JUSTUS-LIEBIG-
UNIVERSITÄT
GIESSEN

Multiple Funktionen des SAM-II Riboswitches in *Sinorhizobium meliloti*

Multiple functions of the SAM-II Riboswitch in *Sinorhizobium meliloti*

Inaugural Dissertation

zur

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

vorgelegt von
Robina Scheuer

angefertigt am Institut für Mikrobiologie und
Molekularbiologie Fachbereich Biologie und Chemie
Justus-Liebig-Universität Gießen
Gießen, März 2023

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie des Fachbereichs Biologie und Chemie der Justus-Liebig-Universität Gießen in der Zeit von September 2018 bis März 2023 unter der Leitung von Apl. Prof. Dr. Elena Evguenieva-Hackenberg angefertigt.

1. Gutachterin: Apl. Prof. Dr. Elena Evguenieva-Hackenberg
Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie
Justus-Liebig-Universität Gießen

2. Gutachter: Prof. Dr. Roland Hartmann
Institut für Pharmazeutische Chemie
Philipps-Universität Marburg

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt zu haben, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Ort, Datum	Robina Scheuer

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis I

Zusammenfassung IV

Abstract V

1. Einleitung 1

1.1 Transkriptionelle Genregulation 1

1.2 Posttranskriptionelle Genregulation 2

1.2.1 RNA Prozessierung und Degradation 2

1.3 Regulatorische RNAs 4

1.3.1 *Cis*-kodierte antisense sRNAs 5

1.3.2 *Trans*-kodierte antisense sRNAs 6

1.3.3 Attenuation 8

1.3.4 Riboswitches 8

1.3.4.1 SAM-II Riboswitch 12

1.4 *Sinorhizobium meliloti* 13

1.5 Zielsetzung 14

2 Ergebnisse 15

2.1 Vorhersage der Rolle der SAM-II Riboswitches in den *metZ* und *metA* 5'-UTRs 15

2.2 SAM-II Riboswitch sRNAs 19

2.3 Etablierung eines RNA *spike-ins* als externe Kontrolle für RT-qPCR Analysen 21

2.4 Riboswitch sRNA und mRNA Mengen in Vollmedium- und Minimalmedium-Kulturen 24

2.5 Korrelation zwischen SAM-Konzentration und Abundanz der Riboswitch sRNA und *metZ* und *metA* mRNA 26

2.6 Stabilisierung der SAM-II Riboswitch enthaltenden sRNAs und mRNAs in Vollmedium-Kulturen 30

2.7 Untersuchungen zur Transkription von *metZ* und *metA* 32

2.8 Vorläufige Transkriptionstermination von *metA* 35

2.9 Untersuchung der Translationsinitiation von *metA* 37

2.10 Wirkung des SAM-II Riboswitches auf *metA* mRNA 44
2.11 Untersuchung das Stammes *S. meliloti* 2011 ΔRA 46
2.12 Versuche zum Einfluss des SAM-II Riboswitches auf den Terminator in der 5'-UTR von *metA* 49
3 Diskussion 52
3.1 Regulation der *metZ* und *metA* Expression auf Promotorebene 52
3.2 Neuer *standby* Mechanismus in der *metA* Translation 54
3.3 Funktionen der SAM-II Riboswitches von *metZ* und *metA* 58
3.3.1 Vorhergesagte Funktionen und Validierung der Auswirkung des *metA* Riboswitches auf die Translation 58
3.3.2 Mögliche Auswirkung des *metA* Riboswitches auf den Transkriptionsterminator 60
3.3.2 Zusätzliche, konträre Funktion des SAM-II Riboswitches 64
3.4 Riboswitch sRNA 66
4 Material 69
4.1 Bakterienstämme 69
4.2 Plasmide 69
4.3 Oligonukleotide 73
4.4 Größenstandards 82
4.5 Molekularbiologische Reagenzien und Kits 82
4.6 Enzyme 83
4.7 Geräte und Ausrüstung 83
4.8 Antibiotika 84
4.9 Chemikalien 84
5 Methoden 86
5.1 Sterilisation 86
5.2 Kultivierung und Haltung von Bakterienstämmen 86
5.3 Transformation von chemisch kompetenten *E. coli* Zellen 88
5.4 Konjugation von Plasmiden von *E. coli* in *S. meliloti* 88
5.5 Konstruktion des Stammes *S. meliloti* 2011 *FLAG-metK* 89

5.6 Konstruktion des Stammes *S. meliloti* 2011 ΔRA 89
5.7 Bestimmung der Zelldichte 90
5.8 Mikroskopie 90
5.9 Bestimmung des Nassgewichts 90
5.10 RNA Stabilitätsbestimmung 91
5.11 SAM Depletionstest 91
5.12 Fluoreszenzmessung 92
5.13 Bestimmung des intrazellulären SAM-Niveaus 93
5.14 Quantifizierung von Nukleinsäuren 93
5.15 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) 93
5.16 Agarosegelelektrophorese 95
5.17 Ortsspezifische Mutagenese von Plasmid-DNA 96
5.18 DNA Aufreinigung 96
5.19 DNA Restriktion 97
5.20 Hybridisierung von komplementären Oligonukleotiden 97
5.21 DNA Ligation 98
5.22 Sequenzierung 99
5.23 Isolation von Plasmid DNA aus *E. coli* 99
5.24 Plasmid Konstruktion 100
5.25 Polyacrylamid-Harnstoff-Gelelektrophorese 102
5.26 T7-*in-vitro* Transkription 103
5.27 RNA-Isolation 104
5.26.1 RNA-Isolation mittels TRIZol (modifizierte TRIZol Prozedur) 104
5.26.2 RNA-Isolation mittels heißen Phenols 105
5.26.4 RNA Isolation mittels RNeasy Mini Kits (Qiagen) 106
5.27 DNase Verdau 106
5.28 Northern Blot Hybridisierung 107
5.29 Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden 109
5.30 Bestimmung von sRNA Größen 109
5.31 Echtzeit (*real time*) Quantitative PCR (RT-qPCR) 110

5.32 Bestimmung des relativen Verhältnisses Ribosomen-gebundener und -nicht-gebundener RNA 112

5.33 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelektrophorese (SDS-PAGE) 115

5.34 Coomassie-Färbung 117

5.35 Semi-dry Western Blot 117

5.36 Statistik 118

Literaturverzeichnis 119

Anhang 138

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µ	mikro
Abb.	Abbildung
Abs	Absorption
AdoCbl	Adenosylcobalamin
APS	Ammoniumpersulfut
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
bzw.	Beziehungsweise
c-di-GMP	zyklisches dimeres Guanisnmonophophat
cDNA	complementary DNA
Ci	Curie
C-Terminus	Carboxyl-Terminus
CTP	Cytosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyriblonuklease
dNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	*enhancend green fluorescent protein*
et al.	et altera (und andere)
FMN	Flavinmononukleotid
g	Gramm
GMS	Natriumglutamat-Mannitol-Salz
IP	Immunopräzipitation
IPTG	Isopropyl-ß-D-thiogalactopyranosid
i.v.	*in vitro*

kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	*lysogeny broth*
LSD	Lachssperma-DNA
M	Molar
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mol	Basiseinheit der Stoffmenge
mRNA	messenger RNA
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nt	Nukleotide
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	Optische Dichte
ORF	*open reading frame*
P	Promotor
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	polymerase chain reactionII
PNK	Polynukleotidkinase
Tab.	Tabelle
TY	*tryptone-yeast*
u.a.	unter anderem
qRT	Quantitative Real Time
RBS	Ribosomenbindestelle
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	*revolutions per minute*
rRNA	ribosomale RNA

rS1	ribosomales Protein S1
SAM	S-Adenosylmethionin
SD	Shine-Dalgarno Sequenz
SDS	Natriumlauryylsulfat
Sec	Sekunde
Seq	Sequenzierung
sRNA	small RNA
U	Uridin
UTR	untranslatierte Region
UV	ultraviolett
T	Zeitpunkt
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED T	etramethylendiamin
Tris	Trishydoxymethlaminomethon
tRNA	transfer RNA
TSS	*transcriptional start site*
V	Volumen
v/v	Volumen/Volumenverhältnis
W	Watt
w/v	Gewichts/Volumenverhältnis
WT	Wildtyp
Δ	Deletion

Zusammenfassung

In *Sinorhizobium melitloti* besitzen die Methioninbiosynthesegene *metZ* und *metA* in der 5' nicht translatierten Region S-Adenosyl-L-Methionin (SAM) Riboswitches der Klasse II. In dieser Arbeit wurde die Rolle der SAM-II Riboswitches in der Regulation der *metZ* und *metA* Expression untersucht. Zuerst wurde mit bioinformatischer Strukturmodellierung vorhergesagt, dass nach SAM-Bindung der *metZ* Riboswitch einen Rho-unabhängigen Terminator bildet. Als Konsequenz wird die Transkription vorzeitig beendet und dabei wird die sRNA RZ generiert. Für den *metA* Riboswitch wurde eine translationale Regulation, durch die Kontrolle der Zugänglichkeit der Shine-Dalgarno (SD)1 Sequenz des putativen Startcodons AUG1, vorhergesagt. Jedoch befindet sich 69 nt stromabwärts, im Leserahmen von AUG1, ein weiteres AUG (AUG2) mit möglichen SD Sequenzen (SD2 und SD3). Zudem wurde zwischen AUG1 und AUG2 ein Rho-unabhängiger Transkriptoinsterminator vorhergesagt und mit Hilfe von *egfp*-Reporterfusionen experimentell validiert. Die Ergebnisse zeigen, dass dieser Terminator die *metA* Expression stark begrenzt. Dabei entsteht die sRNA RA1, die wahrscheinlich weiter zur sRNA RA2 prozessiert wird. Verglichen mit Bedingungen niedriger intrazellulärer SAM-Konzentration (Wachstum in Minimalmedium, MM), waren unter Bedingungen hoher SAM-Konzentration (Wachstum im reichen TY-Medium) die SAM-II Riboswitch enthaltende sRNAs, RZ und RA2, abundanter, während die Menge der *metZ* und *metA* mRNAs niedriger war. Außerdem wurde gezeigt, dass generell in der Zelle die sRNAs weitaus abundanter vorkommen als ihre zugehörigen mRNAs. Im Vergleich zu MM-Kulturen war die Stabilität der SAM-II Riboswitch enthaltenden sRNAs und mRNAs in TY-Kulturen höher, während die Aktivität der *metZ*- und *metA*- Promotoren niedriger war.

Mit *egfp*-Reporterfusionen wurde auch nachgewiesen, dass die Translation von *metA* am AUG2 beginnt und für eine effiziente Translation SD1 (unmittelbar stromabwärts des Riboswitches) sowie SD2 und SD3 (vor AUG2) relevant sind. Somit werden bei diesem neuen Translationsinitiationsmechanismus Ribosomen erst an die SD1 (*standby* Region) gebunden, um die Translation 69 nt stromabwärts zu initiieren. Mittels einer Mutation in der SAM-Bindetasche in einer Reporterfusion wurde die Rolle des *metA* Riboswitches weiter untersucht. Die Ergebnisse legen nahe, dass der Riboswitch im SAM-gebundenen Zustand die Zugänglichkeit der SD1 negativ reguliert und gleichzeitig die mRNA stabilisiert. Wahrscheinlich gewährleistet diese duale konträre Regulation durch den SAM-II Riboswitch ein basales *metA* mRNA-Niveau bei schnell wechselnden Umweltbedingungen und trägt so zur SAM-Homöostase bei.

Abstract

In *Sinorhizobium melitloti*, the methionine biosynthesis genes *metZ* and *metA* harbor in the 5' untranslated region S-adenosyl-L-methionine (SAM) riboswitches of the class II. In this work, the role of SAM-II riboswitches in the regulation of *metZ* and *metA* expression was investigated. First, bioinformatic structural modeling was used to predict that after SAM binding, the *metZ* riboswitch forms a Rho-independent terminator. As a consequence, transcription is terminated prematurely and the the sRNA RZ is generated. For the *metA* Rboswitch, translational regulation was predicted, by controlling the accessibility of a Shine-Dalgarno (SD)1 sequence upstream of a putative start codon AUG1. However, 69 nt downstream, in the reading frame of AUG1, another AUG (AUG2) with possible SD sequences (SD2 and SD3) is present. Moreover, between AUG1 and AUG2, a Rho-independent transcriptional terminator was predicted and experimentally validated using *egfp* reporter fusions. The results show that this terminator strongly limits *metA* expression, giving rise to the sRNA RA1, which is probably processed to the sRNA RA2. Compared with conditions of low intracellular SAM concentration (growth in minimal medium, MM), under conditions of high SAM concentration (growth in rich TY-Medium), the SAM-II riboswitch-containing sRNAs RZ and RA2 were more abundant, whereas the amount of the *metZ* and *metA* mRNAs was lower. It was also shown that in general, the sRNAs were much more abundant in the cell than their corresponding mRNAs. Compared with MM cultures, the stability of SAM-II riboswitch-containing sRNAs and mRNAs was higher in TY cultures, whereas the activity of *metZ* and *metA* promoters was lower.

Using *egfp* reporter fusions, it was also demonstrated that the translation of *metA* starts at AUG2 and that SD1 (immediately downstream of the riboswitch) and SD2 and SD3 (upstream of AUG2) are relevant for efficient translation. Thus, in this novel translation initiation mechanism, ribosomes are first bound to SD1 (standby region) to initiate translation 69 nt downstream. Using a mutation in the SAM binding pocket in a reporter fusion, the role of the *metA* riboswitch was further investigated. The results suggest that the riboswitch negatively regulates SD1 accessibility in the SAM-bound state while stabilizing the mRNA. This dual contrary regulation by the SAM-II riboswitch likely ensures basal *metA* mRNA levels under rapidly changing environmental conditions, contributing to SAM homeostasis.

1. Einleitung

Bakterien sind ständig wechselnden Umweltbedingungen ausgesetzt und können deshalb schnell auf externe und interne Stimuli reagieren. Dabei werden zur Anpassung der Genexpression Signale erfasst und über ein hierarchisches Netzwerk weitergeleitet (Goudreau und Stock 1998; Samal und Jain 2008). Die Änderung der Genexpression kann auf verschiedenen Ebenen stattfinden. Eine zentrale Rolle spielt die Regulation der Initiierung der Transkription am Promotor und somit die Aktivität des Promotors (transkriptionelle Ebene). In Bakterien ist die Transkription nicht räumlich und zeitlich von der Translation getrennt, wie in Eukaryoten. Aus diesem Grund hat die posttranskriptionelle Ebene mit regulatorischen RNA-Elementen in der naszierenden RNA eine große Bedeutung bei der Genregulation in Bakterien (López-Maury et al. 2008; Hör et al. 2018).

1.1 Transkriptionelle Genregulation

Für die allgemeine Fitness (Wachstum und Stressantwort) von Bakterien sind auf transkriptioneller Ebene die maßgeblichen Schritte der Regulation die Promotorerkennung und die Initiierung der Transkription (Browning und Busby 2004). Der Proteinkomplex, welches an die DNA bindet und RNA synthetisiert, ist die RNA-Polymerase (RNAP). Das Kernenzym (*core enzyme)* setzt sie sich zusammen aus den β-, β‘-, zwei α- und der ω-Untereinheiten. Um spezifische Promotorsequenzen zu erkennen wird die Bindung der σ-Untereinheit benötigt und der vollständige Komplex als Holoenzym wird ausgebildet. Die Bindung an den Promotor wird über dessen diskrete Sequenzmotive entschieden, u. a die -35 Region, die -10 Region und ihre Trennsequenz (Singh et al. 2011; Feklístov et al. 2014). Für die unterschiedlichen Promotorsequenzen gibt es entsprechende Gruppen an σ-Faktoren (Gruppe I-IV). Die meisten Gene, die z. B. für Wachstum benötigt werden, werden durch σ-Faktoren aus der Gruppe I reguliert, sogenannte *housekeeping* σ-Faktoren (σ^{70}-Faktoren) (Paget und Helmann 2003). Gruppen II – IV enthalten alternative σ-Faktoren, die u. a. an der Sressantwort, Flagellensynthese oder Sporulation beteiligt sind. Zudem kann die Promotoraktivität durch Bindung von Anti-σ-Faktoren an σ-Faktoren beeinflusst werden (Paget 2015).

Die Initiierung der Transkription kann weiterhin über Transkriptionsfaktoren (TFs) kontrolliert werden. Transkriptionsfaktoren sind Proteine, die meistens ein Helix-*turn*-Helix Motiv haben und als Homodimer an regulierende DNA-Sequenzen binden (TF-Bindestellen) (Huffman und Brennan 2002). Dabei können TFs reprimierend und/ oder aktivierend für die Transkription sein. Ein Repressor kann dabei als sterisches Hindernis für die RNAP direkt an den Promotor oder stromabwärts in den codierenden Bereich binden. Im Gegensatz dazu unterstützen Aktivatoren i.d.R. die Bindung der RNAP an die DNA (van Hijum et al. 2009). Ebenso können durch stromaufwärts und stromabwärts positionierte TF-Bindestellen Transkriptionsfaktoren

distale DNA-Regionen in räumliche Nähe bringen (DNA-Schleife) (van der Vliet und Verrijzer 1993; van Hijum et al. 2009). Des Weiteren kann der Methylierungsgrad des Promotors einen Einfluss auf die Bindung von TFs haben, beispielsweise die Bindung des Zellzyklus Regulators GcrA in Alphaproteobakterien (Fioravanti et al. 2013; Mouammine und Collier 2018).

1.2 Posttranskriptionelle Genregulation

Auf posttranskriptioneller Ebene wird die Translation, die Stabilität und die Modellierung (Struktur und Prozessierung) der *messenger* RNAs (mRNAs) reguliert. Auf posttranslationaler Ebene wird die Stabilität und Konformation der Proteine reguliert. Korrekte Proteinmengen werden u.a. durch die Effizienz der Translation gewährleistet. Dabei spielen intrinsische mRNA Kontrollelemente, das Binden von Effektorproteinen, -RNAs und Metaboliten eine Rolle. Eine effiziente Initiierung der Translation kann durch das Erkennen der sogenannten Shine-Dalgarno (SD) Sequenz in der 5'-untranslatierten Region (UTR) der mRNA bestimmt werden. Die Purin-reiche SD Sequenz befindet sich i.d.R. 5 – 9 Basen stromaufwärts des Startcodons und ist komplementär zu einem Sequenzbereich der 16S ribosomalen RNA (rRNA) in der kleinen ribosomalen Untereinheit (30S) (Shine und Dalgarno 1974; Osada et al. 1999). Überwiegend besitzen Starcodons die Sequenz AUG (alternativ GUG oder UUG) und werden von der mit N-Formylmethionin beladenen Initiator-tRNA mit dem Anticodon CAU gebunden (Adams und Capecchi 1966; Villegas und Kropinski 2008). Der Übergang von Initiation zur Elongation der Translation erfolgt u.a. durch die Bindung der großen ribosomalen 50S Untereinheit an die kleine 30S Untereinheit (Goyal et al. 2015). Weiter bestimmen die Codonverwendung, die Aminosäurensequenz und der Kontext des Startcodons die Translationsrate eines Proteins (Nie et al. 2006). Proteine sind auch in Bakterien recht stabil und ihre Degradation energieaufwändig (Gottesman 2003). Im Gegensatz dazu beträgt die Halbwertszeit von mRNAs nur wenige Minuten (Rauhut und Klug 1999; Bernstein et al. 2002). Demzufolge beeinflusst auch die Stabilität der mRNA die Translation durch die Verfügbarkeit des Transkripts.

1.2.1 RNA Prozessierung und Degradation

Der Abbau oder die Prozessierung von mRNAs ist essentiell für die Anpassung der Zelle an wechselnde Umweltbedingungen, Bereitstellung von Ribonukleotiden und das Verhindern der Translation von defekten mRNAs. Dabei bestimmen RNA-Sequenz, -Struktur, regulatorische Elemente, so wie RNA-Bindeproteine und Ribonukleasen die Stabilität der mRNA (Rauhut und Klug 1999; Evguenieva-Hackenberg und Klug 2011).

Endoribonukleasen sind wichtig für die Reifung von RNAs. Dabei spielt in *Escherichia coli* die RNase E eine zentrale Rolle in der Prozessierung von tRNA, rRNA, sRNA und mRNA (Li und Deutscher 2002; Deutscher 2009).

Der Abbau von RNAs wird durch ein Zusammenspiel von Endo- und Exoribonukleasen koordiniert, die auch bei der Prozessierung beteiligt sind. Durch endonukleolytische Spaltung kann die RNA-Degradation initialisiert werden oder durch Dephosphorylierung des mRNA 5'-Triphosphats in ein 5'-Monophosphat. Von wichtiger Bedeutung ist dabei ein Multiproteinkomplex, das Degradosom. In *E. coli* sind Bestandteile des Degradosoms die RNase E, Polynukleotidphosphorylase (PNPase), die DEAD-Box RNA Helikase B (RhlB) und das glykolytische Enzym, Enolase. Der C-Terminus der RNase E dient als Interaktionsfläche mit den vorher genannten Enzymen zur Bildung des Komplexes (Carpousis et al. 1994; Py et al. 1996; Vanzo et al. 1998). RNase E spaltet bevorzugt in einzelsträngigen A/U reichen Regionen (McDowall et al. 1994). Um zu ihrer Zielsequenz zu gelangen, bindet sie am RNA 5'-Monophosphatende und scannt sie in 5'-3' Richtung ab (Feng et al. 2002; Hui et al. 2014). Das i.d.R. durch ein Triphosphat geschützte 5'-Ende einer RNA kann durch das Enzym RNA-Pyrophosphohydrolase (RppH) in ein Monophosphat umgewandelt werden (Deana et al. 2008). Die PNPase als 3'-5' Exoribonuklease degradiert einzelsträngige RNA und setzt dabei 5'-Dinukleotide frei (Deutscher und Reuven 1991). Die RhlB Helikase entwindet RNA Duplexe und für die Enolase konnte gezeigt werden, dass sie u.a. eine Rolle in der Zellmorphologie spielt, indem sie sRNA Degradation und die zelluläre Verteilung/Aktivität der RNase E reguliert (Carpousis 2007; Murashko und Lin-Chao 2017). Neben der RNase E und dem Degradosom gibt es weitere RNasen, die an Prozessierung und Abbau beteiligt sind, wie z.B. die RNase III. Diese schneidet doppelsträngige RNA und kommt sowohl in Bakterien als auch in Eukaryoten vor (Conrad et al. 1998; Filippov et al. 2000).

In *Bacillus subtilis* kommt die RNase E nicht vor, stattdessen übernimmt als funktionelles Homolog die RNase Y ähnliche zentrale Funktionen, wie der Assemblierung des Degradosoms. Im Gegensatz zu *E. coli* besitzt *B. subtilis* die 5'-3'-Exoribonukleasen RNase J1 und J2 mit endoribonukleolytischer Aktivitäten (Even et al. 2005; Britton et al. 2007; Mathy et al. 2007). Unterschiedliche Bakterien haben abweichende RNasen-Ausstattungen. Die RNase E von *S. meliloti* spielt eine Rolle in der sRNA vermittelten Degradation von mRNAs (Baumgardt et al. 2014; Baumgardt et al. 2016; Melior et al. 2019a). Ebenso konnten für die RNase YbeY und RNase III eine Beteiligung an einer durch *antisense* RNA hervorgerufenen Degradation beobachtet werden (Saramago et al. 2017; Melior et al. 2019b). Außerdem besitzt *S. meliloti* die 5'-3' Exoribonuklease RNase J, die an der Reifung von ribosomaler RNAs beteiligt ist (Madhugiri und Evguenieva-Hackenberg 2009).

Außerhalb der codierenden Sequenz werden die Randbereiche der mRNA nicht translatiert (5'- und 3'-UTR) und sind anfällig für einen ribonukleolytischen Angriff (Chevrier-Miller et al. 1990; Joyce und Dreyfus 1998). Anders als in Eukaryoten besitzen Prokaryoten keine Cap-Struktur am 5'-Ende. Wie oben erwähnt schützt ein Triphosphat am 5'-Ende vor Degradation

und stabilisiert die mRNA (Celesnik et al. 2007). Darüber hinaus können RNA-Sekundärstrukturen in den UTRs, wie eine Rho-unabhängige Terminations-Haarnadelschleife am 3'-Ende, die Halbwertszeit steigern. Da Transkription und Translation gekoppelt sein können, kann die mRNA während der Translation durch Ribosomen vor dem Abbau geschützt werden. Dementsprechend ist die SD Sequenz als ribosomale Bindestelle ein stabilisierender Faktor in der 5'UTR einer mRNA (Arnold et al. 1998; Hambraeus et al. 2002; Rauhut und Klug 1999). Durch das Binden von Ribosomen an die mRNA werden potenzielle endonukleolytische Schnittstellen verdeckt (Braun et al. 1998; Vargas-Blanco et al. 2019).

Anders als in Eukaryoten wirkt ein Poly(A)-Schwanz in Bakterien destabilisierend. Die Poly(A) Polymerase I (PAPI) kann RNAs zum Abbau durch Exoribonukleasen, wie der RNase R, RNase II oder PNPase, markieren (Mohanty und Kushner 1999; Dreyfus und Régnier 2002).

Darüber hinaus können auch regulierende kleine RNAs (sRNAs) die Halbwertszeit der mRNAs beeinflussen. Dabei können sRNAs an mRNAs über Basenpaarung binden, wodurch sie u.a. von der RNase E über das RNA Chaperon Hfq oder von der RNase III erkannt und abgebaut werden (Storz et al. 2011; Svensson und Sharma 2021).

1.3 Regulatorische RNAs

Durch unterschiedliche Mechanismen, wie Konformationsänderung der mRNA oder Bindung von Faktoren, können regulatorische RNAs sowohl auf transkriptioneller, als auch auf translationaler Ebene agieren. Von wichtiger Bedeutung sind kleine regulatorische RNAs (sRNAs) mit einer Länge von 50 – 500 Nukleotiden. Die Regulation erfolgt meistens über Bindung an mRNAs. Jedoch können einige sRNAs auch mit Proteinen interagieren und ihre Aktivität regulieren (Vogel und Wagner 2007; Waters und Storz 2009). Ein Vertreter ist die 6S RNA, die in zahlreichen Bakterien vorhanden ist (Trotochaud und Wassarman 2005). Während der stationären Phase akkumuliert die prozessierte 6S RNA und interagiert mit der σ^{70}-*housekeeping* Faktor gebunden RNA-Polymerase. Da die 6S RNA-Sekundärstruktur einer offenen DNA-Promotorstruktur ähnelt, konkurriert sie mit σ^{70}- regulierten Promotoren. Somit wird die Transkription von σ^{S}-assoziierten Genen gewährleistet, die in der stationären Phase relevant sind. Der Anstieg von freien Nukleotiden beim Verlassen der stationären Phase führt zur Transkription einer 14 – 20 nt langen RNA (pRNA) von der 6S RNA als Matrize. Dadurch wird die Struktur des 6S-RNA-Polymerase Komplexes verändert und die RNA-Polymerase wird freigesetzt (Trotochaud und Wassarman 2005; Wassarman und Saecker 2006; Gildehaus et al. 2007; Beckmann et al. 2012).

Die mRNA-bindenden regulatorischen sRNAs, können aufgrund ihrer genomischen Lokalisation in zwei Gruppen unterteilt werden, *cis*- und *trans*-kodierte sRNAs. Sie besitzen

unterschiedliche Bindungspotentiale aufgrund ihrer Komplementarität zur Ziel-mRNA (Waters und Storz 2009).

1.3.1 *Cis*-kodierte antisense sRNAs

Cis-kodierte sRNAs werden vom gegenüberliegenden DNA-Strang ihrer Ziel-mRNA mit einem eigenen Promotor transkribiert. Aufgrund ihrer genomischen Position sind sie in größeren Bereichen vollständig komplementär zur Ziel-mRNA (Brantl 2007). Die meisten *cis*-kodierten sRNAs binden in die UTRs der Ziel-mRNA, wodurch die Initiation der Translation inhibiert wird und/ oder auch mRNA-Degradation induziert wird. Dieser Mechanismus kommt oft in Toxin-Antitoxin-Systemen vor, wie dem *hok/sok* oder dem *ratA/txpA* Toxin-Antitoxin-System (Thisted und Gerdes 1992; Wagner und Unoson 2012; Silvaggi et al. 2005). In *Bacillus subtilis* bindet die sRNA RatA in die 3'-UTR der Toxin-codierende mRNA *txpA* und initiiert Degradation durch die RNase III (Silvaggi et al. 2005; Durand et al. 2012).

Cis-kodierte sRNAs können auch positiv auf die Genexpression wirken. Beispielsweise in *E. coli* stabilisiert die *cis*-kodierte antisense RNA GadY die *gadX* mRNA und fördert die Expression dieses Gens. GadY bindet in die intercistronische Region von *gadX* und *gadW.* Die darauffolgende Prozessierung führt zu einer Stabilisation der *gadX* mRNA (Opdyke et al. 2004; Tramonti et al. 2008).

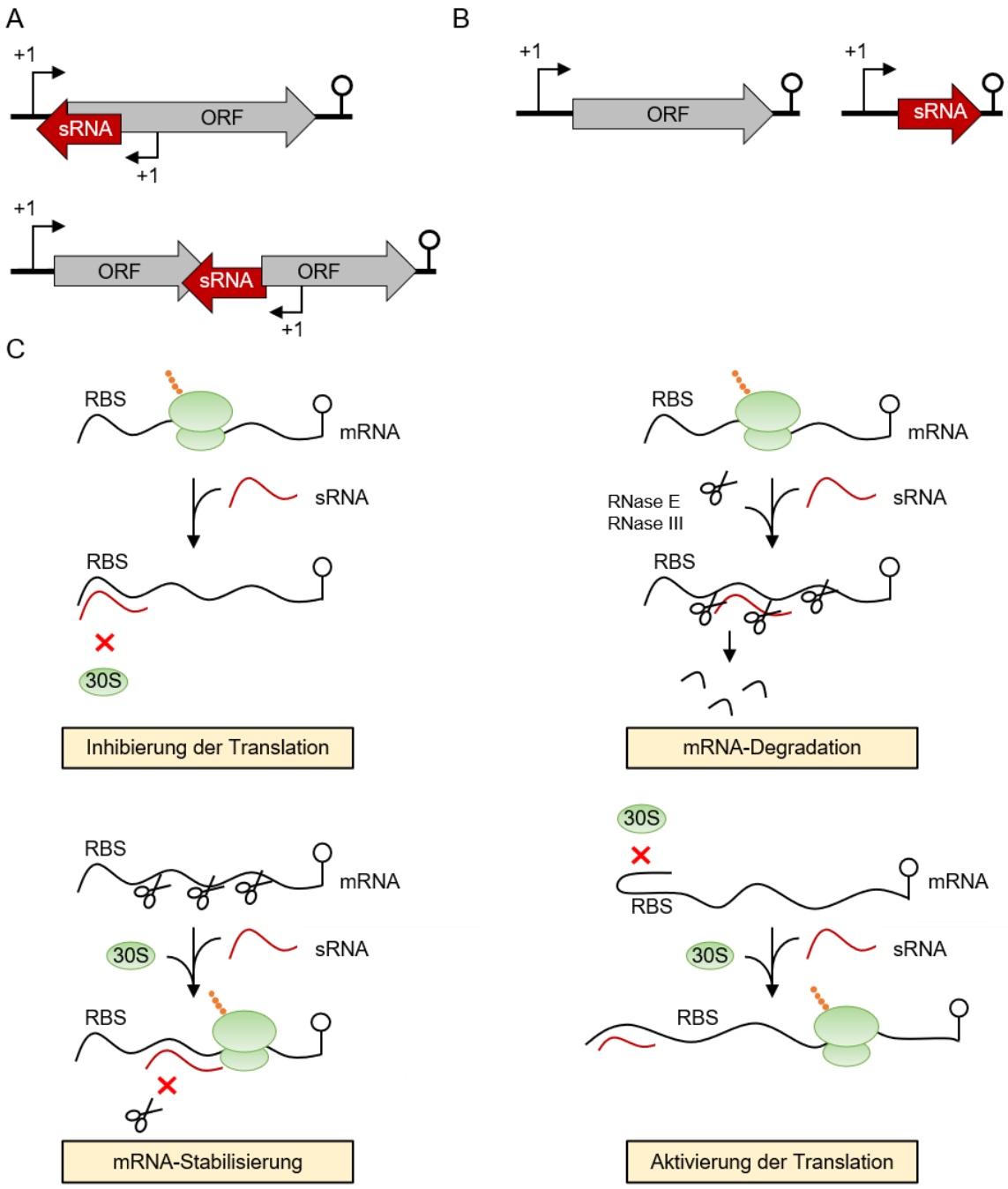

Abbildung 1: Wirkmechanismen kleiner regulatorischer RNAs. Genomische Anordnung *cis*-kodierter (**A**) und *trans*-kodierter (**B**) sRNAs. **A** *Cis*-kodierte RNAs sind komplementär zu ihrer Ziel-mRNA. **B** Gene *trans*-kodierter sRNAs befinden sich woanders als die Gene ihre Ziel-mRNA. Schwarzer Pfeil symbolisiert den Transkriptionsstart, die Haarnadel den transkriptionellen Terminator, grauer Pfeil den offenen Leserahmen (ORF) der Ziel-mRNA, roter Pfeil den codierenden Bereich der sRNA. **C** Mechanismen der sRNAs auf Ziel-mRNAs (Waters und Storz 2009).

1.3.2 *Trans*-kodierte antisense sRNAs

Trans-kodierte sRNAs können durch die Transkription eigener (kleiner) Gene oder durch Prozessierung einer polycistronischen mRNA entstehen. Anders als die *cis*-kodierten *antisense* sRNAs befinden sich die Gensequenzen der *trans*-kodierten sRNAs in einem anderen Genombereich als die Gene ihrer Ziel-mRNA. Aufgrund dessen sind sie nicht perfekt komplementär zu ihrer Ziel-mRNA. Die imperfekte Komplementarität erlaubt *trans*-kodierten

sRNAs mit mehreren Zielmolekülen zu interagieren (Gottesman 2005). Die Interaktion zwischen *tans*-kodierter sRNA und mRNA benötigt oft die Unterstützung von RNA-Chaperonen, wie Hfq oder ProQ. Sie fördern die Stabilität der sRNA und vermitteln die Basenpaarung zwischen mRNA und sRNA (Aiba 2007; Smirnov et al. 2016). Die Interaktion wirkt sich überwiegend negativ auf die Genexpression aus. Wie bei *cis*-kodierten sRNAs, binden die meisten *trans*-kodierte sRNAs in die 5'-UTR der jeweiligen Ziel-mRNA und können dabei die Translationsinitiation inhibieren. Beispielsweise in *E. coli* bindet die intergenisch kodierte sRNA MicF die 5'-UTR der *outer membrane* Protein OmpF-codierende mRNA, wodurch die Translation unterbunden wird (Mizuno et al. 1984; Andersen et al. 1989). Zusätzlich gibt es sRNAs, die weiter stromaufwärts oder stromabwärts der Translationsstartseite binden. Dies kann zur Prozessierung und weiteren Degradation der mRNA führen, wie z. B. in *S. typhimuirum* die Interaktion der sRNA MicC im kodierenden Bereich von *ompD* (Sharma et al. 2007; Pfeiffer et al. 2009). In *Staphylococcus aureus* agiert RNAIII zum einen negativ auf die Expression von frühen Virulenzgenen durch Interaktion mit der ribosomalen Bindungsstelle (RBS), zum anderen wirkt sie auch positiv für die Produktion von Sekretionsfaktoren im späteren Verlauf einer Infektion (Novick et al. 1993). Die α-Hämolysin (*hla*) mRNA besitzt eine stark strukturierte 5'-UTR, in der die RBS verdeckt wird. Durch Basenpaarung der RNAIII in die *hla* 5'-UTR erfolgt eine Reorganisation der Sekundärstruktur, sodass die RBS zugänglich wird und die Translation initiiert werden kann (Morfeldt et al. 1995). Des Weiteren besitzt die RNAIII einen kleinen offenen Leserahmen (*open reading frame,* ORF), welcher das cytotoxische Peptid δ-Hämolysin codiert. Somit zeigt die RNAIII eine duale Funktion, indem sie als sRNA agiert und gleichzeitig ein funktionelles Protein codiert (Raina et al. 2018). Eine weitere sRNA mit dualer Funktion in *S. meliloti* ist rnTrpL, welche das funktionale kleine Protein peTrpL codiert. rnTrpL entsteht unter ausreichend hohen zellulären Tryptophan-Konzentration durch den Mechanismus der Attenuation. Die sRNA rnTrpL reguliert u.a. die Acyl-Homoserinlacton Synthetase (Baumgardt et al. 2016).

Das Genom von *S. meliloti* weist einen hohen Anteil an sRNAs auf (3 % der Gene *trans*-codierte sRNAs und 2 % *antisense* Transkripte) (Valverde et al. 2008; Schlüter et al. 2010). Die im Tandem codierten sRNAs AbcR1 und AbcR2 spielen eine Rolle in der Regulation von ABC-Transportern. AbcR1 wird in sich aktiv teilenden Bakterien exprimiert und AbcR2 wird beim Eintritt in die stationäre Phase oder unter abiotischem Stress exprimiert (Torres-Quesada et al. 2013). Die sRNA EcpR1 wird in *S. meliloti* ebenfalls beim Eintritt in die stationäre Phase und unter Stressbedingungen exprimiert und moduliert die Regulation des Zellzyklus (Robledo et al. 2015).

1.3.3 Attenuation

Für die Regulation der Genexpression in Bakterien gibt es weitere Mechanismen, die auf einer vorläufigen Termination der Transkription beruhen (Transkriptionsattenuation). Diese wird durch *cis*-Elemente in der entstehenden (naszierenden) RNA gesteuert, die sich stromaufwärts des zu regulierenden ORFs befinden. Durch Effektoren, wie Aminosäuren oder Metabolite, wird die Ausbildung eines Transktriptionsterminators in der entstehenden RNA kontrolliert (Turnbough 2019).

Das klassische Beispiel ist die Ribosomen-abhängige Transkritptionsattenuation des Tryptophan (Trp)-Biosynthese Operons (*trp*-Operon) in *E. coli* (Bertrand et al. 1975). In dessen 5'-*Leader*-Sequenz befindet sich ein kleiner ORF (*short upstream* ORF, uORF), *trpL,* welches das 14 aa lange *Leader*-Peptid codiert. Die *trpL*-Sequenz beinhaltet zwei konsekutive Trp-Codons. Die Geschwindigkeit der Translation des uORFs ist ausschlaggebend für die Transkription der *trp*-Strukturgene im Operon. Bei niedriger zellulärer Trp-Konzentration kommt es zu einer Verknappung an Trp-beladenen tRNAs, weshalb das Ribosom an den *trp*-Codons pausiert. Folglich bildet sich eine Anti-Terminator Haarnadelschleife in der entstehenden RNA aus, wodurch die anschließende Transkription des vollständigen Operons gewährleistet wird. Im Gegensatz dazu bei einer hohen zellulären Trp-Konzentration pausiert das Ribosom nicht, da ausreichend Trp-beladene tRNAs vorhanden sind. Dies hat zur Folge, dass die *trpL* Translation schnell erfolgt, die Entstehung des Antiterminators verhindert wird, und deswegen ein transkriptioneller Terminator (Attenuator) stromabwärts des *trpL*-Gens ausgebildet wird (Lee und Yanofsky 1977; Oxender et al. 1979; Roesser und Yanofsky 1988).

Die Transkriptionsattenuation ist ein weitverbreiteter Regulationsmechanismus für Genexpression in aufwändigen Biosynthesewegen. Dabei reguliert die intrazelluläre Konzentration des entsprechenden Produktes den Fortgang der Transkription. Riboswitches (RNA-Schalter) üben einen ähnlichen Mechanismus aus (Winkler und Breaker 2003; Vitreschak et al. 2008; Naville und Gautheret 2010).

1.3.4 Riboswitches

Weitere *cis*-agierende RNA-Elemente sind Riboswitches, die meistens in der 5'-UTR einer mRNA lokalisiert sind. Durch Bindung eines spezifischen Liganden wird die Expression der stromabwärts gelegenen Gene, welche meist im Ligandenmetabolismus involviert sind, reguliert (Serganov und Nudler 2013). Als Liganden der Riboswitches sind zelluläre Metabolite, wie Aminosäuren und ihre Derivate, Kohlenhydrate, Koenzyme, Nukleotide und ihre Derivate, so wie Ionen und nicht beladene tRNAs, bekannt (Barrick und Breaker 2007; Regulski et al. 2008; Spinelli et al. 2008; Henkin und Grundy 2006). Aufgrund der Diversität

der Liganden, die charakteristischen Konsensussequenzen und RNA-Sekundärstrukturen werden momentan ca. 40 verschiedene Riboswitch-Klassen gezählt (McCown et al. 2017).

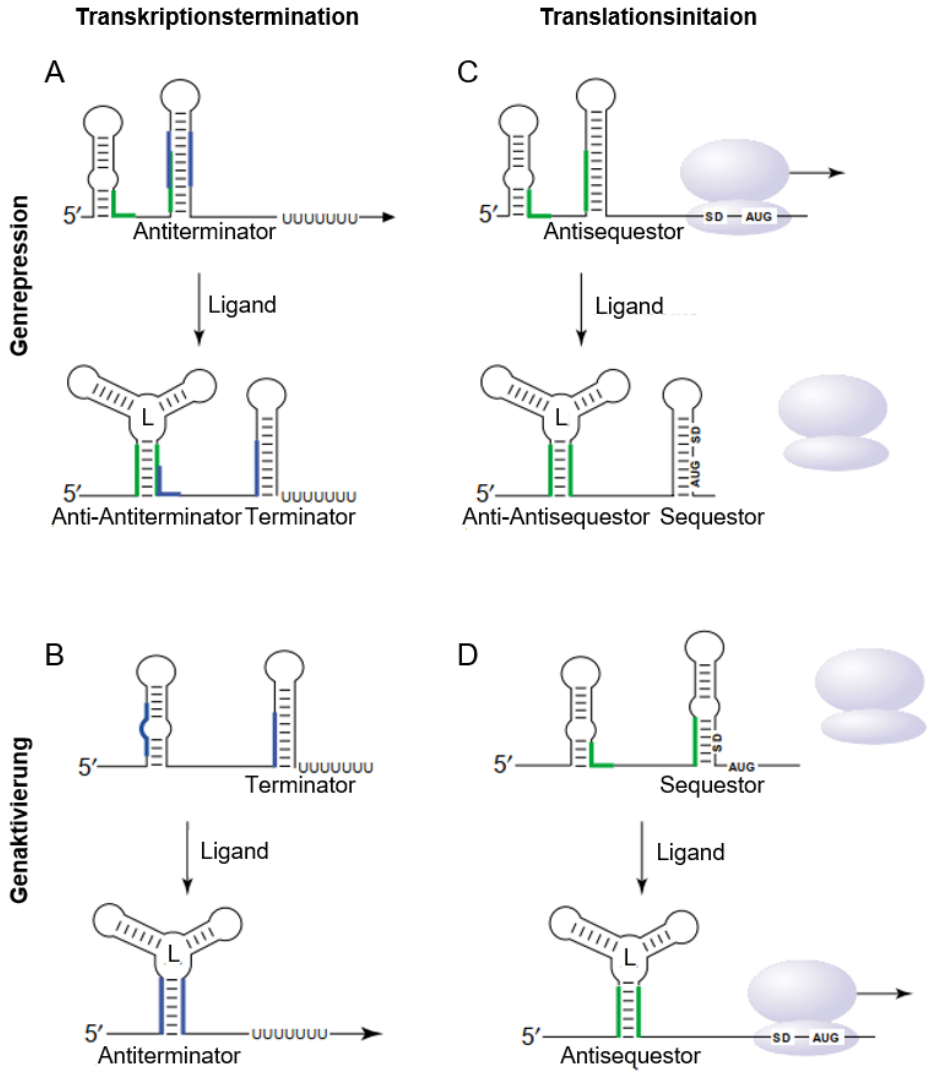

Abbildung 2: Regulationsmechanismen von Riboswitches. Dargestellt sind die 5'-UTRs von Genen, die von Riboswitches reguliert werden. Dabei können sie auf transkriptioneller und translationaler Ebene sowohl aktivierend als auch reprimierend wirken. Die konservierte Sensordomäne (Aptamer), als farbige Abschnitte dargestellt, bindet den Liganden (L), wodurch sich eine alternative Struktur ausbildet. **A** Ohne Ligandenbindung im Aptamer existiert ein Antiterminator, der die vollständige Transkription erlaubt. Nach Bindung des Liganden entsteht eine alternative Sekundärstruktur mit einem Anti-Antiterminator und einem Terminator in der Expressionsplattform. Die Folge ist ein vorzeitiger Stopp der Transkription und Repression der Genexpression. **B** Im nicht ligandengebundenen Zustand existiert ein Terminator in der Expressionsplattform, der nach Ligandenbindung durch die Bildung eines Antiterminators ausgeschlossen wird. Dieser Riboswitch wirkt aktivierend auf die Genexpression. **C** In der Expressionsplattform befindet sich die ribosomale Bindestelle (RBS: Shine-Dalgarno (SD) Sequenz und Startcodon). Ohne Ligandenbindung existiert ein Antisequestor, wodurch die RBS zugänglich für Ribosomen ist. Nach Bindung des Liganden entsteht ein Anti-Antisequestor und in der Expressionsplattform ist die RBS im Sequestor unzugänglich für Ribosomen, sodass die Translationsinitiiation unterbunden ist (Genrepression). **D** Im nicht ligandengebundenen Zustand ist die RBS durch den Sequestor in der Expressionsplattform unzugänglich. Erst durch die Bindung des Liganden und der Ausbildung des Antisequestors ist die RBS zugänglich und Translation kann initiiert werden (Genaktivierung) (Nudler und Mironov 2004).

Die Liganden werden in der Aptamerregion (Sensordomäne) des Riboswitches gebunden. Dabei entsteht eine dreidimensionale Ligandenbindetasche, welche die Diskriminierung zwischen den Liganden gewährleistet. Sowohl die Sequenz als auch die Struktur eines

Aptamers sind konserviert. Stromabwärts der Sensordomäne befindet sich die weniger konservierte Expressionsplattform, die den Ligandenstatus auf die Genexpression vermittelt. Dies wird erreicht indem zwei alternative RNA-Strukturen innerhalb der Expressionsplattform den „An"- oder „Aus"-Status der mRNA bestimmen (Garst et al. 2011).

Die Regulation kann sowohl auf transkriptioneller als auch auf translationaler Ebene stattfinden. Transkriptionsregulierende Riboswitches kontrollieren die Formation eines Terminators oder Antiterminators in der 5'-UTR (Yarnell und Roberts 1999). In *Bacillus subtilis* reguliert der Riboflavin (RFN) Riboswitch die im Operon angeordneten Strukturgene für die Synthese von Riboflavin. Dabei bindet das Aptamer das Riboflavin-abgeleitete Koenzym Flavinmononukleotid (FMN). Unter hoher zellulärer FMN-Konzentration wird einAnti-Antiterminators ausgebildet, der mit einem Teil der Antiterminator-bildenden Sequenz interagiert, sodass die Formation des Terminators und der Stopp der Transkription ermöglicht wird (siehe Abb. 2A) (Gelfand 1999; Winkler et al. 2002). Im Gegensatz dazu agiert in *B. subtilis* der Adenin Riboswitch positiv auf die Transkription des Genes *pbuE* (früher *ydhL,* codiert eine Purineffluxpumpe)*.* Durch die Bindung von Adenin bildet sich ein Antiterminator, der die Ausbildung des Terminators ausschließt. Die Transkription des Genes wird so gewährleistet, sodass unter hohen zellulären Adeninkonzetrationen die Purinkonzentration gesenkt werden kann (Mandal und Breaker 2004; Marcano-Velázquez und Batey 2015). Transkriptionsregulierende Riboswitches können aufgrund der Termination oder Freilegung von RNase-Schnittstellen sRNAs generieren, die das Aptamer besitzen. Dabei kann es herausfordernd sein diese nachzuweisen. In *B. subtilis* konnte die SAM-I Riboswitch sRNA nur in einer *rny* Mutante, ohne RNase Y, mittels Northern Blot nachgewiesen werden (Shahbabian et al. 2009). Des Weiteren können Riboswitch sRNAs Funktionen in *trans* haben. Als einer der wenigen Beispiele wurde in *Listeria monocytogenes* und *Enterococcus fasecalis* gezeigt, dass die Adenosylcobalamin (Ado-Cbl, B_{12}) Riboswitch-sRNA an Transkriptionsregulatoren bindet, um die Genexpression eines weiteren Syntheseweges in die Abhängigkeit von Ado-Cbl zu bringen (Mellin et al. 2014; DebRoy et al. 2014).

Anhand der Zugänglichkeit der ribosomalen Bindestelle kontrollieren translationsregulierende Riboswitches die Translationsinitiation. In *E. coli* wird auf diese Weise die Translationsinitiation des Gens *btuB,* welches einen Transporter für Ado-Cbl codiert, kontrolliert. Unter hoher zellulärer Ado-Cbl-Konzentration bindet Ado-Cbl an das Aptamer, wodurch die RBS in einer Haarnadelschleife verdeckt wird und die Translation blockiert wird, sodass weiteres Ado-Cbl nicht aufgenommen werden kann. Durch die Struktur des Antisequestors im Liganden-ungebundenen Zustand bleibt die RBS zugänglich (Abb. 2C) (Nou und Kadner 1998). *Vibrio vulnificus* besitzt ebenfalls einen Adenin Riboswitch in der 5'-UTR der *add* mRNA, welche Adenindeaminase codiert. Im Gegensatz zum oben beschriebenen transkriptionellen

Mechanismus in *B. subtilis,* agiert dieser Adenin Riboswitch auf translationaler Ebene. Dabei vermittelt der Riboswitch nach Bindung von Adenin die Freilegung der RBS für die Translationsinitiation der Adenindeaminase (Rieder et al. 2007). In einigen Fällen kann ein Riboswitch sowohl auf transkriptioneller als auch auf translationaler Ebene agieren. Beispielsweise in *E. coli* führt die Bindung von FMN durch den Riboswitch stromaufwärts eines Riboflavinbiosynthesegens, *ribB,* zu Sequestrierung der RBS in einem transkriptionellen Terminator, sodass unter ausreichender zellulärer FMN-Konzentration die *ribB* Expression schnell unterbunden werden kann (Pedrolli et al. 2015). Darüber hinaus können Riboswitches hintereinander als Tandem arrangiert sein. Dies konnte in *Candidatur pelagibacter ubique* beobachtet werden. Dabei handelt es sich um zwei S-Adenosyl-L-Methionin (SAM)-bindende Riboswitches in der 5'-UTR eines Methioninbiosynthesegenes, *metY,* die zum einen auf die Transkription und zum anderen auf die Translation negativ wirken, um ebenfalls schnell auf wechselnde Bedingungen reagieren zu können (Poiata et al. 2009). In *Legionella pneumophila* kontrolliert ein Guanidin-bindender Riboswitch die Translation einer Guanidineffluxpumpe. Unter hoher zellulärer Guanidin-Konzentration wird die Translation aktiviert und die mRNA stabilisiert. Die Stabilisierung wird dadurch bewirkt, dass der Riboswitch im ligandengebundenen Zustand einen Pseudoknoten bildet und dieser das Scannen der RNase E nach Schnittstellen verhindert (Richards und Belasco 2021b).

1.3.4.1 SAM-Riboswitch

S-Adenosyl-L-methionin (SAM) ist der Hauptmethyldonor für biochemische Reaktionen in der Zelle und wird aus einem ATP und Methionin synthetisiert. Durch den Transfer der Methylgruppe wird SAM in das strukturell ähnliche S-Adenosyl-L-homocystein (SAH) umgewandelt, welches zu Adenosin und Homocystein hydrolysiert werden kann. Des Weiteren kann Homocystein zu Methionin umgewandelt werden (Fontecave et al. 2004). Dementsprechend ist SAM ein zentraler Bestandteil in vielen metabolischen Prozessen und die intrazelluläre Konzentration von Methionin und SAM wird streng reguliert. Dies geschieht u.a. durch die SAM-bindenden Riboswitches, die hauptsächlich Gene für den Sulfurmetabolismus regulieren. Dabei wirken sie auf transkriptioneller und/ oder auf translationaler Ebene meist negativ auf die Genexpression. SAM Riboswitches sind die größte Riboswitches Gruppe und können aufgrund der Eigenschaften der Ligandenbindetasche und der evolutionären Zusammenhänge in verschiedene Klassen unterteilt werden (Epshtein et al. 2003; Corbino et al. 2005; Batey 2011; Mirihana Arachchilage et al. 2018; Breaker 2012). Die SAM-I Aptamer Klasse umfasst die SAM-I, SAM-IV und SAM-I/SAM-IV Familien (Grundy und Henkin 1998; Weinberg et al. 2008; Weinberg et al. 2010). Die SAM-II und SAM-V Familien werden zu Klasse II gezählt (Corbino et al. 2005; Poiata et al. 2009). Zur Klasse III gehört bislang nur die SAM-III Familie (Fuchs et al. 2006). Ähnlichkeiten mit der SAM-III Bindetasche haben Vertreter der SAM-IV Familie. Jedoch werden sie zu unterschiedlichen Klassen gezählt,

da die Bakterienphyla Firmicutes (SAM-III) und Actinobacteria (SAM-IV) phylogenetisch zu weit auseinander sind, um die Riboswitch Familien in eine Klasse einzuordnen (Mirihana Arachchilage et al. 2018).

Die Klassen I bis III binden mit einer 100- bis 1000-fachen größeren Affinität SAM als SAH. Diese Diskriminierung wird durch die Interaktionen zwischen RNA und den funktionellen Gruppen von SAM in der Bindetasche erreicht. Während der Bindung interagiert die positiv geladene Sulfoniumgruppe von SAM elektrostatisch mit Carbonyl- bzw. Hydroxlgruppen der RNA. Zudem geht der SAM-Adeninrest eine Basenpaarung ein oder ist Teil eines Basentripletts. Bei den SAM-I und SAM-II Riboswitches bindet auch der Methionrest von SAM über Wasserstoffbrückenbindungen der Carboxylatgruppe an konservierte Basen (Gilbert et al. 2006; Batey 2011; Breaker 2012). Mit einer weniger starken Diskriminierung zwischen SAM und SAH bindet der Riboswitch der Klasse SAM/SAH beide Liganden (Weinberg et al. 2010). Zusätzlich gibt es SAH Riboswitches, die mit einer ca. 1000-fach größeren Affinität SAH binden als SAM. Diese Riboswitches kontrollieren Gene zum Abbau und Wiederaufbereitung des toxischen SAH (Wang et al. 2008). Die SAM-II Riboswitches kommen hauptsächlich in α-Proteobacteria vor (Corbino et al. 2005).

1.3.4.1 SAM-II Riboswitch

Über eine Reihe von diversen enzymatischen Reaktionen wird Methionin bzw. SAM synthetisiert (Abb. 3A). Dieser energieaufwändige Prozess wird streng reguliert. Dabei werden in α-Proteobacteria einige Strukturgene von SAM-II Riboswitches kontrolliert, u. a. die Gene *metA* und *metZ* in *S. meliloti*. SAM-II Aptamere sind im Vergleich zu SAM-I Aptameren wesentlich simpler. Mit weniger als 70 nt formen sie einen H-Typ Pseudoknoten mit einer zentral gelegenen SAM-Bindetasche (Abb. 3B). Für die meisten SAM-II Riboswitches wurde die Regulation eines stromabwärts gelegenen Transkriptionsterminators postuliert (Corbino et al. 2005). Jedoch wurden in der Arbeit von Corbino et al. (2005) lediglich *in vitro* Strukturanalysen des Aptamers von *metA* aus *Agrobacterium tumefaciens* durchgeführt. Die Auswirkung des Riboswitches auf die Expression von *metA* wurde nicht untersucht.

Weitere extensive strukturelle Untersuchungen *in vitro* wurden an einem SAM-II Riboswitch des Sargassosee-Metagenom durchgeführt. Die Analysen haben ergeben, dass nach SAM-Bindung die Formation des Pseudoknotens stabilisiert wird. Dies hat zur Folge, dass eine vorhergesagte SD Sequenz in unmittelbarer Nähe des Aptamers verdeckt und dadurch wahrscheinlich die Translation des stromabwärts liegenden Gens inhibiert wird. Jedoch wurde auch in diesem Fall die physiologische Auswirkung des Riboswitches nicht untersucht (Gilbert et al. 2008; Kelley und Hamelberg 2010; Haller et al. 2011; Chen et al. 2012; Roy et al. 2017).

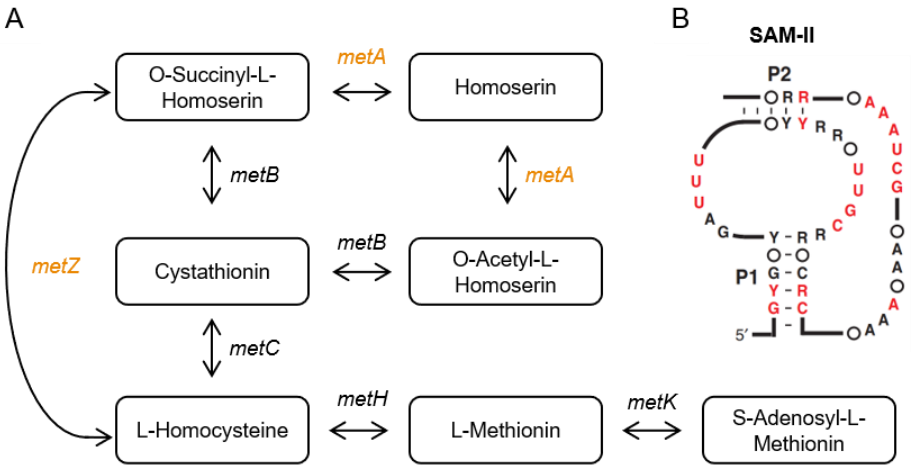

Abbildung 3: SAM Biosyntheseweg und SAM-II Riboswitch in α-Proteobacteria. A SAM Biosyntheseweg. In *Sinorhizobium meliloti* SAM-II regulierte Gene sind in orange dargestellt (Corbino et al. 2005). **B** Konsensussequenz und Sekundärstruktur des SAM-II Aptamers. Rote und schwarze Positionen zeigt eine Konservierung der angegebenen Nukleotide von jeweils >95 % und >80 %. Purin (R) oder Pyrimidin (Y) entsprechen einer Konservierung von <80 %. Schwarze dicke Linien deuten variable Regionen an. Kreise deuten auf einzelne nicht konservierte Nukleotide (Corbino et al. 2005).

Bislang wurde für kein SAM-II Riboswitch die physiologische Rolle experimentell nachgewiesen, lediglich wurden in einer Studie zur SAM Synthetase (MetK) translationale *metZ'::egfp* Reporterfusionen verwendet. Damit sollte in einem *S. meliloti metK* Deletionsstamm die ektopische Expression von *metK*, indirekt über die SAM Verfügbarkeit, nachgewiesen werden. Zunehmende MetK Produktion resultierte in einer Abnahme der *metZ'::egfp* Expression, was der erwarteten *metZ* Repression bei steigender SAM-Konzentration entspricht (Robledo et al. 2021). Der dahinterstehende Mechanismus der Regulation wurde nicht behandelt. Ebenso wurde der SAM-II Riboswitch stromaufwärts von *metA* nicht untersucht.

1.4 *Sinorhizobium meliloti*

Das grammnegative Bakterium *Sinorhizobium meliloti* gehört der Klasse der α-Proteobacteria an und kann freilebend in der Erde vorkommen oder eine Symbiose mit Leguminosen eingehen (Jones et al. 2007; Lagares et al. 2014). Um eine Symbiose eingehen zu können, werden die Bakterien durch Flavonoide an die Wurzeln gelockt. Sie sekretieren daraufhin Nod-Faktoren, welche von den Pflanzen erkannt werden. Die Leguminosen verändern ihr Wurzelgewebe nach Aktivierung einiger Signalkaskaden. So gelangen die Bakterien über einen Infektionsschlauch in die kortikale Wurzelzellschicht. Dieser endozytotische Vorgang endet mit der Bildung von Wurzelknöllchen. Als differenzierte Bakteroiden können sie in den Knöllchen atmosphärischen Stickstoff fixieren und sind somit von ökologischer und landwirtschaftlicher Bedeutung (Gage 2004).

Der in dieser Arbeit verwendete Stamm *S. meliloti* 2011 besitzt ein 6,7 Mb Genom bestehend aus einem Bakterienchromosom (3,66 Mb) und zwei Megaplasmiden, pSymA (1,35 Mb) und

pSymB (1,68 Mb) (Sallet et al. 2013). *S. meliloti* 2011 stammt, wie der enge verwandte Stamm *S. meliloti* 1021, von *S. meliloti* SU47 ab. Das Genom, so wie das Transkriptom und Proteom der beiden streptomycinresistenten Stämme wurde exzessiv analysiert (Galibert et al. 2001; Schlüter et al. 2013; Sallet et al. 2013; Hadjeras et al. 2023). Aus diesem Grund eignet sich der Stamm 2011 als Modellorganismus für die Analyse posttranskriptioneller Regulation in *S. meliloti*.

1.5 Zielsetzung

Sinorhizobium meliloti besitzt zwei SAM-II Riboswitches stromaufwärts von den Methioninbiosynthesegenen, *metA* und *metZ* (Corbino et al. 2005). Da bisherige Analysen der SAM-II Riboswitches sich maßgeblich auf deren strukturelle Beschaffenheit im SAM-gebundenen und nicht gebundenen Zustand beschränkten (Gilbert et al. 2008; Kelley und Hamelberg 2010; Haller et al. 2011; Chen et al. 2012; Roy et al. 2017), sollte in dieser Arbeit erstmalig die physiologische Bedeutung der SAM-II Riboswitches in *S. meliloti* analysiert werden.

Erste Schlüsse sollten durch bioinformatische Strukturmodellierungen auf die Rolle der SAM-II Riboswitches in der Regulation der *metZ* und *metA* Genexpression gezogen werden. Die SAM-II Riboswitch-enthaltenden sRNAs und mRNAs sollten unter zwei Wachstumsbedingungen (Vollmedium, TY und Minimalmedium, MM; die unterschiedliche intrazelluläre SAM-Konzentration unter diesen Bedingungen sollten bestimmt werden) mit Hilfe von Northern Blot Hybridisierung und RT-qPCR analysiert werden. Dabei sollten Gleichgewichtsmengen und Halbwertszeiten der RNAs berücksichtigt werden. Beim Vergleich von TY- und MM-Kulturen benötigte es die Etablierung eines RNA *spike-ins* als externe Kontrolle für die RT-qPCR Analyse. Um die Wirkungsweise des *metA* SAM-II Riboswitches genauer zu erforschen, sollten translationale und transkriptionelle *egfp*-Reporterfusionen verwendet werden. Unter Verwendung geeigneter Mutationen (wie z.B. in der SAM-Bindetasche) in den Reporter-Konstrukten sollten Änderungen in der Fluoreszenz, der *egfp* mRNA Menge und Halbwertszeit Aufschluss über die physiologische Rolle des *metA* SAM-II Riboswitches in der Genexpression geben.

2 Ergebnisse

2.1 Vorhersage der Rolle der SAM-II Riboswitches in den *metZ* und *metA* 5'-UTRs

2005 wurde die Klasse der SAM-II Riboswitches entdeckt (Corbino et al. 2005). Dabei zeigten Sequenzanalysen eine Konservierung der Aptamersequenz innerhalb der α-Proteobacteria. Die konservierte Aptamersequenz ist vorhanden in den *metZ* und *metA* 5'-UTRs von *S. meliloti,* aber wie diese Gene in Antwort auf Veränderungen der SAM-Konzentration reguliert werden, war zu Beginn dieser Arbeit unbekannt. Um die Rolle der SAM-II Riboswitches in *S. meliloti* in der Regulation der Genexpression zu untersuchen, wurde zuerst die Struktur der Riboswitches in Bezug auf SAM-Bindung mittels bioinformatischen Strukturmodellierungen analysiert.

Die 5'-UTR von *metZ* ist 117 nt lang (Abb. 4). Die 57 nt lange, konservierte Aptamersequenz des *metZ* Riboswitches befindet sich unmittelbar nach der Transkriptionsinitiationsstelle (*transcriptional start site*, TSS) (Schlüter et al. 2013). Die bioinformatischen Strukturvorhersagen mit RNafold (Gruber et al. 2008) deuteten auf eine strukturelle Neuanordnung der 5'-UTR nach SAM Bindung in der Ligandentasche des Aptamers (auch SAM-Bindetasche [*SAM binding pocket*] genannt, rote Nukleotide in Abb. 4). Dadurch könnte es zu einer alternativen Basenpaarung von konservierten Nukleotiden kommen (Abb. 4, blaue Nukleotide). Das Resultat wäre die Formation eines Pseudoknotens im Aptamer und eines Rho-unabhängigen Terminators in der Expressionsplattform, die sich stromaufwärts der ribosomalen Bindestelle (RBS) befindet. Die RBS besteht aus einer Shine-Dalgarno (SD) Sequenz und dem Startcodon AUG. Als Konsequenz der SAM-Bindung, durch die Ausbildung des Rho-unabhängigen Terminators, käme es zu einem vorzeitigen Stopp der *metZ* Transkription und hiermit zur Genrepression. Im SAM-ungebundenen Zustand wären die Nukleotide für die Pseudoknotenformation Teil einer Antiterminator-Struktur, sodass *metZ* vollständig transkribiert werden könnte. Aufgrund dieser Strukturvorhersagen wurde angenommen, dass der *metZ* Riboswitch negativ die Transkription reguliert (Abb. 4).

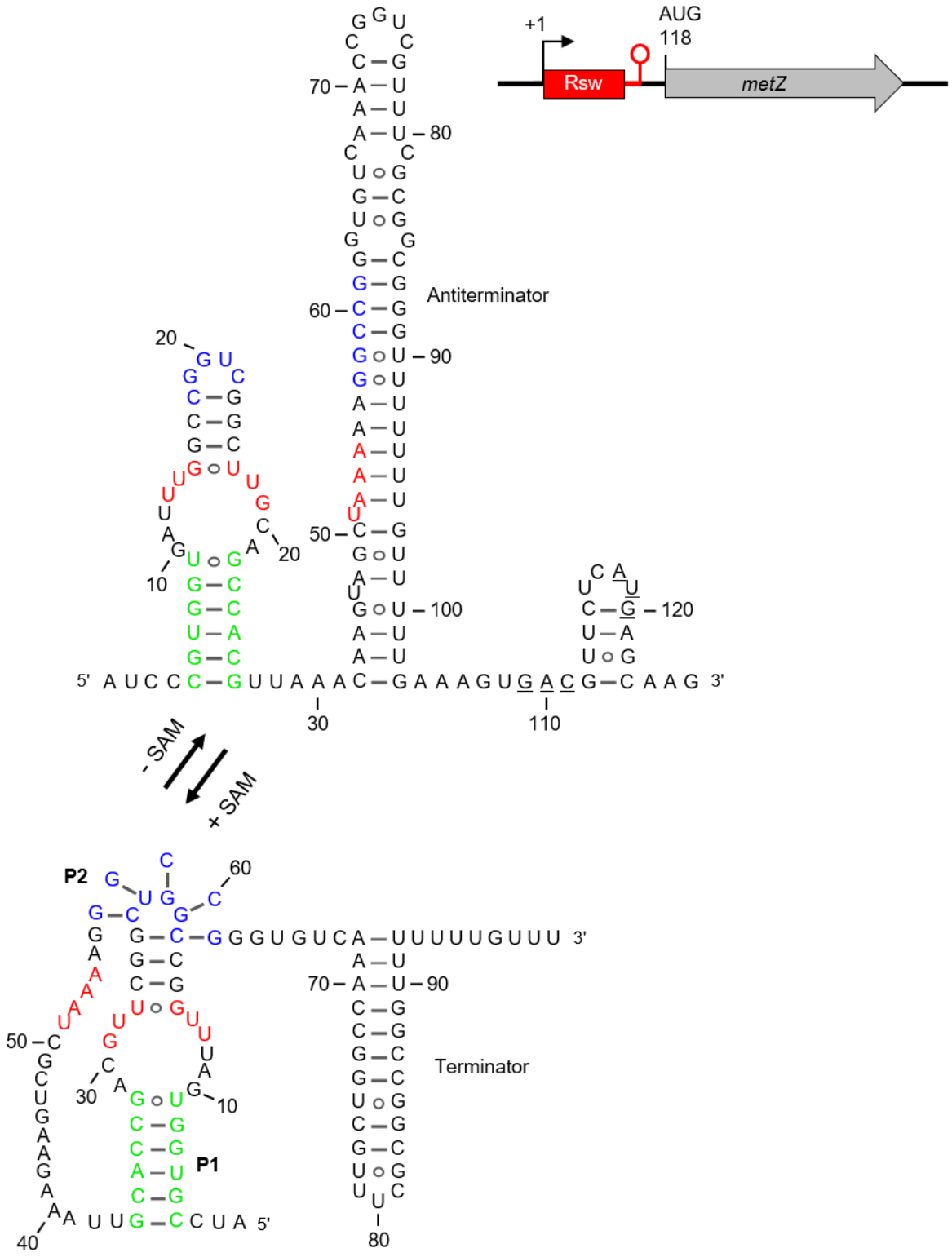

Abbildung 4: SAM-II Riboswitch in der *metZ* 5'-UTR in *S. meliloti* 2011. Oben rechts: Schema des Genlocus von *metZ.* Die Transkriptionsinitiationsstelle (+1) ist als schwarzer Pfeil dargestellt. In Rot sind die von SAM beeinflussten Bereiche (Riboswitch) markiert. Innerhalb des Riboswitches ist das SAM Aptamer als rote Box gezeigt. Die Haarnadel steht für den transkriptionellen, Rho-unabhängigen Terminator. Der graue Pfeil symbolisiert das *metZ* ORF. Des Weiteren sind vorhergesagte alternative Strukturen ohne (-) und mit (+) SAM Bindung des *metZ* Riboswitches gezeigt. Rote Nukleotide: SAM-Bindetasche. Im SAM-gebundenen Zustand: die grünen Nukleotide bilden den P1 Stamm; die dunkelblauen Nukleotide bilden den P2 Pseudoknoten. Die SD-ähnliche Sequenz und das AUG Startcodon sind unterstrichen (in der Struktur – SAM). Die Strukturen wurden mit Hilfe von RNAfold (Gruber et al. 2008) und unter Berücksichtigung der Analysen von (Corbino et al. 2005) vorhergesagt.

Direkt nach der *metA* TSS (Schlüter et al. 2013) befindet sich das SAM-II Aptamer (Abb. 5). Unmittelbar stromabwärts vom Aptamer sind eine potenzielle SD Sequenz (SD1, GAGG) und ein AUG (AUG1) lokalisiert. Im Leserahmen des AUG1, 69 nt stromabwärts, befindet sich ein weiteres AUG (AUG2) mit möglichen SD Sequenzen (SD2, GAG 13 nt stromaufwärts und, GGA 9 nt stromaufwärts von AUG2). Die Strukturvorhersage deutete auf einen Rho-unabhängigen Terminator zwischen AUG1 und AUG2 (Abb. 5, die konsekutiven Uridine des Terminators sind in Cyan). Diese Terminatorstruktur wurde im SAM-gebundenen und -ungebundenen Zustand des Riboswitches vorhergesagt. Laut der bioinformatischen Vorhersage käme es nach SAM Bindung in der Ligandentasche zu einer alternativen Basenpaarung der konservierten Nukleotide (Abb. 5, farbige Nukleotide), wobei sich voraussichtlich ein Pseudoknoten im Aptamer bilden würde. Durch dessen Formation wäre die unmittelbar stromabwärts gelegene SD1 Sequenz für Ribosomen unzugänglich. Falls die SD1 Sequenz bei der Initiation der Translation von Bedeutung wäre, würde im SAM-gebundenen Zustand die Translation inhibiert werden. Da sich jedoch stromabwärts eine weitere potenzielle RBS befindet, hat sich die Rolle des Riboswitches in der Regulation der *metA* Expression als schwer vorhersagbar erwiesen. Vorerst wurde aufgrund dieser Sequenz- und Strukturanalysen angenommen, dass der Riboswitch translationsregulierend ist.

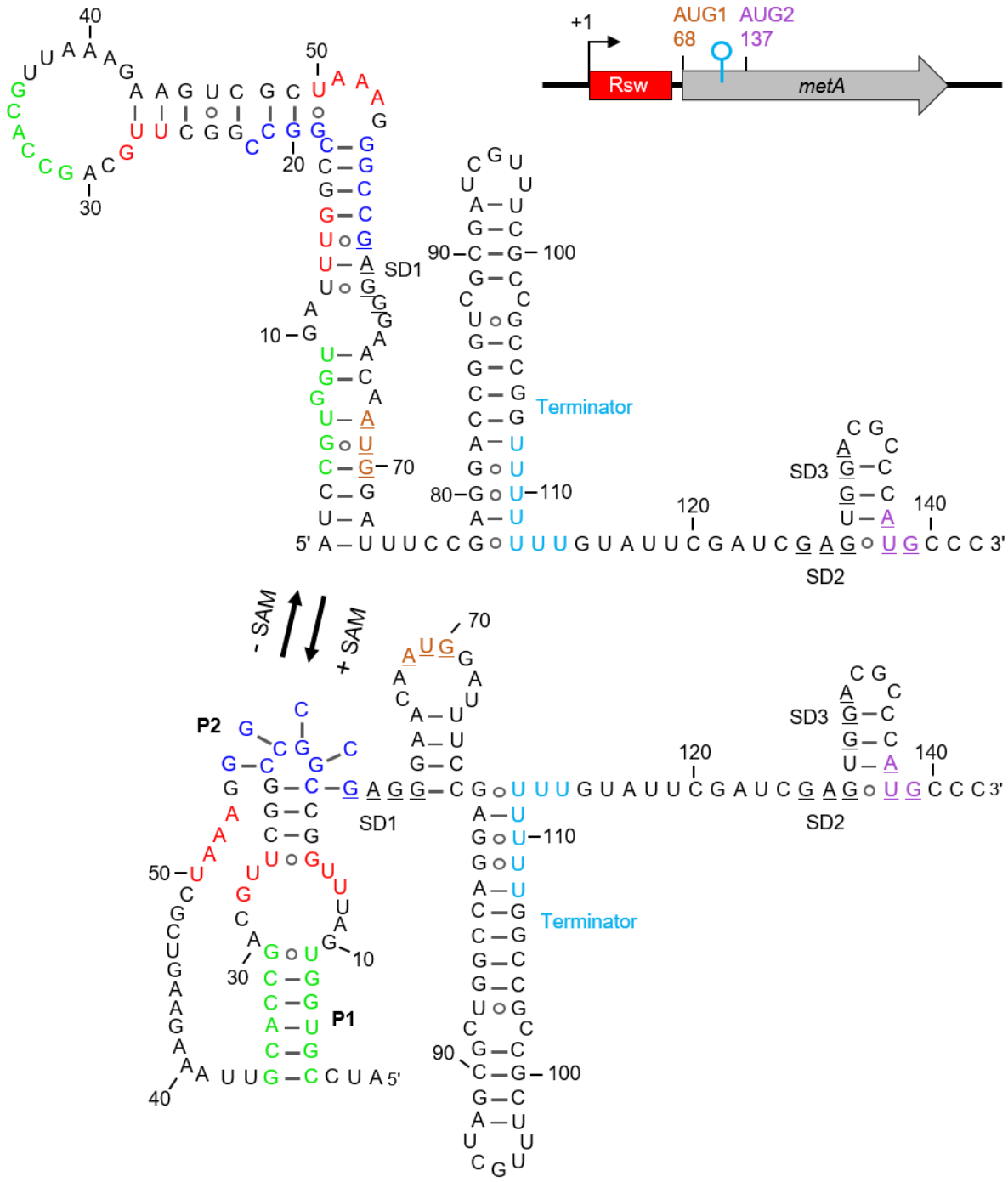

Abbildung 5: SAM-II Riboswitch in der *metA* 5'-UTR in *S. meliloti* 2011. Oben rechts: schematische Darstellung des Genlocus von *metA.* Der schwarze Pfeil deutet die Transkriptionsinitiationsstelle (+1) an. Die rote Box entspricht dem SAM Aptamer. Die Haarnadel symbolisiert einen transkriptionellen Rho-unabhängingen Terminator. Das ORF von *metA* wird als grauer Pfeil dargestellt. Des Weiteren werden vorhergesagte alternative Strukturen des *metA* Riboswitches, ohne (-) und mit (+) SAM Bindung, dargestellt. Zusätzlich ist der Stromabwärtsbereich inklusive AUG2 gezeigt. Cyane U-Nukleotide deuten den transkriptionellen Terminator zwischen AUG1 und AUG2 an. Rote Nukleotide: SAM-Bindetasche. Im SAM-gebundenen Zustand: die grünen Nukleotide bilden den P1 Stamm; die dunkelblauen Nukleotide bilden den P2 Pseudoknoten. SD-ähnliche Sequenzen und potenzielle AUG Startcodons sind unterstrichen. Die Strukturen wurden mit Hilfe von RNAfold (Gruber et al. 2008) und unter Berücksichtigung der Analysen von (Corbino et al. 2005) vorhergesagt. Für weitere Details siehe den Text.

.

2.2 SAM-II Riboswitch sRNAs

Der Nachweis von Riboswitch-enthaltenden sRNAs kann herausfordernd sein. Oft sind sie im Liganden-gebundenen Zustand destabilisiert durch die Exposition von RNase Schnittstellen (Richards und Belasco 2021a). Um mögliche SAM-II Riboswitch sRNAs in *S. meliloti* nachzuweisen, wurden Northern Blot Hybridisierungen durchgeführt. Für die Analyse wurden Kulturen in Voll- (TY) oder Minimalmedium (sollen unterschiedliche SAM-Bedingungen bieten) angezogen.

Bisher wurde in unserem Labor die Abundanz von Transkripten in Zellen, die in TY oder in MM kultiviert wurden, nicht miteinander verglichen. Dabei stellte sich die Frage ob es legitim ist, RNA Proben zu vergleichen, die bei gleicher OD_{600} aus gleichen Volumina von TY- oder MM-Kulturen isoliert wurden. Um das zu beurteilen, wurden *S. meliloti* TY- und MM-Kulturen bezüglich Zellgröße, sowie Zellzahl, -masse und Gesamt-RNA Menge aus einem definierten Volumen untersucht. Es wurde gezeigt, dass bei einer OD_{600} von 0,5 die Zellen in TY 1,5-fach größer waren als in MM (Abb. 6A). Dahingegen war die Zellzahl pro ml in TY 1,6-fach geringer als in MM (Abb. 6B). Keinen signifikanten Unterschied haben das Nassgewicht der Zellen oder die Gesamt-RNA Mengen aus gleichen Volumina ergeben (Abb. 6C und 6D). Aufgrund der gleichen Zellmasse und Gesamt-RNA Menge pro Volumeneinheit wurde es als legitim erachtet, die Abundanz bestimmter Transkripte in Kulturen, die in TY oder MM zur OD_{600} von 0,5 angezogen wurden, miteinander zu vergleichen.

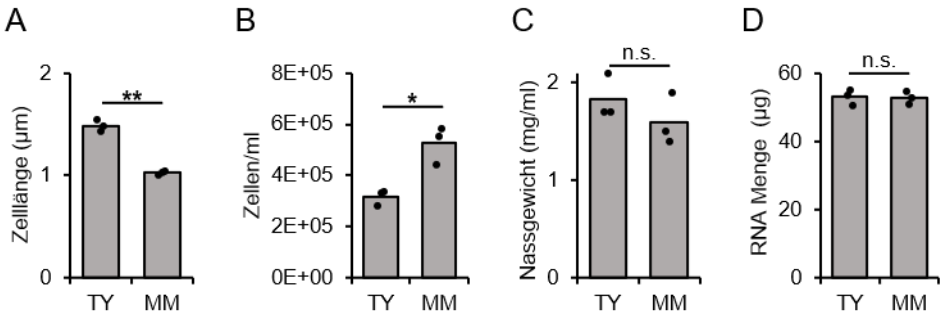

Abbildung 6: Vergleich zwischen *S. meliloti* 2011 Kulturen bei einer OD_{600} von 0,5 gewachsen in TY und MM. A Zelllängen (n = 350). **B** Zellzahl pro ml (ermittelt von Theresa Dietz). **C** Nassgewicht von Zellpellets aus 1 ml Kultur. **D** RNA Menge isoliert aus 15 ml Kultur.

Es wurde erwartet, dass die Riboswitch sRNAs mindestens den SAM-bindenden Aptamer beinhalten (Abb. 7A). Da die SAM-II Aptamere hochkonserviert sind, wurde darauf geachtet, dass die *metA*- und *metZ*-spezifischen Sonden im Aptamerbereich mit der größten Varianz binden (4 nt Unterschied in einem Bereich von 30 nt) (Abb. 7B).

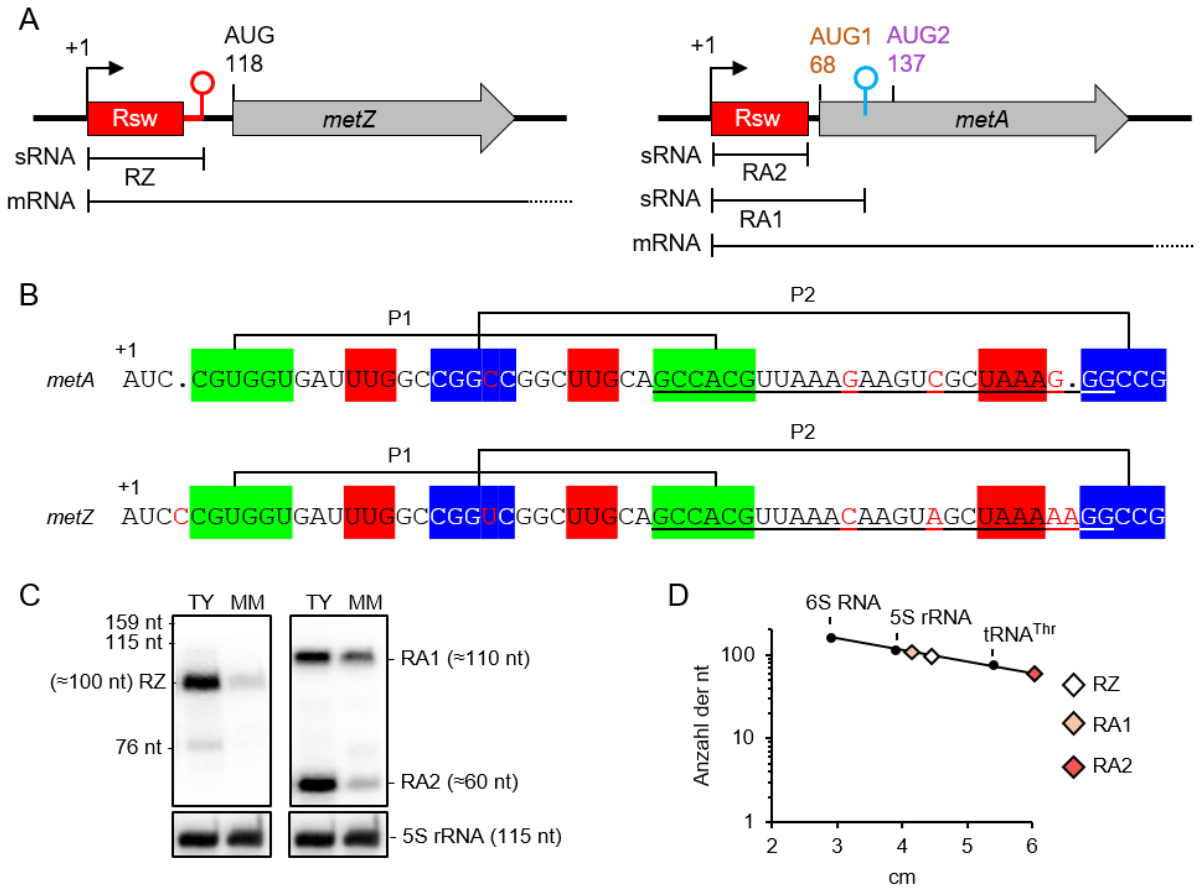

Abbildung 7: Nachweis von SAM-II Riboswitch sRNAs. A Schematische Darstellung der Genloci von *metZ* und *metA*. Der schwarze Pfeil deutet die jeweilige Transkriptionsinitiationsstelle (+1) an. In Rot sind die von SAM beeinflussten Bereiche (Riboswitch) dargestellt, dabei entspricht die rote Box dem SAM Aptamer. Die Haarnadeln symbolisieren transkriptionelle Terminatoren. Als graue Pfeile sind die ORFs von *metZ* und *metA* dargestellt. Die Bereiche der Riboswitch sRNAs (RZ, RA1 und RA2) sind angedeutet. **B** Sequenz der konservierten Riboswitch Aptamere von *metA* und *metZ* (DNA-Sequenz). Die Transkriptionsinitiationsstelle wird als +1 angezeigt. Grün hinterlegte Nukleotide bilden den P1 Stamm. Dunkelblau hinterlegte Nukleotide bilden den Pseudoknoten P2. Rot hinterlegte Nukleotide bilden die SAM-Bindetasche (siehe auch Abb. 4 und Abb. 5). Die roten Nukleotide weisen auf die Unterschiede zwischen *metA* und *metZ* Riboswitch hin. Die unterstrichene Sequenz entspricht dem Hybridisierungsbereich der jeweiligen Sonde für Northern Blot Analysen. **C** Northern Blot Analysen von Gesamt-RNA aus Kulturen gewachsen in TY-Medium oder Minimalmedium (MM). RNA wurde elektrophoretisch aufgetrennt in einem 10% Polyacrylamid-Harnstoff-Gel. Die Sonden richten sich gegen die Aptamere von *metZ* Riboswitch (RZ) und *metA* Riboswitch (RA1 und RA2). Als Referenz-sRNA (Ladekontrolle) dient die 5S rRNA. Um die Längen der Riboswitch sRNAs zu bestimmen, wurde die Membran mit Sonden spezifisch für sRNAs bekannter Größen (6S RNA – 159 nt, 5S rRNA – 115 nt, $tRNA^{Thr}$ – 76 nt) rehybridisiert. Ihr Laufverhalten und Größen sind links angegeben. **D** Graphische Darstellung der sRNA Längen (in nt) in Relation zur Laufdistanz (cm).

Mit Hilfe der so ausgewählten Sonden wurden sRNAs mit SAM-II Riboswitches detektiert. Die Längen der sRNAs wurden bestimmt, indem dieselbe Membran mit Sonden gegen verschiedene sRNAs mit bekannten Größen rehybridisiert wurde (6S RNA – 159 nt, 5S rRNA – 115 nt, $tRNA^{Thr}$ – 76 nt, annotiert in NCBI) (siehe Kap. 5.31, Abb. 7D).

Die Hybridisierung des *metZ* Riboswitches zeigte ein Signal für eine sRNA mit einer ungefähren Größe von 100 nt in TY und MM (Abb. 7C). Dies entspricht in etwa einer sRNA (RZ sRNA), die durch die vorzeitige transkriptionelle Termination von *metZ* nach SAM Bindung entstehen würde (Abb. 4 und 7A).

Die Hybridisierung des *metA* Riboswitches zeigte in TY und MM zwei Signale für sRNAs mit Größen von ca. 110 nt (RA1 sRNA) und 60 nt (RA2 sRNA) (Abb. 7C). Wie oben erklärt, befindet sich zwischen AUG1 und AUG2 im *metA* Transkript ein putativer Terminator (Abb. 5 und Abb. 7A). Durch Transkriptionstermination an dieser Stelle könnte eine sRNA entstehen, welche mit der Länge von RA1 übereinstimmen würde (Abb. 7A). Nach der Längenbestimmung von RA2 würde diese sRNA nur das Aptamer mit dem Pseudoknoten umfassen (Abb. 7A). Die Entstehung von RA2 ist unklar. Denkbar wäre, dass RA2 durch eine Prozessierung der RA1 sRNA entsteht. Möglich ist auch, dass aufgrund fehlender Translation nach SAM Bindung das *metA* Transkript durch Exoribonukleasen in 3'-5' Richtung abgebaut wird. Da es sich bei dem Riboswitch um eine kompakte Struktur handelt, wäre die 5'-UTR des *metA* Transkriptes vor Abbau geschützt. Eine genaue Bestimmung des 3'-Endes wie z.B. mittels 3'-RACE wurde nicht durchgeführt.

Zusammengefassend wurden drei SAM-II Riboswitch sRNAs detektiert: RZ, RA1 und RA2. Nach Bindung von SAM an das Aptamer des *metZ* Transkriptes könnte durch frühzeitige Termination der Transkription RZ generiert werden. Das *metA* Transkript besitzt einen putativen Terminator, welches durch vorläufige Transkriptionstermination die sRNA RA1 generieren könnte. Durch RA1 Prozessierung oder Abbau der *metA* mRNA könnte die RA2 sRNA entstehen. Abb. 7C legt nahe, dass die Gleichgewichtsmengen der sRNAs in TY und MM unterschiedlich sind, was möglicherweise auch mit Veränderungen der mRNA Mengen einhergeht und als nächstes untersucht wurde. Die Gleichgewichtsmengen der mRNAs wurden im Folgenden mit Hilfe von RT-qPCR Analysen ermittelt, da *metZ* und *metA* mRNA nicht über Northern Blot Hybridisierung detektiert werden konnten.

2.3 Etablierung eines RNA *spike-ins* als externe Kontrolle für RT-qPCR Analysen

In früheren Arbeiten wurde für RT-qPCR Analysen als interne Kontrolle die mRNA *rpoB,* welche die β-Untereinheit der RNA Polymerase codiert, verwendet. Beim Vergleich von TY- und MM-Kulten zeigten die RT-qPCR Daten eine unterschiedliche Abundanz der *rpoB* mRNA (Abb. 8). MM-Kulturen hatten ein höheres *rpoB*-Niveau als TY-Kutluren (Cq-Werte: MM, 20 und TY, 22). Deswegen benötigt es eine externe Kontrolle, um die RNA Mengen unter diesen Bedingungen vergleichen zu können. Hierfür wurden *in vitro* Transkripte in Betracht gezogen, die von Photosynthese-Genen in *Rhodobacter sphaeroides* (Rs_*crtA* und Rs_*pufL*) mit einen ähnlichen GC-Gehalt und von einem Archaeon, *Sulfolobus solfataricus* (Sso_*rrp41*) mit einem niedrigeren GC-Gehalt als *S. meliloti* stammen. Die Transkripte haben keine Homologe in *S. meliloti*. Um die geeignete Menge an *in vitro* Transkript als *spike-in* für RT-qPCR Analysen zu bestimmen, wurden verschiedene Mengen zu in Trizol aufgelöste *S. meliloti* Zellpellets zugegeben (wie in M&M angegeben, 1 ml TRIzol wurde genutzt um RNA aus 15 ml *S. meliloti*

Kultur bei einer OD_{600} von 0,5 zu isolieren). Als interne Kontrolle wurde die *rpoB* mRNA hinzugezogen.

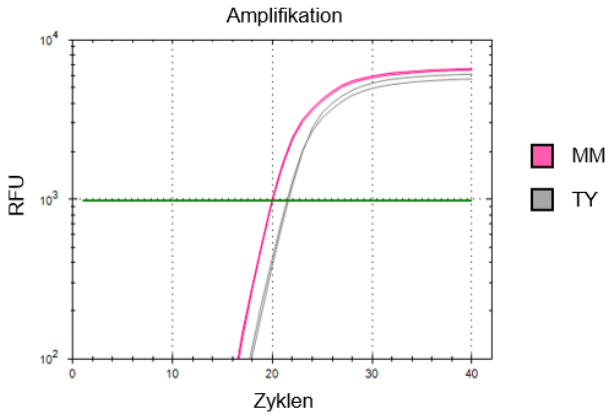

Abbildung 8: Höhere Abundanz von *rpoB* mRNA in MM-Kulturen verglichen mit TY-Kulturen. RT-qPCR Analyse von *rpoB* in Gesamt-RNA aus Zellen gewachsen in MM (Magenta) oder in TY (grau), dargestellt als Amplifaktionskurve. Zwei technische Replikate sind abgebildet.

Die Cq-Werte von Rs_*pufL* zeigten sich unabhängig der eingesetzten Transkriptmengen (Tab. 1 und Abb. 9A). Die Analyse der Schmelzkurve der PCR-Produkte, die mit den Primern gerichtet gegen Rs_*pufL* amplifiziert wurden, wies zwei Schmelzspitzen auf, die den Schwellenwert überschritten (Abb. 9A'). Demzufolge handelte es sich um zwei Produkte der RT-qPCR. Diese waren auch sichtbar in einem 10%-igen Polyacrylamidgel nach Elektrophorese und EtBr-Färbung (Abb. 9D). Somit war dieses *spike-in* Transkript als externe Kontrolle für RT-qPCR Analysen ungeeignet.

Tabelle 1: Cq Werte einer RT-qPCR Analyse von *S. meliloti rpoB* und *spike-in* Transkripten. Unterschiedliche Mengen (0,25 ng, 1 ng und 4 ng in je 1 µl) der *spike-in* Transkripte *pufL, crtA* (abgeleitet von *R. sphaeroides*) und *rrp41* (abgeleitet von *S. solfatricus*) wurden zu 1 ml TRIZol, in dem Zellpellets aus15 ml einer *S. meliloti* Kultur (OD_{600} von 0,5) aufgelöst wurden, hinzugegeben. Die isolierte Gesamt-RNA mit *spike-in* Transkripten wurde einer RT-qPCR Analyse unterzogen.

Mengen eingesetzter *spike-in* RNA	**Rs_*pufL* Cq Werte**	**Rs_*crtA* Cq Werte**	**Sso_*rrp41* Cq Werte**	**Sme_*rpoB* Cq Werte**
0,25 ng	16,4 ± 0,325	21,48 ± 0,004	21,93 ± 0,156	22,8 ± 0,063
1 ng	16,61 ± 0,251	19,36 ± 0,085	19,93 ± 0,028	22,78 ± 0,053
4 ng	16,11 ± 0,183	17,63 ± 0,071	18,15 ± 0,06	22,69 ± 0,035

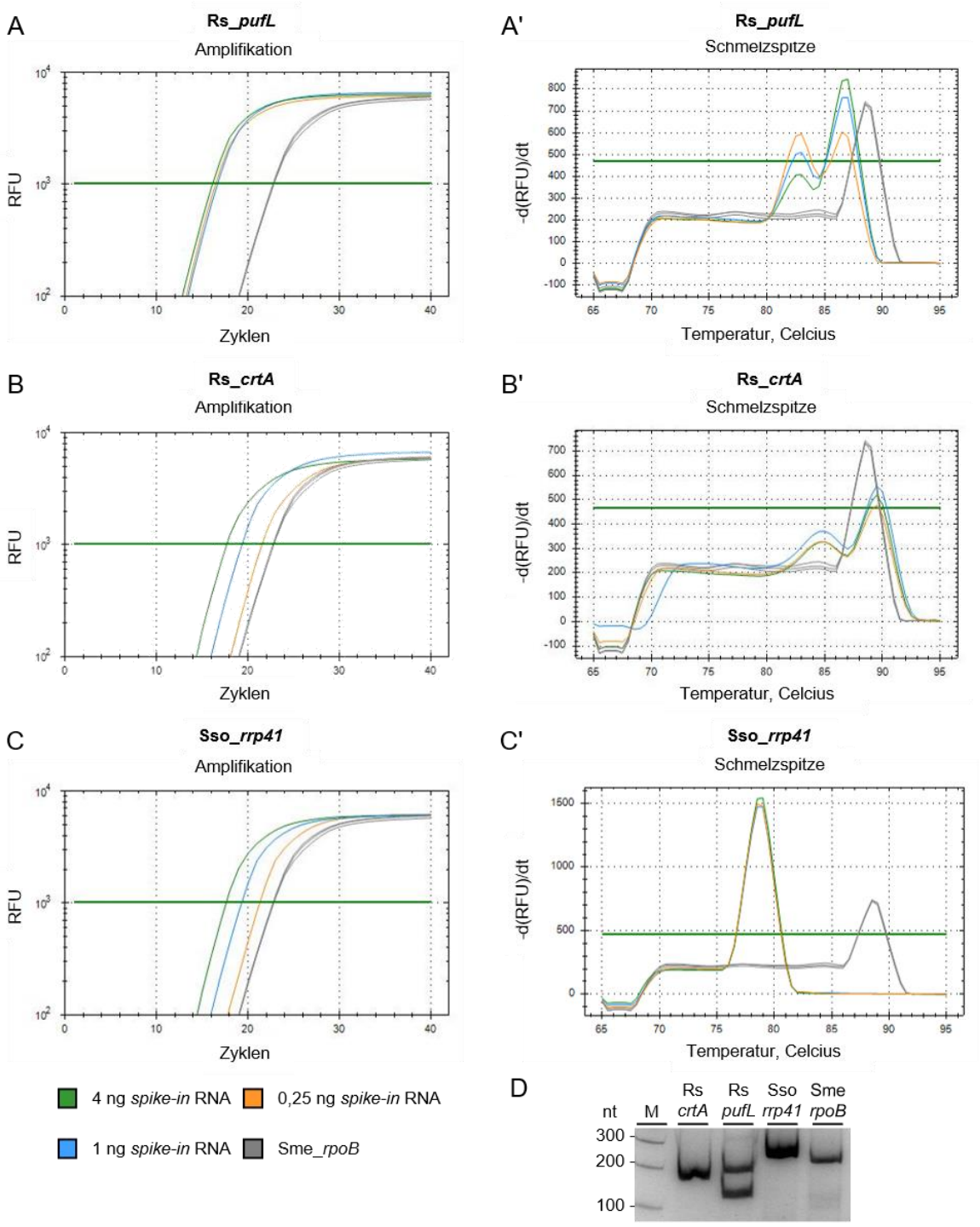

Abbildung 9: RT-QPCR Analysen der *spike-in* Transkripte zeigen ein zusätzliches PCR-Produkt mit Primern gegen Rs_*pufL*. Verschiedene Mengen von *spike-in* Transkript wurden zu in TRIZol aufgelöste *S. meliloti* Zellen hinzugegeben. Dargestellt sind die Amplifikationskurven (A – C) und Schmelzkurven (A' – C') der Transkripte von (A) *R. sphaeroides pufL* (Rs_*pufL*), (B) und *crtA* (Rs_*crtA*) und (C) von *S. solfataricus rrp41* (Sso_*rrp41*). In jedem Graphen ist zusätzlich der Verlauf von *S. meliloti rpoB* als interne Kontrolle dargestellt. Es werden je zwei technische Replikate gezeigt. (D) PCR-Produkte elektrophoretisch aufgetrennt in einem 10 % Polyacrylamidgel, gefärbt mit EtBr.

Die Cq-Werte für die *spike-ins* Rs_*crtA* und Sso_*rrp41* ähnelten sich (Tab. 1 und Abb. 9B und 9C). Die Verdünnungen der *spike-in* RNA Mengen spiegelte sich im linearen Anstieg der Cq-Werte wider. Im Fall von Rs_*crtA* zeigte die Schmelzkurve ebenfalls eine zweite Spitze (Abb. 9B'). Da sie unter dem Schwellenwert lag und nicht im Gel sichtbar war, konnte sie

vernachlässigt werden (Abb. 9D). Eine distinkte Schmelzspitze wurde für Sso_*rrp41* ermittelt (Abb. 9C'). Aufgrund der AT-reichen Sequenz von Sso_*rrp41* zeigte sich die Schmelzspitze bereits bei einer niedrigeren Temperatur als die interne Kontrolle Sme_*rpoB*. Das Transkript Sso_*rrp41* eignet sich als externe Kontrolle für Analysen von Organismen mit weniger GC-Gehalt, z.B. *E. coli*. Da *S. meliloti*, wie *R. sphaeroides* ein GC-reicher Organismus ist, wurde im Weiteren Rs_*crtA* verwendet. Beide *spike-ins* sollten/ wurden mit einer Konzentration von 1 ng in 1 µl für Zellpellets aus 15 ml Kultur (entspricht ca. 50 µg Gesamt-RNA) verwendet.

2.4 Riboswitch sRNA und mRNA Mengen in Vollmedium- und Minimalmedium-Kulturen

Aufgrund der RNA-Strukturvorhersagen wurde vermutet, dass unter hoher zellulärer SAM-Konzentration die Genexpression von *metZ* und *metA* posttranskriptionell unterdrückt wird (Abb. 4 und Abb. 5). Es wurden die Gleichgewichtsmengen der *metZ* und *metA* mRNAs, so wie der Riboswitch sRNAs, aus Kulturen gewachsen unter zwei verschiedenen Bedingungen (Vollmedium, TY und Minmalmedium, MM), bestimmt. Es wurde angenommen, dass TY hohen zellulären SAM-Konzentrationen entspricht und MM niedrigen. Die sRNAs wurden mittels Norhtern Blot Hybridisierungen und RT-qPCR analysiert und die mRNAs mithilfe von RT-qPCR. Dabei binden die verwendeten Primer entweder an die sRNAs bzw. in die 5'-UTR der mRNA oder in die codierenden Bereiche der mRNAs (Abb. 10A).

Die Northern Blot und die RT-qPCR Analysen zeigten jeweils eine höhere Abundanz der sRNA RZ in TY-Kulturen als in MM-Kulturen (Abb. 10B und 10C). Das Ergebnis der Hybridisierung des *metA* Riboswitches ergab vergleichbare Abundanz von RA1 in TY- und MM-Kulturen. Das Niveau der sRNA RA2 war in TY-Kulturen über ein 4-faches höher als in MM-Kulturen (Abb. 10B). Die Mengen der sRNAs RA1 und RA2 (dabei war der Anteil an detektierten 5'-UTR der *metA* mRNA zu vernachlässigen, siehe unten) wurden während der RT-qPCR Analyse zusammen (RA) detektiert und zeigten ebenfalls ein höheres Niveau in TY-Kulturen als in MM-Kulturen (Abb. 10C). Dahingegen wurde für *metZ* und *metA* mRNA ein niedrigeres Niveau in TY-Kulturen verglichen mit MM-Kulturen nachgewiesen (Abb. 10C).

Isolation von Gesamt-RNA mittels TRIzol reichert kleine RNA Spezies an und große ab (Damm et al. 2015). Deswegen wird die TRIzol-Methode routinemäßig in unserer Arbeitsgruppe verwendet, die an sRNAs interessiert ist. Um das intrazelluläre Verhältnis zwischen sRNAs und mRNAs zu untersuchen, benötigte es eine quantitative RNA-Isolierungsmethode, weshalb Gesamt-RNA mit Hilfe von heißem Phenol isoliert wurde.

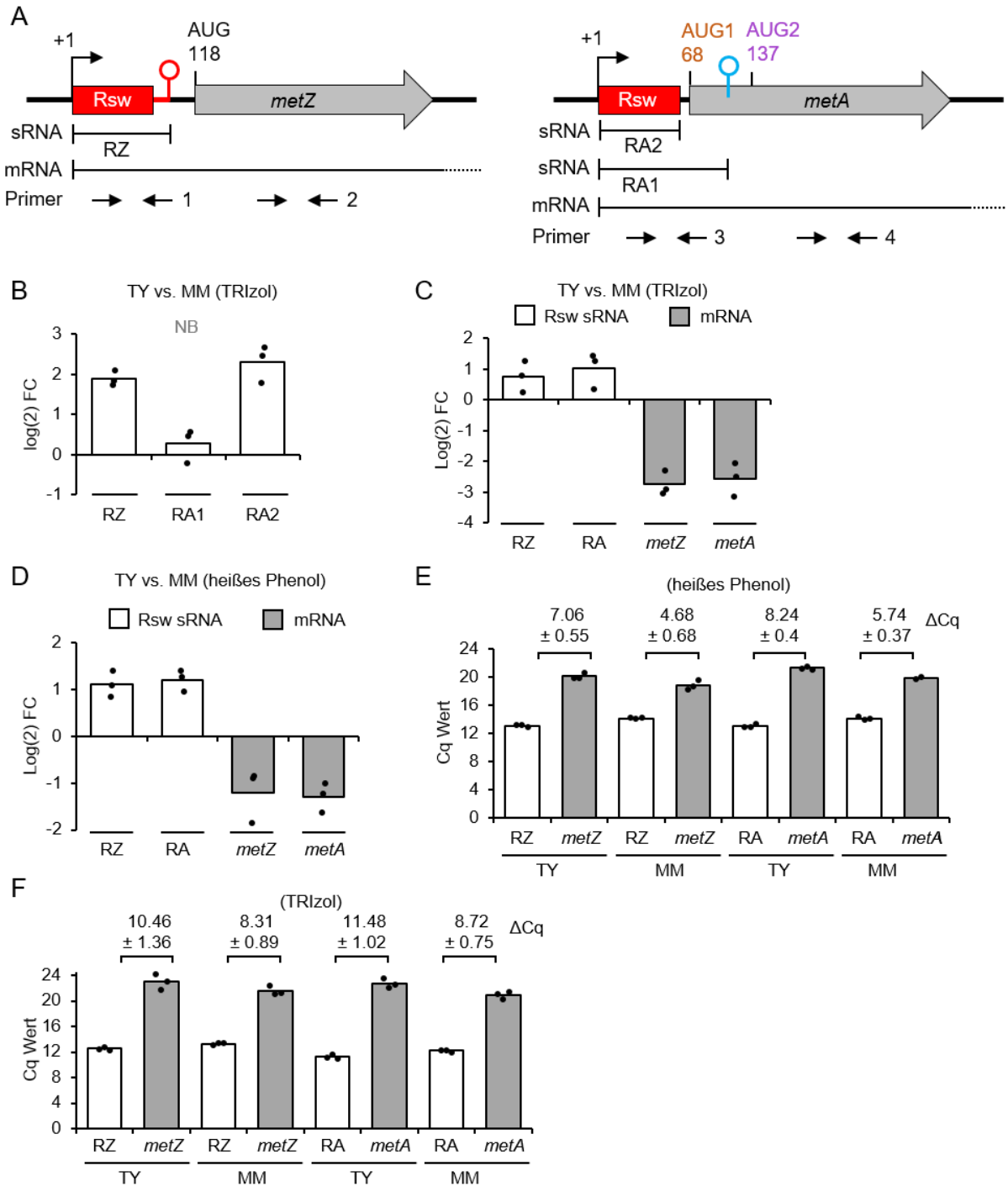

Abbildung 10: Abundanz der Riboswitch sRNAs, *metZ* und *metA* mRNAs in *S. meliloti* 2011 kultiviert in TY und MM. A Schemata der Genloci von *metZ* und *metA*. Die Transkriptionsinitiationsstellen (+1) sind als schwarze, gebogene Pfeile dargestellt. Von SAM beeinflusste Bereiche sind in Rot abgebildet. Die rote Box entspricht dem Aptamer. Haarnadeln symbolisieren transkriptionelle Terminatoren, als graue Pfeile sind die ORFs von *metZ* und *metA* dargestellt. Bereiche der Riboswitch sRNAs, RZ, RA1 und RA2 sind angedeutet, sowie die Position der Primer. **B**, **C** und **F** zeigen graphische Darstellungen der Ergebnisse mit TRIzol isolierter RNA und **D** und **E** mit heißem Phenol isolierter RNA. **B** Vergleich von Kulturen aus TY und MM bezüglich der sRNA Abundanz. Die Änderungen (*fold change* – FC) sind als $\log_2$ dargestellt. Die sRNA Mengen wurden mit Northern Blot Analysen bestimmt (vergleiche Abb. 7C). **C** und **D** Ergebnisse der RT-qPCR Analyse von RNA aus TY- und MM-Kulturen. Die Analyse wurde mit Primerpaaren, die in A schematisch gezeigt sind, durchgeführt. Die Primerpaare 1 und 3 detektieren sRNA und 5'-UTR der jeweiligen mRNA; RA: RA1 + RA2. Die Primerpaare 2 und 4 detektieren die jeweilige mRNA. **E** und **F** Cq Werte der RT-qPCR Analysen aus C bzw. D. Die Cq-Unterschiede sind angegeben (Mittelwerte und Standardabweichungen).

Der Vergleich von Gesamt-RNA isoliert mithilfe von heißem Phenol aus TY-Kulturen und MM-Kulturen zeigte ein höheres Niveau der Riboswitch sRNAs, RZ und RA in TY (Abb. 10D). Gleichzeitig wurde gezeigt, dass die Mengen an *metZ* und *metA* mRNA in TY niedriger waren (Abb. 10D). Diese Ergebnisse sind ähnlich den vorherigen Ergebnissen mit TRIzol isolierter Gesamt-RNA (vergleiche Abb. 10C und Abb. 10D).

Die sRNA und mRNA Cq-Werte der RT-qPCR Analyse wurden miteinander verglichen. Die Analyse der Gesamt-RNA, die mit heißem Phenol isoliert wurde, ergab viel niedrigere Cq-Werte für die sRNAs als für die mRNAs (Abb. 10E). Dabei betrug die Differenz aus TY-Kulturen zwischen RZ sRNA und *metZ* mRNA 7 Zyklen und zwischen RA sRNA und *metA* mRNA 8 Zyklen. Der Cq-Unterschied zwischen sRNA und mRNA war um ca. 2 Zyklen geringer in MM-Kulturen. Das spricht dafür, dass in den Zellen die sRNA Mengen weitaus größer sind als die mRNA Mengen. Die Untersuchung der TRIzol isolierten Gesamt-RNA zeigte ähnliche Ergebnisse, wobei die Cq-Differenz zwischen sRNA und mRNA generell höher war als bei Phenol-isolierter RNA (vergleiche Abb. 10E und Abb. 10F). Da TRIzol kleine RNA-Spezies anreichert und größere abgereichert werden, kommt es zu diesem Differenzunterschied.

Zusammenfassend wurde mit verschiedenen RNA-Isolationsmethoden und anschließenden RT-qPCR Analysen gezeigt, dass in TY-Kulturen *metZ* und *metA* Transkriptmengen niedriger sind als in MM-Kulturen und gleichzeitig die Riboswitch sRNAs (RZ und RA) abundanter in TY-Kulturen sind. Darüber hinaus kommen die sRNAs wesentlich abundanter in der Zelle vor als ihre zugehörigen mRNAs. Dieser Mengenunterschied ist größer in TY als in MM, was das höhere Niveau der sRNAs und das niedrigere Niveau der mRNAs in TY widerspiegelt.

Um eine Korrelation zwischen hohem SAM-Spiegel und hoher Abundanz der Riboswitch sRNAs und gleichzeitiger niedriger Abundanz der *metZ* und *metA* mRNAs zu bestätigen, wurden im Weiteren SAM-Messungen und die intrazelluläre SAM-Konzentration manipuliert.

2.5 Korrelation zwischen SAM-Konzentration und Abundanz der Riboswitch sRNA und *metZ* und *metA* mRNA

Es wurde angenommen, dass die SAM-Konzentration die Mengen der Riboswitch sRNAs und mRNAs unterschiedlich beeinflusst. Um dieser Fragestellung nachzugehen wurden Bakterien im reichhaltigen Medium (TY) und minimalem Medium (MM) kultiviert. Dabei wurde vermutet, dass aufgrund der ausreichenden Verfügbarkeit von Aminosäuren in TY die intrazelluläre SAM-Konzentration hoch ist. Dem entgegenliegend wurde erwartet, dass das Wachstum in MM dem Zustand der niedrigen intrazellulären SAM-Konzentration entspricht, da hier die Bakterien Methionin selbst synthetisieren müssen.

Um dies zu beweisen, wurde das Bridge-IT S-Adenosyl Methionine (SAM) Fluoresecence Assay Kit (Mediomics) genutzt. Dabei wurden zellfreie Lysate von Kulturen gewachsen in TY oder MM bis zu einer OD_{600} von 0,5 verwendet. Mit Hilfe einer Kalibrationskurve konnte die SAM-Konzentration in den Lysaten bestimmt werden (Abb. 11A). Es wurde gezeigt, dass TY -Kulturen, mehr als doppelt so viel SAM enthalten als MM-Kulturen (Abb. 11B).

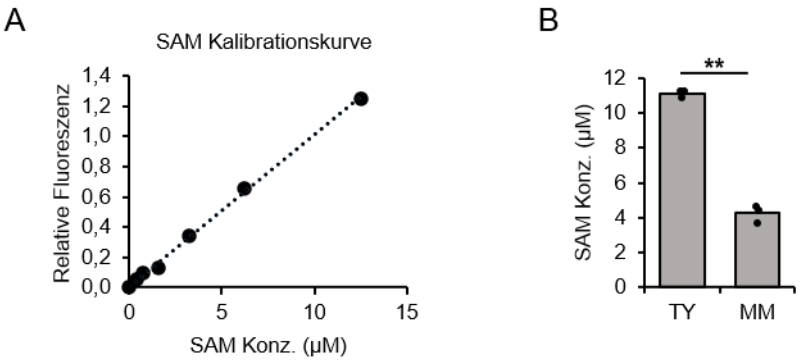

Abbildung 11: Bestimmung der SAM-Konzentration in *S. meliloti* 2011 Kulturen bei einer OD_{600} von 0,5, gewachsen in TY und MM. A Kalibrationskurve mit bekannten SAM-Konzentrationen und entsprechender Fluoreszenz (Bridge-IT S-Adenosyl Methionine (SAM) Fluoresecence Assay Kit). **B** SAM-Konzentrationen in Zelllysaten von TY- und MM-Kulturen (ermittelt von Theresa Dietz).

Um die Korrelation zwischen SAM-Konzentration und RNA-Niveaus weiter zu prüfen, wurde versucht die intrazelluläre SAM-Konzentration bei Wachstum von *S. meliloti* in TY-Medium zu manipulieren. Dabei spielt für die SAM-Synthese das essentielle Gen *metK,* welches die SAM-Synthetase codiert, eine zentrale Rolle. Im Folgenden wurde versucht mit Hilfe des Integrationsplasmides pKACIT-FLAG-metK die Expression von *metK* und folglich die SAM-Konzentration zu kontrollieren.

Das Plasmid besitzt zwei Kristallviolett-induzierbare Promotoren, welche die Expression der Repressorgene *eilR* und *lacI* kontrollieren, und einen IPTG induzierbaren Promotor (Abb. 12A). Stromabwärts des IPTG induzierbaren Promotors befinden sich eine *3x-FLAG* codierende Sequenz, fusioniert (im selben Leserahmen) mit ca. 400 bp der codierenden Sequenz von *metK,* beginnend mit dem zweiten Codon und gefolgt von einem transkriptionellen Terminator. Aufgrund des homologen *metK*-Bereichs hat sich das Plasmid in das Chromosom integriert (Abb. 12B). Dadurch kontrollierte der native Promotor von *metK* nur einen Teil des Gens. In dem entsprechenden Mutantenstamm unterliegt das rekombinante Gen *FLAG-metK* der Kontrolle des IPTG-induzierbaren Promotors.

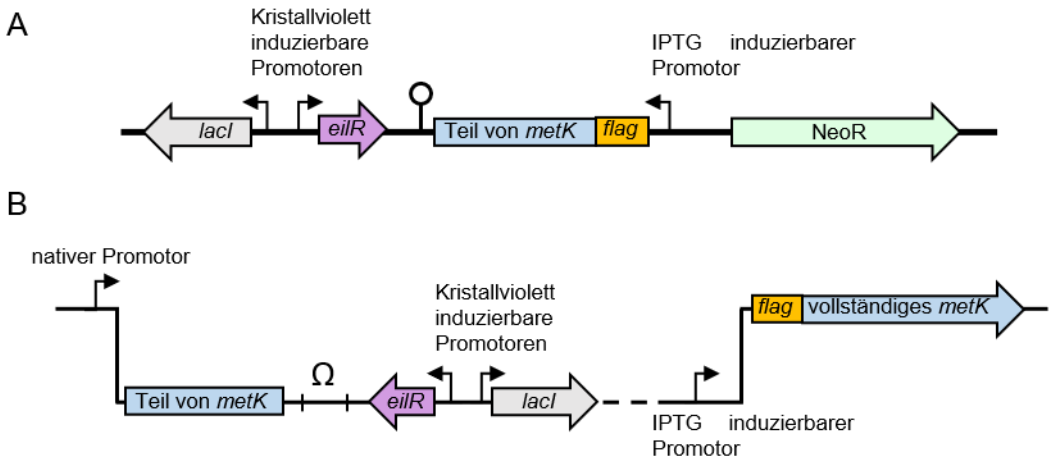

Abbildung 12: Aufbau des Plasmides pKACIT-FLAG-metK und seine chromosomale Integration in *S. meliloti*. **A** Schematische Darstellung des Plasmides pKACIT-FLAG-metK. Als schwarze Pfeile werden die zwei Kristallviolett-induzierbaren Promotoren und der IPTG-induzierbare 16S-O Promotor dargestellt. Grauer Pfeil: *lacI* ORF; violetter Pfeil: *eilR* ORF; blaue Box: Teil des *metK* ORFs, beginnend mit dem zweiten Codon, fusioniert im Leserahmen mit der *3x-FLAG* (*flag*) Sequenz (gelbe Box); mintgrüner Pfeil: Neomycinresistenzkassette (NeoR). Die Haarnadel symbolisiert einen transkriptionellen Terminator. **B** Schematische Darstellung des Genlocus von *metK* im Stamm *S. meliloti* 2011 *FLAG-metK*. Das Plasmid pKACIT-FLAG-metK integriert sich über homologe Rekombination in den Genbereich von *metK* stromabwärts des nativen Promotors. Der native Promotor kontrolliert nur noch einen unvollständigen Teil des *metK* Gens. Der 16S-O Promotor kontrolliert das vollständige rekombinante Gen, das MetK mit einer N-terminalen 3x-FLAG Markierung codiert. Die restlichen Bereiche des Plasmides mit der Neomycinkassette werden als Strichelung dargestellt. Zugabe von Kristallviolett induziert die Produktion des Repressorproteins, LacI, und es kommt zur Repression des rekombinanten Gens *FLAG-metK*. Zugabe von IPTG induziert die Produktion des FLAG-MetK Proteins (modifiziert nach Jonas Kretz).

Um die intrazelluläre SAM-Konzentration über die FLAG-MetK Verfügbarkeit zu manipulieren, wurde ein SAM Depletionstest mit dem Stramm 2011 *FLAG-metK* durchgeführt (Kap. 5.11). Da das Gen *metK* essentiell ist, musste durch 1 mM IPTG Zugabe die Produktion des rekombinanten FLAG-MetK Proteins in der Vorkultur induziert werden. Am folgenden Tag wurde die Vorkultur mit frischem TY-Medium ohne IPTG, unter Zugabe von 0,2 µM Kristallviolett (um *lacI* zu induzieren), auf eine OD_{600} von 0,2 verdünnt und auf vier Kolben verteilt (Abb. 13A). In einem der vier Kolben wurde kein IPTG zugegeben. Unter diesen Bedingungen wurde die Expression des *FLAG-metK* Gens durch LacI inhibiert und demzufolge während des Bakterienwachstums die intrazelluläre Konzentration des FLAG-MetK Proteins kontinuierlich herabgesetzt. Zu den restlichen drei Kulturen wurde IPTG in unterschiedlichen Konzentrationen (0,1; 0,5 und 1 mM) hinzugefügt. Die unterschiedlichen IPTG-Konzentrationen sollten unterschiedlich starke Induktion der *FLAG-metK* Expression während des Wachstums gewährleisten. Bei einer OD_{600} von 0,5 wurden die Expression des FLAG-MetK Proteins, die SAM-Konzentration und die Abundanz relevanter RNAs untersucht.

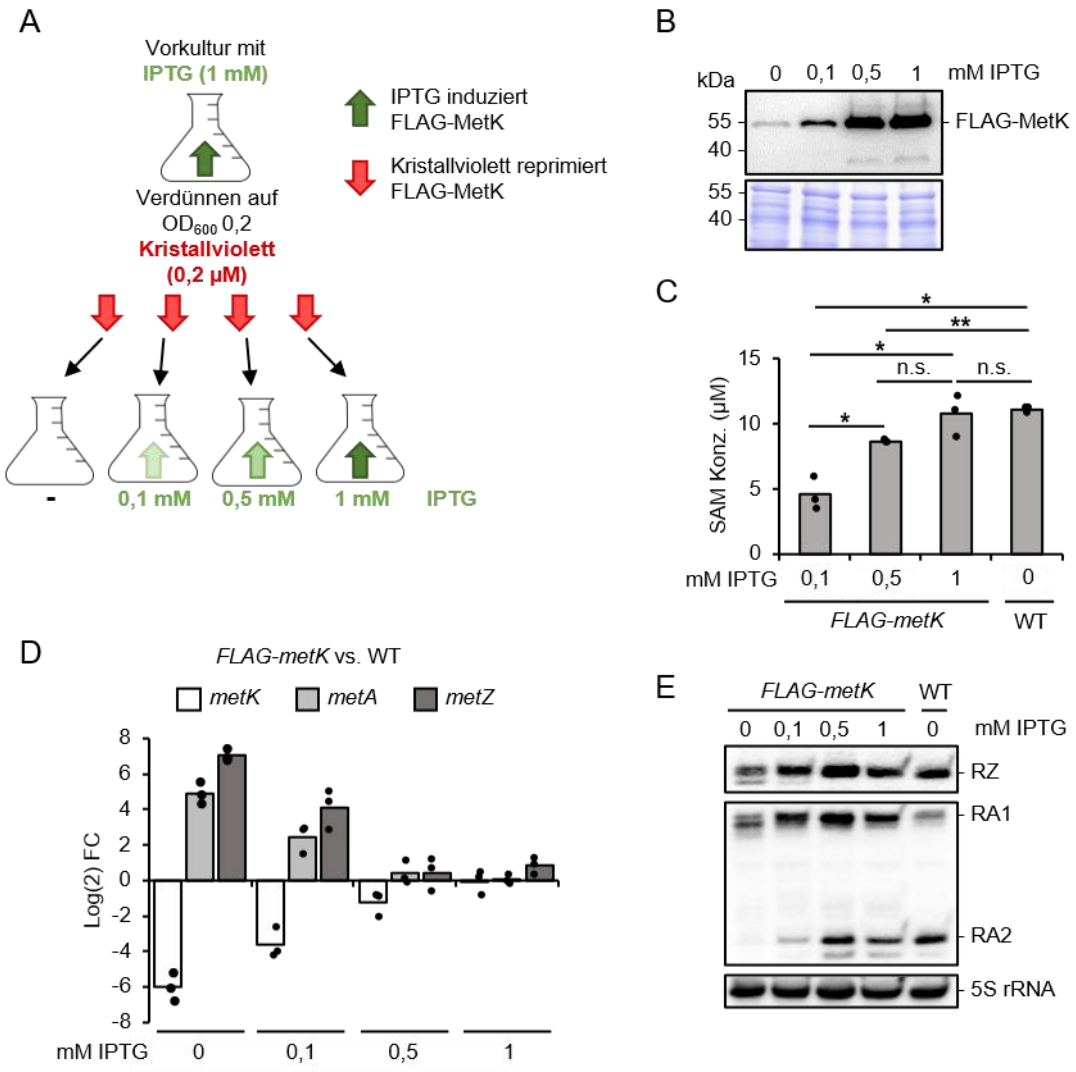

Abbildung 13: Manipulation von SAM und RNA-Niveaus durch IPTG-induzierbare SAM-Synthetase (*metK*) im Stamm 2011 *FLAG-metK*. A Schematischer Aufbau des SAM Depletionstests. Grüner Pfeil deutet auf die IPTG-induzierte FLAG-MetK Synthese, roter Pfeil deutet auf Kristallviolett-reprimierte Synthese von FLAG-MetK. TY-Vorkulturen wurden mit 1 mM IPTG inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen auf eine OD_{600} von 0,2 verdünnt. Um die Produktion des LacI Repressors zu induzieren und die *FLAG-metK* Expression zu reprimieren wurden 0,2 µM Kristallviolett hinzugefügt. Nach Aufteilen der Vorkultur in vier frische Kulturen wurde kein bzw. IPTG in den angegebenen Konzentrationen zur Induktion der *FLAG-metK* Expression hinzugegeben. Die Zellen wurden bei einer OD_{600} von 0,5 geerntet. **B** Western Blot Analyse zeigt Zunahme des FLAG-MetK Proteins bei zunehmender IPTG-Konzentration. Darunter ist ein Coomassie gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel als Ladekontrolle abgebildet. **C** SAM Messungen der Kulturen aus A. **D** Vergleich der angegebenen mRNAs zwischen dem *2011 FLAG-metK* Stamm (unter der Benutzung der in A gezeigten Kulturen) und dem Parentalstamm 2011 (WT) mittels RT-qPCR. Die Unterschiede (FC: *fold change*) werden als $\log_2$ dargestellt. **E** Northern Blot Analyse von Gesamt-RNA, elektrophoretisch aufgetrennt in einem 10 % PAA-Harnstoff-Gel. Die Sonden detektieren die angegebenen sRNAs. Die IPTG-Konzentrationen, so wie die verwendeten Stämme (siehe A und D) sind angegeben.

Die Western Blot Analyse zeigte mit steigender IPTG-Konzentration eine Zunahme des FLAG-MetK Proteins (Abb. 13B). Zudem zeigten SAM-Messungen eine Zunahme der SAM-Konzentration bei steigender IPTG-Konzentration (Abb. 13C). Das SAM-Niveau des parentalen Stamms 2011 wurde bei einer Zugabe von 1 mM IPTG erreicht. Auf RNA-Ebene korrelierte die Zunahme der IPTG-Konzentration mit einer Zunahme der *metK* mRNA und Abnahme der *metA* und *metZ* mRNA (Abb. 13D), sowie mit einer Zunahme der Riboswitch sRNAs, RZ, RA1 und RA2 (Abb. 13E).

Obwohl bei 0,5 µM IPTG-Konzentration im Mutantenstamm die SAM-Konzentration und die Mengen der untersuchten mRNAs fast das Niveau wie im Stamm 2011 erreicht haben (Abb. 13D), wurde ein Wildtyp-Muster der relativen Mengen der RA1 und RA2 sRNAs sogar bei 1mM IPTG nicht erreicht (Abb. 13E). Deswegen wurden die weiteren Analysen mit dem Stamm 2011, kultiviert in TY oder MM, angefertigt.

Die Ergebnisse dieses Kapitels zeigen die Abhängigkeit der Gleichgewichtsmengen der Riboswitch sRNAs und *metZ* und *metA* mRNAs von der intrazellulären SAM-Konzentration (Abb. 13). Sie belegen auch die höhere zelluläre SAM-Konzentration in TY- als in MM-Kulturen (Abb.11).

2.6 Stabilisierung der SAM-II Riboswitch enthaltenden sRNAs und mRNAs in Vollmedium-Kulturen

Die *S. meliloti* 2011 Riboswitch sRNAs RZ und RA2 sind in TY-Kulturen abundanter als in MM-Kulturen (Abb. 10B). Dem entgegengesetzt sind die *metZ* und *metA* Transkriptmengen geringer in TY- als in MM-Kulturen (Abb. 10C). Die RNA Abundanz (Gleichgewichtsmenge) wird durch die Transkription und den Abbau bestimmt. Um Stabilitätsunterschiede als möglichen Grund für die Abundanzunterschiede zu untersuchen, wurde bei einer OD_{600} von 0,5 durch Rifampicin die Transkription in *S. meliloti* 2011 TY- und MM-Kulturen gestoppt. Es wurden Proben entnommen vor (t = 0 sec) und nach der Rifampicinzugabe (t = 60 sec und 120 sec). Mittels Northern Blot und RT-qPCR Analysen wurde die Abbaukinetik relevanter RNAs ermittelt (Abb. 14).

Die Halbwertszeiten (HWZ) der Riboswitch-sRNAs wurden mit Hilfe von Northern Blot Hybridisierungen bestimmt. Es zeigte sich, dass die RZ sRNA in TY stabiler ist als in MM (HWZ in TY ≈ 90 sec und in MM ≈ 27 sec, Abb. 15A und 15B). Auch die RA1 sRNA war in TY-Kulturen mit einer HWZ von ≈ 58 sec stabiler als in MM-Kulturen, wo die HWZ ≈ 29 sec war (Abb. 15A und 15C). Da RA2 wahrscheinlich durch (RA1-) Prozessierung entsteht, konnte anhand dieser Methode keine korrekte Halbwertszeit bestimmt werden. In MM-Kulturen halbierte sich die Menge an RA2 ca. alle 107 Sekunden und in TY-Kulturen konnte kein Zerfall beobachtet werden, was auf eine Stabilisierung in TY hindeutet (Abb. 15A und 15D). Alle sRNAs wurden also im Vollmedium stabilisiert bzw. in Minimalmedium destabilisiert.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die höhere Stabilität der Riboswitch-sRNAs während des Wachstums in TY im Einklang mit der erhöhten Abundanz der sRNAs RZ und RA2 (und einer angenommenen Prozessierung von RA1 zu RA2) ist, und zu dieser erhöhten Abundanz beiträgt.

Die Stabilität der *metZ* und *metA* mRNAs wurde mittels RT-qPCR analysiert. Auch hier wurde gezeigt, dass *metZ* und *metA* mRNAs in TY-Kulturen deutlich stabiler sind als in MM-Kulturen (HWZ von *metZ* in TY ≈ 60 sec, in MM ≈ 32 sec; HWZ von *metA*, in TY ≈ 60 sec, in MM ≈ 26 sec; Abb. 15E und 15F). Da die Halbwertzeiten der Kontroll-mRNA *trpE* unter beiden Bedingungen gleich waren, ist davon auszugehen, dass die Stabilisierung der *metZ* und *metA* mRNAs während des Wachstums in TY spezifisch ist (Abb. 15G).

Die höhere Stabilität der *metZ* und *metA* mRNAs in TY-Kulturen steht entgegen der niedrigeren Abundanz dieser mRNAs in solchen Kulturen im Vergleich mit MM-Kulturen. Um die Abundanzunterschiede weiter zu untersuchen wurde im Folgenden die Transkription analysiert.

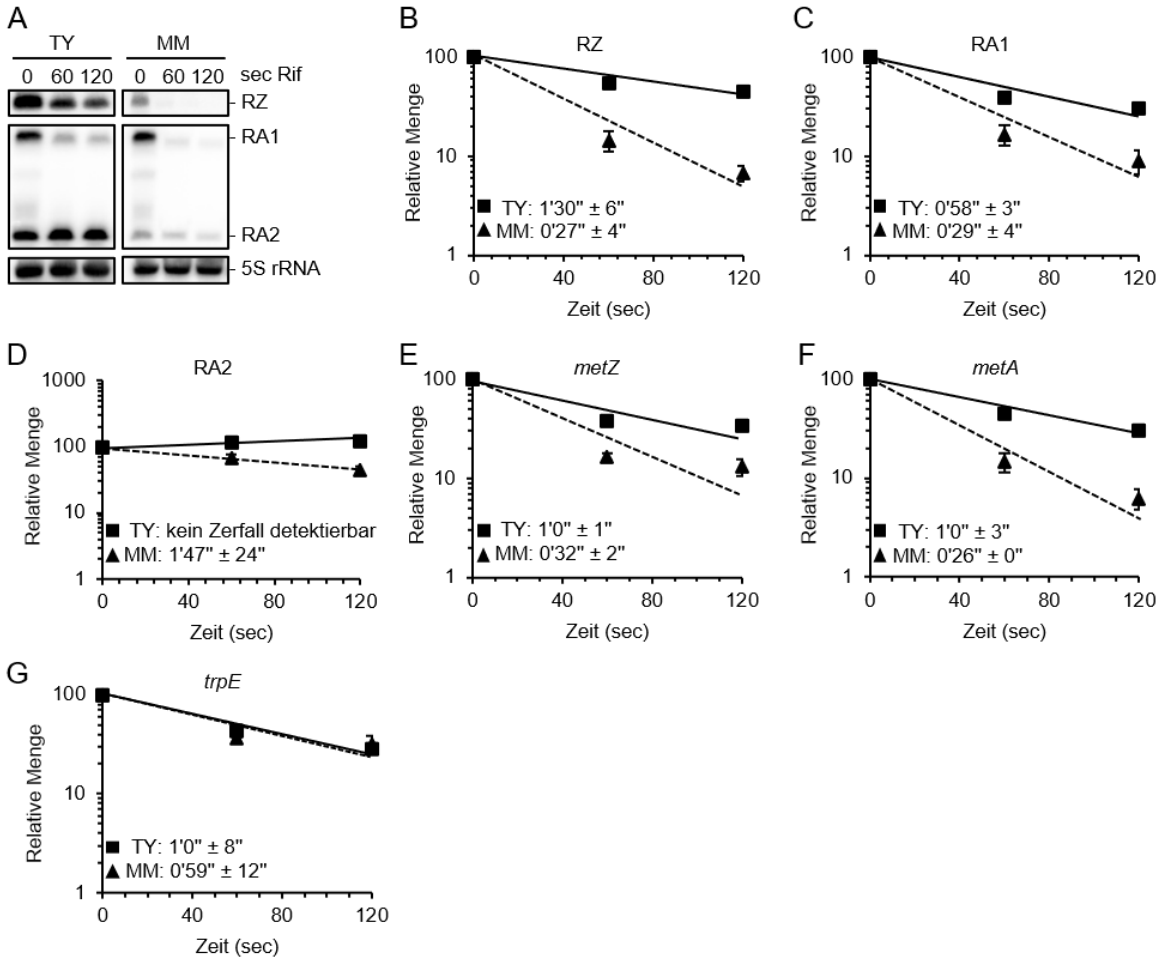

Abbildung 14: SAM-II Riboswitch enthaltende RNAs von *S. meliloti* 2011 sind stabiler in TY- als in MM-Kulturen. A Northern Blot Analysen von Gesamt-RNA elektrophoretisch aufgetrennt in einem 10 % PAA-Harnstoff-Gel. Die Sonden richten sich gegen die angegebenen sRNAs. Gesamt-RNA wurde vor (t = 0) und zu den angegebenen Zeitpunkten nach Zugabe von Rifampicin (Rif) isoliert. Die Zeit ist in Sekunden (sec) angegeben. **B-G** Graphische Darstellungen der Bestimmung der Halbwertszeiten der angegebenen sRNAs und mRNAs mittels Northern Blot (A – D) und RT-qPCR (E – G). Aufgetragen ist die relative RNA-Menge in Abhängigkeit von der Zeit nach Rif Zugabe. Die RNA-Menge zum Zeitpunkt 0 sec (vor Rif Zugabe) wurde als 100 % definiert. RNA aus TY-Kulturen: Rechtecke und durchgezogene Linie; RNA aus MM-Kulturen: Dreiecke und gestrichelte Linie; n = 2. Gezeigt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen. In manchen Fällen ist die Standardabweichung so gering, dass sie durch das Symbol verdeckt wird. Die bestimmten Halbwertszeiten sind auch angegeben.

2.7 Untersuchungen zur Transkription von *metZ* und *metA*

Wie zuvor vermerkt sind Transkription und Stabilität maßgebend für die Gleichgewichtsmenge einer RNA. Im Folgenden wurde die Promotoraktivität von *metA* und *metZ* mit Promotorfusionsreportern auf Plasmiden analysiert.

Die Reporterplasmide (Abb. 15A) beinhalten die Sequenz des verstärkt grün fluoreszierenden Proteins (*enhanced green fluorescent protein, egfp*) mit einer für *S. melitloti* angepassten Codonverwendung. Vor dem *egfp*-ORF befindet sich eine typische SD Sequenz. Um die Aktivität der Promotoren von *metZ* (P_{metZ}) und *metA* (P_{metA}) zu analysieren, wurden diese stromaufwärts der SD Sequenz in das Plasmid pRS1-SD-egfp kloniert. Hierfür wurde die *metZ* Region von -206 bis +5 im Plasmid pP_{metZ}-egfp und die *metA* Region von -209 bis +5 im Plasmid pP_{metA}-egfp verwendet (+1 entspricht dem jeweiligen Transkriptionsstart, bestimmt durch (Schlüter et al. 2013)). Als Kontrollen dienten der leere Vektor (pRS1-SD-efp) und ein weiteres Fusionsplasmid mit dem Promotor von *sinI*, welches ebenfalls die Produktion des stromabwärts gelegenen *egfp* Gens kontrolliert, pP_{sinI}-egfp.

Die jeweiligen Plasmide wurden in *S. meliloti* 2011 konjugiert und die Konjugationsstämme in TY und MM kultiviert. Bei einer OD_{600} von 0,5 wurde die Fluoreszenz gemessen und in Relation zur OD_{600} und Autofluoreszenz der Bakterien mit leerem Vektor gesetzt (Abb. 15B).

Die Kulturen mit den Plasmiden pP_{metZ}-egfp und pP_{metA}-egfp zeigten signifikant höhere Fluoreszenz in MM als in TY, wobei der Unterschied größer mit pP_{metA}-egfp war. Außerdem zeigten Kulturen mit pP_{metZ}-egfp generell eine höhere Fluoreszenz als Kulturen mit pP_{metA}-egfp. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die Promotoren von *metZ* und *metA* aktiver in MM als in TY sind, weshalb ihnen eine Mediumsensitivität zugesprochen wurde.

Um zu beurteilen, ob die *egfp* mRNA-Stabilität bei Wachstum in TY oder MM zur erhöhten Fluoreszenz beiträgt, wurde die *egfp* mRNA analysiert. Es wurde eine größere Abundanz der *egfp* mRNA transkribiert von P_{metA} in MM-Kulturen als in TY-Kulturen nachgewiesen (log_2FC 0,67 ± 0,2). Jedoch war die *egfp* mRNA weniger stabil in MM- als in TY-Kulturen (Abb. 15C). Diese Ergebnisse zeigen klar, dass die P_{metA} Aktivität in MM-Kulturen höher ist als in TY-Kulturen. Da für P_{metZ} eine ähnliche Mediumsensitivität mithilfe desselben Reportergens beobachtet wurde, wurde angenommen, dass die Aktivität von P_{metZ} auch in MM-Kulturen höher ist als in TY-Kulturen.

Interessanterweise hat sich herausgestellt, dass die Plasmide pP_{metz}-egfp und pP_{metA}-egfp einen starken negativen Effekt auf die Abundanz der chromosomtranskribierten *metZ* und *metA* mRNAs haben (Abb. 15D). In den meisten Fällen war der negative Einfluss auf die mRNA Mengen stärker in TY als in MM.

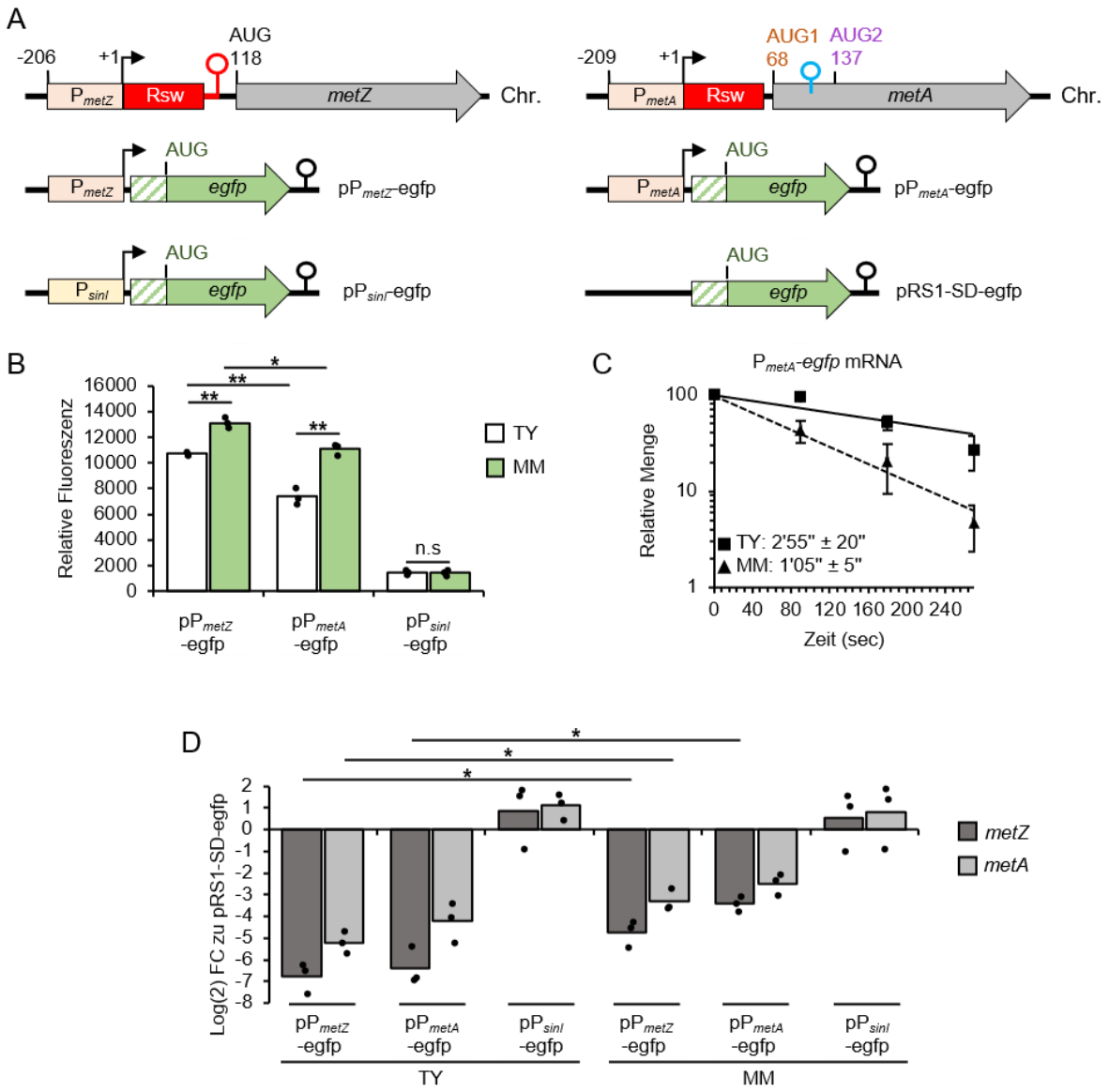

Abbildung 15: Charakterisierung der Plasmide pP*metZ*-*egfp* und pP*metA*-egfp in *S. meliloti* 2011 in TY und MM. **A** Schematische Darstellung der *metZ* und *metA* Genloci (Chr.: Chromosom) und der verwendeten Plasmide mit entsprechenden promotorumfassenden Regionen der Gene *metZ, metA,* und *sinI.* Grüner Pfeil*:* das Reportergen *egfp*. Die grün-straffierte Box stellt eine synthetische 5'-UTR mit Shine-Dalgarno Sequenz dar. **B** Fluoreszenzmessungen der *S. meliloti* 2011 Stämme mit aufgeführten Plasmiden in TY und MM bei einer OD_{600} von 0,5. **C** Stabilitätsanalyse der Reporter-mRNA *egfp* im Stamm mit dem Plasmid pP*metA*-egfp, kultiviert in TY und MM. Dargestellt ist die relative mRNA-Menge in Bezug auf die Zeit nach Zugabe von Rifampicin. **D** Messungen der *metZ* und *metA* mRNA-Niveaus mittels RT-qPCR in Stämmen mit entsprechenden Plasmiden, im Vergleich zur leeren Vektorkontrolle (Stamm mit pRS1-SD-egfp).

Es wäre ideal, als Kontrolle einen Promotor zu verwenden, der nicht von den verwendeten Wachstumsmedien beeinflusst ist. Es wurde getestet, ob der Promotor des Gens *sinI* (P*sinI*) diesen Anforderungen entspricht. Dafür wurde das Reporterplasmid pP*sinI*-egfp verwendet (Abb. 15A). Kulturen mit dem Plasmid pP*sinI*-egfp zeigten eine geringere Fluoreszenz als mit den Plasmiden pP*metZ*-egfp und pP*metA*-egfp und keine Mediumsensitivität (Abb. 15B). Die Gleichgewichtsmengen der transkribierten *egfp* mRNA in TY und MM waren ebenfalls vergleichbar (TY vs. GMX $\log_2$FC 0,12 ± 0,13). Dahingegen war die von pP*sinI*-egfp

transkribierte *egfp* mRNA in TY-Kulturen stabiler als in MM-Kulturen (TY ≈ 4,5 min und MM ≈ 1,5 min, n = 1). Demzufolge ist der *sinI* Promotor aktiver in MM und nicht, wie erst angenommen wurde, Medium unabhängig. Anders als in den Kulturen mit pP$_{metZ}$-egfp und pP$_{metA}$-egfp wurde in Kulturen mit pP$_{sinI}$-egfp kein negativer Effekt auf die von den Chromosomen transkribierte *metZ* und *metA* mRNA nachgewiesen (Abb. 15D). Deshalb wurde angenommen, dass die mRNA-Abnahme ein spezifischer Effekt von pP$_{metA}$-egfp und pP$_{metZ}$-egfp ist.

Es wurden Konstrukte mit unterschiedlichem Längen des chromosmalen *metA* Bereiches, welche alle die Promotorregion umfassen, verwendet, um die Regulation der Mediumsensitivität zu untersuchen (Abb. 16A). Für jedes Konstrukt wurde eine ähnliche Fluoreszenzintensität wie für pP$_{metA}$-egfp gemessen (Abb. 16B); d.h., es wurde keine Aufhebung der Mediumsensitivität festgestellt. Dies lässt darauf schließen, dass sich der entscheidende Bereich für die Regulation in der Region -52 bis +5 und hiermit nahe dem oder überlappend mit dem Promotor befindet.

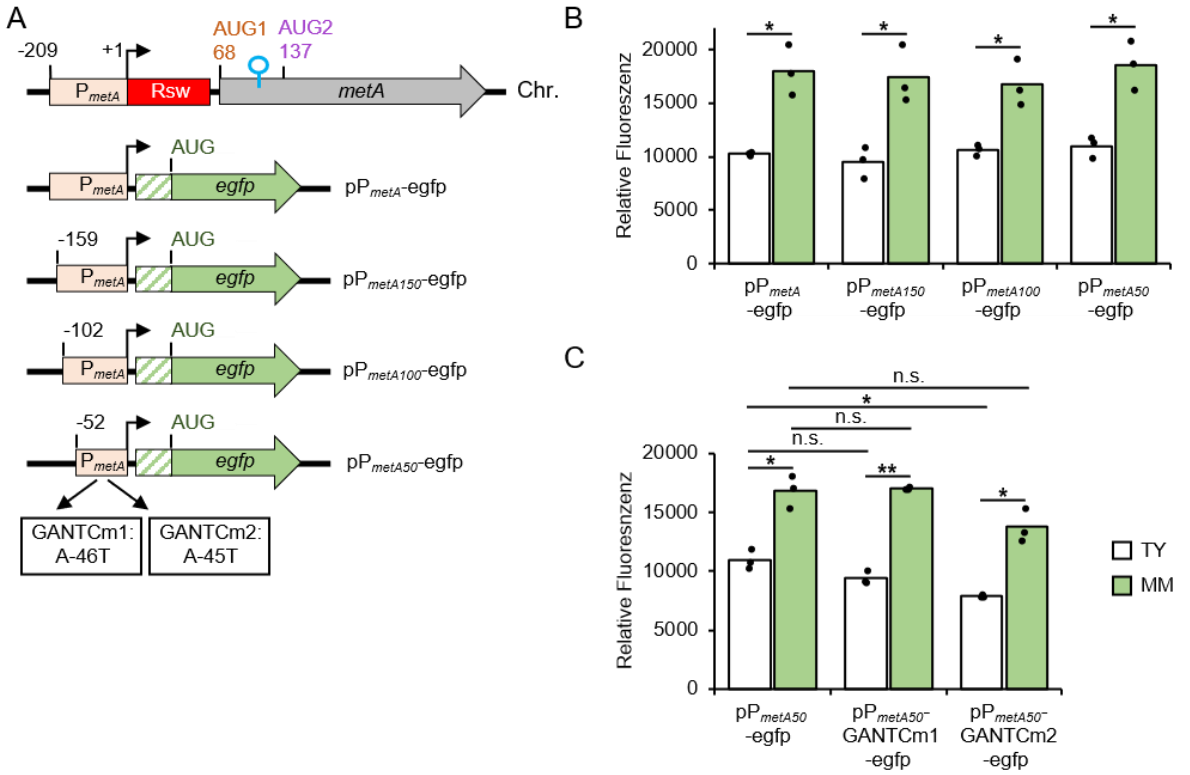

Abbildung 16: Regulierender Bereich für Mediumsensitivität nahe P$_{metA}$. **A** Schematische Darstellung des *metA* Genlocus (Chr.: Chromosom) und der verwendeten Plasmide mit den angegebenen, P$_{metA}$-umfassenden Regionen und *egfp* (grüner Pfeil). Die grün-straffierte Box stellt eine synthetische 5'-UTR mit Shine-Dalgarno Sequenz dar. **B** und **C** Relative Floreszenzen von *S. meliloti* 2011 Stämmen mit den angegebenen Plasmiden bei einer OD$_{600}$ von 0,5. Die Bakterien wurden in TY und MM kultiviert (angegeben). **B**, das Experiment wurden von Theresa Dietz durchgeführt.

Es ist bekannt, dass das Sequenzmotiv „GANTC“ in Alphaproteobakterien eine Zielsequenz der N6-Adenosinmethyltransferase CcrM ist. Solche methylierten Promotoren werden von

dem transkriptionellen Aktivator GcrA erkannt und gebunden (Fioravanti et al. 2013). Ein solches Motiv befindet sich in der *metA* Region -47 bis -43. Um die Bedeutung des Motivs für die hier beobachtete Mediumsensitivität des Promotors zu überprüfen, wurden Punktmutationen in das Sequenzmotiv des Promotorfusionsplasmids pP_{metA50}-egfp eingeführt und erneut Fluoreszenz gemessen (Abb. 16A).

Obwohl das potenziell methylierte Adenosin im G**A**NTC-Motiv mutiert wurde (A-46T, pP_{metA50}-GANTCm1-egfp), wurden keine Änderung der Fluoreszenzintensität beobachtet (vergleiche pP_{metA50}-egfp mit pP_{metA50}-GANTCm1-egfp in Abb. 16C) und die Mediumsensitivität wurde nicht beeinträchtigt. Als Kontrolle wurde das variable Nukleotid im GA**N**TC-Motiv (A-45T, pP_{metA50}-GANTCm2-egfp) mutiert. Auch hier wurde die Mediumabhängigkeit (wie erwartet) nicht verändert. Allerdings wurde dabei die Promotoraktivität in TY leicht gemindert (vergleiche pP_{metA50}-GANTCm2-egfp mit pP_{metA50}-egfp und pP_{metA50}-GANTCm1-egfp in Abb. 16C). Die Ergebnisse sprechen dafür, dass eine putative Methylierung im GANTC-Motiv in TY (intrazelluläre SAM-Konzentration höher als in MM) keine Auswirkung auf die Aktivität von P_{metA} unter den hier beschriebenen Bedingungen hat. Der Mechanismus der Transkriptionsregulation des P_{metA} und die mögliche Bindung eines Transkriptionsfaktors in der Region -52 bis +5 bleibt hiermit unklar.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass die Transkription von *metZ* und *metA* bereits auf Promotorebene reguliert wird und in MM stärker als in TY ist. Es liegt die Vermutung nahe, dass die Verfügbarkeit von Methionin oder SAM für die jeweilige Promotorenaktivität eine Rolle spielt.

2.8 Vorläufige Transkriptionstermination von *metA*

Stromabwärts des *metA* Riboswitches zwischen AUG1 und AUG2 wurde ein transkriptioneller Terminator vorhergesagt (Abb. 5). Um diesen experimentell nachzuweisen, wurde in das Plasmid pP_{metA}-egfp zwischen P_{metA} und *egfp* (im 5'-UTR des *egfp*) die vorhergesagte Terminatorsequenz kloniert, (siehe pTerm-egfp in Abb. 17A und 17B). S. *meliloti* 2011 Stämme mit den entsprechenden Plasmiden wurden in TY und MM kultiviert und die Fluoreszenz wurde bei einer OD_{600} von 0,5 gemessen.

Die Anwesenheit der Terminatorsequenz führte zu einer deutlichen Minderung der Fluoreszenz in beiden Medien (vergleiche pP_{metA}-egfp mit pTerm-egfp in Abb. 17C). Um zu beweisen, dass diese Fluoreszenzminderung tatsächlich durch transkriptionelle Termination hervorgerufen wurde, wurde eine destabilisierende Mutation (M1) im vorhergesagten Terminatorstamm eingeführt (Abb. 17B). Wie erwartet, führte diese Mutation zu starker Fluoreszenz (vergleiche pP_{metA}-egfp mit pTerm-M1-egfp in Abb. 17C), die durch eine Aufhebung der Transkriptionstermination erklärt werden kann. Durch das Einführen einer

kompensatorischen Mutation M2, die die Sekundärstruktur des Terminators wiederherstellen sollte (Abb. 17B), wurde die Fluoreszenz erneut gemindert (vergleiche pTerm-M1+M2-egfp mit pTerm-M1-egfp in Abb. 17C). Somit wurde die Existenz eines Rho-unabhängigen Terminators zwischen AUG1 und AUG2 bewiesen.

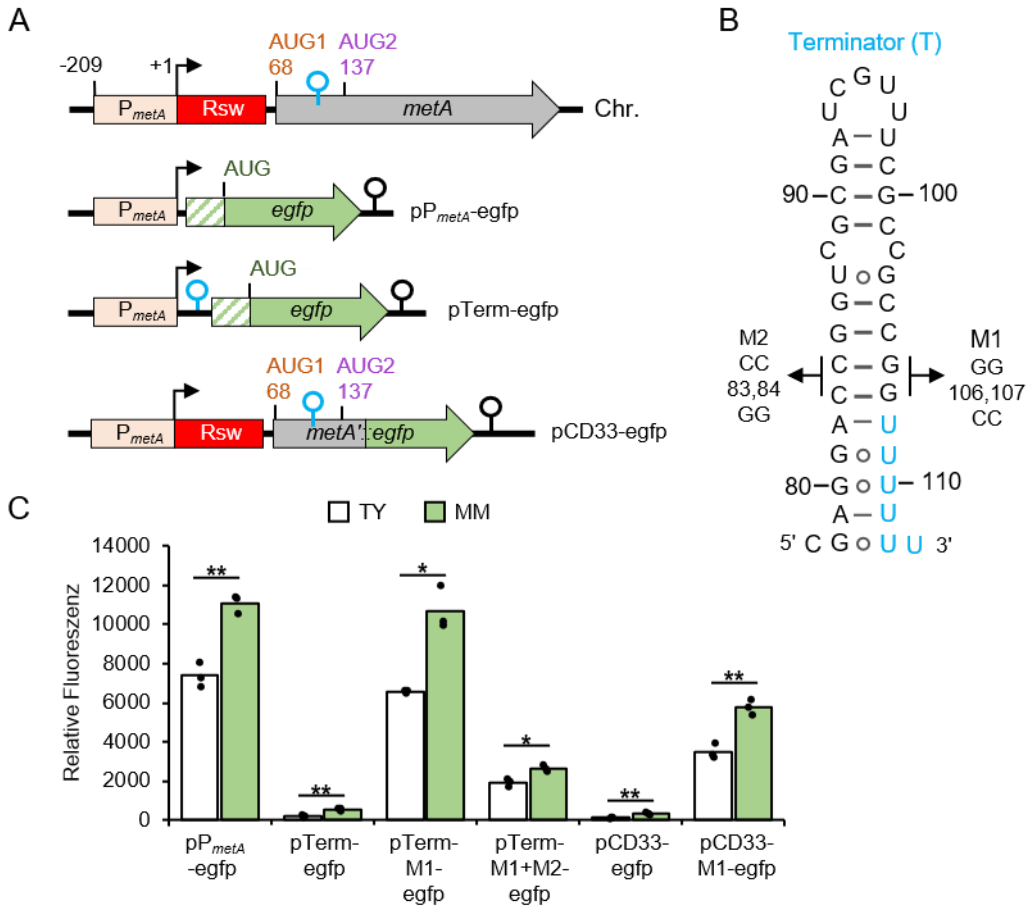

Abbildung 17: Starke Limitierung der *metA* Expression durch einen transkriptionellen Terminator zwischen AUG1 und AUG2. A Schematische Darstellung des *metA* Genlocus (Chromosom: Chr.). Die verwendeten Plasmide besitzen die P_{metA} Region und die Reportersequenz von *egfp* (grüner Pfeil). Das Plasmid pP_{metA}-egfp enthält eine synthetische 5'-UTR mit Shine-Dalgarno Sequenz (grün-gestreifte Box) vor *egfp*. Das Plasmid pTerm-egfp (Derivat von pP_{metA}-egfp) enthält zusätzlich die Terminatorsequenz (siehe B) in Cyan zwischen P_{metA} und Reporter-*egfp*. Das Plasmid pCD33-egfp ist eine translationale Fusion. Sie enthält P_{metA}, die 5'-UTR mit dem Riboswitch (rote Box, Rsw) und die ersten 33 *metA* Codons (AUG1 = 1. Codon) wurden im Leserahmen mit dem dritten Codon von *egfp* fusioniert. Das Plasmid enthält den Terminator (Cyane Haarnadel) zwischen AUG1 und AUG2. **B** Vorhergesagte Sekundärstruktur des Rho-unabhängigen Terminators. Die benutzten Mutationen (M1 und M2) sind angegeben. **C** Fluoreszenz von *S. meliloti* 2011 Stämmen mit den angegebenen Plasmiden, kultiviert in TY und MM bei einer OD_{600} von 0,5.

Im Weiteren wurde die Funktion des Terminators im Kontext einer translationalen Fusion untersucht. Hierfür wurde das Reporterplasmid pCD33-egfp verwendet. Es besitzt den P_{metA}, den Riboswitch und 33 *metA* Codons (wenn AUG1 als erstes Codon erachtet wird), fusioniert mit dem dritten *egfp* Codon. Somit befindet sich auf diesem Reporterplasmid zwischen AUG1 und AUG2 die Terminatorsequenz (Abb. 17A).

Sowohl in TY als auch in MM wurde bei Kulturen mit pCD33-egfp sehr schwache Fluoreszenz gemessen (vergleiche pP_{metA}-egfp mit pCD33-egfp in Abb. 17C). Diese wurde durch die M1

Mutation gesteigert (vergleiche pCD33-M1-egfp mit pCD33-egfp in Abb. 17C). Diese Ergebnisse sprechen für einen funktionsfähigen Transkriptionsterminator auch im nativen Kontext.

Zusammengefasst zeigen die Daten eine starke Limitierung der *metA* Expression durch den transkriptionellen Terminator unter Wachstum in beiden bentzten Medien. Diese vorzeitige Transkriptionstermination findet vor dem AUG2 statt.

2.9 Untersuchung der Translationsinitiation von *metA*

Wie in Kap. 2.1 bereits erklärt (Abb. 5), befindet sich in unmittelbarer Nähe zum *metA* Aptamer eine potentielle ribosomale Bindestelle (RBS), bestehend aus SD1 und AUG1. Zudem befindet sich 69 nt weiter stromabwärts im Leserahmen ein weiteres AUG, AUG2 mit potenziellen SD2 und SD3 Sequenzen. Hiermit war der Translationsstart von *metA* unklar.

Um zu testen, welches AUG als Startcodon für die *metA* Expression dient, wurden Plasmide mit translationalen Fusionen konstruiert, pAUG1-egfp und pAUG2-egfp (Abb. 18A). Diese Plasmide besitzen den $P_{metA,}$ aber keinen funktionsfähigen SAM-II Riboswitch. Das Plasmid pAUG1-egfp beinhaltet die SD1 Sequenz GAGG 5 nt vor AUG1 (RBS b in Abb. 18A). Das Plasmid pAUG2-egfp enthält die SD2 und SD3 Sequenzen GAG und GGA mit einem Abstand von 9 bzw. 5 Nukleotiden zu AUG2 (RBS c in Abb. 18A). In den Reporterplasmiden wurde die jeweilige RBS (b oder c), gefolgt von je einem weiteren *metA*-Codon, mit dem dritten *egfp* Codon fusioniert.

Die Fluoreszenz von *S. meliloti* 2011 TY- und MM-Kulturen mit den jeweiligen Plasmiden wurde bei einer OD_{600} von 0,5 gemessen. Es wurde nur Fluoreszenz bei den Kulturen mit pAUG1-egfp detektiert (Abb. 18B). Dies weist auf einen Translationsstart am AUG1 hin.

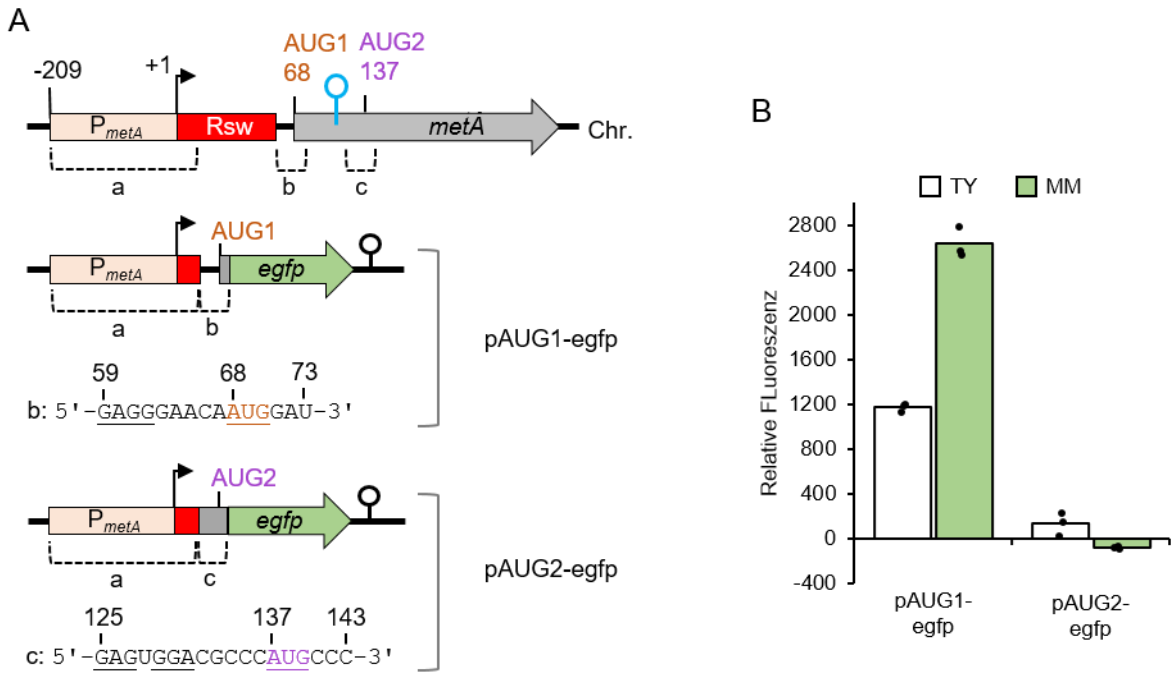

Abbildung 18: Außerhalb des nativen Kontexts wurde Translation von AUG1 detektiert, nicht aber von AUG2. A Schematische Darstellung des *metA* Genlocus (Chr: Chromosom) und die verwendeten translationalen Fusionen. In den angegebenenPlasmiden wurden die chromosomale Region a entweder mit b oder c fusioniert. Die Sequenzen von b und c sind abgebildet. Potenzielle Shine-Dalgarno Sequenzen und AUG Codons sind unterstrichen. Weitere Informationen zu *metA* Transkript sind im Text und in Abb. 5. **B** Fluoreszenz von *S. meliloti* 2011 Stämmen mit den angegebenen Plasmiden bei einer OD_{600} von 0,5, kultiviert in TY und MM.

Im Kontrast dazu stehen die Ergebnisse mit translationalen Fusionen, welche den SAM-II Riboswitch enthalten und in denen der native Kontext der beiden potentiellen Translationsstarts erhalten wurde (Abb. 19A). Es wurden Plasmide verwendet, die 3, 16, 28, 33, 36, 39 oder 51 *metA* Codons umfassen (1. Codon = AUG1; Abb. 19A; das 33-Codons umfassende Plasmid pCD33-egfp ist auch in Abb. 17 dargestellt). Stämme mit den Plasmiden pCD3-egfp und pCD16-egfp, die lediglich AUG1 besitzen, wiesen keine Fluoreszenz auf (Abb. 19B). Auch wenn das Plasmid pCD28-egfp beide AUGs beinhaltet, wurde auch bei Kulturen mit diesem Plasmid keine Fluoreszenz detektiert. Erst ab Fusionen mit 33 *metA* Codons war eine stabile Fluoreszenz nachweisbar (siehe pCD33-, pCD36, pCD39 und pCD51-egfp in Abb. 19B).

Um weiter der Frage nach dem Translationsstart nachzugehen wurde AUG1 bzw. AUG2 in pCD33-egfp mutiert (Abb. 19C und 19D). Die Mutation von AUG1 zu einem Stoppcodon (pCD33-AUG1m-egfp) führte zu keiner Minderung der Fluoreszenz, wohingegen eine Mutation von AUG2 zu GUC (pCD33-AUG2m-egfp) in fehlender Fluoreszenz resultierte (Abb. 19E). Auch eine Stoppmutation zwischen AUG1 und AUG2 zeigte keine Fluoreszenzminderung, sondern erhöhte diese sogar (vergleiche pCD33-egfp und pCD33-Stopp-egfp). Diese Ergebnisse zeigen, dass im natürlichen Kontext AUG2 als Translationsstart verwendet wird.

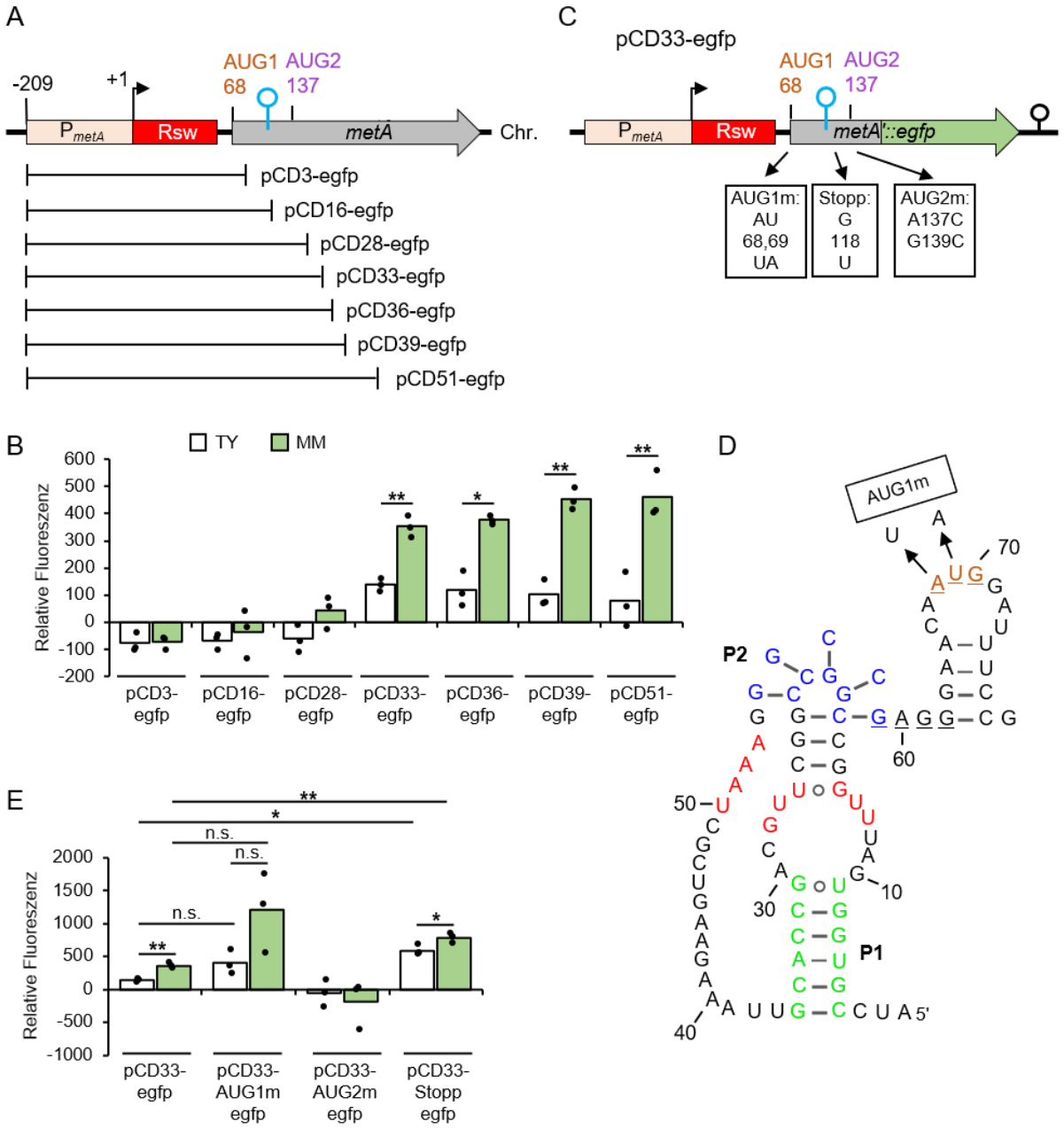

Abbildung 19: Translation von *metA* beginnt an AUG2. A Schematische Darstellung des *metA* Genlocus (Chr.: Chromosom). Die verwendeten translationalen Fusionen werden angedeutet. **B** Fluoreszenz der *S. meliloti* 2011 Stämme mit den angegebenen Plasmiden bei einer OD_{600} von 0,5, kultiviert in TY und MM. Es gibt keinen signifikanten Unterschied der Fluoreszenz der Stämme mit den Reporterkonstrukten pCD33-, pCD36-, pCD39- und pCD51-egfp. **C** Schema des Plasmids pCD33-egfp mit den eingeführten Mutationen. **D** Vorhergesagte Sekundärstruktur des Riboswitches im SAM-gebundenen Zustand. Die eingeführte AUG1m Mutation ist abgebildet. Unterstrichen ist die Shine-Dalgarno Sequenz von AUG1. Die konservierten Nukleotide des Aptamers sind farbig (genaue Beschreibung siehe Abb. 5). **E** Fluoreszenz der *S. meliloti* 2011 Stämme mit den angegebenen Plasmiden bei einer OD_{600} von 0,5 kultiviert in TY und MM.

Da sich unmittelbar stromabwärts des Riboswitches die SD Sequenz des AUG1 befindet, blieb dessen Rolle für die *metA* Expression zu klären. Hierfür wurde im Plasmid pCD33-egfp die SD Sequenz GAGG zu GAUU mutiert (Mutation SD1m, resultierendes Plasmid pCD33-SD1m-egfp) und die Fluoreszenz des entsprechenden Stammes gemessen (Abb. 20A, 20B). Die Mutation führte in TY bei einem Klon zu einer erhöhten Fluoreszenz und bei zwei Klonen wurde

keine Fluoreszenz detektiert (Abb. 20C). In MM zeigten die drei untersuchten Klone eine stark verminderte Fluoreszenz. Daraus lässt sich ableiten, dass die SD Sequenz vor AUG1 (SD1) für die *metA* Expression sehr wichtig ist.

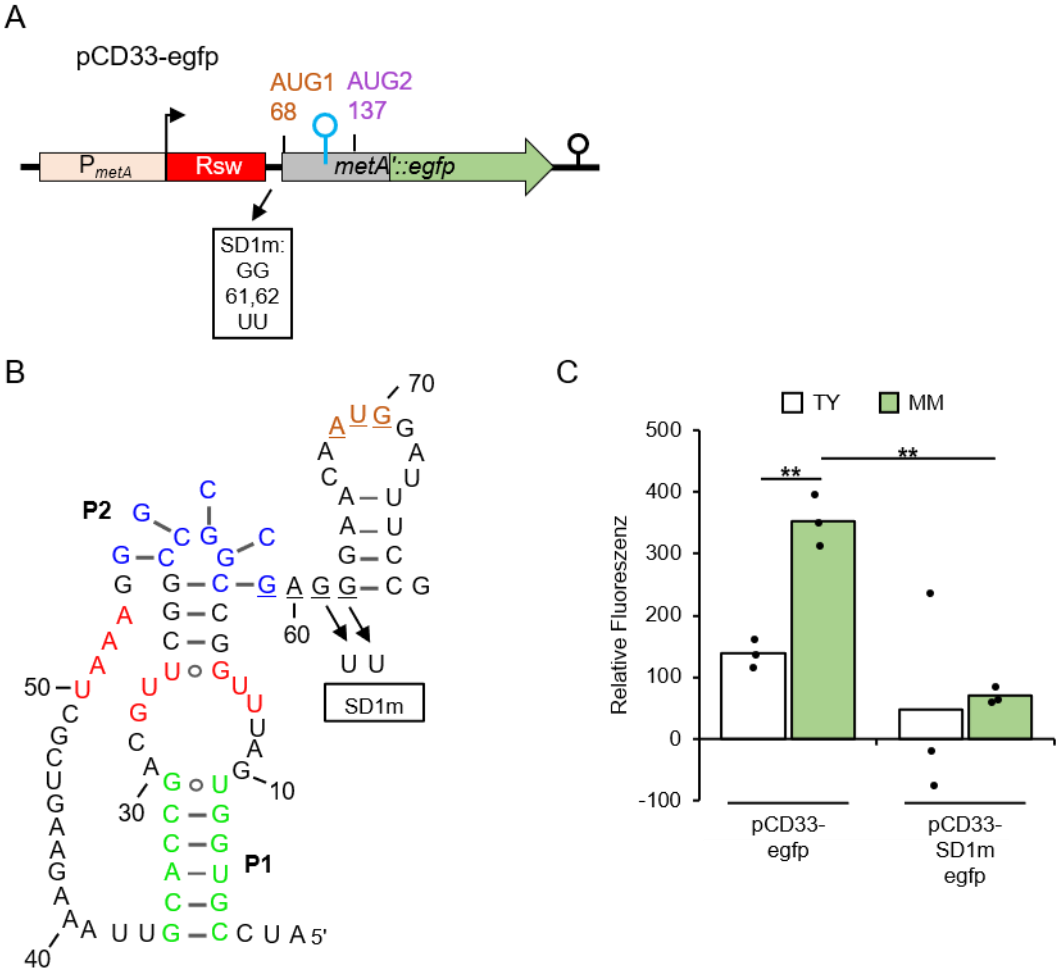

Abbildung 20: Unmittelbar stromabwärts des Riboswitches ist die Shine-Dalgarno Sequenz wichtig für die *metA* Translation. A Schematische Darstellung des Plasmids pCD33-egfp und der eingeführten Mutation SD1m. **B** Vorhergesagte Sekundärstruktur des Riboswitches im SAM-gebundenen Zustand. Die eingeführte Mutation SD1m ist abgebildet. **C** Fluoreszenz der *S. meliloti* 2011 Stämme mit angegebenen Plasmiden bei einer OD_{600} von 0,5, kultiviert in TY und MM.

Da SD1 sehr wichtig für die Translation 74 nt stromabwärts am AUG2 ist, stellt sich die Frage, ob der Abstand zwischen den beiden Elementen eine Rolle für die *metA* Expression spielt. Hierfür wurden in das Plasmid pCD33-egfp drei Deletionsmutationen zwischen dem Transkriptionsterminator und AUG2 eingeführt (Abb. 21A). Wie bereits dargelegt, befinden sich vor AUG2 zwei SD-ähnliche Sequenzen (SD2: GAG, Position 125-127 und SD3: GGA, Position 129-131; siehe auch Abb. 5). Das Plasmid pCD33-Δ116-124-egfp trägt eine Deletion von Position 116 bis Position 124, und beinhaltet hiermit SD2 und SD3. Das Plasmid pCD33-Δ124-136-egfp umfasst eine Deletion von Position 124 bis Position 136, und beinhaltet hiermit AUG2 ohne SD2 und SD3. Im Plasmid pCD33-Δ116-136-egfp wurde der gesamte Bereich stromabwärts des Terminators (Position 116) bis zu AUG2 (Position 136) deletiert (Abb. 21A).

Die Fluoreszenz der Stämme mit jeweiligem Plasmid wurde gemessen (Abb. 21B). Durch die Verkürzung der 5'-UTR um 8 nt stromabwärts des Terminators bis zu SD2 wurde eine erhöhte Fluoreszenz gemessen (vergleiche pCD33-egfp und pCD33-Δ116-124-egfp in Abb. 21B). Der Grund könnte im Abstand liegen oder auch in einer veränderten mRNA-Stabilität, welche hier nicht überprüft wurde.

Die Deletionen im Bereich von 124-136 nt oder 116-136 nt führten zu keiner Fluoreszenz (pCD33-Δ124-136-egfp und pCD33-Δ116-136-egfp in Abb. 21B), was eine wichtige Rolle der SD2 und SD3 Sequenzen für die Translation vom AUG2 nahelegt. Um die Rollen von SD2 und SD3 in der *metA* Translation weiter zu analysieren, wurden diese mutiert.

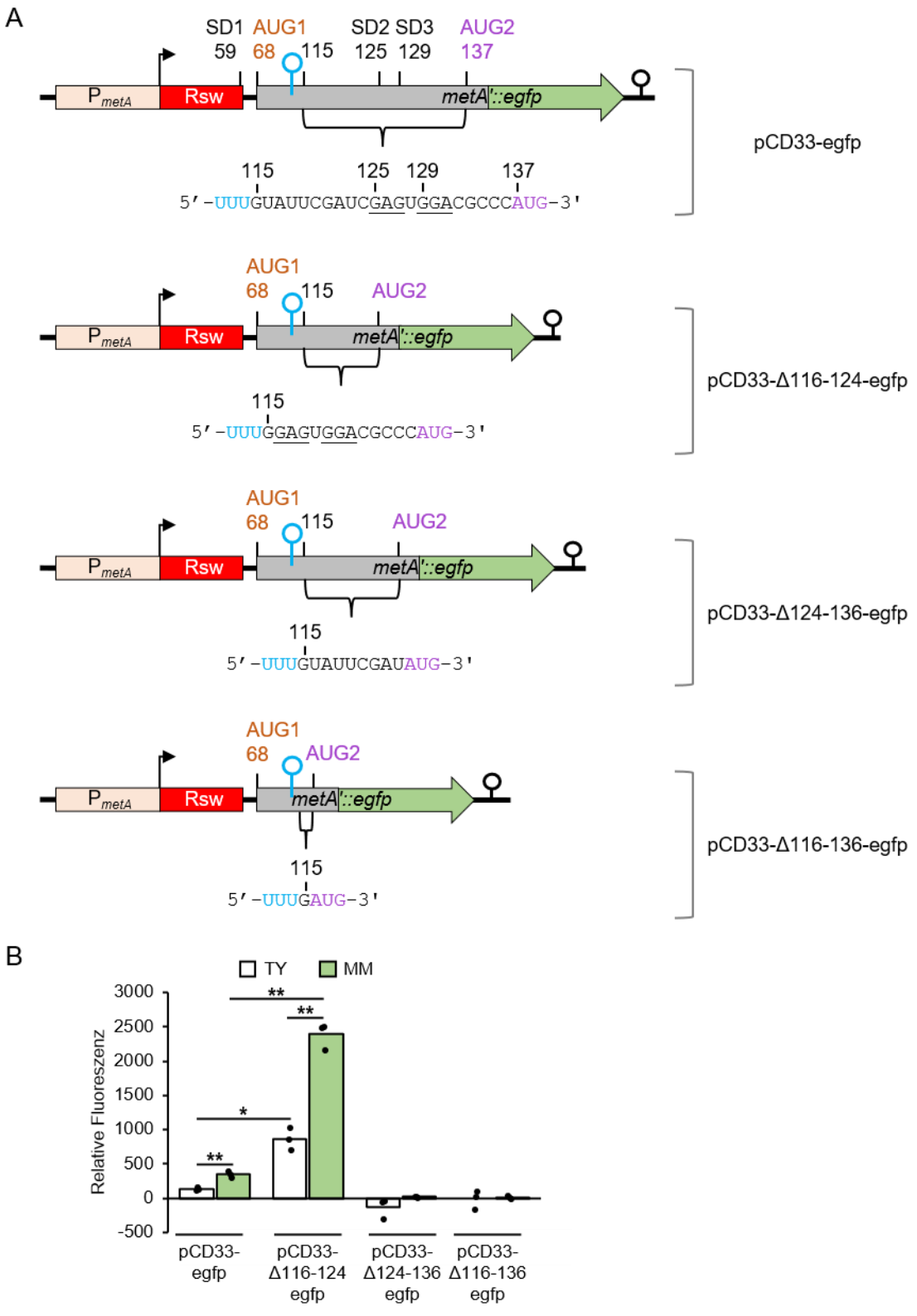

Abbildung 21: Möglicher Einfluss der Shine-Dalgarno Sequenzen stromaufwärts von AUG2 auf die Translation. A Schematische Darstellung des Plasmids pCD33-egfp und der eingeführten Deletionsmutationen. Die Bereiche 116-124; 124-136 und 11-136 wurden jeweils in den Plasmiden pCD33-Δ116-124-egfp, pCD33-Δ124-136-egfp und pCD33-Δ116-136-egfp deletiert. Die Sequenz zwischen Terminator (cyane UU) bis zum AUG2 ist angegeben. Die SD Sequenzen sind unterstrichen. **B** Fluoreszenz der *S. meliloti* 2011 Stämme mit angegebenen Plasmiden bei einer OD_{600} von 0,5, kultiviert in TY und MM.

Es wurden jeweils einzelne Punktmutationen in SD2 oder SD3 eingeführt (pCD33-SD2m-egfp und pCD33-SD3m-egfp, Abb. 22A). Die Mutationen in SD2 oder SD3 zeigten keine signifikanten Effekte auf die Fluoreszenz (Abb. 22B), mit Ausnahme einer geringfügigen Steigerung der Intensität in TY nach der Mutation von SD3 (vergleiche pCD33-egfp und pCD33-SD3m-egfp in Abb. 22B). Bei einer Doppelmutation von SD2 und SD3 (pCD33-SD2+3m, Abb. 22A) war kaum Fluoreszenz detektierbar (Abb. 22B). Demzufolge sind beide sehr kurzen SD Sequenzen vor AUG2 wichtig für die Translation.

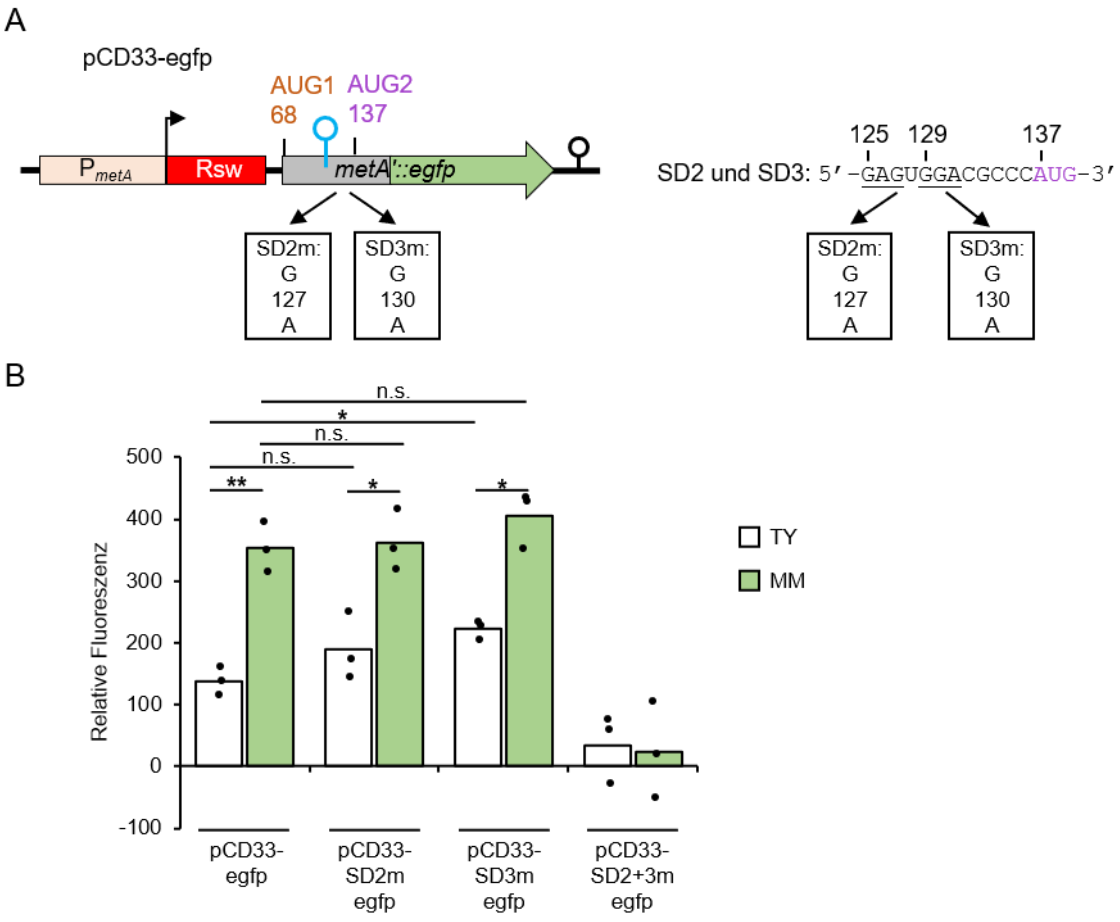

Abbildung 22: Beide Shine-Dalgarno Sequenzen stromaufwärts von AUG2 sind wichtig für die *metA* Translation. A Schematische Darstellung des Plasmids pCD33-egfp und die eingeführten Mutationen. Die SD Sequenzen (SD2 und SD3) sind unterstrichen. **B** Fluoreszenz der *S. meliloti* 2011 Stämme mit angegebenen Plasmiden bei einer OD_{600} von 0,5, kultiviert in TY und MM.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass die *metA* Translation am AUG2 beginnt. Die Ergebnisse legen nahe, dass für eine effiziente Translation sowohl SD1, unmittelbar stromabwärts des Riboswitches, als auch die vor AUG2 liegenden kurzen SD2 und SD3 Sequenzen benötigt werden.

2.10 Wirkung des SAM-II Riboswitches auf *metA* mRNA

In Kapitel 2.5 wurde unter hoher SAM-Konzentration (in TY) eine Stabilisierung von SAM-II Riboswitch-enthaltenden sRNAs und mRNAs gezeigt. Um zu überprüfen, ob der Riboswitch der stabilisierende Faktor für die *metA* mRNA ist, wurde die Sequenz der SAM-Bindetasche (SBP) im Plasmid pCD33-egfp mutiert (Abb. 23A und 23B). Dadurch sollte auf RNA-Ebene eine SAM-Bindung am Riboswitch nicht mehr möglich sein. Die Stämme mit dem mutationstragenden Plasmid pCD33-SBPm-egfp und dem Kontrollplasmid pCD33-egfp wurden auf Fluoreszenz, Reporter-mRNA Abundanz und Stabilität hin untersucht.

Die SBP-Muation spiegelte sich in einer höheren Fluoreszenz wider (vergleiche pCD33-egfp mit pCD33-SBPm-egfp in Abb. 23C). Im Einklang damit zeigten RT-qPCR Analysen mit *egfp*-spezifischen Primern einen Anstieg des Niveaus der mutierten Reporter-mRNA *CD33-SBPm-egfp* im Vergleich mit der *CD33-egfp* mRNA (Abb. 23D). Dieser Anstieg könnte durch 1) stärkere Transkription vom Promoter, 2) weniger Transkriptionstermination zwischen AUG1 und AUG2 (siehe Abb. 17) oder 3) höhere mRNA-Stabilität zustande kommen. Eine mRNA-Stabilitätsbestimmung zeigte, dass die SBP-Mutation zu einer Destabilisierung der Reporter-mRNA in beiden Medien führte (Abb. 23E und 23F). Der Grund für die Erhöhung der Menge der mutierten Reporter-mRNA wurde aus zeitlichen Gründen nicht untersucht. Das Ergebnis zeigt aber, dass der SAM-II Riboswitch ein Stabilisierungsfaktor in der mRNA ist.

Für die *metA* Translation ist die SD1 wichtig (Abb. 20). Laut den Strukturvorhersagen wird nach SAM-Bindung durch den Riboswitch die Ribosomeninterkation mit SD1 unterbunden (Abb. 5). Hier sollte untersucht werden, ob die SBP-Muation sich auf die Ribosomenbesetzung der *metA* mRNA auswirkt und eine SAM-Bindung am Riboswitch die *metA* Translation beeinflusst.

S. meliloti 2011 Kulturen mit den jeweiligen Plasmiden wurden in TY kultiviert. Um eine Dissoziation der (translatierenden) Ribosomen zu unterbinden, wurden die Kulturen bei einer OD_{600} von 0,5 sehr schnell im Eisbad gekühlt und die Lysate in einem Puffer mit 150 mM $MgCl_2$ hergestellt. Das geklärte Lysat wurde bei 100.000x g ultrazentrifugiert. Die Pelletfraktion (P100) enthält die Ribosomen und die Polysomen, während sich in der Überstandsfraktion (S100) freie mRNA befindet. Nach RNA-Isolierung aus den P100 und S100 Fraktionen wurde mit Hilfe von RT-qPCR und *egfp* spezifischen Primern der Anteil an gebundener und freier Reproter-mRNA bestimmt.

Es stellte sich heraus, dass die meiste Reporter-mRNA *CD33-egfp* mit den Ribosomen assoziiert ist (P100 vs. S100 FC: 5112,45 ± 1136,45; Abb. 23G). Die SBP-Muation führte zu einem signifikanten Anstieg des Anteils der Reporter-mRNA in P100 (*CD33-SBPm-egfp*, P100 vs. S100 FC: 20471 ± 3657,92; Abb. 23G). Als Kontrollen wurden die strak translatierte mRNA

rpmA (codiert das ribosomale Protein L27) und die peptidkodierende sRNA rnTrpL analysiert (Abb. 23G). Beim Vergleich der P100-Anteile dieser Kontroll-mRNAs im Stamm 2011 pCD33-egfp mit den P100-Anteilen im Stamm 2011 pCD33-SBPm-egfp, konnte keine gesteigerte Ribosomen-Interaktion beider Kontroll-mRNAs im Stamm mit der SBPm-Mutation festgestellt werden (Abb. 23G). Das zeigt, dass die gesteigerte Ribosomen-Besetzung der SBP-mutierten Reporter mRNA spezifisch ist.

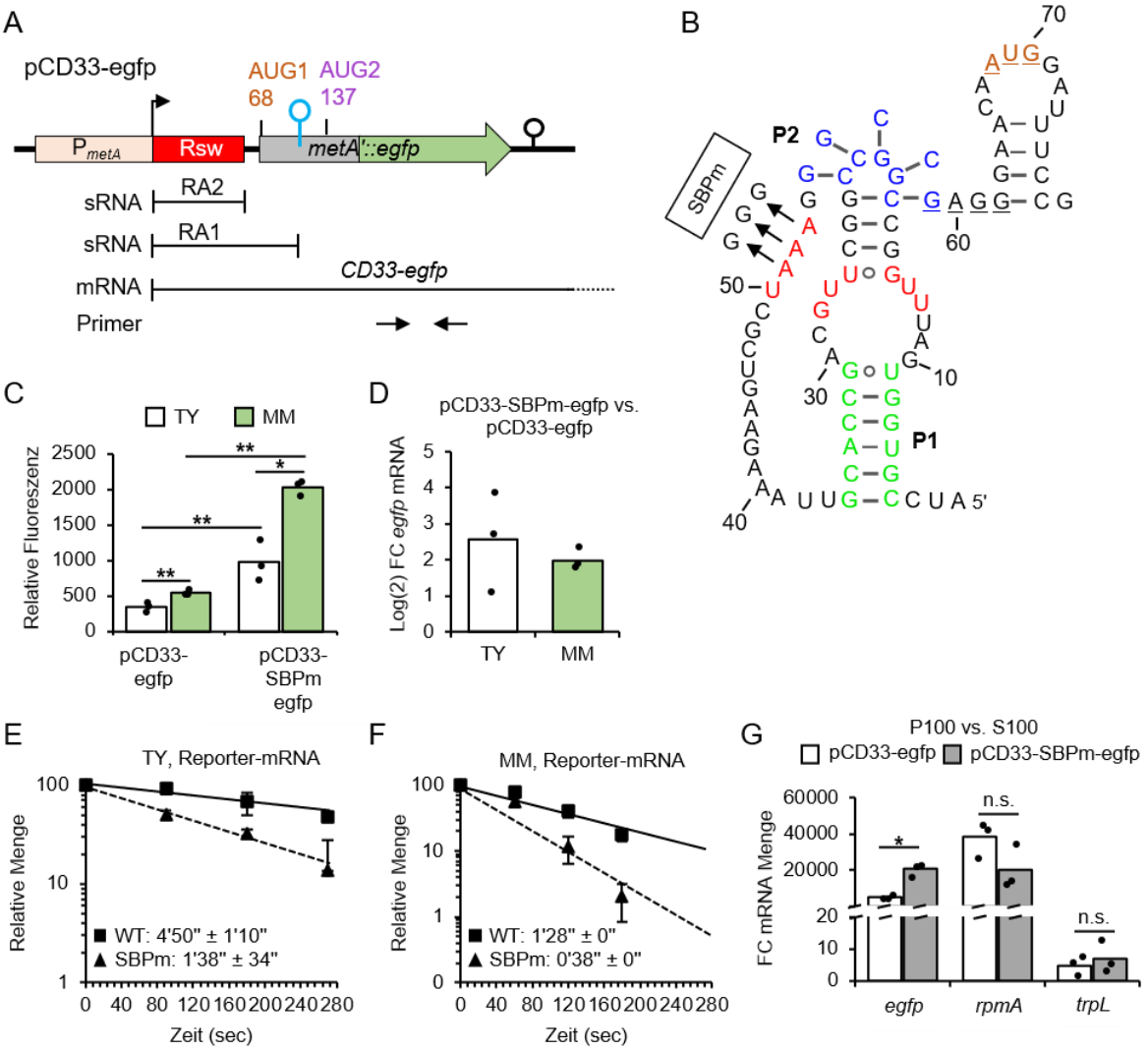

Abbildung 23: mRNA-Stabilität und Translation von *metA* werden gegensätzlich vom SAM-II Riboswitch reguliert. A Schematische Darstellung des Plasmids pCD33-egfp, der davon entstehenden RNA-Produkte, und der Primer für die RT-qPCR Analyse der Reporter-mRNAs. **B** Vorhergesagte Sekundärstruktur des Riboswitches im SAM-gebundenen Zustand. Die eingeführte Mutation ist abgebildet. **C** Fluoreszenz der *S. meliloti* 2011 Stämme mit den angegebenen Plasmiden bei einer OD_{600} von 0,5, kultiviert in TY und MM. **D** Vergleich der *egfp* mRNA Abundanz mittels RT-qPCR Analyse zwischen Stämmen mit dem Plasmid pCD33-SBPm-egfp oder dem Plasmid pCD33-egfp, kultiviert in TY oder MM. Das verwendete Primerpaar ist in A schematisch dargestellt. Gezeigt ist eine log_2 Mengenveränderung (FC). **E-F** RT-qPCR Bestimmung der Halbwertszeiten der Reporter-mRNAs *CD33-egfp* (WT) und *CD33-SBPm-egfp* (SBPm) in TY- (E) und MM-Kulturen (F) von *S. meliloti* 2011 Stämmen mit den entsprechenden Plasmiden. Aufgetragen ist die relative mRNA-Menge in Abhängigkeit von der Zeit nach Rifampicin (Rif) Zugabe. Die mRNA-Menge zum Zeitpunkt 0 min (vor Rif Zugabe) wurde als 100 % definiert **G** Vergleich der relativen Mengen an *CD33-egfp* und *CD33-SBPm-egfp* mRNA in den P100 und S100 Fraktionen von *S. meliloti* 2011 Stämmen mit den angegebenen Plasmiden, kultiviert in TY (bestimmt mittels RT-qPCR). Als Kontrollen wurden die mRNA des ribosomalen Proteins L27 (*rpmA*) und die ein Peptid codierende sRNA rnTrpL untersucht.

Wie zu erwarten für eine stark translatierte RNA, wurde der weitaus größte Anteil an *rpmA* mRNA in P100 nachgewiesen (Abb. 23G). Ein generell geringer Anteil der sRNA rnTrpL wurde in P100 detektiert, was daraufhin deutet, dass diese kleine mRNA nicht besonders effizient translatiert wird.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass der SAM-II Riboswitch zwei gegensätzliche Wirkungsweisen auf *metA* mRNA besitzt. Im SAM-gebundenen Zustand stabilisiert der Riboswitch die mRNA und wirkt sich gleichzeitig negativ auf die *metA* Translation aus.

2.11 Untersuchung das Stammes *S. meliloti* 2011 ΔRA

Im *metA* Transkript ist ein transkriptioneller Terminator zwischen AUG1 und AUG2 lokalisiert (Kap. 2.7). Durch Transkriptionstermination entsteht wahrscheinlich die Riboswitch sRNA RA1; kommt es zu keiner Termination, wird die gesamte *metA* mRNA transkribiert (Kap. 2.2). Wie im vorherigen Kapitel (2.10) gezeigt wurde, führte eine Mutation der SAM-Bindetasche (SBP) in einem Reporterplasmid (pCD33-SBPm-egfp) zum Anstieg der Reporter-mRNA Abundanz, obwohl die Reporter-mRNA destabilisiert wurde (Abb. 23D-23F). Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass aufgrund der mutierten SBP es zu weniger der vorläufigen Transkriptionstermination zwischen AUG1 und AUG2 kommt. Die Konsequenz wäre eine Zunahme der mRNA und eine Abnahme der sRNA Abundanz. Um die Menge an sRNA mit und ohne SBP-Mutation, entstanden von den jeweiligen Plasmiden, pCD33-SBPm-egfp und pCD33-egfp, analysieren zu können, benötigte es einen Stamm ohne chromosomal produzierte *metA* Riboswitch enthaltende sRNAs.

Hierfür wurde der Stamm 2011 ΔRA verwendet mit einer chromosomalen Deletion der SAM-bindende Aptamerregion vor *metA* (Abb. 24A-C). Es wurde der Bereich von +3 bis +59 deletiert, sodass die Transkriptionsstartseite (+1) und die SD1 Sequenz intakt blieben (Abb. 24A und 24B). Die Hybridisierung mit der Sonde gegen das *metA* Aptamer zeigte im Parentalstamm 2011 die Signale für die sRNAs RA1 und RA2. Diese waren im Stamm 2011 ΔRA nicht detektierbar, wodurch die erfolgreiche Deletion der Aptamerregion bestätigt wurde (Abb. 24C). Die Northern Blot Analyse mit einer Sonde gegen den Tranksriptionsterminator stromabwärts des Aptamers wies im Parentalstamm 2011 die sRNA, RA1 nach, welche im Deletionsstamm als kleinere sRNA (D-RA1) detektiert wurde (Abb. 24C). Das spricht dafür, dass obgleich im Stamm 2011 ΔRA der *metA* Riboswitch fehlt, der Terminator funktionsfähig geblieben ist.

Zur Charakterisierung des Stamms wurden gleiche Mengen der sRNA D-RA1 in TY- und MM-Kulturen detektiert (log_2FC 0,65 ± 0,92). Jedoch waren in TY und MM die Signale der Deletions-sRNA D-RA1 viel schwächer als die der Signale von RA1.

Die Deletion des SAM-II Amptamers wirkte sich positiv auf die *metA* Abundanz im Stamm 2011 ΔRA. Es kam in TY zu einem 4-fachen und in MM zu einem 6-fachen Anstieg der Transkriptmenge im Vergleich zum Stamm 2011 (Abb. 24D). Die Abundanz der *metZ* mRNA war in MM nicht verändert, wurde jedoch in TY halbiert verglichen zum Parentalstamm (Abb. 24D). Diese Veränderungen in den *metA* und teilweise *metZ* Transkriptmengen spiegelten sich nicht in einer veränderten SAM-Konzentration im Stamm 2011 ΔRA wider (Abb. 24E). Sowohl in TY als auch in MM war die SAM-Konzentration in der Deletionsmutatnte 2011 ΔRA vergleichbar mit denen im Parentalstamm 2011.

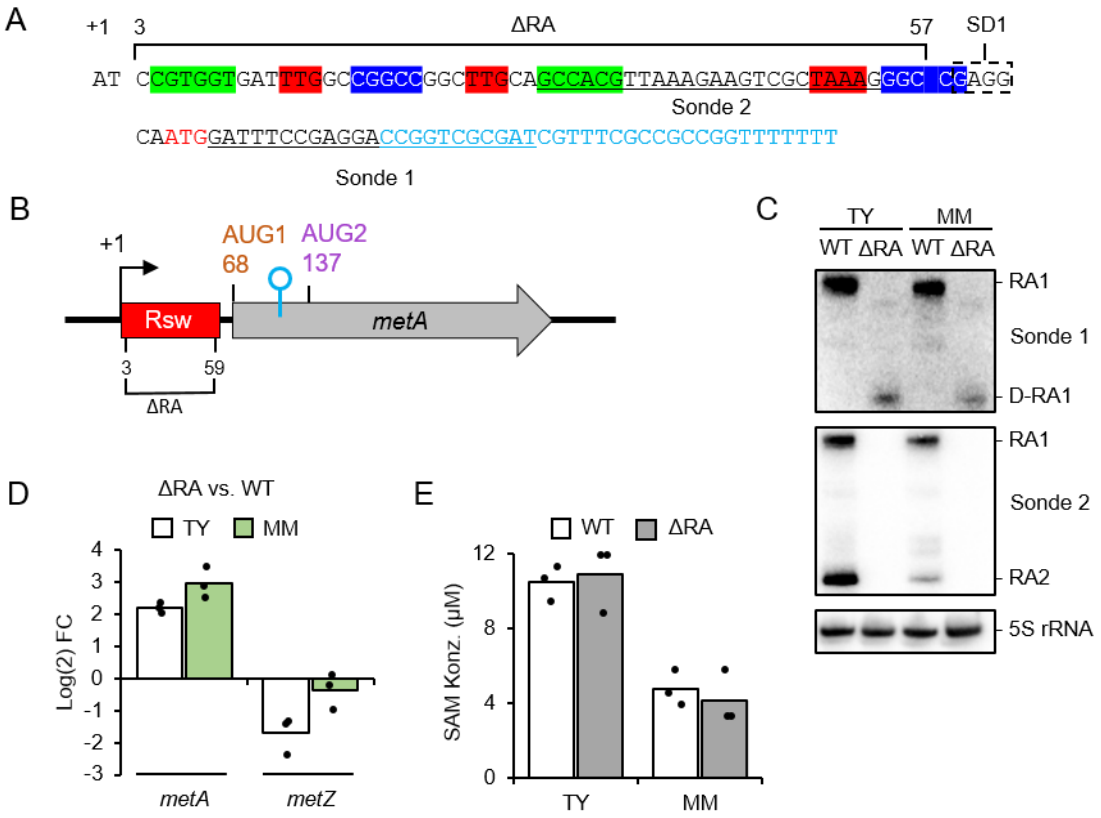

Abbildung 24: Charakterisierung des Stamms *S. meliloti* 2011 ΔRA, der eine chromosomale Deletion des SAM-II Aptamers von *metA* trägt. A RA1 Sequenz. +1 steht für Transkriptionsinitiationsstelle (TSS). Markiert ist die chromosomale Deletion ΔRA in der Aptamerregion. Die unterstrichenen Sequenzen sind komplementär zu den verwendeten Sonden für die Northern Blot Analysen. Die Shine-Dalgarno (SD)1 Sequenz ist umrandet von einer gestrichelten Box. Farbig hinterlegt sind die konsevierten Nukleotide (für detaillierte Beschreibung siehe Abb. 5 und Abb. 7B) **B** Schematische Darstellung des *metA* Lokus mit der Deletion des Aptamers (rote Box). Die Mutante besitzt den TSS, die SD vor AUG1 und den Transkriptionsterminator (als Haarnadel zwischen AUG1 und AUG2 dargestellt). **C** Northern Blot Hybridisierungen mit den in A dargestellten Sonden zur Validierung der ΔRA Deletion im Stamm 2011 ΔRA (angefertigt von Theresa Dietz). **D** RT-qPCR Analyse der angegebenen mRNAs verglichen wurde die Deletionsmutante 2011 ΔRA mit dem Parentalstamm 2011 (WT). **E** Graphische Darstellung der SAM Messungen der TY und MM Kulturen von *S. meliloti* 2011 (WT) und 2011 ΔRA.

Nach Konjugation der Plasmide pCD33-egfp und pCD33-SBPm-egfp wurden die Riboswitch sRNAs, RA1 und RA2, nur von diesen Plasmiden in *S. meliloti* 2011 ΔRA produziert (Abb. 25A und 25B). Um die Abundanz der sRNAs und der (*read-through*) Reporter-mRNAs zu analysieren, wurden RT-qPCRs durchgeführt. Dabei wurden *egfp* spezifische Primer für die Reporter mRNA verwendet, und für die sRNA-Analyse wurden Primer verwendet, welche

sowohl die sRNAs RA1 und RA2 (RA1 + RA2 = RA) als auch die 5'-UTR der Reporter-mRNA detektierten (Abb. 25A).

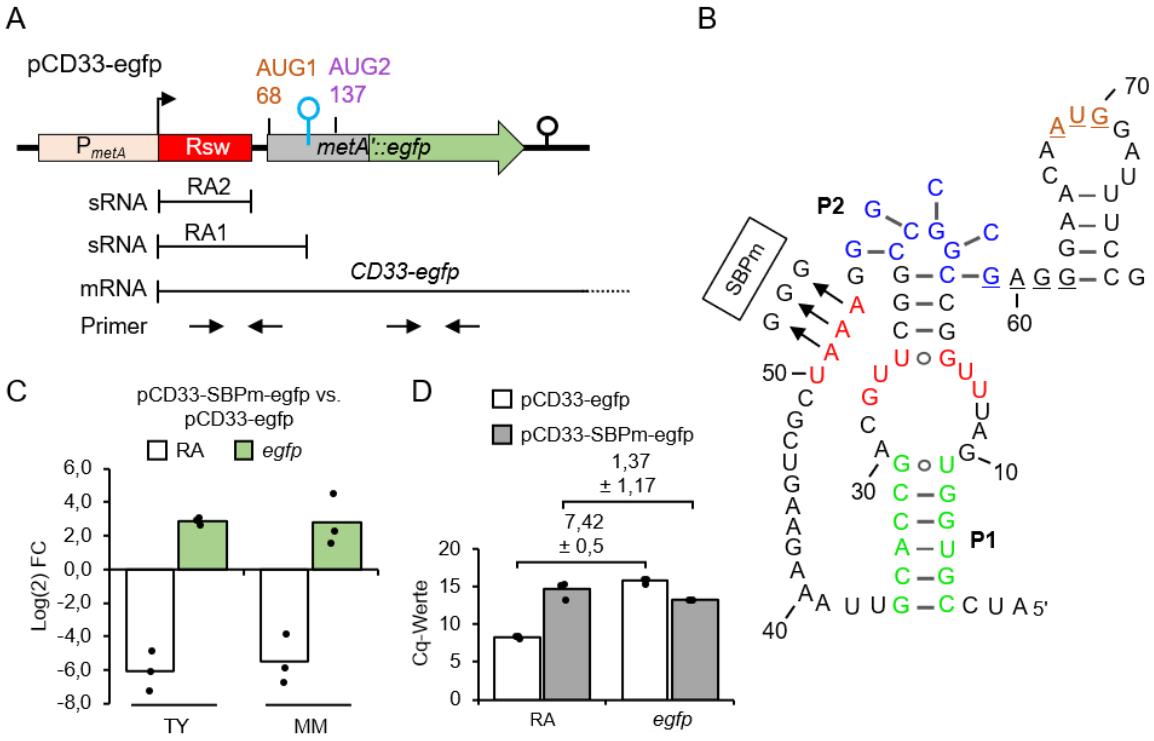

Abbildung 25: Mutation der SAM-Bindetasche von *metA* führt zur Abnahme der Riboswitch sRNA-Menge und Zunahme der mRNA-Menge. A Schematische Darstellung des Plasmids pCD33-egfp und die davon entstehenden RNA-Produkte mit den Primern für die RT-qPCR Analysen. **B** Vorhergesagte Sekundärstruktur des Riboswitches im SAM-gebundenen Zustand. Die eingeführte Mutation ist abgebildet. **C** Graphische Darstellung der RT-qPCR Analyse von den plasmidproduzierten sRNAs RA (RA1 + RA2) und der Reporter mRNA (*egfp*) in *S. meliloti* 2011 ΔRA Stämmen mit angegebenen Plasmiden. Gezeigt ist eine $\log_2$ Mengenveränderung (FC). **D** Cq-Werte aus der RT-qPCR Analyse der TY-Kulturen (siehe C). Die Unterschiede zwischen den Cq-Werten von RA und *egfp,* transkribiert von den angegebenen Plasmiden, sind über den Balken angegeben (Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten).

Verglichen mit dem Stamm 2011 ΔRA pCD33-egfp, nahm im Stamm mit dem SBP-mutierten Plasmid (2011 ΔRA pCD33-SBPm-egfp) das Niveau der plasmidtranskribierten Riboswitch-sRNAs (RA = RA1 + RA2) um ein Vielfaches ab, in TY und MM (Abb. 26C). Dem gegenüber war die Reporter-mRNA mit der SBP-Mutation abundanter als die Reporter-mRNA ohne SBP-Mutation (Abb. 25C).

Ein Vergleich der Cq-Werte von sRNA und mRNA zeigte, dass die vom Plasmid pCD33-egfp transkribierten Riboswitch sRNAs (RA = RA1 + RA2) weitaus abundanter waren als die Reporter-mRNA *CD33-egfp* (Abb. 26D). Die SBP-Mutation führte zur Angleichung der Cq-Werte, welche der starken Abnahme des sRNA-Niveaus und der Zunahme des mRNA-Niveaus entsprachen (Abb. 26C und 26D). Ein möglicher Grund für die Abnahme der sRNA Mengen könnte die sRNA-Destabilisierung durch die SBP-Muation sein. Die Bestimmung der Stabilität mittels RT-qPCR ist nicht geeignet, da die Cq-Werte der SBP-mRNA und SBP-sRNA ähnlich sind, sodass während der Detektion der SBP-sRNA auch eine große Menge der 5'-

UTR der mRNA detektiert werden würde. Um die Stabilität korrekt zu bestimmen, benötigt es eine Northern Blot Analyse die zwischen sRNA und mRNA unterscheidet. Jedoch konnte dies aus zeitlichen Gründen nicht durchgeführt werden. Dennoch zeigten die Ergebnisse der Stabilitätsbestimmung in Kap. 2.10, dass die CD33-egfp mRNA und die CD33-SBPm-egfp mRNA durch den Riboswitch stabilisiert werden (Abb. 23E und 23F), dasselbe ist für die sRNAs wahrscheinlich (siehe auch Abb. 14B-D).

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass eine Mutation des SBP zu weniger RA sRNA (im Einklang mit der sRNA-Destabilisierung) und gleichzeitig zu einem Anstieg des mRNA-Niveaus (trotz mRNA-Destabilisierung Abb. 23E und 23F) führt. Das Ergebnis lässt vermuten, dass es aufgrund der SBP-Muation zu weniger Transkriptionstermination zwischen AUG1 und AUG2 (in der 5'-UTR von *metA*) kommt. Welcher Einfluss der Riboswitch auf den Terminator hat, wurde weiter untersucht.

2.12 Versuche zum Einfluss des SAM-II Riboswitches auf den Terminator in der 5'-UTR von *metA*

Bisher wurde gezeigt, dass der *metA* Riboswitch posttranskriptionell auf die RNA-Stabilität und Translation wirkt (Kap. 2.10 und Kap. 2.11). Um zu analysieren, ob der Riboswitch auch auf transkriptioneller Ebene wirkt durch die Kontrolle des stromabwärts gelegenen Transkriptionsterminators (zwischen AUG1 und AUG2 in der 5'-UTR von *metA*) wurden transkriptionelle Reporterfusionen herangezogen.

Dazu wurde das Reporterplasmid pRA1-egfp verwendet (Abb. 26A), ein Derivat des Plasmids pP_{sinI}-egfp (siehe Kap. 2.7). Im pP_{sinI}-egfp, stromabwärts des *sinI* Promotors, befindet sich eine SD Sequenz und das *egfp* Reportergen (Abb. 26A). Für das Plasmid pRA1-egfp wurde zwischen Promotor und SD Sequenz die Sequenz von RA1 (+1 bis +116 des *metA* Transkripts) kloniert (Abb. 26A). Dadurch sollte eine transkriptionelle Wirkung des Riboswitches und des Terminators auf die Produktion des EGFP Proteins analysiert werden. Nach Konjugation des Plasmids pRA1-egfp in *S. meliloti* 2011 wurde von TY- und MM-Kulturen die Fluoreszenz bei einer OD_{600} von 0,5 gemessen.

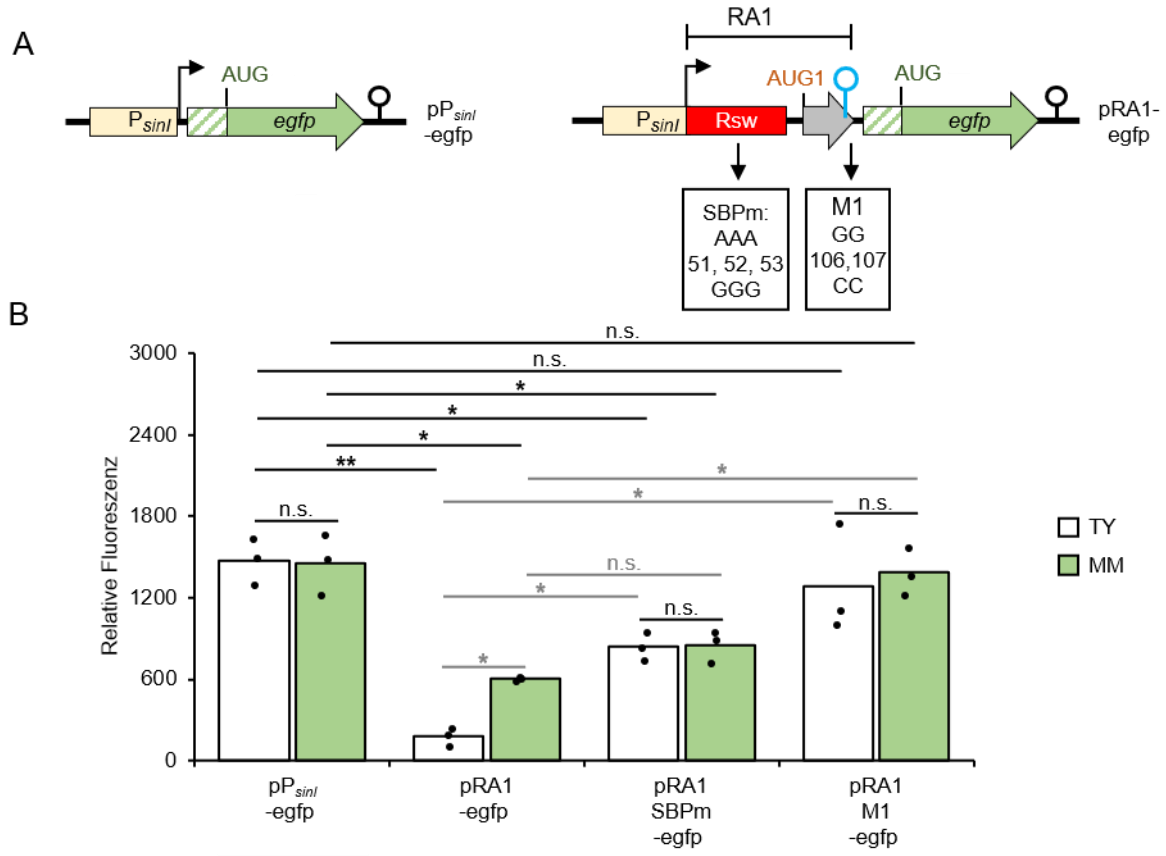

Abbildung 26: Versuche zum transkriptionellen Einfluss des *metA* Riboswitches. A Schematische Darstellung der verwendeten Plasmide. pRA1-egfp: Die Sequenz der sRNA RA1 wurde zwischen den heterologen Promotor P_{sinI} und das Reportergen *egfp* (grüne Box) kloniert. RA1 umfasst den Riboswitch und den transkriptionellen Terminator (cyane Haarnadel). Ein Stoppcodon wurde im AUG1-Leserahmen am 3'-Ende der klonierten Regionen eingefügt, um eine transkriptionelle Fusion zu gewährleisten. Die eingeführten Mutationen sind angegeben. **B** Fluoreszenz der *S. meliloti* 2011 Stämme mit den angegebenen Plasmiden bei einer OD_{600} von 0,5 kultiviert in TY und MM.

Es wurde gleiche Fluoreszenz in TY- und MM-Kulturen mit dem Plasmid pP_{sinI}-egfp gemessen (Abb. 26B). Mit dem Plasmid pRA1-egfp wurde, verglichen mit pP_{sinI}-egfp, eine deutlich niedrigere Fluoreszenz in beiden Medien detektiert, wahrscheinlich aufgrund von einer vorläufigen Transkriptionstermination. Zudem zeigte sich mit pRA1-egfp eine höhere Fluoreszenz in MM- als in TY-Kulturen. Zusammenfassend wurde aufgrund des klonierten Teils der *metA* 5'-UTR eine herabgesetzte und mediumsensitive Expression des Reportergens beobachtet.

Die Mutation der SAM-Bindetasche (SBP) im Plasmid pRA1-egfp (Abb. 26A) führte zu vergleichbarer Fluoreszenz in TY und MM (Abb. 26B). Dabei stieg lediglich in TY die Fluoreszenz signifikant (vergleiche pRA1-egfp mit pRA1-SBPm-egfp in Abb. 26B). Die Fluoreszenz der Kulturen mit pRA1-SBPm-egfp war sowohl in TY als auch in MM niedriger als die der Kultur mit pP_{sinI}-egfp (Abb. 26B). Dieses Ergebnis zeigt, dass die SBP-Muation die Mediumsensitivität der Expression vom Reporterkonstrukt aufhebt, jedoch wurde nicht das

gleiche Niveau der Fluoreszenz erreicht wie mit dem Kontrollplasmid pP_{sinI}-egfp (der Promotorkontrolle).

Eine destabilisierende Mutation des Terminatorstammes (vergleiche Abb. 17 in Kap. 2.8) in pRA1-egfp, pRA1-M1-egfp (Ab. 26A), führte in TY und MM zu einem Anstieg der Fluoreszenz verglichen mit pRA1-egfp (vergleiche pRA1-egfp mit pRA1-M1-egfp in Ab. 26B). Die Fluoreszenz war ähnlich zur Fluoreszenz von Kulturen mit pP_{sinI}-egfp (vergleiche pP_{sinI}-egfp mit pRA1-M1-egfp in Abb. 27B). Mit pRA1-M1-egfp war die Fluoreszenz in TY und MM vergleichbar, da die mediumsensitive Expression des Reportergens durch die Terminator-Mutation aufgehoben wurde.

Die Ergebnisse zeigen, dass in der transkriptionellen Reporterfusion die Region RA1, mit den Elementen SAM-II Riboswitch und Transkriptionsterminator, sich negativ auf die Fluoreszenz und folglich EGFP-Produktion auswirkte. Außerdem wurde eine mediumsensitive EGFP-Produktion festgestellt im Sinne des Riboswitches: höhere EGFP-Produktion unter niedrigerer zellulärer SAM-Konzentration (in MM). Eine SBP-Muation bewirkte eine SAM-unabhängige Fluoreszenz (EGFP-Produktion). Ebenso wurde die mediumsensitive *egfp* Expression nach Mutation des Terminators aufgehoben. Zusammenfassend deuten die Ergebnisse darauf hin, dass der Riboswitch Einfluss auf den Terminator nehmen kann und ihn SAM-abhängig reguliert. Das führt zur Hypothese, dass der *metA* Riboswitch eine weitere Funktion hat: bei hoher SAM-Konzentration führt die SAM-Bindung am Riboswitch zur verstärkten vorläufigen transkriptionellen Termination vor AUG2 und hiermit zur Drosselung der *metA* Expression. Das konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht werden.

3 Diskussion

Die Genexpression kann über verschiedene Mechanismen auf transkriptioneller und posttranskriptioneller Ebene reguliert werden. Dabei können *cis*-agierende RNA-Elemente, wie Riboswitches, auf die Expression wirken. Nach Binden eines Liganden können sie ihre RNA-Konformation ändern, wodurch die Expression der stromabwärts gelegenen Gene reguliert wird. Die Gene sind oft beteiligt bei der Synthese oder Aufnahme des Liganden (Waters und Storz 2009). Am weitesten verbreitet sind Riboswitches, die S-Adenosyl-L-Methionin (SAM) binden, den Hauptmethyldonor der Zelle. In *Sinorhizobium meliloti* besitzen die Methioninbiosynthesegene *metZ* und *metA* in der 5'-UTR SAM-II Riboswitches (Corbino et al. 2005). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Genregulation von *metZ* und *metA*, insbesondere im Hinblick auf die Bedeutung ihrer SAM-II Riboswitches, untersucht. Dabei wurden die Mechanismen der *metA* Regulation detailliert analysiert.

3.1 Regulation der *metZ* und *metA* Expression auf Promotorebene

Mit Hilfe von Reporterkonstrukten wurde gezeigt, dass die Promotoren von *metZ* und *metA* (P_{metZ} und P_{metA}) in MM-Kulturen aktiver sind als in TY-Kulturen (Abb. 15B). Dies spricht für eine unterschiedliche Regulation der Promotoren während des Wachstums in beiden Medien. Transkriptionsfaktoren (TFs), die an Promotoren binden, haben Kontrolle auf die Transkription (van Hijum et al. 2009). Es ist denkbar, dass ein Regulator der *metZ* und *metA* Methioninbiosynthesegene abhängig von der intrazellulären Methionin- bzw. SAM-Verfügbarkeit ist.

Über die Regulation der Methioninbiosynthesegene in *S. meliloti* ist wenig bekannt. In *E. coli* sind die Gene, die in der Methioninbiosynthese und -transport involviert sind, in einem Met-Regulon organisiert. Ihre Promotoren besitzen palindromische Konsensussequenzen, welche von dem Repressor MetJ gebunden werden. Die Aktivität von MetJ wird über die intrazelluläre SAM-Verfügbarkeit reguliert. Steigt die Konzentration, bindet SAM an den Repressor, sodass MetJ mit gesteigerter Affinität an die Promotoren des Met Regulons bindet und die Genexpression reprimiert (Shoeman et al. 1985; Smith et al. 1985; Belfaiza et al. 1986). Für *S. meliloti* ist kein MetJ-Homolog und kein anderer SAM abhängiger Transkriptionsfaktor der Methioninbiosynthesegene bekannt.

Reporterfusionen mit sukzessiv verkürzten chromosomalen Bereichen stromaufwärts der *metA*-TSS, welche den Promotor beinhalten, zeigten ähnliche Fluoreszenz (Abb. 16B). Die kürzeste Fusion umfasste den Bereich -52 bis +5. Die Mutation A-45T in der Promotorregion von *metA* führte zu einer Abnahme der Fluoreszenz in TY (vergleiche pP_{metA50}-egfp mit pP_{metA50}-GANTCm2-egfp in Abb. 16C). Transkriptionsfaktoren, die direkt die Promtorregion

binden sind oft Repressoren (van Hijum et al. 2009). Jedoch sind auch aktivierende Regulatoren bekannt, wie die Aktivatoren der MerR Familie (Brown et al. 2003). Aus diesem Grund wäre es denkbar, dass sich an der Regulation der *metZ* und *metA* Promotoren in *S. meliloti* ebenfalls ein Aktivator beteiligt.

Andere Ergebnisse legen ebenfalls die Beteiligung eines Transkriptionsaktivators nahe. Zum Beispiel zeigten RT-qPCR Analysen mit Kulturen, welche die Reporterplasmide pP_{metZ}-egfp und pP_{metA}-egfp besaßen, eine Abnahme der Abundanz der chromosomal transkribierten *metZ* und *metA* mRNAs (Abb. 15D). Im Vergleich zum Chromosom liegen die Plasmide in einer höheren Kopienzahl vor (Kopienzahl 5 – 10, (Khan et al. 2008)). Aus diesem Grund wäre eine Depletion eines Transkriptionsaktivators durch sein Binden an den Promotoren, die in den Plasmiden kloniert vorliegen, eine mögliche Erklärung für die Abnahme.

Die *metZ* und *metA* Promotoren sind aktiver in MM-Kulturen, was einer Wachstumsbedingung der Unterversorgung mit Nährstoffen wie Aminosäuren gleicht. Während einer solchen Unterversorgung wird die Genexpression global verändert (stringente Antwort). Dabei reguliert DksA durch das Binden an die RNA Polymerase negativ die Transkription von rRNAs und tRNAs und positiv die Expression von Aminosäurebiosynthesegenen und Transportgenen (Paul et al. 2005). In *S. meliloti* wurde ebenfalls eine *dksA* abhängige Regulation während der stringenten Antwort nachgewiesen (Krol und Becker 2011). Eine DksA-abhängige Aktivierung der Transkription bei Wachstum in MM könnte auch die Beobachtung erklären, dass die Region -50 bis +5 ausreichend für die mediumabhängige Regulation am *metA* Promotor ist. Um das nachzuweisen, könnte eine *dksA*-Deletionsmutante und die Promotorfusionsplasmiden pP_{metZ}-egfp und pP_{metA}-egfp genutzt werden. Dabei sollte während des Wachstums in MM die Fluoreszenz niedriger sein und der Fluoreszenz in TY ähneln.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass in TY die Riboswitch sRNA RA2 akkumuliert und stabilisiert wird (Abb. 10B und Abb. 14D). Kleine regulierende RNAs können die Genexpression durch die Aktivität von transkriptionellen oder translationalen Regulatoren kontrollieren, indem sie entweder direkt mit der mRNA des Regulators oder mit dem Protein interagieren (zusammengefasst in Majdalani et al. 2005 und Gottesman und Storz 2011). Es ist denkbar, dass RA2 eine Funktion in *trans* hat und einen möglichen Transkriptionsfaktor reguliert. Unter hoher zellulärer SAM-Konzentration (TY), wenn eine hohe Aktivität der Promotoren unnötig ist und RA2 ausreichend vorhanden ist, könnte RA2 mit der mRNA des Transkriptionsfaktors oder mit dem Protein interagieren. Die Interaktion mit dem Protein würde die Bindungsaffinität an die Promotoren herabgesetzen, sodass auch die Promotoraktivitäten von *metZ* und *metA* sinken. Erste *in silico* Analysen ergaben eine mögliche Bindung der sRNA RA2 an den codierenden Bereich der *dksA* mRNA (siehe Anhang Abb. 35). Um einen solchen Mechanismus in *S. meliloti* nachzuweisen, benötigt es noch weitere Analysen, die die

Abhängigkeit zwischen Promotoraktivität und RA2 bestätigen. Auch die Möglichkeit der Beteiligung eines Transkriptionsfaktors sollte nicht ausgeschlossen werden und sollte weiter untersucht werden. Bereits in *Enterococcus faecalis* konnte eine Interaktion zwischen Riboswitch sRNA und Regulator festgestellt werden. In diesem Fall reguliert der AdoCbl Riboswitch in der naszierenden RNA die Länge und dadurch die Funktion der sRNA EutX. Wird AdoCbl nicht an die naszierende RNA gebunden, entsteht eine längere EutX sRNA mit zwei Haarnadelstrukturen im 3'-Bereich. An diese Strukturen bindet der Antwortregulator EutV und terminiert somit die Transkription von *eut* (*ethanolamine-utilization* – Ethanolamin-Verwertung) Genen. Bindet AdoCbl an den Riboswitch, stoppt die sRNA-Transkription vorzeitig, sodass eine kürzere EutX ohne die Haarnadelstrukturen entsteht. Diese ist nicht fähig EutV zu binden und EutV induziert die Expression der *eut* Gene durch Antitermination (DebRoy et al. 2014; Mellin et al. 2014).

Um unbekannte DNA-bindende Proteine zu identifizieren, können DNA-*Pulldown*-Tests mit anschließendes Massenspektrometrie durchgeführt werden (Jutras et al. 2012). In der Masterthesis von Theresa Dietz (2022) wurde mithilfe einer biotinylierten DNA-Sequenz der Promotorregion von *metA* und nachfolgender Massenspektrometrie das Protein LpxA als potenzieller Interaktionspartner identifiziert. LpxA ist an der Synthese von Lipid A beteiligt und nicht als DNA-bindendes Protein bekannt (Anderson und Raetz 1987). Um eine Interaktion zwischen LpxA und der *metA* Promotorregion zu bestätigen, wurden ChIP und Affinitätsanalysen (*electrophoretic mobility shift assay*) durchgeführt, jedoch konnte keine Interaktion nachgewiesen werden (Theresa Dietz, Masterthesis 2022).

Zusammenfassend, wird die Genexpression von *metZ* und *metA* bereits auf Promotorebene reguliert. Ein Regulator konnte bisher nicht identifiziert werden. Da es sich um Methioninbiosynthesegene handelt, liegt die Vermutung nahe, dass die Konzentration von SAM bzw. Methionin eine Rolle in der Regulation der Promotoraktivität spielt. Jedoch ist eine Beteiligung von DksA als Regulator während einer Nährstoffunterversorgung, wie bei Wachstum in MM, nicht auszuschließen.

3.2 Neuer *standby* Mechanismus in der *metA* Translation

In *S. meliloti* 2011 besitzt das *metA* Transkript zwei AUGs im selben Leserahmen, beide mit potenziellen SD Sequenzen (Abb. 5). Die Daten dieser Arbeit zeigten, dass obwohl AUG1 als Startcodon außerhalb des nativen Kontextes genutzt werden kann, im nativen Kontext AUG2 die Translationsstartseite ist (Abb. 18B und 19E). Trotz allem ist die, 76 nt stromaufwärts von AUG2 gelegene, SD1 Sequenz für eine effiziente Translation relevant (Abb. 20C). Es ist denkbar, dass die ribosomale 30S Untereinheit bereits an diese entfernte SD1 Sequenz als

standby Region rekrutiert wird, um die Translation stromabwärts, an der ribosomalen Bindestelle, die aus SD2, SD3 und AUG2 besteht, zu initiieren (Abb. 22B).

Das Konzept einer *standby* Region wurde erstmals von Smit und van Duin (2003) beschrieben. Ist eine RBS aufgrund von Sekundärstrukturen nicht zugänglich, kann die 30S Untereinheit vorläufig an eine einzelsträngige, sequenzunspezifische Region in der 5'-UTR binden, die sogenannte *standby* Region, und nach einer transienten Öffnung der Struktur auf die RBS zugreifen (Smit und van Duin 2003; Studer und Joseph 2006; Romilly et al. 2019). In *E. coli* wurde am Beispiel der 5'-UTR der *lpp* mRNA (codierend für das Lipoprotein) gezeigt, dass für eine effiziente Translation und Formation des Polysoms, bereits das zweite Ribosom an die 5'-UTR, an eine einzelsträngige *standby* Region, bindet, bevor das erste Ribosom das Startcodon verlassen hat (Andreeva et al. 2018). Um den hier vorgeschlagenen *standby* Mechanismus in *S. meliloti* zu validieren, benötigt es Analysen zur Bindung der 30S Untereinheit an SD1, beispielsweise durch ein *ribosome toeprint assay* (Yakhnin und Babitzke 2022). Der entscheidende Unterschied zu den bisher bekannten *standby* Regionen (sequenzunspezifisch und einzelsträngig (Smit und van Duin 2003; Andreeva et al. 2018; Sterk et al. 2018)) ist, dass in *S. meliloti* eine Konsensussequenz, die SD Sequenz, wahrscheinlich als *standby* Region für die Rekrutierung der 30S Untereinheit dient.

Die 5'-UTR von *metA* ist strukturiert, u.a. beinhaltet sie die „durchgelesene“ Terminatorstruktur stromabwärts der SD1, die gegebenenfalls vom Ribosom für die Translationsinitiation überwunden werden muss. Zudem ist in der *metA* 5'-UTR zeitweise ein H-typischer Pseudoknoten vorhanden (SAM-II Riboswitch im SAM-gebundenen Zustand, Abb. 5 (Corbino et al. 2005)). In *E. coli* besteht die *standby* Region in der 5'-UTR der *tisB* Toxin-mRNA aus einer einzelsträngigen Region, welche durch die *antisense* RNA IstR1 reguliert wird und aus einem Pseudoknoten. Es wurde gezeigt, dass die Interaktion des ribosomalen Proteins S1 (rS1) mit beiden Elementen notwendig für die Bindung der 30S Untereinheit ist (Darfeuille et al. 2007; Romilly et al. 2019; Romilly et al. 2020). In gramnegativen Bakterien spielt rS1 für die Translationsinitiation von mRNAs mit strukturierten 5'-UTRs eine zentrale Rolle. Es wurde gezeigt, dass rS1 an komplexe RNA Strukturen binden und diese entwinden kann (Qu et al. 2012; Qureshi et al. 2018).

Ein Beispiel für eine vor kurzem entdeckte *standby* Region, welche das Zusammenspiel zwischen Riboswitch-Pseudoknoten und rS1 für die Translationsinitiation zeigt, wurde für den $preQ_1$ Riboswitch in *Thermoanaerobacter tengcongensis* beschrieben. Nach der Bindung des Queuosinvorläufers, $preQ_1$, formt sich ebenfalls ein H-typischer Pseudoknoten. Dabei wird die SD Sequenz partiell verdeckt, sodass die Translation von Queuosinbiosynthesegenen (Queuosin ist ein modifiziertes Nukleosid) inhibiert wird (Eichhorn et al. 2014). Es wurde gezeigt, dass die 30S Untereinheit an eine sequenzunspezifische *standby* Region binden

kann. Dabei bestimmt der Status des Aptamers (Liganden gebunden oder nicht gebunden) die Bindungsstabilität zwischen der 30S Untereinheit und mRNA. Somit kann der Riboswitch die Rekrutierung der 30S Untereinheit und den 30S-mRNA-Komplex kontrollieren. Als Gegenspieler agiert rS1, welches den Pseudoknoten entfalten kann und notwendig für die Translationsinitiation ist (Ray et al. 2022).

Ähnlich wurde in *V. vulnificus* für einen Adenin-bindenden, aktivierenden Riboswitch, gezeigt, dass die Bindung des Liganden alleine nicht die Translation der Adenosindesaminase initiiert. Zwar erlaubt es die Bindung der 30S Untereinheit an eine *standby* Region, aber eine effiziente Translationsinitiation wird erst durch die Bindung von rS1 erreicht, welche die gesamte Translationsinitiationsregion öffnet (Jesus et al. 2021).

In der Studie von Roy et al. (2017) wurde gezeigt, dass der SAM-II Riboswitch im ungebundenen Zustand sich bereits in einer vororganisierten Struktur befindet (Abb. 28). Demzufolge ist auch im nicht-gebundenen SAM-Zustand, wenn die SD1 zugänglich für Ribosomen sein sollte, die *metA* 5'-UTR stark strukturiert. Aus diesem Grund könnte es möglich sein, dass, wie im zuvor erwähnten Beispiel des Adenin-bindenden Riboswitches in *V. vulnificus* (Jesus et al. 2021), rS1 benötigt wird, um die gesamte *metA* Translationsinitiationsregion zu öffnen und die Translation zu initiieren. Bindet SAM an den Riboswitch formiert sich der Pseudoknoten und die SD1 wird unzugänglich. Der SAM-II Riboswitch-Pseudoknoten ist hinderlich für die Initiation der Translation. Ähnlich wie im Fall des $preQ_1$ Riboswitches in *T. tengcongensis* (Ray et al. 2022) würde er ein Gegenspieler von rS1 sein und sich somit von der Rolle des Pseudoknotens in der *E. coli tisB* Translation unterscheiden, bei dem die Struktur relevant für die Bindung von rS1 und Translationsinitiation ist (Ray et al. 2022).

Da der SAM-II Riboswitch in α-Proteobakterien konserviert ist, ist es denkbar, dass der *S. meliloti standby* Mechanismus ebenfalls konserviert ist. Sequenzanalysen der 5'-UTR von homologen Genen, welches das Protein Homoserin-O-Succinyltransferase codieren (*metA* und *metX*), in α-Proteobakterien zeigten in unmittelbarer Nähe des SAM-II Aptamers und 95 bzw. 60 nt stromaufwärts des annotierten Startcodons eine SD-ähnliche Sequenz in *Agrobacterium tumefaciens* und *Rhodobacter sphaeroides* (At12D1_RS12925; RSKD131_RS06345; NCBI 24.11.2022; Abb. 27). Demzufolge könnte der hier vorgeschlagene *standby* Mechanismus (der SAM-II-Riboswitch kontrolliert die Zugänglichkeit der SD *standby* Region) in weiteren α-Proteobakterien konserviert sein. Es bleibt zu überprüfen, ob diese SD ähnlichen Sequenzen in *A. tumefaciens* und *R. sphaeroides* eine Rolle in der Translation und ihre Regulation spielen.

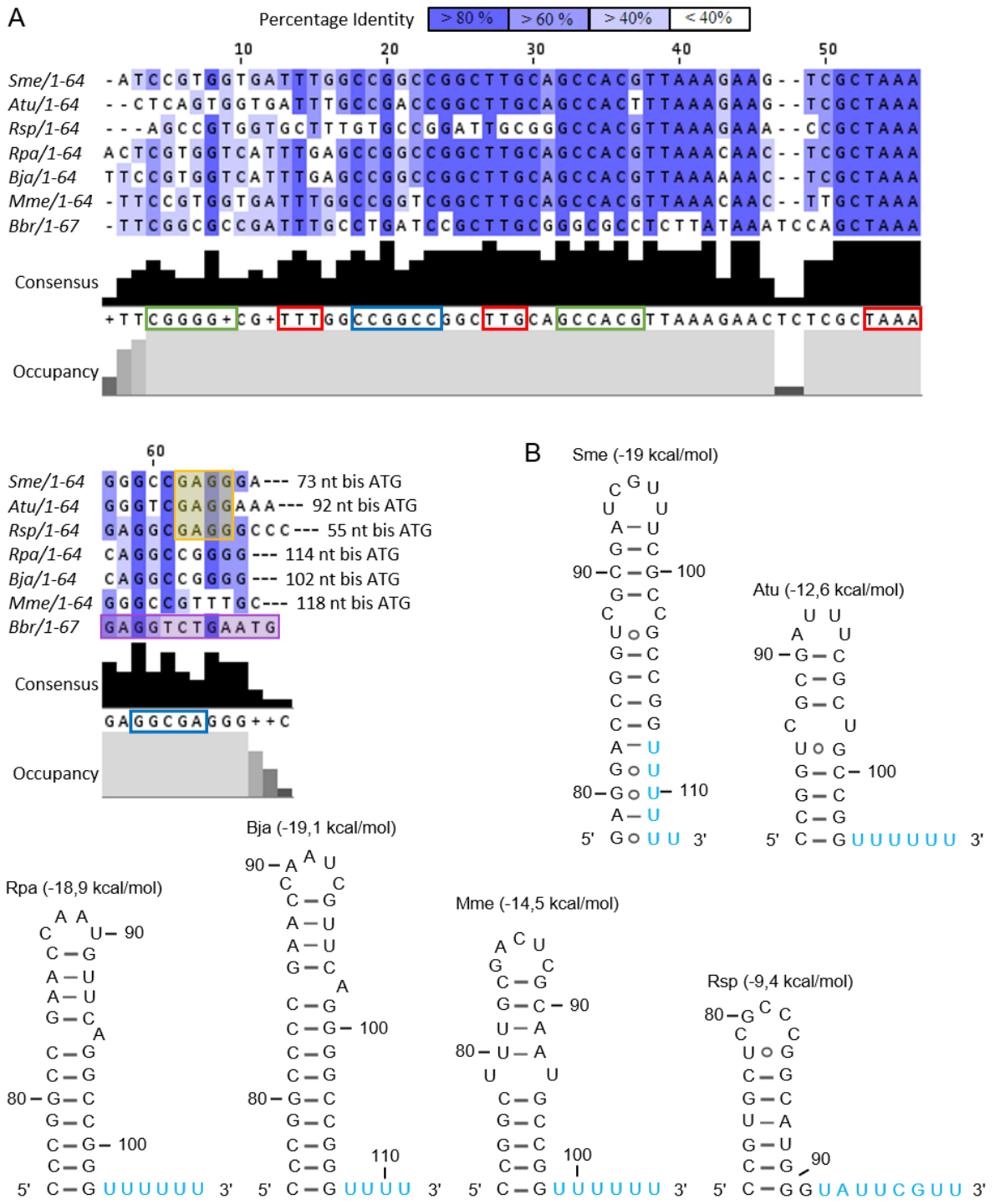

Abbildung 27: Konservierung einer SD-ähnlichen Sequenz in unmittelbarer Nähe des SAM-II Aptamers und eines putativen Terminators stromabwärts. A Sequenzvergleich der 5'-UTR des *S. meliloti metA* Homologs in ausgewählten α-Proteobakterien mit Hilfe von Clustal Omega (Larkin et al. 2007). Die Konservierung wurde mittels Jalview dargestellt (Waterhouse et al. 2009). Grün umrahmte Nukleotide bilden den P1 Stamm, rot umrahmte Nukleotide bilden die SAM-Bindetasche und blau umrahmte Nukleotide bilden den P2 Stamm des SAM-II Riboswitches. SD ähnliche Sequenzen sind gelb markiert. In violett hervorgehoben ist eine potentielle ribosomale Bindestelle in *Bordetella bronchiseptica, Bbr* (EL288_RS02195). *Sme*, *Sinorhizobium meliloti* (SM2011_RS30600); *Atu, Agrobacterium tumefaciens* (At12D1_RS12925)*; Rsp, Rhodobacter sphaeroides* (RSKD131_RS06345)*; Rpa, Rhodopseudomonas palustris* (I8G32_RS22915)*; Bja, Bradyrhizobium japonicum* (HXT67_RS39880)*; Mme, Mesorhizobium loti* (C8D77_RS33100) (NCBI, 24.11.2022). **B** Strukturvorhersagen putativer Transkriptionsterminatoren zwischen SAM-II Aptamer und Startcodon. Die Strukturen wurden mit Hilfe von RNAfold (Gruber et al. 2008) vorhergesagt und die minimalen freien Energien sind angegeben.

Transkription und Translation können in Bakterien gekoppelt sein. Mit Hilfe eines translationalen preQ$_1$ Riboswitches aus *Bacillus anthracis* wurde gezeigt, dass nach Ligandenbindung die Transkriptionsgeschwindigkeit durch die Entkopplung von Transkription und Translation gesenkt wird. Sobald die RBS bzw. *standby* Region transkribiert wird, kann die 30S Untereinheit an die mRNA binden und mit der RNAP interagieren. Dieser Schritt verlangsamt die Transkription, jedoch wird sie durch das translatierende 70S Ribosom wieder beschleunigt (Chatterjee et al. 2021). In der vorliegenden Arbeit wurde beobachtet, dass Kulturen mit dem Plasmid pCD33-Δ116-124-egfp (verkürzter Abstand zwischen *standby* Region (SD1) und RBS, Abb. 21) stärker fluoreszierten als Kulturen mit dem Plasmid pCD33-egfp. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Effizienz der Transkription der *CD33-Δ116-124-egfp* mRNA gesteigert wurde. Da der Abstand zwischen SD1 und RBS verkürzt wurde, könnte das 70S Ribosom zu einem früheren Zeitpunkt assemblieren und die Transkription beschleunigen im Vergleich zur *CD33-egfp* mRNA. Die beschleunigte Transkription könnte zu mehr Transkripten führen, die von Ribosomen translatiert werden könnten, sodass generell mehr Protein vorhanden wäre. Jedoch kann die Verkürzung der mRNA auch zu einer veränderten RNA-Stabilität oder räumlichen Struktur des 5'-UTRs, welche die Initiation der Translation positiv beeinflusst, führen.

Zusammenfassend wurden in dieser Arbeit Hinweise dafür vorgelegt, dass die *metA* Translation über einen neuen *standby* Mechanismus reguliert wird. Dabei weist die *standby* Region die Konsensussequenz einer SD Sequenz auf. Da die 5'-UTR von *metA* mit komplexen Strukturen besetzt ist, ist es denkbar, dass das ribosomale Protein S1 eine Rolle für die Initiation der Translation spielt.

3.3 Funktionen der SAM-II Riboswitches von *metZ* und *metA*

3.3.1 Vorhergesagte Funktionen und Validierung der Auswirkung des *metA* Riboswitches auf die Translation

In *S. meliloti* sind die SAM-II Riboswitch Aptamere von *metZ* und *metA* nahezu identisch (Abb. 7B). Wie für die meisten SAM-II Riboswitches postuliert (Corbino et al. 2005), deutete die Strukturvorhersage für den *metZ* Riboswitch auf eine Regulation der Transkription hin: Im SAM-gebundenen Zustand, nach Ausbildung des Pseudoknotens im Aptamer, würde sich ein Terminator in der Expressionsplattform bilden (Abb. 4). Die Existenz dieses Terminators wurde nicht experimentell validiert, aber die Daten dieser Arbeit (Abb. 10) und anderer (Robledo et al. 2021) zeigen eine negative Regulation der *metZ* Expression durch den Riboswitch.

Im Gegensatz dazu wurde aufgrund der in Abbildung 5 gezeigten Strukturvorhersage eine Regulation der Translation durch den *metA* Riboswitch angenommen, da in unmittelbarer Nähe zum Aptamer eine RBS aus SD1 Sequenz und AUG1 positioniert sind. Dieser Aufbau

ähnelt dem SAM-II Riboswitch in der 5'-UTR des Genes *metX* aus einem Sargassosee-Metagenom. Dessen *in vitro* Strukturanalysen hatte darauf schließen lassen, dass nach SAM-Bindung die SD Sequenz unzugänglich für Ribosomen ist und die Translationsinitiation inhibiert wird (Gilbert et al. 2008). Auch die RBS des *metX* Gens in *Bordetella bronchiseptica* befindet sich wahrscheinlich teilweise im SAM-II Aptamer (Abb. 27), und demzufolge ist nur im offenen Zustand die SD Sequenz zugänglich und *metX* wird translatiert.

Um den translationalen Einfluss des *metA* Riboswitches in *S. meliloti* zu bestätigen, wurde die SAM-Bindetasche (SBP) in pCD33-egfp mutiert, sodass SAM nicht mehr gebunden werden kann (Abb. 23B). Ähnlich wie eine Mutation im Pseudoknoten (P2, siehe Abb. 5 (Corbino et al. 2005)), sollte der mutierte Riboswitch nur im offenen, SAM-ungebundenen Zustand sein, und die SD Sequenz sollte immer zugänglich für Ribosomen sein, was die Translation erhöhen sollte. Wie effizient eine mRNA translatiert wird, entscheidet u.a. die Frequenz der Ribosomen, welche an die mRNA binden und die Translation initiieren (Gingold und Pilpel 2011).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass nach SBP-Muation im *metA* Riboswitch die Fluoreszenz des Reporterstammes gesteigert war (Abb. 23C). Ebenso war die Reporter-mRNA Abundanz erhöht, was ein Grund für den Anstieg der Fluoreszenz sein könnte (Abb. 23D). Um einen Zusammenhang zwischen SBP-Muation und Translationseffizienz zu untersuchen, wurde der relative Anteil Ribosomen-gebundener und -ungebundener Reporter-mRNA bestimmt. Das Verhältnis an Ribosomen-gebundener mRNA für die Reporter-mRNA mit SBP-Muation (permanent offener Zustand in der Zelle) war größer als für die mRNA mit intaktem Riboswitch (zumindest zeitweise im geschlossenen Zustand) (Abb. 23G). Daraus wurde geschlossen, dass die mRNA im nicht SAM-gebundenen Zustand effizienter translatiert wird. Mit Hilfe von Analysen zum Einfluss des *metA* Riboswitches auf die Bindung der 30S ribosomalen Untereinheit könnte in Zukunft seine direkte Wirkung auf die Ribosom-Rekrutierung zusätzlich validiert werden. Beispielsweise wurden in der *in vitro* Studie von Fuchs et al. (2007) Interaktionsanalysen mit dem translationalen SAM-III Riboswitch aus Lactobacillales und der 30S ribosomalen Untereinheit mit und ohne SAM durchgeführt. Es wurde gezeigt, dass die 30S Untereinheit nur in Abwesenheit von SAM an die SD Sequenz der mRNA bindet (Fuchs et al. 2007). Ähnliche Experimente könnten mit dem *metA* SAM-II Riboswitch aus *S. meliloti* durchgeführt werden.

3.3.2 Mögliche Auswirkung des *metA* Riboswitches auf den Transkriptionsterminator

Laut den Strukturvorhersagen der *metA* 5'-UTR befindet sich stromabwärts des Riboswitches zwischen AUG1 und AUG2 ein Rho-unabhängiger Transkriptionsterminator (Abb. 5). Außerdem zeigten Sequenzanalysen der 5'-UTR von *metA* Homologen in α-Proteobakterien eine konservierte Sekundärstruktur gefolgt von einer Poly-Uracil Region (Anhang Abb. 36), die nach Strukturvorhersagen Teil eines putativen Terminators sein könnte (Abb. 27B). Dabei ist anzumerken, dass für *R. sphaeroides* kein typischer Rho-unabhängiger Terminator vorausgesagt wurde, da nach dem doppelsträngigen Bereich kein Poly(U)-Schwanz folgt. Für *S. meliloti* wurde zunächst angenommen, dass der Terminator unabhängig vom Riboswitch ist, da die Struktur des Terminators mit und ohne SAM vorhergesagt wurde (Abb. 5).

Mit Hilfe einer *metA* Promotorfusion konnte gezeigt werden, dass die strukturgebende Sequenz des Terminators zu einer drastischen Senkung der Fluoreszenz führt (Abb. 17C). Dabei konnte nicht beurteilt werden, ob der Terminator auf variierende zelluläre SAM-Konzentrationen reagiert, da der Promotor von *metA* selbst mediumresponsiv (aktiver in MM als in TY) ist. Der Terminator wurde durch Mutationsanalyse validiert und die Ergebnisse zeigen, dass die *metA* Expression sowohl in TY als auch in MM erheblich durch diesen Terminator gedrosselt wird. Die vorläufige Transkriptionstermination von *metA* generiert die Riboswitch sRNA RA1, welche vermutlich weiter zur sRNA RA2 prozessiert wird (Abb. 7C). Da laut Abb. 17C in beiden benutzten Medien nur in wenigen Fällen eine vollständige Transkription des *metA* Gens erreicht wird, ist es denkbar, dass eine wichtige Funktion dieses Terminators die Generierung der sRNAs RA1 und RA2 ist. Mögliche Funktionen der sRNA RA2, die stark in TY-Kulturen akkumuliert, werden im Kapitel 3.5 diskutiert.

Ob der Riboswitch Einfluss auf den Terminator hat, wurde in einem ersten vorläufigen Experiment analysiert. Hierfür wurde eine transkriptionelle Fusionen mit dem *sinI* Promotor verwendet (pRA1-egfp, Abb. 26A). Im Vergleich zum Kontrollplasmid (pP_{sinI}-egfp), führte die Präsenz der RA1 Sequenz (Riboswitch + Terminator) im pRA1-egfp zu einer niedrigeren Fluoreszenz, wahrscheinlich aufgrund von Transkriptionsterminationsereignissen (Abb. 26B). Außerdem wurde eine mediumabhängigen Fluoreszenz (höher in MM als TY) festgestellt (Abb. 26B). Durch eine Mutation im Terminatorstamm wurde das gleiche Fluoreszenzniveau wie mit dem Kontrollplasmid erreicht (durch aufheben der Termination; siehe auch Abb. 17). Obwohl der Riboswitch intakt war, wurde wurde die Mediumsensitivität aufgehoben. Eine Aufhebung der Mediumsensitivität und Erhöhung der Fluoreszenz in TY konnte auch mit einer SBP-Mutation in pRA1-egfp beobachtet werden (Abb. 26B). Dies lässt vermuten, dass unter niedriger zellulärer SAM-Konzentration, im SAM-ungebundenen Zustand, der Riboswitch die Transkriptionstermination aufhebt (die Formation des Terminators verhindert) und die *metA*

Transkription ermöglicht. Um den Fortschritt der *metA*-Transkription durch den SAM-II Riboswitch zu kontrollieren, könnten sich gegenseitig ausschließende Terminator und Antiterminator Strukturen bilden. Diese Überlegungen führten zu erneuten Strukturvorhersagen, welche die Existenz eines putativen Antiterminators stützen (Abb. 28).

In Abbildung 5 wurden die Strukturen vorhergesagt, indem die Sequenz von Position +1 bis Position +143 in RNAfold eingegebenen wurde. Dabei wurde sowohl im SAM-gebundenen als auch im -ungebundenen Zustand die Struktur des Terminators vorausgesagt (Abb. 5). Das kann dadurch erklärt werden, dass der Terminator eine starke intrinsische Struktur ist, mit einer minimalen freien Energie (mfe) von -19 kcal/mol. Rückblickend muss gesagt werden, dass die Eingabe einer 143 nt Sequenz für die Vorhersage der Struktur einer naszierenden RNA suboptimal war. Bei dieser *in silico* Faltung wurden potentielle Strukturen im 5'-Bereich nicht berücksichtigt, da sie durch Sequenzen im 3'-Bereich ausgeschlossen wurden, die in der naszierenden RNA noch nicht synthetisiert wären. Aus diesem Grund wurde für die Vorhersage der naszierenden RNA die Sequenz bis zur Hälfte des Terminators in RNAfold eingegeben (von Position +1 bis Position +95, Abb. 28). Die Vorhersage legt nahe, dass, wenn die zweite Hälfte der Terminatorsequenz noch nicht synthetisiert ist, es zu einer alternativen Basenpaarung käme, die zu zwei Haarnadelstrukturen in der naszierenden RNA führt. Die zweite Haarnadelstruktur entspricht einem putativen Antiterminator mit einer mfe von -15,7 kcal/mol, während die erste Haarnadel bereits die Basenpaarung des P1 Stamms aufweist, welcher auch im SAM-gebundenen Zustand vorhanden ist (vergleiche SAM-ungebunden mit SAM-gebundener Zustand in Abb. 28). Die Erkenntnis, dass sich der SAM-II Riboswitch für eine effiziente SAM-Bindung bereits in einer vororganisierten Struktur befindet, die durch die Interaktion mit SAM schnell in einen stabilisierten Pseudoknoten übergeht (Roy et al. 2017), spricht für die neu vorhergesagte Struktur. Die Strukturvorhersage aus Abbildung 28 entspricht diesem Sachverhalt eher als die Strukturvorhersage aus Abb. 5, und außerdem unterstützt sie die Idee eines Einflusses des *metA* Riboswitches auf die Formation des Terminators.

Einen weiteren Hinweis auf das Zusammenspiel des *metA* Riboswitches und des Terminators könnten die Ergebnisse der RT-qPCR Analyse geben, die mit sRNA (5'-UTR)-gerichteten und *egfp*-gerichteten Primern unter Verwendung der translationalen *egfp*-Fusion im Stamm 2011 ΔRA pCD33-egfp erzielt wurden. Die Mutation der SBP im *egfp*-Reporterkonstrukt führte zum Anstieg der *egfp*-mRNA Abundanz und gleichzeitig zur Abnahme der Abundanz der Riboswitch sRNA-Sequenz, bis zum Angleichen dieser Abundanzen (Abb. 25C und Abb. 25D). Das spricht dafür, dass praktisch keine Termination vor AUG2 stattgefunden hat und die RA1 Sequenz mit der Reporter-mRNA co-transkribiert wurde. Um das zu beweisen, könnte mit Hilfe einer *in vitro* Transkriptionsanalyse geprüft werden, ob das Vorhandensein von SAM während

der Transkription die Termination beeinflusst, ähnlich wie es für den transkriptionellen SAM-I Riboswitch aus *Bacillus subtilis* gezeigt wurde (McDaniel et al. 2003).

Nach den Ergebnissen dieser Arbeit lässt sich spekulieren, dass der *metA* Riboswitch auf transkriptioneller Ebene und auf translationaler Ebene agiert. Dabei würde nach SAM Bindung die SD Sequenz für Ribosomen unzugänglich sein und stromabwärts der SD Sequenz würde sich ein Rho-unabhängiger Terminator bilden. Riboswitches, die sowohl auf transkriptioneller als auf translationaler Ebene regulieren, sind bereits bekannt. Einen ähnlichen Mechanismus besitzt der Flavinmononukleotid (FMN) bindende Riboswitch des Gens *ribB* in *E. coli*. In diesem Fall ist die SD Sequenz im Terminatorstamm positioniert und nicht wie in *S. meliloti,* stromabwärts des Terminators (Pedrolli et al. 2015). Eine Termination stromabwärts der SD Sequenz erfolgt nach Bindung von Thiaminpyrophosphat (TPP) an den TPP Riboswitch von *thiM* in *E. coli*. Durch die Sequestrierung der RBS wird die *rut* Sequenz für Rho zugänglich, sodass Transkription terminiert werden kann (Bastet et al. 2017). In *E. coli* zeigt der *lysC* Riboswitch zusätzlich zur Translationsrepression eine weitere Möglichkeit die Genexpression zu mindern. Nach ligandeninduzierter Konformationsänderung wird die Translationsinitiation blockiert und stromaufwärts eine RNase E Schnittstelle freigelegt, um den Abbau zu initiieren (Caron et al. 2012).

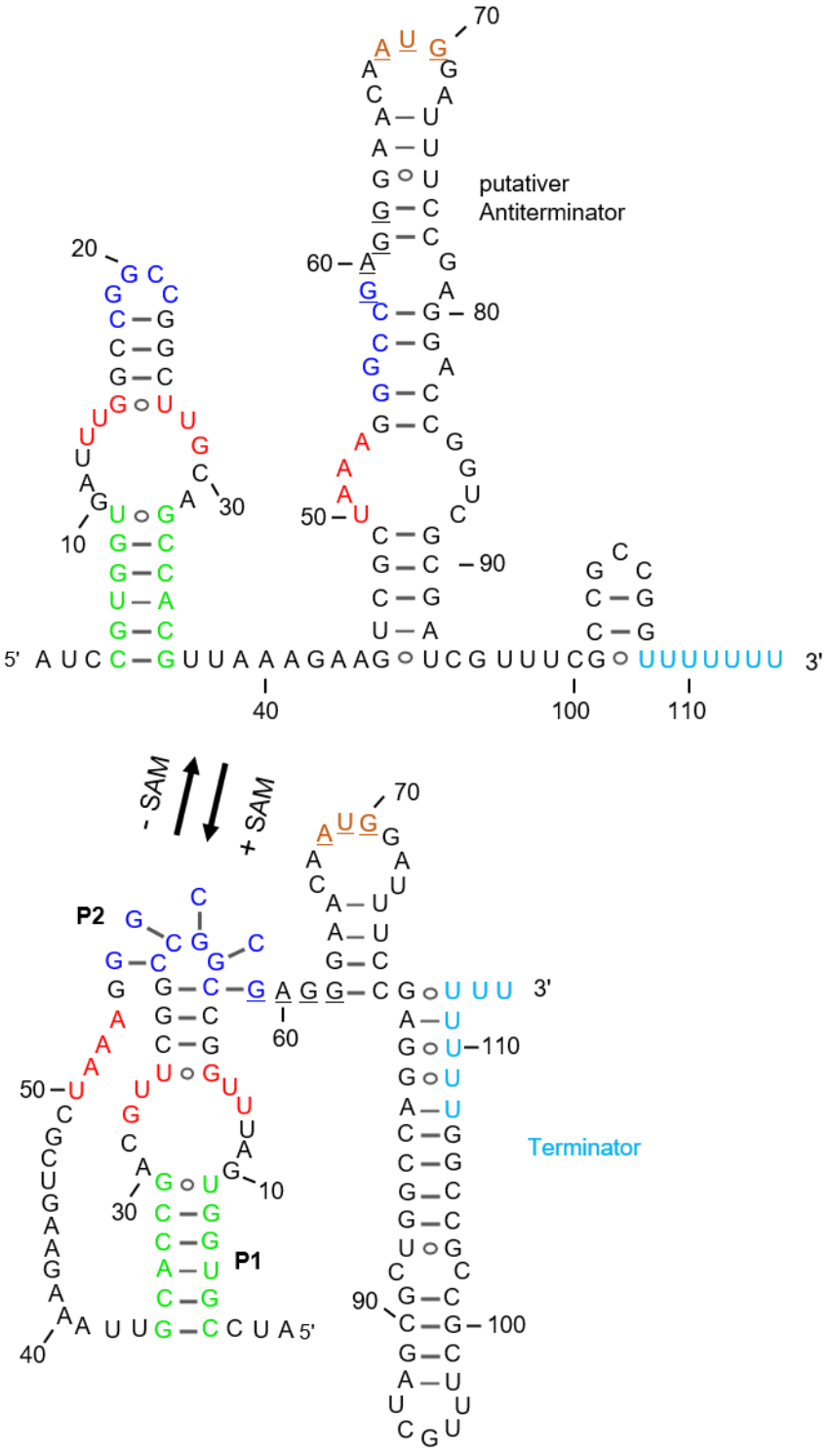

Abbildung 28: Mögliche transkriptionelle Regulation durch den *metA* Riboswitch. Strukturen des *metA* Riboswitches sind ohne (-) und mit (+) SAM dargestellt. Die roten Nukleotide bilden die SAM-Bindetasche. Im SAM-gebundenen Zustand bilden die grünen Nukleotide den P1 Stamm, während die dunkelblauen Nukleotide den P2 Pseudoknoten bilden. Cyane U-Nukleotide deuten den transkriptionellen Terminator an. SD Sequenz und AUG1 Startcodon sind unterstrichen. Die Strukturen wurden mit Hilfe von RNAfold (Gruber et al. 2008) und unter Berücksichtigung der Analysen von (Corbino et al. 2005) vorhergesagt.

Die Kombination der transkriptionellen und translationalen Kontrolle eines Riboswitches erlaubt eine effiziente Regulation der Genexpression unter unterschiedlichen Bedingungen. Zum einen kann unter hoher zellulärer SAM-Konzentration die Energie für die Transkription

des gesamten *metA* Transkriptes bereits durch die vorzeitige Termination gespart werden, zum anderen kann ohne großen energetischen Aufwand, wenn *metA* bereits vollständig transkribiert wurde, die Translationsinitiation inhibiert werden.

3.3.2 Zusätzliche, konträre Funktion des SAM-II Riboswitches

Die Abundanz von mRNAs ist eng verknüpft mit der Abundanz der von ihnen codierten Proteine und muss deshalb streng reguliert werden. Die Gleichgewichtsmenge der mRNAs wird neben der Transkription und dem RNA Abbau auch von der RNA Stabilität bestimmt. Die durchschnittliche Halbwertszeit von mRNAs in *E. coli* beträgt zwischen 3 und 8 Minuten. Während der Translation werden mRNAs meist stabilisiert, die die gebundenen Ribosomen vor dem Abbau schützen (Richards et al. 2008).

Bindet SAM an den Riboswitch, stabilisiert die Bindung die Formation des Pseudoknotens (Corbino et al. 2005). Die Konsequenz für die Expression von *metA* ist weniger Translation (Abb. 23G). Allerdings wurde eine Stabilisierung der *metA* mRNA unter hoher zellulärer SAM-Konzentration beobachtet (Abb. 14F). Eine ähnliche Beobachtung wurde für die *metZ* mRNA und die Riboswitch sRNAs, RZ, RA1 und RA2 gemacht (Abb. 14A – 14E). Nach der Mutation der SBP im Plasmid pCD33-egfp, welche die Formation des Pseudoknotens unmöglich machen sollte, wurde gezeigt, dass die mutierte mRNA destabilsiert wurde (Abb. 23E und Abb. 23F). Daraus wurde geschlossen, dass der SAM-II Pseudoknoten stabilsierend auf RNAs wirkt. Der Guanidin-III Riboswitch stromaufwärts von Genen der Guanidineffluxpumpe in *Legionella pneumophila* bildet ebenfalls nach Ligandenbindung einen Pseudoknoten. In der Arbeit von Richards und Belasco (2021) wurde gezeigt, dass dieser Pseudoknoten stabilisierend wirkt, da er ein sterisches Hindernis für die RNase E darstellt und somit den Abbau verhindert. Jedoch ist anzumerken, dass dieser Riboswitch positiv auf die Translation wirkt (Richards und Belasco 2021b). Unter hoher Guanidin-Konzentration in der Zelle wirken beide Mechanismen des Guanidin-III Riboswitches, Translations- und Stabilitätsregulation, synergistisch zur Aktivierung der Genexpression. Der in dieser Arbeit untersuchte SAM-II Riboswitch hingegen weist konträre Funktionen auf: während die Translation und möglicherweise sogar die Transkription bei SAM-Bindung inhibiert werden, werden existierende Transkripte stabilisiert. Es ist möglich, dass in *S. meliloti* der SAM-II Riboswitch-Pseudoknoten am 5'-Ende den Abbau durch die RNase E und/ oder durch die 5'-3' Exoribonuklease RNase J verhindert.

Denkbar ist, dass diese Gegensätzlichkeit vor allem im Wechsel von hohen zu niedrigen bzw. von niedrigen zu hohen SAM-Bedingungen relevant ist und zur SAM Homöostase beiträgt. Das wird hier am Beispiel von *metA* erklärt. Unter niedriger zellulärer SAM-Konzentration ist die *metA* mRNA höchst instabil (Halbwertszeit < 30 Sekunden; Abb. 14); dem ist die starke Promotoraktivität entgegengesetzt, die für ausreichende Genexpression sorgt, obwohl viele

der Transkriptionsereignisse vorzeitig abgebrochen werden (Abb. 15B und Abb. 17C). Unter hoher zellulärer SAM-Konzentration wird die Promotoraktivität gedrosselt (Abb. 15B). Zudem wird überwiegend die Transkription von *metA* aufgrund des starken Terminators in der 5'-UTR vorzeitig terminiert (Abb. 17C), und diese Termination wird durch den Riboswitch möglicherweise verstärkt (Abb. 25D und Abb. 28). Um einer starken Depletion der *metA* mRNA entgegenzuwirken, ist es vorteilhaft, unter diesen Bedingungen die *metA* mRNA zu stabilisieren. Das wäre für eine schnelle Umstellung von hohe auf niedrige intrazelluläre SAM-Konzentration von Vorteil. Die Verdopplung der mRNA-Halbwertszeit unter hoher zellulären SAM-Konzentration puffert die Abnahme der Abundanz der *metA* mRNA (und ähnlich auch der *metZ* mRNA) und trägt somit zu der SAM-Homöostase bei. Dies gewährleistet schnelle Umstellung der Genexpression und Adaptation der Bakterien auf ständig wechselnden Umweltbedingungen.

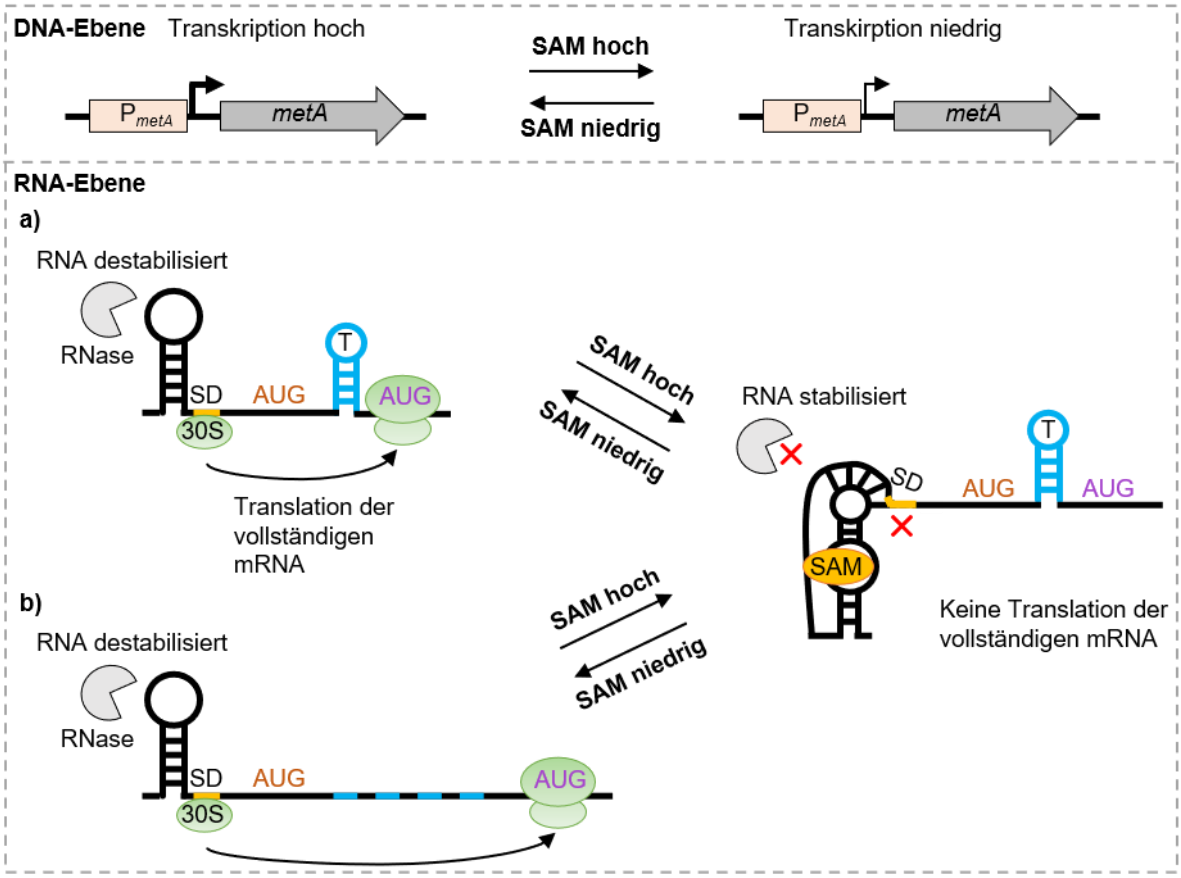

Abbildung 29: Model der *metA* Regulation auf transkriptioneller und posttranskriptioneller Ebene. Unter niedriger zellulärer SAM-Konzentration (links) ist die Aktivität des Promotors von *metA* (P_{metA}) hoch. Auf RNA-Ebene gibt es die Möglichkeit a), dass der Transkriptionsterminator (cyan) unabhängig des Riboswitches existiert. Im nicht-gebundenen Zustand ist die Shine-Dalgarno (SD) Sequenz zugänglich und Translation wird am AUG2 (violett) initiiert. Die RNA ist destabilisiert, möglicherweise wegen freigewordener RNase Schnittstellen in der mRNA. Möglichkeit b) zeigt, dass der Terminator unter der Kontrolle des Riboswitches ist. Im nicht-gebundenen Zustand bildet sich der Terminator nicht aus. Unter hoher zellulärer SAM-Konzentration (rechts) ist die *metA* Promotoraktivität niedrig. Der Riboswitch bindet SAM, sodass die SD Sequenz unzugänglich ist und Translation unterbunden ist. Der Pseudoknoten stabilisiert die RNA und blockiert wahrscheinlich den Zugang von RNasen zur mRNA. Der Transkriptionsterminator ist ausgebildet.

3.4 Riboswitch sRNA

Riboswitches, die auf transkriptioneller Ebene wirken, kontrollieren oft die Formation eines Terminators. Kommt es zur Termination, können sRNAs mit Riboswitch Aptameren generiert werden (McDaniel et al. 2003; Epshtein et al. 2003).

Laut der Strukturvorhersagen des *metZ* Riboswitches aus *S. meliloti* wirkt dieser, wie bereits oben erwähnt, auf transkriptioneller Ebene. Nach SAM Bindung würde ein transkriptioneller Terminator in der Expressionsplattform entstehen (Abb. 4). Dazu passend wurde eine sRNA mit *metZ* Riboswitch mittels Northern Blot Hybridisierungen nachgewiesen, die unter hoher intrazellulärer SAM-Konzentration akkumuliert, wahrscheinlich aufgrund der gesteigerten Terminationsrate (Abb. 7C und Abb. 10B). Ebenso eine Rolle spielt die erhöhte RZ Stabilität unter diesen Bedingungen, obwohl die Promotoraktivität gedrosselt ist (Abb. 14D und Abb. 15B).

Wie auch bereits erwähnt, befindet sich stromabwärts des *metA* Riboswitches ein Terminator, der ebenfalls zu einer frühzeitigen Termination führen kann. Die resultierende sRNA wurde als Riboswitch sRNA RA1 detektiert (Abb. 7C). Weiterhin wurde eine kleinere sRNA, RA2, nachgewiesen, die unter hoher intrazellulärer SAM-Konzentration akkumuliert (Abb. 7C und Abb. 10B). RA2 ist ca. 60 nt lang und umfasst lediglich das Aptamer. Jedoch wurde das genaue Ende, bspw. mittels 3'-RACE, nicht bestimmt. Das Volllängen-Transkript (*metA* mRNA) und die sRNA RA1 könnten durch 3'-5' Exoribonukleasen abgebaut werden, sodass die sRNA RA2 generiert wird. Ein vollständiger Abbau des Riboswitch-Bereiches könnte blockiert sein, da der Riboswitch im SAM-gebundenen Zustand als kompakte Struktur schwer angreifbar für Ribonukleasen sein sollte und demzufolge als RA2 akkumuliert. Eine ähnliche Entwicklung wurden für die Vc2 Riboswitch sRNAs (*P_1-Vc2, P_2Vc2*) aus *Vibrio cholerae* postuliert. Dabei befindet sich der zyklische (*cyclic*) di-GMP (c-di-GMP) bindende Riboswitch am 3'-Ende der sRNAs und stabilisiert diese unter hohen zellulären c-di-GMP-Konzentrationen. Die Autoren vermuten einen 3'-5' exoribonukleolytischen Abbau der *tfoY* mRNA bis zum Riboswitch, da dieser im gebundenen Zustand den Abbau blockiert. Eine transkriptionelle Termination zur Entstehung der sRNAs wurde ausgeschlossen, da der Vc2 Riboswitch die Translationsinitiation des stromabwärts liegenden *tfoY* nach Ligandenbindung inhibiert und eine weitere Funktion zur vorzeitigen Transkriptionstermination nicht bekannt ist (Inuzuka et al. 2018; Pursley et al. 2019).

Anhand von Transkriptomanalysen wurden einige Riboswitch sRNAs in relativ hohen Mengen detektiert, was auf deren Funktion in *trans* schließen könnte. Neben einer direkten Interaktion mit einem Zieltranskript, wurde als weitere mögliche Funktion der Riboswitch sRNAs eine Art Lager für die jeweilige Metaboliten angegeben, die die Homöostase erhalten soll (Kawano et

al. 2005; Karunker et al. 2013; Pursley et al. 2019). Dafürsprechend wurde in der Arbeit von Pursley et al. (2019) nach Überexpression der *P_1-Vc2* sRNA ein erhöhter flagellenbasierter Schwimmphänotyp festgestellt, der durch Sequestrieren des c-di-GMP durch die sRNA und demnach Senkung des c-di-GMP Spiegels erklärt werden könnte, oder auch durch direkte Interaktion der sRNA mit Zieltranskripten hervorgerufen wird. Eine Veränderung des c-di-GMP Spiegels nach Überexpression wurde nicht analysiert (Pursley et al. 2019).

Unter hoher zellulärer SAM-Konzentration sind die RA2 und RZ sRNAs sehr abundant und daher könnten sie eine Rolle als Metabolitenlager spielen. Betrachtet man die Bindungsaffinitäten der SAM-I und SAM-II Riboswitches, zeigt sich, dass der SAM-II Riboswitch mit einer 1000-fach geringeren Affinität an SAM bindet als der SAM-I Riboswitch (Corbino et al. 2005). Wahrscheinlich aus diesem Grund wird die SAM-I sRNA in *B. subtilis* schneller abgebaut, um freies SAM zur Verfügung zu stellen (Shahbabian et al. 2009), während SAM-II sRNAs ohne größeren Aufwand SAM bereitstellen könnten und so die Verfügbarkeit an freien SAM puffern könnten.

In dieser Arbeit wurde das Aptamer von *metA* im Stamm 2011 ΔRA deletiert und daher existieren in diesem Stamm keine sRNAs mit *metA* Riboswitch (Abb. 24C). Das Fehlen des *metA* Riboswitches hat zu einer Zunahme der *metA* Abundanz geführt (Abb. 24D), jedoch nicht zu einer Veränderung des SAM-Spiegels (Abb. 24E). Dadurch, dass *S. meliloti* zwei SAM bindende Riboswitches besitzt, ist es denkbar, dass der *metZ* Riboswitch den fehlenden *metA* Riboswitch kompensieren kann. Dabei ist unklar, ob die *metZ* Riboswitch sRNA, RZ, als Metabolitenlager die Homöostase erhält und/ oder durch die Regulation der *metZ* mRNA. Denn zumindest unter hoher intrazellulärer SAM-Konzentration war die *metZ* mRNA Menge im 2011 ΔRA Stamm gesenkt, was eine Folge der gesteigerten Expression von *metA* sein könnte (Abb. 24D). Die Abnahme der *metZ* mRNA könnte aber auch ein direkter Effekt durch eine fehlende Interaktion mit der sRNA RA2 sein.

Es ist vorstellbar, dass RA2 eine Funktion in *trans* ausübt. In *Listeria monocytogenes* binden die sRNAs SreA und SreB des transkriptionellen SAM-I Riboswitches an die 5'-UTR der *pfrA* mRNA, welche einen Virulenzregulator codiert (Loh et al. 2009). In einem SreA Deletionsstamm wurde eine Zunahme der *pfrA* mRNA und eine Abnahme der *agrD* mRNA, welches wichtig für die Biofilmformation ist, nachgewiesen. Über welchen Mechanismus SreA die Expression von *agrD* reguliert und wo die Interaktion stattfindet wurde nicht gezeigt (Loh et al. 2009).

In silico Analysen deuten auf eine mögliche Bindung der sRNA RA2 im SAM-ungebundenen Zustand im codierenden Bereich von *metZ* (Abb. 30). Eine Bindung der RZ sRNA mit *metZ* mRNA wurde mit Hilfe von IntaRNA nicht vorhergesagt. Es benötigt weitere *in vivo* und *in vitro* Analysen, um eine Rolle der RA2 sRNA in der *metZ* Expression zu untersuchen.

Beispielsweise könnten, wie in der Arbeit von Loh et al. (2009), transkriptionelle und translationale *metZ* Reporterfusionen verwendet werden. Um einen direkten Einfluss von RA2 auf die Expression der *metZ* Reporterfusionen nachzuweisen, könnten weitere Mutationen und entsprechende kompensatorische Mutationen im Bereich der Bindung von RA2 und *metZ* eingeführt werden. Dabei wäre zu beachten, dass bei Mutationen der RA2 sRNA die Formation des Riboswitches nicht gestört werden sollte (siehe in Abb. 30B gelb hinterlegt, P2 Pseudoknoten und Teil der SBP).

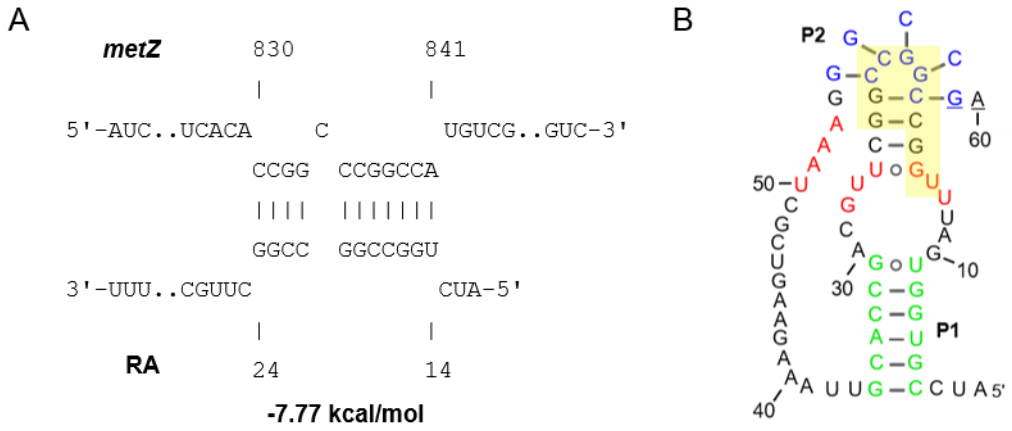

Abbildung 30: Mögliche Interaktion von RA2 und *metZ*. A Mögliche Basenpaarung der Riboswitch sRNA RA2 im codierenden Bereich von *metZ* mRNA vorhergesagt mit Hilfe von IntaRNA 2.0 (Mann et al. 2017). **B** Strukturvorhersage von RA2 im SAM-gebundenen Zustand. Die konservierten Nukleotide des SAM-II Aptamers sind farbig, für detaillierte Beschreibung siehe Abb. 5. Teil der Shine-Dalgarno Sequenz ist dargestellt und unterstrichen. Im Pseudoknoten P2 ist gelb hinterlegt der Bereich, der mit *metZ* interagieren könnte.

Da RA2 unter hoher intrazellulärer SAM-Konzentration stark stabilisiert wird (Abb. 14B) ist es auch möglich, dass die sRNA mit einem Protein interagieren kann, beispielsweise mit einem Transkriptionsfaktor, wie in Kapitel 3.1 besprochen. Die Adenosylcobalamin Riboswitch sRNA, EutX stromaufwärts von Ethanolamingenen (*eut*) in *Enterococcus faecalis* bindet den Reaktionsregulator, EutV, (DebRoy et al. 2014). Um einen Interaktionspartner von RA2 zu ermitteln, wären *in vivo* Pulldown-Assays und anschließende RNA-Sequenzierung und Massenspektrometrie möglich.

In den letzten Jahren wurden immer mehr Funktionen von 5'-UTR abgeleiteten sRNAs nachgewiesen (zusammengefasst in, (Hör et al. 2020). Dies deckt eine weitere Möglichkeit der Genregulation auf. Aus diesem Grund sollten auch die SAM-II Riboswitch sRNAs in *S. meliloti* weiter analysiert werden.

4 Material

4.1 Bakterienstämme

Stamm	Beschreibung	Referenz
Sinorhizobium meliloti		
2011	Stamm Rm2011, Insertionssequenz im *expR* Gen; Sm^R	(Casse et al. 1979)
2011 *FLAG-metK*	Chromosomale Integration des Plasmides pKACIT, rekombinantes *FLAG-metK* Gen unter Kontrolle eines IPTG induzierbaren Promotors; Sm^R, Nm^R	(Scheuer et al. 2022)
2011 ΔRA	Deletion des SAM-II Aptamers von *metA* (Bereich von +3 - +57 deletiert, +1 = Transkriptionsinitiationsseite); Sm^R	(Scheuer et al. 2022)
Escherichia coli		
DH5α	Klonierungsarbeiten und Plasmidreplikation. F^- Φ80*lacZ*ΔM15 Δ(*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1*, *hsdR17* (*rK*$^-$, *mK*$^+$), *phoA supE44 thi-1*	NEB
S17-1	Donorstamm bei biparentaler Konjugation von *S. meliloti. recA, pro*, *hsdR, RP4*$^{-2}$ (Tc::Mu)(Km::Tn7); TP^r, Str^r, Sp^r	(Simon et al. 1983)

4.2 Plasmide

Plasmid*	Description	Referenz
pJET1.2/blunt	Klonierungsvektor, Amp^r	Thermo Fischer Scientific
pLK46	Enthält *egfp* mit GC-reichen Codons; Tc^r	McIntosh et al., 2008
pJet-CD33	pJET1.2/blunt Derivat; enthält die *metA* Region beginnend von -209 (+1 ist die TSS) und reicht bis zu den ersten 33 Codons (AUG1 wurde als erstes Codon erachtet).	(Scheuer et al. 2022)
pJET-metA-a::b	pJet-CD33 Derivat, die *metA* Sequenz von +13 bis +58 (+1 ist die TSS) wurde deletiert durch Inverse PCR.	(Scheuer et al. 2022)
pJET-metA-a::c	pJet-CD33 Derivat, die *metA* Sequenz von +13 bis +124 (+1 ist die TSS) wurde deletiert durch Inverse PCR.	(Scheuer et al. 2022)
pKACIT-FLAG	Integrationsvektor mit IPTG induzierbaren Promoter und 3×FLAG-Markierungscodons für eine N-terminale Fusion; Nm^r	Kretz J und McIntosh M, Manuskript in Bearbeitung.
pKACIT-FLAG-metK	pKACIT Derivat; enthält 400 nt der *metK* Sequenz zwischen den XbaI and KpnI Restriktionsschnittstellen. Die *metK* Sequenz beginnt mit dem zweiten Codon und wurde im Leserahmen der 3X-FLAG Sequenz kloniert.	(Scheuer et al. 2022)
pK18mobsacB	*Suicide* Plasmid mit *sacB,* lethal in der Anwesenheit von Saccharose im Medium; Km^r	(Schäfer et al. 1994)

pSRKGm	Expressionvektor mit weitem Wirtsspektrum mit IPTG induzierbaren P_{lac}; Gm^r	Khan et al., 2008
pRS1	pSRKGm Derivat; das *lac* Modul wurde ersetzt durch eine synthetische MCS, enthält Restriktionsschnittstellen für NheI, HindIII, XbaI, SpeI, BamHI, PstI, und EcoRI; Gm^r	(Scheuer et al. 2022)
pRS1-T	pRS1 Derivat; der transkriptionelle Terminator von dem *B. japonicum* USDA 110 *rrn* Gen wurde in die EcoRI Restriktionsschnittstelle kloniert.	(Scheuer et al. 2022)
pRS1-SD-egfp	pRS1-T Derivat; eine Shine-Dalgarno Sequenz und *egfp* wurden zwischen die XbaI und BamHI Restriktionsschnittstellen kloniert.	(Scheuer et al. 2022)
pP_{metZ}-egfp	pRS1-SD-egfp Derivat; Promotorfusionsplasmid; enthält die *metZ* Region von -206 bis +5 (+1 ist die TSS) zwischen die NheI und XbaI Restriktionsschnittstellen kloniert.	(Scheuer et al. 2022)
pP_{metA}-egfp	pRS1-SD-egfp Derivat; Promotorfusionsplasmid; enthält die *metA* Region von -209 bis +5 (+1 ist die TSS) zwischen die NheI und XbaI Restriktionsschnittstellen kloniert.	(Scheuer et al. 2022)
$pP_{metA150}$-egfp	pRS1-SD-egfp Derivat; Promotorfusionsplasmid; enthält die *metA* Region von -159 bis +5 (+1 ist die TSS) zwischen die NheI und XbaI Restriktionsschnittstellen kloniert.	Diese Arbeit
$pP_{metA100}$-egfp	pRS1-SD-egfp Derivat; Promotorfusionsplasmid; enthält die *metA* Region von -102 bis +5 (+1 ist die TSS) zwischen die NheI und XbaI Restriktionsschnittstellen kloniert.	Diese Arbeit
pP_{metA50}-egfp	pRS1-SD-egfp Derivat; Promotorfusionsplasmid; enthält die *metA* Region von -52 bis +5 (+1 ist die TSS) zwischen die NheI und XbaI Restriktionsschnittstellen kloniert.	Diese Arbeit
pP_{metA50}-GANTCm1-egfp	pP_{metA50}-egfp Derivat; enthält A-46T Mutation, um potentielle Methylierungsstelle zu mutieren	Diese Arbeit
pP_{metA50}-GANTCm2-egfp	pP_{metA50}-egfp Derivat; enthält A-45T Mutation, sollte als Kontrolle für Mutation der Methylierungsstelle dienen.	Diese Arbeit
pTerm-egfp	pP_{metA}-egfp Derivat; RA1 Terminator wurde in die XbaI Restriktionsschnittstelle kloniert.	(Scheuer et al. 2022)
pTerm-M1-egfp	pP_{metA}-egfp Derivat; destabilisierter RA1 Terminator mit GG106,107CC Mutationen wurde in die XbaI Restriktionsschnittstelle kloniert.	(Scheuer et al. 2022)
pTerm-M1+M2-egfp	pTerm-M1-egfp Derivat; enthält kompensatorische CC83,84GG Mutationen; stellt RA1 Terminator wieder her.	(Scheuer et al. 2022)
pRS-'egfp	pRS1-T Derivat; enthält trunkiertes *egfp* beginnend mit dem dritten Codon, wurde zwischen BamHI und PstI Restriktionsschnittstellen kloniert; enthält keinen Promotor und RBS.	(Scheuer et al. 2022)
pCD3-egfp	pRS-'egfp Derivat; translationales Fusionsplasmid enthält die *metA* Region beginnend von -209 (+1 ist die TSS) bis zu den ersten 3 Codons (AUG1 wurde als erstes Codon erachtet) fusioniert an *egfp;* NheI und BamHI wurden für die Klonierung verwendet.	(Scheuer et al. 2022)
pCD16-egfp	pRS-'egfp Derivat; translationales Fusionsplasmid enthält die *metA* Region beginnend von -209 (+1 ist die TSS) bis zu den ersten 16	(Scheuer et al. 2022)

	Codons (AUG1 wurde als erstes Codon erachtet) fusioniert an *egfp;* NheI und BamHI wurden für die Klonierung verwendet.	
pCD28-egfp	pRS-'egfp Derivat; translationales Fusionsplasmid enthält die *metA* Region beginnend von -209 (+1 ist die TSS) bis zu den ersten 28 Codons (AUG1 wurde als erstes Codon erachtet) fusioniert an *egfp;* NheI und BamHI wurden für die Klonierung verwendet.	Diese Arbeit
pCD36-egfp	pRS-'egfp Derivat; translationales Fusionsplasmid enthält die *metA* Region beginnend von -209 (+1 ist die TSS) bis zu den ersten 36 Codons (AUG1 wurde als erstes Codon erachtet) fusioniert an *egfp;* NheI und BamHI wurden für die Klonierung verwendet.	Diese Arbeit
pCD39-egfp	pRS-'egfp Derivat; translationales Fusionsplasmid enthält die *metA* Region beginnend von -209 (+1 ist die TSS) bis zu den ersten 39 Codons (AUG1 wurde als erstes Codon erachtet) fusioniert an *egfp;* NheI und BamHI wurden für die Klonierung verwendet.	Diese Arbeit
pCD51-egfp	pRS-'egfp Derivat; translationales Fusionsplasmid enthält die *metA* Region beginnend von -209 (+1 ist die TSS) bis zu den ersten 51 Codons (AUG1 wurde als erstes Codon erachtet) fusioniert an *egfp;* NheI und BamHI wurden für die Klonierung verwendet.	Diese Arbeit
pCD33-egfp	pRS-'egfp Derivat; translationales Fusionsplasmid enthält die *metA* Region beginnend von -209 (+1 ist die TSS) bis zu den ersten 33 Codons (AUG1 wurde als erstes Codon erachtet) fusioniert an *egfp;* NheI und BamHI wurden für die Klonierung verwendet.	(Scheuer et al. 2022)
pCD33-M1-egfp	pCD33-egfp Derivat; enthält GG106,107CC Mutationen, destabilisiert den RA1 Terminator positioniert zwischen AUG1 and AUG2.	(Scheuer et al. 2022)
pCD33-AUG1m-egfp	pCD33-egfp Derivat; enthält AU68,69UA Mutationen in *metA;* AUG1 ist zu einem Stoppcodon mutiert.	(Scheuer et al. 2022)
pCD33-AUG2m-egfp	pCD33-egfp Derivat; enthält A137C, G139C Mutation in *metA;* AUG2 ist zu einem Leucincodon mutiert.	(Scheuer et al. 2022)
pCD33-Stopp-egfp	pCD33-egfp Derivat; enthält G118U Mutation; zwischen AUG1 und AUG2 ist ein Stoppcodon.	Diese Arbeit
pCD33-SD1m-egfp	pCD33-egfp Derivat; enthält GG61,62UU Mutation in der Shine-Dalgarno Sequenz des *metA* Riboswitches.	(Scheuer et al. 2022)
pCD33-Δ116-124-egfp	pCD33-egfp Derivat; die *metA* Sequenz von +116 bis +124 (+1 ist die TSS) wurde deletiert durch Inverse PCR.	Diese Arbeit
pCD33-Δ124-136-egfp	pCD33-egfp Derivat; die *metA* Sequenz von +124 bis +136 (+1 ist die TSS) wurde deletiert durch Inverse PCR.	Diese Arbeit
pCD33-Δ116-136-egfp	pCD33-egfp Derivat; die *metA* Sequenz von +116 bis +136 (+1 ist die TSS) wurde deletiert durch Inverse PCR.	Diese Arbeit
pCD33-SD2m-egfp	pCD33-egfp Derivat; enthält G127A Mutation in der potentiellen Shine-Dalgarno Sequenz 10 nt stromaufwärts von AUG2.	Diese Arbeit
pCD33-SD3m-egfp	pCD33-egfp Derivat; enthält G130A Mutation in der potentiellen Shine-Dalgarno Sequenz 6 nt stromaufwärts von AUG2	Diese Arbeit

pCD33-SD2+3m-egfp	pCD33-egfp Derivat; enthält G127A und G130A Mutationen in den potentiellen Shine-Dalgarno Sequenzen 10 bzw. 6 nt stromaufwärts von AUG2.	Diese Arbeit
pCD33-SBPm-egfp	pCD33-egfp Derivat; enthält AAA51,52,53TTT Mutationen in der SAM-Bindetasche des *metA* Riboswitches.	(Scheuer et al. 2022)
pAUG1-egfp	pRS1-T Derivat; translationales Fusionsplasmid erstellt um Potential von AUG1 als translationales Startcodon zu testen. Die klonierte Sequenz besitzt kein *metA* Aptamer. Es besitzt P_{metA}, die SD aus der Expressionsplattform des Riboswitches, AUG1 und die folgenden Codons wurden an das dritte *egfp* Codon fusioniert. Das Konstrukt wurde gneriert durch überlappende PCR wie beschrieben, und in die NheI and PstI Restriktionsschnittstellen kloniert.	(Scheuer et al. 2022)
pAUG2-egfp	pRS1-T Derivat; translationales Fusionsplasmid erstellt um Potential von AUG2 als translationales Startcodon zu testen. Die klonierte Sequenz besitzt kein *metA* Aptamer. Es besitzt P_{metA}, die SD Sequenzen unmittelbar stromaufwärts von AUG2, AUG2 und die folgenden Codons wurden an das dritte *egfp* Codon fusioniert. Das Konstrukt wurde gneriert durch überlappende PCR wie beschrieben, und in die NheI and PstI Restriktionsschnittstellen kloniert.	(Scheuer et al. 2022)
pSRKGm-T	pSRKGm Derivat; enthält die *rrn* Terminatorsequenz von *B. japonicum* USDA 110, wurde in die HindIII Restriktionsschnittstelle kloniert.	(Scheuer et al. 2022)
pSRKGm-egfp-T	pSRKGm-T Derivat; enthält eine Shine-Dalgarno Sequenz und *egfp* zwischen den BamHI und PstI Restriktionsschnittstellen; Gm^r	(Scheuer et al. 2022)
pP_{sinI}-egfp	pSRKGm-egfp-T Derivat; enthält *sinR* und die intergenetische Region zwischen *sinR* und *sinI,* welche den P_{sinI} enthält. Das Insert wurde zwischen die NdeI und XbaI Restriktionsschnittstellen klonier.t	Diese Arbeit
pRA1-egfp	pP_{sinI}-egfp Derivat; transkriptionelle Fusion, der *metA* Riboswitch kontrolliert die entfernte Translation eines mit SD Sequenz versehenen *egfp* Reportergens; die Reporter-mRNA wird konstitutiv von P_{sinI} transkribiert. Enthält die RA1-Sequenz, welche den *metA* Riboswitch und den transkriptionellen Terminator umfasst; zwischen die SpeI und BamHI Restriktionsschnittstellen kloniert	Diese Arbeit
pRA1-SBPm-egfp	pRA1-Derivat; enthält AAA51,52,53TTT Mutationen in der SAM-Bindetasche des *metA* Riboswitches.	Diese Arbeit
pRA1-M1-egfp	pRA1-Derivat; enthält GG106,107CC Mutationen, destabilisiert den RA1 Terminator.	Diese Arbeit

* Die meisten Inserts der Plasmide, welche in dieser Arbeit und in Scheuer et al. 2022 erstellt worden sind, wurden vorher in pJET1.2/blunt kloniert. Für das Verständnis der Klonierung von pAUG1-egfp und pAUG2-egfp wurden hier lediglich diese pJET1.2/blunt-Derivate erwähnt.

4.3 Oligonukleotide

Oligonukleotide	Sequenz	Kommentar	Referenz	PE
NB RswA 1	ATCGCGACCGGT CCTCGGAAATC	Northern Blot Analyse der *S. meliloti metA* Riboswitch sRNA (Terminator).	(Scheuer et al. 2022)	
NB RswA 2	CTTCTTTAACGTG GCTGCAAGCCG	Northern Blot Analyse der *S. meliloti metA* Riboswitch sRNA (Aptamer)	(Scheuer et al. 2022)	
NB RswA	CCCTTTAGCGACT TCTTTAACGTGGC	Northern Blot Analyse der *S. meliloti metA* Riboswitch sRNA (Kontrollsonde, Aptamer)	Diese Arbeit	
NB RswZ	GTTTAACGTGGCT GCAAGCCGAC	Northern Blot Analyse der *S. meliloti metZ* Riboswitch sRNA (Aptamer)	(Scheuer et al. 2022)	
NB RswZ	CCTTTTTAGCTAC TTGTTTAACGTGG C	Northern Blot Analyse der *S. meliloti metZ* Riboswitch sRNA (Kontrollsonde, Aptamer)	Diese Arbeit	
NB 5S rRNA	GTTCGGAATGGG AACGGGTGCAG	Northern Blot Analyse der *S. meliloti* 5S rRNA	(Baumgardt et al. 2016)	
Spike T7-RsCrtA-Fw	TAATACGACTCAC TATAGGGCCGAA TCGCCGATCTAC	Für *in vitro* Transkriptionsmatrize; *forward* Primer für die Amplifikation von 718 bp des *R. sphaeroides crtA* Gens*;* enthält die T7 Promotersequenz	(Scheuer et al. 2022)	
Spike-Rs CrtA-Rv	GGGCTTGCCCTT GAAGTT	Für *in vitro* Transkriptionsmatrize; *reverse Primer* für die Amplifikation von 718 bp des *R. sphaeroides crtA* Gens	(Scheuer et al. 2022)	
RsCrtA-qPCR-Fw	CCAGCAGGTTAC CTTCTCGA	*R. sphaeroides crtA* RT-qPCR Analyse, *forward* Primer	(Scheuer et al. 2022)	2,009
RsCrtA-qPCR-Rv	TTGCCCTCCCACT TACCAAT	*R. sphaeroides crtA* RT-qPCR Analyse, *reverse* Primer	(Scheuer et al. 2022)	
Spike T7-RsPufL-Fw	TAATACGACTCAC TATAGGAAACCTG TTCGACTTCTGGG T	Für *in vitro* Transkriptionsmatrize; *forward* Primer für die Amplifikation von 563 bp des *R. sphaeroides pufL* Gens*;* enthält die T7 Promotersequenz	Diese Arbeit	
Spike-RsPufL-Rv	CATTTCCTTGCCC TTCTCGG	Für *in vitro* Transkriptionsmatrize; *reverse Primer* für die Amplifikation von 563 bp des *R. sphaeroides pufL* Gens	Diese Arbeit	
RsPufL-qPCR-Fw	TAAGCTGGGCAT CGGGTA	*R. sphaeroides pufL* RT-qPCR Analyse, *forward* Primer	Diese Arbeit	
RsPufL-qPCR-Rv	ATCATGTGGGCA GGGTTGTA	*R. sphaeroides pufL* RT-qPCR Analyse, *reverse* Primer	Diese Arbeit	2,502
Spike T7-Sso41-Fw	TAATACGACTCAC TATAGGATGATGG AAAGCGAACAGA TGG	Für *in vitro* Transkriptionsmatrize; *forward* Primer für die Amplifikation von 608 bp des *S. solfataricus rrp41* Gens*;* enthält die T7 Promotersequenz	Diese Arbeit	

Spike-Sso41-Rv	GCTTGCCTAAACT CATCTGGT	Für *in vitro* Transkriptionsmatrize; *reverse Primer* für die Amplifikation von 608 bp des *S. solfataricus rrp41* Gens	Diese Arbeit	
Sso41-qPCR-Fw	GCATCCAAGGCA CCTATCTC	*S. solfataricus rrp41* RT-qPCR Analyse, *forward* Primer	Diese Arbeit	2,023
Sso41-qPCR-Rv	GGAGGCGGCCAT TAATGAAA	*S. solfataricus rrp41* RT-qPCR Analyse, *reverse* Primer	Diese Arbeit	
qRT metA-fwd	CAACAAGATCAAG ACCGAGA	*S. meliloti metA* RT-qPCR Analyse, *forward* Primer	(Scheuer et al. 2022)	1,964
qRT metA rev	CAACTCCTTCCAG TAGGTGA	*S. meliloti metA* RT-qPCR Analyse, *reverse* Primer	(Scheuer et al. 2022)	
qRT metZ fwd	ACACCAAGGTCTT CTTCCTC	*S. meliloti metZ* RT-qPCR Analyse, *forward* Primer	(Scheuer et al. 2022)	1,992
qRT metZ rev	CGTCTACCCACT GCTTGTC	*S. meliloti metZ* RT-qPCR Analyse, *reverse* Primer	(Scheuer et al. 2022)	
rpoB-qPCR-Fwd	ATCCTCGACACCT TCTACAC	*S. meliloti rpoB* RT-qPCR Analyse, *forward* Primer	(Baumgardt et al. 2016)	1,987
rpoB-qPCR-Rev	GATAGTTGCCGTA GAGATCG	*S. meliloti rpoB* RT-qPCR Analyse, *reverse* Primer	(Baumgardt et al. 2016)	
qRT-metK-fwd	GATCATCGTCGA CACCTATG	*S. meliloti metK* RT-qPCR Analyse, *forward* Primer	(Scheuer et al. 2022)	2,040
qRT-metK-rev	CCTGATCTTCCGA GACTTTT	*S. meliloti metK* RT-qPCR Analyse, *reverse* Primer	(Scheuer et al. 2022)	
trpE-FW1-qPCR-19	TCCATACCCTCGC GAACTAC	*S. meliloti trpE(G)* RT-qPCR Analyse, *forward* Primer	(Melior et al. 2019)	1,994
trpE-RE1-qPCR-19	CCTTCTTGATCGT CGCCTTG	*S. meliloti trpE(G)* RT-qPCR Analyse, *reverse* Primer	(Melior et al. 2019)	
qRT-RA-fwd	ATCCGTGGTGATT TGGCCG	*S. meliloti metA* Riboswitch enthält sRNA RT-qPCR Analyse, *forward* Primer	(Scheuer et al. 2022)	2,082
qRT-RA-rev	ATTGTTCCCTCGG CCCTTTA	*S. meliloti metA* Riboswitch enthält sRNA RT-qPCR Analyse, *reverse* Primer	(Scheuer et al. 2022)	
qRT-RZ-fwd	ATCCCGTGGTGA TTTGGC	*S. meliloti metZ* Riboswitch enthält sRNA RT-qPCR Analyse, *forward* Primer	(Scheuer et al. 2022)	1,931
qRT-RZ-rev	TGACACCCGGCC TTTTTAGC	*S. meliloti metZ* Riboswitch enthält sRNA RT-qPCR Analyse, *reverse* Primer	(Scheuer et al. 2022)	
qRT-eGFP-Sme-fwd	GGACGACGGCAA CTACAAGA	*egfp* (GC reiche Codons) RT-qPCR Analyse, *forward* Primer	(Scheuer et al. 2022)	2,038
qRT-eGFP-Sme-rev	TTGTACTCCAGCT TGTGCCC	*egfp* (GC reiche Codons) RT-qPCR Analyse, *reverse* Primer	(Scheuer et al. 2022)	
RcsR1-RT-PCR-f	ATGGCAAACACG CAGAACAT	*S. meliloti* rnTrpL RT-qPCR Analyse, *forward* Primer	(Melior et al. 2019)	1,995
RcsR1-RT-PCR-r	AAAGCCGCCTCG AAATCTCC	*S. meliloti* rnTrpL RT-qPCR Analyse, *reverse* Primer	(Melior et al. 2019)	
SMc03772_f	ATGGCACACAAG AAAGCTG	*S. meliloti rpmA* RT-qPCR Analyse, *forward* Primer	(Melior et al. 2021)	1.932

SMc03772_r	GTAAGCGCAAAAATCGTATG	*S. meliloti rpmA* RT-qPCR Analyse, *reverse* Primer	(Melior et al. 2021)
XbaI-metK(CD2)-fwd	GCTCTAGACGCGCAAACTACCTGTTCAC	pKACIT-FLAG-metK Konstruktion. *Forward* Primer für die Amplifikation von 444 bp des *metK* Gens beginnend mit dem zweiten Codon; enthält die XbaI Restriktionsschnittstelle. Wurde zusammen mit dem Primer KpnI-metK-rev verwendet und das Amplikon wurde in pKACIT-FLAG über die Restriktionsschnittstellen XbaI und KpnI kloniert	(Scheuer et al. 2022)
KpnI-metK-rev	GCGGTACCCATAGCCGAACATGATGCCCTG	pKACIT-FLAG-metK Konstruktion. *Reverse* Primer für die Amplifikation von 444 bp des *metK* Gens; enthält die KpnI Restriktionsschnittstelle. Wurde zusammen mit dem Primer XbaI-metK(2CD)-fwd verwendet und das Amplikon wurde in pKACIT-FLAG über die Restriktionsschnittstellen XbaI und KpnI kloniert	(Scheuer et al. 2022)
MSC-pSRK-se	AATTCCTGCAGGGGATCCACTAGTTCTAGAAAGCTTCTG	pRS1 Konstruktion. *Sense* Oligonukleotide wurden für die Primerhybridisierung mit *anitsense* Oligonukleotiden MSC-pSRK-as verwendet. Nach Hybridisierung besitzt die dsDNA NheI and EcoRI Überhänge. Sie wurden genutzt um *lac*-Module in pSRK-Gm durch eine synthetische *Multiple Cloning Site* zu ersetzen, Restriktionsschnittstellen für NheI, HindIII, XbaI, SpeI, BamHI, PstI, und EcoRI.	(Scheuer et al. 2022)
MSC-pSRK-as	CTAGCAGAAGCTTTCTAGAACTAGTGGATCCCCTGCAGG	pRS1 Konstruktion. *Antisense* Oligonukleotide, verwendet für die Primerhybridisierung mit *sense* Oligonukleotiden MSC-pSRK-se	(Scheuer et al. 2022)
Bj-Trrn-Fw-2019	AGGCCTGCCAAGGACAAG	pRS1-T Konstruktion. *Forward* Primer für die Amplifikation der *rrn* Terminatorsequenz aus *B. japonicum* USDA 110, über EcoRI pRS-1 kloniert	(Scheuer et al. 2022)
Bj-Trrn-Rv-2019	CGGAATTCAATTCTTGAAGACCACGGCA	pRS1-T Konstruktion. *Reverse* Primer für die Amplifikation der *rrn* Terminatorsequenz aus *B. japonicum* USDA 110, über EcoRI pRS-1 kloniert	(Scheuer et al. 2022)

XbaI-sSD-egf-fw	AATCTAGATTAAA GAGGAGAAATTAA CTATGGTGAGC	pRS1-SD-egfp Konstruktion. *Forward* Primer für die *egfp* Amplifikation, mit XbaI Restriktionsschnittstelle und Shine-Dalgarno Sequenz	(Scheuer et al. 2022)
BamHI-egfp-rev	AAGGATCCTTACT TGTACAGCTCGTC CATG	pRS1-SD-egfp Konstruktion. *Reverse* Primer für die *egfp* Amplifikation, mit BamHI Restriktionsschnittstelle	(Scheuer et al. 2022)
NheI-P_{metZ}-fwd	ATTGCTAGCAAG GCGAAGATCGAG GCTG	pP_{metZ}-egfp Konstruktion. *Forward* Primer für die Amplifikation der *metZ* Region von -206 (+1 ist die TSS) bis +5; enthält die NheI Restriktionsschnittstelle	(Scheuer et al. 2022)
XbaI-P_{metZ}-rev	TCTAGACGGGAT AAAGCTCCAATAC TGCCTG	pP_{metZ}-egfp Konstruktion. *Reverse* Primer für die Amplifikation der *metZ* Region von -206 (+1 ist die TSS) bis +5; enthält die XbaI Restriktionsschnittstelle	(Scheuer et al. 2022)
NheI-P_{metA}-fwd	AATTGCTAGCGTT TCGGGGATAAGG CAG	pP_{metA}-egfp Konstruktion. *Forward* Primer für die Amplifikation der *metA* Region von -209 (+1 ist die TSS) bis +5; enthält die NheI Restriktionsschnittstelle	(Scheuer et al. 2022)
NheI-$P_{metA150}$-fwd	CTAGCTAGCCAAT CTCCCGCAAGCA GG	p$P_{metA150}$-egfp Konstruktion. *Forward* Primer für die Amplifikation der *metA* Region von -159 (+1 ist die TSS) bis +5; enthält die NheI Restriktionsschnittstelle	Diese Arbeit
NheI-$P_{metA100}$-fwd	CTAGCTAGCCGC TTGCGGGGAGAA GGTC	p$P_{metA100}$-egfp Konstruktion. *Forward* Primer für die Amplifikation der *metA* Region von -102 (+1 ist die TSS) bis +5; enthält die NheI Restriktionsschnittstelle	Diese Arbeit
NheI-P_{metA50}-fwd	CTAGCTAGCCCG TCGAATCCTTTTT CATTGAC	p$P_{metA100}$-egfp Konstruktion. *Forward* Primer für die Amplifikation der *metA* Region von -52 (+1 ist die TSS) bis +5; enthält die NheI Restriktionsschnittstelle	Diese Arbeit
NheI-P_{metA50}-GANTCm1-fwd	CTAGCTAGCCCG TCGTATCCTTTTT CATTGACCGCG	p$P_{metA100}$-egfp Konstruktion. *Forward* Primer für die Amplifikation der *metA* Region von -52 (+1 ist die TSS) bis +5; enthält Mutation A-46T und die NheI Restriktionsschnittstelle	Diese Arbeit
NheI-P_{metA50}-GANTCm2-fwd	CTAGCTAGCCCG TCGATTCCTTTTT CATTGACCGCG	p$P_{metA100}$-egfp Konstruktion. *Forward* Primer für die Amplifikation der *metA* Region von -52 (+1 ist die TSS) bis +5; enthält Mutation A-45T und die NheI Restriktionsschnittstelle	Diese Arbeit
XbaI-P_{metA}-rev	AATCTAGACGGAT CATTTGATAGCGC GAG	pP_{metA}-egfp Konstruktion. *Reverse* Primer für die Amplifikation der *metA* Region von -209/ -159/ -103/ -52 (+1 ist die TSS) bis	(Scheuer et al. 2022)

		+5; enthält die XbaI Restriktionsschnittstelle	
Term-se	CTAGACGAGGAC CGGTCGCGATCG TTTCGCCGCCGG TTTTTT	pTerm-egfp Konstruktion. *Sense* Oligonukleotide wurden für die Primerhybridisierung mit *anitsense* Oligonukleotiden Term-as verwendet. Nach Hybridisierung besitzt die dsDNA XbaI Überhänge, wurden genutzt für die Klonierung über XbaI Restriktionsschnittstellen in pPmetA-egfp.	(Scheuer et al. 2022)
Term-as	CTAGAAAAAACCG GCGGCGAAACGA TCGCGACCGGTC CTCGT	pTerm-egfp Konstruktion. *Antisense* Oligonukleotide wurden für die Primerhybridisierung mit *sense* Oligonukleotiden Term-se verwendet	(Scheuer et al. 2022)
Term-GG106,107CC-se	CTAGACGAGGAC CGGTCGCGATCG TTTCGCCGCCCC TTTTTT	pTerm-M1-egfp Konstruktion. *Sense* Oligonukleotide wurden für die Primerhybridisierung mit *anitsense* Oligonukleotiden Term-GG106,107CC-as verwendet. Nach Hybridisierung besitzt die dsDNA XbaI Überhänge, wurden genutzt für die Klonierung über XbaI Restriktionsschnittstellen in pPmetA-egfp	(Scheuer et al. 2022)
Term-GG106,107CC-as	CTAGAGGAAACC GGCGGCGAAACG ATCGCGACCGGT CCTCGT	pTerm-M1-egfp Konstruktion. *Antisense* Oligonukleotide wurden für die Primerhybridisierung mit *sense* Oligonukleotiden Term-GG106,107CC-se verwendet	(Scheuer et al. 2022)
Term-CC83,84GG-fwd	ACGAGGAGGGGT CGCGATCGTTTC G	pTerm-M1+M2-egfp Konstruktion. *Forward* Primer für die ortsspezifische Mutagenese CC83,84GG	(Scheuer et al. 2022)
Term-CC83,84GG-rev	CGCGACCCCTCC TCGTCTAGACGG ATC	pTerm-M1+M2-egfp Konstruktion. *Reverse* Primer für die ortsspezifische Mutagenese CC83,84GG	(Scheuer et al. 2022)
TSS-AUG1-fwd	GGTGATGAGGGA ACAATGGAT	pAUG1-egfp Konstruktion. *Forward* Primer für inverse PCR von pJET-CD33 um *metA* Δ13-58 Deletion (+1 is the TSS) zu generieren, resultiert in pJET-metA-a::b	(Scheuer et al. 2022)
TSS-AUG1-rev	TCCCTCATCACCA CGGATCATT	pAUG1-egfp Konstruktion. *Reverse* Primer für inverse PCR von pJET-CD33 um *metA* Δ13-58 Deletion (+1 is the TSS) zu generieren, resultiert in pJET-metA-a::b	(Scheuer et al. 2022)
AUG1-egfp-fwd	ATGGATGTGAGC AAGGGCGAGGA	pAUG1-egfp Konstruktion. *Forward* Primer für die *egfp* Amplifikation um	(Scheuer et al. 2022)

		metA'::egfp Fusion zu generieren; enthält die ersten zwei Codons von *metA* (AUG1 wurde als erstes Codon erachtet) fusioniert an das dritte Codon von *egfp.* Wurde mit dem *reverse* Primer PstI_egfp_rev verwendet. Das Amplikon wurde in einer überlappenden PCR mit dem *forward* Primer NheI-PmetA-fwd und dem *reverse* Primer PstI_egfp_rev verwendet.	
AUG1-egfp-rev	TGCTCACATCCAT TGTTCCCTC	pAUG1-egfp Konstruktion. *Reverse* Primer für die *egfp* Amplifikation um *metA'::egfp* Fusion zu generieren; enthält die Δ13-58 Deletion. Der Primer enthält die ersten zwei Codons von *metA* (AUG1 wurde als erstes Codon erachtet) fusioniert an das dritte Codon von *egfp;* wurde verwendet mit dem *forward* Primer NheI-PmetA-fwd. Das Amplikon wurde in einer überlappenden PCR mit dem *forward* Primer NheI-PmetA-fwd und dem *reverse* Primer PstI_egfp_rev verwendet.	(Scheuer et al. 2022)
TSS-AUG2-fwd	GGTGATGAGTGG ACGCCCATG	pAUG2-egfp Konstruktion. *Forward* Primer für inverse PCR von pJET-CD33 um *metA* Δ13-124 Deletion (+1 ist die TSS) zu generieren, resultiert in pJET-metA-a::c	(Scheuer et al. 2022)
TSS-AUG2-rev	CCACTCATCACCA CGGATCATT	pAUG2-egfp Konstruktion. *Reverse* Primer für inverse PCR von pJET-CD33 um *metA* Δ13-124 Deletion (+1 ist die TSS) zu generieren, resultiert in pJET-metA-a::c	(Scheuer et al. 2022)
AUG2-egfp-fwd	GCCCGTGAGCAA GGGCGAGG	pAUG2-egfp Konstruktion. *Forward* Primer für die *egfp* Amplifikation um *metA'::egfp* Fusion zu generieren; enthält AUG2 und die folgenden zwei Codons, fusioniert an das dritte Codon von *egfp*; Wurde mit dem *reverse* Primer PstI_egfp_rev verwendet Das Amplikon wurde in einer überlappenden PCR mit dem *forward* Primer NheI-PmetA-fwd und dem *reverse* Primer PstI_egfp_rev verwendet	(Scheuer et al. 2022)
AUG2-egfp-rev	CTCACGGGCATG GGCGTCCA	pAUG2-egfp Konstruktion. *Reverse* Primer für die Amplifikation der *metA*	(Scheuer et al. 2022)

		Region von pJET-metA-a::c; enthält die Δ13-124 Deletion und AUG2 und die folgenden zwei Codons, fusioniert an das dritte Codon von *egfp*; wurde mit dem *forward* Primer NheI-PmetA-fwd verwendet. Das Amplikon wurde in einer überlappenden PCR mit dem *forward* Primer NheI-PmetA-fwd und dem *reverse* Primer PstI_egfp_rev verwendet	
PstI_egfp_rev	AACTGCAGTTACTTGTACAGCTCGTCCATG	*Reverse* Primer für Amplifikation von *egfp* wurde für die Klonierung in pRS-T oder pP_{sinI}-T verwendet	(Scheuer et al. 2022)
BamHI-egfp(CD3)-fwd	CGGGATCCAGCAAGGGCGAGGAGCTG	pRS-'egfp Konstruktion. *Forward* Primer für die Aamplifikation von *egfp* beginnend mit dem dritten Codon; enthält eine BamHI Restriktionsschnittstelle. Wurde mit dem *reverse* Primer PstI_egfp_rev verwendet	(Scheuer et al. 2022)
BamHI-metA-CD3-rev	CGGGATCCGAAATCCATTGTTCCCTCGGC	pCD3-egfp Konstruktion. *Reverse* Primer enthält eine BamHI Restriktionsschnittstelle, wurde mit dem *forward* Primer NheI-PmetA-fwd verwendet	(Scheuer et al. 2022)
BamHI-metA-CD16-rev	CGGGATCCCAAAAAAACCGGCGGCGA	pCD16-egfp Konstruktion. *Reverse* Primer enthält eine BamHI Restriktionsschnittstelle, wurde mit dem *forward* Primer NheI-PmetA-fwd verwendet	(Scheuer et al. 2022)
BamHI-metA-CD28-rev	CGGGATCCTATCTTGATGGGCATGGGC	pCD28-egfp Konstruktion. *Reverse* Primer enthält eine BamHI Restriktionsschnittstelle, wurde mit dem *forward* Primer NheI-PmetA-fwd verwendet	Diese Arbeit
BamHI-metA-CD36-rev	CGGGATCCTTCGAAGGCGGGCAGCGTATCG	pCD36-egfp Konstruktion. *Reverse* Primer enthält eine BamHI Restriktionsschnittstelle, wurde mit dem *forward* Primer NheI-PmetA-fwd verwendet	Diese Arbeit
BamHI-metA-CD39-rev	CGGGATCCAACGAGAGTTTCGAAGGCG	pCD39-egfp Konstruktion. *Reverse* Primer enthält eine BamHI Restriktionsschnittstelle, wurde mit dem *forward* Primer NheI-PmetA-fwd verwendet	Diese Arbeit
BamHI-metA-CD51-rev	CGGGATCCCGCCTCGGTCTCGGTCATCAG	pCD51-egfp Konstruktion. *Reverse* Primer enthält eine BamHI Restriktionsschnittstelle, wurde mit dem	Diese Arbeit

		forward Primer NheI-PmetA-fwd verwendet	
BamHI-metA-CD33-rev	GCGGATCCGGGCAGCGTATCGGGTATCTTG	pCD33-egfp Konstruktion. *Reverse* Primer enthält eine BamHI Restriktionsschnittstelle, wurde mit dem *forward* Primer NheI-PmetA-fwd verwendet	(Scheuer et al. 2022)
metA-AUG1m-fw	GGGAACATAGGATTTCCGAGGACCGGTC	pCD33-AUG1m-egfp Konstruktion. *Forward* Primer für ortsspezifische Mutagenese AT68,69TA	(Scheuer et al. 2022)
metA-AUG1m-rev	GGAAATCCTATGTTCCCTCGGCCCTTTAG	pCD33-AUG1m-egfp Konstruktion. *Reverse* Primer für ortsspezifische Mutagenese AT68,69TA	(Scheuer et al. 2022)
metA-AUG2m-fw	ACGCCCCTCCCCATCAAGATACCCGAT	pCD33-AUG2m-egfp Konstruktion. *Forward* Primer für ortsspezifische Mutagenese A137C, G139C	(Scheuer et al. 2022)
metA-AUG2m-rev	GATGGGGAGGGGCGTCCACTCGATC	pCD33-AUG2m-egfp Konstruktion. *Reverse* Primer für ortsspezifische Mutagenese A137C, G139C	(Scheuer et al. 2022)
metA-Stopp-fwd	GGTTTTTTTGTAGTCGATCGAGTGGACG	pCD33-Stopp-egfp Konstruktion. *Forward* Primer für ortsspezifische Mutagenese G118U	Diese Arbeit
metA-Stopp-rev	CGTCCACTCGATCGACTACAAAAAAACC	pCD33-Stopp-egfp Konstruktion. *Reverse* Primer für ortsspezifische Mutagenese G118U	Diese Arbeit
metA-SDm-fwd	GCCGATTGAACAATGGATTTCCGAG	pCD33-SDm-egfp Konstruktion. *Forward* Primer für ortsspezifische Mutagenese GG61,62TT	(Scheuer et al. 2022)
metA-SDm-rev	TTGTTCAATCGGCCCTTTAGCGACTT	pCD33-SDm-egfp Konstruktion. *Reverse* Primer für ortsspezifische Mutagenese GG61,62TT	(Scheuer et al. 2022)
metA-SBPm-fwd	TCGCTGGGGGGCCGAGGGAACAAT	pCD33-SBPm-egfp und pRA1-SBPm-egfp Konstruktion. *Forward* Primer für ortsspezifische Mutagenese AAA51,52,53TTT	(Scheuer et al. 2022)
metA-SBPm-rev	TCGGCCCCCCAGCGACTTCTTTAAC	pCD33-SBPm-egfp und pRA1-SBPm-egfp Konstruktion. *Reverse* Primer für ortsspezifische Mutagenese AAA51,52,53TTT	(Scheuer et al. 2022)
metA-M1-fwd	CGCCGCCCCTTTTTTTGTATTCGATCGA	pCD33-M1-egfp Konstruktion *Forward* Primer für ortsspezifische Mutagenese GG106,107CC destabilisiert den transkriptionellen Terminator	(Scheuer et al. 2022)

metA-M1-rev	AAAAAAAGGGGCGGCGAAACGATCGC	pCD33-M1-egfp Konstruktion. *Reverse* Primer für ortsspezifische Mutagenese GG106,107CC destabilisiert den transkriptionellen Terminator	(Scheuer et al. 2022)
HindIII-Bj-Trrn-Fwd	CAGAAGCTTAGGCCTGCCAAGGACAAG	pSRKGm-T Konstruktion. *Forward* Primer für *B. japonicum rrn* Sequenz Amplikon kloniert über HindIII in pSRKGm	Diese Arbeit
HindIII-Bj-Trrn-rev	CCCAAGCTTCAATTCTTGAAGACCACGGC	pSRKGm-T Konstruktion. *Reverse* Primer für *B. japonicum rrn* Sequenz Amplikon kloniert über HindIII in pSRKGm	Diese Arbeit
NdeI-sinRI-fwd	CGCACATATGGCTAATCAACAGGCTGTCCTC	pP_{sinI}-T Konstruktion. *Forward* Primer für die Amplifikation der *S. meliloti sinR* und intergenetischen Region zwischen *sinR* und *sinI,* welche den P_{sinI} enthält; über NdeI und XbaI in pSRKGm-T kloniert	Diese Arbeit
XbaI-sinRI-rev	TTCTAGATAGCGATGCTGTCAGGCTCG	pP_{sinI}-T Konstruktion. *Reverse* Primer für die Amplifikation der *S. meliloti sinR* und intergenetischen Region zwischen *sinR* und *sinI,* welche den P_{sinI} enthält; über NdeI und XbaI in pSRKGm-T kloniert	Diese Arbeit
BamHI-sSD-egfp-fwd	GTGGATCCTTAAAGAGGAGAAATTAACTATGGTGAGCAAGG	pP_{sinI}-egfp Konstruktion. *Forward* Primer für die Amplifikation von *egfp*; enthält eine Shine-Dalgarno Sequenz und BamHI Restriktionsschnittstelle; wurde mit dem *reverse* Primer PstI-egfp-rev verwendet	Diese Arbeit
SpeI-RA1-fwd	GAACTAGTATCCGTGGTGATTTGGCCGG	pRA1-egfp Konstruktion. *Forward* Primer für die Amplifikation der *metA* Sequenz, welche der RA1 Sequenz entspricht; enthält SpeI Restriktionsschnittstelle; wurde mit dem BamHI-stop-RA1-rev verwendet. Das Amplikon wurde zwischen SpeI und BamHI in pP_{sinI}-egfp kloniert	Diese Arbeit
BamHI-stop-RA1-rev	TAAGGATCCCTAAAAAAAACCGGCGGCGA	pRA1-egfp Konstruktion. *Reverse* Primer für die Amplifikation der *metA* Sequenz, welche der RA1 Sequenz entspricht; enthält BamHI Restriktionsschnittstelle; wurde mit dem SpeI-RA1-fwd verwendet. Das Amplikon wurde zwischen SpeI und BamHI in pP_{sinI}-egfp kloniert	Diese Arbeit
BamHI-stop-RA1-M1-rev	TAAGGATCCCTAAAAAAAGGGGCGGCGAAACGATCGCGACC	pRA1-M1-egfp Konstruktion. *Reverse* Primer für die Amplifikation der *metA* Sequenz, welche der RA1 Sequenz entspricht; enthält GG106,107CC Mutation und BamHI Restriktionsschnittstelle; wurde mit dem	Diese Arbeit

		SpeI-RA1-fwd verwendet. Das Amplikon wurde zwischen SpeI und BamHI in pP_{sinI}-egfp kloniert	
EcoRI_del_RA2_up_Fw	AAAGAATTCGCGTTTCGGGGATAAGGCAG	pK18mobsacB-ΔRA Konstruktion. *Forward* Primer für die Amplifikation der stromaufwärts Region, welche die zu deletierende Sequenz flankiert	(Scheuer et al. 2022)
Del_RA2_up_RV	GCCGTCGACGGATCCGAGGCAATCATTTGATAGCGCGAGGAGG	pK18mobsacB-ΔRA Konstruktion. *Reverse* Primer für die Amplifikation der stromaufwärts Region, welche die zu deletierende Sequenz flankiert	(Scheuer et al. 2022)
Del_RA2_dw_Fw	TGCCTCGGATCCGTCGACGGCCGAGGGAACAATGGATTTCCGAGG	pK18mobsacB-ΔRA Konstruktion. *Forward* Primer für Amplifikation der stromabwärts Region, welche die zu deletierende Sequenz flankiert	(Scheuer et al. 2022)
XbaI_del_RA2_dw_Rv	GCTCTAGACTCGGTCTTGATCTTGTTGGGC	pK18mobsacB-ΔRA Konstruktion. *Reverse* Primer für Amplifikation der stromabwärts Region, welche die zu deletierende Sequenz flankiert	(Scheuer et al. 2022)
Contr_del_RA2 Fw	CCTCCTCGCGCTATCAAATGAT	Test-PCR um die Stämme *S. meliloti* 2011 und 2011 ΔRA zu unterscheiden*, forward* Primer	(Scheuer et al. 2022)
Contr_del_RA2_Rv	CCGGTCCTCGGAAATCCAT	Test-PCR um die Stämme *S. meliloti* 2011 und 2011 ΔRA zu unterscheiden*, reverse* Primer	(Scheuer et al. 2022)
pSRK-2017	CAGCAATAGACATAAGCGG	Sequenzierprimer für pSRKGm	(Scheuer et al. 2022)
pRS1-rev	GTTATTGGTGCCCTTAAACGC	Sequenzierprimer für pRS1	(Scheuer et al. 2022)

4.4 Größenstandards

Name	**Hersteller**
GeneRuler 1 kb Plus	Thermo Fischer Scientific
GeneRuler 100 bp Plus	Thermo Fischer Scientific
Prestained Protein Marker	Thermo Fischer Scientific
RiboRuler *Low Range*	Thermo Fischer Scientific

4.5 Molekularbiologische Reagenzien und Kits

Name	**Hersteller**
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	Thermo Fischer Scientific
E.Z.N.A. Gel Extraction Kit	OMEGA
E.Z.N.A. DNA Probe Rurification Kit	OMEGA

Brilliant III Ultra-Fast SYBR®Green RT-QPCR Master Mix	Agilent Technologies
RNeasy® Mini Kit	Qiagen
TURBO DNA-*free*™ Kit	Thermo Fischer Scientific
MEGAscript™ T7 Transription Kits	Thermo Fischer Scientific

4.6 Enzyme

Name	**Hersteller**
Taq DNA-Polymerase	Tim Rick (AG Thormann)
Phusion DNA-Polymerase	Therno Fischer Scientific
Fast*Digest* Restriktionsenzyme	Therno Fischer Scientific
T4-DNA-Ligase	Therno Fischer Scientific
T4-Polynukleotidkinase	Therno Fischer Scientific
RNase A	Thermo Fischer Scientific
Lysozym	Boehringer
RNaseOut	Thermo Fischer Scientific

4.7 Geräte und Ausrüstung

Name	**Hersteller**
Blue Slick™	Serva
Cell density meter (40)	Thermo Fischer Scientific
Elektroblotter, *Perfect Blue ´Semi-dry´ Blotter*	VWR PeqLab
Elektroporationspulser, MicroPulser™	BioRad
ThermoMixer C	eppendorf
Heizblock	VWR PeqLab
Imaging Screen	BioRad
Kühlzentrifuge, Heraeus Fresco 17	Thermo Fischer Scientific
Kühlzentrifuge, Sorvall RC-5C Plus	Thermo Fischer Scientific
Kühlzentrifuge, Sorvall RC-6+	Thermo Fischer Scientific
Mikrotiterplatte (96-well, schwarz, flach)	Greiner
NanoDrop 1000	PeqLab
Nylonmembran, Roti®-Nylon plus, 0,45 µm	Roth
Phosphoimager, *Personal Phospho Imager FX*	BioRad
PCR-*Cycler*, T100™ Thermal *Cycler*	BioRad
PCR Tubes 0,2 ml	VWR PeqLab
Plate Reader Infinite M200	Tecan
Pipetboy2	Integra
Pipetten; 0,1-2 µl; 2-20 µl; 200-1000µl	HTL
Polystyrolküvette 10 x 4 x 45 mm	Sarstedt
Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran	Amersham Bioscence
RT-qPCR-Maschine, CFX *Connect*	BioRad

RT-qPCR Tubes, 0,2 ml *Low Profile Thin-walled 8 Tube Strips*	Thermo Fischer Scientific
RT-qPCR Tubes, *Optical clear flat 8 Cap Strips*	Thermo Fischer Scientific
Röhrchen (12 ml)	Greiner
Rotationsofen, *PerfectBlot*	PeqLab
Rotilabo®-Spritzenfilter, 0,22 µm	Roth
Safelock Eppi, SafeSeal Gefäß 1,5 ml	Sarstedt
Safelock Eppi, SafeSeal Gefäß 2,0 ml	Sarstedt
Schraubröhre (15 ml; 50 ml)	Sarstedt
Screen Eraser K	BioRad
Sonfizierer, Sonoplus	Bandlin
Speedvac, Concentrator plus	Eppendorf
Ultrazentrifuge, Optima™ TLX Ultracentrifuge	Beckman Coulter
UV-Tisch, UVT-20 M/W	Herolab
Vortexer, Vortex Genie 2™	Scientific Industries
Wasserbad	GFL
Whatman Papier	Albet
Zentrifuge, Heraeus Fresco 17 *centrifuge*	Thermo Fischer Scientific

4.8 Antibiotika

Name	**Hersteller**	**Endkonzentration *E. coli* [ug/ml]**	**Endkonzentration *S. meliloti* [ug/ml]**
Ampicillin	Roth	20	-
Streptomycin	Serva	10	25
Gentamycin	Roth	10	10 in Flüssigkulturen 20 in Plattenkulturen
Neomycin	Roth	120	120
Rifampicin	Serva	-	600

4.9 Chemikalien

Chemikalie	**Hersteller**
2-Propanol/ Isopropanol	Roth
Acrylamide 4K-Solution (40 %)	AplliChem
Agarose	Biozym Scientific GmbH
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	AppliChem
Bacto Agar	Roth
Borsäure	Roth
ß-Mercaptoethanol	Roth
Bromphenolblau Natriumsalz	Roth
Calciumchlorid Dihydrat	Roth
Chloroform	Roth
Desoxyribonukleosidtriphosphate	Thermo Scientific

Dithiothreitol (DTT)	Sigma Aldrich
Ethanol (96 %)	Roth
Eisessig	Roth
Ethidiumbromid	Roth
Ethyliendiamin-Tetraessigsäure (EDTA)	Roth
Formaldehyd 37%	Roth
Formamid	Roth
Glycerin	Roth
Harnstoff	Roth
Hefeextrakt	Roth
Isoamylalkohol	Roth
Isoprpyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Roth
Kaliumchlorid	Roth
Magnesiumchlorid	Roth
Methanol	Roth
Methylenblau	Sigma Aldrich
Natriumcholorid	Roth
Paraquat Dichlorid Hydrat	Sigma Aldrich
Phenolwasser	AppliChem
Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1)	AppliChem
RNAprotect Bacteria Reagent	Qiagen
RNase-freies Wasser	Thermo Fischer Scientific
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth
Tris	Roth
TRIzol Reaganz	Ambion
Trypton	Roth

5 Methoden

5.1 Sterilisation

Hitzebeständige Puffer und Lösungen wurden 20 Minuten bei 121°C und 1 bar Überdruck autoklaviert. Hitzeempfindliche Lösungen wurden steril filtriert (0,2 µM Porendurchmesser).

5.2 Kultivierung und Haltung von Bakterienstämmen

S. meliloti wurde semi-aerob (30 ml in 50 ml Erlenmeyerkolben) bei 30°C und 140 rpm in Trypton-Hefeextrakt (TY)- oder in Natriumglutamat-Mannitol-Salz (GMS)-Flüssigmedium kultiviert. Zur Kultivierung des Stammes 2011 *FLAG-metK* wurden 0,1 – 1 mM IPTG und gegebenenfalls 0,2 µM Kristallviolett hinzugegeben. *E. coli* wurde aerob bei 37°C und 180 rpm in Lysogeny Broth (LB)-Flüssigmedium kultiviert. Zur Anzucht auf Agarplatten wurde 1,5% [w/v] Agar dem Medium hinzugefügt. Entsprechende Antibiotika wurden zugegeben, 250 µg/ml Streptomycin, 120 µg/ml Neomycin, 20 µg/ml Gentamycin, 200 µg/ml Ampicillin.

Zur Stammhaltung wurden 3 ml einer Übernachtkultur bei 3.500x g, 10 Minuten zentrifugiert, mit 1 ml Medium gewaschen und in 1,5 ml 25 % [v/v] Glycerol/Mediumlösung aufgenommen und mit flüssigen Stickstoff in einem Kryoröhrchen eingefroren. Gelagert wurden die Glycerolkulturen bei -80°C.

Tabelle 2: Zusammensetzung für 1 l TY-Medium

Trypton	5 g
$CaCl_2$	0,3 g
Hefeextrakt	3 g

Tabelle 3: Zusammensetzung für GMS-Medium

Lösung A	1 l
Lösung E	811 µl
Lösung F	272 µl
Lösung G	10 µl
Lösung H	1 ml
Lösung A (1 l, pH 7)	
Mannitol	10 g
K_2PO_4	5 g
Natriumglutamat	5 g
Lösung B	400 µl
Lösung C	50 µl
Lösung D	500 µl
Lösung B (1l)	
$FeCl_3$ * 6 H_2O	0,125 g
Lösung C (500 ml)	
H_3Bo_3	0,1g
$ZnSO_4$ * 7 H_2O	0,145 g
$CuSO_4$ * 5 H_2O	0,1 g
$CoCl_2$	0,055 g
Na_2MoO_4 * 2 H_2O	0,1 g
Lösung D (50 ml)	
$MnCl_2$ * 4 H_2O	0,149 g
Lösung E (10 ml)	
$MgSO_4$ * 7 H_2O	2,47 g

Lösung F (10 ml)	
$CaCl_2 * 2 H_2O$	1,47 g
Lösung G (10 ml, 0,1 M NaOH)	
Biotin	10 mg
Lösung H (10 ml)	
Thiamin	100 mg

Tabelle 4 Zusammensetzung für 1 l LB-Medium

Trypton	1 % [w/v]
NaCl	1 % [w/v]
Hefeextrakt	0,5 % [w/v]

5.3 Transformation von chemisch kompetenten *E. coli* Zellen

Chemisch kompetente *E. coli* Zellen (DH5α und S17-1) wurden bei -80°C gelagert und für die Transformation auf Eis aufgetaut. Zu 100 µl *E. coli* wurden 1 µl Plasmid (50 – 100 ng) hinzugegeben. Auf Eis wurde der Transformationsansatz für 30 Minuten inkubiert. Nach einem 45-sekündigen Hitzeschock bei 42°C wurde die Suspension für weitere 5 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml LB Medium aufgenommen und regenerierten schüttelnd (180 rpm) für eine Stunde bei 37°C. Zur Selektion wurden die Zellen in verschiedenen Verdünnungen auf entsprechenden antibiotikahaltigen LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

5.4 Konjugation von Plasmiden von *E. coli* in *S. meliloti*

Durch den horizontalen Gentransfer wird eine effiziente Aufnahme von Plasmiden in *S. meliloti* gewährleistet. Über einen bakteriellen Zell-Zellkontakt ermöglicht die Konjugation artübergreifend einen DNA Austausch.

Für die diparentale Konjugation wurde der *E. coli* Stamm S17-1 mit entsprechendem Plasmid verwendet. Dabei wurden einige Kolonien von Platte zu 2 ml einer *S. meliloti* Übernachtkultur zugegeben. Nach dreimaligem Waschen mit TY-Medium (5 Minuten, 3.500x g, RT) wurden die Zellen in 100 µl TY aufgenommen. Der Ansatz wurde auf einen Membranfilter, welcher auf einer TY Agarplatte lag, getropft und wurde mindestens 12 Stunden bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml TY vom Filter in ein Reaktionsgefäß gelöst. In verschiedenen Verdünnungsstufen (meist 10^{-3} und 10^{-4}) wurden die Zellen (in 100 µl) auf

antibiotikahaltigen Selektionsplatten ausplattiert und inkubierten bei 30°C für zwei bis drei Tage. Der Akzeptorstamm, *S. meliloti*, besitzt eine Sm-Resistenz, welche der Donorstamm, *E. coli*, nicht besitzt. Das Plasmid, welches von *E. coli* in *S. meliloti* konjugiert wurde, besaß eine Gm-, Km- oder Nm-Resistenzkassette. Die Selektionplatten enthielten neben Sm auch Gm, Km oder Nm, sodass nur Konjuganten wachsen konnten.

5.5 Konstruktion des Stammes *S. meliloti* 2011 *FLAG-metK*

Das essentielle Gen *metK* codiert die SAM-Synthetase. Für die Generierung des Stammes 2011 *FLAG-metK* wurde das Integrationsplasmid pKACIT-FLAG-metK genutzt. Das Plasmid besitzt einen Kristallviolett-induzierbaren Promotor, welches die Produktion des *lacI* Repressorgens kontrolliert. Außerdem besitzt es einen IPTG-induzierbaren Promotor, eine synthetische Shine-Dalgarno Sequenz und ein *3xFLAG*-Sequenz mit Startcodon. Anschließend im Leserahmen der *3xFLAG* Codons liegt ein Teil der *metK*-Sequenz. Der Abschnitt umfasst 444 bp des codierenden Bereiches von *metK* beginnend mit dem Startcodon (ATG). Nach Konjugation des Plasmides pKACIT-FLAG-metK in *S. meliloti* integrierte das Plasmid über den homologen Bereich von *metK* in das Chromosom (siehe Abb. 12 in Kap. 2.5). Durch die Plasmidintegration wurde die Expression der SAM-Synthetase unter die Kontrolle des IPTG-induzierbaren Promotors gebracht. Dabei wurde auch das Protein, MetK, N-terminal mit einem 3xFLAG markiert. Um die Lebensfähigkeit der Konjuganten mit dem integrierten Plasmid durch die Expression von *3xFLAG-metK* zu gewährleisten, war während der Konjugation 1 mM IPTG im TY-Medium vorhanden.

5.6 Konstruktion des Stammes *S. meliloti* 2011 ΔRA

Um das Aptamer des Riboswitches von *metA* zu deletieren (+3 – 57, +1 ist derTranskriptionsstart (Schlüter et al. 2013)) wurde das Integrationsplasmid pK18mobsacB-ΔRA verwendet. Das Plasmid umfasst Sequenzen, die 213 nt stromaufwärts (A) und 235 nt stromabwärts (B) des zu deletierenden Bereichs identisch sind. Die Abschnitte A und B werden durch eine synthetische Sequenz von 21 nt unterbrochen. Eine Kanamycin- (Km) Kassette ist ebenfalls auf dem Plasmid vorhanden. Durch Konjugation und Selektion auf Platten mit Sm und Km wurde das Plasmid in *S. meliloti* 2011 eingeführt. Die Km resistenten Transkonjuganten wurden erneut auf TY-Agarplatten (+20 µg/ml L-Methionin) mit den Antibiotika Sm und Km ausgestrichen. In diesen Konjuganten hat sich über homologe Rekombination das Plasmid über eine die Sequenzen A oder B, welche im Plasmid und im Chromosom vorkommen, integriert (Crossover). Das Plasmid kann über eine weitere homologe Rekombination wieder aus dem Chromosom entfernt werden (Doppel-Crossover). Dabei entsteht entweder die gewünschte Deletion, oder der Wildtyp (Ausgangsstamm) wird wiederhergestellt. Die homologe Rekombination passiert mit einer bestimmten

Wahrscheinlichkeit. Um Kolonien mit Doppel-Crossover zu selektieren wurden Konjugantenkolonien mit integriertem Plasmid in 100 µl und 1.000 µl 0,9 % [w/v] NaCl-Lösung aufgenommen und 100 µl der Bakteriensuspension wurden auf 10 %-igen Saccharose TY-Agarplatten (+L-Methionin und Sm) ausplattiert. Es ist zu erwarten, dass in diesen Kolonien einige Doppelcrossover-Zellen enthalten sind (Wildtyp oder mit Deletion). Aufgrund des Selektionsdruck der Saccharose (für Bakterien, die *sacB* exprimieren, ist Saccharose tödlich) sollten nach drei Tagen Inkubation Klone ohne Plasmid oder mit Mutation, welche die *sacB* Expression verhindern, sichtbar werden. Diese wurden gepickt und in 50 µl 0,9 % [w/v] NaCl-Lösung resuspendiert. Je 2 µl der Bakteriensuspension wurden auf TY-Platten mit L-Methionin und Sm, und parallel auf TY-Platten, die zusätzlich Km enthielten, getropft. Nach dem Vergleichen der inkubierten Platten wurden die Klone gewählt, die auf Km nicht wachsen konnten, denn diese haben offenbar das Plasmid und somit die Kanamycinresistenz verloren. Um Deletionsmutanten vom Wildtyp zu unterscheiden, wurden *colony* PCR Analysen durchgeführt.

5.7 Bestimmung der Zelldichte

Die Zelldichte einer *S. meliloti* Flüssigkultur (optische Dichte; OD) wurde durch die Lichtstreuung bei einer Wellenlänge von 600 nm photometrisch gemessen. Dabei wurden 1 ml Kultur in eine Küvette gegeben. Bei einer $OD_{600} > 1$ wurde eine 1:10 Verdünnung angefertigt und gemessen.

5.8 Mikroskopie

Um die Längen der Zellen zu bestimmen, wurden 3 µl auf 1 %-ige Agaroseplättchen getropft. Es wurden 350 Zellen analysiert mit Hilfe des Leica DMI600B (Leica) Mikroskops und dem Phasenkontrastobjektiv HCX PL APO 100x/1.4 PH3 (Leica). Ausgewertet wurde mit dem Programm BacStalk (Hartmann et al. 2020).

Die Zellzahl pro ml wurde mit Hilfe einer Neubauer-improved Zählkammer mit einer Kammertiefe von 0,1 mm (Marienfeld Superior) bestimmt. Die Zellen wurden in „Z“-Richtung in vier Quadraten mit einer Fläche von 0,025 mm^2 gezählt. Dabei wurden die rechte und untere Grenzlinie nicht ausgezählt.

5.9 Bestimmung des Nassgewichts

Für die Bestimmung der Zellmasse in einer Bakterienkultur wurden Zellen semiaerob in Voll- bzw. Minimalmedium kultiviert (30°C, 140 rpm). Bei einer OD_{600} von 0,5 wurden 1 ml Kultur für 10 Minuten bei 3.500x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet wurde gewogen.

5.10 RNA Stabilitätsbestimmung

Um die Halbwertszeit einer RNA zu bestimmen, wurde die Neusynthese der RNA mittels Rifampicin (Rif) gestoppt. Das Antibiotikum hemmt die bakterielle DNA-abhängige RNA-Polymerase. Die Rif-Stammlösung (600 mg/ml) wurde frisch am Tag des Versuches in Methanol angesetzt. In einem 500 ml Erlenmeyerkolben mit weitem Hals wurden Zellen in 300 ml Medium bis zur OD_{600} von 0,5 kultiviert. Aliquots von 15 ml wurden vor (t = 0) und nach Zugabe von Rif (0,6 mg/ml finale Konzentration) zu entsprechenden Zeitpunkten in Zentrifugenröhrchen (2/3 mit Eis gefüllt) überführt und auf Eis gehalten. Nach Zentrifugation (10 Minuten, 3.500x g, 4°C) wurde die Gesamt-RNA isoliert und mit RT-qPCR (siehe Kap. 5.31) oder Northern Blot Hybridisierungen (siehe Kap. 5.28) analysiert. Wurden lediglich RT-qPCR Analysen durchgeführt, wurden nur 30 ml Kultur benötigt (in 50 ml Erlenmeyerkolben). Die Zellernte erfolgte mit Hilfe des RNAprotect Bacteria Reagent (Qiagen). Dabei wurden zu 500 µl Reagenz 1 ml Kultur gegeben, geschüttelt und es wurde für 5 Minuten auf Raumtemperatur inkubiert. Die Suspension wurde bei 5.000x g für 10 Minuten zentrifugiert und anschließend wurde die Gesamt-RNA mit Hilfe des RNeas Mini Kits (Qiagen) isoliert.

Die Halbwertszeit wurde mit Hilfe eines semilogarithmischen Diagrammes (RNA Menge in Abhängigkeit von der Zeit) ermittelt. Dabei sollten mindesten drei Punkte in einem linearen Zusammenhang stehen. Die Menge zum Zeitpunkt 0 Minuten (vor Rif-Zugabe) wurde als 100 % definiert und 50 % RNA Menge entsprachen der Halbwertszeit (Zeitpunkt bei dem nur noch die Hälfte der Menge vorhanden ist).

5.11 SAM Depletionstest

Im Stamm 2011 *FLAG-metK* wurde das Plasmid pKACIT-FLAG-metK chromosomal integriert. Hiermit wurde das essentielle Gen *metK*, welches die SAM-Synthetase codiert, unter die Kontrolle eines IPTG-induzierbaren Promotors gebracht und gleichzeitig mit einer *3x-FLAG* Sequenz im Leserahmen fusioniert. Mit Hilfe von IPTG wird die Expression des rekombinanten Gens *3x-FLAG-metK* induziert, indem die Repression durch die Bindung von IPTG an LacI aufgehoben wird. Durch Kristallviolett wird die Expression von *lacI* induziert. Der Repressor, LacI, reprimiert den Promotor für die *3x-FLAG-metK* Expression (Abb. 31).

Im Stamm 2011 *FLAG-metK* wurde die intrazelluläre SAM-Konzentration manipuliert. Für Depletionsassays wurde eine TY-Übernachtkultur mit 1 mM IPTG versetzt. Das IPTG führte zur Expression von *3x-FLAG-metK*. Am folgenden Tag wurde die Kultur in 4 Kolben auf eine OD_{600} von 0,2 verdünnt und mit 0,2 µM (finale Konzentration) Kristallviolett und ohne IPTG oder mit unterschiedlichen IPTG Konzentrationen (0,1; 0,5; 1 mM) kultiviert. Bei einer OD_{600} von 0,5 wurden Proben genommen zur Bestimmung des intrazellulären SAM Gehalts (1 ml) sowie für RNA (15 ml) und Western Blot (2 ml) Analysen.

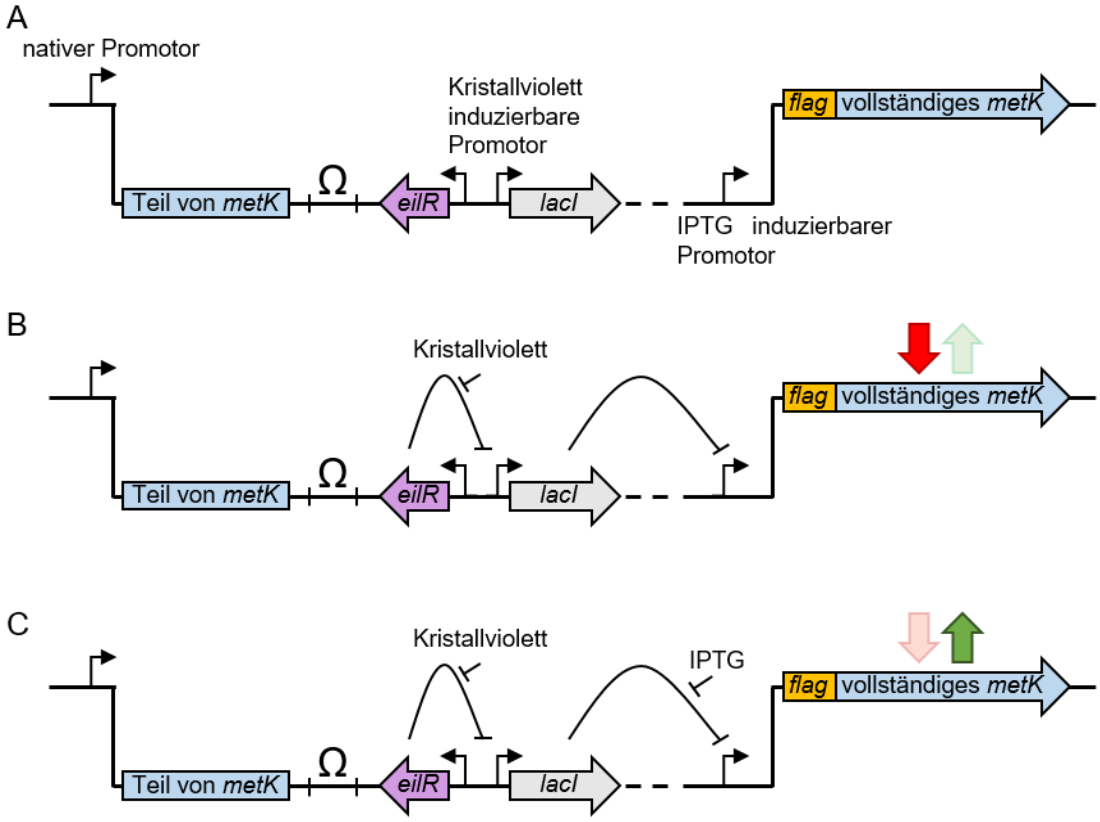

Abbildung 31: Regulation des rekombinaten Gens *metK* im Stamm *Sinorhizobium meliloti* 2011 *FLAG-metK*. Schematische Darstellung des *metK*-Locus im Stamm *S. meliloti* 2011 *FLAG-metK.* **A** Das Plasmid pKACIT-FLAG-metK wurde chromosomal integriert. Der native Promotor von *metK* kontrolliert nur einen Teil des Genes *metK* (die Translriptionstermination wird durch das integrierte Plasmid gewährleistet, als Omega dargestellt). Das vollständige rekombinante Gen wurde mit einer 3x-*FLAG*-kodierenden Sequenz im Leserahmen fusioniert und befindet sich unter der Kontrolle eines IPTG-induzierbaren Promotors (Hybridpromotor, besteht aus *Rhodobacter sphaeroides rrn* Promotor und dem Lac-Operator, an dem LacI binden kann). Die Strichelungen stellen die restlichen Bereiche des Plasmides mit Neomycinkassette dar. **B** Durch die Bindung von Kristallviolett an den Repressor EilR wird die Konformation allosterisch verändert, sodass die Repression aufgehoben wird. Es kommt zur Aktivierung der Promotoren der Gene *eilR* und *lacI.* LacI reprimiert den IPTG-induzierbaren Promotor, wodurch das rekombinante *metK* nicht exprimiert wird. **C** Durch die Bindung von IPTG an LacI kommt es zu einer allosterischen Konformationsänderung von LacI und seine Affinität zum Operator wird aufgehoben. Somit wird FLAG-MetK exprimiert. (Modifiziert nach Jonas Kretz)

5.12 Fluoreszenzmessung

Die Fluoreszenz wurde von *S. meliloti* Stämmen mit *egfp*-enthaltenden Reporterplasmiden gemessen. Dabei wurden 150 µl einer Kultur bei einer OD_{600} von 0,5 in eine schwarze 96-well Mikrotiterplatte (Greiner) transferiert und die Fluoreszenz der Proben (F) und der Leervektor Kontrolle (F0) wurde gemessen (Wellenlängeneinstellung: Extinktion von 488 nm; Emission von 522 nm). Die relative Fluoreszenz wurde auf die gemessene OD_{600} und die Autofluoreszenz der Leervektorkontrolle normalisiert ($\frac{F-F0}{OD600}$). Für alle Messungen wurden drei unabhängige Replikate mit technischen Triplikaten angefertigt.

5.13 Bestimmung des intrazellulären SAM-Niveaus

Das Bridge-IT S-Adenosyl Methionine (SAM) Fluoresecence Assay Kit (Mediomics) wurde verwendet, um das SAM-Niveau von Lysaten zu bestimmen. Mit Hilfe des DNA-bindenden Proteins, MetJ, aus *E. coli* werden unter Anwesenheit von SAM zwei fluoreszenzmarkierte DNA-Fragmente in räumliche Nähe gebracht, sodass eine Fluoreszenzsteigerung messbar wird. Hierfür wurden 1 ml Zellen bei einer OD_{600} von 0,5 für 10 Minuten bei 3.500x g zentrifugiert und zweimal mit 1 ml eiskaltem Wasser gewaschen. Die Bakterienpellets wurden in 40 µl SAM Extraktionspuffer resuspendiert und mit der Assay-Lösung behandelt. Der Reaktionsansatz wurde für 1,5 Stunden bei RT inkubiert. Die Fluoreszenz der Proben (F) und die der Assay-Lösung (F0) wurden gemessen (Wellenlängeneinstellung: Extinktion von 485 nm, Emission von 665 nm). Die relative Fluoreszenz wurde wie folgt berechnet: $\frac{F-\mathrm{F0}}{F0}$. Durch eine Kalibrationskurve (1:2 Verdünnungsreihe mit bekannten SAM-Konzentrationen) konnte der relativen Fluoreszenz eine SAM-Konzentration zugeordnet werden.

5.14 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Es wurde die Absorption bei 260 nm gemessen. Die Werte wurden genutzt, um die Konzentration der Nukleinsäuren zu bestimmen. Dabei entsprachen 50 µg/ml doppelsträngige DNA bzw. 40 µg/ml einzelsträngige RNA einer A_{260} von 1. Die Reinheit der Nukleinsäuren wird über das Verhältnis der Absorptionsquotienten bei 260 nm (DNA) und 280 nm (Protein) bestimmt. Bei reiner DNA beträgt das Verhältnis 1,8 und bei reiner RNA 2,0.

5.15 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Um spezifische DNA-Segmente zu amplifizieren wurde PCR durchgeführt. Dabei wurden zwei verschiedene Polymerasen verwendet. Die Taq DNA Polymerase (Thermo Scientific) wurde zur einfachen Amplifikation genutzt, z.B. um nach DNase Behandlung von isolierter RNA DNA-Rückstände nachzuweisen. Die Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific) wurde verwendet für Amplifikationen, die für Klonierungen eine geringere Fehlerrate erforderten. Die Polymerasen wurden nach entsprechenden Herstellerangaben verwendet. Der Reaktionsansatz wurde auf Eis zusammengestellt. Beim Zusammenstellen des Reaktionsansatzes wurde Wasser vorgelegt. Anschließend Puffer, Primer, dNTPs (auf Eis auftauen), Matrize und als letztes die Polymerase (erst aus dem Freezer holen, wenn alles zusammengestellt worden ist und immer auf Eis oder in einem Kühlakku halten). Dabei ist zu beachten, dass die einzelnen Komponenten durchmischt (nicht vortexen) und kurz abzentrifugiert wurden.

Tabelle 5: Reaktionsansatz für *Taq*-Polymerase

10x *Taq* Puffer	2 µl
dNTPs (10 mM)	0,8 µl
Primer *forward* (10 pmol/µl)	0,8 µl
Primer *reverse* (10 pmol/µl)	0,8 µl
Matrizen-DNA (max. 20 ng)	X µl
Taq DNA Polymerase	0,2 µl
H_2O	auf 20 µl auffüllen

Tabelle 6: PCR Progaramm für *Taq*-Polymerase

1.	95°C	3 min
2.	95°C	30 sec
3.	Tm*-5	30 sec
4.	72°C	1 kb/min
5.	Schritt 2-4, 25 Zyklen	
6.	72°C	5 min
7.	16°C	∞

Tabelle 7: Reaktionsansatz für Phusion DNA-Polymerase

5x GC-Puffer	10 µl
dNTPs (10 mM)	2 µl
Primer *forward* (10 pmol/µl)	2 µl
Primer *reverse* (10 pmol/µl)	2 µl
Matrizen-DNA (max. 20 ng)	X µl
Taq DNA Polymerase	0,5 µl
H_2O	auf 50 µl auffüllen

Tabelle 8: PCR Progaramm für Phusion DNA-Polymerase

1.	98°C	30 sec
2.	98°C	10 sec
3.	Tm*	10 sec
4.	72°C	2 kb/min
5.	Schritt 2-4, 35 Zyklen	
6.	72°C	5 min
7.	16°C	∞

*Tm: Schmelztemperatur (Primer spezifisch)

5.16 Agarosegelelektrophorese

Um DNA Fragmente zu analysieren wurden diese auf ein 1 % Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Dabei wurden 1 % [w/v] Agarose durch Erhitzen in 1x TBE-Puffer gelöst und in einen Schlitten gegossen. Vor dem Laden der DNA-Proben wurden diese mit 0,17x Volumen des 6x DNA-Ladepuffers versetzt. Es wurden 5 µl des Längenstandards aufgetragen (GeneRuler 1 kb plus oder GeneRuler 100 bp plus; Thermo Scientific). Die Gelelktrophorese mithilfe eines Minigels erfolgte in 1x TBE-Puffer bei 100 V für 30 Minuten. Anschließend wurde mit Ethidiumbromid gefärbt.

Tabelle 9: 10x Tris-Borsäure-EDTA- (TBE) Puffer

Tris-HCl	1 M
Borsäure	1 M
Na_2EDTA	0,02 M

Tabelle 10: 6x DNA-Ladepuffer

Glycerin	60 %
Bromphenolpblau	0,1 % [w/v]
Xylenyanol	0,1 % [w/v]

5.17 Ortsspezifische Mutagenese von Plasmid-DNA

Für eine ortsspezifische Mutagenese von Plasmid-DNA wurde eine PCR durchgeführt, um ein lineares Plasmid mit Mutation zu erhalten, welches nach Transformation in *E. coli* in den Zellen ligiert wird. Mit Hilfe von PCR wurde die Sequenz des Plasmids linear mit entsprechender Mutation und überhängenden komplementären Enden amplifiziert. Die Primer, welche für die PCR verwendet wurden, enthielten die Punktmutation und flankierten überlappend die zu mutierende Stelle 8 Nukleotide stromaufwärts und 20 Nukleotide stromabwärts. Um die methylierte Plasmid-DNA (DNA Matrize) zu entfernen wurden 25 µl des PCR Produktes mit 3 µl 10x FastDigest Puffer (Thermo Scientific) und 2 µl FastDigest DpnI (Thermo Scientific) versetzt und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die DpnI Inaktivierung erfolgte bei 80°C für 5 Minuten. Der DpnI-behandelte PCR-Ansatz (30 µl) wurde in DH5α Zellen transformiert. Eine erfolgreiche Punktmutation in den Plasmiden wurde durch Sequenzieren von präparierten Plasmiden überprüft.

5.18 DNA Aufreinigung

Das E.Z.N.A. DNA Probe Purification Kit wurde zur Aufreinigung von PCR-Produkten und geschnittenen Vektoren für anschließende Ligationen verwendet. Das E.Z.N.A. Gel Extraction Kit (Omega Bio-tek, Norcross) wurde zur Aufreinigung von DNA Fragmenten aus einem Agarosegel verwendet. Hierfür wurde das DNA Fragment nach einer Gelelektrophorese unter UV-Licht aus dem Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel herausgeschnitten und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Aufreinigung mit Hilfe der Säule erfolgte nach entsprechenden Herstellerangaben. Für eine optimale Elution wurden das Wasser bei 50°C erhitzt. Es wurden 30 µl H_2O auf die Säule gegeben und für 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz bei max. Geschwindigkeit für 1 Minute zentrifugiert. Das Eluat wurde erneut auf die Säule aufgetragen, 1 Minute inkubiert und erneut zentrifugiert.

5.19 DNA Restriktion

Zur Analyse von Plasmiden oder um DNA Fragmente in einen Vektor zu integrieren wurden Einzel- und Doppelrestriktionen mit FastDigest Restriktionsenzymen (Thermo Scientific) nach Herstellerinformationen verwendet. Dabei wurden Vektor und PCR Produkt mit den gleichen Restriktionsenzymen bei 37°C für 30 Minuten behandelt. Anschließend wurde die Integrität der Plasmid-DNA mittels Elektrophorese in einem 1 % Agarosegel überprüft.

Tabelle 11: Restriktionsansatz für Analyse

10x FastDigest Puffer	2 µl
DNA	500 ng
FastDigest Enzym (10 U/µl)	0,5 µl
H_2O	Auf 20 µl auffüllen

Tabelle 12 Restriktionsansatz für Klonierung

Komponente	**Plasmid DNA**	**PCR Produkt**
10x FastDigest Puffer	4 µl	4 µl
DNA	1,5 – 2 µg	10 µl (≈ 0,2 µg)
FastDigest Enzym (10 U/µl)	2 µl	2 µl
H_2O	Auf 40 µl auffüllen	Auf 40 µl auffüllen

5.20 Hybridisierung von komplementären Oligonukleotiden

Synthetische komplementäre Oligonukleotide wurden hybridisiert indem die Stammlösung der Oligonukleotide (100 mM in 1X TE-Puffer) 1:10 in Oligopuffer verdünnt worden sind. Es wurden 10 µl des jeweiligen Oligonukleotids (A und B) mit 20 µl Oligopuffer gemischt. Der Ansatz wurde für 15 Minuten bei 95°C trinkubiert. Der Heizblock wurde ausgeschaltet, sodass die Reaktion langsam abkühlen konnte. Die hybridisierten Oligonukleotide wurden bei -20°C gelagert oder direkt 1 – 2 µl für die Ligation mit einem Vektor eingesetzt (Kap. 5.21).

Tabelle 13: Oligopuffer, pH 7,5

Tris-HCl	10 mM
EDTA	1 mM
NaCl	50 mM

5.21 DNA Ligation

Für die Ligation eines DNA Fragmentes nach Restriktion in einen Vektor wurde die T4 DNA Ligase (Thermo Scientific) verwendet. Dabei sollte das optimale Verhältnis von Vektor und Insert ca. 1:5 betragen. Die Menge an Vektor-DNA sollte 20 – 100 ng betragen. Um die Menge an Insert zu berechnen wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{Menge Insert ng} = \frac{\text{Menge Vektor (ng)} * \text{Größe Insert (bp)}}{\text{Größe Vektor (bp)}} * 5$$

Der Ligationsansatz wurde entweder für 2 Stunden bei RT oder über Nacht bei 16°C inkubiert und anschließend in chemisch kompetente *E. coli* Zellen transformiert.

Tabelle 14: Ligationsansatz von DNA Fragmenten nach Restriktion

Linearisierte Vektor DNA	20 ng
Insert DNA	X ng
10X T4 DNA Ligase Puffer	2 µl
T4 DNA Ligase (1 U/µl)	1 µl
H_2O	Auf 20 µl auffüllen

PCR-Produkte, die mittels Phusion-Polymerase (Thermo Scientific) generiert worden sind, besitzen *blunt ends* und wurden direkt in pJET2.1 Vektor ligiert (CloneJet^{Tm} PCR Cloning Kit, Thermo Scientific).

Tabelle 15: Ligationsansatz für pJET2.1

2X Reaktionspuffer	5 µl
PCR-Produkt (nicht aufgereinigt)	1 µl
pJET1.2/blunt Clonig Vector (50 ng/µl)	0,5 µl
T4 DNA Ligase (5 U/µl)	0,5 µl
H_2O	Auf 10 µl auffüllen

Der Ligationsansatz wurde für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in chemisch kompetente *E. coli* Zellen transformiert.

5.22 Sequenzierung

PCR-Produkte und Plasmide wurden zusammen in einem Reaktionsgefäß vorbereitet und von Microsynth Seqlab (Göttingen) nach Sanger sequenziert.

Tabelle 16: Sequenzieransatz für Microsynth Seqlab

Matrizen-DNA	Menge/ Konzentration
Plasmid	0,5 – 1 µg pJET
	1,5 – 2 µg pSRK
PCR-Produkt	1,5 ng/µl pro 100 bp
Primer	20 µM

In der Regel: 12 µl Matrizen-DNA + 3 µl Sequenzierprimer

5.23 Isolation von Plasmid DNA aus *E. coli*

Für eine Plasmidpräparation wurden 3 ml einer *E. coli* Übernachtnachtkultur bei 3.500x g für 5 Minuten pelletiert. Die Zellen wurden mit 250 µl Lösung 1 resuspendiert. Nach Zugabe von 250 µl Lösung 2 und vorsichtigem invertieren, inkubierte die Suspension für 5 Minuten bei RT. Anschließend wurden 250 µl Lösung 3 hinzugegeben und bei 14.000x g für 10 Minuten zentrifugiert. Die Plasmid DNA im Überstand wurde abgenommen (möglichst ohne Partikel) und in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und erneut bei 14.000x g für 10 Minuten zentrifugiert. Danach wurde der Überstand zu 0,7-Fachen Volumen Isopropanol gegeben, gemischt und für 10 Minuten zentrifugiert (14.000x g). Das DNA-Pellet wurde mit 1 ml 70% [v/v] Ethanol gewaschen (14.000x g, 5 Minuten). Um die Restflüssigkeit zu entfernen wurde erneut für 1 Minute bei 14.000x g zentrifugiert und der Überstand mit einer gelben Spitze entfernt. Anschließend wurde das Plasmid getrocknet und in 30 µl nukleasefreien Wasser (Roth) aufgenommen.

Tabelle 17: Lösung 1

Tris-HCl; pH 7,5	50 mM
EDTA	10 mM
RNase A	0,1 mg/ml

Tabelle 18: Lösung 2

NaOH	200 mM
SDS	1% [w/v]

Tabelle 19: Lösung 3

Kaliumacetat; pH 5	3 M

5.24 Plasmid Konstruktion

Zur Generierung von Plasmiden wurden Standard Klonierungstechniken verwendet (siehe Kap. 5.19 bis 5.21). Die verwendeten Oligonukleotide (Primer) sind in Kap. 4.3 aufgeführt. Mit Hilfe des CloneJET PCR-Cloning Kit (Thermo Scientific) wurden PCR-Produkte in den Klonierungsvektor pJET1.2/blunt eingebracht. Für die Konjugation in *S. meliloti* wurden die *Inserts* aus pJET über Restriktion und Ligation weiter in die Plasmide pSRKGm (Khan et al. 2008), seinem Derivat pRS1, pKACIT-FLAG oder pK18mobsacB kloniert. Diese Plasmide haben ein breites Wirtsspektrum (*broad host range*) und können sowohl in *E. coli* als auch in *S. meliloti* repliziert werden. Alle konjugierten Plasmide werden in Kap. 4.2 aufgelistet.

Das Plasmid pSRKGm besitzt ein *lac* Promotor System um klonierte Gene zu regulieren. Um das pSRKGm Derivat pRS1 zu generieren, wurden die *lac*-Anteile mittels der Restriktionsendonukleasen NheI und EcoRI mit einem synthetischen Polylinker (*mutliple cloning site*, NheI, HindIII, XbaI, SpeI, BamHI, PstI, EcoRI) ersetzt (Plasmidkarten siehe Anhang Abb. 33 und Abb. 34). Das Plasmid pRS1 besitzt keinen Promotor für klonierte Gene. Über die EcoRI Schnittstelle wurde ein Transkriptionsterminator von dem *rrn* Opoeron aus *B. japonicum* USDA110 (T_{rrn}) in pRS1 kloniert, sodass das Plasmid pRS1-T entsteht.

Das Plasmid pLK64 (McIntosh et al. 2008) besitzt eine für *S. meliloti* angepasste *egfp* Sequenz mit hohem GC-Gehalt. Um die Promotorfusionsplasmide pP_{metZ}-egfp und pP_{metA}-egfp zu generieren, wurde die angepasste *egfp* Sequenz mit einem *forward* Primer amplifiziert, welche eine typische bakterielle Shine-Dalgarno Sequenz besitzt. Durch das Einsetzten des Amplicons in pRS1-T zwischen die XbaI und BamHI Schnittstellen wurde pRS1-SD-egfp konstruiert. Für pP_{metZ}-egfp wurde eine Region stromaufwärts der codierenden Sequenz von *metZ* (-206 bis +5, +1 ist die Transkriptionsstartseite), welche den Promotor enthält, amplifiziert und über die Schnittstellen NheI und XbaI in pRS1-SD-egfp eingebracht. Ähnlich wurde für die Promotorfusionen für *metA* verfahren. Die Bereiche stromaufwärts der codierenden Sequenz von -209 bis +5 (für pP_{metA}-egfp), -159 bis +5 (für p$P_{metA150}$-egfp), -102 bis +5 (für p$P_{metA100}$-egfp) und -52 bis +5 (für pP_{metA50}-egfp) wurden amplifiziert und jeweils zwischen die Schnittstellen NheI und XbaI in pRS1-SD-egfp kloniert. Die Mutationen in pP_{metA50}GANTCm1-

egfp und pP_{metA50}GANTCm2-egfp wurden mittels ortsspezifischer Mutagenese eingeführt (siehe Kap. 5.16).

Für die Konstruktion von pTerm-egfp wurde die Sequenz des Terminators, welche sich zwischen dem AUG1 und AUG2 von *metA* befindet, als synthetische, zueinander komplementäre Oligonukleotide, bestellt (Microsynth). Die Oligonukleotide wurden hybridisiert (siehe Kap. 5.20). Die Oligonukleotide wurden so entworfen, dass die nach der Hybridisierung entstandene dsDNA überstehende, kohäsive Einzelstrangbereiche hat, welche einer XbaI Schnittstelle (T/CTAG) entsprechen, sodass über diese Schnittstelle die Terminatorsequenz in pP_{metA}-egfp eingebracht wurde. Für die Konstruktion von pTerm-M1-egfp wurde ähnlich Verfahren mit synthetischen, zueinander komplementären Oligonukleotide mit Veränderungen in der Terminatorsequenz. Mit Hilfe von ortsspezifischer Mutagenese in pTerm-M1-egfp (siehe Kap. 5.16) wurde pTerm-M1+M2-egfp generiert.

Zur Anfertigung der translationalen Fusionsplasmide wurde das pRS1-T Derivat pRS-'egfp generiert. Dieses besitzt zwischen den Schnittstellen BamHI und PstI eine *egfp* Sequenz vom dritten Codon bis zum Stoppcodon. Auf dessen Grundlage wurden verschieden große, trunkierte translationale metA'::egfp Fusionen konstruiert. Dabei wurden erst die *metA* Regionen von der Position -209 bis zu den ersten 3, 16, 28, 33, 36, 39 und 51 Codons amplifiziert (angenommen AUG1 ist das erste Codon) und in pJET1.2/blunt kloniert. Schließlich wurden die *Inserts* weiter zwischen die Schnittstellen NheI und BamHI von pRS-′egfp kloniert, im Leserahmen von egfp.

Weiterhin wurden mittels ortsspezifischer Mutagenese (siehe Kap. 4.16) des Plasmids pJET-CD33 und anschließender Klonierung der relevanten Abschnitte in pRS-'egfp die Plasmide pCD33-stopp-egfp, pCD33-SDm-egfp, pCD33-SBPm-egfp, pCD33-Δ116-124-egfp, pCD33-Δ124-136-egfp, pCD33-Δ116-136-egfp, pCD33-AUG2-SD1m-egfp, pCD33-AUG2-SD2m-egfp und pCD33-AUG2-SD1+2m-egfp generiert.

Um das Plasmid pAUG1-egfp zu konstruieren wurden mittels inverser PCR die *metA* Bereiche +13 bis +58 aus dem Plasmid pJET-CD33 deletiert. Der verkürzte *metA* Bereich wurde weiterhin amplifiziert. Mit Hilfe einer überlappenden PCR wurde das Amplikon an das dritte Codon von *egfp* fusioniert und zwischen die Schnittstellen NheI und PstI in pRS1-T kloniert. Im Falle das Plasmids pAUG2-egfp wurde der Bereich +13 bis +124 durch inverse PCR deletiert. Ebenfalls wurde der entsprechende *metA* Bereich amplifiziert und an *egfp* fusioniert.

Um das transkriptionelle Fusionsplasmid, pRA1-egfp, und das Kontrollplasmid pP_{sinI}-egfp zu generieren, wurde T_{rrn} in die HindIII Schnittstelle von pSRKGm kloniert. Das resultierende Plasmid pSRKGm-T wurde weiterentwickelt in pP_{sinI} durch integrieren eines Amplikons mit Promotor P_{sinI} zwischen die Schnittstellen NdeI und XbaI. Das Amplikon reicht von der

codierenden Sequenz von *sinR* bis zur intergenischen Region zwischen *sinR* und *sinI*, indem der Promotor positioniert ist. Weiter wurde über die Schnittstellen BamHI und PstI die *egfp* Sequenz mit eigener Shine-Dalgarno Sequenz eingeführt, sodass das Kontrollplasmid pP_{sinI}-egfp entstanden ist. Durch die Integration der entsprechenden *metA* Region mit RA1 in die Schnittstellen SpeI und BamHI wurde das Plasmid pRA1-egfp generiert. Das Überexpressionsplasmid pRA1 wurde konstruiert indem zwischen die Schnittstellen SpeI und BamHI von pP_{sinI} die *metA* Region mit RA1 integriert wurde.

Für die Anfertigung des Integrationsplasmids pKACIT-FLAG-metK wurden ca. 400 bp der *metK* Gens (angefangen vom zweiten Codon) amplifiziert. Über die Schnittstellen XbaI und KpnI wurde das Amplikon in das Plasmid pKACIT-FLAG integriert. Dadurch wurde es stromabwärts und im Leserahmen einer *3xFLAG*-codierenden Sequenz positioniert. Durch die Integration des Plasmids in den *metK* Lokus wurde ein rekombinantes *3XFLAG-metK* Gen generiert. Dieses ist unter der Kontrolle eines IPTG induzierbaren Promotors und codiert ein N-terminales markiertes 3xFLAG-MetK Protein.

Für die chromosomale Deletion des *metA* Riboswitches wurde das Plasmid pK18mobsacB-ΔRA generiert Hierfür wurde eine Region stromaufwärts und eine Region stromabwärts des Riboswitches amplifiziert. Die beiden PCR Produkte wurden weiter über eine überlappende PCR fusioniert und amplifiziert. Das resultierende Amplikon wurde zwischen die Schnittstellen EcoRI und XbaI in pK18mobsacB kloniert. Das Plasmid pK18mobsacB-ΔRA wurde genutzt um die chromosomale *metA* Region von +3 bis +54 zu deletieren. Dabei bleibt die Shine-Dalgarno Sequenz von *metA* erhalten.

5.25 Polyacrylamid-Harnstoff-Gelelektrophorese

Um RNA ihrer Größe nach aufzutrennen wurde eine Polyacrylamid-Harnstoff-Gelelektrophorese durchgeführt. Es wurde ein 10 &iges TBE-Polyacrylamid-Harnstoffgel mit einer Größe von 18 x 18 cm und einer *Spacer* Dicke von 1mm genutzt. Die Glasplatten wurden vor dem Zusammensetzen gründlich mit 70 % Ethanol gereinigt. Die Ohrenplatte wurde silanisiert (BlueSlick; Serva). Die Polymerisation des Gels erfolgte im Liegen für ca. 45 Minuten bei Raumtemperatur. Nach erfolgreicher Polymerisation wird das Gel in eine Gelapperatur eingespannt und mit 1X TBE-Puffer überschichtet. Dabei ist zu achten, dass unten zwischen den Glasplatten keine Luftblasen sind. Die Taschen wurden vor dem Auftragen der RNA gründlich gespült. Die RNA-Proben wurden mit 0,7-fachen Volumen FU-Mix versetzt, für 10 Minuten bei 65°C erhitzt, kurz abzentrifugiert (4°C), auf Eis gestellt und aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt in 1x TBE-Puffer für 4 Stunden bei 300 V. Das Gel wurde entweder mit Ethidiumbromid gefärbt oder weiter zu Northern Blot Analysen verwendet.

Tabelle 20: 10 %iges Polyacrylamid-Urea-Gel (1 mm x 20 cm x 20 cm)

Harnstoff	18,9 g [7 M]
40 % Polyacrylamid	11,25 ml
10x TBE-Puffer	4,5 ml
H_2O	auffüllen auf 45 ml
10 % APS	200 µl
TEMED	20 µl

Tabelle 21: FU-Mix

Harnstoff	6 M
Deionisiertes Formamid	80 % [v/v]
10x TBE-Puffer	10 %
Bromphenolpblau	0,1 % [w/v]
Xylencyanol	0,1 % [w/v]

5.26 T7-*in-vitro* Transkription

Die *in-vitro* Transkription wurde mit Hilfe des MEGAscript™ T7 Transription Kits (Thermo Scientific) durchgeführt. Die rNTPs wurden auf Eis und der 10X Reaktionspuffer bei Raumtemperatur aufgetaut. Die Lösungen wurden gevortext und kurz abzentrifugiert. Der Reaktionsansatz wurde bei Raumtemperatur zusammengesetzt. Dabei wurde der Puffer nach der Zugabe von Wasser und rNTPs hinzugefügt. Als Matrize wurden die aufgereinigten PCR-Produkte der entsprechenden Genbereiche aus *Rhodobacter sphaeroides* (*crtA* und *pufL*) und *Sulfolobus solfataricus* (*rrp41*) verwendet. Dabei wurden 150 ng PCR-Produkt eingesetzt. Zuletzt wurde der Enzym Mix hinzugefügt (Enzym Mix im Kühlakku oder auf Eis). Nach 3 Stunden Inkubation bei 37°C wurde der Ansatz für eine weitere Stunde mit 1 µl TURBO-DNase bei 37°C behandelt. Die RNA-Suspension wurde um ein 10-Faches mit Wasser verdünnt (optional können freie Nukleotide mit Hilfe einer G25-Säule (GE Healthcare) aus dem RNA-Gemisch entfernt werden). Die RNA wurde mit 200 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol 25:24:1 aufgereinigt. Dabei wurde nach Mischen und Zentrifugation bei 17.000x g für 10 Minuten die obere Phase mit 200 µl Chloroform-Isoamylalkohol 24:1 (Roth, Karlsruhe) gemischt und erneut bei 17.000x g für 10 Minuten zentrifugiert. Schließlich wurde der Überstand mit RNA mittels 1/10 des Volumens Natriumacetat (3 M, pH 5,2) und 2,5-fachem Volumen Ethanol (96% [v/v]) für 15 Minuten bei -20°C präzipitiert. Die RNA-Lösung wurde

zentrifugiert (30 Minuten bei 4°C und 17.000x g) und mit 1 ml 75 % Ethanol gewaschen (5 Minuten bei 4°C und 17.000x g), getrocknet (ca. 20 Minuten) und in nukleasefreiem Wasser (Roth) aufgenommen. Die Integrität wurde anhand eines Polyacrylamid-Harnstoff-Gels überprüft.

Tabelle 22: T7-*in-vitro*-Transkriptionsansatz

PCR-Produkt (150 ng)	X µl
10x Reaktionspuffer	2 µl
ATP-, CTP-, GTP-, UTP-Lösung	je 2 µl
Enzym Mix	2 µl
Nuklease freies Wasser	auf 20 µl auffüllen

5.27 RNA-Isolation

Zur Isolation von Gesamt-RNA aus Bakterienzellen wurden in der Regel 15 ml einer *S. melitoti* Kultur (OD_{600} = 0,5) geerntet. Dabei wurde die 30 ml Kultur direkt in Röhrchen mit Eis (das Volumen entspricht ca. 15 ml) überführt und für 10 Minuten bei 3.500x g, 4°C pelletiert. Die Zellen wurden in 1 ml Medium aufgenommen, auf zwei 1,5 ml *Safelock* Eppis verteilt und gewaschen (3.500x g, 4°C für 5 Minuten). Das Zellpellet konnte entweder direkt für die RNA-Isolierung eingesetzt werden oder durch schnelles einfrieren mit flüssigen Stickstoff bei -80°C gelagert werden, um zu einem späteren Zeitpunkt die RNA zu isolieren. Mit Hilfe von TRIzol wurden große RNA Spezies abgereichert und kleinere angereichert (Damm et al. 2015). Mittels heißen Phenols wurde Gesamt-RNA quantitativ isoliert (ohne RNA Spezies besonders an- oder abzureichern). Als weitere Methode wurde zur RNA-Extraktion das RNeasy Mini Kit (Qiagen) verwendet.

5.26.1 RNA-Isolation mittels TRIZol (modifizierte TRIZol Prozedur)

Das Zellpellet wurde mit 1 ml TRIzol®-Reagenz (Thermo Scientific) resuspendiert und 1 µl (1ng/µl) *spike in* RNA (*in vitro* Transkript) von *R. sphaeroides* wurden hinzugegeben. Die Proben inkubierten für 10 Minuten bei 65°C und 1.200 rpm in einem Thermoblock (Eppendorf, ThermoMixer C). Anschließend wurden 200 µl Chloroform hinzugegeben und nach dem Mischen bis zur milchigen Trübung 3 Minuten bei RT inkubiert. Zur Phasentrennung wurden die Proben für 20 Minuten bei 12.000x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde zu 500 µl Isopropanol transferiert und invertiert. Die präzipitierte RNA wurde für 25 Minuten bei 4°C und 14.000x g abzentrifugiert. Das RNA-Pellet wurde mit 1 ml 75% [v/v] Ethanol gewaschen und zentrifugiert (14.000x g, 5 Minuten). Nach Abnahme des Überstands, um die Restflüssigkeit

zu entfernen, wurde erneut kurz abzentrifugiert und mit einer gelben Spitze der restliche Überstand entfernt. Nach kurzem Trocknen des Pellets, ca. 5 Minuten (geöffnetes Reaktionsgefäß unter dem Abzug), wurde die RNA in 300 µl nukleasefreiem eiskalten Wasser (Roth) aufgenommen. Um restliche RNasen zu entfernen, wurde 300 µl heiße Phenol-Wasser-Lösung (65°C) hinzugegeben und bei 65°C für 5 Minuten mit gelegentlichem vortexen oder in einem Thermoblock bei 1.200 rpm inkubiert. Zur Phasentrennung wurden die Proben bei 17.000x g für 10 Minuten bei RT zentrifugiert. Die obere wässrige Phase (270 µl) wurde mit 270 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (PCI) 25:24:1 gemischt und bei 17.000x g für 10 Minuten bei RT zentrifugiert. Anschließend wurde die obere Phase (250 µl) mit 250 µl Chloroform-Isoamylalkohol (CI) 24:1 ausgeschüttelt und erneut zentrifugiert (17.000x g; 10 Minuten; RT). 200 µl der RNA-enthaltenden wässrigen Phase wurden mit 1/10 des Volumens (20 µl) Natriumacetat (3 M, pH 5,2) und 2,5-fache Volumen (500 µl) Ethanol (96% [v/v]) versetzt. Die RNA wurde über Nacht bei -20°C oder für 5 Minuten in flüssigem Stickstoff präzipitiert. Anschließend wurde die Probe für 30 Minuten bei 4°C und 17.000x g zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 1 ml 75% Ethanol gewaschen. Die Restflüssigkeit wurde entfernt, indem nach erneutem kurzem Zentrifugieren mit einer gelben Spitze der Überstand abgenommen wurde. Das RNA-Pellet wurde getrocknet (ca. 15 – 20 Minuten). Schließlich wurde die RNA in 50 µl eiskaltem nukleasefreiem Wasser (Roth) aufgenommen.

5.26.2 RNA-Isolation mittels heißen Phenols

Um die Abundanz von sRNA und mRNA miteinander vergleichen zu können, wurde die Gesamt-RNA mit der heißem Phenol Methode isoliert. Dabei wurde das Zellpellet in 200 µl Resuspensionslösung aufgenommen. Nach Zugabe von 200 µl Lysis-Lösung wurde der Ansatz für 90 Sekunden bei 65°C inkubiert. Darauffolgend wurden 400 µl heiße Phenol-Wasser-Lösung (65°C) hinzugegeben, stark gemischt und erneut bei 65°C für 3 Minuten inkubiert. Die Proben wurden in Flüssigstickstoff gefroren (*Safelock*-Eppi nutzen) und anschließend für 15 Minuten bei 17.000x g zentrifugiert (Eppi muss vor dem Zentrifugieren antauen). Die obere Phase wurde abgenommen und es wurde fortgefahren mit PCI- und CI-Extraktion wie zuvor beschrieben (Kap. 5.26.1).

Tabelle 23: Resuspensionslösung

Saccharose	0,3 M
NaOAc (pH 4,5)	0,01 M

Tabelle 24: Lysis-Lösung

SDS	2%
NaOAc (pH 4,5)	0,01 M

5.26.4 RNA Isolation mittels RNeasy Mini Kits (Qiagen)

Für die Bestimmung der Halbwertszeiten der *egfp* mRNA in den Stämmen, welche die Plasmide pP$_{metA}$-egfp, pCD33-egfp, oder pCD33-SBPm-egfp besitzen, wurde die RNA mithilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben isoliert. Für die Zellernte wurden 500 µl Zellkultur mit 1 ml RNAprotect Bacteria Reagent (Qiagen) vermischt. Nach 5 Minuten Inkubation auf Raumtemperatur wurde die Suspension bei 5.000x g für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 100 µl TE-Puffer (versetzt mit 1 mg/ml Lysozym) aufgenommen. Während der 10-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde alle 2 Minuten für ca. 10 Sekunden das Gemisch gevortext. Danach wurden 350 µl RLT-Puffer (versetzt mit 10 µl/ml β-Mercaptoenthanol) hinzugefügt und gevortext. Nach Zugabe von 250 µl 96 % Ethanol wurde die Suspension mit Hilfe einer Pipette durchmischt und 700 µl wurden auf die RNeasy Mini spin Säule geladen. Es wurde für 15 Sekunden bei 8.000x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Die Säule wurde gewaschen, zunächst mit 700 µl RW1-Puffer und daraufhin mit 500 µl RPE-Puffer (jeweils für 15 Sekunden bei 8.000x g). Anschließend wurden erneut 500 µl RPE-Puffer aufgetragen und für 2 Minuten bei 8.000x g gewaschen. Die Säule wurde getrocknet, indem für 1 Minute bei 17.000x g zentrifugiert wurde. Zur Elution der RNA wurde 20 µl nukleasefreies Wasser (Roth) aufgetragen und für 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich wurde bei 8.000x g für 1 Minute zentrifugiert. Der Schritt wurde mit frischen 20 µl nukleasefreiem Wasser (Roth) wiederholt.

Tabelle 25: TE-Puffer

Tris-HCl (pH 8)	10 mM
EDTA (pH 8)	1 mM

5.27 DNase Verdau

Für RT-qPCR Analysen muss überschüssige DNA aus RNA-Proben entfernt werden. Dabei wurden 10 µg RNA mit 1 µl TURBO^{Tm} DNase (Thermo Scientific) für 30 – 60 Minuten bei 37°C behandelt. Anschließend wurde der Verdau kurz abzentrifugiert und 5 µl des 10X Inaktivierungsreagenz (Thermo Scientific) wurden hinzugefügt. Nach dem Mischen wurde der Ansatz für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und für 2 Minuten bei 17.000x g zentrifugiert, sodass die Kügelchen des Inaktivierungsreagenz sich absetzen. Der Überstand mit der DNA-freien RNA wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Reaktion wurde auch inaktiviert, indem 15 mM EDTA (finale Konzentration) hinzugegeben wurden und für 10 Minuten bei 75°C inkubiert wurde. Anschließend wurde die RNA-Lösung auf 200 µl verdünnt und mit 1/10 Volumen Natriumacetat (3 M, pH 5,2) und 2,5-fache Volumen 96 % Ethanol (-

20°C) gefällt. Der Erfolg der Behandlung wurde mit Hilfe von PCR und *rpoB*-spezifischen Primern überprüft.

Anmerkung zum Inaktivierungsreagenz:

Das Inaktivierungsreagenz enthält Kügelchen in einer Flüssigkeit. Es ist zu beachten, dass vor dem Nutzen gründlich gevortext und kurz wieder abzentrifugiert wurde. Nach mehrmaligem Benutzen des Inaktivierungsreagenz sinkt der Flüssigkeitsspiegel, sodass das Pipettieren nicht mehr möglich ist. In diesem Fall sollte ca. 20 – 25 % des verbleibenden Volumens nukleasefreies Wasser (Roth) hinzugefügt und gevortext werden, um ein pipettierbares Gemisch zu erhalten.

Tabelle 26: DNase Reaktionsansatz

10X TURBO^{Tm} DNase Puffer	5 µl
RNA (10 µg)	X µl
TURBO^{Tm} DNase (2 U/µl)	1 µl
H_2O	Auf 50 µl auffüllen

5.28 Northern Blot Hybridisierung

Um die Abundanz von sRNAs zu analysieren, wurden Northern Blot Hybridisierungen durchgeführt. Dabei wurden 10 µg RNA mittels einer drei- bis vierstündigen Elektrophorese über ein 10% Polyacrylamid-Harnstoff-Gel aufgetrennt (siehe Kap. 5.25). Die RNA wurde auf eine positiv geladene Nylonmembran transferiert. Hierfür wurden sechs Whatmanpaper und eine Nylonmembran auf die Größe des Gels zurechtgeschnitten und in 1X TBE-Puffer getränkt. Drei Whatmanpaper wurden auf die Anodenseite des Semi-Dry Blotters gelegt. Auf die Whatmanpaper wurde die Membran gelegt. Nach der Elektrophorese wurde das zurechtgeschnittene Gel auf die Nylonmembran gelegt. Um das Gel sicher anzuheben, hilft es, die Handschuhe und das Gel selbst mit Puffer zu benässen. Auf das Gel wurden drei weitere Whatmanpaper gelegt. Der Transfer der RNA erfolgte für 1,5 – 2 Stunden bei 250 mA. Die RNA wurde durch UV-Licht (2x Autocrosslink) an die Membran gebunden. Anschließend wurde die Membran für 2 Stunden bei 56°C mit Prähybridisierungslösung in einem Hybridisierungsrohr rotierend inkubiert. 5 µl radioaktivmarkierte Oligonukleotide in einem Schraubröhrchen mit 400 µl Lachs-DNA-Sperma (LSD) wurden für 10 Minuten bei 95°C inkubiert. Während des kurzen Abkühlens der Sonde wurde die Prähybridisierungslösung mit Hybridisierungslösung ausgetauscht und die Sonde wurde in das Hybridisierungsrohr gegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht (mind. 8 Stunden). Nach der Inkubation der Membran mit Hybridisierungslösung wurde die Lösung mit der Sonde in einem dafür

geeigneten Radioaktivmüll-Kanister entsorgt. Die Membran wurde erst einmal im Rohr mit Waschlösung gewaschen und danach in einen Behälter transferiert. Durch ein etwa 30-sekündiges Schwenken der Membran in einem Behälter mit Waschlösung(3x frisch hinzugeben) wurde überschüssige, ungebundene Sonde entfernt. Die Membran wurde für kurze Zeit zwischen Küchentüchern getrocknet und anschließend in eine Folie eingeschweißt. In der Regel wurde die Membran über Nacht exponiert (*imaging screen*). Bei einer Hybridisierung mit der 5S rRNA reichte eine Exposition von ca. 2 Stunden. Die Signale wurden mit Hilfe eines BioRad Molecular Imager® detektiert. Zur Quantifizierung wurde das Programm Quantity One (BioRad) verwendet. Dabei wurden die Intensitäten der sRNA Signale auf die Intensität der 5S rRNA normalisiert. Um die Membran erneut zu hybridisieren, wurde die radioaktiv-markierte Sonde durch Erhitzen der Membran in 0,1% SDS [w/v] für 20 min bei 96°C schwenkend gelöst.

Tabelle 27: SSC-Lösung (20x)

Natriumchlorid	3 M
Natriumcitrat	300 mM
Nukleasefreies Wasser, pH 7	ad 1 l

Tabelle 28: Prähybridisierungslösung

20x SSC	6 ml
50x Denhardt's Reagenz	1 ml
10 % SDS [w/v]	1 ml
Lachs-Sperma-DNA	400 µl
H_2O	11,6 ml

Tabelle 29: Hybridisierungslösung

20x SSC	6 ml
10% SDS [w/v]	1 ml
Lachs-Sperma-DNA (LSD)	400 µl
ddH_2O	12,6 ml

Tabelle 30: Waschlösung

20x SSC	250 ml
10 % SDS [w/v]	1 ml
ddH_2O	ad 1 l

5.29 Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden

Durch die T4-Polynkleotid-Kinase (PNK; NEB) wurden Oligonukleotide am 5'-Ende mittels γ-[^{32}P]-Adenosin-5'-Triphosphat (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml) markiert. Nach einer Stunde Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion mit 40 µl STE-Puffer gestoppt. Ungebundene Nukleotide wurden über eine G25-Säule (GE Healthcare) nach Herstellerangaben entfernt. Dabei wurde die Säule gevortext und der Deckel etwas aufgeschraubt, während die untere Kappe entfernt wurde. Um den Lagerungspuffer zu entfernen, wurde die Säule zusammen mit dem Durchflussröhrchen für 1 Minuten bei 1.000x g zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule auf ein neues Reaktionsgefäß gesetzt und die radioaktivmarkierten Oligonukleotide wurden auf die Säule geladen. Nach Zentrifugation bei 1.000x g für 2 Minuten befanden sich die Oligonukleotide im Reaktionsgefäß und wurden bei -20°C gelagert.

Tabelle 31: Markierungsreaktion

H_2O	2 µl
Oligonukleotid (10 pmol/µl)	3 µl
10x PNK-Puffer (A)	1 µl
PNK (5 U)	1 µl
γ-[^{32}P]-Adenosintriphosphat	3 µl (30 µCi)

Tabelle 32: Natriumchlorid-Tris-EDTA (STE) Puffer

Tris-HCl, pH 8	10 mM
NaCl	0,1 M
EDTA	2 M

5.30 Bestimmung von sRNA Größen

Um die Länge einer sRNA zu bestimmen wurden Northern Blot Hybridisierungen durchgeführt. Nach Hybridisierung der zu untersuchenden sRNA wurde die Membran nacheinander mit Sonden für die $tRNA^{Thr}$ (76 nt), 6S RNA (159 nt) und 5S rRNA (115 nt) rehybridisiert. Die

Laufdistanz aller sRNAs wurde gemessen. Die Laufdistanz wurde in Abhängigkeit zur Größe gesetzt und als halblogarithmischen Graph dargestellt. Somit konnte die Länge der zu untersuchenden sRNA ermittelt werden.

5.31 Echtzeit (*real time*) Quantitative PCR (RT-qPCR)

Um die Gleichgewichtsmenge von RNAs zu bestimmen, wurde das Brilliant III Ultra Fast SYBR® Green RT-QPCR Kit (Agilent) verwendet. Die dNTPs und der 2X SYBR Green QPCR Mastermix aus dem Kit wurden auf Eis aufgetaut. Auf Eis wurden die Lösungen ohne RNA in einem Reaktionsgefäß als Reaktions-Mastermix gemischt und kurz abzentrifugiert. Dieser wurde auf die PCR-Reaktionsgefäße verteilt und 2 µl RNA (20 ng/µl) wurden an den oberen Rand der Gefäße pipettiert. Nachdem die Deckel auf die Reaktionsgefäße gesetzt wurden, wurden diese abzentrifugiert. Es wurden *one-step* RT-qPCR Analysen, bei dem beide Primer gleichzeitig vor der cDNA Synthese zur Reaktion gegeben werden, und *two-step* RT-qPCR Analysen durchgeführt. Bei den Letzteren wurde erst der Primer, der nötig ist für die cDNA Synthese ist, zum Reaktions-Mastermix hinzugegeben. Nach erfolgreicher cDNA Synthese und Inaktivierung der reversen Transkriptase für 3 min bei 95°C wurden die Proben auf 4°C heruntergekühlt und der zweite Primer hinzugegeben. Mit Erhitzen der Proben auf 95°C für 1 Minute wurde die qPCR gestartet. Für die Analysen wurde ein spektrofluorometrischer Thermozykler verwendet. Der Quantifizierungszyklus (Cq) wurde an das Maximum der Amplifikationskurve gesetzt. Für die Ermittlung der RNA Niveaus wurde als Referenz eine externe *spike-in* Kontroll-RNA, Rs*crtA*, hinzugezogen. Mit Hilfe der Pfaffl-Formel und den normalisierten Cq-Werten wurden Unterschiede in den Transkriptmengen bestimmt (Pfaffl 2001).

$$\log 2 \text{ fold change} = \log 2 \left(\frac{E_{\text{Ziel}}^{\Delta Cq_{\text{Ziel (Kontrolle-Probe)}}}}{E_{\text{Referenz}}^{\Delta Cq_{\text{Referenz (Kontrolle-Probe)}}}}\right)$$

Formel: Pfaffl-Formel zur Errechnung der logarithmierten Transkriptmengenänderung. E ist die Primereffizienz. Ziel bezieht sich auf die zu untersuchende RNA und Referenz auf Rs*crtA.* In dieser Arbeit wurden zwei Wachstumsbedingungen miteinander verglichen, dabei entspricht die Kontrolle der RNA aus GMS-Kulturen Probe der RNA aus TY-Kulturen. Beim Vergleich von Wildtyp und Mutante entspricht die Kontrolle dem Wildtypen und die Probe der Mutante (siehe Bsp. Abb. 23D, Ergebnisse).

Dabei wurden die entsprechenden Primereffizienzen berücksichtigt. Diese wurden ermittelt durch RT-qPCR Analysen einer zweifachen Verdünnungsreihe von Gesamt-RNA (80 – 2,5 ng/ml). Von jeder Verdünnung wurden 2 µl in den Reaktionsansatz eingesetzt.

Tabelle 33: *One-step* RT-qPCR Reaktionsansatz

H_2O	0,4 µl
2X SYBR Green QPCR Mastermix	5 µl
Primer *forward* (10 pmol/µl)	1 µl
Primer *reverse* (10 pmol/µl)	1 µl
DTT (100 mM)	0,1 µl
RT/RNase Block	0,5 µl
RNA (20 ng/µl)	2 µl

Tabelle 34: *One-step* RT-qPCR Programm

1.	50°C	10 min	
2.	95°C	3 min	
3.	94°C	5 sec	
4.	56°C	5 sec	
5.	60°C	5 sec	+ Plattenlesen
6.	Schritt 3-5, 39 Zyklen		
7.	95°C	10 sec	
8.	Schmelzkurve von 65°C bis 95°C, Steigerung von 0,5°C für 5 sec + Plattenlesen		

Tabelle 35: *Two-step* RT-qPCR Reaktionsansatz

H_2O	0,4 µl
2x Mastermix	5 µl
Primer *forward* (10 pmol/µl)	1 µl
DTT (100 mM)	0,1 µl
RT/RNase Block	0,5 µl
RNA (20 ng/µl)	2 µl

Tabelle 36: *Two-step* RT-qPCR Programm

1.	50°C	10 min
2.	95°C	3 min
3.	4°C	Primer *reverse* hinzugeben
4.	95°C	1 min
5.	94°C	5 sec
6.	56°C	5 sec
7.	60°C	5 sec + Plattenlesen
8.	Schritt 5-7, 39 Zyklen	
9.	95°C	10 sec
10.	Schmelzkurve von 65°C bis 95°C, Steigerung von 0,5°C für 5 sec + Plattenlesen	

5.32 Bestimmung des relativen Verhältnisses Ribosomen-gebundener und -nicht-gebundener RNA

Der Stamm *S. meliloti* 2011 mit dem Plasmid pCD33-egfp bzw. pCD33-SBPm-egfp wurde bis zu einer OD_{600} von 0,5 in TY kultiviert. Zur schnellen Abkühlung der Kultur wurden die 300 ml Zellsuspension in einen vorgekühlten, im Eiswasser stehenden 1 l Kolben überführt und für 3 Minuten vorsichtig schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde bei 3.500x g für 10 Minuten und 4°C zentrifugiert. Die Zellen wurden in 10 ml kalten *high magnesium* Puffer (Tab. 36) resuspendiert, in zwei Portionen auf vorgekühlte 12 ml Röhrchen geteilt, und erneut bei 3.500x g für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert (für die 12 ml Greiner-Röhrchen gibt es Aufsätze für die Sorvall RC6+ Zentrifuge). Die Zellpellts wurden mit Flüssigstickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Zur Lyse mit Ultraschall (50% Intensität, 50% Pause, 3 x 30 sec Zyklen) wurde das Zellpellet (entspricht 150 ml TY-Kultur) in 1,8 ml kalten *high magnesium* Puffer aufgenommen. Das Lysat wurde bei 10.000x g und 4°C für 10 Minuten geklärt und schließlich für 1 Stunde bei 1000.000x g und 4°C ultrazentrifugiert. Es wurden die oberen Zweidrittel des Überstandes (1,2 ml) abgenommen (S100) und auf zwei 1,5 ml Reaktionsgefäße geteilt. Das untere Drittel wurde verworfen, um eine Vermischung der S100 und P100 Fraktionen zu vermeiden. Das Pellet (P100) wurde mit 300 µl *high magnesium* Puffer resuspendiert. Die RNA aus S100 (aufgeteilt auf zwei Reaktionsgefäße) und P100 wurde mittels der heißen Phenol Methode (Kap. 5.27.2) isoliert. Das RNA-Pellet aus den Fraktionen S100 und P100 wurden in 100 µl

bzw.150 µl nukleasefreiem Wasser (Roth) aufgenommen. Es wurden jeweils 10 µl RNA mit 1 µl RS*crtA spike-in* Transkript [1ng/µl) versetzt und mit DNase (Kap. 5.28) behandelt.

Es wurde die dynamische Detektionsbreite der RT-qPCR Reaktion und das lineare Verhältnis zwischen der *egfp* Matrize und den Cq Werten von S100 und P100 überprüft (siehe Anhang Tabelle 48). Hierfür wurde die RNA-Konzentration der S100-Probe gemessen (siehe Kap. 5.13). Die Probe wurde auf eine Konzentration von 40 ng/µl verdünnt und eine 1:2 Verdünnungsreihe (40, 20, 10 ng/µl) angefertigt. Die P100-Probe wurde volumengleich behandelt, unabhängig der RNA-Konzentration (Abb. 32A).

In einem parallelen Ansatz wurde die RNA-Konzentration der P100-Probe gemessen (siehe Kap. 5.13), eine Verdünnung auf 40 ng/µl durchgeführt und von der so verdünnten Probe eine 1:2 Verdünnungsreihe (40 – 10 ng/µl) angefertigt. In diesem Parallelversuch wurde die S100-Probe volumengleich behandelt, unabhängig der RNA-Konzentration (Abb. 32B).

Die Verdünnungsansätze wurden mittels RT-qPCR analysiert. Das Beispiel im Anhang (Tabelle 48) zeigt, dass bei der in Abb. 32A dargestellte Vorgehensweise die P100-Verdünnungen ungeeignet für die qRT-PCR Analyse waren, da kein lineares Verhältnis zwischen *egfp* mRNA-Menge und Cq bestand. Im Gegensatz dazu waren bei der in Abb. 32B dargestellte Vorgehensweise die P100- und die S100- Verdünnungen geeignet für die qRT-PCR Analyse. Für die Bestimmung der relativen Verhältnisse der RNA Abundanz in den S100 und P100 Fraktionen wurden 40 ng/µl RNA der P100 Fraktion und die entsprechende volumengleiche Verdünnung der S100 Fraktion in der RT-qPCR Analyse eingesetzt (Abb. 32B), da hier für beide Verdünnungen ein lineares Verhältnis zwischen Menge und Cq besteht. Dabei wurde Rs*crtA* als externe Kontrolle verwendet.

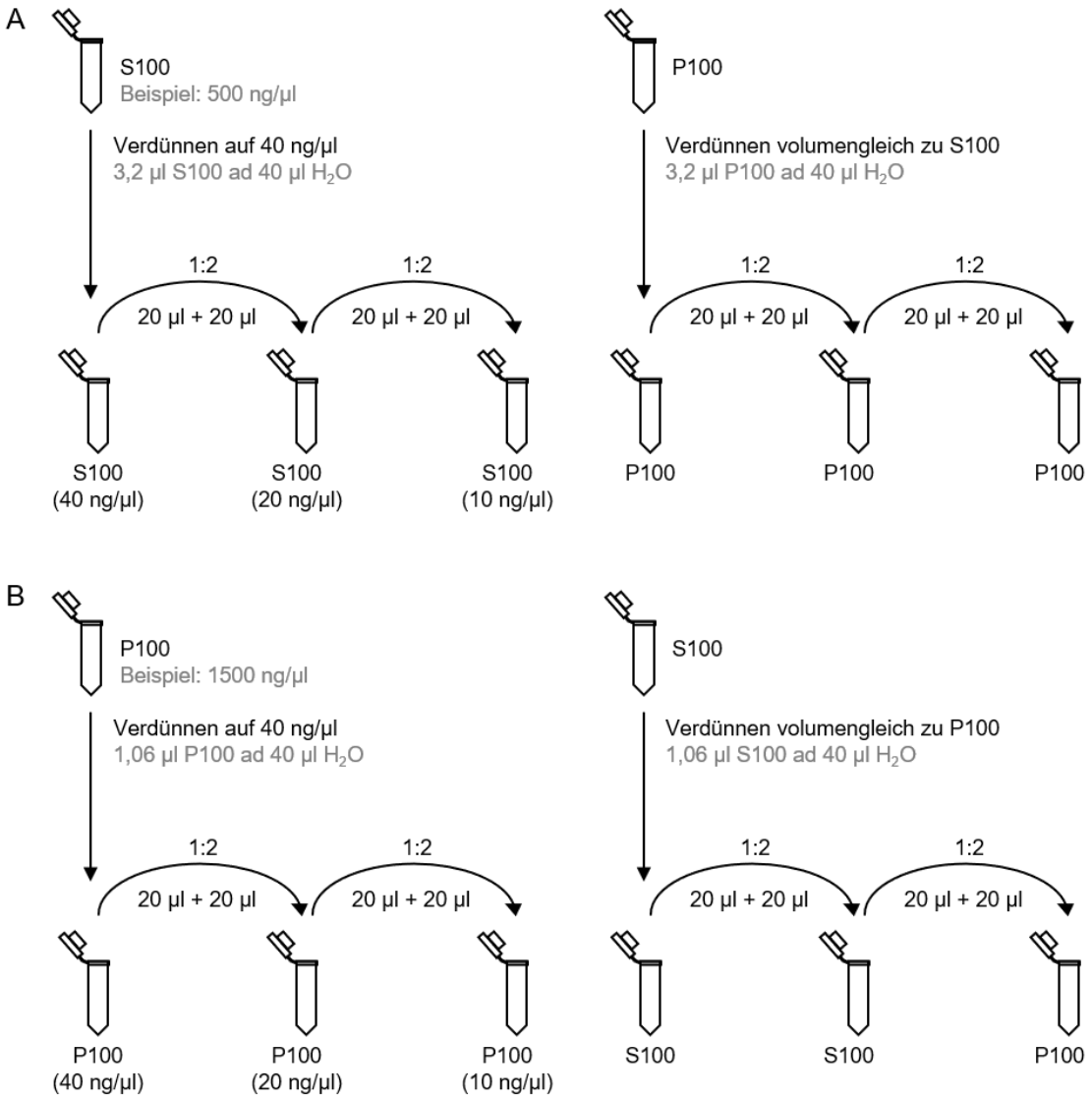

Abbildung 32: Versuchsaufbau zu S100 und P100 Verdünnungen. A S100 wird auf 40 ng/µl verdünnt und das für die Verdünnung benötigte Volumen (Beispiel 3,2 µl) wird auch für die P100 Verdünnung verwendet. **B** P100 wird auf 40 ng/µl verdünnt und das für die Verdünnung benötigte Volumen (Beispiel 1,06 µl) wird auch für die S100 Verdünnung verwendet. In Grau sind Beispiel Konzentrationen und Volumina angegeben.

Tabelle 37: *High magnesium* Puffer

NH_4Cl	1 M
$MgCl_2$	150 mM
Tris-HCl (pH 8)	20 mM
$CaCl_2$	5 mM
Triton X-100	0,4%
DNase I	150 U
RNase Inhibitor	1000 U

5.33 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelektrophorese (SDS-PAGE)

Um Proteine nach ihrer Masse aufzutrennen wurde eine diskontinuierliche SDS-PAGE unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt (Laemmli 1970). Dabei wurden Bakterienzellen bei einer OD_{600} von 0,5 (2 ml Kultur) für 10 Minuten bei 3.500x g und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 500 µl Medium aufgenommen, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und gewaschen (5 Minuten, 3.500x g und 4°C). Das Zellepellt wurde in 2X SDS-Ladepuffer resuspendiert (100 µl bei 2 ml Kultur OD_{600} von 0,5, entspricht OD_{600} 10) und bei -20°C gelagert. Für ein SDS-Polyacrylamidgel wurde das Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell System mit 0,75 mm dicken *Spacern* (Bio-Rad) verwendet. Die Glasplatten, sowie *Spacer* und Kamm wurden mit ddH_2O gereinigt. Nachdem die Glasplatten in die Apparatur eingespannt wurden, wurde bis ca. 2/3 der Höhe eine Trenngel-Lösung gegossen. Für die Begradigung der Kante wurde darüber Isopropanol aufgefüllt. Nach der Polymerisierung des Trenngels wurde das Isopropanol abgeschüttet und mit einem Whatmanpaper vorsichtig die Restflüssigkeit aufgesogen (ohne dabei das Trenngel zu berühren). Anschließend wurde das Sammelgel-Lösung auf das Trenngel gegossen und der Kamm wurde eingesetzt. Nach der Polymerisierung des Sammelgels wurdes das Gel in die Gelklammer platziert und mit 1X SDS-Laufpuffer überschichtet. Es wurden Proben mit einer OD_{600} von 1 aufgetragen (10 µl, wenn Ausgangslösung OD_{600} 10 in 100 µl beträgt), welche zuvor für 10 Minuten bei 95°C erhitzt und abzentrifugiert wurden. Es wurden 5 µl des Prestained Protein Marker (Thermo Scientific) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 70 V. Anschließend wurde das Gel entweder mit Coomassie-Brilliant-Blau gefärbt oder weiter zu Western Blot Analysen verwendet.

Tabelle 38: Sammelgel

30 % Acrylamid	0,825 ml
1 M Tris-HCl (pH 6,8)	0,625 ml
10 % [w/v] SDS	0,15 ml
H_2O	3,4 ml
10 % [w/v] APS	50 µl
TEMED	5 µl

Tabelle 39: 10 %iges Trenngel

30 % Acrylamid	3,33 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	2,5 ml
10 % [w/v] SDS	0,1 ml
H_2O	4,07 ml
10 % [w/v] APS	100 µl
TEMED	4 µl

Tabelle 40: 10x SDS-Laufpuffer

Tris-HCl (pH 8,3)	0,25 M
Glycin	1,92 M
SDS	10 g

Tabelle 41: 2x SDS-Probenpuffer

Tris-HCl (pH 6,8)	0,125 M
SDS	4 % [w/v] SDS
Glyzerol	20 % [v/v]
Dithiothreitol (DTT)	0,2 M
2-Mercaoptoethanol	10 % [v/v]
Bromphenolblau	0,02 [w/v]

5.34 Coomassie-Färbung

Proteine wurden mit Hilfe des Farbstoffs Coomassie-Brilliant-Blau gefärbt. Dabei wurde nach der SDS-PAGE das Gel in Coomassie-Färbelösung über Nacht auf einem Schütteltisch bei Raumtemperatur inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde das Gel erst mit klarem ve⁻ Wasser entfärbt und anschließend für mind. 2 Stunden mit Entfärbelösung entfärbt.

Tabelle 42: Coomassie-Färbelösung

Coomassie-Brilliant-Blau G250	0,1 [w/v]
Ethanol	40 % [v/v]
Essigsäure	10 % [v/v]

Tabelle 43: Entfärbelösung

Ethanol	25 % [v/v]
Essigsäure	5 % [v/v]

5.35 Semi-dry Western Blot

Um spezifisch Proteine nachzuweisen, wurden Western Blot Analysen durchgeführt. Nach der Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE (Kap. 5.34) wurden diese auf eine PVDF-Membran (Amersham Bioscence) transferiert. Zuvor wurde die Membran für 15 Sekunden in 100 % Methanol aktiviert, in ddH_2O gewaschen und in 1x Transferpuffer für 5 Minuten inkubiert. Zusammen mit sechs Whatmanpapern, welche ebenfalls in 1x Transferpuffer getränkt wurden, wurde die Membran mit dem Gel zwischen den Filterpapieren in der Blotting-Apparatur aufgeschichtet. Dabei wurden drei Whatmanpaper auf die Anodenseite gelegt. Anschließend wurde die Membran, das Gel und drei weitere Whatmanpaper aufgelegt. Der Proteintransfer wurde mit einer Stromstärke von 2,5 mA pro cm^2 Gelgröße für eine Stunde durchgeführt. Anschließend wurde die Membran für eine Stunde oder über Nacht bei 4°C schüttelnd mit 5 % [w/v] Milchpulver in 1x PBS-T-Puffer inkubiert, um unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden. Zum spezifischen Proteinnachweis wurde die Membran für 1 Stunde bei RT oder über Nacht bei 4°C schüttelnd mit dem entsprechend verdünnten Erstantikörper in PBS-T (enthält 2,5 % [w/v] Milchpulver) inkubiert. Danach wurde die Membran dreimal mit PBS-T für 5 Minuten schüttelnd gewaschen. Die Membran wurde für eine weitere Stunde bei RT schüttelnd inkubiert und anschließen erneut dreimal mit PBS-T gewaschen werden. Der verwendete FLAG-Antikörper ist direkt mit dem Reportermolekül Meerrettich-Peroxidase gekoppelt, sodass eine weitere Inkubation mit einem Zweitantikörper überflüssig ist. Für die Immunodetektion wurde Western Lightning Ultra, Chemiluminescent Substrat (PerkinElmer) verwendet. Dabei wurden je 450 µl der Substratlösung und stabilen

Peroxidlösung in einem Reaktionsgefäß gemischt und auf die Membran, welche auf einer Folie vorbereitet wurde, geträufelt. Die Visualisierung erfolgte mit einem Fusion-SL Chemilumineszenz-Gerät (Peqlab).

Tabelle 44: 10x Transfer-Puffer

Tris-HCl (pH 8,3)	0,25 M
Glycin	1,92 M

Tabelle 45: 1x Transfer-Puffer

10x Transfer-Puffer	1x
Methanol	10 % [v/v]

Tabelle 46: 10x PBS (pH 7,4)

NaCl	1,37 M
KCl	27 nM
Na_2HPO_2	66 nM
KH_2PO_4	18 nM

Tabelle 47: 1x PBS-T

10x PBS	1x
Tween®20	0,1 % [v/v]

5.36 Statistik

In der Regel wurden alle Daten als Mittelwerte und Einzelmessungen von drei unabhängigen Experimenten mit Hilfe von Excel dargestellt. Für statistische Analysen wurde der Welch's *t*-test durchgeführt. Unterschiede wurden als nicht signifikant erachtet, wenn der *P* Wert > 0,05 ist. Ein Stern bedeutet, dass der *P* Wert ≤ 0,05 ist zwei Sterne stehen für einen *P* Wert ≤ 0,005.

Literaturverzeichnis

Adams, J. M.; Capecchi, M. R. (1966): N-formylmethionyl-sRNA as the initiator of protein synthesis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 55 (1), S. 147–155. DOI: 10.1073/pnas.55.1.147.

Aiba, Hiroji (2007): Mechanism of RNA silencing by Hfq-binding small RNAs. In: *Current opinion in microbiology* 10 (2), S. 134–139. DOI: 10.1016/j.mib.2007.03.010.

Andersen, J.; Forst, S. A.; Zhao, K.; Inouye, M.; Delihas, N. (1989): The function of *micF* RNA. *micF* RNA is a major factor in the thermal regulation of OmpF protein in *Escherichia coli*. In: *The Journal of biological chemistry* 264 (30), S. 17961–17970.

Anderson, M. S.; Raetz, C. R. (1987): Biosynthesis of lipid A precursors in *Escherichia coli*. A cytoplasmic acyltransferase that converts UDP-N-acetylglucosamine to UDP-3-O-(R-3-hydroxymyristoyl)-N-acetylglucosamine. In: *The Journal of biological chemistry* 262 (11), S. 5159–5169.

Andreeva, Irena; Belardinelli, Riccardo; Rodnina, Marina V. (2018): Translation initiation in bacterial polysomes through ribosome loading on a standby site on a highly translated mRNA. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115 (17), S. 4411–4416. DOI: 10.1073/pnas.1718029115.

Arnold, T. E.; Yu, J.; Belasco, J. G. (1998): mRNA stabilization by the ompA 5' untranslated region: two protective elements hinder distinct pathways for mRNA degradation. In: *RNA* 4 (3), S. 319–330.

Barrick, Jeffrey E.; Breaker, Ronald R. (2007): The distributions, mechanisms, and structures of metabolite-binding riboswitches. In: *Genome Biol* 8 (11), R239. DOI: 10.1186/gb-2007-8-11-r239.

Bastet, Laurène; Chauvier, Adrien; Singh, Navjot; Lussier, Antony; Lamontagne, Anne-Marie; Prévost, Karine et al. (2017): Translational control and Rho-dependent transcription termination are intimately linked in riboswitch regulation. In: *Nucleic acids research* 45 (12), S. 7474–7486. DOI: 10.1093/nar/gkx434.

Batey, Robert T. (2011): Recognition of S-adenosylmethionine by riboswitches. In: *Wiley interdisciplinary reviews. RNA* 2 (2), S. 299–311. DOI: 10.1002/wrna.63.

Baumgardt, Kathrin; Charoenpanich, Pornsri; McIntosh, Matthew; Schikora, Adam; Stein, Elke; Thalmann, Sebastian et al. (2014): RNase E affects the expression of the acyl-homoserine lactone synthase gene sinI in *Sinorhizobium meliloti*. In: *Journal of Bacteriology* 196 (7), S. 1435–1447. DOI: 10.1128/JB.01471-13.

Baumgardt, Kathrin; Šmídová, Klára; Rahn, Helen; Lochnit, Günter; Robledo, Marta; Evguenieva-Hackenberg, Elena (2016): The stress-related, rhizobial small RNA RcsR1 destabilizes the autoinducer synthase encoding mRNA *sinI* in *Sinorhizobium meliloti*. In: *RNA biology* 13 (5), S. 486–499. DOI: 10.1080/15476286.2015.1110673.

Beckmann, Benedikt M.; Hoch, Philipp G.; Marz, Manja; Willkomm, Dagmar K.; Salas, Margarita; Hartmann, Roland K. (2012): A pRNA-induced structural rearrangement triggers 6S-1 RNA release from RNA polymerase in *Bacillus subtilis*. In: *The EMBO Journal* 31 (7), S. 1727–1738. DOI: 10.1038/emboj.2012.23.

Belfaiza, J.; Parsot, C.; Martel, A.; La Tour, C. B. de; Margarita, D.; Cohen, G. N.; Saint-Girons, I. (1986): Evolution in biosynthetic pathways: two enzymes catalyzing consecutive steps in methionine biosynthesis originate from a common ancestor and possess a similar regulatory region. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83 (4), S. 867–871. DOI: 10.1073/pnas.83.4.867.

Bernstein, Jonathan A.; Khodursky, Arkady B.; Lin, Pei-Hsun; Lin-Chao, Sue; Cohen, Stanley N. (2002): Global analysis of mRNA decay and abundance in *Escherichia coli* at single-gene resolution using two-color fluorescent DNA microarrays. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (15), S. 9697–9702. DOI: 10.1073/pnas.112318199.

Bertrand, K.; Korn, L.; Lee, F.; Platt, T.; Squires, C. L.; Squires, C.; Yanofsky, C. (1975): New features of the regulation of the tryptophan operon. In: *Science (New York, N.Y.)* 189 (4196), S. 22–26. DOI: 10.1126/science.1094538.

Brantl, Sabine (2007): Regulatory mechanisms employed by cis-encoded antisense RNAs. In: *Current opinion in microbiology* 10 (2), S. 102–109. DOI: 10.1016/j.mib.2007.03.012.

Braun, F.; Le Derout, J.; Régnier, P. (1998): Ribosomes inhibit an RNase E cleavage which induces the decay of the *rpsO* mRNA of *Escherichia coli*. In: *The EMBO Journal* 17 (16), S. 4790–4797. DOI: 10.1093/emboj/17.16.4790.

Breaker, Ronald R. (2012): Riboswitches and the RNA world. In: *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4 (2). DOI: 10.1101/cshperspect.a003566.

Britton, Robert A.; Wen, Tingyi; Schaefer, Laura; Pellegrini, Olivier; Uicker, William C.; Mathy, Nathalie et al. (2007): Maturation of the 5' end of *Bacillus subtilis* 16S rRNA by the essential ribonuclease YkqC/RNase J1. In: *Molecular microbiology* 63 (1), S. 127–138. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2006.05499.x.

Brown, Nigel L.; Stoyanov, Jivko V.; Kidd, Stephen P.; Hobman, Jon L. (2003): The MerR family of transcriptional regulators. In: *FEMS microbiology reviews* 27 (2-3), S. 145–163. DOI: 10.1016/S0168-6445(03)00051-2.

Browning, Douglas F.; Busby, Stephen J. (2004): The regulation of bacterial transcription initiation. In: *Nature reviews. Microbiology* 2 (1), S. 57–65. DOI: 10.1038/nrmicro787.

Caron, Marie-Pier; Bastet, Laurène; Lussier, Antony; Simoneau-Roy, Maxime; Massé, Eric; Lafontaine, Daniel A. (2012): Dual-acting riboswitch control of translation initiation and mRNA decay. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (50), E3444-53. DOI: 10.1073/pnas.1214024109.

Carpousis, Agamemnon J. (2007): The RNA degradosome of *Escherichia coli*: an mRNA-degrading machine assembled on RNase E. In: *Annual review of microbiology* 61, S. 71–87. DOI: 10.1146/annurev.micro.61.080706.093440.

Carpousis, Agamemnon J.; van Houwe, Griet; Ehretsmann, Claude; Krisch, Henry M. (1994): Copurification of E. coli RNAase E and PNPase: Evidence for a specific association between two enzymes important in RNA processing and degradation. In: *Cell* 76 (5), S. 889–900. DOI: 10.1016/0092-8674(94)90363-8.

Casse, F.; Boucher, C.; Julliot, J. S.; Michel, M.; DÉNari, J. (1979): Identification and Characterization of Large Plasmids in *Rhizobium meliloti* using Agarose Gel Electrophoresis. In: *Gen. Microbiol. (Journal of general microbiology)* (113), S. 229–242.

Celesnik, Helena; Deana, Atilio; Belasco, Joel G. (2007): Initiation of RNA decay in *Escherichia coli* by 5' pyrophosphate removal. In: *Molecular cell* 27 (1), S. 79–90. DOI: 10.1016/j.molcel.2007.05.038.

Chatterjee, Surajit; Chauvier, Adrien; Dandpat, Shiba S.; Artsimovitch, Irina; Walter, Nils G. (2021): A translational riboswitch coordinates nascent transcription-translation coupling. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 118 (16). DOI: 10.1073/pnas.2023426118.

Chen, Bin; Zuo, Xiaobing; Wang, Yun-Xing; Dayie, T. Kwaku (2012): Multiple conformations of SAM-II riboswitch detected with SAXS and NMR spectroscopy. In: *Nucleic acids research* 40 (7), S. 3117–3130. DOI: 10.1093/nar/gkr1154.

Chevrier-Miller, M.; Jacques, N.; Raibaud, O.; Dreyfus, M. (1990): Transcription of single-copy hybrid *lacZ* genes by T7 RNA polymerase in *Escherichia coli*: mRNA synthesis and degradation can be uncoupled from translation. In: *Nucleic acids research* 18 (19), S. 5787–5792. DOI: 10.1093/nar/18.19.5787.

Conrad, C.; Rauhut, R.; Klug, G. (1998): Different cleavage specificities of RNases III from *Rhodobacter capsulatus* and *Escherichia coli*. In: *Nucleic acids research* 26 (19), S. 4446–4453. DOI: 10.1093/nar/26.19.4446.

Corbino, Keith A.; Barrick, Jeffrey E.; Lim, Jinsoo; Welz, Rüdiger; Tucker, Brian J.; Puskarz, Izabela et al. (2005): Evidence for a second class of S-adenosylmethionine riboswitches and other regulatory RNA motifs in alpha-proteobacteria. In: *Genome Biol* 6 (8), R70. DOI: 10.1186/gb-2005-6-8-r70.

Damm, Katrin; Bach, Simone; Müller, Katrin M. H.; Klug, Gabriele; Burenina, Olga Y.; Kubareva, Elena A. et al. (2015): Impact of RNA isolation protocols on RNA detection by Northern blotting. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1296, S. 29–38. DOI: 10.1007/978-1-4939-2547-6_4.

Darfeuille, Fabien; Unoson, Cecilia; Vogel, Jörg; Wagner, E. Gerhart H. (2007): An antisense RNA inhibits translation by competing with standby ribosomes. In: *Molecular cell* 26 (3), S. 381–392. DOI: 10.1016/j.molcel.2007.04.003.

Deana, Atilio; Celesnik, Helena; Belasco, Joel G. (2008): The bacterial enzyme RppH triggers messenger RNA degradation by 5' pyrophosphate removal. In: *Nature* 451 (7176), S. 355–358. DOI: 10.1038/nature06475.

DebRoy, Sruti; Gebbie, Margo; Ramesh, Arati; Goodson, Jonathan R.; Cruz, Melissa R.; van Hoof, Ambro et al. (2014): Riboswitches. A riboswitch-containing sRNA controls gene expression by sequestration of a response regulator. In: *Science (New York, N.Y.)* 345 (6199), S. 937–940. DOI: 10.1126/science.1255091.

Deutscher, M. P.; Reuven, N. B. (1991): Enzymatic basis for hydrolytic versus phosphorolytic mRNA degradation in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (8), S. 3277–3280. DOI: 10.1073/pnas.88.8.3277.

Deutscher, Murray P. (2009): Chapter 9 Maturation and Degradation of Ribosomal RNA in Bacteria. In: Ciaran Condon (Hg.): Molecular Biology of RNA Processing and Decay in Prokaryotes, Bd. 85. San Diego: Academic Press [Imprint]; Elsevier Science & Technology Books (Progress in Molecular Biology and Translational Science Ser), S. 369–391.

Dreyfus, Marc; Régnier, Philippe (2002): The Poly(A) Tail of mRNAs. In: *Cell* 111 (5), S. 611–613. DOI: 10.1016/S0092-8674(02)01137-6.

Durand, Sylvain; Gilet, Laetitia; Condon, Ciarán (2012): The essential function of *B. subtilis* RNase III is to silence foreign toxin genes. In: *PLoS genetics* 8 (12), e1003181. DOI: 10.1371/journal.pgen.1003181.

Eichhorn, Catherine D.; Kang, Mijeong; Feigon, Juli (2014): Structure and function of preQ1 riboswitches. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* 1839 (10), S. 939–950. DOI: 10.1016/j.bbagrm.2014.04.019.

Epshtein, Vitaly; Mironov, Alexander S.; Nudler, Evgeny (2003): The riboswitch-mediated control of sulfur metabolism in bacteria. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (9), S. 5052–5056. DOI: 10.1073/pnas.0531307100.

Even, Sergine; Pellegrini, Olivier; Zig, Lena; Labas, Valerie; Vinh, Joelle; Bréchemmier-Baey, Dominique; Putzer, Harald (2005): Ribonucleases J1 and J2: two novel endoribonucleases in *B.subtilis* with functional homology to *E.coli* RNase E. In: *Nucleic acids research* 33 (7), S. 2141–2152. DOI: 10.1093/nar/gki505.

Evguenieva-Hackenberg, Elena; Klug, Gabriele (2011): New aspects of RNA processing in prokaryotes. In: *Current opinion in microbiology* 14 (5), S. 587–592. DOI: 10.1016/j.mib.2011.07.025.

Feklístov, Andrey; Sharon, Brian D.; Darst, Seth A.; Gross, Carol A. (2014): Bacterial sigma factors: a historical, structural, and genomic perspective. In: *Annual review of microbiology* 68, S. 357–376. DOI: 10.1146/annurev-micro-092412-155737.

Feng, Yanan; Vickers, Timothy A.; Cohen, Stanley N. (2002): The catalytic domain of RNase E shows inherent 3' to 5' directionality in cleavage site selection. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (23), S. 14746–14751. DOI: 10.1073/pnas.202590899.

Filippov, Valery; Solovyev, Victor; Filippova, Maria; Gill, Sarjeet S. (2000): A novel type of RNase III family proteins in eukaryotes. In: *Gene* 245 (1), S. 213–221. DOI: 10.1016/S0378-1119(99)00571-5.

Fioravanti, Antonella; Fumeaux, Coralie; Mohapatra, Saswat S.; Bompard, Coralie; Brilli, Matteo; Frandi, Antonio et al. (2013): DNA binding of the cell cycle transcriptional regulator GcrA depends on N6-adenosine methylation in *Caulobacter crescentus* and other Alphaproteobacteria. In: *PLoS genetics* 9 (5), e1003541. DOI: 10.1371/journal.pgen.1003541.

Fontecave, Marc; Atta, Mohamed; Mulliez, Etienne (2004): S-adenosylmethionine: nothing goes to waste. In: *Trends in biochemical sciences* 29 (5), S. 243–249. DOI: 10.1016/j.tibs.2004.03.007.

Fuchs, Ryan T.; Grundy, Frank J.; Henkin, Tina M. (2006): The S(MK) box is a new SAM-binding RNA for translational regulation of SAM synthetase. In: *Nature structural & molecular biology* 13 (3), S. 226–233. DOI: 10.1038/nsmb1059.

Fuchs, Ryan T.; Grundy, Frank J.; Henkin, Tina M. (2007): S-adenosylmethionine directly inhibits binding of 30S ribosomal subunits to the SMK box translational riboswitch RNA. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (12), S. 4876–4880. DOI: 10.1073/pnas.0609956104.

Gage, Daniel J. (2004): Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. In: *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 68 (2), S. 280–300. DOI: 10.1128/MMBR.68.2.280-300.2004.

Galibert, F.; Finan, T. M.; Long, S. R.; Puhler, A.; Abola, P.; Ampe, F. et al. (2001): The composite genome of the legume symbiont Sinorhizobium meliloti. In: *Science (New York, N.Y.)* 293 (5530), S. 668–672. DOI: 10.1126/science.1060966.

Garst, Andrew D.; Edwards, Andrea L.; Batey, Robert T. (2011): Riboswitches: structures and mechanisms. In: *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3 (6). DOI: 10.1101/cshperspect.a003533.

Gelfand, M. (1999): A conserved RNA structure element involved in the regulation of bacterial riboflavin synthesis genes. In: *Trends in genetics : TIG* 15 (11), S. 439–442. DOI: 10.1016/s0168-9525(99)01856-9.

Gilbert, S. D.; Montange, R. K.; Stoddard, C. D.; Batey, R. T. (2006): Structural studies of the purine and SAM binding riboswitches. In: *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 71, S. 259–268. DOI: 10.1101/sqb.2006.71.015.

Gilbert, Sunny D.; Rambo, Robert P.; van Tyne, Daria; Batey, Robert T. (2008): Structure of the SAM-II riboswitch bound to S-adenosylmethionine. In: *Nature structural & molecular biology* 15 (2), S. 177–182. DOI: 10.1038/nsmb.1371.

Gildehaus, Nina; Neusser, Thomas; Wurm, Reinhild; Wagner, Rolf (2007): Studies on the function of the riboregulator 6S RNA from *E. coli*: RNA polymerase binding, inhibition of in vitro transcription and synthesis of RNA-directed de novo transcripts. In: *Nucleic acids research* 35 (6), S. 1885–1896. DOI: 10.1093/nar/gkm085.

Gingold, Hila; Pilpel, Yitzhak (2011): Determinants of translation efficiency and accuracy. In: *Molecular systems biology* 7, S. 481. DOI: 10.1038/msb.2011.14.

Gottesman, Susan (2003): Proteolysis in bacterial regulatory circuits. In: *Annual review of cell and developmental biology* 19, S. 565–587. DOI: 10.1146/annurev.cellbio.19.110701.153228.

Gottesman, Susan (2005): Micros for microbes: non-coding regulatory RNAs in bacteria. In: *Trends in genetics : TIG* 21 (7), S. 399–404. DOI: 10.1016/j.tig.2005.05.008.

Gottesman, Susan; Storz, Gisela (2011): Bacterial small RNA regulators: versatile roles and rapidly evolving variations. In: *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3 (12). DOI: 10.1101/cshperspect.a003798.

Goudreau, Paul N.; Stock, Ann M. (1998): Signal transduction in bacteria: molecular mechanisms of stimulus—response coupling. In: *Current opinion in microbiology* 1 (2), S. 160–169. DOI: 10.1016/s1369-5274(98)80006-4.

Goyal, Akanksha; Belardinelli, Riccardo; Maracci, Cristina; Milón, Pohl; Rodnina, Marina V. (2015): Directional transition from initiation to elongation in bacterial translation. In: *Nucleic acids research* 43 (22), S. 10700–10712. DOI: 10.1093/nar/gkv869.

Gruber, Andreas R.; Bernhart, Stephan H.; Hofacker, Ivo L.; Washietl, Stefan (2008): Strategies for measuring evolutionary conservation of RNA secondary structures. In: *BMC Bioinformatics* 9 (1), S. 122. DOI: 10.1186/1471-2105-9-122.

Grundy, F. J.; Henkin, T. M. (1998): The S box regulon: a new global transcription termination control system for methionine and cysteine biosynthesis genes in gram-positive bacteria. In: *Molecular microbiology* 30 (4), S. 737–749. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1998.01105.x.

Hadjeras, Lydia; Heiniger, Benjamin; Maaß, Sandra; Scheuer, Robina; Gelhausen, Rick; Azarderakhsh, Saina et al. (2023): Unraveling the small proteome of the plant symbiont *Sinorhizobium meliloti* by ribosome profiling and proteogenomics. In: *µLife* (in press)

Haller, Andrea; Rieder, Ulrike; Aigner, Michaela; Blanchard, Scott C.; Micura, Ronald (2011): Conformational capture of the SAM-II riboswitch. In: *Nature chemical biology* 7 (6), S. 393–400. DOI: 10.1038/nchembio.562.

Hambraeus, Gustav; Karhumaa, Kaisa; Rutberg, Blanka (2002): A 5' stem-loop and ribosome binding but not translation are important for the stability of *Bacillus subtilis* aprE leader mRNA. In: *Microbiology* 148 (Pt 6), S. 1795–1803. DOI: 10.1099/00221287-148-6-1795.

Hartmann, Raimo; van Teeseling, Muriel C. F.; Thanbichler, Martin; Drescher, Knut (2020): BacStalk: A comprehensive and interactive image analysis software tool for bacterial cell biology. In: *Molecular microbiology* 114 (1), S. 140–150. DOI: 10.1111/mmi.14501.

Henkin, T. M.; Grundy, F. J. (2006): Sensing metabolic signals with nascent RNA transcripts: the T box and S box riboswitches as paradigms. In: *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 71, S. 231–237. DOI: 10.1101/sqb.2006.71.020.

Hör, Jens; Gorski, Stanislaw A.; Vogel, Jörg (2018): Bacterial RNA Biology on a Genome Scale. In: *Molecular cell* 70 (5), S. 785–799. DOI: 10.1016/j.molcel.2017.12.023.

Hör, Jens; Matera, Gianluca; Vogel, Jörg; Gottesman, Susan; Storz, Gisela (2020): Trans-Acting Small RNAs and Their Effects on Gene Expression in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. In: *EcoSal Plus* 9 (1). DOI: 10.1128/ecosalplus.ESP-0030-2019.

Huffman, Joy L.; Brennan, Richard G. (2002): Prokaryotic transcription regulators: more than just the helix-turn-helix motif. In: *Current opinion in structural biology* 12 (1), S. 98–106. DOI: 10.1016/s0959-440x(02)00295-6.

Hui, Monica P.; Foley, Patricia L.; Belasco, Joel G. (2014): Messenger RNA degradation in bacterial cells. In: *Annual review of genetics* 48, S. 537–559. DOI: 10.1146/annurev-genet-120213-092340.

Inuzuka, Saki; Kakizawa, Hitoshi; Nishimura, Kei-Ichiro; Naito, Takuto; Miyazaki, Katsushi; Furuta, Hiroyuki et al. (2018): Recognition of cyclic-di-GMP by a riboswitch conducts translational repression through masking the ribosome-binding site distant from the aptamer domain. In: *Genes to Cells* 23 (6), S. 435–447. DOI: 10.1111/gtc.12586.

Jesus, Vanessa de; Qureshi, Nusrat S.; Warhaut, Sven; Bains, Jasleen K.; Dietz, Marina S.; Heilemann, Mike et al. (2021): Switching at the ribosome: riboswitches need rProteins as modulators to regulate translation. In: *Nature communications* 12 (1), S. 4723. DOI: 10.1038/s41467-021-25024-5.

Jones, Kathryn M.; Kobayashi, Hajime; Davies, Bryan W.; Taga, Michiko E.; Walker, Graham C. (2007): How rhizobial symbionts invade plants: the Sinorhizobium-Medicago model. In: *Nature reviews. Microbiology* 5 (8), S. 619–633. DOI: 10.1038/nrmicro1705.

Joyce, S. A.; Dreyfus, M. (1998): In the absence of translation, RNase E can bypass 5' mRNA stabilizers in *Escherichia coli*. In: *Journal of molecular biology* 282 (2), S. 241–254. DOI: 10.1006/jmbi.1998.2027.

Jutras, Brandon L.; Verma, Ashutosh; Stevenson, Brian (2012): Identification of novel DNA-binding proteins using DNA-affinity chromatography/pull down. In: *Current protocols in microbiology* Chapter 1, Unit1F.1. DOI: 10.1002/9780471729259.mc01f01s24.

Karunker, Iris; Rotem, Or; Dori-Bachash, Mally; Jurkevitch, Edouard; Sorek, Rotem (2013): A global transcriptional switch between the attack and growth forms of *Bdellovibrio bacteriovorus*. In: *PloS one* 8 (4), e61850. DOI: 10.1371/journal.pone.0061850.

Kawano, Mitsuoki; Reynolds, April A.; Miranda-Rios, Juan; Storz, Gisela (2005): Detection of 5'- and 3'-UTR-derived small RNAs and cis-encoded antisense RNAs in *Escherichia coli*. In: *Nucleic acids research* 33 (3), S. 1040–1050. DOI: 10.1093/nar/gki256.

Kelley, Jennifer Munro; Hamelberg, Donald (2010): Atomistic basis for the on-off signaling mechanism in SAM-II riboswitch. In: *Nucleic acids research* 38 (4), S. 1392–1400. DOI: 10.1093/nar/gkp1106.

Khan, Sharik R.; Gaines, Jennifer; Roop, R. Martin; Farrand, Stephen K. (2008): Broad-host-range expression vectors with tightly regulated promoters and their use to examine the influence of TraR and TraM expression on Ti plasmid quorum sensing. In: *Applied and Environmental Microbiology* 74 (16), S. 5053–5062. DOI: 10.1128/AEM.01098-08.

Krol, Elizaveta; Becker, Anke (2011): ppGpp in *Sinorhizobium meliloti*: biosynthesis in response to sudden nutritional downshifts and modulation of the transcriptome. In: *Molecular microbiology* 81 (5), S. 1233–1254. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2011.07752.x.

Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: *Nature* 227 (5259), S. 680–685. DOI: 10.1038/227680a0.

Lagares, Antonio; Sanjuán, Juan; Pistorio, Mariano (2014): The Plasmid Mobilome of the Model Plant-Symbiont *Sinorhizobium meliloti*: Coming up with New Questions and Answers. In: *Microbiology spectrum* 2 (5). DOI: 10.1128/microbiolspec.PLAS-0005-2013.

Larkin, M. A.; Blackshields, G.; Brown, N. P.; Chenna, R.; McGettigan, P. A.; McWilliam, H. et al. (2007): Clustal W and Clustal X version 2.0. In: *Bioinformatics (Oxford, England)* 23 (21), S. 2947–2948. DOI: 10.1093/bioinformatics/btm404.

Lee, F.; Yanofsky, C. (1977): Transcription termination at the trp operon attenuators of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: RNA secondary structure and regulation of termination. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74 (10), S. 4365–4369. DOI: 10.1073/pnas.74.10.4365.

Li, Zhongwei; Deutscher, Murray P. (2002): RNase E plays an essential role in the maturation of *Escherichia coli* tRNA precursors. In: *RNA* 8 (1), S. 97–109. DOI: 10.1017/s1355838202014929.

Loh, Edmund; Dussurget, Olivier; Gripenland, Jonas; Vaitkevicius, Karolis; Tiensuu, Teresa; Mandin, Pierre et al. (2009): A trans-acting riboswitch controls expression of the virulence regulator PrfA in *Listeria monocytogenes*. In: *Cell* 139 (4), S. 770–779. DOI: 10.1016/j.cell.2009.08.046.

López-Maury, Luis; Marguerat, Samuel; Bähler, Jürg (2008): Tuning gene expression to changing environments: from rapid responses to evolutionary adaptation. In: *Nature reviews. Genetics* 9 (8), S. 583–593. DOI: 10.1038/nrg2398.

Madhugiri, Ramakanth; Evguenieva-Hackenberg, Elena (2009): RNase J is involved in the 5'-end maturation of 16S rRNA and 23S rRNA in *Sinorhizobium meliloti*. In: *FEBS letters* 583 (14), S. 2339–2342. DOI: 10.1016/j.febslet.2009.06.026.

Majdalani, Nadim; Vanderpool, Carin K.; Gottesman, Susan (2005): Bacterial small RNA regulators. In: *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 40 (2), S. 93–113. DOI: 10.1080/10409230590918702.

Mandal, Maumita; Breaker, Ronald R. (2004): Adenine riboswitches and gene activation by disruption of a transcription terminator. In: *Nature structural & molecular biology* 11 (1), S. 29–35. DOI: 10.1038/nsmb710.

Mann, Martin; Wright, Patrick R.; Backofen, Rolf (2017): IntaRNA 2.0: enhanced and customizable prediction of RNA-RNA interactions. In: *Nucleic acids research* 45 (W1), W435-W439. DOI: 10.1093/nar/gkx279.

Marcano-Velázquez, Joan G.; Batey, Robert T. (2015): Structure-guided mutational analysis of gene regulation by the *Bacillus subtilis pbuE* adenine-responsive riboswitch in a cellular context. In: *The Journal of biological chemistry* 290 (7), S. 4464–4475. DOI: 10.1074/jbc.M114.613497.

Mathy, Nathalie; Bénard, Lionel; Pellegrini, Olivier; Daou, Roula; Wen, Tingyi; Condon, Ciarán (2007): 5'-to-3' exoribonuclease activity in bacteria: role of RNase J1 in rRNA maturation and 5' stability of mRNA. In: *Cell* 129 (4), S. 681–692. DOI: 10.1016/j.cell.2007.02.051.

McCown, Phillip J.; Corbino, Keith A.; Stav, Shira; Sherlock, Madeline E.; Breaker, Ronald R. (2017): Riboswitch diversity and distribution. In: *RNA* 23 (7), S. 995–1011. DOI: 10.1261/rna.061234.117.

McDaniel, Brooke A. Murphy; Grundy, Frank J.; Artsimovitch, Irina; Henkin, Tina M. (2003): Transcription termination control of the S box system: direct measurement of S-adenosylmethionine by the leader RNA. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (6), S. 3083–3088. DOI: 10.1073/pnas.0630422100.

McDowall, K. J.; Lin-Chao, S.; Cohen, S. N. (1994): A+U content rather than a particular nucleotide order determines the specificity of RNase E cleavage. In: *The Journal of biological chemistry* 269 (14), S. 10790–10796.

McIntosh, Matthew; Krol, Elizaveta; Becker, Anke (2008): Competitive and cooperative effects in quorum-sensing-regulated galactoglucan biosynthesis in *Sinorhizobium meliloti*. In: *Journal of Bacteriology* 190 (15), S. 5308–5317. DOI: 10.1128/JB.00063-08.

Melior, Hendrik; Li, Siqi; Madhugiri, Ramakanth; Stötzel, Maximilian; Azarderakhsh, Saina; Barth-Weber, Susanne et al. (2019a): Transcription attenuation-derived small RNA rnTrpL regulates tryptophan biosynthesis gene expression in trans. In: *Nucleic acids research* 47 (12), S. 6396–6410. DOI: 10.1093/nar/gkz274.

Melior, Hendrik; Maaß, Sandra; Stötzel, Maximilian; Li, Siqi; Förstner, Konrad U.; Schütz, Rubina et al. (2019b): The bacterial leader peptide peTrpL has a conserved function in antibiotic-dependent posttranscriptional regulation of ribosomal genes.

Mellin, J. R.; Koutero, Mikael; Dar, Daniel; Nahori, Marie-Anne; Sorek, Rotem; Cossart, Pascale (2014): Riboswitches. Sequestration of a two-component response regulator by a riboswitch-regulated noncoding RNA. In: *Science (New York, N.Y.)* 345 (6199), S. 940–943. DOI: 10.1126/science.1255083.

Mirihana Arachchilage, Gayan; Sherlock, Madeline E.; Weinberg, Zasha; Breaker, Ronald R. (2018): SAM-VI RNAs selectively bind S-adenosylmethionine and exhibit similarities to SAM-III riboswitches. In: *RNA biology* 15 (3), S. 371–378. DOI: 10.1080/15476286.2017.1399232.

Mizuno, T.; Chou, M. Y.; Inouye, M. (1984): A unique mechanism regulating gene expression: translational inhibition by a complementary RNA transcript (micRNA). In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81 (7), S. 1966–1970. DOI: 10.1073/pnas.81.7.1966.

Mohanty, B. K.; Kushner, S. R. (1999): Analysis of the function of *Escherichia coli* poly(A) polymerase I in RNA metabolism. In: *Molecular microbiology* 34 (5), S. 1094–1108. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1999.01673.x.

Morfeldt, E.; Taylor, D.; Gabain, A. von; Arvidson, S. (1995): Activation of alpha-toxin translation in *Staphylococcus aureus* by the trans-encoded antisense RNA, RNAIII. In: *The EMBO Journal* 14 (18), S. 4569–4577. DOI: 10.1002/j.1460-2075.1995.tb00136.x.

Mouammine, Annabelle; Collier, Justine (2018): The impact of DNA methylation in Alphaproteobacteria. In: *Molecular microbiology* 110 (1), S. 1–10. DOI: 10.1111/mmi.14079.

Murashko, Oleg N.; Lin-Chao, Sue (2017): *Escherichia coli* responds to environmental changes using enolasic degradosomes and stabilized DicF sRNA to alter cellular morphology. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (38), E8025-E8034. DOI: 10.1073/pnas.1703731114.

Naville, Magali; Gautheret, Danie (2010): Transcription attenuation in bacteria: theme and variations. In: *Briefings in functional genomics* 9 (2), S. 178–189. DOI: 10.1093/bfgp/elq008.

Nie, Lei; Wu, Gang; Zhang, Weiwen (2006): Correlation of mRNA expression and protein abundance affected by multiple sequence features related to translational efficiency in

Desulfovibrio vulgaris: a quantitative analysis. In: *Genetics* 174 (4), S. 2229–2243. DOI: 10.1534/genetics.106.065862.

Nou, X.; Kadner, R. J. (1998): Coupled changes in translation and transcription during cobalamin-dependent regulation of *btuB* expression in *Escherichia coli*. In: *Journal of Bacteriology* 180 (24), S. 6719–6728. DOI: 10.1128/JB.180.24.6719-6728.1998.

Novick, R. P.; Ross, H. F.; Projan, S. J.; Kornblum, J.; Kreiswirth, B.; Moghazeh, S. (1993): Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. In: *The EMBO Journal* 12 (10), S. 3967–3975. DOI: 10.1002/j.1460-2075.1993.tb06074.x.

Nudler, Evgeny; Mironov, Alexander S. (2004): The riboswitch control of bacterial metabolism. In: *Trends in biochemical sciences* 29 (1), S. 11–17. DOI: 10.1016/j.tibs.2003.11.004.

Opdyke, Jason A.; Kang, Ju-Gyeong; Storz, Gisela (2004): GadY, a small-RNA regulator of acid response genes in *Escherichia coli*. In: *Journal of Bacteriology* 186 (20), S. 6698–6705. DOI: 10.1128/JB.186.20.6698-6705.2004.

Osada, Y.; Saito, R.; Tomita, M. (1999): Analysis of base-pairing potentials between 16S rRNA and 5' UTR for translation initiation in various prokaryotes. In: *Bioinformatics (Oxford, England)* 15 (7-8), S. 578–581. DOI: 10.1093/bioinformatics/15.7.578.

Oxender, D. L.; Zurawski, G.; Yanofsky, C. (1979): Attenuation in the *Escherichia coli* tryptophan operon: role of RNA secondary structure involving the tryptophan codon region. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76 (11), S. 5524–5528. DOI: 10.1073/pnas.76.11.5524.

Paget, Mark S. (2015): Bacterial Sigma Factors and Anti-Sigma Factors: Structure, Function and Distribution. In: *Biomolecules* 5 (3), S. 1245–1265. DOI: 10.3390/biom5031245.

Paget, Mark S. B.; Helmann, John D. (2003): The sigma70 family of sigma factors. In: *Genome Biol* 4 (1), S. 203. DOI: 10.1186/gb-2003-4-1-203.

Paul, Brian J.; Berkmen, Melanie B.; Gourse, Richard L. (2005): DksA potentiates direct activation of amino acid promoters by ppGpp. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (22), S. 7823–7828. DOI: 10.1073/pnas.0501170102.

Pedrolli, Danielle; Langer, Simone; Hobl, Birgit; Schwarz, Julia; Hashimoto, Masayuki; Mack, Matthias (2015): The *ribB* FMN riboswitch from *Escherichia coli* operates at the transcriptional and translational level and regulates riboflavin biosynthesis. In: *The FEBS journal* 282 (16), S. 3230–3242. DOI: 10.1111/febs.13226.

Pfaffl, M. W. (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. In: *Nucleic acids research* 29 (9), e45. DOI: 10.1093/nar/29.9.e45.

Pfeiffer, Verena; Papenfort, Kai; Lucchini, Sacha; Hinton, Jay C. D.; Vogel, Jörg (2009): Coding sequence targeting by MicC RNA reveals bacterial mRNA silencing downstream of translational initiation. In: *Nature structural & molecular biology* 16 (8), S. 840–846. DOI: 10.1038/nsmb.1631.

Poiata, Elena; Meyer, Michelle M.; Ames, Tyler D.; Breaker, Ronald R. (2009): A variant riboswitch aptamer class for S-adenosylmethionine common in marine bacteria. In: *RNA* 15 (11), S. 2046–2056. DOI: 10.1261/rna.1824209.

Pursley, Benjamin R.; Fernandez, Nicolas L.; Severin, Geoffrey B.; Waters, Christopher M. (2019): The Vc2 Cyclic di-GMP-Dependent Riboswitch of *Vibrio cholerae* Regulates Expression of an Upstream Putative Small RNA by Controlling RNA Stability. In: *Journal of Bacteriology* 201 (21). DOI: 10.1128/JB.00293-19.

Py, B.; Higgins, C. F.; Krisch, H. M.; Carpousis, A. J. (1996): A DEAD-box RNA helicase in the *Escherichia coli* RNA degradosome. In: *Nature* 381 (6578), S. 169–172. DOI: 10.1038/381169a0.

Qu, Xiaohui; Lancaster, Laura; Noller, Harry F.; Bustamante, Carlos; Tinoco, Ignacio (2012): Ribosomal protein S1 unwinds double-stranded RNA in multiple steps. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (36), S. 14458–14463. DOI: 10.1073/pnas.1208950109.

Qureshi, Nusrat Shahin; Bains, Jasleen Kaur; Sreeramulu, Sridhar; Schwalbe, Harald; Fürtig, Boris (2018): Conformational switch in the ribosomal protein S1 guides unfolding of structured RNAs for translation initiation. In: *Nucleic acids research* 46 (20), S. 10917–10929. DOI: 10.1093/nar/gky746.

Raina, Medha; King, Alisa; Bianco, Colleen; Vanderpool, Carin K. (2018): Dual-Function RNAs. In: *Microbiology spectrum* 6 (5). DOI: 10.1128/microbiolspec.RWR-0032-2018.

Rauhut, R.; Klug, G. (1999): mRNA degradation in bacteria. In: *FEMS microbiology reviews* 23 (3), S. 353–370. DOI: 10.1111/j.1574-6976.1999.tb00404.x.

Ray, Sujay; Dandpat, Shiba S.; Chatterjee, Surajit; Walter, Nils G. (2022): Precise tuning of bacterial translation initiation by non-equilibrium 5'-UTR unfolding observed in single mRNAs. In: *Nucleic acids research* 50 (15), S. 8818–8833. DOI: 10.1093/nar/gkac635.

Regulski, Elizabeth E.; Moy, Ryan H.; Weinberg, Zasha; Barrick, Jeffrey E.; Yao, Zizhen; Ruzzo, Walter L.; Breaker, Ronald R. (2008): A widespread riboswitch candidate that

controls bacterial genes involved in molybdenum cofactor and tungsten cofactor metabolism. In: *Molecular microbiology* 68 (4), S. 918–932. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2008.06208.x.

Richards, Jamie; Belasco, Joel G. (2021a): Riboswitch control of bacterial RNA stability. In: *Molecular microbiology* 116 (2), S. 361–365. DOI: 10.1111/mmi.14723.

Richards, Jamie; Belasco, Joel G. (2021b): Widespread Protection of RNA Cleavage Sites by a Riboswitch Aptamer that Folds as a Compact Obstacle to Scanning by RNase E. In: *Molecular cell* 81 (1), 127-138.e4. DOI: 10.1016/j.molcel.2020.10.025.

Richards, Jamie; Sundermeier, Thomas; Svetlanov, Anton; Karzai, A. Wali (2008): Quality control of bacterial mRNA decoding and decay. In: *Biochimica et biophysica acta* 1779 (9), S. 574–582. DOI: 10.1016/j.bbagrm.2008.02.008.

Rieder, Renate; Lang, Kathrin; Graber, Dagmar; Micura, Ronald (2007): Ligand-induced folding of the adenosine deaminase A-riboswitch and implications on riboswitch translational control. In: *Chembiochem : a European journal of chemical biology* 8 (8), S. 896–902. DOI: 10.1002/cbic.200700057.

Robledo, Marta; Frage, Benjamin; Wright, Patrick R.; Becker, Anke (2015): A stress-induced small RNA modulates alpha-rhizobial cell cycle progression. In: *PLoS genetics* 11 (4), e1005153. DOI: 10.1371/journal.pgen.1005153.

Robledo, Marta; García-Tomsig, Natalia I.; Matia-González, Ana M.; García-Rodríguez, Fernando M.; Jiménez-Zurdo, José I. (2021): Synthetase of the methyl donor S-adenosylmethionine from nitrogen-fixing α-rhizobia can bind functionally diverse RNA species. In: *RNA biology* 18 (8), S. 1111–1123. DOI: 10.1080/15476286.2020.1829365.

Roesser, J. R.; Yanofsky, C. (1988): Ribosome release modulates basal level expression of the *trp* operon of *Escherichia coli*. In: *The Journal of biological chemistry* 263 (28), S. 14251–14255.

Romilly, Cédric; Deindl, Sebastian; Wagner, E. Gerhart H. (2019): The ribosomal protein S1-dependent standby site in *tisB* mRNA consists of a single-stranded region and a 5' structure element. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116 (32), S. 15901–15906. DOI: 10.1073/pnas.1904309116.

Romilly, Cédric; Lippegaus, Anne; Wagner, E. Gerhart H. (2020): An RNA pseudoknot is essential for standby-mediated translation of the *tisB* toxin mRNA in *Escherichia coli*. In: *Nucleic acids research* 48 (21), S. 12336–12347. DOI: 10.1093/nar/gkaa1139.

Roy, Susmita; Lammert, Heiko; Hayes, Ryan L.; Chen, Bin; LeBlanc, Regan; Dayie, T. Kwaku et al. (2017): A magnesium-induced triplex pre-organizes the SAM-II riboswitch. In: *PLoS computational biology* 13 (3), e1005406. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1005406.

Sallet, Erika; Roux, Brice; Sauviac, Laurent; Jardinaud, Marie-Francoise; Carrère, Sébastien; Faraut, Thomas et al. (2013): Next-generation annotation of prokaryotic genomes with EuGene-P: application to *Sinorhizobium meliloti* 2011. In: *DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes* 20 (4), S. 339–354. DOI: 10.1093/dnares/dst014.

Samal, Areejit; Jain, Sanjay (2008): The regulatory network of E. coli metabolism as a Boolean dynamical system exhibits both homeostasis and flexibility of response. In: *BMC Systems Biology* 2, S. 21. DOI: 10.1186/1752-0509-2-21.

Saramago, Margarida; Peregrina, Alexandra; Robledo, Marta; Matos, Rute G.; Hilker, Rolf; Serrania, Javier et al. (2017): *Sinorhizobium meliloti* YbeY is an endoribonuclease with unprecedented catalytic features, acting as silencing enzyme in riboregulation. In: *Nucleic acids research* 45 (3), S. 1371–1391. DOI: 10.1093/nar/gkw1234.

Scheuer, Robina; Dietz, Theresa; Kretz, Jonas; Hadjeras, Lydia; McIntosh, Matthew; Evguenieva-Hackenberg, Elena (2022): Incoherent dual regulation by a SAM-II riboswitch controlling translation at a distance. In: *RNA biology* 19 (1), S. 980–995. DOI: 10.1080/15476286.2022.2110380.

Schlüter, Jan-Philip; Reinkensmeier, Jan; Barnett, Melanie J.; Lang, Claus; Krol, Elizaveta; Giegerich, Robert et al. (2013): Global mapping of transcription start sites and promoter motifs in the symbiotic α-proteobacterium *Sinorhizobium meliloti* 1021. In: *BMC genomics* 14, S. 156. DOI: 10.1186/1471-2164-14-156.

Schlüter, Jan-Philip; Reinkensmeier, Jan; Daschkey, Svenja; Evguenieva-Hackenberg, Elena; Janssen, Stefan; Jänicke, Sebastian et al. (2010): A genome-wide survey of sRNAs in the symbiotic nitrogen-fixing alpha-proteobacterium *Sinorhizobium meliloti*. In: *BMC genomics* 11, S. 245. DOI: 10.1186/1471-2164-11-245.

Serganov, Alexander; Nudler, Evgeny (2013): A decade of riboswitches. In: *Cell* 152 (1-2), S. 17–24. DOI: 10.1016/j.cell.2012.12.024.

Shahbabian, Karen; Jamalli, Ailar; Zig, Léna; Putzer, Harald (2009): RNase Y, a novel endoribonuclease, initiates riboswitch turnover in *Bacillus subtilis*. In: *The EMBO Journal* 28 (22), S. 3523–3533. DOI: 10.1038/emboj.2009.283.

Sharma, Cynthia M.; Darfeuille, Fabien; Plantinga, Titia H.; Vogel, Jörg (2007): A small RNA regulates multiple ABC transporter mRNAs by targeting C/A-rich elements inside and upstream of ribosome-binding sites. In: *Genes & development* 21 (21), S. 2804–2817. DOI: 10.1101/gad.447207.

Shine, J.; Dalgarno, L. (1974): The 3'-terminal sequence of Escherichia coli 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 71 (4), S. 1342–1346. DOI: 10.1073/pnas.71.4.1342.

Shoeman, Robert; Coleman, Timothy; Redfield, Betty; Greene, Ronald C.; Smith, Albert A.; Saint-Girons, Isabelle et al. (1985): Regulation of methionine synthesis in *Escherichia coli*: Effect of *metJ* gene product and S-adenosylmethionine on the in vitro expression of the *metB*, *metL* and *metJ* genes. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 133 (2), S. 731–739. DOI: 10.1016/0006-291X(85)90965-9.

Silvaggi, Jessica M.; Perkins, John B.; Losick, Richard (2005): Small untranslated RNA antitoxin in *Bacillus subtilis*. In: *Journal of Bacteriology* 187 (19), S. 6641–6650. DOI: 10.1128/JB.187.19.6641-6650.2005.

Simon, R.; Priefer, U.; Pühler, A. (1983): A Broad Host Range Mobilization System for In Vivo Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria. In: *Nat Biotechnol* 1 (9), S. 784–791. DOI: 10.1038/nbt1183-784.

Singh, Shivani S.; Typas, Athanasios; Hengge, Regine; Grainger, David C. (2011): *Escherichia coli* σ^{70} senses sequence and conformation of the promoter spacer region. In: *Nucleic acids research* 39 (12), S. 5109–5118. DOI: 10.1093/nar/gkr080.

Smirnov, Alexandre; Förstner, Konrad U.; Holmqvist, Erik; Otto, Andreas; Günster, Regina; Becher, Dörte et al. (2016): Grad-seq guides the discovery of ProQ as a major small RNA-binding protein. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (41), S. 11591–11596. DOI: 10.1073/pnas.1609981113.

Smit, Maarten H. de; van Duin, Jan (2003): Translational Standby Sites: How Ribosomes May Deal with the Rapid Folding Kinetics of mRNA. In: *Journal of molecular biology* 331 (4), S. 737–743. DOI: 10.1016/S0022-2836(03)00809-X.

Smith, A. A.; Greene, R. C.; Kirby, T. W.; Hindenach, B. R. (1985): Isolation and characterization of the product of the methionine-regulatory gene *metJ* of *Escherichia coli* K-12. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82 (18), S. 6104–6108. DOI: 10.1073/pnas.82.18.6104.

Spinelli, Silvana V.; Pontel, Lucas B.; García Véscovi, Eleonora; Soncini, Fernando C. (2008): Regulation of magnesium homeostasis in Salmonella: Mg(2+) targets the *mgtA* transcript for degradation by RNase E. In: *FEMS microbiology letters* 280 (2), S. 226–234. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2008.01065.x.

Sterk, Maaike; Romilly, Cédric; Wagner, E. Gerhart H. (2018): Unstructured 5'-tails act through ribosome standby to override inhibitory structure at ribosome binding sites. In: *Nucleic acids research* 46 (8), S. 4188–4199. DOI: 10.1093/nar/gky073.

Storz, Gisela; Vogel, Jörg; Wassarman, Karen M. (2011): Regulation by small RNAs in bacteria: expanding frontiers. In: *Molecular cell* 43 (6), S. 880–891. DOI: 10.1016/j.molcel.2011.08.022.

Studer, Sean M.; Joseph, Simpson (2006): Unfolding of mRNA secondary structure by the bacterial translation initiation complex. In: *Molecular cell* 22 (1), S. 105–115. DOI: 10.1016/j.molcel.2006.02.014.

Svensson, Sarah Lauren; Sharma, Cynthia Mira (2021): RNase III-mediated processing of a trans-acting bacterial sRNA and its cis-encoded antagonist. In: *eLife* 10. DOI: 10.7554/eLife.69064.

Thisted, Thomas; Gerdes, Kenn (1992): Mechanism of post-segregational killing by the hok/sok system of plasmid R1. In: *Journal of molecular biology* 223 (1), S. 41–54. DOI: 10.1016/0022-2836(92)90714-U.

Torres-Quesada, Omar; Millán, Vicenta; Nisa-Martínez, Rafael; Bardou, Florian; Crespi, Martín; Toro, Nicolás; Jiménez-Zurdo, José I. (2013): Independent activity of the homologous small regulatory RNAs AbcR1 and AbcR2 in the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. In: *PloS one* 8 (7), e68147. DOI: 10.1371/journal.pone.0068147.

Tramonti, Angela; Canio, Michele de; Biase, Daniela de (2008): GadX/GadW-dependent regulation of the *Escherichia coli* acid fitness island: transcriptional control at the gadY-gadW divergent promoters and identification of four novel 42 bp GadX/GadW-specific binding sites. In: *Molecular microbiology* 70 (4), S. 965–982. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2008.06458.x.

Trotochaud, Amy E.; Wassarman, Karen M. (2005): A highly conserved 6S RNA structure is required for regulation of transcription. In: *Nature structural & molecular biology* 12 (4), S. 313–319. DOI: 10.1038/nsmb917.

Turnbough, Charles L. (2019): Regulation of Bacterial Gene Expression by Transcription Attenuation. In: *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 83 (3). DOI: 10.1128/MMBR.00019-19.

Valverde, Claudio; Livny, Jonathan; Schlüter, Jan-Philip; Reinkensmeier, Jan; Becker, Anke; Parisi, Gustavo (2008): Prediction of *Sinorhizobium meliloti* sRNA genes and experimental detection in strain 2011. In: *BMC genomics* 9, S. 416. DOI: 10.1186/1471-2164-9-416.

van der Vliet, P. C.; Verrijzer, C. P. (1993): Bending of DNA by transcription factors. In: *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 15 (1), S. 25–32. DOI: 10.1002/bies.950150105.

van Hijum, Sacha A. F. T.; Medema, Marnix H.; Kuipers, Oscar P. (2009): Mechanisms and evolution of control logic in prokaryotic transcriptional regulation. In: *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 73 (3), 481-509, Table of Contents. DOI: 10.1128/MMBR.00037-08.

Vanzo, N. F.; Li, Y. S.; Py, B.; Blum, E.; Higgins, C. F.; Raynal, L. C. et al. (1998): Ribonuclease E organizes the protein interactions in the *Escherichia coli* RNA degradosome. In: *Genes & development* 12 (17), S. 2770–2781. DOI: 10.1101/gad.12.17.2770.

Vargas-Blanco, Diego A.; Zhou, Ying; Zamalloa, L. Gregory; Antonelli, Tim; Shell, Scarlet S. (2019): mRNA Degradation Rates Are Coupled to Metabolic Status in *Mycobacterium smegmatis*. In: *mBio* 10 (4). DOI: 10.1128/mBio.00957-19.

Villegas, Andre; Kropinski, Andrew M. (2008): An analysis of initiation codon utilization in the Domain Bacteria - concerns about the quality of bacterial genome annotation. In: *Microbiology* 154 (Pt 9), S. 2559–2661. DOI: 10.1099/mic.0.2008/021360-0.

Vitreschak, Alexey G.; Mironov, Andrei A.; Lyubetsky, Vassily A.; Gelfand, Mikhail S. (2008): Comparative genomic analysis of T-box regulatory systems in bacteria. In: *RNA* 14 (4), S. 717–735. DOI: 10.1261/rna.819308.

Vogel, Jörg; Wagner, E. Gerhart H. (2007): Target identification of small noncoding RNAs in bacteria. In: *Current opinion in microbiology* 10 (3), S. 262–270. DOI: 10.1016/j.mib.2007.06.001.

Wagner, E. Gerhart H.; Unoson, Cecilia (2012): The toxin-antitoxin system *tisB*-istR1: Expression, regulation, and biological role in persister phenotypes. In: *RNA biology* 9 (12), S. 1513–1519. DOI: 10.4161/rna.22578.

Wang, Joy Xin; Lee, Elaine R.; Morales, Dianali Rivera; Lim, Jinsoo; Breaker, Ronald R. (2008): Riboswitches that sense S-adenosylhomocysteine and activate genes involved in coenzyme recycling. In: *Molecular cell* 29 (6), S. 691–702. DOI: 10.1016/j.molcel.2008.01.012.

Wassarman, Karen M.; Saecker, Ruth M. (2006): Synthesis-mediated release of a small RNA inhibitor of RNA polymerase. In: *Science (New York, N.Y.)* 314 (5805), S. 1601–1603. DOI: 10.1126/science.1134830.

Waterhouse, Andrew M.; Procter, James B.; Martin, David M. A.; Clamp, Michèle; Barton, Geoffrey J. (2009): Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis

workbench. In: *Bioinformatics (Oxford, England)* 25 (9), S. 1189–1191. DOI: 10.1093/bioinformatics/btp033.

Waters, Lauren S.; Storz, Gisela (2009): Regulatory RNAs in bacteria. In: *Cell* 136 (4), S. 615–628. DOI: 10.1016/j.cell.2009.01.043.

Weinberg, Zasha; Regulski, Elizabeth E.; Hammond, Ming C.; Barrick, Jeffrey E.; Yao, Zizhen; Ruzzo, Walter L.; Breaker, Ronald R. (2008): The aptamer core of SAM-IV riboswitches mimics the ligand-binding site of SAM-I riboswitches. In: *RNA* 14 (5), S. 822–828. DOI: 10.1261/rna.988608.

Weinberg, Zasha; Wang, Joy X.; Bogue, Jarrod; Yang, Jingying; Corbino, Keith; Moy, Ryan H.; Breaker, Ronald R. (2010): Comparative genomics reveals 104 candidate structured RNAs from bacteria, archaea, and their metagenomes. In: *Genome Biol* 11 (3), R31. DOI: 10.1186/gb-2010-11-3-r31.

Winkler, Wade C.; Breaker, Ronald R. (2003): Genetic control by metabolite-binding riboswitches. In: *Chembiochem : a European journal of chemical biology* 4 (10), S. 1024–1032. DOI: 10.1002/cbic.200300685.

Winkler, Wade C.; Cohen-Chalamish, Smadar; Breaker, Ronald R. (2002): An mRNA structure that controls gene expression by binding FMN. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (25), S. 15908–15913. DOI: 10.1073/pnas.212628899.

Yakhnin, Helen; Babitzke, Paul (2022): Toeprint Assays for Detecting RNA Structure and Protein-RNA Interactions. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 2516, S. 305–316. DOI: 10.1007/978-1-0716-2413-5_16.

Yarnell, W. S.; Roberts, J. W. (1999): Mechanism of intrinsic transcription termination and antitermination. In: *Science (New York, N.Y.)* 284 (5414), S. 611–615. DOI: 10.1126/science.284.5414.611.

Anhang

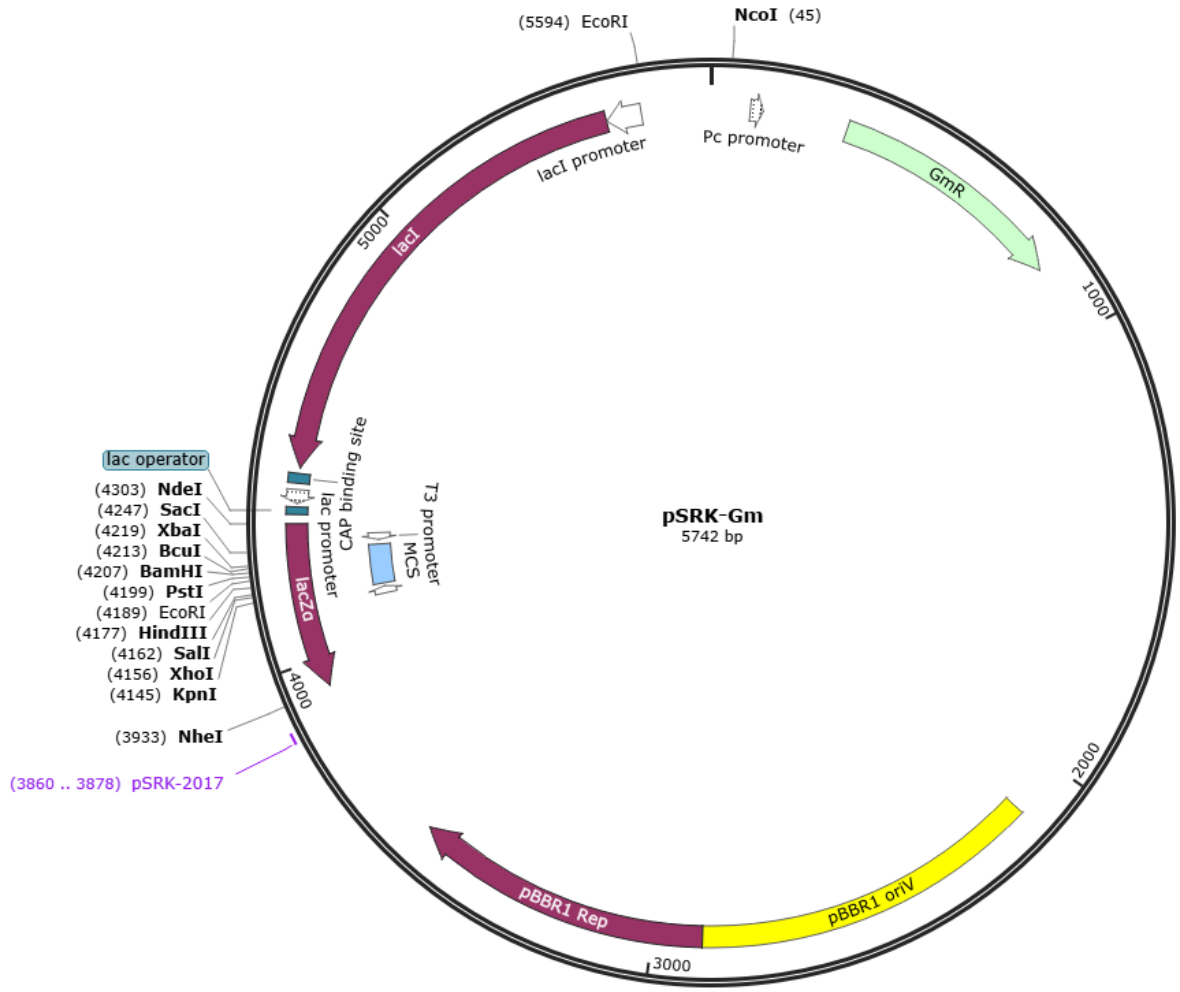

Abbildung 33: Plasmidkarte von pSRK-Gm. Die Lac-Module, die Gentamycinresistenzkassette, und der Replikationsursprung sind eingezeichnet. Die Restriktionsschnittstellen in der *mutliple cloning site* (MCS), sowie die Position des Sequenzierprimers (pSRK-2017) sind angeben. Die Plasmidkarte wurde mit Hilfe von SnapGene® erstellt.

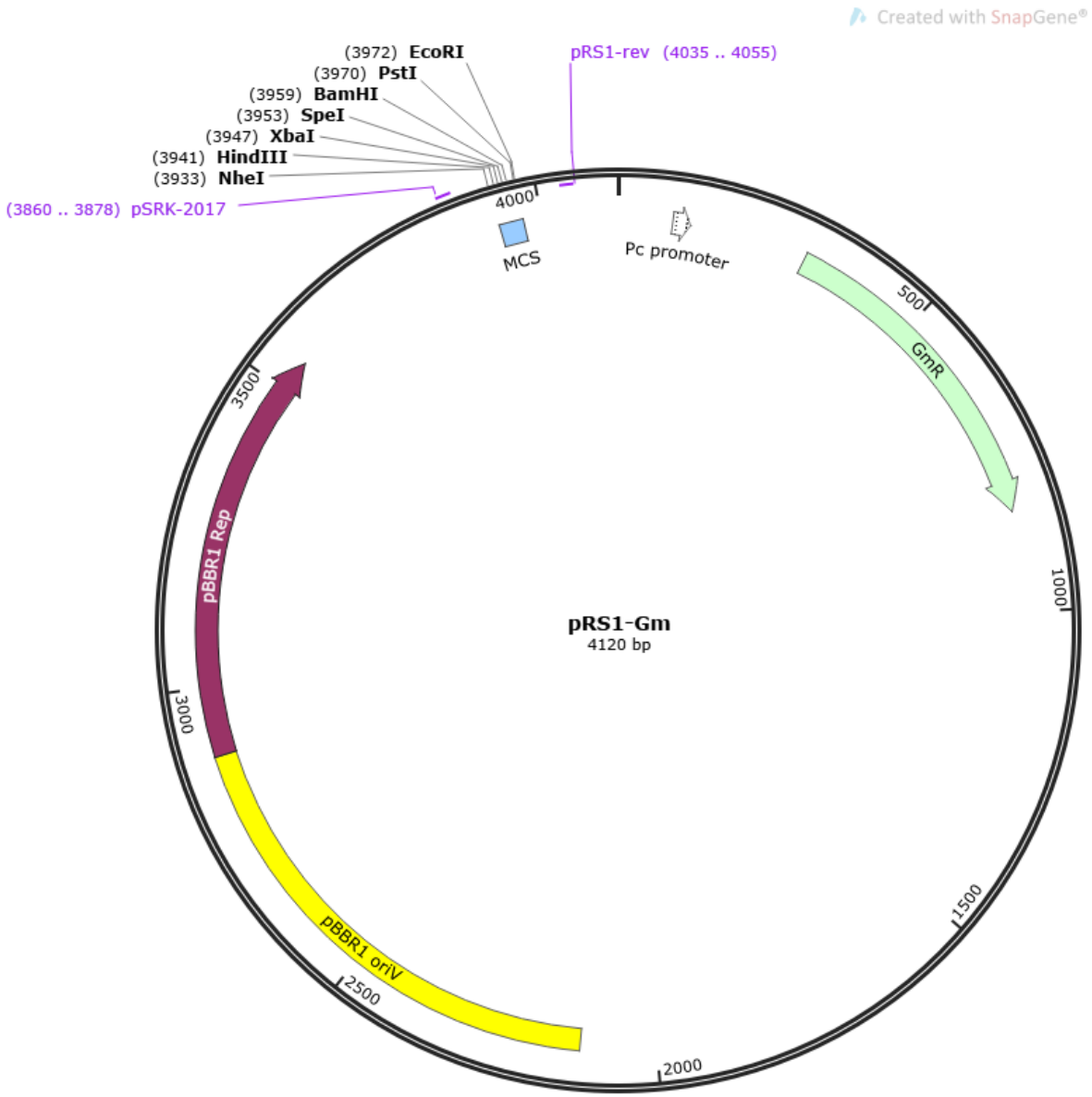

Abbildung 34: Plasmidkarte von pRS1-Gm. Die Gentamycinresistenzkassette, und der Replikationsursprung sind eingezeichnet. Die Restriktionsschnittstellen in der *mutliple cloning site* (MCS), sowie die Position der Sequenzierprimers (pSRK-2017 und pRS1-rev) sind angeben. Die Plasmidkarte wurde mit Hilfe von SnapGene® erstellt.

Tabelle 48: Bestimmung der dynamischen Detektionsbreite der RT-qPCR Reaktion und das lineare Verhältnis zwischen der *egfp* Matrize und den Cq Werten von S100 und P100. Der Stamm *S. meliloti* pCD33-egfp wurde verwendet zur Bestimmung des relativen Verhältnisses Ribosomen-gebundener und -nicht-gebundener *egfp* mRNA. **A** S100 wurde auf 40 ng/µl verdünnt. Das verwendete Volumen für diese Verdünnung wurde ebenfalls für eine Verdünnung von P100 verwendet. Die S100 und P100 Verdünnungen wurden weiter 1:2 verdünnt. **B** P100 wurde auf 40 ng/µl verdünnt. Das verwendete Volumen für diese Verdünnung wurde ebenfalls für eine Verdünnung von P100 verwendet. P100 und S100 Verdünnungen wurden 1:2 verdünnt. Angeben sind die Cq Werte einer RT-qPCR Reaktion mit *egfp* spezifischen Primern.

A

Konzentration (ng/µl) S100	**Cq_{egfp} S100**	**Volumengleich (V_{gleich}) zu S100 Verdünnung**	**Cq_{egfp} P100**
40	23,21	V_{gleich} zu S100 40 ng/µl	15,21
	23,20		15,21
20	24,19	V_{gleich} zu S100 20 ng/µl	14,95
	24,17		15
10	25,08	V_{gleich} zu S100 10 ng/µl	15,46
	25,02		15,57

B

Konzentration (ng/µl) P100	**Cq_{egfp} P100**	**Volumengleich (V_{gleich}) zu P100 Verdünnung**	**Cq_{egfp} S100**
40	15,57	V_{gleich} zu P100 40 ng/µl	26,27
	15,31		26,42
20	16,15	V_{gleich} zu P100 20 ng/µl	27,48
	16,52		27,38
10	17,34	V_{gleich} zu P100 10 ng/µl	28,57
	17,07		28,5

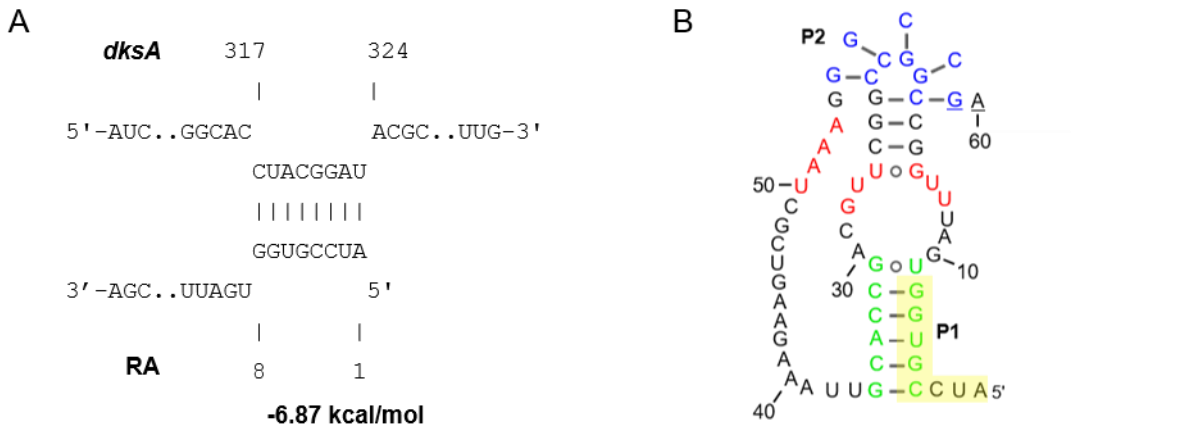

Abbildung 35: Mögliche Interaktion von RA2 und *dksA*. A Mögliche Basenpaarung der Riboswitch sRNA RA2 im codierenden Bereich von *dksA* mRNA vorhergesagt mit Hilfe von IntaRNA 2.0 (Mann et al. 2017). **B** Strukturvorhersage von RA2 im SAM-gebundenen Zustand. Die konservierten Nukleotide des SAM-II Aptamers sind farbig, für detaillierte Beschreibung siehe Abb. 5. Teil der Shine-Dalgarno Sequenz ist dargestellt und unterstrichen. Im P1-Stamm ist gelb hinterlegt der Bereich, der mit *dksA* interagieren könnte.

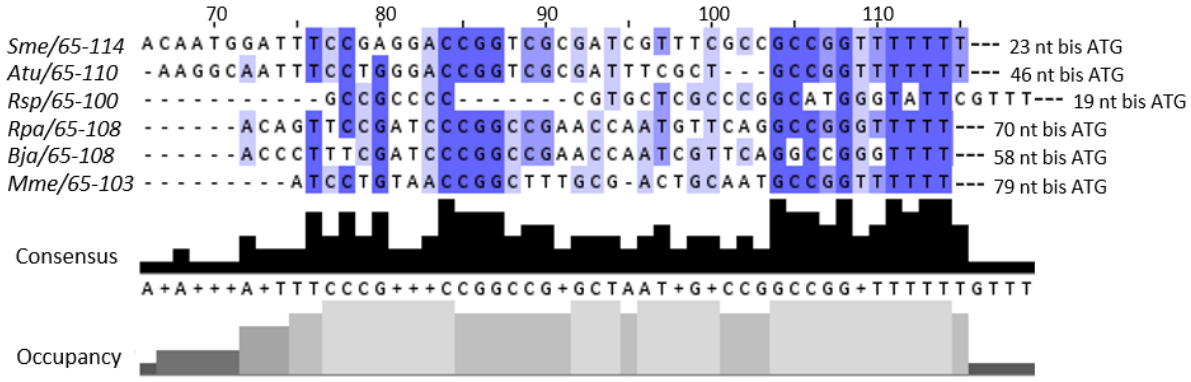

Abbildung 36: konservierte Sekundärstruktur gefolgt von einer Poly-Uracil Region stromabwärts des SAM-II Aptamers. Sequenzvergleich der 5'-UTR des *S. meliltoi metA* Homologs in ausgewählten α-Proteobakterien mit Hilfe von Clustal Omega (Larkin et al. 2007). Die Konservierung wurde mittels Jalview dargestellt (Waterhouse et al. 2009). *Sme*, *Sinorhizobium meliloti* (SM2011_RS30600); *Atu, Agrobacterium tumefaciens* (At12D1_RS12925)*; Rsp, Rhodobacter sphaeroides* (RSKD131_RS06345)*; Rpa, Rhodopseudomonas palustris* (I8G32_RS22915)*; Bja, Bradyrhizobium japonicum* (HXT67_RS39880)*; Mme, Mesorhizobium loti* (C8D77_RS33100)*.*