse, was Sinn macht, da *ccaF1* verstärkt über den 16S rRNA Promotor des Plasmidvektors pRKccaF1 exprimiert wird (Tabelle 64). Außerdem zeigten die mRNAs für den RNA Polymerase σ -70 Faktor (RSP_3095) und den entsprechenden Anti- σ -Faktor Faktor (RSP_3094) erhöhte Spiegel mit einem Log2FC von 2,05 bzw. 1,83 (Tabelle 64). Aus einer vorherigen Studie ist bekannt, dass der alternative σ -70 Faktor in *R. sphaeroides* eine Rolle beim Übergang von der exponentiellen in die stationäre Wachstumsphase spielt (McIntosh *et al.*, 2019). Neben dem alternativen σ -70 Faktor und dessen Anti- σ -70 Faktor waren auch die mRNA-Transkript-Spiegel für *sitA*, *sitB* und *sitC* in der DESeq2 Analyse gesteigert (Tabelle 64). Diese Gene kodieren in *R. sphaeroides* ein Mangan (Mn²⁺) Transporter-System. Neben den bekannten RNAs zeigten auch acht mRNA-Transkripte erhöhte *read*-Zahlen, die hypothetische Proteine kodieren (Tabelle 64). Dazu gehört unter anderem auch RSP_0019, das ebenfalls ein Protein mit einer DUF1127 Domäne kodiert. Zusätzlich zu den kodierenden mRNAs waren auch die *read*-Zahlen für drei Transkripte nicht kodierender RNAs (3' Enden von RSP_3595, RSsPA01 und SorX) in der DESeq2 Analyse erhöht (Tabelle 64). SorX ist eine sRNA, die in der Studie von Peng *et al.* 2016 charakterisiert wurde. Die sRNA SorX wird aus der 3' UTR des *ompR*-1 Gens prozessiert und reguliert den Polyamin-Transporter unter Singulett-Sauerstoffstress und organischen Hydroperoxid-Stress über eine direkte Bindung (Peng *et al.*, 2016).

Außerdem zeigte die DESeq2 Analyse, dass die RNA-Transkript-Mengen von 20 Genen in *R. sphaeroides* pRKccaF1 im Vergleich zu *R. sphaeroides* pRK4352 mit einem Log2FC von ≤ -1 reduziert sind. Dazu gehören unter anderem die ribosomalen RNAs 23S (RSP_4294, RSP_4352) und 16S (RSP_4347), die einen Log2FC von -1,9 bzw. 1,4 zeigten (Tabelle 65). Zusätzlich zeigten auch drei mRNAs für DNA-bindende *cold-shock* Proteine (RSP_3620, RSP_3621 und RSP_1952) und sechs mRNAs, die hypothetische Proteine kodieren (RSP_1844, RSP_6085, RSP_7191, RSP_6235, RSP_4285 und RSP_7363), einen Log2FC von ≤ -1 (Tabelle 65). In dieser Gruppe war auch eine bisher nicht charakterisierte sRNA (RSs0058), mit einem Log2FC von -1,3 in der DESeq2 Analyse (Tabelle 65). Die sRNAs CcsR1-4, die in den Northern Blots ein geringeres Signal bei Überexpression von CcaF1 zeigten (Abbildung 34), konnten aufgrund des gewählten p-Werts (*p-value*) von $\leq 0,05$ in den finalen Daten nicht berücksichtigt werden. Dies ist auch der Fall für verschiedene tRNAs und weitere sRNAs, die durch den gesetzten *cut-off* Wert nicht in die finalen Daten einfließen.

Die RNASeq-Daten zeigen, dass das Protein CcaF1 durch eine Überexpression nicht nur einen regulatorischen Einfluss auf die Spiegel der CcsR RNAs besitzt, sondern auch auf andere RNA-Spezies aus dem Transkriptom von *R. sphaeroides*. Zu diesen gehören unter anderem mRNAs, rRNAs und sRNAs (Tabelle 64 und 65), die unterschiedliche physiologische Funktionen in der Zelle haben. Jedoch lässt sich anhand der RNASeq-Daten nicht sagen, ob das Protein CcaF1 durch RNA-Bindung einen direkten Einfluss auf die entsprechenden RNA-Transkripte nimmt oder nur einen indirekten, über andere Faktoren in der Zelle vermittelten Einfluss auf die entsprechenden RNA-Transkripte hat.

3.2.3 Identifizierung von CcaF1-Interaktionspartnern

Da die DUF1127 Domäne eine 70 %ige Homologie zu dem RNA-bindenden Smaug Protein aus *D. melanogaster* besitzt, war eine Interaktion des Proteins CcaF1 mit verschiedenen RNA-Molekülen in *R. sphaeroides* denkbar. Die RNASeq-Daten im Abschnitt 3.2.2 zeigten, dass CcaF1 die Spiegel verschiedener RNA-Spezies wie mRNAs, rRNAs und sRNAs (Tabelle 64 und 65) im Transkriptom von *R. sphaeroides* beeinflusst. Jedoch konnte anhand der RNASeq-Daten nicht geklärt werden, ob CcaF1 direkt an die entsprechenden RNA-Moleküle bindet oder diese indirekt reguliert. Um zu verifizieren, dass CcaF1 mit seiner DUF1127 Domäne grundsätzlich RNAs binden kann und um mögliche Interaktionspartner zu identifizieren, wurde eine Co-Immunopräzipitation (CoIP) mit anschließender RNA-Sequenzierung durchgeführt (RipSeq). Für die CoIP wurde das Protein CcaF1 mit einem N-terminalen 3xFLAG-tag bzw. ohne 3xFLAG-tag unter Kontrolle des 16S rRNA-Promotor (RSP_4352) in das Plasmid pRK4352 kloniert (pRKccaF1FLAG_NT bzw. pRKccaF1). Die entsprechenden *R. sphaeroides* Stämme wurden bei 32 °C und mikroaeroben Bedingungen bis zu einer OD₆₆₀ von 0,6 kultiviert. Das Protein und die gebundene RNA wurde nach dem Zellaufschluss mit anti-FLAG M2 Antikörpern präzipitiert, die an magnetische Dyna-Beads gebunden waren. Die gebundene RNA wurde anschließend über eine Phenol-Extraktion von CcaF1 und anderen Proteinen getrennt und mit Ethanol gefällt. Um auszuschließen, dass die präzipitierte RNA nach DNase-Behandlung noch DNA-Kontaminationen enthält, wurde eine RT-PCR mit spezifischen Primern für die sRNA CcsR1 durchgeführt (Abbildung 40).

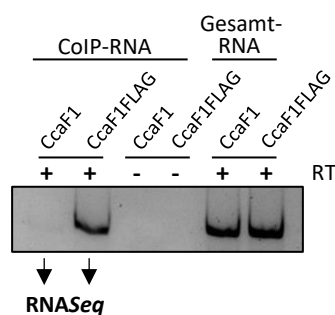
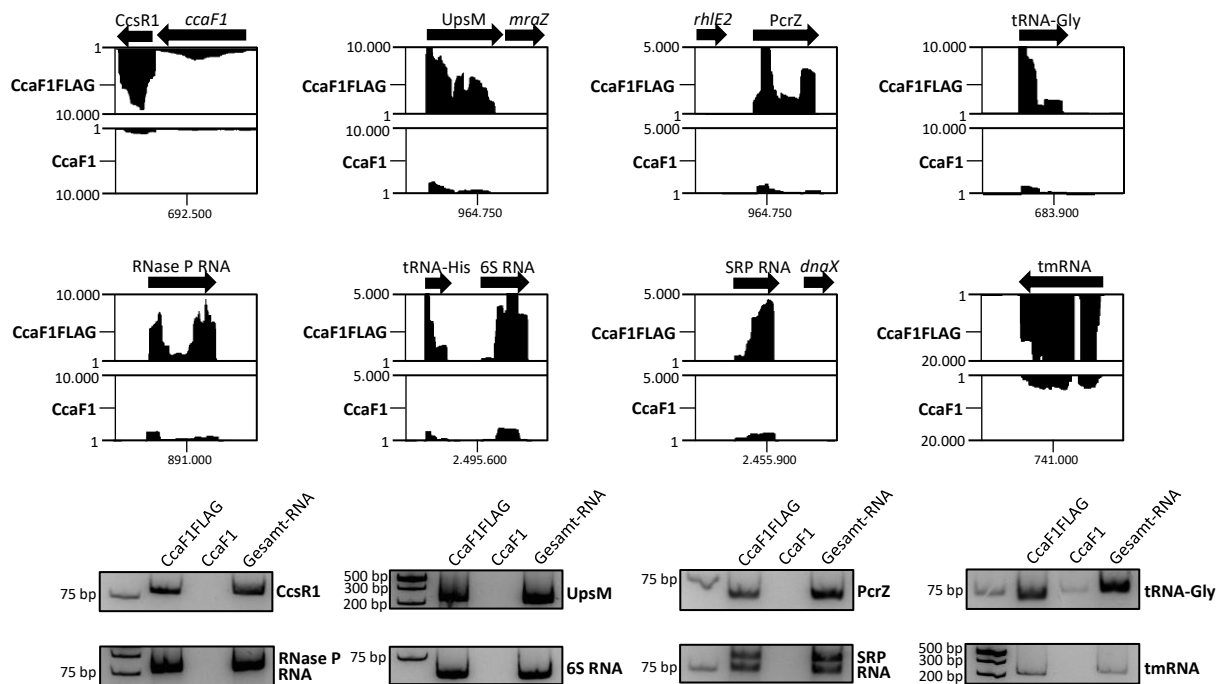


Abbildung 40: Qualitätskontrolle der CoIP RNA mittels RT-PCR. Die isolierte RNAs aus den CoIPs von CcaF1 mit 3xFLAG-tag und CcaF1 ohne 3xFLAG-tag als Kontrolle sowie Gesamt-RNA aus dem Zell-Lysat wurden in eine RT-PCR mit und ohne reverse Transkriptase (RT) eingesetzt, um die Wirksamkeit des DNase-Verdau und die Qualität der RNA vor der RNA-Sequenzierung zu überprüfen. Die RT-PCR wurde mit spezifischen Primern für die sRNA CcsR1 durchgeführt. Die Proben wurden auf ein 10 %iges Polyacrylamidgel aufgetragen und nach der Elektrophorese mit Ethidiumbromid gefärbt.

Die Ethidiumbromid-Färbung des Gels zeigt, dass nur in der Probe mit dem präzipitierten Protein CcaF1FLAG und in Gegenwart der reversen Transkriptase eine deutliche Bande auftrat, während in den Proben ohne reverse Transkriptase keine sichtbaren Banden entstanden. Dies Ergebnis bestätigt, dass die Proben nach dem DNase-Verdau keine DNA-Kontaminationen mehr enthielten und somit den Qualitätsanforderungen für die RNA-Sequenzierung entsprachen (Core Unit SysMed, Universität Würzburg).

A Regulatorische, nicht kodierende RNA-Transkripte:



B Kodierende mRNA-Transkripte:

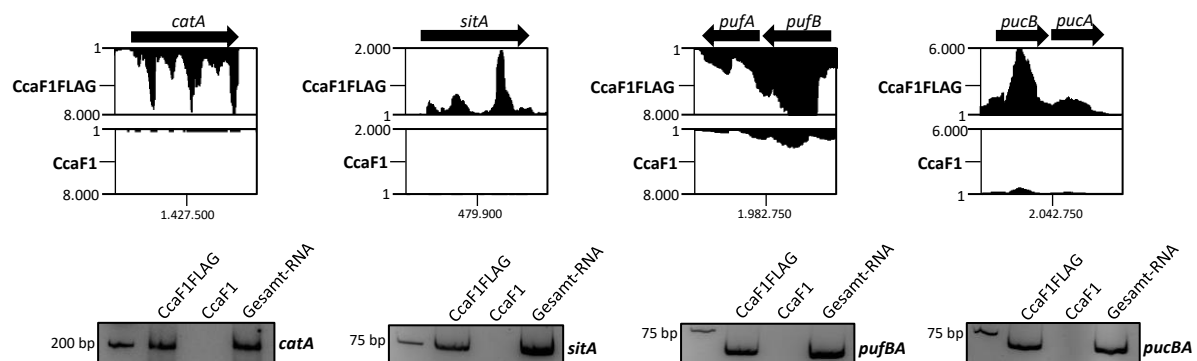


Abbildung 41: Identifizierung von RNA-Transkripten als Bindungspartner von CcaF1 mittels Co-Immunopräzipitation (CoIP) und RNA-Sequenzierung (RipSeq). (A) Beispiele co-immunopräzipitierter RNAs von CcaF1 mit 3xFLAG-tag (CcaF1FLAG) bzw. ohne 3xFLAG-tag (CcaF1) als Kontrolle, die mittels RNASeq (RipSeq) identifiziert wurden. Die Diagramme in beiden Teilabbildungen zeigen die *read coverage plots* aus dem *Integrated Genome Browser* für (A) ausgewählte regulatorische, nicht kodierende RNA-Transkripte und (B) ausgewählte mRNA-Transkripte. Die Gelbilder darunter zeigen jeweils die Analyse der präzipitierten RNAs mittels RT-PCR. Für die RT-PCR wurden jeweils genspezifische Primer verwendet; die RT-PCR-Produkte wurden auf ein 10 %iges Polyacrylamidgel aufgetragen und nach der Elektrophorese mit Ethidiumbromid angefärbt Grützner *et al.*, 2021a).

In der Sequenzierung der RNA-Proben aus der CoIP wurden mehrere regulatorische, nicht kodierende RNAs als Interaktionspartner von CcaF1 identifiziert (Abbildung 41 A). Zu dieser Gruppe gehören die sRNAs CcsR1, UpsM, PcrZ sowie die 6S RNA. CcsR1 ist jene sRNA, die mit *ccaF1* co-transkribiert wird und deren Prozessierung durch Überexpression von CcaF1 beeinflusst wird (Abbildung 34 B und 37). Die CoIP bestätigte somit die Annahme einer Bindung von CcaF1 an die CcsR RNAs. UpsM ist jene sRNA, die aus der 5' UTR von *mraZ* transkribiert wird und einen regulatorischen Einfluss auf die Zellteilung von *R. sphaeroides* hat (Weber *et al.*, 2016; Grützner *et al.*, 2021b; Abschnitt 3.1). PcrZ ist eine sRNA, die unter bestimmten Bedingungen die Gene für die Ausbildung des Photosyntheseapparates reguliert (Mank *et al.*, 2012). Die 6S RNA hingegen ist keine typische sRNA, sondern reguliert die Transkription über eine Interaktion mit dem *housekeeping* Holoenzym der RNA-Polymerase beim Übergang der Zellen von der exponentiellen in die stationäre Wachstumsphase (Wassarman, 2007; Elkina *et al.*, 2017). Außerdem wurden die katalytische RNA-Untereinheit der RNase P und die RNA-Komponente des *signal-recognition particle* (SRP) in dieser CoIP identifiziert. Neben den regulatorischen, nicht kodierenden RNAs wurde in der CoIP auch eine begrenzte Anzahl von mRNA-Transkripten als Bindungspartner von CcaF1 identifiziert (Abbildung 41 B). Dazu gehören *catA*, *sitA*, *pufBA* und *pucBA*. *catA* kodiert eine Katalase in *R. sphaeroides*, ein Enzym, das Wasserstoffperoxid (H₂O₂) zu Wasser und Sauerstoff umsetzt und somit eine wichtige Schutzfunktion gegenüber ROS in der Zelle ausübt. *sitA* ist ein mRNA-Transkript, das mit *sitB* und *sitC* einen Transport-Komplex für Mangan-Ionen (Mn²⁺) kodiert. Mangan-Ionen sind Cofaktoren für die Superoxid-Dismutase, die ebenfalls eine wichtige Rolle bei der zellulären ROS-Entgiftung spielt. Die mRNAs *pufBA* und *pucBA* kodieren in *R. sphaeroides* Pigment-bindende Proteine des Photosyntheseapparats (Abbildung 41 B).

Kodierende mRNA-Transkripte ohne Anreicherung in der Co-Immunopräzipitation:

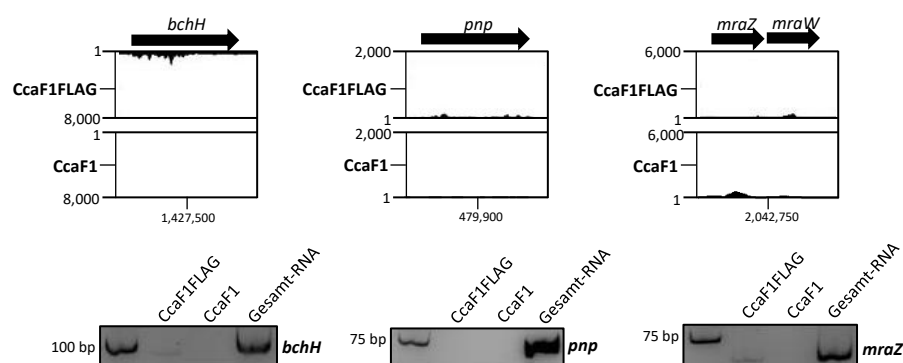


Abbildung 42: Exemplarische Beispiele von RNA-Transkripten, die in der Co-Immunopräzipitation (CoIP) und RNA-Sequenzierung (RipSeq) nicht als Bindungspartner von CcaF1 identifiziert wurden. Analyse co-immunopräzipitierter RNAs von CcaF1 mit 3xFLAG-tag (CcaF1FLAG) und ohne 3xFLAG-tag (CcaF1) als Kontrolle mittels RNASeq (RipSeq). Die Diagramme zeigen exemplarisch *read coverage plots* aus dem *Integrated Genome Browser* für kodierende RNA-Transkripte, die keine Anreicherung in der CoIP zeigten. Die Gelbilder darunter zeigen jeweils die Analyse der präzipitierten RNAs mittels RT-PCR. Für die RT-PCR wurden jeweils genspezifische Primer verwendet. Die RT-PCR-Produkte wurden auf ein 10 %iges Polyacrylamidgel aufgetragen und nach der Elektrophorese mit Ethidiumbromid gefärbt.

Die *read coverage plots* aus dem *Integrated Genome Browser* sind in Abbildung 42 exemplarisch für die mRNA-Transkripte *bchH*, *pnp* und *mraZ* gezeigt, die in der ColP mit CcaF1FLAG nicht angereichert wurden. *bchH* kodiert ein Enzym, das an der Synthese der Bakteriochlorophyll-Moleküle in *R. sphaeroides* beteiligt ist, *pnp* kodiert das RNA-abbauende Enzym PNPase und *mraZ* ist ein mRNA-Transkript aus dem *division and cell wall* Gencluster, das an der Zellteilung beteiligt sind. Die in den Abbildungen 41 und 42 gezeigten Beispiele verdeutlichen, dass CcaF1 RNA-Moleküle nicht unspezifisch bindet. Jedoch kann auf Grundlage der ColP-Ergebnisse keine Aussage über die Struktur- oder Sequenz-Abhängigkeit der RNA-Bindung durch CcaF1 getroffen werden. Die iCLIP-Methode wäre z.B. geeignet, um eine spezifische Bindungssequenz zwischen Protein und RNA zu identifizieren (Abschnitt 3.2.6).

Die in der ColP von CcaF1FLAG angereicherten RNAs wurden zusätzlich mittels qRT-PCR validiert (Abbildung 43). Die Analyse bestätigte, dass das Protein CcaF1 die in der RipSeq identifizierten RNA-Transkripte bindet. (Abbildung 43).

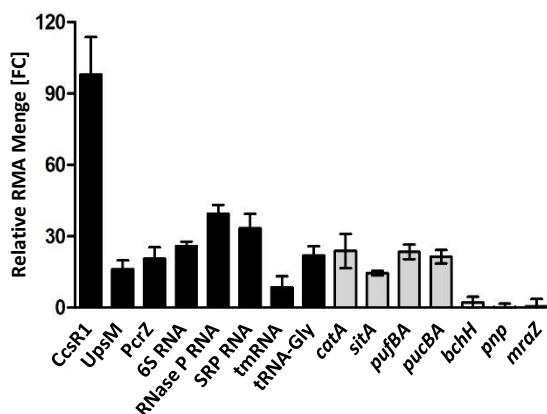


Abbildung 43: Validierung der in der RipSeq identifizierten RNA-Bindungspartner von CcaF1 mittels qRT-PCR. Die qRT-PCR wurde mit den RNA-Proben der ColP durchgeführt. Die nicht kodierenden (schwarz) und kodierenden (grau) RNA-Transkripte wurden mit jeweils spezifischen Primerpaaren nachgewiesen. Es wurde anschließend der *fold change* [FC] aus dem Verhältnis der RNA-Mengen in der ColP-Probe von CcaF1FLAG zu jenen in der Kontrolle (CcaF1 ohne 3xFLAG-tag) errechnet. Das Experiment wurde in drei unabhängigen Experimenten mit technischen Duplikaten durchgeführt (modifiziert nach Grützner *et al.*, 2021a).

Um die Ergebnisse aus der ColP besser beurteilen zu können, wurden neben der Darstellung der Ergebnisse im *Integrated Genome Browser* die *read*-Zahlen der stark angereicherten Gene tabellarisch gelistet (Tabelle 66). Dabei werden nur RNA-Transkripte berücksichtigt, die insgesamt durch ≥ 10 *reads* und eine 10-fach höhere *read*-Anzahl zwischen den Proben 'CcaF1 mit 3xFLAG-tag' und 'CcaF1 ohne 3xFLAG-tag (Kontrolle)' repräsentiert wurden.

Tabelle 66: In der colIP angereicherte RNA-Transkripte, die insgesamt durch ≥ 10 reads und eine 10-fach höhere *read*-Anzahl zwischen den Proben 'CcaF1 mit 3xFLAG-tag' und 'CcaF1 ohne 3xFLAG-tag (Kontrolle)' repräsentiert wurden.

Lokus	Gen	Funktion	Read-Ratio
RSP_2779	<i>catA</i>	Katalase	219,35
RSP_0904	<i>sitA</i>	ABC Mn²⁺ Transporter	77,29
RSP_1943		hypotetisches Protein	61,36
RSP_1944		Uroporphyrin-III C-Methyltransferase/Siroheme Synthase	60,3
RSP_0908	<i>sitD</i>	ABC Mn²⁺ Transporter	57,83
RSP_1942		Sulfite/Nitrite Reduktase	46,87
RSP_0129	<i>metN</i>	ABC D-Methionine Transporter	36,75
RSP_0906	<i>sitC</i>	ABC Mn²⁺ Transporter	34,7
RSP_0905	<i>sitB</i>	ABC Mn²⁺ Transporter	34,48
RSP_1940		hypotetisches Protein	32,1
RSP_0132	<i>metQ</i>	ABC D-Methionine Transporter	29,3
RSP_1941	<i>cysH</i>	Phosphoadenosin/Phosphosulfat Reduktase	28,53
RSP_0130	<i>metI</i>	ABC D-Methionine Transporter	28,08
RSP_1109	<i>cysK1</i>	Cysteinsynthase	25,85
RSP_3696	<i>cysA</i>	ABC Sulfate/Thiosulfate Transporter	25,35
RSP_3594		<i>antifreeze</i> Protein	20,09
RSP_3860		ABC Sulfate/Molybdate Transporter	18,92
RSP_2738		Rhodanese-abhängige Sulfurtransferase	17,41
RSP_3697	<i>cysP</i>	ABC Sulfate/Molybdate Transporter	17,19
RSP_3698	<i>cysT</i>	ABC Sulfate/Molybdate Transporter	16,98
RSP_3699	<i>cysW</i>	ABC Sulfate/Molybdate Transporter	16,26
RSP_3861		ABC Sulfate/Molybdate Transporter	15,75
NA		3' Ende RSP_3595	14,65
RSP_3119		Konserviertes, hypotetisches Protein	14,19
RSP_3509	<i>expE1</i>	Hemolysin-Typ Calcium-binde Region	13,36

Die Quantifizierung der RNA nach der ColIP zeigte die stärkste Anreicherung für die mRNA des Katalase-Gens *catA* (RSP_2279) mit einem *read*-Verhältnis von 219. Es ist außerdem interessant, dass in der ColIP viele Transkripte identifiziert wurden, die am Cystein/Methionin/Schwefel-Metabolismus von *R. sphaeroides* beteiligt sind: RSP_1944 (Methyltransferase), RSP_1942 (Sulfite/Nitrite Reduktase), *cysH* (RSP_1941, Phosphoadenosin/Phosphosulfat Reduktase), *cysK1* (RSP_1109, Cysteinsynthase), *cysA*, *cysP*, *cysT*, *cysW* (RSP_3696–3699), RSP_3861 (ABC Sulfat/Thiosulfat Transporter), RSP_3859 (ABC Sulfat/Molybdate Transporter), *metN*, *metQ* und *metI* (RSP_0129, RSP_0130, RSP_0132, Methionin Transporter). Außerdem wurden fünf RNA-Transkripte gefunden, die durch Überexpression von CcaF1 in ihren zellulären Spiegeln verändert werden (Tabelle 64 und 65; in der Tabelle 66 rot hervorgehoben). Dies könnte einen direkten Zusammenhang zwischen der Bindung und Regulierung dieser RNA-Transkripte durch CcaF1 widerspiegeln. Leider konnte dies nicht für alle RNA-Transkripte gezeigt werden, die in der ColIP als mögliche Interaktionspartner von CcaF1 identifiziert wurden, was mit dem *cut-off* Wert der DESeq2 Analyse der RNASeq-Daten in Zusammenhang stehen könnte. Nichtsdestotrotz legen die Daten aus der DESeq2 Analyse (Abschnitt 3.2.2) und der ColIP den Schluss

nahe, dass das Protein CcaF1 über eine direkte Bindung an verschiedene RNA-Transkripte das Transkriptom von *R. sphaeroides* beeinflusst.

Bei der Strukturvorhersage der DUF1127 Domäne stellte sich neben der hohen Ähnlichkeit zu der RNA-bindenden Smaug Domäne aus *D. melanogaster* auch eine hohe Ähnlichkeit zu der Protein-interagierenden SAM (*steril alpha motif*) Domäne heraus. Es ist bekannt, dass kleine Proteine eine wichtige Rolle für die Strukturierung und Stabilisierung größerer Proteinkomplexe spielen können, wie zum Beispiel der Photosynthesekomplexe oder bestimmter Transportsysteme (Hobbs *et al.*, 2011; Andrews & Rothnagel, 2014; Storz *et al.*, 2014). Da CcaF1 einen Einfluss auf die Prozessierung des *ccaF1_CcsR1-4* Vorläufertranskript besitzt, wird eine Interaktion von CcaF1 mit RNA-prozessierenden Enzymen vermutet. Um dies zu testen, wurde erneut eine CoIP von CcaF1 mit 3xFLAG-tag (CcaF1FLAG) und ohne 3xFLAG-tag (CcaF1) durchgeführt. Die Proben wurden nach der CoIP auf ein 12 %iges SDS-Gel aufgetragen, um mögliche Protein-Interaktionspartner mittels Silber-Färbung zu identifizieren (Abbildung 44). Die Silber-Färbung des SDS-Gels zeigt in der CcaF1FLAG Probe jedoch nur Proteinbanden der schweren (55 kDa) und leichten (25 kDa) Antikörperkette (AK) und als schwache Bande das Protein CcaF1FLAG (15 kDa). Als Kontrolle wurde zusätzlich ein Western Blot durchgeführt, um die Identität der putativen CcaF1FLAG Bande in der Silber-Färbung zu bestätigen.

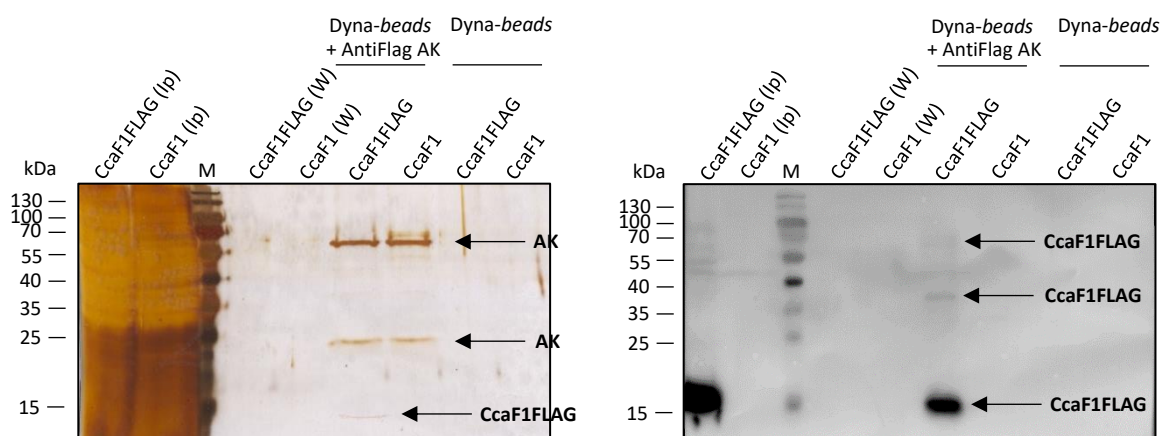


Abbildung 44: Co-Immunopräzipitation (CoIP) von CcaF1 zur Identifizierung möglicher Protein-Interaktionspartner. (A) 12 %ige SDS-PAGE mit anschließender Silber-Färbung von Proben aus der CoIP von CcaF1 mit 3xFLAG-tag (CcaF1FLAG) und ohne 3xFLAG-tag (CcaF1) als Kontrolle. (B) Western Blot der CoIP von CcaF1 mit 3xFLAG-tag (CcaF1FLAG) und ohne 3xFLAG-tag (CcaF1) als Kontrolle. Das Protein CcaF1FLAG wurde mittels spezifischer Peroxidase-gekoppelter Anti-FLAG M2 Antikörper nachgewiesen (Ip: Input; M: Marker; W: Wasch-Fraktion; AK: Antikörper; modifiziert nach Grützner *et al.*, 2021a).

Um die Möglichkeit auszuschließen, dass Interaktionspartner von CcaF1 möglicherweise durch Silber-Färbung des SDS-Gels nicht anfärbbar sind, wurde in Kooperation mit Prof. Dr. Günter Lochnit (Institut für Biochemie, Universität Gießen) eine massenspektroskopische Analyse der CcaF1FLAG CoIP-Proben durchgeführt. Dabei wurde mit dem höchsten Mascot-Wert das Protein CcaF1 identifiziert (Tabelle

67). Es konnten jedoch keine weiteren Proteine mit einem ähnlich hohen oder höheren Mascot-Wert identifiziert werden, die auf eine Interaktion von CcaF1 mit einem anderen Protein oder Protein-Komplex schließen lassen. Es wurden lediglich einige Proteine identifiziert, die einen wesentlich geringeren Mascot-Wert als CcaF1 besitzen. Von diesen Proteinen ist bekannt, dass sie in der Zelle mit unterschiedlichen Proteinen spezifisch oder unspezifisch interagieren können (GroEL) oder RNA-Bindeproteine (TufA, ribosomale Proteine) sind.

Tabelle 67: Auswertung der *high resolution* Massenspektrometrie (LS-ESI-HRMS) von CcaF1 mit 3xFLAG-tag (CcaF1FLAG)

Lokus	Gen	Funktion	Score-Mascot
RSP_6037	<i>ccaF1</i>	Hypotetisches Protein	1410
RSP_1714	<i>tufA</i>	Elongation Faktor TU	227
RSP_2311	<i>groEL</i>	Chaperonin GroEL	162
RSP_1044	<i>rplS</i>	Große ribosomale Untereinheit L19	87
RSP_1725	<i>rplN</i>	Große ribosomale Untereinheit L14	70
RSP_1701	<i>rplJ</i>	Große ribosomale Untereinheit L10	57
RSP_1700	<i>rplL</i>	Große ribosomale Untereinheit L7/L12	55

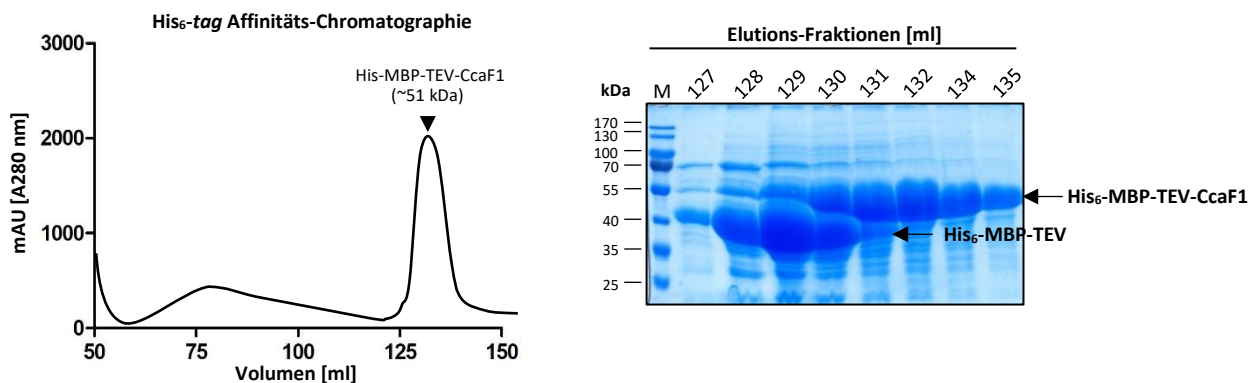
3.2.4 Nachweis einer direkten Interaktion zwischen CcaF1 und CcsR RNAs

Die in den Abschnitten 3.2.1 und 3.2.3 beschriebenen Ergebnisse lassen auf eine Bindung des Proteins CcaF1 über die DUF1127 Domäne an die CcsR RNAs schließen. Die Interaktion zwischen CcaF1 und CcsR RNA könnte dabei die Prozessierung bzw. die Stabilität dieser RNA-Transkripts beeinflussen.

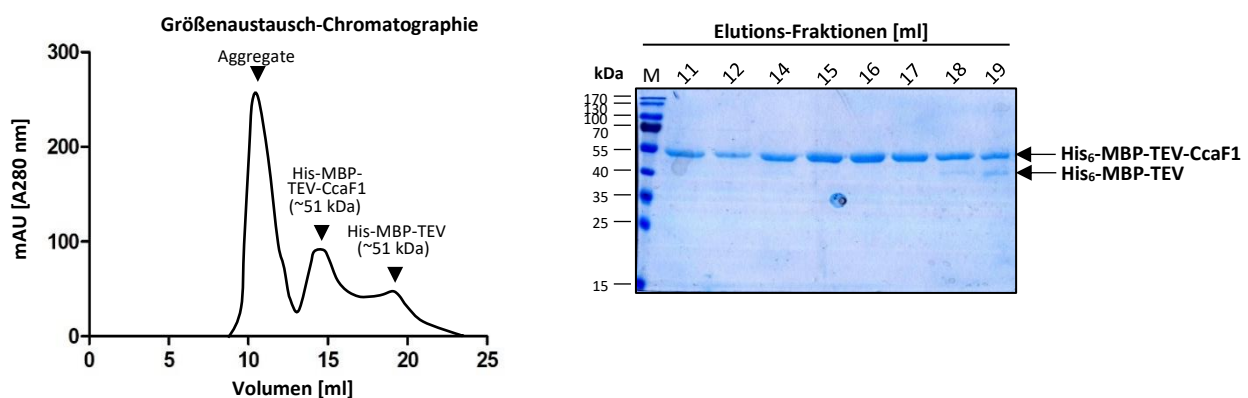
Für den Nachweis einer RNA-Bindung von CcaF1 eignen sich EMSA-Experimente. Dafür wurde neben der *in vitro* transkribierten RNA rekombinant exprimiertes und aufgereinigtes CcaF1-Protein benötigt. Damit Aggregationen des Proteins während der Aufreinigung vermieden werden, wurde CcaF1 mit einem MBP- (*maltose-binding-protein*) und His₆- (Histidin) tag fusioniert (Abbildung 45 C). Der MBP-tag sorgt für eine Stabilisierung des Proteins und über den His₆-tag kann das Protein mittels Affinitäts-Chromatographie aufgereinigt werden. Um den His₆-MBP-tag von dem Protein CcaF1 zu entfernen, da dieser im EMSA zu einer unspezifischen Bindung mit RNA-Transkripten führen könnte, wurde zusätzlich zwischen His₆-MBP-tag und CcaF1 Protein eine TEV-Protease Schnittstelle integriert (Abbildung 45 C). Die Sequenz für das His₆-MBP-TEV-CcaF1 Fusions-Protein (51 kDa) wurde in den Vektor pET24c kloniert und in *E. coli* BL21 transformiert. Die Überexpression des Proteins fand anschließend durch die Zugabe von Lactosemonohydrat statt. Nach dem Zellaufschluss wurde das Protein His₆-MBP-TEV-CcaF1 zuerst über den His₆-tag mittels Affinitäts-Chromatographie (5 ml HisTrap HP) und anschließend über eine Größenausschluss-Chromatographie aufgereinigt (Abbildung 45 A und B). Für die Größenausschluss-Chromatographie wurden die Elutions-Fractionen 131-135 ml aus der Affinitäts-Chromatographie vereint und auf eine Superdex 10/300 GL Größenausschlusssäule geladen. In einem letzten Schritt wurde der His₆-MBP-tag (43 kDa) proteolytisch durch die TEV-Protease von

dem Protein CcaF1 getrennt, sodass am Ende das reine Protein CcaF1 (8 kDa) ohne jeglichen Fusions-*tag* erhalten wurde (Abbildung 45 C).

A



B



C

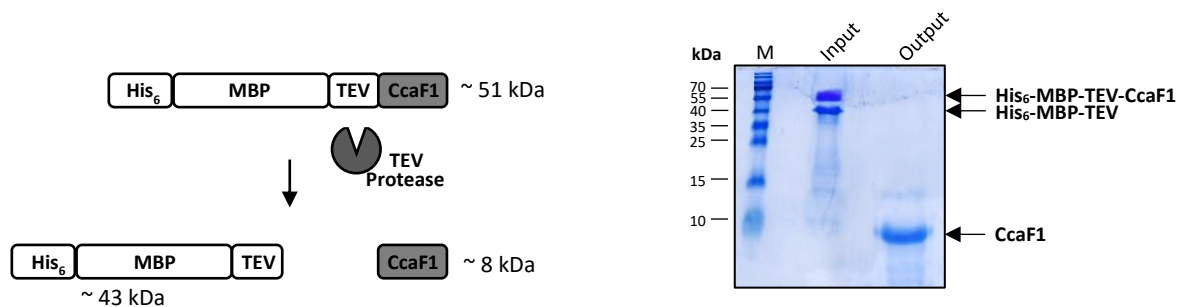


Abbildung 45: Aufreinigung von CcaF1 mittels Affinitäts- und Größenausschluss-Chromatographie. (A) Auf der linken Seite ist das Chromatogramm der His₆-tag Affinitäts-Chromatographie für die Aufreinigung des His₆-MBP-TEV-CcaF1 Fusions-Protein gezeigt und auf der rechten Seite das dazugehörige SDS-Gel (12 %ig) mit den Elutions-Fractionen 127-135 ml, welches mit Coomassie gefärbt wurde. (B) Auf der linken Seite ist das Chromatogramm der Größenausschluss-Chromatographie von His₆-MBP-TEV-CcaF1 dargestellt und auf der rechten Seite das mit Coomassie gefärbte SDS-Gel (12 %ig) mit den entsprechenden Elutions-Fractionen 11-19 ml (mAU: *milli absorbance units*). (C) Der schematische proteolytische Verdau von His₆-MBP-TEV-CcaF1 mittels TEV-Protease ist auf der linken Seite und das SDS-Gel (12 %ig) mit den Proben vor und nach dem TEV-Protease-Verdau auf der rechten Seite dargestellt (modifiziert nach Grützner *et al.*, 2021a).

Das *electrophoretic mobility shift assay* (EMSA) beruht auf einem antiproportionalen Laufverhalten von freier RNA und RNA, die Teil eines Protein-Komplexes ist. Der RNA-Protein-Komplex zeigt dabei ein langsames Laufverhalten im Gel als die freie RNA, es kommt also zu einer Laufverschiebung (*shift*), wenn sich ein RNA-Protein-Komplex formiert.

Für einen Nachweis der Interaktion zwischen CcaF1 und RNA wurden intern mit α - ^{32}P -UTP markierte T7 *in vitro* Transkripte von CcsR1 (82 nt) sowie dem Vorläufertranskript CcsR1-4 (415 nt) synthetisiert. Die radioaktiv markierten RNAs (15 nM) wurden anschließend mit aufsteigenden Konzentrationen (0, 2, 5, 10, 50, 100, 200 und 500 nM) des aufgereinigten CcaF1-Proteins inkubiert und auf einem nativen, 6 %igen TBE-Polyacrylamidgel aufgetrennt (Abbildung 46 links). Bereits bei niedrigen CcaF1-Konzentrationen (2-10 nM) wurde eine Komplexbildung von CcsR1-Transkript und CcaF1 beobachtet (Abbildung 46 links). Bei einer Proteinkonzentration von 500 nM lag die CcsR1 RNA vollständig an CcaF1 gebunden vor. Bei dem EMSA, in dem das CcsR1-4 Vorläufertranskript verwendet wurde (Abbildung 46 rechts), bildete sich zusätzlich ein Intermediat des Protein-RNA-Komplexes (mittlere Bande). Dies legt die Vermutung nahe, dass mehr als ein CcaF1 Protein (oder Proteinkomplex) an das CcsR1-4 Vorläufertranskript binden kann. Auch bei anderen RNA-Bindeproteinen wie z.B. Hfq wurden in EMSAs solche Intermediate mit einer 1:1 Stöchiometrie (Protein:RNA) bei geringen Proteinkonzentrationen beobachtet. Bei höheren Proteinkonzentrationen bindet offensichtlich mehr als ein CcaF1-Molekül pro RNA-Transkript, was die zweite, langsamere laufende *shift* Bande erklärt (Updegrave *et al.*, 2011; Updegrave *et al.*, 2016).

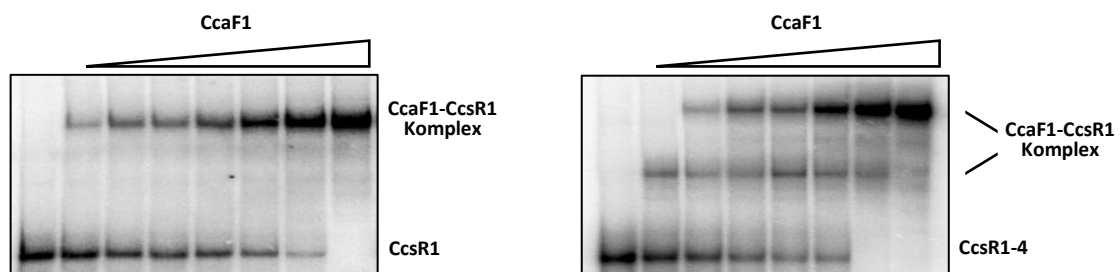


Abbildung 46: EMSA zum Nachweis einer *in vitro* Interaktion von CcaF1 und CcsR1 bzw. CcsR1-4 RNA-Transkript. Die EMSAs wurden mit 15 nM intern ^{32}P -markierten CcsR1 (82 nt) bzw. CcsR1-4 (415 nt) *in vitro* Transkripten durchgeführt, die mit aufsteigenden Konzentrationen des gereinigten CcaF1-Proteins (2, 5, 10, 50, 100, 200 oder 500 nM) inkubiert wurden. Die Proben wurden anschließend auf einem nativen 6 %igen TBE-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mittels *phosphorimaging* analysiert (modifiziert nach Grützner *et al.*, 2021a).

Um eine unspezifische Bindung von CcsR1 an CcaF1 auszuschließen, wurde ein Kompetitions-EMSA durchgeführt (Abbildung 47). Dafür wurde einerseits radioaktiv markiertes CcsR1 *in vitro* Transkript mit steigenden Konzentrationen des Proteins CcaF1 wie in Abbildung 46 inkubiert. Zusätzlich wurde in 7 parallelen Ansätzen die radioaktive CcsR1 RNA mit der höchsten CcaF1-Konzentration (500 nM) präinkubiert. In diese Ansätze wurden nach der Protein-RNA-Komplexbildung steigende Konzentrationen (1, 2, 5, 10, 25, 50, 100 nM) nicht radioaktiv markierter CcsR1 oder StsR RNA als Kompetitor gegeben. Die Zugabe der „kalten“ *in vitro* Transkripte in aufsteigenden Konzentrationen führt im Fall einer spezifischen Bindung zu einer Konkurrenz der radioaktiv markierten und der nicht

radioaktiv markierten RNAs um die Bindung an CcaF1. Je höher die Konzentration an „kalter“ RNA ist, um so stärker wird die radioaktive RNA im Fall eines spezifischen Kompetitors aus dem Komplex verdrängt wird. Abbildung 47 A zeigt solch eine spezifische Kompetition mit „kalter“ CcsR1 RNA. Als Kontrolle wurde wie für die „kalte“ CcsR1 RNA das Kompetitions-EMSA mit „kalter“ StsR RNA durchgeführt (Abbildung 47 B). StsR ist eine sRNA, die in der ColP (Abschnitt 3.2.3) nicht nachgewiesen wurde und daher keine Bindung mit CcaF1 eingehen sollte. Wie aus Abbildung 47 B ersichtlich ist die StsR RNA nicht in der Lage, die radioaktiv markierte CcsR1 RNA aus dem RNA-Protein-Komplex zu verdrängen. Die Ergebnisse der Abbildung 47 lassen daher auf eine spezifische Bindung von CcaF1 und CcsR1 schließen.

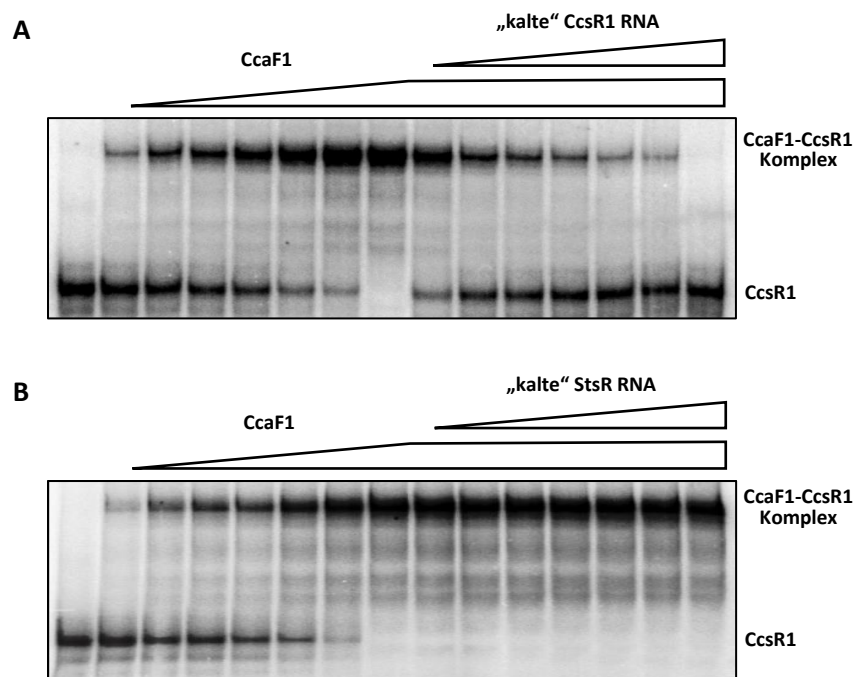


Abbildung 47: Kompetition des CcaF1:CcsR1 Komplexes mit kalten CcsR1 oder StsR RNA. Die EMSAs wurden mit intern ^{32}P -markiertem CcsR1 (15 nM) *in vitro* Transkript durchgeführt, das mit aufsteigenden Konzentrationen des aufgereinigten Proteins CcaF1 (2, 5, 10, 50, 100, 200 oder 500 nM) inkubiert wurde (jeweils linken Spuren 2-8; Spur 1: ohne CcaF1). Zusätzlich wurden sieben parallele Ansätze pipettiert (jeweils die 7 rechten Spuren der gele), bei denen die RNA mit der höchsten CcaF1-Konzentration (500 nM) zwecks Komplexbildung präinkubiert wurde. Anschließend wurden in diese Ansätze steigende Mengen nicht radioaktiv markierter („kalter“) CcsR1 (A) oder StsR (B) RNA gegeben. Nach einer weiteren Inkubation wurden die Proben wurden auf einem nativen, 6 %igen TBE-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mittels *phosphorimaging* analysiert (modifiziert nach Grützner *et al.*, 2021a).

Aus der Literatur ist bekannt, dass in *D. melanogaster* das *smaug recognition element* (SRE) eine Haarnadelschleife bildet, die für die Bindung des Smaug Proteins an die *nos* mRNA und deren Regulation wichtig ist. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass Mutationen in dem Sequenzmotiv 5'-CNGGN zu einer verringerten Bindung des Smaug Proteins an die *nos* mRNA führen (Dahanukar & Wharton, 1996; Smibert *et al.*, 1996; Dahanukar *et al.*, 1999; Smibert *et al.*, 1999). Da die sRNA CcsR1 von *R. sphaeroides* eine ähnliche Sequenz mit einer Nukleotidabfolge 5'-CGGGA in der ersten Haarnadelschleife (*loop* 1) besitzt, wurde letztere als mögliche Bindungsregion des DUF1127 Proteins CcaF1 untersucht (Abbildung 48 A). Dafür wurden ebenfalls EMSAs mit der nativen CcsR1 RNA sowie

Varianten mit mutierter 5'-CGGGA Sequenz durchgeführt (Abbildung 48). Die verschiedenen RNA-Transkripte wurden wieder intern mit α - 32 P-UTP radioaktiv markiert und mit steigenden Konzentrationen (0, 2, 5, 10, 50, 100, 200 und 500 nM) des Proteins CcaF1 inkubiert. Die Proben wurden anschließend auf 6 %igen TBE-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und die Gele mittels *phosphorimaging* analysiert (Abbildung 48).

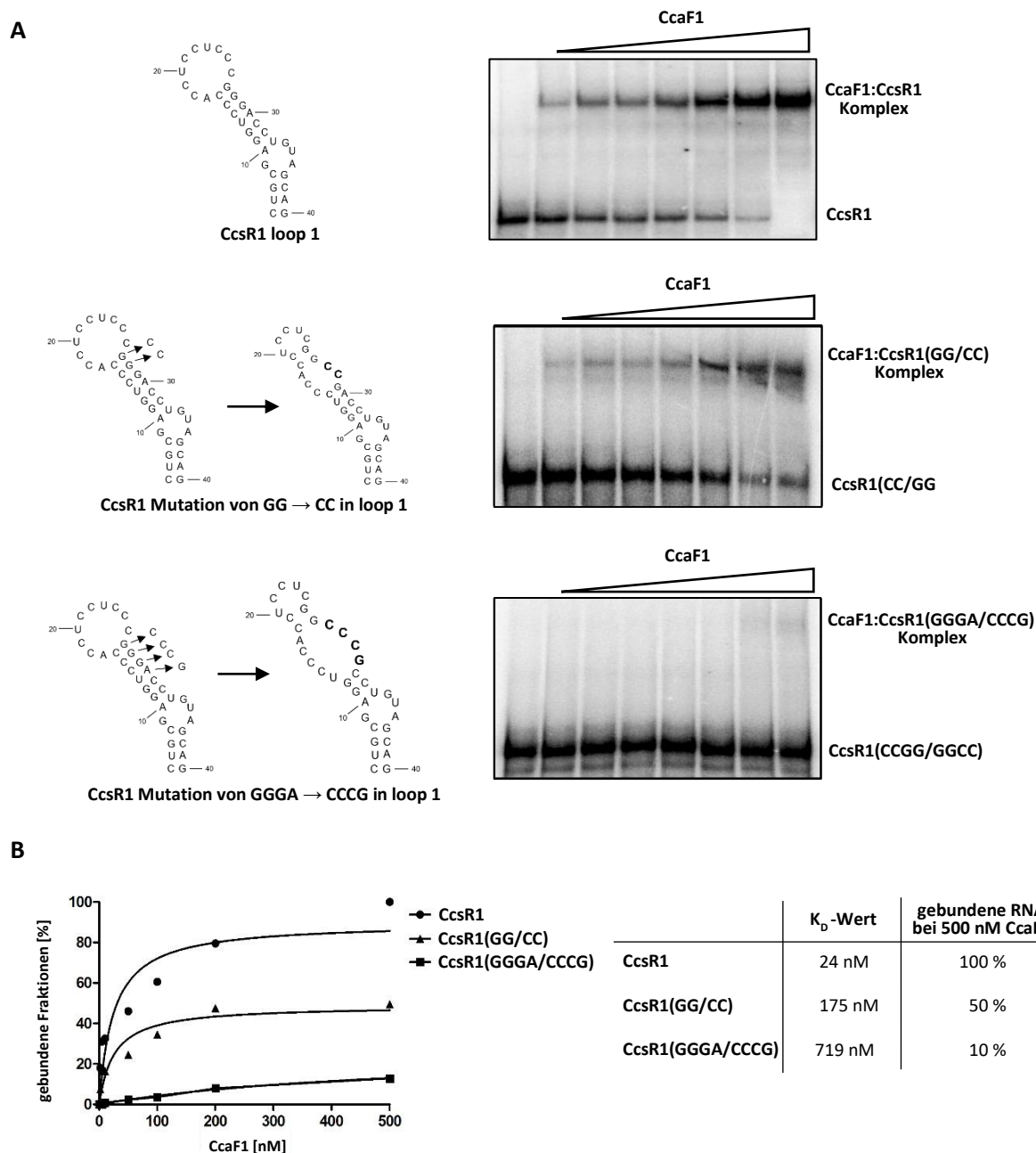


Abbildung 48: EMSA-Analysen zur *in vitro* Interaktion zwischen CcaF1 und mutierten CcsR1 RNA-Transkripten. (A) Die EMSAs wurden mit intern 32 P-markierten *in vitro* Transkripten von CcsR1 (Wildtyp CcsR1 Sequenz), CcsR1 mit einem Austausch von 2 Nukleotiden (GG→CC) in der Haarnadelschleife 1 (*loop* 1) bzw. CcsR1 mit einem Austausch von 4 Nukleotiden (GGGA→CCCG) in *loop* 1 durchgeführt. Die *in vitro* RNA-Transkripte wurden mit steigenden Mengen (2, 5, 10, 50, 100, 200 or 500 nM) an CcaF1 inkubiert und anschließend auf einem nativen, 6 %igen TBE-Polyacrylamidgel dargestellt und mittels *phosphorimaging* analysiert. Auf der linken Seite ist jeweils die vorhergesagte Struktur des CcsR1 *loop* 1 ohne und mit Mutationen dargestellt (modifiziert nach Grützner *et al.*, 2021a). (B) Berechnung der Dissoziationskonstante K_D anhand der EMSAs aus dem Abbildungsteil (A). Der K_D -Wert gibt an, bei welcher Konzentration ein Gleichgewicht zwischen freier und gebundener RNA (halbmaximale Komplexbildung) vorliegt.

Der EMSA mit der Wildtyp CcsR1 RNA zeigte bei einer CcaF1-Konzentration von 500 nM einen vollständigen *shift* der RNA in die Komplexbande (Abbildung 48 A). Die berechnete Dissoziationskonstante K_D , die der Proteinkonzentration bei halbmaximaler Bindung der RNA entspricht, betrug etwa 24,5 nM (Abbildung 48 B). Wurden in der Haarnadelschleife 1 der sRNA CcsR1 (*loop* 1) die beiden 5'-proximalen Guanine in Cytosine (GG → CC) mutiert, so war die Komplexbildung bei der höchsten Proteinkonzentration (500 nM) nur noch partiell (Abbildung 48 A). Die entsprechende Bindungskurve zeigte nur noch einen Endpunkt von etwa 50% und die CcaF1-Konzentration bei halbmaximaler Sättigung der Bindung lag nur noch bei etwa 175 nM (Abbildung 48 B). Wurden die *loop* 1 Nukleotide 5'-GGGA noch weitergehend in 5'-CCCG mutiert, so war im EMSA kaum noch ein *shift* der RNA erkennbar (Abbildung 48 A). In diesem Fall erreichte der Endpunkt der Bindungskurve weniger als 10% und die CcaF1-Konzentration bei halbmaximaler Sättigung der Bindung stieg auf etwa 700 nM (Abbildung 48 B), was einem dramatischen Affinitätsverlust entspricht. Die Ergebnisse verdeutlichen die essentielle Rolle des 5'-CGGGA Sequenzmotifs für die CcaF1-Bindung an die CcsR1 RNA. Dabei lässt sich jedoch nicht abschließend klären, ob die Sequenz 5'-CGGGA das direkte Bindungsmotiv für CcaF1 darstellt oder ob die eingeführten Mutationen über die Veränderung der Sekundärstruktur der CcsR1 RNA (Abbildung 48 A, Strukturen auf der linken Seite) die Bindung des Proteins CcaF1 negativ beeinflussen.

Die in diesem Abschnitt gezeigten Ergebnisse bestätigen, dass es sich um eine spezifische Bindung zwischen dem Protein CcaF1 und der sRNA CcsR1 bzw. dem CcsR1-4 Vorläufertranskripts handelt. Es konnte zudem gezeigt werden, dass Mutationen in der ersten Haarnadelschleife der CcsR1 RNA (*loop* 1) die Bindung des Proteins CcaF1 stark beeinträchtigen. Die Bestimmung eines Bindungsmotivs des Proteins CcaF1 in der sRNA CcsR1 bzw. in den anderen RNA-Bindungspartnern des Proteins erfordert jedoch weiterführende Ansätze wie z.B. iCLIP, eine Methode, die *in vivo* auf globaler Ebene Aufschluss über RNA-Bindungspartner und Bindungssequenzen geben kann. Außerdem ermöglicht die EMSA-Methodik keine genaue Aussagen über die Stöchiometrie von Protein und sRNA in Protein-RNA-Komplexen.

3.2.5 CcaF1 beeinflusst die Stabilität von CcsR1 und anderer RNA-Transkripter

Aus den bisherigen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass das DUF1127 Protein CcaF1 in einer möglichen Kombination mit der RNase E und über eine direkte Bindung an die RNA einen Einfluss auf die Prozessierung bzw. „Reifung“ des *ccaF1_CcsR1-4* Vorläufertranskripts ausübt. Die RNase E ist in Gram-negativen Bakterien eine essentielle Endoribonuklease, die eine zentrale Rolle in RNA-Prozessierung und RNA-Abbau spielt (Mackie, 2013). Da die Prozessierung und der Abbau von RNA-Transkripten oft ineinander übergehen und deshalb sehr gut reguliert sein müssen, können RNA-Transkripte je nach Umweltbedingung für ihre „Aktivierung“ prozessiert oder für ihre „Inaktivierung“ abgebaut werden. Um den Einfluss des Proteins CcaF1 nicht nur auf die Prozessierung des Vorläufertranskripts sondern auch auf die Stabilität der einzelnen CcsR RNAs zu testen, wurde die Halbwertszeit der CcsR1 sRNA bestimmt (Abbildung 49 A). Dafür wurden der *R. sphaeroides* Wildtyp und der CcaF1-Überexpressionsstamm (*R. sphaeroides* pRK*ccaF1*) in der exponentiellen Phase unter

mikroaeroben Bedingungen kultiviert. Durch die Zugabe von Rifampicin wurde die Transkription gestoppt, sodass keine neuen RNA-Transkripte initiiert werden können und die Geschwindigkeit der RNA-Degradation durch die Zell-eigenen Ribonukleasen beobachtet werden kann. Für die Northern Blot-Analyse des RNA-Abbaus wurde Gesamt-RNA mittels Phenol-Extraktion isoliert, in einem 10 %igen denaturierenden TBE-Harnstoff-Gel aufgetrennt und auf eine Nylon-Membran transferiert. Die Northern Blot-Signale der RNA wurden auf die 5S rRNA (Abbildung 49 und 50) oder 14S rRNA (Abbildung 51) normalisiert, da die ribosomalen RNAs unabhängig von den experimentellen Bedingungen eine hohe Stabilität besitzen. Der prozentuale Abbau der RNA wurde halblogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen und die Halbwertszeit anschließend aus der Exponentialfunktion der Ausgleichsgerade errechnet (Abbildung 49 B).

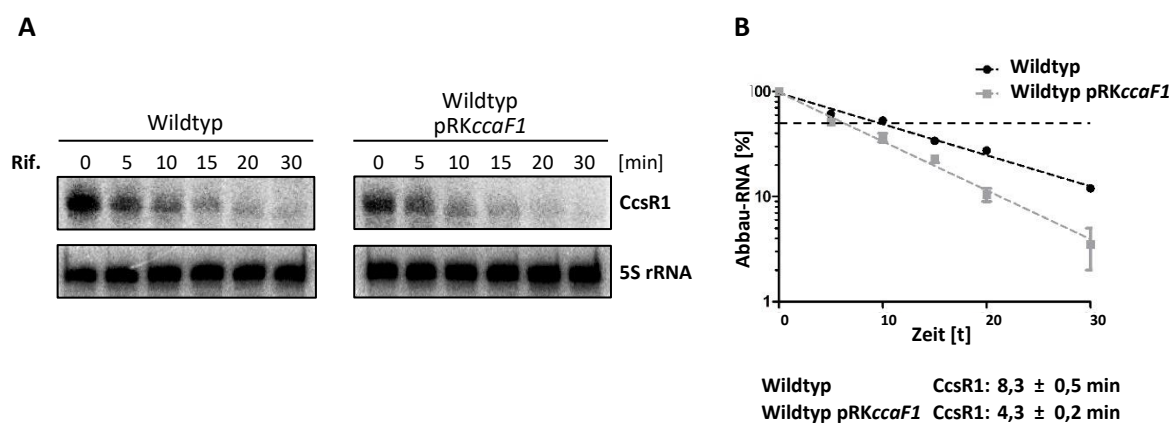


Abbildung 49: Einfluss des Proteins CcaF1 auf die Stabilität der CcsR1 RNA. (A) Northern Blot-Analyse zur Bestimmung der Halbwertszeit der RNA CcsR1 in *R. sphaeroides* Wildtyp und *R. sphaeroides* pRKccaF1 (Überexpression von CcaF1) in der exponentiellen Wachstumsphase. Die Reinitiation der Transkription wurde durch die Zugabe von Rifampicin (Rif.) nach der Entnahme von Zellen zum Zeitpunkt 0 min gestoppt. Weitere Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen. Jeweils 7,5 µg Gesamt-RNA pro Spur wurden auf einem 10 %igen denaturierenden TBE-Polyacrylamid-Harnstoffgel aufgetrennt. Die sRNA CcsR1 sowie die 5S rRNA (Ladekontrolle) wurden mit spezifischen, radioaktiv markierten Oligonukleotid-Sonden detektiert. (B) Die prozentuale Abbaurate von CcsR1 [in %] in *R. sphaeroides* Wildtyp und *R. sphaeroides* pRKccaF1 wurde aus dem Mittelwert biologischer Triplikate berechnet, auf die Ladekontrolle 5S rRNA normiert und halblogarithmisch gegen die Zeit [t] dargestellt. Die Bestimmung der Halbwertszeit von CcsR1 erfolgte anhand der Exponentialfunktion der Ausgleichsgerade (modifiziert nach Grützner *et al.*, 2021a).

Es ist deutlich erkennbar, dass bei einer Überexpression des Proteins CcaF1 (pRKccaF1) die Halbwertszeit und somit die Stabilität der sRNA CcsR1 um die Hälfte von ca. 8 auf 4 Minuten (~50 %) abnimmt (Abbildung 49 B). Das Ergebnis dokumentiert den Einfluss des Proteins CcaF1 auf die Stabilität der sRNA CcsR1.

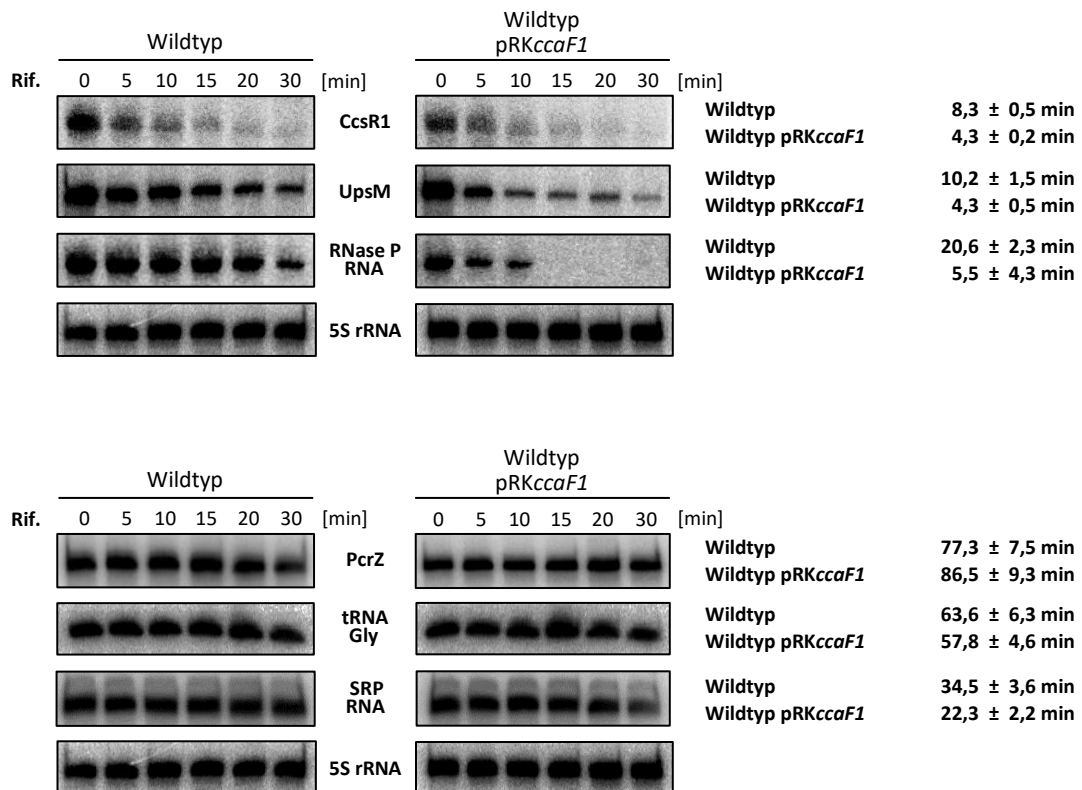


Abbildung 50: Einfluss des Proteins CcaF1 auf die Stabilität verschiedener nicht kodierender RNAs. Northern Blot-Analyse zur Bestimmung der Halbwertszeit verschiedener nicht kodierender RNAs im *R. sphaeroides* Wildtyp und CcaF1-Überexpressionsstamm. Die Reinitiation der Transkription wurde durch die Zugabe von Rifampicin (Rif.) nach der Entnahme von Zellen zum Zeitpunkt 0 min gestoppt. Weitere Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen. Jeweils 7,5 µg Gesamt-RNA pro Spur wurden auf einem 10 %igen denaturierenden TBE-Polyacrylamid-Harnstoffgel aufgetrennt. Die Detektion der nicht kodierenden RNAs erfolgte durch spezifische, radioaktiv markierte Oligonukleotid-Sonden. Die 5S rRNA wurde als interne Ladekontrolle verwendet. Die Halbwertszeit wurde auf Grundlage biologischer Triplikate wie in der Legende zu Abbildung 49 beschrieben berechnet (modifiziert nach Grützner *et al.*, 2021a).

Weitere Halbwertszeiten wurden für jene nicht kodierenden RNA-Transkripte bestimmt, die in der CoIP als Bindungspartner identifiziert wurden (Abbildung 41). Die Überexpression des Proteins CcaF1 (pRKccaF1) zeigte dabei einen Einfluss auf die Stabilität der UpsM und RNase P RNAs (Abbildung 50 oben). Bei der sRNA UpsM, die eine zentrale Rolle in der Zellteilung von *R. sphaeroides* spielt, reduzierte sich die Halbwertszeit von 10 auf 4 Minuten (Abbildung 50 oben). Für die katalytische RNA der RNase P, die zusammen mit der RNase P-Proteinuntereinheit für die Prozessierung und „Reifung“ von tRNAs essentiell ist (Mohanty *et al.*, 2020), verkürzt sich die Halbwertszeit von 20 auf 5 min (Abbildung 50 oben). Andere nicht kodierende RNAs, wie die sRNA PcrZ (Mank *et al.*, 2012), die SRP RNA (Herskovits *et al.*, 2000) und die tRNA für Glycin (tRNA-Gly) zeigten hingegen bei Überexpression des Proteins CcaF1 keine der nur eine geringe (SRP RNA) Veränderung in der Halbwertszeit bzw. Stabilität (Abbildung 50 unten). Es ist jedoch aus den Studien von Mank *et al.* 2012 bekannt, dass die sRNA PcrZ eine sehr lange Halbwertszeit und damit hohe Stabilität in *R. sphaeroides* besitzt. Auch tRNAs und die SRP RNA haben eine Halbwertszeit von über 30 min. Die gewählten Zeitpunkte für die Zellentnahme nach Rifampicin-Zugabe könnten daher für diese RNAs ein zu kurzes Zeitfenster gewesen

sein, um mögliche Stabilitätsunterschiede zwischen den beiden Stämmen deutlicher herauszukristallisieren.

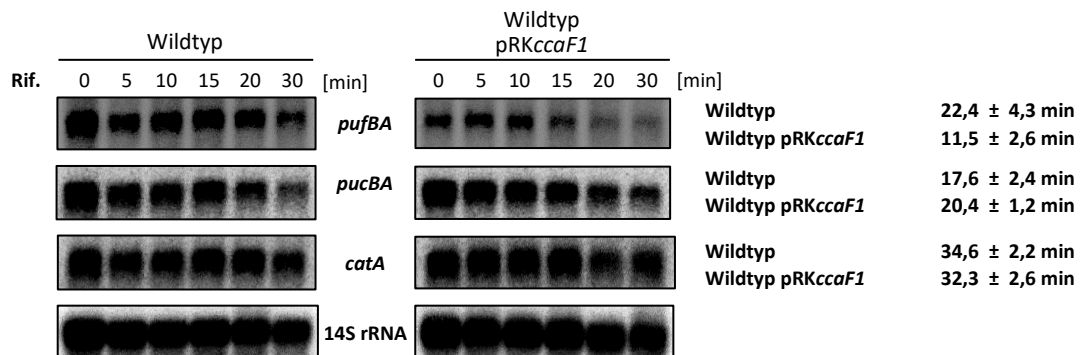


Abbildung 51: Einfluss des Proteins CcaF1 auf die Stabilität verschiedener, kodierender mRNAs. Northern Blot-Analyse zur Bestimmung der Halbwertszeit verschiedener mRNA-Transkripte in *R. sphaeroides* Wildtyp und *R. sphaeroides* pRKccaF1. Die Reinitiation der Transkription wurde durch die Zugabe von Rifampicin (Rif.) nach der Entnahme von Zellen zum Zeitpunkt 0 min gestoppt. Weitere Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen. Jeweils 10 µg Gesamt-RNA wurden in einem 1 % Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt. Zum Nachweis der mRNA-Transkripte wurden spezifische, radioaktiv markierte PCR-Produkte verwendet. 14S rRNA diente als Ladekontrolle. Die Halbwertszeit wurde aus biologischen Triplikaten berechnet und auf die Ladekontrolle 14S rRNA normiert (modifiziert nach Grützner *et al.*, 2021a).

In der CoIP wurden neben nicht kodierenden RNAs auch mRNA-Transkripte als mögliche Bindungspartner von CcaF1 identifiziert. Um den Einfluss des DUF1127 Proteins CcaF1 auf die Stabilität verschiedener mRNA-Transkripte näher zu untersuchen, wurde ebenfalls die Halbwertszeit dieser Transkripte bestimmt (Abbildung 51). Die isolierte Gesamt-RNA wurde in diesem Fall in einem 1 %igen Formamid-Agarosegel aufgetrennt, das zur Detektion längerer RNA-Transkripte geeignet ist. Die mRNAs *pufBA*, *pucBA* und *catA* wurden anschließend mittels radioaktiv markierten PCR-Sonden nachgewiesen und die RNA-Halbwertszeit über eine Normalisierung auf die 14S rRNA (Ladekontrolle) bestimmt. Die Ergebnisse zeigten, dass auch die Stabilität der *pufBA* mRNA bei Überexpression von CcaF1 (pRKccaF1) abnimmt. Für die mRNA-Transkripte *pucBA* und *catA* waren jedoch nur geringe Unterschiede in der Halbwertszeit zwischen *R. sphaeroides* Wildtyp und *R. sphaeroides* pRKccaF1 feststellbar (Abbildung 50). *pufBA* ist ein mRNA-Transkript aus dem *puf*-Operon und kodiert die Pigment-bindenden Proteine des Lichtsammelkomplexes I. Bei diesem mRNA-Transkript nimmt die Halbwertszeit um die Hälfte von 22 auf 11 Minuten ab. Für die mRNA *pucBA*, die die Pigment-bindenden Proteine des Lichtsammelkomplexes II kodiert, sowie für die mRNA der Katalase *catA* waren dagegen keine Änderungen in der Halbwertszeit aufgrund der Überexpression von CcaF1 erkennbar.

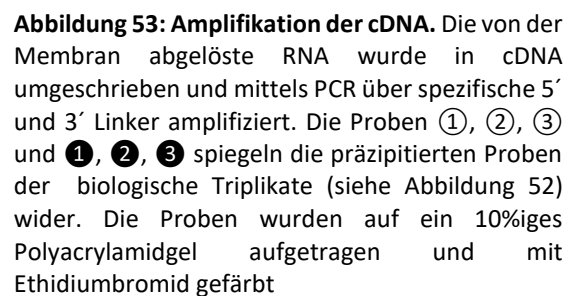
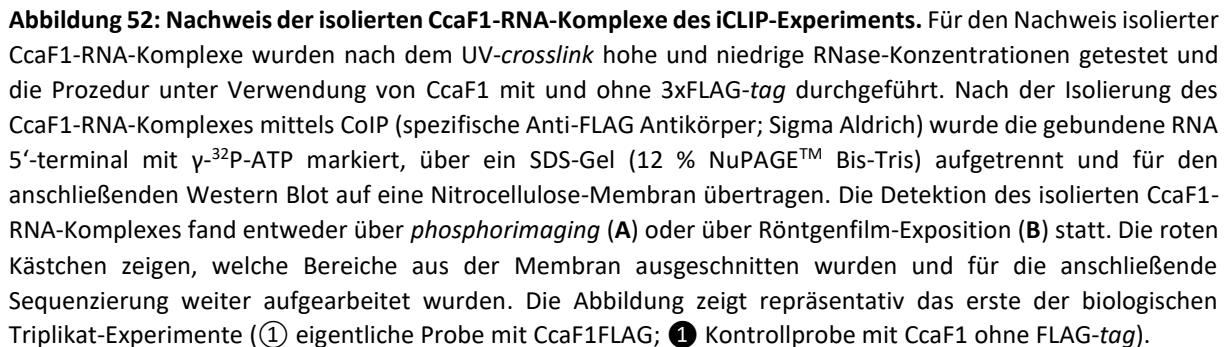
Aus den ermittelten Halbwertszeiten lässt sich schließen, dass eine Überexpression des kleinen Proteins CcaF1 (pRKccaF1) einen Einfluss auf die Stabilität verschiedener nicht kodierender und kodierender RNA-Transkripten besitzt. Es lässt sich jedoch auf Basis der Halbwertszeiten-Experimente keine Aussage treffen, wie CcaF1 die Stabilität dieser RNA-Transkripte reduziert und welche Ribonukleasen den beschleunigten Abbau der RNA-Transkripte bei Überexpression von CcaF1 katalysieren.

3.2.6 Identifizierung eines Bindemotivs von CcaF1 mittels iCLIP

Um die Funktion des DUF1127 Proteins CcaF1 umfassend zu verstehen, ist es von zentraler Bedeutung, die Sequenz und die strukturellen Elemente, die für eine Interaktion zwischen dem Protein und den RNA-Transkripten wichtig sind, zu identifizieren. Die bis zu diesem Zeitpunkt durchgeführten CoIPs mit anschließender RNA-Sequenzierung (RipSeq) gaben bisher lediglich über mögliche Bindungspartner des Proteins Aufschluss, jedoch nicht über spezifische Bindungssequenzen und RNA-Strukturelemente. Für diese Fragestellung wurde in Kooperation mit Dr. Oliver Rossbach (Institut für Biochemie, Universität Gießen) die Methode des iCLIPs (*individual nucleotide resolution cross-linking and immunoprecipitation*) angewandt. Mittels iCLIP können RNA-Sequenzen, die dem Protein als Bindungsmotiv fungieren, *in vivo* ermittelt werden, unter der Voraussetzung, dass das Protein mit unterschiedlichen RNA-Bindungspartnern in der Zelle interagiert. In der vorliegenden Arbeit wurde das Protokoll des iCLIP2 verwendet, das auf der Studie von Buchbender *et al.* 2019 basiert und an das Protein CcaF1 aus *R. sphaeroides* angepasst wurde.

Zu diesem Zweck wurde CcaF1 mit einem N-terminalen 3xFLAG-*tag* bzw. ohne 3xFLAG-*tag* (Negativkontrolle) unter Kontrolle des 16S rRNA-Promotor (RSP_4352) in das Plasmid pRK4352 kloniert und in *R. sphaeroides* konjugiert. Die entsprechenden *R. sphaeroides* Stämme wurden anschließend bei 32 °C und unter mikroaeroben Bedingungen bis zu einer OD₆₆₀ von 0,6 kultiviert. Nach der Ernte wurden die Zellen mit UV-Licht bestrahlt (UV-*crosslink*), um die RNA-Transkripte kovalent an CcaF1 zu binden. Nach dem Zellaufschluss wurde mit dem Lysat ein DNase-Verdau durchgeführt, um störende DNA zu entfernen. Da mit der iCLIP-Methode das RNA-Bindungsmotiv des Proteins CcaF1 identifiziert werden sollte, wurde zusätzlich ein partieller RNase-Verdau durchgeführt. Durch diesen Schritt wurden nicht nur ungebundene RNA-Transkripte abgebaut, sondern auch die kovalent an das Protein gebundenen RNA-Moleküle verkürzt, sodass im weiteren Verlauf dieses Experiments im Wesentlichen der von dem Protein geschützte Bereich des Bindungsmotivs sequenziert wurde. Anschließend wurde der Protein-RNA-Komplex mittels CoIP mit einem anti-FLAG M2 Antikörper von den restlichen Zellbestandteilen getrennt. Um die Effizienz der einzelnen Schritte zu testen, wurden UV-*crosslink*, partieller RNase-Verdau (hohe und niedrige RNase Konzentration) und CoIP methodisch variiert. Die gebundene RNA in dem isolierten Protein-RNA-Komplex wurde im nächsten Schritt radioaktiv markiert und der Protein-RNA-Komplex in einem SDS-Gel separiert sowie nach dem Gellauf für einen Western Blot auf eine Nylon-Membran übertragen. Die Effektivität der einzelnen Schritte konnte anschließend mittels *phosphorimaging* (Abbildung 52 A) und Röntgenfilm-Exposition (Abbildung 52 B) überprüft werden.

Abbildung 52 A und B zeigen in den Spuren ① ein deutliches radioaktives Signal, das auf eine Präzipitation des CcaF1-RNA Komplexes hindeutet. Demnach wurden durch den UV-*crosslink* erfolgreich RNA-Transkripte an CcaF1 kovalent gebunden, die über den 3xFLAG-*tag* von CcaF1 präzipitiert werden konnten. Die niedrige RNase-Konzentration in dem partiellen RNase-Verdau sorgte außerdem dafür, dass die an CcaF1 gebunden RNA-Transkripte nicht vollständig zu Mono- oder Oligonukleotiden abgebaut wurden. Die anderen Spuren, bei denen es sich um verschiedene Kontrollen handelte, zeigten wie erwartet kein vergleichbar starkes Signal. Die roten Markierungen in der Abbildung 52 A und B deuten an, welche Bereiche der Membran ausgeschnitten und für die anschließende RNA-Sequenzierung weiter aufgearbeitet wurden.



negativen Kontrollen wurde die CoIP mit dem Protein CcaF1 ohne 3xFLAG-*tag* durchgeführt. Dadurch konnte kein Protein und somit auch keine RNA präzipitiert werden, weshalb es in dem späteren Schritt auch zu keiner Amplifikation der cDNA kommen konnte. Die Proben Input 1, 2, 3 sowie ①, ② und ③ wurden auf gleiche RNA-Konzentrationen eingestellt und für die Sequenzierung verwendet (Core Unit SysMed, Universität Würzburg). Die Negative-Kontrollen ①, ② und ③ wurden verworfen. Die Auswertung der iCLIP-Daten wurde in Kooperation mit Patrick Barth (Institut für Bioinformatik und Systembiologie, Universität Gießen) durchgeführt.

Der iCLIP ergab jedoch nur für eine Probe ein brauchbares Ergebnis in der Sequenzierung, während die anderen beiden Proben des biologischen Triplikats nicht auswertbar waren. Die Gründe dafür können unterschiedlicher Natur sein. Der Schritt des UV-*crosslinks* ist entscheidend für den weiteren Verlauf des iCLIP-Experiments. Durch eine falsche Präparation der Zellen könnte die Effizienz des UV-*crosslinks* reduziert worden sein, sodass während der CoIP weniger RNA präzipitiert wurde. Auch bei der 5′ oder 3′ Linker-Ligation bzw. der späteren cDNA-Synthese und PCR-Amplifikation der präzipitierten RNA könnte die Effizienz der einzelnen Reaktionen unterschiedlich gewesen sein, obwohl das Analyse-Gel der cDNA-Amplifikation (Abbildung 53) ähnliche Bandenmuster für allen drei biologischen Triplikaten zeigte.

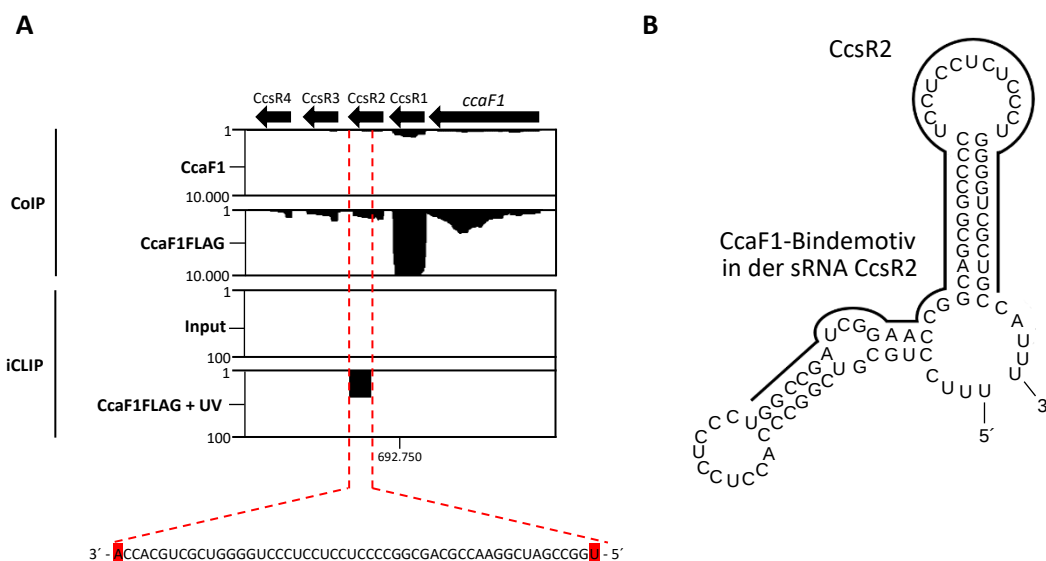


Abbildung 54: Identifizierung einer CcsR2-Bindungsregion für das Protein CcaF1. (A) In der Abbildung sind die Vergleiche der Ergebnisse der RNA-Sequenzierung aus der CoIP und dem iCLIP als *read coverage plots* aus dem *Integrated Genome Browser* für das *ccaF1_CcsR1-4* Gencluster dargestellt. Der rot markierte Bereich zeigt die Bindungssequenz von CcsR2, die über den iCLIP identifiziert wurde. (B) Sequenz und Struktur der sRNA CcsR2. Die in dem iCLIP-Experiment (A) identifizierte CcaF1-Bindungsregion ist durch die schwarze Linie entlang der Struktur von CcsR2 gekennzeichnet.

Die Sequenzierung der auswertbaren iCLIP-Probe des biologischen Triplikats offenbarte ein 52 nt lange Bindungsregion des Proteins CcaF1 in der sRNA CcsR2 (Abbildung 54 A). Diese Sequenz deckt den Bereich 3′ der ersten Haarnadelschleife bis zum Ende der RNA ab (Abbildung 54 B). Während in der CoIP eine viel stärkere Anreicherung der sRNA CcsR1 beobachtet wurde, so war im iCLIP nur eine

Bindungsregion des Proteins CcaF1 an CcsR2 identifizierbar. Dies könnte unter anderem an einer einseitigen Zuordnung der *reads* zum Locus der sRNA CcsR2 liegen, da alle CcsR RNAs in *R. sphaeroides* eine sehr hohe Homologie aufweisen. Da die sRNAs CcsR1-4 in ihren Sequenzen und Strukturen stark konserviert sind, könnten sich die im iCLIP identifizierte *reads* der Bindungsregion möglicherweise auch auf alle vier CcsR RNAs verteilen.

Neben der Bindungsregion von CcsR2 wurde in der iCLIP-Analyse auch eine CcaF1-Bindungssequenz in der SRP RNA detektiert (Abbildung 55 A). Die SRP RNA war bereits in der zuvor durchgeführten CoIP (Abbildung 41) als möglicher Bindungspartner des Proteins CcaF1 identifiziert worden und kam daher als CcaF1-Bindungspartner in Frage. Die 69 nt lange, im iCLIP identifizierte Sequenz erstreckt sich in der vorhergesagten Struktur der SRP RNA ähnlich wie bei der sRNA CcsR2 über mehrere Haarnadelschleifen (Abbildung 55 B).

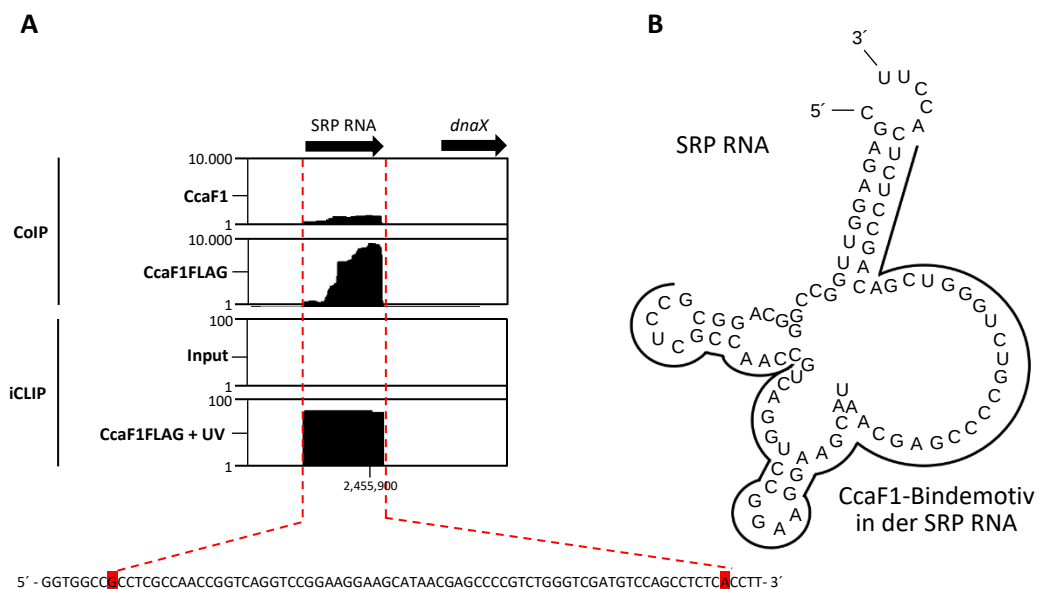


Abbildung 55: Identifizierung einer CcaF1-Bindungsregion in der signal-recognition particle (SRP) RNA. (A) In der Abbildung sind die Ergebnisse der RNA-Sequenzierungen der CoIP- und iCLIP-Analysen für die SRP RNA als *read coverage plots* aus dem *Integrated Genome Browser* vergleichend dargestellt. Der rot markierte Bereich kennzeichnet die mittels iCLIP identifizierte Bindungssequenz der SRP RNA. (B) Sequenz und Struktur der SRP RNA. Die in dem iCLIP-Experiment (A) identifizierte CcaF1-Bindungsregion ist durch die schwarze Linie entlang der Struktur der SRP RNA gekennzeichnet.

Weitere Bindungssequenzen des Proteins CcaF1 wurden auch in verschiedenen tRNAs aus *R. sphaeroides* identifiziert (Abbildung 56). Eine tRNA, die in der CoIP als möglicher Bindungspartner detektiert wurde, ist die tRNA für die Aminosäure Histidin (tRNA-His). Die Sequenzierung der iCLIP-Probe ergab für das Protein CcaF1 eine 35 nt lange Sequenz in der tRNA-His (Abbildung 56 A), die ähnlich wie bei der sRNA CcsR2 in der Struktur zweier Haarnadelschleifen liegt und sich bis zum 3' Ende der Sequenz erstreckt (Abbildung 56 B). Es ist jedoch fragwürdig, ob es sich bei der Bindung von CcaF1 an verschiedene tRNAs in *R. sphaeroides* um eine spezifische Bindung handelt. Die 6S RNA, die in

direkter Nachbarschaft zu dieser tRNA auf dem Chromosom kodiert ist und die in der CcaF1 CoIP deutlich angereichert wurde, ist in der Sequenzbibliothek des iCLIP-Experiments nicht repräsentiert.

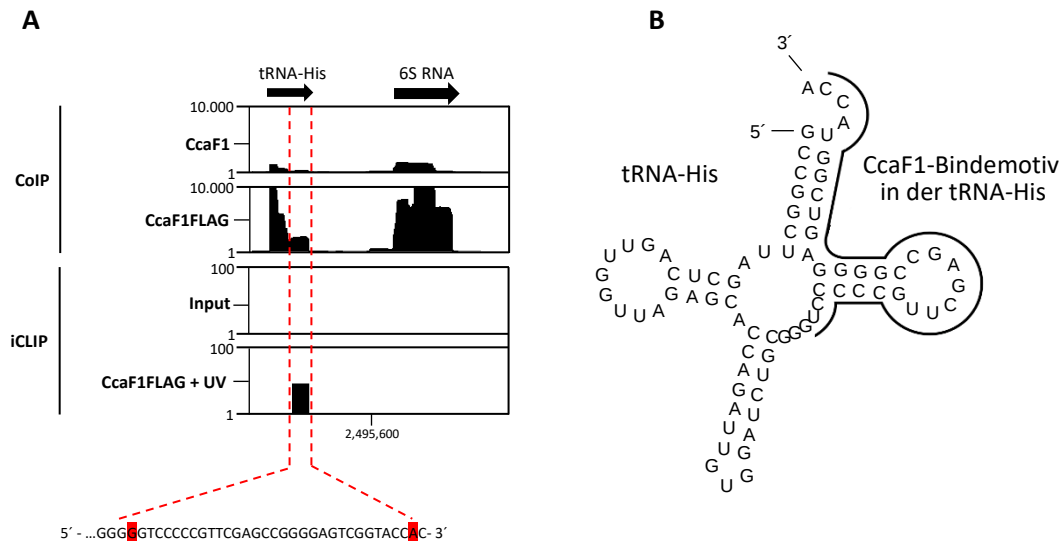


Abbildung 56: Identifizierung einer CcaF1-Bindungsregion in der tRNA für Histidin. (A) In der Abbildung sind die Ergebnisse der RNA-Sequenzierungen der CoIP- und iCLIP-Analysen für die tRNA-His und die 6S RNA als *read coverage plots* aus dem *Integrated Genome Browser* vergleichend dargestellt. Der rot markierte Bereich kennzeichnet die mittels iCLIP identifizierte Bindungssequenz der tRNA-His. **(B)** Sequenz und Struktur der tRNA-His. Die in dem iCLIP-Experiment (A) identifizierte CcaF1-Bindungsregion ist durch die schwarze Linie entlang der Struktur der tRNA-His gekennzeichnet.

Für andere RNA-Transkripte, die in der CoIP als mögliche Bindungspartner für das Protein CcaF1 erfasst wurden, förderte die iCLIP-Analyse keine Bindungssequenzen zutage. Dies ist in der Abbildung 57 beispielhaft für die regulatorischen RNAs UpsM, PcrZ und RNase P RNA sowie für das kodierende RNA-Transkript des *pucBA* Operons gezeigt. Weshalb für diese RNA-Transkripte keine Bindungsregion in der iCLIP-Analyse identifiziert wurde, während in den Sequenzbibliotheken der CoIP eine hohe Anzahl an *reads* vorhanden war, kann anhand dieses Experiments nicht geklärt werden. Um eine valide Aussage über CcaF1-Bindungsregionen in den verschiedenen RNA-Transkripten treffen zu können, muss der iCLIP wiederholt werden, mit dem Ziel, für alle Replikat-Proben ein verlässliches und vergleichbares Ergebnis in der Sequenzierung zu erzielen.

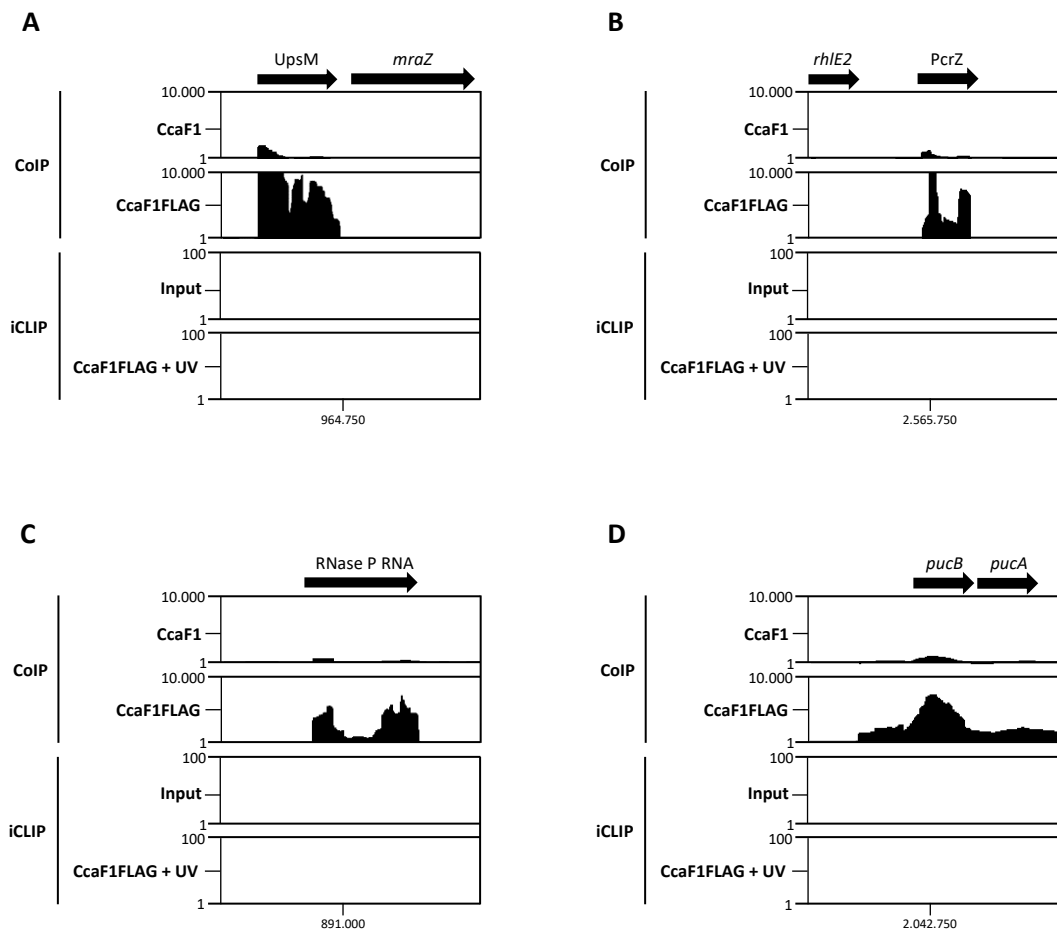


Abbildung 57: Beispiele von RNA-Transkripten, die in der Sequenzbibliothek des CcaF1 iCLIPs nicht repräsentiert waren. In der Abbildung sind die Ergebnisse der RNA-Sequenzierungen der ColIP- und iCLIP-Analysen für die sRNAs UpsM (A), PcrZ (B), die RNase P RNA (C) sowie für das *pucBA* Operon (D) als *read coverage plots* aus dem *Integrated Genome Browser* vergleichend dargestellt.

3.2.7 DUF1127 Protein RSP_0557

Neben dem Gen *ccaF1* (*RSP_6037*) besitzt *R. sphaeroides* drei weitere Gene in seinem Genom, die Proteine mit einer sogenannten DUF1127 Domäne kodieren. Dazu gehört unter anderem das Gen *RSP_0557*. Das Gen bzw. das Protein RSP_0557 wurde erstmals im Zusammenhang mit der sRNA Pos19 (*photooxidative stress induced sRNA 19*) charakterisiert (Müller *et al.*, 2016). Microarray-Daten haben gezeigt, dass die mRNA von *RSP_0557* negativ durch die sRNA Pos19 reguliert wird und es eine vorhergesagte Bindungsregion zwischen der mRNA von *RSP_0557* und der sRNA Pos19 gibt (Müller *et al.*, 2016). Pos19 ist eine sRNA, die unter photooxidativem Stress exprimiert wird und zum RpoE-Regulon in *R. sphaeroides* gehört. Welche genaue Funktion eine mögliche Interaktion zwischen der Pos19 RNA und der mRNA von *RSP_0557* zugrundeliegt, ist bis jetzt jedoch nicht geklärt.

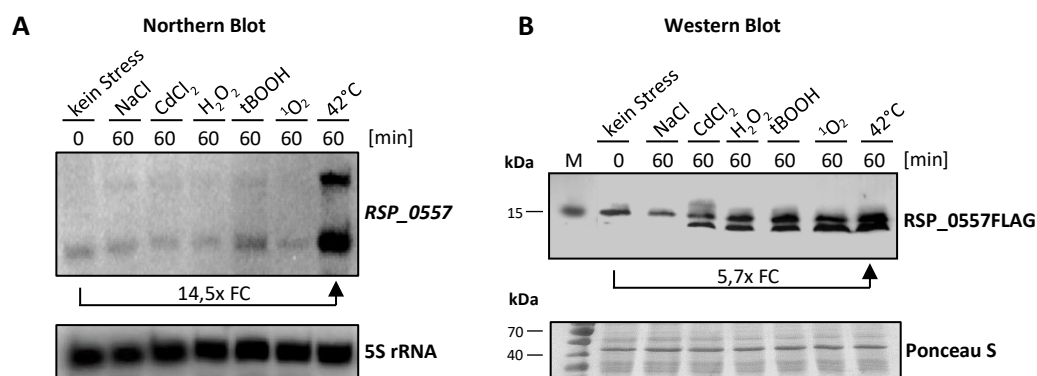


Abbildung 58: Expression von RSP_0557 unter verschiedenen Stressbedingungen. (A) Northern Blot-Analyse zur Expression der mRNA *RSP_0557* unter verschiedenen Stressbedingungen. *R. sphaeroides* Wildtyp wurde für 60 min unter mikroaeroben Bedingungen und in Anwesenheit verschiedener Stressfaktoren (250 mM NaCl, 10 µM CdCl₂, 1 mM H₂O₂, 300 µM tBOOH, ¹O₂-Stress oder 42 °C) inkubiert. Jeweils 10 µg Gesamt-RNA wurden auf einem 10 %igen, denaturierenden TBE-Polyacrylamid-Harnstoffgel aufgetrennt. Die mRNA von *RSP_0557* wurde mittels spezifischer, radioaktiv markierter Oligonukleotid-Sonden nachgewiesen. 5S rRNA dient als Ladekontrolle. (B) Western Blot-Analyse zum Nachweis von RSP_0557 unter verschiedenen Stressbedingungen. Ein *R. sphaeroides* Stamm, bei dem das chromosomale *RSP_0557* Gen mit einem 3xFLAG-tag fusioniert wurde, wurde für 60 min unter mikroaeroben Bedingungen und in Anwesenheit der gleichen Stressfaktoren wie in (A) inkubiert. Für die Präparation der Zelllysate wurden gleiche OD₆₆₀ Mengen an Zellkultur verwendet; die Lysate wurden für den Western Blot auf ein 12 %iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und nach der Elektrophorese auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Detektion des RSP_0557-Proteins erfolgte mittels spezifischer Peroxidase-gekoppelter Anti-FLAG M2 Antikörper. Eine Ponceau-Färbung (unteres Bild) diente als Ladekontrolle.

Aus vorherigen Untersuchungen zum Protein RSP_0557 war bekannt, dass das Gen *RSP_0557* einen RpoH/I-abhängigen Promotor besitzt und somit unter verschiedenen Stressbedingungen exprimiert wird. Um die Expression und die damit verbundene Funktion des DUF1127 Proteins RSP_0557 genauer zu charakterisieren, wurde eine Northern Blot-Analyse durchgeführt. Dafür wurde *R. sphaeroides* Wildtyp unter mikroaeroben Bedingungen kultiviert und für 60 min verschiedenen Stressfaktoren ausgesetzt. Die Gesamt-RNA wurde anschließend mit heißem Phenol isoliert und jeweils 10 µg wurden auf einem 10 %igen denaturierenden TBE-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die mRNA von *RSP_0557* wurde mittels spezifischer, radioaktiv markierter Oligonukleotid-Sonden nachgewiesen

(Abbildung 58 A). Die Northern Blot-Analyse zeigte, dass *RSP_0557* die stärkste Expression (*fold change* von 14,5) unter Hitzestress (42 °C) aufweist (Abbildung 58 A). Dieses Ergebnis wird auch durch vergleichende RNASeq-Daten bestätigt, die für den *R. sphaeroides* Wildtyp unter normalen Bedingungen (mikroaerob und 32 °C) und unter Hitzestress (mikroaerob und 42 °C) generiert wurden (Daten nicht gezeigt). Andere Stressfaktoren, die Salz- und oxidativen Stress in den Zellen auslösen, führten dagegen zu keinen größeren Veränderungen im RNA-Spiegel von *RSP_0557* (Abbildung 58 A).

Neben den mRNA- wurden auch die Protein-Spiegel von *RSP_0557* mittels Western Blot untersucht. Dafür wurde ein *R. sphaeroides* Stamm, bei dem das Gen *RSP_0557* chromosomal mit einem 3xFLAG-tag fusioniert ist, unter den gleichen Bedingungen (mikroaerob) und Stressfaktoren wie in Abbildung 58 A kultiviert. Das Gesamt-Zelllysate wurde auf einem 12 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen. Das Protein *RSP_0557FLAG* wurde anschließend mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen (Abbildung 58 B). Die Western Blot-Analyse zeigte, dass *RSP_0557FLAG* ebenfalls die höchste Expressionsstärke unter Hitzestress mit einem *fold change* von 5,7 gegenüber Normalbedingungen aufweist (Abbildung 58 B). Allerdings waren auch bei oxidativem Stress, im Gegensatz zu den mRNA-Mengen, erhöhte Spiegel des *RSP_0557FLAG* Proteins nachweisbar. Die Gründe für solche Unterschiede können vielfältig sein. Die Transkription von RNAs ist ein relativ schneller Prozess in der Zelle, während die Translation von Proteinen wesentlich langsamer verläuft. RNA-Transkripte besitzen außerdem gegenüber Proteinen auch eine deutlich geringere Stabilität bzw. Halbwertszeit. Während die Halbwertszeit von RNA-Transkripten bei nur wenigen Minuten liegt, besitzen Proteine eine Halbwertszeit von mehreren Stunden. Dies bedeutet, dass die RNA-Transkripte von *RSP_0557* unter oxidativen Stress nach 60 min abgebaut sein könnten, sodass sie nicht mehr in der Northern Blot-Analyse nachweisbar sind. Das translatierte Protein *RSP_0557FLAG* kann hingegen deutlich stabiler sein, sodass es auch nach 60 min unter oxidativen Stress noch in erhöhten Mengen im Western Blot-Analyse nachweisbar ist.

In der Northern Blot-Analyse ist auffällig (Abbildung 58 A), dass zwei RNA-Transkripte von *RSP_0557* nachweisbar sind. Wie die RNA-Sequenzierung und die Kartierung von 5' Enden im *R. sphaeroides* Wildtyp sowie in einem *R. sphaeroides* Stamm mit thermosensitiver RNase E Substitution (*rne^{E.c(ts)}*) ergab, liegt in dem kodierenden Bereich von *RSP_0557* eine RNase E Schnittstelle (Abbildung 59 A, roter Pfeil). Eine Berechnung der Größen der beiden Banden mittels RNA-Marker in einer weiteren Northern Blot-Analyse ergaben, dass die obere Bande das gesamte *RSP_0557* Transkript mit ungefähr 345 nt und die untere Bande ein mögliches Prozessierungsprodukt mit ungefähr 275 nt repräsentiert (Master-Thesis Anna Latz; Abbildung 59 B). Die thermosensitive RNase E Substitutionsmutante (*rne^{E.c(ts)}*) zeigte unter Hitzestress ein dementsprechend verändertes Bandenmuster in der Northern Blot-Analyse (Abbildung 59 B). Somit scheint die RNase E das mRNA-Transkript von *RSP_0557* unter bestimmten Bedingungen zu prozessieren. Die Daten der RNA-Sequenzierung zeigten außerdem, dass das Gen *RSP_0557* zwei Start-Codons besitzt, die zusammen in einem Leseraster liegen (Abbildung 59 A). Das zweite Start-Codon liegt dabei 20 nt hinter der RNase E Schnittstelle. Möglicherweise könnte eine Prozessierung des mRNA-Transkripts durch die RNase E bewirken, dass zwei unterschiedlich große Translationsprodukte in der Zelle entstehen. In der Western Blot-Analyse von *RSP_0557FLAG* zeigte sich eine solche Doppelbande, die auf zwei unterschiedlich große Proteine hindeuten könnte

(Abbildung 58 B). Jedoch spricht eine fehlende Shine-Dalgarno-Sequenz vor dem zweiten Start-Codon gegen diese Theorie. Somit bleibt weiterhin offen, welche Funktion die Prozessierung des *RSP_0557* Transkripts besitzt und wodurch sich die Proteine der Doppelbande im Western Blot voneinander unterscheiden.

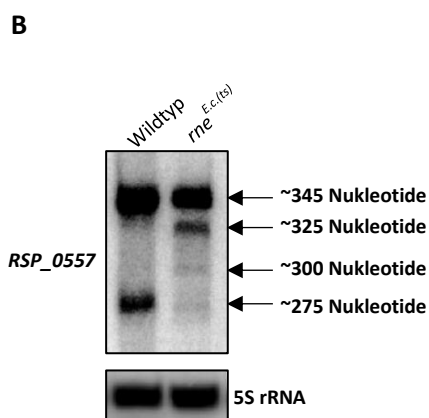
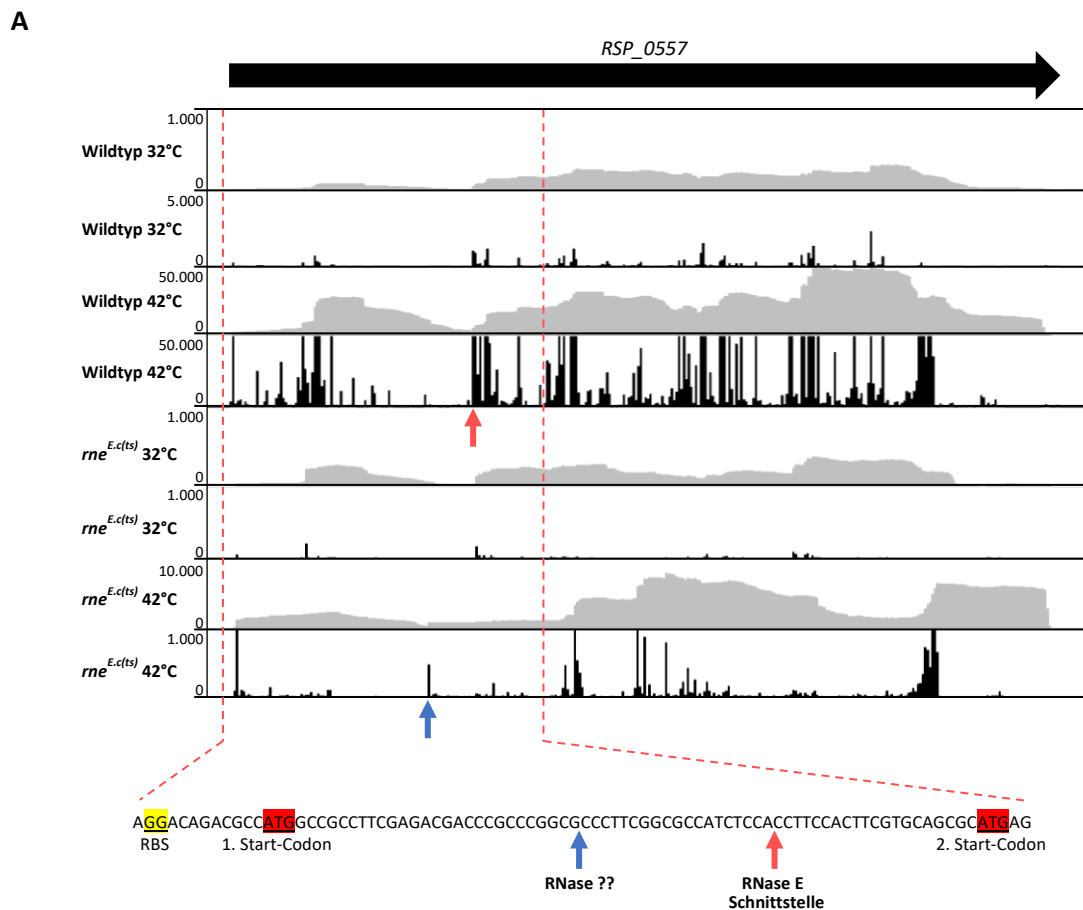


Abbildung 59: Einfluss der RNase E auf die Prozessierung der *RSP_0557* mRNA. (A) In der Abbildung sind die Vergleiche der Ergebnisse der RNA-Sequenzierung als *read coverage plots* und die angereicherten 5' Enden aus dem *Integrated Genome Browser* von *R. sphaeroides* Wildtyp und *R. sphaeroides* mit einer thermosensitiven RNase E Substitution (*rne^{E.c(ts)}*) unter normalen Bedingungen (mikroaerob und 32 °C) und nach 20 min Hitzestress (mikroaerob und 42 °C) dargestellt. Die Sequenz des *RSP_0557* Gens zeigt zwei Start-Codons, die im selben Leseraster liegen (rot markiert). Die Abbildung basiert auf der Master-Thesis von Anna Latz. (B) Northern Blot-Analyse von *R. sphaeroides* Wildtyp und *R. sphaeroides* mit einer thermosensitiven RNase E Substitution (*rne^{E.c(ts)}*) unter Hitzestress (42 °C). Jeweils 10 µg Gesamt-RNA pro Spur wurden auf einem 10%igen denaturierenden TBE-Polyacrylamid-Harnstoffgel aufgetrennt. Die mRNA von *RSP_0557* wurde mit einer spezifischen, radioaktiv markierten Oligonukleotid-Sonde detektiert. 5S rRNA dient als Ladekontrolle.

Das Protein RSP_0557 besitzt wie das Protein CcaF1 eine DUF1127 (*domain of unknown function*) Domäne im C-terminalen Bereich des Proteins, die eine mögliche RNA-Bindedomäne ist. Im Abschnitt 3.2.3 konnte für das Protein CcaF1 eine Interaktion mit verschiedenen kodierenden und nicht kodierenden RNA-Transkripten mittels CoIP gezeigt werden. Um eine RNA-bindende Funktion für die DUF1127 Domäne des Proteins RSP_0557 ebenfalls zu bestätigen, wurde erneut eine CoIP mit anschließender RNA-Sequenzierung (RipSeq) durchgeführt, für die RSP_0557 mit einem 3xFLAG-tag (RSP_0557FLAG) am N-Terminus fusioniert wurde. Die Sequenzierung der CoIP zeigte, dass RSP_0557FLAG wie CcaF1FLAG die regulatorischen RNAs CcsR1, UpsM und tmRNA mit ähnlicher Effizienz bindet, jedoch nicht die Glycin-tRNA (tRNA-Gly) und die SRP RNA, die als Interaktionspartner von CcaF1 identifiziert wurden. Das Protein RSP_0557FLAG zeigte außerdem eine Interaktion mit den kodierenden mRNA-Transkripten *rpoHII*, *rpoE-chrR*, und *znuA-galM* (Abbildung 60), aber nicht mit den *catA*, *pufBA* und *pucBA* mRNAs. *rpoHII* und *rpoE* kodieren alternative σ -Faktoren, die in der Stressantwort von *R. sphaeroides* wichtig sind, und *znuA* ein Protein, das an der Formation eines ABC Zink Transporters beteiligt ist. Die CoIP von CcaF1 (Abbildung 41 und 42) und RSP_0557 (Abbildung 60) zeigen, dass beide Proteine teilweise die gleichen aber auch unterschiedliche RNA-Transkripte binden. Es könnte sich somit um eine Sequenz- und Struktur-spezifische Bindung handeln. Um jedoch die Funktion des DUF1127 Proteins RSP_0557 in *R. sphaeroides* zu identifizieren, müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

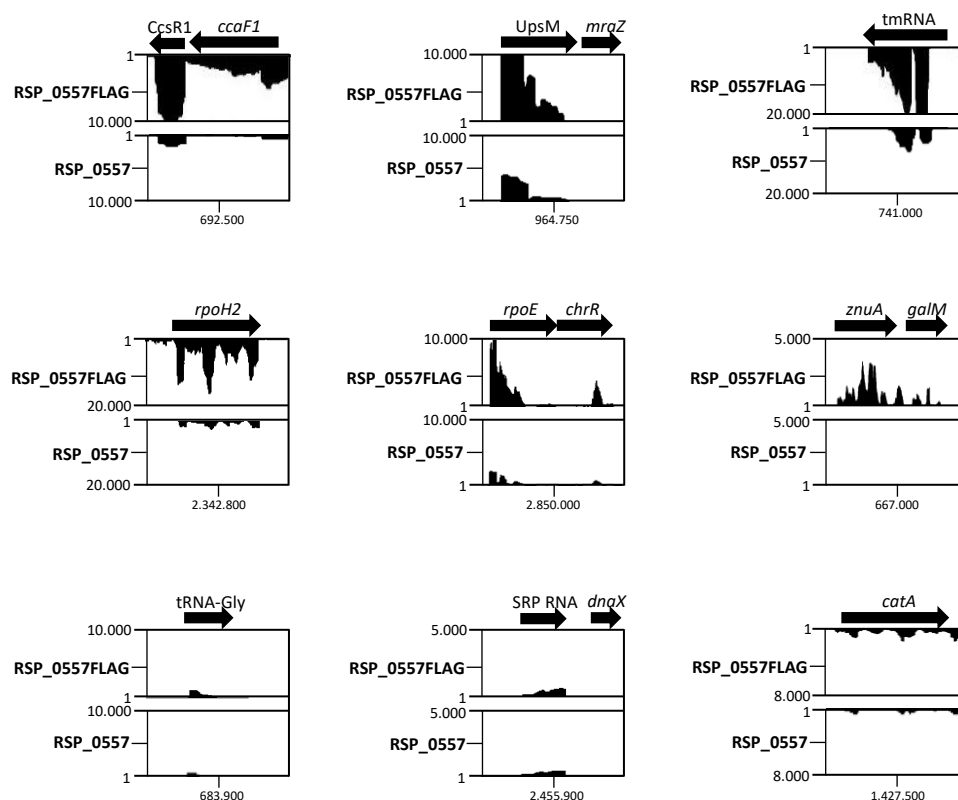


Abbildung 60: Identifizierung RSP_0557-bindender RNA-Transkripte mittels CoIP und RNA-Sequenzierung (RipSeq). Mittels RNASeq (RipSeq) identifizierte RNAs, die durch RSP_0557 mit 3xFLAG-tag (RSP_0557FLAG) und ohne 3xFLAG-tag (RSP_0557) als Kontrolle co-immunopräzipitiert wurden. Gezeigt sind die *read coverage plots* aus dem *Integrated Genome Browser* für ausgewählte nicht kodierende RNA-Transkripte (obere Reihe) und mRNA-Transkripte (mittlere Reihe). Die untere Reihe zeigt RNA-Transkripte, die in der CoIP mit CcaF1FLAG, aber nicht in der mit RSP_0557FLAG angereichert wurden (modifiziert nach Grützner *et al.*, 2021b).

4 Diskussion

Die Forschungsergebnisse der letzten zwei Jahrzehnte haben gezeigt, dass die posttranskriptionelle Regulation der Genexpression in Bakterien ein komplexes Netzwerk aus regulatorischen RNAs, RNA-Bindeproteinen und Ribonukleasen ist, die eine schnelle Adaption der Zelle an sich verändernde Umweltbedingungen ermöglicht. Wie die einzelnen Facetten der posttranskriptionellen Regulation zusammenhängen und kontrolliert werden, ist für viele Bakteriengattungen zum Teil noch nicht vollständig oder gar nicht aufgeklärt. In dieser Arbeit wurden neue Aspekte der sRNA-vermittelten Stressantwort sowie die Funktion eines kleinen Proteins in der posttranskriptionellen Genregulation im Hinblick auf die RNA-Stabilität und -Prozessierung in dem Modellorganismus *R. sphaeroides* untersucht. Die Ergebnisse dieser Arbeit vertiefen den Kenntnisstand zur Komplexität der bakteriellen Genregulation und den damit verbundenen Anpassungsmöglichkeiten.

4.1 Die kleinen regulatorischen RNAs StsR und UpsM

4.1.1 Charakterisierung der sRNA StsR

Die sRNA StsR (*small RNA targets small RNA*; früher RSs0827) wurde zum ersten Mal im Kontext von Transkriptom-Analysen (RNASeq) in *R. sphaeroides* identifiziert und auf dem Chromosom 1 im intercistronischen Bereich der Gene *RSP_2239* (tRNA/rRNA Methyltransferase) und *RSP_2240* (CoA-Bindeprotein) mit einer Länge von 72 Nukleotiden annotiert (Peuser *et al.*, 2012; Remes *et al.*, 2017). Bioinformatische Untersuchungen des Genlokus der sRNA zeigten, dass dieser in der Familie der *Rhodobacteraceae* stark konserviert ist (Abbildung Anhang 1). Der Genlokus weist dabei in *R. sphaeroides*, *R. capsulatus* und *Jannaschia sp.* strain CCS1 eine RpoHI/II abhängige Promotorsequenz am 5' Ende auf und kodiert einen Rho-unabhängigen Terminator am 3' Ende. Experimentell konnte in *R. sphaeroides* die Expression der sRNA StsR unter Singulett-Sauerstoff- ($^1\text{O}_2$) und Hitzestress (42 °C) auf die alternativen σ -Faktoren RpoHI/II zurückgeführt werden (Abbildung 14). RpoHI und RpoHII sind in *R. sphaeroides* alternative σ -Faktoren, die an unterschiedlichen Stressantworten in der Zelle beteiligt sind (Nuss *et al.*, 2009; Nuss *et al.*, 2010; Glaeser *et al.*, 2011). Es ist bekannt, dass durch $^1\text{O}_2$ der alternative σ -Faktor RpoE von seinem Anti- σ -Faktor ChrR durch proteolytischen Abbau des letzteren freigesetzt wird (Nuss *et al.*, 2013). Zu dem Regulon, welches durch RpoE exprimiert wird, gehört unter anderem der alternative σ -Faktor RpoHII. RpoHII aktiviert als alternativer σ -Faktor ein eigenes Regulon, das zu einer vielseitigen Stressantwort führt (Nuss *et al.*, 2009). Zu dem RpoHII-Regulon gehören verschiedene sRNAs (SorY, SorX und CcsR1-4) und Gene, die unterschiedliche Schutzsysteme gegen oxidativen Stress (GSH-abhängige Schutzsysteme, $^1\text{O}_2$ -Quencher, Methioninsulfoxid- und Thioredoxin-Reduktasen) kodieren. Dadurch wird der Energie- und Aminosäurestoffwechsel reduziert und die Zelle vor Schäden geschützt (Adnan *et al.*, 2015; Billenkamp *et al.*, 2015; Peng *et al.*, 2016). Der alternative σ -Faktor RpoHI wird verstärkt bei Hitze- und Singulett-Sauerstoffstress exprimiert, wobei die Expression unter $^1\text{O}_2$ unabhängig von RpoE geschieht (Abbildung 9; Green & Donohue, 2006). Neben Hitze und $^1\text{O}_2$ konnte die Expression der sRNA StsR auch durch das Salz ZnSO_4 und das Schwermetall CdCl_2 induziert werden (Abbildung 16). Hinzu kommt eine verstärkte Induktion der sRNA StsR unter aeroben Wachstumsbedingungen (Abbildung 16). Sobald Sauerstoff in der Umgebung von *R. sphaeroides* vorliegt, stellt das Bakterium seinen Stoffwechsel auf eine aerobe

Atmung um, wodurch große Mengen an Energie generiert werden. Jedoch besteht bei einer aeroben Atmung die Gefahr der Entstehung von ROS, die schädlich für alle zellulären Moleküle sein können. ROS entstehen im aeroben Stoffwechsel durch eine fehlerhafte Übertragung von Elektronen und Protonen auf Sauerstoff in der Atmungskette. Um sich vor einer zu hohen Konzentration an ROS zu schützen, exprimiert *R. sphaeroides* Gene für verschiedene Schutzmechanismen, zu denen unter anderem auch verschiedene sRNAs gehören (Adnan *et al.*, 2015; Billenkamp *et al.*, 2016; Peng *et al.*, 2016). Erhöhte Transkript-Spiegel der sRNA StsR wurden dementsprechend auch in Gegenwart ROS H₂O₂ und Superoxid festgestellt (Abbildung 16). Das Expressionsmuster von StsR unter den getesteten Stressbedingungen ist sehr ähnlich zu dem der sRNAs CcsR1-4, SorY und SorX, die ebenfalls einen RpoHI/HII-abhängigen Promotor besitzen (Adnan *et al.*, 2015; Billenkamp *et al.*, 2015; Peng *et al.*, 2016). RNASeq-Daten und Northern Blot-Analysen bestätigten zudem (Abbildung Anhang 2 und Abbildung 16 & 26), dass die sRNA StsR am stärksten in der stationären Phase exprimiert wird, was in Abschnitt 4.1.3 diskutiert wird (Remes *et al.*, 2017; McIntosh *et al.*, 2019).

4.1.2 Die Prozessierung von UpsM wird über StsR reguliert

Die sRNA StsR besitzt neben einem eigenständigen Promotor am 5' Ende und einem Rho-unabhängigen Terminator am 3' Ende weitere Eigenschaften einer prototypischen *trans*-kodierten sRNA. *Trans*-kodierte sRNAs sind in der Regel 50-400 Nukleotide lang und werden in intercistronischen Bereichen, das heißt zwischen zwei Protein-kodierenden Genen, kodiert. Ein Großteil der *trans*-kodierten sRNAs regulieren die Translation ihrer Ziel-mRNA(s), indem über eine Interaktion der sRNA mit der mRNA die Translation inhibiert wird oder die Degradation der mRNA initiiert wird (Gottesman, 2005; Aiba, 2007). Da *trans*-kodierte sRNAs in den meisten Fällen eine begrenzte Komplementarität zu ihrer Ziel-RNA aufweisen, gestaltet sich die Identifikation eines Interaktionspartners oft schwierig (Massé *et al.*, 2003; Storz *et al.*, 2011; Vogel & Luisi, 2011).

Auch die Bestimmung der Ziel-RNA und der damit verbundenen Funktion erwies sich bei der sRNA StsR aufgrund ihres *trans*-kodierten Charakters als schwierig. Dennoch konnte durch *in vivo* Studien eine kausale Abhängigkeit zwischen der Expression von StsR und der Prozessierung der sRNA UpsM unter verschiedenen Stress- und Wachstumsbedingungen festgestellt werden (Abbildung 16). Dabei wird UpsM aus einer 206 nt langen Vorläufer-RNA zu einem 130 nt langen 3' Fragment prozessiert, welches stabil in der Zelle vorliegt (Abbildung 16). Auch über den zeitlichen Verlauf unter Singulett-Sauerstoffstress (¹O₂) wurde eine Akkumulation von StsR sowie des UpsM-Prozessierungsfragments mittels Northern Blot nachgewiesen, sodass ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der StsR-Expression und der UpsM-Prozessierung hergestellt werden konnte (Abbildung 18). Die Deletion der sRNA StsR (Δ StsR) bestätigt den beobachteten Effekt, da ohne StsR keine Prozessierung der sRNA UpsM induziert wird (Abbildung 18). Eine *in silico* Hybridisierungsanalyse mittels IntaRNA (Mann *et al.*, 2017) sagt die Interaktion der beiden sRNAs vorher (Abbildung 15). Um die StsR-abhängige Prozessierung der sRNA UpsM weitergehend *in vivo* zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit verschiedene Plasmid-basierte Überexpressionsvarianten von StsR kloniert. Diese verdeutlichen eindrucksvoll, dass die Prozessierung der sRNA UpsM von StsR abhängt. Eine Überexpression der vorhergesagten, 28 nt langen StsR-Bindungsregion für UpsM (pBBRStsR_BR) genügt, um eine

Prozessierung von UpsM hervorzurufen (Abbildung 19). Eine Mutation von vier Nukleotiden in der Bindungsregion (pBBRStsR_mut) ist hingegen ausreichend, um die Akkumulation des UpsM 3' Fragments und somit die Prozessierung deutlich zu reduzieren (Abbildung 19). Eine direkte Interaktion zwischen beiden sRNAs konnte mittels EMSAs zusätzlich *in vitro* gezeigt werden, wobei der durch IntaRNA vorhergesagte Interaktionsbereich (Mann *et al.*, 2017) an das 5' Ende der sRNA UpsM durch verschieden lange *in vitro* Transkripte bestätigt wurde (Abbildung 23). Die EMSAs demonstrieren außerdem, dass eine Mutation in der vorhergesagten Bindungsregion zu einer schwächeren Interaktion beider RNAs führt. Dieses Ergebnis unterstützt die Beobachtung der verringerten Prozessierung von UpsM durch die Überexpression einer mutierten Sequenz von StsR *in vivo* (Northern Blot), die auf eine instabilere Interaktion der beiden RNAs zurückzuführen ist (Abbildung 19).

Wie schon in Abschnitt 1.2.4.2 beschrieben, beschränkt sich der Interaktionsbereich zwischen einer *trans*-kodierte sRNA und ihrer Ziel-RNA in der Regel auf eine nicht durchgehende Komplementarität, die maximal 20 Bp, inklusive Nicht-Watson-B'Crick-Bp, umfasst. Deshalb sind *trans*-wirkende sRNAs oft auf die RNA-Bindeproteine (RNA-Chaperone) Hfq oder ProQ angewiesen, die die Stabilität und die Basenpaarung zwischen beiden RNA-Molekülen vermitteln (Franze de Fernandez *et al.*, 1968; Smirnov *et al.*, 2016; Olejniczak & Storz, 2017). Für UpsM konnte bereits in Berghoff *et al.* 2011 gezeigt werden, dass diese sRNA Hfq-abhängig ist (Berghoff *et al.*, 2011; Weber *et al.*, 2016). In dieser Arbeit konnte in den Abbildungen 20 und 21 bestätigt werden, dass die sRNA StsR ebenfalls von dem RNA-Chaperon Hfq abhängig ist und ihre Stabilität darüber beeinflusst wird. Die Abhängigkeit von Hfq konnte zusätzlich durch eine CoIP bestätigt werden (Abbildung 21). Ob die Interaktion beider sRNAs jedoch auch durch Hfq vermittelt wird, lässt sich auf der Grundlage dieser Daten nicht abschließend sagen. StsR könnte jedoch über ihre Uracil-reiche Sequenz am 3' Ende an die proximale Oberfläche des Hfq-Proteins binden, während UpsM mit der distalen Oberfläche des Proteins interagieren könnte (Lorenz *et al.*, 2010; Otaka *et al.*, 2011; Ishikawa *et al.*, 2012). Diese Hypothese müsste aber durch weitere Untersuchungen validiert werden.

Neben ihrer Hfq-vermittelten Interaktion könnten beide sRNAs auch einen Einfluss auf die vorhandene Menge bzw. den Pool von Hfq in der Zelle haben. Es ist bekannt, dass das Hfq-Protein bei sRNA-abhängigen Regulationsprozessen ein limitierender Faktor sein kann (Papenfort & Vogel, 2009; Hussein & Lim, 2011; Moon & Gottesman, 2011). In einer *E. coli*-Zelle befinden sich ungefähr 10.000 Hfq-Hexamere. Bei oxidativem Stress wird die sRNA OxyS mit ungefähr 4.500 Molekülen pro Zelle exprimiert (Altuvia *et al.*, 1997). Diese hohe Anzahl an sRNA-Molekülen verknüpft dementsprechend die verfügbare Hfq-Menge in einer Situation, in der die Zelle eine effektive Stressantwort organisieren muss (Hussein & Lim, 2011; Moon & Gottesman, 2011). In der exponentiellen Phase macht die sRNA UpsM 60 % aller Hfq-gebundenen RNA-Moleküle aus, was den Pool an freien Hfq-Molekülen verringert (Berghoff *et al.*, 2011). Beim Übergang in die stationäre Phase wird die sRNA StsR stark exprimiert (Remes *et al.*, 2017; McIntosh *et al.*, 2019). Beide sRNAs konkurrieren in dieser Phase um Hfq-Proteine, was zu einer Freisetzung, Degradation und somit verringerten Abundanz von UpsM führen könnte (Abbildung 26 A). Gleichzeitig wird die sRNA StsR durch Hfq stabilisiert (Abbildung 20 A) und ist funktionell aktiv für weitere Ziel-mRNAs. Zusätzlich können durch die direkte sRNA-sRNA Interaktion Hfq-Hexamere freigesetzt werden, die weitere sRNAs für die Anpassung an die stationäre Phase binden könnten.

Aus den *in vivo* und *in vitro* Daten lässt sich schließen, dass es sich in diesem Fall um eine Interaktion zweier *trans*-kodierten sRNAs in *R. sphaeroides* handelt, die über das RNA-Chaperon Hfq vermittelt wird. Aus den Studien von Weber *et al.* 2016 ist bekannt, dass die Prozessierung der sRNA UpsM aus einem 206 nt langen Transkript in ein 130 nt langes Prozessierungsfragment durch die Endoribonuklease E (RNase E) an der Position 76 katalysiert wird (Weber *et al.*, 2016). Die RNase E ist ein Enzym, das eine Präferenz für einzelsträngige, AU-reiche Bereiche in der Nähe einer Haarnadelschleife besitzt (Mackie, 2013). Die vorhergesagte Struktur von UpsM durch den Webserver Mfold (Zuker, 2003) zeigt, dass die Prozessierungsstelle von UpsM im Stammbereich einer Haarnadelschleife liegt. Diese Haarnadelschleife im 5' Bereich sorgt dafür, dass das RNA-Molekül in diesem Bereich stabilisiert und vor einer ribonukleolytischen Spaltung bzw. einem Abbau geschützt wird (Abbildung 24 A). Durch ein *structure probing* Experiment mit der sRNA UpsM allein und nach Komplettierung mit der sRNA StsR wurde gezeigt, dass die Interaktion beider sRNAs zu einer Konformationsänderung in UpsM führt (Abbildung 24 B). Der stabile Bereich, in dem die RNase E Schnittstelle liegt, wird durch die Bindung von StsR an das 5' Ende von UpsM aufgelöst. Als Folge wird die Prozessierungsstelle für RNase E zugänglich (Abbildung 24 C). Dass die Prozessierung von UpsM allein auf eine StsR-abhängige Konformationsänderung zurückzuführen ist, wird zusätzlich durch ein Degradations-Experiment mit beiden sRNAs und der katalytischen Untereinheit der RNase E bestätigt (Abbildung 23 B). Eine entsprechende Prozessierung von UpsM wird hervorgerufen, wenn StsR zuvor mit UpsM einen Komplex bildet (Abbildung 23 B).

Die beschriebenen Ergebnisse verdeutlichen, dass es sich bei StsR und UpsM um eine sRNA-sRNA Interaktion handelt, durch die eine RNase E-katalysierte Prozessierung des UpsM-Primärtranskripts ausgelöst wird. Bis jetzt ist eine direkte sRNA-sRNA Interaktion nur für die RNAs CyaR und ArcZ beschrieben worden, die beide die Translation von *rpoS* in *E. coli* regulieren. ArcZ bewirkt durch eine Bindung an die 5' UTR der *rpoS* mRNA eine Strukturänderung, sodass *rpoS* translatiert wird. CyaR kann zum einen an die 5' UTR von *rpoS* binden und deren Degradation fördern oder zum anderen mit der sRNA ArcZ interagieren. Durch die Interaktion der sRNA CyaR mit ArcZ, die Hfq-abhängig ist, werden beide sRNAs durch RNase E geschnitten. Dadurch wird die aktivierende Wirkung von ArcZ auf die Translation von *rpoS* inhibiert. In unseren Northern Blot-Analysen konnte jedoch gezeigt werden, dass das prozessierte 3' Fragment von UpsM (130 nt) stabil in der Zelle vorliegt, während das 5' Fragment (76 nt) nach der Prozessierung schnell abgebaut wird (Weber *et al.*, 2016). Somit kann das stabile 3' Fragment von UpsM (130 nt) als die funktionelle Form von UpsM betrachtet werden. In *Vibrio cholerae* ist MicX eine sRNA, die RNase E- und Hfq-abhängig aus einem Vorläufertranskript in ihre funktionell aktive Form prozessiert wird. Jedoch ist bei MicX nicht bekannt, ob diese Art der Prozessierung über eine weitere sRNA ausgelöst wird oder andere Faktoren beteiligt sind (Davis & Waldor, 2007). Durch bioinformatische und experimentelle Analysen konnte für UpsM bestätigt werden, dass das 3' Prozessierungsfragment (130 nt) die biologisch funktionelle Form von UpsM ist und eine Interaktion mit den mRNA-Transkripten *mraY* und *ftsW* aus dem *dcw* Gencluster eingeht (Abbildung 28). Diese Interaktion führt zu verringerten mRNA-Spiegeln der Gene *ftsW* und *mraY* (Abbildung 29). Dabei bindet UpsM (130 nt) nicht in der 5' Region dieser RNA-Transkripte, sondern in der kodierenden Sequenz (Abbildung 28). Eine Interaktion mit dem kodierenden Bereich der Ziel-mRNA ist auch für die sRNAs RyhB und SgrS in *E. coli*, RybB in *S. typhimurium* und PcrX in *R. sphaeroides* beschrieben, wodurch die

Stabilität der entsprechenden mRNA-Transkripte beeinflusst wird (Desnoyers *et al.*, 2009; Pfeiffer *et al.*, 2009; Papenfort *et al.*, 2010; Bobrovskyy & Vanderpool, 2014; Eisenhardt *et al.*, 2018). Der Mechanismus, der zu verringerten RNA-Spiegeln von *ftsW* und *mraY* führt, konnte in dieser Arbeit jedoch nicht geklärt werden. Die Bindung von UpsM (130 nt) im kodierenden Bereich der Gene *ftsW* und *mraY* könnte entweder die Translation inhibieren, indem das Ribosom blockiert wird, oder eine Prozessierung der doppelsträngigen RNA durch die RNase III bewirken (Silvaggi *et al.*, 2005; Brantl & Müller, 2019).

4.1.3 Effekt von StsR auf das Wachstum von *R. sphaeroides*

Neben der direkten sRNA-sRNA Bindung zwischen StsR und UpsM konnte auch eine Interaktion von StsR mit der 5' UTR der *dcw* mRNA nachgewiesen werden, die ja die UpsM RNA-Sequenz beinhaltet. Die Bindung von StsR an die UpsM RNA als Bestandteil der 5' UTR der *dcw* mRNA führt wahrscheinlich zu der gleichen Strukturveränderung wie in der freien UpsM RNA und somit zur RNase E-abhängigen Prozessierung der 5' UTR, was experimentell noch bestätigt werden müsste (Abbildungen 26, 27). Das durch die RNase E-Spaltung entstehende monophosphorylierte 5' Ende der *dcw* mRNA könnte dabei ausschlaggebend für einen weiteren Abbau der *dcw* mRNA durch RNase E und weitere RNasen sein (Mackie, 1998; Jiang *et al.*, 2000). Ein zweiter negativer Effekt, der durch die Interaktion von StsR mit der 5' UTR der *dcw* mRNA verursacht wird, ist das reduzierte Überlesen der Terminatorstruktur (*read-through*) zwischen UpsM und *mraZ* aus (Abbildung 26 B), d.h. die verstärkte vorzeitige Termination der Transkription des *dcw* Genclusters in Anwesenheit von StsR. Ein ähnlicher Mechanismus, bei dem eine sRNA eine vorzeitige Termination begünstigt, ist für die sRNA ChiX in *E. coli* und *S. enterica* beschrieben. In diesem Fall bewirkt die Interaktion der sRNA mit der 5' UTR eine vorzeitige Rho-abhängige Termination (Bossi *et al.*, 2012; Kavita *et al.*, 2018). In unserem Fall löst die Bindung von StsR an die 5' UTR keine Rho-abhängige, sondern eine Rho-unabhängige Termination aus. Ein ähnlicher Prozess ist die Attenuation, bei der ebenfalls die Rho-unabhängigen Termination reguliert wird. Die Interaktion einer sRNA oder einer „unbeladenen“ tRNA mit der 5' UTR eines mRNA-Transkripts führt dabei entweder zu einer vorzeitigen Termination oder zu *read-through* Transkription (Henkin & Yanofsky, 2002; Merino & Yanofsky, 2005; Naville & Gautheret, 2010; Silva *et al.*, 2019). Für sRNAs ist allerdings am häufigsten eine erhöhte *read-through* Transkription beschrieben, die durch eine sRNA-Interaktion mit der 5' UTR eines mRNA-Transkripts ausgelöst wird. Beispiele dafür sind die sRNAs DsrA, ArcZ und RprA, die an die 5' UTR von *rpoS* binden und eine vorzeitige Termination durch Rho inhibieren (Lease *et al.*, 1998; Majdalani *et al.*, 2002; Madhugiri *et al.*, 2010; Sedlyarova *et al.*, 2016). Bei der Interaktion der sRNA StsR mit der 5' UTR der *dcw* mRNA kommt es dagegen zu einer erhöhten vorzeitigen Rho-unabhängigen Termination der Transkription, was die Besonderheit der regulatorischen Funktion von StsR illustriert.

Auf Grundlage dieser Daten lässt sich ein Modell entwickeln, das den außergewöhnlichen Phänotyp des *R. sphaeroides* ΔStsR Stamms bezüglich Wachstumsverhalten (Abbildung 11) und Zellmorphologie (Abbildung 12) erklärt. In der exponentiellen Phase werden große Mengen der sRNA UpsM generiert, sodass UpsM einen Großteil aller Hfq-gebundenen RNA-Moleküle ausmacht (Berghoff *et al.*, 2011). In 1 % aller Transkriptionsereignisse wird die Terminatorstruktur zwischen UpsM und *mraZ* überlesen

und führt zur Expression der *downstream* liegenden *dcw* Gene, die für eine geregelte Zellteilung und normales Wachstum von *R. sphaeroides* sorgen (Abbildung 61).

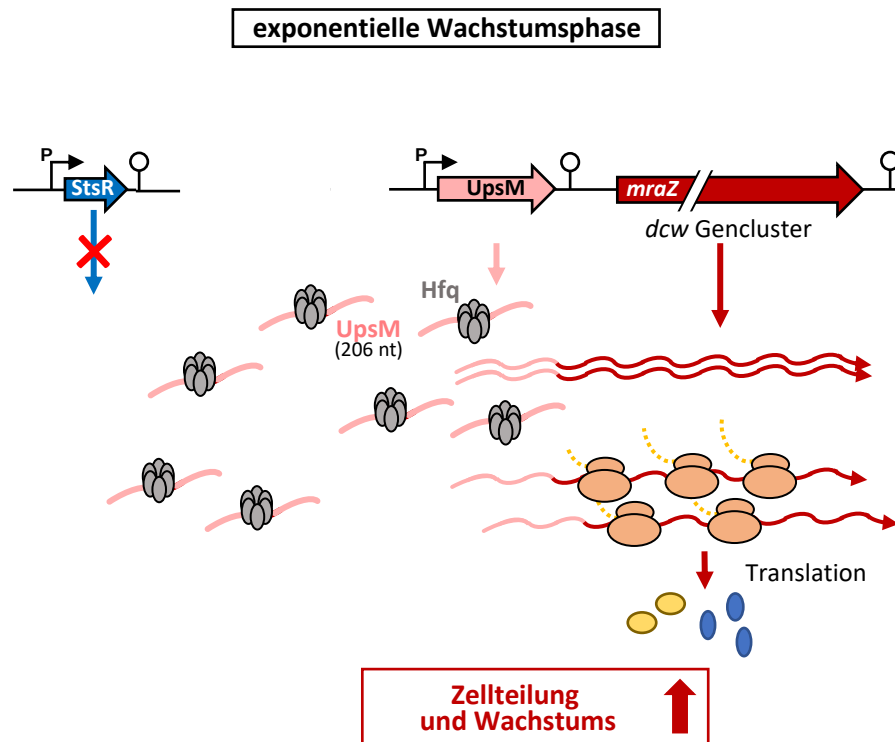


Abbildung 61: Modell zur Regulation der Zellteilung in *R. sphaeroides* in der exponentiellen Wachstumsphase. In der exponentiellen Wachstumsphase werden in *R. sphaeroides* UpsM und das *dcw* (*division and cell wall* Gencluster) über den konstitutiven Promotor am 5' Ende exprimiert. Die sRNA UpsM entsteht durch vorzeitige Termination in der 5' UTR vor dem Gen *mraZ* (Haarnadelschleife). Der Terminator wird in etwa 1% der Transkriptionsereignisse überlesen (*read-through*), um die *dcw* Gene zu exprimieren. Dies führt zu einer regulierten Zellteilung und normalem Wachstumsverhalten. UpsM ist eine der abundantesten sRNAs in *R. sphaeroides* und macht 60 % aller Hfq-gebundenen RNA-Moleküle aus. Die sRNA StsR wird in der exponentiellen Phase nicht oder nur mit sehr geringer Abundanz exprimiert (rotes X; modifiziert nach Grützner *et al.*, 2021b).

Unter Stressbedingungen oder beim Übergang in die stationäre Phase wird die sRNA StsR über die alternativen σ -Faktoren RpoH/HII stark exprimiert. Die sRNA StsR kann einerseits über das RNA-Chaperon Hfq eine Interaktion mit UpsM (206 nt) eingehen, was eine strukturelle Veränderung in UpsM hervorruft und zu einer RNase E-abhängigen Prozessierung führt (Abbildung 62). Durch die Prozessierung geht UpsM (206 nt) von einer inaktiven in seine funktionell aktive Form über (UpsM 130 nt). Das 3' Prozessierungsfragment (130 nt) von UpsM kann anschließend mit den mRNA-Transkripten von *ftsW* und *mraY* interagieren. Die Interaktion führt durch einen bis jetzt noch nicht untersuchten Mechanismus zu einem verringerten mRNA-Spiegel der Gene *ftsW* und *mraY* (Abbildung 29). Andererseits kann die sRNA StsR auch eine Interaktion mit der 5' UTR der *dcw* mRNA eingehen. Diese Bindung bewirkt eine Prozessierung der 5' UTR des *dcw* Genclusters durch die RNase E. Das entstandene 5' Monophosphat kann über die RNase E wahrgenommen werden, wodurch eine weitere

Spaltung des *dcw* Transkripts stattfinden und seinen Abbau verstärken könnte. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Bindung von StsR an die 5' UTR der *dcw* mRNA das Überlesen des Terminators zwischen *UpsM* und *mraZ* negativ beeinflusst (Abbildung 62).

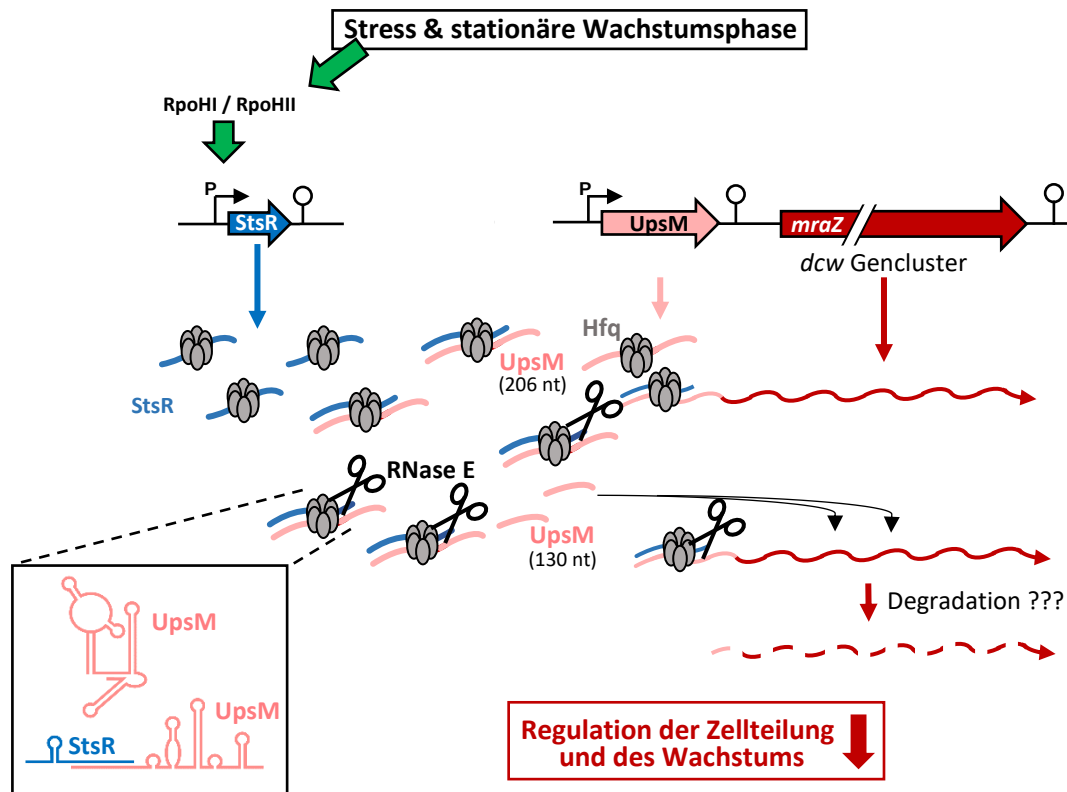


Abbildung 62: Modell zur Regulation der Zellteilung in *R. sphaeroides* unter Stressbedingungen und beim Übergang in die stationäre Phase. Unter Stressbedingungen und beim Übergang in die stationäre Phase wird die *trans*-kodierte sRNA StsR über die alternativen σ -Faktoren RpoHI und RpoHII exprimiert. Die sRNA StsR geht eine Interaktion mit der sRNA UpsM und der 5' UTR der *dcw* mRNA (bei der UpsM Teil ihres 5' UTRs ist) über das RNA-Chaperon Hfq ein. Die Interaktion führt zu einer Änderung in der Sekundärstruktur von UpsM und der 5' UTR der *dcw* mRNA. Dies ermöglicht eine Prozessierung von UpsM und der 5' UTR durch die RNase E. Das resultierende 3' Fragment von UpsM kann anschließend mit Cistrons der *dcw* mRNA (*ftsW* und *mraY*) interagieren. Durch die Prozessierung der 5' UTR und die Antisense-Funktion des UpsM 3' Fragments (130 nt) wird die Translation des *dcw* Genclusters reprimiert und die Zellteilung verlangsamt (modifiziert nach Grützner *et al.*, 2021b).

Die Deletion von StsR (Δ StsR) führt entsprechend zu einem längeren Wachstum in der exponentiellen Phase (Abbildung 11 A), zu einer höheren Überlebensrate in der stationären Phase (Abbildung 11 B) und zu einem vorzeitigen Auswachsen der Zellen in der *outgrowth* Phase gegenüber dem *R. sphaeroides* Wildtyp (Abbildung 11 A und 12). Die Beobachtung, dass die Deletion der sRNA StsR ein stärkeres Wachstum als der Wildtyp aufweist, war zwar überraschend, lässt sich aber durch die Lebensbedingungen von *R. sphaeroides* erklären. *R. sphaeroides* ist ein aquatisches Bakterium, das in seiner natürlichen Umgebung oft wechselnden Licht- und Sauerstoffkonzentrationen, Nährstofflimitierungen, antimikrobiellen Stoffen, Fressfeinden oder Phagen ausgesetzt ist. Ein verlangsamtes Wachstum unter bestimmten Bedingungen kann in der Natur dafür sorgen, dass sich

die Bakterienzelle besser anpassen kann und das Überleben der einzelnen Zelle bzw. der gesamten Population gesichert wird (McArthur, 2006; Menge *et al.*, 2012; Hobbie & Hobbie, 2013; Chubukov & Sauer, 2014; Díaz-Muñoz & Koskella, 2014). Da sowohl die sRNA StsR (Abbildung Anhang 1) als auch eine verlängerte 5' UTR des *dcw* Genclusters in verschiedenen Mitgliedern der *Rhodobacteraceae* bioinformatisch identifiziert wurde (Weber *et al.*, 2016), kann das beschriebene Modell ein neuer Mechanismus zur Regulation der Zellteilung in der Gruppe der α -Proteobakterien sein. Somit scheint die sRNA StsR nicht nur in *R. sphaeroides*, sondern auch in anderen Gruppen der *Rhodobacteraceae* eine wichtige Funktion in der Zellteilung und der damit verbundenen Anpassung an biotische und abiotische Faktoren in der Umwelt zu haben.

Trans-kodierte sRNAs haben die Eigenschaft, dass sie aufgrund ihrer begrenzten Basenkomplementarität mehrere Ziel-Gene als Interaktionspartner besitzen können (Massé *et al.*, 2003; Storz *et al.*, 2011; Vogel & Luisi, 2011). Neben der Interaktion mit UpsM bzw. der 5' UTR des *dcw* Genclusters konnte experimentell gezeigt werden, dass StsR auch an die mRNA von *rpoE* bindet (Eisenhardt *et al.*, 2021). Wie in Abschnitt 1.5.2 beschrieben, ist RpoE der zentrale alternative σ -Faktor, der an einer zellulären Antwort auf $^1\text{O}_2$ und andere Stressbedingungen in *R. sphaeroides* beteiligt ist. Die Aktivierung von RpoE unter verschiedenen Stressbedingungen und die gegenläufige (negative) Regulation der *rpoE* mRNA-Spiegel durch die sRNA StsR ist ein *incoherent feed-forward loop* hinsichtlich der RpoE-abhängigen Stressantwort (Kim *et al.*, 2008; Eisenhardt *et al.*, 2021). Dadurch kann StsR indirekt die Expression weiterer mRNAs bzw. Gene beeinflussen. Ein ähnlicher Mechanismus des *incoherent feed-forward loops* ist auch für die sRNA PcrZ in *R. sphaeroides* und für andere sRNAs in verschiedenen Bakterienspezies, wie zum Beispiel für *E. coli*, *Legionella pneumophila*, *Vibrio cholerae* oder *Streptomyces coelicolor*, beschrieben (Mank *et al.*, 2012; Mank *et al.*, 2013; Butz *et al.*, 2019; Engel *et al.*, 2019; Khan *et al.*, 2020; Saoud *et al.*, 2021). In *R. sphaeroides* wird die Transkription von PcrZ durch die Regulatoren PrrA und FnrL induziert. Gleichzeitig beeinflusst die sRNA PcrZ die mRNAs der Photosynthesegene negativ (Mank *et al.*, 2012; Mank *et al.*, 2013). Auch weitere mRNA-Transkripte, die bis jetzt nicht identifiziert wurden, könnten durch die *trans*-kodierte sRNA StsR beeinflusst werden und für eine Anpassung an die vorliegenden Umwelt- und Wachstumsbedingungen sorgen.

In vielen Gram-negativen Bakterien, unter anderem in *E. coli*, wird die Stressantwort durch den alternativen σ -Faktor RpoH und der Übergang von der exponentiellen in die stationäre Wachstumsphase durch RpoS reguliert (Fredriksson & Nyström, 2006; Navarro Llorens *et al.*, 2010; Battesti *et al.*, 2011; Hengge, 2011). In α -Proteobakterien, zu denen *R. sphaeroides* zählt, fehlt jedoch ein Homolog zu RpoS und die Koordination der Genexpression in der stationären Phase ist weitgehend unbekannt. Untersuchungen zur Adaption von *R. sphaeroides* an die stationäre Phase zeigten, dass in dieser Phase ein Set von Genen induziert wird, die an dieser Anpassung beteiligt sind (McIntosh *et al.*, 2019). Dazu gehören vor allem Gene des Quorum Sensing Systems *cerI* und der alternative σ -Faktor *RSP_3095*, der ein Homolog zu RpoS aus Gram-negativen Bakterien sein könnte (Lange & Hengge-Aronis, 1994; McIntosh *et al.*, 2019). Die sRNA StsR gehört entsprechend auch zu diesem Set von Genen, die unter verschiedenen Stressbedingungen und in der stationären Phase exprimiert werden.

Wie die Ergebnisse in dieser Arbeit zeigen, besitzt StsR eine wichtige Funktion in der Stressantwort und beim Übergang von der exponentiellen in die stationäre Phase. Zum einen kann die *trans*-kodierte sRNA die Zellteilung durch die Interaktion mit UpsM und der 5' UTR des *dcw* Genclusters, zum anderen aber auch durch einen *incoherent feed-forward loop* die Expression des alternativen σ -Faktors *rpoE* attenuierend regulieren. Es kann auch vermutet werden, dass StsR weitere mRNA-Transkripte im Hinblick auf die Stressantwort, den Metabolismus oder die Ausbildung des Photosyntheseapparates negativ beeinflusst. Dies muss in weiterführenden Experimenten geklärt werden. Die Erkenntnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Zellteilung und das Wachstum des phototrophen Bakteriums *R. sphaeroides* durch eine sRNA-sRNA und sRNA-mRNA Interaktion zwischen StsR und UpsM bzw. zwischen StsR und der *dcw* mRNA reguliert wird. Sie zeigen aber auch eindrucksvoll die Komplexität der posttranskriptionellen Genregulation in Bakterien, die aus einem Wechselspiel von σ -Faktoren, regulatorischen RNAs, RNA-Strukturänderungen und RNasen besteht.

4.2 Die DUF1127 Proteine CcaF1 (*conserved CcsR associated factor*) und RSP_0557

In der Datenbank InterPro sind ungefähr 17.000 Proteine mit einer DUF1127 Domäne in über 4.000 Bakterienspezies gelistet (Mitchell *et al.*, 2019). Die meisten Spezies gehören der Gruppe der α - (67 %) oder γ -Proteobakterien (30 %) an, wobei bisher nur für wenige Proteine mit einer DUF1127 Domäne eine Funktion beschrieben ist. In dem pflanzenpathogenen Bodenbakterium *Agrobacterium tumefaciens* wird der Phosphat- und Kohlenstoff-Metabolismus (Kraus *et al.*, 2020) und in dem zoopathogenen Bakterium *Brucella abortus* der Fructose-Metabolismus durch kleine Proteine mit einer DUF1127 Domäne beeinflusst (Budnick *et al.*, 2018). In *Salmonella* spp. ist das Protein YjiS aus der DUF1127 Protein-Familie an der Virulenz des Bakteriums beteiligt (Venturini *et al.*, 2020). Der genaue Mechanismus, der der Regulation des Metabolismus bzw. der Virulenz zugrundeliegt, ist jedoch unbekannt.

In dem phototrophen Bakterium *R. sphaeroides* wurden durch RNA-Sequenzierungen vier offene Leseraster identifiziert, die Proteine mit einer DUF1127 Domäne kodieren. Das Protein RSP_6037 (*ccaF1*) ist dabei mit den vier homologen „Cuckoo“-RNAs CcsR1-4 in seiner 3' UTR kodiert, während die Gene der anderen drei Proteine keine benachbarten sRNAs aufweisen (Abbildung 30 und 32). Bioinformatische Analysen ergaben, dass die Anordnung von DUF1127 Protein und sRNA(s) in der 5' bzw. 3' UTR konserviert ist. Diese konservierte Organisation ist nach Reinkensmeier und Giegerich 2015 als CIN1-Lokus (*conserved intergenic neighborhood 1*) bezeichnet worden (Reinkensmeier & Giegerich, 2015) und kommt in vielen α -Proteobakterien vor (Abbildung 31). Aus einer vorherigen Studie ist bekannt, dass die sRNAs CcsR1-4 eine wichtige Rolle in der Stressantwort von *R. sphaeroides* spielen (Billenkamp *et al.*, 2015). Homologe sRNAs zu CcsR1-4 aus *Sinorhizobium meliloti* (NfeR1-2) sind ebenfalls mit DUF1127 Proteinen (SMc02051 und SMc02052) in einem Operon kodiert (Robledo *et al.*, 2017). Die NfeR1-2 sRNAs besitzen in *S. meliloti* eine Funktion in der Resistenz gegen Salzstress und in der Ausbildung von Wurzelknöllchen (Schlüter *et al.*, 2010; Vercruysse *et al.*, 2010; Wilms *et al.*, 2012). Um die Funktion der DUF1127 Proteine näher zu charakterisieren, wurden in dieser Arbeit Untersuchungen zu den *R. sphaeroides* Proteinen CcaF1 (*conserved CcsR associated factor*; früher RSP_6037) und RSP_0557 durchgeführt.

4.2.1 Das DUF1127 Protein CcaF1 ist als RNA-bindendes Protein an der RNA-„Reifung“ beteiligt

Das Protein CcaF1 besitzt in *R. sphaeroides* 71 Aminosäuren und ist mit den sRNAs CcsR1-4 in einem Operon kodiert. Faltungsvorhersagen des Proteins CcaF1 mit dem Webserver PHYPE2 (Kelley *et al.*, 2015) ergaben eine 70 %ige Homologie zu der RNA-Bindedomäne der Smaug Proteine von *D. melanogaster* (Dahanukar & Wharton, 1996; Smibert *et al.*, 1996; Dahanukar *et al.*, 1999; Smibert *et al.*, 1999). Die Smaug Proteine binden während der Embryonalentwicklung von *D. melanogaster* an die *nos* mRNA, inhibieren deren Translation und fördern den Abbau des RNA-Moleküls (Green *et al.*, 2002; Benoit *et al.*, 2009). *In vitro* Bindungs-Experimente (EMSAs) zwischen dem Protein CcaF1 und der sRNA CcsR1 (82 nt) bzw. dem Vorläufertranskript CcsR1-4 (415 nt) zeigen, dass das Protein CcaF1 ein RNA-bindendes Protein ist (Abbildung 46 und 47). CoIP-Experimente mit anschließender RNA-Sequenzierung (RipSeq) bestätigen die RNA-bindende Funktion des Proteins CcaF1 in *R. sphaeroides* (Abbildung 41). Dabei interagiert das Protein CcaF1 nicht nur mit den „Cuckoo“-RNAs CcsR1-4, sondern auch mit weiteren kodierenden und nicht kodierenden RNA-Transkripten.

Um die Funktion des kleinen DUF1127 Proteins CcaF1 näher zu charakterisieren, wurde in dieser Arbeit eine Plasmid-basierte Überexpression des Proteins CcaF1 (pRKccaF1) untersucht, da das *ccaF1_CcsR1-4* Operon essentiell für das Bakterium *R. sphaeroides* ist und keine *ccaF1* Deletion möglich war (Billenkamp *et al.*, 2015). Die Northern Blot-Analyse in Abbildung 34 B zeigt, dass das Protein CcaF1 bei einer Überexpression des gesamten Operons (pRKccaF1_CcsR1-4) einen moderaten Effekt auf die RNase E-abhängige Prozessierung des *ccaF1_CcsR1-4* Transkripts besitzt, das in diesem Stamm sowohl vom Chromosom als auch vom Plasmid exprimiert wird. Eine Überexpression des Proteins CcaF1 ohne das sRNA Cluster (pRKccaF1) führt hingegen zu reduzierten Mengen der sRNA CcsR1 (Abbildung 34) und zu einer Akkumulation des *ccaF1_CcsR1-4* Vorläufertranskripts (Abbildung 37). Da in diesem Fall das CcsR1-4 Vorläufertranskript nur vom Chromosom exprimiert wird, verstärkt sich der Effekt des Proteins CcaF1 auf das Vorläufertranskript (Abbildung 34). Der Northern Blot der Abbildung 37 macht deutlich, dass sich das Prozessierungsmuster zwischen der thermosensitiven RNase E Substitutionmutante (*rne^{E.cts}*) und dem CcaF1-Überexpressionsstamm (*R. sphaeroides* pRKccaF1) unterscheidet. Womöglich bindet CcaF1 bei einer Überexpression des Proteins (pRKccaF1) verstärkt an das *ccaF1_CcsR1-4* und CcsR1-4 Vorläufertranskript und führt zu einer strukturellen Veränderung des RNA-Moleküls, sodass die RNase E-abhängige Prozessierung inhibiert und die Akkumulation dieser Vorläufertranskripts gefördert wird (Abbildung 63). Jedoch muss die Theorie einer Strukturveränderung in der sRNA CcsR1 und dem Vorläufertranskript CcsR1-4 durch die Interaktion mit CcaF1 in nachfolgenden Experimenten bestätigt werden. Eine verringerte Prozessierung des chromosomal exprimierten CcsR1-4 Vorläufertranskripts bei Überexpression des DUF1127 Proteins CcaF1 (pRKccaF1) wirkt sich auch auf die Physiologie des Bakteriums aus. Aus einer vorherigen Studie ist bekannt, dass die sRNAs CcsR1-4 den C1-Metabolismus und den damit verbundenen intrazellulären Glutathion-Spiegel über eine direkte Bindung an die mRNA des Transkriptionsfaktors *flhR* regulieren (Billenkamp *et al.*, 2016). Während die Überexpression des sRNA Clusters (pRKcscR1-4) dementsprechend zu einer erhöhten Stressresistenz gegenüber ROS führt, bewirkt die Überexpression des Proteins CcaF1 den entgegengesetzten Effekt einer verringerten Stressresistenz (Abbildung 38 B und C). Auch das Wachstum von *R. sphaeroides* kann durch die verringerte Prozessierung des Vorläufertranskripts beeinträchtigt sein. Die Überexpression des DUF1127 Proteins führt zu einer

verlängerten Lag-Phase des exponentiellen Wachstums (Abbildung 38 A). Jedoch könnte der Effekt des Proteins auf das Wachstum auch indirekt über andere RNA-Transkripte ausgelöst werden, die von CcaF1 beeinflusst werden.

Die DUF1127 Domäne des Proteins CcaF1 besteht in *R. sphaeroides* 2.4.1 aus 33 Aminosäuren und liegt im C-terminalen Bereich des Proteins. Zusätzlich besitzt das Protein CcaF1 aus *R. sphaeroides* 2.4.1 27 Aminosäuren am N-Terminus (Abbildung 34 A). Das homologe Protein CcaF1 aus dem nahen Verwandten *R. sphaeroides* KD131 besitzt neben der DUF1127 Domäne nur 6 Aminosäuren am N-Terminus. Die Northern Blot-Analysen zeigen, dass das kürzere DUF1127 Protein aus *R. sphaeroides* KD131 ebenfalls zu einem reduzierten CcsR1-Level führt (Abbildung 34 A und C). Folglich sind die 33 Aminosäuren der DUF1127 Domäne ausreichend für eine Bindung des kleinen Proteins an das RNA-Molekül.

Aus der Literatur ist bekannt, dass die Interaktion zwischen der *nos* mRNA und Smaug Proteinen in *D. melanogaster* über das *smaug recognition element* (SRE) vermittelt wird. Das SRE besteht aus einer Haarnadelstruktur, die das Sequenzmotiv 5'-CNGG oder 5'-CNGGN (N steht für ein beliebiges Nukleotid) enthalten (Dahanukar *et al.*, 1999). Die Kombination aus einer spezifischen Sequenz und Struktur ist dabei wichtig für die Interaktion des Smaug Proteins mit dem RNA-Molekül (Dahanukar & Wharton, 1996; Smibert *et al.*, 1996; Dahanukar *et al.*, 1999; Smibert *et al.*, 1999). Mutationen in der Sequenz 5'-CNGGN in der *nos* mRNA bewirken eine Verringerung der Bindung zwischen dem Smaug Protein und der mRNA (Dahanukar *et al.*, 1999; Smibert *et al.*, 1999). Die sRNAs CcsR1-4 von *R. sphaeroides* bestehen aus zwei Haarnadelstrukturen, die das konservierte 5'-CCUCCUCCC-Motiv in den Schleifen aufweisen (Billenkamp *et al.*, 2015). Neben dem 5'-CCUCCUCCC-Motiv beinhaltet die sRNA CcsR1 eine Sequenz 5'-CGGGA und die sRNA CcsR2 eine Sequenz 5'-CUGGC in der ersten Haarnadelschleife, Sequenzen, die denen aus dem SRE sehr ähnlich sind. EMSAs mit dem DUF1127 Protein CcaF1 und der sRNA CcsR1 zeigen, dass es durch Mutationen in der Sequenz 5'-GGGA in der ersten Haarnadelschleife zu einer verschlechterten Bindung zwischen CcaF1 und CcsR1 kommt (Abbildung 48 A), die durch die veränderte Sequenz oder Struktur in dem RNA-Molekül hervorgerufen wird. Dies bestätigt eine Sequenz- und Struktur-abhängige Bindung zwischen dem DUF1127 Protein und der sRNA CcsR1. Mittels iCLIP-Analyse wurde *in vivo* ein Interaktionsbereich zwischen dem Protein CcaF1 und der sRNA CcsR2 identifiziert, der die etwa 50 3'-proximalen Nukleotide der RNA umfasst und möglicherweise die Sequenz CUGGC einschließt (Abbildung 54). Somit könnte die Sequenz bzw. die Struktur in der ersten Haarnadelschleife der CcsR RNAs ausschlaggebend für eine Interaktion mit dem Protein CcaF1 sein. Jedoch muss der iCLIP wiederholt und durch andere experimentelle Ansätze ergänzt werden, um eine exakte Aussage über die Erkennungselemente des DUF1127 Proteins CcaF1 in der sRNA CcsR treffen zu können.

Wie schon beschrieben, kann die Bindung eines Proteins an ein RNA-Transkript die Aktivität der Ribonukleasen an dem entsprechenden RNA-Molekül beeinflussen (Bandyra & Luisi, 2013). In *D. melanogaster* bewirkt die Bindung des Smaug Proteins an die *nos* mRNA die Rekrutierung des Argonaut 1 Proteins (Pinder & Smibert, 2013). Argonaut Proteine sind in Eukaryoten wichtige Faktoren des posttranskriptionellen *gene silencing* (Hammell, 2008; Hutvagner & Simard, 2008; Meister, 2013). Der gebildete Smaug/Argonaut Komplex an der *nos* mRNA reprimiert in *D. melanogaster* die

Translation und fördert den Abbau des entsprechenden RNA-Transkripts (Pinder & Smibert, 2013). Auch viele Bakterien und Archaeen kodieren in ihren Genomen das Argonaut Protein (Wang *et al.*, 2008; Miyoshi *et al.*, 2016; Doxzen & Doudna, 2017; Liu *et al.*, 2018), das mit einer sogenannten *guide* RNA (gRNA) an die entsprechende *target* DNA (tDNA) bindet (Makarova *et al.*, 2009; Swarts *et al.*, 2014; Kaya *et al.*, 2016). Dieser Prozess ist in Prokaryoten ein Schutzmechanismus gegenüber Fremd-DNA in der Zelle, die über den gRNA/Argonaut Komplex abgebaut wird (Hur *et al.*, 2014; Swarts *et al.*, 2015). Dabei kann das Argonaut Protein selbst nukleolytisch aktiv sein, wie es bei *Thermus thermophilus* der Fall ist, oder der nukleolytische Abbau findet über andere, zum Teil unbekannte Enzyme statt (Olovnikov *et al.*, 2013). Auch *R. sphaeroides* ATCC17025 besitzt ein Plasmid-kodiertes Argonaut Protein, das über gRNAs den Abbau fremder DNA induzieren kann. (Liu *et al.*, 2018). Die beteiligten Nukleasen sind jedoch bei *R. sphaeroides* ATCC17025 nicht bekannt (Olovnikov *et al.*, 2013). Der Modellorganismus dieser Arbeit, *R. sphaeroides* 2.4.1, kodiert jedoch kein Argonaut Protein in seinem Genom. Somit kann eine Funktion der CcsR sRNAs als *guide* RNA (gRNA) in einem gRNA/Argonaut Komplex ausgeschlossen werden. Da in der CoIP und Massenspektrometrie (Abbildung 44 und Tabelle 67) keine weiteren Proteine bzw. Nukleasen als Interaktionspartner von CcaF1 identifiziert wurden, kann die Bildung eines größeren Proteinkomplexes mit CcaF1 als integralem Bestandteil ausgeschlossen werden. Dennoch könnte die CcaF1-Bindung an ein RNA-Transkript dessen Struktur verändern, wodurch Ribonukleasen für den RNA-Abbau bzw. die RNA-Prozessierung rekrutiert werden.

Die Ergebnisse der *in vivo* und *in vitro* Experimente bestätigen, dass das DUF1127 Protein CcaF1 eine Interaktion mit den sRNAs CcsR1-4 eingeht und einen regulatorischen Effekt auf die Prozessierung bzw. „Reifung“ der sRNAs besitzt (Abbildung 34 B und 37. Da RNA-Bindeproteine oft mehr als einen RNA-Interaktionspartner besitzen, wurden eine Transkriptom-Analyse (RNASeq) und eine CoIP mit anschließender RNA-Sequenzierung (RipSeq) zur Identifizierung weiterer Bindungspartner durchgeführt (Abbildung 39 und 41). Die vergleichende RNASeq von *R. sphaeroides* pRK4352 (EVC; Leervektorkontrolle) und *R. sphaeroides* pRKccaF1 bestätigen, dass das Protein CcaF1 auch einen Effekt auf andere RNA-Spezies aus dem Transkriptom von *R. sphaeroides* besitzt (Tabelle 64 und 65). Die CoIP/RipSeq Analyse bestätigt zudem, dass CcaF1 neben den sRNAs CcsR1-4 auch weitere RNA-Transkripte bindet. Dazu gehören nicht kodierende RNAs (sRNAs, tRNAs, rRNAs) und mRNAs (Abbildung 41). Für einige RNA-Transkripte, die in der CoIP identifiziert wurden, konnte auch eine Bindungssequenz mittels iCLIP identifiziert werden (Abbildungen 54-56). Northern Blot-Analysen und Berechnungen der Halbwertszeit ausgewählter RNA-Transkripte bestätigen, dass das Protein CcaF1 über die Bindung an die RNA-Moleküle auch teilweise deren Stabilität beeinflusst (Abbildung 49-51). Ob eine Strukturveränderung in den RNA-Molekülen durch die Bindung des Proteins CcaF1 ausschlaggebend für den destabilisierenden Effekt ist und welche Ribonukleasen daran beteiligt sind, kann anhand dieser Experimente nicht geklärt werden und erfordert weitere Untersuchungen.

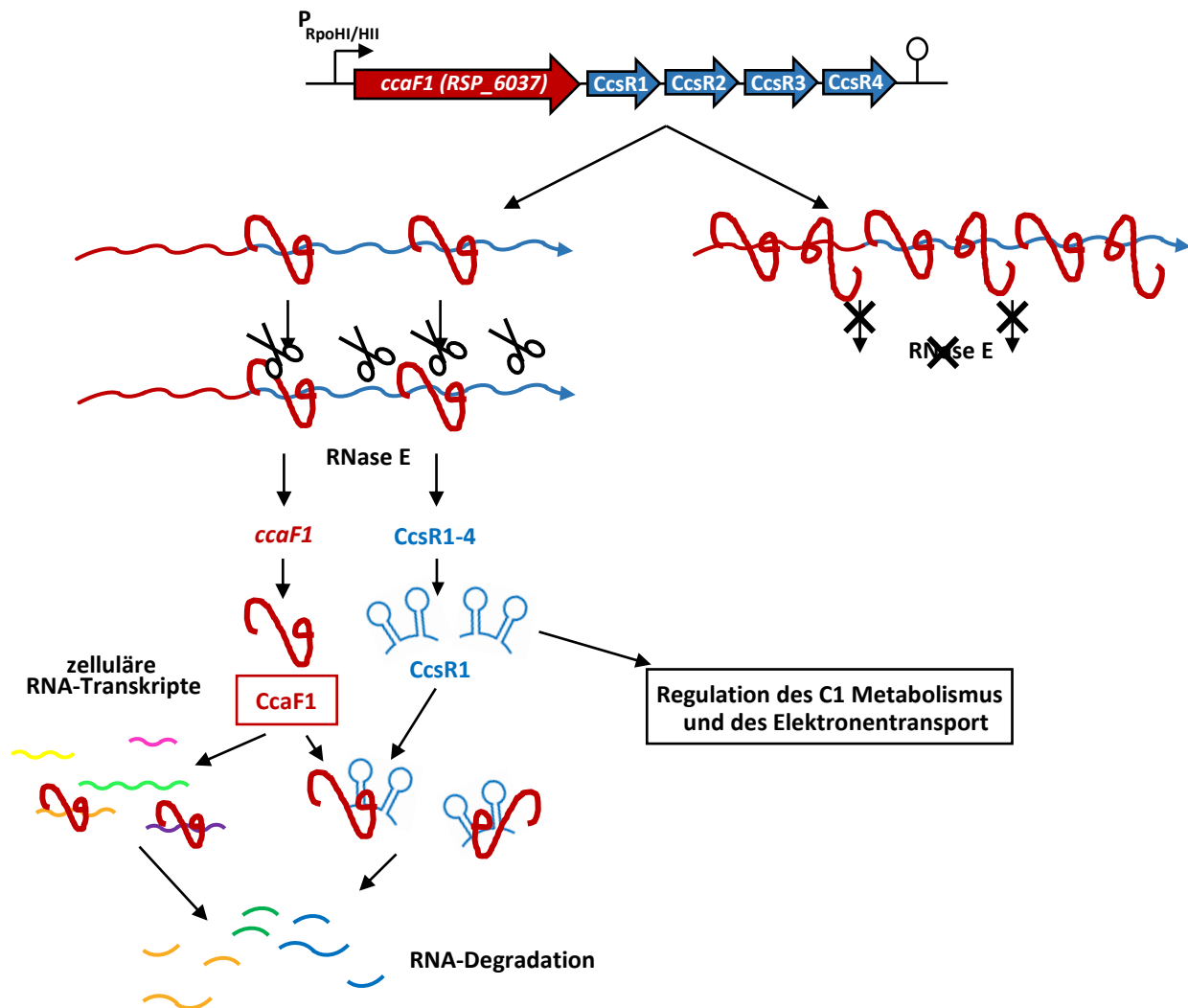


Abbildung 63: Mögliche Funktion des DUF1127 Proteins CcaF1 in der posttranskriptionellen Genregulation von *R. sphaeroides*. Das Protein CcaF1 (rot) bindet an das *ccaF1*-*CcsR1-4* Vorläufertranskript und reguliert darüber die RNase E-abhängige Prozessierung bzw. „Reifung“ der *CcsR1-4* sRNAs (blau). Eine Überexpression des Proteins CcaF1 (rechter Pfad) verringert die RNase E-Aktivität und führt zur Anreicherung des Vorläufertranskripts. Durch den Effekt auf die *CcsR*-Prozessierung trägt CcaF1 zur oxidativen Stressantwort in *R. sphaeroides* bei. Außerdem kann CcaF1 an die sRNA *CcsR1* und an weitere RNA-Transkripte in der Zelle binden und deren Stabilität beeinflussen (modifiziert nach Grützner *et al.*, 2021a).

Die *in vivo* und *in vitro* durchgeführten Experimente zeigen, dass die weit verbreitete DUF1127 Domäne die Bindung zwischen dem Protein CcaF1 und RNA-Molekülen vermittelt. Dabei beeinflusst CcaF1 über die DUF1127 Domäne die Stabilität und Prozessierung seiner RNA-Bindungspartner, wodurch das bakterielle Transkriptom und verschiedene physiologische Prozesse reguliert werden.

Aus Untersuchungen zu Proteinen und Peptiden aus Viren und Bakteriophagen ist bekannt, dass diese über ein sogenanntes Arginin-reiches Motiv (*arginine-rich motif*; ARM) eine Bindung mit RNA-Molekülen eingehen (Tan & Frankel, 1995; Weiss & Narayana, 1998; Bayer *et al.*, 2005). Die Bindung zwischen dem ARM und der RNA wird dabei oft über einen doppelsträngigen Bereich in dem RNA-Molekül vermittelt. Da die meisten Proteine aus der DUF1127-Familie eine große Anzahl an Argininen

in ihrer kurzen Aminosäuresequenz besitzen (Abbildung 34 A) und die Interaktion zwischen dem Protein CcaF1 und der sRNA CcsR1 über eine oder zwei doppelsträngige Haarnadelschleifen vermittelt wird, wäre die Bindung zwischen DUF1127 Domäne und RNA-Molekül über die genannten Arginine denkbar. Jedoch ist das ARM in den untersuchten Proteinen bzw. Peptiden nicht konserviert, was die Identifizierung eines ARM in dem DUF1127 Protein erschwert. Die meisten ARMs bestehen jedoch aus einer Aminosäuresequenz RRXXR (R: Arginin; X: beliebige Aminosäure). Eine ähnlich konservierte Aminosäuresequenz ist auch in der DUF1127 Domäne von CcaF1 mit der Abfolge RRIYR (R: Arginin; I: Isoleucin; Y: Tyrosin) vorhanden (Abbildung 34 A). In weiterführenden Experimenten könnten gezielte Mutationen in der Aminosäuresequenz der DUF1127 Domäne dazu beitragen, ein RNA-bindendes Motiv zu identifizieren.

In Prokaryoten haben RNA-Bindeproteine oft eine Funktion als RNA-Chaperon. Zu den am besten untersuchten RNA-Bindeproteinen in Bakterien gehören Hfq, ProQ, CsrA und CspA. Hfq ist ein RNA-Bindeprotein, das als globaler Regulator in dem sRNA-Netzwerk von Bakterien fungiert und die Ausbildung einer Duplex-Struktur zwischen *trans*-kodierter sRNA und Ziel-mRNA vermittelt. Ein Hfq-Monomer besteht aus 65-100 Aminosäuren (*E. coli* 102 aa; *R. sphaeroides* 77 aa) und bildet mit fünf weiteren Monomeren einen hexameren Ringkomplex. Western Blot-Analysen des Proteins CcaF1 zeigten mehrere Banden, die eine Komplexbildung des Proteins vermuten lassen. Das Laufverhalten der Banden lässt dabei auf einen dimeren bzw. trimeren Komplex schließen (Abbildung 44 und Abbildung Anhang 7). ProQ ist ebenfalls ein RNA-Chaperon, das präferenziell doppelsträngige RNA-Transkripte ohne Sequenzspezifität bindet (Holmqvist *et al.*, 2018; Holmqvist *et al.*, 2020). ProQ besitzt 220 Aminosäuren und bildet im Gegensatz zu Hfq keine Oligomere (Smirnov *et al.*, 2017a). CsrA ist ein 72 Aminosäuren langes Protein, das ähnlich wie CcaF1 das entsprechende RNA-Transkript über eine Haarnadelschleife bindet. In dem Gram-negativen Bakterium *E. coli* bindet CsrA an die RBS oder das Start-Codon der Ziel-mRNA und inhibiert deren Translation. In *B. subtilis* (Gram-positiv) kann CsrA auch als RNA-Chaperon die Interaktion zwischen einer sRNA und einer mRNA vermitteln. Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass es viele funktionelle Ähnlichkeiten zwischen CcaF1 und anderen RNA-Bindeproteinen in Bakterien gibt. Um jedoch die genaue Funktionsweise von Proteinen mit einer DUF1127 Domäne zu verstehen und beschreiben zu können, müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

Die Erkenntnisse dieser Arbeit zeigen, dass Bakterien ein komplexes posttranskriptionelles Netzwerk aus verschiedenen Faktoren besitzen, die ihnen optimale Anpassungsmöglichkeiten an sich ändernde Umweltbedingungen geben. Die identifizierte sRNA StsR spielt dabei eine zentrale Rolle in der Anpassung der Zellteilung unter verschiedenen Wachstums- und Stressbedingungen. Ein neues Feld der posttranskriptionalen Genregulation machen aber auch sogenannte kleine Proteine aus, die unterschiedliche zelluläre Funktionen besitzen können. Das DUF1127 Protein CcaF1 ist ein solches, neu identifiziertes RNA-Bindeprotein, das an der Prozessierung und dem Abbau verschiedener RNA-Transkripte beteiligt ist.

5 Zusammenfassung

Mikroorganismen passen ihre Genexpression den schnell wechselnden Bedingungen in ihrem Lebensraum an. Dazu besitzen Bakterien komplexe transkriptionelle und posttranskriptionelle Regulationsmechanismen, die ihnen eine Anpassung an umweltbedingte Einflüsse ermöglichen. Extra- und intrazelluläre Signale, wie der Eintritt in die stationäre Phase durch Nährstofflimitierungen oder Zellschäden, lösen in Bakterien eine Stressantwort aus. Bakterien induzieren die Stressantwort auf transkriptioneller Ebene durch alternative σ -Faktoren, bei denen es sich um Promotor-spezifische Untereinheiten der RNA-Polymerase handelt, die durch verschiedene Stressbedingungen aktiviert werden. Eine Stressantwort wird zudem posttranskriptionell durch ein Netzwerk aus regulatorischen RNAs (sRNAs), RNA-Bindeproteinen und Ribonukleasen reguliert.

Die Stressantwort wirkt sich in Bakterien unter anderem auf die Zellteilung aus, die inhibiert wird, um das Überleben der einzelnen Zelle oder der gesamten Population zu sichern. Für viele Bakterienspezies ist der regulatorische Mechanismus der Zellteilung noch unbekannt. In dieser Arbeit wird gezeigt, dass die nicht kodierende sRNA StsR (*small RNA targets small RNA*; RSs0827) eine zentrale Funktion bei der Kontrolle der Zellteilung und des Wachstums des phototrophen Bakteriums *R. sphaeroides* besitzt. Die sRNA StsR wird unter verschiedenen Stressbedingungen und in der stationären Phase durch die alternativen σ -Faktoren RpoHI/HII exprimiert. StsR bindet über das RNA-Chaperon Hfq sowohl an die sRNA UpsM (*upstream sRNA mraZ*; RSs0682), die durch eine transkriptionelle Termination in der 5' UTR des *dcw* (*division and cell wall*) Genclusters generiert wird, als auch an die UpsM RNA-Sequenz als Teil der 5' UTR des polycistronischen *dcw* mRNA *read-through* Transkripts. Die sRNA-sRNA und sRNA-mRNA Interaktion führen zu einer Strukturänderung in den Ziel-RNA-Molekülen, wodurch eine RNase E-abhängige Prozessierung induziert wird. Dieser Mechanismus reduziert die mRNA-Spiegel des *dcw* Genclusters, was sich wiederum auf die Zellteilung und das damit verbundene Wachstum von *R. sphaeroides* auswirkt.

Neben regulatorischen RNAs spielen in der posttranskriptionellen Genregulation auch RNA-Bindeproteine eine wichtige Rolle. Untersuchungen in dieser Arbeit zu den DUF1127 Proteinen CcaF1 (*conserved CcsR associated factor*; RSP_6037) und RSP_0557 zeigen, dass es sich bei der DUF1127 Domäne um eine neue RNA-Bindedomäne handelt. Beide Proteine besitzen 71 Aminosäuren und werden als sogenannte „kleine Proteine“ bezeichnet. Die DUF1127 Domäne, die sich im N-terminalen Bereich von CcaF1 befindet und 35 Aminosäuren umfasst, vermittelt die Interaktion des Proteins mit RNA-Molekülen. Dabei hat das DUF1127 Protein CcaF1 einen Einfluss auf die Prozessierung, Reifung und Degradation der sRNAs CcsR1-4 und anderer kodierender und nicht kodierender RNA-Transkripte. Aktuelle Datenbanken listen mittlerweile mehr als 17.000 Proteine mit einer DUF1127 Domäne in der Gruppe der α - und γ -Proteobakterien. Dies deutet auf eine konservierte Funktion dieser Proteine hin, die jedoch in weiteren Experimenten charakterisiert werden muss.

6 Summary

Microorganisms have to adapt their gene expression to changing environmental conditions in their habitats. To accomplish this, bacteria apply complex transcriptional and posttranscriptional regulatory mechanisms. Extra- and intracellular signals, such as entry into stationary growth phase owing to nutrient limitation or cell damage, initiate cellular stress responses. In bacteria, the stress response is controlled on the transcriptional level by alternative σ -factors that are promoter-specific subunits of the RNA polymerase; they become active under several stress conditions. On the posttranscriptional level, the stress response is further triggered by a network of regulatory RNAs (sRNAs), RNA-binding proteins and ribonucleases.

Bacterial stress responses often affect cell division for the sake of protecting individual cells or the entire population from damage and cell death. For many bacteria, the regulatory mechanism of cell division control is still unknown. In this work we could show that the non-coding sRNA StsR (small RNA targets small RNA; RSs0827) plays an important role in controlling cell division and growth in the phototrophic α -proteobacterium *Rhodobacter sphaeroides*. The sRNA StsR is induced by various stress conditions and in the stationary growth phase by the alternative σ -factors RpoHI/HII. StsR binds Hfq-dependently to the sRNA UpsM (upstream sRNA mraZ; RSs0682), which is derived from premature transcription termination in the 5' UTR of the *dcw* (*d*ivision and *c*ell *w*all) gene cluster, as well as to the UpsM RNA sequence as part of the 5' UTR of *dcw* mRNA read-through transcripts. The sRNA-sRNA and sRNA-mRNA interactions lead to a conformational change in the RNA structure that triggers RNase E cleavage in the UpsM moiety. This mechanism reduces the mRNA level of the *dcw* gene cluster and regulates cell division and growth of *R. sphaeroides*.

RNA-binding proteins also play an important role in posttranscriptional gene regulation in bacteria. Studies on the DUF1127 protein CcaF1 (conserved CcsR associated factor; RSP_6037) and RSP_0557 as part of this PhD thesis show that the DUF1127 domain is a novel RNA-binding domain in *R. sphaeroides*. Both proteins comprise 71 amino acids and belong to the so-called „small proteins“. The DUF1127 domain, located in the N-terminal region of the protein and consisting of 35 amino acids, mediates binding to the RNA molecule. Our results show that the DUF1127 protein CcaF1 affects processing, maturation and degradation of the sRNAs CcsR1-4 and other coding and non-coding RNAs. Current databases number more than 17,000 proteins with a DUF1127 domain in α - and γ -proteobacteria. Clearly, this suggests a conserved function of these small proteins, which needs to be characterized further.

7 Verzeichnis

7.1 Literaturverzeichnis

- Adnan, F., Weber, L., and Klug, G. (2015) The sRNA SorY confers resistance during photooxidative stress by affecting a metabolite transporter in *Rhodobacter sphaeroides*. *RNA Biol* **12** (5): 569–577.
- Agüero-Chapin, G., Pérez-Machado, G., Mull, J.C., Ancede-Gallardo, E., Antunes, A., and La Riva, G.A.d.R.d. (2016) How the protein architecture of RNases III influences their substrate specificity? *Curr Pharm Des* **22** (33): 5065–5071.
- Aiba, H. (2007) Mechanism of RNA silencing by Hfq-binding small RNAs. *Curr Opin Microbiol* **10** (2): 134–139.
- Altuvia, S., Weinstein-Fischer, D., Zhang, A., Postow, L., and Storz, G. (1997) A small, stable RNA induced by oxidative stress: Role as a pleiotropic regulator and antimutator. *Cell* **90** (1): 43–53.
- Amir, M., Kumar, V., Dohare, R., Islam, A., Ahmad, F., and Hassan, M.I. (2018) Sequence, structure and evolutionary analysis of cold shock domain proteins, a member of OB fold family. *J Evol Biol* **31** (12): 1903–1917.
- Andrade, J.M., and Arraiano, C.M. (2008) PNPase is a key player in the regulation of small RNAs that control the expression of outer membrane proteins. *RNA* **14** (3): 543–551.
- Andreassen, P.R., Pettersen, J.S., Szczerba, M., Valentin-Hansen, P., Møller-Jensen, J., and Jørgensen, M.G. (2018) sRNA-dependent control of curli biosynthesis in *Escherichia coli*: McaS directs endonucleolytic cleavage of *csgD* mRNA. *Nucleic Acids Res* **46** (13): 6746–6760.
- Andrews, S.J., and Rothnagel, J.A. (2014) Emerging evidence for functional peptides encoded by short open reading frames. *Nat Rev Genet* **15** (3): 193–204.
- Anthony, J.R., Newman, J.D., and Donohue, T.J. (2004) Interactions between the *Rhodobacter sphaeroides* ECF sigma factor, sigma(E), and its anti-sigma factor, ChrR. *J Mol Biol* **341** (2): 345–360.
- Appleby, J.L., Parkinson, J.S., and Bourret, R.B. (1996) Signal transduction via the multi-step phosphorelay: Not necessarily a road less traveled. *Cell* **86** (6): 845–848.
- Arthur, D.C., Edwards, R.A., Tsutakawa, S., Tainer, J.A., Frost, L.S., and Glover, J.N.M. (2011) Mapping interactions between the RNA chaperone FinO and its RNA targets. *Nucleic Acids Res* **39** (10): 4450–4463.
- Arthur, D.C., Ghetu, A.F., Gubbins, M.J., Edwards, R.A., Frost, L.S., and Glover, J.N.M. (2003) FinO is an RNA chaperone that facilitates sense-antisense RNA interactions. *EMBO J* **22** (23): 6346–6355.
- Babitzke, P., Lai, Y.-J., Renda, A.J., and Romeo, T. (2019) Posttranscription initiation control of gene expression mediated by bacterial RNA-binding proteins. *Annu Rev Microbiol* **73**: 43–67.
- Babitzke, P., and Romeo, T. (2007) CsrB sRNA family: sequestration of RNA-binding regulatory proteins. *Curr Opin Microbiol* **10** (2): 156–163.
- Bae, W., Xia, B., Inouye, M., and Severinov, K. (2000) *Escherichia coli* CspA-family RNA chaperones are transcription antiterminators. *Proc Natl Acad Sci USA* **97** (14): 7784–7789.
- Baker, C.S., Morozov, I., Suzuki, K., Romeo, T., and Babitzke, P. (2002) CsrA regulates glycogen biosynthesis by preventing translation of *glgC* in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **44** (6): 1599–1610.

- Baker, K.E., and Mackie, G.A. (2003) Ectopic RNase E sites promote bypass of 5'-end-dependent mRNA decay in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **47** (1): 75–88.
- Bandyra, K.J., and Luisi, B.F. (2013) Licensing and due process in the turnover of bacterial RNA. *RNA Biol* **10** (4): 627–635.
- Barrick, J.E., and Breaker, R.R. (2007) The distributions, mechanisms, and structures of metabolite-binding riboswitches. *Genome Biol* **8** (11): R239.
- Barz, W.P., Francia, F., Venturoli, G., Melandri, B.A., Verméglio, A., and Oesterhelt, D. (1995) Role of PufX protein in photosynthetic growth of *Rhodobacter sphaeroides*. 1. PufX is required for efficient light-driven electron transfer and photophosphorylation under anaerobic conditions. *Biochemistry* **34** (46): 15235–15247.
- Battesti, A., Majdalani, N., and Gottesman, S. (2011) The RpoS-mediated general stress response in *Escherichia coli*. *Annu Rev Microbiol* **65**: 189–213.
- Bayer, T.S., Booth, L.N., Knudsen, S.M., and Ellington, A.D. (2005) Arginine-rich motifs present multiple interfaces for specific binding by RNA. *RNA* **11** (12): 1848–1857.
- Bayer-Santos, E., Lima, L.D.P., Ceseti, L.d.M., Ratagami, C.Y., Santana, E.S. de, da Silva, A.M., Farah, C.S., and Alvarez-Martinez, C.E. (2018) *Xanthomonas citri* T6SS mediates resistance to dictyostelium predation and is regulated by an ECF σ factor and cognate Ser/Thr kinase. *Environ Microbiol* **20** (4): 1562–1575.
- Belasco, J.G. (2010) All things must pass: contrasts and commonalities in eukaryotic and bacterial mRNA decay. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11** (7): 467–478.
- Belasco, J.G., Beatty, J.T., Adams, C.W., Gabain, A. von, and Cohen, S.N. (1985) Differential expression of photosynthesis genes in *R. capsulata* results from segmental differences in stability within the polycistronic *rxcA* transcript. *Cell* **40** (1): 171–181.
- Benoit, B., He, C.H., Zhang, F., Votruba, S.M., Tadros, W., Westwood, J.T., Simbert, C.A., Howard, D.L., and Theurkauf, W.E. (2009) An essential role for the RNA-binding protein Smaug during the *Drosophila* maternal-to-zygotic transition. *Development* **136** (6): 923–932.
- Berghoff, B.A., Glaeser, J., Sharma, C.M., Vogel, J., and Klug, G. (2009) Photooxidative stress-induced and abundant small RNAs in *Rhodobacter sphaeroides*. *Mol Microbiol* **74** (6): 1497–1512.
- Berghoff, B.A., Glaeser, J., Sharma, C.M., Zobawa, M., Lottspeich, F., Vogel, J., and Klug, G. (2011) Contribution of Hfq to photooxidative stress resistance and global regulation in *Rhodobacter sphaeroides*. *Mol Microbiol* **80** (6): 1479–1495.
- Bernstein, J.A., Khodursky, A.B., Lin, P.-H., Lin-Chao, S., and Cohen, S.N. (2002) Global analysis of mRNA decay and abundance in *Escherichia coli* at single-gene resolution using two-color fluorescent DNA microarrays. *Proc Natl Acad Sci USA* **99** (15): 9697–9702.
- Berthoumieux, S., Jong, H. de, Baptist, G., Pinel, C., Ranquet, C., Ropers, D., and Geiselmann, J. (2013) Shared control of gene expression in bacteria by transcription factors and global physiology of the cell. *Mol Syst Biol* **9**: 634.
- Billenkamp, F., Peng, T., Berghoff, B.A., and Klug, G. (2015) A cluster of four homologous small RNAs modulates C1 metabolism and the pyruvate dehydrogenase complex in *Rhodobacter sphaeroides* under various stress conditions. *J Bacteriol* **197** (10): 1839–1852.

- Bird, J.G., Zhang, Y., Tian, Y., Panova, N., Barvík, I., Greene, L., Liu, M., Buckley, B., Krásný, L., Lee, J.K., Kaplan, C.D., Ebright, R.H., and Nickels, B.E. (2016) The mechanism of RNA 5' capping with NAD⁺, NADH and desphospho-CoA. *Nature* **535** (7612): 444–447.
- Bobrovskyy, M., and Vanderpool, C.K. (2014) The small RNA SgrS: roles in metabolism and pathogenesis of enteric bacteria. *Front Cell Infect Microbiol* **4**: 61.
- Boone, D.R., Castenholz, R.W., and Garrity, G.M. (2001) *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*. New York, NY: Springer New York.
- Boor, K.J. (2006) Bacterial stress responses: what doesn't kill them can make them stronger. *PLoS Biol* **4** (1): e23.
- Bossi, L., Schwartz, A., Guillemardet, B., Boudvillain, M., and Figueroa-Bossi, N. (2012) A role for Rho-dependent polarity in gene regulation by a noncoding small RNA. *Genes Dev* **26** (16): 1864–1873.
- Bouvet, P., and Belasco, J.G. (1992) Control of RNase E-mediated RNA degradation by 5'-terminal base pairing in *E. coli*. *Nature* **360** (6403): 488–491.
- Brantl, S. (2002) Antisense-RNA regulation and RNA interference. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* **1575** (1-3): 15–25.
- Brantl, S. (2007) Regulatory mechanisms employed by *cis*-encoded antisense RNAs. *Curr Opin Microbiol* **10** (2): 102–109.
- Brantl, S. (2012) Bacterial type I toxin-antitoxin systems. *RNA Biol* **9** (12): 1488–1490.
- Brantl, S., and Müller, P. (2019) Toxin–Antitoxin Systems in *Bacillus subtilis*. *Toxins* **11** (5): 262.
- Breaker, R.R. (2011) Prospects for riboswitch discovery and analysis. *Mol Cell* **43** (6): 867–879.
- Briani, F., Carzaniga, T., and Dehò, G. (2016) Regulation and functions of bacterial PNPase. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **7** (2): 241–258.
- Browning, D.F., and Busby, S.J. (2004) The regulation of bacterial transcription initiation. *Nat Rev Microbiol* **2** (1): 57–65.
- Brownlee, G.G. (1971) Sequence of 6S RNA of *E. coli*. *Nat New Biol* **229** (5): 147–149.
- Buchbender, A., Mutter, H., Sutandy, F.X.R., Körtel, N., Hänel, H., Busch, A., Ebersberger, S., and König, J. (2020) Improved library preparation with the new iCLIP2 protocol. *Methods* **178**: 33–48.
- Budnick, J.A., Sheehan, L.M., Kang, L., Michalak, P., and Caswell, C.C. (2018) Characterization of three small proteins in *Brucella abortus* linked to fucose utilization. *J Bacteriol* **200** (18).
- Butz, H.A., Mey, A.R., Ciosek, A.L., and Payne, S.M. (2019) *Vibrio cholerae* CsrA directly regulates *varA* to increase expression of the three nonredundant Csr small RNAs. *mBio* **10** (3).
- Caballero, C.J., Menendez-Gil, P., Catalan-Moreno, A., Vergara-Irigaray, M., García, B., Segura, V., Irurzun, N., Villanueva, M., de Los Mozos, I.R., Solano, C., Lasa, I., and Toledo-Arana, A., (2018) The regulon of the RNA chaperone CspA and its auto-regulation in *Staphylococcus aureus*. *Nucleic Acids Res* **46** (3): 1345–1361.
- Cahová, H., Winz, M.-L., Höfer, K., Nübel, G., and Jäschke, A. (2015) NAD captureSeq indicates NAD as a bacterial cap for a subset of regulatory RNAs. *Nature* **519** (7543): 374–377.
- Callaghan, A.J., Grossmann, J.G., Redko, Y.U., Ilag, L.L., Moncrieffe, M.C., Symmons, M.F., Robinson, C.V., McDowall, K.J., and Luisi, B.F. (2003) Quaternary structure and catalytic activity of the

- Escherichia coli* ribonuclease E amino-terminal catalytic domain. *Biochemistry* **42** (47): 13848–13855.
- Callaghan, A.J., Marcaida, M.J., Stead, J.A., McDowall, K.J., Scott, W.G., and Luisi, B.F. (2005a) Structure of *Escherichia coli* RNase E catalytic domain and implications for RNA turnover. *Nature* **437** (7062): 1187–1191.
- Callaghan, A.J., Redko, Y., Murphy, L.M., Grossmann, J.G., Yates, D., Garman, E., Ilag, L.L., Robinson, C.V., Symmons, M.F., McDowall, K.J., and Luisi, B.F.. (2005b) "Zn-link": a metal-sharing interface that organizes the quaternary structure and catalytic site of the endoribonuclease, RNase E. *Biochemistry* **44** (12): 4667–4675.
- Cardinale, C.J., Washburn, R.S., Tadigotla, V.R., Brown, L.M., Gottesman, M.E., and Nudler, E. (2008) Termination factor Rho and its cofactors NusA and NusG silence foreign DNA in *E. coli*. *Science* **320** (5878): 935–938.
- Carmichael, G.G., Weber, K., Niveleau, A., and Wahba, A.J. (1975) The host factor required for RNA phage Q β RNA replication *in vitro*. Intracellular location, quantitation, and purification by polyadenylate-cellulose chromatography. *J Biol Chem* **250** (10): 3607–3612.
- Carpousis, A.J. (2007) The RNA degradosome of *Escherichia coli*: an mRNA-degrading machine assembled on RNase E. *Annu Rev Microbiol* **61**: 71–87.
- Cavanagh, A.T., Sperger, J.M., and Wassarman, K.M. (2012) Regulation of 6S RNA by pRNA synthesis is required for efficient recovery from stationary phase in *E. coli* and *B. subtilis*. *Nucleic Acids Res* **40** (5): 2234–2246.
- Cavanagh, A.T., and Wassarman, K.M. (2013) 6S-1 RNA function leads to a delay in sporulation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **195** (9): 2079–2086.
- Cech, G.M., Szalewska-Pałasz, A., Kubiak, K., Malabirade, A., Grange, W., Arluison, V., and Węgrzyn, G. (2016) The *Escherichia coli* Hfq protein: An unattended DNA-transactions regulator. *Front Mol Biosci* **3**: 36.
- Chaikam, V., and Karlson, D.T. (2010) Comparison of structure, function and regulation of plant cold shock domain proteins to bacterial and animal cold shock domain proteins. *BMB Rep* **43** (1): 1–8.
- Chao, Y., Papenfort, K., Reinhardt, R., Sharma, C.M., and Vogel, J. (2012) An atlas of Hfq-bound transcripts reveals 3' UTRs as a genomic reservoir of regulatory small RNAs. *EMBO J* **31** (20): 4005–4019.
- Chen, S., Lesnik, E.A., Hall, T.A., Sampath, R., Griffey, R.H., Ecker, D.J., and Blyn, L.B. (2002) A bioinformatics based approach to discover small RNA genes in the *Escherichia coli* genome. *Biosystems* **65** (2-3): 157–177.
- Chidgey, J.W., Jackson, P.J., Dickman, M.J., and Hunter, C.N. (2017) PufQ regulates porphyrin flux at the haem/bacteriochlorophyll branchpoint of tetrapyrrole biosynthesis via interactions with ferrochelatase. *Mol Microbiol* **106** (6): 961–975.
- Choudhary, M., Zanhua, X., Fu, Y.X., and Kaplan, S. (2007) Genome analyses of three strains of *Rhodobacter sphaeroides*: evidence of rapid evolution of chromosome II. *J Bacteriol* **189** (5): 1914–1921.
- Chubukov, V., and Sauer, U. (2014) Environmental dependence of stationary-phase metabolism in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **80** (9): 2901–2909.

- Church, G.M., and Gilbert, W. (1984) Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* **81** (7): 1991–1995.
- Coburn, G.A., Miao, X., Briant, D.J., and Mackie, G.A. (1999) Reconstitution of a minimal RNA degradosome demonstrates functional coordination between a 3' exonuclease and a DEAD-box RNA helicase. *Genes Dev* **13** (19): 2594–2603.
- Conrad, C., Rauhut, R., and Klug, G. (1998) Different cleavage specificities of RNases III from *Rhodobacter capsulatus* and *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* **26** (19): 4446–4453.
- Corley, M., Burns, M.C., and Yeo, G.W. (2020) How RNA-binding proteins interact with RNA: molecules and mechanisms. *Mol Cell* **78** (1): 9–29.
- Court, D.L., Gan, J., Liang, Y.-H., Shaw, G.X., Tropea, J.E., Costantino, N., Waugh, D.S., and Ji, X. (2013) RNase III: Genetics and function; structure and mechanism. *Annu Rev Genet* **47**: 405–431.
- Dahanukar, A., Walker, J.A., and Wharton, R.P. (1999) Smaug, a novel RNA-binding protein that operates a translational switch in *Drosophila*. *Mol Cell* **4** (2): 209–218.
- Dahanukar, A., and Wharton, R.P. (1996) The *nanos* gradient in *Drosophila* embryos is generated by translational regulation. *Genes Dev* **10** (20): 2610–2620.
- Damm, K., Bach, S., Müller, K.M.H., Klug, G., Burenina, O.Y., Kubareva, E.A., Grünewlller, A., and Hartmann, R.K. (2015) Impact of RNA isolation protocols on RNA detection by Northern blotting. *Methods Mol Biol* **1296**: 29–38.
- Davies, M.J. (2016) Protein oxidation and peroxidation. *Biochem J* **473** (7): 805–825.
- Davis, B.M., and Waldor, M.K. (2007) RNase E-dependent processing stabilizes MicX, a *Vibrio cholerae* sRNA. *Mol Microbiol* **65** (2): 373–385.
- Deana, A., Celesnik, H., and Belasco, J.G. (2008) The bacterial enzyme RppH triggers messenger RNA degradation by 5' pyrophosphate removal. *Nature* **451** (7176): 355–358.
- Deng, X., Chen, K., Luo, G.-Z., Weng, X., Ji, Q., Zhou, T., and He, C. (2015) Widespread occurrence of N6-methyladenosine in bacterial mRNA. *Nucleic Acids Res* **43** (13): 6557–6567.
- Desnoyers, G., Morissette, A., Prévost, K., and Massé, E. (2009) Small RNA-induced differential degradation of the polycistronic mRNA *iscRSUA*. *EMBO J* **28** (11): 1551–1561.
- Deutscher, M.P. (2003) Degradation of stable RNA in bacteria. *J Biol Chem* **278** (46): 45041–45044.
- Deutscher, M.P. (2006) Degradation of RNA in bacteria: comparison of mRNA and stable RNA. *Nucleic Acids Res* **34** (2): 659–666.
- Deutscher, M.P., and Reuven, N.B. (1991) Enzymatic basis for hydrolytic versus phosphorolytic mRNA degradation in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **88** (8): 3277–3280.
- Dever, T.E., and Green, R. (2012) The elongation, termination, and recycling phases of translation in eukaryotes. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4** (7): a013706.
- Díaz-Muñoz, S.L., and Koskella, B. (2014) Bacteria-phage interactions in natural environments. *Adv Appl Microbiol* **89**: 135–183.
- Dominissini, D., Moshitch-Moshkovitz, S., Schwartz, S., Salmon-Divon, M., Ungar, L., Osenberg, S., Cesarkas, K., Jacob-Hirsch, J., Amariglio, N., Kupiec, M., Sorek, R., and Rechavi, G., (2012) Topology of the human and mouse m6A RNA methylomes revealed by m6A-seq. *Nature* **485** (7397): 201–206.

- Donohue, T.J., Kiley, P.J., and Kaplan, S. (1988) The *puf* operon region of *Rhodobacter sphaeroides*. *Photosynth Res* **19** (1-2): 39–61.
- Dove, S.L., Huang, F.W., and Hochschild, A. (2000) Mechanism for a transcriptional activator that works at the isomerization step. *Proc Natl Acad Sci USA* **97** (24): 13215–13220.
- Doxzen, K.W., and Doudna, J.A. (2017) DNA recognition by an RNA-guided bacterial Argonaute. *PLoS One* **12** (5): e0177097.
- Dreyfus, M., and Régnier, P. (2002) The Poly(A) Tail of mRNAs. *Cell* **111** (5): 611–613.
- Durand, S., Gilet, L., Bessi  res, P., Nicolas, P., and Condon, C. (2012) Three essential ribonucleases-RNase Y, J1, and III-control the abundance of a majority of *Bacillus subtilis* mRNAs. *PLoS Genet* **8** (3): e1002520.
- Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., and Stackebrandt, E. (2006) The Prokaryotes: Volume 5: Proteobacteria: Alpha and Beta Subclasses. New York, NY: Springer-Verlag.
- Edelmann, D., and Berghoff, B.A. (2019) Type I toxin-dependent generation of superoxide affects the persister life cycle of *Escherichia coli*. *Sci Rep* **9** (1): 14256.
- Edelmann, D., Oberpaul, M., Sch  berle, T.F., and Berghoff, B.A. (2021) Post-transcriptional deregulation of the *tisB/istR-1* toxin-antitoxin system promotes SOS-independent persister formation in *Escherichia coli*. *Environ Microbiol Rep* **13** (2): 159–168.
- Eisenhardt, K.M.H., Remes, B., Grützner, J., Spanka, D.-T., Jäger, A., and Klug, G. (2021) A complex network of sigma factors and sRNA StsR regulates stress responses in *R. sphaeroides*. *Int J Mol Sci* **22** (14).
- Eisenhardt, K.M.H., Reuscher, C.M., and Klug, G. (2018) PcrX, an sRNA derived from the 3'-UTR of the *Rhodobacter sphaeroides puf* operon modulates expression of *puf* genes encoding proteins of the bacterial photosynthetic apparatus. *Mol Microbiol* **110** (3): 325–334.
- Eisenhardt, K.M.H. (2017) Small regulatory RNAs promoting the oxidative stress response and adaptive metabolic changes in *Rhodobacter sphaeroides*. Dissertation, Justus-Liebig Universität Gießen
- El-Gebali, S., Mistry, J., Bateman, A., Eddy, S.R., Luciani, A., Potter, S.C., Qureshi, M., Richardson, L.J., Salazar, G.A., Smart, A., Sonnhammer, E.L.L., Hirsh, L., Paladin, L., Piovesan, D., Tosatto, S.C.E., and Finn, R.D. (2019) The Pfam protein families database in 2019. *Nucleic Acids Res* **47** (D1): D427–D432.
- Elkina, D., Weber, L., Lechner, M., Burenina, O., Weisert, A., Kubareva, E., Hartmann, R.K., and Klug, G. (2017) 6S RNA in *Rhodobacter sphaeroides*: 6S RNA and pRNA transcript levels peak in late exponential phase and gene deletion causes a high salt stress phenotype. *RNA Biol* **14** (11): 1627–1637.
- Ellis, M.J., Trussler, R.S., and Haniford, D.B. (2015) A cis-encoded sRNA, Hfq and mRNA secondary structure act independently to suppress IS200 transposition. *Nucleic Acids Res* **43** (13): 6511–6527.
- Engel, F., Ossipova, E., Jakobsson, P.J., Vockenhuber, M.P., and Suess, B. (2019) sRNA scr5239 involved in feedback loop regulation of *Streptomyces coelicolor* central metabolism. *Front Microbiol* **10**: 3121.
- Eraso, J.M., and Kaplan, S. (1994) prrA, a putative response regulator involved in oxygen regulation of photosynthesis gene expression in *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* **176** (1): 32–43.
- Esakova, O., and Krasilnikov, A.S. (2010) Of proteins and RNA: the RNase P/MRP family. *RNA* **16** (9): 1725–1747.

- Evguenieva-Hackenberg, E. (2021) Riboregulation in bacteria: From general principles to novel mechanisms of the *trp* attenuator and its sRNA and peptide products. *Wiley Interdiscip Rev RNA*: e1696.
- Evguenieva-Hackenberg, E., and Klug, G. (2011) New aspects of RNA processing in prokaryotes. *Curr Opin Microbiol* **14** (5): 587–592.
- Feklístov, A., Sharon, B.D., Darst, S.A., and Gross, C.A. (2014) Bacterial sigma factors: a historical, structural, and genomic perspective. *Annu Rev Microbiol* **68**: 357–376.
- Fender, A., Elf, J., Hampel, K., Zimmermann, B., and Wagner, E.G.H. (2010) RNAs actively cycle on the Sm-like protein Hfq. *Genes Dev* **24** (23): 2621–2626.
- Ferenci, T. (2001) Hungry bacteria-definition and properties of a nutritional state. *Environ Microbiol* **3** (10): 605–611.
- Filloux, A.A.M. (2012) Bacterial regulatory networks. Norfolk: Caister Academic Press.
- Finkel, S.E. (2006) Long-term survival during stationary phase: evolution and the GASP phenotype. *Nat Rev Microbiol* **4** (2): 113–120.
- Förstner, K.U., Reuscher, C.M., Habertzettl, K., Weber, L., and Klug, G. (2018) RNase E cleavage shapes the transcriptome of *Rhodobacter sphaeroides* and strongly impacts phototrophic growth. *Life Sci Alliance* **1** (4): e201800080.
- Franze de Fernandez, M.T., Eoyang, L., and August, J.T. (1968) Factor fraction required for the synthesis of bacteriophage Q β -RNA. *Nature* **219** (5154): 588–590.
- Franze de Fernandez, M.T., Hayward, W.S., and August, J.T. (1972) Bacterial proteins required for replication of phage Q ribonucleic acid. Purification and properties of host factor I, a ribonucleic acid-binding protein. *J Biol Chem* **247** (3): 824–831.
- Fredriksson, A., and Nyström, T. (2006) Conditional and replicative senescence in *Escherichia coli*. *Curr Opin Microbiol* **9** (6): 612–618.
- Fritsch, J., Rothfuchs, R., Rauhut, R., and Klug, G. (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. *Mol Microbiol* **15** (6): 1017–1029.
- Galperin, M.Y. (2006) Structural classification of bacterial response regulators: diversity of output domains and domain combinations. *J Bacteriol* **188** (12): 4169–4182.
- Galperin, M.Y. (2010) Diversity of structure and function of response regulator output domains. *Curr Opin Microbiol* **13** (2): 150–159.
- Galperin, M.Y. (2018) What bacteria want. *Environ Microbiol* **20** (12): 4221–4229.
- Gao, R., and Stock, A.M. (2009) Biological insights from structures of two-component proteins. *Annu Rev Microbiol* **63**: 133–154.
- Garber, M., Grabherr, M.G., Guttman, M., and Trapnell, C. (2011) Computational methods for transcriptome annotation and quantification using RNA-seq. *Nat Methods* **8** (6): 469–477.
- Garrey, S.M., Blech, M., Riffell, J.L., Hankins, J.S., Stickney, L.M., Diver, M., Hsu, Y.H.R., Kunanithy, V., and Mackie, G.A. (2009) Substrate binding and active site residues in RNases E and G: role of the 5'-sensor. *J Biol Chem* **284** (46): 31843–31850.

- Garrey, S.M., and Mackie, G.A. (2011) Roles of the 5'-phosphate sensor domain in RNase E. *Mol Microbiol* **80** (6): 1613–1624.
- Gefen, O., Fridman, O., Ronin, I., and Balaban, N.Q. (2014) Direct observation of single stationary-phase bacteria reveals a surprisingly long period of constant protein production activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **111** (1): 556–561.
- Georg, J., and Hess, W.R. (2011) cis-antisense RNA, another level of gene regulation in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **75** (2): 286–300.
- Gerdes, K., and Wagner, E.G.H. (2007) RNA antitoxins. *Curr Opin Microbiol* **10** (2): 117–124.
- Ghora, B.K., and Apirion, D. (1978) Structural analysis and *in vitro* processing to p5 rRNA of a 9S RNA molecule isolated from an *rne* mutant of *E. coli*. *Cell* **15** (3): 1055–1066.
- Ghosh, S., and Deutscher, M.P. (1999) Oligoribonuclease is an essential component of the mRNA decay pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* **96** (8): 4372–4377.
- Glaeser, J., Nuss, A.M., Berghoff, B.A., and Klug, G. (2011) Singlet oxygen stress in microorganisms. *Adv Microb Physiol* **58**: 141–173.
- Glaeser, J., Zobawa, M., Lottspeich, F., and Klug, G. (2007) Protein synthesis patterns reveal a complex regulatory response to singlet oxygen in *Rhodobacter*. *J Proteome Res* **6** (7): 2460–2471.
- Gomelsky, L., Moskvina, O.V., Stenzel, R.A., Jones, D.F., Donohue, T.J., and Gomelsky, M. (2008) Hierarchical regulation of photosynthesis gene expression by the oxygen-responsive PrrBA and AppA-PpsR systems of *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* **190** (24): 8106–8114.
- Gomelsky, L., Sram, J., Moskvina, O.V., Horne, I.M., Dodd, H.N., Pemberton, J.M., McEwan, A.G., Gomelsky, M., and Kaplan, S. (2003) Identification and *in vivo* characterization of PpaA, a regulator of photosystem formation in *Rhodobacter sphaeroides*. *Microbiology (Reading)* **149** (Pt 2): 377–388.
- Gomelsky, M., and Kaplan, S. (1997) Molecular genetic analysis suggesting interactions between AppA and PpsR in regulation of photosynthesis gene expression in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *J Bacteriol* **179** (1): 128–134.
- Goodacre, N.F., Gerloff, D.L., and Uetz, P. (2013) Protein domains of unknown function are essential in bacteria. *mBio* **5** (1): e00744-13.
- Goodrich-Blair, H., Uría-Nickelsen, M., and Kolter, R. (1996) Regulation of gene expression in stationary phase. In *Regulation of Gene Expression in Escherichia coli*. Lin, E.C.C., and Lynch, A.S. (ed.). Boston, MA: Springer US, pp. 571–583.
- Górna, M.W., Carpousis, A.J., and Luisi, B.F. (2012) From conformational chaos to robust regulation: the structure and function of the multi-enzyme RNA degradosome. *Q Rev Biophys* **45** (2): 105–145.
- Gottesman, S. (2005) Micros for microbes: non-coding regulatory RNAs in bacteria. *Trends Genet* **21** (7): 399–404.
- Gottesman, S., and Storz, G. (2011) Bacterial small RNA regulators: versatile roles and rapidly evolving variations. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3** (12).
- Green, H.A., and Donohue, T.J. (2006) Activity of *Rhodobacter sphaeroides* RpoHII, a second member of the heat shock sigma factor family. *J Bacteriol* **188** (16): 5712–5721.

- Green, J.B., Edwards, T.A., Trincao, J., Escalante, C.R., Wharton, R.P., and Aggarwal, A.K. (2002) Crystallization and characterization of Smaug: a novel RNA-binding motif. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **297** (5): 1085–1088.
- Green, J.B., Gardner, C.D., Wharton, R.P., and Aggarwal, A.K. (2003) RNA Recognition via the SAM Domain of Smaug. *Mol Cell* **11** (6): 1537–1548.
- Gruber, T.M., and Gross, C.A. (2003) Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space. *Annu Rev Microbiol* **57**: 441–466.
- Grundy, F.J., and Henkin, T.M. (2006) From ribosome to riboswitch: control of grnr rpression in bacteria by RNA strauctural rearrangements. *Biochem Mol Biol.* **41**: 329–338.
- Grützner, J., Billenkamp, F., Spanka, D.-T., Rick, T., Monzon, V., Förstner, K.U., and Klug, G. (2021a) The small DUF1127 protein CcaF1 from *Rhodobacter sphaeroides* is an RNA-binding protein involved in sRNA maturation and RNA turnover. *Nucleic Acids Res* **49** (6): 3003–3019.
- Grützner, J., Remes, B., Eisenhardt, K.M.H., Scheller, D., Kretz, J., Madhugiri, R., McIntosh, M., and Klug, G. (2021b) sRNA-mediated RNA processing regulates bacterial cell division. *Nucleic Acids Res* **49** (12): 7035–7052.
- Gubbins, M.J., Arthur, D.C., Ghetu, A.F., Glover, J.N.M., and Frost, L.S. (2003) Characterizing the structural features of RNA/RNA interactions of the F-plasmid FinOP fertility inhibition system. *J Biol Chem* **278** (30): 27663–27671.
- Gutiérrez-Preciado, A., Henkin, T.M., Grundy, F.J., Yanofsky, C., and Merino, E. (2009) Biochemical features and functional implications of the RNA-based T-box regulatory mechanism. *Microbiol Mol Biol Rev* **73** (1): 36–61.
- Hajnsdorf, E., and Boni, I.V. (2012) Multiple activities of RNA-binding proteins S1 and Hfq. *Biochimie* **94** (7): 1544–1553.
- Hammell, C.M. (2008) The microRNA-argonaute complex: a platform for mRNA modulation. *RNA Biol* **5** (3): 123–127.
- Hardwick, S.W., Chan, V.S.Y., Broadhurst, R.W., and Luisi, B.F. (2011) An RNA degradosome assembly in *Caulobacter crescentus*. *Nucleic Acids Res* **39** (4): 1449–1459.
- Haseth, P.L. de, and Uhlenbeck, O.C. (1980) Interaction of *Escherichia coli* host factor protein with Q β ribonucleic acid. *Biochemistry* **19** (26): 6146–6151.
- Heck, C., Balzer, A., Fuhrmann, O., and Klug, G. (2000) Initial events in the degradation of the polycistronic *puf* mRNA in *Rhodobacter capsulatus* and consequences for further processing steps. *Mol Microbiol* **35** (1): 90–100.
- Heilmann, B., Hakkila, K., Georg, J., Tyystjärvi, T., Hess, W.R., Axmann, I.M., and Dienst, D. (2017) 6S RNA plays a role in recovery from nitrogen depletion in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *BMC Microbiol* **17** (1): 229.
- Helder, S., Blythe, A.J., Bond, C.S., and Mackay, J.P. (2016) Determinants of affinity and specificity in RNA-binding proteins. *Curr Opin Struct Biol* **38**: 83–91.
- Helm, M., and Motorin, Y. (2017) Detecting RNA modifications in the epitranscriptome: predict and validate. *Nat Rev Genet* **18** (5): 275–291.
- Helmann, J.D., and Chamberlin, M.J. (1988) Structure and function of bacterial sigma factors. *Annu Rev Biochem* **57**: 839–872.

- Hengge, R. (2011) Stationary-Phase Gene Regulation in *Escherichia coli*. *EcoSal Plus* **4** (2).
- Henkin, T.M. (2008) Riboswitch RNAs: using RNA to sense cellular metabolism. *Genes Dev* **22** (24): 3383–3390.
- Henkin, T.M., and Yanofsky, C. (2002) Regulation by transcription attenuation in bacteria: how RNA provides instructions for transcription termination/antitermination decisions. *Bioessays* **24** (8): 700–707.
- Hentze, M.W., Castello, A., Schwarzl, T., and Preiss, T. (2018) A brave new world of RNA-binding proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* **19** (5): 327–341.
- Heroven, A.K., Böhme, K., and Dersch, P. (2012) The Csr/Rsm system of *Yersinia* and related pathogens: a post-transcriptional strategy for managing virulence. *RNA Biol* **9** (4): 379–391.
- Herskovits, A.A., Bochkareva, E.S., and Bibi, E. (2000) New prospects in studying the bacterial signal recognition particle pathway. *Mol Microbiol* **38** (5): 927–939.
- Hobbie, J.E., and Hobbie, E.A. (2013) Microbes in nature are limited by carbon and energy: the starving-survival lifestyle in soil and consequences for estimating microbial rates. *Front Microbiol* **4**: 324.
- Hobbs, E.C., Fontaine, F., Yin, X., and Storz, G. (2011) An expanding universe of small proteins. *Curr Opin Microbiol* **14** (2): 167–173.
- Hoch, P.G., Burenia, O.Y., Weber, M.H.W., Elkina, D.A., Nesterchuk, M.V., Sergiev, P.V., Hartmann, R.K., and Kubareva, E.A. (2015) Phenotypic characterization and complementation analysis of *Bacillus subtilis* 6S RNA single and double deletion mutants. *Biochimie* (**117**) 87–99.
- Höfer, K., Abele, F., Schlotthauer, J., and Jäschke, A. (2016a) Synthesis of 5'-NAD-Capped RNA. *Bioconjug Chem* **27** (4): 874–877.
- Höfer, K., Li, S., Abele, F., Frindert, J., Schlotthauer, J., Grawenhoff, J., Du, J., Patel, D.J., and Jäschke, A., (2016b) Structure and function of the bacterial decapping enzyme NudC. *Nat Chem Biol* **12** (9): 730–734.
- Holmqvist, E., Berggren, S., and Rizvanovic, A. (2020) RNA-binding activity and regulatory functions of the emerging sRNA-binding protein ProQ. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech* **1863** (9): 194596.
- Holmqvist, E., Li, L., Bischler, T., Barquist, L., and Vogel, J. (2018) Global maps of ProQ binding *in vivo* reveal target recognition via RNA structure and stability control at mRNA 3' Ends. *Mol Cell* **70** (5): 971–982.e6.
- Holmqvist, E., and Vogel, J. (2018) RNA-binding proteins in bacteria. *Nat Rev Microbiol* **16** (10): 601–615.
- Holmqvist, E., Wright, P.R., Li, L., Bischler, T., Barquist, L., Reinhardt, R., Backofen, R., and Vogel, J. (2016) Global RNA recognition patterns of post-transcriptional regulators Hfq and CsrA revealed by UV crosslinking *in vivo*. *EMBO J* **35** (9): 991–1011.
- Hör, J., Matera, G., Vogel, J., Gottesman, S., and Storz, G. (2020) Trans-acting small RNAs and their effects on gene expression in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *EcoSal Plus* **9** (1).
- Hördt, A., López, M.G., Meier-Kolthoff, J.P., Schleuning, M., Weinhold, L.-M., Tindall, B.J., Gronow, S., Kyrpides, N.C., Woyke, T., and Göker, M. (2020) Analysis of 1,000+ type-strain genomes substantially improves taxonomic classification of Alphaproteobacteria. *Front Microbiol* **11**: 468.
- Hori, K., and Yanazaki, Y. (1974) Nucleotide sequence specific interaction of host factor I with bacteriophage Q β RNA. *FEBS Letters* **43** (1): 20–22.

- Hur, J.K., Olovnikov, I., and Aravin, A.A. (2014) Prokaryotic Argonautes defend genomes against invasive DNA. *Trends Biochem Sci* **39** (6): 257–259.
- Hussein, R., and Lim, H.N. (2011) Disruption of small RNA signaling caused by competition for Hfq. *Proc Natl Acad Sci USA* **108** (3): 1110–1115.
- Hutvagner, G., and Simard, M.J. (2008) Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9** (1): 22–32.
- Imhoff, J.F. (2006) The Phototrophic Alpha-Proteobacteria. In *The Prokaryotes*. Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., and Stackebrandt, E. (ed.). New York, NY: Springer New York, pp. 41–64.
- Ishihama, A. (2000) Functional modulation of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Annu Rev Microbiol* **54**: 499–518.
- Ishikawa, H., Otaka, H., Maki, K., Morita, T., and Aiba, H. (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** (5): 1062–1074.
- Jackson, R.J., Hellen, C.U.T., and Pestova, T.V. (2010) The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11** (2): 113–127.
- Jäger, S., Fuhrmann, O., Heck, C., Hebermehl, M., Schiltz, E., Rauhut, R., and Klug, G. (2001) An mRNA degrading complex in *Rhodobacter capsulatus*. *Nucleic Acids Res* **29** (22): 4581–4588.
- Jain, C., and Belasco, J.G. (1995) RNase E autoregulates its synthesis by controlling the degradation rate of its own mRNA in *Escherichia coli*: unusual sensitivity of the *rne* transcript to RNase E activity. *Genes Dev* **9** (1): 84–96.
- Jäschke, A., Höfer, K., Nübel, G., and Frindert, J. (2016) Cap-like structures in bacterial RNA and epitranscriptomic modification. *Curr Opin Microbiol* **30**: 44–49.
- Jerome, L.J., van Biesen, T., and Frost, L.S. (1999) Degradation of FinP antisense RNA from F-like plasmids: the RNA-binding protein, FinO, protects FinP from ribonuclease E. *J Mol Biol* **285** (4): 1457–1473.
- Jiang, X., Diwa, A., and Belasco, J.G. (2000) Regions of RNase E important for 5'-end-dependent RNA cleavage and autoregulated synthesis. *J Bacteriol* **182** (9): 2468–2475.
- Jishage, M., Iwata, A., Ueda, S., and Ishihama, A. (1996) Regulation of RNA polymerase sigma subunit synthesis in *Escherichia coli*: intracellular levels of four species of sigma subunit under various growth conditions. *J Bacteriol* **178** (18): 5447–5451.
- Kaberdin, V.R., Singh, D., and Lin-Chao, S. (2011) Composition and conservation of the mRNA-degrading machinery in bacteria. *J Biomed Sci* **18**: 23.
- Kavita, K., Mets, F. de, and Gottesman, S. (2018) New aspects of RNA-based regulation by Hfq and its partner sRNAs. *Curr Opin Microbiol* **42**: 53–61.
- Kawano, M. (2005) Detection of 5'- and 3'-UTR-derived small RNAs and cis-encoded antisense RNAs in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* **33** (3): 1040–1050.
- Kaya, E., Doxzen, K.W., Knoll, K.R., Wilson, R.C., Strutt, S.C., Kranzusch, P.J., and Doudna, J.A. (2016) A bacterial Argonaute with noncanonical guide RNA specificity. *Proc Natl Acad Sci USA* **113** (15): 4057–4062.

- Kelley, L.A., Mezulis, S., Yates, C.M., Wass, M.N., and Sternberg, M.J.E. (2015) The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc* **10** (6): 845–858.
- Khan, M.A., Durica-Mitic, S., Göpel, Y., Heermann, R., and Görke, B. (2020) Small RNA-binding protein RapZ mediates cell envelope precursor sensing and signaling in *Escherichia coli*. *EMBO J* **39** (6): e103848.
- Khemici, V., and Carpousis, A.J. (2004) The RNA degradosome and poly(A) polymerase of *Escherichia coli* are required *in vivo* for the degradation of small mRNA decay intermediates containing REP-stabilizers. *Mol Microbiol* **51** (3): 777–790.
- Khemici, V., Poljak, L., Luisi, B.F., and Carpousis, A.J. (2008) The RNase E of *Escherichia coli* is a membrane-binding protein. *Mol Microbiol* **70** (4): 799–813.
- Kiebel, J. (2013) Funktionsanalyse der sRNA RSs0827 im Eisenstoffwechsel von *Rhodobacter sphaeroides*. Mather-Thesis, Justus-Liebig Universität Gießen
- Kim, C.A., and Bowie, J.U. (2003) SAM domains: uniform structure, diversity of function. *Trends Biochem Sci* **28** (12): 625–628.
- Kim, D., Kwon, Y.-K., and Cho, K.-H. (2008) The biphasic behavior of incoherent feed-forward loops in biomolecular regulatory networks. *Bioessays* **30** (11-12): 1204–1211.
- Kim, W., and Lee, Y. (2020) Mechanism for coordinate regulation of *rpoS* by sRNA-sRNA interaction in *Escherichia coli*. *RNA Biol* **17** (2): 176–187.
- Klinkert, B., and Narberhaus, F. (2009) Microbial thermosensors. *Cell Mol Life Sci* **66** (16): 2661–2676.
- Klug, G. (1991) Endonucleolytic degradation of *puf* mRNA in *Rhodobacter capsulatus* is influenced by oxygen. *Proc Natl Acad Sci USA* **88** (5): 1765–1769.
- Klug, G., Adams, C.W., Belasco, J., Doerge, B., and Cohen, S.N. (1987) Biological consequences of segmental alterations in mRNA stability: effects of deletion of the intercistronic hairpin loop region of the *Rhodobacter capsulatus puf* operon. *EMBO J* **6** (11): 3515–3520.
- Kolter, R., Siegele, D.A., and Tormo, A. (1993) The stationary phase of the bacterial life cycle. *Annu Rev Microbiol* **47**: 855–874.
- Konkel, M.E., and Tilly, K. (2000) Temperature-regulated expression of bacterial virulence genes. *Microbes and Infection* **2** (2): 157–166.
- Koonin, E.V., and Makarova, K.S. (2013) CRISPR-Cas: evolution of an RNA-based adaptive immunity system in prokaryotes. *RNA Biol* **10** (5): 679–686.
- Kovach, M.E., Elzer, P.H., Steven Hill, D., Robertson, G.T., Farris, M.A., Roop, R.M., and Peterson, K.M. (1995) Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166** (1): 175–176.
- Kraus, A., Weskamp, M., Zierles, J., Balzer, M., Busch, R., Eisfeld, J., Lambertz, J., Nowaczyk, M.M., and Narberhaus, F. (2020) Arginine-rich small proteins with a domain of unknown function, DUF1127, play a role in phosphate and carbon metabolism of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* **202** (22).
- Krieger-Liszkay, A. (2005) Singlet oxygen production in photosynthesis. *J Exp Bot* **56** (411): 337–346.
- Laalami, S., Zig, L., and Putzer, H. (2014) Initiation of mRNA decay in bacteria. *Cell Mol Life Sci* **71** (10): 1799–1828.

- Lamontagne, B., Larose, S., Boulanger, J., and Elela, S.A. (2001) The RNase III family: a conserved structure and expanding functions in eukaryotic dsRNA metabolism. *Curr Issues Mol Biol* **3** (4): 71–78.
- Lange, R., and Hengge-Aronis, R. (1994) The cellular concentration of the sigma S subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli* is controlled at the levels of transcription, translation, and protein stability. *Genes Dev* **8** (13): 1600–1612.
- Le Derout, J., Folichon, M., Briani, F., Dehò, G., Régnier, P., and Hajnsdorf, E. (2003) Hfq affects the length and the frequency of short oligo(A) tails at the 3' end of *Escherichia coli* *rpsO* mRNAs. *Nucleic Acids Res* **31** (14): 4017–4023.
- Lease, R.A., Cusick, M.E., and Belfort, M. (1998) Riboregulation in *Escherichia coli*: DsrA RNA acts by RNA:RNA interactions at multiple loci. *Proc Natl Acad Sci USA* **95** (21): 12456–12461.
- Lee, D.J., Minchin, S.D., and Busby, S.J.W. (2012) Activating transcription in bacteria. *Annu Rev Microbiol* **66**: 125–152.
- Lee, F., and Yanofsky, C. (1977) Transcription termination at the *trp* operon attenuators of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: RNA secondary structure and regulation of termination. *Proc Natl Acad Sci USA* **74** (10): 4365–4369.
- Lee, J.K., Wang, S., Eraso, J.M., Gardner, J., and Kaplan, S. (1993) Transcriptional regulation of *puc* operon expression in *Rhodobacter sphaeroides*. Involvement of an integration host factor-binding sequence. *J Biol Chem* **268** (32): 24491–24497.
- Lee, T., and Feig, A.L. (2008) The RNA binding protein Hfq interacts specifically with tRNAs. *RNA* **14** (3): 514–523.
- Lehnik-Habrink, M., Schaffer, M., Mäder, U., Diethmaier, C., Herzberg, C., and Stülke, J. (2011) RNA processing in *Bacillus subtilis*: identification of targets of the essential RNase Y. *Mol Microbiol* **81** (6): 1459–1473.
- Li, Z., Zhu, L., Yu, Z., Liu, L., Chou, S.-H., Wang, J., and He, J. (2020) 6S-1 RNA contributes to sporulation and parasporal crystal formation in *Bacillus thuringiensis*. *Front Microbiol* **11**: 604458.
- Lim, B., Sim, M., Lee, H., Hyun, S., Lee, Y., Hahn, Y., Shin, E., and Lee, K. (2015) Regulation of *Escherichia coli* RNase III activity. *J Microbiol* **53** (8): 487–494.
- Lim, S.-K., Kim, S.J., Cha, S.H., Oh, Y.-K., Rhee, H.-J., Kim, M.-S., and Lee, J.K. (2009) Complete genome sequence of *Rhodobacter sphaeroides* KD131. *J Bacteriol* **191** (3): 1118–1119.
- Link, T.M., Valentin-Hansen, P., and Brennan, R.G. (2009) Structure of *Escherichia coli* Hfq bound to polyriboadenylate RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **106** (46): 19292–19297.
- Liou, G.G., Jane, W.N., Cohen, S.N., Lin, N.S., and Lin-Chao, S. (2001) RNA degradosomes exist *in vivo* in *Escherichia coli* as multicomponent complexes associated with the cytoplasmic membrane via the N-terminal region of ribonuclease E. *Proc Natl Acad Sci USA* **98** (1): 63–68.
- Liou, G.-G., Chang, H.-Y., Lin, C.-S., and Lin-Chao, S. (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. *J Biol Chem* **277** (43): 41157–41162.
- Liu, M.Y., Gui, G., Wei, B., Preston, J.F., Oakford, L., Yüksel, U., Giedroc, D.P., and Romeo, T. (1997) The RNA molecule CsrB binds to the global regulatory protein CsrA and antagonizes its activity in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **272** (28): 17502–17510.

- Liu, M.Y., and Romeo, T. (1997) The global regulator CsrA of *Escherichia coli* is a specific mRNA-binding protein. *J Bacteriol* **179** (14): 4639–4642.
- Liu, M.Y., Yang, H., and Romeo, T. (1995) The product of the pleiotropic *Escherichia coli* gene *csrA* modulates glycogen biosynthesis via effects on mRNA stability. *J Bacteriol* **177** (10): 2663–2672.
- Liu, Y., Esyunina, D., Olovnikov, I., Teplova, M., Kulbachinskiy, A., Aravin, A.A., and Patel, D.J. (2018) Accommodation of helical imperfections in *Rhodobacter sphaeroides* argonaute ternary complexes with guide RNA and target DNA. *Cell Rep* **24** (2): 453–462.
- Lonetto, M., Gribskov, M., and Gross, C.A. (1992) The sigma 70 family: sequence conservation and evolutionary relationships. *J Bacteriol* **174** (12): 3843–3849.
- Lonetto, M.A., Donohue, T.J., Gross, C.A., and Buttner, M.J. (2019) Discovery of the extracytoplasmic function σ factors. *Mol Microbiol* **112** (2): 348–355.
- López-Maury, L., Marguerat, S., and Bähler, J. (2008) Tuning gene expression to changing environments: from rapid responses to evolutionary adaptation. *Nat Rev Genet* **9** (8): 583–593.
- Lorenz, C., Gesell, T., Zimmermann, B., Schoeberl, U., Bilusic, I., Rajkowitsch, L., Waldsich, C., von Haeseler, A., and Schroeder, R. (2010) Genomic SELEX for Hfq-binding RNAs identifies genomic aptamers predominantly in antisense transcripts. *Nucleic Acids Res* **38** (11): 3794–3808.
- Mackenzie, C., Choudhary, M., Larimer, F.W., Predki, P.F., Stilwagen, S., Armitage, J.P., Barber, R.D., Donohue, T.J., Hosler, J.P., Newman, J.E., Shapleigh, J.P., Sockett, R.E., Zeilstra-Ryalls, J., and Kaplan, S. (2001) The home stretch, a first analysis of the nearly completed genome of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *Photosynth Res* **70** (1): 19–41.
- Mackie, G.A. (1998) Ribonuclease E is a 5'-end-dependent endonuclease. *Nature* **395** (6703): 720–723.
- Mackie, G.A. (2013) RNase E: at the interface of bacterial RNA processing and decay. *Nat Rev Microbiol* **11** (1): 45–57.
- Mackie, G.A., and Genereaux, J.L. (1993) The role of RNA structure in determining RNase E-dependent cleavage sites in the mRNA for ribosomal protein S20 *in vitro*. *J Mol Biol* **234** (4): 998–1012.
- Mäder, U., Zig, L., Kretschmer, J., Homuth, G., and Putzer, H. (2008) mRNA processing by RNases J1 and J2 affects *Bacillus subtilis* gene expression on a global scale. *Mol Microbiol* **70** (1): 183–196.
- Madhugiri, R., Basineni, S.R., and Klug, G. (2010) Turn-over of the small non-coding RNA RprA in *E. coli* is influenced by osmolarity. *Mol Genet Genomics* **284** (4): 307–318.
- Majdalani, N., Hernandez, D., and Gottesman, S. (2002) Regulation and mode of action of the second small RNA activator of RpoS translation, RprA. *Mol Microbiol* **46** (3): 813–826.
- Makarova, K.S., Wolf, Y.I., van der Oost, J., and Koonin, E.V. (2009) Prokaryotic homologs of Argonaute proteins are predicted to function as key components of a novel system of defense against mobile genetic elements. *Biol Direct* **4**: 29.
- Mank, N.N., Berghoff, B.A., Hermanns, Y.N., and Klug, G. (2012) Regulation of bacterial photosynthesis genes by the small noncoding RNA PcrZ. *Proc Natl Acad Sci USA* **109** (40): 16306–16311.
- Mank, N.N., Berghoff, B.A., and Klug, G. (2013) A mixed incoherent feed-forward loop contributes to the regulation of bacterial photosynthesis genes. *RNA Biol* **10** (3): 347–352.
- Mann, M., Wright, P.R., and Backofen, R. (2017) IntaRNA 2.0: enhanced and customizable prediction of RNA-RNA interactions. *Nucleic Acids Res* **45** (W1): W435–W439.

- Marbaniang, C.N., and Vogel, J. (2016) Emerging roles of RNA modifications in bacteria. *Curr Opin Microbiol* **30**: 50–57.
- Martin, W., and Koonin, E.V. (2006). A positive definition of prokaryotes. *Nature*. 442:868.
- Masliyah, G., Barraud, P., and Allain, F.H.-T. (2013) RNA recognition by double-stranded RNA binding domains: a matter of shape and sequence. *Cell Mol Life Sci* **70** (11): 1875–1895.
- Massé, E., and Arguin, M. (2005) Ironing out the problem: new mechanisms of iron homeostasis. *Trends Biochem Sci* **30** (8): 462–468.
- Massé, E., Escorcía, F.E., and Gottesman, S. (2003) Coupled degradation of a small regulatory RNA and its mRNA targets in *Escherichia coli*. *Genes Dev* **17** (19): 2374–2383.
- Matin, A., Auger, E.A., Blum, P.H., and Schultz, J.E. (1989) Genetic basis of starvation survival in nondifferentiating bacteria. *Annu Rev Microbiol* **43**: 293–316.
- McArthur, J.V. (2006) *Microbial ecology: An evolutionary approach*. Burlington, MA: Elsevier/Academic Press.
- McCown, P.J., Corbino, K.A., Stav, S., Sherlock, M.E., and Breaker, R.R. (2017) Riboswitch diversity and distribution. *RNA* **23** (7): 995–1011.
- McDowall, K.J., Kaberdin, V.R., Wu, S.W., Cohen, S.N., and Lin-Chao, S. (1995) Site-specific RNase E cleavage of oligonucleotides and inhibition by stem-loops. *Nature* **374** (6519): 287–290.
- McIntosh, M., Eisenhardt, K., Remes, B., Konzer, A., and Klug, G. (2019) Adaptation of the Alphaproteobacterium *Rhodobacter sphaeroides* to stationary phase. *Environ Microbiol* **21** (11): 4425–4445.
- Meade, H.M., Long, S.R., Ruvkun, G.B., Brown, S.E., and Ausubel, F.M. (1982) Physical and genetic characterization of symbiotic and auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* induced by transposon Tn5 mutagenesis. *J Bacteriol* **149** (1): 114–122.
- Meister, G. (2013) Argonaute proteins: functional insights and emerging roles. *Nat Rev Genet* **14** (7): 447–459.
- Menge, D.N.L., Hedin, L.O., and Pacala, S.W. (2012) Nitrogen and phosphorus limitation over long-term ecosystem development in terrestrial ecosystems. *PLoS One* **7** (8): e42045.
- Merighi, M., Majerczak, D.R., Stover, E.H., and Coplin, D.L. (2003) The HrpX/HrpY two-component system activates *hrpS* expression, the first step in the regulatory cascade controlling the Hrp regulon in *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*. *Mol Plant Microbe Interact* **16** (3): 238–248.
- Merino, E., and Yanofsky, C. (2005) Transcription attenuation: a highly conserved regulatory strategy used by bacteria. *Trends Genet* **21** (5): 260–264.
- Michaux, C., Holmqvist, E., Vasicek, E., Sharan, M., Barquist, L., Westermann, A.J., Gunn, J.S., and Vogel, J. (2017) RNA target profiles direct the discovery of virulence functions for the cold-shock proteins CspC and CspE. *Proc Natl Acad Sci USA* **114** (26): 6824–6829.
- Miczak, A., Kaberdin, V.R., Wei, C.L., and Lin-Chao, S. (1996) Proteins associated with RNase E in a multicomponent ribonucleolytic complex. *Proc Natl Acad Sci USA* **93** (9): 3865–3869.
- Mikulecky, P.J., Kaw, M.K., Brescia, C.C., Takach, J.C., Sledjeski, D.D., and Feig, A.L. (2004) *Escherichia coli* Hfq has distinct interaction surfaces for DsrA, rpoS and poly(A) RNAs. *Nat Struct Mol Biol* **11** (12): 1206–1214.

- Milón, P., and Rodnina, M.V. (2012) Kinetic control of translation initiation in bacteria. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **47** (4): 334–348.
- Misra, T.K., and Apirion, D. (1979) RNase E, an RNA processing enzyme from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **254** (21): 11154–11159.
- Mitchell, A.L., Attwood, T.K., Babbitt, P.C., Blum, M., Bork, P., Bridge, A., *et al.* (2019) InterPro in 2019: improving coverage, classification and access to protein sequence annotations. *Nucleic Acids Res* **47** (D1): D351–D360.
- Mitra, P., Ghosh, G., Hafeezunnisa, M., and Sen, R. (2017) Rho Protein: Roles and Mechanisms. *Annu Rev Microbiol* **71**: 687–709.
- Miyoshi, T., Ito, K., Murakami, R., and Uchiumi, T. (2016) Structural basis for the recognition of guide RNA and target DNA heteroduplex by Argonaute. *Nat Commun* **7**: 11846.
- Mizuno, T., Chou, M.Y., and Inouye, M. (1984) A unique mechanism regulating gene expression: translational inhibition by a complementary RNA transcript (micRNA). *Proc Natl Acad Sci USA* **81** (7): 1966–1970.
- Mohanty, B.K., Agrawal, A., and Kushner, S.R. (2020) Generation of pre-tRNAs from polycistronic operons is the essential function of RNase P in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* **48** (5): 2564–2578.
- Mohanty, B.K., Maples, V.F., and Kushner, S.R. (2004) The Sm-like protein Hfq regulates polyadenylation dependent mRNA decay in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **54** (4): 905–920.
- Møller, T., Franch, T., Højrup, P., Keene, D.R., Bächinger, H.P., Brennan, R.G., and Valentin-Hansen, P. (2002) Hfq: a bacterial Sm-like protein that mediates RNA-RNA interaction. *Mol Cell* **9** (1): 23–30.
- Mondal, S., Yakhnin, A.V., Sebastian, A., Albert, I., and Babitzke, P. (2016) NusA-dependent transcription termination prevents misregulation of global gene expression. *Nat. Microbiol.* **11**
- Montzka Wassarman, K. (1999) Small RNAs in *Escherichia coli*. *Trends in Microbiology* **7** (1): 37–45.
- Moon, K., and Gottesman, S. (2011) Competition among Hfq-binding small RNAs in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **82** (6): 1545–1562.
- Morita, T., Maki, K., and Aiba, H. (2005) RNase E-based ribonucleoprotein complexes: mechanical basis of mRNA destabilization mediated by bacterial noncoding RNAs. *Genes Dev* **19** (18): 2176–2186.
- Müller, K.M.H., Berghoff, B.A., Eisenhardt, B.D., Remes, B., and Klug, G. (2016) Characteristics of Pos19 - A Small Coding RNA in the Oxidative Stress Response of *Rhodobacter sphaeroides*. *PLoS One* **11** (9): e0163425.
- Mura, C., Randolph, P.S., Patterson, J., and Cozen, A.E. (2013) Archaeal and eukaryotic homologs of Hfq: A structural and evolutionary perspective on Sm function. *RNA Biol* **10** (4): 636–651.
- Narberhaus, F. (1999) Negative regulation of bacterial heat shock genes. *Mol Microbiol* **31** (1): 1–8.
- Navarro Llorens, J.M., Tormo, A., and Martínez-García, E. (2010) Stationary phase in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **34** (4): 476–495.
- Naville, M., and Gautheret, D. (2010) Transcription attenuation in bacteria: theme and variations. *Brief Funct Genomics* **9** (2): 178–189.
- Newman, J.D., Falkowski, M.J., Schilke, B.A., Anthony, L.C., and Donohue, T.J. (1999) The *Rhodobacter sphaeroides* ECF sigma factor, sigma(E), and the target promoters *cycA* P3 and *rpoE* P1. *J Mol Biol* **294** (2): 307–320.

- Ng Kwan Lim, E., Sasseville, C., Carrier, M.-C., and Massé, E. (2021) Keeping Up with RNA-Based Regulation in Bacteria: New Roles for RNA Binding Proteins. *Trends Genet* **37** (1): 86–97.
- Nicastro, G., Taylor, I.A., and Ramos, A. (2015) KH-RNA interactions: back in the groove. *Curr Opin Struct Biol* **30**: 63–70.
- Nixon, B.T., Ronson, C.W., and Ausubel, F.M. (1986) Two-component regulatory systems responsive to environmental stimuli share strongly conserved domains with the nitrogen assimilation regulatory genes *ntrB* and *ntrC*. *Proc Natl Acad Sci USA* **83** (20): 7850–7854.
- Nuss, A.M., Adnan, F., Weber, L., Berghoff, B.A., Glaeser, J., and 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.
- Nuss, A.M., Glaeser, J., Berghoff, B.A., and Klug, G. (2010) Overlapping alternative sigma factor regulons in the response to singlet oxygen in *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* **192** (10): 2613–2623.
- Nuss, A.M., Glaeser, J., and Klug, G. (2009) RpoH(II) activates oxidative-stress defense systems and is controlled by RpoE in the singlet oxygen-dependent response in *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* **191** (1): 220–230.
- Nyström, T. (2004) Stationary-phase physiology. *Annu Rev Microbiol* **58**: 161–181.
- O'Hara, E.B., Chekanova, J.A., Ingle, C.A., Kushner, Z.R., Peters, E., and Kushner, S.R. (1995) Polyadenylation helps regulate mRNA decay in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **92** (6): 1807–1811.
- Olejniczak, M., and Storz, G. (2017) ProQ/FinO-domain proteins: another ubiquitous family of RNA matchmakers? *Mol Microbiol* **104** (6): 905–915.
- Olovnikov, I., Chan, K., Sachidanandam, R., Newman, D.K., and Aravin, A.A. (2013) Bacterial argonaute samples the transcriptome to identify foreign DNA. *Mol Cell* **51** (5): 594–605.
- Opdyke, J.A., Fozo, E.M., Hemm, M.R., and Storz, G. (2011) RNase III participates in GadY-dependent cleavage of the *gadX-gadW* mRNA. *J Mol Biol* **406** (1): 29–43.
- Opdyke, J.A., Kang, J.-G., and Storz, G. (2004) GadY, a small-RNA regulator of acid response genes in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **186** (20): 6698–6705.
- Orr, M.W., Mao, Y., Storz, G., and Qian, S.-B. (2020) Alternative ORFs and small ORFs: shedding light on the dark proteome. *Nucleic Acids Res* **48** (3): 1029–1042.
- Otaka, H., Ishikawa, H., Morita, T., and Aiba, H. (2011) PolyU tail of rho-independent terminator of bacterial small RNAs is essential for Hfq action. *Proc Natl Acad Sci USA* **108** (32): 13059–13064.
- Oxender, D.L., Zurawski, G., and Yanofsky, C. (1979) Attenuation in the *Escherichia coli* tryptophan operon: role of RNA secondary structure involving the tryptophan codon region. *Proc Natl Acad Sci USA* **76** (11): 5524–5528.
- Paget, M.S. (2015) Bacterial sigma factors and anti-sigma factors: Structure, function and distribution. *Biomolecules* **5** (3): 1245–1265.
- Panja, S., Schu, D.J., and Woodson, S.A. (2013) Conserved arginines on the rim of Hfq catalyze base pair formation and exchange. *Nucleic Acids Res* **41** (15): 7536–7546.

- Papenfort, K., Bouvier, M., Mika, F., Sharma, C.M., and Vogel, J. (2010) Evidence for an autonomous 5' target recognition domain in an Hfq-associated small RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **107** (47): 20435–20440.
- Papenfort, K., Sun, Y., Miyakoshi, M., Vanderpool, C.K., and Vogel, J. (2013) Small RNA-mediated activation of sugar phosphatase mRNA regulates glucose homeostasis. *Cell* **153** (2): 426–437.
- Papenfort, K., and Vogel, J. (2009) Multiple target regulation by small noncoding RNAs rewires gene expression at the post-transcriptional level. *Res Microbiol* **160** (4): 278–287.
- Peng, T., Berghoff, B.A., Oh, J.I., Weber, L., Schirmer, J., Schwarz, J., Glaeser, J., and 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** (10): 988–999.
- Peuser, V., Metz, S., and Klug, G. (2011) Response of the photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* to iron limitation and the role of a Fur orthologue in this response. *Environ Microbiol Rep* **3** (3): 397–404.
- Peuser, V., Remes, B., and Klug, G. (2012) Role of the Irr protein in the regulation of iron metabolism in *Rhodobacter sphaeroides*. *PLoS One* **7** (8): e42231.
- Pfaffl, M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29** (9): e45.
- Pfeiffer, V., Papenfort, K., Lucchini, S., Hinton, J.C.D., and Vogel, J. (2009) Coding sequence targeting by MicC RNA reveals bacterial mRNA silencing downstream of translational initiation. *Nat Struct Mol Biol* **16** (8): 840–846.
- Pinder, B.D., and Smibert, C.A. (2013) microRNA-independent recruitment of Argonaute 1 to *nanos* mRNA through the Smaug RNA-binding protein. *EMBO Rep* **14** (1): 80–86.
- Potts, A.H., Vakulskas, C.A., Pannuri, A., Yakhnin, H., Babitzke, P., and Romeo, T. (2017) Global role of the bacterial post-transcriptional regulator CsrA revealed by integrated transcriptomics. *Nat Commun* **8** (1): 1596.
- Prévost, K., Desnoyers, G., Jacques, J.-F., Lavoie, F., and Massé, E. (2011) Small RNA-induced mRNA degradation achieved through both translation block and activated cleavage. *Genes Dev* **25** (4): 385–396.
- Prévost, K., Salvail, H., Desnoyers, G., Jacques, J.F., Phaneuf, E., and Massé, E. (2007) The small RNA RyhB activates the translation of *shiA* mRNA encoding a permease of shikimate, a compound involved in siderophore synthesis. *Mol Microbiol* **64** (5): 1260–1273.
- Purusharth, R.I., Klein, F., Sulthana, S., Jäger, S., Jagannadham, M.V., Evguenieva-Hackenberg, E., Ray, M.K., and Klug, G. (2005) Exoribonuclease R interacts with endoribonuclease E and an RNA helicase in the psychrotrophic bacterium *Pseudomonas syringae* Lz4W. *J Biol Chem* **280** (15): 14572–14578.
- Py, B., Higgins, C.F., Krisch, H.M., and Carpousis, A.J. (1996) A DEAD-box RNA helicase in the *Escherichia coli* RNA degradosome. *Nature* **381** (6578): 169–172.
- Qayyum, M.Z., Dey, D., and Sen, R. (2016) Transcription Elongation Factor NusA Is a General Antagonist of Rho-dependent Termination in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **291** (15): 8090–8108.
- Qian, P., Hunter, C.N., and Bullough, P.A. (2005) The 8.5Å projection structure of the core RC-LH1-PufX dimer of *Rhodobacter sphaeroides*. *J Mol Biol* **349** (5): 948–960.

- Qian, P., Papiz, M.Z., Jackson, P.J., Brindley, A.A., Ng, I.W., Olsen, J.D., Dickmann, M.J., Bullough, P.A., and Hunter, C.N. (2013) Three-dimensional structure of the *Rhodobacter sphaeroides* RC-LH1-PufX complex: dimerization and quinone channels promoted by PufX. *Biochemistry* **52** (43): 7575–7585.
- Qian, Y., and Tabita, F.R. (1996) A global signal transduction system regulates aerobic and anaerobic CO₂ fixation in *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* **178** (1): 12–18.
- Quendera, A.P., Seixas, A.F., Dos Santos, R.F., Santos, I., Silva, J.P.N., Arraiano, C.M., and Andrade, J.M. (2020) RNA-binding proteins driving the regulatory activity of small non-coding RNAs in bacteria. *Front Mol Biosci* **7**: 78.
- Rauhut, R., and Klug, G. (1999) mRNA degradation in bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **23** (3): 353–370.
- Ray-Soni, A., Bellecourt, M.J., and Landick, R. (2016) Mechanisms of bacterial transcription termination: All good things must end. *Annu Rev Biochem* **85**: 319–347.
- Redko, Y., Tock, M.R., Adams, C.J., Kaberdin, V.R., Grasby, J.A., and McDowall, K.J. (2003) Determination of the catalytic parameters of the N-terminal half of *Escherichia coli* ribonuclease E and the identification of critical functional groups in RNA substrates. *J Biol Chem* **278** (45): 44001–44008.
- Régnier, P., and Arraiano, C.M. (2000) Degradation of mRNA in bacteria: emergence of ubiquitous features. *Bioessays* **22** (3): 235–244.
- Reinkensmeier, J., and Giegerich, R. (2015) Thermodynamic matchers for the construction of the cuckoo RNA family. *RNA Biol* **12** (2): 197–207.
- Remes, B., Berghoff, B.A., Förstner, K.U., and Klug, G. (2014) Role of oxygen and the OxyR protein in the response to iron limitation in *Rhodobacter sphaeroides*. *BMC Genomics* **15**: 794.
- Remes, B., Rische-Grahl, T., Müller, K.M.H., Förstner, K.U., Yu, S.-H., Weber, L., et al. (2017) An RpoHI-dependent response promotes outgrowth after extended stationary phase in the Alphaproteobacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* **199** (14).
- Reuscher, C.M., and Klug, G. (2021) Antisense RNA asPcrL regulates expression of photosynthesis genes in *Rhodobacter sphaeroides* by promoting RNase III-dependent turn-over of *puf* mRNA. *RNA Biol*: 1–13.
- Robledo, M., Peregrina, A., Millán, V., García-Tomsig, N.I., Torres-Quesada, O., Mateos, P.F., Becker, A., and Jimenez-Zurdo, J. (2017) A conserved α -proteobacterial small RNA contributes to osmoadaptation and symbiotic efficiency of rhizobia on legume roots. *Environ Microbiol* **19** (7): 2661–2680.
- Rodnina, M.V. (2018) Translation in prokaryotes. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **10** (9).
- Rodriguez-Navarro, D.N., Ruiz-Sainz, J.E., Buendia-Claveria, A.M., Santamaria, C., Balatti, P.A., Krishnan, H.B., and Pueppke, S.G. (1996) Characterization of fast-growing rhizobia from nodulated soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] in Vietnam. *Systematic and Applied Microbiology* **19** (2): 240–248.
- Roesser, J.R., and Yanofsky, C. (1988) Ribosome release modulates basal level expression of the *trp* operon of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **263** (28): 14251–14255.
- Romeo, T. (1998) Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non-coding RNA molecule CsrB. *Mol Microbiol* **29** (6): 1321–1330.
- Romeo, T., Gong, M., Liu, M.Y., and Brun-Zinkernagel, A.M. (1993) Identification and molecular characterization of *csrA*, a pleiotropic gene from *Escherichia coli* that affects glycogen biosynthesis, gluconeogenesis, cell size, and surface properties. *J Bacteriol* **175** (15): 4744–4755.

- Roundtree, I.A., Evans, M.E., Pan, T., and He, C. (2017) Dynamic RNA modifications in gene expression regulation. *Cell* **169** (7): 1187–1200.
- Saoud, J., Carrier, M.-C., Massé, É., and Faucher, S.P. (2021) The small regulatory RNA Lpr10 regulates the expression of RpoS in *Legionella pneumophila*. *Mol Microbiol* **115** (4): 789–806.
- Scherrer, K., and Darnell, J.E. (1962) Sedimentation characteristics of rapidly labelled RNA from HeLa cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **7** (6): 486–490.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* **9** (7): 676–682.
- Schlüter, J.-P., Reinkensmeier, J., Daschkey, S., Evguenieva-Hackenberg, E., Janssen, S., Jänicke, S., Becker, J.D., Giegerich, R., and Becker, A. (2010) A genome-wide survey of sRNAs in the symbiotic nitrogen-fixing alpha-proteobacterium *Sinorhizobium meliloti*. *BMC Genomics* **11**: 245.
- Schmidt, R. (2006) Photosensitized generation of singlet oxygen. *Photochem Photobiol* **82** (5): 1161–1177.
- Schober, P., Boer, C., and Schwarte, L.A. (2018) Correlation coefficients: Appropriate use and interpretation. *Anesth Analg* **126** (5): 1763–1768.
- Schu, D.J., Zhang, A., Gottesman, S., and Storz, G. (2015) Alternative Hfq-sRNA interaction modes dictate alternative mRNA recognition. *EMBO J* **34** (20): 2557–2573.
- Schultz, J., Ponting, C.P., Hofmann, K., and Bork, P. (1997) SAM as a protein interaction domain involved in developmental regulation. *Protein Sci* **6** (1): 249–253.
- Sedlyarova, N., Shamovsky, I., Bharati, B.K., Epshtein, V., Chen, J., Gottesman, S., Schroeder, R., and Nudler, E. (2016) sRNA-mediated control of transcription termination in *E. coli*. *Cell* **167** (1): 111–121.e13.
- Sharma, C.M., Hoffmann, S., Darfeuille, F., Reignier, J., Findeiss, S., Sittka, A., Chabas, S., Reiche, K., Hackermüller, J., Reinhardt, R., Stadler, P.F., and Vogel, J. (2010) The primary transcriptome of the major human pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* **464** (7286): 250–255.
- Sharma, C.M., and Vogel, J. (2014) Differential RNA-seq: the approach behind and the biological insight gained. *Curr Opin Microbiol* **19**: 97–105.
- Shine, J., and Dalgarno, L. (1974) The 3'-terminal sequence of Escherichia coli 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proc Natl Acad Sci USA* **71** (4): 1342–1346.
- Silva, I.J., Barahona, S., Eyraud, A., Lalaouna, D., Figueroa-Bossi, N., Massé, E., and Arraiano, C.M. (2019) SraL sRNA interaction regulates the terminator by preventing premature transcription termination of *rho* mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **116** (8): 3042–3051.
- Silvaggi, J.M., Perkins, J.B., and Losick, R. (2005) Small untranslated RNA antitoxin in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **187** (19): 6641–6650.
- Simon, R., O'Connell, M., Labes, M., and Pühler, A. (1986) Plasmid vectors for the genetic analysis and manipulation of rhizobia and other gram-negative bacteria. In *Plant Molecular Biology*: Elsevier, pp. 640–659.
- Sittka, A., Lucchini, S., Papenfort, K., Sharma, C.M., Rolle, K., Binnewies, T.T., Hinton, J.C.D., and Vogel, J. (2008) Deep sequencing analysis of small noncoding RNA and mRNA targets of the global post-transcriptional regulator, Hfq. *PLoS Genet* **4** (8): e1000163.

- Smibert, C.A., Lie, Y.S., Shillinglaw, W., Henzel, W.J., and Macdonald, P.M. (1999) Smaug, a novel and conserved protein, contributes to repression of *nanos* mRNA translation *in vitro*. *RNA* **5** (12): 1535–1547.
- Smibert, C.A., Wilson, J.E., Kerr, K., and Macdonald, P.M. (1996) smaug protein represses translation of unlocalized nanos mRNA in the *Drosophila* embryo. *Genes Dev* **10** (20): 2600–2609.
- Smirnov, A., Förstner, K.U., Holmqvist, E., Otto, A., Günster, R., Becher, D., Reinhardt, R., and Vogel, J. (2016) Grad-seq guides the discovery of ProQ as a major small RNA-binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **113** (41): 11591–11596.
- Smirnov, A., Schneider, C., Hör, J., and Vogel, J. (2017a) Discovery of new RNA classes and global RNA-binding proteins. *Curr Opin Microbiol* **39**: 152–160.
- Smirnov, A., Wang, C., Drewry, L.L., and Vogel, J. (2017b) Molecular mechanism of mRNA repression in trans by a ProQ-dependent small RNA. *EMBO J* **36** (8): 1029–1045.
- Sneath, P.H.A., and Sokal, R.R. (1973) Numerical taxonomy: The principles and practice of numerical classification. San Francisco: Freeman.
- Spanka, D.T., Reuscher, C.M., and Klug, G. (2021) Impact of PNPase on the transcriptome of *Rhodobacter sphaeroides* and its cooperation with RNase III and RNase E. *BMC Genomics* **22** (1): 106.
- Staroń, A., Sofia, H.J., Dietrich, S., Ulrich, L.E., Liesegang, H., and Mascher, T. (2009) The third pillar of bacterial signal transduction: classification of the extracytoplasmic function (ECF) sigma factor protein family. *Mol Microbiol* **74** (3): 557–581.
- Steuten, B., Schneider, S., and Wagner, R. (2014) 6S RNA: recent answers-future questions. *Mol Microbiol* **91** (4): 641–648.
- Stock, A.M., Robinson, V.L., and Goudreau, P.N. (2000) Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem* **69**: 183–215.
- Storz, G., Vogel, J., and Wassarman, K.M. (2011) Regulation by small RNAs in bacteria: expanding frontiers. *Mol Cell* **43** (6): 880–891.
- Storz, G., Wolf, Y.I., and Ramamurthi, K.S. (2014) Small proteins can no longer be ignored. *Annu Rev Biochem* **83**: 753–777.
- Suresh, G., Lodha, T.D., Indu, B., Sasikala, C., and Ramana, C.V. (2020) Corrigendum: Taxogenomics resolves conflict in the genus *Rhodobacter*: A two and half decades pending thought to reclassify the genus *Rhodobacter*. *Front Microbiol* **11**: 1111.
- Suwanto, A., and Kaplan, S. (1989) Physical and genetic mapping of the *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 genome: presence of two unique circular chromosomes. *J Bacteriol* **171** (11): 5850–5859.
- Swarts, D.C., Hegge, J.W., Hinojo, I., Shiimori, M., Ellis, M.A., Dumrongkulraksa, J., Terns, R.M., Terns, M.P., and van der Oost, J. (2015) Argonaute of the archaeon *Pyrococcus furiosus* is a DNA-guided nuclease that targets cognate DNA. *Nucleic Acids Res* **43** (10): 5120–5129.
- Swarts, D.C., Jore, M.M., Westra, E.R., Zhu, Y., Janssen, J.H., Snijders, A.P., Wang, Y., Patel, D.J., Berenguer, J., Brouns, S.J.J., and van der Oost, J. (2014) DNA-guided DNA interference by a prokaryotic Argonaute. *Nature* **507** (7491): 258–261.
- Tan, R., and Frankel, A.D. (1995) Structural variety of arginine-rich RNA-binding peptides. *Proc Natl Acad Sci USA* **92** (12): 5282–5286.

- Teplova, M., Malinina, L., Darnell, J.C., Song, J., Lu, M., Abagyan, R., Musunuru, K., Teplov, A., Burley, S.K., Darnell, R.B., and Patel, D.J. (2011) Protein-RNA and protein-protein recognition by dual KH1/2 domains of the neuronal splicing factor Nova-1. *Structure* **19** (7): 930–944.
- Thomason, M.K., Fontaine, F., Lay, N. de, and Storz, G. (2012) A small RNA that regulates motility and biofilm formation in response to changes in nutrient availability in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **84** (1): 17–35.
- Thomason, M.K., and Storz, G. (2010) Bacterial antisense RNAs: how many are there, and what are they doing? *Annu Rev Genet* **44**: 167–188.
- Thüring, M., Ganapathy, S., Schlüter, M.A.C., Lechner, M., and Hartmann, R.K. (2021) 6S-2 RNA deletion in the undomesticated *B. subtilis* strain NCIB 3610 causes a biofilm derepression phenotype. *RNA Biol* **18** (1): 79–92.
- Tomizawa, J., Itoh, T., Selzer, G., and Som, T. (1981) Inhibition of Cole1 RNA primer formation by a plasmid-specified small RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **78** (3): 1421–1425.
- Tramonti, A., Canio, M. de, and Biase, D. de (2008) GadX/GadW-dependent regulation of the *Escherichia coli* acid fitness island: transcriptional control at the *gadY-gadW* divergent promoters and identification of four novel 42 bp GadX/GadW-specific binding sites. *Mol Microbiol*.
- Trotochaud, A.E., and Wassarman, K.M. (2004) 6S RNA function enhances long-term cell survival. *J Bacteriol* **186** (15): 4978–4985.
- Trotochaud, A.E., and Wassarman, K.M. (2005) A highly conserved 6S RNA structure is required for regulation of transcription. *Nat Struct Mol Biol* **12** (4): 313–319.
- Updegrove, T.B., Correia, J.J., Chen, Y., Terry, C., and Wartell, R.M. (2011) The stoichiometry of the *Escherichia coli* Hfq protein bound to RNA. *RNA* **17** (3): 489–500.
- Updegrove, T.B., Zhang, A., and Storz, G. (2016) Hfq: the flexible RNA matchmaker. *Curr Opin Microbiol* **30**: 133–138.
- van Niel, C.B. (1944) The culture, general physiology, morphology, and classification of the non-sulfur purple and brown bacteria. *Bacteriol Rev* **8** (1): 1–118.
- Venturini, E., Svensson, S.L., Maaß, S., Gelhausen, R., Eggenhofer, F., Li, L., *et al.* (2020) A global data-driven census of Salmonella small proteins and their potential functions in bacterial virulence. *microLife* **1** (1).
- Vercruysse, M., Fauvart, M., Cloots, L., Engelen, K., Thijs, I.M., Marchal, K., and Michiels, J. (2010) Genome-wide detection of predicted non-coding RNAs in *Rhizobium etli* expressed during free-living and host-associated growth using a high-resolution tiling array. *BMC Genomics* **11**: 53.
- Verméglio, A., and Joliot, P. (1999) The photosynthetic apparatus of *Rhodobacter sphaeroides*. *Trends in Microbiology* **7** (11): 435–440.
- Vitreschak, A.G., Mironov, A.A., Lyubetsky, V.A., and Gelfand, M.S. (2008) Comparative genomic analysis of T-box regulatory systems in bacteria. *RNA* **14** (4): 717–735.
- Vitreschak, A.G., Rodionov, D.A., Mironov, A.A., and Gelfand, M.S. (2004) Riboswitches: the oldest mechanism for the regulation of gene expression? *Trends Genet* **20** (1): 44–50.
- Vogel, J., and Luisi, B.F. (2011) Hfq and its constellation of RNA. *Nat Rev Microbiol* **9** (8): 578–589.
- Wagner, E.G.H., and Romby, P. (2015) Small RNAs in bacteria and archaea: who they are, what they do, and how they do it. *Adv Genet* **90**: 133–208.

- Wang, Y., Sheng, G., Juranek, S., Tuschl, T., and Patel, D.J. (2008) Structure of the guide-strand-containing argonaute silencing complex. *Nature* **456** (7219): 209–213.
- Wang, Z., Gerstein, M., and Snyder, M. (2009) RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet* **10** (1): 57–63.
- Wassarman, K.M. (2007) 6S RNA: a regulator of transcription. *Mol Microbiol* **65** (6): 1425–1431.
- Waters, L.S., and Storz, G. (2009) Regulatory RNAs in bacteria. *Cell* **136** (4): 615–628.
- Weber, L., Thoelken, C., Volk, M., Remes, B., Lechner, M., and 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.
- Weber, L. (2017) SorY und UpsM, funktionelle Charakterisierung zweier sRNAs in *Rhodobacter sphaeroides*. Dissertation, Justus-Liebig Universität Gießen.
- Wehner, S., Damm, K., Hartmann, R.K., and Marz, M. (2014) Dissemination of 6S RNA among bacteria. *RNA Biol.* **11** (11): 1467–1478
- Weiss, M.A., and Narayana, N. (1998) RNA recognition by arginine-rich peptide motifs. *Biopolymers* **48** (2-3): 167–180.
- Westfall, C.S., and Levin, P.A. (2017) Bacterial cell size: Multifactorial and multifaceted. *Annu Rev Microbiol* **71**: 499–517.
- Wilhelm, B.T., and Landry, J.-R. (2009) RNA-Seq-quantitative measurement of expression through massively parallel RNA-sequencing. *Methods* **48** (3): 249–257.
- Will, W.R., and Frost, L.S. (2006) Hfq is a regulator of F-plasmid TraJ and TraM synthesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **188** (1): 124–131.
- Wilms, I., Overlöpfer, A., Nowrousian, M., Sharma, C.M., and Narberhaus, F. (2012) Deep sequencing uncovers numerous small RNAs on all four replicons of the plant pathogen *Agrobacterium tumefaciens*. *RNA Biol* **9** (4): 446–457.
- Wilusz, C.J., and Wilusz, J. (2005) Eukaryotic Lsm proteins: lessons from bacteria. *Nat Struct Mol Biol* **12** (12): 1031–1036.
- Winz, M.-L., Cahová, H., Nübel, G., Frindert, J., Höfer, K., and Jäschke, A. (2017) Capture and sequencing of NAD-capped RNA sequences with NAD captureSeq. *Nat Protoc* **12** (1): 122–149.
- Woese, C.R., Stackebrandt, E., Weisburg, W.G., Paster, B.J., Madigan, M.T., Fowler, V.J., Hahn, C.M., Blanz, B., Gupta, R., Nealson, K.H., and Fox, E.G. (1984) The phylogeny of purple bacteria: The alpha subdivision. *Systematic and Applied Microbiology* **5** (3): 315–326.
- Yanofsky, C. (1981) Attenuation in the control of expression of bacterial operons. *Nature* **289** (5800): 751–758.
- Zeilstra-Ryalls, J.H., and Kaplan, S. (1995) Aerobic and anaerobic regulation in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1: the role of the *fnrL* gene. *J Bacteriol* **177** (22): 6422–6431.
- Zeilstra-Ryalls, J.H., and Kaplan, S. (2004) Oxygen intervention in the regulation of gene expression: the photosynthetic bacterial paradigm. *Cell Mol Life Sci* **61** (4): 417–436.
- Zere, T.R., Vakulskas, C.A., Leng, Y., Pannuri, A., Potts, A.H., Dias, R., Tang, D., Kolaczowski, B., Georgellis, D., Ahmer, B.M.M., and Romeo, T. (2015) Genomic targets and features of BarA-UvrY (-SirA) signal transduction systems. *PLoS One* **10** (12): e0145035.

- Ziegelhoffer, E.C., and Donohue, T.J. (2009) Bacterial responses to photo-oxidative stress. *Nat Rev Microbiol* **7** (12): 856–863.
- Zschiedrich, C.P., Keidel, V., and Szurmant, H. (2016) Molecular mechanisms of two-component signal transduction. *J Mol Biol* **428** (19): 3752–3775.

7.2 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent	mRNA	<i>messenger</i> RNA
°C	Grad Celsius	n	Nano
μ	mikro	N ₂	Stickstoff
ad	auffüllen auf	nt	Nukleotide
APS	Ammoniumpersulfat	OD	optische Dichte
ATP	Adenosintriposphat	ORF	<i>open reading frame</i>
bp	Basenpaare	PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
BSA	Bovines Serum Albumin	PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
bzw.	beziehungsweise	PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
c	Centi	PNK	Polynukleotidkinase
cDNA	complementary DNA	PY	<i>peptone-yeast</i>
Ci	Curie	RÄ	Rhodobacter-Äpfelsäure
CO ₂	Kohlenstoffdioxid	RBD	RNA-Bindedomäne
CSP	cold-shock Proteine	RBP	RNA-Bindeproteine
CTP	Cytosintriposphat	RBS	Ribosomen-Bindestelle
DNA	Desoxyribonukleinsäure	RNA	Ribonukleinsäure
dNTPs	Didesoxyribonukleosidtriposphat	RNasen	Ribonuklease
ds	doppelsträngig	ROS	<i>reactive oxygen species</i>
DTT	Dithiothreitol	rpm	<i>revolution per minute</i>
ECF	<i>extracytoplasmic function</i>	rRNAs	<i>ribosomale</i> RNA
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	RT	reverse Transkriptase
<i>et al</i>	<i>et altera</i> (und andere)	SD	Shine-Dalgarno Sequenz
g	Gramm	SDS	Natriumdodecylsulfat
h	Stunde	SEC	<i>size exclusion colume</i>
His	Histidin	sRNAs	<i>small</i> RNA
IPTG	Isopropylthiogalaktosid	TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
J	Joule	TBE	Tris-Borat- EDTA-Puffer
kb	Kilobasen	TEMED	Tetramethylendiamin
kDa	Kilodalton	Tris	Trishydroxymethylaminomethan
l	Liter	tRNAs	<i>transfer</i> RNA
LH	Lichtsammelkomplex	UTP	Uridintriposphat
m	Meter/Milli	UTR	untranslatierter Region
M	Molar	UV	ultraviolett
m ²	Quadratmeter	V	Volt
min	Minuten	W	Watt
mol	Basiseinheit der Stoffmenge	w/v	Gewichts/Volumenverhältnis

7.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Wirkungsweise regulatorischer RNA-Elemente in Bakterien.	11
Abbildung 2: Funktion von <i>cis</i> -kodierten sRNAs.	15
Abbildung 3: Funktion von <i>trans</i> -kodierten sRNAs.	17
Abbildung 4: Funktion von Protein-bindenden sRNAs.	19
Abbildung 5: Übersicht über RNA-Bindedomänen (RBD).	20
Abbildung 6: Aufbau und Funktion der RNase E.	26
Abbildung 7: mRNA Degradation in <i>E. coli</i> nach initiale RNase E Spaltung.	29
Abbildung 8: Modell für die posttranskriptionelle Regulation der <i>puf</i> -mRNA.	32
Abbildung 9: Regulation der photooxidativen Stressantwort in <i>R. sphaeroides</i> über die alternativen σ -Faktoren RpoE, RpoH und RpoHII.	34
Abbildung 10: Schematische Lokalisierung der sRNAs StsR und UpsM in <i>R. sphaeroides</i>	91
Abbildung 11: sRNA StsR beeinflusst das Wachstum und die Überlebensrate von <i>R. sphaeroides</i>	93
Abbildung 12: sRNA StsR beeinflusst Zellteilung in <i>R. sphaeroides</i>	94
Abbildung 13: sRNA StsR beeinflusst die Ausbildung der Pigment-bindenden Proteine.	95
Abbildung 14: RpoH/RpoHII abhängige Expression der sRNA StsR.	97
Abbildung 15: Interaktionsbereiche zwischen StsR und UpsM.	98
Abbildung 16: StsR-abhängige Prozessierung von UpsM unter verschiedenen Bedingungen.	99
Abbildung 17: Promotoraktivität von UpsM unter ausgewählten Bedingungen.	100
Abbildung 18: Expression von StsR und Prozessierung von UpsM über die Zeit unter Singulett-Sauerstoffstress ($^1\text{O}_2$).	101
Abbildung 19: StsR-abhängige Prozessierung von UpsM.	102
Abbildung 20: Bindung zwischen StsR und UpsM ist abhängig von dem RNA-Chaperon Hfq.	103
Abbildung 21: Analyse der Halbwertszeit von UpsM in Abhängigkeit von StsR.	105
Abbildung 22: <i>In vitro</i> Interaktion von StsR und UpsM anhand <i>electrophoretic mobility shift assays</i> (EMSAs).	106
Abbildung 23: <i>In vitro</i> Prozessierung von UpsM in Abhängigkeit von StsR.	108
Abbildung 24: Strukturänderung der sRNA UpsM durch die Interaktion mit der sRNA StsR.	110
Abbildung 25: Wachstumsphasen abhängige Expression von UpsM, StsR und <i>mraZ</i>	111
Abbildung 26: sRNA StsR beeinflusst die Menge des <i>read-through</i> Transkripts.	113
Abbildung 27: Veränderungen in der <i>dcw</i> Gen Expression in verschiedenen Wachstumsphasen. ...	114
Abbildung 28: <i>In vitro</i> Interaktion von UpsM (3' Fragment) mit <i>ftsW</i> und <i>mraY</i> anhand von <i>electrophoretic mobility shift assays</i> (EMSAs).	115
Abbildung 29: Überexpression von dem UpsM 3' Fragment (UpsM(130 nt)) reduziert die Level von <i>ftsW</i> und <i>mraY</i>	117
Abbildung 30: Schematische Darstellung des CIN1 Lokus aus DUF1127-Protein und CcsR-RNA in <i>R. sphaeroides</i>	118
Abbildung 31: Phylogenetischer Baum der konservierten Regionen von <i>ccaf1</i> aus verschiedenen α -Proteobakterien.	119
Abbildung 32: Schematische Darstellung der chromosomalen Lokalisierung von <i>RSP_0557</i>	120
Abbildung 33: Konservierte Aminosäuresequenz zwischen der RNA-bindenden Domäne der Smaug Proteine in <i>D. melanogaster</i> und der DUF1127 Domäne in verschiedenen α -Proteobakterien.	121
Abbildung 34: Einfluss des DUF1127 Protein CcaF1 auf das CcsR RNA-Level.	122
Abbildung 35: Einfluss von Hfq und dem DUF1127 Protein CcaF1 auf das CcsR RNA-Level.	124
Abbildung 36: Promotoraktivität des <i>ccaf1</i> -CcsR1-4 Operons.	125
Abbildung 37: Einfluss von der RNase E und CcaF1 auf die Prozessierung der CcsR RNAs.	126
Abbildung 38: Einfluss des DUF1127 Proteins CcaF1 auf das Wachstum und die Stressresistenz von <i>R. sphaeroides</i>	128

Abbildung 39: Einfluss des Proteins CcaF1 auf das Transkriptom von <i>R. sphaeroides</i>	130
Abbildung 40: Qualitätskontrolle der CoIP RNA mittels RT-PCR.	134
Abbildung 41: Identifikation von RNA-Transkripten als Bindungspartner von CcaF1 mittels Co- Immunopräzipitation und RNA Sequenzierung (RipSeq).	135
Abbildung 42: Exemplarische Beispiele von RNA-Transkripten, die in der Co-Immunopräzipitation und RNA Sequenzierung (RipSeq) keine Bindungspartner von CcaF1 sind.	136
Abbildung 43: Validierung der Co-Immunopräzipitation mittels quantitativer <i>real-time</i> RT-PCR (qRT- PCR).	137
Abbildung 44: Co-Immunopräzipitation von CcaF1 zur Identifikation möglicher Protein- Interaktionspartner.	139
Abbildung 45: Aufreinigung von CcaF1 mittels Affinitäts-Chromatographie und Größenausschluss- Chromatographie.	141
Abbildung 46: <i>In vitro</i> Interaktion zwischen CcaF1 und CcsR1 bzw. CcsR1-4 RNA-Transkript anhand <i>electrophoretic mobility shift assays</i> (EMSAs).....	142
Abbildung 47: Konkurrenz des CcaF1:CcsR1 Komplexes mit kalten CcsR1 oder StsR RNA- Transkripten.	143
Abbildung 48: <i>In vitro</i> Interaktion zwischen CcaF1 und mutierten CcsR1 RNA-Transkripten anhand <i>electrophoretic mobility shift assays</i> (EMSA).	144
Abbildung 49: Einfluss des Proteins CcaF1 auf die Stabilität der CcsR1 RNA.	146
Abbildung 50: Einfluss des Proteins CcaF1 auf die Stabilität verschiedener nicht kodierender RNAs.	147
Abbildung 51: Einfluss des Proteins CcaF1 auf die Stabilität verschiedener, kodierender mRNAs....	148
Abbildung 52: Nachweis von isolierten CcaF1-RNA-Komplexen für den entsprechenden iCLIP.....	150
Abbildung 53: Amplifikation der cDNA.	150
Abbildung 54: Identifikation einer Bindungsregion der RNA CcsR2 an das Protein CcaF1.	151
Abbildung 55: Identifikation einer Bindungsregion der <i>signal-recognition particle</i> (SRP) RNA an das Protein CcaF1.....	152
Abbildung 56: Identifikation einer Bindungsregion der tRNA für Histidin an das Protein CcaF1.....	153
Abbildung 57: Identifikation einer Bindungsregion von verschiedenen RNA-Transkripten an das Protein CcaF1.	154
Abbildung 58: Expression von <i>RSP_0557</i> unter verschiedenen Bedingungen.	155
Abbildung 59: Einfluss der RNase E auf die Prozessierung der <i>RSP_0557</i> mRNA.	157
Abbildung 60: Identifikation von RNA-Transkripten als Bindungspartner von <i>RSP_0557</i> mittels Co- Immunopräzipitation und RNA Sequenzierung (RipSeq).	158
Abbildung 61: Modell zur Regulation der Zellteilung in <i>R. sphaeroides</i> in der exponentiellen Wachstumsphase.	164
Abbildung 62: Modell zur Regulation der Zellteilung in <i>R. sphaeroides</i> unter Stressbedingungen und beim Übergang in die stationäre Phase.	165
Abbildung 63: Mögliche Funktion des DUF1127 Proteins CcaF1 in der posttranskriptionellen Genregulation von <i>R. sphaeroides</i>	171

7.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Bakterienstämme	37
Tabelle 2: Plasmide	38
Tabelle 3: Oligonukleotide für das Projekt StsR.....	39
Tabelle 4: Oligonukleotide für das Projekt CcaF1.....	41
Tabelle 5: Labormaterial	44
Tabelle 6: Antibiotika	45
Tabelle 7: Allgemeine Puffer und Lösungen	46
Tabelle 8: Zusammensetzung für Rhodobacter-Äpfelsäure (RÄ)-Minimalmedium.....	48
Tabelle 9: Zusammensetzung für PY-Medium (peptone-yeast medium)	51
Tabelle 10: Zusammensetzung für Standard I-Medium.....	52
Tabelle 11: Zusammensetzung für einen 10 µl PCR-Reaktionsansatz	55
Tabelle 12: Standard PCR Programm	55
Tabelle 13: Zusammensetzung für Lösung I, II und III.....	57
Tabelle 14: Zusammensetzung für TE-Puffer und CTAB-Lösung.....	57
Tabelle 15: Zusammensetzung für 10 ml 10x Ladepuffer.....	59
Tabelle 16: Zusammensetzung für 10%iges TBE-Polyacrylamidgel	60
Tabelle 17: Zusammensetzung für 80 ml Diffusionspuffer.....	60
Tabelle 18: Zusammensetzung für 10%iges TBE-Polyacrylamid-Harnstoffgel.....	61
Tabelle 19: Zusammensetzung für Formamid-Harnstoff-Mix.....	61
Tabelle 20: Zusammensetzung für 6%iges TBE-Polyacrylamid-Harnstoffgel.....	61
Tabelle 21: Zusammensetzung für 6%iges TBE-Polyacrylamidgel	62
Tabelle 22: Zusammensetzung für nativen RNA-Ladepuffer	62
Tabelle 23: Zusammensetzung für 8%iges Sequenziergel	63
Tabelle 24: Zusammensetzung für 1%iges Formaldehyd-Agarosegel	63
Tabelle 25: Zusammensetzung für RNA-Probenpuffer	64
Tabelle 26: Zusammensetzung für 10x RNA-Ladepuffer	64
Tabelle 27: Zusammensetzung für Trenngel und Sammelgel.....	65
Tabelle 28: Zusammensetzung für Trenngel- und Sammelgelpuffer.....	65
Tabelle 29: Zusammensetzung für 4x SDS-Ladepuffer	65
Tabelle 30: Zusammensetzung für Resuspensions- und Lysispuffer.....	66
Tabelle 31: Reaktionsansatz für DNase-Verdau.....	67
Tabelle 32: Zusammensetzung für Denaturierungs- und Neutritisierungspuffer.....	68
Tabelle 33: Zusammensetzung 300 ml Church-Puffer	69
Tabelle 34: Zusammensetzung 1 l Wasch-Lösung	69
Tabelle 35: Zusammensetzung 1 l Stripping-Lösung.....	69
Tabelle 36: Reaktionsansatz für 10 µl	70
Tabelle 37: Zusammensetzung STE-Puffer.....	70
Tabelle 38: Reaktionsansatz für 10 µl	71
Tabelle 39: Reaktionsansatz in vitro Transkription.....	72
Tabelle 40: Zusammensetzung für 10 ml 10x Strukturpuffer	73
Tabelle 41: Zusammensetzung für nativen RNA-Probenpuffer	73
Tabelle 42: Zusammensetzung für AN- und BN- Puffer	75
Tabelle 43: Zusammensetzung für 5x RNase E-Puffer	75
Tabelle 44: Zusammensetzung für Lysispuffer	76
Tabelle 45: Zusammensetzung für RQ1-Puffer	77
Tabelle 46: Zusammensetzung für Puffer für die CoIP	77
Tabelle 47: Zusammensetzung für 1x Phosphatase- und 3' RNA-Linker-Ligation-Mix.....	78

Tabelle 48: Zusammensetzung für PNK dePPL- und TBS400-T-Puffer	78
Tabelle 49: Zusammensetzung für 1x PNK Mix.....	79
Tabelle 50: Zusammensetzung für 2x LDS-Ladepuffer.....	79
Tabelle 51: Zusammensetzung für PK-Puffer und PK-Puffer mit 7 M Harnstoff.....	80
Tabelle 52: Zusammensetzung für 6 µl reverse Transkriptions (RT) Mix.....	80
Tabelle 53: Zusammensetzung für 1x 3' cDNA Linker Ligation Mix.....	81
Tabelle 54: Zusammensetzung für cDNA-Amplifikation (50 µl).....	82
Tabelle 55: PCR Reaktion	82
Tabelle 56: Zusammensetzung für cDNA-Amplifikation (10 µl).....	82
Tabelle 57: PCR Reaktion	83
Tabelle 58: Zusammensetzung für cDNA-Amplifikation (40 µl).....	83
Tabelle 59: PCR Reaktion	83
Tabelle 60: Zusammensetzung RNaseE529-His ₆ Lysispuffer.....	85
Tabelle 61: Zusammensetzung Lysispuffer und SEC-Puffer	86
Tabelle 62: Zusammensetzung Puffer Fixierlösung	87
Tabelle 63: Zusammensetzung für 10l 1x Transferpuffer	88
Tabelle 64: Veränderung der mRNA-Spiegel (Log2FC-Ratio $\geq +1$) entsprechend der DESeq2-Analyse von <i>R. sphaeroides</i> pRK4352 (EVC) und <i>R. sphaeroides</i> pRKccaF1.. .. Fehler! Textmarke nicht definiert.	
Tabelle 65: Veränderung der mRNA-Spiegel (Log2FC-Ratio ≤ -1) entsprechend der DESeq2-Analyse von <i>R. sphaeroides</i> pRK4352 (EVC) und <i>R. sphaeroides</i> pRKccaF1.	134
Tabelle 66: Quantifizierung der Co-Immunopräzipitation, die mehr als ≥ 10 Gesamt- <i>reads</i> und eine 10-fach höhere <i>read</i> -Anzahl zwischen CcaF1 mit 3xFLAG- <i>tag</i> und CcaF1 ohne 3xFLAG- <i>tag</i> (Kontrolle) aufweisen.	138
Tabelle 67: Auswertung der <i>high resolution</i> Massenspektrometrie (LS-ESI-HRMS) von CcaF1 mit 3xFLAG- <i>tag</i> (CcaF1FLAG).....	140

8 Anhang

8.1 Anhang sRNA StsR

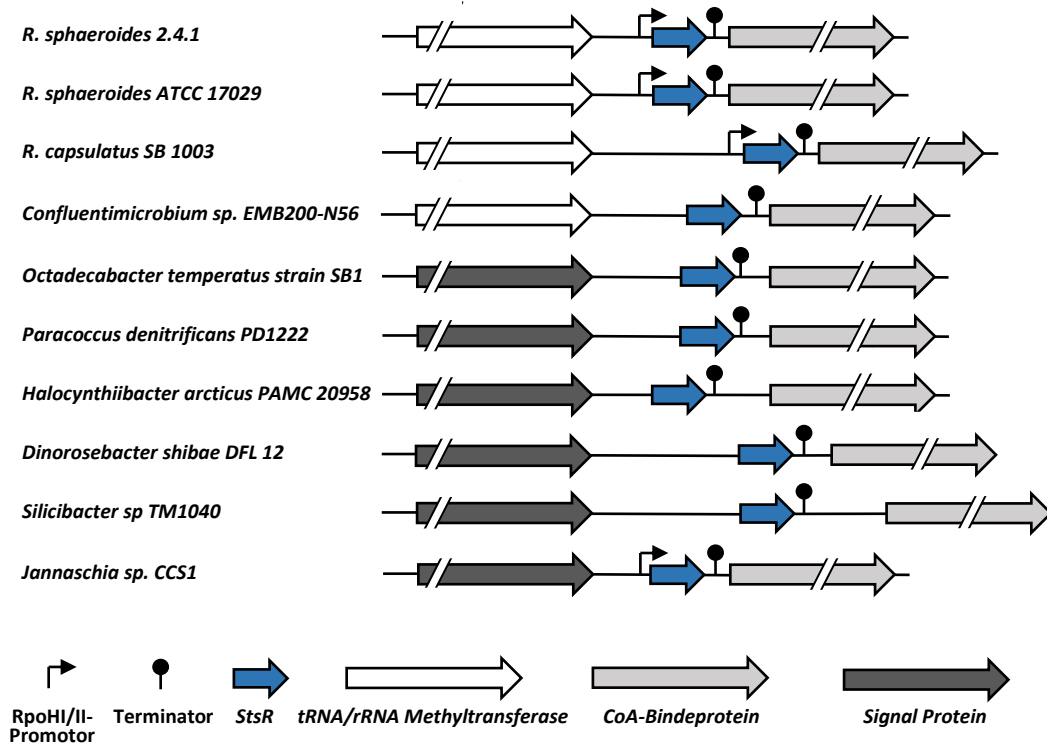


Abbildung Anhang 1: Genomische Lokalisierung des StsR-Lokus in Mitgliedern der Rhodobacteraceae. Der StsR-Lokus besitzt am 3' Ende eine transkriptionellen Terminator (Haarnadelschleife) und in *R. sphaeroides* 2.4.1, *R. capsulatus* SB 1003 und *Jannaschia* sp. CCS1 eine RpoHI/II abhängige Promotorsequenz (Pfeil) am 5' Ende (modifiziert nach Grützner et al., 2021b).

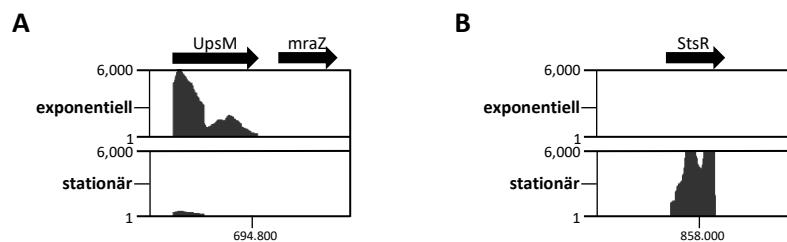


Abbildung Anhang 2: Abundanz von UpsM und StsR in der exponentiellen und stationären Wachstumsphase. RNASeq-Daten von *R. sphaeroides* Wildtyp aus der exponentiellen und stationären (48 h) Wachstumsphase unter mikroaeroben Bedingungen. Gezeigt sind die *read coverage plots* aus dem *Integrated Genome Browser* (modifiziert nach Grützner et al., 2021b).

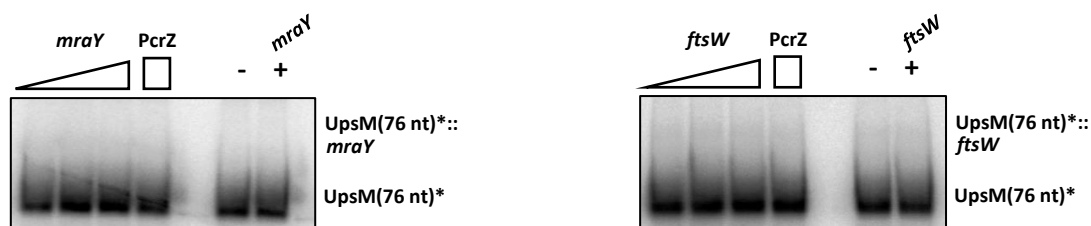


Abbildung Anhang 3: *In vitro* Interaktion von UpsM (5' Fragment) mit *ftsW* und *mraY* anhand von electrophoretic mobility shift assays (EMSA). EMSA mit einem 76 Nukleotid langen UpsM *in vitro* Transkript (UpsM(130 nt)*) dargestellt, welches intern mit [α^{32} UTP] gelabelt wurde und dem 5' Ende von UpsM entspricht. 15 nM UpsM* *in vitro* Transkript wurden mit aufsteigenden Konzentrationen (1:1 [15 nM], 1:10 [150 nM], 1:100 [1,5 μ M]) nicht radioaktiv gelabelten *in vitro* Transkripten von *ftsW* oder *mraY* inkubiert. Als Negativ-Kontrolle wurden die jeweiligen Transkripte von UpsM* alleine mit H_2O (-) oder mit 100x Überschuss von der sRNA PcrZ (1,5 μ M) inkubiert. Als Positiv-Kontrolle wurde das jeweilige UpsM* *in vitro* Transkript im Verhältnis 1:100 [1,5 μ M] mit dem jeweiligen *in vitro* Transkript von *ftsW* oder *mraY* (+) inkubiert, nachdem beide sRNAs zusammen renaturierten. Die Auftrennung erfolgte in einem nativen 6 %igen TBE-Polyacrylamidgel und die Detektion mittels *phosphoimaging* (modifiziert nach Grützner *et al.*, 2021b).

8.2 Anhang DUF1127 Proteine CcaF1 und RSP_0557

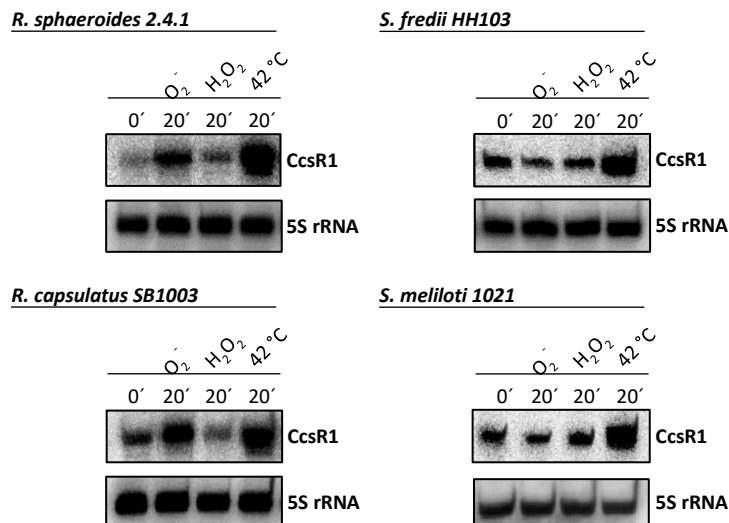


Abbildung Anhang 4: Analyse zur Expression der sRNA CcsR1 in verschiedenen α -Proteobakterien. *R. sphaeroides* 2.4.1, *S. fredii* HH103, *R. capsulatus* SB1003 und *S. meliloti* 1021 wurden in der exponentiellen Phase kultiviert. Die Gesamt-RNA wurde mit heißem Phenol isoliert und anhand eines Northern Blots analysiert. Radioaktiv markierte Oligonukleotide dienen als spezifische Sonde zur Detektion der sRNA CcsR1 (modifiziert nach Grützner *et al.*, 2021a).

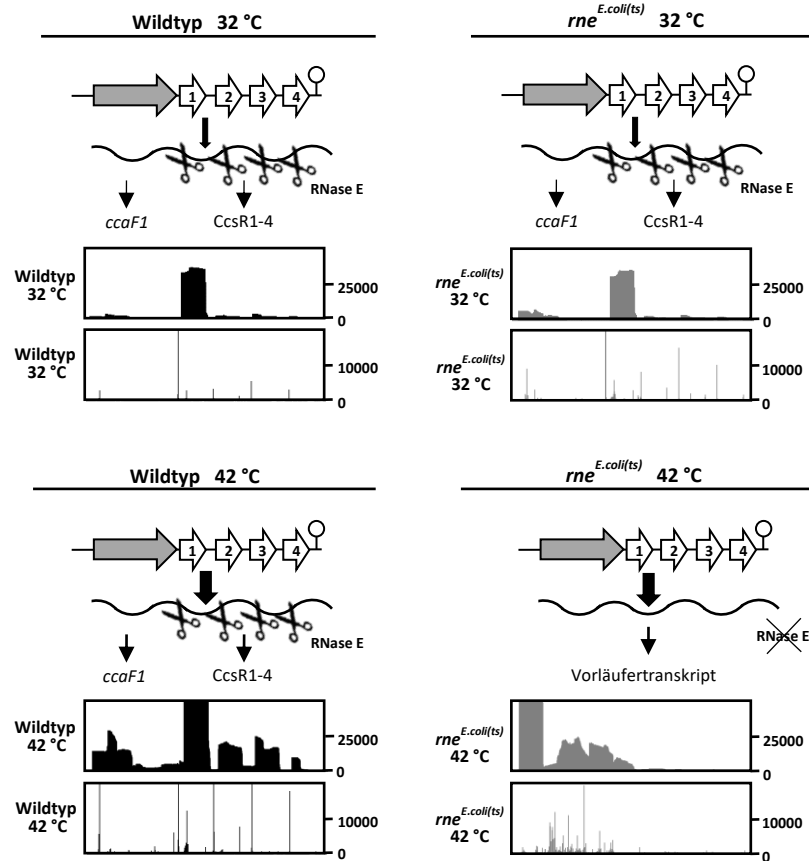


Abbildung Anhang 5: Read coverage Blot und 5' Enden des *ccaF1*-CcsR1-4 Operons in *R. sphaeroides* Wildtyp und der thermosensitiven RNase E Substitution unter normalen Bedingungen (32 °C) und Hitzestress (42 °C) (modifiziert nach Grützner *et al.*, 2021a).

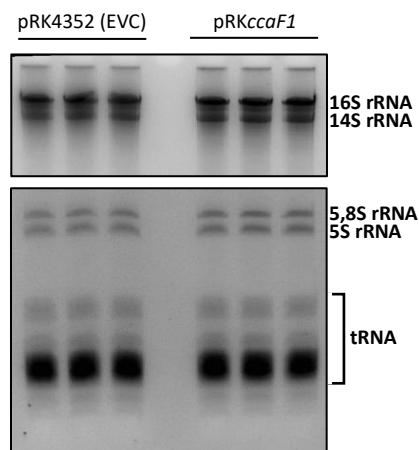


Abbildung Anhang 6: Die RNA-Qualität der Proben, die für die RNASeq-Analyse verwendet wurden, wurde mittels 10%igen denaturierenden TBE-Polyacrylamid-Harnstoffgel (mit Ethidiumbromid gefärbt) dargestellt. 1,5 µg Gesamt-RNA wurden auf dem Gel aufgetrennt.

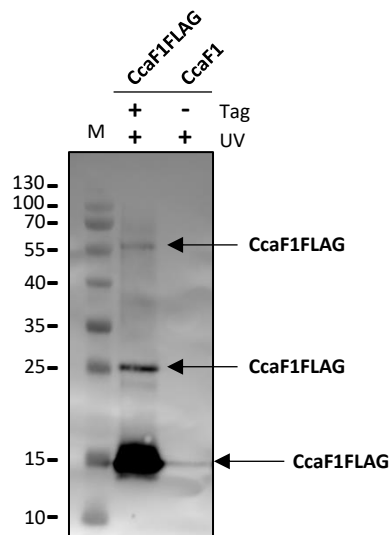


Abbildung Anhang 7: Co-Immunopräzipitation (CoIP) und Western Blot Analyse von CcaF1FLAG.

Für die CoIP wurde *R. sphaeroides* mit einer Plasmid-basierten Überexpression des Proteins CcaF1 mit und ohne FLAG-tag (pRKccaF1_FLAG-tag; pRKccaF1) in der exponentiellen Phase (mikroaerob und 32 °C) kultiviert. Die Zellen wurden aufgeschlossen und das Protein mit Dyna-Beads präzipitiert. Die Proben aus der CoIP wurden anschließend auf einem 12 %igen SDS-Gel aufgetrennt und mittels Western Blot Methode auf eine Membran übertragen. Das Protein CcaF1FLAG wurde mit spezifischen Anti-FLAG Antikörpern nachgewiesen.

9 Akademischer Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen Version der Arbeit entfernt.
The curriculum vitae was removed from the electronic version of the paper.

Publikationen:

Grützner, J., Billenkamp, F., Spanka, D.T., Rick, T., Monzon, V., Förstner, K.U., and Klug, G. (2021) The small DUF1127 protein CcaF1 from *Rhodobacter sphaeroides* is an RNA-binding protein involved in sRNA maturation and RNA turnover. *Nucleic Acids Res* **49** (6): 3003–3019

Grützner, J., Remes, B., Eisenhardt, K.M.H., Scheller, D., Kretz, J., Madhugiri, R., McIntosh, M., and Klug, G. (2021) sRNA-mediated RNA processing regulates bacterial cell division. *Nucleic Acids Res* **49** (12): 7035–7052

Eisenhardt, K.M.H., Remes, B., **Grützner, J.**, Spanka, D.-T., Jäger, A., and Klug, G. (2021) A Complex Network of Sigma Factors and sRNA StsR Regulates Stress Responses in *R. sphaeroides*. *Int J Mol Sci* **22** (14)

Wissenschaftliche Beiträge bei Konferenzen:

- | | |
|---------|--|
| 02/2018 | Vortrag - Role of small proteins in the stress response of Alphaproteobacteria; DFG Tagung Kiel |
| 04/2018 | Poster - The role of the small protein RSP_6037 in the oxidative stress response in <i>Rhodobacter sphaeroides</i> ; VAAM-Tagung Wolfsburg |
| 07/2018 | Poster - The role of the small protein RSP_6037 in the oxidative stress response in <i>Rhodobacter sphaeroides</i> ; Sensory and Regulatory RNAs in Prokaryotes Konferenz Gießen |

- 02/2019 Vortrag - The small DUF1127 protein RSP_6037 from *Rhodobacter sphaeroides* is a RNA-binding protein; DFG Tagung Sylt
- 04/2019 Poster - The small DUF1127 protein RSP_6037 from *Rhodobacter sphaeroides* is a RNA-binding protein; VAAM-Tagung Mainz
- 07/2019 Vortrag - The small DUF1127 protein RSP_6037 from *Rhodobacter sphaeroides* is a RNA-binding protein; Sensory and Regulatory RNAs in Prokaryots Konferenz Freiburg
- 11/2019 Poster - sRNA-mediated RNA processing regulates bacterial cell division; GRK2355 Konferenz Rauschholzhausen
- 03/2020 Vortrag - The small DUF1127 protein RSP_6037 from *Rhodobacter sphaeroides* is a RNA-binding protein; VAAM-Tagung Leipzig

10 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt in erster Linie Prof. Dr. Gabriele Klug für ihre Unterstützung und Vertrauen während meiner Doktorarbeit. Zugleich möchte ich mich bei ihr für die Ratschläge, Diskussionen und Hilfestellungen im Laboralltag, dem Schreiben von Manuskripten und meiner Doktorarbeit bedanken, wodurch ich viel für die Zukunft gelernt habe und mein Interesse an der Mikrobiologie stetig gewachsen ist. Außerdem gilt vor allem ein besonderer Dank an die montägliche Erinnerung der bereits verdrängten Eintracht-Niederlage des vergangenen Wochenendes! ;)

Des Weiteren möchte ich mich bei Prof. Dr. Roland K. Hartmann für die Begutachtung meiner Arbeit und den hilfreichen Diskussionen in den RTG-Meetings bedanken.

Auch bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Michael Niepmann und Prof. Dr. Reinhard Dammann für die Teilnahme an meiner Prüfungskommission.

Außerdem möchte ich mich für die Zusammenarbeit und Kooperation bei Prof. Dr. Konrad U. Förstner, Dr. Ramakanth Madhugiri und Dr. Oliver Roßbach bei den verschiedenen Projekten bedanken.

Ich möchte mich auch bei Apl. Prof. Dr. Elena Evguenieva-Hackenberg und Dr. Bork Berghoff für die hilfreichen Diskussionen und kritischen Beurteilungen meiner Arbeit bedanken.

Neben den Betreuern, Gutachtern und Kooperationspartnern möchte ich mich bei meinen Arbeitskollegen, Freunden und meiner kleinen L236 Familie bedanken.

Carina und Mathieu, von Anfang hatte ich sehr viel Spaß mit euch im Labor und konnte über alles mit euch lachen. Ihr hattet immer ein offenes Ohr für meine Probleme und eine kritische Beurteilung meiner Projekte. Es hat sehr viel Spaß mit euch in L236 gemacht. Vor allem eine Labor-Ehe mit dir Carina war unausweichlich, nachdem ich dich „abgeschleppt“ haben. Es waren schöne Ehe-Jahre mit dir an einer Bench. :)

Ein weiterer Dank gilt auch Robina, Meike, Hendrick, Tim, Janek und allen anderen Arbeitskollegen, die für jeden Spaß zu haben waren. Mit euch war nicht nur der Laboralltag lustig, sondern auch die Freizeit. Außerdem habt ihr jede VAAM-Konferenz unvergesslich gemacht. :)

Auch möchte ich mich bei Lennart, Bernhard, Katrin und Susann bedanken, die immer für eine kleine Diskussion über die Mikrobiologie und für ein paar Bierchen nach der Arbeit zu haben waren. :)

Und zu guter Letzt, DANKE an meine ganze Familie – besonders an mein Schatz Anika und meine Eltern – dafür, dass ihr immer für mich da seid!



van Goghs neuestes Meisterwerk
– „*Rhodobacter sphaeroides*“ –