

Die CcsR sRNAs in
Rhodobacter sphaeroides 2.4.1 und
anderen Alphaproteobakterien

Dissertation:

Fabian Billenkamp

Betreuerin:

Prof. Dr. Gabriele Klug



„Wenn ein unordentlicher Schreibtisch einen unordentlichen Geist repräsentiert, was sagt dann ein leerer Schreibtisch über den Menschen, der ihn benutzt aus?“

Albert Einstein

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis	1
2	Einleitung	5
2.1	Stress	5
2.1.1	Oxidativer Stress	
2.1.2	Hitzestress	
2.1.3	Stress in Verbindung mit verschiedenen Metallen und Salz	
2.1.4	Stress in Verbindung mit anderen Bakterien und organischen Substanzen	
2.2	Regulation von Genexpression in Bakterien	13
2.2.1	Alternative Sigmafaktoren	
2.2.2	Transkriptionsregulation durch DNA-Bindeproteine	
2.2.3	Regulation durch RNA	
2.2.4	Verschiedene Regulationsmechanismen bilden Regulationsnetzwerke	
2.3	Die Alphaproteobakterien	24
2.3.1	Der Modellorganismus <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	
2.3.2	Die Konservierung von sRNAs in verschiedenen Alphaproteobakterien	
2.4	Zielsetzung dieser Arbeit	34
3	Ergebnisse	35
3.1	Bioinformatische Analyse von CcsR Loci aus verschiedenen Alphaproteobakterien	35
3.1.1	CcsR-Homologe sind in verschiedenen Alphaproteobakterien zu finden und können in drei verschiedene Typen eingeteilt werden	
3.1.2	CcsR RNAs sind charakterisiert durch eine konservierte Struktur aus 2 Stammschleifen und durch 2 konservierte CCUCCUCCC-Motive	
3.1.3	CcaF weist eine Homologie zu einem RNA Bindeprotein aus <i>Drosophila</i> auf	
3.2	Die Expression der CcsR RNAs wird durch Stress gesteuert	42
3.2.1	CcsR1-4 können differentiell detektiert werden und weisen andere Größen auf als in der Literatur beschrieben	
3.2.2	CcsR1-4 in <i>R. sphaeroides</i> 2.4.1 werden unter verschiedenen Stressbedingungen und in der stationären Wachstumsphase exprimiert	
3.2.3	CcsR RNAs verschiedener Alphaproteobakterien werden unter Stressbedingungen exprimiert	
3.3	Bestimmung von möglichen Interaktionspartnern der CcsR RNAs	48
3.3.1	Eine differentielle RNA-Sequenzierung legt interne Transkriptionsstarts innerhalb des <i>ccaf1</i> -CcsR Locus nahe	
3.3.2	Bestimmung möglicher PrrA Bindemotive innerhalb des <i>ccaf1</i> -CcsR Locus	
3.3.3	Ermittlung von beteiligten Faktoren in Reifung und Funktion von CcsR1-4	
3.3.4	CcaF1 beeinflusst die sRNAs CcsR1-4 in <i>R. sphaeroides</i> 2.4.1 und eine direkte Interaktion mit den CcsR RNAs ist denkbar	

3.4	Mögliche Funktionen der CcsR-RNAs innerhalb der zellulären Regulation	58
3.4.1	Ermittlung potentieller CcsR1-4 <i>Targets</i> in <i>R. sphaeroides</i> 2.4.1	
3.4.2	Bestätigung potentieller CcsR1-4 Zielgene	
3.4.3	Charakterisierung einer FlhR Deletionsmutante mit Hinblick auf CcsR1-4	
3.4.4	Analyse potentieller CcsR Interaktionen mit mRNAs mit Hinblick auf eine potentielle Konservierung	
4	Diskussion	94
4.1	Analyse der RpoH _I /RpoH _{II} abhängigen Expression und RNase E-abhängigen Prozessierung der CcsR-RNAs aus <i>R. sphaeroides</i> 2.4.1	95
4.2	CcsR1-4 interagieren in <i>R. sphaeroides</i> mit der <i>flhR</i> -mRNA	96
4.3	Eine Konservierung der FlhR-Regulation durch die CcsR-RNAs ist nur eingeschränkt zu beobachten	98
4.4	Mögliche Interaktionspartner und Funktionen der CcsR-RNAs über die Regulation von FlhR hinaus	99
4.5	Die Funktion der CcsR RNAs in der Regulation von zellulären Prozessen in <i>R. sphaeroides</i> und Implikationen für andere Alphaproteobakterien	101
4.5.1	Die Funktion der CcsR-RNAs unter aeroben Bedingungen	
4.5.2	Eine mögliche Funktion der CcsR-RNAs unter anaeroben Bedingungen	
4.5.3	Die CcsR RNAs in der stationären Wachstumsphase und abschließende Implikationen für eine Funktion unter natürlichen Wachstumsbedingungen	
5	Zusammenfassung	115
6	Methoden	116
6.1	Mikrobiologische Methoden	116
6.1.1	Kultivierung verschiedener Bakterienstämme	
6.1.2	Dauerkultur von Bakterienstämmen	
6.1.3	Bestimmung der optischen Dichte von Bakterienkulturen	
6.1.4	Stress- und Wachstumsexperimente	
6.1.5	Elektrotransformation von <i>E. coli</i>	
6.1.6	Plasmidübertragung nach <i>R. sphaeroides</i> durch Konjugation	
6.2	Biochemische und Molekularbiologische Methoden	125
6.2.1	Isolierung, Synthese, Aufreinigung und Markierung von Nukleinsäuren	
6.2.2	Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	
6.2.3	PCR-basierte Methoden	
6.2.4	RNA- <i>Electrophoretic mobility shift assay</i> (EMSA)	
6.2.5	Messungen von enzymatischen Reaktionen	
6.3	Molekulargenetische Methoden	135
6.3.1	Erstellen einer <i>flhR</i> -Deletionsmutante	
6.3.2	Erstellen von plasmidbasierten Überexpressionsstämmen	

6.3.3	Erstellen von Reporterplasmiden für ein <i>lacZ</i> basiertes Reportersystem zur Analyse von sRNA Interaktionen	
6.4	Transkriptom- und Proteomanalysen	137
6.5	Bioinformatische Methoden	139
6.5.1	Vorhersage von CcsR1 Homologen in anderen Alphaproteobakterien	
6.5.2	Berechnung phylogenetischer Stammbäume	
6.5.3	RNA-Faltungsvorhersagen	
6.5.4	Proteinfaltungsvorhersagen	
6.5.5	Darstellung von CcsR1 und CcaF1 aus <i>R. sphaeroides</i> 2.4.1 in einem Modell	
6.5.6	Sequenzmultialignments	
6.5.7	Erstellen von Sequenz- Weblogos	
6.5.8	RNA-RNA-Interaktionsvorhersagen	
7	Materialien	149
7.1	Alphabetische Chemikalienliste	149
7.2	Geräte und sonstige Materialien	153
7.3	Molekularbiologische Kits & Enzyme	153
7.4	Nährmedien	154
7.4.1	Rhodobacter-Äpfelsäure-Medium (RÄ-Medium)	
7.4.2	Roseobacter Marin Medium (<i>RD1-Medium</i>)	
7.4.3	Standard-I-Medium	
7.4.4	GMX-Medium	
7.4.5	PY-Medium	
7.5	Antibiotika	157
7.6	Oligonukleotide	158
7.7	Plasmide	161
7.8	Bakterienstämme	162
7.9	Bioinformatische Ressourcen	163
8	Literatur	164
9	Anhang	179
9.1	Abbildungen	179
9.2	Tabellen	180
9.3	Sequenzen	188
9.4	Quellcode	189
9.5	Abkürzungen	191
9.6	Abbildungsverzeichnis	193
9.6.1	Einleitung	
9.6.2	Ergebnisse	

9.6.3	Diskussion	
9.6.4	Anhang	
9.7	Erklärung	197
9.8	Danksagung	Fehler! Textmarke nicht definiert.
9.9	Laborprotokolle	198
9.9.1	„Hot-Phenol“ RNA Isolation aus Bakterien	
9.9.2	RNA-Isolation mit dem TRIR™-Kit (ABgene)	
9.9.3	Verdau von DNA Kontaminationen in RNA-Proben	
9.9.4	Isolation chromosomaler DNA aus Bakterien (CTAB-Methode)	
9.9.5	<i>in vitro</i> Transkription	
9.9.6	Plasmid-Minipräparation nach dem Prinzip der alkalischen Lyse	
9.9.7	Extraktion von DNA aus Agarosegelen über eine Glaswollematrix	
9.9.8	Extraktion von RNA aus Acrylamidgelen	
9.9.9	Radioaktive Markierung von Oligonukleotidsonden mit γ -ATP ³² unter Nutzung der T4-Polynukleotidkinase	
9.9.10	<i>in vitro</i> Transkription mit α -UTP ³² zur Herstellung markierten Transkripten	
9.9.11	Polyacrylamid -Gele für sRNAs	
9.9.12	Transfer von RNA aus einem Polyacrylamid-Harnstoff-Gel auf eine Nylon-Membran	
9.9.13	Northern Blot Hybridisierung basierend auf einem salinen Natriumcitratpuffersystem für Oligonukleotidsonden ~20 nt	
9.9.14	Northern Blot Hybridisierung basierend auf dem Phosphatpuffersystem nach Church and Gilbert	
9.9.15	Allgemeine PCR-Beschreibungen	
9.9.16	Gerichtete Mutagenese von Plasmiden mittels PCR	

2 Einleitung

Bakterien können in den verschiedensten gemäßigten und extremen Habitaten nachgewiesen werden (z.B. Kim *et al.* 2012; Stres *et al.* 2013; Suhiko *et al.* 2005). Hierbei sind verschiedene Bakterien unterschiedlich gut an verschiedenartige Habitate angepasst. So gibt es Bakterien, die an das Leben in unterschiedlichen Habitaten angepasst sind, aber auch Spezialisten für extreme Habitate. Gebunden an die verschiedenen Habitate erfolgen Anpassungen an Umweltparameter wie die Umgebungstemperatur, die Salz- und Sauerstoffkonzentration in der Umgebung oder an Licht (Koga 2012; Oren 2013; Nakano & Hulett 1997; Kehoe 2010). Um solche Anpassungen zu realisieren, wird die Umgebung mittels verschiedener membrangebundener und intrazellulärer Sensoren analysiert (Taabazuing *et al.* 2014; Schumann 2012; Dubbs & Mongkolsuk 2012). Kommt es zu Änderungen in der Umgebung, führt dies häufig zu Änderungen in einem Netzwerk aus verschiedenen Signaltransduktionskaskaden, wodurch die Expression von spezifischen Genen gesteuert wird (Guariglia-Oropeza *et al.* 2014).

2.1 Stress

In Verbindung mit der Anpassung an unterschiedliche Habitate haben Bakterien Toleranzbereiche für viele verschiedene Umweltparameter entwickelt. Weicht einer dieser Parameter vom bevorzugten Bereich ab, so liegt Stress vor. Häufig folgt einer bestimmten Art von Stress eine Schädigung von spezifischen Zellbestandteilen. Deshalb werden Abwehrmechanismen benötigt, die unter Stressbedingungen gezielt eine weitere Schädigung unterbinden und entstandene Schäden beheben.

2.1.1 Oxidativer Stress

Molekularer Sauerstoff (O_2) stellt als essentieller terminaler Elektronenakzeptor der aeroben Respiration die Grundlage für den Metabolismus vieler Bakterien dar und weist einen relativ reaktionsträgen Grundzustand auf. Dieser träge Triplett-Grundzustand des Sauerstoffs kann durch auf den Sauerstoff übertragene Elektronen aus der Elektronentransportkette geändert werden. Hierbei entsteht Superoxid ($O_2^{\cdot-}$) und in der Folge werden weitere reaktive Sauerstoffspezies (ROS = reactive oxygen species) gebildet. Zusätzlich kann eine fehlgeleitete Excitonen-Übertragung von angeregten Pigmenten auf Triplett-Sauerstoff zu einer *spin*-Umkehr eines der Valenzelektronen führen, wobei Singulett-Sauerstoff entsteht (Ziegelhoffer & Donohue 2009; siehe Abb.1).

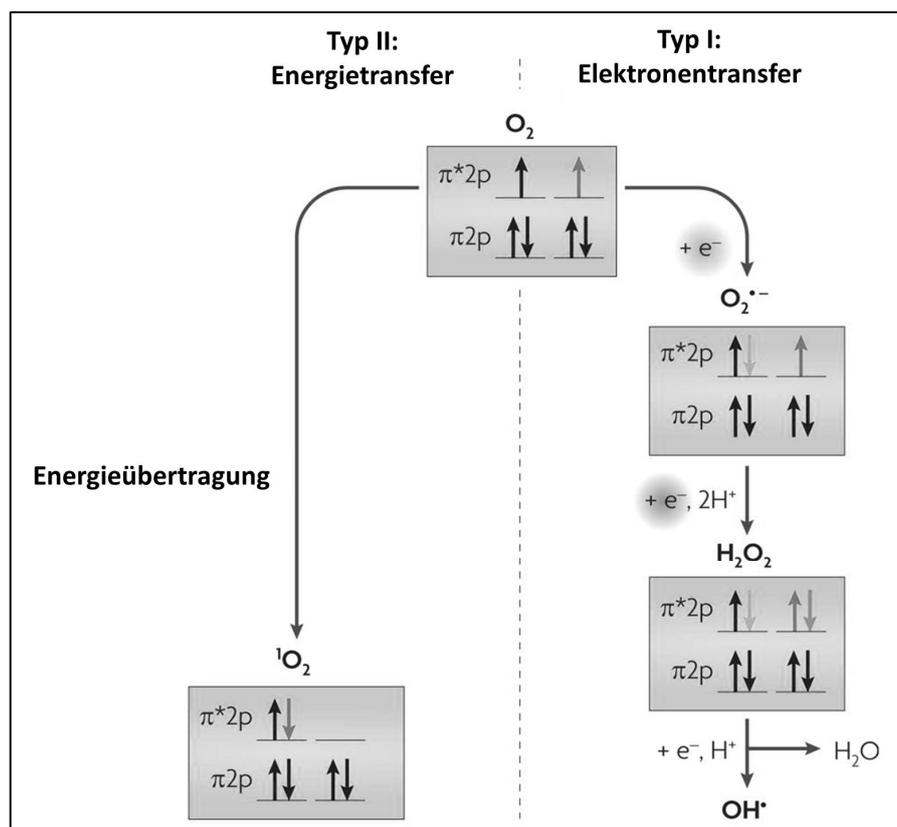


Abbildung 1: Die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies. Reaktive Sauerstoffspezies können einerseits durch Elektronenübertragung auf Sauerstoff in seinem reaktionsträgen Triplett-Grundzustand gebildet werden. Durch verschiedene Elektronenübertragungsprozesse entstehen hierbei Superoxid ($O_2^{\cdot-}$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Hydroxylradikale (OH^{\cdot}). Auf der anderen Seite kann durch Energieübertragung auf Triplett-Sauerstoff eine *spin*-Umkehr für eines der Elektronen des π^* -Orbitals bewirkt werden, die zur Entstehung des reaktiven Singulett-Sauerstoffs (1O_2) führt (modifiziert nach Ziegelhoffer & Donohue 2009).

Die verschiedenen ROS können in der Zelle schwere Schäden verursachen. Für aerobe Lebewesen ist O_2 somit lebensnotwendig und toxisch zugleich (Davies 1995). Als oxidativen Stress bezeichnet man ein Übergewicht von Prooxidantien, die eine Bildung von ROS begünstigen gegenüber den Antioxidantien, die für die Entgiftung der reaktiven Sauerstoffspezies zuständig sind und durch ROS verursachte Schäden beseitigen (Zheng & Storz 2000). Eine primäre Quelle für die Entstehung von ROS stellt der Elektronentransport der Atmungskette dar, bei der Superoxid und Wasserstoffperoxid durch fehlgeleiteten Elektronentransfer entstehen (Messner & Imlay 1999). Das Superoxidradikal kann durch die Aufnahme eines zusätzlichen Elektrons in das π^* -Orbital aus O_2 entstehen. Eine Interaktion des Superoxidradikals mit biologischen Molekülen findet nur in einem geringen Umfang statt. Allerdings stellt das Superoxidradikal eine Vorstufe anderer wesentlich toxischerer ROS dar. Wasserstoffperoxid ist eine weitere reaktive Sauerstoffspezies, die durch Oxidation von Thiol-Gruppen dazu führen kann, dass Enzyme inaktiviert werden (Storz & Imlay 1999). Jedoch gilt, dass auch Wasserstoffperoxid seine hauptsächlich schädliche Wirkung als Vorstufe einer wesentlich toxischeren ROS entfaltet. Im Zusammenhang mit der Bildung des besonders reaktiven Hydroxylradikals aus Wasserstoffperoxid spielen niedervalente Metallionen eine tragende Rolle. Insbesondere Eisen dient hierbei als Katalysator, was in der Fenton-Reaktion dargestellt ist, es können aber auch andere niedervalente Metalle die Reaktion katalysieren, was in der Haber-Weiss Reaktion verdeutlicht ist (siehe Abb. 2). Hydroxylradikale haben die Eigenschaft in biologischen Systemen mit nahezu allen Makromolekülen unspezifisch zu reagieren und weisen eine Halbwertszeit von etwa 10^{-10} Sekunden auf (Gutteridge 1994; Acworth *et al.* 1999). Hieraus resultiert, dass die Reaktionen mit Molekülen in biologischen Systemen relativ nah am Entstehungsort der Hydroxylradikale stattfinden müssen (Imlay 2003).

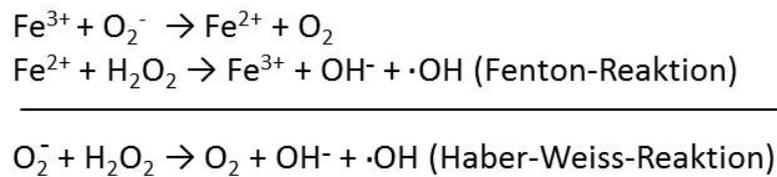


Abbildung 2: Die Entstehung von Hydroxylradikalen aus Superoxidradikalen und Wasserstoffperoxid, wie in der Haber-Weiss-Reaktion beschrieben ist angewiesen auf Eisenionen als Katalysator, wobei aus Superoxidradikalen Wasserstoffperoxid und hochreaktive Hydroxylradikale gebildet werden.

Typische Schäden durch Hydroxylradikale sind insbesondere an DNA-Molekülen zu erkennen, jedoch sind sie nicht auf diese beschränkt. So können Einzel- und Doppelstrangbrüche der DNA, Modifikationen der Nukleotide und Basen, Quervernetzungen von DNA und Proteinen, sowie Fragmentierungen des Zucker-Phosphat-Gerüsts durch Hydroxylradikale verursacht werden (Fang 2004; Bennett 2001; Lushchak 2001; Gracy *et al.* 1999; Halliwell & Aruoma 1991). Diese besonders ausgeprägte Schädigung der DNA-Moleküle ist unter anderem begründet in der hohen Anzahl von Eisenionen am negativ geladenen Phosphatrückgrat der DNA, die die Fenton-Reaktion begünstigen. Weitere durch ROS begünstigte Schädigungen der Zelle liegen in der Oxidation aromatischer Aminosäuren und in der Oxidation von ungesättigten Fettsäuren der Membranlipide, was sogar zum Verlust der Membraneigenschaften führen kann (Davies 2005; Lushchak 2001). Eine weitere reaktive Sauerstoffspezies stellt Singulett-Sauerstoff dar, welcher sowohl an natürlichen *Photosensitizern* wie Bacteriochlorophyll, als auch an künstlichen *Photosensitizern* wie Metylenblau gebildet werden kann (Briviba *et al.* 1997). Singulett-Sauerstoff hat die Fähigkeit, Peptid- und Phosphodiesterbindungen zu spalten, Aminosäuren und Nukleoside zu schädigen, ungesättigte Fettsäuren zu oxidieren, sowie andere Zellkomponenten zu schädigen und wirkt auf sein Hauptziel, die Proteine, unter Entstehung verschiedener Peroxide, die dann selbst weitere Schäden verursachen (Davies 2004). Neben diesen schädigenden Eigenschaften fördert Singulett-Sauerstoff

die Bildung anderer ROS. Um die Bildung von ROS zu unterbinden und Schäden durch ROS einzuschränken, bedienen sich Bakterien einer Vielzahl von Mechanismen. Hierbei werden Glutathion- und Thioredoxin genutzt, um ROS zu *quenchen* und oxidierte Proteine in einer NADPH-abhängigen Weise zu reduzieren (Prinz *et al.* 1997; siehe Abb. 3). Die Bildung von Singulett-Sauerstoff wird unterbunden, indem Carotinoide mit dem Photosyntheseapparat gekoppelt werden, um angeregtes Bakteriochlorophyll zu *quenchen* (Cogdell *et al.* 2000; Griffiths *et al.* 1955; Borland *et al.* 1988).

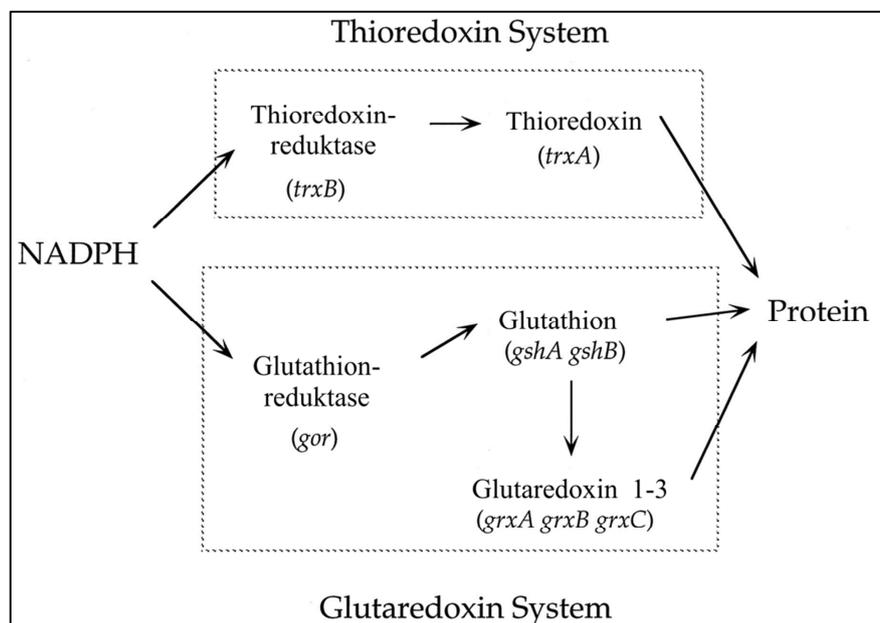


Abbildung 3: Thioredoxin System und Glutaredoxin System am Beispiel von *E. coli*: Die NADPH abhängigen Reduktasen TrxB und Gor reduzieren Thioredoxin und Glutathion. Beide Moleküle können direkt zum Reduzieren oxidierter Disulfidbrücken an wichtigen Cysteinen innerhalb von Proteinen genutzt werden. Zusätzlich dient Glutathion um Glutaredoxine zu reduzieren, die ebenfalls dazu dienen Disulfidbrücken zu reduzieren (modifiziert nach Prinz *et al.* 1997).

Neben dieser Unterbindung der ROS-Bildung und der Reduktion oxidierter Verbindungen, können verschiedene ROS auch aktiv enzymatisch abgebaut werden. So wird Wasserstoffperoxid häufig durch Katalasen abgebaut, während Superoxid durch die Superoxiddismutase entgiftet wird (Hasset & Cohen 1989). Zusätzlich wird unter oxidativen Stressbedingungen eine Vielzahl von Genen reguliert um einerseits die oxidative Stressantwort zu induzieren und andererseits primäre Quellen der ROS-Bildung zu inhibieren.

2.1.2 Hitzestress

Bei Hitzestress liegen Temperaturen oberhalb des Temperaturoptimums für einen Organismus vor. Hierbei kann die Grenze für Hitzestress zwischen unterschiedlichen Organismen stark variieren. Generell steigt bei erhöhten Temperaturen die Membranfluidität der Zellmembran, wodurch die Stabilität gesenkt wird (Koga 2012). Zusätzlich wird die Chance einer Fehlfaltung von Proteinen erhöht und der Zerfall von ATP beschleunigt (King *et al.* 1996; Lee & Colston 1985). Um eine ausreichende Stabilität der Zellmembran bei erhöhten Temperaturen zu gewährleisten, können Bakterien Anpassungen ihrer Zellmembran vornehmen, indem sie langkettige gesättigte Fettsäuren in die Membran einlagern, während bei niedrigeren Temperaturen kurze verzweigtkettige Fettsäuren vermehrt vorliegen (Sinensky 1974; Keweloh *et al.* 1991; Cronan *et al.* 1972). Schäden durch Aggregate aus fehlgefalteten Proteinen werden durch eine Vielzahl unterschiedlicher Hitzeschockproteine vermieden, die sich beispielsweise an fehlgefaltete Proteine anlagern, um sie in einem faltungskompetenten Zustand zu halten oder unter ATP Verbrauch erneute Faltungen der Proteine ermöglichen (Laskowska *et al.* 2010; Walter & Buchner 2002). Zusätzlich werden fehlgefaltete Proteine durch Proteasen spezifisch abgebaut (Truscott *et al.* 2011). Neben den direkten Schäden führt eine erhöhte Umgebungstemperatur auch zu einer Beschleunigung von biochemischen Prozessen, wodurch verschiedene biochemische Reaktionen des Metabolismus beschleunigt ablaufen können. In diesem förderlichen Effekt eines Temperaturanstiegs liegt allerdings auch die potentielle Gefahr einer Störung des zellulären Gleichgewichts. Deshalb ist es wichtig, dass die Steuerung der Hitzestressantwort fein reguliert ist und eine genaue Regulation der Expression verschiedener Hitzeschutzfaktoren und Enzyme erfolgt.

2.1.3 Stress in Verbindung mit verschiedenen Metallen und Salz

Wie bereits beschrieben, katalysieren niedervalente Metallionen die Haber-Weiss-Reaktion und können somit im Überschuss zu einer verstärkten Bildung besonders schädlicher ROS führen (siehe auch Abb. 2 und Abschnitt 2.1.1). Darüber hinaus stellen Metalle essentielle Co-Faktoren in vielen bakteriellen Proteinen dar (Barnett *et al.* 2012). Unter diesen Metallen spielt Eisen eine besonders wichtige Rolle, da es für Eisen-Schwefel Zentren in vielen Proteinen der Atmungskette essentiell ist. Zusätzlich ist Eisen als Co-Faktor für Proteine notwendig, die in der Entgiftung von ROS eine wichtige Rolle spielen. Um einerseits eine ausreichende Versorgung mit Eisen zu gewährleisten und andererseits einen Überschuss an Eisen, der die Fentonreaktion (siehe Abb. 2) und somit ROS-Bildung katalysiert zu vermeiden, haben Bakterien effektive und fein regulierte Mechanismen entwickelt um Eisen in die Zelle zu schleusen (Klebba *et al.* 2012; Carpenter & Payne 2014). Neben Eisen spielen insbesondere verschiedene Schwermetalle wie Cadmium oder Zink eine wichtige Rolle für Bakterien, da sie in nanomolaren Konzentrationen als Spurenelemente essentiell sind, jedoch bereits im mikromolaren Bereich cytotoxische Effekte zeigen (Nies 1992). Hierbei konnten Zellschädigungen im Zusammenhang mit oxidativen Stress nachgewiesen werden und es konnte gezeigt werden, dass die Sigma E abhängige photooxidative Stressantwort von *Caulobacter crescentus* auch durch Cadmium induziert wird (Lourenço & Gomes 2009). Neben Metallen spielen auch anorganische Salze eine wichtige Rolle für Bakterien, da sie ein osmotisches Potential besitzen und entsprechend ein Ausgleich zwischen den in der Zelle vorhandenen gelösten Salzen mit dem umgebenden Medium stattfinden muss, um die Zelle lebensfähig zu halten (Sleator & Hill 2002). Zusätzlich spielen Natriumionen eine zentrale Bedeutung beim Transport von verschiedenen

Stoffen über die Zellmembran und dienen als Austauschionen für die Bildung eines Elektronengradienten über die Zellmembran (Steffen & Steuber 2013).

2.1.4 Stress in Verbindung mit anderen Bakterien und organischen Substanzen

Neben den verschieden beschriebenen abiotischen Stressfaktoren spielen auch verschiedene biologische Faktoren wichtige Rollen in Bezug auf Stress für Bakterien. So kann ein erhöhter Gehalt an gelöstem pigmentierten organischen Material in einem Gewässer dazu führen, dass im Zusammenspiel mit Licht verstärkt ROS an aromatischen Verbindungen wie Huminsäuren gebildet werden (Zhang *et al.* 2014). Des Weiteren kann organisches Material häufig von verschiedenen Organismen verwertet werden, wobei viele verschiedene Stoffwechselprodukte gebildet werden. Hierbei tritt einerseits eine Konkurrenzsituation zwischen den verschiedenen Organismen auf, andererseits kommt es zu einer Konfrontation mit verschiedenen verwertbaren, aber unter Umständen auch toxischen Stoffwechselprodukten (Stams *et al.* 2003). Um andere Bakterien zu detektieren und mit potentiellen Wirtsorganismen und anderen Bakterien zu interagieren, besitzen viele Bakterien ein *Quorum sensing* System. Hierbei werden die Zusammensetzung und Dichte der bakteriellen Gemeinschaft in der Umgebung über spezifische sekretierte Botenstoffe detektiert, die teilweise von Wirtsorganismen imitiert werden (Lowrey *et al.* 2008). Es konnte auch gezeigt werden, dass *Quorum sensing* Moleküle gleichzeitig zur Kommunikation innerhalb einer Bakterienspezies und als Toxin gegen andere Bakterien dienen können (Kumar & Engelberg-Kulka 2014).

2.2 Regulation von Genexpression in Bakterien

Durch den beschriebenen beständigen Wechsel von verschiedenen Umwelteinflüssen müssen Bakterien sich beständig anpassen, um einerseits eine maximale Nutzung der vorhandenen Ressourcen zu gewährleisten und andererseits auf verschiedene Stressbedingungen zu reagieren. Hierfür steuern Bakterien auf verschiedenen Ebenen die Expression ihrer Gene. Es werden Gene für benötigte Proteine aktiviert und Gene für nicht benötigte Proteine reprimiert. Unter anderem wird die Transkription von Genen über verschiedene alternative Sigmafaktoren (siehe 2.2.1) und Transkriptionsfaktoren (siehe 2.2.2) gesteuert, um die Abundanz der entsprechenden mRNAs zu beeinflussen. Zusätzlich wird die Abundanz und Translation einer mRNA durch intrinsische Eigenschaften beeinflusst, die einerseits die Stabilität der mRNA beeinflussen und auf der anderen Seite die Translation der mRNA regulieren können (siehe 2.2.3). Auch spielen kleine, nicht Protein-codierende RNAs (sRNAs = *small RNAs*), die an mRNAs oder Proteine binden und so die Expression oder Aktivität regulieren, eine wichtige Rolle (siehe 2.2.3). Insgesamt ergibt sich das Bild einer fein justierten Genregulation, die eine Steuerung auf verschiedenen Ebenen ermöglicht und auch eine Vernetzung verschiedener Signalwege ermöglicht (siehe 2.2.4).

2.2.1 Alternative Sigmafaktoren

Sigmafaktoren sind als Untereinheit der RNA-Polymerase in Bakterien verantwortlich für die Erkennung spezifischer Sequenzen im Promotor eines Gens. Sie helfen beim Aufschmelzen des DNA-Doppelstrangs und ermöglichen so den Transkriptionsstart, nach welchem sie von der RNA-Polymerase abfallen (Helmann & Chamberlin 1988; Morett & Segovia 1993; Kazmierczak *et al.* 2005). Typischerweise ist einem Sigmafaktor ein Satz verschiedener Gene zugeordnet, die im Regelfall einen funktionellen Zusammenhang besitzen (Pátek & Nešvera 2011). Die Expression alternativer

Sigmafaktoren ist in der Regel über verschiedene Signaltransduktionswege gesteuert, wodurch Aktivität unter spezifischen Bedingungen gewährleistet ist (Mascher 2013). Häufig ist die Aktivität eines alternativen Sigmafaktors zusätzlich durch einen Antisigmafaktor reguliert, der den Sigmafaktor bindet und eine Bindung an die RNA-Polymerase verhindert. Häufig werden diese Antisigmafaktoren durch spezifische Anti-Antisigmafaktoren reguliert. Unter spezifischen Bedingungen erfolgt eine Abspaltung des Antisigmafaktors vom Sigmafaktor und eine Bindung des Sigmafaktors an die RNA-Polymerase wird ermöglicht (Campbell *et al.* 2008). Im Normalfall ist ein *house keeping* Sigmafaktor an die RNA Polymerase gebunden, der die Promotorsequenzen von Genen erkennt, deren Produkte von der Zelle unter regulären Wachstumsbedingungen benötigt werden (Typas *et al.* 2007). Werden zum Beispiel durch Stress alternative Sigmafaktoren exprimiert oder von ihren Antisigmafaktoren abgespalten, so wird eine Teilpopulation der RNA-Polymerase Moleküle mit den alternativen Sigmafaktoren besetzt. Hierdurch kann diese Teilpopulation der RNA-Polymerase Moleküle an neue, dem alternativen Sigmafaktor zugeordnete Gene binden (Landini *et al.* 2014; Potvin *et al.* 2008). Durch eine präzise Steuerung der Anzahl freigesetzter alternativer Sigmafaktoren kann so eine dynamische Steuerung der Transkription erreicht werden. Hierbei kann zum Beispiel die spezifische Expression von Genen einer Stressantwort gesteuert werden.

2.2.2 Transkriptionsregulation durch DNA-Bindeproteine

Um eine feinere Steuerung der Transkription zu erreichen und eine spezifische differentielle Expression vieler verschiedener Gene mit einer limitierten Anzahl an Sigmafaktoren zu erreichen, bedienen sich Bakterien verschiedener Transkriptionsaktivatoren und –repressoren. Diese DNA-Bindeproteine verhindern entweder durch Bindung an spezifische DNA-Basenmotive die Transkription eines Gens

oder sie sorgen dafür, dass der Promotor eines Gens besser zugänglich wird für die RNA-Polymerase, was die Transkriptionsaktivität des Gens erhöht (Klier *et al.* 1992). Ähnlich wie die alternativen Sigmafaktoren, unterliegen die Transkriptionsregulatoren einer strikten Regulation. So spielen in den meisten Bakterien Transkriptionsregulatoren aus der Fur-Superfamilie (*Ferric uptake regulation protein*) eine Rolle in der Steuerung des Eisenhaushalts und des Zinkhaushalts und binden spezifische DNA Sequenzen in Abhängigkeit von einem Metallliganden (Fillat 2014). Des Weiteren sind Transkriptionsfaktoren an der Antwort auf oxidativen Stress beteiligt und erfüllen Funktionen in vielen weiteren zellulären Prozessen wie dem *Quorum sensing* (Dubbs & Mongkolsuk 2012; Patel *et al.* 2013).

2.2.3 Regulation durch RNA

Neben der Regulation der Transkription durch Sigma- und Transkriptionsfaktoren spielt die posttranskriptionelle Regulation von mRNAs eine entscheidende Rolle in der Expression von Genen. Hierbei sind einerseits Eigenschaften der mRNA selbst und andererseits Interaktionen mit anderen RNAs, sowie verschiedenen RNasen und RNA-Bindeproteinen von zentraler Bedeutung.

Kontrolle von mRNA-Stabilität und -Translation durch Elemente innerhalb der mRNA

Neben der Transkriptionsrate einer mRNA spielen die Halbwertszeit der mRNA und die Translationsrate tragende Rollen für die Abundanz des gebildeten Proteins in der Zelle.

RNA Stabilität

Die Stabilität einer mRNA in Bakterien wird maßgeblich durch RNA-spaltende und RNA-hydrolysierende Enzyme, die sogenannten RNasen (RNasen = Ribonukleasen), sowie durch die Struktur und Sequenz der mRNA bestimmt. Die daraus resultierende Halbwertszeit einer mRNA beträgt in Bakterien im Durchschnitt wenige Minuten (Rauhut

& Klug 1999). Hierbei durchläuft eine typische polycistronische bakterielle mRNA nach der Transkription verschiedene Reifungsschritte bis zur Translation und zum Abbau. Im Modellorganismus *E. coli* spielt hierfür insbesondere das Degradosom als Multiproteinkomplex aus RNA-prozessierenden und abbauenden Enzymen eine zentrale Rolle. Das Degradosom ist in diesem Zusammenhang an der mRNA Qualitätskontrolle, der Spaltung und Prozessierung von mRNA-Vorläufern und dem gezielten Abbau von mRNAs beteiligt (Górna *et al.* 2012). Der grundlegende Aufbau des *E. coli* Degradosoms besteht aus RNase E, PNPase, der Helikase Rhlb und Enolase, jedoch sind große Unterschiede im Aufbau verschiedener Degradosom-ähnlicher Proteinkomplexe innerhalb der Proteobakterien bekannt (Carpousis 2007). Neben Organismen mit einem Degradosom oder einem Degradosom-ähnlichen Proteinkomplex sind auch Organismen, wie *Bacillus subtilis* bekannt, die ihren RNA Metabolismus ohne die im Degradosom essentielle RNase E aufrechterhalten (Bechhofer 2009). Zusätzlich zu RNase E sind noch viele weitere RNasen und RNA bindende Proteine an der Prozessierung, Reifung und am Abbau der verschiedenen RNAs in Bakterien beteiligt (Arraiano *et al.* 2013). Zusammen mit den verschiedenen Proteinen, die am RNA-Metabolismus beteiligt sind, beeinflussen verschiedene Eigenschaften der RNAs ihre eigene Stabilität. Je nach Position innerhalb einer RNA kann eine Stammschleifenstruktur stabilisierenden Einfluss auf die RNA ausüben oder als Rekrutierungsstelle für eine RNase dienen (Rauhut & Klug 1999). Nicht nur im Zusammenhang mit der Ausbildung von verschiedenen Sekundärstrukturen in RNAs hat die Basenkomposition selbst einen wichtigen Einfluss auf die Stabilität. Genauso wie Sekundärstrukturen in spezifischen Regionen einer RNA der Rekrutierung oder dem Schutz vor RNasen dienen, werden auch spezifische RNA-Sequenzen durch RNasen erkannt (Rauhut & Klug 1999). Für die Stabilität einer mRNA spielen also, wie

beschrieben, Sequenz und Struktur im Zusammenhang mit RNAsen zentrale Rollen. So kann basierend auf diesen Parametern die Halbwertszeit einer mRNA in der Zelle stark variieren und es können sogar verschiedene Untereinheiten eines polycistronischen Transkripts differentiell reguliert werden (Klug 1993).

Riboswitches

Neben dem Einfluss auf die Stabilität einer mRNA kann durch verschiedene Sekundärstrukturen in einer mRNA auch die Expression des zugehörigen Gens beeinflusst werden. So wird die Transkriptionstermination einiger mRNAs von spezifischen Liganden-bindenden RNA-Strukturen gesteuert, wie für das Tryptophan-Operon beschrieben (Grundy & Henkin 2006; Waters & Storz 2009). Des Weiteren wird die Translation vieler mRNAs über Strukturen im Bereich der Ribosomenbindestelle (RBS = *ribosomal binding site*) abhängig von der Anwesenheit eines spezifischen Liganden gesteuert (Waters & Storz 2009, siehe Abb. 4).

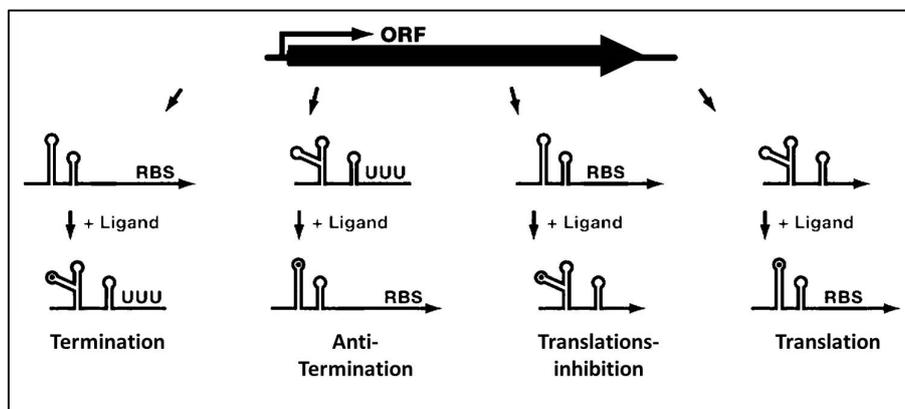


Abbildung 4: Regulation von mRNA durch Riboswitches: Abhängig von der Bindung eines Liganden kann die Transkription einer mRNA entweder terminiert werden oder Terminatorstrukturen können durch Strukturänderungen innerhalb der RNA aufgelöst werden. Zusätzlich kann die Translation einer mRNA abhängig von durch Liganden ausgelösten Strukturänderungen gesteuert werden und es kann die ribosomale Bindestelle (RBS) blockiert oder freigelegt werden (modifiziert nach Waters & Storz 2009).

Diese Liganden-abhängigen Strukturen innerhalb der mRNA nennen sich Riboswitches.

Eine besondere Klasse der Riboswitches stellen die RNA-Thermometer dar, die ihre Struktur abhängig von der Umgebungstemperatur ändern und keine spezifischen Liganden benötigen (Narberhaus et al. 2006).

Regulation durch sRNAs

Neben den *Riboswitches*, die als Teil einer mRNA Einfluss auf die Expression nehmen, gibt es kleine nicht codierende RNAs, die die Genexpression beeinflussen. Diese RNAs werden sRNAs (*small RNAs*) genannt. Bei den sRNAs wird zwischen *trans*-codierten sRNAs und *cis*-codierten sRNAs unterschieden. Unter den sRNAs gibt es zusätzlich zu den sRNAs, die mit mRNAs interagieren, auch sRNAs, die mit Proteinen interagieren (zusammengefasst in Waters & Storz 2009). Die Vielfältigkeit der Regulation durch sRNAs wird besonders deutlich darin, dass einige sRNAs multifunktionell sind. Diese multifunktionellen sRNAs können sowohl an Proteine, als auch an andere RNAs binden oder codieren neben ihrer Funktion als regulatorische RNA auch kleine Peptide, wie zum Beispiel in *Staphylococcus aureus* gezeigt werden konnte (zusammengefasst in Fechter *et al.* 2014).

Protein bindende sRNAs

Protein bindende sRNAs haben häufig die Funktion bestimmte RNA-Moleküle oder DNA-Bereiche zu imitieren und so die Proteine von ihrem eigentlichen Wirkungsort zu titrieren.

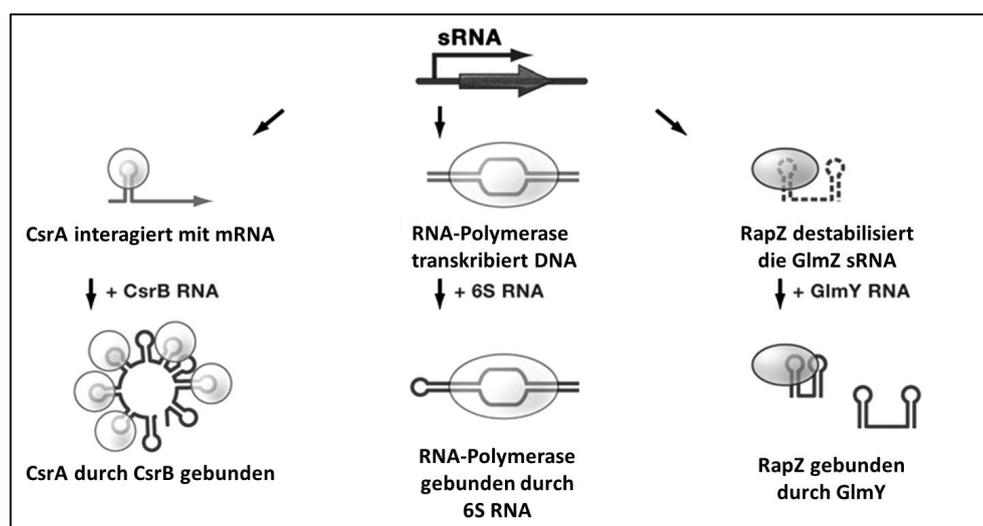


Abbildung 5: Regulation durch Protein-bindende sRNAs: Protein-bindende sRNAs können einerseits dazu dienen, RNA-Bindeproteine von mRNAs und sRNAs zu binden, können aber auch wie die 6S RNA dazu dienen, die RNA-Polymerase zu titrieren (modifiziert nach Waters & Storz 2009).

Hierbei werden RNA bindende Proteine wie CsrA (*Carbon storage regulator A*) oder RapZ durch sRNAs wie CsrB oder GlmY gebunden (Liu *et al.* 1997; Göpel *et al.* 2013, siehe Abb. 5). Einen besonderen Fall stellt die 6S RNA dar, welche die RNA-Polymerase in der stationären Wachstumsphase bindet und so die Transkription inhibiert (Wassarman 2007, siehe Abb. 5).

Cis-codierte sRNAs

Neben den Protein bindenden sRNAs spielen RNA bindende sRNAs tragende Rollen in der Regulation verschiedener Gene. Die RNA bindenden sRNAs werden unterteilt in *trans*-codierte und *cis*-codierte sRNAs. Während *trans*-codierte sRNAs unabhängig von ihren *target*-mRNAs im Genom lokalisiert sind, werden *cis*-codierte sRNAs vom Gegenstrang ihrer *target*-mRNA transkribiert. Die meisten beschriebenen *cis*-codierten sRNAs sind mit Plasmiden und anderen mobilen genetischen Elementen assoziiert und spielen eine Rolle in der Kontrolle der Kopienzahl dieser mobilen Elemente (zusammengefasst in Wagner & Storz 2009; Brantl 2007; Wagner *et al.* 2002).

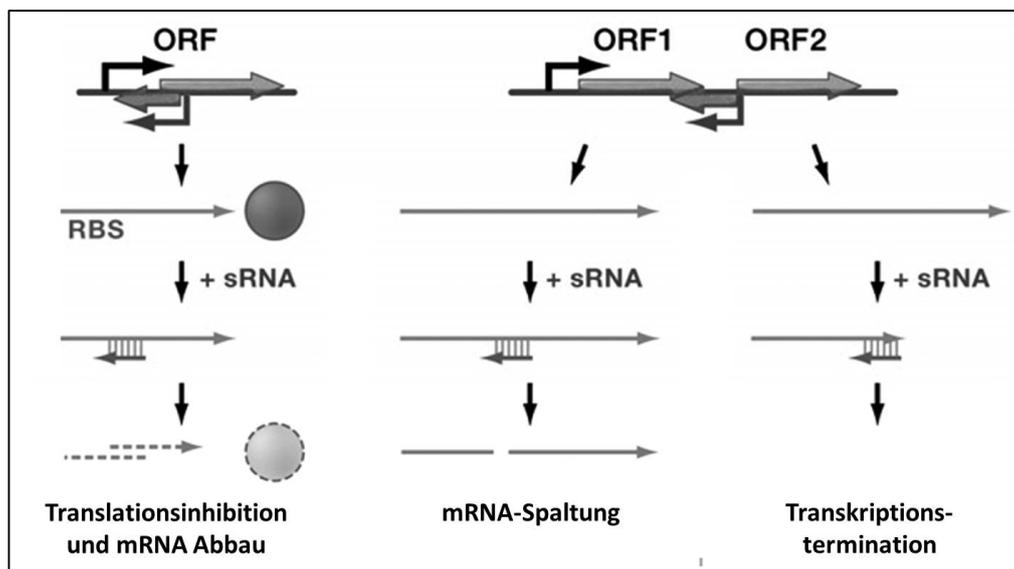


Abbildung 6: Regulation von Genexpression durch cis-codierte sRNAs: Abhängig von der Bindung einer *cis*-codierten sRNA kann die Translation einer mRNA gehemmt werden und/oder die mRNA abgebaut werden. Des Weiteren kann die Bindung einer *cis*-codierten sRNA an eine polycistronische mRNA die Spaltung der mRNA einleiten oder zu einer vorzeitigen Transkriptionstermination führen (modifiziert nach Waters & Storz 2009).

Es werden aber auch zunehmend *cis*-codierte sRNAs beschrieben, die auf bakteriellen Chromosomen lokalisiert sind und wahrscheinlich Funktionen in verschiedenen Toxin-Antitoxin Systemen spielen oder der Regulation von Toxin-Antitoxin Systemen auf mobilen genetischen Elementen dienen (zusammengefasst in Fozo *et al.* 2008a; Fozo *et al.* 2008b; Gerdes & Wagner 2007). In diesen Systemen führt die perfekte Basenkomplementarität zu einer stabilen Interaktion der RNAs über lange Abschnitte und zur Bildung einer RNA Duplexstruktur. Dies führt dazu, dass die Translation einer mRNA mit toxischem Proteinprodukt gezielt gehemmt wird und/oder die mRNA abgebaut wird (siehe Abb. 6). In anderen Fällen dient die Bildung einer Duplexstruktur durch *cis*-codierte sRNAs zur Initiierung einer gezielten Spaltung einer polycistronischen mRNA im Bereich der Bindestelle, wie für die *cis*-codierte sRNA GadY und die gadXW mRNA in *E. coli* beschrieben (Opdyke *et al.* 2004, siehe Abb. 6). Zusätzlich kann es, wie für die sRNA IsrR und die mRNA isiAB gezeigt, durch Bindung einer *cis*-codierten sRNA zu einer gezielten Transkriptionstermination innerhalb einer polycistronischen mRNA kommen (Dühning *et al.* 2006, siehe Abb. 6). Die beiden letzten genannten Mechanismen ermöglichen eine unterschiedlich starke Expression verschiedener Gene aus einer polycistronischen mRNA.

Trans-codierte sRNAs

Bei *trans*-codierten sRNAs handelt es sich um sRNAs, die mit einem eigenen Promoter in intergenischen Regionen oder in den 5' Regionen (5'-UTR) und 3' Regionen (3'UTR) von Protein-codierenden Genen codiert sind (Tsai *et al.* 2015). *Trans*-codierte sRNAs weisen nur eine geringe Basenkomplementarität zu anderen RNAs auf und wirken, indem sie über imperfekte Bindungen an relativ kurze Bereiche von spezifischen mRNAs, den sogenannten *target* mRNAs, binden (zusammengefasst in Aiba 2007; Gottesman 2005). Die Bindungsbereiche zwischen beiden RNAs werden *seeds*

genannt, während die an der Bindung beteiligten Bereiche der jeweiligen sRNA und mRNA Bindestellen (*binding sites*) genannt werden. Die Bindung von einer *trans*-codierten sRNA an eine *target* mRNA ist zunächst von komplementären Sequenzen beider RNAs in der *seed*-Region abhängig, wobei häufig eine Bindung im Bereich der Shine-Dalgarno-Sequenz zu beobachten ist (Aiba 2007). Zusätzlich ist es notwendig, dass die Bindestellen beider RNAs für eine Bindung zugänglich sind, womit die Sekundärstruktur beider RNAs ebenfalls von entscheidender Bedeutung für Interaktion zwischen *trans*-codierter sRNA und *target*-mRNA ist. Typischerweise weisen *trans*-codierte sRNAs mehrere unterschiedliche *target*-mRNAs auf, wobei die Lokalisation der zugrunde liegenden Gene im bakteriellen Genom unabhängig von der Lokalisation der sRNAs ist (zusammengefasst in Prévost 2007; Gottesman 2005). Betrachtet man *trans*-codierte sRNAs, so spielt meist auch das homohexamere Protein Hfq (*host factor required for replication of phage Q*) eine zentrale Rolle. Hfq schützt sRNAs vor dem Abbau durch RNasen und unterstützt häufig auch die relativ schwache Interaktion zwischen *trans*-codierter sRNA und *target*-mRNA indem es Sekundärstrukturen der RNAs löst und den sRNAs hilft, die *target*-mRNAs zu binden (Wagner 2013; Aiba 2007; Brennan & Link 2007; Valentin-Hansen *et al.* 2004). Sowohl sRNAs, als auch mRNAs werden hierbei an speziellen Bindestellen durch Hfq gebunden, wobei sRNAs an die proximale Seite und mRNAs an die distale Seite des homohexameren Rings binden (De Lay *et al.* 2013). Zusätzlich zur beschriebenen Funktion von Hfq die *trans*-codierten sRNAs bei der Bindung von mRNAs zu unterstützen, ist Hfq häufig mit dem bakteriellen Degradosom assoziiert (De Lay *et al.* 2013). Als Konsequenz hieraus ergibt sich aus dem Zusammenspiel von *trans*-codierten sRNAs und Hfq eine Vielfalt von möglichen Wirkungen, die auf eine *target*-mRNA ausgeübt werden können. So kann die Translation einer mRNA durch den Hfq-sRNA Komplex inhibiert werden, wobei eine

Bindung der ribosomalen 30S Untereinheit verhindert wird (Desnoyers & Massé 2012). Gegenstand aktueller Forschung ist hierbei, ob die Ribosomenbindestelle (RBS) durch Bindung der sRNA und die resultierende Bildung eines RNA-Duplexes oder aktiv durch Hfq blockiert wird (Desnoyers & Massé 2012; siehe Abb. 7).

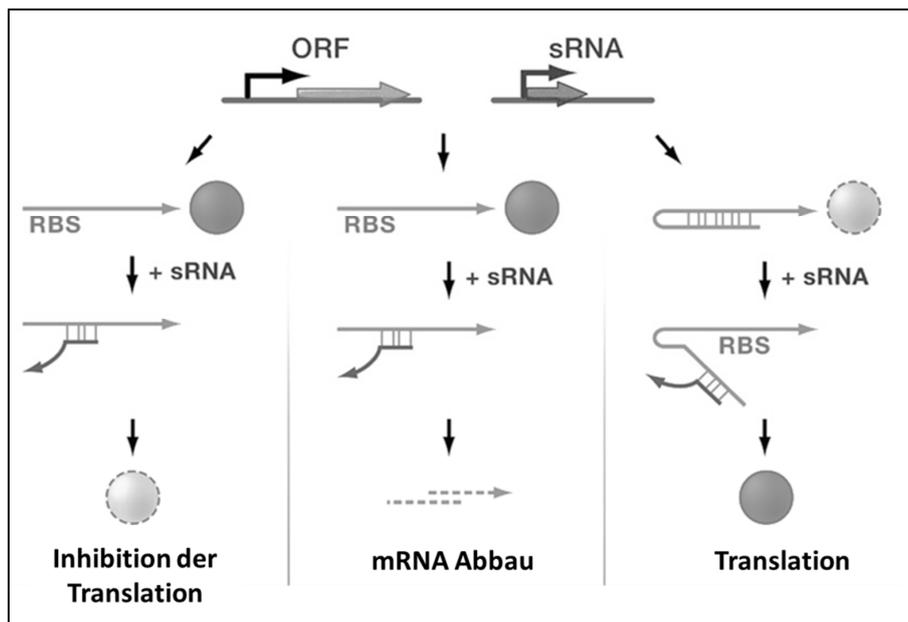


Abbildung 7: Regulation von Genexpression durch trans-codierte sRNAs: Die Bindung einer trans-codierten sRNA kann entweder zu einer Inhibition der Translation durch Blockierung der ribosomalen Bindestelle (RBS) führen oder einen mRNA Abbau einleiten. In seltenen Fällen kann die Bindung einer sRNA an eine mRNA auch zum Auflösen inhibitorischer Strukturen im Bereich der RBS führen und eine Translation ermöglichen (modifiziert nach Waters & Storz 2009).

Ein weiterer möglicher Einfluss von trans-codierten sRNAs auf eine *target*-mRNA ist eine Verminderung der mRNA Stabilität. Hierbei führt die Bildung des RNA-Duplexes dazu, dass RNasen rekrutiert werden, die zu einem Abbau der mRNA führen, was als Manifestation der Translationsinhibition gesehen werden kann (Waters & Storz 2009; siehe Abb. 7). Von besonderer Bedeutung scheint hier die beschriebene Assoziation von Hfq mit dem bakteriellen Degradosom zu sein. Neben diesen Fällen von negativer Regulation der Genexpression tritt in vereinzelt Fällen auch eine positive Regulation der Genexpression durch trans-codierte sRNAs auf. So können durch Bindung von sRNAs inhibierende Strukturen im Bereich der RBS aufgelöst werden und somit die Translation der *target*-mRNA ermöglicht werden, wie für die Interaktion zwischen den

Qrr sRNAs und der *vca0939* mRNA in *Vibrio cholerae* beobachtet wurde (Hammer & Bassler 2007; siehe Abb. 7). Betrachtet man die vielfältigen Regulationsmechanismen, so stellen sich sRNAs als ideale Regulatoren in Stresssituationen dar. So kann eine schnelle und spezifische Regulation verschiedener Gene erreicht werden, da die Translation eines regulatorischen Proteinfaktors umgangen werden kann.

2.2.4 Verschiedene Regulationsmechanismen bilden Regulationsnetzwerke

Besonders in *Escherichia coli* und nahe verwandten Enterobakterien ist die Generegulation unter Stressbedingungen bereits gut untersucht (Beispiele sind zusammengefasst in Landini *et al.* 2014; Miajlovic & Smith 2014; Barria *et al.* 2013). Bei einer genaueren Betrachtung erschließt sich ein komplexes Netzwerk, in dem regulatorische RNAs mit verschiedenen regulatorischen Proteinfaktoren und Sigmafaktoren zusammenspielen (siehe Abb. 8).

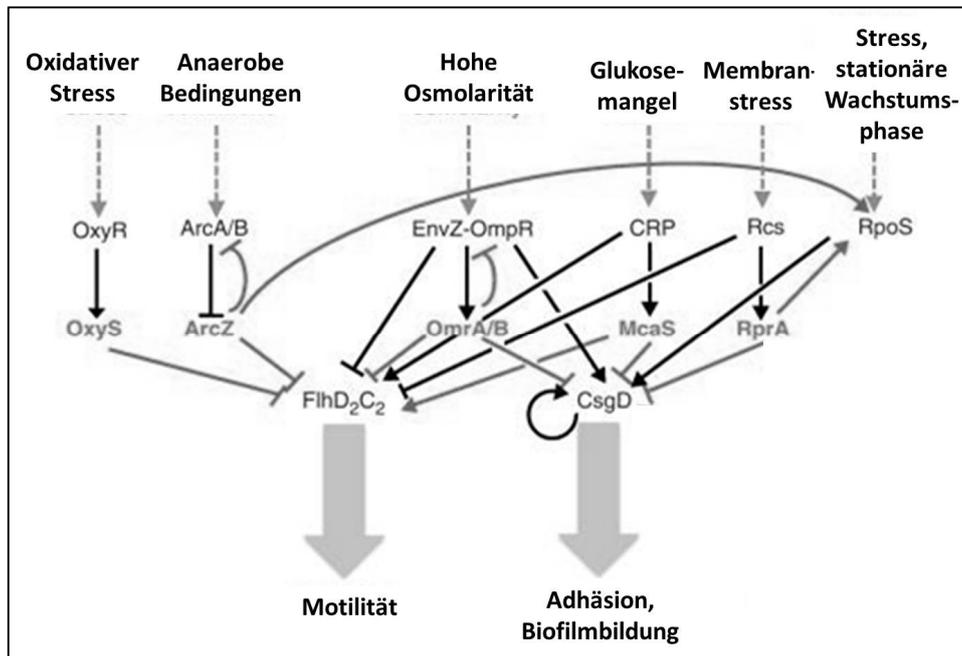


Abbildung 8: Regulation von Motilität und Biofilmbildung in *E. coli* durch ein Netzwerk aus sRNAs und Proteinregulatoren: Motilität und Adhäsion bzw. Biofilmbildung werden durch verschiedene Umweltfaktoren beeinflusst (gestrichelte Pfeile), die ein Netzwerk aus Proteinregulatoren (Regulation dargestellt mittels schwarzen Pfeilen und Linien) und sRNAs (Regulation dargestellt mittels grauen Pfeilen und Linien) induzieren. Hierbei spielen einige Proteine und sRNAs nur in der Regulation von Motilität oder Adhäsion eine Rolle, während andere sRNAs und Proteine sowohl Motilität, als auch Adhäsion regulieren. Zusätzlich ist eine Interaktion verschiedener Proteinregulatoren und sRNAs miteinander zu erkennen. (modifiziert nach Mandin & Guillier 2013)

Häufig überschneiden sich hierbei die Einflüsse von verschiedenen Regulatoren auf die regulierten Gene, so dass es zur Ausbildung von regulatorischen Schleifen kommt. Ein besonders gut untersuchtes sRNA basiertes Regulationssystem ist das unter oxidativem Stress aktive System aus OxyR und der sRNA OxyS, welches Einfluss auf das Transkriptionsregulatorsystem FlhD/C und somit Einfluss auf Flagellarsynthese und Motilität nimmt (De Lay & Gottesman 2012). Das FlhD/C System wird zusätzlich unter weiteren Stressbedingungen durch verschiedene sRNAs reguliert, wodurch klar wird, dass bereits die Regulation eines Transkriptionsregulators durch mehrere sRNAs eine Schnittstelle für die Genregulation unter Stressbedingungen darstellt (De Lay & Gottesman 2012). Ein weiteres Beispiel für eine solche Schnittstelle stellt das CsgD System dar, welches als Transkriptionsregulationssystem in der Ausbildung von Biofilmen und Adhäsion an Oberflächen von Bedeutung ist und über die sRNAs OmrA, OmrB und McaS mit dem FlhD/C System vernetzt ist (zusammengefasst in Mandin & Guillier 2013, siehe Abb. 8). Aus diesem Beispiel lässt sich erkennen, dass die Ausbildung von regulatorischen Schnittstellen eine wichtige Eigenschaft in der posttranskriptionellen Genregulation durch sRNAs ist.

2.3 Die Alphaproteobakterien

In der breit gefächerten Klasse der Alphaproteobakterien ist die Fähigkeit von Bakterien verschiedene Habitate zu besiedeln und sich ihnen anzupassen besonders gut zu erkennen. Die Alphaproteobakterien weisen insgesamt nur wenige Gemeinsamkeiten auf und sind ihren jeweiligen Habitaten angepasst, besitzen jedoch einen gemeinsamen Vorfahren. So leben *Rhizobiales* mit spezifischen Pflanzenwirten in Symbiose und fixieren Stickstoff in den Wurzelknöllchen, während *Rickettsiales* entweder als Endosymbiont oder als intrazelluläres Pathogen vorkommen. Des Weiteren leben

viele Vertreter der Alphaproteobakterien in aquatischen Habitaten und nutzen eine Vielzahl unterschiedlicher metabolischer Wege inklusive der Photosynthese.

2.3.1 Der Modellorganismus *Rhodobacter sphaeroides*

Das fakultativ phototrophe Alphaproteobacterium *Rhodobacter sphaeroides* gehört zur Familie der *Rhodobacteraceae* und ist hauptsächlich in aquatischen Habitaten zu finden. *R. sphaeroides* ist charakterisiert durch die Fähigkeit viele Stoffwechselwege nutzen zu können und kann neben anaerober und aerober Respiration auch durch anaerob-anoxygene Photosynthese und Fermentation Energie gewinnen. Als anaerob-anoxygen phototropher Organismus weist *R. sphaeroides* unter aneroben Bedingungen eine starke und charakteristische purpurfarbene Färbung auf. Insbesondere das Carotinoid Spheroiden ist die Ursache für die charakteristische Färbung von *R. sphaeroides* (Lutz & Kleo 1976). Das Genom von *R. sphaeroides* 2.4.1, dem in dieser Arbeit genutzten Bakterienstamm, besteht aus zwei Chromosomen und fünf Plasmiden, umfasst eine Größe von 4.6×10^6 bp und besitzt einen hohen GC-Gehalt von 65-69 % (Choudhary *et al.* 2004). *R. sphaeroides* dient als etablierter Modellorganismus für die Regulation der Photosynthese in Bakterien und für die oxidative Stressantwort.

Regulation der metabolischen Vielfalt von R. sphaeroides

R. sphaeroides ist in der Lage, aerobe Respiration zu betreiben und kann unter anaeroben Bedingungen organische Verbindungen als terminale Elektronenakzeptoren für eine anaerobe Respiration nutzen. Von besonderer Bedeutung im Metabolismus von *R. sphaeroides* ist allerdings die fein regulierte anaerob-anoxygene Photosynthese. Zusätzlich ist *R. sphaeroides* in der Lage unter unvorteilhaften Bedingungen Fermentation verschiedener Kohlenstoffverbindungen zu betreiben und kann Stickstoff fixieren.

Regulation des Photosyntheseapparates von *R. sphaeroides*

Unter aeroben Bedingungen ist die Expression der Photosynthesegene gehemmt und der Energiebedarf wird über die aerobe Respiration gedeckt. Sinkt der Sauerstoffpartialdruck im umgebenden Medium, so beginnt graduell die Synthese des Photosyntheseapparates. Bevorzugt unter nahezu vollständig anaeroben Bedingungen und in Anwesenheit von Licht wird anoxygene Photosynthese zur Generierung von ATP verwendet (Gregor & Klug 1999; Zeilstra-Ryalls *et al.* 1998). Eine strenge Kontrolle der Expression des Photosyntheseapparates wird durch Regulation auf verschiedenen Ebenen gewährleistet, und hat zur Folge, dass Photosynthese verstärkt unter optimalen Bedingungen betrieben wird. Hierbei wird die Genexpression der Photosynthesegene einerseits durch viele verschiedene Proteinregulatoren, wie das PrrA/PrrB System, das AppA/PpsR System und FnrL gesteuert (Laguri *et al.* 2003; Oh & Kaplan 2001; Oh *et al.* 2001; Gregor & Klug, 1999; Zeilstra-Ryalls *et al.* 1998). Andererseits sind, wie bereits erwähnt, unterschiedliche Stabilitäten für verschiedene mRNAs des polycistronischen *puf*-Operons beschrieben und auch eine Feinjustierung der Expression der Photosynthesegene in *R. sphaeroides* über die sRNA PcrZ konnte beobachtet werden (Mank *et al.* 2012; Klug 1993).

Der C1 Metabolismus von *R. sphaeroides*

Der C1-Metabolismus in *R. sphaeroides* besitzt eine direkte Verbindung zur Photosynthese und auch die Regulation der Expression einiger zu Grunde liegender Gene ist bereits gut untersucht. *R. sphaeroides* ist in der Lage, Methanol als einzige Kohlenstoffquelle im phototrophen Wachstum zu nutzen und mit Hilfe der Pyrolloquinolinkinon-abhängigen Oxidase XoxF zu Formaldehyd zu oxidieren, wobei Elektronen über spezifische Cytochrome in die Elektronentransportkette eingespeist werden (Wilson *et al.* 2008).

Das stark zytotoxische Stoffwechselprodukt Formaldehyd wird im Anschluss in Anhängigkeit von Glutathion über mehrere Zwischenschritte abgebaut, wobei Kohlenstoffdioxid entsteht (Wilson *et al.* 2008, siehe Abb. 9).

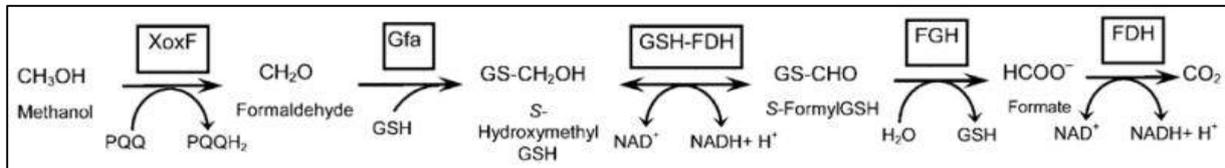


Abbildung 9: Glutathion-abhängiger Methanol-Formaldehyd Metabolismus in *R. sphaeroides*: GSH: reduziertes Glutathion. PQQ: Pyrrolochinolinchinon. XoxF: Pyrrolochinolinchinon abhängige Dehydrogenase. Gfa: Glutathion-Formaldehyd aktivierendes Enzym. GSH-FDH: Glutathion-abhängige Formaldehyddehydrogenase. FGH: S-Formylglutathion Hydrolase. FDH: Formiatdehydrogenase. (Wilson *et al.* 2008)

Reguliert wird der Glutathion-abhängige Methanol-Formaldehyd-Metabolismus unter anderem über Aktivierung durch das AfdS/AfdR-Zweikomponentensystem, Repression durch das RfdR/RfdR-Zweikomponentensystem und durch das globale Regulatorsystem PrrA/PrrB (Hickman *et al.* 2004; Barber & Donohue 1998). AfdS und AfdR sind in *Paracoccus denitrificans* bereits als FlhS und FlhR beschrieben, was auch der Annotation im *R. sphaeroides* 2.4.1 Genom laut NCBI Datenbank (NCBI = National Center for Biotechnology Information) entspricht (Harms *et al.* 2001; Kontur *et al.* 2012). Das FlhS/FlhR-System in *R. sphaeroides* 2.4.1 wird entweder durch methylierte Verbindungen oder durch Formaldehyd induziert und wirkt aktivierend auf die Expression der Gene für die Typ III Alkoholdehydrogenase AdhI (RSP_2576) und das membrangebundene Cytochrom Cycl (RSP_2577), während eine Aktivierung weiterer Gene des Methanol-Formaldehyd-Metabolismus durch das Homolog in *P. denitrificans* beobachtet werden konnte (Hickman *et al.* 2004; Harms *et al.* 2001). Obwohl eine Assoziation des Methanol-Formaldehyd-Metabolismus mit der Photosynthese eine primäre Funktion von AdhI unter anaeroben Bedingungen nahelegt, konnte eine Regulation durch PrrA unter aeroben Bedingungen nachgewiesen werden. Zusätzlich ist

eine essentielle Funktion von Typ III Alkoholdehydrogenasen im aeroben Wachstum von Bakterien bekannt (Echave *et al.* 2003; Barber & Donohue 1998).

Die oxidative Stressantwort in R. sphaeroides

Neben der Untersuchung verschiedener metabolischer Wege ist auch die oxidative Stressantwort in *R. sphaeroides* gut untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die oxidative Stressantwort mit der Expression der Photosynthesegene in Verbindung steht und neuere Studien stellen heraus, dass es neben einer generellen oxidativen Stressantwort auch eine spezifische Antwort auf photooxidativen Stress gibt. Hierbei ist die oxidative Stressantwort in einem Netzwerk aus verschiedenen Proteinfaktoren und regulatorischen RNAs organisiert, welches auf verschiedenen Ebenen eine effektive Abwehr gegen ROS und die durch ROS entstandenen Schäden koordiniert und zusätzlich die Entstehung von ROS durch Hemmung von Primärquellen der ROS Bildung unterbindet.

Aufrechterhaltung des Redoxzustandes mittels Glutathion und Thioredoxin und die enzymatische Entgiftung von reaktiven Sauerstoffspezies

Ein wichtiger Bestandteil des Netzwerks der oxidativen Stressantwort in *R. sphaeroides* sind die Antioxidanten Glutathion und Thioredoxin, die im Zusammenspiel in der Lage sind durch Oxidation gebildete Disulfidbrücken an Cysteinen zu reduzieren und so unspezifisch einer Proteinoxidation entgegenzuwirken. Zusätzlich sind Glutathione und Thioredoxine in der Lage reaktive Sauerstoffspezies durch Reduktion zu *quenchen* und dienen als Reduktionspool. Während der Reduktion oxidiertes Proteine werden sowohl Glutathion, als auch Thioredoxine zunächst oxidiert und dann durch die spezifischen Enzyme des Glutaredoxin- und Thioredoxinreduktasesystems unter NADPH-Verbrauch wieder reduziert, um erneut für die oxidative Stressantwort bereit zu stehen. In *R. sphaeroides* ist die Expression des für aerobe und anaerobe Respiration essentiellen

Thioredoxin I Gens *trxA* an die Sauerstoffkonzentration in der Umgebung und an oxidativen Stress gebunden, während in *R. capsulatus*, einem nahen Verwandten von *R. sphaeroides*, auch eine wichtige Funktion des Glutathion-/ Glutaredoxin Systems in der Antwort auf oxidativen Stress beobachtet werden konnte (Li *et al.* 2004; Li *et al.* 2003; Pasternak *et al.* 1996). Des Weiteren konnte in *R. capsulatus* ermittelt werden, dass sowohl das Glutathion- / Glutaredoxinsystem, als auch das Thioredoxin- / Thioredoxinreduktasesystem Teil eines Regulationsnetzwerkes sind, das weite Teile der oxidativen Stressantwort umfasst (Li *et al.* 2004). Zusätzlich konnte ein Einfluss von Thioredoxin auf die Expression der Photosynthesegene in *R. sphaeroides* gezeigt werden (Pasternak *et al.* 1999). Während Glutathion und Thioredoxine dazu dienen einerseits den Redoxstatus von Zelle und Proteinen aufrechtzuerhalten und andererseits dabei helfen ROS zu entgiften, besitzt *R. sphaeroides* in Ergänzung hierzu Enzyme, die der spezifischen Entgiftung von ROS dienen. Die Expression dieser Enzyme ist dabei an aerobes Wachstum und oxidativen Stress gekoppelt, wie an den Genen für die Superoxiddismutase *sodB* oder die Katalase *katE* zu beobachten ist (Zeller & Klug 2004; Li *et al.* 2003; Cortez *et al.* 1998).

Die oxidative Stressantwort in *Rhodobacter* ist Teil eines Regulationsnetzwerkes

Wie bereits beschrieben haben die Sauerstoffkonzentration und oxidativer Stress in *R. sphaeroides* einen Einfluss auf die Expression verschiedener Gene der oxidativen Stressantwort und es konnte eine Verbindung mit der Expression von Genen des Photosyntheseapparats gezeigt werden (Pasternak *et al.* 1999). Zusätzlich ist eine Vernetzung der oxidativen Stressantwort mit Eisenstress hinlänglich bekannt (z.B. Peuser *et al.* 2012). Auch wurde bereits detailliertes Wissen über die die photooxidative Stressantwort in *R. sphaeroides* gewonnen (Glaeser *et al.* 2011). Innerhalb der Vernetzung der Stressantworten auf (photo-)oxidativen Stress und Hitze mit der

Regulation verschiedener zellulärer Prozesse ist hierbei in *R. sphaeroides* insbesondere das Zusammenspiel von drei Sigmafaktoren untersucht worden (Nuss *et al.* 2010; Nuss *et al.* 2009). Hierbei wird unter photooxidativem Stress die Expression von σ^E (*rpoE*, RSP_1092) induziert (Braatsch *et al.* 2004). σ^E wird durch Proteolyse des Antisigmafaktors ChrR freigesetzt, in welcher Homologe der Proteasen DegS (RSP_3242) und RseP (RSP_2710) aus *E. coli*, sowie RSP_1090 beteiligt sind (Nuss *et al.* 2013; Nam *et al.* 2013). Es folgt eine Selbstinduktion von σ^E und eine Induktion des alternativen Sigmafaktors RpoH_{II} (RSP_0601), welcher für die Aktivierung des Abwehrsystems gegen oxidativen Stress zuständig ist (Nuss *et al.* 2009). Zusätzlich kommt es zu einer σ^E unabhängigen Aktivierung des Sigmafaktors RpoH_I, welcher weitere Gene zur Abwehr gegen oxidativen Stress aktiviert. RpoH_{II} und RpoH_I spielen über einen σ^E unabhängigen Signalweg auch eine Rolle in der Regulation der Hitzestressantwort (Nuss *et al.* 2010). Neben den verschiedenen funktionellen Gruppen aus Protein-codierenden Genen werden auch spezifische sRNAs durch die verschiedenen Sigmafaktoren induziert. Hierbei werden sRNAs spezifisch durch photooxidativen Stress und eine σ^E abhängige Regulation induziert, genau wie es sRNAs gibt, die unter verschiedenen Stressbedingungen eine erhöhte Expression aufweisen und durch RpoH_I und RpoH_{II} induziert werden. (Berghoff *et al.* 2009).

CcsR1-4 und CcaF

Unter den sRNAs die unter oxidativen Stressbedingungen exprimiert werden, befinden sich vier homologe sRNAs, die auch unter verschiedenen anderen Stressbedingungen exprimiert werden. Diese sRNAs werden mit RSP_6037, dem Gen für ein hypothetisches Protein, cotranskribiert. RSP_6037 weist eine konservierte Domäne mit unbekannter Funktion (DUF1127) auf (Berghoff *et al.* 2009, siehe Abb. 10).

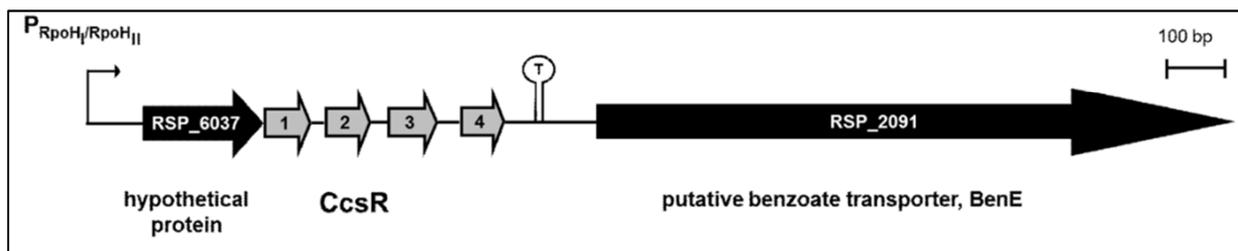


Abbildung 10: Schematische Darstellung des RSP-6037-CcsR1-4 Locus: Dargestellt ist die Organisation des RSP_6037-CcsR1-4 Locus, wobei ein RpoHI/RpoHII-abhängiger Promotor und ein vorhergesagter Terminator angezeigt sind. Protein-codierende Gene sind in dunkelgrau dargestellt, während sRNA-Gene in hellgrau eingefärbt sind (modifiziert nach Berghoff *et al.* 2009).

Die vier sRNAs sind charakterisiert durch zwei konservierte CCUCCUCCC-Motive, die jeweils in Stammschleifen exponiert vorliegen (siehe Abb. 11 & Abb. 12). Auf Grund dieser strukturellen Konservierung und Sequenzkonservierung werden die vier sRNAs CcsR1-4 (Conserved CCUCCUCCC-motif containing stress induced RNA) genannt. CcsR1-4 werden durch RpoH_I und RpoH_{II} sowohl unter Hitzestress als auch unter photooxidativem und oxidativem Stress induziert, wobei eine basale Expression in einer Doppeldeletionsmutante beider Sigmafaktoren erhalten bleibt (Berghoff *et al.* 2009; Billenkamp 2010; Nuss *et al.* 2010, siehe Abb. 13). Eine Verbindung von CcsR1-4 mit der Expression von Genen des C1-Metabolismus und mit der Expression von Genen des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes wird vermutet (Billenkamp 2010).

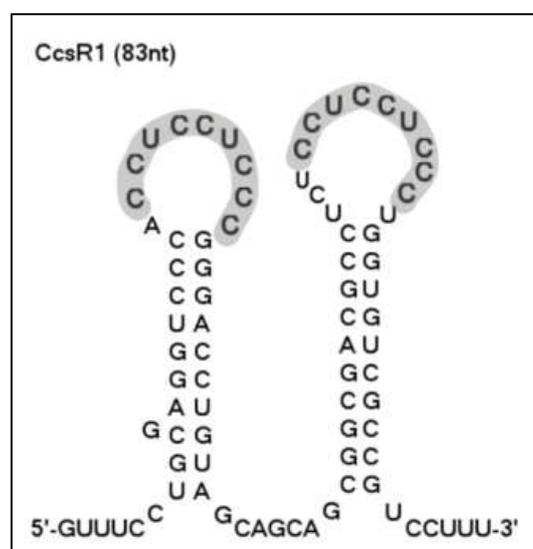


Abbildung 11: Sekundärstruktur der sRNA CcsR1: Dargestellt ist die mit Hilfe von SFOLD ermittelte Sekundärstruktur der sRNA CcsR1 mit zwei Stammschleifen mit jeweils einem konservierten CCUCCUCCC-Motiv (grau unterlegt) im einzelsträngigen Bereich der Stammschleifen.

	5'	Stem 1	Loop 1	Stem 1		Stem 2	Loop 2	Stem 2	3'	
		* *	***** *			* * * * * *	***** *	* * * * *		
CcsR1	GUUUCCUGCGAGGUCCC	--ACCUCUCCC	GGGACCUGUAG	-CAGCA-	GCGGCGACGCCUCUCCUCCUCCUCCUGGUGUCGCCGUCCUUU					83nt
CcsR2	---UCUUCGAAACGGCC	-UCUCCUCCUCCUCCUGGCCGAUCGGA	--ACC--	GCAGCGGCCCC	-CUCCUCCUCCUCCUGGGUGCGUCACCAGAU					81nt
CcsR3	--ACUUCGGCACUGC	---ACCUCUCCC	GCGGUGCCGA	-UGACCAAGCGGCGGUCC	-CUCCUCCUCCUCCUGGAGCCGUCGCCCC					78nt
CcsR4	--ACUUCGGCACUGC	---ACCUCUCCC	GCGGUGCCGA	-UGACCAAGCGGCGGUCC	-CUCCUCCUCCUCCUGGAGCCGCGCCCC					78nt

Abbildung 12: Alignment der sRNAs CcsR1-4: Zu erkennen ist die Konservierung der CCUCCUCCC-Motive in den Stammschleifen (grau hervorgehoben), während für die anderen Bereiche der sRNAs nur eine moderate Konservierung zu erkennen ist.

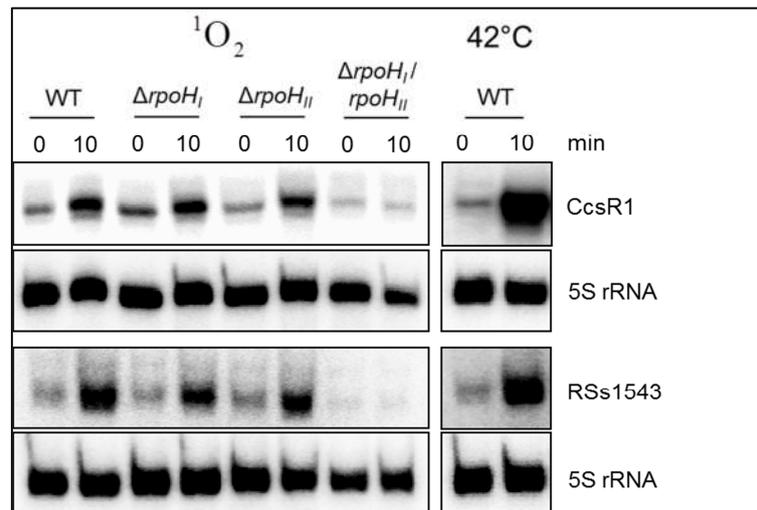


Abbildung 13: Expression der sRNAs CcsR1 und RSs1543 unter Hitzestress und photooxidativem Stress: Dargestellt sind Ergebnisse einer Northern Blot Untersuchung der sRNA Expression unter Stressbedingungen durch photooxidativen Stress oder Hitzestress. Dargestellt sind Proben aus dem *R. sphaeroides* 2.4.1 Wildtyp im Vergleich zu *R. sphaeroides* 2.4.1 Deletionsmutanten der Gene für die Sigmafaktoren RpoH_I und RpoH_{II} (modifiziert nach Nuss *et al.* 2010).

2.3.2 Die Konservierung von sRNAs in verschiedenen Alphaproteobakterien

CcsR1-4, sowie andere sRNAs auch *R. sphaeroides* weisen eine potentielle Konservierung innerhalb verschiedener anderer Alphaproteobakterien auf (Berghoff *et al.* 2009, siehe Abb. 14). Hierbei ist für CcsR1-4 eine Konservierung der Sekundärstruktur und der CCUCCUCCC-Motive bekannt und auch eine partielle Konservierung der Expressionsbedingungen ist zu beobachten, während für die genomische Organisation verschiedene Variationen an CcsR1-4 Loci zu beobachten sind (Helftenbein 2013; Grandt 2012; Billenkamp 2010; Berghoff *et al.* 2009). Besonders interessant erscheint, dass die Expression von Homologen zu RSP_6037, dem in *R. sphaeroides* mit CcsR1-4 cotranskribierten Gen, auch in *Sinorhizobium meliloti* abhängig ist von den Homologen zu RpoH_I und RpoH_{II} (Bittner 2008).

	sRNAs													
	0680a	0682 ^a	0940	1368	1386	1624	1740	2363 ^b	2430	2461 ^a	2778 ^c	2978	0019	
Rhodobacterales														
<i>R. sphaeroides</i> 2.4.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>R. sphaeroides</i> 2.4.3	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>R. sphaeroides</i> 2.4.9	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>R. sphaeroides</i> KD131	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Roseobacter</i> OCh114	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-
<i>Ruegeria</i> DSS-3	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-
<i>Dinoroseobacter</i> DFL12	(+)	+	-	+	+	-	-	+	-	(+)	+	+	+	-
<i>Phaeobacter</i> BS107	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-
<i>Jannaschia</i> CCS1	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-
<i>Loktanella</i> SKA53	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-
<i>Silicibacter</i> TM1040	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-
<i>Oceanicola</i> HTCC 2597	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-
<i>Roseovarius</i> ISM	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-
<i>Sulfitobacter</i> EE-36	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-
<i>Sagittula</i> E-37	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-
<i>Paracoccus</i> PD1222	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-
Rhizobiales														
<i>Agrobacterium</i> S4	+	(-)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Rhizobium</i> WSM1325	(+)	(-)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Rhodospseudomonas</i> BisB18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Sinorhizobium</i> 1021	(+)	(-)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Brucella</i> 16M	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Methylobacterium</i> AM1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Caulobacterales														
<i>Caulobacter</i> CB15	-	(-)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Rhodospirillales														
<i>Gluconobacter</i> PAI5	-	(-)	-	-	-	-	-	(+)	-	-	+	-	-	-
<i>Rhodospirillum</i> SW	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Magnetospirillum</i> AMB-1	-	-	-	-	-	-	-	(+)	-	-	+	-	-	-
Sphingomonadales														
<i>Sphingomonas</i> RW1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-

Abbildung 14: Vorkommen verschiedener sRNAs in verschiedenen Alphaproteobakterien: a: Konservierter 3'-Bereich. b: Putative 6S RNA. c: Auch in anderen Proteobakterien konserviert. +: sRNA vorhanden in identischem genetischen Kontext wie in *R. sphaeroides* 2.4.1; -: sRNA nicht vorhanden. (+): sRNA vorhanden, aber genetischer Kontext nur teilweise oder nicht konserviert. (-): sRNA vorhanden im gleichen Locus, aber Sequenz und Orientierung verändert (modifiziert nach Berghoff *et al.* 2009).

2.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Die Untersuchungen in dieser Arbeit sollen dazu dienen, die bereits gewonnenen Erkenntnisse über die sRNAs CcsR1-4 in *Rhodobacter sphaeroides* zu vertiefen. Hierbei sollen Erkenntnisse über die Prozessierung, potentielle Interaktionspartner und die Funktion innerhalb des zellulären Regulationsnetzwerks gewonnen werden. Um dies zu erreichen, sollen mikrobiologische, molekularbiologische und biochemische Methoden in Zusammenspiel mit bioinformatischen Methoden genutzt werden. Zusätzlich soll, basierend auf den in *R. sphaeroides* gewonnen Erkenntnissen, untersucht werden, ob die CcsR RNAs eine über verschiedene Alphaproteobakterien konservierte Funktion aufweisen. Hierbei sollen sowohl die zu RSP_6037 homologen Proteine, als auch die CcsR RNAs analysiert werden.

3 Ergebnisse

3.1 Bioinformatische Analyse von CcsR Loci aus verschiedenen Alphaproteobakterien

CcsR-RNAs konnten bereits in *R. sphaeroides* 2.4.1 und in verschiedenen anderen Organismen vorhergesagt und nachgewiesen werden. Es konnte hierbei gezeigt werden, dass CcsR-RNAs ausschließlich in den Alphaproteobakterien vorkommen und ein Vorkommen von CcsR RNAs an Gene für Proteine mit konservierter DUF1127-Proteindomäne gebunden ist. Auf Grund dieser Tatsache werden diese Gene im Rahmen dieser Arbeit als *ccaF* Gene (*conserved CcsR associated factor*) bezeichnet. Um die beschriebenen bereits gewonnenen Erkenntnisse zu vertiefen, wurde zunächst untersucht, ob Anzahl, Struktur und genomische Organisation der CcsR RNAs verschiedener Alphaproteobakterien einem bestimmten Muster folgen. Hierbei wurde auch die Frage behandelt, ob eine Untergruppierung der CcsR-RNAs für verschiedene Gruppen der Alphaproteobakterien notwendig ist.

3.1.1 CcsR-Homologe sind in verschiedenen Alphaproteobakterien zu finden und können in drei verschiedene Typen eingeteilt werden

Zur Untersuchung der CcsR RNAs in verschiedenen Alphaproteobakterien wurden die Anzahl homologer sRNAs in einem Organismus, die genomische Organisation der sRNA Loci, sowie die Sequenz der einzelnen sRNAs und ihre Struktur analysiert. Hierbei konnte zunächst gezeigt werden, dass die Anzahl an potentiellen CcsR-Homologen aus 22 verschiedenen Alphaproteobakterien variabel ist und zwischen einem und neun potentiellen Homologen der CcsR-RNAs in einem Organismus vorhergesagt werden können (siehe Abb. 15, Anhang Tab. A1). Hierbei sei anzumerken, dass diese Zahlen auf Grund fehlerhafter Genomsequenzen ungenau sein können, wie für *R. sphaeroides* 2.4.1 beobachtet.

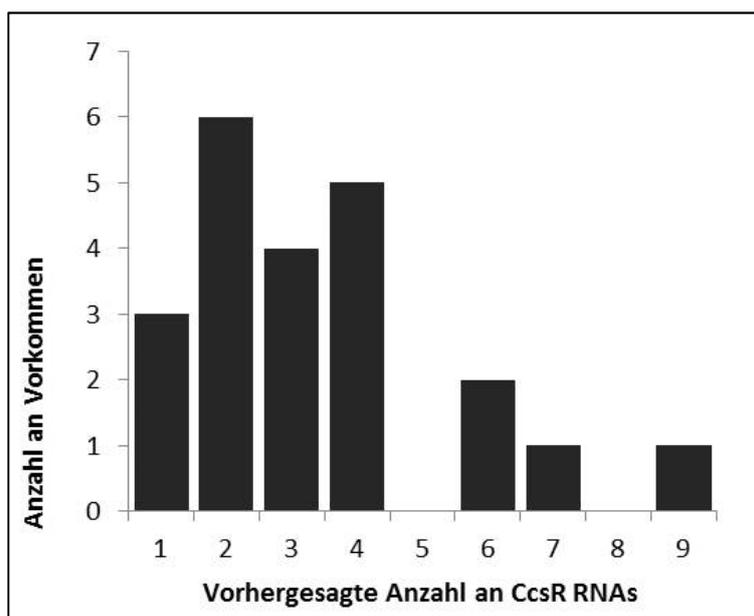


Abbildung 15: Bestimmung der Anzahl an CcsR RNAs pro Organismus in verschiedenen Alphaproteobakterien: Gezeigt ist die vorhergesagte Anzahl an CcsR RNAs pro Organismus gegen die Anzahl an Organismen in denen diese Anzahl an CcsR RNAs vorkommt. Der Umfang der Probe umfasst 22 unterschiedliche Alphaproteobakterien.

Neben der Anzahl an CcsR-RNAs wurde auch die genomische Organisation der CcsR RNAs untersucht. Hierbei stellte sich heraus, dass es drei prinzipiell unterschiedlich organisierte Typen von CcsR Loci gibt. Beim ersten Typ, welcher sowohl in den *Rhodobacterales*, als auch in den *Rhizobiales* gefunden werden konnte, sind ein bis neun Kopien der CcsR RNAs in der 3'UTR eines CcaF codierenden Gens (*ccaF1*) lokalisiert (siehe Abb. 16 & Abb. 17, Anhang Tab. A1). Dieser Typ stellt den größten Anteil an den gefundenen CcsR-Loci. Der zweite Typ, bei dem CcaF1 und eine einzelne CcsR-Kopie unabhängig voneinander im Genom lokalisiert sind, konnte nur ein einziges Mal in *Dinorosebacter shibae* DFL12 vorhergesagt werden (siehe Abb. 16 & Abb. 17, Anhang Tab. A1). Der dritte Typ von CcsR Locus konnte in drei Vertretern der Rhizobien beobachtet werden. Hierbei wurden ein bis drei CcsR-RNAs gefunden, die in der 5'UTR von zwei CcaF codierenden Genen (*ccaF1* & *ccaF2*) lokalisiert sind (siehe Abb. 16 & Abb. 17, Anhang Tab. A1).

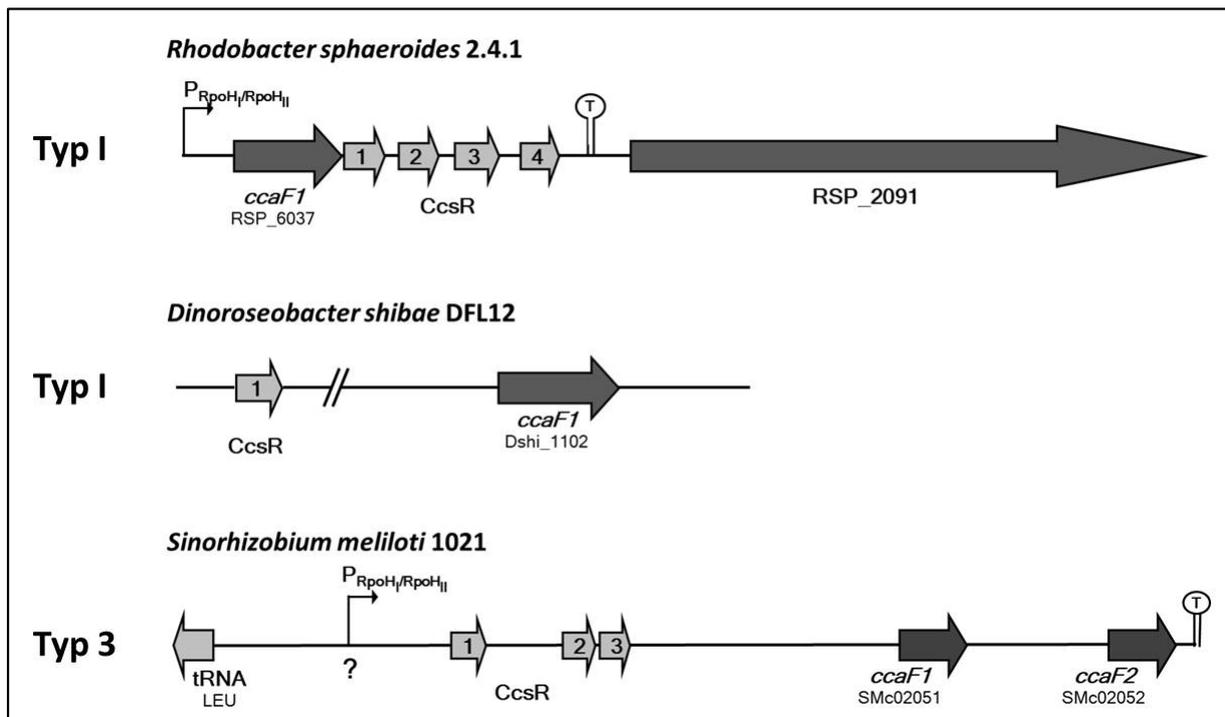


Abbildung 16: Genomische Organisation verschiedener CcsR Loci: Zu sehen ist eine graphische Darstellung des CcsR Locus aus *R. sphaeroides* 2.4.1, der einem CcsR Locus des Typ I entspricht, im Vergleich zu den CcsR Loci aus *D. shibae* DFL12 (Typ II) und *S. meliloti* 1021 (Typ III). Protein-codierende Gene sind in dunkelgrau eingefärbt, während sRNA- und tRNA -codierende Gene in hellgrau hervorgehoben sind. Bekannte Promotoren sind durch Pfeile indiziert. Mittels TRANSTERMHP ermittelte Terminatoren sind durch eine Stammschleifenstruktur mit einem T erkenntlich gemacht.

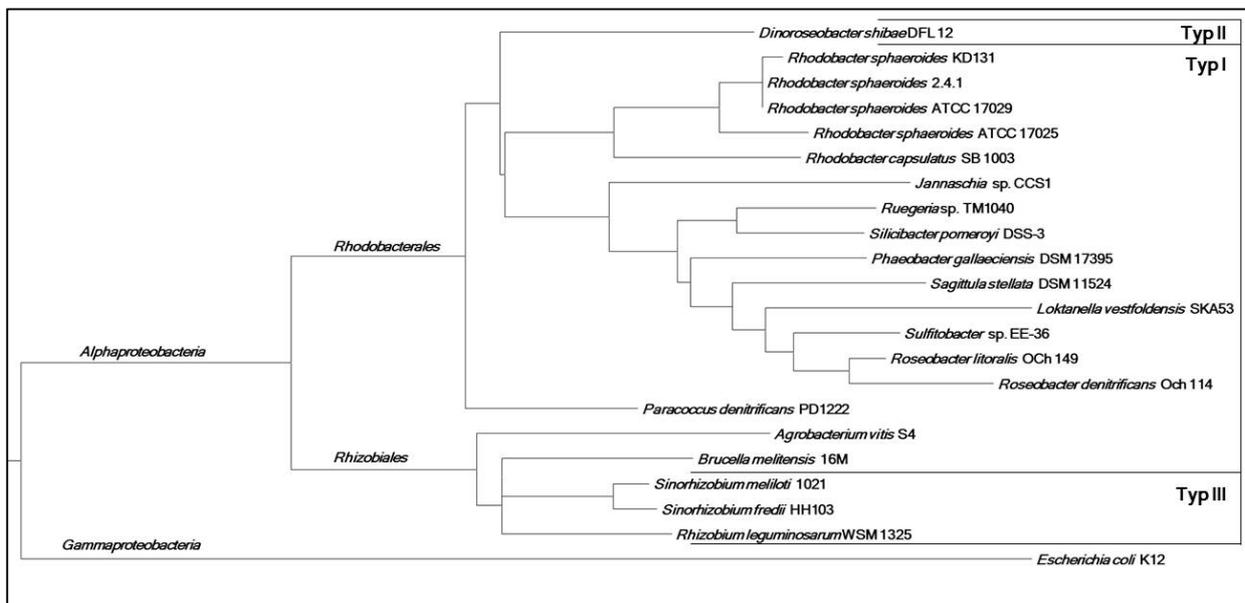


Abbildung 17: Phylogenetischer Stammbaum von Organismen mit CcsR RNAs: Mit Hilfe von Daten aus dem RIBOSOMAL DATABASE PROJECT (RDP) ermittelter phylogenetischer Stammbaum der 16 S rRNA Gene von Organismen mit CcsR RNAs: *E. coli* K12 diente als Ausreißer zur Berechnung des Stammbaums.

3.1.2 CcsR RNAs sind charakterisiert durch eine konservierte Struktur aus 2 Stammschleifen und durch 2 konservierte CCUCCUCCC-Motive

Neben der genomischen Organisation der CcsR RNAs wurden auch die Struktur und Sequenz der verschiedenen CcsR RNAs untersucht. Alle CcsR RNAs sind durch zwei doppelsträngige Stämme charakterisiert, welche in der Regel aus sieben bis 14 Basenpaaren aufgebaut sind. Auf diesen Stämmen sind jeweils einzelsträngige Schleifen mit einer Länge von 10 bis 13 Nukleotiden und einem charakteristischen CCUCCUCCC-Motiv zu finden (siehe Abb. 18).

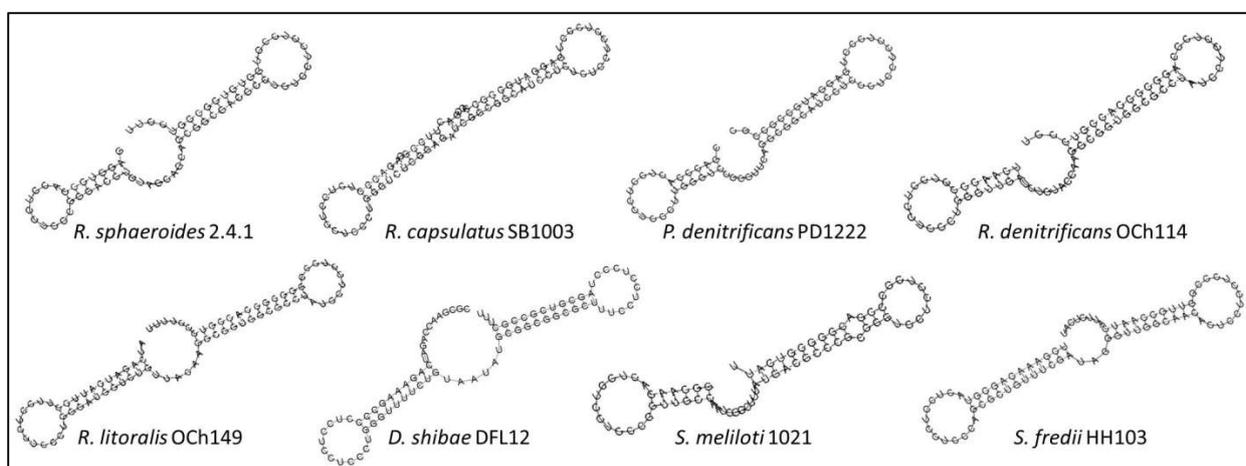


Abbildung 18: Faltungsvorhersagen für die CcsR RNA CcsR1 aus verschiedenen Alphaproteobakterien. Zu sehen sind die mittels RNAfold ermittelten Sekundärstrukturen für vorhergesagte CcsR1-Homologe aus verschiedenen Alphaproteobakterien. Eine Konservierung einer aus zwei Stammschleifen mit präsentierten CCUCCUCCC-Motiven bestehenden Sekundärstruktur ist zu erkennen.

Diese Struktur ist auch in einer 3D-Faltung von CcsR1 aus *R. sphaeroides* 2.4.1 wiederzuerkennen (siehe Anhang Abb. A1). Neben einer Strukturkonservierung konnte auch für Teile der Sequenz der sRNAs eine Konservierung gezeigt werden. So stellte sich heraus, dass die CCUCCC-Basenfolge am Ende der CCUCCUCCC-Motive in allen vorhergesagten CcsR-Homologen konserviert ist, während innerhalb der CCU – Basenfolge am Anfang des CCUCCUCCC-Motivs in einigen Organismen geringe Variationen vorliegen (siehe Abb. 19, Anhang Seq. A1). Im Gegensatz hierzu konnte für die doppelsträngigen Regionen der sRNAs und die einzelsträngigen Regionen

außerhalb der CCUCCUCCC-Motive keine Konservierung der Sequenz beobachtet werden (siehe Abb. 19, Anhang Seq. A1). Eine phylogenetische Untersuchung der Sequenzkonservierung der verschiedenen CcsR1-Homologe mittels LOCARNA zeigte nur eine teilweise Überlappung mit der phylogenetischen Einordnung basierend auf der 16S rRNA (siehe Abb.17 und Abb. 20; Verzeichnis Daten-CD: LocaRNA).

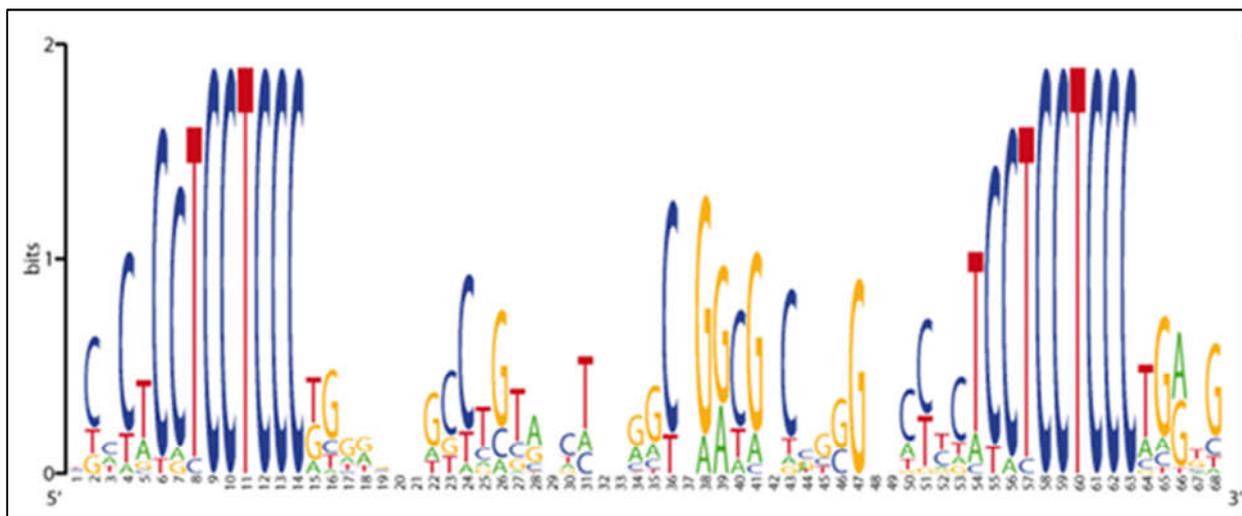


Abbildung 19: Die CCUCCUCCC-Motive der CcsR-RNAs sind konserviert. Unter Berücksichtigung von CcsR1 Homologen aus 22 verschiedenen Alphaproteobakterien wurde ein Weblogo erstellt, das die Konservierung der verschiedenen Basen auf DNA-Ebene darstellt. Zu erkennen ist, dass außerhalb der CCUCCUCCU Motive (CCTCCTCCC) keine starke Konservierung der Basen vorliegt, während die CCUCCUCCC-Motive selbst hochkonserviert sind.

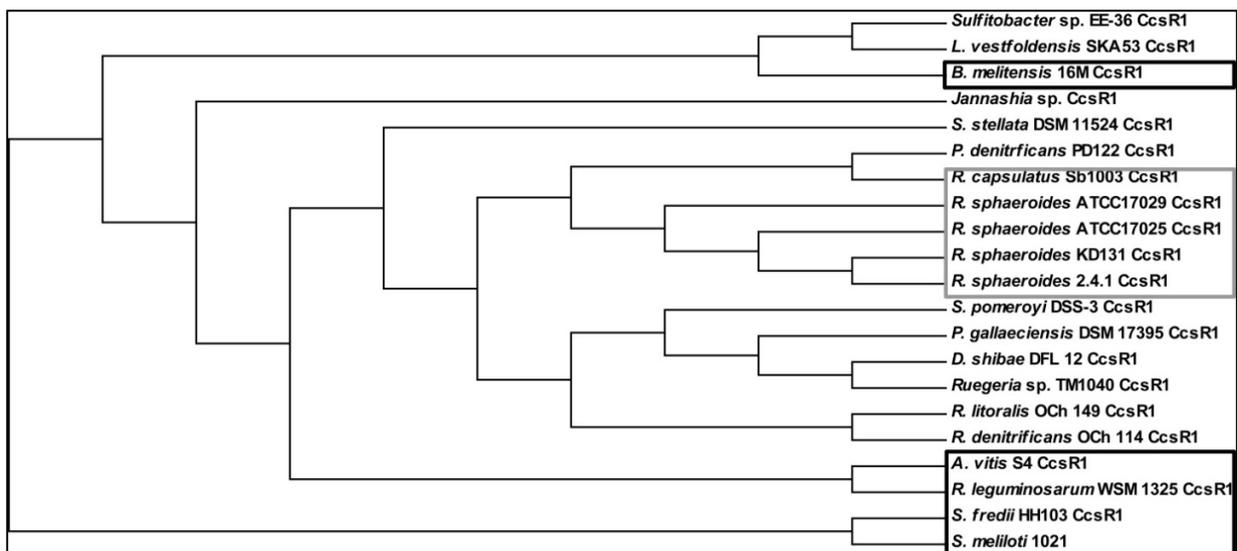


Abbildung 20: Phylogenetischer Stammbaum von CcsR1-Homologen aus verschiedenen Alphaproteobakterien: Mit Hilfe LOCARNA ermittelter Stammbaum von CcsR1 Homologen aus verschiedenen Alphaproteobakterien. Hervorgehoben sind einerseits verschiedene Mitglieder des Genus *Rhodobacter* (grau), auf der anderen Seite Mitglieder der *Rhizobiales* (schwarz).

Hierbei waren insbesondere für den Genus *Rhodobacter* Übereinstimmungen zu erkennen, jedoch lagen innerhalb der *Rhizobiales* starke Variationen zwischen beiden Stammbäumen vor. Die laut 16S rRNA den *Rhizobiales* zugeordneten Organismen waren, basierend auf der Struktur und Sequenz ihrer CcsR RNAs, in mehrere Gruppen unterteilt. Insgesamt ließ sich aus den bioinformatischen Analysen schließen, dass die CcsR-RNAs zwar in ihrer Struktur und in charakteristischen Motiven konserviert sind, jedoch nicht von einer konservierten Nukleotidsequenz über die volle Länge der sRNAs ausgegangen werden kann.

3.1.3 CcaF weist eine Homologie zu einem RNA Bindeprotein aus *Drosophila* auf

Neben den CcsR RNAs spielen die *ccaF* Gene eine tragende Rolle in der Beschreibung der CcsR-Loci. Um einen ersten Einblick in eine potentielle Funktion der hypothetischen CcaF Proteine zu erlangen, wurden die verschiedenen Homologe verschiedener Organismen einer Faltungsvorhersage mittels PHYRE2 unterzogen. Basierend auf den Aminosäuresequenzen der verschiedenen CcaF Homologe und den Aminosäuresequenzen von Proteinen mit veröffentlichter Kristallstruktur stellte sich heraus, dass die CcaF Homologe eine besonders hohe Homologie zum RNA-bindenden Bereich des RNA-Bindeproteins Smaug aus *Drosophila melanogaster* aufwiesen. Diese Homologie war zu beobachten für einen Bereich, der in den CcaF Homologen mit der konservierten DUF1127-Proteindomäne überlappte (siehe Abb. 21, Verzeichnis Daten-CD: Phyre 2). Zusätzlich konnte durch Berechnung eines phylogenetischen Stammbaums gezeigt werden, dass die verschiedenen CcaF1 Homologe untereinander eine hohe Konservierung der Aminosäuren innerhalb ihrer konservierten Proteindomäne aufwiesen. Innerhalb der konservierten Abschnitte der verschiedenen CcaF1-Homologe wurden im Anschluss die konservierten Aminosäuren ermittelt.

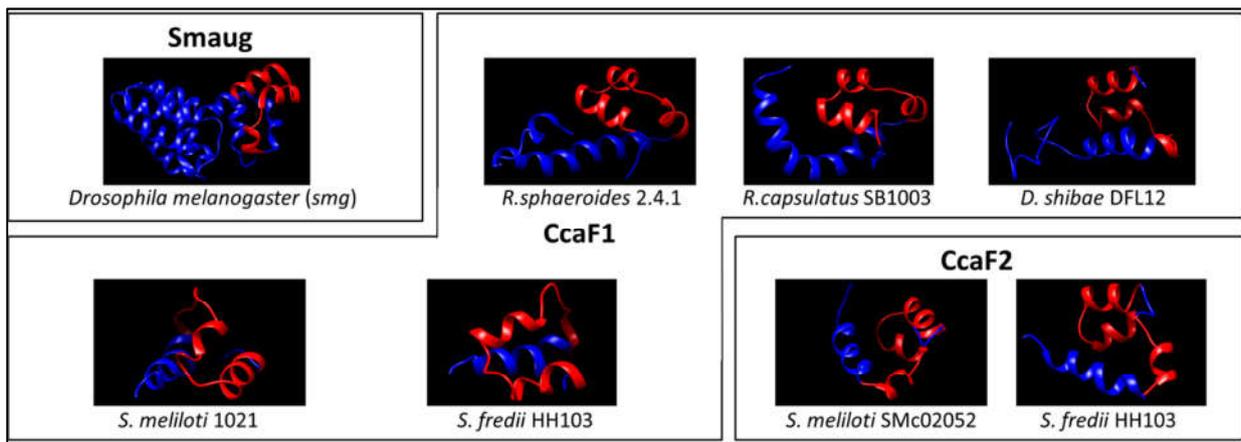


Abbildung 21: Strukturvorhersagen für CcaF Homologe aus verschiedenen Alphaproteobakterien. Mittels PHYRE2 ermittelte und mit Hilfe von UCSF CHIMERA eingefärbte Strukturvorhersagen für CcaF1- und CcaF2-Homologe aus verschiedenen Alphaproteobakterien im Vergleich zum Smaug-Protein aus *D. melanogaster*. Rot: homologe Bereiche der CcaF Proteine und der RNA-Bindedomäne des Smaug-Proteins, Blau: nicht homologe Bereiche.

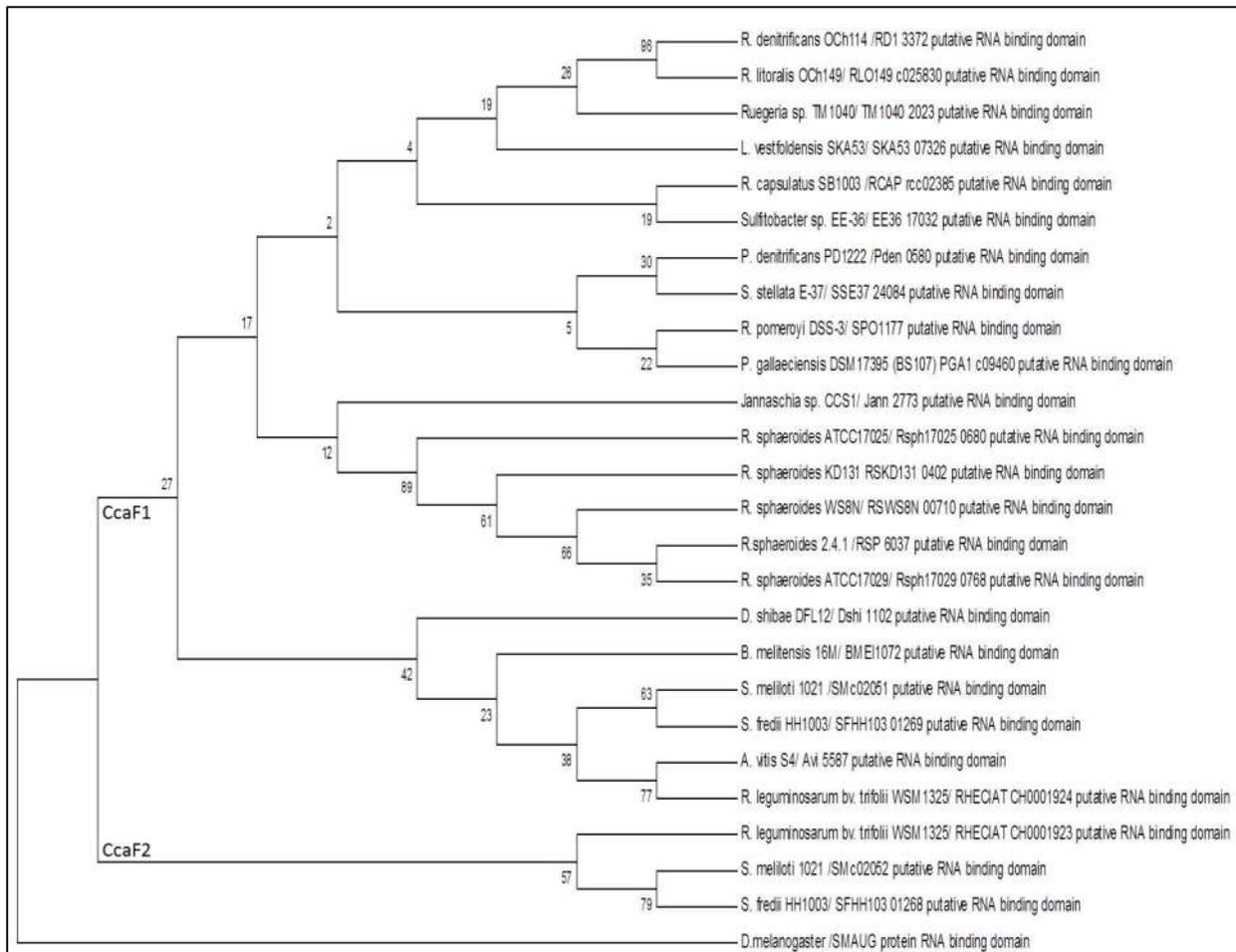


Abbildung 22: Phylogenetischer Stammbaums der konservierten Region der CcaF Homologe verschiedener Alphaproteobakterien. Zu sehen ist ein *Maximum Likelihood*-Stammbaum, wobei eine *Bootstrap*-Methode mit 200 Wiederholungen angewendet wurde. Als Aminosäureaustausch-Modell wurde das Jones-Taylor-Thornton (JTT) Modell genutzt.

Hierbei konnten einerseits Aminosäuren ermittelt werden, die zwischen dem Smaug Protein und den CcaF Homologen konserviert waren, auf der anderen Seite konnten Aminosäuren ermittelt werden, die nur in den verschiedenen CcaF Homologen, nicht aber in Smaug konserviert waren. Bei einer Vorhersage der Oberflächenstruktur mit der Hilfe von UCSF Chimera konnte dann gezeigt werden, dass die konservierten Aminosäuren innerhalb der CcaF Homologe wahrscheinlich an der Proteinoberfläche zu finden sind (Abb. 23).

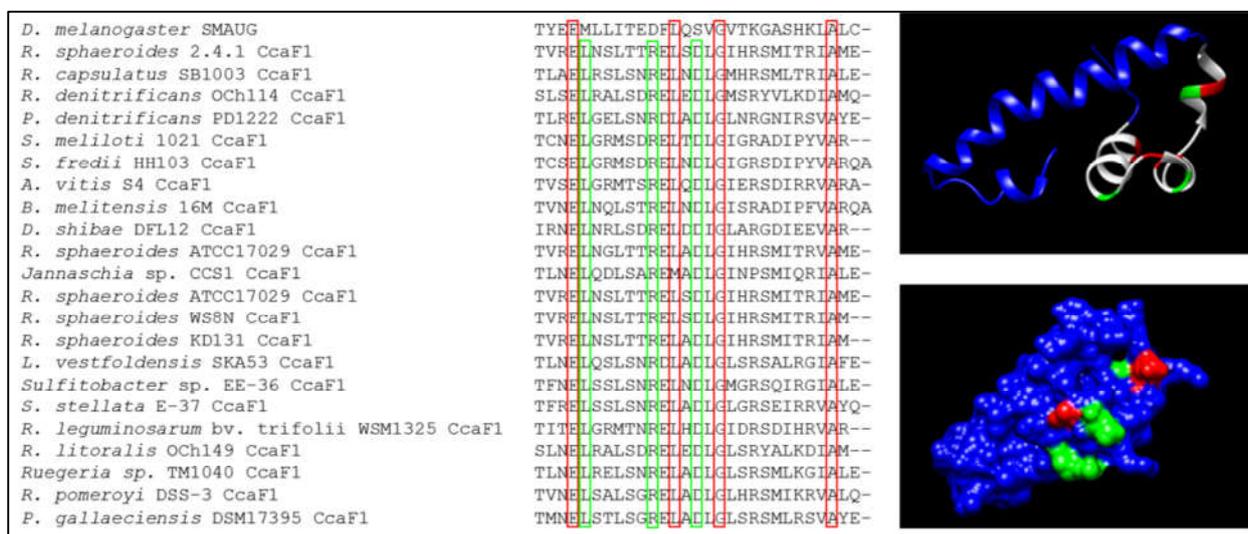


Abbildung 23: CcaF1 Homologe aus verschiedenen Alphaproteobakterien weisen eine besonders hohe Konservierung einzelner Aminosäuren innerhalb ihrer konservierten Proteindomäne auf. Zu sehen ist ein Aminosäure-Alignment der konservierten Abschnitte aus CcaF1 Homologen aus 22 Alphaproteobakterien im Vergleich zu einem Abschnitt der RNA-Bindedomäne des Smaug Proteins aus *D. melanogaster*. Zusätzlich ist eine Strukturvorhersage für CcaF1, sowie eine Vorhersage der CcaF Oberflächenstruktur, aus *R. sphaeroides* 2.4.1 gezeigt. In rot markiert sind Aminosäuren, die zwischen den CcaF Proteinen und Smaug konserviert sind, in grün markiert sind Aminosäuren, die in allen CcaF Proteinen, nicht aber in Smaug konserviert sind. In der Strukturvorhersage in weiß markiert ist der konservierte Bereich des CcaF Proteins, der für das Aminosäure-Alignment genutzt wurde.

3.2 Die Expression der CcsR RNAs wird durch Stress gesteuert

Nachdem eine klare Strukturkonservierung und konservierte Sequenzmotive der CcsR RNAs in verschiedenen Organismen gezeigt werden konnten und auch eine partielle Konservierung der genomische Organisation beobachtet werden konnte, stellte sich die Frage, ob auch die Expression der verschiedenen CcsR RNAs einem konservierten Muster folgt. Hierfür wurden zunächst in *R. sphaeroides* 2.4.1 Bedingungen ermittelt, in

denen die CcsR RNAs eine veränderte Abundanz aufweisen. Danach wurde die Expression von potentiellen CcsR Homologen aus anderen Alphaproteobakterien unter entsprechenden Bedingungen untersucht.

3.2.1 CcsR1-4 können differentiell detektiert werden und weisen andere Größen auf als in der Literatur beschrieben

Da der CcsR-Locus in *R. sphaeroides* 2.4.1 vier homologe CcsR-RNAs beinhaltet, wurde zunächst ein System etabliert, das eine individuelle Detektion der einzelnen CcsR RNAs ermöglichte. Hierfür wurden Oligonukleotidsonden für die individuellen sRNAs erstellt, die jeweils die volle Länge der sRNA laut Literatur umfassten. Mittels Northern Blot Analyse von RNA von *R. sphaeroides* 2.4.1 unter Hitzestress (10 min 42 s), was bekannten Induktionsbedingungen der CcsR RNAs entsprach, konnten hierdurch CcsR1 und CcsR2 spezifisch detektiert werden, während CcsR3 und CcsR4 auf Grund einer hohen Sequenzhomologie nur gemeinsam detektiert werden konnten (siehe Abb. 24).

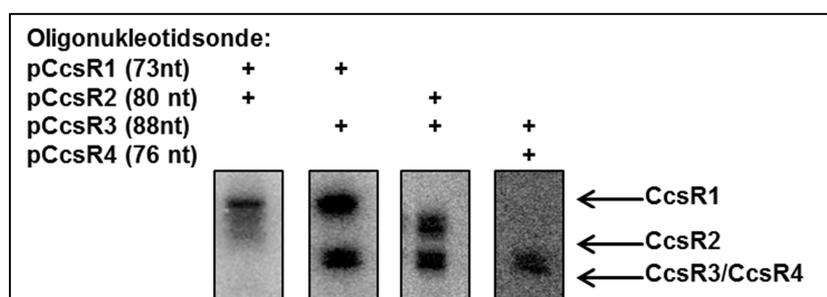


Abbildung 24: Differentielle Detektion von CcsR1-4 mittels Northern Blot. Zu sehen ist die Expression der sRNAs CcsR1-4 unter Hitzestressbedingungen (10 min 42 °C) untersucht mittels Northern Blot mit spezifischen Oligonukleotidsonden. Es ist zu erkennen, dass CcsR1 und CcsR2 spezifisch detektiert sind, während für CcsR3 und CcsR4 eine Kreuzreaktion der Oligonukleotidsonden zu beobachten ist.

Zusätzlich konnten im Zusammenhang mit der Analyse von Daten einer differentiellen RNA Sequenzierung (siehe 3.3.1) neue Größen für die sRNAs ermittelt werden. CcsR1 hatte eine korrigierte Größe von 83 Nukleotiden (vorher R_{SS}0680a 73 Nukleotide), während CcsR2 eine korrigierte Größe von 81 Nukleotiden (vorher R_{SS}0680b 80 Nukleotide) hatte. Für CcsR3 konnte eine korrigierte Größe von 78 Nukleotiden (vorher

RSs0680c 88 Nukleotide) ermittelt werden, während für CcsR4 auf Grund geringer Abdeckung in der differentiellen RNA Sequenzierung keine exakte korrigierte Größe ermittelt werden konnte. Jedoch legte das Ergebnis des Northern Blots, bei dem CcsR3 und CcsR4 eine verschwimmende Bande aufwiesen, eine Größe von 78 +/- 1 Nukleotiden nahe.

3.2.2 CcsR1-4 in *R. sphaeroides* 2.4.1 werden unter verschiedenen Stressbedingungen und in der stationären Wachstumsphase exprimiert

Um mehr Informationen über die Expressionsbedingungen der CcsR RNAs zu erlangen, wurde mittels Northern Blot Analyse RNA aus *R. sphaeroides* Kulturen unter verschiedenen Stressbedingungen untersucht. Hierfür wurde die Expression von CcsR1-4 im Vergleich zu anderen sRNAs der (photo-) oxidativen Stressantwort analysiert. Zunächst wurde RNA aus *R. sphaeroides* Kulturen in der exponentiellen Wachstumsphase mit RNA aus *R. sphaeroides* Kulturen in der stationären Wachstumsphase verglichen, wobei sowohl aerobe als auch mikroaerobe Bedingungen berücksichtigt wurden. Des Weiteren wurde RNA aus *R. sphaeroides* Kulturen in der exponentiellen Wachstumsphase unter aeroben Bedingungen und verschiedenen oxidativen Stressbedingungen analysiert und es wurde RNA aus *R. sphaeroides* Kulturen in der exponentiellen Wachstumsphase unter mikroaeroben Bedingungen unter Hitzestress, Salzstress oder Stress durch Metallionen untersucht (siehe Abb. 25). Hierbei stellte sich heraus, dass die CcsR RNAs generell unter mikroaeroben Bedingungen eine höhere Abundanz aufwiesen als unter aeroben Bedingungen. Zusätzlich war zu erkennen, dass die CcsR RNAs in der stationären Wachstumsphase eine höhere Abundanz aufwiesen als in der exponentiellen Wachstumsphase, wobei dieser Anstieg der Abundanz insbesondere unter aeroben Bedingungen zu beobachten war (siehe Abb. 25).

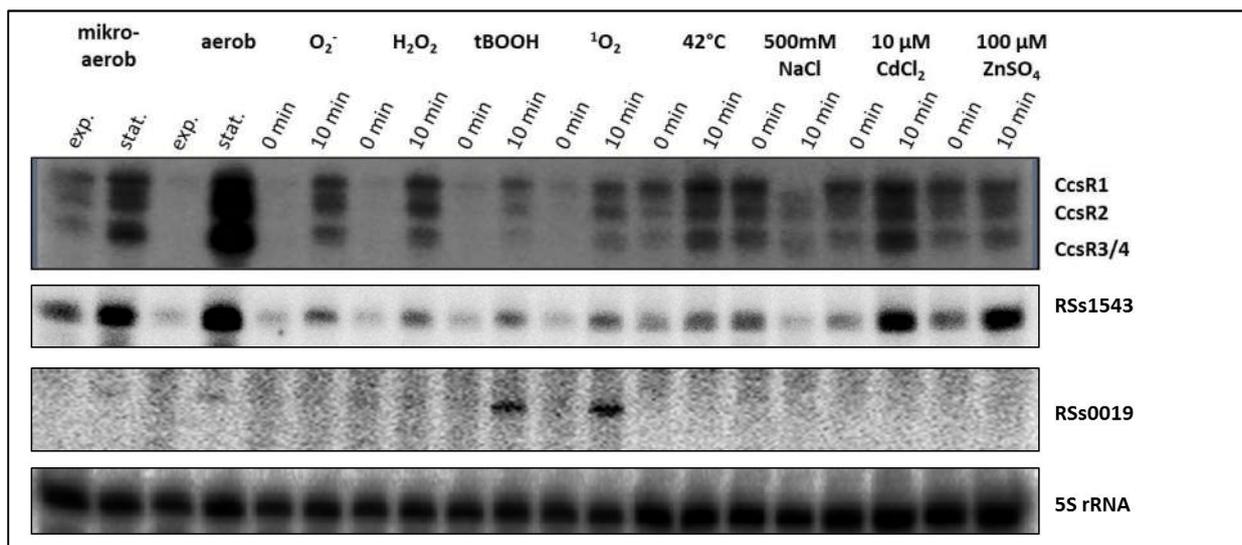


Abbildung 25: CcsR1-4 werden unter verschiedenen Stressbedingungen und in der stationären Wachstumshase exprimiert. Abgebildet ist eine Northern Blot Analyse von RNA aus *R.sphaeroides* 2.4.1 unter verschiedenen Stress- und Wachstumsbedingungen. Es ist zu erkennen, dass unter mikroaeroben Bedingungen in der exponentiellen Wachstumsphase ($OD_{660} = 0,4$) ein höheres Basallevel von CcsR1-4 und RSs1543 vorliegt, jedoch unter aeroben Bedingungen eine stärkere Induktion im Übergang in die stationäre Wachstumsphase zu erkennen ist. Zusätzlich ist zu erkennen, dass beide sRNAs in der stationären Wachstumsphase, durch oxidativen Stress (O_2^- durch 250 μ M Paraquat, aerob; Wasserstoffperoxid durch 1 mM H_2O_2 , aerob; 100 μ M tBOOH, aerob; 1O_2 = Singulett Sauerstoff durch 0,2 μ M Methylenblau und 800 W/m² Weisslicht, aerob), Hitzestress (10 min 42 °C mikroaerob) und Schwermetallstress (10 μ M $CdCl_2$, mikroaerob; 100 μ M $ZnSO_4$, mikroaerob) induziert werden, während sie durch Salzstress (500mM NaCl, mikroaerob) reprimiert werden. Für RSs0019 ist nur eine Induktion unter photooxidativen Stressbedingungen und eine Induktion durch tBOOH zu erkennen.

Eine erhöhte Abundanz der CcsR RNAs war auch unter verschiedenen oxidativen und photooxidativen Stressbedingungen (O_2^- durch 250 μ M Paraquat, aerob; Wasserstoffperoxid durch 1 mM H_2O_2 , aerob; 100 μ M tBOOH, aerob; 1O_2 = Singulett Sauerstoff durch 0,2 μ M Methylenblau und 800 W/m² Weisslicht, aerob) zu beobachten. Zusätzlich war unter Hitzestress (10 min 42 °C mikroaerob), sowie Stress durch Metallionen (10 μ M $CdCl_2$, mikroaerob; 100 μ M $ZnSO_4$, mikroaerob) die Abundanz der CcsR RNAs erhöht. Auch war zu beobachten, dass die vier CcsR RNAs einen gleichmäßigen Anstieg in ihrer Abundanz aufweisen, wodurch die Annahme einer Cotranskription unterstützt wurde. Im Gegensatz hierzu war eine verminderte Abundanz unter Salzsstress (500mM NaCl, mikroaerob) zu erkennen. Im Vergleich zeigte die sRNA RSs1543, welche auch von einem RpoH_I/RpoH_{II} abhängigen Promoter kontrolliert wird, unter gleichen Bedingungen eine vergleichbare Änderung der Abundanz.

Die von einem RpoE abhängigen Promoter kontrollierte sRNA RSs0019 zeigte erwartungsgemäß nur unter photooxidativen Stressbedingungen und unter oxidativem Stress, verursacht durch organische Peroxide, eine erhöhte Abundanz (siehe Abb. 25). Insgesamt konnte daraus geschlossen werden, dass die CcsR RNAs in *R. sphaeroides* wahrscheinlich im Rahmen einer allgemeinen Stressantwort induziert werden und dass das RpoH_I/RpoH_{II}-Regulon möglicherweise unter mehr Bedingungen aktiviert wird als bis jetzt beschrieben wurde.

3.2.3 CcsR RNAs verschiedener Alphaproteobakterien werden unter Stressbedingungen exprimiert

Nachdem in *R. sphaeroides* 2.4.1 verschiedene Bedingungen ermittelt wurden, unter denen die CcsR RNAs eine erhöhte Abundanz aufwiesen, wurde um eine mögliche Konservierung der CcsR-RNAs weiter zu untersuchen Gesamt-RNA verschiedener Alphaproteobakterien mit vorhergesagten CcsR-RNAs mittels Northern Blot auf die Expression der jeweiligen CcsR RNAs analysiert. Hierbei wurde deutlich, dass die Expression der CcsR RNAs in Organismen mit einem Typ I CcsR Locus zumindest teilweise konserviert war. So konnte gezeigt werden, dass sowohl in *R. sphaeroides* 2.4.1, als auch in *R. capsulatus* SB1003 und *R. capsulatus* 37b4 unter Hitzestress und oxidativem Stress CcsR RNAs induziert wurden (siehe Abb. 26). Im Gegensatz hierzu war in *P. denitrificans* PD1222 keine Erhöhung der Abundanz der CcsR RNAs unter diesen Stressbedingungen zu erkennen, während in *R. denitrificans* Och114 kein Nachweis von CcsR RNAs gelang (siehe Abb. 26). Ebenso war es nicht möglich, CcsR RNAs in *D. shibae* DFL12, dem einzigen Repräsentanten für Typ II CcsR-Loci, zu detektieren (siehe Abb. 26). Im Vergleich konnte in Rhizobien mit Typ III CcsR-Locus unter Stress eine Erhöhung der Abundanz von CcsR RNAs nachgewiesen werden.

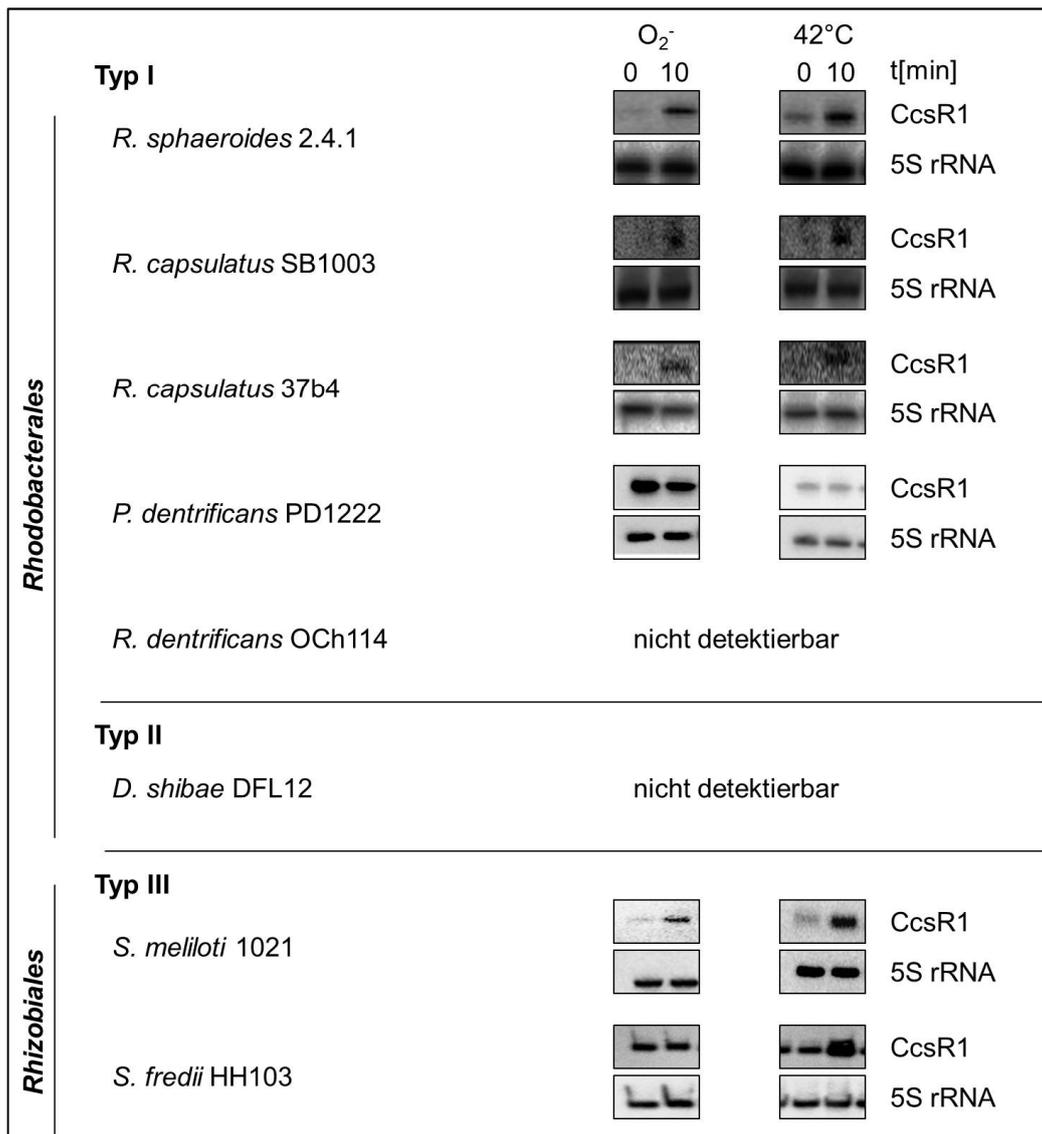


Abbildung 26: CcsR RNAs weisen in verschiedenen Alphaproteobakterien unter Stress eine erhöhte Abundanz auf. Abgebildet ist eine Northern Blot Analyse von RNA aus verschiedenen Alphaproteobakterien in der exponentiellen Wachstumsphase unter Hitzestress (10 min 42 °C, mikroaerob) oder oxidativem Stress (O₂⁻ durch 250 µM Paraquat, aerob).

So konnte in *S. meliloti* 1021 in GMX-Medium sowohl unter oxidativen Stressbedingungen eine schwache, als auch unter Hitzestress eine starke Induktion der CcsR1-Expression nachgewiesen werden. Im Vergleich zeigte *S. fredii* HH103 in TY-Medium eine erhöhte CcsR1 Basalexpression: Eine Induktion von CcsR1 unter oxidativen Stressbedingungen konnte für *S. fredii* HH103 nicht nachgewiesen werden, während unter Hitzestressbedingungen eine starke Induktion zu beobachten war (siehe Abb. 26).

3.3 Bestimmung von möglichen Interaktionspartnern der CcsR RNAs

Um einen ersten Einblick in eine mögliche Funktion der CcsR RNAs zu erlangen, wurden in *R. sphaeroides* verschiedene Analysen an CcsR1-4 durchgeführt, die sich mit der Prozessierung der sRNAs, möglichen RpoH_I/RpoH_{II}-unabhängigen Expressionsbedingungen, sowie möglichen Regulatoren und Interaktionspartnern der sRNAs beschäftigten.

3.3.1 Eine differentielle RNA-Sequenzierung legt interne Transkriptionsstarts innerhalb des *ccaf1*-CcsR Locus nahe

Mittels differentieller RNA-Sequenzierung (*dRNA-Seq.*) für *R. sphaeroides* RNA Proben aus Kulturen unter oxidativen Stressbedingungen (O₂⁻ durch 250 µM Paraquat, aerob) konnte bei einem Vergleich der mit terminaler Exonuklease behandelten Probe zur unbehandelten Referenz eine Anreicherung von *reads* für CcsR1-4 festgestellt werden (siehe Abb. 27, Daten zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. G. Klug).

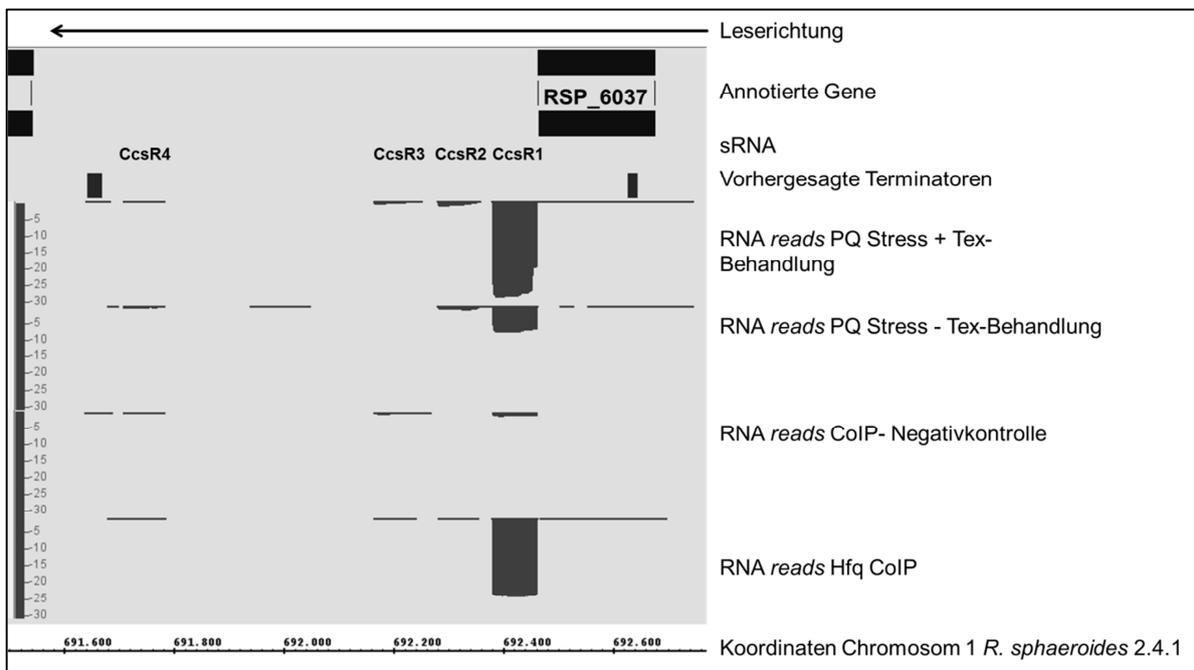


Abbildung 27: Eine Differentielle RNA Sequenzierung legt interne Transkriptionsstarts für das CcaF-CcsR1-4 Operon nahe. Zu sehen ist ein modifizierter Screenshot aus dem INTEGRATED GENOME BROWSER mit einem Abschnitt des Negativstrangs des bakteriellen Chromosoms 1 aus *R. sphaeroides* 2.4.1. Zu erkennen sind die Leserichtung der Transkription von 5' in 3'-Richtung, die laut NCBI Datenbank annotierten Protein-codierenden Gene, die Lokalisation der Gene für die sRNAs CcsR1-4 und mittels TRANSTERMHP vorhergesagte Terminatoren.

Auch wenn für kleine strukturierte RNAs häufig Messungenauigkeiten in dieser Methode zu beobachten sind und eine unabhängige Überprüfung notwendig ist, deutet dies an, dass eine Anreicherung von CcsR-RNA Primärtranskripten stattgefunden haben könnte und somit möglicherweise ein Teil der CcsR RNAs nicht aus einem Co-Transkript mit *ccaF1* prozessiert wird.

3.3.2 Bestimmung möglicher PrrA Bindemotive innerhalb des *ccaF1*-CcsR Locus

Da eine Fraktion CcsR RNAs in *R. sphaeroides* möglicherweise nicht durch Prozessierung aus einem RpoH_I/RpoH_{II} abhängig gebildetem Primärtranskript gebildet wird, stellte sich im Folgenden die Frage nach den Expressionsbedingungen und Regulatoren dieser Fraktion der CcsR RNAs. Interessant hierbei erschien die Beobachtung, dass die Abundanz der CcsR RNAs auch an den Sauerstoffpartialdruck des umgebenden Mediums gekoppelt war (siehe oben). Ein typisches Regulatorsystem unter solchen Bedingungen stellt in *R. sphaeroides* das PrrA/PrrB System dar. Zwischen Transkriptionsstart des *ccaF1*-CcsR1-4 Primärtranskripts und dem 3' Ende von CcsR1 befinden sich 4 Bereiche, deren Sequenzen potentiellen Bindestellen für PrrA entsprechen könnten (siehe Abb. 28 & Abb. 29).

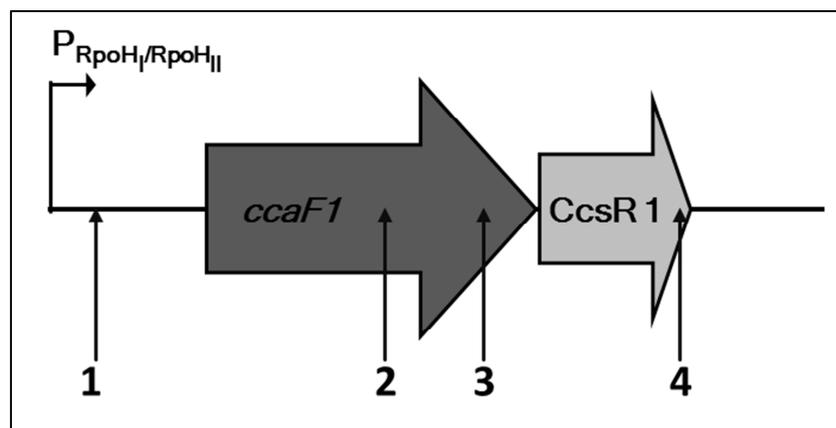


Abbildung 28: Lokalisation verschiedener potentieller PrrA Bindestellen innerhalb von *ccaF1* und CcsR1. Dargestellt ist die Lokalisation vier potentieller PrrA Bindestellen. Die potentiellen Bindestellen befinden sich in der 5' UTR von *ccaF1*, innerhalb der codierenden Region von *ccaF1* und innerhalb der 3' Region von CcsR1.

cgttccgcga	ca---a-aca	gaggtc	cbbII2
gtgatcgcat	cg---agccg	caccat	cbbI1
tcccctgcgg	ca--aa-gcg	tctttc	cbbIII1
cgttgtgcgg	ca--at-ccg	tcatat	cycA P2
acgagggcgc	gc---agctg	cttcag	cbbI2
agcactgcga	cag--a-atg	acctcg	cbbI3
gctgaagggc	cgc--aggca	ggacca	cbbII5
ggcgtggtgc	aggc-tgtcg	cggcgg	cbbII6
ccatctgcgc	gac-atgatg	gtccgt	cbbII3
tttcgcgccg	cggc-tgggtg	aagatg	cbbI4
gttcttgccg	gtcatttccg	cgcagg	cbbII4
-----YGCGR	CR--MMGNCG	C-----	Abgeleitete Konsensussequenz
-cccatgcgg	cgcattg-tg	cagatg	Bindestelle 1
gctctcgcgc	ag---cgccg	gatcta	Bindestelle 2
cgcacgcga	tgg-aagccg	cctacg	Bindestelle 3
gcagcagcgg	cg--acgcct	ctcctc	Bindestelle 4

Abbildung 29: Sequenzen verschiedener potentieller PrrA Bindestellen innerhalb des *ccaF1*-CcsR Locus. Dargestellt ist ein *Alignment* potentieller PrrA Bindestellen in der 5' UTR von *ccaF1*, innerhalb der codierenden Region von *ccaF1* und innerhalb der 3' Region von CcsR1 mit bekannten PrrA Bindestellen für PrrA basierend auf Laguri *et al.* 2003.

Hierbei befindet sich eine potentielle Bindestelle in der 5' UTR von *ccaF1* und zwei potentielle Bindestellen konnten innerhalb der codierenden Region von *ccaF1* identifiziert werden. Eine weitere potentielle Bindestelle konnte innerhalb der 3' Region von CcsR1 vorhergesagt werden. Hiermit konnte gemutmaßt werden, dass die CcsR-RNA Expression zusätzlich auch RpoH_I/RpoH_{II} unabhängig durch das PrrA/PrrB-System gesteuert werden könnte, jedoch muss dies durch weitere Experimente verifiziert werden.

3.3.3 Ermittlung von beteiligten Faktoren in Reifung und Funktion von CcsR1-4

Nachdem verschiedene Induktionsbedingungen für CcsR1-4 in *R. sphaeroides* ermittelt werden konnten, stellte sich die Frage, wie aus dem Primärtranskript aus *ccaF1* und den vier CcsR RNAs die einzelnen sRNAs gebildet werden können, und welche Interaktionspartner die sRNAs brauchen, um ihre Wirkung entfalten zu können. Hierfür wurden verschiedene Experimente *in vitro* und *in vivo* durchgeführt.

CcsR1* bindet *Hfq* *in vitro

Zunächst wurde mittels aufgereinigtem *R. sphaeroides* Hfq getestet, ob eine Interaktion mit CcsR *in vitro* stattfindet. Um dieses zu erreichen, wurde aufgereinigtes Hfq mit der radioaktiv markierten sRNA CcsR1 inkubiert und anschließend mittels eines *Electrophoretic mobility shift assay* (EMSA) untersucht.

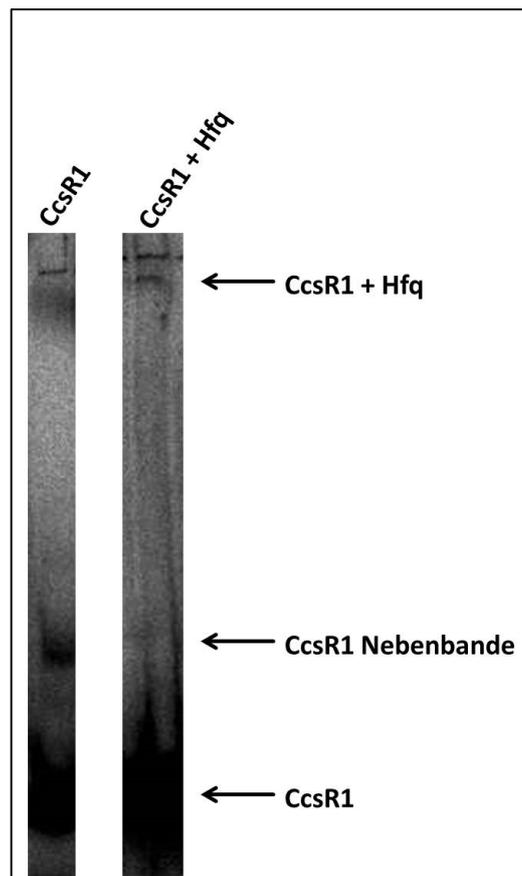


Abbildung 30: CcsR1 interagiert *in vitro* mit Hfq. Dargestellt sind die Ergebnisse einer EMSA Analyse zur Überprüfung einer Interaktion von CcsR1 mit Hfq. Inkubiert wurden 250 fmol der radioaktiv markierten sRNA CcsR1 mit 5 μ L frisch aufgereinigtem Hfq.

Hierbei stellte sich heraus, dass eine Interaktion zwischen CcsR1 und Hfq auch *in vitro* zu beobachten war. So war für CcsR1 eine schwache Bande im Gel zu erkennen, die bei Inkubation mit Hfq verschwand (siehe Abb. 30). Eine weitere starke Bande, die wahrscheinlich eine andere Faltungsform von CcsR1 darstellte, zeigte keine Veränderung (siehe Abb. 30). Hieraus wurde geschlossen, dass die CcsR1 Struktur möglicherweise Einfluss nimmt auf die Interaktion mit Hfq.

***RppH*, RNase J und RNase III sind nicht essentiell für die Prozessierung von CcsR1-4**

Die beobachtete direkte Interaktion von CcsR1 mit Hfq legte nahe, dass das Transkript aus *ccaF1* und CcsR1-4 möglicherweise durch RNasen des Degradosoms prozessiert wird, welches mit Hfq assoziiert ist. Um die Beteiligung verschiedener RNA prozessierender Enzyme an der Reifung der CcsR RNAs zu untersuchen, wurde Gesamt-RNA des *R. sphaeroides* 2.4.1 Wildtyp Stamms mit Gesamt-RNA aus einer *RppH*- Deletionsmutante (RNA 5'-Pyrophosphohydrolase, RSP_0931) und aus einer RNase J /RNase III Doppeldeletionsmutante (Δrnj (RSP_2534) & Δrnc (RSP_1675)) mittels Northern Blot verglichen.

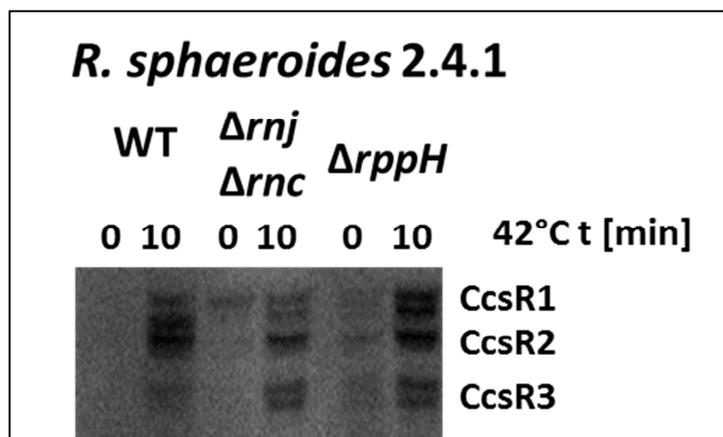


Abbildung 31: Die Expression von CcsR1-4 ist unabhängig von RNase J, RNase III und RppH. Abgebildet sind die Ergebnisse eines Northern Blots von Gesamt RNA aus *R. sphaeroides* 2.4.1, sowie von Gesamt RNA aus endogenen Deletionsmutanten der RNA prozessierender Enzyme RNase J und RNase III ($\Delta rnj\Delta rnc$), sowie der RNA 5' Pyrophosphohydrolase (*rppH*) unter Hitzestressbedingungen (10 min 42 °C). Es ist zu erkennen, dass alle getesteten Stämme das gleiche Bandenmuster für CcsR1-4 aufweisen.

Hierbei stellte sich heraus, dass der Wildtyp Stamm und die verschiedenen Mutanten das gleiche Bandenmuster und eine Induktion der CcsR RNAs unter Hitzestress aufwiesen. Hieraus wurde geschlossen, dass die beschriebenen RNA prozessierenden Enzyme nicht essentiell sind für die Reifung der CcsR RNAs (siehe Abb. 31).

CcsR1-4 werden in *E. coli* von RNase E prozessiert

Neben RNase J, RNase III und RppH gehört insbesondere RNase E zu den zentralen und essentiellen RNA prozessierenden Enzymen vieler Bakterien. Da eine Deletion von RNase E in *R. sphaeroides* letal ist, musste der Einfluss dieses Enzyms auf die Prozessierung von CcsR1-4 mit Hilfe einer temperatursensitiven *E. coli* RNase E Mutante (*E. coli* N3431) untersucht werden. Hierfür wurden CcsR1-4 aus *R. sphaeroides* in der temperatursensitiven RNase E Mutante und dem korrespondierenden Wildtyp (*E. coli* N3433) von einem Plasmid exprimiert. Die Gesamt RNA aus beiden Stämmen wurde mittels Northern Blot verglichen.

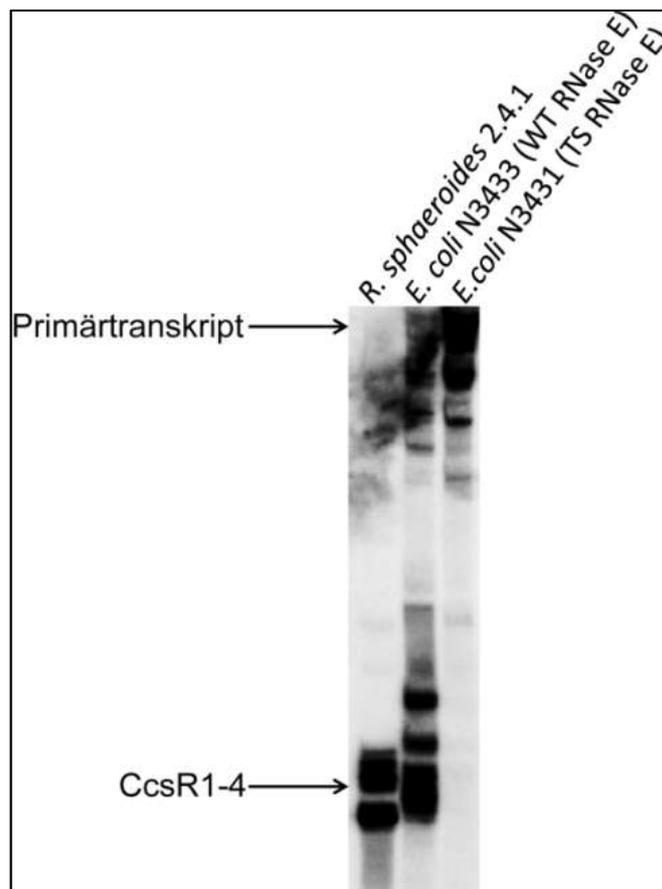


Abbildung 32: Prozessierung von CcsR1-4 in einer temperatursensitiven *E. coli* RNase E Mutante. Abgebildet ist ein Northern Blot mit Gesamt RNA aus *R. sphaeroides* 2.4.1 unter Hitzestressbedingungen (10 min, 42 °C) im Vergleich zu Gesamt RNA aus *E. coli* N3433 mit dem CcsR1-4 Expressionsplasmid pRCcsR1-4 und der endogenen temperatursensitiven RNase E Mutante *E. coli* N3431 mit pRCcsR1-4 nach einer Hitzestressbehandlung (120 min, 42 °C). Zu sehen sind CcsR1-4 in *R. sphaeroides*, ein Transkript ähnlicher Größe in *E. coli* N3433 und ein angereichertes Primärtranskript in der temperatursensitiven RNase E Mutante *E. coli* N3431.

Es zeigte sich, dass in der RNase E Mutante nach Exposition unter Hitzestressbedingungen mehrere relativ lange Transkripte, bei denen es sich vermutlich um Primärtranskripte handelte, akkumulierten, während im Wildtypstamm neben diesen Primärtranskripten verstärkt kürzere Transkripte akkumulierten, die eine ähnliche Größe wie CcsR1-4 aus *R. sphaeroides* 2.4.1 aufwiesen (siehe Abb. 32). Um einen weiteren Einblick in die mögliche Prozessierung der CcsR RNAs durch RNase E zu bekommen, wurde die Bildung der CcsR RNAs in *E. coli* N3433 und *E. coli* N3431 über eine andauernde Hitzestressexposition untersucht.

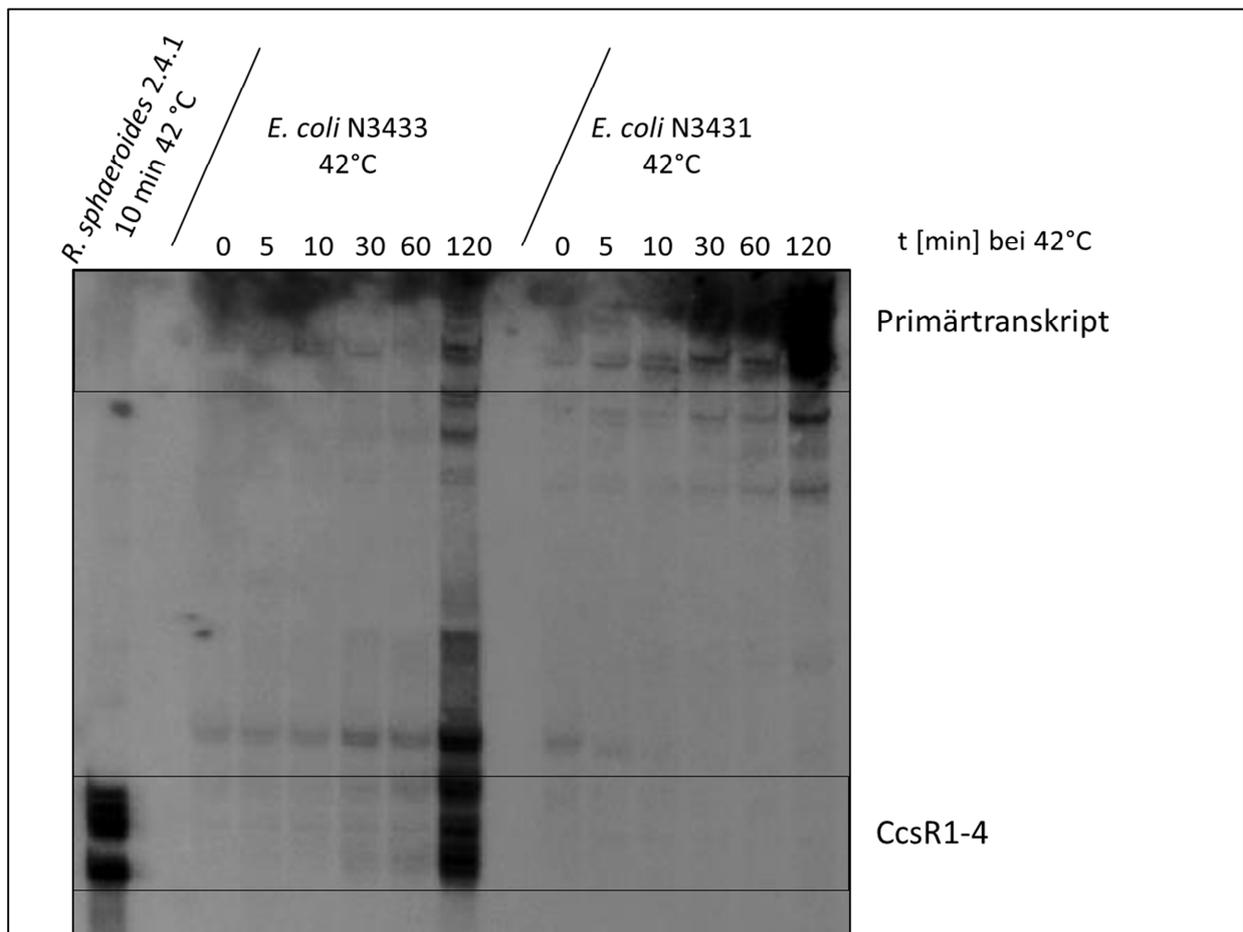


Abbildung 33: Die Erhöhung der Umgebungstemperatur inhibiert schrittweise die Prozessierung von CcsR1-4 in einer temperatursensitiven *E. coli* RNase E Mutante. Abgebildet ist ein Northern Blot mit Gesamt RNA aus *R. sphaeroides* 2.4.1 unter Hitzestressbedingungen (10 min, 42 °C) im Vergleich zu Gesamt RNA aus *E. coli* N3433 mit dem CcsR1-4 Expressionsplasmid pRCcsR1-4 und der endogenen temperatursensitiven RNase E Mutante *E. coli* N3431 mit pRCcsR1-4 im Verlauf einer Hitzestressexposition.

Hierbei zeigte sich, dass in der temperatursensitiven *E. coli* RNase E Mutante N3431 und im Wildtyp N3433 bei einer Inkubation bei 32 °C sowohl verschiedene relativ lange Transkripte zu detektieren waren, als auch Transkripte die in ihrer Größe ungefähr CcsR1-4 entsprachen (siehe Abb. 33). Über den Verlauf der Hitzestressbehandlung erfolgte im Wildtyp N3433 eine schrittweise Anreicherung der kurzen CcsR1-4 ähnlichen Transkripte und es war ein sprunghafter Anstieg der detektierten Gesamttranskriptmenge nach 120 Minuten zu erkennen (siehe Abb. 33). Im Gegensatz hierzu zeigte die temperatursensitive RNase E Mutante N3431 im Verlauf der Hitzestressexposition eine Abnahme der Transkriptmenge für die kurzen CcsR1-4 ähnlichen Transkripte über die Expositionszeit, während eine Zunahme der Abundanz der längeren Primärtranskripte mit einem sprunghaften Anstieg nach 120 Minuten zu beobachten war (siehe Abb. 33). Hieraus wurde geschlossen, dass das Primärtranskript aus CcsR1-4 unter Beteiligung von RNase E prozessiert wird.

3.3.4 CcaF1 beeinflusst die sRNAs CcsR1-4 in *R. sphaeroides* 2.4.1 und eine direkte Interaktion mit den CcsR RNAs ist denkbar

Neben der gezeigten Beeinflussung der Prozessierung von CcsR1-4 durch RNase E ist ein Einfluss von weiteren Faktoren auf die Funktion der sRNAs zu vermuten. Hierbei ist durch die Co-Transkription von *ccaF1* (RSP_6037) mit CcsR1-4 und die hohe Homologie mit bekannten RNA-Bindeproteinen CcaF1 von besonderem Interesse. Um einen ersten Einblick in die mögliche Interaktion zwischen den sRNAs und CcaF1 zu gewinnen, wurden verschiedene Überexpressionsstämme von CcsR1-4 und *ccaF1* genutzt. Hierbei wurden Überexpressionen für CcsR1-4 allein, CcsR1-4 zusammen mit *ccaF1* oder CcsR1-4 zusammen mit *ccaF1*, welches ein mutiertes Startcodon (ATG=Methionin zu TGA=Stopp) aufwies, erstellt. Diese wurden mit einer Leervektorkontrolle mit dem Plasmid pRK415 in Bezug auf ihre Resistenz gegen

oxidativen Stress verglichen (siehe Abb. 34 & Abb. 35). Hierbei zeigte sich, dass eine konstitutive Überexpression von CcsR1-4, wie bereits beschrieben, in Hemmhoftests mit 200 mM Paraquat und 700 mM tBOOH die Resistenz gegenüber oxidativem Stress erhöhte. Eine Co-Überexpression des *ccaF1* Gens revidierte diesen Effekt.

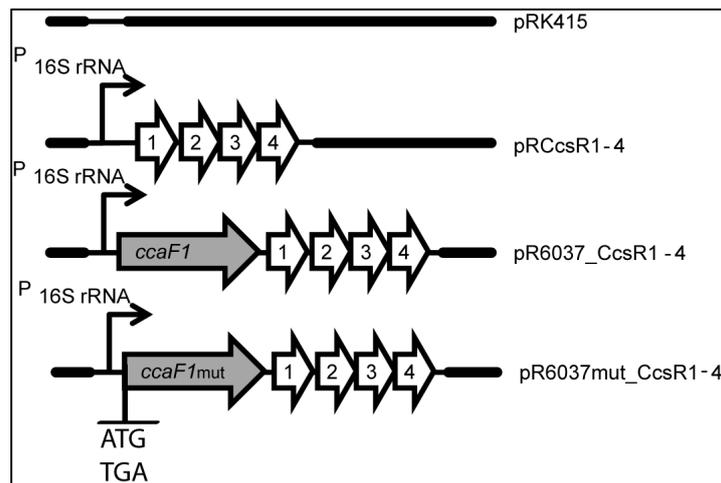


Abbildung 34: Schematische Darstellung der auf pRK415 basierenden CcaF1/CcsR1-4 Überexpressionsplasmide. Dargestellt sind Ausschnitte aus den Plasmiden pRK415 (Leervektorkontrolle), pRCcsR1-4 (CcsR1-4 Überexpression), pR6037_CcsR1-4 (*ccaF1*-CcsR1-4 Überexpression) und pR6037mut_CcsR1-4 (*ccaF1*-CcsR1-4 Überexpression mit Startcodonmutation (ATG=Methionin zu TGA=Stopp) in *ccaF1*).

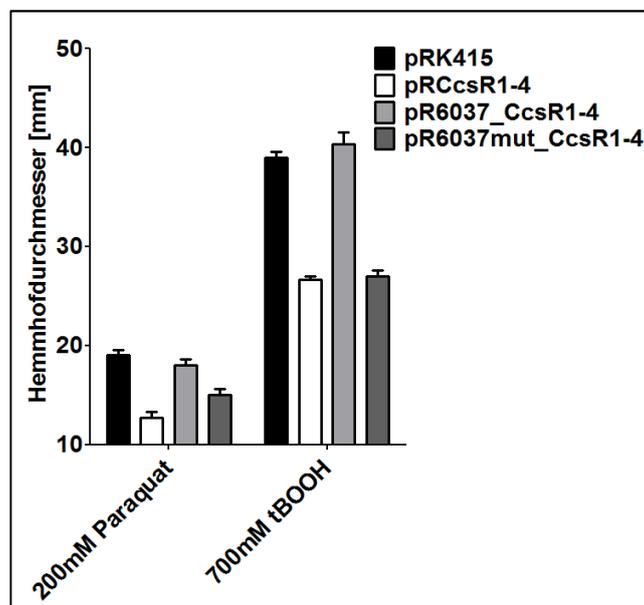


Abbildung 35: Eine Mutation im Startcodon von *ccaF1* revidiert den Effekt der Co-Überexpression des *ccaF1* Gens auf die induzierte Resistenz gegen oxidativen Stress durch CcsR1-4. Dargestellt sind Daten aus Hemmhoftests mit *R. sphaeroides* 2.4.1 mit den Plasmiden pRCcsR1-4 (CcsR1-4 Überexpression), pR6037_CcsR1-4 (*ccaF1*-CcsR1-4 Überexpression) und pR6037mut_CcsR1-4 (*ccaF1*-CcsR1-4 Überexpression mit Startcodonmutation in *ccaF1*) unter Einfluss von 200 mM Paraquat oder 700 mM tBOOH. Die individuellen Balken repräsentieren den Durchschnitt aus drei biologischen Replikaten und die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von diesem Durchschnitt an.

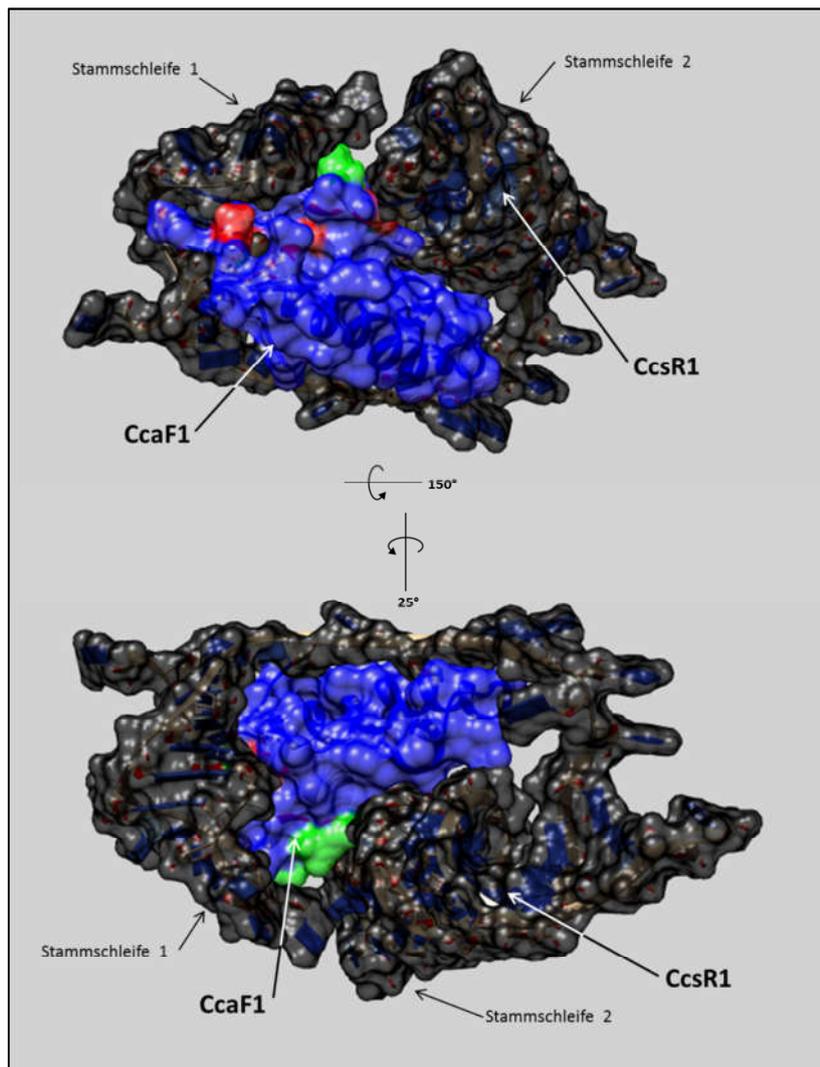


Abbildung 36: Die *in silico* 3D-Strukturen von CcsR1 und CcaF1 deuten auf eine mögliche Interaktion hin. Dargestellt ist eine mit UCSFCHIMERA erstellte Fusion aus *in silico* 3D-Strukturvorhersagen für CcaF1 (PHYRE2) und CcsR1 (RNACOMPOSER). In dunkelgrau dargestellt ist CcsR1, in blau CcaF1. Konservierte Aminosäuren innerhalb von CcaF1 sind farblich hervorgehoben. In rot markiert sind Aminosäuren, die zwischen den CcaF Proteinen verschiedener Alphaproteobakterien und in Smaug aus *D. melanogaster* konserviert sind, in grün markiert sind Aminosäuren, die nur in den CcaF Proteinen konserviert sind.

Durch Austausch des ATG Startcodons von *ccaF1* durch ein TGA-Stopcodon wurde die Resistenz gegenüber oxidativem Stress wiederhergestellt (siehe Abb. 35). Daraus wurde geschlossen, dass das Proteinprodukt des *ccaF1* Gens für den beschriebenen Effekt verantwortlich ist und wahrscheinlich mit CcsR1-4 interagiert. Eine Analyse von *in silico* ermittelten 3D-Strukturen von CcsR1 (siehe Anhang Abb. A1) und CcaF1 (siehe Abb. 21) aus *R. sphaeroides* 2.4.1 zeigte, dass CcaF1 möglicherweise unter Beteiligung der konservierten Aminosäuren an CcsR1 binden könnte.

Hierbei war eine Anlagerung von CcaF1 an helikale Strukturen in den Stammschleifen von CcsR1 denkbar und der Raum im einzelsträngigen Bereich zwischen den beiden Stammschleifen von CcsR1 war von CcaF1 ausgefüllt (siehe Abb. 36). Eine Verifizierung mittels unabhängiger Experimente ist an dieser Stelle jedoch notwendig.

3.4 Mögliche Funktionen der CcsR-RNAs innerhalb der zellulären Regulation

Nachdem erste Erkenntnisse über die sRNAs CcsR1-4 aus *R. sphaeroides* gewonnen wurden und eine mögliche Konservierung in verschiedenen Alphaproteobakterien gezeigt werden konnte, stellte sich die Frage nach der Funktion der sRNAs. Die Induktion einer Resistenz gegen oxidativen Stress durch CcsR1-4 und die RpoH_I/RpoH_{II}-abhängige Expression in *R. sphaeroides* legten hierbei insbesondere die Suche nach einer Funktion innerhalb der oxidativen Stressantwort nahe. Um diese Funktion und mögliche weitere Funktionen näher zu bestimmen, wurde *R. sphaeroides* als Modellorganismus beibehalten, in dem eine zelluläre Funktion der CcsR RNAs bestimmt wurde. Hierfür wurden die Daten aus einer Transkriptomanalyse und einer Proteomanalyse eines CcsR1-4 Überexpressionstamms mit bioinformatischen Analysen kombiniert. Die gewonnenen Erkenntnisse aus diesen Analysen wurden mittels molekularbiologischer, mikrobiologischer und biochemischer Methoden validiert und abschließend mittels bioinformatischer Methoden auf weitere Alphaproteobakterien angewandt.

3.4.1 Ermittlung potentieller CcsR1-4 Targets in *R. sphaeroides* 2.4.1

Um mögliche Gene zu ermitteln, deren Expression in *R. sphaeroides* 2.4.1 durch die CcsR RNAs beeinflusst wird, wurde zunächst nach Möglichkeiten gesucht die Abundanz von CcsR1-4 in *R. sphaeroides* 2.4.1 zu verändern. Hierbei stellte sich heraus, dass eine Deletion einzelner oder mehrerer CcsR-RNAs nicht erreicht werden konnte. Da

eine Überexpression der CcsR RNAs CcsR1-4 von einem Plasmid in *R. sphaeroides* 2.4.1, wie in Billenkamp 2010 beschrieben, zu einer erhöhten Resistenz gegenüber oxidativem Stress führt, wurde davon ausgegangen, dass eine solche Überexpression geeignet ist für eine weitergehende Analyse. Für diese Analyse wurden das Transkriptom und das Proteom eines *R. sphaeroides* Stammes mit konstitutiver CcsR1-4 Überexpression mit einer entsprechenden Leervektorkontrolle verglichen (siehe Abb. 37). Danach wurde eine genomweite bioinformatische Suche nach Interaktionspartnern von CcsR1-4 durchgeführt und mit den Daten der Transkriptom- und Proteomanalysen verglichen.

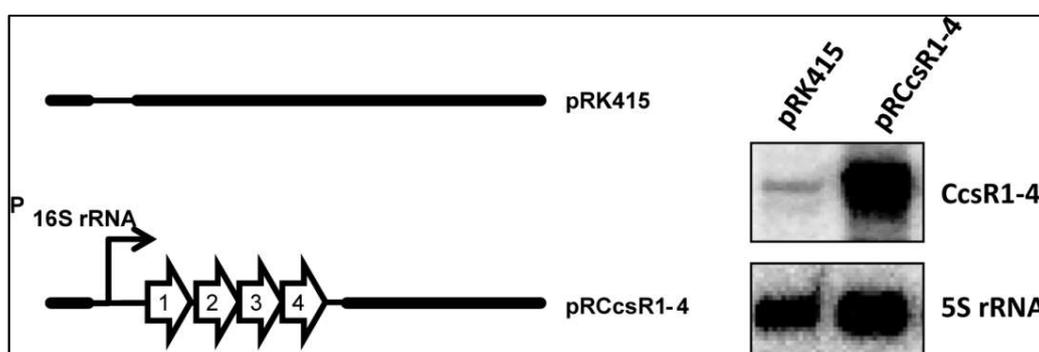


Abbildung 37: Schematische Darstellung des CcsR1-4 Überexpressionsplasmids pRCcsR1-4. Dargestellt sind Ausschnitte aus den Plasmiden pRK415 (Leervektorkontrolle) und pRCcsR1-4 zusammen mit einer Northern Blot Kontrolle mit Gesamt RNA aus *R. sphaeroides* 2.4.1 in der exponentiellen Wachstumsphase unter aeroben Bedingungen mit einem der beiden Plasmide.

Eine Überexpression von CcsR1-4 führt zu einer Repression der mRNAs von Genen, deren Produkte dem C1 Metabolismus und dem Pyruvatdehydrogenase-Komplex zugeordnet werden

Um den Einfluss von CcsR1-4 auf die globale Genexpression zu untersuchen, wurde zunächst das Transkriptom eines CcsR1-4 Überexpressionsstammes unter aeroben Bedingungen in der exponentiellen Wachstumsphase mit einer entsprechenden Leervektorkontrolle verglichen. Eine Analyse der Daten zeigte, dass rund 1 % der Transkripte mit einem verlässlichen Fluoreszenzwert eine eindeutige Veränderung der Expression aufwiesen.

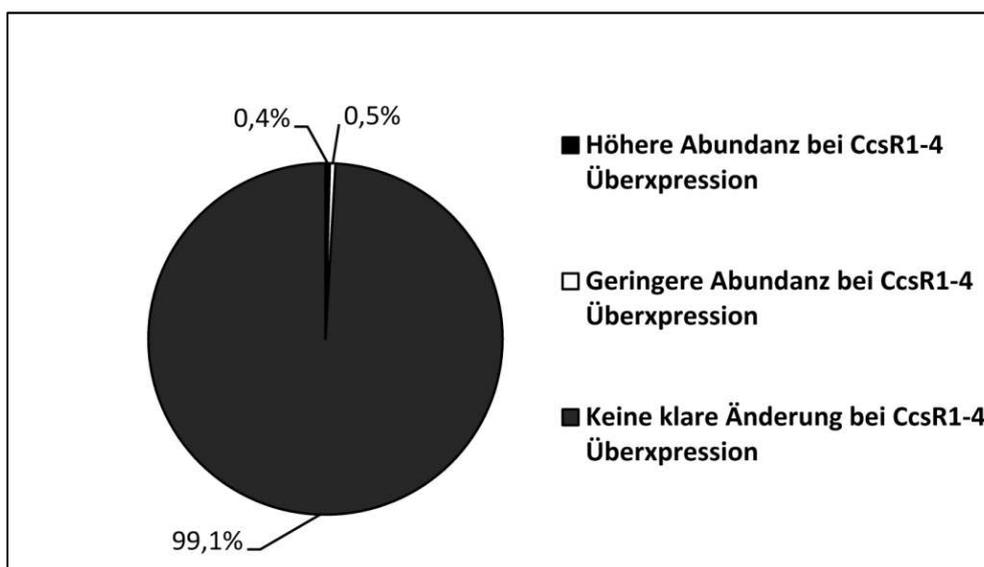


Abbildung 38: Globale Änderungen der Genexpression von *R. sphaeroides* 2.4.1 durch CcsR1-4 Überexpression. Angezeigt sind die globalen Änderungen in der Transkriptabundanz für einen *R. sphaeroides* 2.4.1 Überexpressionsstamm der sRNAs CcsR1-4 im Vergleich zu einer Leervektorkontrolle unter aeroben Wachstumsbedingungen ermittelt durch eine *Microarray*-Analyse.

Hierbei zeigten 0,4 % der Transkripte eine höhere Expression ($\log_2(\text{Ratio}) \geq 0.7$) und 0,5 % eine niedrigere Expression ($\log_2(\text{Ratio}) \leq -0.7$, siehe Abb. 38). Unter den Transkripten mit Anstieg in der Abundanz bei CcsR1-4 Überexpression waren die sRNAs CcsR1-3, die erwartungsgemäß den stärksten Anstieg von allen Transkripten aufwiesen, zu finden. Des Weiteren waren eine sRNA, RSs1543, deren Funktion in der Beeinflussung des Metabolismus unter oxidativem Stress beschrieben ist, und 10 Protein-codierende Gene, denen keine zusammenhängende Funktion zugeordnet werden konnte, zu finden (siehe Abb. 39). Bei der Analyse von mRNAs, die im Vergleich zur Leervektorkontrolle eine verminderte Abundanz aufwiesen, zeigte sich, dass insbesondere verschiedene Gene für Untereinheiten des Pyruvat-dehydrogenase-Komplexes und Gene für Enzyme des C1 Metabolismus eine verringerte Expression aufwiesen. Hierbei zeigten für den Pyruvatdehydrogenase-Komplex die Untereinheiten *pdhD* (RSP_2968, Dihydrolipoamid-dehydrogenase), *pdhAb* (RSP_4049, Dehydrolipoamidacetyltransferase) und *pdhB* (RSP_4050, Deydrolipoamid-acetyltransferase) eine verringerte Expression (siehe Abb. 39).

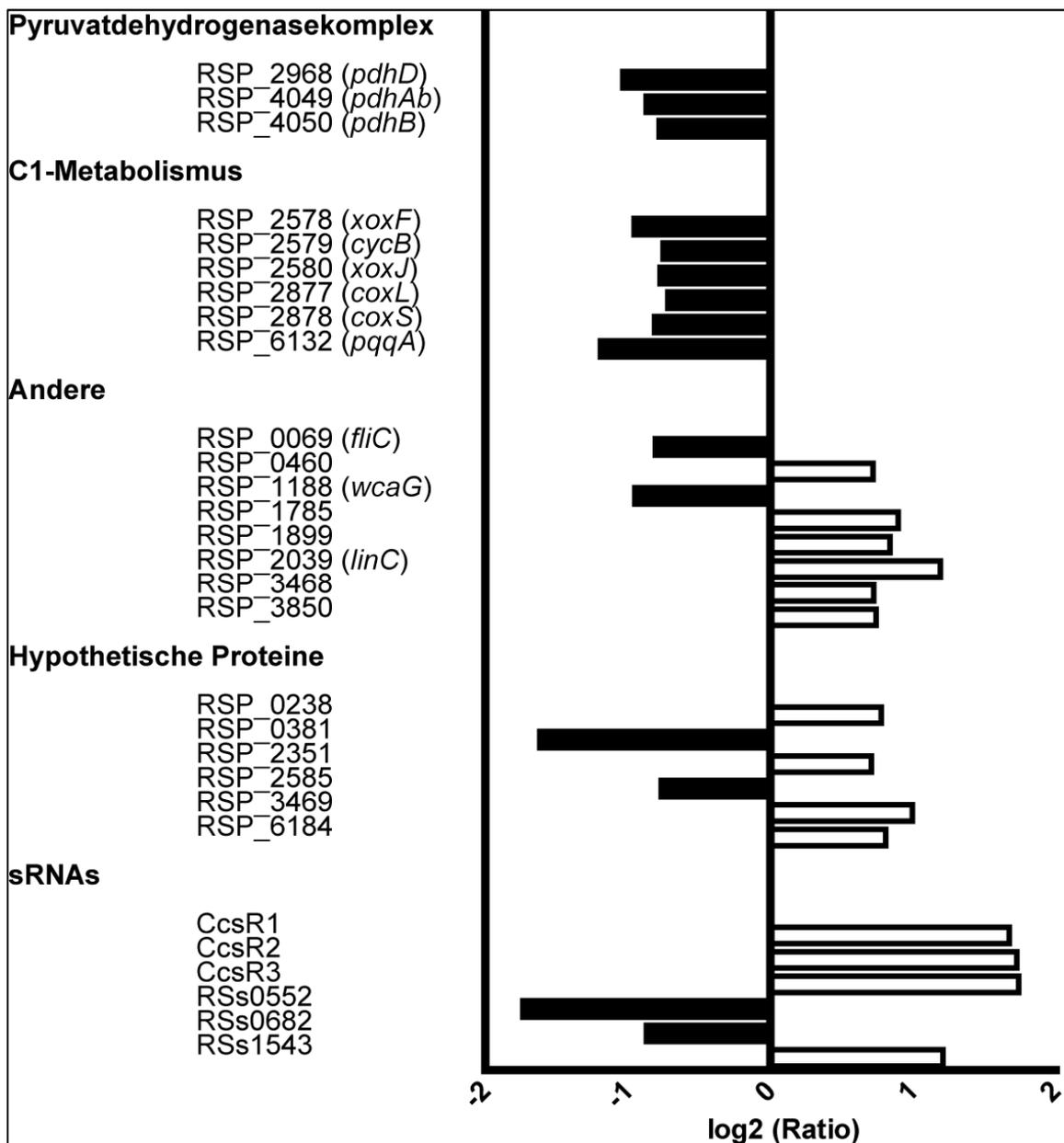


Abbildung 39: Eine Konstitutive Überexpression von CcsR1-4 führt zur Repression von Genen des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes und von Genen des C1-Metabolismus. Dargestellt sind Ergebnisse einer *Microarray*-Analyse zur Untersuchung von Effekten einer konstitutiven CcsR1-4 Überexpression unter aeroben Bedingungen. Hierfür wurden die sRNAs CcsR1-4 unter Kontrolle des RSP_4352 16S rRNA Promotors von einem Plasmid exprimiert (*R. sphaeroides* 2.4.1 (pRCcsR1-4)) und mit einer Leervektorkontrolle (*R. sphaeroides* 2.4.1 (pRK415)) verglichen.

Unter den Enzymen des C1- Metabolismus und den zugeordneten Cytochromen und Co-Faktoren war insbesondere eine verminderte Expression von *xoxF* (RSP_2578, putatives PQQ-Dehydrogenase Protein), *cycB* (RSP_2579, Cytochrom c533i), *xoxJ* (RSP_2580, putative Methanoxidase), *coxL* und *coxS* (RSP_2877 & RSP_2878, Untereinheiten einer putativen Kohlenstoffmonoxid-Dehydrogenase), sowie *pqqA*

(RSP_6132 putatives PQQ Syntheseprotein) zu beobachten (siehe Abb. 39). Zusätzlich zeigten die Gene für eine Nukleotidzuckerepimerase, ein Flagellenstrukturprotein und zwei hypothetische Proteine eine verminderte Expression. Neben den mRNAs Protein-codierender Gene wiesen die sRNAs RSs0552 und RSs0682 eine verminderte Abundanz auf (siehe Abb. 39, Datensatz siehe Daten-CD\Microarray).

Eine Überexpression von CcsR1-4 führt zu einer Repression von Enzymen des C1 Metabolismus, von Untereinheiten des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes und von verschiedenen Transportern

Um die Ergebnisse der Transkriptomanalyse zu vertiefen und weitere Informationen über eine mögliche Funktion der CcsR RNAs zu erlangen, wurde eine gelbasierte Proteomanalyse des CcsR1-4 Überexpressionsstamms *R. sphaeroides* 2.4.1 (pRCcsR1-4) im Vergleich zu einer entsprechenden Leervektorkontrolle unter aeroben Bedingungen in der exponentiellen Wachstumsphase durchgeführt. Durch eine Neuanalyse der Daten aus Billenkamp 2010 konnten 511 Proteinspots detektiert werden, von denen 18 eine signifikant niedrigere ($\log_2(\text{Ratio}) \leq -0,3$; $p \leq 0,05$) und 5 eine signifikant erhöhte Spotintensität aufwiesen ($\log_2(\text{Ratio}) \geq 0,3$; $p \leq 0,05$). Hierbei konnte allerdings nur eine geringe Übereinstimmung mit den Daten aus der Transkriptomanalyse beobachtet werden. So zeigten neben verschiedenen Transportern einerseits verschiedene Proteine mit Bezug zum C1 Metabolismus eine verringerte Spotintensität, wobei nur für CoxL (RSP_2877) eine direkte Übereinstimmung mit den Transkriptomdaten zu erkennen war (siehe Abb. 40 & Abb. 42). Andererseits zeigte mit PdhAa eine Untereinheit des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes eine verminderte Spotintensität, die mit den in der Transkriptomanalyse auffälligen Genen *pdhAb* und *pdhB* in einem Operon codiert ist (siehe Abb. 40). Insgesamt ließ sich erkennen, dass die auf Grund der Transkriptomanalyse gebildete

Hypothese einer Funktion von CcsR1-4 in der Regulation von C1-Metabolismus und Pyruvatdehydrogenase-Komplex durch die Proteomanalyse unterstützt wurde.

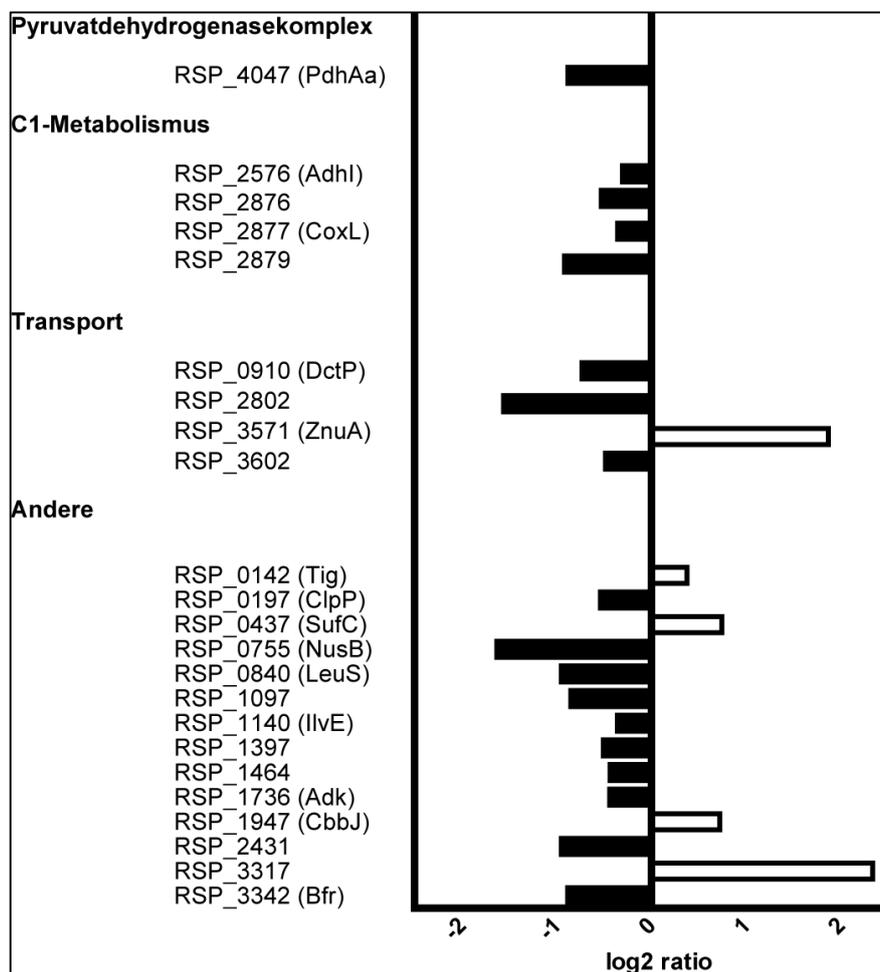


Abbildung 40: Eine Konstitutive Überexpression von CcsR1-4 führt zur Repression von Proteinen des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes, Transportern und von Enzymen des C1-Metabolismus. Dargestellt sind die Ergebnisse einer gelbasierten Proteomanalyse zur Untersuchung von Effekten einer konstitutiven CcsR1-4 Überexpression unter aeroben Bedingungen. Hierfür wurden die sRNAs CcsR1-4 unter Kontrolle des RSP_4352 16S rRNA Promotors von einem Plasmid exprimiert (*R. sphaeroides* 2.4.1 (pRCcsR1-4)) und mit einer Leervektorkontrolle (*R. sphaeroides* 2.4.1 (pRK415)) verglichen.

Vorhersage von CcsR1-4 Interaktionen und von Operonstrukturen potentieller CcsR1-4 Targets

Um in *R. sphaeroides* potentielle mRNA Kandidaten für eine direkte Interaktion mit CcsR1-4 zu ermitteln, wurden genomweite bioinformatische Vorhersagen für Interaktionen der sRNAs CcsR1-4 mit mRNAs durchgeführt und im Anschluss mit den gewonnen Erkenntnissen aus den Transkriptom- und Proteomanalysen verglichen. Hierbei wurden insbesondere die vorhergesagten Interaktionen von CcsR1-4 mit

mRNAs von Genen, die eine veränderte Expression in Transkriptom- und Proteomanalysen aufwiesen, sowie vorhergesagte Interaktionen von CcsR1-4 mit bekannten Regulatoren dieser Gene berücksichtigt. Neben potentiellen Kandidaten für eine RNA-RNA Interaktion konnte hierbei zusätzlich eine mögliche bevorzugte RNA-Binderegion innerhalb der CcsR RNAs identifiziert werden.

Die mittels INTARNA vorhergesagten Bindestellen für CcsR1-4 überlappen mit den CCUCCUCCC-Motiven

Um eine jeweilige wahrscheinliche Bindestelle für CcsR1-4 zu bestimmen, wurde für die vier sRNAs CcsR1-4 eine globale Suche nach Bindestellen an bekannten mRNAs im Genom von *R. sphaeroides* 2.4.1 mittels INTARNA durchgeführt (siehe Daten-CD\IntaRNA*R. sphaeroides* 2.4.1). Hierbei wurden nur vorhergesagte Interaktionen mit einer hohen freien Energie aus der Duplexbildung von sRNA und mRNA berücksichtigt (freie Energie > 16 kcal/Mol). Um zu bestimmen, ob sich die Interaktionsvorhersagen auf bestimmte Basen der sRNA konzentrierten, wurden zunächst alle berücksichtigten INTARNA Resultate mit Hilfe des eigenen Java-Programms INTARNAGETINTERACTIONREGION analysiert (Quellcode siehe Anhang Src.1). Hierfür wurde in allen berücksichtigten Interaktionen nach der Beteiligung der einzelnen Basen der sRNA an der Interaktion gesucht. Im Falle einer Beteiligung einer Base wurde dann für die jeweilige Base eine Beteiligung aufaddiert und am Ende abschließend die Anzahl an vorhergesagten Beteiligungen der einzelnen Basen an RNA-RNA Interaktionen gegenüber der sRNA-Sequenz ausgegeben (siehe Abb. 41). Hierbei stellte sich heraus, dass sich die meisten Beteiligungen an Bindungen für CcsR1-4 jeweils auf eines der beiden charakteristischen CCUCCUCCC-Motive konzentrierten, wobei für CcsR1, CcsR3 und CcsR4 eine Konzentration auf das zweite CCUCCUCCC-Motiv zu erkennen war. Im Gegensatz hierzu zeigte CcsR2 tendenziell eher eine Konzentration der vorhergesagten Interaktionen auf das erste CCUCCUCCC Motiv der sRNA.

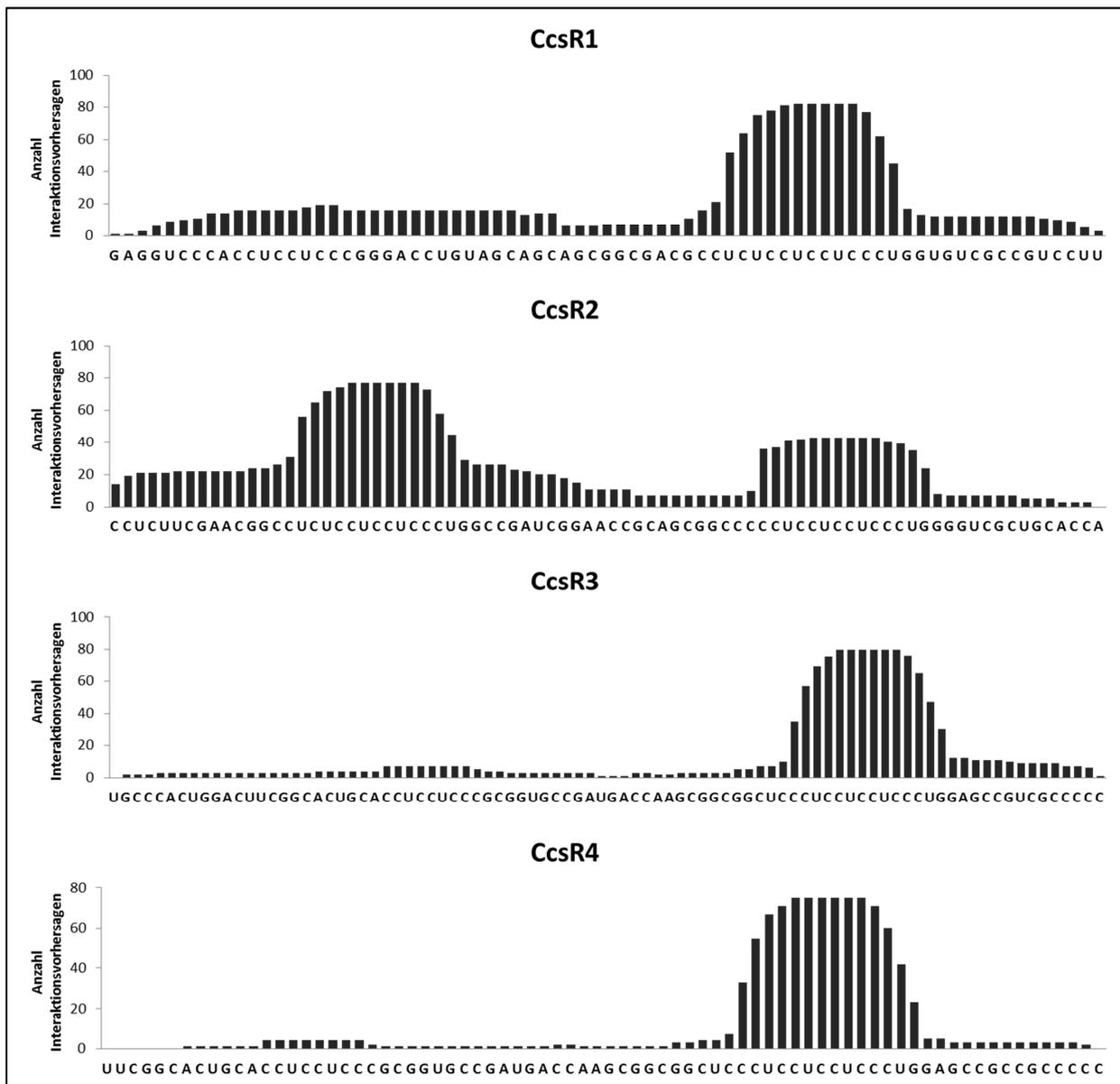


Abbildung 41: Vorhersage eines möglichen Bindemotivs für CcsR1-4 mittels INTARNA und INTARNAGETINTERACTIONREGION. Dargestellt sind Ergebnisse einer Vorhersage von Beteiligungen der einzelnen Basen von CcsR1-4 an den Vorhersagen einer globalen RNA-RNA Interaktionsvorhersage mittels INTARNA (freie Energie > 16 kcal/Mol). Die Daten wurden mit Hilfe des Java-Programms INTARNAGETINTERACTIONREGION (Quellcode siehe Anhang Src.1) ermittelt.

RNA-RNA Interaktionsvorhersagen mit Hilfe von INTARNA und RNAPREDATOR legen eine kooperative Funktion von CcsR1-4 nahe

Nachdem putative Bindemotive von CcsR1-4 mittels INTARNA und INTARNAGETINTERACTIONREGION bestimmt wurden, wurden die einzelnen vorhergesagten RNA-RNA Interaktionen mit den Daten der Transkriptom- und Proteomanalysen abgeglichen (Datensatz INTARNA siehe Daten-CD\IntaRNA\

R. sphaeroides 2.4.1). Hierbei zeigte sich, dass nur eine sehr kleine Überlappung zwischen den *in silico* generierten Daten und den *in vivo* gewonnenen Daten bestand.

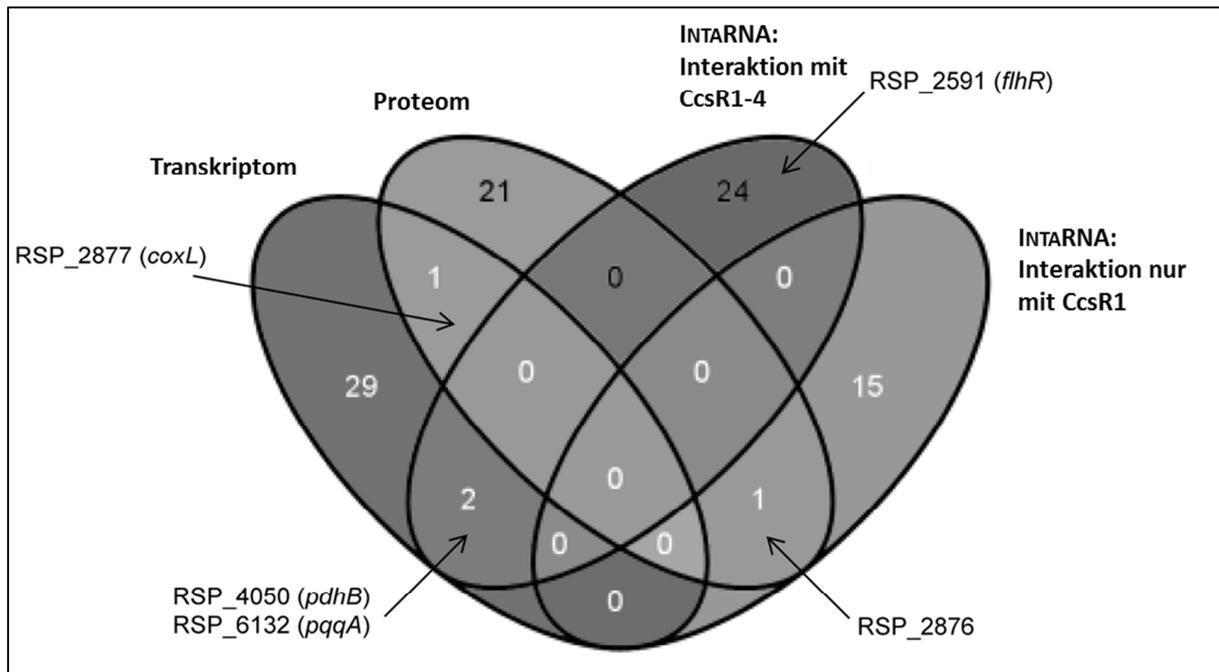


Abbildung 42: Vergleich von bioinformatischen RNA-RNA Interaktionsvorhersagen mittels INTARNA mit den Ergebnissen aus Transkriptom- und Proteomanalyse. Dargestellt ist die Überlappung von den Daten aus einer Transkriptomanalyse und einer Proteomanalyse von einer CcsR1-4 Überexpression in *R. sphaeroides* 2.4.1 gegenüber einer entsprechenden Leervektorkontrolle und den Daten einer Vorhersage für RNA-RNA Interaktionen mittels INTARNA. Hierbei wurde bei der bioinformatischen Analyse zwischen RNA-RNA Interaktionsvorhersagen, die eine Bindung von CcsR1-4 an identische Bindestellen innerhalb einer mRNA nahelegen, und Interaktionen, die eine exklusive Bindung von CcsR1 ohne Bindung von CcsR2-4 an eine Bindestelle einer mRNA nahelegen, unterschieden.

Auch konnte anhand der bestehenden Daten keine Hypothese erstellt werden, ob CcsR1-4 kooperativ an der Regulation identischer mRNAs beteiligt sind oder ob eine individuelle Regulation durch die individuellen CcsR RNAs erfolgt. Dies liegt unter anderem darin begründet, dass für verschiedene mRNAs von Genen mit Bezug zu C1-Metabolismus oder Pyruvatdehydrogenase-Komplex eine Interaktion mit CcsR1-4 vorhergesagt wurde, während für die mRNA von RSP_2876, einem Gen aus dem *cox*-Operon eine Interaktion nur mit CcsR1 vorhergesagt wurde (siehe Abb. 42). Um weitere Informationen darüber zu erlangen, ob eine Bindung von CcsR1-4 an identische mRNAs oder ob eine Bindung von CcsR1-4 an individuelle mRNAs zu erwarten war, wurde eine

Vergleichsanalyse für CcsR1 mit dem vergleichbaren alternativen bioinformatischen Vorhersage Programm RNAPREDATOR durchgeführt. Hierbei wurden die 50 besten Resultate berücksichtigt (Datensatz RNAPREDATOR siehe Daten-CD\RNApredator\ *R. sphaeroides* 2.4.1). Dieser Vergleichslauf zeigte zunächst, dass auch zwischen den beiden bioinformatischen Vorhersagen nur eine sehr limitierte Überlappung zu erkennen war (siehe Abb. 43).

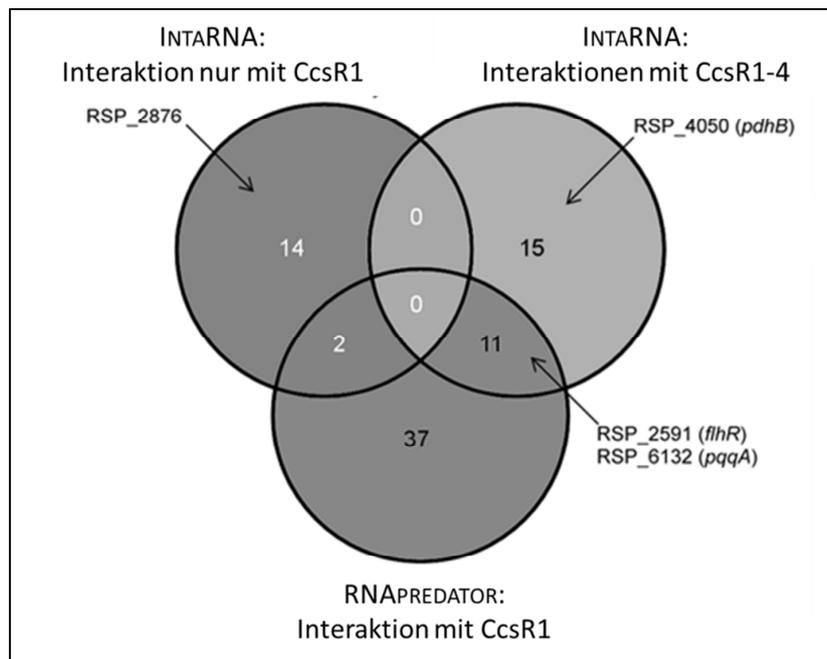


Abbildung 43: Vergleich von bioinformatischen RNA-RNA Interaktionsvorhersagen mittels INTARNA und RNAPREDATOR. Dargestellt ist die Überlappung von den Daten aus RNA-RNA Interaktionsvorhersagen mittels INTARNA und RNAPREDATOR. Es ist in der bioinformatischen Analyse unterschieden zwischen RNA-RNA Interaktionsvorhersagen, die eine Bindung von CcsR1-4 an identische Bindestellen innerhalb einer mRNA nahelegen, und Interaktionen, die eine exklusive Bindung von CcsR1 ohne Bindung an eine Bindestelle einer mRNA nahelegen.

Hierbei war zu erkennen, dass tendenziell Interaktionen, die von INTARNA für alle vier sRNAs CcsR1-4 vorhergesagt waren, eher Überlappungen mit der Analyse durch RNAPREDATOR aufwiesen, als Interaktionen, die in der INTARNA Vorhersage CcsR1 spezifisch waren. Hieraus ließ sich ableiten, dass CcsR1-4 eher an identische mRNAs binden und nicht individuellen mRNAs zugeordnet sind (siehe Abb. 43, Anhang Tab. A2).

Eine CcsR1-4 Überexpression erhöht den intrazellulären Glutathionpool.

Da viele der identifizierten möglichen Interaktionspartner von CcsR1-4 eine Rolle in der Regulation des Glutathion-abhängigen C1-Metabolismus nahelegten, wurde der zelluläre Glutathiongehalt des CcsR1-4 Überexpressionsstamms aus Transkriptom- und Proteomanalysen im Vergleich zur entsprechenden Leervektorkontrolle in der exponentiellen Wachstumsphase unter mikroaeroben Bedingungen bestimmt. Hierbei stellte sich heraus, dass im CcsR1-4 Überexpressionsstamm eindeutig mehr Glutathion vorhanden war (siehe Abb. 44).

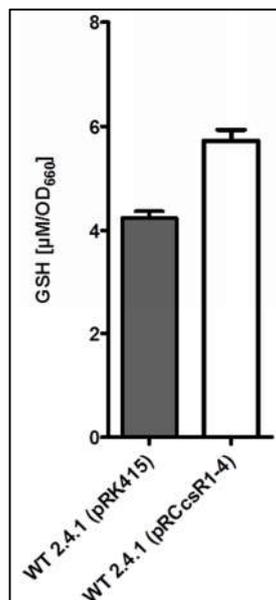


Abbildung 44: Eine Überexpression von CcsR1-4 erhöht den zellulären Glutathionpool. Dargestellt sind die Ergebnisse einer Bestimmung der intrazellulären Glutathionkonzentration eines *R. sphaeroides* 2.4.1 CcsR1-4 Überexpressionsstamms (WT 2.4.1 (pRCcsR1-4)) im Vergleich zur entsprechenden Leervektorkontrolle (WT 2.4.1 (pRK415)).

Analyse von Operon-Strukturen potentieller CcsR1-4 Targets

Nachdem verschiedene Gene mit Verbindung zum Glutathion-abhängigen C1-Metabolismus und zum Pyruvatdehydrogenase-Komplex als potentielle Ziele einer möglichen Regulation durch CcsR1-4 identifiziert wurden und verschiedene mögliche Bindestellen für die CcsR1-4 ermittelt waren, wurden die Operonstrukturen potentieller Interaktionspartner mit Hilfe von PROOPDB ermittelt und abschließend verschiedene Kandidaten zur weiteren Analyse bestimmt (siehe Abb. 45).

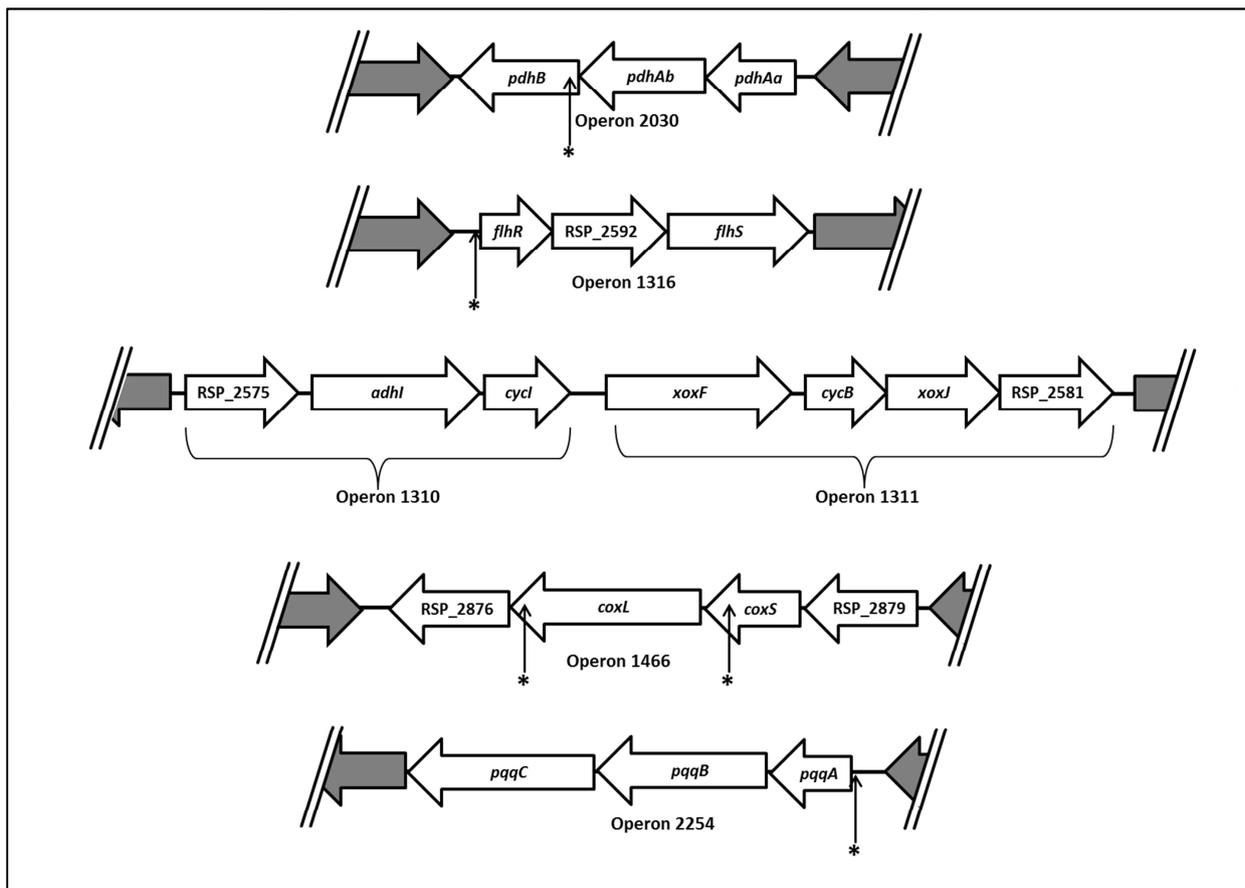


Abbildung 45: Operonstrukturen und Lokalisation putativer CcsR1-4 Bindestellen für ausgewählte Gene mit Verbindung zu C1-Metabolismus und Pyruvatdehydrogenase-Komplex. Dargestellt sind schematische Repräsentationen verschiedener mittels ProOpDB ermittelter Operons, die durch eine Überexpression von CcsR1-4 eine veränderte Expression zeigten und die putative Bindestellen für CcsR1-4 aufwiesen (dargestellt durch Pfeile mit Sternchen).

Zunächst zeigte sich bei der Analyse der verschiedenen Operons, dass für die in den Operons 1310 und 1311 organisierten Gene des Glutathion-abhängigen C1 Metabolismus trotz eindeutiger Repression bei CcsR1-4-Überexpression keine potentiellen Bindestellen für CcsR1-4 gab (siehe Abb. 45). Ein bekannter Transkriptionaktivator (FlhR, RSP_2591) dieser beiden Operons ist als erstes Gen in Operon 1316 codiert und eine potentielle Bindestelle für CcsR1-4 im Bereich der 5'UTR von *flhR* wurde mittels INTARNA und RNAPREDATOR vorhergesagt (siehe Abb. 45), so dass die *flhR*-mRNA für eine weitere Analyse gewählt wurde. Eine weitere potentielle Bindestelle für CcsR1-4 konnte in der 5' UTR der *pqqA*-mRNA, die ein Kofaktorsyntheseprotein für den Glutathion-abhängigen C1 Metabolismus codiert,

vorhergesagt werden. Hierbei ist *pqqA* als erstes Gen in Operon 2254 codiert (siehe Abb. 45). Zusätzlich wurden eine putative Bindestelle für CcsR1-4 und eine putative Bindestelle nur für CcsR1 im *cox*-Operon (RSP_2879-RSP_2876, Operon 1466) identifiziert. Dieses Operon wird dem C1-Metabolismus zugeordnet. Hierbei waren die potentiellen Bindestellen in den codierenden Regionen von *coxL* und *coxS* lokalisiert (siehe Abb. 45). Darüber hinaus wurde innerhalb eines Operons mit Genen für Untereinheiten des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes (Operon 2030) eine Bindestelle für CcsR1-4 in der codierenden Region von *pdhB* nachgewiesen (siehe Abb. 45). Für eine weitere Analyse wurden entsprechend die fünf beschriebenen potentiellen Bindestellen der CcsR RNAs gewählt (siehe Abb. 45).

3.4.2 Bestätigung potentieller CcsR1-4 Zielgene

Analyse von CcsR1-4 Interaktionen mit potentiellen Target-mRNAs

Nachdem potentielle Bindestellen für CcsR1-4 in verschiedenen mRNAs bestimmt waren, wurden diese mittels verschiedenen Untersuchungen sowohl *in vivo*, als auch *in vitro* analysiert.

CcsR1-4 beeinflussen die FlhR Expression in *R. sphaeroides* 2.4.1

Um die Interaktion zwischen CcsR1-4 und den potentiellen mRNA Interaktionspartnern zu analysieren, wurden die 5' Regionen von den Genen, die *downstream* der vorhergesagten CcsR1-4 Bindestellen lagen, konstitutiv von einem Plasmid in einer Translationsfusion mit *lacZ* exprimiert, wobei immer 150 Basenpaare in 5' Richtung der Bindestelle berücksichtigt wurden (siehe Abb. 46a). Hierbei wurden diese Translationsfusionen entweder in *R. sphaeroides* Stämmen, die CcsR1-4 konstitutiv von einem Plasmid exprimierten oder eine entsprechende Leervektorkontrolle enthielten, mit Hinblick auf ihre Expression untersucht (siehe Abb. 46b).

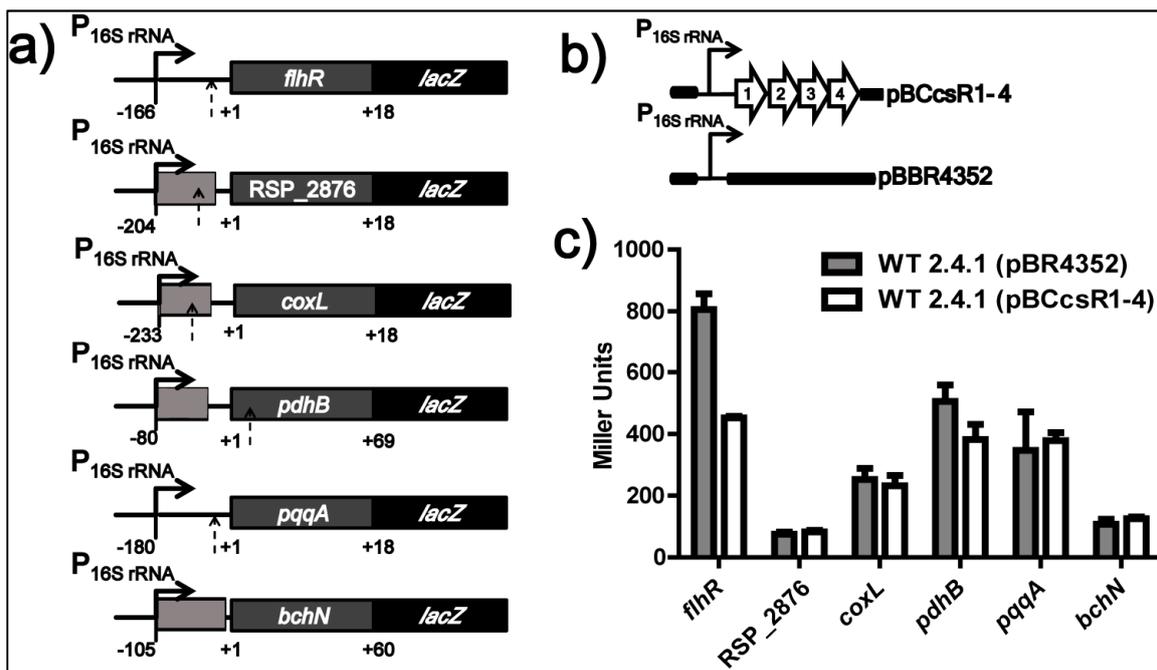


Abbildung 46: Effekt einer CcsR1-4 Überexpression auf die Expression potentieller Zielgene.

a) Translationsfusionen von *target* mRNAs mit *lacZ* im Plasmid pPHU16S. Der Translationsstart der Zielgene ist durch die +1 Positionsmarkierung angezeigt. Jeweilige Basenpositionen *upstream* und *downstream* des Translationsstarts sind durch positive und negative Nummern repräsentiert. Zusätzliche Gene in den *upstream* Regionen der Translationsstarts sind in hellgrau dargestellt. Vorhergesagte CcsR1-4 Bindestellen sind durch Pfeile dargestellt. b) Graphische Darstellung des CcsR1-4 Überexpressions Plasmids pBCcsR1-4, das für das *in vivo* Reportersystem genutzt wurde. Das Plasmid pBBR4352 diente als Kontrollhintergrund für die basale β -Galaktosidaseaktivität durch die Reporterplasmide. c) β -Galaktosidaseaktivitäten der translationalen *lacZ* Fusionen mit *flhR* (RSP_2591), *RSP_2876*, *coxL* (RSP_2877), *pdhB* (RSP_4050), *pqqA* (RSP_6132) und *bchN* (RSP_0285). Die Enzymaktivitäten wurden aus Zellextrakten von *R. sphaeroides* 2.4.1 in der exponentiellen Wachstumsphase ermittelt, wobei eine *bchN::lacZ* Fusion als unspezifische Negativkontrolle diente. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung vom Mittelwert aus drei biologischen Replikaten mit jeweils zwei technischen Replikaten.

Bei der Messung der β -Galaktosidaseaktivität stellte sich heraus, dass die Translationsfusionen für *RSP_2876*, *coxL* und *pqqA*, ähnlich wie die Negativkontrolle *bchN*, keine klaren Unterschiede in der Enzymaktivität zwischen Leervektorkontrolle und CcsR1-4 Überexpression aufwiesen. Dies ließ darauf schließen, dass CcsR1-4 keinen direkten Einfluss auf die Expression dieser Translationsfusionen hatten (siehe Abb. 46c). Im Gegensatz hierzu war für die Translationsfusion mit *pdhB* eine schwache Verminderung der Enzymaktivität zu erkennen, die einen direkten oder indirekten Einfluss von CcsR1-4 auf die Expression nahelegte (siehe Abb. 46c). Des Weiteren konnte ein starker Effekt der CcsR1-4 Überexpression auf die Expression der *flhR*

Translationsfusion beobachtet werden, der eine direkte Interaktion zwischen den RNAs indizierte (siehe Abb. 46c). Um einen genaueren Eindruck von der Interaktion zwischen CcsR1-4 und der *flhR* mRNA zu erlangen, wurde mittels NUPACK eine Sekundärstruktur für die Umgebung der vorhergesagten CcsR1-4 Bindestelle ermittelt (siehe Abb. 47). Es zeigte sich, dass die mit INTARNA vorhergesagte potentielle Bindestelle für CcsR1-4 innerhalb einer exponierten Stammschleifenstruktur zu finden war, die eine geringe Distanz zum ATG-Startcodon des *flhR*-Gens aufwies.

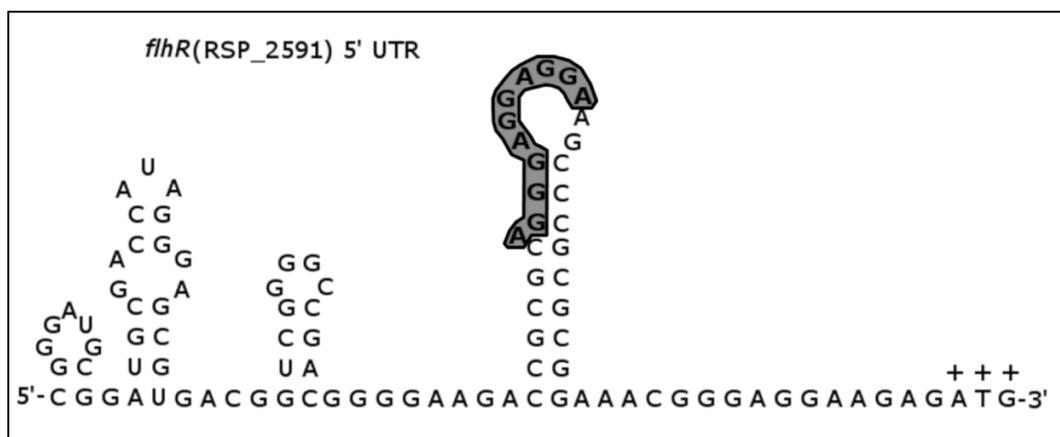


Abbildung 47: Die Sekundärstruktur der *flhR* mRNA weist eine exponierte potentielle CcsR1-4 Bindestelle auf. Die Bindestelle (hervorgehoben in grau und Fettdruck) weist eine relative geringe Distanz zum ATG Startcodon (hervorgehoben durch + Zeichen) auf. Ermittelt mit Hilfe von NUPACK.

Hierbei war ein großer Teil der Bindestelle in einem einzelsträngigen Bereich der Stammschleife, was eine anfängliche Bindung der einzelsträngigen Bereiche der CCUCCUCCC-Motive von CcsR1-4 an den einzelsträngigen Bereich innerhalb der vorhergesagten Bindestelle in der *flhR*-mRNA vermuten ließ.

Hfq beeinflusst die FlhR Expression und die Repression der Expression durch CcsR1-4

Nachdem eine Interaktion von CcsR1-4 mit der *flhR* mRNA gezeigt wurde und eine mögliche Bindestelle ermittelt und dargestellt werden konnte, sollte die Interaktion beider RNAs an dieser Bindestelle weiter analysiert werden. Hierbei stellte sich zunächst die Frage, in wieweit die Interaktion zwischen den beiden RNAs von Hfq abhängig ist. Da eine Bindung von CcsR1-4 an Hfq bereits gezeigt werden konnte, war

nun Gegenstand des Interesses, ob die sRNAs CcsR1-4 durch die Bindung an Hfq lediglich vor einem Abbau durch RNasen geschützt werden, oder ob Hfq zusätzlich notwendig ist für die Interaktion von CcsR1-4 mit der *flhR* mRNA. Um diese Frage zu adressieren, wurden das CcsR1-4 Expressionsplasmid und das *flhR* Reporterplasmid des *in vivo* Reportersystems (siehe Abb. 46a & 46b) in *R. sphaeroides* 2.4.1 und in eine endogene *R. sphaeroides* 2.4.1 Hfq Deletionsmutante übertragen. Messungen der β -Galaktosidaseaktivität zeigten, dass in der Hfq-Deletionsmutante generell eine höhere β -Galaktosidaseaktivität für die *lacZ::flhR*- Fusion zu beobachten war, als im respektiven Wildtyp (siehe Abb. 48). Zusätzlich war zu erkennen, dass auch in der Hfq-Deletionsmutante eine tendenzielle Verminderung der β -Galaktosidaseaktivität durch konstitutive CcsR1-4 Überexpression detektierbar war (siehe Abb. 48). Hieraus ließ sich vermuten, dass eine Interaktion zwischen den CcsR RNAs und der *flhR* mRNA auch unabhängig von Hfq stattfinden konnte. Dieses konnte im Folgenden durch Experimente *in vitro* belegt werden (vgl. Abb. 51)

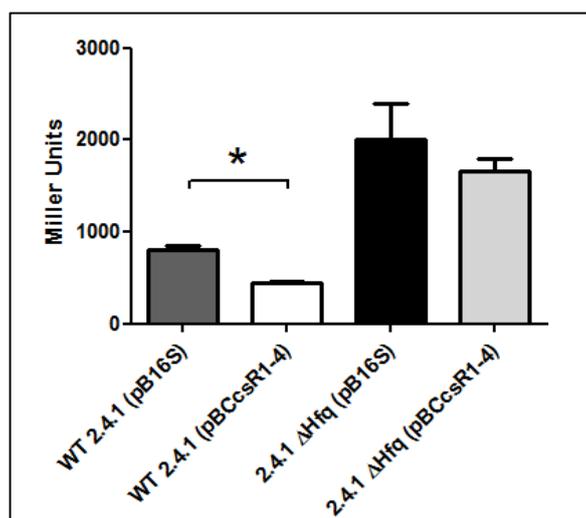


Abbildung 48: Einfluss von Hfq auf die CcsR1-4 Interaktion mit der *flhR* mRNA. β -Galaktosidaseaktivität einer translationalen *lacZ* Fusion mit *flhR* (RSP_2591) in *R. sphaeroides* 2.4.1 und einer endogenen Hfq Deletionsmutante im Vergleich zu den entsprechenden Leervektorkontrollen. Die Enzymaktivitäten wurden aus Zellextrakten von Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase ermittelt. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung vom Mittelwert aus drei biologischen Replikaten mit jeweils zwei technischen Replikaten (*: $p \leq 0,05$).

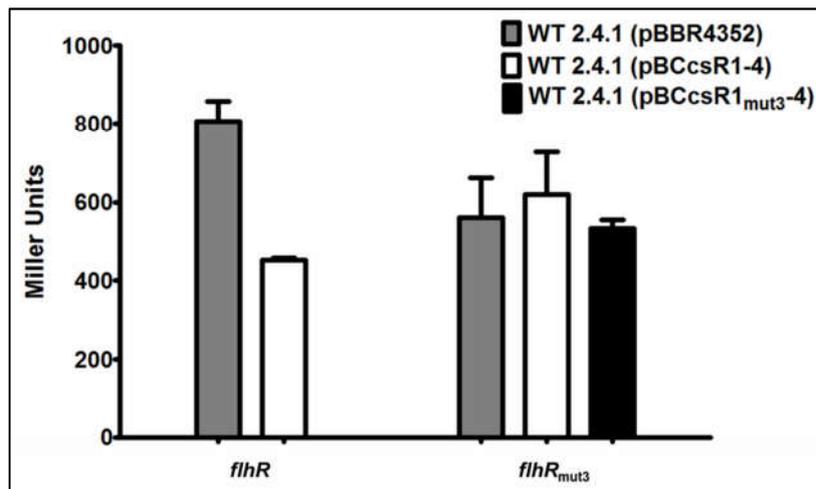


Abbildung 50: Einfluss einer Mutation innerhalb der 5' UTR der *flhR* mRNA auf die Interaktion mit CcsR1-4. β -Galaktosidaseaktivitäten von translationalen *lacZ* Fusionen mit *flhR* (RSP_2591) und mutiertem *flhR* (siehe Abb. 49). Die Enzymaktivitäten wurden aus Zellextrakten von *R. sphaeroides* 2.4.1 in der exponentiellen Wachstumsphase entweder mit dem Plasmid pBCcsR1-4 oder mit dem Plasmid pBCcsR1_{mut3}-4 ermittelt. Ein Zellextrakt aus *R. sphaeroides* 2.4.1 in der exponentiellen Wachstumsphase mit dem Plasmid pBBR4352 diente als Kontrollhintergrund für die β -Galaktosidaseaktivität. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung vom Mittelwert aus drei biologischen Replikaten mit jeweils zwei technischen Replikaten.

Zusätzlich war zu erkennen, dass der beobachtete Effekt einer CcsR1-4 Überexpression auf die Expression des *flhR::lacZ* Reporterplasmids durch die Mutation innerhalb der CcsR1-4 Bindestelle gestört wurde, da keine signifikante Unterschiede der Expression zwischen CcsR1-4 Überexpression und respektiver Leervektorkontrolle zu beobachten waren und tendenziell sogar ein Anstieg der β -Galaktosidaseaktivität zu beobachten war (siehe Abb. 50). Eine kompensatorische Mutation von CcsR1 führte allerdings nicht zu einem kompensatorischen Effekt auf die Änderung der β -Galaktosidaseaktivität. Entsprechend stellte sich anschließend die Frage, ob die untersuchte Interaktion möglicherweise noch durch weitere Faktoren beeinflusst wird und deshalb eine kompensatorische Mutation von CcsR1 nicht den erwarteten Effekt zeigte. In diesem Zusammenhang stellte sich die Frage, ob ein Zusammenspiel aller vier sRNAs benötigt wird für eine Regulation der *flhR* mRNA und folglich eine kompensatorische Mutation von CcsR1 nicht ausreichend ist, um einen kompensatorischen Effekt zu erreichen.

CcsR1 interagiert *in vitro* unabhängig von Hfq mit der *flhR* (RSP 2591) - mRNA

Um zu klären, ob weitere unbekannte Partner für die Interaktion zwischen den CcsR1-4 und der *flhR* mRNA nötig sind, wurde ein EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*) durchgeführt und die Interaktion von CcsR1 mit der *flhR* mRNA *in vitro* untersucht. Hierfür wurden CcsR1 und die Kontroll-sRNA PcrZ in einer *in vitro* Transkription radioaktiv markiert und mit *in vitro* -Transkripten von *flhR*, einer in der CcsR1-4 Bindestelle mutierten Version von *flhR* (siehe Abb. 49) und der Kontroll-mRNA für *bchN* inkubiert. Es zeigte sich, dass CcsR1 bei Inkubation mit den *flhR* eine dosisabhängige Veränderung in der Migration durch ein Gel aufwies, was eine direkte Interaktion beider mRNAs indizierte (siehe Abb. 51).

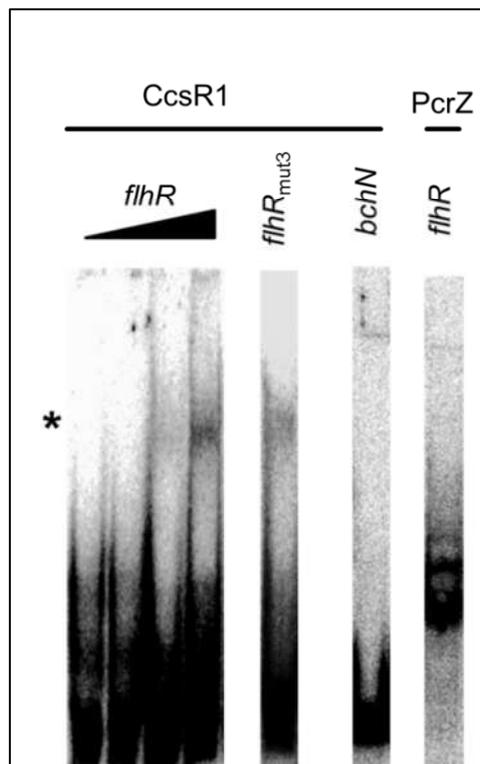


Abbildung 51: CcsR1 interagiert *in vitro* mit der *flhR* mRNA. Dargestellt sind die Ergebnisse eines *Electro mobility shift assays* für CcsR1 mit einem 177 nt *flhR*-mRNA Fragment mit der vorhergesagten CcsR1 Bindestelle, mit einem durch Basenaustausch in der Bindestelle mutierten 177 nt *flhR* mRNA Fragment und einem *bchN* mRNA Kontrollfragment. 250 fmol CcsR1 wurden hierbei entweder mit 25 fmol, 250 fmol oder 2500 fmol des *flhR* Fragments, sowie mit 2500 fmol des mutierten *flhR* Fragments oder mit 2500 fmol des *bchN* Fragments inkubiert. Zusätzlich wurden 250 fmol PcrZ mit 2500 fmol des *flhR* Fragments inkubiert. Änderung im Migrationsverhalten im Gel waren nur für CcsR1 mit dem *flhR* Fragment und dem mutierten *flhR* Fragment zu beobachten (*), wobei für das *flhR* Fragment eine dosisabhängige Steigerung dieser Änderung im Migrationsverhalten zu beobachten ist. Im Vergleich hierzu sind für die Kontrollen keine solche Änderungen zu beobachten.

Zusätzlich zeigte sich, dass trotz einer Mutation der *flhR* mRNA innerhalb der Bindestelle bei einer Inkubation mit CcsR1 eine vergleichbare Änderung der Migration von CcsR1 im Gel zu beobachten war. Im Gegensatz hierzu zeigten eine Inkubation von CcsR1 mit der *bchN* mRNA und eine Inkubation von PcrZ mit der *flhR* mRNA keinen Effekt (siehe Abb. 51). Dies bedeutete, dass CcsR1 zumindest *in vitro* unabhängig von anderen Faktoren mit der *flhR* mRNA interagieren kann. Zusätzlich ließ sich erkennen, dass eine drei Basen Mutation innerhalb des Bindemotivs der *flhR* mRNA nicht ausreichte, um die Interaktion mit CcsR1 *in vitro* zu unterbinden. Hieraus ließ sich mutmaßen, dass die genutzte Mutation innerhalb der *flhR*-mRNA entweder einen starken Effekt auf die Ribosomenbindestelle hatte und so einen CcsR1-4-Effekt auf die Translation störte oder, dass für die Bindung zwischen CcsR1 und der *flhR*-mRNA wenige Basen ausreichend waren, jedoch für einen Effekt auf die Translation die mutierten Basen benötigt wurden.

Ein Zusammenspiel von CcsR1-4 wird benötigt für eine uneingeschränkte Repression der FlhR Expression

Da in den durchgeführten Untersuchungen nur gezeigt werden konnte, dass CcsR1-4 *in vivo* gemeinsam einen Effekt auf die Expression der *flhR* mRNA haben und CcsR1 mit dieser mRNA *in vitro* interagiert, blieb die Frage zu klären, ob ein Zusammenspiel der CcsR RNAs CcsR1-4 nötig ist oder ob einzelne CcsR RNAs ausreichend sind, um die FlhR Expression zu reprimieren. Um dies zu untersuchen, wurden für das bereits genutzte *in vivo* Reportersystem Plasmide erstellt, die einzelne CcsR RNAs oder verschiedene Kombinationen der CcsR-RNAs unter Kontrolle des RSP_4352 16S rRNA Promotors exprimierten (siehe Abb. 52). Diese Plasmide wurden in den *R. sphaeroides* 2.4.1 Stamm übertragen, der das *flhR::lacZ* Reporterplasmid trug (siehe Abb. 46a).

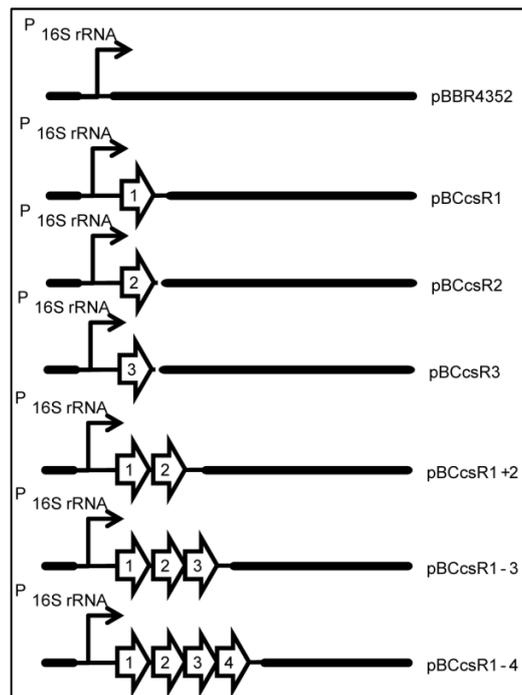


Abbildung 52: Graphische Darstellung der CcsR-RNA Überexpressions Plasmide pBCcsR1, pBCcsR2, pBCcsR3, pBCcsR1+2, pBCcsR1-3 und pBCcsR1-4, die für das *in vivo* Reportersystem genutzt wurden. Das Plasmid pBBR4352 diente als Kontrollhintergrund für die basale β -Galaktosidaseaktivität durch die Reporterplasmide.

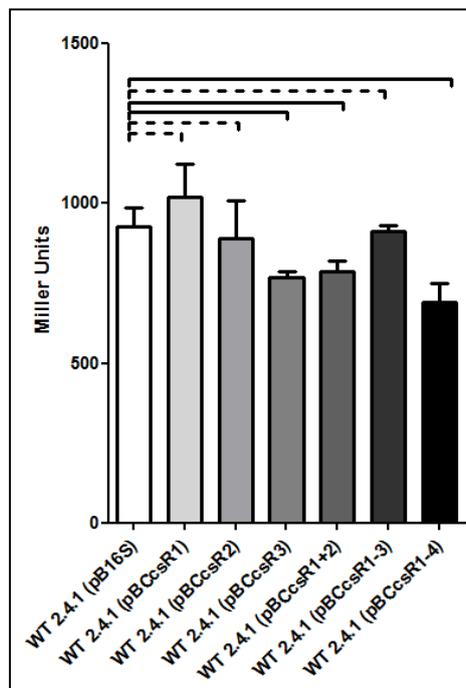


Abbildung 53: CcsR1-4 werden benötigt für eine effektive Repression der Expression der *flhR* mRNA. β -Galaktosidaseaktivitäten einer translationalen *lacZ* Fusion mit *flhR* (RSP_2591). Die Enzymaktivitäten wurden aus Zellextrakten von *R. sphaeroides* 2.4.1 mit verschiedenen CcsR-RNA Überexpressionsplasmiden in der exponentiellen Wachstumsphase ermittelt. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung vom Mittelwert aus drei biologischen Replikaten mit jeweils zwei technischen Replikaten. Eine durchgezogene Verbindungsklammer indiziert einen signifikanten Unterschied in der β -Galaktosidaseaktivität ($p \leq 0,05$).

Eine Messung der β -Galaktosidaseaktivität im Vergleich zu einem Reporterplasmid zeigte, dass CcsR1-4, wie bereits beschrieben, die Expression des *flhR::lacZ* Reporterplasmids hemmen (siehe Abb. 53). Darüber hinaus war für die einzeln exprimierten CcsR RNAs und für die nicht vollständigen Kombinationen von CcsR-RNAs entweder nur ein schwächerer Effekt auf die *flhR* Expression vorhanden oder es war keine signifikante Änderung in der Expression der *flhR::lacZ* Fusion zu beobachten. Daraus konnte abgeleitet werden, dass alle vier sRNAs CcsR1-4 vorhanden sein müssen, um einen vollständigen Effekt auf die *flhR* Expression zu entfalten.

Für eine volle Induktion einer Resistenz gegenüber oxidativem Stress werden alle CcsR RNA benötigt.

Um abzugleichen, ob auch die Induktion einer Resistenz gegen oxidativen Stress, wie sie für eine Überexpression für CcsR1-4 beobachtet wurde, abhängig ist von der Anzahl der exprimierten CcsR RNAs, wurden verschiedene CcsR Überexpressionsplasmide in pRK415 erstellt.

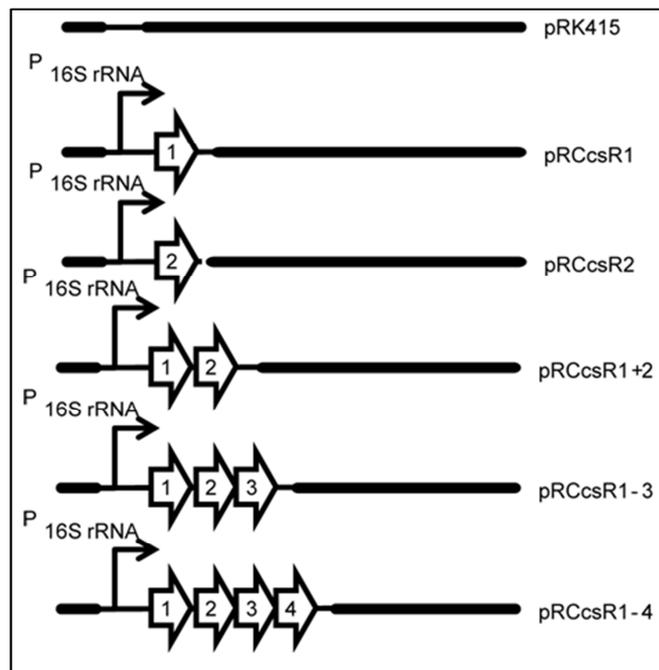


Abbildung 54: Graphische Darstellung der CcsR-RNA Überexpressions Plasmide pRCcsR1, pRCcsR2, pRCcsR1+2, pRCcsR1-3 und pRCcsR1-4, die für Hemmhofests zur Bestimmung der Resistenz gegen oxidativen Stress genutzt wurden. Das Plasmid pRK415 diente als Kontrollhintergrund für die Resistenz von *R. sphaeroides* 2.4.1 gegen oxidativen Stress.

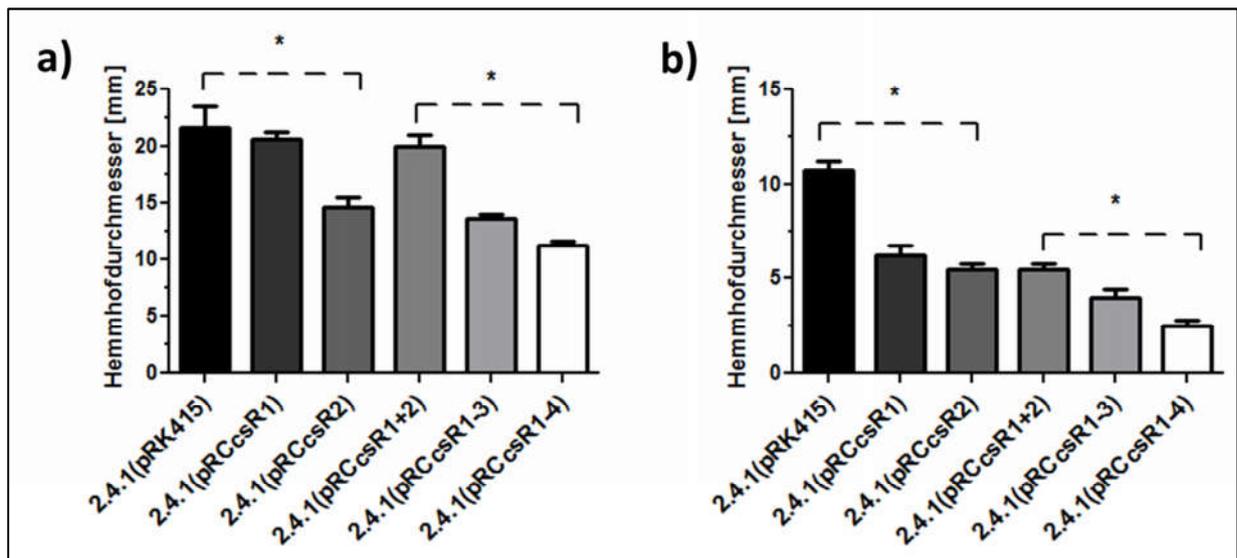


Abbildung 55: Eine Überexpression von CcsR RNAs führt zu einer erhöhten Resistenz gegenüber oxidativem Stress. Dargestellt sind die Ergebnisse von Hemmhoftests mit *R. sphaeroides* 2.4.1 mit den CcsR-Überexpressionsplasmiden pRCcsR1, pRCcsR2, pRCcsR3, pRCcsR1+2, pRCcsR1-3 oder pRCcsR1-4, zur Bestimmung der Resistenz gegen oxidativen Stress durch organische Peroxide (700 mM tBOOH) a) und durch Superoxid (200 mM Paraquat) b). Das Plasmid pRK415 diente jeweils als Kontrollhintergrund für die Resistenz von *R. sphaeroides* 2.4.1 gegen oxidativen Stress (Messung durchgeführt und Daten bereitgestellt von Tao Peng).

Hierfür wurde der RSP_4352 16S rRNA Promotor zur Expression einzelner oder mehrerer CcsR RNAs genutzt (siehe Abb. 54). Es zeigte sich, dass die Expression einzelner CcsR RNAs zu einer schwachen Induktion der Resistenz gegenüber oxidativem Stress durch Superoxid (200mM Paraquat) und durch organische Peroxide (700mM tBOOH) führte (siehe Abb. 55; Messung durchgeführt und Daten bereitgestellt von Tao Peng). Hierbei ist insbesondere für die Resistenz gegenüber Superoxid eine Korrelation zwischen der Anzahl an CcsR RNAs und der Resistenz zu erkennen. Hieraus lässt sich ableiten, dass die CcsR RNAs gemeinsam in der Abwehr gegen oxidativen Stress wirken.

3.4.3 Charakterisierung einer FlhR Deletionsmutante mit Hinblick auf CcsR1-4

Da festgestellt werden konnte, dass die CcsR RNAs einen Einfluss auf die Expression von FlhR nehmen und eine Resistenz gegenüber oxidativem Stress induzieren, stellte sich die Frage nach einer möglichen Verbindung von FlhR zur oxidativen Stressantwort. Hierbei war von besonderem Interesse, inwieweit beobachtete Effekte von CcsR1-4 auf

die Expression von verschiedenen Genen, die Modulation des Glutathionpools und die Resistenz gegenüber organischen Peroxiden durch FlhR beeinflusst waren. Um dies zu ermitteln wurde eine *R. sphaeroides* 2.4.1 *flhR* Deletionsmutante erstellt und danach in enger Zusammenarbeit mit Tao Peng, der für diese Charakterisierung die Messungen durchgeführt hat, mit Hilfe verschiedener molekularbiologischer und mikrobiologischer Methoden untersucht.

Eine *flhR* Deletion führt zu einem Verlust des CcsR1-4 Effekts auf den zellulären Glutathionpool

Es konnte ermittelt werden, dass eine Überexpression von CcsR1-4 in *R. sphaeroides* 2.4.1 im Vergleich zu einer Leervektorkontrolle zu einem Anstieg im zellulären Glutathiongehalt führt. Um den Einfluss von FlhR zu überprüfen, wurde diese Untersuchung in der *R. sphaeroides flhR* Deletionsmutante wiederholt, wobei wieder eine Überexpression von CcsR1-4 mit der entsprechenden Leervektorkontrolle verglichen wurde. Hierbei zeigte sich, dass das zelluläre Glutathionlevel in der *R. sphaeroides flhR* Deletionsmutante minimal höher, jedoch vergleichbar ist mit dem Glutathionlevel des *R. sphaeroides* 2.4.1 Wildtyps (siehe Abb. 56).

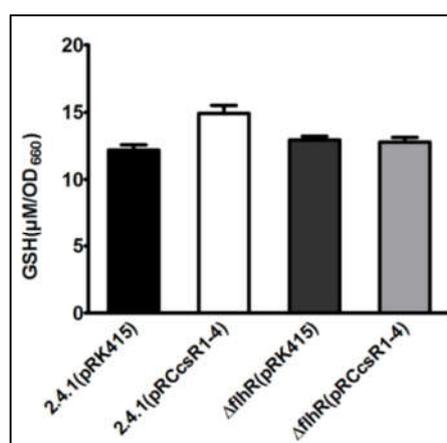


Abbildung 56: Eine Deletion von *flhR* führt zu einem Verlust des Effekts einer Überexpression von CcsR1-4 auf den zellulären Glutathionpool. Dargestellt sind die Ergebnisse einer Bestimmung der intrazellulären Glutathionkonzentration bei CcsR1-4 Überexpression in *R. sphaeroides* 2.4.1 und in einer endogenen *flhR* Deletionsmutante. Das Plasmid pRCcsR1-4 wurde für die CcsR1-4 Überexpression genutzt, während das Plasmid pRK415 als Leervektorkontrolle zur Bestimmung des Glutathiongehalts ohne CcsR1-4 Überexpression genutzt wurde. Messung durchgeführt und Daten bereitgestellt von Tao Peng).

Zusätzlich war zu beobachten, dass der Einfluss von CcsR1-4 auf den intrazellulären Glutathionpool in der FlhR Deletionsmutante nicht detektierbar war (siehe Abb. 56). Dies ließ darauf schließen, dass für eine Modulation des intrazellulären Glutathionpools durch CcsR1-4 die Interaktion der sRNAs mit der *flhR* mRNA benötigt wird, jedoch nicht ausschließlich das Expressionslevel von FlhR Grundlage dieser Beobachtung ist.

Eine *flhR* Deletion führt zu einem Verlust des CcsR1-4 Effekts auf die Resistenz gegen oxidativen Stress

Nachdem gezeigt werden konnte, dass der Einfluss von CcsR1-4 auf den zellulären Glutathionpool in einer *flhR* Deletionsmutante nicht mehr zu beobachten war, stellte sich die Frage, inwiefern eine Induktion von Resistenz gegenüber oxidativem Stress durch die sRNAs CcsR1-4 in dieser Deletionsmutante noch möglich ist. Um dies zu untersuchen, wurden der für die Bestimmung des zellulären Glutathions genutzte *R. sphaeroides* 2.4.1 Wildtyp und die erstellte endogene *flhR* Deletionsmutante, jeweils mit dem CcsR1-4 Expressionsplasmid pRCcsR1-4 oder mit der entsprechenden Leervektorkontrolle pRK415, in Hemmhoftests auf ihre Resistenz gegen organische Peroxide getestet. Es stellte sich dabei heraus, dass eine CcsR1-4 Überexpression, wie bereits beschrieben, in *R. sphaeroides* 2.4.1 zu einer erhöhten Resistenz führte (siehe Abb. 57). Im Vergleich zeigte die Leervektorkontrolle für die *R. sphaeroides* 2.4.1 *flhR* Deletionsmutante eine ähnliche Resistenz gegenüber organischen Peroxiden wie die entsprechende Leervektorkontrolle im Wildtyp. Eine Überexpression von CcsR1-4 führte in der *flhR* Deletionsmutante aber im Gegensatz zum Wildtyp nicht zu einer erhöhten Resistenz gegen organische Peroxide (siehe Abb. 57). Hieraus ließ sich schließen, dass eine Modulation der Expression von FlhR durch CcsR1-4 nötig ist, um eine Resistenz gegen oxidativen Stress zu induzieren.

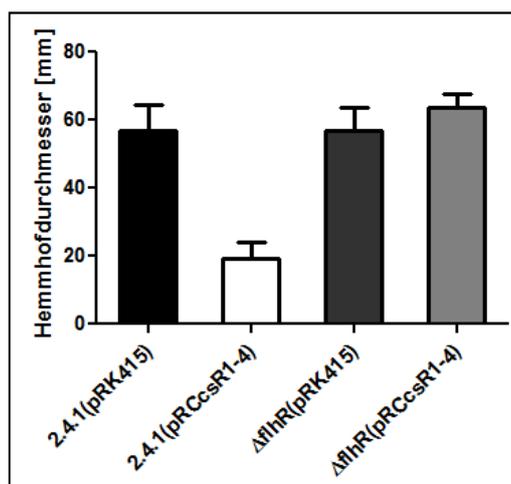


Abbildung 57: Eine Überexpression von CcsR RNAs führt zu einer erhöhten Resistenz gegenüber oxidativem Stress, während eine Deletion des *flhR* Gens diesen Effekt revidiert. Dargestellt sind die Ergebnisse von Hemmhoftests mit *R. sphaeroides* 2.4.1 und einer endogenen *flhR* Deletionsmutante mit dem CcsR1-4-Überexpressionsplasmid pRCcsR1-4 zur Bestimmung der Resistenz gegen oxidativen Stress durch organische Peroxide (700mM tBOOH). Das Plasmid pRK415 diente als Leervektorkontrolle um einen Kontrollhintergrund für die Resistenz der getesteten Stämme gegen oxidativen Stress zu bestimmen (Messung durchgeführt und Daten bereitgestellt von Tao Peng).

Verschiedene Gene mit verminderter Expression bei CcsR1-4 Überexpression zeigen eine FlhR-Abhängigkeit

Da gezeigt werden konnte, dass physiologische Effekte einer CcsR1-4 Überexpression in *R. sphaeroides* 2.4.1 in einem endogenen *flhR* Deletionsstamm weder auf Grund der *flhR* Deletion auftraten, noch durch eine CcsR1-4 Expression induziert wurden, stellte sich die Frage nach der zellulären Grundlage dieser Beobachtungen. Um diese Frage zu adressieren, wurde mittels quantitativer RT-PCR die Expression ausgewählter Gene untersucht. Hierbei wurden *R. sphaeroides* 2.4.1 mit konstituiver CcsR1-4 Überexpression von einem Plasmid, *R. sphaeroides* 2.4.1 mit konstitutiver *flhR* Überexpression von einem Plasmid, ein *flhR*-Deletionsstamm mit dem Leerplasmid pRK415 und ein *flhR*-Deletionsstamm mit konstitutiver *flhR* Überexpression von einem Plasmid mit einer entsprechenden *R. sphaeroides* 2.4.1 Leervektorkontrolle verglichen. Bei den für diese Analyse ausgewählten Genen handelte es sich um Gene mit Verbindung zum C1-Metabolismus und zum Pyruvatdehydrogenase-Komplex, die in den vorhergehenden Untersuchungen eine veränderte Expression bei CcsR1-4 Überexpression von einem Plasmid zeigten.

Es stellte sich heraus, dass die mRNAs für *adhI*, *cycB*, *xoxJ*, *pdhB*, und *coxL* im *R. sphaeroides* Stamm mit einer CcsR1-4 Überexpression und in der *flhR* Deletionsmutante eine verminderte Expression zeigten, während aus einer *flhR* Überexpression erhöhte mRNA Level dieser Gene resultierten (siehe Abb. 58).

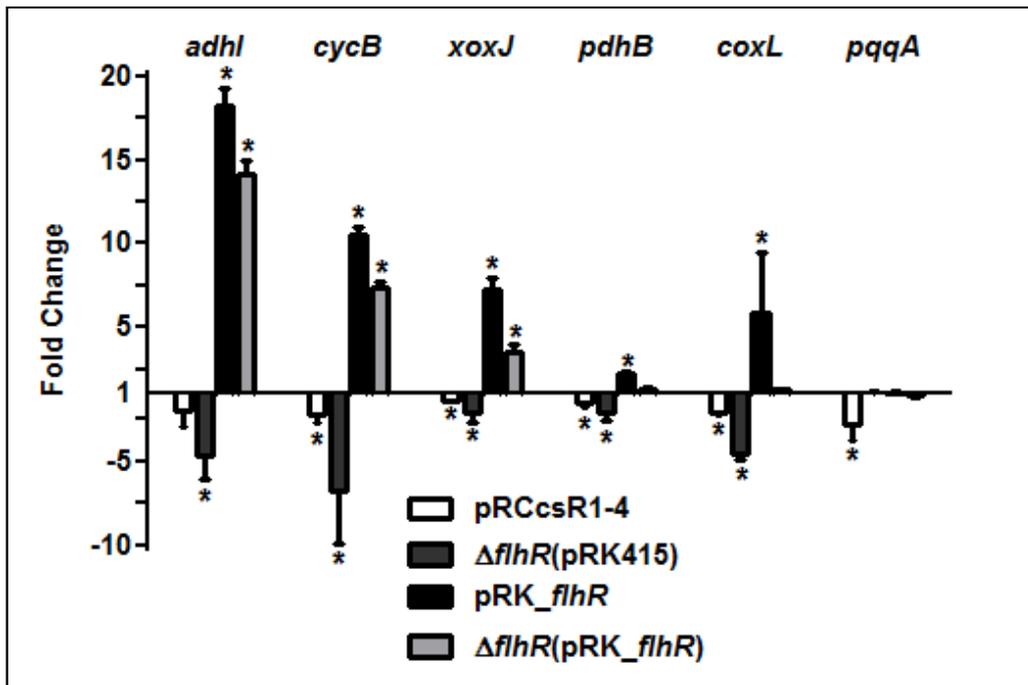


Abbildung 58: Expression ausgewählter Gene des C1-Metabolismus und des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes. Die dargestellten Änderungen der Expression wurden mittels qRT-PCR von Proben aus *R. sphaeroides* 2.4.1 mit konstitutiver CcsR1-4 Überexpression, *R. sphaeroides* 2.4.1 mit konstitutiver *flhR* Überexpression, einem endogenen *R. sphaeroides* 2.4.1 *flhR*-Deletionsstamm mit Leerplasmid und einem endogenen *R. sphaeroides* 2.4.1 *flhR*-Deletionsstamm mit konstitutiver *flhR* Überexpression von einem Plasmid ermittelt. *R. sphaeroides* 2.4.1 mit dem Leerplasmid pRK415 diente in allen Fällen als Referenz (Messung durchgeführt und Daten bereitgestellt von Tao Peng). Die Fehlerbalken beschreiben die Standardabweichung vom Mittelwert aus drei biologischen Replikaten mit jeweils zwei technischen Replikaten. Signifikante Änderungen der Genexpression sind durch * markiert ($p \leq 0.05$).

Hieraus wurde geschlossen, dass die CcsR1-4 abhängige Repression dieser Gene indirekt ist und über die Regulation der *flhR* mRNA realisiert ist. Im Gegensatz hierzu zeigte die *pqqA* mRNA nur im *R. sphaeroides* Stamm mit konstitutiver CcsR1-4 Überexpression eine reprimierte Expression, während eine Deletion oder Überexpression von *flhR* keinen Einfluss auf die Expression der mRNA dieses Gens nahmen (siehe Abb. 58). Dies wurde als Hinweis darauf gesehen, dass *pQQA* wahrscheinlich unabhängig von *flhR* durch CcsR1-4 beeinflusst wird.

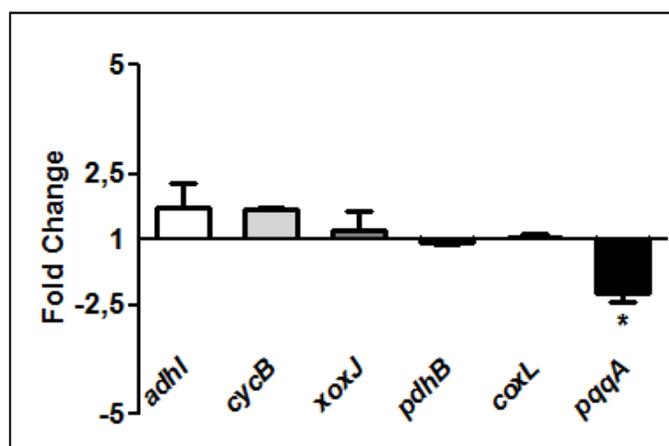


Abbildung 59: Eine CcsR 1-4 Überexpression in einer *R. sphaeroides* 2.4.1 *flhR* Deletionsmutante reprimiert die *pqqA* Expression, während Gene des C1-Metabolismus und des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes nicht beeinflusst werden. Die dargestellten Änderungen der Expression wurden mittels qRT-PCR von Proben aus einem *R. sphaeroides* 2.4.1 *flhR* Deletionsstamm mit CcsR1-4 Überexpression von einem Plasmid ermittelt. Der gleiche *R. sphaeroides* 2.4.1 *flhR* Deletionsstamm mit dem Leerplasmid pRK415 diente als Referenz für die Grundexpression (Messung durchgeführt und Daten bereitgestellt von Tao Peng). Die Fehlerbalken beschreiben die Standardabweichung vom Mittelwert aus drei biologischen Replikaten mit jeweils zwei technischen Replikaten. Signifikante Änderungen der Genexpression sind durch * markiert ($p \leq 0.05$).

Um die gezogenen Rückschlüsse zu untermauern, wurde in der *R. sphaeroides flhR* Deletionsmutante eine konstitutive CcsR1-4 Überexpression in Bezug auf die mRNA Level der zuvor analysierten Gene untersucht, wobei eine entsprechende Leervektorkontrolle als Referenz diente. Es zeigte sich, dass nur die *pqqA* mRNA eine verminderte Expression bei CcsR1-4 Überexpression aufwies, während für *adhI*, *cycB*, *xoxJ*, *pdhB*, und *coxL* keine signifikante Änderung der Expression nachgewiesen werden konnte (siehe Abb. 59).

3.4.4 Analyse potentieller CcsR Interaktionen mit mRNAs mit Hinblick auf eine potentielle Konservierung

Nachdem gezeigt werden konnte, dass CcsR-RNAs in verschiedenen Alphaproteobakterien in ähnlichen genetischen Kontexten zu finden sind und auch ein vergleichbares Expressionsmuster beobachtet werden konnte, stellte sich die Frage, ob auch eine Konservierung einer Funktion der sRNAs vorhanden ist. Hierbei war einerseits von Interesse, ob die in *R. sphaeroides* 2.4.1 ermittelte Interaktion von CcsR1-4 mit der *flhR*-mRNA in anderen Organismen mit CcsR-RNAs konserviert ist und

andererseits, ob es über diese Interaktion hinaus noch weitere möglicherweise konservierte Interaktionen mit anderen mRNAs gibt. Um diese Fragen zu adressieren, wurden verschiedene bioinformatische Methoden angewandt. Auf der einen Seite wurde mittels eines Zusammenspiels aus BLASTp und INTARNA-Vorhersagen halbautomatisch nach konservierten Interaktionspartnern der CcsR-RNAs gesucht (siehe Tab. 1). Auf der anderen Seite wurde mittels HOMOLGYINTARNA, welches ein Vorläuferprogramm zu COPRARNA ist, nach konservierten Interaktionen gesucht. Ergänzend wurde mittels COPRARNA nach verschiedenen Ebenen der Konservierung gesucht (siehe Tab. 2 und Tab. 3). Die drei bioinformatischen Vorhersagen wurden dann abschließend gegeneinander abgeglichen. Zusätzlich wurde ein Vergleich zu den globalen Expressionsanalysen in Zusammenhang mit CcsR1-4 Überexpression in *R. sphaeroides* durchgeführt, um die Qualität der Vorhersagen zu verstärken (siehe Abb. 60 & Abb. 61).

Die Interaktion zwischen den CcsR RNAs und der flhR mRNA ist möglicherweise teilweise konserviert

Bei der Untersuchung von möglichen konservierten Interaktionen der CcsR RNAs stand zunächst die beobachtete Interaktion von CcsR1-4 mit der *flhR* mRNA im Vordergrund. Hierbei stellte sich bei der Untersuchung mittels BLASTp und INTARNA zunächst heraus, dass für alle Organismen mit vorhergesagten CcsR-RNAs und einem ermittelten *flhR*-Homolog auch eine potentielle Konservierung der Interaktion zu beobachten war, wobei diese Interaktion innerhalb verschiedener *R. sphaeroides* Stämme besonders stark ausgeprägt war (siehe Tab. 1 & Anhang Tab. A4). Im Gegensatz dazu schloss eine Untersuchung mittels HOMOLGYINTARNA eine Konservierung der *flhR* Interaktion innerhalb verschiedener Alphaproteobakterien aus (siehe Tab. 2). Die Analyse mit COPRARNA legte eine auf *R. sphaeroides* Stämme beschränkte Konservierung der Interaktion zwischen den CcsR RNAs und der *flhR* mRNA nahe (siehe Tab.3).

Tabelle 1: Vorhersage konservierter Interaktionspartner der CcsR RNAs mittels BLASTP und INTARNA. Zusammenstellung der 25 besten Vorhersagen für konservierte CcsR Interaktionen, sortiert nach der durchschnittlichen INTARNA-Bewertung („*INTARNA-Score*“: Freie Energie einer vorhergesagten Interaktion in INTARNA im Vergleich zu den fünf Interaktionsvorhersagen mit der höchsten freien Energie in einem Organismus) der mittels BLASTP ermittelten Homologe zu vorhergesagten CcsR1 Interaktionspartnern aus *R. sphaeroides* 2.4.1. In grau hervorgehoben sind Interaktionsvorhersagen für mRNAs von Genen mit Verbindung zum C1-Metabolismus, zum Glutathion-Haushalt oder zum Pyruvatdehydrogenase-Komplex.

Pos.	\emptyset IntaRNA- Score	R. <i>sphaeroides</i> 2.4.1	R. <i>sphaeroide</i> s 2.4.3	R. <i>sphaeroides</i> 2.4.9	R. <i>sphaeroide</i> s KD131	S. <i>meliloti</i> 1021	R. <i>litoralis</i> OCh149	P. <i>denitrificans</i> PD1222	R. <i>denitrificans</i> OCh114
1	0,79	RSP_2255	Rsph17025_2241	Rsph17029_0929	RSKD131_0573	SMc02162	RLO149_c011180	Pden_2005	RD1_1974
2	0,77	RSP_2591	Rsph17025_1932	Rsph17029_1249	RSKD131_0903	SM_b20162	RLO149_c037810	Pden_2354	RD1_0879
3	0,76	RSP_0573	Rsph17025_0504	Rsph17029_2226	RSKD131_1913	SMc02140	RLO149_c015990	Pden_4555	RD1_2841
4	0,73	RSP_3500	Rsph17025_3355	Rsph17029_3146	RSKD131_3667	SM_b21016	RLO149_c023110	Pden_4851	RD1_3080
5	0,67	RSP_2669	Rsph17025_1207	Rsph17029_1326	RSKD131_0983	SMc02519	RLO149_c003480	Pden_4392	RD1_4120
6	0,65	RSP_1195	Rsph17025_2633	Rsph17029_2856	RSKD131_2592	SMc02444	RLO149_c042010	Pden_2585	RD1_0398
7	0,62	RSP_2365	Rsph17025_2619	Rsph17029_1026	RSKD131_0677	SM_b20349	RLO149_c023110	Pden_2160	RD1_3080
8	0,62	RSP_2104	Rsph17025_0691	Rsph17029_0780	RSKD131_0414	SMc00431	RLO149_c008780	Pden_2253	RD1_2499
9	0,60	RSP_6132	Rsph17025_0386	Rsph17029_2450	-	SM_b20204	RLO149_c036920	Pden_4883	RD1_1154
10	0,60	RSP_0793	Rsph17025_0387	Rsph17029_2449	RSKD131_2155	SM_b20205	RLO149_c036930	Pden_2362	RD1_1153
11	0,59	RSP_2872	Rsph17025_1148	Rsph17029_1518	RSKD131_1187	SMc03062	RLO149_c021740	Pden_1089	RD1_2323
12	0,57	RSP_2876	Rsph17029_1522	Rsph17025_1144	RSKD131_1192	SMc03103	RLO149_c014560	Pden_4257	RD1_2972
13	0,54	RSP_0598	Rsph17025_4038	Rsph17029_2251	RSKD131_1939	SMc00461	RLO149_c035790	Pden_1946	RD1_1201
14	0,53	RSP_0725	Rsph17025_2444	Rsph17029_2380	RSKD131_2083	SMc00726	RLO149_c031150	Pden_2023	RD1_1590
15	0,51	RSP_2719	Rsph17025_2138	Rsph17029_1377	RSKD131_1037	SMc00681	RLO149_c020480	Pden_0653	RD1_2510
16	0,50	RSP_1576	Rsph17025_0256	Rsph17029_0228	RSKD131_2974	SMc01224	RLO149_c027080	Pden_2208	RD1_3505
17	0,49	RSP_6040	-	Rsph17029_0862	RSKD131_0501	-	RLO149_c011760	Pden_3687	RD1_2029
18	0,49	RSP_0488	Rsph17025_2412	Rsph17029_2139	RSKD131_1820	SM_b21354	RLO149_c015060	-	RD1_2934
19	0,48	RSP_2844	Rsph17025_1494	Rsph17029_1450	RSKD131_1116	SMc01049	RLO149_c018010	Pden_4123	RD1_2754
20	0,48	RSP_3674	Rsph17025_1681	Rsph17029_3409	RSKD131_3904	SMc01977	RLO149_c026310	Pden_4181	RD1_3571
21	0,43	RSP_3133	Rsph17025_3420	Rsph17029_3870	-	-	RLO149_c002320	-	RD1_1027
22	0,41	RSP_3399	Rsph17025_2631	Rsph17029_3044	RSKD131_3564	SMc02442	RLO149_c042030	Pden_2587	RD1_0395
23	0,39	RSP_3949	Rsph17025_3643	-	RSKD131_4339	-	-	Pden_4244	-
24	0,37	RSP_1370	Rsph17025_0029	Rsph17029_0039	RSKD131_2770	SMc01532	RLO149_c021720	-	RD1_2326
25	0,34	RSP_2939	Rsph17025_0906	Rsph17029_1584	RSKD131_1258	SMc02069	RLO149_c023890	Pden_1866	RD1_3161

Die vorhergesagte Bindestelle für diese Interaktion umfasste in *R. sphaeroides* 2.4.1 hierbei eine wesentlich längere Region von mRNA und sRNA auf und umschloss eine Interaktion mit beiden CCUCCUCCC-Motiven der sRNA (siehe Anhang Abb. A2). Hieraus wurde abgeleitet, dass neben einer teilweise konservierten Interaktion mit der *flhR* mRNA, die möglicherweise beide CCUCCUCCC-Motive der sRNA umschließt, weitere konservierte Interaktionen der CcsR RNAs vorliegen könnten.

Vorhersagen mittels BLASTP und INTARNA, sowie HOMOLOGYPINTARNA legen weitere mögliche Interaktionspartner der CcsR RNAs nahe

Um mögliche weitere konservierte Interaktionen zu untersuchen, wurde einerseits in den Ergebnissen der drei bioinformatischen Analysen nach konservierten Vorhersagen für mRNAs von Genen mit Verbindung zum C1-Metabolismus, zum Glutathion-Haushalt oder zum Pyruvatdehydrogenase-Komplex gesucht (siehe Tab. 1, Tab. 2 und Tab. 3). Auf der anderen Seite wurden die Ergebnisse der bioinformatischen Analysen miteinander abgeglichen, um über potentielle Überlappungen verschiedener bioinformatischer Vorhersagen verlässlichere Aussagen zu bekommen. Hierbei konnten mittels BLASTP und INTARNA die mRNAs für das Signaltransduktionsprotein PhoB (RSP_0573), für die Pyroloquinolinquinon-Synthesepoteine PqqA und PqqB (RSP_0793 & RSP_6132), für die Thioredoxinreduktase TrxB (RSP_1576), für Thioredoxin (RSP_0725) und für die Kohlenstoffmonoxiddehydrogenase-Untereinheit RSP_2876 als potentiell über *R. sphaeroides* 2.4.1 hinaus konservierte Interaktionspartner der CcsR-RNAs identifiziert werden (siehe Tab. 1 und Anhang Tab. A5, Tab. A6, Tab. A7, Tab. A8, Tab. A9 & Tab. A10). Ein Vergleich mit der HOMOLOGYPINTARNA Vorhersage für eine Interaktionskonservierung unterstützte die Vorhersagen für die *pqqB*-mRNA und die RSP_2876 mRNA, unterstützte aber keine der weiteren möglichen CcsR-Interaktionspartner (siehe Tab. 2 und Abb. 60).

Tabelle 2: Vorhersage konservierter Interaktionspartner der CcsR RNAs mittels HOMOLOGYPINTARNA (HINTARNA). Dargestellt ist eine Zusammenstellung der 50 besten Vorhersagen für konservierte CcsR Interaktionen zusammen mit den vorhergesagten Interaktionspartnern in den untersuchten Organismen. In grau hervorgehoben sind Interaktionsvorhersagen für mRNAs von Genen mit Verbindung zum C1-Metabolismus, zum Glutathion-Haushalt oder zum Pyruvatdehydrogenase-Komplex.

Rang	<i>R. sphaeroides</i> 2.4.1	<i>R. sphaeroides</i> ATCC 17025	<i>R. denitrificans</i> OCH114	<i>P. denitrificans</i> PD1222	<i>S. meliloti</i> 1021
1	RSP_2886(<i>glgC</i>)	Rsph17025_1134(<i>glgC</i>)	Rd1_2874(<i>glgC</i>)	Pden_4427(<i>glgC</i>)	SMc03923(<i>glgC</i>)
2	RSP_0097(<i>smoM</i>)	Rsph17025_1686	Rd1_1717	Pden_0193	SMc04251
3	RSP_2184(<i>betA</i>)	Rsph17025_2310	Rd1_2024(<i>betA</i>)	Pden_1896	SMc00093(<i>betA</i>)
4	RSP_2363	Rsph17025_1554	Rd1_1109(<i>idnO</i>)	Pden_3542	SMc02339
5	RSP_1195(<i>comF</i>)	Rsph17025_2633	Rd1_0398(<i>comF</i>)	Pden_2585	SMc02444
6	RSP_0240(<i>pntA</i>)	Rsph17025_1582(<i>pntA</i>)	Rd1_3319(<i>pntA</i>)	Pden_4048(<i>pntA</i>)	SMc03950(<i>pntAa</i>)
7	RSP_2663	Rsph17025_1201	Rd1_4122	Pden_4387	SMc02514
8	RSP_0579	Rsph17025_0510	Rd1_2332(<i>acsA</i>)	Pden_4213	SMc04093(<i>acsA1</i>)
9	RSP_0723(<i>ald</i>)	Rsph17025_2442	Rd1_1033(<i>ald</i>)	Pden_1729	
10	RSP_2199	Rsph17025_2293	Rd1_3969	Pden_2868	SMc02229
11	RSP_3297		Rd1_2843	Pden_3574	SMc03121
12	RSP_0007	Rsph17025_2164	Rd1_2780	Pden_0590	SMc02079
13	RSP_1145	Rsph17025_2782	Rd1_0059(<i>mtgA</i>)	Pden_2288	SMc03883(<i>mtgA</i>)
14	RSP_2669	Rsph17025_1207	Rd1_4120(<i>ugpC</i>)	Pden_4392	SMc02519
15	RSP_0099	Rsph17025_1688	Rd1_1716	Pden_0190	SMc04248
16	RSP_2872(<i>aglF</i>)	Rsph17025_1148	Rd1_2323(<i>aglF</i>)		SMc03062(<i>aglF</i>)
17	RSP_0989	Rsph17025_0235	Rd1_2212(<i>rbcS</i>)	Pden_0504	SMc02170
18	RSP_1020(<i>glcD</i>)	Rsph17025_0208	Rd1_0625(<i>glcD</i>)	Pden_4399	SMc00832(<i>glcD</i>)
19	RSP_0990	Rsph17025_0234	Rd1_2213	Pden_0505	SMc02171
20	RSP_0793(<i>pqqB</i>)	Rsph17025_0387	Rd1_1153(<i>pqqB</i>)	Pden_2362	
21	RSP_0193	Rsph17025_1452	Rd1_2853	Pden_1269	SMc01347
22	RSP_1245	Rsph17025_2682	Rd1_3703	Pden_4436	SMc03161
23	RSP_0991	Rsph17025_0233	Rd1_2214(<i>frcR</i>)	Pden_0506	SMc02172
24	RSP_0812	Rsph17025_0368	Rd1_1179	Pden_2178	SMc01930
25	RSP_0735	Rsph17025_2453	Rd1_1601	Pden_2015	SMc00714
26	RSP_2876	Rsph17025_1144	Rd1_2972(<i>coxM</i>)		SMc03103
27	RSP_0931(<i>ialA</i>)	Rsph17025_2984	Rd1_0960	Pden_2509	SMc03785(<i>ialA</i>)
28	RSP_0418	Rsph17025_2342	Rd1_2526	Pden_3981	SMc01366
29	RSP_2257	Rsph17025_2239	Rd1_2877(<i>frk</i>)	Pden_2946	SMc02164(<i>frk</i>)
30	RSP_3500		Rd1_3080		SMc02324
31	RSP_1838	Rsph17025_0627	Rd1_2152	Pden_3621	SMc01013
32	RSP_2873(<i>aglE</i>)	Rsph17025_1147	Rd1_2322(<i>aglE</i>)		SMc03061(<i>aglE</i>)
33	RSP_2279	Rsph17025_2217	Rd1_0702	Pden_0048	
34	RSP_0688	Rsph17025_0542	Rd1_1278(<i>dacA</i>)	Pden_1757	SMc00996
35	RSP_2275	Rsph17025_2221	Rd1_0708	Pden_0052	
36	RSP_0366	Rsph17025_0875	Rd1_1912(<i>purA</i>)	Pden_0603	SMc00643(<i>purA</i>)
37	RSP_0629	Rsph17025_0596	Rd1_1074	Pden_2128	SMc01558
38	RSP_0247	Rsph17025_2020	Rd1_1747	Pden_0731	SMc02558
39	RSP_2255	Rsph17025_2241	Rd1_1974(<i>lcfA</i>)	Pden_2005	
40	RSP_2727	Rsph17025_2076	Rd1_3176	Pden_3945	SMc00736
41	RSP_1078(<i>fdsG</i>)	Rsph17025_2855		Pden_2858	SMc02524(<i>fdsG</i>)
42	RSP_2582	Rsph17025_1941	Rd1_0898	Pden_0026	
43	RSP_0708	Rsph17025_0522	Rd1_1259		SMc02903
44	RSP_0140(<i>rpsR</i>)	Rsph17025_1351(<i>rpsR</i>)	Rd1_3044(<i>rpsR</i>)	Pden_0890(<i>rpsR</i>)	SMc00567(<i>rpsR</i>)
45	RSP_1081(<i>fdsC</i>)	Rsph17025_2852	Rd1_3410(<i>fdhD</i>)	Pden_2855	SMc03085(<i>fdsC</i>)
46	RSP_2846	Rsph17025_1496	Rd1_2751	Pden_4003	SMc00133
47	RSP_2193(<i>gcvT</i>)	Rsph17025_2299(<i>gcvT</i>)	Rd1_1222(<i>gcvT</i>)	Pden_2348	SMc02047(<i>gcvT</i>)
48	RSP_2244		Rd1_3559	Pden_1885	SMc02391
49	RSP_1841	Rsph17025_0630	Rd1_1934(<i>ispZ</i>)	Pden_4299	SMc03853
50	RSP_1834	Rsph17025_0623	Rd1_2144		SMc03970

Eine eingehende bioinformatische Analyse mittels CopraRNA zeigt mögliche Stufen der Konservierung

Über die beschriebenen Untersuchungen hinaus wurde mittels einer COPRARNA-Analyse mit Organismen, die eine nachweisliche CcsR-RNA Expression aufwiesen und das für *R. sphaeroides* beobachtete CcsR-Expressionsmuster zeigten, ermittelt, dass es möglicherweise verschiedene Ebenen der Konservierung von CcsR-Interaktionspartnern gibt. So konnte ermittelt werden, dass für die Thioredoxin-mRNA (RSP_0725), für die ABC-Transporter Untereinheit RSP_2582 und für die Maltosetransporteruntereinheit AglF (RSP_2872) eine Konservierung innerhalb aller Organismen mit CcsR Homologen möglich sein könnte, während für *catR* (RSP_0794) eine Konservierung innerhalb des Genus *Rhodobacter* denkbar ist. Für *flhR* (RSP_2591) wurde, wie bereits beschrieben, ebenso wie für *pdhB* (RSP_4050) eine möglicherweise auf *R. sphaeroides* beschränkte Konservierung der Interaktion mit den CcsR-RNAs nahegelegt (siehe Tab. 3).

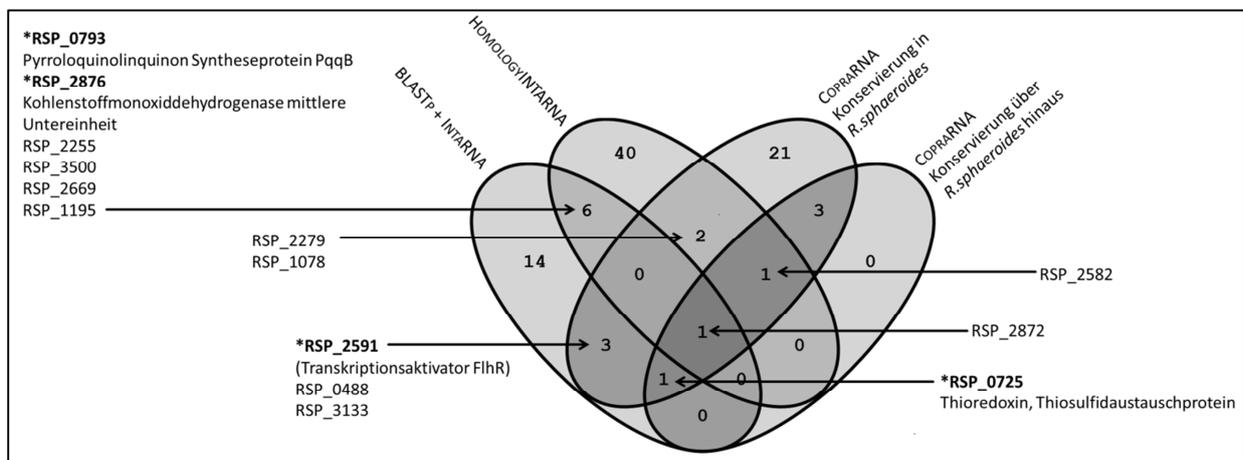


Abbildung 60: Vergleich bioinformatischer Vorhersagen für konservierte Interaktionen von CcsR-RNAs aus verschiedenen Alphaproteobakterien. Gezeigt ist die Übereinstimmung zwischen verschiedenen bioinformatischen Suchen nach konservierten CcsR-RNA Interaktionspartnern. Berücksichtigt wurden die Ergebnisse einer Suche mittels BLASTP und INTRANA, einer Suche mittels HOMOLOGYINTRANA und zweier Analysen mittels COPRARNA.

Tabelle 3: Vorhersage konservierter Interaktionspartner der CcsR RNAs mittels COPRARNA. Zusammenstellung konservierter Interaktionen innerhalb der Alphaproteobakterien, innerhalb des Genus *Rhodobacter* und innerhalb der Art *Rhodobacter sphaeroides*. Berücksichtigt wurden jeweils die 40 besten Vorhersagen für konservierte CcsR Interaktionen pro Vorhersage, In grau hervorgehoben sind Interaktionsvorhersagen für mRNAs von Genen mit Verbindung zum C1-Metabolismus, zum Glutathion-Haushalt oder zum Pyruvatdehydrogenase-Komplex.

Gen <i>R. sphaeroides</i> 2.4.1	Funktion	Rang CopraRNA		
		<i>Rhizobiales & Rhodobacterales</i>	<i>Rhodobacter</i>	<i>R: sphaeroides</i>
Mögliche Konservierung zwischen <i>Rhodobacterales</i> und <i>Rhizobiales</i>				
RSP_2872 (<i>aglF</i>)	<i>alpha-glucoside ABC transporter inner membrane protein AglF</i>	15	20	3
RSP_0725	<i>thioredoxin</i>	25	2	2
RSP_2582	<i>amino acid/amide ABC transporter substrate-binding protein, HAAT family</i>	26	6	9
Mögliche Konservierung in <i>Rhodobacter</i>				
RSP_0171	<i>response regulator receiver protein</i>		5	13
RSP_1599	<i>AMP-binding protein</i>		8	19
RSP_0794 (<i>catR</i>)	<i>LysR family transcriptional regulator</i>		37	21
Mögliche Konservierung innerhalb von <i>Rhodobacter sphaeroides</i>				
RSP_0488 (<i>uxaC</i>)	<i>glucuronate isomerase</i>			1
RSP_2872 (<i>aglF</i>)	<i>alpha-glucoside ABC transporter inner membrane protein AglF</i>			3
RSP_0928	<i>hypothetical protein</i>			4
RSP_3133	<i>hypothetical protein</i>			5
RSP_0649 (<i>thiM</i>)	<i>hydroxyethylthiazole kinase</i>			6
RSP_2279	<i>long chain acyl-CoA synthetase</i>			7
RSP_2591 (<i>flhR</i>)	<i>LuxR family transcriptional regulator</i>			8
RSP_1134 (<i>Dxs</i>)	<i>1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase</i>			10
RSP_3732	<i>sugar ABC transporter substrate-binding protein</i>			12
RSP_2205	<i>hypothetical protein</i>			14
RSP_3094	<i>transmembrane anti-sigma factor</i>			15
RSP_1691 (<i>etfB</i>)	<i>electron transfer flavoprotein subunit beta</i>			18
RSP_0768	<i>LuxR family transcriptional regulator</i>			20
RSP_6079	<i>hypothetical protein</i>			22
RSP_1249	<i>ribose ABC transporter periplasmic solute-binding protein</i>			23
RSP_3177 (<i>fabB</i>)	<i>3-oxoacyl-ACP synthase</i>			24
RSP_2972	<i>hypothetical protein</i>			25
RSP_0357	<i>HflK protein</i>			27
RSP_1565 (<i>appA</i>)	<i>protein AppA antirepressor of ppsR sensor of blue light</i>			29
RSP_1078 (<i>fdsG</i>)	<i>formate dehydrogenase subunit gamma</i>			30
RSP_2947	<i>glutamate racemase</i>			32
RSP_2749	<i>P4 family integrase</i>			34
RSP_1277	<i>hypothetical protein</i>			36
RSP_2544	<i>protein-L-isoaspartate O-methyltransferase</i>			37
RSP_0586 (<i>nadD</i>)	<i>nicotinic acid mononucleotide adenyltransferase</i>			38
RSP_4050 (<i>pdhB</i>)	<i>branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase subunit E2</i>			39
RSP_3442	<i>2-hydroxyacid dehydrogenase</i>			40

Ein Abgleich mit den weiteren bioinformatischen Vorhersagen zeigte für die Thioredoxin- und *flhR*-mRNAs eine Übereinstimmung mit der Suche mittels BLASTP und INTARNA, während keine Übereinstimmung mit HOMOLOGYPINTARNA für mRNAs von Genen mit Verbindung zum C1-Metabolismus, zum Glutathion-Haushalt oder zum Pyruvatdehydrogenase-Komplex ermittelt werden konnte (siehe Abb. 60). Zusätzlich konnte für den Maltosetransporter AgIF eine Übereinstimmung zwischen der Suche mittels BLASTP und INTARNA gezeigt werden, während für den ABC-Transporter RSP_2582 eine Übereinstimmung zwischen COPRARNA und HOMOLOGYPINTARNA beobachtet werden konnte.

Ein Vergleich der bioinformatischen Vorhersagen mit Expressionsdaten zeigt bereits bekannte potentielle Interaktionspartner

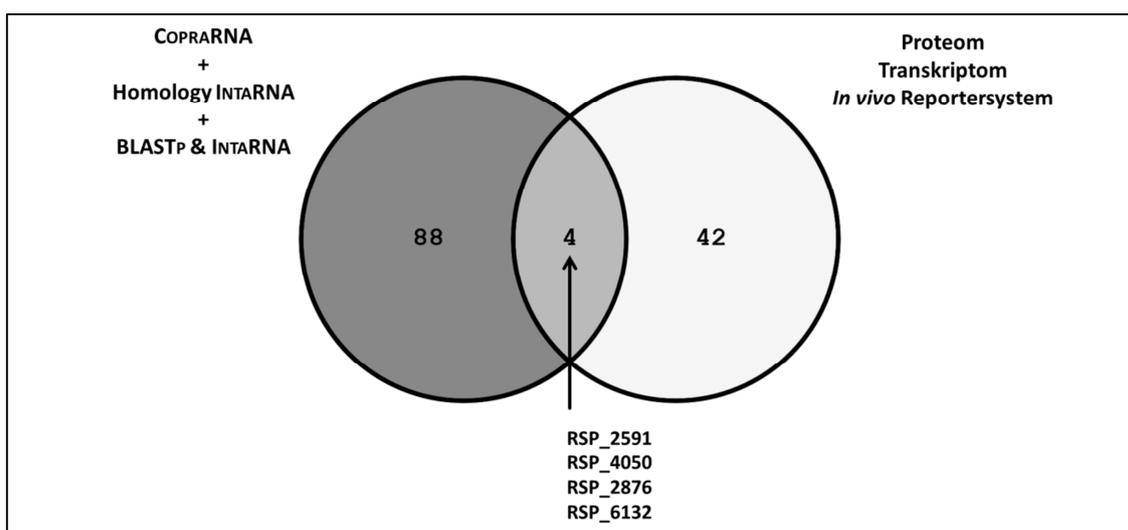


Abbildung 61: Vergleich bioinformatischer Vorhersagen für konservierte Interaktionen von CcsR-RNAs aus verschiedenen Alphaproteobakterien mit Expressionsstudien in *R. sphaeroides*. Gezeigt ist die Übereinstimmung zwischen verschiedenen bioinformatischen Suchen nach konservierten CcsR-RNA Interaktionspartnern mit den Ergebnissen verschiedener Expressionsstudien unter CcsR1-4 Überexpression in *R. sphaeroides* 2.4.1.

Um weitere mögliche konservierte Interaktionspartner der CcsR-RNAs zu ermitteln, die unabhängig von C1-Metabolismus, Glutathion-Haushalt oder Pyruvatdehydrogenase-Komplex einzuordnen sind, wurden die zusammengefassten Daten der verschiedenen Expressionsanalysen in *R. sphaeroides* mit den zusammengefassten bioinformatischen

Vorhersagen konservierter CcsR-RNA Interaktionspartner kombiniert. Hierbei zeigte sich, dass lediglich für die bereits für CcsR1-4 in *R. sphaeroides* 2.4.1 analysierten potentiellen Interaktionspartner *flhR* (RSP_2591), *pdhB* (RSP_4050), *pqqA* (RSP_6132) und RSP_2876 eine Übereinstimmung zwischen bioinformatischen Vorhersagen und den Expressionsanalysen vorlag (siehe Abb. 61).

4 Diskussion

Betrachtet man die verschiedenen bioinformatischen und molekulabiologisch-biochemischen Befunde zu den CcsR-RNAs aus *R. sphaeroides* 2.4.1 unter Berücksichtigung der Befunde in anderen Alphaproteobakterien, so ergibt sich zunächst das Bild von mehreren homologen sRNAs, die abhängig von Hitzestress und oxidativem Stress zusammen mit dem Gen für CcaF1 transkribiert werden. Hierbei nehmen die Sigmafaktoren RpoH_I und RpoH_{II}, sowie möglicherweise der globale Regulator PrrA, Einfluss auf die Expression der sRNAs (siehe Abb. 62).

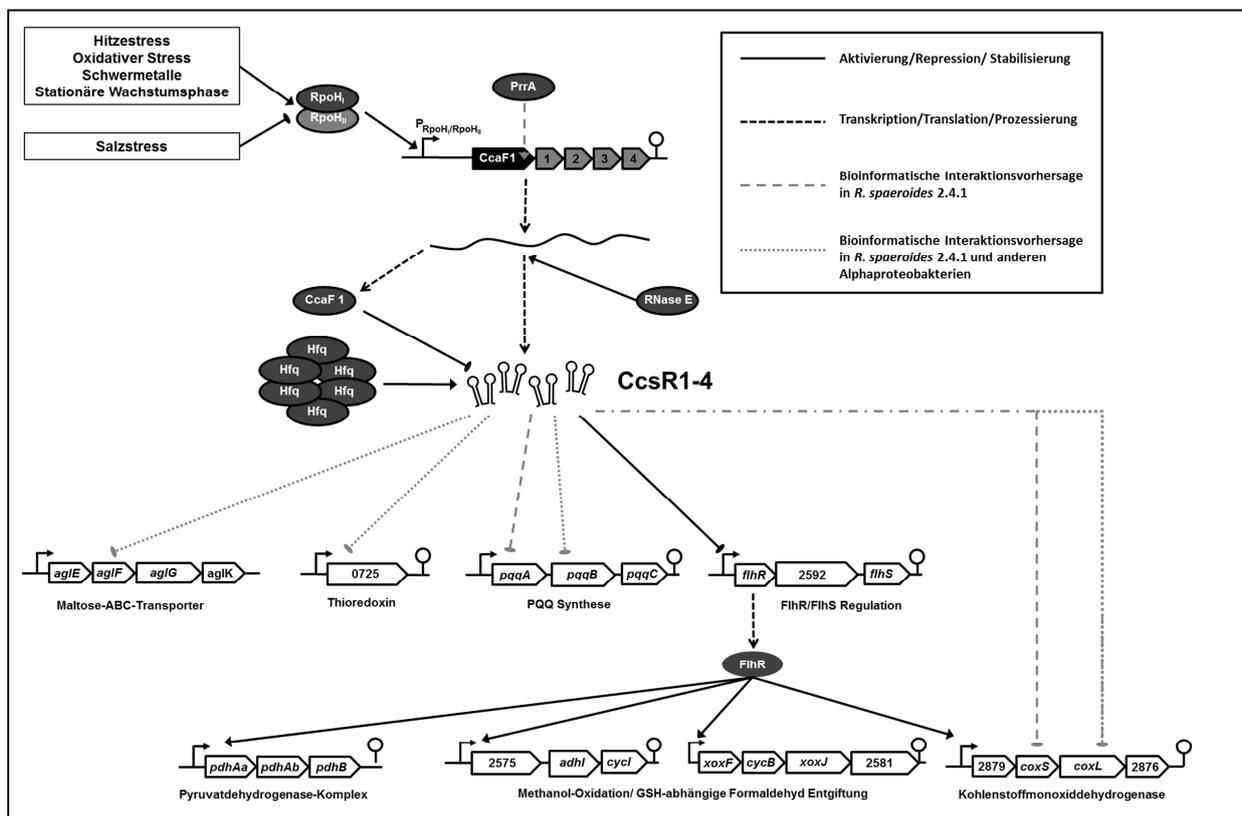


Abbildung 62: Schematische Darstellung der Regulation der CcsR RNAs in *R. sphaeroides* 2.4.1: Dargestellt ist die Regulation der CcsR-RNAs durch oxidativen Stress und den globalen Regulator PrrA, sowie die Prozessierung der sRNAs und folgende Regulation durch die sRNAs.

Nach der Transkription des polycistronischen Transkripts erfolgt eine Prozessierung der einzelnen CcsR-RNAs unter Beteiligung von RNase E. Im Anschluss wirken die prozessierten CcsR-RNAs unter Interaktion mit Hfq und möglicherweise CcaF1 auf

verschiedene mRNAs, deren Expression reprimiert wird (siehe Abb. 62). Hierbei scheint eine Feinjustierung von Redoxprozessen innerhalb von Energiemetabolismus und Glutathion-abhängiger Formaldehydentgiftung eine zentrale Funktion der CcsR-RNAs zu sein.

4.1 Analyse der RpoH_I/RpoH_{II} abhängigen Expression und RNase E-abhängigen Prozessierung der CcsR-RNAs aus *R. sphaeroides* 2.4.1

Die CcsR-RNAs CcsR1-4 in *R. sphaeroides* konnten im Rahmen einer Suche nach hochabundanten und nach durch (photo-)oxidativen Stress induzierten sRNAs unter dem Namen RSs0680a-d zuerst beschrieben werden und konnten bereits kurze Zeit später den Hfq-bindenden sRNAs zugeordnet werden (Berghoff *et al.* 2009; Berghoff *et al.* 2011). Die für die CcsR-RNAs beobachtete Cotranskription mehrerer homologer sRNA stellt keine exklusive Besonderheit dieser sRNAs dar. So wurden unter anderem bereits cotranskribierte Duplikate von sRNAs in *Pseudomonas aeruginosa* und in *Erwinia carotovora* beschrieben (Wilderman *et al.* 2004; Fienran *et al.* 2009). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass CcsR1-4 in der 3' UTR von *ccaf1* (RSP_6037) lokalisiert sind. Eine Lokalisierung von sRNAs in UTRs und insbesondere 3' UTRs von Protein-codierenden Genen ist eine häufig wiederkehrende Beobachtung und es konnten zum Beispiel auch in *E. coli* und *Salmonella typhimurium* bereits sRNAs in UTRs nachgewiesen werden (Miyakoshi *et al.* 2015; Chao *et al.* 2012; Kawano *et al.* 2005). Die Expression von CcsR1-4 ist in *R. sphaeroides* 2.4.1 gesteuert durch einen RpoH_I und RpoH_{II} abhängigen Promotor. Im Rahmen dieser Arbeit und weiterer Studien konnte gezeigt werden, dass dieser Promotor wahrscheinlich unter vielen verschiedenen Stressbedingungen aktiv ist und zum Beispiel durch oxidativen Stress, Hitzestress oder Ethanolstress induziert wird (Adnan *et al.* 2015). Folglich ist die Expression von CcsR1-4 unter diesen Stressbedingungen vergleichbar mit anderen

RpoH_I und RpoH_{II} abhängigen sRNAs wie SorY (Adnan *et al.* 2015). Ein Blick auf die CcsR RNAs anderer Alphaproteobakterien zeigte vergleichbare Expressionsmuster der sRNAs in verschiedenen Rhizobien und *Rhodobacter* Stämmen, jedoch waren konservierte Expressionsmuster in anderen Alphaproteobakterien nicht zu beobachten. Dies ließ vermuten, dass nur eine Teilkonservierung der Expressionsbedingungen der CcsR-RNAs vorhanden ist. Hierbei ist unter Annahme einer konservierten Cotranskription der CcsR-RNAs mit dem *ccaF1*-Gen auch eine Konservierung der RpoH_I und RpoH_{II} abhängigen Expression wahrscheinlich, da in *S. meliloti* für *ccaF1* eine entsprechende RpoH_I und RpoH_{II} abhängige Expression beobachtet werden konnte (Bittner 2008). Nach der Transkription der CcsR RNA erfolgt eine Reifung aus dem Primärtranskript. Hierbei konnten RNase E, Hfq und vermutlich CcaF1 entscheidende Rollen für diese Reifung und die Stabilität der gereiften sRNAs zugeordnet werden, wobei insbesondere die Interaktion mit RNase E auch in anderen Arbeiten bestätigt werden konnte (L. Weber persönliche Rücksprache). Eine Assoziation der sRNAs mit Hfq und RNase E ist hierbei wenig verwunderlich, da eine zentrale Rolle von beiden Proteinen im Zusammenhang mit dem sRNA vermittelten mRNA-Abbau durch das Degradosom bekannt und hinreichend belegt ist (Saramago *et al.* 2014; Lalalouna *et al.* 2013; De Lay *et al.* 2013; Storz *et al.* 2011).

4.2 CcsR1-4 interagieren in *R. sphaeroides* mit der *flhR*-mRNA

Nachdem Expressions- und Prozessierungsbedingungen, sowie stabilisierende Faktoren für CcsR1-4 bestimmt waren, stellte sich die Frage nach der Funktion der vier sRNAs. Hierbei war einerseits von Interesse, welche zellulären Prozesse von CcsR1-4 reguliert werden, andererseits stellte sich die Frage warum vier nahezu identische sRNAs in einer funktionellen Einheit cotranskribiert werden. In diesem Zusammenhang war besonders interessant, ob den vier sRNAs spezifische Interaktionspartner

zuzuordnen sind, oder ob die vier sRNAs identische Interaktionspartner aufweisen. Durch eine Kombination von molekularbiologischen, biochemischen und bioinformatischen Analysen konnten diese Fragen adressiert werden. Hierbei zeigte sich eine spezifische Repression der Expression von *FlhR* durch *CcsR1-4*, was einem typischen sRNA Effekt entsprach (Waters & Stroz 2009). Mittels Basenaustauschmutationen konnte eine spezifische Bindestelle in der Nähe der ribosomalen Bindestelle identifiziert werden, die eine Störung der Translation durch die sRNAs nahelegte. Eine Störung der Translation durch sRNAs konnte bereits mit verschiedenen Wirkmechanismen für verschiedene sRNAs wie *RyhB*, *IstR1* und *GcvB* beobachtet werden (Vecerek *et al.* 2007; Darfeuille *et al.* 2007; Sharma *et al.* 2007). Zusätzlich stellte sich heraus, dass für eine volle Ausprägung des Effekts auf die *flhR* mRNA und auch für eine effiziente Ausbildung einer Resistenz gegen oxidativen Stress alle vier sRNAs notwendig sind. Hieraus konnte geschlossen werden, dass vier Kopien der *CcsR*-RNAs im Genom von *R. spaeroides* vorliegen um einen möglichst starken modulatorischen Effekt durch eine größere Anzahl von sRNA-Molekülen im Vergleich zur regulierten mRNA zu erreichen. Dieses Phänomen einer funktionellen Redundanz mehrerer sRNAs ist bereits aus anderen Bakterien bekannt und konnte zum Beispiel bereits für *PrrF1* und *PrrF2* in *P. aeruginosa*, *OmrA* und *OmrB* in *E. coli* und die *Qrr* sRNAs in *V. cholerae* gezeigt werden (Guillier *et al.* 2006; Guillier *et al.* 2008; Holmqvist *et al.* 2010; Lenz *et al.* 2005). Neben dem Vorhandensein aller vier *CcsR* RNAs spielte auch das Vorhandensein von *Hfq* eine entscheidende Rolle für die Interaktion der *CcsR* RNAs mit der *flhR* mRNA. Hierbei konnte nicht abschließend geklärt werden, ob *Hfq* lediglich eine Rolle in der Stabilisierung der *CcsR* RNAs spielt oder ob *Hfq* eine direkte Funktion in der Interaktion zwischen sRNAs und mRNA hat. Für eine solche Funktion innerhalb der Interaktion ist einerseits das generell akzeptierte Szenario denkbar, dass

die sRNAs und die mRNA durch Hfq zueinander geführt werden (Maki *et al.* 2008). Eine alternative Möglichkeit ist, dass Hfq durch die sRNAs zur mRNA rekrutiert wird und die Translation blockiert, wie für die sRNA Spot 42 und die *sdhC* mRNA beschrieben (Desnoyers *et al.* 2012).

4.3 Eine Konservierung der FlhR-Regulation durch die CcsR-RNAs ist nur eingeschränkt zu beobachten

Es ist aus den Enterobakterien bekannt, dass viele trans-codierte sRNAs eine Konservierung aufweisen. So konnten zum Beispiel für die sRNAs RybB und MicA konservierte Funktionen in der Modulation der Zellmembran ermittelt werden (Vogel & Pappenfort 2006). Vor diesem Hintergrund stellte sich die Frage, ob auch eine Konservierung der FlhR Regulation durch die CcsR-RNAs zu beobachten ist. Hierbei zeigten die verschiedenen genutzten bioinformatischen Analysen grundsätzlich widersprüchliche Ergebnisse. Eine Suche mit BLASTP und INTARNA legte eine partielle Konservierung der CcsR-RNA Interaktion mit der *flhR*-mRNA über den Genus *Rhodobacter* hinaus nahe, während HOMOLOGYPINTARNA diese Konservierung ausschloss und COPRARNA nur eine Konservierung der Interaktion innerhalb verschiedener *R. sphaeroides* Arten vorhersagte. Diese widersprüchlichen Ergebnisse der unterschiedlichen bioinformatischen Vorhersagen decken sich mit der Aussage, dass die bioinformatische Analyse von bakteriellen Zweikomponenten-Systemen ausserhalb der Enterobakterien auf Grund einer eingeschränkten Sequenzkonservierung an große Herausforderungen gekoppelt ist. Diese Herausforderungen sind entsprechend auch für die Analyse von Effekten regulatorischer RNAs auf Zweikomponenten-Systeme zu erwarten (M. Gelfand persönliche Rücksprache). Vor diesem Hintergrund erscheint es besonders bemerkenswert, dass sich in der semiautomatisierten Suche nach konservierten Interaktionspartnern mittels

BLASTP und INTARNA für *flhR* zeigte, dass in allen untersuchten Fällen LuxR-homologe Transkriptionsfaktoren einerseits eine hohe Homologie zu FlhR aufwiesen und andererseits für ihre mRNAs eine hohe freie Energie für eine potentielle Interaktion mit den CcsR-RNAs aufwiesen. Da sowohl COPRARNA, als auch HOMOLGYINTARNA, für die Analyse einen Austausch von sRNAs verschiedener Organismen (*Shuffling*) vornehmen, ist es gut vorstellbar, dass bei der Analyse von relativ schwach konservierten Zweikomponenten-Systemen für beide Programme verfälschte Ergebnisse auftreten können. Eine Berücksichtigung dieser Einschränkung beider Programme lässt vermuten, dass die Interaktion zwischen den CcsR-RNAs und FlhR möglicherweise partiell konserviert ist. Generell entspricht das Bild einer partiellen Konservierung der FlhR-Regulation den Erwartungen, die für sRNAs basierend auf der sRNA MicA in den Enterobakterien ausgesprochen wurden (Van Puyvelde *et al.* 2015). Andererseits ist es unwahrscheinlich, dass eine Regulation der *flhR*-mRNA die einzige konservierte Funktion der CcsR RNAs ist, da eine Deletion von *flhR* in *R. sphaeroides* 2.4.1 möglich war, während eine Deletion der CcsR-RNAs weder im *R. sphaeroides* 2.4.1 Wildtyp noch in der endogenen *flhR* Deletionsmutante möglich war. Hieraus lässt sich ableiten, dass es wahrscheinlich eine Funktion der CcsR-RNAs über die Regulation der FlhR-Expression hinaus gibt.

4.4 Mögliche Interaktionspartner und Funktionen der CcsR-RNAs über die Regulation von FlhR hinaus

Die Analyse der CcsR-RNAs in Zusammenhang mit einem *R. sphaeroides* 2.4.1 *flhR* Deletionsstamm legte nahe, dass es eine Funktion von der CcsR-RNAs über die Regulation der FlhR Expression hinaus gibt. Hierbei wäre prinzipiell eine Funktion der CcsR RNAs zusammen mit CcaF als Toxin-Antitoxin System denkbar, jedoch besteht laut RASTA-BACTERIA (**R**apid **A**utomated **S**can for **T**oxins and **A**ntitoxins in **B**acteria) in

R. sphaeroides 2.4.1 nur eine sehr schwache Homologie zu bekannten Toxin-Antitoxin Systemen (Sevin & Barloy-Huber 2007). Darüber hinaus ist es denkbar, dass die CcsR-RNAs neben der möglicherweise konservierten Interaktion mit der *flhR*-mRNA Interaktionen mit weiteren mRNAs eingehen. An dieser Stelle sei zunächst anzumerken, dass für alle vorhergesagten potentiell konservierten mRNA Interaktionspartner der CcsR-RNAs, die auch in den Expressionsanalysen einer *R. sphaeroides* 2.4.1 CcsR1-4 Überexpression ein auffälliges Verhalten zeigten, bereits molekularbiologische Interaktionsanalysen mit CcsR1-4 aus *R. sphaeroides* 2.4.1 durchgeführt wurden. Hierbei konnte nur für *flhR* die Interaktion wie beschrieben bestätigt werden. Für *pqqA*, den einzigen ermittelten FlhR-unabhängigen potentiellen Interaktionspartner der CcsR-RNAs, konnte keine Interaktion mit den CcsR-RNAs gezeigt werden, jedoch ist eine direkte oder indirekte Regulation des Pyrolloquinolinquinon-Synthesefaktors durch die CcsR RNAs stark impliziert: Einerseits wurde die *pqqA*-mRNA durch eine CcsR1-4 Überexpression in *R. sphaeroides* 2.4.1 stark reprimiert und andererseits besitzt Pyrolloquinolinquinon eine funktionelle Verbindung zum durch FlhR regulierten C1-Metabolismus (siehe unten). Unter Berücksichtigung der Tatsachen, dass in der Proteomanalyse nur die Analyse der Expression einer begrenzten Anzahl von Proteinen gelang und heutige bioinformatische Vorhersageprogramme für bakterielle sRNAs eine relativ hohe Fehlerquote aufweisen ist es möglich, dass CcsR-Interaktionspartner mit einer Verbindung zu oxidativem Stress nicht gefunden identifiziert werden konnten (Pain *et al.* 2015). Hierbei stellen insbesondere das Maltosetransportsystem, das Thioredoxinsystem und das Pyrolloquinolinquinonsynthese-System in den verschiedenen bioinformatischen Analysen und in den Expressionsanalysen wiederkehrende zelluläre Funktionen dar, deren mRNAs als potentielle CcsR Interaktionspartner in Frage kommen. Über die untersuchte Funktion der CcsR-RNAs unter oxidativen

Stressbedingungen hinaus, wurde eine mögliche PrrA Abhängigkeit der sRNAs vermutet. Diese mögliche Abhängigkeit wurde durch eine erhöhte Abundanz der sRNAs unter mikroaeroben Bedingungen, sowie durch die Vorhersage möglicher PrrA-Bindestellen nahegelegt. Eine solche Regulation würde der regulatorische Funktion der CcsR-RNAs potentiell eine neue Facette hinzufügen und neben der Auflösung, warum die Abundanz der sRNAs unter Sauerstofflimitierten Bedingungen erhöht ist, auch die beschriebene erhöhte Abundanz von CcsR1 in einer *R. sphaeroides* 2.4.1 *cryB* Deletionsmutante erklären (Frühwirth *et al.* 2009). Unter Berücksichtigung der Annahme, dass es eine PrrA abhängige Expression der CcsR RNAs gibt, wäre es dann schlüssig anzunehmen, dass es auch weitere Interaktionspartner der CcsR RNAs gibt, die durch die experimentellen Parameter der Expressionsanalysen unter aeroben Bedingungen nicht ausreichend erfasst wurden. Zusätzlich weist PrrA eine hohe Konservierung in den Alphaproteobakterien auf, was zusätzlich eine mögliche Konservierung der PrrA abhängigen CcsR-RNA Expression indizieren könnte (Elsen *et al.* 2004; Eraso & Kaplan 2009).

4.5 Die Funktion der CcsR RNAs in der Regulation von zellulären Prozessen in *R. sphaeroides* und Implikationen für andere Alphaproteobakterien

Nach der Betrachtung der verschiedenen Protein und RNA-Interaktionspartner der CcsR RNAs stellte sich die Frage nach der Funktion der CcsR RNAs innerhalb der komplexen Regulationsnetzwerke von *R. sphaeroides* und möglicherweise weiterer Alphaproteobakterien. Hierbei galt es zu klären, ob es eine allgemeingültigen Funktion der CcsR RNAs gibt oder ob die Beobachtungen in dieser Arbeit eine spezielle Funktion in *R. sphaeroides* 2.4.1 beschreiben. In diesem Zusammenhang ist es zunächst einmal hilfreich, sich noch einmal mögliche Gefahren für die Zelle durch Sauerstoff zu vergegenwärtigen. Grundsätzlich stellt das Vorhandensein von Sauerstoff selbst ein

großes Problem für die Zelle dar, da einerseits innerhalb des Elektronentransports der Atmungskette Elektronen auf molekularen Sauerstoff übertragen werden können und andererseits Photosynthesepigmente ihren Anregungszustand in Form von sogenannten Excitonen auf Sauerstoff übertragen können. Beide Prozesse haben die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies zur Folge. Diese können sowohl direkt Schäden an Zellbestandteilen hervorrufen und diese so inaktivieren, als auch zur Bildung besonders toxischer Biomoleküle wie Methylglyoxal führen (Davies 1995, Davies 2004, Davies 2005). Zusätzlich ist es von großer Bedeutung unter Anwesenheit von Sauerstoff ein reduziertes Zellmilieu aufrecht zu erhalten. Hierfür werden unter Anderem verschiedene Nicotinamid-, Flavin- und Pyrroloquinolinquinon- basierte Reduktionsäquivalente genutzt, deren Verfügbarkeit gezielt gesteuert wird. Eine Analyse der in dieser Arbeit gewonnenen Daten legte zunächst eine Regulation des Glutathion-abhängigen C1 Metabolismus durch die CcsR RNAs nahe. Für den Glutathion-abhängigen C1 Metabolismus ist sowohl eine Verbindung zur Photosynthese, als auch zur Elektronentransportkette der Atmung beschrieben (Wilson *et al.* 2008). Folglich ist es gut vorstellbar, dass die CcsR RNAs dabei helfen, den an den C1-Metabolismus gekoppelten Elektronenfluss über die Zellmembran zu koordinieren und zusätzlich über eine Regulation des Glutathion-Pools die Reduktion von oxidierten Zellkomponenten und reaktiven Sauerstoffspezies, unterstützen. Um die Funktion der CcsR-RNAs zu verdeutlichen ist es sinnvoll, die Regulation des Glutathion-abhängigen C1-Metabolismus einerseits im Zusammenhang mit oxidativem Stress zu betrachten und andererseits einen Blick auf diesen Metabolismus in Zusammenhang mit den vorherrschenden Wachstumsbedingungen zu werfen. Hierfür werden zunächst die einzelnen Schlüsselstationen des C1-Metabolismus im Kontext von oxidativem Stress betrachtet und anschließend die Konsequenzen einer Regulation durch die CcsR RNAs

präsentiert. In diesem Kontext ist insbesondere die Regulation von *AdhI*, einem zentralen Enzym des Metabolismus Glutathion-abhängigen C1 Metabolismus von Interesse, da *AdhI*, wie beschrieben, mit den Elektronentransportketten von Photosynthese und Atmung interagieren kann und so die ROS-Bildung begünstigt. Die Expression von *adhI* wird durch den von *CcsR1-4* regulierten LuxR-Transkriptionsregulator *FlhR* und durch den zentralen Regulator *PrrA*, welcher möglicherweise auch die Expression der *CcsR*-RNAs reguliert, gesteuert (Barber & Donohue 1998; Hickman *et al.* 2004, siehe Abb. 63). *PrrA* ist konserviert und reguliert in *R. sphaeroides* neben der Expression von *adhI* insbesondere die Expression der Photosynthesegene: Zusätzlich spielen *PrrA* und Homologe anderer Alphaproteobakterien eine zentrale Rolle in der Regulation der Sauerstoff-sensitiven Stickstofffixierung (Imam *et al.* 2014; Finan *et al.* 2001, siehe Abb 63). Eine weitere wichtige Quelle von ROS, neben der Einspeisung von Elektronen aus dem über *FlhR* regulierten glutathionabhängigen C1-Metabolismus, stellt die Einspeisung von Elektronen durch den ebenfalls *FlhR*-regulierten Pyruvatdehydrogenase-Komplex in die Elektronentransportkette der Atmung dar (Wilson *et al.* 2008; De Kok *et al.* 1998). In diesem Zusammenhang erscheint es interessant, dass in den bioinformatischen Vorhersagen eine Interaktion der *CcsR*-RNAs mit dem Maltosetransportsystem nahegelegt wurde, welches durch Maltoseimport die Bildung von Pyruvat und somit die Aktivität des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes steigert (Caldwell *et al.* 1969).

Neben einem Einfluss der *CcsR* RNAs auf die an den Elektronenfluss gekoppelte ROS-Bildung konnte auch eine Verbindung zum Glutathionpool gezeigt werden, dem eine zentrale Rolle in der ROS Abwehr zugesprochen wird. So wird, um die an reaktive Sauerstoffspezies gekoppelte Protein und Lipidoxidation und die damit verbundene Bildung reaktiver Biomoleküle zu unterbinden, die Bildung von reaktiven

Sauerstoffspezies schon an den Photosystemen *gequencht* und die Proteinoxidation und Lipidperoxidation durch Glutathion und Thioredoxin abhängige Mechanismen gehemmt (Domonkos *et al.* 2013; Lu & Holmgren 2013; Koháryová & Kolárová 2008; Li *et al.* 2003).

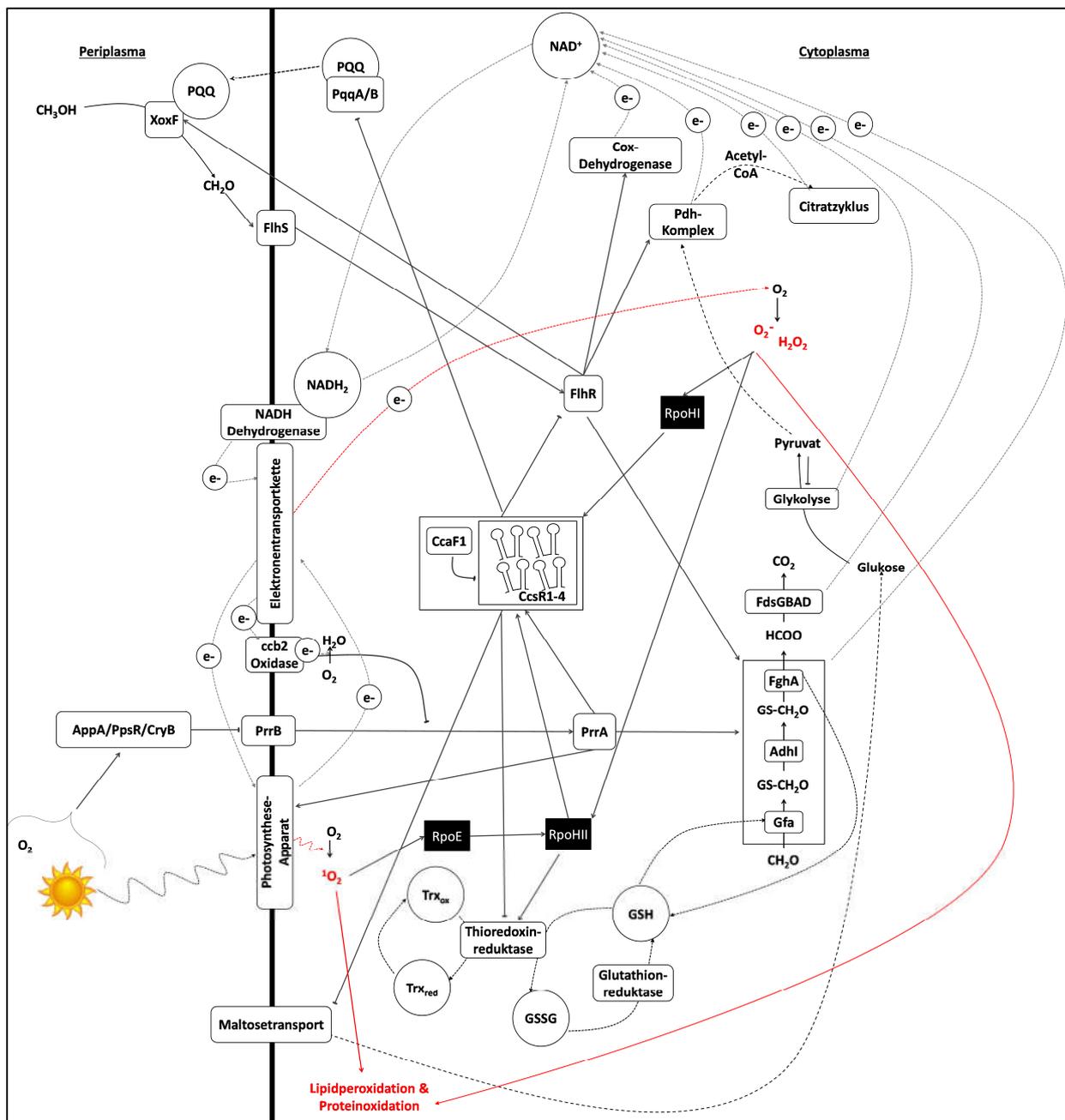


Abbildung 63: Schematische Darstellung der Regulation durch die CcsR RNAs in *R. sphaeroides* 2.4.1: Dargestellt ist die Regulation der CcsR-RNAs und die Regulation durch die CcsR-RNAs. Zu erkennen ist insbesondere, dass die CcsR RNAs wahrscheinlich unter den stark unterschiedlichen Bedingungen der Sauerstofflimitierung und des oxidativen Stresses eine Rolle spielen. Hierbei ist ein indirekter Einfluss auf verschiedene Hydrogenasen, den Glutathionpool und den Redoxfaktorpool zu vermuten.

Interessanterweise wurde, zusätzlich zur FlhR abhängigen Modulation des Glutathion-Pools, eine möglicherweise reprimierende Regulation von zentralen Komponenten des Thioredoxinsystems durch die CcsR-RNAs in verschiedenen bioinformatischen Analysen nahegelegt (siehe Abb. 63). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass dem Glutathionsystem unter oxidativen Stressbedingungen eine besondere Bedeutung zugeordnet wird, da es neben seiner beschriebenen Funktion als Antioxidant auch als Cofaktor für den Abbau reaktiver Bicarbone aus der Lipidperoxidation und Proteinoxidation dient und so unter anderem für das Glutathion-abhängige Glyoxylase-System genutzt wird (Deponte 2013). Insgesamt betrachtet ist also die Funktion der CcsR-RNAs wahrscheinlich an einer komplexen regulatorischen Schnittstelle zwischen den verschiedenen Redox-Prozessen des C1-Metabolismus und des aeroben Pyruvatmetabolismus, sowie der Regulation der Photosynthesegene, der Stickstofffixierung und der oxidativen Stressabwehr zu finden. Es nimmt hierbei eine Vielzahl von Umgebungsbedingungen und regulatorischen Faktoren Einfluss auf die Expression der CcsR-RNAs. Darüber hinaus ist die Expression von potentiell durch die CcsR RNAs regulierten Genen stark an Umgebungsvariablen gekoppelt. Daher ist es um die genaue Funktion der CcsR RNAs zu ermitteln hilfreich, die Funktion der sRNAs zunächst unter vereinfachten Umweltbedingungen zu betrachten und hierbei zusätzlich die Regulation durch die sRNAs zunächst als einen Schalter zu betrachten. Die so gewonnenen Erkenntnisse erlauben dann abschließende Rückschlüsse auf die Funktion der CcsR-RNAs *in vivo*, wo komplexe Umweltbedingungen vorliegen bei denen eher mit einem Modulationseffekt der CcsR RNAs auf die Interaktionspartner zu rechnen ist.

4.5.1 Die Funktion der CcsR-RNAs unter aeroben Bedingungen

Betrachtet man zunächst die Funktion der CcsR RNAs unter aeroben Bedingungen, so muss berücksichtigt werden, dass eine PrrA abhängige Expression des Photosyntheseapparats, der Stickstofffixierung und möglicherweise der CcsR RNAs inhibiert ist (Gregor & Klug 1999; Finan *et al.* 2001). Sind die verschiedenen Reduktionsäquivalente im Gleichgewicht, so findet unter aeroben Bedingungen insbesondere aerobe Respiration mit verschiedenen Kohlenhydraten als Substrat statt, wobei Sauerstoff als terminaler Elektronenakzeptor genutzt wird (Keppen *et al.* 2013). Neben der Glykolyse, dem Pyruvatdehydrogenase-Komplex und dem Citratcyclus, speist auch die PQQ-abhängige Methanoxidation mit den folgenden metabolischen Schritten des Glutathion-abhängigen C1-Metabolismus unter aeroben Bedingungen Elektronen in die Atmungskette ein (Wilson *et al.* 2008). Zusätzlich dient Glutathion unter aeroben Bedingungen einerseits zusammen mit dem Thioredoxinsystem als Antioxidant bei der Aufrechterhaltung der Redoxbedingungen in der Zelle und andererseits als Co-Faktor für verschiedene Enzyme (Deponte 2013; Li *et al.* 2003; Lu & Holgreen 2013). Wenn über die Elektronentransportkette und die terminale Cytochrom Oxidase ausreichend Reduktionsäquivalente in Form von NAD wiederhergestellt werden, kann theoretisch konstant eine weitere Oxidation von verschiedenen Substraten unter Energiegewinn stattfinden. Prinzipiell ist allerdings nicht davon auszugehen, dass solch ideale Verhältnisse vorliegen. Gekoppelt an die aerobe Atmung kommt es, wie beschrieben, häufig zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies durch fehlgeleiteten Elektronentransfer und verbunden damit zu Schäden an verschiedenen Makromolekülen der Zelle. Hierbei entstehen reaktive Bicarbone und im speziellen Methylglyoxal, welches zusätzlich auch im Rahmen der Glykolyse entstehen kann (Allaman *et al.* 2015). Methylglyoxal ist zytotoxisch und kann über spezifische

Mechanismen wie das glutathionabhängige Glyoxylasesystem abgebaut werden (Deponte 2013). Um irreparable Schäden zu vermeiden, induziert ein erhöhtes Vorkommen an reaktiven Sauerstoffspezies folglich die oxidative Stressantwort.

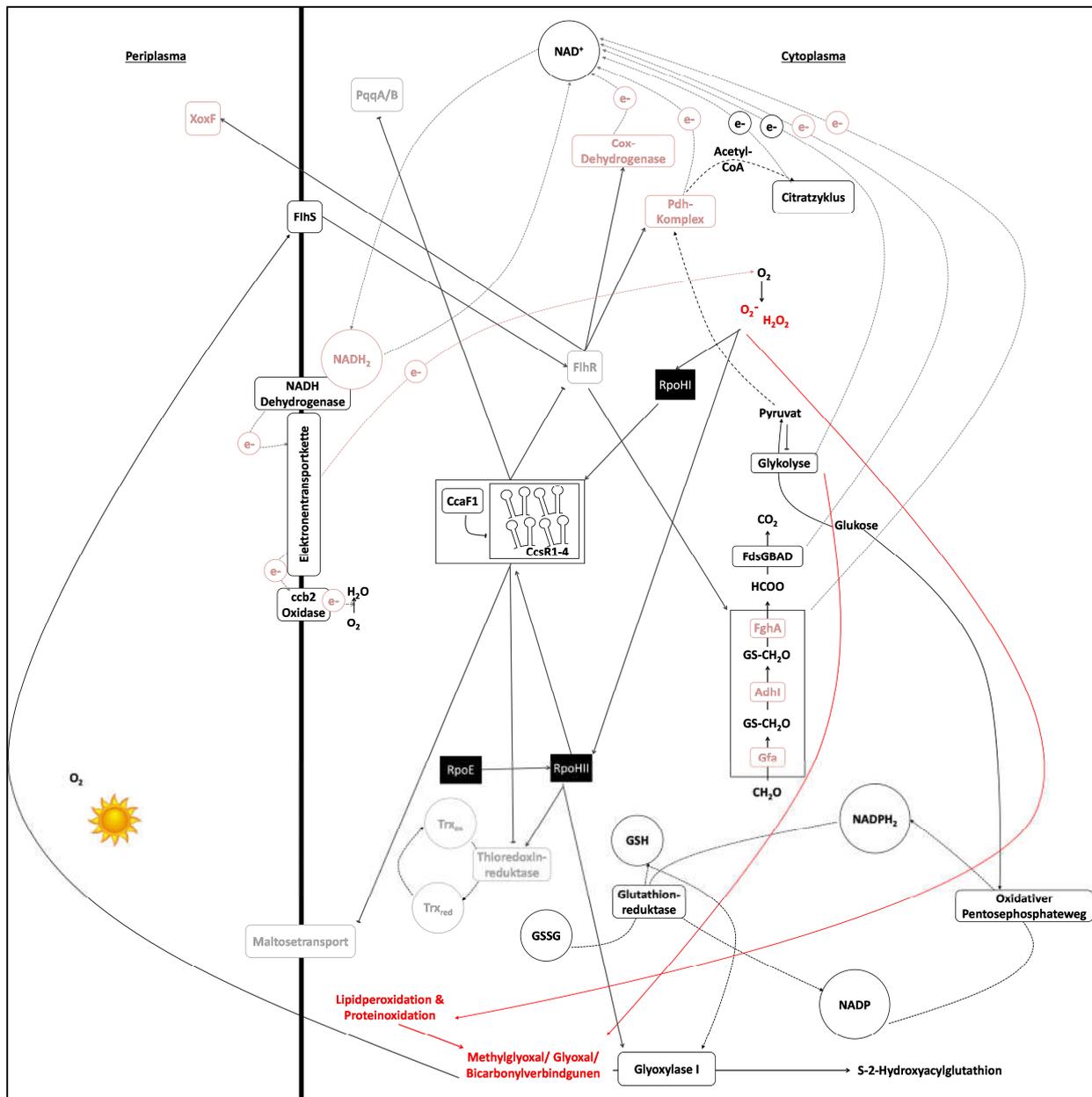


Abbildung 64: Schematische Darstellung einer CcsR RNA Expression unter oxidativen Stressbedingungen in *R. sphaeroides* 2.4.1: Dargestellt ist die Regulation der CcsR-RNAs und die Regulation durch die CcsR-RNAs. Zu erkennen ist, dass die CcsR RNAs indirekten Einfluss auf die Expression verschiedener Dehydrogenasen nehmen und so den Schwerpunkt von NAD basierten Stoffwechselprozessen auf NADPH abhängige Stoffwechselprozesse verschieben. Des Weiteren ist eine Hemmung von PQQ Synthese, Maltosetransport und des Thiothoxinsystems nahegelegt. Hierdurch kommt es insgesamt zu einer Entspannung des Glutathionpools, verminderten Elektronentransport über die Zellmembran und zu einer verstärkten Bildung von NADPH, welches als Co-Faktor in der oxidativen Stressabwehr hilfreich ist. Direkt durch die CcsR reprimierte Gene und Prozesse sind in hellgrau dargestellt, während indirekt reprimierte Gene und Prozesse in hellrot eingefärbt sind.

Es kommt zu einer erhöhten Expression von verschiedenen Entgiftungs- und Reparaturproteinen, Proteasen und Antioxidantien wie Thioredoxin und Glutathion (Nuss *et al.* 2009; Nuss *et al.* 2010). Zusätzlich wird die Expression verschiedener sRNAs, wie der CcsR RNAs induziert. In dieser Situation führt eine möglicherweise über verschiedene Alphaproteobakterien konservierte Repression des Transkriptionsregulators FlhR durch die CcsR RNAs zu einer Repression verschiedener Dehydrogenasen und Oxidasen des C1- Metabolismus und des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes. Hieraus resultiert eine verminderte Bildung von NADH_2 und somit auch ein verminderter Elektronenfluss innerhalb der Elektronentransportkette, was zur Folge hat, dass die Gefahr einer Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies aus dieser Quelle vermindert wird. Die vorhergesagte möglicherweise konservierte Interaktion der CcsR-RNAs mit dem Maltosetransportsystem würde indirekt diesen Effekt verstärken. Neben einem Effekt auf den Elektronenfluss ist unter oxidativen Stressbedingungen, wie beschrieben, auch eine Beeinflussung des Redoxpools zu erwarten. Hierbei kommt es zunächst zu einer verminderten Bildung von NADH_2 . Darüber hinaus kommt es durch die FlhR-Repression potentiell zu einer Inhibition der Glutathion-Nutzung im C1-Metabolismus, was zur Folge hätte, dass mehr Glutathion für die oxidative Stressantwort zur Verfügung steht. In dieser Stressantwort kann das Glutathion dann direkt im *Quenching*, in der Reparatur von oxidierten Proteinen und für die Entgiftung von Methylglyoxal durch das Glyoxylase System eingesetzt werden. Neben dem Methylglyoxalsystem können auch weitere Enzyme eine Rolle in der Entgiftung von reaktiven Bicarbonylen spielen, wobei auch Typ III Alkoholdehydrogenasen, wie AdhI eine Antioxidanten Rolle zugeordnet wird (Echave *et al.* 2003). In diesem Zusammenhang erscheint die Vernetzung der CcsR-RNAs mit dem FlhR System von besonderem Interesse. Das FlhR-System wird durch reaktive Aldehyde aktiviert und

sorgt für eine Aktivierung der Adhl Expression (Barber & Donohue 1998). Da Methylglyoxal auf Grund seiner chemischen Eigenschaften sowohl als Bicarbonyl, als auch als reaktives Aldehyd betrachtet werden kann, ist eine Aktivierung des FlhR System unter fortschreitendem oxidativen Stress denkbar. Dies hätte in Kombination mit den CcsR RNAs zur Folge, dass in frühen oxidativen Stressbedingungen zunächst die Entgiftung durch Adhl mit Hilfe der CcsR-RNAs gehemmt ist und so das vorhandene Glutathion eher für *Quenching*-Prozesse und das Glyoxylase System bereitgestellt wird. Fortschreitende Schädigung zellulärerer Komponenten unter verstärkter Methylglyoxalbildung und Absättigung des Glyoxylasesystems hätte zur Folge, dass Methylglyoxal akkumuliert und via FlhR eine potentielle unterstützende Entgiftung über Adhl zugeschaltet wird. Diese wäre dann über eine Rückkopplung mit den CcsR-RNAs vernetzt. Interessant erscheint zusätzlich die vorhergesagte Hemmung des PQQ-Synthesystems im Zusammenhang mit den CcsR-RNAs. PQQ, welches als dritter Redoxfaktor der Bakterien beschrieben wurde, wird zwar einerseits eine protektive Funktion im Zusammenhang mit oxidativem Stress zugeordnet, jedoch stellt es in *Rhodobacter* auch einen wichtigen Co-Faktor in der Oxidation von Methanol zu Formaldehyd dar (Ge *et al.* 2015; Nunome *et al.* 2008; Wilson *et al.* 2008). Folglich erscheint es sinnvoll, die PQQ-Synthese zu reduzieren um eine potentielle Methanoloxidation zu unterbinden und somit den Adhl Weg, sowie den Glutathionpool zu entlasten. Da in den gewählten experimentellen Bedingungen kein Methanol im umgebenden Medium vorhanden war, jedoch eine Resistenz gegen oxidativen Stress durch die CcsR RNAs beobachtet werden konnte, ist allerdings auch davon auszugehen, dass eine solche indirekte Hemmung der Methanoloxidation möglicherweise nur einen untergeordnete Bedeutung hat. Über die beschriebenen Effekte hinaus, kommt es möglicherweise durch die Hemmung der PQQ Synthese zu

einer Hemmung der PQQ abhängigen Quinoprotein Glukosedehydrogenase RSP_2673, die potentiell eine Umwandlung von Glukose und PQQ zu Glucono-1,5-Lacton katalysiert. Zusätzlich ist bedingt durch die Hemmung des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes eine indirekte Hemmung von Enzymen der Glykolyse denkbar. Dies würde ermöglichen vorhandene Glukose bevorzugt dem RpoH_{II} abhängigen Pentosephosphatweg zuzuführen und somit eine Bildung von NADPH₂ zu unterstützen. NADPH₂ wird im Gegensatz zu NADH₂ nicht für die Elektronentransportkette genutzt, sondern dient insbesondere der Regeneration von Redoxfaktoren wie Glutathion (Lu & Holmgreen 2013). Hierdurch wird einerseits eine protektive Wirkung verstärkt und andererseits die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies gehemmt. Eine vergleichbare Unterstützung des Pentosephosphatwegs durch die sRNA SorY konnte in *R. sphaeroides* bereits beobachtet werden (Adnan *et al.* 2015). Die mittels bioinformatischen Analysen in verschiedenen Alphaproteobakterien ermittelte mögliche Interaktion der CcsR-RNAs mit mRNAs von Genen, die dem RpoH_{II} abhängigen Thioredoxinsystem zuzuordnen sind, würde die beschriebene Hypothese einer Modulation des Redoxpools unter oxidativen Stressbedingungen weiter unterstützen. Hierbei würde durch eine Rückkopplungsschleife eine zu hohe Expression des Thioredoxinsystems vermieden, die auf Grund der Glutathion-abhängigen Thioredoxinreduktase den Glutathionpool erschöpfen könnte (siehe Abb. 64).

Insgesamt ist also davon auszugehen, dass die CcsR RNAs unter oxidativen Stressbedingungen über eine Interaktion mit der *flhR* mRNA indirekt dazu beitragen, dass der Elektronenfluss über die Zellmembran reduziert wird und der intrazelluläre Redox-Pool mit Priorität auf NADPH und Glutathion moduliert wird. Darüber hinaus ist eine Unterstützung dieser Modulation über vorhergesagte Interaktionen mit mRNAs des Thioredoxin-, des PQQ-Synthese und des Maltosetransport-Systems indiziert.

4.5.2 Eine mögliche Funktion der CcsR-RNAs unter anaeroben Bedingungen

Betrachtet man, dass die Expression der CcsR-RNAs auch unabhängig von oxidativem Stress unter Sauerstofflimitierung induziert wird, stellt sich die Frage nach einer Funktion der sRNAs unter anaeroben Bedingungen. Die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies steht auf Grund von Sauerstoffabwesenheit wahrscheinlich nicht im Zusammenhang mit der zentralen Funktion der sRNAs unter diesen Bedingungen. Auf Grund der potentiellen Regulation der CcsR RNAs durch PrrA erscheint es eher wahrscheinlich, dass eine Verbindung zu PrrA regulierten Prozessen gesucht werden sollte. PrrA und seine Homologe in verschiedenen Alphaproteobakterien sind insbesondere in der Aktivierung der Expression der Gene für die Stickstofffixierung, sowie der Expression der Gene für Photosynthese und Kohlenstofffixierung beteiligt (Emmerich *et al.* 2000; Joshi & Tabita 1996; Quian & Tabita 1996). Um Kohlenstoff in einem photolithoautotrophen Wachstum zu fixieren, besteht für *Rhodobacter* die Möglichkeit, über einen reversen Elektronentransport innerhalb des cyclischen Elektronentransports der Photosynthese NADPH_2 zu generieren und für die Kohlenstofffixierung über den reduktiven Pentosephosphatzyklus bereitzustellen. In diesem Zusammenhang erscheint eine, wie für oxidative Stressbedingungen beschriebene, Modulation des zellulären Pools an Reduktionsäquivalenten von NAD zu NADP durch die CcsR-RNAs vorteilhaft. Darüber hinaus sind sowohl *Rhodobacter*, als auch andere Alphaproteobakterien mit CcsR-RNAs in der Lage Stickstoff zu fixieren, wobei eine Abhängig vom PrrA-System konserviert ist (Emmerich *et al.* 2000; Joshi & Tabita 1996; Quian & Tabita 1996). Die Fixierung von Stickstoff ist von einem hohen Level an NADPH_2 abhängig, da so die NADP abhängige Malatdehydrogenase gehemmt wird (Mitsch *et al.* 2007). Vor diesem Hintergrund erscheinen die für oxidativen Stress beschriebenen Effekte der CcsR RNAs auf den Pool an Reduktionsäquivalenten

besonders interessant, da hier zusätzlich eine Unterstützung der Stickstofffixierung zu erkennen ist. Eine Verifizierung mit weiteren Experimenten ist für die Funktion der CcsR RNAs unter sauerstofflimitierten Bedingungen allerdings notwendig.

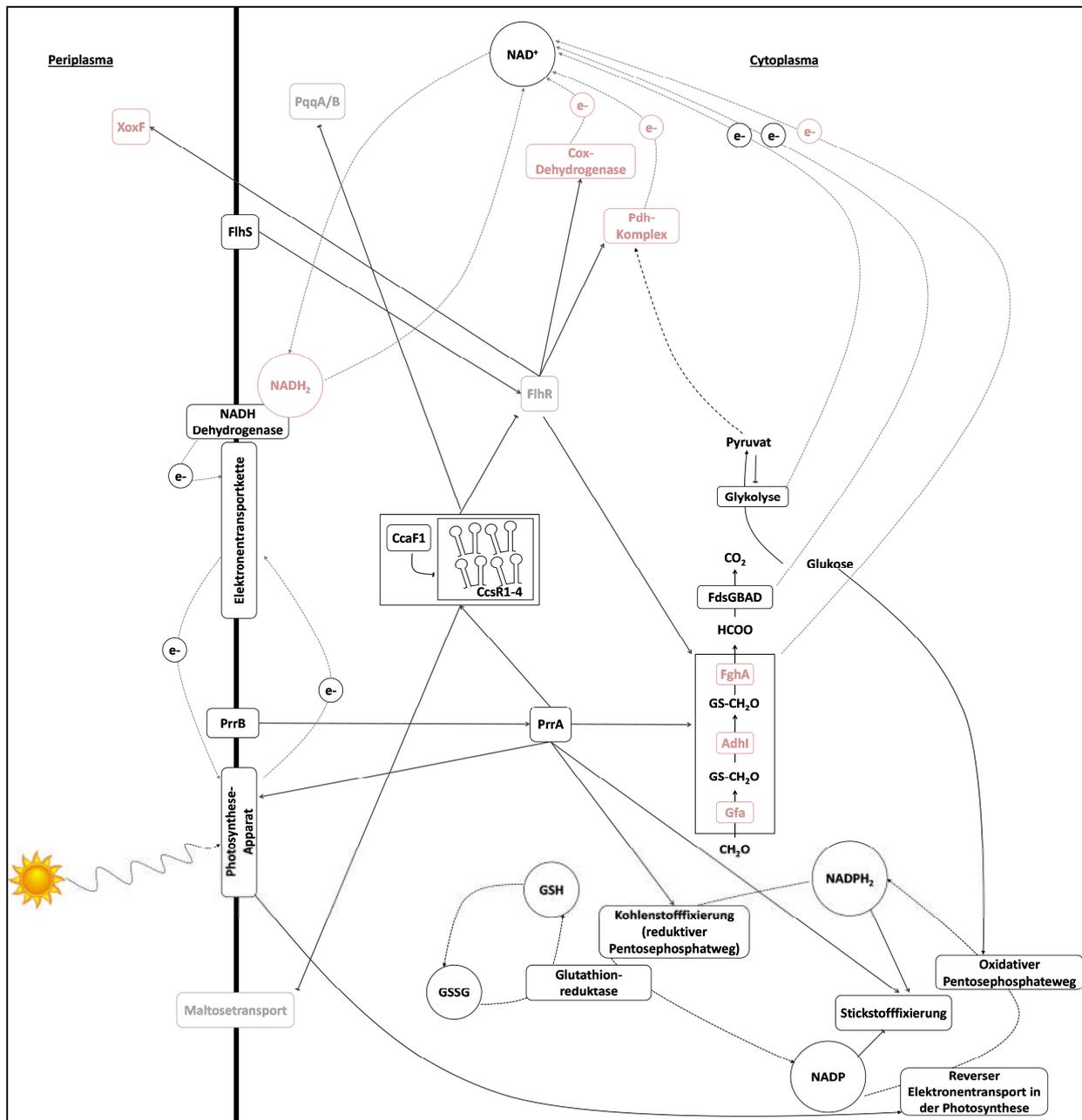


Abbildung 65: Schematische Darstellung einer CcsR RNA Expression unter anaeroben Bedingungen in *R. sphaeroides* 2.4.1: Dargestellt ist die Regulation der CcsR-RNAs und die Regulation durch die CcsR-RNAs. Zu erkennen ist, dass die CcsR RNAs indirekten Einfluss auf die Expression verschiedener Dehydrogenasen nehmen und so den Schwerpunkt von NAD basierten Stoffwechselprozessen auf NADPH abhängige Stoffwechselprozesse verschiebt. Des Weiteren ist eine Hemmung von PQQ Synthese und Maltosetransport nahegelegt. Hierdurch kommt es insgesamt zu einer Entspannung des Glutathionpools, vermindertem Elektronentransport über die Zellmembran und zu einer verstärkten Bildung von NADPH, welches als Co-Faktor in der Fixierung von Stickstoff und Kohlenstoff nötig ist.

4.5.3 Die CcsR RNAs in der stationären Wachstumsphase und abschließende Implikationen für eine Funktion unter natürlichen Wachstumsbedingungen

Neben einer erhöhten Expression der CcsR-RNAs unter oxidativen Stressbedingungen und unter Sauerstofflimitierung, konnte insbesondere in der stationären Wachstumsphase eine erhöhte Abundanz der sRNAs nachgewiesen werden. Im natürlichen Habitat werden die im Labor beobachteten Zellkonzentrationen allerdings nur selten erreicht, jedoch sind im Bezug auf verschiedene Nährstofflimitierungen vergleichbare Bedingungen zu erwarten. So sind in natürlichen Habitaten häufig Kohlenstoffquellen und verfügbarer Stickstoff für den Aufbau zellulärer Komponenten nicht in ausreichenden Mengen verfügbar. Dies bedeutet, dass eine Fixierung dieser Grundstoffe von zentraler Bedeutung ist, um einen zellulären Metabolismus aufrecht zu erhalten. Hieraus lässt sich ableiten, dass unter Mangel an Kohlenstoffquellen oder Stickstoffquellen die beschriebenen Effekte der CcsR-RNAs auf den zellulären Pool an Redoxäquivalenten die jeweiligen Fixierungsprozesse unterstützen. Darüber hinaus ist für die natürlichen Habitate vieler Alphaproteobakterien eine moderate Sauerstoffsättigung zu erwarten, die den experimentell genutzten mikroaeroben Bedingungen nahe kommt. Hieraus resultiert, dass bei Vorhandensein geeigneter Substrate eine aerobe Atmung stattfinden kann, aber auch die Expression von Photosyntheseorganen in einem geringen Maße stattfindet und auch die Fixierung von Kohlenstoff und Stickstoff als Unterstützung für den zellulären Metabolismus genutzt werden. Aus dieser Aktivität verschiedener Stoffwechselwege resultiert, dass einerseits über den Elektronentransfer der Atmungskette und andererseits über Excitonentransfer aus der Photosynthese reaktive Sauerstoffspezies gebildet werden können. Diese werden, ebenso wie ROS geschädigte Makromoleküle, über NADPH- und Glutathion-abhängige Mechanismen entgiftet. Hierbei stellen die CcsR RNAs eine Möglichkeit dar,

der NADPH- und Glutathion- Bereitstellung für diese Prozesse eine erhöhte Priorität zu geben. Gleichzeitig erfolgt über die CcsR-RNAs eine Inhibition zentraler Ursprünge von Elektronenfluss über die Atmungskette, was eine weitere ROS-Bildung hemmt. Insgesamt betrachtet stellen die CcsR-RNAs also eine Möglichkeit dar, unter suboptimalen Wachstumsbedingungen einerseits eine Fixierung von anorganischen Grundstoffen zu unterstützen und gleichzeitig mögliche an ROS gekoppelte Probleme einzudämmen, wobei diese Wirkungen insbesondere durch eine Modulation des Pools an Reduktionsäquivalenten erreicht werden.

5 Zusammenfassung

Bakterien kommen in den unterschiedlichsten Habitaten vor und haben sich über eine Vielzahl von regulatorischen Mechanismen an diese Habitate angepasst. So wird der zelluläre Metabolismus beispielweise den vorhandenen Nährstoffen angepasst und häufig zusätzlich stressabhängig reguliert. Hierbei werden neben einer Vielzahl von regulatorischen Proteinen auch kleine nicht-kodierende RNAs (sRNAs) genutzt, die unter ausgewählten Bedingungen exprimiert werden und die Expression spezifischer Gene regulieren. Im photosynthetisch aktiven Alphaproteobakterium *Rhodobacter sphaeroides* gibt es einen *Cluster* aus den vier homologen sRNAs CcsR1 bis CcsR4, das unter oxidativen Stressbedingungen zusammen mit der mRNA für ein hypothetisches Protein (RSP_6037) exprimiert wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Funktion dieser sRNAs in *R. sphaeroides* analysiert und zusätzlich die Frage adressiert, ob es eine mögliche Konservierung der sRNAs in anderen Alphaproteobakterien gibt. Hierbei konnte einerseits gezeigt werden, dass CcsR1-4 unter oxidativen Stressbedingungen und Hitzestress über die Repression des LuxR-Transkriptionsaktivators FlhR Einfluss nehmen auf die Expression von Genen des Glutathion-abhängigen C1-Metabolismus und des Pyruvatdehydrogenase Komplexes. Andererseits konnte gezeigt werden, dass es verschiedene CcsR RNA *Cluster* in verschiedenen Alphaproteobakterien gibt, deren Expression häufig an sehr ähnliche Bedingungen gekoppelt ist. Abschließend konnte gezeigt werden, dass die regulatorische Funktion der CcsR RNAs wahrscheinlich nicht auf oxidative Stressbedingungen beschränkt ist, sondern auch auf anaerobe Wachstumsbedingungen erweitert werden kann. Insgesamt konnten die CcsR RNAs also als sRNAs beschrieben werden, die spezifische Teile des zellulären Metabolismus in Zusammenhang mit einem Schutz vor Sauerstoff steuern.

6 Methoden

6.1 Mikrobiologische Methoden

6.1.1 Kultivierung verschiedener Bakterienstämme

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Proteobakterien kultiviert, die unterschiedliche Nährstoffansprüche aufweisen. Entsprechend wurden für die unterschiedlichen Bakterien auch unterschiedliche Nährmedien benötigt, die in der Regel sowohl als Flüssigmedium, als auch als festes Agarmedium eingesetzt wurden.

Allgemeine Kulturbedingungen

Obwohl unterschiedliche Organismen häufig sehr spezielle Anforderungen an die Nährstoffe in ihrem Nährmedium stellen, können für viele Organismen ähnliche Bedingungen in Bezug auf Temperatur und Sauerstoffgehalt des umgebenden Medium angewandt werden. Hieraus ergibt sich, dass im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Kultivierungsmethoden für das Wachstum unter mikroaeroben Bedingungen (25 μM gelöster Sauerstoff) und unter aeroben Bedingungen (>150 μM gelöster Sauerstoff) für unterschiedliche Organismen genutzt wurden.

Wachstum unter mikroaeroben Bedingungen

Für eine Flüssigkultur unter mikroaeroben Bedingungen wurden sterile Erlenmeyerkolben zu 80 % ihres Nennvolumens mit Medium befüllt und unter Schütteln (140 rpm) inkubiert. Das Animpfen erfolgte mittels einer sterilen Impföse aus Einzelkolonien von Agarplatten und aus Dauerkulturen oder alternativ mit einer sterilen Glaspipette aus einer bereits existierenden Flüssigkultur.

Wachstum unter aeroben Bedingungen in begasten Metplatflaschen

Metplatflaschen wurden basierend auf den in Nuss *et al.* 2009 beschriebenen Methoden mit sterilen Glaspipetten zu 80 % mit einer verdünnten Bakterienkultur gefüllt. Die Flaschen wurden dann mit einer elektrischen Aquarienluftpumpe begast, indem Luft

über einen Silikonschlauch und Pasteurpipetten an den Boden der Flaschen geleitet wurde. Hiermit wurde sichergestellt, dass in der ganzen Kultur eine ausreichende Sättigung mit Sauerstoff gewährleistet war. Die Metplatflaschen wurden nach Bedarf mit Aluminiumfolie abgedunkelt, um störende Effekte durch einfallendes Licht zu vermeiden und wenn nötig in einem temperaturgepufferten Wasserbad inkubiert, um experimentell bedingte Temperaturschwankungen zu unterbinden.

Wachstum unter aeroben Bedingungen in Erlenmeyerkolben mit Schikanen

Für Flüssigkulturen unter aeroben Bedingungen wurden Erlenmeyerkolben mit Schikanen zu 20 % ihres Nennvolumens mit Medium befüllt und unter Schütteln (140 rpm) inkubiert.

Wachstum unter aeroben Bedingungen in Erlenmeyerkolben ohne Schikanen

Flüssigkulturen unter aeroben Bedingungen wurden wie unter mikroaeroben Bedingungen (siehe oben) behandelt. Jedoch wurden die Erlenmeyerkolben nur zu 20 % des Nennvolumens mit Nährmedium gefüllt, um eine höhere Durchmischung mit Sauerstoff zu erreichen und die Drehzahl des Schüttlers wurde auf 180 rpm erhöht. Alternativ wurden mit 2 ml Medium gefüllte Reagenzgläser verwendet, die schräg unter Schütteln (180 rpm) inkubiert wurden.

Spezielle Kulturbedingungen

Einzelne Bakterienstämme haben, wie beschrieben, unterschiedliche optimale Wachstumsbedingungen. Hierbei wurden für die im Rahmen dieser Arbeit kultivierten Bakterien folgende Wachstumsbedingungen angewandt.

Escherichia coli

E. coli Stämme wurden typischerweise bei 37 °C Umgebungstemperatur in flüssigem Standard I-Medium (Standard-I-Medium, Carl Roth, siehe 6.4.3) unter aeroben

Bedingungen oder auf St-I-Agarplatten kultiviert. Eine Ausnahme in dieser Arbeit bildeten die Stämme *E. coli* N3433 und *E. coli* N3431 (Goldblum & Apirion 1981). Diese wurden bei 32 °C unter aeroben Bedingungen inkubiert, um eine Hitzeinaktivierung der termolabilen RNase E zu vermeiden. Nach Bedarf wurden den Agarplatten und Flüssigmedien zur *E. coli*-Kultivierung Antibiotika als Selektionsmarker zugesetzt (siehe 6.5).

Rhodobacter sphaeroides und *Rhodobacter capsulatus*

R. sphaeroides und *R. capsulatus* Stämme wurden in der Regel bei 32 °C Umgebungstemperatur in flüssigem Rhodobacter-Äpfelsäure-Medium (RÄ-Medium, siehe 6.4.1) unter mikroaeroben Bedingungen oder auf RÄ-Agarplatten kultiviert. Für verschiedene Experimente wurde *R. sphaeroides* unter aeroben Bedingungen bei 32 °C kultiviert. Nach Bedarf wurden Agarplatten und Flüssigmedien Antibiotika als Selektionsmarker zugesetzt (siehe 6.5).

Dinoroseobacter shibae und *Roseobacter denitrificans*

D. shibae und *R. denitrificans* wurden kultiviert wie für *R. sphaeroides* beschrieben, wobei *Roseobacter*-Marin-Medium (siehe 6.4.2) als Nährmedium eingesetzt wurde.

Sinorhizobium meliloti und *Sinorhizobium fredii*

S. meliloti und *S. fredii* wurden kultiviert wie für *R. sphaeroides* beschrieben, wobei GMX-Medium (siehe 6.4.4) als Nährmedium eingesetzt wurde.

Paracoccus denitrificans

P. denitrificans wurde kultiviert wie für *R. sphaeroides* beschrieben, wobei St-I-Medium (siehe 6.4.3) als Nährmedien eingesetzt wurde.

6.1.2 Dauerkultur von Bakterienstämmen

Bakteriendauerkulturen wurden erstellt, um eine langfristige Lagerung von Bakterienstämmen bei -80 °C zu ermöglichen. Hierfür wurden 4 ml Übernachtkultur

eines Bakterienstamms für 8 Minuten bei 5000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet mit 1 ml von dem für den Bakterienstamm passenden Medium gewaschen und noch einmal für 5 Minuten bei 5000 g zentrifugiert. Der Waschschrift wurde wiederholt und nach dem Zentrifugieren wurden die gewaschenen Bakterien in 0,75 ml des entsprechenden Mediums aufgenommen. Nach Zugabe von 0,25 ml Glycerin (80 %) wurden die Zellen in Kryoröhrchen überführt. Diese wurden danach zügig in flüssigem Stickstoff gefroren, wonach sie bei -80 °C gelagert werden konnten.

6.1.3 Bestimmung der optischen Dichte von Bakterienkulturen

Die optische Dichte (OD) beschreibt die Abschwächung von Licht beim Durchgang durch ein Medium und ist bedingt durch die Streuung an Partikeln. Sie wird genutzt, um die Zellkonzentration einer Bakterienkultur zu messen und wird wie folgt berechnet:

$$OD = -\log \frac{I}{I_0}$$

Hierbei gilt:

OD = optische Dichte

I = ausfallende Strahlung

I₀ = einfallende Strahlung

Steigt die optische Dichte in Bereiche von einer OD > 0,8 werden die Proben verdünnt, da eine hohe Zelldichte zu mehrfacher Streuung des Lichts und somit zu Messungenauigkeiten führt.

Für *E. coli*-, *P. denitrificans*- und *S. meliloti*-Stämme wurde in dieser Arbeit die optische Dichte photometrisch bei 600 nm (OD₆₀₀) bestimmt, während für *Rhodobacter*, *D. shibae* und *R. denitrificans* die optische Dichte auf Grund einer Verfälschung durch Absorption der Photosynthesepigmente statt dessen bei 660 nm bestimmt wurde (OD₆₆₀).

6.1.4 Stress- und Wachstumsexperimente

Experimente mit verschiedenen Alphaproteobakterien in Flüssigkultur

Vergleich von exponentieller und stationärer Wachstumsphase in *R. sphaeroides* 2.4.1

Um den Einfluss von Wachstumsphasen auf die CcsR1-4 Expression zu ermitteln, wurden zunächst Vorkulturen auf eine OD₆₆₀ von 0,2 verdünnt. Danach wurden die Bakterien bei 32° C in RÄ-Medium inkubiert, wobei sowohl mikroaerobe, als auch aerobe Wachstumsbedingungen berücksichtigt wurden. Nach einer Verdopplung der OD₆₆₀ (OD₆₆₀ = 0,4) befanden sich die Bakterien in der frühen exponentiellen Wachstumsphase und es wurden Proben entnommen. Danach wurden die Kulturen mit Nährmedium wieder aufgefüllt und es erfolgte eine weitere Inkubation bis zum Übergang in die stationäre Wachstumsphase, wo eine zweite Probenahme stattfand (OD₆₆₀ = 1,2).

Untersuchung von oxidativem Stress in *R. sphaeroides* 2.4.1 und anderen Alphaproteobakterien

Um Bakterien oxidativem Stress auszusetzen, wurden Vorkulturen auf eine OD von 0,1 bis 0,2 verdünnt und in Metplatflaschen unter aeroben Bedingungen inkubiert. Nach einer Verdopplung der OD (OD = 0,2 bis 0,4) befanden sich die Bakterien in der frühen exponentiellen Wachstumsphase und es wurden Referenzproben entnommen. Danach wurden Chemikalien zur Erzeugung von oxidativem Stress zugegeben. Hierbei wurden finale Konzentrationen 250 µM Paraquat zur Erzeugung von Superoxid, 1mM Wasserstoffperoxid (H₂O₂) oder 100 µM *tert*-Butylhydroperoxid (tBOOH) für Stress durch organischer Peroxide zugegeben. Es erfolgte eine weitere Inkubation für 10 Minuten unter aeroben Bedingungen und es wurden Proben entnommen.

Untersuchung von photooxidativem Stress in *R. sphaeroides* 2.4.1

Bakterienkulturen, die photooxidativem Stress ausgesetzt werden sollten, wurden zunächst, wie Kulturen, die oxidativem Stress ausgesetzt wurden, behandelt und in Metplatflaschen auf eine OD₆₆₀ von 0,2 eingestellt. Danach wurden die Metplatflaschen

in Alufolie eingeschlagen, um eine Belichtung der Bakterienkulturen zu unterbinden und die Bakterienkulturen wurden mit 0,2 μM Methylenblau versetzt. Im Anschluss erfolgte eine Inkubation unter aeroben Bedingungen bis eine Verdopplung der OD_{660} stattgefunden hatte. Es wurden Referenzproben entnommen, die Metplatflaschen entpackt und mit 800 W/m^2 beleuchtet. Hierdurch wurde Singulett-Sauerstoff am Methylenblau gebildet. Nach einer Inkubation von 10 Minuten erfolgte die Probenahme.

Untersuchung von Hitzestress in *R. sphaeroides* 2.4.1 und anderen Alphaproteobakterien

Um den Einfluss von Hitzestress auf Bakterien zu ermitteln, wurden Vorkulturen verdünnt auf eine OD von 0,1 bis 0,2. Danach wurden die Bakterien bei 32 °C unter für den Organismus typischen mikroaeroben Bedingungen inkubiert. Nach einer Verdopplung der OD ($\text{OD} = 0,2$ bis $0,4$) wurden Referenzproben entnommen und die Gefäße mit den Bakterienkulturen wurden in ein Wasserbad mit Horizontalschüttler bei 42 °C überführt. Es folgte eine Inkubation für 10 Minuten und es wurden weitere Proben entnommen.

Untersuchung von Salzstress in *R. sphaeroides* 2.4.1

Für Salzstress-Experimente wurden Vorkulturen verdünnt auf eine OD_{660} von 0,2. Danach wurden die Bakterien unter mikroaeroben Wachstumsbedingungen inkubiert. Nach einer Verdopplung der OD_{660} wurden Referenzproben entnommen und 5 M NaCl bis zu einer finalen Konzentration von 500 mM zugegeben. Danach erfolgte eine Inkubation unter Salzstressbedingungen für 10 Minuten und es wurden Proben entnommen.

Untersuchungen von Stress verursacht durch Schwermetalle in *R. sphaeroides* 2.4.1

Um den Einfluss von Schwermetallen auf Bakterien zu ermitteln, wurden Vorkulturen entsprechend den Untersuchungen zu Salzstress verdünnt und unter mikroaeroben

Bedingungen inkubiert. Nach einer Verdopplung der OD₆₆₀ wurden Referenzproben entnommen und den Kulturen entweder 10 µM Cadmiumchlorid (CdCl₂) oder 100 µM Zinksulfat (ZnSO₄) zugegeben. Danach folgte eine Inkubation für 10 Minuten und es wurden Proben entnommen.

Experimente mit Escherichia coli in Flüssigkultur

Um eine mögliche RNase E abhängige RNA-Prozessierung der CcsR RNAs zu untersuchen, wurde die CcsR Prozessierung in einer temperatursensitiven *E. coli* RNase E Mutante im Vergleich zum entsprechenden *E. coli* Wildtyp untersucht. Hierbei wurden Vorkulturen verdünnt auf eine OD von 0,05-0,1 und weiter bei 32 °C unter aeroben Wachstumsbedingungen inkubiert. Nach einer Verdopplung der OD (OD = 0,1 bis 0,2) wurde eine Referenzprobe entnommen und die Gefäße mit den Bakterienkulturen wurden in ein Wasserbad bei 42 °C mit Horizontalschüttler überführt. Danach erfolgte eine Inkubation für 120 Minuten mit Probenahmen nach 5 min, 10 min, 30 min, 60 min und 120 min für eine spätere Analyse.

Hemmhoftest

Hemmhoftests sind eine geeignete Methode, um schnell und ohne großen experimentellen Aufwand die Sensitivität von Bakterienstämmen gegenüber bestimmten Agenzien, beziehungsweise den durch die Agenzien verursachten Stress zu testen. Hierfür wurden im Rahmen dieser Arbeit zunächst *Rhodobacter sphaeroides* Übernachtkulturen unter mikroaeroben Bedingungen angezogen. Diese wurden dann verdünnt auf eine OD₆₆₀ von 0,2 und bis zu einer OD₆₆₀ von 0,4 unter mikroaeroben Bedingungen inkubiert. Danach wurden die Kulturen wieder exakt auf OD₆₆₀ = 0,2 verdünnt und 200 µl Kultur wurden mit 10 ml handwarmem RÄ-Medium-Weichagar (5 ml doppelt supplementiertes RÄ Medium + 5 ml RÄ-Agar flüssig) gemischt und gleichmäßig auf RÄ-Agarplatten vom Vortag verteilt. Nach Erhärten des Weichagars wurden kleine

aus Whatman-Filterpapier gestanzte Filterplättchen mit 7 µl 200 mM Paraquat oder 7 µl 700 mM tBOOH getränkt und auf den erstarrten Weichagar gegeben. Die Chemikalien diffundierten mit abnehmender Konzentration durch den Weichagar und ließen so Hemmhöfe entstehen, in denen keine Bakterien wuchsen und deren Durchmesser nach vier Tagen ermittelt wurde. Je größer hierbei ein solcher beschriebener Hemmhof im Durchmesser war, desto höher war auch die Sensitivität des getesteten Stamms gegenüber dem durch die Chemiklaie simulierten Stress.

6.1.5 Elektrotransformation von *E. coli*

Bei der Elektroporation werden zuvor durch mehrere Waschschrirte von Salzen befreite elektrokompetente Zellen für kurze Zeit unter elektrische Spannung gesetzt. Hierdurch erhöht sich die Durchlässigkeit der Cytoplasmamembran für Fremd-DNA, wodurch die in die Elektrotransformation eingesetzte DNA in die Zellen gelangt. Da Salze die Leitfähigkeit erhöhen, können sie zu Kurzschlüssen während der Elektroporation führen, weshalb nicht nur die Zellen gewaschen werden sollten, sondern auch die eingesetzte DNA möglichst salzfrei sein sollte. Im Rahmen dieser Arbeit wurden für Elektroporationen typischerweise 40 µl kompetenter *E. coli* Zellen eingesetzt und mit 20-50 ng der zu transformierenden DNA durch vorsichtiges Resuspendieren gemischt. Der Transformationsansatz wurde dann in eine gekühlte Elektroporationsküvette gegeben und im *Micro Pulser*TM (Biorad) mit einer Spannung von 2,1 kV für ~ 5 ms transformiert. Danach wurden die Zellen in 1 ml St-I- Medium aufgenommen und für eine Stunde bei 37 °C auf dem Schüttler (180 rpm) inkubiert. Aus dem Ansatz wurden 100 µl ausplattiert auf St-I-Agar mit Antibiotika passend zu den in der Transformation mit Fremd-DNA vermittelten Resistenzen. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 37 °C.

6.1.6 Plasmidübertragung nach *R. sphaeroides* durch Konjugation

R. sphaeroides nimmt Fremd-DNA nur sehr schlecht durch Elektrotransformation oder andere gängige Transformationsmethoden auf. Daher wird typischerweise, um Fremd-DNA in *R. sphaeroides* einzubringen, die diparentale Konjugation mit dem *E. coli*-Stamm S17-1 genutzt. Für eine diparentale Konjugation zwischen *E. coli* S17-1 und *Rhodobacter sphaeroides* wurde für diese Arbeit *R. sphaeroides* zunächst in Flüssigmedium angezogen, bis exponentielles Wachstum zu erkennen war und es wurden unterschiedliche Volumina an Flüssigkultur in 1,5 ml Reaktionsgefäße gegeben und 5 Minuten bei 8000 rpm in der Tischzentrifuge sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen mit 1 ml RÄ-Medium gewaschen und der Überstand nochmals verworfen. Danach wurden die gewünschten *E. coli* Zellen mit einer sterilen Impföse von einer Agarplatte entnommen und zum *R. sphaeroides* Zellpellet gegeben. Die Zellen wurden durch vorsichtiges Resuspendieren in 50 µl PY-Medium (siehe 6.4.5) durchmischt und vorsichtig auf sterile Nitrocellulosefilter auf PY-Agarplatten (siehe 6.4.5) getropft. Die PY-Agarplatten wurden im Anschluss für 4-5 h bei 32 °C inkubiert. Abschließend wurden die Zellen mit 1 ml RÄ-Medium in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß von den Nitrocellulosefiltern gewaschen. Danach wurden jeweils 100 µl einer Verdünnungsreihe mit 10^{-2} und 10^{-3} Verdünnungen, sowie 100 µl unverdünnter Konjugations Ansatz pro Reaktion auf RÄ-Agar mit passenden Antibiotika (siehe 6.4.1 & 6.5) ausplattiert.

6.2 Biochemische und Molekularbiologische Methoden

6.2.1 Isolierung, Synthese, Aufreinigung und Markierung von Nukleinsäuren

Isolierung von RNA aus Bakterien

„Hot-Phenol“-Methode

Bei der Isolierung von RNA ist es von großer Bedeutung, die RNA zu schützen. Daher sollten Kontaminationen mit RNasen umgangen werden und Proben zu jedem möglichen Zeitpunkt kühl gehalten werden. In der „Hot-Phenol“ Methode wird diesen Anforderungen Sorge getragen (Janzon *et al.* 1986; Durchführung siehe Laborprotokolle im Anhang). Da in dieser Methode mit DNA-Verunreinigung zu rechnen ist, müssen diese durch eine DNase I Behandlung und eine folgende weitere Phenol-Chloroform-Aufreinigung beseitigt werden. Im Rahmen dieser Arbeit war die „Hot-Phenol“ Methode die gängige Methode zur Isolation von RNA aus verschiedenen Bakterien.

TRIRTM-Kit (ABgene)

Eine zeitsparende alternative Methode RNA aus bakteriellen Zellpellets zu extrahieren, stellt das *Total RNA Isolation Reagent* (TRIR)-Kit dar, welches, wie andere kommerzielle RNA Isolationskits, auf einer Guanidinthiocyanat-Phenol-Chloroform Extraktion (Chomczynski & Sacchi 1987) beruht. Bei diesem molekularbiologischen *Kit* erweist es sich als wesentlich einfacher, DNA-freie Proben zu erhalten, weshalb diese Extraktionsmethode im Rahmen dieser Arbeit für Proben bevorzugt wurde, die für RT-PCRs bestimmt waren. Hierbei wurde ein dem Herstellerprotokoll angelehntes und auf die Extraktion bakterieller RNA angepasstes Protokoll genutzt (siehe Laborprotokolle im Anhang).

Verdau von DNA Kontaminationen in RNA-Proben

Frisch isolierte RNA-Proben weisen häufig DNA Kontaminationen auf, die mit einer DNase Behandlung entfernt werden können. Im Rahmen dieser Arbeit wurden DNA

Kontaminationen mittels 30 bis 60 minütigen DNase I Behandlungen bei 37 °C entfernt (siehe Laborprotokolle im Anhang).

Isolierung chromosomaler DNA aus Bakterien

Um chromosomale DNA aus Bakterien zu isolieren, ist neben einer Reihe an etablierten molekularbiologischen Kits auch eine große Anzahl an Methoden verfügbar, die es ermöglicht bakterielle DNA zu isolieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die Isolierung chromosomaler DNA aus Bakterien die etablierte CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid) Methode genutzt, bei der CTAB dazu dient, störende Proteine und Polysaccharide zu binden und von der zu isolierenden DNA zu trennen (Winnepenninckx *et al.* 1993; siehe Laborprotokolle im Anhang).

Plasmid-Minipräparation nach dem Prinzip der alkalischen Lyse

Die klassische Methode der Plasmid-Minipräparation nach dem Prinzip der alkalischen Lyse ist auch in Zeiten molekularbiologischer Kits eine kostengünstige und relativ zeitsparende Möglichkeit Plasmid-DNA zu erhalten, die frei von Verunreinigungen durch genomische DNA ist (Birnboim & Doly 1979; siehe Laborprotokolle im Anhang). Daher wurde sie im Rahmen dieser Arbeit als Hauptmethode genutzt um Plasmid-DNA zu isolieren.

In vitro Transkription mit T7-RNA-Polymerase

Um biochemische Experimente an spezifischen RNAs durchzuführen, ist es nötig, diese RNAs anzureichern und aufzureinigen. Eine gängige Methode hierfür ist die Synthese der RNAs mit Hilfe der RNA Polymerase aus verschiedenen Phagen, wobei insbesondere die RNA-Polymerase aus dem Phagen T7 gut charakterisiert ist (Tabor & Richardson 1985; Chamberlin & Ring 1973). In der Regel wird für eine *in vitro* Transkription mit der T7-RNA-Polymerase der passende T7-Promotor in einer PCR Reaktion mit Hilfe spezieller Primer an ein gewünschtes DNA-Amplifikat angefügt,

welches dann im Anschluss transkribiert werden kann. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die sRNA CcsR1 aus *R. sphaeroides* 2.4.1, sowie putative CcsR1-Bindestellen in verschiedenen *R. sphaeroides* 2.4.1 mRNAs durch *in vitro* Transkription mit T7-RNA-Polymerase synthetisiert und für biochemische Untersuchungen eingesetzt (siehe Laborprotokolle im Anhang).

Extraktion von Nukleinsäuren aus Agarosegelen und Acrylamidgelen

Um Nukleinsäuren aus Agarosegelen zu extrahieren, können verschiedene Methoden angewandt werden. Allgemein wird in diesen Methoden nach der Auftrennung von Nukleinsäuren über ein Gel ein Streifen des Gels mit dem gewünschten DNA-Fragment mit einem Skalpell ausgeschnitten aus dem dann die DNA extrahiert werden kann. Im Rahmen dieser Arbeit wurden hierfür verschiedene Methoden mit unterschiedlichen Prinzipien angewandt.

Extraktion mit dem QIAEX II *Gel extraction Kit* von Qiagen

Durch irreversible Verflüssigung der Agarose wird im QIAEX II *Gel extraction Kit* die DNA freigegeben und kann an im *Kit* enthaltene Glaspartikel binden. Diese werden dann abzentrifugiert und gewaschen. Im Anschluss wird die DNA von den Glaspartikeln eluiert. Hierbei wird streng nach Vorgaben des Herstellerprotokolls vorgegangen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das QIAEX II *Gel extraction Kit* genutzt, um zeitsparend DNA-Fragmente im Bereich von 500 bp bis 2000 bp aus Agarosegelen zu extrahieren.

Extraktion über eine Glaswollematrix

Eine kostengünstige Alternative zur Gelextraktion mittels kommerziellen *Kits* stellt die Extraktion von DNA aus Agarosegelen über eine Glaswollematrix dar. Hierbei wird der ausgeschnittene Gelstreifen über eine Glaswollematrix zentrifugiert und die Flüssigkeit aus dem Gel mit den darin gelösten Nukleinsäuren in einem Reaktionsgefäß aufgefangen. Diese werden dann aufgereinigt, gefällt und ins Reinstwasser

aufgenommen (siehe Laborprotokolle im Anhang). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Extraktion von DNA aus Agarosegelen über eine Glaswollematrix insbesondere für kleinere DNA Fragmente (<500 bp) und besonders große DNA-Fragmente (>3000 bp) genutzt (siehe Laborprotokolle im Anhang).

Extraktion von Nukleinsäuren aus Acrylamidgelen

Häufig sind Nukleinsäurefragmente zu klein, um sie über ein Agarosegel sauber aufzutrennen. Solche Nukleinsäurefragmente werden typischerweise über Acrylamidgele aufgetrennt. Da Acrylamidgele sich nicht wie Agarosegele auflösen lassen und eine fest verbundene Matrix aufweisen, müssen spezielle Methoden zur Extraktion von Nukleinsäuren aus den Gelen angewandt werden. Hierbei kann einerseits auf kommerzielle Kits zurückgegriffen werden, andererseits können die Nukleinsäure über spezielle Elutionspuffer aus dem Gel ausgewaschen werden. Im Rahmen der Experimente für diese Arbeit wurden die *in vitro* Transkripte für RNA-RNA Interaktionsstudien mit Hilfe von einem Elutionspuffer über Acrylamidgele aufgereinigt (siehe Laborprotokolle im Anhang).

Quantifizierung von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren absorbieren elektromagnetische Strahlung mit einem Maximum bei 260 nm, während aromatische Aminosäuren elektromagnetische Strahlung mit einem Maximum bei 280 nm absorbieren.

Hierbei gilt für die Absorption bei 260 nm ($A_{260 \text{ nm}}$):

1 $A_{260 \text{ nm}}$ entspricht 50 μg dsDNA bzw. 40 μg RNA

Zusammen mit dem Absorptionsmaximum der aromatischen Aminosäuren bei 280 nm ($A_{280 \text{ nm}}$) lässt sich die Reinheit der Proben über das Verhältnis der beiden beschriebenen Absorptionsmaxima bestimmen ($A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$). Abhängig davon, ob die

Nukleinsäureprobe in Reinstwasser oder einem Puffer gelöst ist, kann dieses Verhältnis etwas variieren. Bei RNA liegt es idealerweise in einem Bereich von $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}} = 1,8-2,2$. Traditionell werden Konzentrationen von Nukleinsäuren in Quarzküvetten in einem Spektralphotometer bestimmt. In dieser Arbeit wurden die Konzentrationen von Nukleinsäurelösungen mit einem *NanoDrop*TM Spektralphotometer (Thermo Scientific) bestimmt.

Markierung von Nukleinsäuren

Um Nukleinsäuren nachzuweisen oder um Nukleinsäuren für biochemische Experimente detektierbar zu machen werden, entweder die Nukleinsäuren selbst oder chemisch synthetisierte homologe Nukleinsäuren, die Oligonukleotide markiert. Neben verschiedenen fluoreszenten Markierungen stellt hierbei insbesondere eine Markierung mit radioaktivem P^{32} eine vielseitig einsetzbare Möglichkeit in diesem Bereich dar. Durch diese Methode wird es einerseits ermöglicht, in wenigen Schritten gewünschte Oligonukleotide zu markieren. Andererseits ist es möglich Nukleinsäurenketten in einer *in vitro* Synthese mit inkorporierten Markierungen auszustatten.

End-labeling von Oligonukleotiden

Oligonukleotidsonden für Northern Blot Analysen können mit Hilfe von $\gamma\text{-ATP}^{32}$ und der Polynukleotidkinase aus dem Phagen T4 markiert werden. Hierbei werden in einer enzymatischen Reaktion γ -Phosphatgruppen des $\gamma\text{-ATP}^{32}$ auf die Oligonukleotidsonden übertragen (siehe Laborprotokolle im Anhang). Für diese Arbeit wurden die Oligonukleotidsonden zur Detektion der CcsR1-Homologe aus verschiedenen Alphaproteobakterien und zur Detektion weiterer sRNAs mittels *end-labeling* markiert und für Northern Blot Analysen eingesetzt (Oligonukleotidsonden siehe 6.6).

Internes labeling von RNA durch *in vitro* Transkription

Neben der Markierung von Oligonukleotidsonden für Northern Blots wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene biochemische Experimente mit CcsR1 durchgeführt, bei denen eine markierte sRNA benötigt wurde. Um eine markierte Version von CcsR1 zu erhalten, wurde eine *in vitro* Transkription so angepasst, dass während der Transkription die inkorporierten UTP Nukleotide im wachsenden RNA Strang zu einem großen Anteil aus radioaktiv markiertem α -UTP³² bestanden (siehe Laborprotokolle im Anhang, Primer zum Erstellen der Templates siehe Kapitel 6.6 Tabelle 7).

6.2.2 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Eine gängige Methode zur Auftrennung von Nukleinsäuren basierend auf der Länge der Nukleotidkette und damit Größe des Moleküls stellt die Gelelektrophorese dar. Bei der Gelelektrophorese passieren Nukleinsäuremoleküle basierend auf ihrer negativen Grundladung im Spannungsfeld ein Gel. Abhängig von der erwarteten Größe der zu untersuchenden Nukleinsäuren werden für die Gelelektrophorese grundsätzlich verschiedene Gel- und Puffersysteme genutzt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde hierbei mit TBE- und TAE-Puffern, sowie mit Agarose und Polyacrylamid Gelsystemen gearbeitet.

Agarosegelelektrophorese

Um DNA-Moleküle im Größenbereich von 100 bp bis in den Bereich einiger tausend Basenpaare aufzutrennen, wurden Agarosegele im Bereich von 1 % (w/v) Agarose bis hin zu 3 % (w/v) Agarose in TBE- und TAE- Puffer genutzt, wobei für langkettigere Nukleinsäuren geringere Konzentrationen an Agarose genutzt wurden. Es wurde grundsätzlich für kleinere DNA Fragmente (<500 bp) und für präparative Zwecke das TBE-Puffersystem bevorzugt, da etwas schärfere Banden erreicht werden konnten. Für die Analyse größerer DNA-Fragmente wurde das TAE-Puffersystem bevorzugt, da die

höhere Konzentration der Puffer-Stammlösung eine große Arbeitserleichterung darstellt und so eine leichte Unschärfe von Nukleinsäurebanden im niedermolekularen Bereich rechtfertigt.

Polyacrylamidgelelektrophorese

Für die Auftrennung sehr kleiner DNA Fragmente (<100 bp) wurden im Rahmen dieser Arbeit TBE-Gele mit einer Konzentration von 8 % bis 10 % Polyacrylamid eingesetzt. Zusätzlich wurden denaturierende Harnstoff-TBE Gele mit einer Konzentration von 8 % bis 10 % Polyacrylamid dazu genutzt, sRNAs unabhängig von ihrer Sekundärstruktur aufzutrennen (siehe Laborprotokolle im Anhang). Die fertigen Gele wurden entweder genutzt für Etidium-Bromidfärbungen, für die Aufreinigung von *in vitro* Transkripten oder für Northern Blot Analysen. Zusätzlich wurden für die biochemischen Analysen native TBE Polyacrylamidgele genutzt (siehe Laborprotokolle im Anhang.)

Northern Blot

Um die Expression spezifischer sRNAs zu detektieren, wurden diese zunächst in einem Polyacrylamid-Harnstoffgel aufgetrennt und mittels Elektroblothing auf eine Nylonmembran übertragen (siehe Laborprotokolle im Anhang). Anschließend erfolgte eine Hybridisierung der Nylonmembranen mit spezifischen Oligonukleotidsonden entweder in einem Phosphatpuffersystem oder alternativ, wenn sich die Detektion einer sRNA sich in Kombination mit dem Phosphatpuffersystem als problematische erwies, in einem salinen Natriumcitratpuffersystem (Church & Gilbert 1984; Berghoff *et al.* 2009). Hierbei wurden im Phosphatpuffersystem bei konstanter Hybridisierungstemperatur von 42 °C die Hybridisierungs und Waschbedingungen den jeweiligen Oligonukleotidsonden über die Konzentration an SDS und Salzen angepasst, während im salinen Natriumcitratpuffersystem bei konstanten Wasch- und Hybridisierungsbedingungen die

Hybridisierungstemperatur den jeweiligen Oligonukleotidsonden angepasst wurde (siehe Laborprotokolle im Anhang; Oligonukleotidsonden siehe 6.6).

6.2.3 PCR-basierte Methoden

Um gezielt im Rahmen von Klonierungen DNA Abschnitte zu amplifizieren, Mutationen in diese einzubringen oder um im Rahmen von Experimenten die Abundanz bestimmter RNAs nachzuweisen, wurden PCR-basierte Methoden in dieser Arbeit angewandt.

PCR

Für die PCR werden heutzutage in der Regel DNA-Polymerasen mit einer Fehlerkorrekturfunktion genutzt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die KOD-DNA Polymerase und die Phusion DNA Polymerase eingesetzt. Hierbei wurde den entsprechenden Protokollen der Hersteller gefolgt und wenn möglich die Menge an genutztem Enzym reduziert (Laborprotokolle siehe Anhang, Primer siehe 6.6).

Gerichtete Mutagenese von Plasmiden mittels PCR

Für die gezielte Mutation einzelner Basen in Plasmiden, kann mit Hilfe der Phusion DNA Polymerase eine Methode angewandt werden, bei der das ganze Plasmid mit Primern amplifiziert wird, die einen Basenaustausch verursachen. Durch gezielten Verdau wird nach der PCR dann das Template lysiert und nach einer Ligation verbleiben Plasmide mit einem Basenaustausch an der gewünschten Stelle, die für eine Transformation genutzt werden können (Protokoll siehe Anhang, Primer siehe 6.6). Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Methode genutzt, um Mutationen in DNA Fragmente mit der potentiellen Bindestelle der CcsR-RNAs in der *flhR* mRNA von *R. sphaeroides* einzubringen.

qRT-PCR

Die RNA wurde für diese Arbeit wie oben beschrieben isoliert. Danach wurde das One-Step Brilliant III QRT-PCR Master Mix Kit (Agilent) nach Vorgaben des Herstellers genutzt, wobei ein Reverse Transkriptase-Schritt durchgeführt wurde. Für die Reaktionen, die in einem *C1000TM Thermal cycler* (Bio-Rad) inkubiert wurden, wurde RNA mit einerer Konzentration von 4 ng RNA pro μl eingesetzt. Die Expression der mRNAs wurde relativ zu einer Kontrolle berechnet und auf die *rpoZ* Expression normalisiert. Zur statistischen Auswertung wurde ein t-Test durchgeführt und es wurden p-Werte ≤ 0.05 als signifikant betrachtet (Primer siehe 6.6).

6.2.4 RNA-Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene RNAs mit Hilfe der T7-RNA Polymerase von PCR-Produkten mit T7-Promotor transkribiert (PCR-Primer siehe Anhang Tab. A13), wobei die sRNAs CcsR1 und PcrZ radioaktiv markiert wurden, während Ausschnitte aus der *flhR*-mRNA und der *bchN* mRNA ohne Markierung transkribiert wurden. Im Anschluss an die Transkription wurden die RNAs mittels G50 Säulchen (GE HEALTHCARE) und Gel-Extraktion aufgereinigt. Die Interaktionen der sRNAs (CcsR1 und PcrZ) wurden in 1x Strukturpuffer für RNase T1 (100 mM Tris pH 7, 1 M KCl, 100 mM MgCl_2) in einem Volumen von 15 μl überprüft. Hierbei wurden 250 fmol sRNA bei einer Temperatur von 32 °C für 30 Minuten mit unterschiedlichen Mengen an mRNA oder Hfq inkubiert und im Anschluss mit 3 μl Ladepuffer (50 % Glycerin, 0.5x TBE, 0.2 % Bromphenolblau) gemischt: Die Reaktionsansätze wurden über native 0,5x TBE 6 % Acrylamid Gele (30 Minuten bei 100 V Vorlauf vor dem Laden, danach 2,5 Stunden bei 200 V und Raumtemperatur) aufgetrennt und via Autoradiographie analysiert.

6.2.5 Messungen von enzymatischen Reaktionen

Bestimmung der Glutathionkonzentration in R. sphaeroides

Um die Konzentration von Glutathion zu bestimmen, wurden 2 ml von *R. sphaeroides*-Kulturen unter mikroaeroben Bedingungen bei einer OD₆₆₀ von 0,4 bei 10.000 g abzentrifugiert und bis zur Messung der Glutathionkonzentration bei -20 °C aufbewahrt. Die Glutathionmessung erfolgte in einem zellfreien Extrakt. Hierfür wurden zunächst die Zellen in 3,75 % 5-Sulfosalicylsäure unter Vortexen lysiert. Zelltrümmer und ausgefallene Proteine wurden im Anschluss durch Zentrifugation bei 4 °C und 10.000 g pelletiert und dadurch vom im Überstand verbleibenden Glutathion getrennt. Der Überstand wurde in neue Reaktionsgefäße überführt und auf Eis gestellt. Danach wurde einerseits eine 6 mM Lösung von Ellman's Reagenz in Reaktionspuffer angesetzt, andererseits wurde Reaktionspuffer mit 0,3 mg*ml⁻¹ NADPH versetzt. Für die colorimetrische Bestimmung der Glutathionkonzentration wurden 1 ml Reaktionen angesetzt. Ein Reaktionsansatz bestand aus 845 µl Reaktionspuffer mit NADPH der mit 50 µl zellfreiem Überstand und 100 µL der 6 mM Lösung von Ellman's Reagenz gemischt wurde. Danach wurde der Reaktionsansatz für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um eine komplette Oxidation des Glutathions durch Ellman's Reagenz zu erreichen. Durch Zugabe von 5 µl Glutathionreduktase aus Bäckerhefe (Sigma-Aldrich; Verdünnt auf 100 units* ml⁻¹ in Reaktionspuffer) wurde die Reaktion gestartet und es wurde die Veränderung der Färbung der Probe bei 412 nm über die Zeit beobachtet. Die Gesamtkonzentration an Glutathion wurde bestimmt aus dem Vergleich zu Referenzmessungen mit Glutathion gelöst in Reaktionspuffer. Abschließend wurde die gemessene Glutathionmenge mit der gemessenen OD₆₆₀ zum Probenahmezeitpunkt normalisiert.

Bestimmung der Betagalaktosidaseaktivität in einem RNA-Interaktions in vivo Reportersystem in R. sphaeroides

Um die Betagalaktosidaseaktivität in *R. sphaeroides* zu bestimmen wurden Kulturen mit den Plasmiden des *in vivo* Reportersystems bei 32 °C unter mikroaeroben Bedingungen bis zu einer OD₆₆₀ von 0,4 inkubiert. Danach wurden 2 ml der Bakterienkultur bei 10.000 g abzentrifugiert und bis zur Messung bei -20 °C aufbewahrt. Für eine Messung wurden jeweils die Messwerte für drei biologische Replikate mit zwei technischen Replikaten berücksichtigt. Die Messung der Betagalaktosidaseaktivität erfolgte in Z-Puffer mit ONPG als Substrat wie beschrieben (Klug *et al.* 1997): Abschließend wurde die Betagalaktosidaseaktivität in *Millerunits* bestimmt (Miller 1972).

6.3 Molekulargenetische Methoden

6.3.1 Erstellen einer *flhR*-Deletionsmutante

Um die Funktion von Genen in Bakterien zu untersuchen, werden häufig Deletionsmutanten dieser Gene erstellt, bei denen die codierende Region des Gens entweder teilweise oder komplett durch eine Antibiotikaresistenz-vermittelnde Kasette ersetzt wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die komplette Protein-codierende Sequenz von *flhR* (RSP_2591) durch die Kanamycinkassette aus pUC4K ausgetauscht (Vieira & Messing 1982). Hierfür wurden zunächst ein 688 bp DNA Fragment aus der *upstream* Region von *flhR* mit den Primern up2591Kpn-f und up2591Pst-r und ein 682 bp DNA Fragment aus der *downstream* Region von *flhR* mit den Primern down2591Pst-f und down2591Hind-r amplifiziert (Primer siehe 6.6). Im Anschluss wurde zunächst das *flhR downstream* Fragment über die HindIII und Pst I Restriktionsschnittstellen und danach das *flhR upstream* Fragment über die PstI und KpnI Restriktionsschnittstellen in pPHU281 kloniert (Hübner *et al.* 1993). Zum Abschluss wurde die Kanamycin-Kassette aus pUC4K in die PstI Restriktionsschnittstelle kloniert und das resultierend Plasmid

pPHU2591up-KM-down via Konjugation in *R.sphaeroides* 2.4.1 eingebracht. Kanamycin-resistente und gleichzeitig Tetrazyklin-sensitive Klone wurden ausgewählt und mittels PCR überprüft.

6.3.2 Erstellen von plasmidbasierten Überexpressionsstämmen

Da häufig eine Deletion von gewünschten Genen oder sRNAs nicht möglich ist oder ein Vergleich für Deletionsmutanten zu Rate gezogen werden muss, stellt die Überexpression von einzelnen Genen von einem Plasmid eine häufig genutzte Methode dar um veränderte Expressionslevel für gewünschte Proteine oder RNAs zu erreichen.

Erstellen einer flhR Überexpression in pRK4352

Um einen Vergleich zur *R. sphaeroides flhR* Deletionsmutante zu erhalten, wurde die Überexpression von *flhR* von einem Plasmid angestrebt. Hierfür wurde zunächst *flhR* zusammen mit der 5'UTR mit den Primern 2591ovfbam1 and 2591ovRkpn1 amplifiziert. Das entstandene DNA Fragment wurde über die BamHI und KpnI Restriktionsschnittstellen in pRK4352 eingebracht (Mank *et al.* 2012). Das entstandene Plasmid pRK_*flhR* wurde mittels Konjugation in *R. sphaeroides* 2.4.1 und die *flhR* Deletionsmutante eingebracht und es wurde auf Tetrazyklinresistenz selektiert.

Erstellen von Überexpressionen der CcsR-RNAs in pRK4352 und pBBR4352

Um erhöhte Level der CcsR RNAs in *R. sphaeroides* zu erreichen, wurden die Überexpressionsplasmide pRK4352 und pBBR4352 genutzt (Mank *et al.* 2012). Ein DNA Fragment mit dem RSP_6037-CcsR1-4 Locus ohne Promotor wurde mittels PCR amplifiziert, und in pDrive (Qiagen) kloniert. Nach einer Restriktion mit BamHI/EcoRI wurde das ausgeschnittene DNA Fragment in die entsprechenden Restriktionsschnittstellen in pRK4352 eingebracht. Das entstandene Plasmid wurde pR6037_CcsR1-4 benannt. Kleinere DNA Fragmente bestehend aus CcsR1-4, wurden auf ähnliche Weise in die BamHI/EcoRI und BamHI/XbaI Restriktionsschnittstellen von

pRK4352 and pBBR4352 kloniert. Hieraus entstanden die Plasmide pRCcsR1-4 und pBCcsR1-4. Für eine Überexpression von CcsR1, CcsR2, CcsR1+2 und CcsR1-3, in pRK4352 und pBBR4352 wurde eine entsprechende Klonierungsstrategie und für die resultierenden Plasmide eine entsprechende Nomenklatur angewandt (pRCcsR1, pBCcsR1,...). Alle Plasmide wurden durch Konjugation in *R. sphaeroides* übertragen (Primer siehe 6.6, Plasmide siehe 6.7).

6.3.3 Erstellen von Reporterplasmiden für ein *lacZ* basiertes Reportersystem zur Analyse von sRNA Interaktionen

Um sRNA-mRNA Interaktionen zu untersuchen, wurde für diese Arbeit ein Reportersystem genutzt. Hierfür wurde der 16S rRNA (RSP_4352) Promotor zunächst mittels PCR amplifiziert und in pDrive (Qiagen) kloniert. Nach einem Restriktionsverdau mit XhoI und KpnI wurde das Promotorfragment in die entsprechenden Restriktionsschnittstellen des *lacZ* Fusionsplasmids pPHU235 (Simon *et al.* 1983) eingebracht. Das entstandene Plasmid pPHU16S wurde genutzt um DNA Fragmente, die potentielle CcsR1-4 Bindestellen enthielten, einzubringen und die potentiell regulierten Gene als *lacZ*-Fusion zu exprimieren. Die Reporterplasmide wurden mittels Konjugation in *R. sphaeroides* Stämme mit den Plasmiden pBBR4352 oder pBCcsR1-4 eingebracht (Primer siehe 6.6, Plasmide siehe 6.7).

6.4 Transkriptom- und Proteomanalysen

Um den Einfluss eines Regulators auf die globale Genexpression zu untersuchen, werden Proteom- und Transkriptomanalysen durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine gelbasierte Proteomanalyse mit einer Microarray-Transkriptomanalyse gekoppelt.

Microarray

Für die Transkriptomanalyse wurden *R. sphaeroides* 2.4.1 (pRK415) und *R. sphaeroides* 2.4.1 (pRCcsR1-4) unter aeroben Bedingungen bis in die frühe exponentielle Wachstumsphase angezogen und Proben entnommen. Für zwei eigenständige Microarrays wurden jeweils drei Experimente pro Stamm durchgeführt und die Gesamt-RNA eines Stammes zu einem *Pool* zusammengeführt. Jeweils 2 µg der gepoolten Gesamt-RNA eines Stammes wurden im Anschluss mit dem *ULS Fluorescent Labeling Kit for Agilent arrays* (Kreatech) mit Cy3 oder Cy5 markiert. Danach wurde die RNA einem *Custom Gene Expression Microarray* von Agilent Technologies (8x15K; ID: 027061) für *R. sphaeroides* nach Vorgaben von Agilent hybridisiert (Peuser *et al.* 2012). Die weitere Bearbeitung der Microarrays folgte den Vorgaben von Agilent und die Rohdaten der Analyse wurden im NCBI Gene Expression Omnibus und der der Referenznummer GSE67145 hinterlegt (Edgar 2002; Datensatz siehe Daten-CD\Microarray). Die finale Auswertung der Daten wurde mittels des LIMMA Pakets für R durchgeführt (Smyth & Speed 2003). Hierbei wurde innerhalb der Arrays nach dem LOESS-Model normalisiert und so ein Fehler durch potentiell unterschiedliches Verhalten der Farbstoffe ausgeglichen. Die normalisierten Fluoreszenzwerte wurden dann genutzt, um Expressionsratios zu ermitteln, wobei nur Sonden berücksichtigt wurden, deren Fluoreszenzwerte oberhalb des durch unspezifische Sonden ermittelten Hintergrunds lagen. Um eine veränderte Expression zu ermitteln, wurden nur Gene mit einer durchschnittlichen \log_2 Ratio von $\leq -0,7$ oder $\geq 0,7$ berücksichtigt. Zusätzlich wurden Gene von besonderem Interesse manuell analysiert.

2D-Gelelektrophorese

Für die gelbasierte Proteomanalyse wurden die experimentellen Daten aus Billenkamp 2010 genutzt. Diese wurden mittels Delta2D (Decodon) nach Vorgaben des Herstellers neu analysiert, wobei weitgehend eine Übereinstimmung mit den Daten aus Billenkamp 2010 erreicht wurde.

6.5 Bioinformatische Methoden

6.5.1 Vorhersage von CcsR1 Homologen in anderen Alphaproteobakterien

Um CcsR1 Homologe in anderen Bakterien zu finden, wurden zwei unterschiedliche auf dem BLAST (*B*asic *L*ocal *A*lignment *S*earch *T*ool) Algorithmus basierende Strategien angewandt (Altschul *et al.* 1990). Für die eine Strategie wurde zunächst mittels Protein-BLAST (BLASTP) nach Homologen zu CcaF1 aus *Rhodobacter sphaeroides* (RSP_6037) gesucht und anschließend nach CCTCCTCCC- Basenmotiven in der DNA der flankierenden intergenischen Regionen gesucht. Danach wurden verschiedene CCTCCTCCC-Motive kombiniert und die entsprechende RNA der Motive und ihrer Umgebung einer Faltungsvorhersage unterzogen (siehe unten). In der zweiten Strategie wurde mittels Nukleotid-BLAST (BLASTN) direkt nach Homologen zu CcsR1 aus *Rhodobacter sphaeroides* gesucht. Hierbei wurde auf eine Konservierung der CCTCCTCCC-Basenmotive auf DNA-Ebene geachtet. Im Anschluss wurden Faltungsvorhersagen durchgeführt um nach konservierten Sekundärstrukturen für die mit BLAST vorhergesagten sRNAs zu suchen (siehe unten).

6.5.2 Berechnung phylogenetischer Stammbäume

Berechnung eines 16S rRNA Stammbaums für Bakterien mit CcsR1 Homologen

Zur Berechnung eines Stammbaums, der den Verwandtschaftsgrad der verschiedenen Bakterien mit vorhergesagten CcsR1- Homologen, basierend auf dem Gen für die ribosomale 16S rRNA-Untereinheit, darstellt, wurde die Datenbank des *RIBOSOMAL*

DATABASE PROJECT zur Hilfe genommen (Cole *et al.* 2009). Hierbei wurde in der Datenbank nach den Organismen mit CcsR Homologen gesucht und diese dann in einem individuellen Stammbaum zusammengestellt. Um die Verlässlichkeit des Stammbaums zu erhöhen, wurde *Escherichia coli* K12 als Referenz-Außenseiter eingefügt.

Berechnung eines Stammbaums für CcsR1 Homologe aus verschiedenen Alphaproteobakterien

Ein Stammbaum, der eine potentielle Verwandtschaft der CcsR1 Homologe aus verschiedenen Organismen beschreibt, wurde mittels des im Internet verfügbaren Programms LOCARNA erstellt, welches für die Erstellung lokaler und globaler Sequenz *Alignments* programmiert wurde (Smith *et al.* 2010). Hierzu wurde zunächst die Größe der verschiedenen vorhergesagten CcsR1 Homologe definiert. Hierfür wurden jeweils 5 Nukleotide *upstream* des ersten CCUCCUCCC- Motivs eines CcsR Homologs als Start der sRNA gewählt und das Ende der sRNA 5 Nukleotide *downstream* des zweiten CCUCCUCCC- Motivs gesetzt. Abschließend wurden die Sequenzen in das *.fasta* Format umgewandelt und für die Berechnung genutzt.

Berechnung eines Stammbaums für CcaF1

Zur Berechnung eines CcaF1 Stammbaums wurden die Aminosäuresequenzen von verschiedenen CcaF1 und CcaF2 Homologen in das Programm MEGA5 eingespeist (Tamura *et al.* 2011). Es wurde ein *Alignment* mittels *Custalw* durchgeführt (Larkin *et al.* 2007). Danach wurde ein phylogenetischer Stammbaum der verschiedenen homologen Proteine mittels *maximum likelihood* Methode mit Aminosäureaustausch erstellt. Hierbei wurde der erstellte Stammbaum mit 1000 Wiederholungen eines *bootstrap* Tests überprüft.

6.5.3 RNA-Faltungsvorhersagen

Häufig ist es hilfreich, *in silico* vorhergesagte Sekundärstrukturen von RNA-Molekülen heranzuziehen, um einen ersten Eindruck über die Zugänglichkeit bestimmter Regionen des RNA-Moleküls zum Beispiel für RNAsen oder für eine Interaktion mit anderen RNA-Molekülen zu gewinnen. Hierbei ist eine Vielzahl verschiedener Programme und Web-Applikationen verfügbar, die eine Faltungsvorhersage ermöglichen.

Berechnung von sRNA Sekundärstrukturen mittels RNAFOLD

Eine klassische Web-Applikation zur Berechnung von RNA-Sekundärstrukturen basierend auf der minimalen freien Energie (MFE) stellt RNAFOLD dar (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>; Hofacker 2003; Hofacker *et al.* 1993). Neben einer klassischen 2D-Struktur bietet RNAFOLD an, sich die Struktur einer RNA-Sequenz auch in der sogenannten *dot-bracket*-Annotierung anzeigen zu lassen. RNAFOLD wurde im Rahmen dieser Arbeit genutzt, um die Sekundärstruktur von CcsR1 aus *R. sphaeroides* 2.4.1 in der *dot-bracket*-Annotierung zu ermitteln. Diese wurde benötigt zur Vorhersage einer 3D-Struktur der sRNA mittels RNACOMPOSER (siehe unten). Die Daten für RNAfold Faltungen sind hinterlegt auf der beiliegenden Daten-CD im Verzeichnis RNAfold.

Berechnung von sRNA Sekundärstrukturen mittels SFOLD

Eine weitere klassische Web-Applikation zur Berechnung von RNA-Sekundärstrukturen stellt SFOLD dar (<http://sfold.wadsworth.org/cgi-bin/index.pl>; Ding *et al.* 2004). SFOLD ist prinzipiell vergleichbar mit RNAFOLD, jedoch werden in der graphischen Ausgabe dieser Web-Applikation die Vorhersagen für MFE-Struktur und Centroid-Struktur direkt verglichen, was auch unerfahrenen Nutzern erlaubt einen Einblick in die Qualität einer RNA-Strukturvorhersage zu gewinnen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde allgemein SFOLD

für die Vorhersage der 2D-Struktur verschiedener CcsR RNAs genutzt. Die Daten für SFOLD- Faltungen sind hinterlegt auf der beiliegenden Daten-CD im Verzeichnis Sfold.

Berechnung von mRNA Sekundärstrukturen mittels NUPACK

Eine weitere, laut Literatur besonders zur Berechnung von mRNA-Strukturen geeignete, Web-Applikation stellt NUPACK dar (<http://www.nupack.org>; Zadeh *et al.* 2011). Im Rahmen dieser Arbeit wurde NUPACK genutzt um die mRNA Bindestellen der CcsR RNAs darzustellen. Die Daten für RNAfold Faltungen sind hinterlegt auf der beiliegenden Daten-CD im Verzeichnis NUPACK.

Berechnung von RNA-3D Strukturen mit RNACOMPOSER

Neben mittlerweile relativ robusten Vorhersagen zu RNA-Sekundärstrukturen sind auch einige Web-Applikationen verfügbar, mit denen es möglich ist, eine 3D-Struktur von RNA Molekülen berechnen zu lassen und diese mit Hilfe von Programmen zur Darstellung von Proteinstrukturen auch zu bearbeiten. Ein besonders benutzerfreundliches Beispiel für eine solche Web-Applikation zur RNA-3D-Strukturvorhersage stellt RNACOMPOSER dar (<http://rnacomposer.ibch.poznan.pl/Home>; Popenda *et al.* 2012). Für RNACOMPOSER wird neben der Sequenz einer RNA auch die Sekundärstruktur in *dot-bracket*-Annotation benötigt, weshalb sich eine Kombination mit RNAFOLD empfiehlt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde RNACOMPOSER, genutzt um die Tertiärstruktur von CcsR1 aus *R. sphaeroides* 2.4.1 vorherzusagen. Die Daten für RNACOMPOSER Faltungen sind hinterlegt auf der beiliegenden Daten-CD im Verzeichnis RNACOMPOSER.

6.5.4 Proteinfaltungsvorhersagen

Um die Strukturen von annotierten Proteinen vorherzusagen, kann die Web-Applikation PHYRE2 genutzt werden (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>; Kelley & Sternberg 2009). Hierbei werden die Sequenzen der Proteine manuell aus einer beliebigen Datenbank abgerufen und können dann eingegeben werden. Es

werden dann die Sequenzen mit den Sequenzen von Proteinen mit bekannten Proteinstrukturen verglichen. Abschließend werden die zwischen Eingabe und bekannten Proteinen konservierten Proteindomänen hervorgehoben und eine mögliche 3D-Struktur für die Eingabe berechnet. Auf Grund hoher Rechenkapazität sollten PHYRE2 Vorhersagen über Nacht betrieben werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden mögliche Faltungen der CcaF1 und CcaF2 Homologe verschiedener Alphaproteobakterien mit PHYRE2 berechnet. Die Daten für PHYRE2 Faltungen sind hinterlegt auf der beiliegenden Daten-CD im Verzeichnis PHYRE2.

6.5.5 Darstellung von CcsR1 und CcaF1 aus *R. sphaeroides* 2.4.1 in einem Modell

Um Modelle von Proteinen oder RNA Molekülen auf einem Computer bearbeiten zu können, wird in der Regel ein Programm benötigt, das Dateien im .pdb Format darstellen kann. Häufig wird das im Rahmen der universitären Forschung freie Programm UCSFCHIMERA genutzt (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>; Pettersen *et al.* 2004). Im Rahmen dieser Arbeit wurde UCSFCHIMERA unter Anderem genutzt um die vorhergesagten Modelle für CcaF1 und CcsR1 aus *R. sphaeroides* 2.4.1 einzufärben und zu einem gemeinsamen Modell zusammen zu fassen.

6.5.6 Sequenzmultialignments

Die Aminosäuresequenzen der konservierten Proteindomänen der verschiedenen CcaF1 Homologe und die Aminosäuresequenz der RNA-Bindedomäne des *Drosophila melanogaster* SMAUG Proreins wurden mittels MEGA5 und Custalw *aligned* (<http://www.megasoftware.net/>; Tamura *et al.* 2011; Larkin *et al.* 2007).

6.5.7 Erstellen von Sequenz- Weblogos

Um konservierte Regionen innerhalb der verschiedenen CcsR1 Homologe hervorzuheben, wurden mit Weblogo (<http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>) sogenannte Weblogos erstellt (Crooks *et al.* 2004; Schneider & Stephens 1990). Hierfür wurden

Alignments von CcsR1 aus verschiedenen Organismen in das Programm geladen und eine Abbildung errechnet, die die Häufigkeit eines bestimmten Nukleotids an einer bestimmten Position in der Konsensussequenz für die CcsR1 Homologe angibt.

6.5.8 RNA-RNA-Interaktionsvorhersagen

RNA-RNA-Interaktionsvorhersagen sind eine gängige Methode, um in Kombination mit weiteren Experimenten mögliche mRNA Interaktionspartner von sRNAs für eine weitere Analyse zu bestimmen. Bei diesen Interaktionsvorhersagen wird prinzipiell zwischen Vorhersagen unterschieden, die sich mit den Interaktionen einer sRNA in einem Organismus beschäftigen, und Vorhersagen, die sich mit den Interaktionen einer potentiell konservierten sRNA beschäftigen.

Genomweite Suche nach CcsR1-4 Interaktionspartnern mit INTARNA

Eine Web-Applikation zur genomweiten Vorhersage von mRNA-Interaktionspartnern von sRNAs in einem Organismus stellt INTARNA dar, welches von der Universität Freiburg zur Verfügung gestellt wird (<http://rna.informatik.uni-freiburg.de/IntaRNA/Input.jsp>; Busch *et al.* 2008). INTARNA-Vorhersagen basieren unter Anderem auf der Zugänglichkeit einer potentiellen Bindestelle und auf der Energie, die während des Auflösens der Sekundärstrukturen von zwei RNAs unter Bildung eines RNA-Hybrids umgesetzt wird. Eine hohe frei werdende Energie indiziert hierbei eine bevorzugte RNA-RNA-Hybridisierung und führt zu einer guten Bewertung innerhalb einer genomweiten Interaktionsvorhersage. Um dies zu erreichen, werden für INTARNA-Untersuchungen die Sequenz einer zu analysierenden sRNA, definierte Bereiche aller Gene (annotierte ORFs laut NCBI Datenbank) und die Umgebungstemperatur berücksichtigt. Zusätzlich gibt es die Möglichkeit Bindungsparameter wie die Länge der Interaktionsstelle (*seed*) zu definieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde INTARNA genutzt, um Interaktionsvorhersagen für CcsR1 aus verschiedenen Alphaproteobakterien und

Interaktionsvorhersagen für CcsR1-4 aus *R. sphaeroides* 2.4.1 bei einer Temperatur von 32 °C durchzuführen. Zusätzlich wurden die mittels INTARNA generierten Daten für *R. sphaeroides* 2.4.1 dazu genutzt, ein potentielles Bindemotiv der CcsR-RNAs zu bestimmen. Darüber hinaus wurde mit Hilfe der INTARNA-Daten für CcsR1 aus verschiedenen Alphaproteobakterien nach möglichen konservierten Interaktionspartnern der CcsR-RNAs gesucht.

Genomweite Suche nach CcsR1 Interaktionspartnern mit RNAPREDATOR

Neben INTARNA stellt RNAPREDATOR ein gängiges Programm zur Vorhersage von sRNA Interaktionspartnern dar (http://rna.tbi.univie.ac.at/RNAPredator2/target_search.cgi; Eggenhofer *et al.* 2011). RNAPREDATOR basiert auf dem RNAPLEX-Algorithmus, der, ähnlich wie der für INTARNA genutzte Algorithmus funktioniert. RNAPLEX berücksichtigt insbesondere die Zugänglichkeit einer potentiellen Bindestelle und die Energie, die während des Auflösens der RNA Sekundärstrukturen unter Bildung eines RNA-Hybrids umgesetzt wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurde RNAPREDATOR genutzt, um die mittels INTARNA für CcsR1 aus *R. sphaeroides* 2.4.1 ermittelten Interaktionsvorhersagen zu überprüfen und bewerten.

Komparative Suche nach konservierten CcsR1 Interaktionspartnern mittels BLAST und INTARNA

Neben der bioinformatischen Analyse von sRNA-mRNA Interaktionen in einzelnen Organismen ist die Analyse von über mehrere Organismen konservierten sRNA-mRNA Interaktionen von besonderem Interesse. In einem semimanuellen Ansatz wurden die INTARNA-Interaktionsvorhersagen für die CcsR1-Homologe verschiedener Alphaproteobakterien abgeglichen (<http://rna.informatik.uni-freiburg.de/IntaRNA/Input.jsp>; Busch *et al.* 2008). Hierbei wurde analysiert, ob eine vorhergesagte Interaktion für CcsR1 in einem Organismus für das CcsR1-Homolog und eine homologe mRNAs in

einem anderen Organismus auch eine Vorhersage einer stabilen Interaktion lieferten. Um diese Interaktionsvorhersagen in verschiedenen Organismen bewerten und vergleichen zu können, musste zunächst der Beobachtung Sorge getragen werden, dass INTARNA-Vorhersagen in unterschiedlichen Organismen häufig unterschiedlichen Niveaus an freier Energie aufweisen. Hierfür wurde zunächst der relative Bewertungsstandard INTARNA-Score definiert.

$$\text{INTARNA Score} = \frac{\text{Freie Energie Interaktionsvorhersage}}{\bar{x}(\text{Freie Energie der 5 stärksten Interaktionsvorhersagen})}$$

Diese wurde dann auf die stärksten Interaktionsvorhersagen für CcsR1 in *R. sphaeroides* 2.4.1 angewandt. Danach wurden die homologen Gene zu den mRNAs mit den stärksten Interaktionsvorhersagen für CcsR1 aus *R. sphaeroides* 2.4.1 mittels BLASTp in ausgewählten Alphaproteobakterien mit vorhergesagten CcsR1-Homologen ermittelt (Altschul *et al.* 1990). Im Anschluss wurden für die gefundenen homologen mRNAs die INTARNA-Scores in den jeweils entsprechenden Organismen ermittelt. Um die Konservierung der Regulation einer konservierten mRNA durch die CcsR1 Homologe zu beschreiben, wurde abschließend eine durchschnittliche INTARNA-Score für alle untersuchten Organismen berechnet. Hierbei wurde ein Fehlen des Gens für eine konservierte mRNA mit einer INTARNA-Score von 0 bewertet. Abschließend wurden die durchschnittlichen INTARNA-Scores für die verschiedenen potentiell konservierten mit CcsR1 interagierenden mRNAs verglichen, wobei ein hoher Wert eine Konservierung indizierte, während ein niedriger Wert gegen eine Konservierung sprach.

Komparative Suche nach konservierten CcsR1 Interaktionspartnern mittels HINTARNA

Eine weitere Möglichkeit um die Konservierung von sRNA-mRNA Interaktionen basierend auf INTARNA zu untersuchen, stellte das mittlerweile eingestellte und durch

COPRARNA ersetzte HOMOLOGYPINTARNA (HINTARNA) dar (Wright 2012). HOMOLOGYPINTARNA verglich, ähnlich wie für die Suche mittels BLASTP und INTARNA beschrieben, die verschiedenen Interaktionsvorhersagen aus den untersuchten Organismen. Zusätzlich verstärkte HOMOLOGYPINTARNA die getroffenen Vorhersagen, indem die CcsR1-Homologe der verschiedenen Organismen für ergänzende Interaktionsvorhersagen ausgetauscht wurden, die in die Bewertung mit einbezogen wurden. Hierbei wurde in den ergänzenden Analysen CcsR1 aus einem Organismus für eine Interaktionsvorhersage in einem anderen Organismus genutzt. Zusammen mit dem Hauptentwickler wurden im Rahmen dieser Arbeit und in Rahmen der Entwicklung von HINTARNA die CcsR1-Homologe aus verschiedenen Alphaproteobakterien bezüglich möglicher konservierter mRNA Interaktionspartner getestet.

Komparative Suche nach konservierten CcsR1 Interaktionspartnern mittels CopraRNA

Eine Weiterentwicklung von HOMOLOGYPINTARNA stellt die Web-Applikation COPRARNA dar (<http://rna.informatik.uni-freiburg.de/CopraRNA/Input.jsp>; Wright *et al.* 2013). Der technische Hintergrund von COPRARNA ist mit Ausnahme von Fehlerbehebungen mit dem von HOMOLOGYPINTARNA vergleichbar, jedoch bietet COPRARNA die Möglichkeit über ein Web-Interface eine Mehrzahl an Suchen parallel auszuführen und bietet eine höhere Nutzerfreundlichkeit als die beiden vorher beschriebenen Methoden zur Analyse konservierter sRNA Interaktionspartner. In dieser Arbeit wurde COPRARNA genutzt, um die Konservierung von Interaktionspartnern der CcsR-RNAs auf verschiedenen Ebenen zu untersuchen. Hierbei wurde einerseits eine Suche in verschiedenen *R. spaheroides* Spezies durchgeführt, des Weiteren wurde innerhalb des Genus *Rhodobacter* nach potentiellen konservierten Interaktionspartnern gesucht und abschließend wurde nach

möglichen Interaktionspartnern der CcsR-RNAs gesucht, die über die Alphaproteobakterien konserviert sind.

7 Materialien

7.1 Alphabetische Chemikalienliste

A

Acetat	AppliChem
Aceton	Roth
Acrylamid/Bisacrylamid 40 % (PAA 40)	AppliChem
Acrylamid/Bisacrylamid 30 % (PAA 30)	Roth
Agarose	Roth
Aluminiumchlorid (AlCl ₃)	Sigma
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Aldrich
Ammoniumsulfat ((NH ₄) ₂ SO ₄)	Roth
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Roth
Ampicilin-Natriumsalz	Roth
γ-ATP ³²	Hartmann Analytic
Äpfelsäure (Malat)	Roth

B

Bacto Agar	Difco
Bacto Pepton	Difco
Bacto Trypton	Difco
Bariumchlorid (BaCl ₂)	Sigma
Biotin	Roth
Bovines Serum Albumin (BSA)	NEB
Borsäure (H ₃ BO ₃)	Roth
Bromphenolblau	Merck
5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-Galaktopyranosid (X-Gal)	Roth
n-Butanol	Roth

C

Calciumchlorid-Dihydrat (CaCl ₂ x 2 H ₂ O)	Merck
Cadmiumchlorid (CdCl ₂)	AppliChem
Chloroform	Roth
Chloroform-Isoamylalkohol (24:1)	AppliChem
CTAB (hexa-Decyltrimethylammoniumbromid)	Sigma

D

Diethylpyrocarbonat (DEPC)	AppliChem
Dithiothreitol (DTT)	Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
Dikaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄)	Roth

E

Eisenammoniumcitrat (Fe(NH ₄)-Citrat)	Sigma
---	-------

Eisen(II)-Citrat (Fe(II)-Citrat)	Sigma
Eisen(III)-Chlorid (FeCl ₃ x 6 H ₂ O)	Aldrich
Essigsäure	AppliChem
Ethanol	AppliChem
Ethidiumbromid	Roth
Ethylendiamin-tetraacetat-Dinatriumsalz (EDTA)	Roth
F	
Formamid, deionisiert	AppliChem
G	
Glaswolle (silanisiert)	Serva
Glucose	Roth
Glycerin	Carl Roth
Glycerin	AppliChem
Glycin	Roth
H	
Harnstoff	Roth
Hefeextrakt	Difco
I	
Isoamylalkohol	Roth
Isopropanol	Roth
Isopropyl-β-D-thiogalaktosid (IPTG)	Roth
K	
Kaliumacetat	Roth
Dikaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄)	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Roth
Kaliumbromid (KBr)	Sigma
Kaliumchlorid (KCl)	Roth
Kaliumiodid (KI)	Sigma
Kanamycinsulfat	Roth
Kobaltchlorid (CoCl ₂ x 6H ₂ O)	Sigma
Kupferchlorid-Dihydrat (CuCl ₂ x 2H ₂ O)	Sigma
Kupfer(II)-Sulfat-Pentahydrat (CuSO ₄ x 5H ₂ O)	Merck
L	
Lachs Spermien DNA (LSD)	AppliChem
LE Agarose	Biozym Scientific
Lithiumchlorid (LiCl)	Sigma
<i>low melting</i> Agarose	FMC Bio Products
M	
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Roth

Magnesiumsulfat-Heptahydrat ($\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$)	Merck
Manganchlorid-Tetrahydrat ($\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$)	Sigma
Mannitol	Roth
Menadion	AppliChem
Methylenblau	Sigma
Methylviologen (Paraquat)	Sigma
Mineralöl	Biorad
N	
Natriumacetat	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Natriumcitrat	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS), Pellets	Serva
Natriumdodecylsulfat (SDS), ultra pur	MP Biomedicals
Natriumglutamat	Merck
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth
di-Natriumhydrogenphosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$)	Roth
Natriummolybdad-Dihydrat ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$)	Sigma
Nickelchlorid-Hexyhydrat ($\text{NiCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$)	Sigma
Niacin	Sigma
Nicotinamid	Sigma
O	
o-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid (ONPG)	Appllichem
P	
Pepton aus Casein	Difco
Perborat (H_3BO_4)	Merck
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roth
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1)	Roth
Phenol, wassergesättigt (pH 4,5-5)	AppliChem
R	
rNTPs (ATP, CTP, UTP, GTP)	Roth
Reinstwasser (HPLC-grade)	Roth
S	
Saccharose	Roth
Salzsäure (37 %)	Roth
Scintilationscocktail	Roth
Spectinomycin-Dihydrochlorid	Sigma
Spurenelemente (RÄ-Medium)	Sigma
Standard-I-Nährbouillon (St-I)	Roth
Streptomycinsulfat	Sigma
T	

tert-Butylhydroperoxid (tBOOH)	AppliChem
Tetracyclin-Hydrochlorid	Sigma
Tetramethyldiamin (TEMED)	Roth
Thiamin-HCl	Roth
Thioharnstoff	Fluka
Trichloressigsäure (TCA)	Roth
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	AppliChem
Triton x 100	Roth
U	
α -UTP ³²	Hartmann Analytic
W	
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Roth
X	
Xylencyanol	Serva
Z	
Zinn(II)-chlorid (SnCl ₂ x 2H ₂ O)	Roth
Zinkchlorid (ZnCl ₂)	Sigma
Zinksulfat (ZnSO ₄ x 7 H ₂ O)	Sigma

7.2 Geräte und sonstige Materialien

ElektroBlotter	PeqLab
Elektroporation <i>Micro Pulser</i> TM	Biorad
Elektroporationsküvetten; 0,2 cm	PeqLab
Kühlzentrifuge, Sorvall RC-5C Plus	Sorvall
LI-250 Light Meter (Lichtmessgerät)	LI-COR
Microspin G-25 <i>spin columns</i>	GE Healthcare
Microspin G-50 <i>spin columns</i>	GE Healthcare
<i>NanoDrop</i> TM 1000 Spectrophotometer	Thermo Scientific
Nitrocellulose-Membranfilter; 0,45 µm	Schleicher & Schuell
PCR-Maschine S1000 TM <i>Thermal Cycler</i>	Biorad
Personal Molecular ImagerFX	Biorad
Phosphoimaging Screens	Biorad, Fuji, BASF
Photometer <i>Specord 50</i>	Analytik Jena
Pyranometer py 42525 (Sensor LI-250 Light Meter)	LI-COR
<i>Ready Strip</i> IPG Streifen; 17 cm pH 4-7	Biorad
Screen Eraser K	Biorad
<i>Speed Vac</i> SC 110	Savant
Szintillationszähler	Beckmann Coulter
UV- <i>Stratalinker</i> TM 1800	Stratagene
<i>Whatman</i> Papier	Schleicher & Schuell

7.3 Molekularbiologische Kits & Enzyme

DNase I	Invitrogen
DNase I	Promega
KOD <i>Hot Start</i> DNA Polymerase	Novagen (Merck)
One-Step Brilliant III QRT-PCR Master Mix Kit	Agilent
Phusion <i>High-Fidelity</i> DNA Polymerase	Thermo Scientific
QIAEX II <i>Gel extraction Kit</i>	Qiagen
Restriktionsendonukleasen	NEB/Fermentas
RiboLock RNase Inhibitor	Thermo Scientific
T4-Polynukleotidkinase	NEB
T7-RNA Polymerase	NEB
<i>Total RNA Isolation Reagent</i> (TRIR)	ABgene
<i>ULS Fluorescent Labeling Kit for Agilent arrays</i>	Kreatech

7.4 Nährmedien

7.4.1 Rhodobacter-Äpfelsäure-Medium (RÄ-Medium)

RÄ-Medium

Äpfelsäure	30,0 g
MgSO ₄ x 2 H ₂ O	0,2 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,2 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,07 g
Spurenelementlösung	1,5 ml
ad. 1000 ml Reinstwasser	

pH 6,9 einstellen, danach autoklavieren, nach dem Autoklavieren abkühlen lassen. Nach dem Öffnen mit 20 ml Phosphatlösung und 8 ml Vitaminlösung supplementieren

Phosphatlösung

K ₂ HPO ₄	45 g
KH ₂ PO ₄	30 g
ad. 1000 ml Reinstwasser	

Vitaminlösung

Niacin	200 mg
Thiamin-HCl	400 mg
Nicotinamid	200 mg
Biotin	8 mg
ad. 1000 ml Reinstwasser	

Spurenelementlösung

Fe(II)-Citrat	500 mg
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	20 mg
ZnCl ₂	5 mg
LiCl	5 mg
KI	2,5 mg
CuSO ₄	0,15 mg
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	5 mg
SnCl ₂ x 2 H ₂ O	0,5 mg
BaCl ₂	0,5 mg
AlCl ₃	1 mg
H ₃ BO ₄	10 mg
EDTA	20 mg
ad. 1000 ml H ₂ O	

RÄ-Agar

Bacto Agar (1,6 % (w/v), Difco)
ad. 500 ml RÄ-Medium

Autoklavieren, nach dem Autoklavieren abkühlen lassen und mit 10 ml Phosphatlösung, sowie 4 ml Vitaminlösung supplementieren.

7.4.2 Roseobacter Marin Medium (RD1-Medium)

RD1-Medium (Nährlösung A)

NaCl	23,5 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	2 g
KCl	0,6 g
Pepton aus Casein	1 g
Bacto Pepton	1 g
Hefeextrakt	1 g
Glyzerin	1,86 g
Spurenelement-Lösung	10 ml
H ₂ O	750 ml

pH auf 7,6 – 7,8 einstellen und autoklavieren, nach dem Autoklavieren mit Nährlösung B vereinigen und 5 ml Vitaminlösung zugeben.

Nährlösung B

MgCl ₂ x 6 H ₂ O	10 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	1,46 g
H ₂ O	250 ml

Autoklavieren

Vitaminlösung

Niacin	200 mg
Thiamin-HCl	400 mg
Nicotinamid	200 mg
Biotin	8 mg
ad. 1000 ml Reinstwasser	

Spurenelement-Lösung

Titriplex III	500 mg
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	300 mg
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	3 mg
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	5 mg
CuCl ₂ x 2 H ₂ O	1 mg
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	2 mg
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	3 mg
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	5 mg
H ₃ BO ₃	2mg
ad. 1000 ml H ₂ O	

RD1-Agarplatten

Bacto Agar (1,6 % (w/v), Difco)
ad. 500 ml RD1-Medium

Autoklavieren und nach dem Autoklavieren mit 4 ml Vitaminlösung supplementieren.

7.4.3 Standard-I-Medium

Standard-I-Medium (St-I-Medium)

St-I-Nährboullion (Carl Roth) 25 g
ad. 1000 ml H₂O

Autoklavieren

St-I-Agarplatten

Bacto Agar (1,6 % (w/v), Difco)
ad. 500 ml St-I-Medium

Autoklavieren

7.4.4 GMX-Medium

Lösung A

Mannitol 10 g
K₂HPO₄ 5 g
Natriumglutamat 5 g
Lösung B 400 µl
Lösung C 50 µl
Lösung D 500 µl
ad. 1000 ml H₂O

pH 7,0 mit HCl einstellen, autoklavieren,
nach dem Autoklavieren 811 µl Lösung
E, 272 µl Lösung F, 10 µl Lösung G und
1000 µl Lösung H zugeben.

Lösung B

FeCl₃ x 6 H₂O 0,125 g
ad. 1000 ml H₂O

Autoklavieren

Lösung C

H₃BO₃ 0,1 g
ZnSO₄ x 7 H₂O 0,145 g
CuSO₄ x 5 H₂O 0,1 g
CoCl₂ 0,055 g
Na₂MoO₄ x 2H₂O 0,1 g
ad. 500 ml H₂O

Autoklavieren

Lösung D

MnCl₂ x 4 H₂O 0,149 g
ad. 50 ml H₂O

Autoklavieren

Lösung E

MgSO₄ x 7 H₂O 2,47 g
Ad. 10 ml H₂O

Steril filtrieren

Lösung F

CaCl₂ x 2 H₂O 1,47 g
ad. 10 ml H₂O

Steril filtrieren

Lösung G

Biotin 10 mg
ad. 10 ml 0,1 M NaOH

Steril filtrieren

Lösung H

Thiamin 100 mg
ad. 10 ml H₂O

steril filtrieren

7.4.5 PY-Medium

PY-Medium

Bacto-Pepton	10 g
Hefeextrakt	0,5 g
CaCl ₂ (1 M)	2 ml
MgCl ₂ (1 M)	2 ml
FeSO ₄ (0,5 %)	2,4 ml
Bacto Agar (w/v)	1,8 %
ad. 1000 ml H ₂ O	

PY-Agarplatten

Bacto Agar 8 g (1,6 % (w/v))
ad. 500 ml PY-Medium

Autoklavieren

pH 7,0 einstellen, dann autoklavieren

7.5 Antibiotika

Um eine Selektion von Bakterienstämmen mit Plasmiden oder mit Insertionen von Resistenzmarkern im Genom zu erreichen, wurden in dieser Arbeit die folgenden Antibiotika genutzt.

Tabelle 4: Antibiotika.

Antibiotikum	Abkürzung	Lösungsmittel	<i>E. coli</i> [µg/ml]	Andere [µg/ml]
Tetracyclin	Tc	75 % EtOH	20	1,5
Kanamycin	Km	Reinstwasser	25	25
Ampicillin	Ap	Reinstwasser	200	-
Streptomycin	Sm	Reinstwasser	100	25
Spectinomycin	Sp	Reinstwasser	10	10
Rifampicin	Rif	DMSO	-	20

7.6 Oligonukleotide

Tabelle 5: Oligonukleotidsonden für Northern Blot Detektionen.

Name	Sequenz	Funktion
p-0680a	5'-CGTCGCCGCTGCTGCTACAGGTC-3'	24 nt Sonde zur Detektion von CcsR1 in <i>R. sphaeroides</i>
pCcsR1 (73 nt)	5'-AAGGACGGCGACACCAGGGAGGAGGAGGGCGTCG CCGCTGCTGCTACAGGTCCCGGGAGGAGGTGGGACCTC-3'	83 nt Sonde zur differentiellen Detektion von CcsR1 in <i>R. sphaeroides</i>
pCcsR2 (80 nt)	5'-TGGTGCAGCGACCCAGGGAGGAGGAGGGGGCCG CTGCGGTTCCGATCGGCCAGGGAGGAGGAGGCCGTTTCAAGAGG-3'	80 nt Sonde zur differentiellen Detektion von CcsR2 in <i>R. sphaeroides</i>
pCcsR3 (88 nt)	5'-GGGGGCGACGGCTCCAGGGAGGAGGAGGGAGCCGCGCTTGG TCATCGGCACCCGCGGGAGGAGGTGCAGTGCCGAAGTCCAGTGGGCA-3'	88 nt Sonde zur Detektion von CcsR3 und CcsR4 in <i>R. sphaeroides</i>
p-1543	5'-CAGGGAGGTATGAAGCGGACGAG-3'	Sonde für Rss1543 in <i>R. sphaeroides</i>
p-5S	5'-CTTGAGACGCAGTACCATTG-3'	Sonde für die 5S rRNA in <i>Rhodobacterales</i>
P-5S-R	5'-CTGGCAGCGACCTACTCTCCC-3'	Sonde für die 5S rRNA in <i>Rhizobiales</i> (siehe auch Madhugiri <i>et al.</i> 2012)
pCcsR1Smel	5'-GGACCGCGGGCGTCATAAAGG-3'	22 nt Sonde zur Detektion von CcsR1 in <i>S. meliloti</i>
pCcsR1Pden	5'-GGGAGGATGCCGCTGAACCCG-3'	22 nt Sonde zur Detektion von CcsR1 in <i>P. denitrificans</i>
pCcsR1Sfred	5'-GAATGATTGGCAACCGGAGG-3'	21 nt Sonde zur Detektion von CcsR1 in <i>S. fredii</i>
pCcsR1Rcap	5'-CTCAGGGAGGAGGAGAGAG-3'	19 nt Sonde zur Detektion von CcsR1 in <i>R. capsulatus</i>
pCcsR1Rden	5'-GGGAGGAGGATAGCGCCACCG CCTTGGTACAGATCAACCCAGGGAGGAGG-3'	51 nt Sonde zur Detektion von CcsR1 in <i>R. denitrificans</i>
pCcsR1Dshi	5'-AGGGAGGAGGAAAAGCGCCGCCCATAT TACAGAAAACCCAGGGAGGAGGAG-3'	51 nt Sonde zur Detektion von CcsR1 in <i>D. shibae</i>

Tabelle 6: Primer für Klonierungen.

Name	Sequenz	Funktion
RSP_4352_5'_HindIII_fw	5'-AAGCTTCAGGTCGGGCGAAAGG-3'	Klonierung des 16S rRNA (RSP_4352) Promotors in pPHU235, <i>forward</i> Primer
RSP_4352_5'_BamHI_rv	5'-GGATCCGTTTCTAGGAGCAGACGGCCC-3'	Klonierung des 16S rRNA (RSP_4352) Promotors in pPHU235, <i>reverse</i> Primer
RSP_6037_for_BamHI	5'-GGATCCAACAGCGCGACGGCAAAG-3'	Klonierung von RSP_6037 und CcsR1-4 in pRK4352, <i>forward</i> Primer
CcsR1_for_BamHI	5'-GGATCCTTCTGCGAGGTCCCAC-3'	Klonierung von CcsR1, CcsR1+2, CcsR1-3 and CcsR1-4 in pRK4352/pBBR4352, <i>forward</i> Primer
CcsR1-rev-EcoRI	5'- GAATCAAAGGACGGCGACACCAG -3'	Klonierung von CcsR1 in pRK4352, <i>reverse</i> Primer
CcsR2-for-BamHI	5'-GGATCCTTTCGAACGGCCTCTCC-3'	Klonierung von CcsR2 in pRK4352, <i>forward</i> Primer
CcsR2-rev-EcoRI	5'-GAATTCATCTGGTGCAGCGACCC -3'	Klonierung von CcsR2 und CcsR1+2 in pRK4352 <i>reverse</i> Primer
CcsR3-rev-EcoRI	5'-GAATTCGGGGGCGACGGCTCC-3'	Klonierung von CcsR1 -3 in pRK4352, <i>reverse</i> Primer
CcsR4_rev_XbaI	5'-TCTAGACTCATCGGCCGATGAAT -3'	Klonierung von CcsR1-4 in pBBR4352, <i>reverse</i> Primer
CcsR4_rev_EcoRI	5'-GAATTCCTCATCGGCCGATGAATC-3'	Klonierung von RSP_6037 + CcsR1-4 /CcsR1-4 in pRK4352, <i>reverse</i> Primer
up2591Kpn-f	5'-GGTACCCTGGGCCCGCGATGCATC-3'	Klonierung eines <i>flhR upstream</i> Fragments für einen <i>Knockout</i> , <i>forward</i> Primer
up2591Pst-r	5'-CTGCAGCTCTTCTCCGTTTCCGCGC-3'	Klonierung eines <i>flhR upstream</i> Fragments für einen <i>Knockout</i> , <i>reverse</i> Primer
down2591Pst-f	5'-CTGCAGGGAGCGTCGCGTGACGACAGA-3'	Klonierung eines <i>flhR downstream</i> Fragments für einen <i>Knockout</i> , <i>forward</i> Primer
down2591Hind-r	5'-AAGCTTCATCCGGCTCCCGAGGGGGT-3'	Klonierung eines <i>flhR downstream</i> Fragments für einen <i>Knockout</i> , <i>reverse</i> Primer
RSP_2591_Xba_fw	5'-TCTAGACGGCAACATTTGCCCGCC-3'	Klonierung von einem DNA Fragment aus 166 bp 5'-UTR und den ersten 18 Basen von RSP_2591 int pPHU16S für eine <i>lacZ</i> Fusion, <i>forward</i> Primer
RSP_2591_Pst_rv	5'-CTGCAGTCCCGAAACATGTCCCATC-3'	Klonierung von einem DNA Fragment aus 166 bp 5'-UTR und den ersten 18 Basen von RSP_2591 int pPHU16S für eine <i>lacZ</i> Fusion, <i>reverse</i> Primer
RSP_2876_Xba_fw	5'-TCTAGAACCATTCTGCGTCAC-3'	Klonierung von 204 bp in 5' Richtung des ATG-Codons und den ersten 18 Basen von RSP_2876 in pPHU16S für eine <i>lacZ</i> Fusion, <i>forward</i> Primer
RSP_2876_Pst_rv	5'-CTGCAGCAGGTCGAAATTGT-3'	Klonierung von 204 bp in 5' Richtung des ATG-Codons und den ersten 18 Basen von RSP_2876 in pPHU16S für eine <i>lacZ</i> Fusion, <i>reverse</i> Primer
RSP_2877_Xba_fw	5'-TCTAGATCACCACGGCCTCCA-3'	Klonierung von 233 bp in 5' Richtung des ATG-Codons und den ersten 18 Basen von RSP_2877 in pPHU16S für eine <i>lacZ</i> Fusion, <i>forward</i> Primer
RSP_2877_PstI_rv	5'-CTGCAGGCCTCCGCTCTT-3'	Klonierung von 233 bp in 5' Richtung des ATG-Codons und den ersten 18 Basen von RSP_2877 in pPHU16S für eine <i>lacZ</i> Fusion, <i>reverse</i> Primer
RSP_4050_Xba_fw	5'-TCTAGATCTCGAGAAGCACGCG-3'	Klonierung von 80 bp in 5' Richtung des ATG-Codons und den ersten 69 Basen von RSP_4050 in pPHU16S für eine <i>lacZ</i> Fusion, <i>forward</i> Primer
RSP_4050_Pst_rv	5'-CTGCAGCAGCCATTTCCGCA-3'	Klonierung von 80 bp in 5' Richtung des ATG-Codons und den ersten 69 Basen von RSP_4050 in pPHU16S für eine <i>lacZ</i> Fusion, <i>reverse</i> Primer
RSP_6132_Xba_fw	5'-TCTAGACCGCCATCCGCCCTC-3'	Klonierung von einem DNA Fragment aus 180 bp 5'-UTR und den ersten 18 Basen von RSP_2591 in pPHU16S für eine <i>lacZ</i> Fusion, <i>forward</i> Primer
RSP_6132_Pst_rv	5'-CTGCAGCGGGTCTTCCAGG-3'	Klonierung von einem DNA Fragment aus 180 bp 5'-UTR und den ersten 18 Basen von RSP_2591 in pPHU16S für eine <i>lacZ</i> Fusion, <i>reverse</i> Primer
2591ovfbam1	5'-GGATCCTTGCCCGCGAAAGGAAC-3'	Klonierung von <i>flhR</i> in pRK4352, <i>forward</i> Primer
2591ovRkpn1	5'-GGTACCCCGCGCAAGATCCGCG-3'	Klonierung von <i>flhR</i> in pRK4352, <i>reverse</i> Primer
Mut2591GGA27CCTfw	5'-GGGAGGACCTAGCCCGCGGAAACGGG-3'	Basenaustausch in RSP_2591 (GGA27 zu CCT27) für eine Analyse in pPHU16S, <i>forward</i> Primer
Mut2591GGA27CCTrv	5'-CGGGCTAGGtCCTCCCTGCGCGTCTTC-3'	Basenaustausch in RSP_2591 (GGA27 zu CCT27) für eine Analyse in pPHU16S, <i>reverse</i> Primer

Tabelle 7: Primer zum Erstellen von Templates für die T7 RNA Polymerase

Name	Sequenz	Funktion
T7_CcsR1_f	5'-TAATACGACTCACTATAGAGGTCACCTCCTCCTC-3'	Amplifikation eines DNA Fragments aus T7 Promotor und einem 83 bp Fragment, das CcsR1 codiert, <i>forward</i> Primer
T7_CcsR1_r	5'-AAGGACGGCGACACCAGGG-3'	Amplifikation eines DNA Fragments aus T7 Promotor und einem 83 bp Fragment, das CcsR1 codiert, <i>reverse</i> Primer
T7_PcrZ_f	5'-TAATACGACTCACTATAGGGCACGCCGAGTGTAAC-3'	Amplifikation eines DNA Fragments aus T7 Promotor und einem 135 bp Fragment, das PcrZ codiert, <i>forward</i> Primer
T7_PcrZ_r	5'-GCAGCGAAGGATGCCCGACAG-3'	Amplifikation eines DNA Fragments aus T7 Promotor und einem 135 bp Fragment, das PcrZ codiert, <i>reverse</i> Primer
T7_2591_f	5'-TAATACGACTCACTATAGTTGCCCGCCGAAGGGAAC-3'	Amplifikation eines DNA Fragments aus T7 Promotor und einem 177 bp Fragment, das die vorhergesagte CcsR1 Bindestelle in der <i>flhR</i> 5'UTR codiert, <i>forward</i> Primer
T7_2591_r	5'-TCCCGAAACATGTCCCATC-3'	Amplifikation eines DNA Fragments aus T7 Promotor und einem 177 bp Fragment, das die vorhergesagte CcsR1 Bindestelle in der <i>flhR</i> 5'UTR codiert, <i>reverse</i> Primer
T7_0285_f	5'-TAATACGACTCACTATAGCCCGCTCGACATGGAG-3'	Amplifikation eines DNA Fragments aus T7 Promotor und einem 130 bp Fragment, das die vorhergesagte PcrZ Bindestelle in <i>bchN</i> codiert, <i>forward</i> Primer
T7_0285_r	5'-GATGATGCCGGTCAGTCCGC-3'	Amplifikation eines DNA Fragments aus T7 Promotor und einem 130 bp Fragment, das die vorhergesagte PcrZ Bindestelle in <i>bchN</i> codiert, <i>reverse</i> Primer

Tabelle 8: Primer für die qRT-PCR

Name	Sequenz	Funktion
RSP2576up	5'-GGTCATGGTCGAGATCAAGG-3'	<i>Forward</i> Primer für qRT-PCR RSP_2576
RSP2576down	5'-AGGTTCTGTTCTGGCTGAG-3'	<i>Reverse</i> Primer für qRT-PCR RSP_2576
2580RT-F	5'-GATCCGCGCTCTCCTGC-3'	<i>Forward</i> Primer für qRT-PCR RSP_2580
2580RT-R	5'-CAGGGGCGAATTCGCCG-3'	<i>Reverse</i> Primer für qRT-PCR RSP_2580
2579RT-F	5'-CATCCGCTCGTTCAATGC-3'	<i>Forward</i> Primer für qRT-PCR RSP_2579
2579RT-R	5'-CAGACATGGCACTCCGAC-3'	<i>Reverse</i> Primer für qRT-PCR RSP_2579
2877_real-A	5'-TACGAGCAGGCCAAGGAT-3'	<i>Forward</i> Primer für qRT-PCR RSP_2877
2877_real-B	5'-GGCGGTTGTTCAACAGTT-3'	<i>Reverse</i> Primer für qRT-PCR RSP_2877
RSP4050_real_Up	5'-AAGCTCGACCCGACGAATA-3'	<i>Forward</i> Primer für qRT-PCR RSP_4050
RSP4050_real_Dwn	5'-ATCATGGTGGCCGTCGTGAT-3'	<i>Reverse</i> Primer für qRT-PCR RSP_4050
6132RT-F	5'-GGAAGACCCCGCTTAC-3'	<i>Forward</i> Primer für qRT-PCR RSP_6132
6132RT-R	5'-CTTGCGCTTGCGCAGG-3'	<i>Reverse</i> Primer für qRT-PCR RSP_6132

7.7 Plasmide

Tabelle 9: Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pRK415	<i>broad-host-range cloning vector</i> , Tc ^r	Keen <i>et al.</i> 1988
pRK4352	pRK415 mit dem RSP_4352 16S rRNA Promotor, Tc ^r	Mank <i>et al.</i> 2012
pRCcsR1	pRK4352 mit der sRNA CcsR1 unter Kontrolle des RSP_4352 16S rRNA Promotors, Tc ^r	Diese Arbeit
pRCcsR2	pRK4352 mit der sRNA CcsR2 unter Kontrolle des RSP_4352 16S rRNA Promotors, Tc ^r	Diese Arbeit
pRCcsR1+2	pRK4352 mit den 2 sRNAs CcsR1+2 unter Kontrolle des RSP_4352 16S rRNA Promotors, Tc ^r	Diese Arbeit
pRCcsR1-3	pRK4352 mit den 3 sRNAs CcsR1-3 unter Kontrolle des RSP_4352 16S rRNA Promotors, Tc ^r	Diese Arbeit
pRCcsR1-4	pRK4352 mit den 4 sRNAs CcsR1-4 unter Kontrolle des RSP_4352 16S rRNA Promotors, Tc ^r	Diese Arbeit
pR6037_CcsR1-4	pRK4352 mit RSP_6037 und den 4 sRNAs Ccsr1-4 unter Kontrolle des RSP_4352 16S rRNA Promotors, Tc ^r	Diese Arbeit
pRK_flhR	pRK4352 mit RSP_2591 unter Kontrolle des RSP_4352 16S rRNA Promotors, Tc ^r	Diese Arbeit
pBBR4352	pBBR1MCS2 mit dem RSP_4352 16S rRNA Promotor, Km ^r	Mank <i>et al.</i> 2012; Kovach <i>et al.</i> 1995
pBCcsR1	pBBR4352 mit der sRNA CcsR1 unter Kontrolle des RSP_4352 16S rRNA Promotors, Km ^r	Diese Arbeit
pBCcsR2	pBBR4352 mit der sRNA CcsR2 unter Kontrolle des RSP_4352 16S rRNA Promotors, Km ^r	Diese Arbeit
pBCcsR1+2	pBBR4352 mit den 2 sRNAs CcsR1+2 unter Kontrolle des RSP_4352 16S rRNA Promotors, Km ^r	Diese Arbeit
pBCcsR1-3	pBBR4352 mit den 3 sRNAs CcsR1-3 unter Kontrolle des RSP_4352 16S rRNA Promotors, Km ^r	Diese Arbeit
pBCcsR1-4	pBBR4352 mit den 4 sRNAs CcsR1-4 unter Kontrolle des RSP_4352 16S rRNA Promotors, Km ^r	Diese Arbeit
pPHU281	Tc ^r	Hübner <i>et al.</i> 1993
pUC4K	Km ^r	Vieira <i>et al.</i> 1982
pPHU2591up-KM-down	pPHU281 mit RSP_2591 (<i>flhR</i>) <i>upstream</i> und <i>downstream</i> Fragmenten, die die Km-Resistenz-Kassette aus pUC4K flankieren, Km ^r Tc ^r	Diese Arbeit
pPHU235	<i>broad-host-range lacZ-fusion vector</i> , Tc ^r	Simon <i>et al.</i> 1983
pPHU16S	pPHU235 mit dem RSP_4352 16S rRNA Promotor, Tc ^r	Diese Arbeit
pPHU16S2591	pPHU16S mit den ersten 18bp von RSP_2591 (<i>flhR/afdR</i>) und 166 bp der 5' Region als <i>lacZ</i> Fusion	Diese Arbeit
pPHU16S2591 _{mut3}	pPHU16S2591 mit einer 3 bp Austauschmutation in der CcsR1-4 Bindestelle	Diese Arbeit
pPHU16S2876	pPHU16S mit den letzten 194 bp von RSP_2877, der 10bp UTR zwischen RSP_2877 und RSP_2876 und den ersten 18 bp von RSP_2876 als <i>lacZ</i> Fusion	Diese Arbeit
pPHU16S2877	pPHU16S mit den letzten 205 bp von RSP_2878, der 28 bp UTR zwischen RSP_2878 und RSP_2877 und den ersten 18bp of RSP_2877 (<i>coxL</i>) als <i>lacZ</i> Fusion	Diese Arbeit
pPHU16S4050	pPHU16S mit den ersten 69 bp von RSP_4050 (<i>pdhB</i>) und 80 bp der 5'Region als <i>lacZ</i> Fusion	Diese Arbeit

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pPHU16S6132	pPHU16S mit den ersten 18bp von RSP_6132(pqqA) und 180 bp der 5' Region als <i>lacZ</i> Fusion	Diese Arbeit
pPHU16S <i>bchN</i>	pPHU4352 mit den ersten 60 bp von <i>bchN</i> (RSP_0285) und 105 bp der 5'Region als <i>lacZ</i> Fursion	Mank <i>et al.</i> 2012
pDrive cloning vector	Ap ^r , Km ^r	Quiagen
pJet1.2 cloning vector	Ap ^r	Thermo Scientific

7.8 Bakterienstämme

Bakterienstamm	Beschreibung	Resistenzen	Quelle
<u>E. coli</u>			
<i>E. coli</i> JM109	<i>recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi (lac-proAB)</i>		New England Biolabs
<i>E. coli</i> S17-1	<i>recA pro hsdR RP4-2-Tc::Mu-Km::Tn7</i>		Simon <i>et al.</i> 1983
<i>E. coli</i> N3433	<i>lacZ43(Fs) λ- relA1 spoT1 thiE1</i>		Goldblum & Apirion 1981
<i>E. coli</i> N3431	<i>lacZ43(Fs), λ-, rne-3071(ts), relA1, spoT1, thiE1</i>		Goldblum & Apirion 1981
<u>Rhodobacter</u>			
<i>R. sphaeroides</i> 2.4.1	Wildtyp, Typstamm		Erstbeschrieben in Van Niel 1944
<i>R. sphaeroides</i> 2.4.1 Δ <i>hfq</i>	<i>hfq</i> Deletion in <i>R. sphaeroides</i> 2.4.1, Sp ^r	Spectinomycin	Glaeser <i>et al.</i> 2007
<i>R. sphaeroides</i> 2.4.1 Δ <i>flhR</i>	<i>flhR</i> Deletion in <i>R. sphaeroides</i> 2.4.1, Km ^r	Kanamycin	Diese Arbeit
<i>R. capsulatus</i> SB1003	Wildtyp mit Polysaccharidkapsel		Erstbeschrieben in Van Niel 1944
<i>R. capsulatus</i> 37b4	Wildtyp ohne Kapsel		V Erstbeschrieben in an Niel 1944
<u>Verschiedene Alphaproteobakterien</u>			
<i>Roseobacter denitrificans</i> OCh114	Wildtyp, Typstamm		Shiba <i>et al.</i> 1979
<i>Dinoroseobacter shibae</i> DFL12	Wildtyp, Typstamm, Symbiont von Dinoflagellaten		Biebl <i>et al.</i> 2005
<i>Paracoccus denitrificans</i> PD1222	Genetisch modifizierte Version des Typstamms DSM 413	Rifampicin	De Vries <i>et al.</i> 1989, bereitgestellt von Prof. Dr. R. van Spanning, Vrije Universiteit Amsterdam
<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021	Genetisch modifizierte Version des Wildtyps 2011	Streptomycin	Meade <i>et al.</i> 1982
<i>Sinorhizobium fredii</i> HH103	Wildtyp		Buendía-Clavería <i>et al.</i> 1989

7.9 Bioinformatische Ressourcen

Programm	Adresse	Referenz
<u>RNA Faltungsvorhersagen</u>		
RNAFOLD	http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi	Hofacker 2003; Hofacker <i>et al.</i> 1993
SFOLD	http://sfold.wadsworth.org/cgi-bin/index.pl	Ding <i>et al.</i> 2004
RNACOMPOSER	http://rnacomposer.ibch.poznan.pl/Home	Popoenda <i>et al.</i> 2012
<u>Proteinfaltungsvorhersagen</u>		
PHYRE2	http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index	Kelley & Sternberg 2009
<u>sRNA-mRNA Interaktionsvorhersagen</u>		
INTARNA	http://rna.informatik.uni-freiburg.de:8080/IntaRNA/Input.jsp	Bush <i>et al.</i> 2008
HOMOLOGYINTARNA		Wright 2012
COPRARNA	http://rna.informatik.uni-freiburg.de:8080/CopraRNA/Input.jsp	Wright <i>et al.</i> 2013
RNAPREDATOR	http://rna.tbi.univie.ac.at/RNAPredator2/target_search.cgi	Eggenhofer <i>et al.</i> 2011
<u>Suche nach homologen Aminosäure- oder DNA-Sequenzen</u>		
BLAST	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi	Altschul <i>et al.</i> 1990
<u>Darstellung von Protein und RNA 3D-Strukturen</u>		
UCSF CHIMERA	http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/	Pettersen <i>et al.</i> 2004

8 Literatur

A

Acworth IN, Bogdanov MB, McCabe DR, Bea, MF. 1999. *Estimation of hydroxyl free radical levels in vivo based on liquid chromatography with electrochemical detection.* Methods Enzymol. **300**: 297-313.

Adnan F, Weber L, Klug G. 2015. *The sRNA SorY confers resistance during photooxidative stress by affecting a metabolite transporter in Rhodobacter sphaeroides.* RNA Biol. **12**: 569-577.

Aiba H. 2007. *Mechanism of RNA silencing by Hfq-binding small RNAs.* Curr Opin Microbiol. **10**: 134-139.

Allaman I, Bélanger M, Magistretti PJ. 2015. *Methylglyoxal, the dark side of glycolysis.* Front Neurosci. **9**: 23.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. *Basic local alignment search tool.* J Mol Biol. **215**: 403-410.

Arraiano CM, Mauxion F, Viegas SC, Matos RG, Séraphin B. 2013. *Intracellular ribonucleases involved in transcript processing and decay: precision tools for RNA.* Biochim Biophys Acta. **1829**: 491-513.

B

Barber RD, Donohue TJ. 1998. *Pathways for transcriptional activation of a glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase gene.* J Mol Biol. **280**: 775-784.

Barria C, Malecki M, Arraiano CM. 2013. *Bacterial adaptation to cold.* Microbiology. **159**: 2437-2443.

Barnett JP, Scanlan DJ, Blindauer CA. 2012. *Protein fractionation and detection for metalloproteomics: challenges and approaches.* Anal Bioanal Chem. **402**: 3311-3322.

Bechhofer DH. 2009. *Messenger RNA decay and maturation in Bacillus subtilis.* Prog Mol Biol Transl Sci. **85**: 231-273.

Bennett MR. 2001. *Reactive oxygen species and death: oxidative DNA damage in atherosclerosis.* Circ Res. **88**: 648-650.

Berghoff BA, Glaeser J, Sharma CM, Vogel J, Klug G. 2009. *Photooxidative stress-induced and abundant small RNAs in Rhodobacter sphaeroides.* Mol Microbiol. **74**: 1497-1512.

Berghoff BA, Glaeser J, Sharma CM, Zobawa M, Lottspeich F, Vogel J, Klug G. 2011. *Contribution of Hfq to photooxidative stress resistance and global regulation in Rhodobacter sphaeroides.* Mol Microbiol. **80**: 1479-1495.

Biebl H, Allgaier M, Tindall BJ, Koblizek M, Lünsdorf H, Pukall R, Wagner-Döbler I. 2005. *Dinoroseobacter shibae gen. nov., sp. nov., a new aerobic phototrophic bacterium isolated from dinoflagellates.* Int J Syst Evol Microbiol. **55**: 1089-1096.

Billenkamp F. 2010. *Das sRNA-repeat RSs0680a-d in Rhodobacter sphaeroides und seine Homologe in anderen α -Proteobakterien.* Diplomarbeit. Institut für Mikro- und Molekularbiologie. Justus-Liebig-Universität Gießen.

Birnboim HC, Doly J. 1979. *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.* Nucleic Acids Res. **7**: 1513–1523

Bittner AN. 2008. *Molecular genetic analysis of multiple rpoH and groEL genes in Sinorhizobium meliloti.* PhD Thesis. School of Arts and Sciences. University of Pittsburgh.

Borland CF, McGarvey DJ, Morgan AR, Truscott TG. 1988. *Laser flash photolysis of purpurins: novel potential photosensitizers of interest in photodynamic therapy.* J Photochem Photobiol. **2**: 427-434.

Braatsch S, Moskvina OV, Klug G, Gomelsky M. 2004. *Responses of the Rhodobacter sphaeroides transcriptome to blue light under semiaerobic conditions.* J Bacteriol. **186**: 7726-7735.

Brantl S. 2007. *Regulatory mechanisms employed by cis-encoded antisense RNAs.* Curr. Opin. Microbiol. **10**: 102–109.

Brennan RG, Link TM. 2007. *Hfq structure, function and ligand binding.* Curr. Opin. Microbiol. **10**:125–133.

Briviba K, Klotz LO, Sies H. 1997. *Toxic and signaling effects of photochemically or chemically generated singlet oxygen in biological systems.* Biol Chem. **378**: 1259-1265.

Busch A, Richter AS, Backofen R. 2008. *IntaRNA: efficient prediction of bacterial sRNA targets incorporating target site accessibility and seed regions.* Bioinformatics. **24**: 2849-2856.

Buendía-Clavería AM, Chamber M, Ruiz-Sainz JE. 1989. *A comparative study of the physiological characteristics, plasmid content and symbiotic properties of different Rhizobium fredii in European soils.* System Appl Bacteriol. **17**:155-160.

C

Caldwell DR, Keeney M, Van Soest PJ. 1969. *Effects of carbon dioxide on growth and maltose fermentation by Bacteroides amylophilus.* J Bacteriol. **98**: 668-676.

Campbell EA, Westblade LF, Darst SA. 2008. *Regulation of bacterial RNA polymerase sigma factor activity: a structural perspective.* Curr Opin Microbiol. **11**: 121-127.

Carpenter C, Payne SM. 2014. *Regulation of iron transport systems in Enterobacteriaceae in response to oxygen and iron availability.* J Inorg Biochem. **133**: 110-117.

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

Chamberlin M, Ring J. 1973. *Characterization of T7-specific ribonucleic acid polymerase. 1. General properties of the enzymatic reaction and the template specificity of the enzyme.* J Biol Chem. **248**: 2235-2244.

- Chao Y, Papenfort K, Reinhardt R, Sharma CM, Vogel J.** 2012. *An atlas of Hfq-bound transcripts reveals 3' UTRs as a genomic reservoir of regulatory small RNAs.* EMBO J. **31**:4005–4019.
- Chomczynski P, Sacchi N.** 1987. *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.* Anal. Biochem. **162**: 156–159.
- Choudhary M, Fu YX, Mackenzie C, Kaplan S.** 2004. *DNA sequence duplication in Rhodobacter sphaeroides 2.4.1: evidence of an ancient partnership between chromosomes I and II.* J. Bacteriol. **186**: 2019-2027.
- Church GM, Gilbert W.** 1984. *Genomic sequencing.* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **81**: 1991–1995.
- Cogdell RJ, Howard TD, Bittl R, Schlodder E, Geisenheimer I, Lubitz W.** 2000. *How carotenoids protect bacterial photosynthesis.* Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. **355**: 1345-1349.
- Cole JR, Wang Q, Cardenas E, Fish J, Chai B, Farris RJ, Kulam-Syed-Mohideen AS, McGarrell DM, Marsh T, Garrity GM, Tiedje JM.** 2009. *The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis.* Nucleic Acids Res. **37**: D141-D145.
- Cortez N, Carrillo N, Pasternak C, Balzer A, Klug G.** 1998. *Molecular cloning and expression analysis of the Rhodobacter capsulatus sodB gene, encoding an iron superoxide dismutase.* J Bacteriol. **180**: 5413-5420.
- Crooks GE, Hon G, Chandonia JM, Brenner SE.** 2004. *WebLogo: A sequence logo generator.* Genome Research. **14**: 1188-1190.
- Cronan JR, Vagelos PR.** 1972. *Metabolism and function of the membrane phospholipids of Escherichia coli.* Biochim Biophys Acta. **265**: 25-60.
- D**
- Darfeuille F, Unoson C, Vogel J, Wagner EG.** 2007 *An antisense RNA inhibits translation by competing with standby ribosomes.* Mol Cell. **26**:381-392.
- Davies KJ.** 1995. *Oxidative stress: the paradox of aerobic life.* Biochem Soc Symp. **61**: 1-31.
- Davies MJ.** 2004. *Reactive species formed on proteins exposed to singlet oxygen.* Photochem Photobiol Sci. **3**: 17-25.
- Davies MJ.** 2005. *The oxidative environment and protein damage.* Biochim Biophys Acta. **1703**: 93-109.
- De Kok A, Hengeveld AF, Martin A, Westphal AH.** 1998. *The pyruvate dehydrogenase multi-enzyme complex from Gram-negative bacteria.* Biochim Biophys Acta. **1385**: 353-366.
- De Lay N, Gottesman S.** 2012. *A complex network of small non-coding RNAs regulate motility in Escherichia coli.* Mol Microbiol. **86**: 524-538.

-
- De Lay N, Schu DJ, Gottesman S.** 2013. *Bacterial small RNA-based negative regulation: Hfq and its accomplices.* J Biol Chem. **288**: 7996-8003.
- De Vries GE, Harms N, Hoogendijk J, Stouthamer AH.** 1989. *Isolation and characterization of Paracoccus denitrificans mutants with increased conjugation frequencies and pleiotropic loss of a (nGATCn) DNA-modifying property.* Arch. Microbiol. **152**: 52–57.
- Deponte M.** 2013. *Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes.* Biochim Biophys Acta. **1830**: 3217-3266.
- Desnoyers G, Massé E.** 2012. *Noncanonical repression of translation initiation through small RNA recruitment of the RNA chaperone Hfq.* Genes Dev. **26**: 726-739.
- Ding Y, Chan CY, Lawrence CE.** 2004. *Sfold web server for statistical folding and rational design of nucleic acids.* Nucleic Acids Res. **32**:W135-141.
- Domonkos I, Kis M, Gombos Z, Ughy B.** 2013. *Carotenoids, versatile components of oxygenic photosynthesis.* Prog Lipid Res. **52**: 539-561
- Dubbs JM, Mongkolsuk S.** 2012. *Peroxide-sensing transcriptional regulators in bacteria.* J Bacteriol. **194**: 5495-5503.
- Dühring U, Axmann IM, Hess WR, Wilde A.** 2006. *An internal antisense RNA regulates expression of the photosynthesis gene isiA.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA **103**: 7054–7058.
- E**
- Echave P, Tamarit J, Cabisco E, Ros J.** 2003. *Novel antioxidant role of alcohol dehydrogenase E from Escherichia coli.* J Biol Chem. **278**: 30193-30198.
- Edgar R.** 2002. *Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository.* Nucleic Acids Research. **30**:207–210.
- Eggenhofer F, Tafer H, Stadler PF, Hofacker IL.** 2011. *RNApredator: fast accessibility-based prediction of sRNA targets.* Nucleic Acids Research **39**: W149.
- Elsen S, Swem LR, Swem DL, Bauer CE.** 2004. *RegB/RegA, a highly conserved redox-responding global two-component regulatory system.* Microbiol Mol Biol Rev. **68**: 263-279.
- Emmerich R, Hennecke H, Fischer HM.** 2000. *Evidence for a functional similarity between the two-component regulatory systems RegSR, ActSR, and RegBA (PrrBA) in alpha-Proteobacteria.* Arch Microbiol. **174**: 307-313.
- Eraso JM, Kaplan S.** 2009. *Half-Site DNA sequence and spacing length contributions to PrrA binding to PrrA site 2 of RSP3361 in Rhodobacter sphaeroides 2.4.1.* J Bacteriol. **191**: 4353-4364.
- F**
- Fang FC.** 2004. *Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies.* Nat Rev Microbiol. **2**: 820-832.
-

Fechter P, Caldelari I, Lioliou E, Romby P. 2014 *Novel aspects of RNA regulation in Staphylococcus aureus.* FEBS Lett. **588**: 2523-2529.

Fillat MF. 2014. *The FUR (ferric uptake regulator) superfamily: diversity and versatility of key transcriptional regulators.* Arch Biochem Biophys. **546**: 41-52.

Finan TM, O'Brian MR, Layzell DB, Vessey JK, Newton W. 2001. *Nitrogen Fixation: Global Perspectives.* Proceedings of the 13th International Congress on Nitrogen Fixation, Hamilton, Ontario, Canada

Fineran PC, Blower TR, Foulds IJ, Humphreys DP, Lilley KS, Salmond GPC. 2009. *The phage abortive infection system, ToxIN, functions as a protein-RNA toxin-antitoxin pair.* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **106**:894–899.

Fozo EM, Hemm MR, Storz G. 2008a. *Small toxic proteins and the antisense RNAs that repress them.* Microbiol. Mol. Biol. Rev. **72**: 579–589.

Fozo EM, Kawano M, Fontaine F, Kaya Y, Mendieta KS, Jones KL, Ocampo A, Rudd KE, Storz G. 2008b. *Repression of small toxic protein synthesis by the Sib and OhsC small RNAs.* Mol. Microbiol. **70**:1076–1093.

Frühwirth S, Teich K, Klug G. 2012. *Effects of the cryptochrome CryB from Rhodospirillum rubrum on global gene expression in the dark or blue light or in the presence of singlet oxygen.* PLoS One. **7**: e33791.

G

Ge X, Wang W, Du B, Wang J, Xiong X, Zhang W. 2015. *Multiple pqqA genes respond differently to environment and one contributes dominantly to pyrroloquinoline quinone synthesis.* J Basic Microbiol. **55**: 312-323.

Gerdes K, Wagner EGH. 2007. *RNA antitoxins.* Curr. Opin. Microbiol. **10**: 117–124.

Glaeser J, Nuss AM, Berghoff BA, Klug G. 2011. *Singlet oxygen stress in microorganisms.* Adv Microb Physiol. **58**:141-173.

Glaeser J, Zobawa M, Lottspeich F, Klug G. 2007. *Protein synthesis patterns reveal a complex regulatory response to singlet oxygen in Rhodospirillum rubrum.* J. Proteome Res. **6**:2460–2471.

Göpel Y, Papenfort K, Reichenbach B, Vogel J, Görke B. 2013. *Targeted decay of a regulatory small RNA by an adaptor protein for RNase E and counteraction by an anti-adaptor RNA.* Genes Dev. **27**: 552-564.

Goldblum K, Apirion D. 1981. *Inactivation of the ribonucleic acid-processing enzyme ribonuclease E blocks cell division.* J Bacteriol. **146**: 128–132.

Górna MW, Carpousis AJ, Luisi BF. 2012. *From conformational chaos to robust regulation: the structure and function of the multi-enzyme RNA degradosome.* Q Rev Biophys. **45**: 105-145.

Gottesman S. 2005. *Micros for microbes: Non-coding regulatory RNAs in bacteria.* Trends Genet. **21**: 399–404.

- Gracy RW, Talent JM, Kong Y, Conrad CC** 1999. *Reactive oxygen species: the unavoidable environmental insult?* Mutat Res. **428**: 17-22.
- Grandt JK**. 2012. *Die Rolle der sRNAs Rcs0680a-d in Rhodobacter capsulatus in Analogie zur Rolle der sRNAs RSs0680a-d in Rhodobacter sphaeroides 2.4.1*. Bachelorthesis. Institut für Mikro- und Molekularbiologie. Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Gregor J, Klug G**. 1999. *Regulation of bacterial photosynthesis genes by oxygen and light*. FEMS Microbiol Lett. **179**: 1-9.
- Griffiths M, Siström WR, Cohenbazire G, Stanier RY, Calvin M**. 1955. *Function of carotenoids in photosynthesis*. Nature. **176**: 1211-1215.
- Grundy FJ, Henkin TM**. 2006. *From ribosome to riboswitch: control of gene expression in bacteria by RNA structural rearrangements*. Crit Rev Biochem Mol Biol. **41**: 329-338.
- Guariglia-Oropeza V, Orsi RH, Yu H, Boor KJ, Wiedmann M, Guldemann C**. 2014. *Regulatory network features in Listeria monocytogenes-changing the way we talk*. Front Cell Infect Microbiol. **4**:14.
- Guillier M, Gottesman S**. 2006. *Remodelling of the Escherichia coli outer membrane by two small regulatory RNAs*. Mol. Microbiol. **59**:231–247.
- Guillier M, Gottesman S**. 2008. *The 5' end of two redundant sRNAs is involved in the regulation of multiple targets, including their own regulator*. Nucleic Acids Res. **36**:6781–6794.
- Gutteridge JM**. 1994. *Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection*. Chem Biol Interact. **91**: 133-140.
- H**
- Halliwell B, Aruoma OI**. 1991. *DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems*. FEBS Lett. **281**: 9-19.
- Hammer BK, Bassler BL**. 2007. *Regulatory small RNAs circumvent the conventional quorum sensing pathway in pandemic Vibrio cholerae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **104**: 11145–11149.
- Harms N, Reijnders WN, Koning S, van Spanning RJ**. 2001. *Two-component system that regulates methanol and formaldehyde oxidation in Paracoccus denitrificans*. J Bacteriol. **183**:664-670.
- Hassett DJ, Cohen MS**. 1989. *Bacterial adaptation to oxidative stress: implications for pathogenesis and interaction with phagocytic cells*. FASEB J. **3**: 2574-2582.
- Helftenbein K**. 2013. *Die Rolle der sRNAs CcsR1&2 in Ensifer (Sinorhizobium) fredii und CcsR1-3 in Ensifer meliloti in Analogie zur Rolle der sRNAs CcsR1-4-d in Rhodobacter sphaeroides 2.4.1*. Bachelorthesis. Institut für Mikro- und Molekularbiologie. Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Helmann JD, Chamberlin MJ**. 1988. *Structure and function of bacterial sigma factors*. Annu Rev Biochem. **57**: 839-872.

Hickman JW, Witthuhn VC Jr, Dominguez M, Donohue TJ. 2004. *Positive and negative transcriptional regulators of glutathione-dependent formaldehyde metabolism.* J Bacteriol. **23**: 7914-7925.

Hofacker IL. 2003. *Vienna RNA secondary structure server.* Nucleic Acids Research **31**:3429–3431.

Hofacker IL, Fontana W; Stadler PF; Bonhoeffer LS; Tacker M; Schuster P. 1993. *Fast Folding and Comparison of RNA Secondary Structures* (Santa Fe Institute).

Holmqvist E, Reimegård J, Sterk M, Grantcharova N, Römling U, Wagner EGH. 2010. *Two antisense RNAs target the transcriptional regulator CsgD to inhibit curli synthesis.* EMBO J. **29**:1840–1850.

Hübner P, Masepohl B, Klipp W, Bickle TA. 1993. *nif gene expression studies in Rhodobacter capsulatus: ntrC-independent repression by high ammonium concentrations.* Mol Microbiol. **10**:123–132.

I

Imam S, Noguera DR, Donohue TJ. 2014. *Global analysis of photosynthesis transcriptional regulatory networks.* PLoS Genet. **10**: e1004837.

Imlay JA. 2003. *Pathways of oxidative damage.* Annu Rev Microbiol. **57**: 395-418.

J

Janzon L, Löfdahl S, Arvidson S. 1986. *Evidence for a coordinate transcriptional control of alpha-toxin and protein a synthesis in Staphylococcus aureus.* FEMS Microbiology Letters. **33**:193–198.

Joshi HM, Tabita FR. 1996. *A global two component signal transduction system that integrates the control of photosynthesis, carbon dioxide assimilation, and nitrogen fixation.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**: 14515–14520.

K

Kazmierczak MJ, Wiedmann M, Boor KJ. 2005. *Alternative sigma factors and their roles in bacterial virulence.* Microbiol Mol Biol Rev. **69**: 527-543.

Kawano M, Reynolds AA, Miranda-Rios J, Storz G. 2005. *Detection of 5'- and 3'-UTR-derived small RNAs and cis-encoded antisense RNAs in Escherichia coli.* Nucleic Acids Res. **33**:1040–1050.

Keen NT, Tamaki S, Kobayashi D, Trollinger D. 1988. *Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in gram-negative bacteria.* Gene. **70**: 191–197.

Kehoe DM. 2010. *Chromatic adaptation and the evolution of light color sensing in cyanobacteria.* Proc Natl Acad Sci U S A. **107**: 9029-9030.

Keppen OI, Krasil'nikova EN, Lebedeva NV, Ivanovskii RN. 2013. *Comparative study of metabolism of the purple photosynthetic bacteria grown in the light and in the dark under anaerobic and aerobic conditions.* Mikrobiologija. **82**: 534-41.

Kelley LA, Sternberg MJ. 2009. *Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server.* Nat Protoc. **4**: 363-371.

Keweloh H, Diefenbach R, Rehm HJ. 1991. *Increase of phenol tolerance of Escherichia coli by alterations of the fatty acid composition of the membrane lipids.* Arch Microbiol. **157**: 49-53.

Kim SJ, Park SJ, Oh YS, Lee SA, Shin KS, Roh DH, Rhee SK. 2012. *Shewanella arctica* sp. nov., an iron-reducing bacterium isolated from Arctic marine sediment. Int J Syst Evol Microbiol. **62**: 1128-1133.

King J, Haase-Pettingell C, Robinson AS, Speed M, Mitraki A. 1996. *Thermolabile folding intermediates: inclusion body precursors and chaperonin substrates.* FASEB J. **10**: 57-66.

Klebba PE, Charbit A, Xiao Q, Jiang X, Newton SM. 2012. *Mechanisms of iron and haem transport by Listeria monocytogenes.* Mol Membr Biol. **29**: 69-86.

Klier A, Msadek T, Rapoport G. 1992. *Positive regulation in the gram-positive bacterium: Bacillus subtilis.* Annu Rev Microbiol. **46**: 429-459.

Klug G. 1993. *The role of mRNA degradation in the regulated expression of bacterial photosynthesis genes.* Mol Microbiol. **9**: 1-7.

Klug G, Jäger A, Heck C, Rauhut R. 1997. *Identification, sequence analysis, and expression of the lepB gene for a leader peptidase in Rhodobacter capsulatus.* Mol. Gen. Genet. **253**: 666–673.

Koga Y. 2012. *Thermal adaptation of the archaeal and bacterial lipid membranes.* Archaea. **2012**: 789652.

Koháryová M, Kolárová M. 2008. *Oxidative stress and thioredoxin system.* Gen Physiol Biophys. **27**: 71-84.

Kontur WS, Schackwitz WS, Ivanova N, Martin J, Labutti K, Deshpande S, Tice HN, Pennacchio C, Sodergren E, Weinstock GM, Noguera DR, Donohue TJ. 2012. *Revised sequence and annotation of the Rhodobacter sphaeroides 2.4.1 genome.* J Bacteriol. **194**: 7016-7017.

Kovach ME, Elzer PH, Hill DS, Robertson GT, Farris MA, Roop RM, Peterson KM. 1995. *Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes.* Gene. **166**: 175–176.

Kumar S, Engelberg-Kulka H. 2014. *Quorum sensing peptides mediating interspecies bacterial cell death as a novel class of antimicrobial agents.* Curr Opin Microbiol. **21C**: 22-27.

L

Laguri C, Phillips-Jones MK, Williamson MP. 2003. *Solution structure and DNA binding of the effector domain from the global regulator PrrA (RegA) from Rhodobacter sphaeroides: insights into DNA binding specificity.* Nucleic Acids Res. **31**: 6778-6787.

Lalaouna D, Simoneau-Roy M, Lafontaine D, Massé E. 2013. *Regulatory RNAs and target mRNA decay in prokaryotes.* Biochim Biophys Acta. **1829**: 742-747.

- Landini P, Egli T, Wolf J, Lacour S.** 2014. *sigmaS*, a major player in the response to environmental stresses in *Escherichia coli*: role, regulation and mechanisms of promoter recognition. *Environ Microbiol Rep.* **6**: 1-13.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG.** 2007. *ClustalW and ClustalX version 2*. *Bioinformatics.* **23**: 2947-2948.
- Laskowska E, Matuszewska E, Kuczyńska-Wiśnik D.** 2010. *Small heat shock proteins and protein-misfolding diseases*. *Curr Pharm Biotechnol.* **11**: 146-157.
- Lee YN, Colston MJ.** 1985. *Measurement of ATP generation and decay in Mycobacterium leprae in vitro*. *J Gen Microbiol.* **131**: 3331-3337.
- Lenz DH, Miller MB, Zhu J, Kulkarni RV, Bassler BL.** 2005. *CsrA and three redundant small RNAs regulate quorum sensing in Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* **58**:1186-1202.
- Li K, Hein S, Zou W, Klug G.** 2004. *The glutathione-glutaredoxin system in Rhodobacter capsulatus: part of a complex regulatory network controlling defense against oxidative stress*. *J Bacteriol.* **186**: 6800-6808.
- Li K, Pasternak C, Klug G.** 2003. *Expression of the trxA gene for thioredoxin 1 in Rhodobacter sphaeroides during oxidative stress*. *Arch Microbiol.* **180**: 484-489.
- Liu MY, Gui G, Wei B, Preston JF 3rd, Oakford L, Yüksel U, Giedroc DP, 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**: 17502-17510.
- Lourenço RF, Gomes SL.** 2009. *The transcriptional response to cadmium, organic hydroperoxide, singlet oxygen and UV-A mediated by the sigmaE-ChrR system in Caulobacter crescentus*. *Mol Microbiol.* **72**: 1159-1170.
- Lowery CA, Dickerson TJ, Janda KD.** 2008. *Interspecies and interkingdom communication mediated by bacterial quorum sensing*. *Chem Soc Rev.* **37**: 1337-1346.
- Lu J, Holmgren A.** 2013. *The thioredoxin antioxidant system*. *Free Radic Biol Med.* **66**: 75-87.
- Lushchak VI.** 2001. *Oxidative stress and mechanisms of protection against it in bacteria*. *Biochemistry (Mosc).* **66**: 476-489.
- Lutz M, Kleo J.** 1976. *Resonance Raman scattering of bacteriochlorophyll, bacteriopheophytin and spheroidene in reaction centers of Rhodospseudomonas spheroides*. *Biochem Biophys Res Commun.* **69**: 711-717.

M

- Madhugiri R, Pessi G, Voss B, Hahn J, Sharma CM, Reinhardt R, Vogel J, Hess WR, Fischer HM, Evguenieva-Hackenberg E.** 2012. *Small RNAs of the Bradyrhizobium/Rhodospseudomonas lineage and their analysis*. *RNA Biol.* **9**: 47-58.

- Maki K, Uno K, Morita T, Aiba H.** 2008. *RNA, but not protein partners, is directly responsible for translational silencing by a bacterial Hfq-binding small RNA.* . Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **105**: 10332–10337.
- Mandin P, Guillier M.** 2013. *Expanding control in bacteria: interplay between small RNAs and transcriptional regulators to control gene expression.* Curr Opin Microbiol. **16**: 125-132.
- Mank NN, Berghoff BA, Hermanns YN, Klug G.** 2012. *Regulation of bacterial photosynthesis genes by the small noncoding RNA PcrZ.* Proc Natl Acad Sci U S A. **109**: 16306-16311.
- Mascher T.** 2013. *Signaling diversity and evolution of extracytoplasmic function (ECF) σ factors.* Curr Opin Microbiol. **16**: 148-155.
- Meade HM, Long SR, Ruvkun GB, Brown SE, Ausubel FM.** 1982. *Physical and genetic characterization of symbiotic and auxotrophic mutants of Rhizobium meliloti induced by transposon Tn5 mutagenesis.* J Bacteriol. **149**: 114-122.
- Messner KR, Imlay JA.** 1999. *The identification of primary sites of superoxide and hydrogen peroxide formation in the aerobic respiratory chain and sulfite reductase complex of Escherichia coli.* J Biol Chem. **274**:10119-10128.
- Miajlovic H, Smith SG.** 2014. *Bacterial self-defence: how Escherichia coli evades serum killing.* FEMS Microbiol Lett. **354**: 1-9.
- Miller JH.** 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y..
- Mitsch MJ, Cowie A, Finan TM.** 2007. *Malic enzyme cofactor and domain requirements for symbiotic N₂ fixation by Sinorhizobium meliloti.* J Bacteriol. **189**: 160-168.
- Morett E, Segovia L.** 1993. *The sigma 54 bacterial enhancer-binding protein family: mechanism of action and phylogenetic relationship of their functional domains.* J Bacteriol. **175**: 6067-6074.
- Miyakoshi M, Chao Y, Vogel J.** 2015. *Regulatory small RNAs from the 3' regions of bacterial mRNAs.* Curr Opin Microbiol. **24**: 132-139.
- N**
- Nam TW, Ziegelhoffer EC, Lemke RA, Donohue TJ.** 2013. *Proteins needed to activate a transcriptional response to the reactive oxygen species singlet oxygen.* MBio. **4**: e00541-12.
- Nakano MM, Hulett FM.** 1997. *Adaptation of Bacillus subtilis to oxygen limitation.* FEMS Microbiol Lett. **157**: 1-7.
- Narberhaus F, Waldminghaus T, Chowdhury S.** 2006. *RNA thermometers.* FEMS Microbiol Rev. **30**: 3-16.
- Nies DH.** 1992. *Resistance to cadmium, cobalt, zinc, and nickel in microbes.* Plasmid. **27**: 17-28.
- Nunome K, Miyazaki S, Nakano M, Iguchi-Ariga S, Ariga H.** 2008. *Pyroloquinoline quinone prevents oxidative stress-induced neuronal death probably through changes in oxidative status of DJ-1.* Biol Pharm Bull. **31**: 1321-1326.

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

Nuss AM, Glaeser J, 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**: 220-230.

Nuss AM, Glaeser J, Berghoff BA, Klug G. 2010. *Overlapping alternative sigma factor regulons in the response to singlet oxygen in Rhodobacter sphaeroides.* J Bacteriol. **192**: 2613-2623.

O

Oh JI, Kaplan S. 2001. *Generalized approach to the regulation and integration of gene expression.* Mol Microbiol **39**: 1116-1123.

Oh JI, Ko IJ, Kaplan S. 2001. *The default state of the membrane-localized histidine kinase PrrB of Rhodobacter sphaeroides 2.4.1 is in the kinase-positive mode.* J Bacteriol. **183**: 6807-6814.

Opdyke JA, Kang JG, Storz G. 2004. *GadY, a small RNA regulator of the acid response in Escherichia coli.* J. Bacteriol. **186**: 6698–6705.

Oren A. 2013. *Salinibacter: an extremely halophilic bacterium with archaeal properties.* FEMS Microbiol Lett. **342**: 1-9.

P

Pain A, Ott A, Amine H, Rochat T, Bouloc P, Gautheret D. 2015. *An assessment of bacterial small RNA target prediction programs.* RNA Biol. **12**: 509-513.

Pasternak C, Assemat K, Breton AM, Clement-Metral JD, Klug G. 1996. *Expression of the thioredoxin gene (trxA) in Rhodobacter sphaeroides Y is regulated by oxygen.* Mol Gen Genet. **250**: 189-196.

Pasternak C, Haberzettl K, Klug G. 1999. *Thioredoxin is involved in oxygen-regulated formation of the photosynthetic apparatus of Rhodobacter sphaeroides.* J Bacteriol. **181**: 100-106.

Pátek M, Nešvera J. 2011. *Sigma factors and promoters in Corynebacterium glutamicum.* J Biotechnol. **154**: 101-113.

Patel HK, Suárez-Moreno ZR, Degrassi G, Subramoni S, González JF, Venturi V. 2013. *Bacterial LuxR solos have evolved to respond to different molecules including signals from plants.* Front Plant Sci. **4**: 447.

Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE. 2004. *UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis.* J Comput Chem. **25**: 1605-1612.

Peuser V, Remes B, Klug G. 2012. *Role of the Irr protein in the regulation of iron metabolism in Rhodobacter sphaeroides.* PLoS One. **7**: e42231.

Popenda M, Szachniuk M, Antczak M, Purzycka KJ, Lukasiak P, Bartol N, Blazewicz J, Adamiak RW. 2012. *Automated 3D structure composition for large RNAs*. *Nucleic Acids Res.* **40**: e112.

Potvin E, Sanschagrín F, Levesque RC. 2008. *Sigma factors in Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Rev.* **32**: 38-55.

Prévost K, Salvail H, Desnoyers G, Jacques JF, Phaneuf E, Massé E. 2007. *The small RNA RyhB activates the translation of shiA mRNA encoding a permease of shikimate, a compound involved in siderophore synthesis*. *Mol. Microbiol.* **64**: 1260–1273.

Prinz WA, Aslund F, Holmgren A, Beckwith J. 1997. *The role of the thioredoxin and glutaredoxin pathways in reducing protein disulfide bonds in the Escherichia coli cytoplasm*. *J Biol Chem.* **272**: 15661-15667

Q

Qian Y, Tabita FR. 1996. *A global signal transduction system regulates aerobic and anaerobic CO₂ fixation in Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bacteriol.* **178**: 12–18.

R

Rauhut R, Klug G. 1999. *mRNA degradation in bacteria*. *FEMS Microbiol Rev.* **23**: 353-70.

S

Saramago M, Bárria C, Dos Santos RF, Silva IJ, Pobre V, Domingues S, Andrade JM, Viegas SC, Arraiano CM. 2014. *The role of RNases in the regulation of small RNAs*. *Curr Opin Microbiol.* **18**: 105-115.

Schneider TD, Stephens RM. 1990. *Sequence Logos: A New Way to Display Consensus Sequences*. *Nucleic Acids Res.* **18**: 6097-6100.

Schumann W. 2012. *Thermosensor systems in eubacteria*. *Adv Exp Med Biol.* **739**: 1-16.

Sevin EW, Barloy-Hubler F. 2007. *RASTA-Bacteria: a web-based tool for identifying toxin-antitoxin loci in prokaryotes*. *Genome Biology.* **8**: R155.

Sharma CM, Darfeuille F, Plantinga TH, Vogel J. 2007. *A small RNA regulates multiple ABC transporter mRNAs by targeting C/A-rich elements inside and upstream of ribosome-binding sites*. *Genes Dev.* **21**:2804-2817.

Shiba T, Simidu U, Taga N. 1979. *Distribution of aerobic bacteria which contain bacteriochlorophyll α* . *Appl Environ Microbiol.* **38**: 43–45.

Simon R, Priefer U, Pühler A. 1983. *A Broad Host Range Mobilization System for In Vivo Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria*. *Nat Biotechnol* **1**: 784–791.

Sinensky M. 1974. *Homeoviscous adaptation: a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in Escherichia coli*. *Proc. Natl Acad Sci USA.* **71**: 522-525.

Sleator RD, Hill C. 2002. *Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence.* FEMS Microbiol Rev. **26**: 49-71.

Smith C, Heyne S, Richter AS, Will S, Backofen R. 2010. *Freiburg RNA Tools: a web server integrating INTARNA, EXPARNA and LOCARNA.* Nucleic Acids Res. **38**: W373-W377.

Smyth GK, Speed T. 2003. *Normalization of cDNA microarray data.* Methods. **31**:265–273.

Stams AJ, Oude Elferink SJ, Westermann P. 2003. *Metabolic interactions between methanogenic consortia and anaerobic respiring bacteria.* Adv Biochem Eng Biotechnol. **81**: 31-56.

Steffen W, Steuber J. 2013. *Cation transport by the respiratory NADH:quinone oxidoreductase (complex I): facts and hypotheses.* Biochem Soc Trans. **41**: 1280-1287.

Stres B, Sul WJ, Murovec B, Tiedje JM. 2013. *Recently deglaciated high-altitude soils of the Himalaya: diverse environments, heterogenous bacterial communities and long-range dust inputs from the upper troposphere.* Plos One. **8**: e76440.

Storz G, Imlay JA. 1999. *Oxidative stress.* Curr Opin Microbiol. **2**: 188-194.

Storz G, Vogel J, Wassarman KM. 2011. *Regulation by small RNAs in bacteria: expanding frontiers.* Mol Cell. **43**: 880-891.

Suihko ML, Partanen L, Mattila-Sandholm T, Raaska L. 2005. *Occurrence and molecular characterization of cultivable mesophilic and thermophilic obligate anaerobic bacteria isolated from paper mills.* Syst Appl Microbiol. **28**: 555-561.

T

Tabor S, Richardson CC. 1985. *A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes.* Proc Natl Acad Sci U S A. **82**: 1074-1078.

Taabazuig CY, Hangasky JA, Knapp MJ. 2014. *Oxygen sensing strategies in mammals and bacteria.* J Inorg Biochem. **133**: 63-72

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. *MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods.* Mol Biol Evol. **28**: 2731-2739.

Truscott KN, Bezawork-Geleta A, Dougan DA. 2011. *Unfolded protein responses in bacteria and mitochondria: a central role for the ClpXP machine.* IUBMB Life. **63**: 955-963.

Tsai CH, Liao R, Chou B, Palumbo M, Contreras LM. 2015. *Genome-wide analyses in bacteria show small-RNA enrichment for long and conserved intergenic regions.* J Bacteriol. **197**: 40-50.

Typas A, Becker G, Hengge R. 2007. *The molecular basis of selective promoter activation by the sigmaS subunit of RNA polymerase.* Mol Microbiol. **63**: 1296-1306.

V

Valentin-Hansen P, Eriksen M, Udesen C. 2004. *The bacterial Sm-like protein Hfq: a key player in RNA transactions.* Mol. Microbiol. **51**:1525–1533.

van Niel CB. 1944. *THE CULTURE, GENERAL PHYSIOLOGY, MORPHOLOGY, AND CLASSIFICATION OF THE NON-SULFUR PURPLE AND BROWN BACTERIA.* Bacteriol Rev **8**:1–118.

Van Puyvelde S, Vanderleyden J, De Keersmaecker SC. 2015. *Experimental approaches to identify small RNAs and their diverse roles in bacteria - what we have learnt in one decade of MicA research.* Microbiologyopen. [elektronisch verfügbar vor Druck Mai 2015]

Vecerek B, Moll I, Bläsi U. 2007. *Control of Fur synthesis by the non-coding RNA RyhB and iron-responsive decoding.* EMBO J. **26**:965-975.

Vieira J, Messing J. 1982. *The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers.* Gene. **19**: 259-68.

Vogel J, Papenfort K. 2006. *Small non-coding RNAs and the bacterial outer membrane.* Curr Opin Microbiol. **9**: 605-611.

W

Wagner EGH, 2013. *Cycling of RNAs on Hfq.* RNA Biol. **10**:619-626

Wagner EGH, Altuvia S, and Romby P. 2002. *Antisense RNAs in bacteria and their genetic elements.* Adv. Genet. **46**: 361–398.

Walter S, Buchner J. 2002. *Molecular chaperones--cellular machines for protein folding.* Angew Chem Int Ed Engl. **41**: 1098-1113.

Wassarman KM. 2007. *6S RNA: a regulator of transcription.* Mol Microbiol. **65**: 1425-1431.

Waters LS, Storz G. 2009. *Regulatory RNAs in bacteria.* Cell. **136**: 615-628.

Wider de Xifra EA, Sandy JD, Davies RC, Neuberger A. 1976. *Control of 5-aminolaevulinic synthetase activity in Rhodopseudomonas spheroides.* Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. **273**: 79-98.

Wilderman PJ, Sowa NA, FitzGerald DJ, FitzGerald PC, Gottesman S, Ochsner UA, Vasil ML. 2004. *Identification of tandem duplicate regulatory small RNAs in Pseudomonas aeruginosa involved in iron homeostasis.* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **101**:9792–9797.

Wilson SM, Gleisten MP, Donohue TJ. 2008. *Identification of proteins involved in formaldehyde metabolism by Rhodobacter sphaeroides.* Microbiology. **154**: 296-305.

Winnepenninckx B, Backeljau T, De Wachter R. 1993. *Extraction of high molecular weight DNA from molluscs.* Trends Genet. **9**: 407.

Wright PR. 2012. *hIntaRNA - Comparative prediction of sRNA targets in prokaryotes.* Diplomarbeit. Institut für Informatik. Albert-Ludwigs-Universität Freiburg.

Wright PR, Richter AS, Papenfort K, Mann M, Vogel J, Hess WR, Backofen R, Georg J. 2013. *Comparative genomics boosts target prediction for bacterial small RNAs.* Proc Natl Acad Sci U S A. **110**: E3487-3496.

Z

Zadeh JN, Steenberg CD; Bois, JS; Wolfe BR; Pierce MB; Khan AR; Dirks RM; Pierce NA. 2011. *NUPACK: Analysis and design of nucleic acid systems.* J Comput Chem. **32**:170–173.

Zeilstra-Ryalls J, Gomelsky M, Eraso JM, Yeliseev A, O'Gara J, Kaplan S. 1998. *Control of photosystem formation in Rhodobacter sphaeroides.* J Bacteriol. **180**: 2801-2809.

Zeller T, Klug G. 2004. *Detoxification of hydrogen peroxide and expression of catalase genes in Rhodobacter.* Microbiology. **150**: 3451-3462.

Zhang D, Yan S, Song W. 2014. *Photochemically Induced Formation of Reactive Oxygen Species (ROS) from Effluent Organic Matter.* Environ Sci Technol. **48**: 12645-12653.

Zheng M, Storz G. 2000. *Redox sensing by prokaryotic transcription factors.* Biochem Pharmacol **59**: 1-6.

Ziegelhoffer EC, Donohue TJ. 2009. *Bacterial responses to photo-oxidative Stress.* Nature Rev Mikrobiol. **7**: 856-863.

9 Anhang

9.1 Abbildungen

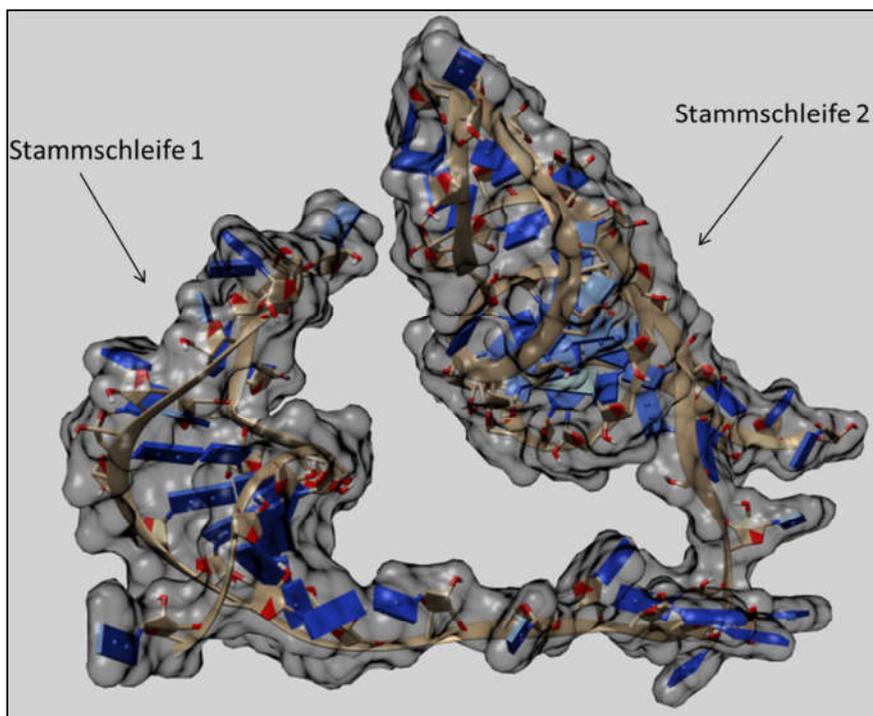


Abbildung A1: 3D-Struktur von CcsR1 aus *R. sphaeroides* 2.4.1. Dargestellt ist ein mit Hilfe von RNACOMPOSER erstelltes 3D-Modell für CcsR1 aus *R. sphaeroides* 2.4.1. Die charakteristischen Stamm Schleifen sind durch Pfeile markiert.

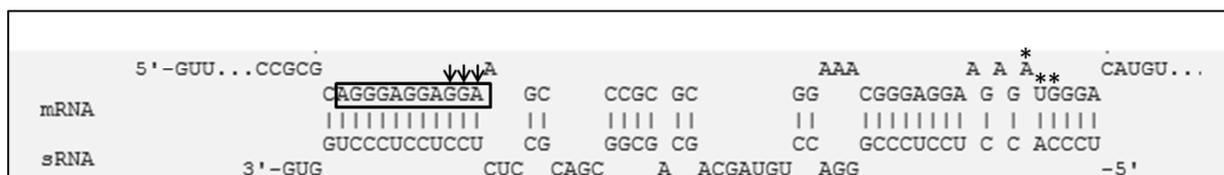


Abbildung A2: Schematische Darstellung der mittels CopraRNA ermittelten Bindestelle zwischen CcsR1 und der *flhR*-mRNA in *R. sphaeroides* 2.4.1. Dargestellt sind die mRNA Region und die sRNA Region, die an der Bindung beteiligt sind. Mit * markiert ist das Startcodon der *flhR*-mRNA. Die mittels INTARNA ermittelte Bindestelle für CcsR1 ist mit einem Kasten hervorgehoben und die drei in der zielgerichteten Mutagenese ausgetauschten Nukleotide sind mit Pfeilen markiert.

9.2 Tabellen

Tabelle A1: Organismen mit vorhergesagten CcsR RNAs. Dargestellt ist eine Auflistung von Organismen, in denen CcsR RNAs vorhergesagt werden konnten mit der Anzahl an vorgesagten Homologen, sowie der Zuordnung zu einem CcsR-Locus Typ.

Organismus	Anzahl CcsR RNAs	CcsR Locus-Typ
<i>Agrobacterium vitis</i> S4	2	Typ I
<i>Brucella melitensis</i> 16M	2	Typ I
<i>Dinoroseobacter shibae</i> DFL 12	1	Typ II
<i>Jannashia</i> sp. CCS1	4	Typ I
<i>Loktanella vestfoldensis</i> SKA53	3	Typ I
<i>Paracoccus denitrificans</i> PD1222	6	Typ I
<i>Phaeobacter gallaeciensis</i> DSM17395	2	Typ I
<i>Rhizobium leguminosarum</i> WSM1325	1	Typ III
<i>Rhodobacter capsulatus</i> SB1003	4	Typ I
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> 2.4.1	4	Typ I
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> ATCC17025	4	Typ I
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> ATCC17029	9	Typ I
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> KD131	7	Typ I
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> WS8N	6	Typ I
<i>Roseobacter dentrificans</i> OCh114	2	Typ I
<i>Roseobacter litoralis</i> OCh149	2	Typ I
<i>Ruegeria</i> sp. TM1040	2	Typ I
<i>Sagittula stellata</i> DSM11524	4	Typ I
<i>Silicibacter pomeroyi</i> DSS-3	3	Typ I
<i>Sinorhizobium fredii</i> HH103	3	Typ III
<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021	3	Typ III
<i>Sulfitobacter</i> sp. EE-36	1	Typ I

Tabelle A2: RNA-RNA Interaktionsvorhersagen ausgewählter Gene aus *R. sphaeroides* 2.4.1 für eine Interaktion mit CcsR1-4. Dargestellt ist eine Auflistung von ausgewählten Genen, bei deren mRNAs eine hohe freie Energie für eine Interaktion mit den CcsR-RNAs vorhergesagt wurde. Dargestellt sind die Vorhersagen für CcsR1-4 mittels INTARNA und für CcsR1 mittels RNAPREDATOR.

Gen Nr.	Gen	Funktion laut NCBI Datenbank	Freie Energie [kcal/mol]				
			IntaRNA				RNApredator
			CcsR1	CcsR2	CcsR3	CcsR4	CcsR1
<u>Interaktion mit CcsR1-4</u>							
RSP_6040		<i>Hypothetical protein</i>	-27.4	-27.4	-25.6	-25.6	-22.70
RSP_2255		<i>AMP-binding domain protein</i>	-22.7	-22.7	-21.9	-21.9	
RSP_1576	<i>trxB</i>	<i>Thioredoxin reductase</i>	-22	-22.6	-21.2	-21.3	-19.59
RSP_2591	<i>flhR</i>	<i>Two component LuxR family transcriptional regulator</i>	-21.8	-24.3	-22.4	-22.4	-20.26
RSP_1195	<i>comF</i>	<i>Competence protein F</i>	-21.7	-18.8	-23.3	-18.6	
RSP_2749		<i>P4 family integrase</i>	-21.5	-23.1	-27	-23.1	
RSP_2872	<i>aglF</i>	<i>ABC alpha-glucoside transporter, inner membrane subunit AgIF</i>	-21.4	-22.7	-23.8	-23.8	-20.17
RSP_0573	<i>phoB</i>	<i>Response regulator receiver protein</i>	-21.2	-21.2	-19.8	-19.8	-19.86
RSP_2844		<i>putative GTP-binding protein</i>	-20.9	-20.9	-20.8	-20.8	-16.81
RSP_2365		<i>ABC sugar (ribose) transporter, periplasmic substrate-binding subunit</i>	-20.3	-20.3	-18.9	-18.9	-19.67
RSP_2669		<i>ABC sugar (glycerol) transporter, ATPase subunit</i>	-19.7	-17.3	-17.3	-17.3	
RSP_6132	<i>pqqA</i>	<i>Coenzyme PQQ synthesis protein PqqA</i>	-19.7	-19.7	-18.4	-18.4	-17.96
RSP_2104		<i>Hypothetical protein</i>	-19.3	-21.1	-21.1	-21.1	
RSP_0793	<i>pqqB</i>	<i>Pyrroloquinoline quinone biosynthesis protein PqqB</i>	-19.1	-19.1	-18.3	-18.3	-19.26
RSP_0488	<i>uxaC</i>	<i>Glucuronate isomerase</i>	-19	-19.7	-19.7	-19.7	-18.55
RSP_0725		<i>thioredoxin, thioldisulfide interchange protein</i>	-19	-19	-18.8	-18.8	
RSP_2939		<i>Condensin subunit ScpB</i>	-18.8	-18.8	-17.9	-17.9	
RSP_4050	<i>pdhB</i>	<i>Branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase subunit E2</i>	-18.2	-18.2	-17.3	-17.3	

Gen Nr.	Gen	Funktion laut NCBI Datenbank	Freie Energie [kcal/mol]				
			IntaRNA				RNApredator
			CcsR1	CcsR2	CcsR3	CcsR4	CcsR1
<u>Interaktion nur mit CcsR1</u>							
RSP_2719		AsnC family transcriptional regulator	-20.3				
RSP_0598	<i>dut</i>	deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase	-19.6				
RSP_2876		Putative carbon monoxide dehydrogenase medium chain	-18.4				
RSP_2521	<i>nuoG</i>	NADH dehydrogenase subunit G	-18.3				
RSP_0487		TRAP dicarboxylate family transporter DctP subunit	-17.1				
RSP_1438		Iron-hydroxamate transporter permease subunit	-17				
<u>Interaktion nur mit CcsR2</u>							
RSP_2889		Transcriptional regulator		-22.2			
RSP_2376	<i>kbl</i>	2-amino-3-ketobutyrate coenzyme A ligase		-19.9			
RSP_2003	<i>yibQ</i>	YibQ protein		-19			
RSP_2084		Hypothetical protein		-18.7			
RSP_2526	<i>nuoK</i>	NADH dehydrogenase subunit K		-17.8			
RSP_1019		Putative glycolate oxidase subunit protein		-17.7			
RSP_2381		3-methyladenine DNA glycosylase		-17.2			
<u>Interaktion nur mit CcsR3</u>							
RSP_0640		Putative_N-methylhydantoinase A			-24		
RSP_1077		LysR family transcriptional regulator			-19		
RSP_6242		Hypothetical protein			-18.3		
RSP_2480		Hypothetical protein			-17.3		
<u>Interaktion nur mit CcsR4</u>							
RSP_2220	<i>fliG</i>	Flagellar motor switch protein				-16.5	
RSP_2932	<i>hutC</i>	GntR family transcriptional regulator				-16,5	

Tabelle A3: Operonstrukturen ausgewählter Gene aus *R. sphaeroides* 2.4.1. Dargestellt ist eine Auflistung von ausgewählten Genen mit Angabe der Organisation zugehöriger Operons laut PROOPDB.

Gen Nummer	Gen	Operon Nr.	Position im Operon	Funktion laut NCBI Datenbank
<u>Pyruvatdehydrogenase-Komplex</u>				
RSP_2968	<i>pdhD</i>	1515	1	<i>Dihydrolipoamide dehydrogenase</i>
RSP_4047	<i>pdhAa</i>	2030	1	<i>Dihydrolipoamide acetyltransferase</i>
RSP_4049	<i>pdhAb</i>	2030	2	<i>Pyruvate dehydrogenase E1 component, alpha subunit</i>
RSP_4050	<i>pdhB</i>	2030	3	<i>Dihydrolipoamide acetyltransferase</i>
<u>C1 Metabolismus mit Cofaktorsynthese und bekannten Regulatoren</u>				
RSP_2575		1310	1	<i>Glutathione-dependent formaldehyde-activating enzyme</i>
RSP_2576	<i>adhI</i>	1310	2	<i>Alcohol dehydrogenase class III</i>
RSP_2577	<i>cycl</i>	1310	3	<i>Isocytochrome c2</i>
RSP_2578	<i>xoxF</i>	1311	1	<i>Putative pqq dehydrogenase protein</i>
RSP_2579	<i>cycB</i>	1311	2	<i>Cytochrome c553i</i>
RSP_2580	<i>xoxJ</i>	1311	3	<i>Putative methanol oxidation protein</i>
RSP_2581		1311	4	<i>Rhodanese</i>
RSP_2591	<i>flhR</i>	1316	1	<i>Two component transcriptional regulator, LuxR family</i>
RSP_2592		1316	2	<i>Hypothetical protein</i>
RSP_2593	<i>flhS</i>	1316	3	<i>Hybrid histidine kinase</i>
RSP_2876		1466	4	<i>Putative carbon monoxide dehydrogenase medium chain</i>
RSP_2877	<i>coxL</i>	1466	3	<i>Putative carbon monoxide dehydrogenase large chain</i>
RSP_2878	<i>coxS</i>	1466	2	<i>Putative carbon-monoxide dehydrogenase small chain</i>
RSP_2879		1466	1	<i>Hypothetical protein</i>
RSP_6132	<i>pqqA</i>	2254	1	<i>Putative coenzyme PQQ synthesis protein A</i>
RSP_0793	<i>pqqB</i>	2254	2	<i>pyrroloquinoline quinone biosynthesis protein PqqB</i>
RSP_0792	<i>pqqC</i>	2254	3	<i>pyrroloquinoline quinone biosynthesis protein PqqC</i>
<u>Transport</u>				
RSP_0910	<i>dctP</i>	462	1	<i>TRAP dicarboxylate family transporter DctP subunit</i>
RSP_0911	<i>dctQ</i>	462	2	<i>TRAP dicarboxylate family transporter DctQ subunit</i>
RSP_0912	<i>dctM</i>	462	3	<i>TRAP dicarboxylate family transporter DctM subunit</i>
RSP_2802		1492	1	<i>multidrug/cation efflux pump, membrane fusion protein subunit</i>
RSP_2803		1492	2	<i>RND family multidrug/cation transporter</i>
RSP_3571	<i>znuA</i>	1797	1	<i>ABC zinc transporter, periplasmic binding protein ZnuA</i>
RSP_3572	<i>galM</i>	1797	2	<i>putative aldose 1-epimerase protein</i>
RSP_3602		1814		<i>ABC efflux transporter, ATPase subunit</i>
RSP_3603		1814		<i>efflux ABC transporter inner membrane protein</i>
RSP_6185		1814		<i>hypothetical protein</i>

Tabelle A4: Konservierung der mittels INTARNA vorhergesagten Interaktion zwischen RSP_2591 Homologen und CcsR1 Homologen aus verschiedenen Alphaproteobakterien. Dargestellt sind die Ergebnisse einer BLASTp-Suche nach Homologen zu RSP_2591 in anderen Alphaproteobakterien mit CcsR1 Homologen, sowie die Ergebnisse einer INTARNA-Vorhersage für die RSP_2591 Homologe in ihren jeweiligen Organismen. Um eine Vergleichbarkeit zu erreichen, wurde basierend auf der freien Energie jeweils eine sogenannte INTARNA-Score berechnet.

Organismus	Gen	Funktion laut NCBI-Datenbank	Intarna Freie Energie (IntaRNA-Score)	BLASTp Identities
<i>R. sphaeroides</i> 2.4.1	RSP_2591 (<i>fhIR</i>)	<i>two component LuxR family transcriptional regulator</i>	-21,8 kcal/mol (0,93)	235/235 (100%)
<i>R. sphaeroides</i> 2.4.3	Rsph17025_1932	<i>two component LuxR family transcriptional regulator</i>	-18,7 kcal/mol (0,95)	218/235 (92%)
<i>R. sphaeroides</i> 2.4.9	Rsph17029_1249	<i>two component LuxR family transcriptional regulator</i>	-20 kcal/mol (0,90)	233/235 (99%)
<i>R. sphaeroides</i> KD131	RSKD131_0903	<i>LuxR family two component transcriptional regulator</i>	-20,4 kcal/mol (0,98)	234/235 (99%)
<i>S. meliloti</i> 1021	SM_b20162	<i>LuxR family two component transcriptional regulator</i>	-16,7 kcal/mol (0,64)	89/212 (42%)
<i>R. litoralis</i> (OCh149)	RLO149_c037810	<i>HTH-type transcriptional regulator, LuxR family</i>	-10,8 kcal/mol (0,66)	78/210 (37%)
<i>P. denitrificans</i> (PD122)	Pden_2354	<i>two component LuxR family transcriptional regulator</i>	-12,1 kcal/mol (0,57)	135/219 (62%)
<i>R. denitrificans</i> (OCh114)	RD1_0879	<i>LuxR family transcriptional regulator</i>	-10,5 kcal/mol (0,53)	79/210 (38%)

Tabelle A5: Konservierung der mittels INTARNA vorhergesagten Interaktion zwischen RSP_0573 Homologen und CcsR1 Homologen aus verschiedenen Alphaproteobakterien. Dargestellt sind die Ergebnisse einer BLASTp-Suche nach Homologen zu RSP_0573 in anderen Alphaproteobakterien mit CcsR1 Homologen, sowie die Ergebnisse einer INTARNA-Vorhersage für die RSP_0573 Homologe in ihren jeweiligen Organismen. Um eine Vergleichbarkeit zu erreichen, wurde basierend auf der freien Energie jeweils eine sogenannte INTARNA-Score berechnet.

Organismus	Gen	Funktion laut NCBI-Datenbank	Intarna Freie Energie (IntaRNA-Score)	BLASTp Identities
<i>R. sphaeroides</i> 2.4.1	RSP_0573 (<i>phoB</i>)	<i>response_regulator_receiver_protein</i>	-21,2 kcal/mol (0,91)	129/129 (100%)
<i>R. sphaeroides</i> 2.4.3	Rsph17025_0504	<i>response_regulator_receiver_protein</i>	-14,1 kcal/mol (0,68)	126/128 (98%)
<i>R. sphaeroides</i> 2.4.9	Rsph17029_2226	<i>response_regulator_receiver_protein</i>	-19,3 kcal/mol (0,87)	129/129 (100%)
<i>R. sphaeroides</i> KD131	RSKD131_1913	<i>response regulator receiver protein</i>	-19,6 kcal/mol (0,94)	116/117 (99%)
<i>S. meliloti</i> 1021	SMc02140 (<i>phoB</i>)	<i>phosphate regulon transcriptional regulatory protein</i>	-6,2 kcal/mol (0,24)	51/117 (44%)
<i>R. litoralis</i> (OCh149)	RLO149_c01599_0	<i>response regulator receiver protein, CheY like protein/</i>	-14,2 kcal/mol (0,87)	48/118 (41%)
<i>P. denitrificans</i> (PD122)	Pden_4555	<i>response regulator receiver protein</i>	-17,4 kcal/mol (0,83)	82/117 (70%)
<i>R. denitrificans</i> (OCh114)	RD1_2841	<i>response regulator receiver domain-containing protein</i>	-14,3 kcal/mol (0,73)	51/119 (43%)

Tabelle A6: Konservierung der mittels INTARNA vorhergesagten Interaktion zwischen RSP_6132 Homologen und CcsR1 Homologen aus verschiedenen Alphaproteobakterien. Dargestellt sind die Ergebnisse einer BLASTp-Suche nach Homologen zu RSP_6132 in anderen Alphaproteobakterien mit CcsR1 Homologen, sowie die Ergebnisse einer INTARNA-Vorhersage für die RSP_6132 Homologe in ihren jeweiligen Organismen. Um eine Vergleichbarkeit zu erreichen, wurde basierend auf der freien Energie jeweils eine sogenannte INTARNA-Score berechnet.

Organismus	Gen	Funktion laut NCBI-Datenbank	Intarna Freie Energie (IntaRNA-Score)	BLASTp Identities
<i>R. sphaeroides</i> 2.4.1	RSP_6132 (<i>pqqA</i>)	<i>coenzyme_PQQ_synthesis_protein_PqqA</i>	-19,7 kcal/mol (0,84)	26/26 (100%)
<i>R. sphaeroides</i> 2.4.3	Rsph17025_0386 (<i>pqqA</i>)	<i>coenzyme PQQ biosynthesis protein A</i>	-18,5 kcal/mol (0,94)	26/26 (100%)
<i>R. sphaeroides</i> 2.4.9	Rsph17029_2450 (<i>pqqA</i>)	<i>coenzyme PQQ synthesis protein PqqA</i>	-18,2 kcal/mol (0,82)	25/26 (96%)
<i>R. sphaeroides</i> KD131	-	-	-	-
<i>S. meliloti</i> 1021	SM_b20204 (<i>pqqA</i>)	<i>pyrroloquinoline quinone synthesis protein A</i>	-17,9 kcal/mol (0,69)	9/20 (45%)
<i>R. litoralis</i> (OCh149)	RLO149_c036920 (<i>pqqA</i>)	<i>coenzyme PQQ synthesis protein A</i>	-7,6 kcal/mol (0,46)	13/22 (59%)
<i>P. denitrificans</i> (PD122)	Pden_4883	<i>ABC transporter related</i>	-12,0 kcal/mol (0,57)	8/17 (47%)
<i>R. denitrificans</i> (OCh114)	RD1_1154 (<i>pqqA</i>)	<i>coenzyme PQQ synthesis protein A</i>	-9,2 kcal/mol (0,47)	13/22 (59%)

Tabelle A7: Konservierung der mittels INTARNA vorhergesagten Interaktion zwischen RSP_0793 Homologen und CcsR1 Homologen aus verschiedenen Alphaproteobakterien. Dargestellt sind die Ergebnisse einer BLASTp-Suche nach Homologen zu RSP_0793 in anderen Alphaproteobakterien mit CcsR1 Homologen, sowie die Ergebnisse einer INTARNA-Vorhersage für die RSP_0793 Homologe in ihren jeweiligen Organismen. Um eine Vergleichbarkeit zu erreichen, wurde basierend auf der freien Energie jeweils eine sogenannte INTARNA-Score berechnet.

Organismus	Gen	Funktion laut NCBI-Datenbank	Intarna Freie Energie (IntaRNA-Score)	BLASTp Identities
<i>R. sphaeroides</i> 2.4.1	RSP_0793 (<i>pqqB</i>)	<i>pyrroloquinoline quinone biosynthesis protein PqqB</i>	-19,1 kcal/mol (0,82)	300/300 (100%)
<i>R. sphaeroides</i> 2.4.3	Rsph17025_0387	<i>pyrroloquinoline quinone biosynthesis protein PqqB</i>	-19,2 kcal/mol (0,97)	272/300 (91%)
<i>R. sphaeroides</i> 2.4.9	Rsph17029_2449	<i>pyrroloquinoline quinone biosynthesis protein PqqB</i>	-17,8 kcal/mol (0,80)	296/300 (99%)
<i>R. sphaeroides</i> KD131	RSKD131_2155	<i>pyrroloquinoline quinone biosynthesis protein PqqB</i>	-18,0 kcal/mol (0,87)	297/300 (99%)
<i>S. meliloti</i> 1021	SM_b20205 (<i>pqqB</i>)	<i>pyrroloquinoline quinone biosynthesis protein PqqB</i>	-6,9 kcal/mol (0,26)	157/303 (52%)
<i>R. litoralis</i> (OCh149)	RLO149_c036930 (<i>pqqB</i>)	<i>coenzyme PQQ biosynthesis protein B</i>	-9,8 kcal/mol (0,60)	150/302 (50%)
<i>P. denitrificans</i> (PD122)	Pden_2362	<i>pyrroloquinoline quinone biosynthesis protein PqqB</i>	-	160/302 (53%)
<i>R. denitrificans</i> (OCh114)	RD1_1153 (<i>pqqB</i>)	<i>pyrroloquinoline quinone biosynthesis protein PqqB</i>	-9,7 kcal/mol (0,49)	157/302 (52%)

Tabelle A8: Konservierung der mittels INTARNA vorhergesagten Interaktion zwischen RSP_2876 Homologen und CcsR1 Homologen aus verschiedenen Alphaproteobakterien. Dargestellt sind die Ergebnisse einer BLASTp-Suche nach Homologen zu RSP_2876 in anderen Alphaproteobakterien mit CcsR1 Homologen, sowie die Ergebnisse einer INTARNA-Vorhersage für die RSP_2876 Homologe in ihren jeweiligen Organismen. Um eine Vergleichbarkeit zu erreichen, wurde basierend auf der freien Energie jeweils eine sogenannte INTARNA-Score berechnet.

Organismus	Gen	Funktion laut NCBI-Datenbank	Intarna Freie Energie (IntaRNA-Score)	BLASTp Identities
<i>R. sphaeroides</i> 2.4.1	RSP_2876	<i>putative_carbon_monoxide_dehydrogenase_medium_chain</i>	-18,4 kcal/mol (0,79)	261/261 (100%)
<i>R. sphaeroides</i> 2.4.9	Rsph17029_1522	<i>molybdopterin dehydrogenase, FAD-binding</i>	-17,1 kcal/mol (0,77)	260/261 (99%)
<i>R. sphaeroides</i> 2.4.3	Rsph17025_1144	<i>FAD-binding molybdopterin dehydrogenase</i>	-14,5 kcal/mol (0,73)	233/261 (89%)
<i>R. sphaeroides</i> KD131	RSKD131_1192	<i>putative_carbon_monoxide_dehydrogenase_medium_chain</i>	-16,9 kcal/mol (0,81)	261/261 (100%)
<i>S. meliloti</i> 1021	SMc03103	<i>putative carbon monoxide dehydrogenase medium subunit transmembrane protein/carbon-monoxide dehydrogenase (acceptor)</i>	-13,2 kcal/mol (0,51)	154/266 (58%)
<i>R. litoralis</i> (OCh149)	RLO149_c014560	<i>molybdenum hydroxylase family protein, medium subunit</i>	-6,9 kcal/mol (0,42)	182/262 (69%)
<i>P. denitrificans</i> (PD122)	Pden_4257	<i>molybdopterin dehydrogenase, FAD-binding</i>	-2,3 kcal/mol (0,11)	35/123 (28%)
<i>R. denitrificans</i> (OCh114)	RD1_2972 (<i>coxM</i>)	<i>carbon monoxide dehydrogenase, medium subunit</i>	-8,5 kcal/mol (0,43)	186/262 (71%)

Tabelle A9: Konservierung der mittels INTARNA vorhergesagten Interaktion zwischen RSP_0725 Homologen und CcsR1 Homologen aus verschiedenen Alphaproteobakterien. Dargestellt sind die Ergebnisse einer BLASTp-Suche nach Homologen zu RSP_0725 in anderen Alphaproteobakterien mit CcsR1 Homologen, sowie die Ergebnisse einer INTARNA-Vorhersage für die RSP_0725 Homologe in ihren jeweiligen Organismen. Um eine Vergleichbarkeit zu erreichen, wurde basierend auf der freien Energie jeweils eine sogenannte INTARNA-Score berechnet.

Organismus	Gen	Funktion laut NCBI-Datenbank	Intarna Freie Energie (IntaRNA-Score)	BLASTp Identities
<i>R. sphaeroides</i> 2.4.1	RSP_0725	<i>thioredoxin, thioldisulfide interchange protein</i>	-19,0 kcal/mol (0,81)	183/183 (100%)
<i>R. sphaeroides</i> 2.4.3	Rsph17025_2444	<i>alkyl hydroperoxide reductase/ Thiol specific antioxidant/ Mal allergen</i>	-15,6 kcal/mol (0,79)	157/183 (86%)
<i>R. sphaeroides</i> 2.4.9	Rsph17029_2380	<i>alkyl hydroperoxide reductase/ Thiol specific antioxidant/ Mal allergen</i>	-16,7 kcal/mol (0,75)	181/182 (99%)
<i>R. sphaeroides</i> KD131	RSKD131_2083	<i>Alkyl hydroperoxide reductase/ Thiol specific antioxidant/ Mal allergen</i>	-16,7 kcal/mol (0,80)	180/182 (99%)
<i>S. meliloti</i> 1021	SMc00726 (<i>tIpA</i>)	<i>putative thiol:disulfide interchange redox-active center transmembrane protein</i>	-8,4 kcal/mol (0,32)	65/192 (34%)
<i>R. litoralis</i> (OCh149)	RLO149_c031150 (<i>tIpA</i>)	<i>thiol:disulfide interchange protein TIpA</i>	-8,9 kcal/mol (0,54)	91/187 (49%)
<i>P. denitrificans</i> (PD122)	Pden_2023	<i>redoxin domain-containing protein</i>	-5,3 kcal/mol (0,25)	79/137 (58%)
<i>R. denitrificans</i> (OCh114)	RD1_1590 (<i>tIpA</i>)	<i>thiol:disulfide interchange protein tIpA, putative</i>	-	90/187 (48%)

Tabelle A10: Konservierung der mittels INTARNA vorhergesagten Interaktion zwischen RSP_1576 Homologen und CcsR1 Homologen aus verschiedenen Alphaproteobakterien. Dargestellt sind die Ergebnisse einer BLASTp-Suche nach Homologen zu RSP_1576 in anderen Alphaproteobakterien mit CcsR1 Homologen, sowie die Ergebnisse einer INTARNA-Vorhersage für die RSP_1576 Homologe in ihren jeweiligen Organismen. Um eine Vergleichbarkeit zu erreichen, wurde basierend auf der freien Energie jeweils eine sogenannte INTARNA-Score berechnet.

Organismus	Gen	Funktion laut NCBI-Datenbank	Intarna Freie Energie (IntaRNA-Score)	BLASTp Identities
<i>R. sphaeroides</i> 2.4.1	RSP_1576 (<i>trxB</i>)	<i>thioredoxin reductase</i>	-22 kcal/mol (0,94)	317/317 (100%)
<i>R. sphaeroides</i> 2.4.3	Rsph17025_0256	<i>thioredoxin reductase</i>	-12,2 kcal/mol (0,62)	283/313 (90%)
<i>R. sphaeroides</i> 2.4.9	Rsph17029_0228	<i>thioredoxin reductase</i>	-11,8 kcal/mol (0,49)	312/312 (100%)
<i>R. sphaeroides</i> KD131	RSKD131_2974 (<i>trxB</i>)	<i>thioredoxin reductase</i>	-19,6 kcal/mol (0,94)	317/317 (100%)
<i>S. meliloti</i> 1021	SMc01224 (<i>trxB</i>)	<i>thioredoxin reductase protein</i>	-6,0 kcal/mol (0,23)	190/312 (61%)
<i>R. litoralis</i> (OCh149)	RLO149_c027080 (<i>trxB</i>)	<i>Thioredoxin reductase</i>	-3,2 kcal/mol (0,20)	238/310 (77%)
<i>P. denitrificans</i> (PD122)	Pden_2208	<i>Thioredoxin reductase</i>	-5,7 kcal/mol (0,27)	245/305 (80%)
<i>R. denitrificans</i> (OCh114)	RD1_3505 (<i>trxB</i>)	<i>thioredoxin-disulfide reductase</i>	-5,5 kcal/mol (0,28)	235/309 (76%)

9.3 Sequenzen

Seq. A1 Sequenzen für die Erstellung eines Konsensussequenz-Weblogos für CcsR1 Homologe aus verschiedenen Alphaproteobakterien. Berücksichtigt ist ein Sequenzbereich, der beide CCUCCUCCC-Motive, den Sequenzbereich zwischen den CCUCCUCCC-Motiven, sowie 5 flankierende Nukleotide in 5' und 3' Richtung der Motive umschließt. Die Sequenzen sind dargestellt im Fasta-Format.

```
>R._sphaeroides_2.4.1_CcsR1
TCCCACCTCCTCCCGGGACCTGTAGCAGCAGCGGCGACGCCTCTCCTCCTCCCTGGTG
>R._sphaeroides_KD131_CcsR1
TCCCACCTCCTCCCGGGACCTGTAGCAGCAGCGGCGACGCCTCTCCTCCTCCCTGGTG
>R._sphaeroides_ATCC17025_CcsR1
TCCCACCTCCTCCCGGGACCTGTAGCAGCAGCGGCGACGCCTCTCCTCCTCCCTGGTG
>R._sphaeroides_ATCC17029_CcsR1
TCCCACCTCCTCCCGGGCCTGTAGCAGCAGCGGCGACGCCTCTCCTCCTCCCTGGTG
>R._capsulatus_Sb1003_CcsR1
CCTCTCCTCCTCCCTGGGTCTCGGAGATCGGCGGCATCCTCTCTCCTCCTCCCTGAGG
>Jannashia_sp._CcsR1
GCCCCCGTCTCCACGGGGTATCCGGGCCAGCGGGCTGCGCTCTACCCTCCCTTGGG
>Ruegeria_sp._TM1040_CcsR1
TTTCTCCTCCTCCCTTAAGGGCTGTCCTAAGCGGTGGCATCCTCCTCCTCCCTGATG
>Silicibacter_pomeroyi_DSS-3_CcsR1
CTTCTCCTCCTCCCTGGGGCCTGAGACTACGCGGCGGCATCCTCCTCCTCCCTGATG
>Phaeobacter_gallaeciensis_DSM_17395_CcsR1
CTTCTCCTCCTCCCTTGAGGGCCTGTAATCGCGGTGACATCCTCCTCCTCCCTGATG
>Sagittula_stellata_DSM_11524_CcsR1
GCACTCCTCCTCCCGCCCTTCCGTCTTAGGCGGTGCATCCTCTCCTCCTCCCTGGAT
>Loktanella_vestfoldensis_SKA53_CcsR1
TGCTGCCTCCTCCCTGAAAAGGCAGATCTGACAGACCCCCGCGCTCTACCTCCTCCCGGAGC
>Sulfitobacter_sp._EE-36_CcsR1
ACACGCACCCTCCCTGTTGTGCTGTAGAAAGCTTCGGGTCTCCTCCTCCTCCCTGAGA
>Roseobacter_litoralis_OCh_149_CcsR1
CTTTATCTCCTCCCTGAGACGCCCGCATGTTGGCGGGCATCTATCCTCCTCCAGATG
>Roseobacter_denitrificans_OCh_114_CcsR1
CCCCTCCTCCTCCCTGGGTTGATCTGTACCAAGGCGGTGGCGCCTATCCTCCTCCAGGCG
>Dinoroseobacter_shibae_DFL_12_CcsR1
CCCCTCCTCCTCCCTGGGTTTTCTGTAATATGCGGCGGCGCTTTCCTCCTCCCTAGCG
>Paracoccus_denitrificans_PD122_CcsR1
CCACTCCTCCTCCCTTGGGTCCGGGTTTCAGGCGGCATCCTCCCTCCTCCTCCCTGAGG
>Agrobacterium_vitis_S4_CcsR1
TGCATCCTCCTCCCGCAAAGCTTCGTCTCTCGGACGACCCACTCCTCCTCCCTAGGG
>Rhizobium_leguminosarum_WSM_1325_CcsR1
GCACTCCTCCTCCAGCGCGCTGCGATAGACTGACAACACTCCTCCTCCAGTTG
>Brucella_melitensis_16M_CcsR1
TGGTTCTCCTCCCAATTCAGGCCCGGTTTCGTCGCAAAGCTCTCCACCTCCTCCAGACT
>Ensifer_meliloti_1021
AACTCCTCCTCCCGGTTGCCAATCGCCTTTATGACGCCCGCGGTCTCCTCCCCCGAC
>Ensifer_fredii_HH103_CcsR1
AACTCCTCCTCCCGGTTGCCAATCATTCTCATGACGCCCGCTGGATCTCCTCCCCAGC
```

9.4 Quellcode

Src. 1 INTARNAGETINTERACTIONREGION

INTARNAGETINTERACTIONREGION wurde mit Hilfe der Programmierumgebung NetBeans IDE 8.0.2 (www.netbeans.org) erstellt. Hierbei wurde die Java Funktion aus Netbeans genutzt und das Programm aus dem Netbeans-Projekt gestartet, ohne dass es komplett zu einem eigenständigen Programm kompiliert wurde. In der Klasse „calcInteractionProbability.java“ sind die Funktionen zum Auslesen von INTARNA-Daten im Textformat, zur Aufsummierung von Beteiligungen der einzelnen sRNA-Basen an Interaktionen und zum Schreiben der Ergebnisse in ein neues Textdokument realisiert.

Hauptklasse (Main.java)

```
public class Main extends javax.swing.JFrame {
    public Main() {
        initComponents();
    }
    @SuppressWarnings("unchecked")
    private void initComponents() {
        jButton1 = new javax.swing.JButton();
        setDefaultCloseOperation(javax.swing.WindowConstants.EXIT_ON_CLOSE);
        jButton1.setText("start");
        jButton1.addActionListener(new java.awt.event.ActionListener() {
            public void actionPerformed(java.awt.event.ActionEvent evt) {
                jButton1ActionPerformed(evt);
            }
        });
        javax.swing.GroupLayout layout = new javax.swing.GroupLayout(getContentPane());
        getContentPane().setLayout(layout);
        layout.setHorizontalGroup(
            layout.createParallelGroup(javax.swing.GroupLayout.Alignment.LEADING)
                .addGroup(layout.createSequentialGroup()
                    .addGap(154, 154, 154)
                    .addComponent(jButton1)
                    .addGap(191, 191, Short.MAX_VALUE))
        );
        layout.setVerticalGroup(
            layout.createParallelGroup(javax.swing.GroupLayout.Alignment.LEADING)
                .addGroup(layout.createSequentialGroup()
                    .addGap(133, 133, 133)
                    .addComponent(jButton1)
                    .addGap(144, 144, Short.MAX_VALUE))
        );
        pack();
    }
    private void jButton1ActionPerformed(java.awt.event.ActionEvent evt) {
        calcInteractionProbability losgehts = new calcInteractionProbability();
    }
    public static void main(String args[]) {
        java.awt.EventQueue.invokeLater(new Runnable() {
            public void run() {
                new Main().setVisible(true);
            }
        });
    }
    private javax.swing.JButton jButton1;
}
```

Berechnungsklasse (calcInteractionProbability.java)

```

import java.io.*;
import java.util.Scanner;
public class calcInteractionProbability {
    File intaRNAfile = new File(System.getProperty("user.dir") + File.separator
        + "Data" + File.separator
        + "inFile.txt");

    File outputFile = new File(System.getProperty("user.dir") + File.separator
        + "Data" + File.separator
        + "outFile.txt");

    int[][] interactionRegions = new int[50000][2];
    int[] sRNA = new int[1000];
    public calcInteractionProbability() {
        run();
    }
    private void getRegion() {
        Scanner s = null;
        int i = 0;
        try {
            s = new Scanner(new BufferedReader(new FileReader(intaRNAfile))).useDelimiter("\\s+");
            while (s.hasNext()) {
                if (s.next().equals("Position")&& s.next().equals("-")&& s.next().equals("ncRNA:")) {
                    interactionRegions[i][0] = Integer.parseInt(s.next()); System.out.print(interactionRegions[i][0] + " ");
                    s.next();
                    interactionRegions[i][1] = Integer.parseInt(s.next()); System.out.println(interactionRegions[i][1]);
                    i++;
                }
            }
        } catch (IOException e) {
            System.out.println(e);
            System.out.println(">>importFile not found or corrupt!<<");
        }
        finally {
            if (s != null) {s.close();}
        }
        for(int j=0; j<interactionRegions.length; j++) {
            for(int k=1; k<sRNA.length; k++) {
                if(k >= interactionRegions[j][0] && k <= interactionRegions[j][1]) {
                    sRNA[k] +=1;
                }
            }
        }
    }
    public void toText() {
        char txtBuffer[] = new char[10000000];
        int txtBufferCounter = 0;
        try {
            char stringBuffer[] = new char[10000];
            String s = "";
            for (int i=1; i<sRNA.length; i++) {
                s += sRNA[i] + ",";
            }
            s += "\n";
            StringReader sr = new StringReader(s);
            int max = sr.read(stringBuffer);
            for (int n=0; n<max; n++){
                txtBuffer[txtBufferCounter] = stringBuffer[n];
                txtBufferCounter++;
            }
            FileWriter txtOut = new FileWriter(outputFile);
            for (int a=0; a<txtBufferCounter; a++) {txtOut.append(txtBuffer[a]);}
            txtOut.flush();
            txtOut.close();
        }
        catch (IOException e) {
            System.out.println(e);
            System.out.println(">>could not write txt file!<<");
        }
    }
    public void run() {
        getRegion();
        toText();
        System.out.println("finished!");
    }
}

```

9.5 Abkürzungen

A

ATP = Adenosintri-phosphat

B

bp = Basenpaare

BLAST = Basic Local Alignment Search Tool

C

CcsR = Conserved CCUCCUCCC-motif containing stress induced RNA

CcaF = Conserved CcsR associated factor

CoIP = Co-Immunpräzipitation

D

DNA = Desoxyribonukleinsäure

DNase = Desoxyribonuklease

dRNA-Seq. = differentielle RNA-Sequenzierung

E

EMSA = Electrophoretic mobility shift assay

G

GSH = Glutathion (reduziert)

GSSG = Glutathion (oxidiert)

H

Hfq = Host factor required for replication of phage Q

J

JTT-Modell = Jones-Taylor-Thornton Modell

M

mRNA = *messenger* RNA

MFE = Minimum free energy (minimale freie Energie)

N

NAD = Nicotinamidadenindinukleotid

NADP = Nicotinamidadenindinukleotidphosphat

NCBI = National Center for bio**t**echnology information
nt

O

OD = optische Dichte

ONPG = o-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid

ORF = open reading frame (offener Leserahmen/ offenes Leseraster)

P

PCR = Polymerase chain reaction (Polymerase Kettenreaktion)

PNPase = Polynukleotid-Phosphorylase

PY = Peptone-Yeast (Pepton-Hefe)

Q

qRT-PCR = quantitative RT-PCR

R

RÄ = Rhodobacter Äpfelsäure

RBS = Ribosomale Bindestelle

RDP = *R*ibosomal *d*atabase *p*roject

RNA = Ribonukleinsäure

RNase = Ribonuklease

RT-PCR = PCR mit vorhergehendem reverse Transkriptase Schritt zur Amplifikation von
RNA

S

sRNA = kleine RNA (*small RNA*)

T

tBOOH = tert-Butylhydroperoxid

U

UCSF = *University of California, San Francisco*

UTR = *U*ntranslated *r*egion (nicht translatierter Bereich einer mRNA)

W

WT = Wildtyp

9.6 Abbildungsverzeichnis

9.6.1 Einleitung

- ❖ Abbildung 3: Die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies.
- ❖ Abbildung 4: Die Entstehung von Hydroxylradikalen aus Superoxidradikalen und Wasserstoffperoxid
- ❖ Abbildung 3: Thioredoxin System und Glutaredoxin System am Beispiel von *E. coli*
- ❖ Abbildung 4: Regulation von mRNA durch *Riboswitches*
- ❖ Abbildung 5: Regulation durch Protein-bindende sRNAs
- ❖ Abbildung 6: Regulation von Genexpression durch *cis*-codierte sRNAs
- ❖ Abbildung 7: Regulation von Genexpression durch *trans*-codierte sRNAs
- ❖ Abbildung 8: Regulation von Motilität und Biofilmbildung in *E. coli* durch ein Netzwerk aus sRNAs und Proteinregulatoren
- ❖ Abbildung 9: Glutathion-abhängiger Methanol-Formaldehyd Metabolismus in *R. sphaeroides*
- ❖ Abbildung 10: Schematische Darstellung des RSP-6037-CcsR1-4 Locus
- ❖ Abbildung 11: Sekundärstruktur der sRNA CcsR1
- ❖ Abbildung 12: Alignment der sRNAs CcsR1-4
- ❖ Abbildung 13: Expression der sRNAs CcsR1 und RSs1543 unter Hitzestress und photooxidativem Stress
- ❖ Abbildung 14: Vorkommen verschiedener sRNAs in verschiedenen Alphaproteobakterien

9.6.2 Ergebnisse

Bioinformatische Analyse von CcsR Loci aus verschiedenen Alphaproteobakterien

- ❖ Abbildung 15: Bestimmung der Anzahl an CcsR RNAs pro Organismus in verschiedenen Alphaproteobakterien
- ❖ Abbildung 16: Genomische Organisation verschiedener CcsR Loci
- ❖ Abbildung 17: Phylogenetischer Stammbaum von Organismen mit CcsR RNAs
- ❖ Abbildung 18: Faltungsvorhersagen für die CcsR RNA CcsR1 aus verschiedenen Alphaproteobakterien
- ❖ Abbildung 19: Die CCUCCUCCC-Motive der CcsR-RNAs sind konserviert
- ❖ Abbildung 20: Phylogenetischer Stammbaum von CcsR1-Homologen aus verschiedenen Alphaproteobakterien
- ❖ Abbildung 21: Strukturvorhersagen für CcaF Homologe aus verschiedenen Alphaproteobakterien.

-
- ❖ Abbildung 22: Phylogenetischer Stammbaums der konservierten Region der CcaF Homologe verschiedener Alphaproteobakterien
 - ❖ Abbildung 23: CcaF1 Homologe aus verschiedenen Alphaproteobakterien weisen eine besonders hohe Konservierung einzelner Aminosäuren innerhalb ihrer konservierten Proteindomäne auf

Die Expression der CcsR RNAs wird durch Stress gesteuert

- ❖ Abbildung 24: Differentielle Detektion von CcsR1-4 mittels Northern Blot
- ❖ Abbildung 25: CcsR1-4 werden unter verschiedenen Stressbedingungen und in der stationären Wachstumshase exprimiert
- ❖ Abbildung 26: CcsR RNAs weisen in verschiedenen Alphaproteobakterien unter Stress eine erhöhte Abundanz auf

Bestimmung von möglichen Interaktionspartnern der CcsR RNAs

- ❖ Abbildung 27: Eine Differentielle RNA Sequenzierung legt interne Transkriptionsstarts für das CcaF-CcsR1-4 Operon nahe
- ❖ Abbildung 28: Lokalisation verschiedener potentieller PrrA Bindestellen innerhalb von *ccaF1* und CcsR1
- ❖ Abbildung 29: Sequenzen verschiedener potentieller PrrA Bindestellen innerhalb des *ccaF1*-CcsR Locus
- ❖ Abbildung 30: CcsR1 interagiert *in vitro* mit Hfq.
- ❖ Abbildung 31: Die Expression von CcsR1-4 ist unabhängig von RNase J, RNase III und RppH
- ❖ Abbildung 32: Prozessierung von CcsR1-4 in einer temperatursensitiven *E. coli* RNase E Mutante.
- ❖ Abbildung 33: Die Erhöhung der Umgebungstemperatur inhibiert schrittweise die Prozessierung von CcsR1-4 in einer temperatursensitiven *E. coli* RNase E Mutante.
- ❖ Abbildung 34: Schematische Darstellung der auf pRK415 basierenden CcaF1/CcsR1-4 Überexpressionsplasmide.
- ❖ Abbildung 35: Eine Mutation im Startcodon von *ccaF1* revidiert den Effekt der Co-Überexpression des *ccaF1* Gens auf die induzierte Resistenz gegen oxidativen Stress durch CcsR1-4.
- ❖ Abbildung 36: Die *in silico* 3D-Strukturen von CcsR1 und CcaF1 deuten auf eine mögliche Interaktion hin.

Funktion der CcsR-RNAs innerhalb der zellulären Regulation

- ❖ Abbildung 37: Schematische Darstellung des CcsR1-4 Überexpressionsplasmids pRCcsR1-4.
- ❖ Abbildung 38: Globale Änderungen der Genexpression von *R. sphaeroides* 2.4.1 durch CcsR1-4 Überexpression.

-
- ❖ Abbildung 39: Eine Konstitutive Überexpression von CcsR1-4 führt zur Repression von Genen des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes und von Genen des C1-Metabolismus.
 - ❖ Abbildung 40: Eine Konstitutive Überexpression von CcsR1-4 führt zur Repression von Proteinen des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes, Transportern und von Enzymen des C1-Metabolismus.
 - ❖ Abbildung 41: Vorhersage eines möglichen Bindemotivs für CcsR1-4 mittels INTARNA und INTARNAGETINTERACTIONREGION.
 - ❖ Abbildung 42: Vergleich von bioinformatischen RNA-RNA Interaktionsvorhersagen mittels INTARNA mit den Ergebnissen aus Transkriptom- und Proteomanalyse.
 - ❖ Abbildung 43: Vergleich von bioinformatischen RNA-RNA Interaktionsvorhersagen mittels INTARNA und RNAPREDATOR.
 - ❖ Abbildung 44: Eine Überexpression von CcsR1-4 erhöht den zellulären Glutathionpool.
 - ❖ Abbildung 45: Operonstrukturen und Lokalisation putativer CcsR1-4 Bindestellen für ausgewählte Gene mit Verbindung zu C1-Metabolismus und Pyruvatdehydrogenase-Komplex.
 - ❖ Abbildung 46: Effekt einer CcsR1-4 Überexpression auf die Expression potentieller Zielgene.
 - ❖ Abbildung 47: Die Sekundärstruktur der *flhR* mRNA weist eine exponierte potentielle CcsR1-4 Bindestelle auf.
 - ❖ Abbildung 48: Einfluss von Hfq auf die CcsR1-4 Interaktion mit der *flhR* mRNA.
 - ❖ Abbildung 49: Mutation innerhalb der CcsR1-4 Bindestelle der *flhR* mRNA.
 - ❖ Abbildung 50: Einfluss einer Mutation innerhalb der 5' UTR der *flhR* mRNA auf die Interaktion mit CcsR1-4.
 - ❖ Abbildung 51: CcsR1 interagiert *in vitro* mit der *flhR* mRNA.
 - ❖ Abbildung 52: Graphische Darstellung der CcsR-RNA Überexpressions Plasmide pBCcsR1, pBCcsR2, pBCcsR3, pBCcsR1+2, pBCcsR1-3 und pBCcsR1-4
 - ❖ Abbildung 53: CcsR1-4 werden benötigt für eine effektive Repression der Expression der *flhR* mRNA.
 - ❖ Abbildung 54: Graphische Darstellung der CcsR-RNA Überexpressions Plasmide pRCcsR1, pRCcsR2, pRCcsR1+2, pRCcsR1-3 und pRCcsR1-4
 - ❖ Abbildung 55: Eine Überexpression von CcsR RNAs führt zu einer erhöhten Resistenz gegenüber oxidativem Stress.
 - ❖ Abbildung 56: Eine Deletion von *flhR* führt zu einem Verlust des Effekts einer Überexpression von CcsR1-4 auf den zellulären Glutathionpool.
 - ❖ Abbildung 57: Eine Überexpression von CcsR RNAs führt zu einer erhöhten Resistenz gegenüber oxidativem Stress, während eine Deletion des *flhR* Gens diesen Effekt revidiert.
 - ❖ Abbildung 58: Expression ausgewählter Gene des C1-Metabolismus und des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes.
-

- ❖ Abbildung 59: Eine CcsR 1-4 Überexpression in einer *R. sphaeroides* 2.4.1 *flhR* Deletionsmutante reprimiert die *pqqA* Expression, während Gene des C1-Metabolismus und des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes nicht beeinflusst werden.
- ❖ Abbildung 60: Vergleich bioinformatischer Vorhersagen für konservierte Interaktionen von CcsR-RNAs aus verschiedenen Alphaproteobakterien.
- ❖ Abbildung 61: Vergleich bioinformatischer Vorhersagen für konservierte Interaktionen von CcsR-RNAs aus verschiedenen Alphaproteobakterien mit Expressionsstudien in *R. sphaeroides*.

9.6.3 Diskussion

- ❖ Abbildung 62: Schematische Darstellung der Regulation der CcsR RNAs in *R. sphaeroides* 2.4.1
- ❖ Abbildung 63: Schematische Darstellung der Regulation durch die CcsR RNAs in *R. sphaeroides* 2.4.1
- ❖ Abbildung 64: Schematische Darstellung einer CcsR RNA Expression unter oxidativen Stressbedingungen in *R. sphaeroides* 2.4.1
- ❖ Abbildung 65: Schematische Darstellung einer CcsR RNA Expression unter anaeroben Bedingungen in *R. sphaeroides* 2.4.1

9.6.4 Anhang

- ❖ Abbildung A1: 3D-Struktur von CcsR1 aus *R. sphaeroides* 2.4.1.
- ❖ Abbildung A2: Schematische Darstellung der mittels CopraRNA ermittelten Bindestelle zwischen CcsR1 und der *flhR*-mRNA in *R. sphaeroides* 2.4.1.

9.7 Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, 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.

Gießen, den

Fabian Billenkamp

9.8 Laborprotokolle

9.8.1 „Hot-Phenol“ RNA Isolation aus Bakterien

Die angegebenen Volumen sind angepasst für Zellpellets aus 20 ml *R. sphaeroides* 2.4.1 Kulturen in der exponentiellen Wachstumsphase, die in 1,5 ml „Eppis“ überführt wurden, und können für andere Bakterien und Wachstumsphasen abweichen. Schon bei der Probenahme sollte darauf geachtet werden die Proben schnell auf Eiswasser zu kühlen oder mit Eis zu durchmischen. Alle weiteren Arbeitsschritte sind unbedingt auf Eis durchzuführen. Im folgenden Protokoll ist es ausserdem wichtig, zügig und sauber zu arbeiten, um qualitativ hochwertige RNA zu erlangen. Daher ist es vorzuziehen, nur 3 Proben in einem Durchlauf zu bearbeiten. Unbedingt unter dem Abzug durchführen, da mit erwärmtem Phenol gearbeitet wird.

- 1) Zellpellet im „Eppi“ in 200 µl Resuspensionspuffer (0,3 M Saccharose, 0,01 M Natriumacetat (pH 4,5)) aufnehmen und vorsichtig mit gelber Pipettenspitze gründlich resuspendieren.
- 2) 200 µl Lysepuffer (2 % SDS in 0,01 M Natriumacetat (pH 4,5)) zugeben und gründlich durchmischen. Für 90 Sekunden bei 65 °C im Wasserbad oder in einem Heizblock inkubieren um die Zellen zu lysieren.
- 3) 400 µl in Wasser gessättigtes Phenol (pH 4,5 (Roti®-Aqua-Phenol, Carl Roth), auf 65 °C vorgewärmt) zugeben und gründlich schütteln; dann bei 65 °C in einem Wasserbad oder Heizblock für 3 Minuten inkubieren.
- 4) „Eppis“ für mindestens 30 Sekunden auf einem Schwimmer in flüssigem Stickstoff einfrieren; danach für 10 Minuten unter dem Abzug zentrifugieren (13.000 rpm, Raumtemperatur). Da Plastik bei sehr niedrigen Temperaturen leicht bricht, ist es ratsam die „Eppis“ vor dem Zentrifugieren kurz antauen zu lassen.
Vorsicht, die „Eppis“ können beim Antauen aufspringen!
- 5) Die obere wässrige Phase vorsichtig in ein frisches 1,5 ml „Eppi“ überführen, die Schritte 3) bis 5) zweimal wiederholen
- 6) 400 µl Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) zur wässrigen Phase geben, „Eppi“ stark schütteln und für 3 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugieren (13.000 rpm). Danach die obere wässrige Phase vorsichtig in ein frisches 1,5 ml „Eppi“ überführen (geringen Verlust an Überstand in Kauf nehmen).
- 7) 20 µl 3 M Natriumacetat (pH 4,5) und 500 µl 95 % Ethanol (-20 °C) pro 200 µl RNA-Lösung zugeben, mixen und bei -20 °C für eine Stunde inkubieren
- 8) RNA durch Zentrifugation (13.000 rpm, 4 °C, 30 Minuten) pelletieren und Überstand verwerfen.
- 9) Pellet mit 1ml 70 % Ethanol (-20 °C) waschen, erneut zentrifugieren (13.000 rpm, 4 °C, 30 Minuten) und Überstand verwerfen.
- 10) Pellet in *Speed-Vac* trocknen und RNA in 50 µl Reinstwasser (Carl Roth) resuspendieren.

Benötigte LösungenResuspensionspuffer (Lösung I):

0,3 M Saccharose
0,01 M Natriumacetat, pH 4.5

Lysepuffer (Lösung II):

2 % SDS
0.01 M Natriumacetat, pH 4.5

In Wasser gesättigtes Phenol

Roti®-Aqua-Phenol, Carl Roth

Chloroform:Isoamylalkohol (24:1)3 M Natriumacetat pH 4.570 % Ethanol95 % Ethanol**Anmerkungen:**

- 1) Alle Lösungen, außer dem Lysepuffer (Raumtemperatur) und dem wassergestättigtem Phenol (65 °C) bei 4 °C oder auf Eis halten!
- 2) Nicht mehr als 3 Proben parallel von Schritt 3) bis 5)!

9.8.2 RNA-Isolation mit dem TRIR™-Kit (ABgene)

Bei diesem Protokoll handelt es sich um eine Anpassung eines Herstellerprotokolls. Die angegebenen Volumen sind angepasst für Zellpellets aus 20 ml *R. sphaeroides* 2.4.1 Kulturen in der exponentiellen Wachstumsphase, die in 1,5 ml „Eppis“ überführt wurden und können für andere Bakterien und Wachstumsphasen abweichen.

- 1) Zellpellet im „Eppi“ in 1 ml TRIR™ aufnehmen und vorsichtig mit gelber Pipettenspitze gründlich resuspendieren.
- 2) 5 Minuten auf Eis inkubieren
- 3) 200 µl Chloroform zugeben und gründlich vortexen (pro 1 ml eingesetztem „TRIR“).
- 4) 15 Minuten auf Eis inkubieren.
- 5) 15 Minuten bei 13.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugieren
- 6) Die obere wässrige Phase in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen (etwas Überstand stehenlassen).
- 7) 20 µl 3 M Natriumacetat (pH 4,5) und 500 µl 95 % Ethanol (-20 °C) pro 200 µl RNA-Lösung zugeben, mixen und bei -20 °C für eine Stunde inkubieren
- 8) RNA durch Zentrifugation (13.000 rpm, 4 °C, 30 Minuten) pelletieren und Überstand verwerfen.
- 9) Pellet mit 1 ml 70 % Ethanol (-20 °C) waschen, erneut zentrifugieren (13.000 rpm, 4 °C, 30 Minuten) und Überstand verwerfen.
- 10) Pellet in *Speed-Vac* trocknen und RNA in 50 µl Reinstwasser (Carl Roth) resuspendieren.

9.8.3 Verdau von DNA Kontaminationen in RNA-Proben

Um DNA Kontaminationen aus RNA-Proben zu entfernen, kann ein Verdau mittels DNase I (Invitrogen) durchgeführt werden. Im Anschluss werden die RNA-Proben durch Phenolisierung aufgereinigt.

- 1) RNA-Lösung auf ein Volumen von 100 µl mit Reinstwasser auffüllen.
- 2) DNA Verdau ansetzen:

Reaktionsansatz

RNA-Lösung:	100 µl
DNase Puffer (10x, Invitrogen)	12 µl
DNase I (Invitrogen)	3-4 Units pro 10 µg RNA
Roth-H ₂ O	ad 120 µl

- 3) 30 bis 60 Minuten bei 37 °C inkubieren.
- 4) 100 µl Reinstwasser zugeben
- 5) 200 µl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) zugeben und vortexen.
- 6) 10 Minuten bei 13.000 rpm unter Abzug zentrifugieren (Raumtemperatur).
- 7) Die wässrige obere Phase in ein frisches „Eppi“ überführen.
- 8) 200 µl Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) zugeben und vortexen.
- 9) 3 Minuten bei 13.000 rpm unter Abzug zentrifugieren (Raumtemperatur).
- 10) Die obere wässrige Phase in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen (etwas Überstand stehenlassen).
- 11) 20 µl 3 M Natriumacetat (pH 4,5) und 500 µl 95 % Ethanol (-20 °C) pro 200 µl RNA-Lösung zugeben, mixen und bei -20 °C für eine Stunde inkubieren
- 12) RNA durch Zentrifugation (13.000 rpm, 4 °C, 30 Minuten) pelletieren und Überstand verwerfen.
- 13) Pellet mit 1ml 70 % Ethanol (-20 °C) waschen, erneut zentrifugieren (13.000 rpm, 4 °C, 30 Minuten) und Überstand verwerfen.
- 14) Pellet in *Speed-Vac* trocknen und RNA in 50 µl Reinstwasser (Carl Roth) resuspendieren.

9.8.4 Isolation chromosomaler DNA aus Bakterien (CTAB-Methode)

- 1) 5 ml Bakterienkultur bis in die stationäre Phase wachsen lassen.
- 2) 1,5 ml Bakterienkultur entnehmen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen.
- 3) 5 Minuten bei 8000 rpm in der Tischzentrifuge bei Raumtemperatur zentrifugieren.
- 4) Bakterienpellet wird in 567 µl TE-Puffer aufnehmen.
- 5) 30 µl 10 % SDS und 12 µl Proteinase K (5 mg/ml) zugeben und die Proben durchmischen.
- 6) Eine Stunde bei 37 °C inkubieren.
- 7) 100 µl 5 M NaCl zugegeben und gut durchmischen.
- 8) 80 µl CTAB/NaCl-Lösung zugegeben und gut durchmischen.
- 9) Für 10 Minuten bei 65 °C inkubieren.
- 10) 750 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) zugeben und durch mehrfaches Invertieren mischen.
- 11) 5 Minuten bei 13.000 rpm in einer Tischzentrifuge unter dem Abzug zentrifugieren (Raumtemperatur).
- 12) Die wässrige obere Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführen.
- 13) 0,6 Volumen Isopropanol zugeben.
- 14) 5 Minuten bei 13.000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugieren (Raumtemperatur), Überstand verwerfen.
- 15) Pellet in 1 ml 70 % Ethanol waschen und 5 Minuten bei 13.000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugieren (Raumtemperatur), Überstand verwerfen.
- 16) DNA-Pellet in der SpeedVac trocknen und in 100 µl TE-Puffer aufnehmen.

Benötigte Lösungen

5M NaCl

CTAB/NaCl-Lösung:

- 4,1 g NaCl in 80 ml H₂O lösen.
- 10 g CTAB langsam unter Erhitzen bis 65 °C zugeben.
- ad 100 ml Reinstwasser

TE-Puffer

- 10 mM Tris-HCl (pH 7,4)
- 1 mM EDTA (pH 8,0)

10 % SDS

Proteinase K (5 mg/ml)

Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)

Isopropanol

70 % Ethanol

9.8.5 *in vitro* Transkription

- 1) Durchführung einer PCR-Reaktion mit *proof reading* DNA-Polymerase für ein PCR-Produkt mit T7-Promotor (kann über einen Primer angefügt werden). Alternativ: Plasmid mit PCR-Produkt und T7-Promotor in 3' Richtung des PCR Produkts schneiden (*run off in vitro* Transkription).
- 2) Aufreinigung von PCR-Produkt bzw. Plasmid über Agarosegel und folgende Gelextraktion.
- 3) *in vitro* Transkriptionsreaktion ansetzen.

Reaktionsansatz

Roth-H ₂ O	. x µl
DNA (PCR-Fragment mit T7-Promotor)	1-3 µl
10x T7 Puffer (NEB)	2 µl
rNTPs (jeweils 25 mM)	2 µl
100 mM MgCl ₂	1.2 µl
100 mM DTT	1 µl
RNasin (40 U/µl; Fermentas)	0.5 µl
T7 RNA Polymerase (NEB)	0.8 µl
	<hr/>
	Σ 20 µl

- Komponenten in der angegebenen Reihenfolge pipettieren
 - alles bei Raumtemperatur pipettieren
- 4) Inkubation bei 37 °C für 2 bis 3 Stunden (während der Inkubation erneut durchmischen).
 - 5) 180 µl Reinstwasser (Carl Roth) zugeben.
 - 6) 200 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) zugeben und durch mehrfaches Invertieren mischen.
 - 7) 5 Minuten bei 13.000 rpm in einer Tischzentrifuge unter dem Abzug zentrifugieren (Raumtemperatur).
 - 8) Die wässrige obere Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführen.
 - 9) 2,5 Volumen 95 % Ethanol und 1/10 Volumen Natriumacetat (pH 4,5) zugeben und für 2 Stunden bei -20 °C inkubieren.
 - 10) 30 Minuten bei 13.000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugieren (Raumtemperatur), Überstand verwerfen.
 - 11) Pellet in 1 ml 70 % Ethanol waschen und 5 Minuten bei 13.000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugieren (Raumtemperatur), Überstand verwerfen.
 - 12) DNA-Pellet in der SpeedVac trocknen und in 100 µl TE-Puffer aufnehmen.

Anzusetzende Lösungen

Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol
(25:24:1)

100 mM MgCl₂

100 mM DTT

rNTPs

25 mM ATP
25 mM CTP
25 mM GTP
25 mM UTP

Natriumacetat (pH 4,5)

70 % Ethanol

9.8.6 Plasmid-Minipräparation nach dem Prinzip der alkalischen Lyse

- 1) 2 ml Bakterienkultur bei Raumtemperatur zentrifugieren (6000 rpm, 5 min).
- 2) Überstand verwerfen.
- 3) Pellets in 200 µl Lösung I (versetzt mit RNase A) resuspendieren.
- 4) 200 µl Lösung II zugeben und durch wiederholtes Invertieren mischen.
- 5) Bei Raumtemperatur für 5 min inkubieren.
- 6) 200 µl Lösung III zugeben und durch wiederholtes Invertieren mischen.
- 7) Für 15 min auf Eis inkubieren.
- 8) Zentrifugieren (13000 rpm, 4 °C, 10 min).
- 9) Überstand (~ 450 µl) in neue „Eppis“ überführen.
- 10) (Empfohlen) Für eine bessere Qualität Schritte 9) und 10) wiederholen.
- 11) Überstand mit 1/10 Volumen Natriumacetat (3 M, pH 5.2) und 2,5x Volumen 95 % Ethanolversetzen und gut durchmischen.
- 12) (Empfohlen) Für 2 Stunden bei -20 °C inkubieren für eine bessere Ausbeute.
- 13) Zentrifugieren (13000 rpm, 4 °C, 30 min).
- 14) Pellet in 1 ml 70 % Ethanol waschen und 5 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugieren.
- 15) DNA-Pellet in der SpeedVac trocknen und in 50 µl Reinstwasser aufnehmen.

Anzusetzende Lösungen**Resuspensionspuffer (Lösung I)**

50 mM Glucose
25 mM Tris pH 8
10 mM EDTA pH 8
→ bei 4 °C lagern
→ 1 ml Lösung I nach Bedarf frisch mit
2-4 µl RNaseA (100 mg/ml) versetzen

3 M Natriumacetat pH 5,2

Lysepuffer (Lösung II)

200 mM NaOH
1 % SDS
→ frisch ansetzen, bei RT lagern
(SDS fällt auf Eis aus)

SDS-Fällungspuffer

3 M Kaliumacetat
2 M Essigsäure
→ bei 4 °C lagern

9.8.7 Extraktion von DNA aus Agarosegelen über eine Glaswollematrix

- 1) Ausschneiden des gewünschten Gelstreifens mit dem gewünschten DNA-Fragment.
- 2) Gelstreifen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß geben und mindestens 2 Minuten in flüssigem Stickstoff einfrieren.
- 3) Das „Eppi“ mit dem ausgeschnittenen Gelstreifen aus dem Stickstoff nehmen, den Gelstreifen mit Hilfe eines Skalpell zerkleinern und auf das „Durchflusssäulchen“ geben.
- 4) Zentrifugieren bei 8000 rpm für 10 Minuten (Raumtemperatur) in der Tischzentrifuge.
- 5) Durchflusssäulchen mit den Gelresten verwerfen und die im 2 ml „Eppi“ aufgefangene Flüssigkeit mit einem Volumen Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) versetzen.
- 6) 5 Minuten bei 13.000 rpm in einer Tischzentrifuge unter dem Abzug zentrifugieren (Raumtemperatur).
- 7) Die wässrige obere Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführen.
- 8) 0,6 Volumen Isopropanol und 1/10 Volumen Natriumacetat (pH 5,2) zugeben.
- 9) 30 Minuten bei 13.000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugieren (Raumtemperatur), Überstand verwerfen.
- 10) Pellet in 1 ml 70 % Ethanol waschen und 5 Minuten bei 13.000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugieren (Raumtemperatur), Überstand verwerfen.
- 11) DNA-Pellet in der SpeedVac trocknen und in einem geeigneten Volumen Wasser (~10 µl) aufnehmen.

Benötigte Lösungen und Materialien

„Durchflusssäulchen“

Silanisierte Glaswolle

0,5 ml „Eppi“

2 ml „Eppi“

Bunsenbrenner

Spritzenkanüle

→Spritzenkanüle mit Bunsenbrenner erhitzen und ein 1 mm Loch in den Boden eines 0,5 ml „Eppis“ schmelzen, danach das „Eppi“ zu ca .1/3 fest mit silanisierter Glaswolle füllen, den Deckel des „Eppis“ entfernen und in ein 2 ml „Eppi“ stellen.

Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1)

3 M Natriumacetat (pH 5,2)

Isopropanol

9.8.8 Extraktion von RNA aus Acrylamidgelen

- 1) Gelstreifen mit den gewünschten Nukleinsäurefragmenten aus Gel ausschneiden und in 2 ml „Eppi“ geben.
- 2) 1 ml Elutionspuffer zugeben.
- 3) „Eppis“ bei 20 °C inkubieren bis der Elutionspuffer durchgefroren ist.
- 4) „Eppis“ erwärmen bis der Elutionspuffer aufgetaut ist.
- 5) Schritte 3) und 4) mehrfach wiederholen.
- 6) (Optional) Um die Elutionseffizienz zu erhöhen „Eppis“ über Nacht bei 4 °C unter langsamer Rotation inkubieren.
- 7) Elutionspuffer in ein frisches 1,5 ml „Eppi“ überführen (Gelreste verwerfen oder für zweite Elution nutzen).
- 8) Aufgefängene Flüssigkeit mit einem Volumen Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) versetzen.
- 9) 5 Minuten bei 13.000 rpm in einer Tischzentrifuge unter dem Abzug zentrifugieren (Raumtemperatur).
- 10) Die wässrige obere Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführen.
- 11) 0,6 Volumen Isopropanol und 1/10 Volumen Natriumacetat (pH 4,5) zugeben.
- 12) 30 Minuten bei 13.000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugieren (Raumtemperatur), Überstand verwerfen.
- 13) Pellet in 1 ml 70 % Ethanol (-20 °C) waschen und 5 Minuten bei 13.000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugieren (Raumtemperatur) und Überstand verwerfen.
- 14) RNA-Pellet in der *SpeedVac* trocknen und in einem geeigneten Volumen Wasser (~30 µl) aufnehmen.

Benötigte Lösungen

Elutionspuffer

3 M Natriumacetat pH 4,5

70 % Ethanol (-20 °C)

Isopropanol

Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1)

9.8.9 Radioaktive Markierung von Oligonukleotidsonden mit γ -ATP³² unter Nutzung der T4-Polynukleotidkinase

- 1) Oligonukleotid auf 10 pmol/ μ l verdünnen.
- 2) Markierungsreaktion ansetzen.

Reaktionsansatz

Oligo/Primer (10 pmol/ μ l)	2 μ l
Roth-H ₂ O	3 μ l
T4 PNK Puffer (10x)	1 μ l
T4 PNK	1 μ l
γ -ATP ³² (30 μ Ci)	3 μ l
	Σ 10 μ l

- 3) Bei 37 °C für eine Stunde inkubieren.
- 4) 40 μ l STE-Puffer zugeben
- 5) Aufreinigen des Labeling-Ansatzes über ein G-25 Säulchen (GE Healthcare).
- 6) CPM (counts per minute) in 2 μ l bestimmen und gewünschte Menge an Sonde für die Hybridisierung nutzen.

Benötigte Lösungen

1x STE-Puffer

10 mM Tris-HCl,
1 mM EDTA
100 mM NaCl

9.8.10 *in vitro* Transkription mit α -UTP³² zur Herstellung markierten Transkripten

- 1) Durchführung einer PCR-Reaktion mit *proof reading* DNA-Polymerase für ein PCR-Produkt mit T7-Promotor (kann über einen Primer angefügt werden). Alternativ: Plasmid mit PCR-Produkt und T7-Promotor in 3' Richtung des PCR Produkts schneiden (*run off in vitro* Transkription).
- 2) Aufreinigung von PCR-Produkt bzw. Plasmid über Agarosegel und folgende Gelextraktion.
- 3) *in vitro* Transkriptionsreaktion ansetzen.

Reaktionsansatz

Roth-H ₂ O	. x μ l
DNA (PCR-Fragment mit T7-Promotor)	1-3 μ l
10x T7 Puffer (NEB)	2 μ l
low U rNTPs (ATP,CTP, GTP: 25 mM each, UTP: 5mM)	1.6 μ l
100 mM MgCl ₂	1.2 μ l
100 mM DTT	1 μ l
RNasin (40 U/ μ l; Fermentas)	0.5 μ l
T7 RNA Polymerase (NEB)	0.8 μ l
α -UTP ³² (~ 20 μ Ci)	2 μ l
	Σ 20 μ l

- Komponenten in der angegebenen Reihenfolge pipettieren
 - alles bei Raumtemperatur pipettieren.
- 4) Inkubation bei 37 °C für 2 bis 3 Stunden (während der Inkubation erneut durchmischen).
 - 5) 30 μ l STE-Puffer zugeben.
 - 6) Aufreinigung über G-25 *spin column* (GE-Healthcare) um nicht inkorporierte Nukleotide zu entfernen.
 - 7) Über denaturierendes präparatives Acrylamidgel auftrennen.
 - 8) Gel auf Röntgenfilm exponieren und Röntgenfilmentwickeln.
 - 9) Mit Hilfe des Röntgenfilms gewünschte Banden aus dem Gel ausschneiden.
 - 10) *in vitro* Transkripte eluieren und aufreinigen (siehe Protokoll: Extraktion von RNA aus Acrylamidgelen).
 - 11) CPM in 2 μ l bestimmen und wenn nötig Konzentration in pM/ μ l berechnen.

Anzusetzende Lösungen

1x STE-Puffer

10mM Tris-HCl,
1mM EDTA
100mM NaCl

100 mM MgCl₂

100 mM DTT

low U rNTPs

25 mM ATP
25 mM CTP
25 mM GTP
5 mM UTP

9.8.11 Polyacrylamid -Gele für sRNAs

Polyacrylamid-Harnstoff-Gele für sRNAs

- 1) Gel ansetzen und Harnstoff bei Raumtemperatur lösen lassen (~15-30 Minuten)

Gel-Ansatz

Harnstoff	16.8 g (final 7 M)
10x TBE	4 ml (final 1x)
Acrylamid/Bisacrylamid (40 %)	10 ml (final 10 %)
	ad 40 ml ddH ₂ O

- 2) In der Zwischenzeit Glasplatten gründlich säubern und entfetten (1x normale Glasplatte, 1x Ohrenplatte (nach dem Reinigen gründlich silanisieren), je 20 x 20 cm) und mit Spacern (Dicke 1 mm für Northern Blot und Ethidiumbromidfärbung, 0,2 mm für EMSAs und Aufreinigungen) zusammenbauen. Optional: Abdichten mit Agarose.
- 3) Wenn der Harnstoff vollständig gelöst ist 120 µl APS (10 %) und 20 µl TEMED zugeben, und das Gel zügig gießen (Gel waagrecht legen und zum Gießen leicht anschrägen). Dann Kamm stecken und Gel waagrecht auspolymerisieren lassen.
- 4) Die gewünschte Menge RNA (mindestens 1 µg für eine Ethidiumbromid-Färbung; mindestens 5 µg für eine *Northern Blot* Hybridisierung) mit FU-Mix mischen und für 10 min bei 65 °C inkubieren (ca. 7 µl FU-Mix auf 10 µl RNA-Lösung). Danach die Proben bis zum Beladen des Gels wieder auf Eis stellen.
- 5) Wenn das Gel auspolymerisiert ist, aufbauen und die Taschen gründlich spülen.
- 6) Proben auf Gel auftragen.
- 7) Gellauf: 1x TBE
100 V 10 min
300 V ~bis Bromphenolblau ausfäuft

Native Gele für sRNAs

Die Durchführung entspricht Polyacrylamid-Harnstoff-Gelen, wobei kein Harnstoff zur Denaturierung zugegeben wird und die Proben nicht in FU-Mix erhitzt werden sondern in einem nicht denaturierenden Ladepuffer aus TBE-Puffer, Glycerin, Bromphenolblau und Xylencyanol aufgenommen werden.

Anzusetzende Lösungen

<u>FU-Mix</u>		<u>10x TBE-Puffer (pH 8,3)</u>
Harnstoff	6 M	890 mM Tris
deionisiertes Formamid	80 %	890 mM Borat
10x TBE	10 %	25 mM EDTA
Bromphenolblau	0.1 %	
Xylencyanol	0.1 %	

9.8.12 Transfer von RNA aus einem Polyacrylamid-Harnstoff-Gel auf eine Nylon-Membran

- 1) RNA-Auftrennung über Polyacrylamid-Harnstoff-Gel
- 2) Während des Gellaufs den Transfer durch Elektroblothing vorbereiten.
 - Gelbereich ausmessen, der transferiert werden soll
 - 1x Nylon-Membran etwas größer als das Gel ausschneiden
 - 6x Whatmanpapier in der Größe der Nylon-Membran ausschneiden
- 3) Wenn das Gel ausreichend weit gelaufen ist Elektroblothing starten.
 - 3x Whatmanpapier mit 1x TBE anfeuchten übereinander auf die Anodenplatte des Elektroblothers (PeqLab) legen.
 - Nylon-Membran ebenfalls mit 1x TBE anfeuchten und auflegen
 - Gel auf der Membran platzieren
 - 3x Whatmanpapier mit 1x TBE anfeuchten und übereinander auf das Gel legen
 - Überprüfen, dass keine Luftblasen vorhanden sind
 - Kathodenplatte auflegen
- 4) Transfer bei 250 mA für 2-3 Std.
- 5) Blotter abbauen und direkt RNA auf Nylonmembran crosslinken (2x Auto-Crosslink-Funktion)
- 6) ;Membran in Whatmanpapier einschlagen und bei Raumtemperatur lagern.

Anzusetzende Lösungen

10x TBE-Puffer (pH 8,3):

890 mM Tris
890 mM Borat
25 mM EDTA

9.8.13 Northern Blot Hybridisierung basierend auf einem salinen Natriumcitratpuffersystem für Oligonukleotidsonden ~20 nt

- 1) RNA-Auftrennung über Polyacrylamid-Harnstoff-Gel
- 2) Transfer auf Nylon-Membran
- 3) Prähybridisierungslösung ansetzen

Prähybridisierungslösung

DEPC-H ₂ O	17.4 ml
50x Denhardt's	1.5 ml
SDS 10 %	1.5 ml
20x SSC	9.0 ml
Lachsspermien DNA	0.6 ml (bei 100 °C für 5 min aufkochen)
	Σ 30 ml

- 4) Prähybridisierung in Hybridisierungsöfen für mindestens 2 Stunden mit einer Temperatur angepasst an die Schmelztemperatur der zu hybridisierenden Oligonukleotidsonde.
- 5) Hybridisierungslösung mit Oligonukleotidsonde ansetzen

Hybridisierungslösung

DEPC-H ₂ O	18.9 ml
SDS 10 %	1.5 ml
20x SSC	9.0 ml
Lachsspermien DNA	0.6 ml (mit Oligonukleotidsonde bei 100 °C für 5 min aufkochen)
	Σ 30 ml

- 6) Hybridisierung in Hybridisierungsöfen über Nacht mit einer Temperatur angepasst an die Schmelztemperatur der zu hybridisierenden Oligonukleotidsonde.
- 7) Waschen der Membran mit Waschlösung.

Benötigte Lösungen und Materialien

20x SSC

3 M NaCl
300 mM Trinatriumcitrat
pH 7,3

10 % SDS

50x Denhardt's-Lösung

P³² markierte Oligonukleotidsonde

DEPC-H₂O

9.8.14 Northern Blot Hybridisierung basierend auf dem Phosphatpuffersystem nach Church and Gilbert

- 1) RNA-Auftrennung über Polyacrylamid-Harnstoff-Gel
- 2) Transfer auf Nylon-Membran
- 3) Hybridisierungslösung ansetzen:

	Stringenz		
	Niedrig (kurze Sonden)	Moderat (ca. 100 nt)	Hoch (PCR Sonden)
<u>BSA</u>	<u>1 g</u>	<u>1 g</u>	<u>1 g</u>
<u>H₂O</u>	<u>15 ml</u>		<u>30 ml</u>
<u>10x Natriumphosphat-Puffer</u>	<u>50 ml</u>	<u>50 ml</u>	<u>20 ml</u>
<u>Formamid</u>	-	<u>15 ml</u>	<u>15 ml</u>
<u>EDTA (0,5 M, pH 8,0)</u>	<u>0,2 ml</u>	<u>0,2 ml</u>	<u>0,2 ml</u>
<u>20 % SDS</u>	<u>35 ml</u>	<u>35 ml</u>	<u>35 ml</u>

- 4) Prähybridisierung in 20 ml Lösung in Hybridisierungssofen für mindestens eine Stunde bei einer Temperatur von 42 °C.
- 5) Sonde zugeben.
- 6) Hybridisierung in Hybridisierungssofen über Nacht bei einer Temperatur von 42 °C.
- 7) Sonde Waschen in vorgewärmter Waschlösung (42 °C) waschen (wenn nötig mehrfach für 30 Sekunden):

	Stringenz		
	Niedrig (kurze Sonden)	Moderat (ca. 100 nt)	Hoch (PCR Sonden)
<u>20X SSC</u>	<u>200 ml</u>	<u>20 ml</u>	<u>20 ml</u>
<u>20% SDS</u>	<u>100 ml</u>	<u>10 ml</u>	<u>10 ml</u>
<u>H₂O</u>	<u>1700 ml</u>	<u>1970 ml</u>	<u>1970 ml</u>

Benötigte Lösungen und Materialien

20x SSC

3 M NaCl
300 mM Trinatriumcitrat
pH 7,3

BSA

10x Natriumphosphatpuffer pH 7,2

500 mM Na₂HPO₄·7 H₂O (134 g)
0,34 % H₃PO₄ (3ml 85% H₃PO₄)
Ad. 1 l H₂O

P³² markierte Oligonukleotidsonde

EDTA (0,5 M, pH 8,0)

Formamid

20 % SDS

DEPC-H₂O

9.8.15 Allgemeine PCR-Beschreibungen

KOD Hot Start DNA Polymerase

20 µl Reaktion:

H ₂ O	12.2 µl
10x Puffer	2.0 µl
MgSO ₄ (25 mM)	1.2 µl
dNTPs (2 mM each)	2.0 µl
Primer-A (10 µM)	0.6 µl
Primer-B (10 µM)	0.6 µl
DNA (50 ng/µl)	1.0 µl
KOD DNA Polymerase (1 U/µl)	0.4 µl
	Σ 20.0 µl

Temperaturprogramm

95 °C	2	min	}	30 Zyklen
95 °C	20	sec		
XY °C	10	sec		
70 °C	XY	sec		
70 °C	10	min		
8 °C	∞			

Phusion DNA Polymerase

20 µl Reaktion:

H ₂ O	12.2 µl
10x Puffer	2.0 µl
MgSO ₄ (25 mM)	1.2 µl
dNTPs (2 mM each)	2.0 µl
Primer-A (10 µM)	0.6 µl
Primer-B (10 µM)	0.6 µl
DNA (50 ng/µl)	1.0 µl
KOD DNA Polymerase (1 U/µl)	0.4 µl
	Σ 20.0 µl

Temperaturprogramm

95 °C	2	min	}	30 Zyklen
95 °C	20	sec		
XY °C	10	sec		
70 °C	XY	sec		
70 °C	10	min		
8 °C	∞			

9.8.16 Gerichtete Mutagenese von Plasmiden mittels PCR

- 1) „Gegenläufige“ Primer mit Nukleotidaustausch für Rundlauf um das Plasmid erstellen.
- 2) Mutagenese PCR mit Phusion-DNA-Polymerase

Reaktionsansatz-PCR

PCR-H ₂ O	25,2 µl	
5x HF	8,0 µl	
dNTPs	0,8 µl	
PrimerA	0,8 µl	
PrimerB	0,8 µl	
Phusion	0,4 µl	
Template*	4,0 µl	*Minipräp-Plasmid 1:10 verdünnt

Temperaturprogramm

98 °C	30	sec	} 30 Zyklen
98 °C	10	sec	
60-X °C	20	sec	
72 °C	60	sec	
72 °C	10	min	
8 °C	∞		

- 3) 5 µl auf Gel anschauen
- 4) Restlichen Ansatz Verdauen mit DpnI um ausschließlich PCR-Produkt zu behalten.

Reaktionsansatz-DpnI-Verdau

~35 µl PCR
 9 µl H₂O
 5 µl Puffer
 1 µl DpnI

- 5) Für 2 Stunden bei 37 °C inkubieren.
- 6) Gelaufreinigung über präparatives Gel und QIAQUICK PCR PURIFICATION KIT (Qiagen) (Elution mit 20-30 µl Elutionspuffer EB).
- 7) 3 µl auf Gel anschauen.
- 8) 5-10 µl transformieren in JM109 und kompletten Transformationsansatz ausplattieren auf Stl +Antibiotikum.