
**Die Auswirkung von Umwelteinflüssen
auf die mRNA Stabilitäten in
*Rhodobacter sphaeroides***

Globale Untersuchungen der mRNA Halbwertszeiten unter
aeroben, microaeroben und phototrophen Wachstumsbedingungen

Inaugural Dissertation
zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -

vorgelegt von

Dipl. Biol. Yannick Nils Hermanns

geboren am 07.10.1982 in Böblingen

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

Die vorliegende Arbeit wurde angefertigt am Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie des Fachbereiches 08 der Justus-Liebig-Universität Gießen in der Zeit von Januar 2010 bis Dezember 2013 unter der Leitung von Prof. Dr. Gabriele Klug.

1. Gutachterin: Prof. Dr. Gabriele Klug

Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie

2. Gutachterin: PD Dr. Elena Evguenieva-Hackenberg

Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie

Erklärung:

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

Pohlheim, der 30.7.2014

Yannick Hermanns

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis.....	I
1. Einleitung.....	1
1.1. Degradation und Prozessierung von mRNA in Bakterien	1
1.1.1. Ribonukleasen.....	2
1.1.1.1. RNase E.....	4
1.1.1.2. RNase J und RNase Y.....	6
1.1.2. Mechanismen der mRNA Degradation in Bakterien.....	8
1.1.3. Stabilisierende und Destabilisierende Elemente	13
1.2. mRNA Stabilitäten als Mittel der Genregulation	16
1.3. Rhodobacter sphaeroides.....	19
1.4. Zielsetzung.....	20
2. Material und Methoden	22
2.1. Material	22
2.1.1. Bakterienstämme.....	22
2.1.2. Nährmedien	22
2.1.3. Größenstandards für die Gelelektrophorese	22
2.1.4. Oligonukleotide.....	23
2.1.5. Radioaktive Nukleotide.....	24
2.1.6. Enzyme.....	24
2.1.7. Molekularbiologische Kits.....	24
2.2. Mikrobiologische Methoden	25
2.2.1. Flüssigkulturen von <i>Rhodobacter sphaeroides</i> 2.4.1	25
2.2.1.1. Wachstum unter microaeroben Bedingungen	25
2.2.1.2. Wachstum unter aeroben Bedingungen	25
2.2.1.3. Wachstum unter phototrophen Bedingungen	25
2.2.2. Plattenkulturen von <i>R. sphaeroides</i>	25
2.2.3. Experimente zur Bestimmung von RNA-Halbwertszeiten in <i>R. sphaeroides</i>	26
2.3. Molekularbiologische Methoden	27
2.3.1. Isolierung von Nukleinsäuren	27
2.3.1.1. Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>R. sphaeroides</i>	27
2.3.2. DNase I Behandlung und Aufreinigung von Ribonukleinsäuren	27
2.3.3. Quantifizierung von Nukleinsäuren	28
2.3.4. Auftrennung von Nukleinsäuren mittels Gelelektrophorese.....	28
2.3.4.1. Formaldehyd/Agarose-Gelelektrophorese.....	28
2.3.4.2. Polyacrylamid-Harnstoff-Gele zur Auftrennung von RNA	29
2.3.5. Quantifizierung von RNA mittels <i>Northern Blot</i>	29
2.3.5.1. <i>Northern Blot</i> durch Vakuumblot	29

2.3.5.2.	<i>Northern Blot</i> durch Elektroblobt.....	30
2.3.6.	Radioaktive Markierung von Nukleinsäuren.....	30
2.3.6.1.	Radioaktive Markierung durch <i>end labeling</i>	30
2.3.6.2.	Radioaktive Markierung durch <i>random priming</i>	30
2.3.6.3.	Radioaktive Markierung durch <i>in vitro</i> Transkription.....	31
2.3.7.	Aufreinigung radioaktiv markierter Nukleinsäuren.....	31
2.3.8.	Prähybridisierung und Hybridisierung von Membranen mit radioaktiv markierten Sonden.....	32
2.3.9.	Phosphoimaging.....	33
2.3.10.	Strippen von Membranen.....	33
2.3.11.	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	33
2.3.11.1.	Quantitative <i>real time</i> RT-PCR.....	34
2.4.	Transkriptomstudien in <i>R. sphaeroides</i>	35
2.4.1.	Erstellung der <i>R. sphaeroides</i> Microarrays.....	35
2.4.2.	Experimentelles Design.....	36
2.4.3.	Fluoreszenzmarkierung von RNA.....	36
2.4.3.1.	Fluoreszenzmarkierung von RNA mit Agilent <i>Low Input Quick Amp WT Labeling Kit</i>	37
2.4.4.	Bestimmung der <i>label</i> -Effizienz.....	38
2.4.5.	Hybridisieren und Waschen von Microarrays.....	38
2.4.6.	Scannen von Microarrays.....	39
2.4.7.	Normalisierung der Microarrays.....	39
2.5.	Berechnung von Halbwertszeiten.....	40
2.5.1.	Berechnung von Halbwertszeiten aus Microarraydaten.....	41
2.5.2.	Berechnung von Halbwertszeiten aus <i>Northern blot</i> Daten.....	42
2.5.3.	Berechnung von Halbwertszeiten aus <i>real time</i> RT PCR Daten.....	42
3.	Ergebnisse	43
3.1.	Aufarbeitung der Rohdaten und Vergleich der Normalisierungsmethoden.....	43
3.2.	Analyse der Halbwertszeiten aus den Transkriptomdaten.....	49
3.2.1.	Kategorisierung in <i>Clusters of orthologous Groups</i>	51
3.2.2.	Vergleich der Halbwertszeiten in den funktionellen Kategorien.....	55
3.2.2.1.	Vergleich der Medianwerte der Halbwertszeiten.....	55
3.2.2.2.	Über- und Unterrepräsentation von bestimmten Halbwertszeiten in den funktionellen Kategorien.....	57
3.2.2.3.	Verteilung der Halbwertszeiten in den funktionellen Kategorien.....	61
3.2.3.	Vergleich der Halbwertszeiten in den funktionellen Kategorien unter jeweils zwei Wachstumsbedingungen.....	69
3.2.3.1.	Zusammenfassung der Ergebnisse aus Abschnitt 3.2.3.....	102
3.2.4.	Direkter Vergleich der Halbwertszeiten unter jeweils zwei Wachstumsbedingungen.....	103
3.3.	Verifizierung der Microarray-Daten mittels <i>Northern blot</i> und qRT PCR.....	108

4. Diskussion	123
4.1. Aufarbeitung der Rohdaten.....	123
4.2. Halbwertszeiten in <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	123
4.2.1. Halbwertszeiten in Bezug auf die Funktion	126
4.2.2. Einfluss der Wachstumsbedingung auf die Transkripthalbwertszeiten.....	128
4.2.2.1. Halbwertszeiten in Abhängigkeit von der Wachstumsrate – Kategorien L und D.....	129
4.2.2.2. Halbwertszeiten in Kategorie J	134
4.2.2.3. Halbwertszeiten in Kategorie V	135
4.2.2.4. Halbwertszeiten in Kategorie T	135
4.2.2.5. Halbwertszeiten in Kategorie U	138
4.2.2.6. Halbwertszeiten in Kategorie H.....	139
4.2.2.7. Halbwertszeiten in Kategorie I	141
4.2.2.8. Halbwertszeiten in Kategorie PS.....	142
4.2.2.9. Halbwertszeiten kleiner, nicht-kodierender RNAs	144
4.3. Verifizierung der Microarraydaten	145
5. Zusammenfassung	149
6. Referenzen	151
7. Anhang	162
7.1. Datenträger mit den Dateien der Microarray-Analyse.....	167

1. EINLEITUNG

Ribonukleinsäuren (RNA) übernehmen in prokaryotischen und eukaryotischen Zellen vielfältige Funktionen. Eine zentrale Rolle übernimmt RNA als Bindeglied bei der Übersetzung der Erbinformation, kodiert durch die Basensequenz der DNA in die Aminosäuresequenz der Proteine. Die in mRNA (*messenger*) transkribierte Sequenz der DNA wird an den Ribosomen mittels tRNAs (*transfer*) translatiert. Die Ribosomen bestehen als Ribonukleoprotein-Komplexe neben Proteinen ebenfalls aus RNA, der rRNA (*ribosomal*). Die katalytische Wirkung entfaltet bei der Translation allein die RNA-Komponente der Ribosomen, weshalb Ribosomen auch als Ribozyme bezeichnet werden. Die Proteine haben ausschließlich stabilisierende Wirkung. Ribosomale RNA stellt in der Zelle mit ~80 % den größten Anteil der RNA-Moleküle dar, gefolgt von tRNA mit ~15 %. Den geringsten Teil macht mit 5 % mRNA aus. Neben diesen drei Hauptspezies gibt es weitere RNA Moleküle, welche assoziiert mit Proteinen oder alleine meist regulatorische Funktionen übernehmen.

In schnellwachsenden Zellen, wie zum Beispiel Bakterien mit hoher Zellteilungsrate, unterliegt mRNA einem rapiden Umsatz. Eine stete Neusynthese und Degradation von mRNA ist für eine Anpassung an die wechselnden metabolischen Anforderungen während des exponentiellen Wachstums notwendig. Die Zeit, in der ein mRNA Molekül der Zelle zur Translation zur Verfügung steht, deren funktionelle Lebensdauer, ist in Bakterien vergleichsweise kurz. Die mRNA Halbwertszeiten erstrecken sich in der Regel von nur Sekunden bis zu über einer Stunde (Laalami & Putzer, 2011). Im Vergleich dazu kann die Halbwertszeit von mRNA Molekülen in höheren Eukaryoten mehrere Stunden bis zu einem Tag und mehr betragen (Belasco, 2010).

Der Abbau von RNA durch Ribonukleasen (RNasen) hat dabei jedoch nicht nur eine reine Recycling-Funktion, um die Zelle wieder mit freien, zuvor eingebauten Ribonukleotiden zu versorgen. Eine Einflussnahme auf die Stabilität einer mRNA hat auch eine unmittelbare Auswirkung auf den *steady state* Expressionslevel der mRNA des entsprechenden Gens. Somit ist klar, dass die Abundanz einer mRNA nicht alleine auf die Aktivierung oder Inhibition der Transkription zurückzuführen ist.

Ein Abbau-Prozess muss jedoch nicht zwangsläufig zu einem Funktionsverlust einer mRNA führen. Eine Spaltung durch Ribonukleasen kann in einem als Prozessierung oder auch Reifung bezeichneten Prozess erst zu der funktionsfähigen bzw. translatierbaren Form der mRNA beitragen. Eine RNA liegt direkt nach der Transkription als unprozessiertes Primärtranskript vor. Ein solches Primärtranskript kann Bereiche besitzen, welche zur Erfüllung der biologischen Funktion hinderlich sind bzw. die endgültige Funktion gänzlich unterbinden können. Diese Bereiche können durch RNasen abgebaut werden, sodass die Funktionsfähigkeit der RNA gewährleistet ist. Auch kann eine endonukleolytische Spaltung zwischen den offenen Leserahmen (*open reading frames*; ORF) einer polycistronischen mRNA zu Transkripten unterschiedlicher Stabilitäten führen, wodurch zum Beispiel Proteine in unterschiedlichen stöchiometrischen Mengen produziert werden können, obwohl die dafür notwendige mRNA aus einem einzigen Transkriptionsvorgang entstanden ist (Klug & Cohen, 1990, Meinken, 2003, Mader et al., 2004).

1.1. DEGRADATION UND PROZESSIERUNG VON mRNA IN BAKTERIEN

Der Abbau von RNA ist also ein wichtiger Teil des RNA Stoffwechsels und stellt ebenfalls ein Mittel der Genregulation dar. Die Menge an mRNA hat einen direkten Einfluss auf die Translation an den Ribosomen und beeinflusst somit die Syntheserate von Proteinen. Ein schneller Abbau von mRNA dient einer kontinuierlichen Anpassung an die wechselnden Anforderungen einer Zelle an spezifische

Proteine und trägt, da Bakterien ihrer Umwelt unmittelbar ausgesetzt sind, zu einer höheren Fitness in potenziell feindlichen Umgebungen bei.

Der Abbau einer mRNA in Bakterien folgt einer sogenannten Kinetik erster Ordnung, d. h. der Abbau ist von einem Abbaurate bestimmenden, initialen Schritt abhängig. Demnach besteht die effizienteste Möglichkeit den Abbau zu kontrollieren darin, diesen Schritt zu beeinflussen. Dieses „Alles-oder-Nichts“ Muster ist für alle bisher untersuchten Bakterienspezies typisch (Laalami et al., 2014). In den beiden Modellorganismen *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis* ist dieser erste Schritt eine endonukleolytische Spaltung. Dies trifft vermutlich auch viele der bisher bekannten Bakterienspezies zu, für die diese beiden Spezies als Modell dienen (Laalami et al., 2014). In *E. coli* wird diese Spaltung von der Ribonuklease E (RNase E) katalysiert, welche in *E. coli* auch essentiell ist (Carpousis, 2007). Ein *knock-out* des *rne* Gens führt zu einer fünffach verlängerten, mittleren Halbwertszeit der mRNAs (Babitzke & Kushner, 1991). Interessanterweise besitzen viele Bakterienspezies, wie auch *B. subtilis* keine RNase E (Condon & Putzer, 2002). Es wurde jedoch auf Grund RNase E abhängiger Degradation von beispielsweise Aminoacyl-tRNA-Synthetase Transkripten, die man heterolog in *E. coli* exprimiert, vermutet, dass es ein funktionelles Homolog zur RNase E geben musste (Condon et al., 1997). Tatsächlich wurden zwei paraloge RNasen identifiziert, RNasen J1 und J2 (Even et al., 2005). Für RNase J1 konnte später auch eine für Bakterien bis dato unbekannte 5'-3' Exonukleaseaktivität gezeigt werden (Mathy et al., 2007). Jedoch konnte ebenso gezeigt werden, dass RNasen J1 und J2 nicht alleine für eine Abbau-initiiierende Spaltung verantwortlich sein konnten, da ein *knock-out* beider Gene keinen so deutlichen Effekt auf die Stabilität des Großteils der mRNAs wie in *E. coli* hatte (Even et al., 2005). Letztendlich wurde eine RNase identifiziert, die wie RNase E einzelsträngige, AU-reiche Sequenzen in der Nähe von Sekundärstrukturen spaltet und deren *knock-out* die Halbwertszeiten von mRNAs deutlich erhöht: RNase Y (Baker & Mackie, 2003, Hankins et al., 2007, Shahbabian et al., 2009).

RNasen E, J und Y spalten also mRNAs mit ähnlicher Spezifität und haben ebenfalls signifikante Eigenschaften bei der Initiierung des mRNA Abbaus in Bakterien. Jedoch zeigen alle drei RNasen keine Ähnlichkeiten weder in Bezug auf Sequenz noch auf den Mechanismus der katalysierten Spaltung und sind damit ein herausragendes Beispiel für konvergente Evolution. Dies zeigt auch dass die Funktionen dieser Enzyme für den RNA Metabolismus in Bakterien von großer Wichtigkeit sind und obwohl von unterschiedlichen Enzymen katalysiert, der Abbau von mRNA in Bakterien einigen grundlegenden Mustern folgt (Laalami et al., 2014).

Bevor auf diese Prozesse, die zum Abbau von mRNAs führen eingegangen wird, beleuchtet der nächste Abschnitt die wichtigsten Aspekte von Ribonukleasen und gibt einen kurzen Überblick über die drei genannten RNasen E, J und Y.

1.1.1. RIBONUKLEASEN

Ribonukleasen sind Enzyme, die Phosphodiesterbindungen in Ribonukleinsäuren hydrolytisch oder phosphorolytisch spalten. Sie finden sich in allen Organismen, wobei einige essentiell sind. RNasen können in zwei Klassen unterteilt werden, je nachdem an welcher Stelle sie das RNA-Substrat spalten. Dabei erfolgt die Einteilung in Endonukleasen für solche RNasen, die innerhalb des RNA Moleküls schneiden und in Exonukleasen, die entweder vom 5' oder vom 3' Ende der RNA her schneiden und dabei Nukleosidmonophosphate freisetzen. Die hydrolytische Spaltung der Ribonukleinsäure erfolgt dabei nach zwei unterschiedlichen Mechanismen: (1) das Phosphoratom

der Phosphodiesterbindung wird direkt von einem aktivierten Wassermolekül angegriffen und es entsteht entweder ein 5' oder ein 3' Phosphatmonoester, bzw. (2) eine Transphosphorylierungsreaktion, welche zunächst die 2' Hydroxylgruppe der RNA aktiviert und ein zyklisches 2', 3'-Phosphodiester-Intermediat bildet, welches dann in einem zweiten Schritt durch ein aktiviertes Wassermolekül hydrolysiert wird (Pingoud & Meiss, 2005).

RNasen zeigen eine große Bandbreite an Spezifitäten. So sind rein am Abbau beteiligte RNasen größtenteils unspezifisch, wie beispielsweise die *Serratia* Nuklease, welche neben RNA auch DNA spalten kann. Andere RNasen sind basenspezifisch und spalten nur an der 3' Seite von Pyrimidin- oder Guaninbasen. RNasen, die an Reifungsprozessen beteiligt sind, wie zum Beispiel RNase III sind sequenzspezifisch und spalten nur nach bestimmten Erkennungsmerkmalen im RNA-Substrat (Pingoud & Meiss, 2005).

In *E. coli* sind über 20 ribonukleolytisch aktive Enzyme bekannt, einige davon sind für das Überleben essentiell. Ein Teil der in *E. coli* beschriebenen RNasen scheint ubiquitär auch in anderen Bakterienspezies vorzukommen, während wiederum andere RNasen weniger weit verbreitet sind und nur in einigen Bakterienklassen auftreten.

Tabelle 1-1 zeigt einen Vergleich von Ribonukleasen in *E. coli* und im Gram-positiven Modellorganismus *B. subtilis*.

Tabelle 1-1: Vergleich von Ribonukleasen in *E. coli* und *B. subtilis*.

Die unterstrichenen Gene sind im jeweiligen Organismus essentiell. (verändert nach (Condon, 2007))

Enzym	<i>E. coli</i> Gen	<i>B. subtilis</i> Gen	Homologie (Identität/Similarität)
Exoribonukleasen			
PNPase	<i>pnp</i>	<i>pnpA</i>	52/56%
RNase R	<i>rnr</i>	<i>rnr</i>	39/59%
RNase PH	<i>rph</i>	<i>rph</i>	56/73%
RNase II	<i>rnb</i>	-	-
RNase D	<i>rnd</i>	-	-
RNase T	<i>rnt</i>	-	-
Oligo-RNase	<u><i>orn</i></u>	-	-
YhaM	-	<i>yhaM</i>	-
RNase J1	-	<u><i>rnjA</i></u>	-
RNase J2	-	<i>rnjB</i>	-
Endoribonukleasen			
RNase III	<i>rnc</i>	<u><i>rncS</i></u>	36/60%
RNase P	<u><i>rnpAB</i></u>	<u><i>rnpAB</i></u>	36/63%
RNase Z	<i>rbn/elaC</i>	<u><i>rnz</i></u>	47/64%
MazF/EndoA	<i>mazF</i>	<i>ndoA</i>	32/48%
ChpBK	<i>chpBK</i>	-	-
YoeB	<i>yoeB</i>	-	-
RNase E	<u><i>rne</i></u>	-	-
RNase G	<i>rng</i>	-	-
RNase I	<i>rna</i>	-	-
RNase LS	<i>rnIA</i>	-	-
RNase HI	<i>rnhA</i>	-	-
RNase HII	<i>rnhB</i>	<i>rnhB</i>	48/65%
RNase HIII	-	<i>rnhC</i>	-
RNase M5	-	<i>rnmV</i>	-
RNase BSN	-	<i>yurl</i>	-
YhcR	-	<i>yhcR</i>	-
RNase J1	-	<u><i>rnjA</i></u>	-
RNase J2	-	<i>rnjB</i>	-

Es ist ersichtlich, dass von den 20 in *E. coli* beschriebenen RNasen nur acht ebenfalls im Genom von *B. subtilis* kodiert sind. Wiederum gibt es in *E. coli* für in *B. subtilis* essentielle RNasen nicht immer ein entsprechendes Pendant. Dies verdeutlicht, dass sich in den beiden phylogenetisch weit entfernten Organismen unterschiedliche RNasen entwickelt haben, die in ihrer Funktion für den jeweiligen Organismus unabdingbar sind.

Ein weiterer Aspekt von RNasen ist die Tatsache, dass manche sowohl zur Reifung von rRNAs und tRNAs beitragen, aber ebenfalls auch beim Abbau von mRNAs und sRNAs maßgeblich beteiligt sind. Beispielsweise kann die gut untersuchte, essentielle RNase E aus *E. coli* sowohl mRNA, sRNA, tRNA als auch rRNA als Substrat verwenden. Wiederum gibt es RNasen, die nur wenige RNA Spezies zum Substrat haben, wie die ebenfalls in *E. coli* essentielle Oligo-RNase, welche nur am Abbau von mRNAs beteiligt ist (Mackie, 2013).

1.1.1.1. RNase E

Da die meisten Erkenntnisse zu dieser RNase aus *E. coli* stammen, beschränken sich alle folgenden Aussagen auf das Enzym aus diesem Organismus.

Wie eingangs erwähnt ist RNase E in *E. coli* essentiell, da sie unter anderem für die Prozessierung von rRNA Vorläufern zur reifen 5S rRNA benötigt wird (Misra & Apirion, 1979). Das aktive RNase E Enzym ist ein Tetramer aus vier Rne Monomeren und bildet den Kern eines membrangebundenen Multiproteinkomplexes, dem Degradosom (siehe unten). Jedes Rne Monomer besteht aus über 1000 Aminosäureresten, und kann in eine N-terminale katalytische Domäne und eine C-terminale, makromolekulare Interaktionsdomäne gegliedert werden, die für den Aufbau des Degradosoms beteiligt ist. Abbildung 1.1 zeigt eine schematische Darstellung zur Architektur eines Rne Monomers und den Aufbau des Tetramers.

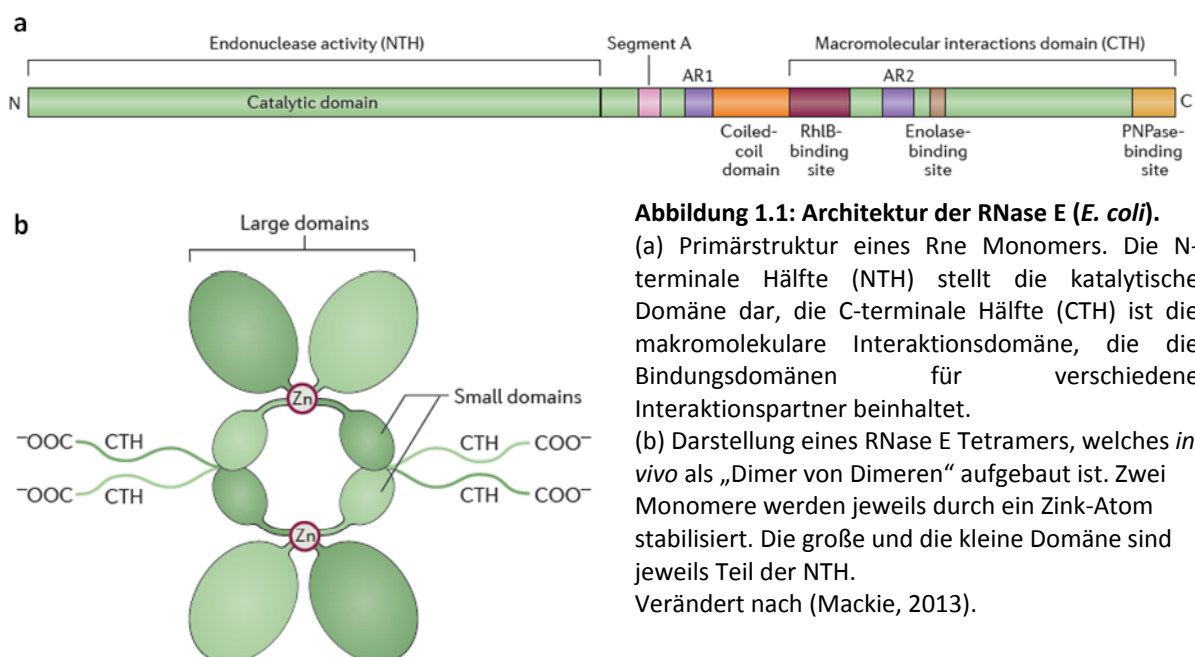


Abbildung 1.1: Architektur der RNase E (*E. coli*).

(a) Primärstruktur eines Rne Monomers. Die N-terminale Hälfte (NTH) stellt die katalytische Domäne dar, die C-terminale Hälfte (CTH) ist die makromolekulare Interaktionsdomäne, die die Bindungsdomänen für verschiedene Interaktionspartner beinhaltet.

(b) Darstellung eines RNase E Tetramers, welches *in vivo* als „Dimer von Dimeren“ aufgebaut ist. Zwei Monomere werden jeweils durch ein Zink-Atom stabilisiert. Die große und die kleine Domäne sind jeweils Teil der NTH.

Verändert nach (Mackie, 2013).

RNase E ist eine relativ unspezifische Endonuklease, die ihr einzelsträngiges mRNA Substrat innerhalb der Sequenz spaltet und dabei jedoch eine Präferenz für AU-reiche Regionen besitzt. Zudem zeigt

RNase E ebenfalls eine Präferenz für monophosphorylierte 5' Enden (Mackie, 1998), ist dabei jedoch nicht vollkommen darauf beschränkt, da einige Substrate auch unabhängig von ihrem Phosphorylierungsgrad gespalten werden können, sogar dann wenn das 5' Ende eine Sekundärstruktur ausbildet (Baker & Mackie, 2003, Hankins et al., 2007). Damit in Zusammenhang stehen die zwei möglichen RNA Degradations Wege für RNase E: der sogenannte 5' Ende abhängige Weg (*5' end-dependent pathway*) und der Weg des direkten Eintritts (*direct entry pathway*), zur näheren Erläuterung siehe Abschnitt 1.1.2. Für die Erkennung des 5' Endes besitzt RNase E eine sogenannte 5' Phosphat Sensortasche in der N-terminalen Domäne, in die eine Monophosphatgruppe des 5' Endes des Substrats binden kann. Diese Tasche ist jedoch vom aktiven Zentrum physikalisch getrennt, beide sind aber in der Lage bei Substratbindung durch eine Konformationsänderung zu kommunizieren, was die 5' Präferenz erklärt (Callaghan et al., 2005, Koslover et al., 2008). Die Aktivität von RNase E unterliegt einer komplexen Regulation, so wird die Konzentration durch einen *feedback loop* kontrolliert, indem RNase E den Abbau der eigenen mRNA moduliert. Weiter ist die Aktivität wie beschrieben abhängig von der Struktur des 5' Endes der zu spaltenden mRNA, und eine Interaktion von RNase E mit dem Chaperon Hfq und kleinen, nichtkodierenden RNAs (sRNAs) spielt eine wichtige Rolle. Zudem wird die Aktivität weiter durch die Regulatoren RraA und RraB (*regulator of RNase activity A and B*) kontrolliert und die Lokalisierung in der Zellmembran und Assoziation mit dem Degradosom kann die Aktivität ebenfalls verändern (Arraiano et al., 2010).

In *R. capsulatus* ist RNase E für den Hauptteil der endonukleolytischen Spaltungen verantwortlich und ist mit der C-terminalen Seite ebenfalls am Aufbau eines Degradosom-ähnlichen Komplexes beteiligt (Jager et al., 2001).

Das Degradosom ist ein membrangebundener, Multiprotein-Komplex, das in mitunter stark unterschiedlicher Form in vielen Bakterien vorkommt und die Degradation von mRNAs durch die Zusammenführung der daran beteiligten Enzyme in einem großen Komplex vereinfacht. Wie erwähnt ist RNase E maßgeblich am Aufbau dieses Komplexes beteiligt, dabei stellt die C-terminale Hälfte sozusagen das Gerüst für den Aufbau des Degradosoms dar. In *E. coli* sind die anderen Komponenten die DEAD-Box RNA-Helikase RhlB, das glykolytische Enzym Enolase und die Polynukleotid-Phosphorylase PNPase (Carpousis, 2007). Abbildung 1.2 zeigt eine schematische Darstellung des Degradosoms in *E. coli*.

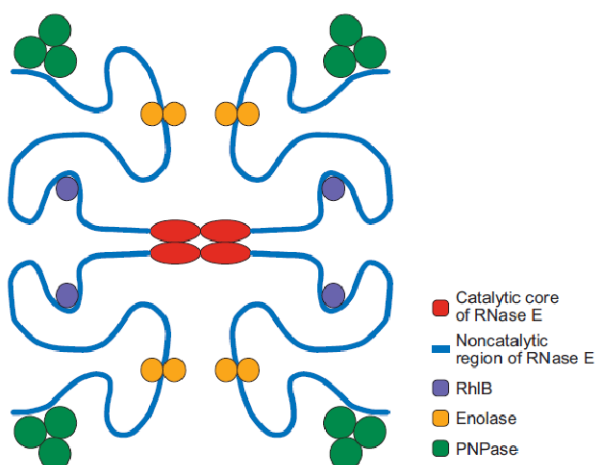


Abbildung 1.2: Modellhafte Darstellung des RNA Degradosoms.

Die Komponenten des Degradosoms sind dargestellt: Katalytische Domäne der RNase E (rot), die nicht-katalytische, makromolekulare Interaktionsdomäne von RNase E (blau), die DEAD-Box Helikase RhlB (violett), die Enolase (gelb) und die Polynukleotid-Phosphorylase PNPase (grün).

Die nicht-katalytische Region von RNase E ist symmetrisch dargestellt, nimmt *in vivo* vermutlich aber eine *coil*-ähnliche Struktur an, die voneinander unabhängig agieren können.

Aus (Carpousis, 2007).

Die PNPase ist eine 3'-5'-Exonuklease, degradiert RNA also von ihrem 3' Ende her, die Besonderheit hierbei ist, dass diese Reaktion keine Hydrolyse sondern eine Phosphorolyse ist. Die räumliche Nähe zur RNase E trägt vermutlich zu einer schnellen und effektiven exonukleolytischen Degradation der mRNA nach der initialen Spaltung durch RNase E bei. Die Funktion der DEAD-Box Helikase RhlE besteht darin, die Degradation komplexerer mRNAs zu erleichtern, indem ein paar wenige Basenpaare in Sekundärstrukturen unter ATP-Verbrauch aufgelöst werden, was das Einfädeln der mRNA in das katalytische Zentrum der PNPase vereinfacht (Liou et al., 2002, Carpousis, 2007). Die Funktion des glykolytischen Enzyms Enolase im Degradosom ist bisher nicht vollkommen geklärt. Vermutet wird, dass dieses Enzym möglicherweise als Sensor dient, der den energetischen Zustand der Zelle mit der mRNA Degradation verbindet, indem der Abbau von mRNAs bestimmter Enzyme des Energiestoffwechsels beeinflusst wird (Bernstein et al., 2004).

Die N-terminale Domäne von RNase E ist in Bakterien stark konserviert, nicht so die C-terminale Domäne. Dieser Befund spricht dafür, dass der Aufbau eines Degradosom-ähnlichen Komplexes in anderen Bakterien nicht immer gleich ist und andere Komponenten teilhaben können. In der Tat ist die Zusammensetzung des Degradosoms in der Gruppe der Enterobakterien weitestgehend gleich (Kaberdin et al., 2011), in anderen Bakterienspezies zeigt die Zusammensetzung jedoch größere Variabilität. In *R. capsulatus* konnte ebenfalls ein mRNA degradierender Komplex identifiziert werden, welcher sich neben der obligatorischen RNase E weiter aus zwei RNA Helikasen und dem Terminationsterminator Rho zusammensetzt, die PNPase spielt in diesem Komplex jedoch nur eine sehr kleine, nicht-stöchiometrische Rolle (Jager et al., 2001). Die Zusammensetzung des Degradosoms bzw. des Degradosom-ähnlichen Komplexes kann sich interessanterweise auch innerhalb eines Organismus verändern. So konnte ebenfalls in *R. capsulatus* gezeigt werden, dass sich die Komposition und die Aktivität des Komplexes in Abhängigkeit von Sauerstoff verändert, so stieg die Menge des assoziierten Rho unter aeroben Bedingungen stark an, während die Level der beiden Helikasen abnahm. Weiter degradierte das Degradosom in aerob angezogenen *R. capsulatus* Kulturen ein Transkript des *puf* Operons schneller als eines aus einer microaeroben Kultur (Jager et al., 2004b).

1.1.1.2. RNase J UND RNase Y

Wie bereits unter 1.1 erwähnt, besitzen viele Bakterien, darunter die meisten Gram-positiven, kein RNase E Homolog. Dennoch haben sich ganz ähnliche Degradationsmechanismen entwickelt, die allerdings von strukturell und mechanistisch unterschiedlichen Enzymen katalysiert werden. So wurden in *B. subtilis* die zwei paralogen Ribonukleasen RNase J1 und J2 entdeckt, deren Spaltungsaktivität äquivalent zur RNase E ist, zusätzlich aber auch eine 5'-3' Exonukleaseaktivität aufzeigt.

Die Exonukleaseaktivität von RNase J1 ist deutlich von monophosphorylierten 5' Enden oder 5' OH-Gruppen abhängig, wird von triphosphorylierten 5' Enden von Primärtranskripten jedoch stark inhibiert. Dahingegen scheint die Endonuklease-Aktivität nicht vom Phosphorylierungszustand des 5' Endes abhängig zu sein (Even et al., 2005, Mathy et al., 2007, Li de la Sierra-Gallay et al., 2008). In *B. subtilis* ist nur J1 essentiell, beide liegen *in vivo* jedoch meist als Heterodimer vor (Even et al., 2005). Interessanterweise ist die endonukleolytische Aktivität und Spezifität des heterodimeren Komplexes im Vergleich zu den individuellen Enzymen leicht unterschiedlich (Mathy et al., 2010). Unterschiede zwischen J1 und J2 zeigen sich darin, dass die exonukleolytischen Aktivität von J1 etwa

200 bis 300-mal höher ist als von J2, ein Unterschied in der endonukleolytischen Aktivität war jedoch bisher nicht feststellbar (Mathy et al., 2010).

RNase J gehört zur β -CASP Unterfamilie der Metallo- β -Lactamasen und besteht aus 3 Hauptdomänen: eine β -Lactamasedomäne, eine β -CASP Domäne und eine C-terminale Domäne, die durch eine flexible Bindung an die β -Lactamasedomäne gebunden ist (Laalami & Putzer, 2011). Das Enzym besitzt ein einziges aktives Zentrum, in welchem beide Nukleaseaktivitäten katalysiert werden. Abbildung 1.3 zeigt die Struktur der RNase J aus *Thermus thermophilus*.

Es wurde vermutet, dass RNase J die Rolle von RNase E in solchen Bakterien übernimmt, in denen RNase E fehlt. Die Rolle von RNase J bei der Initiierung der Degradation ist jedoch bisher noch nicht geklärt. Da es bei der J1/J2 Doppelmutante in *B. subtilis* jedoch zu einer Anhäufung von 3' mRNA Fragmenten kommt, welche oftmals auf Terminatoren zurückgehende, stabile *hairpin* Strukturen enthalten, ist davon auszugehen, dass RNase J erheblich zur Degradation dieser Strukturen beiträgt (Mader et al., 2008).

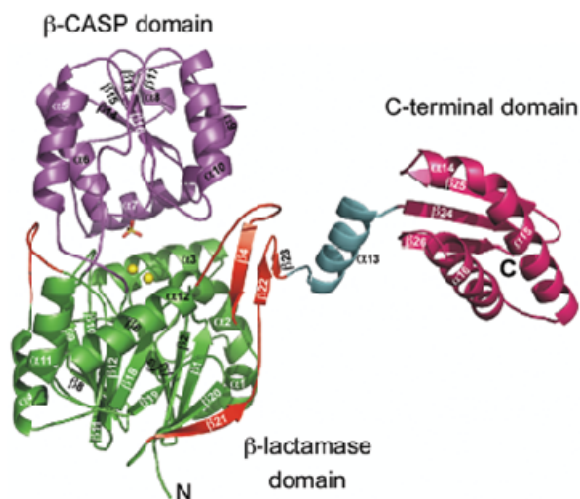


Abbildung 1.3: Struktur des RNase J Monomers aus *T. thermophilus*.

Die beiden Zink Ionen sind als gelbe Kugeln dargestellt, N und C stehen für das amino- und carboxyterminale Ende des Proteins.

Aus (Laalami & Putzer, 2011).

R. sphaeroides besitzt sowohl RNase E als auch RNase J. Die 5'-3' Exonukleaseaktivität konnte nachgewiesen werden, eine endonukleolytische Funktion jedoch noch nicht. RNase J scheint hier eine Rolle bei der Reifung von rRNA 5' und 3' Enden zu spielen (Rische & Klug, 2012) und nach neuesten RNA-seq Daten zu urteilen, wird die RNase J Funktion hauptsächlich für sehr spezifische Prozessierungs- und Degradationsschritte benötigt, da durch ein Fehlen der RNase J nur sehr wenige Transkripte betroffen sind (Rische-Grahl et al., 2014).

Die Endoribonuklease RNase Y wurde erst kürzlich in *B. subtilis* entdeckt und hat bestechende funktionelle Ähnlichkeiten mit RNase E und eine Depletion dieser RNase hat gleichsam einen globalen Effekt auf die mRNA Halbwertszeiten, welche sich in etwa verdoppeln (Shahbadian et al., 2009). RNase Y spaltet ebenfalls in AU-reichen Sequenzen, die von einer stabilisierenden Sekundärstruktur flankiert sind, die transkriptionelle Attenuatoren enthalten, wie sie beispielsweise in 5' untranslatierten Bereichen vorkommen, und zeigt eine Präferenz für 5' Monophosphate. *In vivo* scheint es jedoch so zu sein, dass RNase Y mRNA auch effizient spalten kann, ohne auf ein 5' Monophosphat angewiesen zu sein. Welche Substrate letztendlich von RNase Y erkannt und gespalten werden und in welchem Ausmaß RNase Y mit RNase J um die Bindung solcher Substrate konkurriert, ist bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt und benötigt weitere Untersuchungen (Laalami et al., 2014).

1.1.2. MECHANISMEN DER mRNA DEGRADATION IN BAKTERIEN

Da die meisten Untersuchungen über bakterielle mRNA Degradation in *E. coli* stattfanden, basierten die grundlegenden Modelle zu diesem Vorgang nahezu ausschließlich auf diesen Befunden und darauf, welche RNasen in diesem Organismus vorhanden waren. Da *E. coli* mehrere Endo- und 3' Exonukleasen enthält (siehe Tabelle 1-1), aber keine 5'-3' Exonuklease und 3' Enden typischerweise durch *hairpin* Sekundärstrukturen vor exonukleolytischem Abbau aus dieser Richtung geschützt sind, wurde postuliert, dass die Degradation einer mRNA mit einer endonukleolytischen Spaltung an einer oder mehreren Stellen innerhalb des Transkriptes beginnen muss (Abbildung 1.4). Diese erste Spaltung, welche gleichzeitig auch den Abbaurate bestimmenden Schritt darstellt, hat das Auftreten mehrerer instabiler mRNA Fragmente zur Folge, die dann anfällig für 3' exonukleolytischen Abbau sind. Für die stabilen 3' Fragmente wiederum wiederholt sich der Kreislauf aus endonukleolytischer Spaltung gefolgt von exonukleolytischem Abbau. Wie bereits erwähnt ist RNase E in *E. coli* für den ersten, internen Spaltungsschritt verantwortlich.

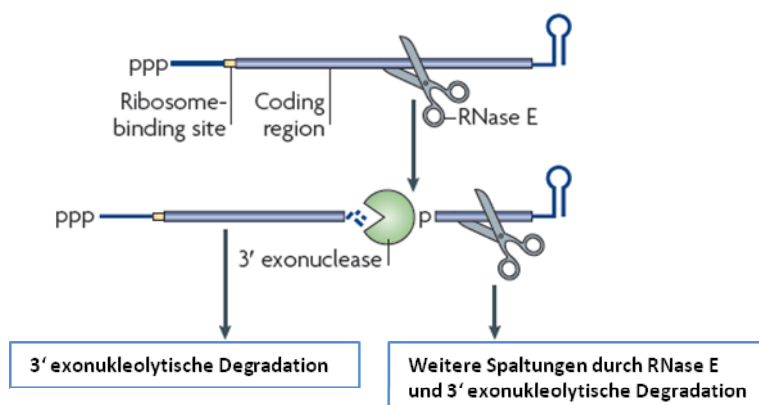


Abbildung 1.4: Vereinfachtes Modell der RNA Degradation in *E. coli*.

Interne Spaltung durch RNase E generiert mRNA Fragmente, die keine stabilisierende 3' Strukturen besitzen und so anfällig für 3' exonukleolytischen Abbau durch Exonukleasen sind (z.B. PNPase, RNase II, RNase R). Transkriptfragmente mit intaktem 3' Ende widerstehen diesem Abbau und werden erneut von RNase E gespalten.

Verändert nach (Belasco, 2010).

Als die wichtigsten 3' Exonukleasen wurden die Polynukleotidphosphorylase PNPase, RNase II, RNase R und die Oligoribonuklease identifiziert, die die Fragmente mit ungeschützten 3' Enden abbauen. RNase E und PNPase befinden sich wie beschrieben zusammen im Degradosom-Komplex. Dieses Modell konnte jedoch nicht erklären, wie 3' Sekundärstrukturen entweder am Ende des Transkriptes oder auch *upstream* der RNase E Spaltungsstelle abgebaut werden oder warum das *downstream* Fragment der initialen Spaltung instabiler ist als das ursprüngliche 3' Ende der intakten mRNA (von Gabain et al., 1983). Dieses Modell wurde erweitert als man erkannte, welche wichtige Rolle eine Polyadenylierung durch die Poly(A)-Polymerase (PAP) beim mRNA Abbau spielt (Xu et al., 1993). Diese Studie zeigte, dass sich die Halbwertszeit des RNA I Transkriptes, ein *antisense* Repressor für die Replikation des ColE1-Plasmids, nach initialer RNase E Spaltung deutlich verlängerte wenn keine posttranskriptionale Polyadenylierung stattfand. Es stellte sich weiterhin heraus, dass eine solche Polyadenylierung von bakteriellen mRNAs von grundlegender Bedeutung für einen 3' exonukleolytischen Abbau von Sekundärstrukturen ist (Belasco, 2010). PNPase, RNase II und RNase R sind eigentlich nicht in der Lage, doppelsträngige Sekundärstrukturen zu lösen und abzubauen. Ein Poly(A)-Schwanz ermöglicht diesen Enzymen aber einen wiederholten Angriff des 3' Endes, wobei die Sekundärstruktur sukzessive mit abgebaut wird (Review in (Regnier & Hajnsdorf, 2009)). Interessanterweise ist für den Vorgang nicht alleine die PAP verantwortlich. Da die PNPase nahe am Gleichgewicht zwischen Phosphorolyse und Oligonukleotid Polymerisation arbeitet, können von diesem Enzym beide Reaktionen in Abhängigkeit von inorganischem Phosphat (P_i) katalysiert werden.

Bei hoher Konzentration degradiert die PNPase RNA, was der Normalfall ist, da die intrazelluläre P_i Konzentration hoch ist. Bei geringer P_i Konzentration kann die PNPase aber ebenfalls die Polymerisation von RNA unter Verbrauch von (Ribo)Nukleotiddiphosphaten (NDPs) katalysieren (Mohanty & Kushner, 2000). Abbildung 1.5 gibt einen Überblick über diesen konzertierten Abbau von mRNA Substraten, deren 3' Enden durch Sekundärstrukturen stabilisiert sind. Die abzubauen mRNA wird wie beschrieben in einem ersten Schritt intern durch RNase E in einer AU-reichen Sequenz gespalten. Das dabei von der Spaltstelle 5' gelegene Fragment wird dann von 3' Exonukleasen sukzessive abgebaut, bis die Exonukleasen eine stabilisierende, doppelsträngige Struktur erreichen und das Substrat nicht mehr binden können. Das ursprüngliche 3' Fragment unterliegt weiteren Spaltungen durch RNase E, wenn weitere Erkennungssequenzen vorhanden sind. Die 3' stabilisierten Fragmente werden dann durch die PAP polyadenyliert, sodass ein weiterer 3'-5' gerichteter exonukleolytischer Abbau stattfinden kann und die stabilisierenden Sekundärstrukturen schrittweise mit abgebaut werden.

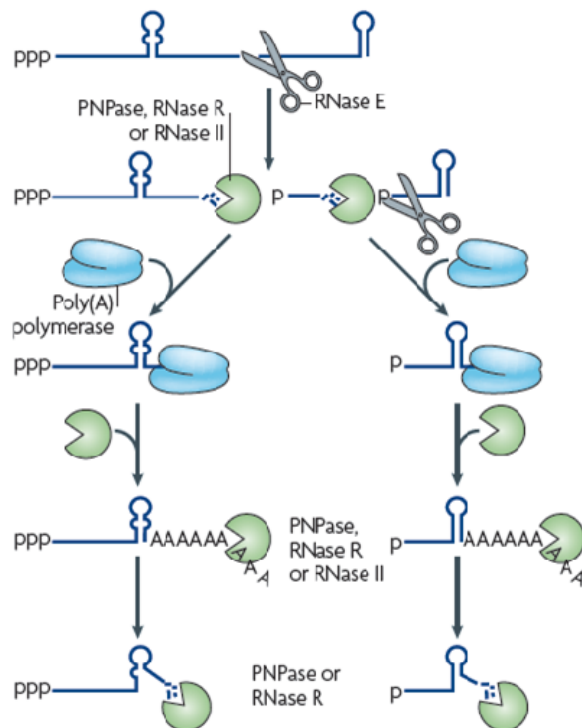


Abbildung 1.5: Erweitertes Modell der RNA Degradation in *E.coli*. 3' exonukleolytischer Abbau wird durch Polyadenylierung des 3' Endes erleichtert.

Die durch endonukleolytische Spaltung durch RNase E entstandenen Fragmente untergehen 3' exonukleolytischen Abbau durch PNPase, RNase R/RNase II bis sie entweder abgebaut sind oder eine stabilisierende Sekundärstruktur erreicht wird, die weiteren Abbau verhindert, da diese RNasen ungepaarte 3' Enden vorziehen. Diese Fragmente und das ursprüngliche 3' Fragment werden dann durch die Poly(A)-Polymerase polyadenyliert, wodurch sie wieder durch die genannten Exonukleasen angreifbar sind. Durch Wiederholung dieses Vorgangs können Sekundärstrukturen Schritt für Schritt überwunden werden. Des Weiteren leistet die im Degradosom enthaltene Helikase ebenfalls einen wichtigen Beitrag zur Auflösung dieser Strukturen (hier nicht gezeigt)

Aus (Belasco, 2010).

Wie unter 1.1.1.1 bereits erläutert, besitzt RNase E eine Präferenz für mRNAs mit 5' monophosphorylierten Enden. Diese Präferenz beruht auf der 5' Phosphat Sensortasche im N-terminalen Teil. Es ist bisher nicht vollkommen geklärt, welche funktionelle Rolle diese Tasche spielt und wie die beobachtete Konformationsänderung der RNase E bei Bindung eines 5' Phosphats hervorgerufen wird (Koslover et al., 2008), jedoch erhöht sich die Affinität zum Substrat und/oder die V_{max} der RNase E um ein Vielfaches. Als Folge werden 5' monophosphorylierte Substrate schneller und effizienter degradiert als solche mit einem Triphosphat am 5' Ende (Jiang & Belasco, 2004, Jourdan & McDowall, 2008). Diese Form des Abbaus wird 5' Enden-abhängiger Abbauweg (*5' end-dependent pathway*) genannt und ist in Abbildung 1.6 schematisch dargestellt. Ein Primärtranskript trägt am 5' Ende immer ein Triphosphat, bevor RNase E also diesen Weg des Abbaus initiieren kann, muss dieses Triphosphat in ein Monophosphat gewandelt werden. Dieser Schritt wird von der Pyrophosphorylase RppH katalysiert. Wie RNase E bevorzugt dieses Enzym einzelsträngige 5' Enden,

was den stabilisierenden Effekt von Sekundärstrukturen am 5' Ende von mRNAs erklärt (Emory et al., 1992). Eine Inaktivierung von RppH hat in *E. coli* jedoch nur einen Effekt auf etwa 10% aller mRNAs (Deana et al., 2008). Dies legt den Schluss nahe, dass der Abbau der Mehrzahl der Transkripte durch den sogenannten direkten Eintritt (*direct entry pathway*) der RNase E initiiert wird (siehe Abbildung 1.6).

Der Weg des direkten Eintritts besteht prinzipiell aus dem bereits geschilderten Vorgang der internen Spaltung unabhängig vom 5' Ende. Der genaue Mechanismus dieses Weges ist allerdings noch nicht vollkommen verstanden. *In vitro* und kristallografische Daten deuten darauf hin, dass eine gewisse Flexibilität des RNase E Tetramers und der katalytischen Region die Bindung von strukturierten Substraten auch ohne die Erkennung des 5' Endes erlaubt (Koslover et al., 2008). In einer weiteren Studie wurde ein auf kinetischen Daten basierendes Modell vorgeschlagen, in dem RNA Substrate mit mehreren einzelsträngigen Bereichen gleichzeitig an zwei oder mehr Untereinheiten des RNase E Tetramers ohne Beteiligung des 5' Endes binden können (Kime et al., 2010). *In vivo* Studien hingegen weisen stark darauf hin, dass die C-terminale Region eine Rolle zu spielen scheint. Dieser Bereich hat keine katalytische Funktion und die Entfernung hat keinen großen Effekt auf die Stabilität des Großteils der mRNAs. Allerdings scheint dieser Teil am schnellen Abbau untranslatierter mRNAs beteiligt zu sein (Leroy et al., 2002) und ebenfalls einen Effekt auf die Selbstregulation der *rne* Expression zu haben, da die *rne* mRNA in einer Mutante mit deletierter C-terminaler Region der RNase E stabiler ist (Jiang et al., 2000). Es konnten jedoch weder individuelle Domänen des C-terminalen Bereichs identifiziert werden, die diesen Abbauweg eindeutig betreffen, noch scheinen die Komponenten des Degradosoms, die mit der C-terminalen Region interagieren den Weg des direkten Eintritts zu beeinflussen (Laalami et al., 2014).

Die Inaktivierung beider Abbauwege *in vivo* ist letal (Anupama et al., 2011, Garrey & Mackie, 2011), wie beschrieben ist die Folge der Inaktivierung nur eines der Abbauwege lediglich ein verlangsamtes Wachstum. RNase E kann also ihre essentielle Funktion durch jeweils einen der beiden Wege erfüllen, was die Schlussfolgerung zulässt, dass diese Wege deutlich überlappen. Die Inhibition des einen Weges resultiert also in der Übernahme des Abbaus mittels des anderen Weges, wenn auch langsamer (Bouvier & Carpousis, 2011).

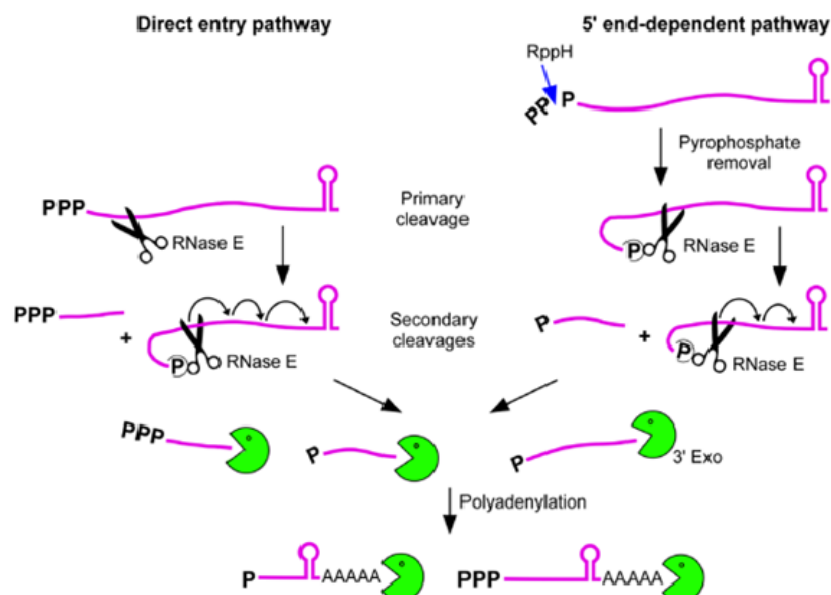


Abbildung 1.6: Vergleich der beiden Wege, wie RNase E den Abbau der mRNA initiieren kann.

Beim direkten Eintritt (*direct entry pathway*) wird das triphosphorylierte 5' Ende nicht in der Sensortasche von RNase E gebunden und die erste Spaltung kann unabhängig vom 5' Ende weiter innerhalb der mRNA stattfinden. Das *upstream* gelegene Fragment wird dann wie beschrieben schnell durch Exonukleasen abgebaut, während das *downstream* gelegene, 3' stabilisierte Fragment durch wiederholte Polyadenylierung und exonukleolytischen Abbau degradiert wird bzw. durch weitere Spaltungen durch RNase E weiter abgebaut, welche nun die entstanden 5' Enden erkennen und binden kann.

Der zweite Weg ist abhängig vom 5' Ende der mRNA und beginnt mit der Entfernung eines Pyrophosphats durch die Pyrophosphohydrolase RppH, sodass ein monophosphoryliertes 5' Ende vorliegt. Dieses Ende wird in der Sensortasche der RNase E erkannt, was diese wiederum an das 5' Ende bindet und eine *downstream* gelegene, gleichgeartete Spaltung wie oben beschrieben nach sich zieht. Der weitere Abbau der mRNA Fragmente erfolgt dann gleich dem bereits beschriebenen Weg.

Aus (Laalami et al., 2014).

Für die mRNA Degradation in *B. subtilis* wurde lange angenommen, dass sie ähnlich wie in *E. coli* verläuft. Diese These wurde aber durch die Tatsache widerlegt, dass es keine RNase E gibt (siehe 1.1 und 1.1.1.2). Ein weiteres Charakteristikum der mRNA Degradation in *B. subtilis* ist der teils dramatische Effekt von 5' stabilisierenden Elementen wie z.B. gebundene oder blockierte Ribosomen. Diese Blockaden haben einen signifikant positiven Effekt auf die Stabilität des *downstream* gelegenen Bereichs der mRNA, aber keinen auf den *upstream* gelegenen (Review in (Condon, 2007) und (Condon & Bechhofer, 2011)). Dies wurde durch einen Abbau in 5'-3' Richtung erklärt und bestätigte sich durch den Befund, dass RNase J neben einer endonukleolytischen Aktivität auch eine 5'-3' Exonukleaseaktivität aufweist (siehe 1.1.1.2). Das Vorhandensein einer solchen Exonuklease hat dementsprechend Auswirkungen auf den mRNA Abbaumechanismus in *B. subtilis*. Dennoch unterscheidet dieser sich nicht grundlegend von den in *E. coli* beschriebenen, nur die beteiligten Enzyme sind unterschiedlich.

Der Weg des direkten Eintritts ist ähnlich wie in *E. coli*, allerdings hauptsächlich abhängig von RNase Y und in etwas geringerem Maße von RNase J1/J2. Eine Bindung oder Interaktion mit dem 5' Ende ist dabei nicht vonnöten. Das entstehende *upstream* Fragment wird in Folge ebenfalls von 3' Exonukleasen abgebaut, hauptsächlich durch PNPase. Das monophosphorylierten *downstream* Fragmente werden von RNase J dann vom 5' Ende her bis zum 3' Ende exonukleolytisch abgebaut. Diese 5'-3' exonukleolytische Aktivität ist auch dahingehend hilfreich, als dass durch Sekundärstrukturen vor 3' exonukleolytischen Abbau geschützte mRNA Fragmente abgebaut werden können. In *B. subtilis* existiert keine PAP, jedoch wurden lange (ca. 40 nt) A-reiche Schwänze an Degradationsintermediaten gefunden (Campos-Guillen et al., 2005). Welches Enzym dies katalysiert ist bis heute ungeklärt. In *E. coli* sind kurze A-Schwänze von nur fünf Nukleotiden ausreichend, 3' Sekundärstrukturen durch Exonukleasen angreifbar zu machen (Blum et al., 1999). Ob die längeren, heteromeren Schwänze in *B. subtilis* ebenfalls einen 3' exonukleolytischen Abbau erleichtern, ist bisher ebenfalls nicht geklärt, vermutlich aber erfüllen sie eine andere Aufgabe im RNA Metabolismus (Laalami et al., 2014).

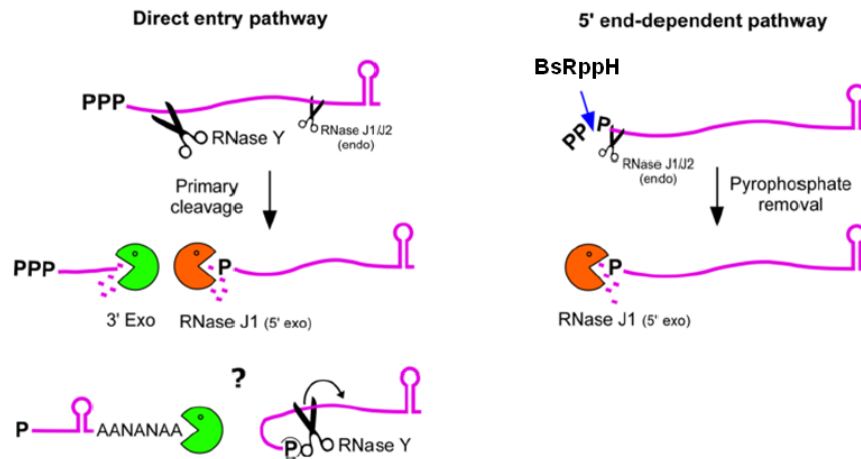


Abbildung 1.7: RNA Degradation in *B. subtilis*.

Auch in *B. subtilis* sind zwei prinzipielle Wege der Degradation bekannt, die zu den in *E. coli* beschriebenen ähnlich sind, sich aber in den Enzymen unterscheiden. Beim Weg des direkten Eintritts (*direct entry pathway*) wird die initiale Spaltung durch RNase Y und in geringerem Maße von RNase J1/2 katalysiert. Der primären Spaltung folgt dann ein 3' exonukleolytischer Abbau des *upstream* Fragments, hauptsächlich katalysiert durch die Polynukleotidphosphorylase. Das monophosphorylierte *downstream* Fragment wird dann durch RNase J1 exonukleolytisch in 5'-3' Richtung abgebaut.

Beim 5' Enden-abhängigen Weg (*5' end-dependent pathway*) erfolgt wie in *E. coli* zunächst die Abspaltung eines Pyrophosphats vom triphosphorylierten Ende des Primärtranskriptes durch die Pyrophosphohydrolase RppH (BsRppH). Das monophosphorylierte Produkt wird dann durch RNase J1 vom 5' Ende her exonukleolytisch abgebaut.

Das Fragezeichen symbolisiert die ungeklärte Rolle von beobachteten heterogenen, A-reichen Schwänzen am 3' Ende von einigen Degradationsintermediaten, sowie die ebenfalls nicht geklärte Konkurrenz der RNase Y mit RNase J1 um monophosphorylierte 5' Enden.

Verändert nach (Laalami et al., 2014).

Ähnlich wie in *E. coli* geht dem Degradationsweg, der vom 5' Ende abhängig ist eine Umwandlung des triphosphorylierten 5' Endes des Primärtranskriptes durch Abspaltung eines Pyrophosphats voraus. Danach erfolgt in der Regel jedoch kein weiterer Abbau durch RNase Y. Hierbei unterscheidet sich der Weg in *B. subtilis* von dem in *E. coli*. Das nun monophosphorylierte Ende wird dann durch RNase J1 5' exonukleolytisch abgebaut. Die Präferenz für Monophosphate am 5' Ende erklärt sich durch die unmittelbare Nähe der Monophosphatbindetasche zum aktiven Zentrum mit einer Entfernung von nur einem Nukleotid (Li de la Sierra-Gallay et al., 2008).

Eine alternative Möglichkeit dieses Abbauweges besteht in der Fähigkeit der RNase J1, *in vivo* sehr nah am 5' Ende endonukleolytisch zu spalten. Bei diesem Mechanismus „gleitet“ das native 5' triphosphorylierte Transkript am aktiven Zentrum vorbei, da das Triphosphat sterisch nicht in die Monophosphatbindetasche hineinpasst und wird dann endonukleolytisch irgendwo nach den ersten Nukleotiden gespalten. Diese Art Mechanismus wird auch „gleitende Endonuklease“ (*sliding endonuclease*) genannt (Dorleans et al., 2011, Taverniti et al., 2011). Diese Art der Spaltung ist naturgemäß anfällig gegenüber Sekundärstrukturen und inwieweit diese Funktionsweise der RNase J *in vivo* eine signifikante Rolle spielt ist ungeklärt.

Wie RNase J und RNase E hat auch RNase Y eine Präferenz für 5' monophosphorylierte mRNA Substrate. In welchem Ausmaß aber RNase Y mit RNase J *in vivo* um die Bindung monophosphorylierter Substrate konkurriert, ist ebenfalls nicht bekannt.

1.1.3. STABILISIERENDE UND DESTABILISIERENDE ELEMENTE

Aus den vorhergehenden Abschnitten wird deutlich, dass es mehrere Elemente in einer mRNA gibt, die stabilisierend wirken. Diese *cis*-wirkenden Elemente sind größtenteils Sekundärstrukturen wie *hairpins* oder Stamm-Schleife Strukturen. Am 3' Ende einer mRNA gehen diese Strukturen meist auf Rho-unabhängige Terminatorstrukturen zurück. Auch das 5' Ende beherbergt solche intrinsischen Elemente. Wie bereits mehrfach erwähnt, ist das triphosphorylierte, native 5' Ende eines Primärtranskriptes ebenfalls ein Stabilisator, da die spaltungsinitiierenden RNasen E, J1/J2 und Y sämtlich auf Grund der Struktur ihrer katalytischen Domäne ein Monophosphat am 5' Ende präferieren. Zudem können die untranslatierten 5' Bereiche (5' UTR, *untranslated region*) einer mRNA ebenfalls Sekundärstrukturen ausbilden, die eine Bindung von Endonukleasen durch das Vorhandensein von doppelsträngigen Bereichen erschweren. Ein gut untersuchtes Beispiel stellt das bereits erwähnte Transkript von RNA I dar (1.1.2). Diese RNA hat neun ungepaarte Nukleotide am 5' Ende, die eine RNase E Konsensussequenz beinhalten, gefolgt von 99 Nukleotiden, die sich in drei Stamm-Schleife Strukturen falten. Bei Anfügung einer weiteren Stamm-Schleife Struktur am äußersten 5' Ende wird das gesamte Transkript stabilisiert auch dann, wenn der einzelsträngige Bereich vergrößert wird (Bouvet & Belasco, 1992, Rauhut & Klug, 1999). Da ein solcher Bereich zumindest in *E. coli* nicht vor 5'-3' gerichtetem Abbau schützen kann, sollte eine derartige Struktur auf andere Transkripte übertragbar sein, die Stabilisierung also auch *trans* wirken. In der Tat konnte dies für die 5' UTR der *ompA* mRNA auch gezeigt werden. Die 5' UTR wirkt *cis* stabilisierend auf das *E. coli ompA* Transkript und ebenfalls auf eine Vielzahl an Transkripten, an deren 5' Enden es fusioniert wird (Arnold et al., 1998). Die stabilisierende Wirkung geht auch hier auf eine Stamm-Schleife Struktur zurück. Die *ompA* 5' UTR enthält zwar auch einen einzelsträngigen Bereich, der eine Ribosomenbindestelle (RBS) enthält, die Stabilisierung scheint aber primär auf die Sekundärstruktur zurückzuführen zu sein. Künstlich in die *bla* mRNA eingefügte Stoppcodons, die an das vollständige *ompA* Transkript fusioniert aber translational unabhängig ist, führen zu einem frühzeitigen Abfallen der Ribosomen. Dies verändert die Stabilität des gesamten Konstrukts jedoch kaum. Im Gegensatz dazu hat ein solcher Translationsabbruch aber einen deutlichen Effekt auf die Stabilität des Wildtyp *bla* Transkriptes (Nilsson et al., 1987, Hansen et al., 1994).

Auch ein Einfluss der RBS selbst auf die Stabilität von mRNAs konnte nachgewiesen werden. Sowohl in *E. coli* als auch in *B. subtilis* konnte durch Mutationen der RBS, die die Komplementarität zur 16S rRNA deutlich verringerte gezeigt werden, dass damit auch die mRNA signifikant destabilisiert wurde. Umgekehrt führte eine verbesserte Ribosomenbindung zu einer verlängerten mRNA Halbwertszeit (Wagner et al., 1994, Arnold et al., 1998, Jurgens et al., 1998). Diese Bindung von Ribosomen ist auch dahingehend wichtig, dass mRNA Fragmente, denen eine RBS fehlt, wie etwa Abbauintermediate, schnell abgebaut werden. Die bessere Bindung von Ribosomen an die RBS führt zu einer effizienteren Initiation der Translation, was weiter zu einem dichteren Besatz der mRNA mit Ribosomen führt (*ribosome spacing*). Dies wiederum hindert beispielsweise RNase E sterisch daran, an potentielle Spaltstellen innerhalb der kodierenden Sequenz (CDS) zu binden (Abbildung 1.8a). Eine andere Möglichkeit schließt den Einfluss der 5' Region der mRNA auf die Stabilität mit ein. So kann eine erhöhte Bindung von Ribosomen am 5' Ende den Zugang zu nahegelegenen Spaltstellen behindern oder gar das gesamte 5' Ende so blockieren, dass RNasen über den 5' Enden-abhängigen Weg keine Degradation initiieren können (Abbildung 1.8b, unterer Teil). Letztere Erklärung scheint die wahrscheinlichere zu sein, da ein schwächeres Startcodon (GUG, CUG, UUG anstatt AUG) zu einer deutlich reduzierten Translationseffizienz führt, hingegen aber nur eine geringfügig verkürzte

Halbwertszeit nach sich zieht (Sharp & Bechhofer, 2003, Komarova et al., 2005). Eine starke Besetzung der RBS durch Ribosomen könnte demnach für die mRNA Halbwertszeit eine bedeutendere Rolle spielen als die Dichte der Ribosomen entlang der mRNA (Deana et al., 2008).

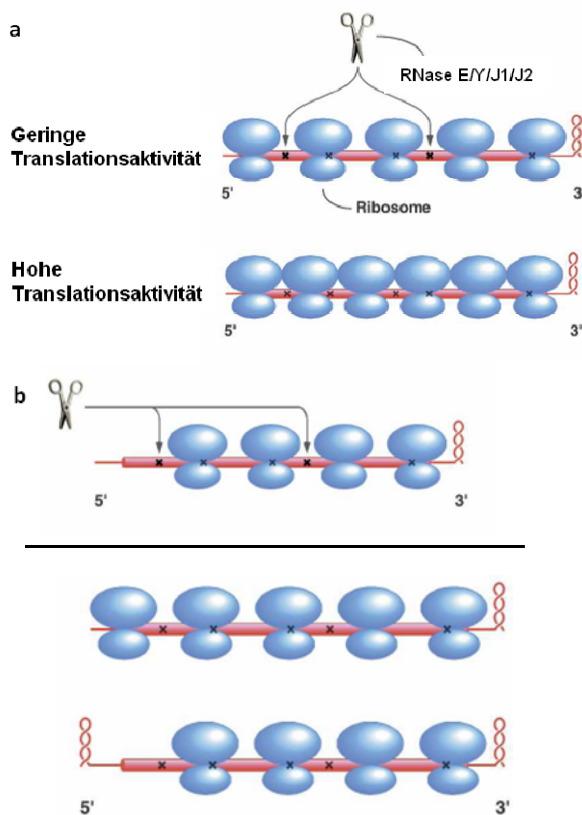


Abbildung 1.8: Einfluss der Translationsaktivität auf die Stabilität von mRNAs.

(a) Bei geringer Translationsaktivität sind weniger Ribosomen an die mRNA gebunden und interne Spaltstellen (x) sind für Endonukleasen für den direkten Eintritt zugänglich. Bei hoher Translationsaktivität ist die mRNA mit Ribosomen dicht besetzt und die Spaltstellen sind somit verdeckt. Endonukleasen haben so keine Möglichkeit an ihren Erkennungssequenzen zu binden und den Abbau der mRNA zu initiieren.

(b) Beim 5' Enden-abhängigen Weg der Degradation kann der Zugang zu den Spaltstellen bzw. der Zugang zum 5' Ende durch Ribosomen oder Sekundärstrukturen verhindert werden, sodass keine Spaltung der mRNA auf diesem Weg stattfinden kann (unterer Teil). Vor allem in Gram-positiven Bakterien wie *B. subtilis* ist das 5' Ende ein sehr stark die Stabilität bestimmender Faktor, da Sekundärstrukturen und gebundene Ribosomen am 5' Ende auch sehr lange *downstream* Bereiche stabilisieren können (siehe Text).

Verändert nach (Deana & Belasco, 2005).

Auch die Bindung von Proteinen kann indirekt die Stabilität der mRNA beeinflussen. So bindet beispielsweise das RNA Chaperon Hfq seine eigene mRNA in der Nähe der RBS, die daraus resultierende verringerte Bindung von Ribosomen führt dann auch folglich zu einer erhöhten Abbaurrate des Transkriptes (Vecerek et al., 2005).

Auch die Bindung von kleinen, nicht kodierenden RNAs (sRNAs) kann einen maßgeblichen Einfluss auf die Stabilität von mRNAs haben. Die erste sRNA induzierte Degradation einer mRNA wurde für die sRNA RyhB in *E. coli* demonstriert. RyhB wird spezifisch unter Eisenmangelbedingungen exprimiert, um den Level von Transkripten für nicht essentielle, Eisen-haltige Proteine zu reduzieren (Masse & Gottesman, 2002). Dieser RyhB induzierte mRNA Abbau hat einen verminderten Eisenbedarf der Zelle zur Folge und sorgt so für eine Anpassung an den Eisenmangel. Die meisten bisher beschriebenen sRNAs binden ihre Ziel-mRNA direkt an der RBS und blockieren damit die Translation. Oftmals wird dadurch der Abbau der mRNA durch RNase E induziert. Diese mRNA Destabilisierung kann prinzipiell durch zwei Arten hervorgerufen werden: (1) die mRNA wird gegenüber einem endonukleolytischen Angriff durch RNase E anfällig, da der Schutz durch translatierende Ribosomen fehlt (passive nukleolytische Repression, Abbildung 1.9a), (2) RNase E kann auch durch eine Bindung der sRNA, unterstützt durch Hfq, direkt zur mRNA rekrutiert werden, wodurch ein Komplex aus sRNA, Hfq und RNase E entsteht, der zum schnellen Abbau der mRNA führt (aktive nukleolytische Repression, Abbildung 1.9b). Oftmals wird dabei nicht nur die mRNA sondern auch die sRNA mit abgebaut.

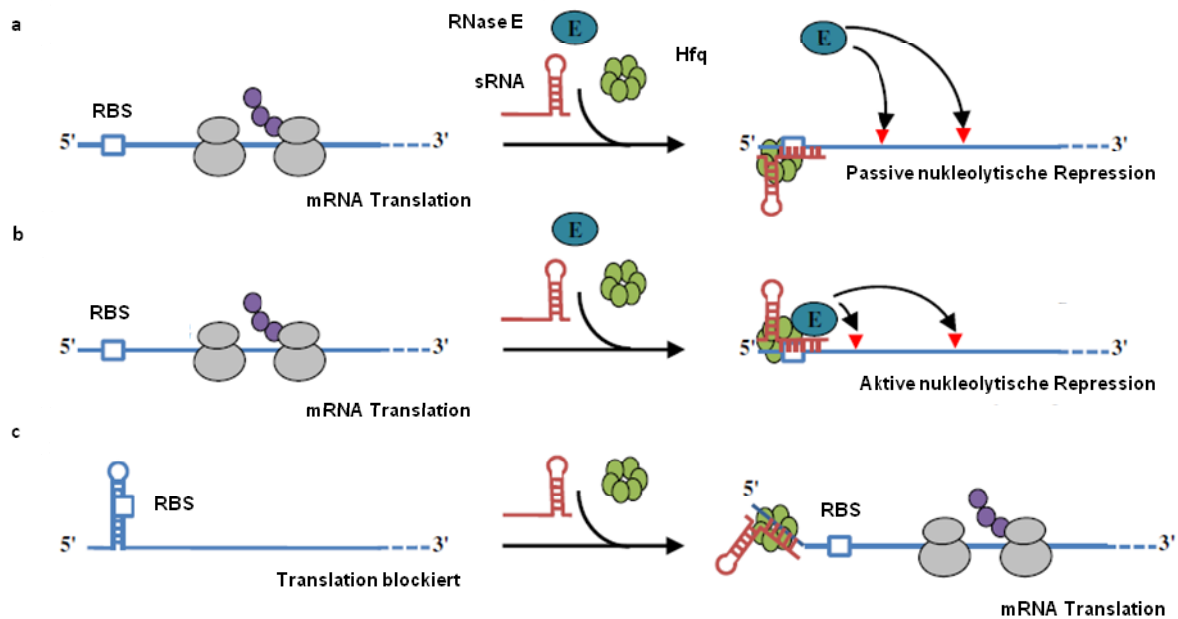


Abbildung 1.9: sRNA vermittelter Abbau von mRNAs.

(a) Die sRNA bindet mit Hilfe des RNA Chaperons Hfq an die Ribosomenbindestelle (RBS) der Ziel-mRNA, wodurch die Translation abgebrochen wird. Eine Degradation erfolgt in diesem Beispiel durch RNase E, welche an nun zugängliche Spaltstellen binden kann und die Degradation des Transkriptes initialisiert. Dieser Vorgang wird passive nukleolytische Repression genannt.

(b) Bei der Hfq-unterstützten Bindung der sRNA an die Ziel-mRNA wird gleichzeitig auch RNase E rekrutiert und damit in die Nähe von Spaltstellen gebracht. eine Spaltung kann hier nahe am sRNA-Hfq-Komplex aber auch an weiter entfernten Stellen erfolgen (aktive nukleolytische Repression).

(c) Die RBS kann durch die Ausbildung einer Sekundärstruktur verdeckt sein, wodurch keine Translation erfolgen kann und das Transkript möglicherweise instabil ist. Bei Bindung der sRNA (und Hfq) an komplementäre Bereiche wird diese Sekundärstruktur gelöst, die RBS wird frei und die mRNA kann translatiert werden, was zu einer Stabilisierung führt.

Verändert nach (Lalaouna et al., 2013).

Tatsächlich ist der Abbau im Fall der aktiven nukleolytischen Repression nicht unbedingt die Folge einer nicht mehr stattfindenden Translation, sondern geht direkt auf diesen Komplex zurück. Ein Beispiel dieser aktiven nukleolytischen Repression stellt das *MicC/ompD* Duplex dar. Die sRNA *MicC* bindet weit downstream der RBS an die Ziel-mRNA *ompD*, wodurch die Initiation der Translation nicht gestört wird, das Transkript aber in Folge RNase E-abhängig degradiert wird (Pfeiffer et al., 2009). *RyhB* induziert die Spaltung der Ziel-mRNA *sodB* durch RNase E auch bei Bindung an die RBS an einer distalen Position hunderte von Nukleotiden *downstream* der eigentlichen Bindestelle (Prevost et al., 2011). Der genau Mechanismus ist nicht vollkommen geklärt, vermutlich aber interagiert das 5' Monophosphat der sRNA und nicht der mRNA mit der Phosphatsensortasche der RNase E und aktiviert so die endonukleolytische Spaltung (Bandyra et al., 2012).

In einem zu den geschilderten Vorgängen umgekehrten Fall kann die Bindung einer sRNA auch indirekt stabilisierend wirken. So kann die RBS der mRNA zunächst durch eine Sekundärstruktur in der 5' UTR verdeckt und für Ribosomen nicht zugänglich sein. Die Bindung der sRNA kann dann zur Auflösung dieser inhibierend wirkenden Sekundärstruktur führen, die RBS wird zugänglich und die mRNA kann translatiert werden, was wie geschildert die Stabilität erhöhen kann (Abbildung 1.9c).

Diese geschilderten Fälle beziehen sich auf *trans*-kodierte sRNAs, die auf Grund von Sequenzunterschieden keine perfekten Bindungen mit der Ziel-mRNA eingehen. Im Gegensatz dazu binden *cis*-kodierte *antisense* RNAs mit 100% Komplementarität an ihre Ziel-mRNA und bilden dadurch lange, doppelsträngige Bereiche. Diese doppelsträngigen Bereiche sind anfällig für einen

Angriff durch RNase III (Review in (Arraiano et al., 2010)). Eine solche Spaltung initiiert meist auch den vollständigen Abbau der betroffenen mRNA (und sRNA).

Die Stabilität einer sRNA hängt oftmals auch direkt mit der Ziel-mRNA zusammen, da sie in vielen Fällen zusammen mit der mRNA abgebaut wird. Tatsächlich erhöht sich die Halbwertszeit einiger sRNAs (RyhB, DsrA, OxyS), wenn die Transkription durch Rifampicin geblockt wird und somit weniger Ziel-mRNAs vorliegen, an die die sRNAs binden können (Masse et al., 2003, Caron et al., 2010)

1.2. mRNA STABILITÄTEN ALS MITTEL DER GENREGULATION

Die Regulation der Genexpression auf Ebene der Transkription durch diverse Aktivatoren, Repressoren und alternative Sigmafaktoren stellt den Hauptteil der Anpassung eines Organismus an wechselnde Umweltbedingungen dar. Der Level der Expression beeinflusst direkt den *steady state* Level einer mRNA. Aber auch posttranskriptionale Ereignisse haben einen maßgeblichen Einfluss und stellen eine weitere regulatorische Ebene der Genexpression dar. Wie in den letzten Jahren zunehmend deutlich wurde, ist die Kontrolle des Abbaus einer mRNA ein kritischer Schritt in der Regulation der Genexpression in Antwort auf sich verändernde Umweltbedingungen.

Ein gut untersuchtes Beispiel stellt dahingehend die *cspA* mRNA in *E. coli* dar, die das Kälteschockprotein CspA kodiert, dessen Expression in Antwort auf einen Kälteschock dramatisch gesteigert wird. Bei einem Wechsel von 37°C zu 15°C erhöht sich auch vorübergehend die Halbwertszeit der mRNA von nur wenigen Sekunden auf über 70 Minuten und sinkt bei kontinuierlichem Wachstum bei 15°C dann wieder auf etwa 10 Minuten (Goldenberg et al., 1996). Gleichermaßen erhöht sich damit auch vorübergehend die Proteinkonzentration. Diese drastisch veränderten Halbwertszeiten gehen alleine auf Veränderungen der Struktur der mRNA zurück. Wie Strukturanalysen ergeben haben, hängen die Temperatur-abhängigen Unterschiede von der co-transkriptionalen Faltung der *cspA* mRNA ab, die bei hohen oder niedrigen Temperaturen einen anderen Verlauf nimmt (Giuliodori et al., 2010). Die Sekundärstrukturen der kompletten *cspA* mRNA bei 10°C und 37°C sind in Abbildung 1.10 schematisch dargestellt. Die Faltung verläuft parallel zur Transkription unter beiden Temperaturen zunächst gleich. Beim Übergang des 87 nt langen Fragments zum 137 nt langen Fragment bilden die ersten 35 nt der späteren 5' UTR einen sogenannten Pseudoknoten. Dieser besteht aus zwei Haarnadelstrukturen, wobei die jeweilige Schleife der einen den Stamm der jeweils anderen bildet (umrandeter Teil der 10°C mRNA in Abbildung 1.10). Schreitet die Transkription fort, nimmt die mRNA jedoch je nach Temperatur zwei unterschiedliche Konformationen an. Unter Kälteschockbedingungen bleibt die Sekundärstruktur in der 5' UTR bestehen. Bei 37°C kommt es hingegen zu einer großen strukturellen Neuordnung und es bilden sich Basenpaarungen der 5' UTR über sehr lange Distanzen mit weit *downstream* in der kodierenden Sequenz (CDS) liegenden Basen aus. Die Struktur des Pseudoknotens ist thermodynamisch ungünstig und ist nur unter kalten Temperaturen stabil. So erklärt sich auch, dass die 10°C Struktur bei steigender Temperatur in die 37°C Konformation übergehen kann, aber nicht umgekehrt. Dadurch stellt die *cspA* mRNA einen funktionellen Thermosensor dar und keinen echten Schalter. Im Konformer bei niedrigen Temperaturen liegen die Shine-Dalgarno-Sequenz (SD) und das Startcodon in einer instabilen Helix, im 37°C Konformer hingegen liegen diese Elemente in einem stabilen, doppelsträngigen Bereich, was aller Wahrscheinlichkeit nach die Translationseffizienz limitiert.

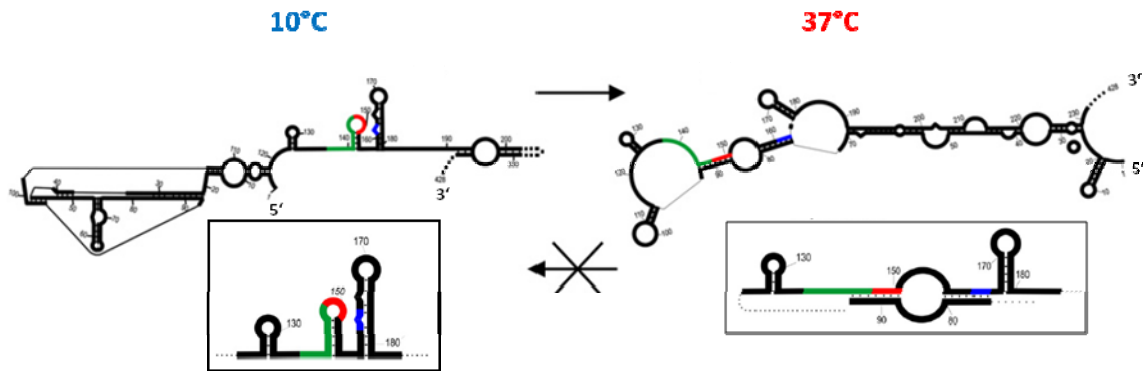


Abbildung 1.10: Schematische Darstellung der Sekundärstruktur der *cspA* mRNA bei 10°C und bei 37°C.

Die *cspA* mRNA faltet sich während der Transkription abhängig von der Temperatur. Die Pseudoknotenstruktur der 5' UTR (umrandet) bildet sich anfänglich bei beiden Temperaturen, ist thermodynamisch aber ungünstig und löst sich bei 37°C auf, sodass sich Basenpaarungen zwischen der 5' UTR und weit *downstream* gelegenen Bereichen ausbilden. Das 10°C Konformer kann bei Temperaturerhöhung in die Konformation der 37°C Struktur übergehen, umgekehrt jedoch nicht. Die beiden Kästen zeigen eine Vergrößerung der jeweiligen Sekundärstruktur, die die Shine-Dalgarno Sequenz (rot), die Bindestelle für das ribosomale Protein S1 (grün) und das Startcodon (blau) enthält. Verändert nach (Giuliodori et al., 2010).

Die Gründe für die stark erhöhte Stabilität des Transkriptes nach Kälteschock sind bisher noch nicht vollkommen ergründet. Eine Hypothese bezieht sich auf eine generelle, funktionelle Inaktivierung der RNA Degradationsmaschinerie bei Kälteschock und einer nachfolgenden Induktion eines an Kälte angepassten Abbauweges durch beispielsweise veränderte Komponenten des Degradosoms (Yamanaka & Inouye, 2001, Prud'homme-Genereux et al., 2004). Eine weitere Hypothese erklärt diesen Sachverhalt durch die stabilisierende Wirkung der translatierenden Ribosomen bei niedrigen Temperaturen (siehe 1.1.3 und (Hankins et al., 2007)). Beide Hypothesen schließen sich nicht gegenseitig aus und vermutlich kann auch die Konformation der mRNA bei niedrigen Temperaturen dazu führen, dass sie vor endonukleolytischem Abbau geschützt ist (Giuliodori et al., 2010).

Eine weitere Form der posttranskriptionalen Genregulation stellt die Prozessierung eines polycistronischen Primärtranskriptes dar, woraus mehrere Segmente mit unterschiedlichen Halbwertszeiten entstehen, was wiederum eine veränderte Proteinsynthese nach sich zieht. So können in Prokaryoten aus einem Transkriptionsvorgang und einer mRNA mehrere Proteine in unterschiedlichen stöchiometrischen Mengen synthetisiert werden. Ein Beispiel hierfür stellt das *malEFG* Operon in *E. coli* dar, das drei Proteine eines Maltosetransporters kodiert. Die *malE* mRNA liegt dabei auf Grund einer verlängerten Halbwertszeit in größeren Mengen vor als das *malEFG* Primärtranskript. Daraus resultiert auch eine höhere Konzentration des MalE Proteins im Vergleich zu MalF und MalG (Newbury et al., 1987b). Die Stabilisierung der *malE* mRNA geht auf zwei *inverted repeat* Sequenzen in der intergenischen Region von *malE-malF* zurück, die in der mRNA zwei Stamm-Schleife Strukturen ausbilden. Eine Deletion dieser Sequenzen reduzierte die Abundanz der *malE* mRNA deutlich, wodurch folglich auch weniger MalE Protein vorlag (Newbury et al., 1987a).

Ein ähnliches Beispiel in *B. subtilis* ist das hexacistronische *gapA* Operon, das mehrere glykolytische Enzyme kodiert, darunter die Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH). Die Menge der GAPDH übertrifft die Menge des Repressors CggR, welcher im Operon zuerst kodiert ist, um mehr als das Hundertfache. Diese unterschiedliche Synthese geht auf Prozessierung des Primärtranskriptes und unterschiedliche Stabilitäten der Prozessierungsprodukte zurück. Die erhöhte Stabilität ist auch

hier das Resultat einer stabilisierenden Stamm-Schleife Struktur am 5' Ende des *gapA* enthaltenden mRNA Fragments (Meinken, 2003).

In *Rhodobacter capsulatus* ist eine solche posttranskriptionale Regulation am Beispiel des *puf* Operons ausgiebig beschrieben worden. Die proteinergeren Komponenten des Reaktionszentrums (RC) und des Lichtsammelkomplexes I (LHI) werden vom polycistronischen *puf* Operon kodiert (*pufBA*: LHI; *pufLM*: RC) (Klug, 1993, Choudhary & Kaplan, 2000). Das ebenfalls in diesem Operon kodierte PufQ besitzt eine regulatorische Funktion in der Bacteriochlorophyllsynthese (Bauer & Marrs, 1988) und das Genprodukt von *pufX* ist Teil des Reaktionszentrums und fungiert als Portal für den Quinol Export (Farchaus et al., 1992, Fulcher et al., 1998, Qian et al., 2005). Die Regulation der Expression der Photosynthesegene ist abhängig von Sauerstoff (Eraso & Kaplan, 1994, Zeilstra-Ryalls & Kaplan, 1995, Zeilstra-Ryalls & Kaplan, 2004) und Licht (Gomelsky & Kaplan, 1997, Braatsch et al., 2002, Happ et al., 2005). Zusätzlich zu dieser transkriptionellen Genregulation, ist bekannt, dass bei einigen Transkripten der Photosynthesegene ebenfalls eine Regulation auf posttranskriptionaler Ebene vorkommt, so zum Beispiel bei den Transkripten des *puf* Operons. Bei sinkendem Sauerstoffpartialdruck steigt die Expression der *puf* Gene an, da sich alle unter der Kontrolle des gleichen Promotorelements befinden. Die Genprodukte für das RC und die LHI-Komplexe werden in unterschiedlichen stöchiometrischen Mengen benötigt (10 bis 15 LHI Proteine pro 1 RC Protein) und da sie von einem polycistronischen Operon kodiert werden, findet in diesem Falle eine posttranskriptionale Prozessierung statt. Die entstehenden Prozessierungsprodukte weisen wie in den bereits genannten Beispielen unterschiedliche Halbwertszeiten und Abundanzen auf (siehe Abbildung 1.11 und Review in (Klug, 1993)). So können zwei *puf* homologe mRNA Spezies via *Northern blot* detektiert werden. Ein 2,7 kb großes Fragment (*pufBALMX*) und ein 0,5 kb kleines, abundanteres Fragment (*pufBA*). Das Primärtranskript mit *pufQBALMX* (3,2 kb) ist auf dem *Northern blot* kaum zu detektieren und degradiert sehr schnell. Für das größere Fragment (*pufBALMX*) wurden in *R. capsulatus* Halbwertszeiten zwischen drei und acht Minuten bestimmt, für das kleinere (*pufBA*) Halbwertszeiten zwischen 22-33 Minuten (Belasco et al., 1985, Klug et al., 1987). In der Tat ist das kleine 0,5 kb Fragment das Abbauprodukt des großen 2,7 kb Fragmentes und wie gezeigt werden konnte, ist eine Sekundärstruktur in der intercistronischen Region zwischen *pufA* und *pufL* für eine Stabilisierung der *pufBA* mRNA verantwortlich, die die mRNA vor 3'-5' exonukleolytischen Abbau schützt (Belasco et al., 1985). Eine Entfernung dieser Sekundärstruktur führt zu einem Verlust des kleinen Fragmentes und einer kontinuierlichen Degradation des großen Fragmentes und letztendlich zu einer veränderten LHI:RC Stöchiometrie (Klug et al., 1987, Chen et al., 1988). Die 5' Enden des großen *pufBALM* und des kleinen *pufBA* Fragmentes werden ebenfalls durch drei Stamm-Schleife-Sekundärstrukturen stabilisiert (Heck et al., 1996). Solche Strukturen *downstream* von *pufX* tragen ebenfalls zu einer Stabilisierung und Schutz vor 3'-5' exonukleolytischen Abbau bei (Klug & Cohen, 1990). Die Degradation des Primärtranskriptes beginnt durch eine RNase E vermittelte endonukleolytische Spaltung in der kodierenden Sequenz von *pufQ* (Heck et al., 2000), gefolgt von der ebenfalls durch RNase E katalysierten Spaltung des *pufBALMX* Fragments in der kodierenden Sequenz von *pufL* (Fritsch et al., 1995). Die Stabilität der *pufBALMX* mRNA ist interessanterweise maßgeblich vom Sauerstoffpartialdruck abhängig, so reduziert sich die Halbwertszeit von etwa acht Minuten unter microaeroben Bedingungen auf drei Minuten unter aeroben Bedingungen. Dieser Effekt geht auf die endonukleolytische Spaltung durch RNase E zurück (Klug, 1991). Die Stabilität der *pufBA* mRNA hingegen wird nicht von Sauerstoff beeinflusst und die Halbwertszeit unter aeroben und microaeroben Bedingungen ist ähnlich. Die genaue Wirkungsweise der sauerstoffabhängigen Spaltung des *pufBALMX* Fragments ist bisher jedoch noch nicht bekannt.

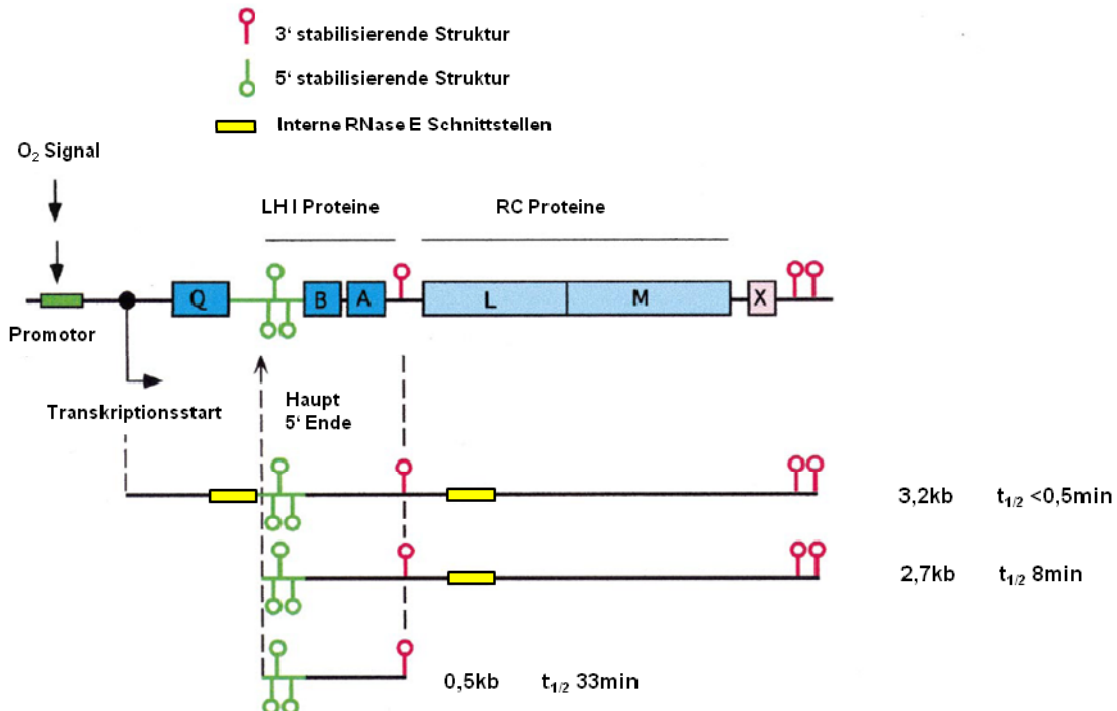


Abbildung 1.11: Schematische Darstellung der Prozessierung und der Stabilisierung der Prozessierungsprodukte des *puf* Operons in *R. capsulatus*.

Das *puf* Operon kodiert die Proteine des Lichtsammelkomplexes I (*pufBA*: LH I) und des Reaktionszentrums (*pufLM*: RC). Die Proteine PufB und PufA werden gegenüber PufL und PufM in einem molaren Verhältnis von 15:1 benötigt. Dies wird durch mehrere Prozessierungen des *pufQBALMX* Primärtranskriptes und entsprechender Stabilisierung des *pufBA* Prozessierungsproduktes erreicht, welches eine deutlich höhere Halbwertszeit ($t_{1/2}$) aufweist als das *pufBALMX* Fragment. Interne RNase E Schnittstellen stellen den Angriffspunkt für die Abbauratenbestimmenden Schritte der beiden großen *puf* Fragmente dar (gelb). Die grünen Haarnadelstrukturen wirken stabilisierend auf den *downstream* Bereich, während die roten Haarnadelstrukturen den *upstream* Bereich beeinflussen. Für die Funktionen von *pufQ* und *pufX* siehe Text. Verändert nach (Rauhut & Klug, 1999, Heck et al., 2000).

1.3. RHODOBACTER SPHAEROIDES

Rhodobacter sphaeroides gehört zur α 3-Untergruppe der Proteobakterien. Es ist ein lateral begeißeltes, 0,2 - 0,5 μm langes Stäbchen (Imhoff, 2001), das aus lichtdurchfluteten, stehenden und fließenden Gewässern aber auch aus Kapillarwasser aus Bodenproben isoliert werden kann. Das Genom von *R. sphaeroides* besteht aus zwei Chromosomen und fünf Plasmiden und ist insgesamt $4,6 \cdot 10^6$ bp groß und hat einen GC-Gehalt von 65 – 69 % (Suwanto & Kaplan, 1989, Imhoff, 2001, Choudhary et al., 2004).

Wie andere *Rhodobacter* Spezies auch ist *R. sphaeroides* ein metabolisch sehr vielseitiger Organismus, der auf vielfältige Weise Energie gewinnen kann: Solange Sauerstoff vorhanden ist, wird der Energiebedarf durch aerobe Atmung gedeckt. Wenn der Sauerstoffpartialdruck fällt, aber Licht vorhanden ist, betreibt *R. sphaeroides* anoxygene Photosynthese. Unter anaeroben Bedingungen und der Abwesenheit von Licht kann bei Vorhandensein eines alternativen, terminalen Elektronenakzeptors ebenfalls anaerobe Atmung zur Deckung des Energiebedarfs betrieben werden. Fehlt auch dieser, ist *R. sphaeroides* in der Lage, Kohlenstoffquellen für verschiedene Gärungen zu nutzen (Imhoff, 2001). Des Weiteren kann *R. sphaeroides* atmosphärisches CO₂ und N₂ fixieren (Madigan, 1995, Tabita, 1995).

Diese Stoffwechselvielfalt und die Tatsache, dass das Genom komplett sequenziert ist, haben *R. sphaeroides* zu einem populären Modellorganismus für die Untersuchung genregulatorischer Mechanismen dieser komplexen Stoffwechselwege werden lassen. Vor allem die Regulation der Expression der für den Aufbau des Photosyntheseapparates verantwortlichen Gene beim Übergang von aerober zu phototropher Lebensweise war und ist Fokus vieler Untersuchungen. So wurden wie beschrieben im nahe verwandten *R. capsulatus* Vorgänge der RNA Prozessierung und Degradation am Beispiel des in beiden Organismen vorkommenden *puf* Operons intensiv studiert (siehe 1.2).

Auch weitere Untersuchungen zur RNA Degradation und Prozessierung wie beispielsweise die Charakterisierung der RNase III und die durch sie vermittelte Reifung der 23S rRNA und die daran beteiligte RNase J wurden in diesen Modellorganismen beschrieben (Rauhut et al., 1996, Evguenieva-Hackenberg & Klug, 2000, Rische & Klug, 2012). Zudem konnte auch ein Degradosom-ähnlicher Komplex in *Rhodobacter* identifiziert und beschrieben werden (Jager et al., 2001, Jager et al., 2004a, Jager et al., 2004b). Des Weiteren sind in *R. sphaeroides* zahlreiche kleine, nicht-kodierende RNAs identifiziert worden, die Gegenstand weiterer Untersuchungen sind (Berghoff et al., 2009, Mank et al., 2012).

1.4. ZIELSETZUNG

Die Bedeutung einer posttranskriptionalen Regulation der Genexpression durch Einflussnahme auf die Stabilitäten von *messenger* RNA Molekülen ist in den vergangenen Jahren zunehmend klarer geworden. Prozessierung und Degradation sind elementare Bestandteile des RNA Metabolismus und eröffnen einem Organismus neben der Regulation der Transkription eine weitere regulatorische Ebene, um sich schnell und adäquat an seine Umwelt anpassen zu können.

Rhodobacter sphaeroides ist ein metabolisch sehr vielseitiger Organismus, der unter diversen Umweltbedingungen überleben kann. Auf Grund der daraus resultierenden Vielseitigkeit seines Stoffwechsels, besitzt *R. sphaeroides* ein sehr komplexes Netzwerk aus Regulationsmechanismen, um sich an wechselnde Umweltbedingungen anpassen zu können. Eine Veränderung der Stabilität von mRNAs in Folge von Umweltreizen und die daraus resultierende Auswirkung auf den Level der kodierten Proteine konnte im verwandten *Rhodobacter capsulatus* am Beispiel des *puf* Operons, das Komponenten des Photosyntheseapparates kodiert, eindrucksvoll gezeigt werden. Diese Ergebnisse sind größtenteils auch auf *R. sphaeroides* direkt übertragbar. Zudem gehört *R. sphaeroides* zu den Bakterienspezies, die sowohl ein Homolog der RNase E als auch zusätzlich ein RNase J Homolog besitzen. Dies macht dieses Bakterium zu einem interessanten Modellorganismus für Untersuchung von RNA Degradationsmechanismen.

Die Erkenntnisse über umweltbedingte Veränderungen der mRNA Halbwertszeit entstammen bisher jedoch den Untersuchungen von nur wenigen Transkripten. Daher war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, mittels mehrerer Microarray Analysen in transkriptomweitem Maßstab einen Überblick über die Halbwertszeiten von insgesamt 4527 Transkripten zu erlangen. Hierfür sollten *R. sphaeroides* Kulturen unter aeroben, microaeroben und phototrophen Bedingungen angezogen werden, um ein möglichst breites Spektrum an Wachstumsbedingungen abzudecken. Die Analyse von RNA Halbwertszeiten sollte durch Arrest der Transkription mittels des Antibiotikums Rifampicin erfolgen, wodurch der RNA Metabolismus in der Zelle prinzipiell nur noch aus Abbauvorgängen besteht.

Ein weiteres Ziel dieser Studie war es, Aufschluss darüber zu erlangen, ob die für Bakterien untypisch langen Halbwertszeiten einiger Transkripte Einzelfälle darstellen oder in *R. sphaeroides* tatsächlich häufiger lange Transkripthalbwertszeiten auftreten.

Zudem sollte untersucht werden, ob durch die unterschiedlichen Wachstumsbedingungen möglicherweise ganze Stoffwechselwege bzw. funktionelle Gruppen von Genen betroffen sind und veränderte Transkripthalbwertszeiten aufweisen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. MATERIAL

In diesem Abschnitt sind alle in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme, Chemikalien, Puffer, Lösungen, Oligonukleotide, Enzyme und Geräte aufgeführt. Zusätzlich enthält der Abschnitt 2.2 weitere Puffer und Lösungen bei den jeweilig beschriebenen Methoden.

2.1.1. BAKTERIENSTÄMME

Stamm	Beschreibung
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> 2.4.1	(van Niel, 1944)

2.1.2. NÄHRMEDIEN

Nährmedium für *R. sphaeroides*

RÄ-Medium (Drews, 1984)	30 g Malat; 0,2 g MgSO ₄ x 2H ₂ O; 1,2 g (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 0,07 g CaCl x 2H ₂ O; 1,5 ml Spurenelementlösung; ad 1 l ddH ₂ O, auf pH = 6,9 einstellen, autoklavieren und 8 ml Vitaminlösung und 20 ml Phosphatlösung zugeben
Spurenelementlösung	500 mg Fe(II)Citrat; 20 mg MnCl ₂ x 4H ₂ O; 5 mg ZnCl ₂ ; 5 mg LiCl; 2,5 mg KI; 2,5 g KBr; 0,15 mg CuSO ₄ ; 1 mg Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O; 6 mg CoCl ₂ x 6H ₂ O; 0,5 mg SnCl ₂ x 2 H ₂ O; 0,5 mg BaCl ₂ ; 1 mg AlCl ₃ ; 10 mg H ₃ BO ₄ ; 10 mg EDTA, ad 1 l ddH ₂ O
Phosphatlösung	45 g K ₂ HPO ₄ ; 35 g KH ₂ PO ₄ , ad 1 l ddH ₂ O
Vitaminlösung	200 mg Niacin; 400 mg Thiamin-HCl; 200 mg Nicotinamid; 8 mg Biotin, ad 1 l ddH ₂ O

2.1.3. GRÖßENSTANDARDS FÜR DIE GELELEKTROPHORESE

DNA Standard	Hersteller
<i>GeneRuler</i> TM 1 kb Plus DNA ladder	Fermentas / Thermo Scientific
<i>GeneRuler</i> TM 100 bp Plus DNA ladder	Fermentas / Thermo Scientific

2.1.4. OLIGONUKLEOTIDE

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide stammen von Eurofins/MWG/Operon (Ebersberg).

Oligonukleotid	Sequenz 5' - 3' (sense/antisense)	Beschreibung
Oligonukleotide für die <i>real time</i> RT PCR		
RSP_0386_Ribo_fw / RT_0386_rev	GCACCGTGAAATGGTTCAA/ CTGCAGTTCGTAACCGATCTTC	<i>Real time</i> RT PCR Primerpaar zur Amplifikation von RSP_0386, Effizienz des Primerpaares 2,05, <i>annealing</i> Temperatur 60°C
RSP_6107_Ribo_fw/ RT_6107_rev	ACAGCACCGCTTTCAACTTC/ CCGTTGCCATACTTCTTGTC	<i>Real time</i> RT PCR Primerpaar zur Amplifikation von RSP_6107, Effizienz des Primerpaares 2,2, <i>annealing</i> Temperatur 60°C
RT_2693_fw/ RT_2693_rev	ATGTCGACAATGGCAACAAG/ TTGTTGAAGATGCCGTTCTG	<i>Real time</i> RT PCR Primerpaar zur Amplifikation von RSP_2693, Effizienz des Primerpaares 2,08, <i>annealing</i> Temperatur 54°C
RSP_1551_Ribo_fw/ RT_1551_rev	AGCGTTCACGGTGCTTCTAT/ TTGATCGAGAAGGCTTCGAC	<i>Real time</i> RT PCR Primerpaar zur Amplifikation von RSP_1551, Effizienz des Primerpaares 2,08, <i>annealing</i> Temperatur 60°C
RSP_1952_Ribo_fw/ RT_1952_rev	CGAGACAGGAGACATCACGA/ CGGTCACATGGACGAAAAC	<i>Real time</i> RT PCR Primerpaar zur Amplifikation von RSP_1952, Effizienz des Primerpaares 2,22, <i>annealing</i> Temperatur 60°C
RSP_0335_Ribo_fw/ RT_0335_rev	ACGGCCATATCGTCTTGAAC/ AGCGACCGCAACTCCATC	<i>Real time</i> RT PCR Primerpaar zur Amplifikation von RSP_0335, Effizienz des Primerpaares 2,12, <i>annealing</i> Temperatur 60°C
RT_2130_fw/ RT_2130_rev	CTCGGGGTTTGACACCGAAA/ GGGCATCTTGATGTCGCTGA	<i>Real time</i> RT PCR Primerpaar zur Amplifikation von RSP_2130, Effizienz des Primerpaares 2,2, <i>annealing</i> Temperatur 60°C
RT_1321_fw/ RT_1321_rev	GTCCTGTTGGCGCAGGATCT/ GATCGCAGTGAAGGCCAAGG	<i>Real time</i> RT PCR Primerpaar zur Amplifikation von RSP_1321, Effizienz des Primerpaares 2,13, <i>annealing</i> Temperatur 60°C
RSP_0698_f/ RSP_0698_r	GAGCCTGCTTGCGATCAT/ CGAGGTAATCCGCCATCT	<i>Real time</i> RT PCR Primerpaar zur Amplifikation von RSP_0698 <i>fnrL</i> , Effizienz des Primerpaares 2,04, <i>annealing</i> Temperatur 59°C
RT_1341-rspT-f/ RT_1341-rspT-r	TCGCCCCAGTCCAAGAAG/ CCACGGTGTCTTGTGCAG	<i>Real time</i> RT PCR Primerpaar zur Amplifikation von RSP_1341 <i>rpsT</i> , Effizienz des Primerpaares 1,95, <i>annealing</i> Temperatur 59°C
Oligonukleotide für die Herstellung von <i>Riboprobes</i>:		
RSP_0386_Ribo_fw/ RSP_0386_T7_rev	GCACCGTGAAATGGTTCAA/ <u>TAATACGACTCACTATAGGGGAC</u> TGCAGTTCGTAACCGATCTT	Primerpaar zur Amplifikation des <i>templates</i> für die <i>in vitro</i> Transkription einer <i>riboprobe</i> zur Detektion der Transkripts von RSP_0386; <i>reverse</i> Primer enthält am 5' Ende die Promotorsequenz der T7-RNA Polymerase (unterstrichen)
RSP_6107_Ribo_fw/ RSP_6107_T7_rev2	ACAGCACCGCTTTCAACTTC/ <u>TAATACGACTCACTATAGGGGCC</u> CGTTGCCATACTTCTTGT	Primerpaar zur Amplifikation des <i>templates</i> für die <i>in vitro</i> Transkription einer <i>riboprobe</i> zur Detektion der Transkripts von RSP_6107; <i>reverse</i> Primer enthält am 5' Ende die Promotorsequenz der T7-RNA Polymerase (unterstrichen)
RSP_6236_Ribo_f2/ RSP_6236_T7_rev	ACCAGCTTACCCCGGAAC/ <u>TAATACGACTCACTATAGGGCA</u> GCTGAAGACCAGCAGGAT	Primerpaar zur Amplifikation des <i>templates</i> für die <i>in vitro</i> Transkription einer <i>riboprobe</i> zur Detektion der Transkripts von RSP_6236; <i>reverse</i> Primer enthält am 5' Ende die Promotorsequenz der T7-RNA Polymerase (unterstrichen)
Oligonukleotide für die Herstellung von <i>templates</i> für <i>random priming</i>		
RSP_2693_fw/ RSP_2693_rev	AGAGACCGATGGCCTTACC/ ACTCCGCCAGCCATGTCAGA	Primerpaar für die Amplifikation eines 623 bp großen Fragments des Gens RSP_2693 (Li et al., 2003). <i>Annealing</i> Temperatur 60°C

2.1.5. RADIOAKTIVE NUKLEOTIDE

Nuklid	Konzentration (Ci mmol ⁻¹)	Hersteller
[γ - ³² P]dATP	3000	Hartmann Analytic
[α - ³² P]dCTP	3000	Hartmann Analytic
[α - ³² P]UTP	3000	Hartmann Analytic

2.1.6. ENZYME

Bezeichnung	Hersteller
DNase I (120-200 U/ μ l)	Invitrogen
Lysozym (Feststoff)	Boehringer
Polynukleotidkinase	Fermentas / Thermo Scientific
Proteinase K	Roth
RNaseA (7 U/ μ l)	Qiagen
RNasin (40 U/ μ l)	Fermentas / Thermo Scientific
T7 RNA Polymerase (50 U/ μ l)	NEB

2.1.7. MOLEKULARBIOLOGISCHE KITS

Bezeichnung	Hersteller
Agilent RNA Spike-In Kit	Agilent
Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green QRT-PCR Master Mix	Agilent
<i>Gene Expression Wash Buffer Kit</i>	Agilent
<i>Gene Expression Hybridization Kit</i>	Agilent
Low Input Quick Amp Labeling WT Kit	Agilent
NEBlot Kit	NEB
OneStep RT-PCR Kit	Qiagen
QiaEx Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
RNeasy MiniElute Cleanup Kit	Qiagen
Taq-Polymerase Kit	Qiagen
ULS™ Labeling Kit for Agilent arrays (Cy3)	Kreatech
ULS™ Labeling Kit for Agilent arrays (Cy5)	Kreatech

2.2. MIKROBIOLOGISCHE METHODEN

2.2.1. FLÜSSIGKULTUREN VON *RHODOBACTER SPHAEROIDES* 2.4.1

Rhodobacter sphaeroides wird generell bei 32°C in RÄ-Medium unter Schütteln (140 rpm) kultiviert. Die Inokulation des Kulturmediums findet dabei stets steril mit abgeflammtten Gaspipetten oder einer vorher ausgeglühten Impföse statt. Durch eine Zugabe von Antibiotika erfolgt eine Selektion der jeweiligen Stämme. Die Zugabe erfolgt in den unter 2.1.4 angegebenen Konzentrationen.

In dieser Arbeit wurden *R. sphaeroides*-Kulturen unter unterschiedlichen Belichtungs- und Sauerstoffbedingungen inkubiert, welche im Folgenden näher beschrieben sind.

2.2.1.1. WACHSTUM UNTER MICROAEROBEN BEDINGUNGEN

Für das Wachstum unter microaeroben Bedingungen werden Erlenmeyerkolben zu 75 % mit RÄ-Medium gefüllt, beimpft und unter Schütteln (140 rpm) im Dunkeln bei 32°C inkubiert. In diesen Kulturen beträgt der Sauerstoffgehalt in der exponentiellen Phase 0,5 bis 1 mg l⁻¹ O₂, da der Großteil des eingetragenen Sauerstoffs direkt von den Zellen veratmet wird.

2.2.1.2. WACHSTUM UNTER AEROBEN BEDINGUNGEN

Für die Anzucht von aeroben Kulturen stehen zwei unterschiedliche Methoden zur Verfügung: Erstens die Anzucht in Schikanekolben unter Schütteln und zweitens die Kultivierung in Meplats-Flaschen mit Begasung durch eine Aquariumspumpe.

Bei der ersten Methode werden Schikanekolben zu 20 % mit RÄ-Medium befüllt, beimpft und bei 140 rpm auf dem Schüttler bei 32°C im Dunkeln inkubiert. Der Sauerstoffgehalt in diesen aeroben Kulturen beträgt 7 bis 8 mg l⁻¹ O₂.

Bei der letztgenannten Methode werden Meplats-Flaschen zu 70% mit RÄ-Medium befüllt, beimpft und in einem auf 32°C erwärmten Wasserbad kultiviert. Die Begasung mit Raumluft erfolgt hierbei über eine Aquariumspumpe mittels eines Schlauches und einer Pasteurpipette. Der Sauerstoffgehalt beträgt hierbei ebenfalls 7 – 8 mg l⁻¹ O₂.

2.2.1.3. WACHSTUM UNTER PHOTOTROPHEN BEDINGUNGEN

Für phototrophes Wachstum werden *R. sphaeroides* Kulturen in zu 100 % gefüllten, luftdicht verschlossenen Meplats-Flaschen inokuliert und bei 32°C inkubiert. Damit die anoxygene Photosynthese möglich ist, werden die Kulturen mit Weißlicht bestrahlt (60 W m⁻²). Da das Wachstum unter phototrophen Bedingungen stark verlangsamt ist, erfolgt die Inkubation über mehrere Tage.

2.2.2. PLATTENKULTUREN VON *R. SPHAEROIDES*

R. sphaeroides wird auf RÄ-Agarplatten bei 32°C im Dunkeln kultiviert. Der Wildtyp 2.4.1 wird ohne die Zugabe von Antibiotika zum Medium kultiviert. Der Ausstrich erfolgt steril mittels einer Impföse.

2.2.3. EXPERIMENTE ZUR BESTIMMUNG VON RNA-HALBWERTSZEITEN IN *R. SPHAEROIDES*

Um die Halbwertszeit von RNA bestimmen zu können, muss zunächst die Transkription in den Zellen gestoppt werden. Dies erfolgt durch die Zugabe des Antibiotikums Rifampicin (Serva) zu einer *R. sphaeroides* Kultur mit einer Endkonzentration von $0,2 \text{ mg ml}^{-1}$. Rifampicin inhibiert spezifisch die bakterielle DNA-abhängige RNA-Polymerase (Hartmann et al., 1967), wodurch keine RNA mehr transkribiert werden kann. Da somit in der Zelle nur noch RNA-Abbau und keine Synthese mehr stattfindet, kann später durch RNA-analytische Methoden wie *Northern blot*, *real time RT PCR* oder Microarrays die Halbwertszeit von RNA Molekülen bestimmt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Experimente zur RNA-Halbwertszeit Bestimmung unter microaeroben, phototrophen und aeroben Bedingungen durchgeführt. Die Anzucht der Kulturen erfolgte dabei prinzipiell wie unter 2.2.1.1, 2.2.1.2 und 2.2.1.3 beschrieben. Die Probennahme erfolgte generell zu den Zeitpunkten 0, 5, 10, 20, 30, 45 und 60 min nach Rifampicin-Zugabe. Es ergaben sich jedoch für die jeweiligen Bedingungen Änderungen, welche im Folgenden aufgeführt sind:

- **Microaerob:**

Für eine microaerobe Übernachtskultur werden 300 ml RÄ-Medium in einem 500 ml Erlenmeyerkolben 1%ig mit *R. sphaeroides* angeimpft und wie unter 2.2.1.1 beschrieben angezogen. Diese Vorkultur wird am Tag des Experiments auf eine $OD_{660 \text{ nm}}$ von 0,3 eingestellt. Für jeden Zeitpunkt wird ein 100 ml Erlenmeyerkolben mit 75 ml dieser Kultur beschickt. Diese Kulturen werden auf dem Schüttler bei 140 rpm bei 32°C inkubiert bis sie eine $OD_{660 \text{ nm}}$ von 0,5 erreichen. Es erfolgt die Zugabe von Rifampicin. Zu den oben genannten Zeitpunkten werden die 75 ml Kultur in 2 mit Eis gefüllte Zentrifugenröhrchen überführt, 5 Minuten bei 4°C und 8000 rpm in einer Tischzentrifuge sedimentiert. Der Überstand wird verworfen und das Zellsediment wird in 200 μl kalter RNA-Lösung 1 (2.3.1.1) resuspendiert, in ein 1,5 ml *safe-lock* Reaktionsgefäß überführt und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung bis zur RNA Isolation erfolgt bei -80°C .

- **Aerob**

Für eine aerobe Vorkultur werden 300 ml RÄ-Medium 1%ig in einem 1 l Schikanekolben mit *R. sphaeroides* inokuliert. Die Anzucht erfolgt über Nacht bei 32°C und 140 rpm auf dem Schüttler. 150 ml dieser Vorkultur werden für das Experiment anschließend auf eine $OD_{660 \text{ nm}}$ von 0,3 eingestellt und in einem 500 ml Schikanekolben unter Schütteln (140 rpm) bei 32°C inkubiert bis sie eine $OD_{660 \text{ nm}}$ von 0,5 erreichen. Die Zugabe von Rifampicin und die Probennahme erfolgt wie unter Aufzählungspunkt „Microaerob“ beschrieben.

- **Phototroph**

Die Anzucht einer phototrophen Vorkultur findet in 100 ml Meplatsflaschen statt. Hierfür werden 2 mal 100 ml RÄ-Medium 10%ig mit *R. sphaeroides* inokuliert und wie unter 2.2.1.3 beschrieben über Nacht angezogen. Folgend werden für jeden Zeitpunkt 50 ml Meplats-Flaschen mit einer auf eine $OD_{660 \text{ nm}}$ von 0,3 eingestellten Kultur beschickt und bis zu einer $OD_{660 \text{ nm}}$ von 0,5 phototroph wachsen gelassen. Da Rifampicin blaulichtempfindlich ist, erfolgt die weitere Belichtung während des Experiments mit Rotlicht ($\lambda < 600 \text{ nm}$). Zu jedem

Zeitpunkt werden die 50 ml phototropher Kultur auf 2 mit Eis gefüllten Zentrifugenröhrchen aufgeteilt. Zentrifugation und weitere Behandlung erfolgen wie unter „Microaerob“ beschrieben.

2.3. MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

2.3.1. ISOLIERUNG VON NUKLEINSÄUREN

2.3.1.1. ISOLIERUNG VON GESAMT-RNA AUS *R. SPHAEROIDES*

Um qualitativ hochwertige RNA in großen Mengen aus *R. sphaeroides* zu erhalten, wird die heiße Phenolextraktion angewendet.

Hierfür werden zunächst die Zellpellets aus den vorhergehenden Experimenten in kühler Lösung I auf Eis resuspendiert, bzw. die bereits in Lösung I aufgenommenen, eingefrorenen Pellets auf Eis auftauen gelassen. Durch Zugabe von 200 µl Lösung II, Vortexen und einer Inkubation bei 65°C für 90 Sekunden erfolgt die Zellyse. Alle nachfolgenden Arbeitsschritte, welche die Nutzung von Phenol beinhalten finden unter dem Abzug statt. Die im Folgenden beschriebenen Phenolisierungsschritte werden 3-mal wiederholt. Der Suspension werden 400 µl 65°C warmes, wassergesättigtes Phenol zugegeben, gevortext und für 3 Minuten bei 65°C inkubiert. Anschließend werden die Reaktionsgefäße für 30 s in flüssigen Stickstoff getaucht. Die Trennung der organischen von der wässrigen Phase erfolgt durch eine 20 minütige Zentrifugation bei 13 000 rpm in einer Tischzentrifuge (Biofuge pico) bei Raumtemperatur. Nach erfolgter Phasentrennung wird die obere, wässrige Phase, welche die Nukleinsäure enthält in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es folgen zwei weitere Phenolisierungsschritte wie oben beschrieben. Um etwaige Phenolreste in der Lösung zu beseitigen, wird die Lösung nun mit dem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (Mischungsverhältnis 24:1) versetzt und kräftig gevortext. Für die Phasentrennung wird im Anschluss 5 min bei Raumtemperatur und 13 000 rpm zentrifugiert. Da anschließende enzymatische Reaktionen durch Phenolreste gestört werden können, wird dieser Schritt für Proben, welche für die *real time* RT PCR oder Microarray Analyse vorgesehen sind noch einmal wiederholt.

Die Fällung der Nukleinsäuren erfolgt durch Zugabe von 0,1 Volumen Natriumacetat (3 M, pH 4,5) und 96 % Ethanol für 1 h bei -80°C oder über Nacht bei -20°C. Die gefällte RNA wird anschließend für 30 min bei 4°C und 13 000 rpm sedimentiert. Das Präzipitat wird nun 2-mal mit 70% Ethanol gewaschen und für 10 min in der *speed vac* getrocknet und abschließend in 50 bis 100 µl nukleasefreiem ddH₂O aufgenommen.

RNA Lösung I	300 mM Saccharose; 10 mM Natriumacetat (pH = 4,5); autoklaviert und gekühlt
RNA Lösung II	2 % SDS; 10 mM Natriumacetat (pH = 4,5), autoklaviert

2.3.2. DNase I BEHANDLUNG UND AUFREINIGUNG VON RIBONUKLEINSÄUREN

Soll Gesamt-RNA zu einem späteren Zeitpunkt als *template* in der *real time* qRT-PCR oder für Microarray Analysen eingesetzt werden, muss sie zunächst von störenden Desoxyribonukleinsäuren befreit werden. Hierfür wird die Desoxyribonuklease I DNase I (Invitrogen) verwendet. Die Anwendung erfolgt nach Herstellerangaben. Die Reaktion erfolgt für 1 h bei 37°C.

Im Anschluss an die DNase I Behandlung erfolgt umgehend eine Aufreinigung mittels des RNeasy MiniElute *Cleanup Kit* (Qiagen) gemäß Herstellerangaben.

Um den Erfolg der DNase I Behandlung zu überprüfen erfolgt eine PCR gegen das *housekeeping* Gen *rpoZ*. Dabei wird eine Positivkontrolle mit chromosomaler DNA als *template* verwendet und eine Negativkontrolle mit ddH₂O. In der Positivkontrolle sollte sich auf einem 10%igen Polyacrylamidgel anschließend eine Bande nachweisen lassen, in den DNase I behandelten Proben und in der Negativkontrolle hingegen nicht.

2.3.3. QUANTIFIZIERUNG VON NUKLEINSÄUREN

Zur Bestimmung der Konzentration gelöster Nukleinsäuren wird eine photometrische Messung bei einer Wellenlänge von 260 nm durchgeführt. Bei gleichzeitiger Bestimmung der Absorption bei 280 nm kann über das Verhältnis $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ eine Aussage über eine mögliche Proteinkontamination der Nukleinsäurelösung getroffen werden. Dabei gilt:

1 A₂₆₀ = 50 µg dsDNA (Eine Ratio von 1,8 spricht für eine saubere DNA-Lösung)

1 A₂₆₀ = 40 µg ssRNA (Ratio von 2 spricht für eine saubere RNA-Lösung)

In dieser Arbeit wurden sämtliche Quantifizierungen gelöster Nukleinsäuren am *NanoDrop* (PeqLab) durchgeführt.

2.3.4. AUFTRENNUNG VON NUKLEINSÄUREN MITTELS GELELEKTROPHORESE

2.3.4.1. FORMALDEHYD/AGAROSE-GELELEKTROPHORESE

Zur Auftrennung von Ribonukleinsäuren kann ein Agarose-Gel verwendet werden, welches Formaldehyd enthält. Formaldehyd dient hier zur Denaturierung und verhindert die Ausbildung von Sekundärstrukturen. Die Agarose wird in DEPC-H₂O durch Aufkochen gelöst, anschließend werden MOPS-Puffer und Formaldehyd hinzugefügt. Die fertige Gelmischung wird anschließend in einen mit 1 N NaOH und DEPC-H₂O gespülten, RNase-freien Gelschlitten gegossen. Aufgrund der geringen Pufferfähigkeit des MOPS-Puffers muss das Gel während der Elektrophorese mit Puffer durch eine Umwälzpumpe umspült werden. Hierfür werden die Gelkammer, die Gelkämme und die Schläuche des Pumpsystems mit 1 N NaOH und DEPC-H₂O gespült um sie so von möglichen RNasen zu befreien. Die in der *speed vac* eingedampften RNA Proben (gewöhnlich 10 µg) werden in 9 µl Probenpuffer resuspendiert, für 10 min bei 65°C auf dem Heizblock inkubiert und mit 1 µl RNA-Auftragspuffer versetzt und auf das polymerisierte Gel aufgetragen. Die Proben werden für 10 min in das Gel bei 110 V einlaufen gelassen. Danach erfolgt die weitere gelelektrophoretische Auftrennung der RNA bei einer Spannung von 110 V für 3 h und eingeschalteter Umwälzpumpe, Laufrichtung ist hierbei von der Anoden-Seite der Gelkammer zur Kathoden-Seite.

Formaldehyd/Agarose-Gel	1,43 g Agarose; 104 ml DEPC- H ₂ O; 26 ml Formaldehyd; 14,3 ml MOPS-Puffer (10x)
Probenpuffer	110 µl DEPC- H ₂ O; 89 µl Formaldehyd; 250 µl Formamid; 50 µl MOPS-Puffer (10x)
Laufpuffer	900 ml DEPC- H ₂ O; 104 ml MOPS-Puffer (10x)

In Vorbereitung für einen *Northern blot* durch Vakuumblot (2.3.5.1) wird das Gel nach dem Lauf für 30 min in Denaturierungspuffer unter leichtem Schütteln inkubiert. Im Anschluss erfolgt eine weitere Inkubation für 30 min in Neutralisierungspuffer.

Denaturierungspuffer	6 ml 5 M NaCl; 10 ml 1 M NaOH; ad 200 ml DEPC-H ₂ O
Neutralisierungspuffer	20 ml 1 M Tris/HCl (pH = 7,5), 6 ml 5 M NaCl; ad 200 ml DEPC-H ₂ O

2.3.4.2. POLYACRYLAMID-HARNSTOFF-GELE ZUR AUFTRENNUNG VON RNA

Für *Northern blots* durch Elektroblothing (2.3.5.2) und zur Visualisierung von RNA für die Bestimmung der RNA-Qualität werden 10%ige Polyacrylamid-Gele mit 7 M Harnstoff verwendet. Die RNA Proben werden vor dem Laden mit einem 0,7-fachem Volumen FU-Mix versetzt und für 10 min bei 65°C inkubiert und anschließend kurz auf Eis abgekühlt. Die Proben werden anschließend für 10 min bei 100 V in das Gel einlaufen gelassen, die weitere Auftrennung erfolgt dann bei 300 bis 400 V in 1x TBE. Das Gel kann dann entweder zur Visualisierung und Kontrolle der RNA Qualität mit Ethidiumbromid gefärbt oder direkt geblottet werden.

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

2.3.5. QUANTIFIZIERUNG VON RNA MITTELS *NORTHERN BLOT*

Durch *Northern blots* kann RNA auf eine Nylonmembran übertagen und gebunden werden. Durch radioaktiv markierte Sonden können spezifische RNAs detektiert werden. Es stehen zwei Methoden zur Verfügung: der Vakuumblot für Formaldehyd/Agarose-Gele und der Elektroblothing für Polyacrylamid-Harnstoff-Gele.

2.3.5.1. *NORTHERN BLOT* DURCH VAKUUMBLOT

Für den Vakuumblot wird zunächst ein Whatmanpapier mit 10x SSC angefeuchtet und auf die Fritte des Vakuumblotter gelegt. Auf diese wird nun eine zurechtgeschnittene Nylonmembran gelegt. Dabei ist darauf zu achten, dass keine Luftblasen zwischen Membran und Whatmanpapier sind. Das Whatmanpapier und die Membran werden dann mit der Maske des Vakuumblotter fixiert. Auf die Membran wird dann das gewaschene Gel (2.3.4.1) gelegt und mit 10x SSC überschichtet. Der Blot erfolgt dann nach Anlegung des Vakuums bei 70 bis 100 mbar für 45 min. Es ist darauf zu achten, dass das Gel während der ganzen Zeit mit 10x SSC überschichtet ist.

Nach dem Blot werden die auf die Membran transferierten Ribonukleinsäuren durch *UV-crosslinking* (*Auto-crosslink*-Funktion des Stratagen *UV-crosslinker*) auf der Membran fixiert. Die Membran kann direkt prähybridisiert und hybridisiert (2.3.8) oder für einige Zeit trocken bei Raumtemperatur gelagert werden.

2.3.5.2. NORTHERN BLOT DURCH ELEKTROBLOT

Für den Elektrobplot werden 3 mit 1x TBE angefeuchtete und zurechtgeschnittene Whatmanpapiere blasenfrei auf die Anodenplatte des Elektrobplotters (Peqlab) gelegt. Auf diese wird dann ebenfalls blasenfrei eine Nylonmembran der gleichen Größe gelegt, auf welche wiederum das RNA-Harnstoffgel (2.3.4.2) platziert wird. Abschließend werden 3 weitere, mit 1x TBE angefeuchtete Whatmanpapiere darüber gelegt. Den Abschluss bildet die Kathodenplatte. Der Blot erfolgt bei 250 mA für 3 h.

Durch *UV-crosslinking* (Auto-crosslink-Funktion des Stratagen UV-crosslinker) wird die transferierte RNA nach dem Blot dann auf der Nylonmembran fixiert. Die Membran kann direkt prähybridisiert und hybridisiert (2.3.8) oder für einige Zeit trocken bei Raumtemperatur gelagert werden.

2.3.6. RADIOAKTIVE MARKIERUNG VON NUKLEINSÄUREN

Um spezifische RNA auf *Northern blot* Membranen sichtbar zu machen, werden entweder Oligonukleotide durch die Anheftung eines radioaktiven ^{32}P - γ -Phosphats durch *end-labeling* (2.3.6.1) oder PCR Produkte bzw. durch Restriktionsverdau mit anschließender Gelextraktion gewonnene doppelsträngige DNA Fragmente durch *random priming* (2.3.6.2) radioaktiv markiert. Eine weitere Methode stellt die Herstellung radioaktiv markierter RNA mittels *in vitro* Transkription dar (2.3.6.3). Alle so markierten Sonden binden spezifisch an ihre entsprechenden Ziel-mRNA auf der Membran.

2.3.6.1. RADIOAKTIVE MARKIERUNG DURCH END LABELING

Bei der radioaktiven Markierung von Oligonukleotiden transferiert die T4-Polynukleotidkinase (PNK, Fermentas) das ^{32}P - γ -Phosphat von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ an das dephosphorylierte 5'-Ende eines DNA-Oligonukleotids an. Die Reaktion erfolgt bei 37°C für 1 h.

Reaktionsansatz	10 pmol Oligonukleotid
	1 μl PNK Puffer (10x)
	1 μl T4 PNK (1 U/ μl)
	30 μCi $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$
	ad 10 μl ddH ₂ O

Zum Abstoppen der Reaktion werden 40 μl STE Puffer hinzugefügt.

STE Puffer | 0,1 M NaCl, 0,02 M Tris-HCl, 0,01 M EDTA (pH 7,5)

2.3.6.2. RADIOAKTIVE MARKIERUNG DURCH RANDOM PRIMING

Für die radioaktive Markierung von beispielsweise PCR Produkten wird das NEBlot Kit (NEB) verwendet. Hierbei werden Oktadesoxynukleotide mit zufälliger Sequenz als Primer für eine *in vitro* DNA Synthese mit denaturierter, doppelsträngiger DNA als *template* verwendet. In der von einer DNA Polymerase katalysierten Reaktion wird ein radioaktiv markiertes $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ in den neuen Strang inkorporiert. Der Reaktionsansatz setzt sich nach Herstellerangaben wie folgt zusammen:

Reaktionsansatz	25 ng DNA (1-33 µl; 5 min im Wasserbad bei 100°C denaturieren, danach 5 min auf Eis abkühlen) ad 35 µl ddH ₂ O 5 µl Oktadesoxyribonukleotide in 10x Puffer 6 µl dNTP Mix (2 µl jeweils dATP, dGTP, dTTP) 1 µl DNA Polymerase I, Klenow-Fragment (5 units) 30 µCi [α^{32} P]dCTP
-----------------	--

Der Reaktionsansatz wird für 1 h bei 37°C auf dem Heizblock inkubiert. Die Reaktion wird durch die Zugabe von 5 µl 0,2 M EDTA (pH = 8) gestoppt.

2.3.6.3. RADIOAKTIVE MARKIERUNG DURCH *IN VITRO* TRANSKRIPTION

Die *in vitro* Transkription dient der Herstellung radioaktiv markierter RNA, welche als Sonden für *Northern blot* Analysen verwendet werden können. Als Enzym wurde die T₇ RNA-Polymerase (NEB) verwendet, welche doppelsträngige DNA mit einem T₇-Promotor als *template* nutzt, um davon ausgehend RNA zu transkribieren. Da die so transkribierte RNA als Sonde für *Northern blots* dienen soll, muss der T₇-Promotor vor der *antisense* Sequenz der gewünschten RNA liegen. Hierdurch entsteht ein RNA-Molekül in *antisense* Orientierung zur gesuchten mRNA. Die radioaktive Markierung erfolgt hierbei durch den Einbau von [α^{32} P]UTP während der Transkription. Ein Reaktionsansatz setzt sich wie folgt zusammen:

Reaktionsansatz	5 µl PCR Produkt (mittels Gelextraktion aufgereinigt) 6,8 µl H ₂ O 2,5 µl 10x Puffer 2,5 µl <i>low U Mix</i> (rATP, rCTP, rGTP je 25mM, UTP 5 mM) 1,25 µl DTT (100 mM) 1,875 µl MgCl ₂ (40 mM) 0,6 µl RNasin (40 U/µl) 1,5 µl T ₇ RNA-Polymerase (50 U/µl) 30 µCi [α^{32} P]UTP
-----------------	--

Der Ansatz wird für 3 h bei 37°C inkubiert und währenddessen durch vorsichtiges Resuspendieren gemischt. Nach der Inkubation wird erneut 1 µl T₇ RNA-Polymerase hinzugefügt und die Reaktion für weitere 2 h fortgesetzt. Ein Abstoppen erfolgt durch Zugabe von 25 µl STE-Puffer (2.3.6.1).

2.3.7. AUFREINIGUNG RADIOAKTIV MARKIERTER NUKLEINSÄUREN

Die Aufreinigung radioaktiv markierter Nukleinsäuren erfolgt durch *ProbeQuantTMG Micro Columns* (GE Healthcare). Dabei werden die durch *end labeling* (2.3.6.1) markierten Oligonukleotide über die *G25 Micro Columns* und die durch *random priming* (2.3.6.2) und *in vitro* Transkription (2.3.6.3) gewonnenen Sonden über die *G50 Micro Columns* aufgereinigt. Das Säulenmaterial wird zunächst durch Vortexen homogenisiert, anschließend wird die Säule für 1 min bei 2600 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen und die Säule in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das komplette Volumen des *labeling*-Ansatzes wird anschließend mittig auf die Säule geladen. Es schließt sich eine weitere Zentrifugation für 2 min bei 2600 rpm an. Die Säule wird verworfen, der Durchfluss enthält

die markierten, gereinigten Nukleinsäuren, deren Aktivität am Szintillationszähler bestimmt werden kann.

2.3.8. PRÄHYBRIDISIERUNG UND HYBRIDISIERUNG VON MEMBRANEN MIT RADIOAKTIV MARKIERTEN SONDEN

Um spezifisch RNA auf *Northern blot* Membranen nachzuweisen werden radioaktiv markierte Sonden (2.3.5) verwendet. Für die Prä- und Hybridisierung der Membranen stehen zwei verschiedene Methoden zu Verfügung:

Um unspezifische Bindung der Sonden an die Membran zu verhindern, wird diese zunächst für mindestens 1 h im Hybridisierungssofen prähybridisiert. Die Temperatur ist dabei abhängig von der verwendeten Sonde; sie beträgt 50°C für Oligonukleotide (*end labeling*) bzw. 42°C für Nukleinsäuren, die durch *random priming* und *in vitro* Transkription markiert wurden. Die in der Prähybridisierungslösung enthaltene Lachssperma DNA (LSD) blockiert dabei unspezifische Bindungsstellen auf der Membran. Die Hybridisierung erfolgt dann mit 2×10^6 counts per minute an markierter Sonde in der Hybridisierungslösung bei unveränderter Temperatur über Nacht drehend im Ofen.

Die Membran wird anschließend 2 mal 5 min im Hybridisierungsröhrchen mit der Waschlösung 1 gewaschen. Anschließend wird die Membran weiter in einer Schale so lange mit Waschlösung 2 gewaschen bis mit dem Geiger-Müller-Zählrohr an den Rändern der Membran keine Hintergrundstrahlung mehr feststellbar ist. Die Membran wird dann leicht trocken getupft, in einer Folie eingeschweißt und auf einem *imaging screen* für den *Molecular Imager FX* exponiert.

Prähybridisierung (<i>random priming</i> , <i>in vitro</i> Transkr.)	2,85 ml DEPC-H ₂ O; 1,93 ml Denhardt's-Reagenz (50x); 6,25 ml SSPE (20x); 12,5 ml Formamid; 250 µl SDS (10 %); 0,25 g Glycin; 1,25 ml LSD (vor Zugabe 5 min aufkochen)
Hybridisierung (<i>random priming</i> , <i>in vitro</i> Transkr.)	2,05 ml DEPC- H ₂ O; 550 µl Denhardt's-Reagenz (50x); 550 µl NaPP _i (200 mM); 6,93 ml SSPE (20x); 13,88 ml Formamid; 280 µl SDS (10 %); 2,75 g Dextransulfat; 600 µl LSD (vor Zugabe 5 min mit „heißer“ Sonde aufkochen und 5 min auf Eis abkühlen)
Prähybridisierung (<i>end labeling</i>)	17,4 ml DEPC- H ₂ O; 1,5 ml Denhardt's-Reagenz (50x); 1,5 ml SDS (10 %); 9 ml SSC (20x) 600 µl LSD (vor Zugabe 5 min aufkochen)
Hybridisierung (<i>end labeling</i>)	18,9 ml DEPC- H ₂ O; 1,5 ml SDS (10 %); 9 ml SSC (20x); 600 µl LSD (vor Zugabe 5 min mit „heißer“ Sonde aufkochen und 5 min auf Eis abkühlen)
Waschlösung 1 2x SSC, 0,1 % SDS	20 ml SSC (20x); 2 ml SDS (10%); ad 200 ml DEPC- H ₂ O
Waschlösung 2 0,2x SSC, 0,1 % SDS	2 ml SSC (20x); 2 ml SDS (10%); ad 200 ml DEPC- H ₂ O

Die zweite Methode der Prä- und Hybridisierung erfolgt mit dem Church und Gilbert Puffersystem. Hierbei wird die Prä- und Hybridisierung im selben Puffer bei 42°C durchgeführt, unabhängig von der verwendeten Sonde. Die radioaktiv markierte Sonde wird nach einer Prähybridisierungszeit von mindestens 1 h in denselben Church-Puffer pipettiert. Welcher Church-Puffer verwendet wird, richtet sich nach der Länge der verwendeten Sonde. Kurze Oligonukleotide werden im *low stringency*, längere Nukleinsäuren (*random priming*) im *moderate* oder *high stringency* Puffer hybridisiert. Die Hybridisierung erfolgt über Nacht bei 42°C drehend im Hybridisierungssofen.

Das Waschen erfolgt für Oligonukleotide für 2x 30 s für andere Sonden 2x 5 min im Hybridisierungsröhrchen. Anschließend wird so lange in einer Schale weiter gewaschen bis an den

Rändern der Membran keine Hintergrundstrahlung mit dem Geiger-Müller-Zählrohr mehr feststellbar ist.

Church-Puffer			
	High stringency	Moderate stringency	Low stringency
BSA	1 g	1 g	1 g
ddH ₂ O	30 ml	-	15 ml
Natriumphosphat-Puffer	20 ml	50 ml	50 ml
Formamid	15 ml	15 ml	-
EDTA (0,5 M, pH 8)	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
SDS (20 %)	35 ml	35 ml	35 ml
Natriumphosphat-Puffer (1 M, pH 7,2)	134 g Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O; 4 ml H ₃ PO ₄ (85 %); ad 1 l ddH ₂ O		

2.3.9. PHOSPHOIMAGING

Mit dem *Molecular Imager FX* (Bio-Rad) werden die *imaging screens* ausgelesen. Bei der Exposition der gewaschenen Membranen versetzt die radioaktive Strahlung der Sonden die BaFBr:Eu-Matrix des *screens* in einen angeregten Zustand (Phosphoroxidation). Der HeNe-Laser ($\lambda = 635 \text{ nm}$) des Scanners kehrt nun diesen angeregten Zustand beim Abtasten um (Phosphorreduktion), dabei wird Energie frei, welche in Form eines Lichtquants von einem *photomultiplier* aufgefangen wird. Die Information wird dann vom Programm *Quantity One* (Bio-Rad), oder AIDA (Raytest) in ein auswertbares Bild umgewandelt. Um den *screen* zu löschen, wird er für 15 min mit Gelblight bestrahlt und kann danach wiederverwendet werden.

2.3.10. STRIPPEN VON MEMBRANEN

Eine Membran kann mehrmals mit verschiedenen Sonden hybridisiert werden, da die RNA durch das UV-*cross linking* dauerhaft gebunden ist. Die radioaktiven Sonden können durch sogenanntes *stripping* wieder von der Membran gelöst werden. Hierfür wird die Membran für 20 min in 0,01 % SDS im Wasserbad bei 96°C inkubiert. Sollte sich danach auf der trockenen Membran noch radioaktive Strahlung detektieren lassen, wird dieser Vorgang ein weiteres Mal für 10 bis 20 min wiederholt. Die so behandelte Membran kann entweder direkt erneut prä- und hybridisiert oder bei Raumtemperatur trocken gelagert werden.

2.3.11. POLYMERASEKETTENREAKTION (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*; PCR) wird verwendet um einzelne DNA Sequenzen spezifisch und genau zu amplifizieren. Als Matrize (*template*) dient hierbei entweder chromosomale DNA oder Plasmid-DNA. In einer üblichen PCR-Reaktion wird im ersten Schritt – *melting* – durch Erhitzen auf 96°C das doppelsträngige DNA-*template* aufgeschmolzen, sodass die DNA einzelsträngig vorliegt. Im zweiten *annealing*-Schritt binden ein zu der gesuchten Sequenz komplementäre *sense*- und *antisense*-Primer an das *template*. Die annealing-Temperatur ist dabei Primer-spezifisch, üblicherweise 5°C unter der Schmelztemperatur. Im folgenden *elongation*-Schritt

füllt eine hitzestabile DNA-Polymerase den zwischen den *primern* liegenden Bereich komplementär mit dNTPs auf. Dieser Zyklus wird dann 30- bis 40-mal wiederholt. Dabei wird der Bereich zwischen den beiden Primern exponentiell amplifiziert. Die *extension*-Temperatur ist abhängig von der verwendeten DNA-Polymerase. In dieser Arbeit wurde die *Taq*-Polymerase (Qiagen) verwendet, die optimale Temperatur liegt hier bei 72°C. Ein üblicher PCR-Ansatz sieht dabei wie folgt aus:

PCR-Ansatz	1 µl DNA- <i>template</i> (50 ng/µl); 1 µl <i>Taq</i> -Polymerase Puffer (10x); 0.4 µl dNTPs (10 mM); 0.6 µl <i>sense</i> -Primer (10 pmol/µl); 0.6 µl <i>antisense</i> -Primer (10 pmol/µl); 0.2 µl <i>Taq</i> -Polymerase (1 U/µl); ad 10 µl Roth-H ₂ O
------------	--

2.3.11.1. QUANTITATIVE REAL TIME RT-PCR

Ein Werkzeug der Genexpressionsanalyse stellt die quantitative *real time* reverse Transkriptase PCR (*real time* qRT-PCR) dar. Bei dieser Methode wird zunächst mit Hilfe einer reversen Transkriptase (RT) ein cDNA-Transkript einer spezifischen mRNA hergestellt. Diese cDNA dient dann in einem weiteren Schritt einer DNA-Polymerase als *template* für eine PCR Reaktion. Um die Amplifikation dieses *templates* in Echtzeit (*real time*) sichtbar zu machen, enthält der Reaktionsansatz zusätzlich zu Puffer, Enzym, dNTPs und Primern den Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I. Dieser Farbstoff absorbiert Licht bei einer Wellenlänge von 494 nm und emittiert Licht bei 524 nm. Da SYBR Green I in die in der PCR-Reaktion gebildete doppelsträngige DNA interkaliert und die Fluoreszenz mit zunehmender Menge an dsDNA zunimmt, kann anhand der Zunahme der Fluoreszenz die Amplifikation in Echtzeit beobachtet werden. Anhand eines internen Standards und des Amplifikationszykluses in dem die gemessene Fluoreszenz einen definierten Schwellenwert überschreitet, lassen sich Rückschlüsse auf die relative Menge der betrachteten mRNA in der Reaktion treffen.

In dieser Arbeit wurde das Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green QRT-PCR Master Mix Kit (Agilent) verwendet. In diesem Kit erfolgen die reverse Transkription der mRNA und die Amplifikation der cDNA mittels PCR in einem Schritt. Der Reaktionsansatz wird nach Herstellerangaben pipettiert, das Reaktionsvolumen jedoch von 20 µl auf 10 µl reduziert. Üblicherweise beträgt die Konzentration der RNA 20 ng µl⁻¹, in Einzelfällen auch 0,2 ng µl⁻¹.

<i>real time</i> qRT-PCR Reaktionsansatz	5 µl 2x SYBR Green QRT-PCR master mix; 0,5 µl <i>sense</i> Primer (10 µM), 0,5 µl <i>antisense</i> Primer (10 µM), 0,1 µl DTT (100 mM), 0,5 µl RT/RNase block, ad 10 µl ddH ₂ O
--	--

Die Berechnung des Unterschiedes in der Expression eines Zielgenes bzw. der Abundanz einer mRNA in Bezug auf ein unverändertes Referenzgen erfolgt mit Hilfe des effizienzkorrigierten Quantifizierungsmodells nach Pfaffl (Pfaffl, 2001):

Formel 1

$$Ratio = \frac{(E_{Ziel})^{\Delta Ct_{Ziel}(Kontrolle-Probe)}}{(E_{Ref})^{\Delta Ct_{Ref}(Kontrolle-Probe)}}$$

E ist in dieser Formel die jeweilige Effizienz der verwendeten Primer für das zu untersuchende Gen und das Kontrollgen. Der Effizienzwert eines Primerpaares gibt dabei an, wie gut die Zielsequenz in einer PCR-Reaktion amplifiziert wird. Ein Wert von 2 entspricht einer vollständigen Verdopplung während eines Zyklus. Der ΔCt Wert gibt dabei den Unterschied in Zyklen an, bei denen die

Fluoreszenz der Kontrolle und des Versuchsansatzes den Fluoreszenz*threshold* des Gerätes überschreiten.

Als Kontrollgen dient in dieser Arbeit entweder *rpoZ* oder das 16S rRNA Gen (RSP_4392). Die „Kontrolle“ ist in den meisten Fällen die t_0 Probe einer Versuchsreihe, während die „Probe“ folglich die Probe eines späteren Zeitpunktes t_x darstellt.

2.4. TRANSKRIPTOMSTUDIEN IN *R. SPHAEROIDES*

Als Transkriptom bezeichnet man die Gesamtheit aller RNAs, die sich zu einem bestimmten Zeitpunkt in einer Zelle befinden. Transkriptom-Chips sind eine etablierte Methode, die Genexpression in einem Gewebe oder einem Organismus zu einem bestimmten Zeitpunkt, zum Beispiel nach einem externen Stimulus, transkriptomweit zu analysieren. Auf einem Chip befinden sich mehrere tausend DNA oder RNA Sonden, die spezifisch für alle bekannten Transkripte eines Organismus oder eines Gewebes sind. Für eine Transkriptomanalyse wird die Gesamt-RNA isoliert und nach der gebräuchlichsten Methode mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Diese *gelabelte* RNA wird anschließend mit den Sonden auf dem Chip hybridisiert. Durch einen Laser kann anschließend der Fluoreszenzfarbstoff angeregt werden und die jeweilige Intensität des emittierten Lichts gibt dann Aufschluss über die Menge des entsprechenden Transkriptes in der Zelle.

2.4.1. ERSTELLUNG DER *R. SPHAEROIDES* MICROARRAYS

Für die Transkriptomanalyse von *R. sphaeroides* existieren bis zum heutigen Zeitpunkt keine kommerziell erwerblichen Chips. Aus diesem Grund wurde von Dr. Sebastian Metz auf Basis der Agilent Plattform im Jahr 2009 ein Microarray designt (Dissertation Sebastian Metz; 2010). Da die vollständige Genomsequenz von *R. sphaeroides* bekannt (Choudhary et al., 1999; Mackenzie et al., 2001; Zhou et al., 2003) und über das *Joint Genome Institute*¹ veröffentlicht ist, können diese Sequenzen im FASTA Format direkt zur Erstellung der Microarray Sonden herangezogen werden. Beinhaltet sind darin Sequenzen von 4304 proteinkodierenden Genen und 79 RNA Gene (tRNA, rRNA), zusätzlich sind die Sequenzen von 144 kleinen RNAs durch einen *Hfq-pulldown* und durch *454 pyrosequencing* bekannt. Die resultierenden 4527 Sequenzen werden im FASTA Format mit Hilfe der webbasierten *eArray* Software von Agilent² für das Design der Sonden herangezogen. Für den von Dr. Sebastian Metz designten Chip wurden die Einstellungen so gewählt, dass pro Gen 3 *antisense* Sonden mit einer Länge von 60 bp generiert werden. Dies war nötig, da für die meisten Fragestellungen die zu verwendende RNA mittels des Kreatech ULSTM- *labeling Kits for Agilent Microarrays* *gelabelt* wurde. Da mit der Methode des direkten RNA-*labelns* mittels dieses Kits keine RNA *spike-ins* als Kontrollen genutzt werden können, musste im Rahmen dieser Arbeit ein neuer *R. sphaeroides* Microarray designt werden, welcher anstatt der *antisense* Sonden nun Sonden in *sense* Orientierung aufweist. Hierfür wurden die Einstellung demzufolge so gewählt, dass pro Gen 3 Sonden in *sense* Orientierung mit einer Länge von 60 bp hergestellt werden. Sollten die Sequenzen der Gene dabei kürzer als 60 nt sein, werden sie in 5' und 3' Richtung zu gleichen Teilen durch angrenzende genomische Sequenzen aufgefüllt. Falls möglich werden die Sonden so gewählt, dass sie

¹ http://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/w/main.cgi?section=TaxonDetail&page=taxonDetail&taxon_oid=640069327

² <https://earray.chem.agilent.com/earray/>

innerhalb der Gensequenz nicht überlappen (*best distribution methodology*). An jede Sonde wird an das 3' Ende ein 60 bp langer, sogenannter *linker* angefügt, um die Sonden später von der Oberfläche des Chips etwas abzuheben. Dabei wird die von *eArray* vorgeschlagene Sequenz genutzt (TAT CCT ACT ATA CGT ATC ACA TAG CGT TCC GTA ATG TGG CCG GGA TAG ACC TAG CTT AAG). Die Chips werden im „8x15K“ Format erstellt. Das bedeutet, dass sich auf jedem Glasobjektträger, dem *slide*, 8 Arrays mit jeweils 15 744 Sonden befinden. Da die Sequenzen von *R. sphaeroides* den Microarray nur zu 90 % füllen, werden die übrigen Plätze mit zufälligen Sonden gefüllt. Zusätzlich sind auf dem Chip 536 Agilent-Kontrollen vorhanden.

Wie erwähnt, sollten für die in dieser Arbeit verwendeten Chips RNA *spike-ins* verwendet werden. Das Agilent RNA *spike-in* Kit enthält zwei Mischungen aus jeweils 10 *in vitro* synthetisierten, polyadenylierten Transkripten des Adenovirus E1A Genoms. Diese Transkripte sind in unterschiedlichen Anteilen gemischt. Werden diese *spike-ins* später mit auf dem Microarray co-hybridisiert, kann anhand der unterschiedlichen Fluoreszenzen eine Aussage über die Qualität, Linearität und Sensitivität mittels einer Soll-Ist-Beziehung getroffen werden. Desweiteren können die Fluoreszenzsignale der *spike-ins* zur Normalisierung der Microarrays herangezogen werden.

Da die Fluoreszenzmarkierung der *spike-ins* nur über einen cDNA Zwischenschritt funktionieren kann, muss die entsprechende Gesamt-RNA ebenfalls mit dieser Methode *gelabelt* werden (2.4.3.1). Da am Ende dieser Markierungsmethode ein cRNA Molekül in *antisense* Orientierung entsteht, müssen die Sonden auf dem Microarray dementsprechend in *sense* Orientierung sein.

2.4.2. EXPERIMENTELLES DESIGN

Für die globale Analyse von RNA Halbwertszeiten unter unterschiedlichen Sauerstoffbedingungen werden für jede untersuchte Bedingungen jeweils 2 Einzelkolonien des *R. sphaeroides* Wildtyps 2.4.1 von Platte angeimpft. Diese sind als Kulturen I und II bezeichnet. Aus jeder Kultur werden für das Experiment 2 Vorkulturen angeimpft, a und b. Mit diesen Proben werden im Folgenden die Experimente zur Bestimmung von RNA Halbwertszeiten wie unter 2.2.3 beschrieben durchgeführt. Endgültig erhält man so für jede Bedingung 4 Probengruppen; Ia, Ib, IIa und IIb. An die Experimente anschließend wird die Gesamt-RNA wie unter 2.3.1.1 beschrieben isoliert, DNase I verdaut (2.3.2), die Qualität der RNA mittels Polyacrylamidgelelektrophorese (2.3.4.2) überprüft und beispielhaft die Halbwertszeiten einiger ausgesuchter Transkripte mittels *Northern blot* (2.3.5) bestimmt.

Für die Transkriptomanalyse werden die Proben Ia mit Ib und IIa mit IIb der aeroben Probengruppe (HO, *high oxygen*) gepoolt. Gleichermaßen wird mit den Proben der microaeroben (LO, *low oxygen*) und der phototrophen Experimente (PT, *phototrophic*) verfahren. Gepoolt werden jeweils 2 µg Gesamt-RNA. Das *Labeln* der Probenpools erfolgt wie unter 2.4.3 beschrieben.

2.4.3. FLUORESZENZMARKIERUNG VON RNA

Die gebräuchlichste Methode RNA für Transkriptomanalysen mittels Microarrays zu markieren, stellt die Fluoreszenzmarkierung dar. Als Fluoreszenzfarbstoffe werden üblicherweise Cy3 und Cy5 aus der Gruppe der Cyanine genutzt. Diese Farbstoffe emittieren bereits bei niedrigen Anregungsenergien sehr stark. Cy3 absorbiert dabei Licht einer Wellenlänge von 550 nm und emittiert bei 570 nm, wodurch die Fluoreszenz grün erscheint. Das Absorptionsmaximum von Cy5 liegt bei 649 nm, die Emissionswellenlänge beträgt 670 nm, was als rotes Fluoreszenzsignal wahrnehmbar ist.

Die Markierung von RNA für Microarray Experimente erfolgte in dieser Arbeit mittels des *Low Input Quick Amp WT labeling Kit* von Agilent, welches im Folgenden beschrieben ist.

2.4.3.1. FLUORESCENZMARKIERUNG VON RNA MIT AGILENT LOW INPUT QUICK AMP WT LABELING KIT

Wie unter 2.4.1 beschrieben, stellen RNA *spike-ins* eine gute Methode dar, die Qualität und Linearität der *labeling* Reaktion zu überwachen. Zusätzlich können die Fluoreszenzdaten der *spike-in* Kontrollen als Anhaltspunkte zur Normalisierung genutzt werden. Der Gebrauch dieser RNA *spike-ins* setzt jedoch eine cDNA-Syntheseschritt voraus. Deshalb wird hierfür das *Low Input Quick Amp WT labeling Kit* von Agilent verwendet.

Durch dieses Kit entsteht in einem ersten Schritt aus der eingesetzten Gesamt-RNA und der jeweilig zugesetzten *spike-in*-RNA durch reverse Transkription cDNA, zu dem ersten *antisense* cDNA Strang wird gleichzeitig ein zweiter *sense* cDNA Strang synthetisiert. Komplementär zu diesem *sense* cDNA Strang wird dann durch die T7 RNA Polymerase ein cRNA Strang polymerisiert. Dabei werden Cy3 bzw. Cy5 markierte CTPs inkorporiert, wodurch Fluoreszenzfarbstoff-markierte cRNA entsteht. Diese wird in einem weiteren Schritt aufgereinigt und kann dann für die Hybridisierung von Microarrays genutzt werden.

Die Vorbereitung der *spike-in* Proben erfolgt nach Herstellerprotokoll. Dabei wird *spike-in A Mix* zu den Proben, die mit Cy3 und *spike-in B Mix* zu denen, die mit Cy5 markiert werden gegeben. Tabelle 2-1 zeigt die relative Kopienzahl der 10 *spike-in* RNAs und deren zu erwartende Ratio.

Tabelle 2-1: Relative Kopienzahl und Ratios der RNA *spike-in* Kontrollen. Auszug aus dem Agilent RNA *spike-in* Kit Protokoll

Name RNA Spike-In	Spike A Mix relative Kopienzahl	Spike B Mix relative Kopienzahl	Erwartete Ratio (A/B)
(+) E1A_r60_1	10	10	1:1
(+) E1A_r60_n11	1,5	0,5	3:1
(+) E1A_r60_a20	100	100	1:1
(+) E1A_r60_3	3	9	1:3
(+) E1A_r60_a104	10	30	1:3
(+) E1A_r60_a107	30	10	3:1
(+) E1A_r60_a135	9	3	3:1
(+) E1A_r60_a22	10	100	1:10
(+) E1A_r60_a97	0,5	1,5	1:3
(+) E1A_r60_n9	100	10	10:1

Für die *label*-Reaktion werden 50 ng Gesamt-RNA eingesetzt, das Vorgehen geschieht nach Herstellerangaben.

Für die Aufreinigung der cRNA wurden die von Agilent empfohlenen *RNeasy mini spin columns* von Qiagen nach Herstellerangaben verwendet.

Die Herstellerprotokolle für das *Low Input Quick Amp WT labeling Kit* und das RNA *spike-in* Kit befinden sich auf der CD im Anhang.

2.4.4. BESTIMMUNG DER LABEL-EFFIZIENZ

Wie effizient die Markierungsreaktion der RNA war, lässt sich photometrisch bestimmen. Hierfür wird zunächst die Konzentration der RNA ($\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$) und die Konzentration des jeweiligen Farbstoffes *Cy3/Cy5* ($\text{pmol } \mu\text{l}^{-1}$) bestimmt.

Die Markierungseffizienz für Proben, die mit dem Agilent *Low Input Quick Amp WT Labeling Kit* *gelabelt* wurden, lässt sich nach folgenden Formeln bestimmen:

Formel 2
$$\mu\text{g } cRNA = \frac{\text{Konzentration } cRNA * 30\mu\text{l (Elutionsvolumen)}}{1000}$$

Die spezifische Aktivität ($\text{pmol Cy3 od Cy5 pro } \mu\text{g } cRNA$) errechnet sich wie folgt:

Formel 3
$$\text{Spezifische Aktivität (pmol Cy3 oder Cy5 pro } \mu\text{g } cRNA) = \frac{\text{Konzentration Cy3 oder Cy5}}{\text{Konzentration } cRNA} * 1000$$

Für das „8x15k“ Microarray Format sollte sich für jeden Array mindestens eine Ausbeute an cRNA von 0,825 μg und eine spezifische Aktivität von 15 ergeben.

2.4.5. HYBRIDISIEREN UND WASCHEN VON MICROARRAYS

Nach der *label*-Reaktion werden die jeweils mit *Cy3* und *Cy5* markierten RNA Proben gemischt. Wie unter 2.4.2 beschrieben sind die 0' Proben jeweils als Referenz zu betrachten und sind mit *Cy5* *gelabelt*, während die 5', 10', 20' und 30' Proben entsprechend mit *Cy3* *gelabelt* sind. Diesem Schema folgend, werden die *gelabelten* RNA Proben vereinigt. Für die Hybridisierung werden 300 ng *gelabelter* RNA verwendet.

Die Hybridisierung erfolgt mit dem *Gene Expression Hybridization Kit* (Agilent). Vor der Hybridisierung muss die RNA jedoch zunächst fragmentiert werden. Die Fragmentierung löst Sekundärstrukturen, sodass die RNA besser an die kurzen Sonden auf dem Chip binden kann.

Fragmentierungsansatz	300 ng <i>Cy3</i> <i>gelabelte</i> RNA 300 ng <i>Cy5</i> <i>gelabelte</i> RNA 5 μl <i>blocking agent</i> (10x) 1 μl <i>fragmentation buffer</i> (25x) ad 25 μl ddH ₂ O
-----------------------	--

Der Ansatz wird für exakt 30 min bei 65°C inkubiert. Es ist darauf zu achten, diese Zeit nicht zu überschreiten. Danach wird der Ansatz direkt auf Eis gestellt. Zu den 25 μl des Fragmentierungsansatzes werden dann 25 μl des 2x GEX *hybridization buffers* gegeben. Die Mischung wird luftblasenfrei, vorsichtig resuspendiert und kurz abzentrifugiert. Bevor die so vorbereiteten Proben geladen werden, muss der *gasket slide* in Hybridisierungsschlitten gelegt werden. Von den 50 μl der Probenansätze werden dann 40 μl in die Vertiefung auf den *gasket slide* geladen. Es ist zu beachten, dass die Flüssigkeit nicht die Gummiumrandung der Vertiefung berührt und keine Luftblasen entstehen. Anschließend wird der Microarray Chip mit der aktiven Seite nach unten auf den *gasket-slide* aufgelegt, dabei sollten sich ebenfalls keine Luftblasen in den Kammern bilden. Danach wird der gesamte Aufbau mittels der Schrauben des Hybridisierungsschlittens fixiert und in

die Halterungen des Hybridisierungsofens eingespannt. Die Hybridisierung erfolgt dann für exakt 17 h bei 65°C. Diese Hybridisierungszeit sollte dabei möglichst genau eingehalten werden.

Abbildung 2.1 zeigt schematisch das Beladungsschema der Microarray Chips und mit welchem Fluoreszenzfarbstoff die jeweiligen Proben *gelabelt* wurden. Die 0' Proben werden als Referenz verwendet und sind mit Cy5 markiert (rot), während die Proben der Zeitpunkte 5', 10', 20' und 30' mit Cy3 (grün) *gelabelt* sind.

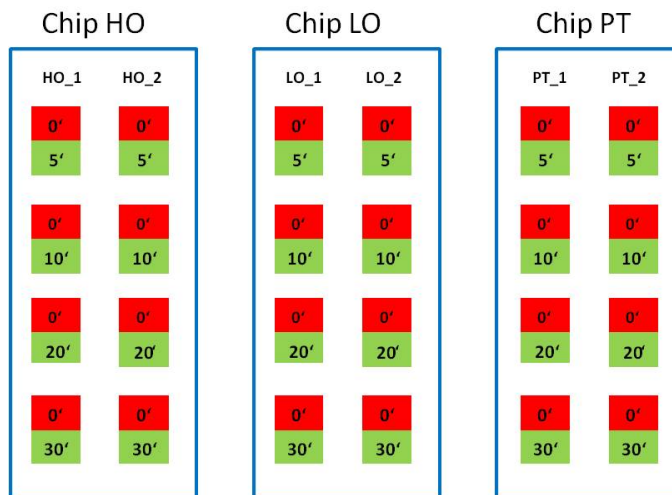


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Beladung der Microarray Chips für die aeroben Proben (HO; *high oxygen*), microaeroben (LO; *low oxygen*) und phototrophen (PT; *phototrophic*) Proben. Die RNA Pools der 0' Proben wurden mit Cy5 *gelabelt* (rot), die RNA Pools der Proben der späteren Zeitpunkte (5', 10', 20', 30') mit Cy3 (grün).

Das Waschen des Chips erfolgt mit den beiden Waschlösungen des *Gene Expression Wash Buffer Kits* nach Anleitung des Herstellers. Dabei wird lediglich die Waschzeit im ersten Waschpuffer aufgrund des hohen GC-Gehalts der *R. sphaeroides* RNA auf 5 min erhöht.

Der Chip sollte dann möglichst zeitnah eingescannt werden, da sich Sauerstoff, besonders Ozon, und Licht negativ auf die Fluoreszenzsignale auswirken.

2.4.6. SCANNEN VON MICROARRAYS

Die Microarray Chips werden mit dem DNA-*microarray* Scanner von Agilent mit einer Auflösung von 3 µm eingescannt. Die erhaltenen Bilder im .tif-Format werden anschließend mit der Agilent *feature extraction* Software ausgewertet. Mit dieser Software werden die Fluoreszenzsignale auf dem Chip jeder einzelnen Sonde zugeordnet, die Informationen aus den Bilddateien in Zahlenwerte umgerechnet und im Textformat ausgegeben. Anhand dieser Rohdaten erfolgt die weitere Normalisierung und Auswertung.

Die Anleitung für die *feature extraction* Software befindet sich auf der CD im Anhang.

2.4.7. NORMALISIERUNG DER MICROARRAYS

Die erhaltenen Rohdaten wurden vor der weiteren Nutzung und der folgenden Berechnung der Halbwertszeiten zunächst von Dr. Birgit Samans (Institut für Biometrie und Populationsgenetik, JLU Gießen) auf ihre Qualität überprüft und dann normalisiert. Hierfür wurden zwei Normalisierungsmethoden getrennt voneinander durchgeführt und verglichen. Zum einen wurde

eine Median basierte Normalisierung und zum anderen eine Normalisierung anhand der Kontrollspots der RNA *spike-ins* durchgeführt.

Bei der Median-Normalisierung wird von den Intensitäten aller *spots* auf dem Microarray (mit Ausnahme der Kontroll- und *blank-spots*) der Median berechnet. Zur Normalisierung wird jede einzelne Intensität dann so korrigiert, dass der Median aller Microarrays vergleichbar ist.

Bei der *spike-in* RNA handelt es sich um 10 *in vitro* synthetisierte, polyadenylierte Transkripte, die aus dem Adenovirus E1A Transkriptom stammen und in zwei Mixen in unterschiedlichen Konzentrationen vorliegen (siehe Tabelle 2-1). Bei Cohybridisierung der beiden *spike-in* Mixe auf den Microarray kann unter anderem durch Vergleich der Soll- und Ist-Werte der Fluoreszenzen dieser Kontrollen die Linearität, Sensitivität und Genauigkeit des Systems überwacht werden. Zusätzlich ließen sich diese sogenannten Kontroll-*spots* aber auch als Anlehnungspunkte für die Normalisierung nutzen. Wie aus den relativen Mengen (Tabelle 2-1) ersichtlich ist, decken die RNA *spike-ins* ein breites Spektrum an Konzentrationen ab. Auf der Grundlage, dass die Konzentration einer RNA naturgemäß in direktem Zusammenhang mit der Fluoreszenz steht, ließen sich die bekannten relativen Mengen der Kontrollen mit den gemessenen Fluoreszenzwerten in Verbindung bringen. Die Normalisierung erfolgte dann anhand dieser Zusammenhänge. Für beide Normalisierungsmethoden wurde die Statistiksoftware R verwendet.

2.5. BERECHNUNG VON HALBWERTSZEITEN

Für die Berechnungen der Halbwertszeiten wird angenommen, dass der RNA-Abbau mit einer konstanten Rate über den beobachteten Zeitraum stattfindet. Für die Berechnungen werden zunächst Verhältnisse gebildet, inwiefern sich die RNA-Level späterer Zeitpunkte nach Rifampicinzugabe zum Zeitpunkt 0 min verhalten. Basis hierfür sind entweder Fluoreszenzwerte (Microarray), *phosphoimaging*-Signale (*Northern blot*) oder Ct-Werte (qRT PCR). Bei konstantem Abbau der RNA sollten die logarithmierten Ratios linear über die Zeit abnehmen. Abbildung 2.2 zeigt die beispielhafte Darstellung eines idealen Abbauprofils.

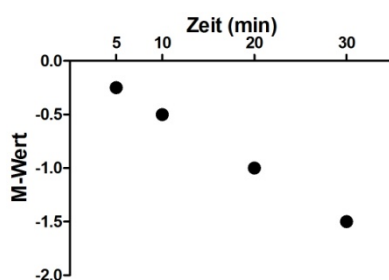


Abbildung 2.2: Beispielhafte Darstellung eines idealen Abbauprofils. Aufgetragen sind die M-Werte zu den vier Zeitpunkten gegen die Zeit. Der Abbau der RNA findet über den beobachteten Zeitraum mit einer konstanten Rate statt. Bei logarithmischer Darstellung zeigt sich so ein lineares Abbauprofil.

Anhand dieser Abbau-Profile lässt sich die Steigung (k) der linearen Regressionsgeraden errechnen. Die Berechnungen der Steigungen erfolgen mittels der Funktion „Steigung“ in Microsoft Excel. Die Halbwertszeit ($t_{1/2}$) eines Transkriptes berechnet sich dann wie folgt:

Formel 4

$$t_{1/2} = -1/k \quad (\text{Andersson et al., 2006})$$

2.5.1. BERECHNUNG VON HALBWERTSZEITEN AUS MICROARRAYDATEN

Für die Auswertung der Microarrays werden nach der Normalisierung zunächst die M-Werte für jede Sonde berechnet. Die M-Werte sind die logarithmierten Ratios der Cy3 und Cy5 Intensitäten.

Formel 5

$$M = \left[\log_2 \left(\frac{Cy5}{Cy3} \right) \right]$$

Der M-Wert entspricht also beispielsweise der Ratio der Intensität des Signals der 5 min-Probe zur Intensität des Signals der 0 min-Probe. Somit erhält man für jede Sonde vier M-Werte (5 min/0 min, 10 min/0 min, 20 min/0 min und 30 min/0 min), aus denen sich letztendlich die Halbwertszeit berechnen lässt.

Wie beschrieben, existieren für jedes Gen mindestens drei Sonden. Die Berechnung der Halbwertszeit erfolgt mittels der gemittelten Steigung aller Sonden und für jedes der beiden Replikate jeweils einzeln, sodass letztendlich zwei Halbwertszeiten pro Bedingung für jedes Transkript vorliegen.

Da das Abbauprofil nicht für jede Sonde dem Idealfall entspricht, eine einzelne Betrachtung eines jeden Profils aber aufgrund der hohen Datenmenge nicht durchführbar ist, werden für die Berechnung der Steigungen folgende Bedingungen vorausgesetzt:

- Die Berechnung der Steigung erfolgt anhand mindestens dreier, aufeinanderfolgender M-Werte.
- Der $M_{10 \text{ min}}$ -Wert muss einen negativeren Wert aufweisen als der $M_{5 \text{ min}}$ -Wert, ansonsten wird der $M_{5 \text{ min}}$ -Wert nicht mit in die Berechnung der Steigung einbezogen (Abbildung 2.3a).
- Der $M_{30 \text{ min}}$ -Wert muss einen negativeren Wert als der $M_{20 \text{ min}}$ -Wert aufweisen, ansonsten wird der $M_{30 \text{ min}}$ -Wert nicht mit in die Berechnung der Steigung einbezogen (Abbildung 2.3b).
- Der $M_{20 \text{ min}}$ -Wert muss einen negativeren Wert als der $M_{10 \text{ min}}$ -Wert aufweisen, ansonsten wird für diese Sonde keine Steigung berechnet, da die Werte nicht aufeinanderfolgen (Abbildung 2.3c).

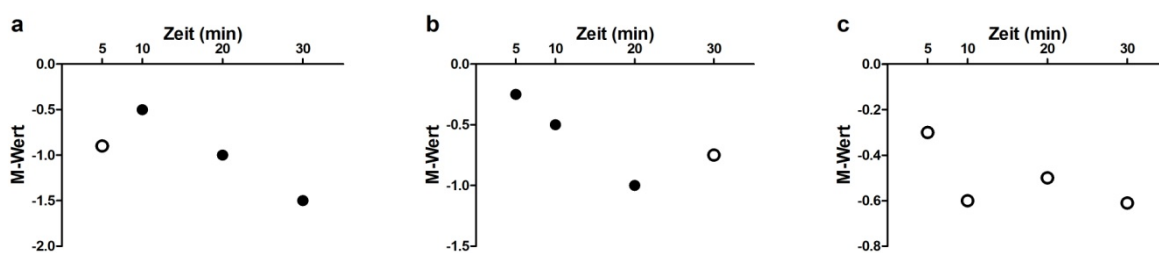


Abbildung 2.3: Beispielhafte Darstellung von Abbauprofilen, bei denen nicht alle M-Werte in die Berechnung der Steigung mit einbezogen werden. (a) Der M-Wert zum Zeitpunkt 5 min ($M_{5 \text{ min}}$ -Wert) hat einen negativeren Wert als der nachfolgende $M_{10 \text{ min}}$ -Wert und fließt daher nicht in die Berechnung der Steigung mit ein (offener Kreis). (b) Wenn der $M_{30 \text{ min}}$ -Wert einen positiveren Wert hat als der $M_{20 \text{ min}}$ -Wert, wird er nicht mit einbezogen (offener Kreis). (c) Ist der $M_{20 \text{ min}}$ -Wert größer als der $M_{10 \text{ min}}$ -Wert, wird für diese Sonde keine Steigung berechnet, da die Werte zeitlich aufeinanderfolgen.

- Desweiteren werden alle positiven Steigungen nicht in die weitere Auswertung mit einbezogen.

Sind alle oben genannten Bedingungen erfüllt, werden die Steigungen aller Sonden eines Gens/Transkriptes gemittelt. Aus dem Mittelwert wird dann mittels der Formel 4 die Halbwertszeit für jedes Gen/Transkript berechnet.

2.5.2. BERECHNUNG VON HALBWERTSZEITEN AUS *NORTHERN BLOT* DATEN

Die *phosphoimage*-Signale der transkriptspezifischen Sonden werden wie unter 2.3.9 beschrieben quantifiziert und gegen die Signale einer Ladekontrolle normalisiert. Anschließend werden wie beschrieben die Ratios berechnet und logarithmiert. Aus den dazugehörigen Abbauprofilen wird dann wie unter 2.5 beschrieben die Halbwertszeit berechnet. Dabei gelten dieselben Prämissen wie bei der Analyse der Microarraydaten.

2.5.3. BERECHNUNG VON HALBWERTSZEITEN AUS *REAL TIME RT PCR* DATEN

Halbwertszeiten aus *real time RT PCR* Daten errechnen sich prinzipiell wie beschrieben. Als Ausgangsdaten werden hierbei jedoch die Ct-Werte verwendet, welche gegen die Ct-Werte eines Standards normalisiert werden. Die wie unter 2.3.11.1 beschrieben errechneten Ratios werden logarithmiert und anschließend gegen die Zeit aufgetragen. Die Berechnung der Halbwertszeiten aus der Steigung dieser Profile erfolgt wie oben erläutert und mit denselben oben dargelegten Voraussetzungen.

3. ERGEBNISSE

3.1. AUFARBEITUNG DER ROHDATEN UND VERGLEICH DER NORMALISIERUNGSMETHODEN

Eine Normalisierung von Microarray Rohdaten ist notwendig, um sichergehen zu können, dass beobachtete Intensitätsunterschiede der Fluoreszenzen tatsächlich auf biologische Effekte zurückzuführen sind, z.B. auf Unterschiede in der Expression, bzw. in diesem speziellen Fall, auf Unterschiede in der Stabilität. Dabei soll die Wahrscheinlichkeit, dass diese Effekte auf künstliche Störquellen, wie beispielsweise auf unterschiedliche *labeling*-Effizienzen, Hybridisierungsunterschiede oder Scanartefakte zurückzuführen sind, möglichst kleingehalten werden. Eine in den meisten Fällen angewendete Normalisierung nach LOWESS (*locally weighted scatterplot smoothing*; (Smyth & Speed, 2003)) konnte für diese Microarrays nicht angewendet werden, da die zugrundeliegende Annahme, dass die meisten Gene nicht unterschiedlich exprimiert sind, nicht zutreffend ist. Durch die Inhibition der gesamten Transkription durch Rifampicin ist vielmehr davon auszugehen, dass die Abundanz der meisten Transkripte in den Zellen abnimmt. Es ist anzunehmen, dass man mit diesen Microarrays nicht nur Änderungen einiger weniger Transkripte beobachtet, sondern dass das gesamte Transkriptom betroffen ist. Aus diesem Grund wurden zwei andere Methoden zur Normalisierung der Rohdaten angewendet. Zum einen wurde eine Median-Normalisierung durchgeführt, wobei jeder Intensitätswert so korrigiert wird, dass der Median der Intensitäten aller Microarrays gleich ist. Zum anderen wurden die Fluoreszenzwerte der *spike-in* RNA als Kontrollen zur Normalisierung verwendet (2.4.7).

Mit den erhaltenen normalisierten Daten wurde zunächst für jeden *array* ein MA-Plot erstellt, um eine erste Abschätzung der Qualität der Daten zu erhalten. Bei einem MA-Plot wird der M-Wert, welcher die logarithmierte Ratio der Intensitäten von Cy3 und Cy5 für die jeweilige Sonde darstellt, gegen den A-Wert aufgetragen. Der A Wert jeder Sonde errechnet sich aus dem logarithmierten Mittelwert der Fluoreszenzwerte von Cy3 und Cy5 (Formel 7).

Formel 6

$$A = \left[\frac{1}{2} (\log_2 Cy5 + \log_2 Cy3) \right]$$

Durch den Vergleich der MA-Plots der Median-normalisierten und der *spike-in* normalisierten Daten erhielt man bereits eine Einschätzung der Qualität der beiden Normalisierungsmethoden. Bei einer gleichmäßigen Normalisierung sollte der MA-Plot eine möglichst parallele Wolke aus Datenpunkten entlang der M-Wert Nulllinie aufzeigen. Dabei sollten in den Extremen der A-Werte keine Ausreißer nach oben oder nach unten auftreten. Desweiteren sollte sich eine Verschiebung der M-Werte in den negativen Bereich mit steigender Minutenzahl beobachten lassen. Ein späterer Zeitpunkt (5min; 10min; 20min; 30min) bedeutet, dass hier eine zunehmend negative Ratio zu erwarten ist, da die Proben zu späteren Zeitpunkten nach Rifampicinzugabe mit den 0 min Proben verglichen werden. Durch den mutmaßlich vorherrschenden Abbau der RNA ist eine Abnahme der Abundanzen und damit eine Abnahme an Fluoreszenzen zu erwarten, was sich in einer negativen Ratio (negativer M-Wert) widerspiegelt.

Als weitere Qualitätskontrolle der *arrays* wurden zusätzlich die M-Werte der Replikate verglichen. Wie unter 2.4.2 beschrieben, wurden auf jeden Chip Duplikate der jeweiligen Proben geladen (Abbildung 2.1). Wie gut die Daten der Duplikate übereinstimmen, lässt sich durch einen MM-Plot bestimmen. Hierfür werden die M-Werte der jeweiligen Duplikate in einem Scatterplot gegeneinander aufgetragen. Aus der Verteilung der Datenpunkte lässt sich dann bereits erkennen,

wie gut die beiden Datensätze zusammenpassen. Im Idealfall sollte ein direkter, linearer Zusammenhang bestehen. Veranschaulichen lässt sich dieser durch eine lineare Regressionsanalyse und den Korrelationskoeffizienten R^2 (auch *Pearson-Korrelation* genannt). R^2 ist ein dimensionsloses Maß für den Grad des linearen Zusammenhanges und kann Werte zwischen +1 und -1 annehmen. Bei Werten von 1 bzw. -1 besteht ein perfekter, linearer Zusammenhang (positiv bzw. negativ), bei 0 hingegen besteht kein Zusammenhang.

Die Abbildungen Abbildung 3.1, Abbildung 3.2 und Abbildung 3.3 zeigen nun die MA- und MM-Plots der Median- und *spike-in* normalisierten Rohdaten der drei Microarrays HO (aerob), LO (microaerob) und PT (phototroph).

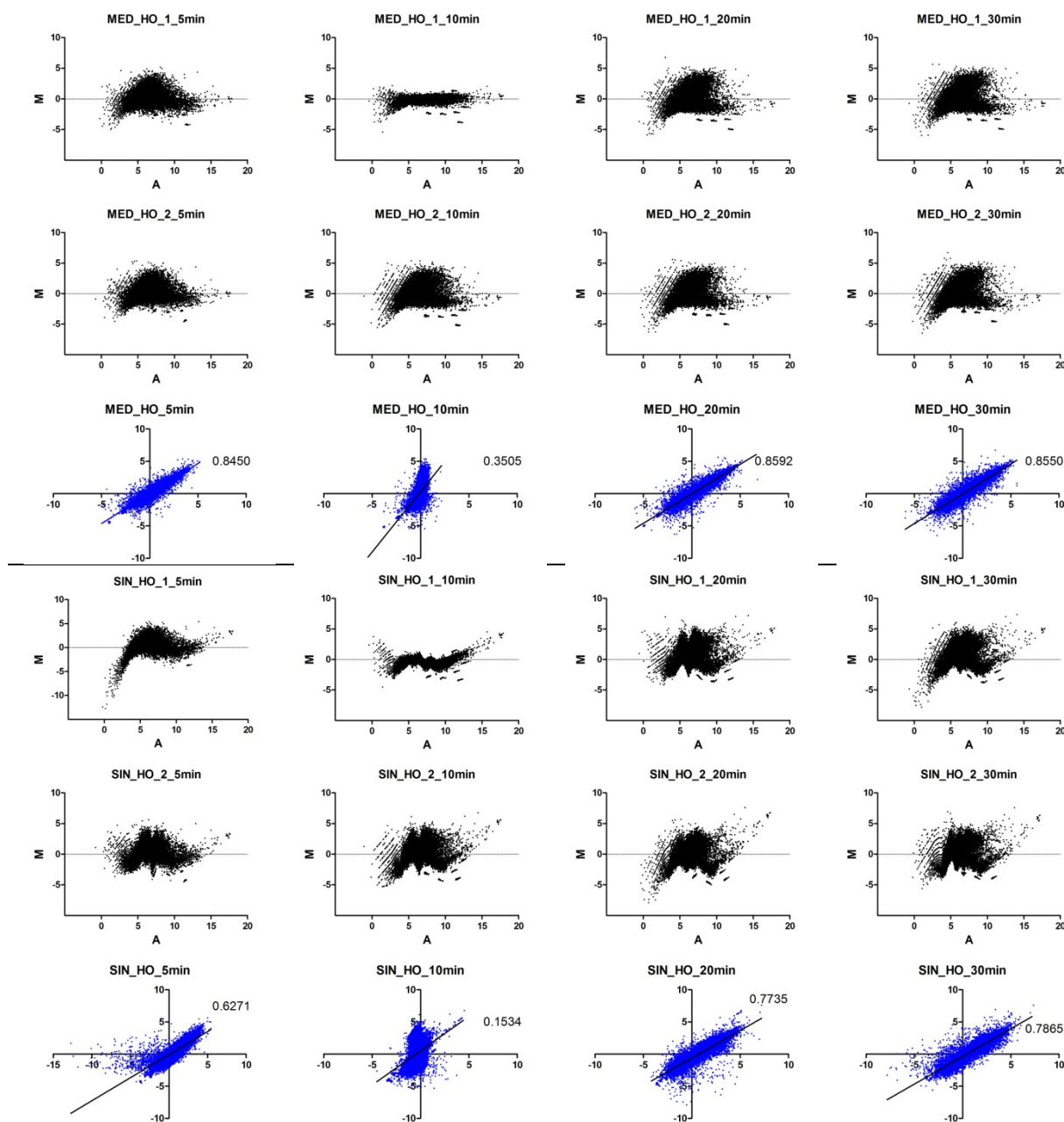


Abbildung 3.1: Vergleich der MA- und MM-Plots der Median-normalisierten (MED_) und *spike-in*-normalisierten (SIN_) Rohdaten des Microarrays der aeroben (HO) Proben. In den MA-Plots (schwarz) sind jeweils die M-Werte gegen die A-Werte pro *array* aufgetragen (z.B. MED_HO_1_5min: Median-normalisierte Werte des *arrays* 0 min / 5 min aerobe Proben; SIN_HO_1_10min: *spike-in*-normalisierte Werte des *arrays* 0 min / 10 min; usw.) Jeweils darunter zeigen die MM-Plots (blau) die Korrelation der M-Werte der normalisierten Rohdaten der zueinandergehörigen *arrays* (z.B. MED_HO_5min entspricht den M-Werten der beiden 0 min / 5 min Arrays mit zugrundeliegenden Median-normalisierten Rohdaten). Mit den M-Werten wurde jeweils eine lineare Regressionsanalyse durchgeführt und der R^2 -Wert zur Abschätzung der Korrelation im Diagramm neben der Regressionsgeraden dargestellt.

Abbildung 3.1 zeigt die MA- und MM-Plots des Microarrays mit den Proben der aeroben Wachstumsbedingungen (HO_1_5min bis HO_1_30min und HO_2_5min bis HO_2_30min). Man erkennt in den MA-Plots der Median-normalisierten Daten (MED_) die zu erwartenden Datenpunktwolken um die M-Wert Nulllinie. Auffällig ist die von den übrigen Plots abweichende Form für den HO_1_10min *array*. Hier ist die Wolke deutlich gepresster und zeigt damit eine geringere Bandbreite an M-Werten ab einem A-Wert Bereich von etwa 5. Weiter erkennt man in allen MA-Plots der Median-normalisierten Daten bis zu fünf distinkte Cluster unterhalb der Hauptwolke. Eine nähere Analyse, welche Sonden bzw. Gene diesen Clustern zugeordnet werden können, wurde anhand der Median-normalisierten Daten der *arrays* HO/LO/PT_1 durchgeführt. Eine Auflistung dieser Zuordnung findet sich im Anhang in Tabelle 7-1. Stichprobenartig wurde desweiteren überprüft, ob die Datensätze der *arrays* HO/LO/PT_2 und die Cluster in den *spike-in* normalisierten Datensätzen ebenfalls zu einem vergleichbaren Ergebnis führten, was der Fall war. Weiter wurde überprüft, ob sich wiederum die Gene eines Clusters jeweils einer funktionellen Gruppe zuordnen ließen. Dabei konnte für keines der fünf Cluster eine auffällige Zugehörigkeit der zugeordneten Gene zu einer funktionellen Gruppe festgestellt werden.

Bei Betrachtung der MM-Plots für die aerobe Versuchsreihe ergab sich für den Vergleich der M-Werte der 0 min / 5 min *arrays* (MED_HO_5min) eine sehr gute Übereinstimmung der Daten mit einer *Pearson*-Korrelation von 0,845. Wie bereits durch den auffälligen MA-Plot des HO_1_10min *arrays* vermutet, zeigte sich im MM-Plot für den Vergleich der 10 min Ratios (MED_HO_10min) eine schlechte Übereinstimmung der beiden Datensätze, was sich auch im schlechten R^2 Wert von nur 0,3505 widerspiegelt. Die übrigen beiden Duplikate der 20 und 30 min Probensätze passten mit einer Korrelation von 0,8592 (MED_HO_20min) und 0,855 (MED_HO_30min) wieder sehr gut zusammen. Mit Ausnahme der 5 min Ratios zeigte sich folglich für den Datensatz der aeroben Bedingungen eine gute Korrelation der Duplikate mit einer mittleren Übereinstimmung von ~85%.

Die MA-Plots der *spike-in* normalisierten Rohdaten derselben HO-*arrays* zeichnen hingegen ein deutlich anderes Bild. Hier war keine gleichmäßige Verteilung der Datenpunkte zu beobachten. Es traten teilweise sehr starke Schwankungen der M-Werte über das gesamte A-Wert Spektrum auf, mit Ausreißern sowohl in den niedrigen als auch in den hohen A-Wert Bereichen (SIN_HO_1_5min), aber auch zum Teil starken Schwankungen in mittleren A-Wert Bereichen zwischen 5 und 10 (SIN_HO_1_20min). Erkennbar sind auch in den *spike-in* normalisierten Datensätzen die Cluster an Datenpunkten unterhalb der Hauptwolke, welche schon in den MA-Plots der Median-normalisierten Daten aufgefallen waren. Für diese Cluster konnte, wie beschrieben, ebenfalls stichprobenartig festgestellt werden, dass es sich größtenteils um dieselben Sonden handelt, welche bereits in den Median-normalisierten Datensätzen diesen Clustern zugeordnet werden konnten.

Die Korrelation der M-Werte basierend auf der *spike-in* Normalisierung zeigte ebenfalls schlechtere Werte. So stimmten die Werte der beiden 5 min Duplikate (SIN_HO_5min) nur zu 63% überein ($R^2=0,6271$). Wie auch bei den Median-normalisierten Daten war ebenfalls eine sehr schlechte Übereinstimmung der M-Werte der HO_1_10min und HO_2_10min *arrays* auffällig. Hier ergab sich

ein Korrelationskoeffizient von nur 0,1534, was eine nochmal schlechtere Korrelation darstellt als die der Median-normalisierten Werte. SIN_HO_20min und SIN_HO_30min korrelierten dann wieder besser, jedoch lagen die R^2 Werte mit 0,7735 und 0,7865 unter denen der Median-Normalisierung.

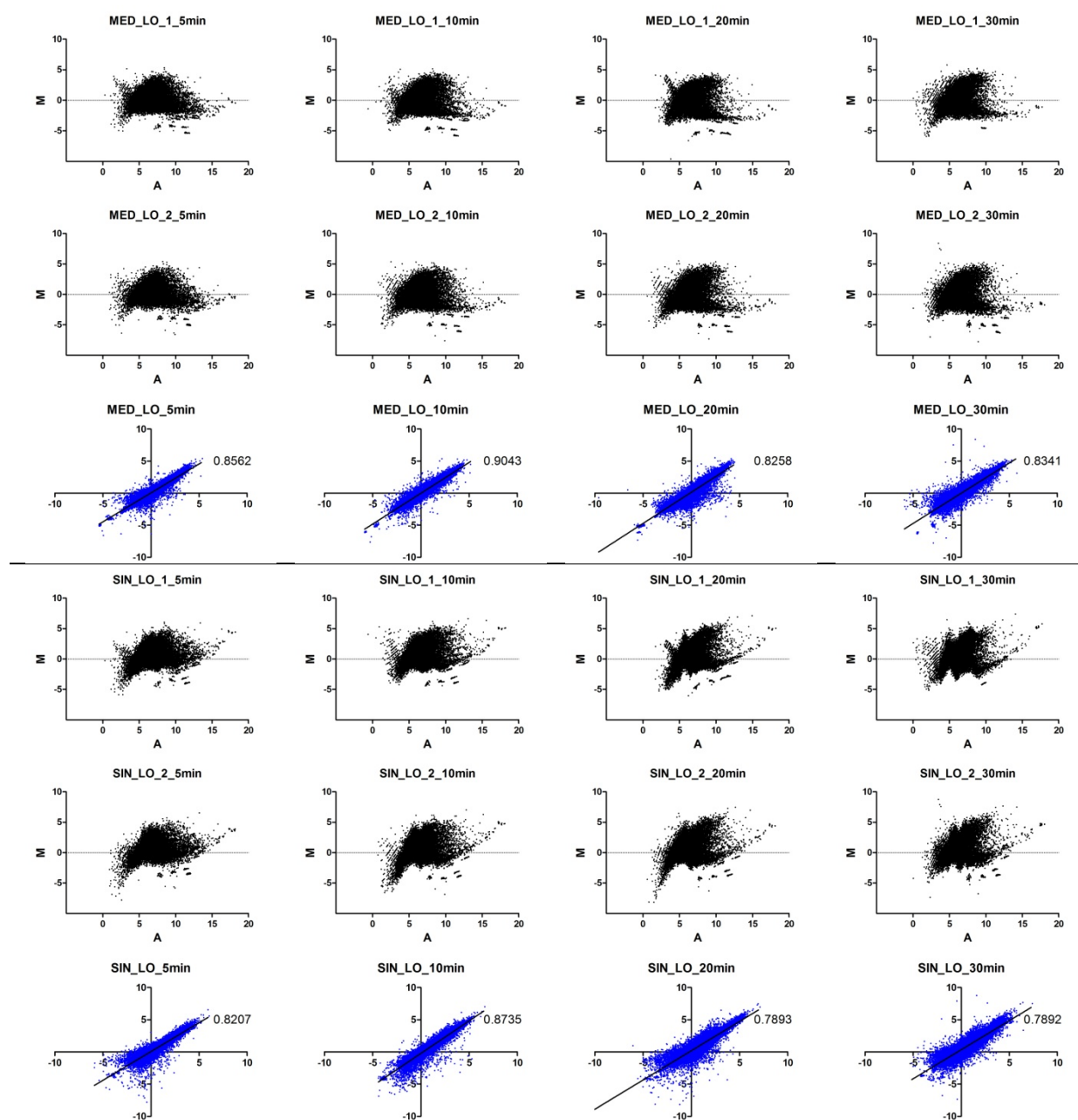


Abbildung 3.2: Vergleich der MA- und MM-Plots der Median-normalisierten (MED_) und *spike-in*-normalisierten (SIN_) Rohdaten des Microarrays der microaeroben (LO) Proben. In den MA-Plots (schwarz) sind jeweils die M-Werte gegen die A-Werte pro Array aufgetragen (z.B. MED_LO_1_5min: Median-normalisierte Werte des arrays 0 min / 5 min microaerobe Proben; SIN_LO_1_10min: *spike-in*-normalisierte Werte des Arrays 0 min / 10 min; usw.) Jeweils darunter zeigen die MM-Plots (blau) die Korrelation der M-Werte der normalisierten Rohdaten der zueinandergehörigen Arrays (z.B. MED_LO_5min entspricht den M-Werten der beiden 0 min / 5 min arrays mit zugrundeliegenden Median-normalisierten Rohdaten). Mit den M-Werten wurde jeweils eine lineare Regressionsanalyse durchgeführt und der R^2 -Wert zur Abschätzung der Korrelation im Diagramm neben der Regressionsgeraden dargestellt.

In Abbildung 3.2 sind die MA- und MM-Plots der arrays mit den microaeroben Proben dargestellt. Die MA-Plots der Median-normalisierten Daten zeigten eine rechte ähnliche Verteilung der Datenpunkte wie die der aeroben Proben. Auch hier war eine stärkere Akkumulation an negativen

M-Werten über einen breiten A-Wert Bereich zu erkennen. In den *arrays* 1_5min, 1_10min und 1_20min (MED_LO_1_5min/10min/20min) war rund um einen A-Wert von 3 eine kleine Population an Datenpunkten im positiven M-Wert Bereich bis etwa 5 zu verzeichnen. Auffällig waren auch hier wieder mehrere distinkte Cluster an Datenpunkten unterhalb der Hauptwolke bei M-Werten um -5. Im MA-Plot MED_LO_1_30min sind diese jedoch nicht unmittelbar sichtbar. Die Korrelation der microaeroben Duplikate bei Median-Normalisierung war sehr gut. Hier lagen die R^2 Werte bei 0,8562 (MED_LO_5min), 0,9043 (MED_LO_10min), 0,8258 (MED_LO_20min) und 0,8341 (MED_LO_30min). Bei der Normalisierung des microaeroben Datensatzes führte, wie auch schon in Abbildung 3.1 zu erkennen war, die Zuhilfenahme der *spike-ins* zu Unregelmäßigkeiten in den MA-Plots. Auch hier waren wieder starke Schwankungen der M-Werte über den gesamten A-Wert Bereich zu erfassen, mit teilweise deutlichen Ausreißern in den Extremen (SIN_LO_2_20min). Deutlich erkennbar war hier das Muster positiver M-Werte bei hohem A-Wert und negativer M-Werte bei niedrigem A-Wert. Ausnahme stellte SIN_LO_1_10min dar, hier waren die höchsten positiven M-Werte bei niedrigen A-Werten zu verzeichnen.

Die M-Werte der Duplikate korrelierten hier besser als beim Vergleich der Normalisierung der aeroben Daten und die *Pearson*-Korrelationen zeigten mit Werten zwischen 0,79 und 0,87 eine gute Übereinstimmung. Jedoch lagen diese Werte im direkten Vergleich mit den Median-normalisierten Daten mit Werten von 0,8207 (SIN_LO_5min), 0,8735 (SIN_LO_10min), 0,7893 (SIN_LO_20min) und 0,7892 (SIN_LO_30min) stets unter diesen. Somit führte auch in diesem Fall die *spike-in* Normalisierung zu einer schlechteren Korrelation.

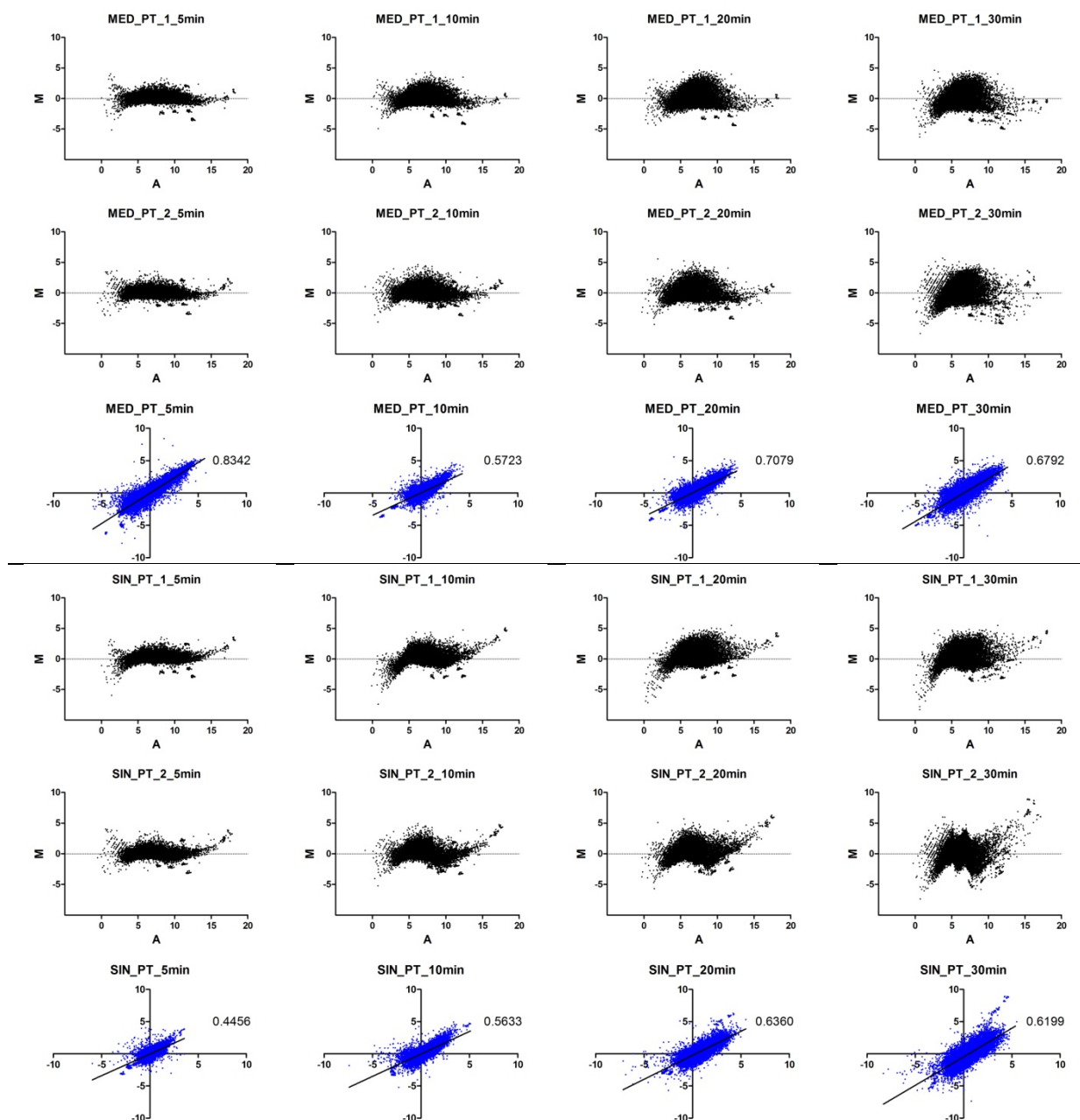


Abbildung 3.3: Vergleich der MA- und MM-Plots der Median-normalisierten (MED_) und *spike-in*-normalisierten (SIN_) Rohdaten des Microarrays der phototropen (PT) Proben. In den MA-Plots (schwarz) sind jeweils die M-Werte gegen die A-Werte pro Array aufgetragen (z.B. MED_PT_1_5min: Median-normalisierte Werte des arrays 0 min / 5 min phototrophe Proben; SIN_PT_1_10min: *spike-in*-normalisierte Werte des Arrays 0 min / 10 min; usw.) Jeweils darunter zeigen die MM-Plots (blau) die Korrelation der M-Werte der normalisierten Rohdaten der zueinandergehörigen Arrays (z.B. MED_PT_5min entspricht den M-Werten der beiden 0 min / 5 min arrays mit zugrundeliegenden Median-normalisierten Rohdaten). Mit den M-Werten wurde jeweils eine lineare Regressionsanalyse durchgeführt und der R^2 -Wert zur Abschätzung der Korrelation im Diagramm neben der Regressionsgeraden dargestellt.

Die Median-Normalisierung der Microarray Daten der phototropen Experimente (Abbildung 3.3) zeigte im array PT_1_5min eine nur sehr geringe Bandbreite an M-Werten, erkennbar an der vermehrten Ansammlung an Datenpunkten entlang der Nulllinie im MA-Plot (MED_PT_1_5min). Ein Hinweis auf eine nur sehr geringe Veränderung der Abundanzen vieler RNAs fünf Minuten nach Stopp der Transkription durch Rifampicin. Eine ähnliche Verteilung war für das Duplikat (PT_2_5min) erkennbar. In den MA-Plots der arrays mit den Proben späterer Zeitpunkte war dann eine Vergrößerung der Wolke zu erkennen und eine zunehmende Verschiebung in den Bereich negativer

M-Werte. Alle MA-Plots des Median-normalisierten Datensatzes wiesen in den Extremen der A-Werte leichte Abweichungen auf, wie sie auch bei den microaeroben Daten beschrieben wurden. Es zeigte sich wieder eine leichte Tendenz, dass sehr niedrige A-Werte (<5) eher negative M-Werte und hohe A-Werte (>15) zunehmend positivere M-Werte zur Folge haben. Desweiteren waren in allen MA-Plots die bereits beschriebenen Cluster an Datenpunkten unterhalb der Hauptwolken vorhanden.

Mit einer 83%igen Übereinstimmung ($R^2=0,8342$) zeigte sich für PT_5min mit zugrundeliegender Median-Normalisierung eine sehr gute Korrelation (MED_PT_5min). Jedoch stimmten die Ratios der Duplikate der 0 min / 10min Proben mit einem R^2 Wert von nur 0,5723 (MED_PT_10min) nur noch in geringerem Maße überein. Die nachfolgenden Werte korrelierten dann mit Werten von 0,7079 (MED_PT_20min) und 0,6792 (MED_PT_30min) wieder besser.

In den *spike-in* normalisierten Datensätzen zeigte sich eine stärkere Ausprägung der Verschiebung der M-Werte in den Randbereichen der A-Werte. So war auch hier eine zunehmende Neigung zu erkennen, dass A-Werte unter 5 verstärkt zu negativen M-Werten führten und sich ab A-Werten von etwa 14 nur noch positive M-Werte fanden. Eine sehr inhomogene Verteilung der M-Werte war vor allem für die Daten des PT_2_30min *arrays* zu verzeichnen (SIN_PT_2_30min).

Die schlechteste Korrelation der M-Werte zeigte sich im Gegensatz zur Median-Normalisierung bei der *spike-in* Normalisierung für die Daten der *arrays* PT_1_5min und PT_2_5min mit einer *Pearson*-Korrelation von 0,4456 (SIN_PT_5min). Mit einem R^2 Wert von 0,5633 lag die Übereinstimmung für SIN_PT_10min im Bereich dessen, was auch die Median-normalisierten Daten zeigten. Mit 0,636 (SIN_PT_20min) und 0,6199 (SIN_PT_30min) lagen die Korrelationen jedoch wieder unter den Werten der Median-Normalisierung.

Beim Vergleich der beiden Normalisierungsmethoden der Rohdaten der Microarrays zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen der Median- und *spike-in* basierten Normalisierung. Wie aus den Abbildungen Abbildung 3.1, Abbildung 3.2 und Abbildung 3.3 ersichtlich ist, führte die Normalisierung anhand des Medians im Vergleich zu deutlich homogeneren MA-Plots. Die Verteilung der M-Werte zeigte eine geringere Abhängigkeit von den A-Werten und in den meisten Fällen waren kaum Abweichungen der M-Werte in den Extremen der A-Werte zu verzeichnen. Die *spike-in* Normalisierung zeigte hier hingegen eine deutliche Unausgewogenheit. Auch beim Vergleich der Übereinstimmung der jeweiligen Duplikate zeigten sich bei den Median-normalisierten Daten eindeutig bessere Korrelationen. Für sämtliche Duplikate aller Bedingungen waren die *Pearson*-Korrelationen höher, wenn die Rohdaten Median-normalisiert wurden, anstatt anhand der *spike-ins*. Aus diesen Gründen wurden für alle weiteren Analysen die Median-normalisierten Datensätze verwendet.

3.2. ANALYSE DER HALBWERTSZEITEN AUS DEN TRANSKRIPTOMDATEN

Anhand der Median-normalisierten Datensätze wurden dann für alle drei Bedingungen die Halbwertszeiten wie unter 2.5 und 2.5.1 beschrieben, berechnet. Für die Duplikate der aeroben Probenreihe HO_1 und HO_2 konnten von 2943 bzw. 3646 der insgesamt 4518 möglichen Transkripte eine Halbwertszeit berechnet werden. Für die microaerobe Versuchsreihen LO_1 und LO_2 gelang dies für 4078 und 3911 Transkripte. Im phototrophen Datensatz PT_1 konnte von 3790 Transkripten eine Halbwertszeit bestimmt werden und für PT_2 von 3785 Transkripten. Alle Transkripte, deren Halbwertszeiten über eine Stunde hinausgingen, wurden als „stabil“ angesehen. Für diese Transkripte wurde die Halbwertszeit dann als 60 min definiert. Aus den oben genannten

Zahlen war ersichtlich, dass nicht für alle Transkripte unter der jeweiligen Bedingung die Halbwertszeit doppelt berechnet werden konnte. So wurden für die weitere Auswertung nur solche Transkripte berücksichtigt, für die in beiden Duplikaten eine Halbwertszeit existierte. Dadurch reduzierte sich die Anzahl an Transkripten mit zugeordneten Halbwertszeiten für den aeroben Datensatz auf 2466, für den microaeroben auf 3553 und für den phototrophen auf 3395.

Für eine Abschätzung, inwieweit die Werte der Duplikate übereinstimmten, wurden in einem nächsten Schritt die Mittelwerte der zueinander gehörenden Halbwertszeiten, sowie die Mittelabweichung bestimmt. Da eine Abweichung von nur wenigen Minuten im unteren Bereich der Halbwertszeiten bereits einen Unterschied darstellen kann, derselbe Unterschied für langlebigere Transkripte aber keinen deutlichen Effekt haben muss, wurde eine relative Bewertungsmethode der Unterschiede in den Halbwertszeiten herangezogen. Hierfür wurde die Streuung der Einzelwerte betrachtet und als Bruchteil des Mittelwertes nach folgender Formel angegeben:

Formel 7

$$\frac{(\text{Halbwertszeit 1} - \text{Halbwertszeit 2})}{\left[\frac{(\text{Halbwertszeit 1} + \text{Halbwertszeit 2})}{2} \right]} \quad (\text{Bernstein et al., 2002})$$

Das resultierende Ergebnis wurde dann als prozentuale Abweichung angegeben und eine Grenze von 50% festgelegt. Dies bedeutet, dass die Differenz der beiden Halbwertszeiten maximal 50% des Mittelwertes betragen durfte, damit die gemittelte Halbwertszeit eines Transkriptes mit in die weiteren Auswertungen mit einfluss. Dieser Vorgang reduzierte die Anzahl an Halbwertszeiten des aeroben Datensatzes auf 1461, des microaeroben auf 2222 und des phototrophen auf 2353. Für diese Anzahl an Transkripten existierte folglich ein Mittelwert aus zwei vergleichbaren Halbwertszeiten. Dieser Datensatz stellte dann im Folgenden die Grundlage für alle weitergehenden Analysen dar.

Zunächst wurde die mittlere Halbwertszeit sowie der Median aller Halbwertszeiten unter den drei Bedingungen berechnet.

Tabelle 3-1: Anzahl an Transkripten mit doppelt bestimmter Halbwertszeit sowie Mittelwert und Median der Halbwertszeiten unter aeroben (HO), microaeroben (LO) und phototrophen (PT) Bedingungen.

Wachstumsbedingung	Anzahl Transkripte mit Halbwertszeit	mittlere Halbwertszeit (min)	Median Halbwertszeit (min)
HO	1461	23,7	22,0
LO	2222	22,6	21,5
PT	2353	22,8	21,0

Tabelle 3-1 verdeutlicht, dass unter aeroben Wachstumsbedingungen im Mittel mit 23,7 min die längsten Halbwertszeiten zu verzeichnen waren, auch der Median war hier mit einem Wert von 22 min am höchsten. Im Mittelwert unterschieden sich hingegen die Werte für microaerobe und phototrophe Bedingungen leicht. Die mittlere Halbwertszeit aller Transkripte unter microaeroben Bedingungen betrug 22,6 min und 22,8 min für Wachstum unter phototrophen Bedingungen. Der Median hingegen betrug für microaerobe 21,5 min und 21,0 min für phototrophe Bedingungen, also ein leicht umgekehrtes Verhältnis.

3.2.1. KATEGORISIERUNG IN *CLUSTERS OF ORTHOLOGOUS GROUPS*

Um einen Eindruck zu erhalten, inwiefern die Funktion des Genproduktes und die Halbwertszeit des Transkriptes zusammenhängen, wurden alle Gene von *Rhodobacter sphaeroides* gemäß der Funktion bzw. mutmaßlichen Funktion ihres Genproduktes in Kategorien eingeteilt.

Mit der schnell gestiegenen Anzahl an sequenzierten Genomen unterschiedlichster Organismen ab Mitte der 1990er Jahre, war es möglich, einen speziesübergreifenden Vergleich der Sequenzen der proteinkodierenden Gene bezüglich deren Funktion anzustellen. Tatusov, Koonin und Lipman beschrieben 1997 die sogenannten *clusters of orthologous groups* (COGs). Jedes COG besteht aus einer Gruppe von Proteinen, die als Orthologe oder als orthologe Gruppe von Paralogen aus drei oder mehr phylogenetischen Abstammungslinien stammen und somit sehr wahrscheinlich auf einen gemeinsamen Vorläufer zurückzuführen sind. So wird die Annahme getroffen, dass sich jedes COG von einem individuellem Ur-Gen durch eine Serie an Artbildungen und Duplikationsereignissen entwickelt hat (Tatusov, 1997).

In dieser Studie entstanden in der anfänglichen Datenbank 720 COGs, welche 6814 Proteine beinhalteten. Die momentan aktuelle Datenbank enthält mittlerweile fast 144 000 Proteine in 4873 COGs (Tatusov et al., 2003). Der Hauptanwendungsbereich der COGs ist die funktionelle Charakterisierung neu sequenzierter Genome, neu beschriebener Gene oder Gruppen von Genen, bzw. die Klassifizierung von Proteinen.

Eine andere und hier genutzte Möglichkeit, ist jedoch auch, eine Aussage für jedes Gen darüber zu treffen, welche zelluläre Funktion das Genprodukt inne hat.

Alle COGs sind hierzu in funktionelle Gruppen bzw. Kategorien eingeteilt. Hierzu gehören Kategorien der Informationsspeicherung und der Prozessierung, Kategorien allgemeiner zellulärer Prozesse, des Stoffwechsels und solche, die nur schlecht oder gar nicht charakterisiert sind. Auf der Seite der *Computational Biology and Bioinformatics* Gruppe des Fachbereiches *Biosciences* am *Oak Ridge National Laboratory* (ORNL)³ lässt sich eine Liste der Gene von *R. sphaeroides*, eingeteilt in diese Kategorien, beziehen⁴. Diese Liste ist zunächst sehr umfangreich. Ein Gen kann aufgrund der Tatsache, dass das Genprodukt mehr als nur eine Domäne besitzen kann, welche zu der Zuordnung zu einem bestimmten COG führt, in mehrere COGs einsortiert werden. Da jede funktionelle Kategorie naturgemäß mehrere COGs enthält, kommt es vor, dass dasselbe Gen in dieser Kategorie somit mehrmals gelistet ist. Für alle hiernach gezeigten Analysen wurden die Kategorien insoweit gekürzt, dass jedes Gen in einer funktionellen Kategorie nur einmal vorkommt. Tabelle 3-2 führt alle 21 funktionellen Kategorien der COGs für *R. sphaeroides* auf.

Anhand der für diese Kategorien aufgeführten Gennummern (RSP_Nummern), konnte dann eine Zuordnung aller Halbwertszeiten der Transkripte für die darin gelisteten Gene durchgeführt werden. Die COG Kategorie B „Chromatinstruktur und Dynamik“ wurde nicht weiter betrachtet, da hier nur für maximal 4 Gene die Transkripthalbwertszeiten bestimmt werden konnten und auch nur für ein Transkript unter allen drei Bedingungen. Desweiteren wurde die Kategorie PS „Photosynthese“, welche nicht in der ursprünglichen Liste aufgeführt ist, für diese Arbeit neu eingeführt. Bei dieser Kategorie handelt es sich *per se* nicht um eine COG Kategorie. In dieser Kategorie sind lediglich alle Gene des photosynthetischen *Genclusters* in *R. sphaeroides* aufgeführt. Einige der hierin enthaltenen Gene sind unter anderem auch z.B. bereits in der Kategorie C „Energiegewinnung und Umwandlung“ gelistet. Diese künstliche Kategorie dient einzig allein dem Zweck des Vergleiches der für die

³ <http://compbio.ornl.gov/index.html>

⁴ <http://genome.ornl.gov/microbial/rsph/final/fun.html>

gewählten Wachstumsbedingungen interessanten Effekte auf die Transkripte der sog. Photosynthesegene, da zu erwarten ist, dass die Verfügbarkeit von Sauerstoff und Licht hierauf Einfluss haben.

Die für die drei Bedingungen ermittelten Halbwertszeiten wurden folgend den 21 COG Kategorien zugeordnet. Eine Auflistung, wie vielen Transkripten in jeder Kategorie eine Halbwertszeit unter der jeweiligen Bedingung zugeordnet werden konnte, zeigt Tabelle 3-2.

Tabelle 3-2: Beschreibung der COG (*clusters of orthologous groups*) Kategorien und Anzahl der Transkripte mit bestimmten Halbwertszeiten unter den Bedingungen aerob (HO), microaerob (LO) und phototroph (PT).

Kategorie	Beschreibung	HWZ zugeordnet		
		HO	LO	PT
Informationsspeicherung und Prozessierung				
J	Translation, Ribosomenstruktur und Biogenese	89	117	145
K	Transkription	124	190	209
L	DNA Replikation, Rekombination, Reparatur	113	165	193
Zelluläre Prozesse				
D	Zellteilung	63	104	108
V	Abwehrmechanismen	61	108	105
T	Signaltransduktion	91	139	153
M	Zellhülle, äußere Membran	171	251	253
N	Zellmotilität, Sekretion	71	105	107
U	Intrazellulärer Transport, Sekretion	49	71	71
O	Posttranslationale Modifikation, Protein <i>turnover</i> , Chaperone	140	206	215
Stoffwechsel				
C	Energiegewinnung und Umwandlung	169	271	292
G	Kohlenhydrattransport und –Metabolismus	103	155	165
E	Aminosäuretransport und –Metabolismus	267	405	425
F	Nukleotidtransport und –Metabolismus	49	77	78
H	Coenzymmetabolismus	161	239	268
I	Fettsäurestoffwechsel	50	91	97
P	Transport anorganischer Ionen und -Metabolismus	148	261	266
Q	Biosynthese von Sekundärmetaboliten, Transport und Katabolismus	109	168	177
PS	Photosynthese	17	25	28
Schlecht charakterisiert				
R	Nur generelle Funktionsvorhersage	385	535	589
S	Funktion unbekannt	149	256	302

Eine detaillierte Auflistung der in den Kategorien enthaltenen COGs findet man auf der Seite der *Computational Biology and Bioinformatics* Gruppe (siehe ⁴) und in der Excel-Tabelle „COG Kategorien *R. sphaeroides*“ auf der CD im Anhang.

Der folgende Abschnitt gibt hier nur einen stichwortartigen Überblick über die in dieser Kategorie jeweils enthaltenen COGs sowie die Anzahl an berechneten Transkripthalbwertszeiten unter den drei Bedingungen.

Kategorie J: „Translation, Ribosomenstruktur und Biogenese“

COGs: Methylasen, Pseudouridylatsynthasen, RNA-Ligase, Methylthioadeninsynthetasen, Acetyltransferasen, tRNA Synthetasen, Amidasen, Deaminasen, Phosphorylasen, Pyrophosphorylasen, Nukleotidyltransferasen, Exonukleasen, GTPasen, Translationsfaktoren (Initiation, Inhibition, Elongation), Aminopeptidasen, ribosomale Proteine

Anzahl zugeordneter Halbwertszeiten: HO: 89; LO: 117; PT: 145

Kategorie K: „Transkription“

COGs: Transkriptionsfaktoren (Elongation, Termination), Kälteschockproteine, DNA-Bindemotiv-Proteine, DNA-abhängige RNA Polymeraseuntereinheiten, Helikasen, Exoribonukleasen (II, R), *response regulator*, Transkriptionsregulatoren

Anzahl zugeordneter Halbwertszeiten: HO: 124; LO: 190; PT: 209

Kategorie L: „DNA Replikation, Rekombination, Reparatur“

COGs: DNA-Glykosylasen, DNA-Methylasen, ATPasen, DNAsen, DNA Polymerasen, Primase, Ligase, Helikasen, Topoisomerasen, Ribonukleasen, Integrasen, Pyrophosphohydrolasen, Rekombinasen, Reverse Gyrase, Proteinkinasen, Transposasen

Anzahl zugeordneter Halbwertszeiten: HO: 113; LO: 165; PT: 193

Kategorie D: „Zellteilung“

COGs: ATPasen, membrangebundene Metallopeptidasen, Zellteilungsproteine

Anzahl zugeordneter Halbwertszeiten: HO: 63; LO: 104; PT: 108

Kategorie V: „Abwehrmechanismen“

COGs: ATPasen, Permeasen, Peptidasen, ABC-Transporter-Untereinheiten, β -Lactamasen, Penicillinbindeproteine, *multidrug efflux* Pumpen, Restriktionsendonukleasen, Restriktions-Modifikationssystem-Proteine

Anzahl zugeordneter Halbwertszeiten: HO: 61; LO: 108; PT: 105

Kategorie T: „Signaltransduktion“

COGs: Bacteriophytochrome, Proteinkinasen, cAMP-Bindeproteine, *response regulator*, (Chemotaxis) Signaltransduktionsproteine, Transkriptionsregulatoren,

Anzahl zugeordneter Halbwertszeiten: HO: 91; LO: 139; PT: 153

Kategorie M: „Zellhülle, äußere Membran“

COGs: ABC-Transporter-Komponenten, Zellteilungsproteine, Penicillinbindeproteine, Cyclopropanfettsäuresynthasen und Methyltransferasen, Carboxypeptidasen, D-Alanin-D-Alanin Ligasen, Glucosamin-6-Phosphat Synthetasen, Epimerasen, Dehydratasen, Glycosyltransferasen, Lipid A-Biosynthesefaktoren, Peptidoglykan-assoziierte (Lipo-) Proteine, Proteine der äußeren Membran, Proteasen, Isomerasen, Acyltransferasen, Transpeptidasen

Anzahl zugeordneter Halbwertszeiten: HO: 171; LO: 251; PT: 253

Kategorie N: „Zellmotilität, Sekretion“

COGs: Chemotaxis Protein-Histidinkinasen, Chemotaxis *response regulator*, Flagellenstruktur und -Biosynthese,

Anzahl zugeordneter Halbwertszeiten: HO: 71; LO: 105; PT: 107

Kategorie U: „Intrazellulärer Transport und Sekretion“

COGs: Biopolymertransportproteine, Flagellenstruktur und –Biosynthese, Preprotein-Translokase-Untereinheiten

Anzahl zugeordneter Halbwertszeiten: HO: 49; LO: 71; PT: 71

Kategorie O: „Posttranslationale Modifikation, Protein *turnover*, Chaperone

COGs: ABC-Transporterkomponenten, ATPasen, Proteasen, Cytochromoxidaseuntereinheiten, Chaperone und Hitzeschockproteine, Isomerasen, Flagellenstruktur und –Biosynthese, Häm-Biosynthese

Anzahl zugeordneter Halbwertszeiten: HO: 140; LO: 206; PT: 215

Kategorie C: „Energiegewinnung und –Umwandlung“

COGs: ABC-Transporterkomponenten, Dehydrogenasen, Cytochrome, FOF1-Typ-ATPase-Untereinheiten, Ferredoxine, FE-S-Oxidoreduktasen, Flavoproteine, Häm-Biosynthesekomponenten, Glyoxylat-*bypass*, *multisubunit* Na⁺/H⁺-Antiporter, NADH/Ubiquinon-Oxidoreduktaseuntereinheiten, Pyridoxalphosphat-Biosynthese, Pyruvat-Decarboxylation, TCA-Zyklus, Ubiquinon-Biosynthese

Anzahl zugeordneter Halbwertszeiten: HO: 169; LO: 271; PT: 292

Kategorie G: „Kohlenhydrattransport und –Metabolismus“

COGs: ABC-Transporterkomponenten, Aldolasen, Pyrophosphorylasen, Zucker-Efflux-Permeasen, Entner-Doudoroff-Weg, Gluconeogenese, Glykolyse, Pentosephosphat-Weg, Transkriptionsregulatoren

Anzahl zugeordneter Halbwertszeiten: HO: 103; LO: 155; PT: 165

Kategorie E: „Aminosäuretransport und –Metabolismus“

COGs: ABC-Transporterkomponenten, Aminopeptidasen, Aminotransferasen, Deacylasen, Dehydrogenasen, Coenzym A Biosynthese, Entner-Doudoroff-Weg, FAD-Biosynthese, Aminosäuren-spezifische Biosynthese, Transkriptionsfaktoren

Anzahl zugeordneter Halbwertszeiten: HO: 267; LO: 405; PT: 425

Kategorie F: „Nukleotidtransport und –Metabolismus“

COGs: Deaminasen, Phosphodiesterasen, Pyrophosphatasen, Triphosphohydrolasen, Nukleotidkinasen, Purin- und Pyrimidinbiosynthese und Wiederverwertung, Thymidylatbiosynthese

Anzahl zugeordneter Halbwertszeiten: HO: 49; LO: 77; PT: 78

Kategorie H: „Coenzymmetabolismus“

COGs: ABC-Transporterkomponenten, Biotinbiosynthese, Cobalaminbiosynthese, Coenzym A Biosynthese, Deoxyxylulose Weg der Terpenoidbiosynthese, FAD-Biosynthese, Hämbiosynthese, Leucinbiosynthese, Menaquinonbiosynthese, NAD-Biosynthese, Pyridoxalphosphatbiosynthese, Thiaminbiosynthese, Ubiquinonbiosynthese, Tryptophanbiosynthese, Transkriptionsregulatoren

Anzahl zugeordneter Halbwertszeiten: HO: 161; LO: 239; PT: 268

Kategorie I: „Fettsäurestoffwechsel“

COGs: Acyltransferasen, Dehydrogenasen, Carboxylasen, Carboxyltransferasen, Deoxyxylulose Weg der Terpenoidbiosynthese, Fettsäurebiosynthese, Menaquinonbiosynthese

Anzahl zugeordneter Halbwertszeiten: HO: 50; LO: 91; PT: 97

Kategorie P: „Transport anorganischer Ionen und –Metabolismus“

COGs: ABC-Transporterkomponenten, Cobalaminbiosynthese, *multisubunit* Na⁺/H⁺ Antiporter,

Anzahl zugeordneter Halbwertszeiten: HO: 148; LO: 261; PT: 177

Kategorie Q: „Biosynthese von Sekundärmetaboliten, Transport und Katabolismus“

COGs: ABC-Transporterkomponenten, Fettsäurebiosynthese, Menaquinonbiosynthese

Anzahl zugeordneter Halbwertszeiten: HO: 109; LO: 168; PT: 177

Kategorie R: „Nur generelle Funktionsvorhersage“

COGs: von Willebrand Faktor Typ A Domänen-Proteine, ABC-Transporterkomponenten (größtenteils ATPase-Komponenten), Fettsäurebiosynthese, Lipid A Biosynthese, Pyridoxalphosphatbiosynthese, Pyrimidinverwertung, Thiaminbiosynthese, Transkriptionsregulatoren, Tryptophanbiosynthese

Anzahl zugeordneter Halbwertszeiten: HO: 385; LO: 535; PT: 589

Kategorie S: „Funktion unbekannt“

COGs: Konservierte hypothetische Proteine, mutmaßliche Phagenproteine

Anzahl zugeordneter Halbwertszeiten: HO: 149; LO: 256; PT: 302

Auffällig ist, dass die Summe aller den Kategorien zugeordneter Halbwertszeiten die Zahl der insgesamt bestimmten Halbwertszeiten unter den jeweiligen Bedingungen übersteigt (vergleiche Tabelle 3-1 und Tabelle 3-2). Dies ist dadurch zu erklären, dass viele Gene entweder wie beschrieben mehreren COGs zugeordnet sind, oder, wie aus der obigen Auflistung deutlich wird, einige COGs in mehreren Kategorien vorkommen.

3.2.2. VERGLEICH DER HALBWERTSZEITEN IN DEN FUNKTIONELLEN KATEGORIEN

3.2.2.1. VERGLEICH DER MEDIANWERTE DER HALBWERTSZEITEN

Um einen ersten Eindruck zu erhalten, wie die Halbwertszeiten in den Kategorien unter den drei Bedingungen verteilt waren, wurde zunächst der Median der Halbwertszeiten in jeder Kategorie für jede Bedingung bestimmt. Der Median wurde auf Grund der Robustheit gegenüber Ausreißern in den Halbwertszeiten gewählt, da bereits wenige Transkripte mit hohen Halbwertszeiten den Mittelwert stark beeinflussen würden. Abbildung 3.4 verdeutlicht den Unterschied der Mediane der Halbwertszeiten zwischen den COG Kategorien in Abhängigkeit von den Wachstumsbedingungen.

Unter aeroben Bedingungen waren die geringsten Medianwerte in den Kategorien F mit 20,6 min, J mit 20,7 min und D mit 20,8 min zu verzeichnen. Dies umfasst die Transkripte von Genen für Nukleotidtransport und –Metabolismus, Translation und Ribosomenstruktur, sowie Gene für Prozesse der Zellteilung. Kategorie K war ebenfalls mit einem Wert von 21,1 min am unteren Ende zu verzeichnen, diese Kategorie beinhaltet Gene für die Transkription. Die höchsten Medianwerte hatten die Kategorien V „Abwehrmechanismen“ (23,2 min), PS „Photosynthese“ (23,1 min), sowie O „Posttranslationale Modifikation“ (23,1 min) und M „Aufbau der Zellhülle“ (23 min). Ebenfalls hohe Medianwerte fanden sich in den Kategorien für den Transport anorganischer Ionen (P; 22,9 min) und die Biosynthese von Sekundärmetaboliten (Q; 22,8 min), sowie in Kategorie G „Kohlenhydrattransport und –Metabolismus“ (22,8 min).

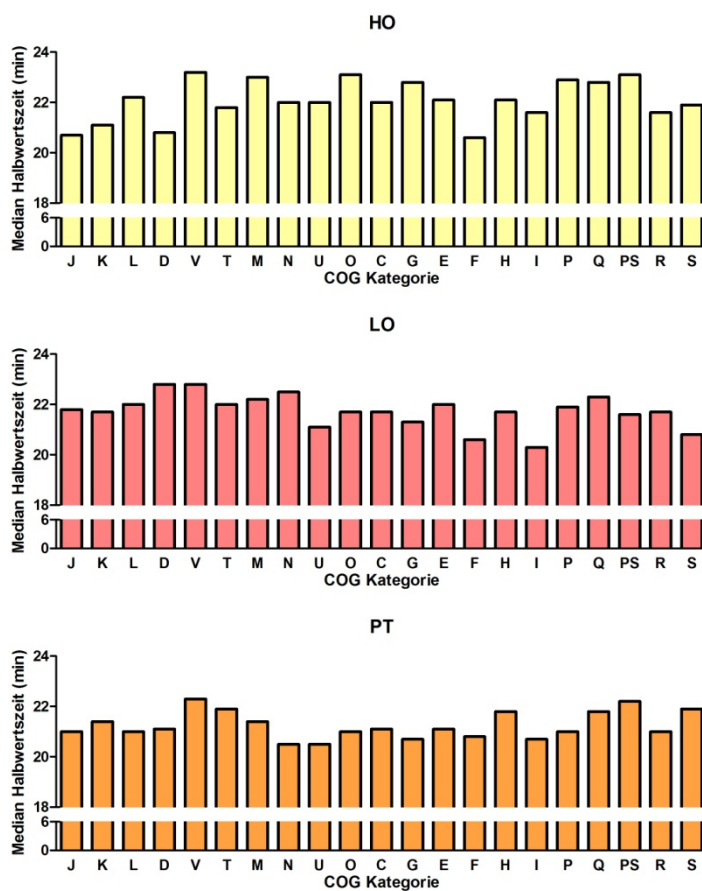


Abbildung 3.4: Median der Halbwertszeiten in den COG Kategorien unter den Bedingungen aerob (HO), microaerob (LO) und phototroph (PT).

Für jede Bedingung wurde der Median der Halbwertszeiten jeder COG Kategorie bestimmt.

Unter microaeroben Bedingungen zeigte sich, dass die niedrigsten Medianwerte in den Kategorien Lipidstoffwechsel (I; 20,3 min), ebenfalls Nukleotidtransport und –Metabolismus (F; 20,6 min) und intrazellulärer Transport und Sekretion (U; 21,1 min) zu verzeichnen waren. Die höchsten Medianwerte waren in den Kategorien D (22,8 min) und V (22,8 min) zu verzeichnen, Kategorien mit Genen für die Zellteilung und Abwehrmechanismen. Die Kategorien für Translation und Transkription sowie Zellteilung (J, K und D) hatten hier im Vergleich zum aeroben Datensatz höhere Medianwerte von 21,8 min, 21,7 min und 22,8 min. Auch gehörte Kategorie N unter microaeroben Bedingungen, im Gegensatz zu aeroben, zu den Kategorien mit durchschnittlich höherem Medianwert. Der Median der Halbwertszeiten in der Kategorie der Photosynthesegene lag hier im Vergleich mit 21,6 min unter dem Wert bei aeroben Wachstumsbedingungen.

Die kleinsten Medianwerte waren unter phototrophen Bedingungen in den Kategorien N und U mit 20,5 min zu finden. Diesen beiden Kategorien sind Gene für Zellmotilität, intrazellulärem Transport und Sekretion zugeordnet. Ebenfalls geringe Medianwerte zeigten die Kategorien G „Kohlenhydrattransport und Metabolismus“ und I „Fettsäurestoffwechsel“ mit jeweils 20,7 min, dicht gefolgt von Kategorie F „Nukleotidtransport und Metabolismus“ mit 20,8 min. Die höchsten Mediane zeigten sich wieder für die Transkripte von Genen für Abwehrmechanismen (V) mit 22,3 min und Photosynthese (PS) mit 22,2 min. Im Unterschied zu aeroben und microaeroben Wachstumsbedingungen, lag der Median unter phototrophen Bedingungen in der Kategorie für DNA Replikation, Rekombination und Reparatur (L) mit einem Wert von 21,0 min unterhalb der Medianwerte bei diesen Bedingungen. Die Werte in den Kategorien J und K (Translation und Transkription; 21,0 min und 21,4 min) lagen unter phototrophen Bedingungen niedriger als unter microaeroben, jedoch nicht so niedrig wie unter aeroben Wachstumsbedingungen. Auch die

Transkripte in der Kategorie D „Zellteilung“ hatten einen Median von 21,1 min und waren damit vergleichbar mit dem Wert unter aeroben Bedingungen, allerdings war dieser nicht so hoch wie unter microaeroben Bedingungen.

Betrachtete man nun die mittleren Medianwerte aller COG Kategorien in den in Tabelle 3-2 benannten Oberkategorien „Informationsspeicherung und Prozessierung“, „Zelluläre Prozesse“, „Stoffwechsel“ und „Schlecht charakterisiert“, ergab sich, dass unter phototrophen und aeroben Bedingungen der geringste mittlere Medianwert der Halbwertszeiten mit 21,1 min und 21,3 min in der Oberkategorie „Informationsspeicherung und Prozessierung“ zu verzeichnen war (Tabelle 3-3). In dieser Oberkategorie hatten die Medianwerte bei microaerober Kultivierung einen Mittelwert von 21,8 min.

Tabelle 3-3: Mittelwerte der Mediane aller COG Kategorien einer Oberkategorie unter aeroben (HO), microaeroben (LO) und phototrophen (PT) Wachstumsbedingungen. Angaben in Minuten.

Oberkategorie	HO	LO	PT
Informationsspeicherung und Prozessierung	21,3	21,8	21,1
Zelluläre Prozesse	22,3	22,2	21,2
Stoffwechsel	22,2	21,5	21,2
Schlecht charakterisiert	21,8	21,3	21,5

Die unter „Zelluläre Prozesse“ zusammengefassten Kategorien waren sich unter aeroben und microaeroben Bedingungen mit Mittelwerten von 22,3 und 22,2 min ähnlich. Unter phototrophen Bedingungen war der Mittelwert hier mit 21,2 min rund eine Minute kürzer. Auch in der übergeordneten Kategorie „Stoffwechsel“ war der Mittelwert der Medianwerte bei phototrophen Wachstum eine Minute kürzer als bei aerobem. Die Mittelwerte der Mediane lagen bei den schlecht charakterisierten Kategorien relativ nah beieinander, in einem Bereich von 21,3 bis 21,8 Minuten.

3.2.2.2. ÜBER- UND UNTERREPRÄSENTATION VON BESTIMMTEN HALBWERTSZEITEN IN DEN FUNKTIONELLEN KATEGORIEN

Die Transkripte mit ermittelten Halbwertszeiten wurden für jede Bedingung in vier Gruppen eingeteilt. Gruppe 1 beinhaltete alle Transkripte mit Halbwertszeiten bis 15 Minuten, Gruppe 2 solche von 15 bis 30 Minuten, Gruppe 3 von 30 bis 45 Minuten und Gruppe 4 alle Halbwertszeiten von 45 bis 60 Minuten. Die Verteilung der Halbwertszeiten in jeder Gruppe wurde folgend als prozentualer Anteil der gesamten, einer COG Kategorie zugeordneten Halbwertszeiten angegeben. Zum Beispiel entfielen in der Kategorie J „Translation und ribosomale Struktur“ unter HO-Bedingung 13,5% der zugeordneten Halbwertszeiten auf die Gruppe 1. 74,2% der Transkripte hatten in dieser Kategorie eine Halbwertszeit von 15 bis 30 Minuten (Gruppe 2), in der Gruppe 3 (30 bis 45 min) fanden sich 9% der der Transkripte und 3,4% in Gruppe 4 mit 45 bis 60 min. Anhand dieser Verteilungen wurde dann überprüft, ob eine COG Kategorie in der jeweiligen Gruppe über- oder unterrepräsentiert war. Hierfür wurden der Mittelwert und die Standardabweichung aller Kategorien einer Gruppe berechnet. Wenn ein Prozentwert in einer Kategorie und Gruppe mit mehr als dem Wert der Standardabweichung vom Mittelwert dieser Gruppe abwich, wurde dies als Über- bzw. Unterrepräsentation dieser Kategorie gewertet. Tabelle 3-4 zeigt die Prozentwerte aller Gruppen in den COG Kategorien für jede untersuchte Bedingung. Solche Werte, die auf eine Über- oder Unterrepräsentation hinweisen, sind fett markiert.

Tabelle 3-4: Prozentuale Anteile an Transkripten mit Halbwertszeiten in den Gruppen 1 bis 4 pro COG Kategorien. Die Halbwertszeiten unter jeder Bedingung und pro COG Kategorie wurden nach 4 Gruppen sortiert (Gr. 1: bis 15 min, Gr. 2: 15 bis 30 min, Gr. 3: 30 bis 45 min, Gr. 4: 45 bis 60 min), anschließend wurde der prozentuale Anteil an Transkripten in jeder Gruppe pro COG Kategorie und Bedingung berechnet. Eine Abweichung vom Mittelwert (MW.) jeder Gruppe größer als die Standardabweichung (Stabw.) deutet auf Über- bzw. Unterrepräsentation hin (fettgedruckt).

Kategorie	HO				LO				PT			
	Gr. 1	Gr. 2	Gr. 3	Gr. 4	Gr. 1	Gr. 2	Gr. 3	Gr. 4	Gr. 1	Gr. 2	Gr. 3	Gr. 4
J	13,5	74,2	9,0	3,4	6,0	79,5	12,8	1,7	11,7	69,7	14,5	4,1
K	16,1	65,3	14,5	4,0	11,6	74,7	12,1	1,6	12,9	74,2	9,1	3,8
L	16,8	67,3	12,4	3,5	8,5	83,6	7,3	0,6	12,4	75,6	9,8	2,1
D	17,5	71,4	9,5	1,6	2,9	85,6	10,6	1,0	14,8	75,0	7,4	2,8
V	13,1	63,9	19,7	3,3	4,6	81,5	13,9	0,0	12,4	76,2	8,6	2,9
T	9,9	70,3	18,7	1,1	7,2	84,9	6,5	1,4	10,5	80,4	7,8	1,3
M	9,9	66,1	19,9	4,1	4,4	82,9	12,0	0,8	10,7	76,7	9,5	3,2
N	15,5	64,8	19,7	0,0	6,7	85,7	7,6	0,0	11,2	75,7	12,1	0,9
U	14,3	65,3	18,4	2,0	8,5	83,1	8,5	0,0	19,7	59,2	18,3	2,8
O	12,9	67,1	17,1	2,9	7,3	80,6	10,7	1,5	12,6	74,4	8,8	4,2
C	13,6	66,3	14,8	5,3	6,3	83,8	9,2	0,7	12,0	75,0	8,6	4,5
G	7,8	75,7	13,6	2,9	8,4	83,2	7,1	1,3	12,1	75,8	9,7	2,4
E	12,3	66,3	16,7	4,7	7,7	79,8	11,4	1,2	11,8	75,5	10,1	2,6
F	14,3	71,4	14,3	0,0	7,8	79,2	9,1	3,9	12,8	71,8	12,8	2,6
H	13,7	61,5	19,3	5,6	7,5	82,4	9,2	0,8	10,4	76,5	10,4	2,6
I	14,0	60,0	20,0	6,0	15,4	70,3	13,2	1,1	12,4	81,4	5,2	1,0
P	11,5	64,2	20,9	3,4	6,5	81,6	10,3	1,5	13,5	72,9	10,5	3,0
Q	11,9	60,6	21,1	6,4	4,8	82,1	10,7	2,4	13,6	76,3	7,3	2,8
PS	0,0	88,2	11,8	0,0	8,0	84,0	8,0	0,0	0,0	92,9	3,6	3,6
R	14,5	68,1	14,3	3,1	7,9	78,3	12,1	1,7	11,5	73,3	11,4	3,7
S	12,8	67,1	17,4	2,7	10,9	75,8	11,3	2,0	12,6	74,2	8,6	4,6
MW.	12,7	67,9	16,3	3,1	7,6	81,1	10,2	1,2	12,0	75,4	9,7	2,9
Stabw.	3,7	6,2	3,7	1,9	2,7	3,8	2,2	0,9	3,4	5,9	3,1	1,0

Insgesamt waren für HO-Bedingungen über alle COG-Kategorien hinweg im Mittel 12,7% der Transkripte in der Gruppe mit den kürzesten Halbwertszeiten (Gruppe 1). Am deutlichsten von diesem Mittel wichen in dieser Gruppe die Kategorien L „DNA Replikation, Rekombination, Reperatur“ und D „Zellteilung“ mit Prozentwerten von 16,8 und 17,5 ab und waren damit überrepräsentiert. Unterrepräsentiert waren mit 7,8 und 0% die Kategorien G „Kohlenhydrattransport und –Metabolismus“ und PS „Photosynthese“.

Wie unter LO- und PT-Bedingungen auch, zeigten die meisten Transkripte eine Halbwertszeit zwischen 15 und 30 min und fielen somit in Gruppe 2. Hier fanden sich im Schnitt 67,9% der Transkripte. Am deutlichsten von diesem Mittelwert abweichend waren die Kategorien G „Kohlenhydrattransport und –Metabolismus“ mit 75,7 und PS „Photosynthese“ mit 88,2%, sowie H

„Coenzym-Metabolismus“ und Q „Biosynthese von Sekundärmetaboliten“ mit 61,5 respektive 60,6%, sowie I „Fettsäurestoffwechsel“ mit 60%.

In Gruppe 3, Halbwertszeiten von 30 bis 45 min, ordneten sich 16,3% der Transkripte ein. Deutlich unterrepräsentiert waren hier die Kategorien J „Translation und ribosomale Struktur“ (9%) und D „Zellteilung“ (9,5%), sowie PS „Photosynthese“ (11,8%) und L „DNA Replikation, Rekombination, Reparatur“ (12,4%). Leicht überrepräsentiert waren die Kategorien P „Transport anorganischer Ionen und -Metabolismus“ und Q „Biosynthese von Sekundärmetaboliten“ mit 20,9 und 21,1%.

In die letzte Gruppe 4, mit den längsten Halbwertszeiten von 45 bis 60 min, fielen die wenigsten Transkripte, im Mittel lediglich 3,1%. 6,4% der Transkripte in dieser Gruppe fanden sich in Kategorie Q „Biosynthese von Sekundärmetaboliten“, mit 6% und 5,6% waren die Kategorien I „Fettsäurestoffwechsel“ und H „Coenzym-Metabolismus“, sowie C „Energiegewinnung und –Umwandlung“ mit 5,3% ebenfalls leicht überrepräsentiert. Mit 1,1% der Transkripte war Kategorie T „Signaltransduktion“ unterrepräsentiert. Keine Transkripte konnten in dieser Gruppe den Kategorien N „Bewegung und Sekretion“, F „Nukleotidtransport und –Metabolismus“ und PS „Photosynthese“ zugeordnet werden.

Unter microaerobe Bedingungen zeigten im Mittel nur 7,6% der Transkripte eine Halbwertszeit bis 15 min (Gruppe 1). Deutlich von diesem Mittel abweichend mit 15,4% war in dieser Gruppe die Kategorie I „Fettsäurestoffwechsel“. Ebenfalls stärker präsentiert waren die Kategorien K „Transkription“ mit 11,6% der Transkripte und S „Unbekannte Funktion“ (10,9%). Die wenigsten Transkripte ließen sich den Kategorien D „Zellteilung“ mit nur 2,9% und M „Zellhülle und Zellmembran“ (4,4%), V „Abwehrmechanismen“ (4,6%) und Q „Biosynthese von Sekundärmetaboliten“ (4,8%) zuordnen.

In Gruppe 2 waren die Kategorien D „Zellteilung“ und N „Bewegung und Sekretion“ mit 85,6 und 85,7% am stärksten vertreten, wichen damit vom Mittelwert mit 81,1% jedoch nur leicht ab. Deutlich unterrepräsentiert war die Kategorie I „Fettsäurestoffwechsel“ mit 70,3%. Ebenfalls weniger stark repräsentiert waren Kategorien K „Transkription“ mit 74,7% und S „Unbekannte Funktion“ mit 75,8%.

In der Gruppe mit Halbwertszeiten von 30 bis 45 min mit durchschnittlich 10,2% der Transkripte waren die Kategorien J „Translation und ribosomale Struktur“ mit 12,8%, I „Fettsäurestoffwechsel“ mit 13,2% und V „Abwehrmechanismen“ mit 13,9% am stärksten vertreten. Unterrepräsentiert waren die Kategorien PS „Photosynthese“ (8%), N „Bewegung und Sekretion“ (7,6%), L „DNA Replikation, Rekombination, Reparatur“ (7,3%), G „Kohlenhydrattransport und -Metabolismus“ (7,1%) und T „Signaltransduktion“ (6,5%).

Nur durchschnittlich 1,2% der Transkripte hatten Halbwertszeiten in der Gruppe 4 von 45 bis 60 min. Mit 3,9% war hier die Kategorie F „Nukleotidtransport und -Metabolismus“ und die Kategorie Q „Biosynthese von Sekundärmetaboliten“ stark überrepräsentiert. In den Kategorien V „Abwehrmechanismen“, M „Zellhülle und Zellmembran“, U „Intrazellulärer Transport und Sekretion“ sowie PS „Photosynthese“ fanden sich keine Transkripte mit langen Halbwertszeiten.

Unter phototrophen Bedingungen hatten im Mittel 12% der Transkripte eine Halbwertszeit von bis zu 15 min (Gruppe 1). Am deutlichsten überrepräsentiert war die Kategorie U „Intrazellulärer Transport und Sekretion“ mit 19,7% der Transkripte. Der Kategorie PS „Photosynthese“ konnten keine Transkripte mit kurzen Halbwertszeiten zugeordnet werden.

Jedoch war in Gruppe 2, Transkripte mit Halbwertszeiten von 15 bis 30 min, die Kategorie PS mit 92,9% deutlich überrepräsentiert, da durchschnittlich nur 75,5% der Transkripte in diese Gruppe

fielen. Leicht überrepräsentiert war zudem Kategorie I „Fettsäurestoffwechsel“ mit 81,4%. Umgekehrt zu Gruppe 1 war hier die Kategorie U mit nur 59,2% nun am wenigsten vertreten. 9,7% der Transkripte hatten Halbwertszeiten zwischen 30 und 45 min (Gruppe 3). Die Kategorie U zeigte sich hier ebenfalls wieder am stärksten vertreten (18,3%). Ebenfalls überdurchschnittlich repräsentiert war Kategorie J „Translation und ribosomale Struktur“ mit 14,5%. Unterrepräsentiert waren die Kategorien I „Fettsäuremetabolismus“ und PS „Photosynthese“ mit 5,2 und 3,6%. Die Kategorien J „Translation und ribosomale Struktur“ (4,1%), O „Posttranslationale Modifikation, Protein turnover, Chaperone“ (4,2%) und C „Energiegewinnung und –Umwandlung“ (4,5%), sowie S „Unbekannte Funktion“ (4,6%) waren in Gruppe 4 (45 bis 60 min) bei durchschnittlich 2,8% in dieser Gruppe am stärksten vertreten. T „Signaltransduktion“ (1,3%), I „Fettsäuremetabolismus“ (1%) und N „Bewegung und Sekretion“ (0,9%) waren deutlich unterrepräsentiert.

Wenn man diese Ergebnisse nun hinsichtlich der Wachstumsbedingungen vergleicht, zeigte sich, dass unter aeroben Bedingungen Transkripte aus der Kategorie der Gene allgemein für Translation und ribosomale Proteine (J) stärker in der Gruppe der Halbwertszeit zwischen 15 und 30 Minuten vertreten waren. Zudem waren diese Transkripte in der Gruppe der Halbwertszeiten von 30 bis 45 Minuten weniger präsent als durchschnittlich die aus anderen Kategorien. Unter microaeroben Bedingungen hingegen war diese Kategorie in der Gruppe mit Halbwertszeiten von 30 bis 45 Minuten stärker vertreten. Dies gilt noch deutlicher für phototrophe Bedingungen, da hier die Gruppen 3 und 4, also lange Halbwertszeiten von 30 bis 60 Minuten, überrepräsentiert waren.

Ähnliches zeigte sich für die Kategorien L und D, also Kategorien mit Genen für DNA Replikation und Zellteilung. Hier waren unter aeroben Bedingungen anteilsmäßig deutlich mehr Transkripte in der Gruppe 1 als in den anderen Kategorien. Hingegen war für diese Kategorien die Gruppe 3 unterrepräsentiert. Auch zeigte sich wieder unter microaerobem Wachstum hierzu ein Unterschied. So waren zumindest die Transkripte aus der Kategorie der Gene für Zellteilung (D) deutlich mehr in Gruppe 2 zu finden, in Gruppe 1 hingegen waren diese weniger vertreten. Unter phototrophen Bedingungen waren allerdings keine Gruppen über- bzw. unterrepräsentiert.

Eine weitere Auffälligkeit zeigte sich bei Transkripten aus der Kategorie C. Diese Kategorie enthält Gene für die Energiegewinnung und Umwandlung. Hier zeigte sich, dass aerobe und phototrophe Wachstumsbedingungen dazu führen, dass diese Transkripte tendenziell eher langlebig sind, da hier unter diesen beiden Bedingungen die Halbwertszeitengruppe 4 überrepräsentiert war.

Transkripte von Genen, die in Verbindung mit dem Lipidstoffwechsel stehen (Kategorie I), zeigten ebenfalls unterschiedliche Halbwertszeiten abhängig von den Wachstumsbedingungen. Unter aeroben Bedingungen war hier Gruppe 2 weniger stark vertreten, dafür aber Gruppe 4 stärker. Somit scheinen Transkripte dieser Kategorie bei aerobem Wachstum durchschnittlich längere Halbwertszeiten zu haben. Bei microaeroben Bedingungen hingegen war Gruppe 1 deutlich stärker und Gruppe 2 schwächer repräsentiert. Jedoch zeigte sich in Gruppe 3 ebenfalls eine leichte Überrepräsentation. Die Halbwertszeiten der Transkripte aus dieser Kategorie waren unter microaeroben Bedingungen verglichen mit aeroben demnach kürzer. Ein ähnliches Bild zeichnet sich unter phototrophen Bedingungen. Auch hier war Gruppe 2 über- und die Gruppen 3 und 4 unterrepräsentiert, was auf tendenziell kürzere Halbwertszeiten schließen lässt.

Für die Kategorie der Photosynthese zeigte sich sowohl unter aeroben als auch unter phototrophen Bedingungen eine sehr starke Überrepräsentation in der Gruppe der Halbwertszeiten von 15 bis 30 Minuten. Unterrepräsentiert waren hier unter aeroben Bedingungen alle anderen Gruppen, keine Transkripte hatten Halbwertszeiten von unter 15 Minuten oder länger als 45 Minuten. Unter

phototrophen Bedingungen gab es ebenfalls keine Transkripte mit einer Halbwertszeit unter 15 Minuten, jedoch eines mit einer Halbwertszeit über 45 Minuten.

3.2.2.3. VERTEILUNG DER HALBWERTSZEITEN IN DEN FUNKTIONELLEN KATEGORIEN

Anschließend an diesen ersten Überblick, wie sich die Halbwertszeiten unter den drei getesteten Bedingungen in den Kategorien verteilen, wurden die einzelnen Kategorien detaillierter betrachtet. Hierfür wurden die Transkripte in jeder Kategorie ihrer Halbwertszeit nach sortiert und in 12 Gruppen eingeteilt. Jede Gruppe umfasste einen Zeitraum von fünf Minuten. In der ersten Gruppe wurden alle Transkripte mit einer Halbwertszeit bis fünf Minuten gezählt, in der zweiten all diejenigen mit einer Halbwertszeit zwischen fünf und zehn Minuten, in der dritten alle zwischen zehn und 15 Minuten usw. Die letzte Gruppe beinhaltet alle Transkripte mit einer Halbwertszeit über 60 Minuten, also all diejenigen, die künstlich auf 60 Minuten gesetzt wurden (s. o.). Diese Ergebnisse sind in den Abbildungen Abbildung 3.5 bis Abbildung 3.10 in Form von Säulendiagrammen dargestellt. Jeder Balken im Diagramm stellt dabei die Anzahl an Transkripten dar, die eine Halbwertszeit im Bereich des jeweiligen Zeitintervalls haben.

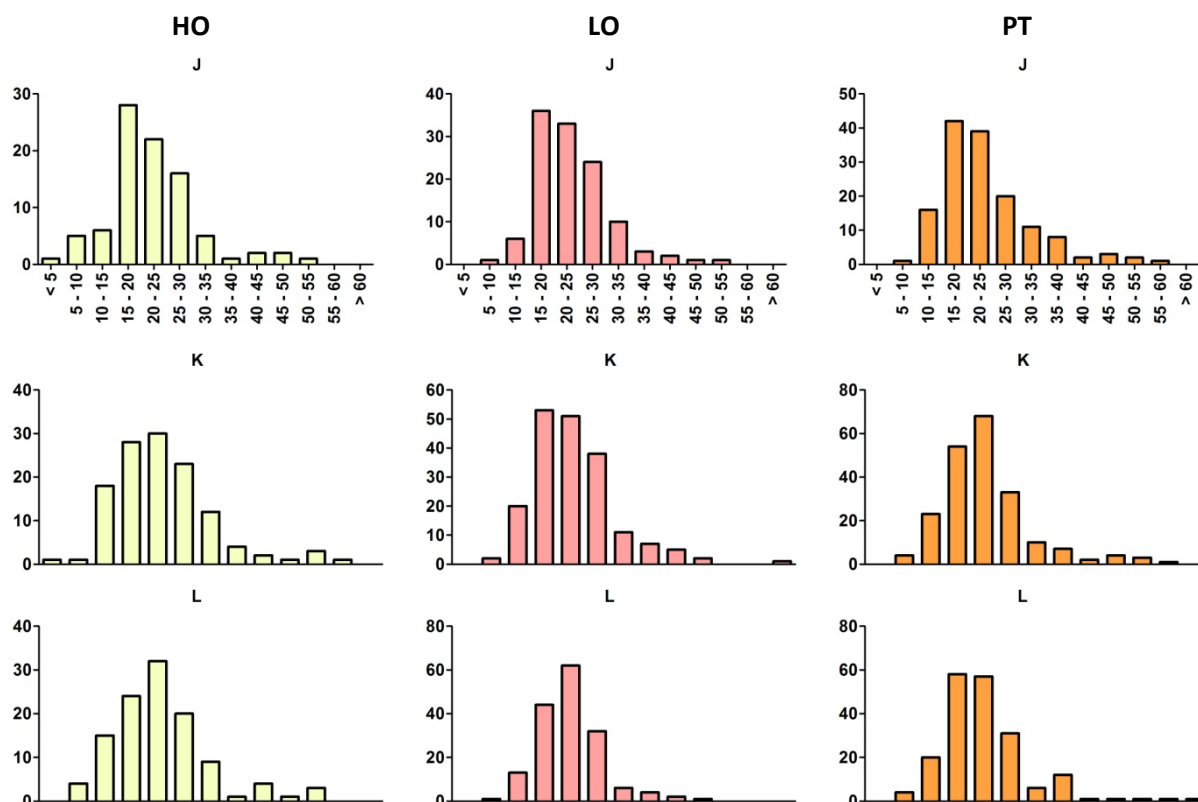


Abbildung 3.5: Verteilung der Halbwertszeiten in den Kategorien J, K und L unter aeroben (HO), microaeroben (LO) und phototrophen (PT) Bedingungen. Die Ordinate zeigt die Anzahl an Transkripten, die Abszisse die Halbwertszeiten, aufgeteilt in 5-Minuten Intervalle. Jeder Balken zeigt die Anzahl an Transkripten mit einer Halbwertszeit im jeweiligen Zeitintervall. Die genaue Anzahl, wie vielen Transkripten einer Kategorie pro Bedingungen eine Halbwertszeit zugeordnet werden konnte, ist Tabelle 3-2 zu entnehmen. Die Skalierung der Ordinate ist auf Grund der unterschiedlichen Anzahl an bestimmten Halbwertszeiten pro Bedingungen individuell angepasst.

Kategorien: J „Translation, Ribosomenstruktur und Biogenese“, K „Transkription“, L „DNA Replikation, Rekombination, Reparatur“.

Abbildung 3.5 zeigt die Verteilung der Halbwertszeiten in den Kategorien J „Translation, Ribosomenstruktur und Biogenese“, K „Transkription“ und L „DNA Replikation, Rekombination, Reparatur“.

Kategorie J: In dieser Kategorie hatten unter allen Bedingungen die meisten Transkripte Halbwertszeiten zwischen 15 und 20 Minuten. Unter phototrophen Bedingungen hatten jedoch auch viele Transkripte eine längere Halbwertszeit von 20 bis 25 Minuten. Jedoch waren unter phototrophen Bedingungen auch vergleichsweise mehr Transkripte mit Halbwertszeiten zwischen 15 und 20 Minuten zu beobachten. Kürzere Halbwertszeiten unter zehn Minuten traten vermehrt unter aeroben Bedingungen auf, die längsten Halbwertszeiten bis 60 Minuten zeigten sich unter phototrophen Bedingungen.

Kategorie K: Unter aeroben und phototrophen Bedingungen hatten die meisten Transkripte eine Halbwertszeit im Bereich von 20 bis 25 Minuten, unter microaeroben hatte die Mehrzahl eine etwas kürzere Halbwertszeit von 15 bis 20 Minuten. Jedoch hatten fast gleich viele Transkripte ebenfalls eine längere Halbwertszeit von 20 bis 25 Minuten. Die Unterschiede in der Anzahl an Transkripten pro jeweiligem Zeitintervall waren unter phototrophen Bedingungen am deutlichsten. Die kürzesten Halbwertszeiten zeigten sich unter aeroben Bedingungen, die längste Halbwertszeit von über 60 Minuten hatte ein Transkript unter microaeroben Bedingungen.

Kategorie L: Die meisten Transkripte hatten in dieser Kategorie bei aerobem und microaerobem Wachstum eine Halbwertszeit von 20 bis 25 Minuten. Unter phototrophen Bedingungen war der Unterschied in der Anzahl nur gering, hier verteilten sich die meisten Transkripte auf die Halbwertszeitenbereiche zwischen 15 und 25 Minuten. Unter phototrophen Bedingungen traten Halbwertszeiten bis über 60 Minuten auf, unter aeroben und microaeroben nur maximal bis 55 bzw. 50 Minuten.

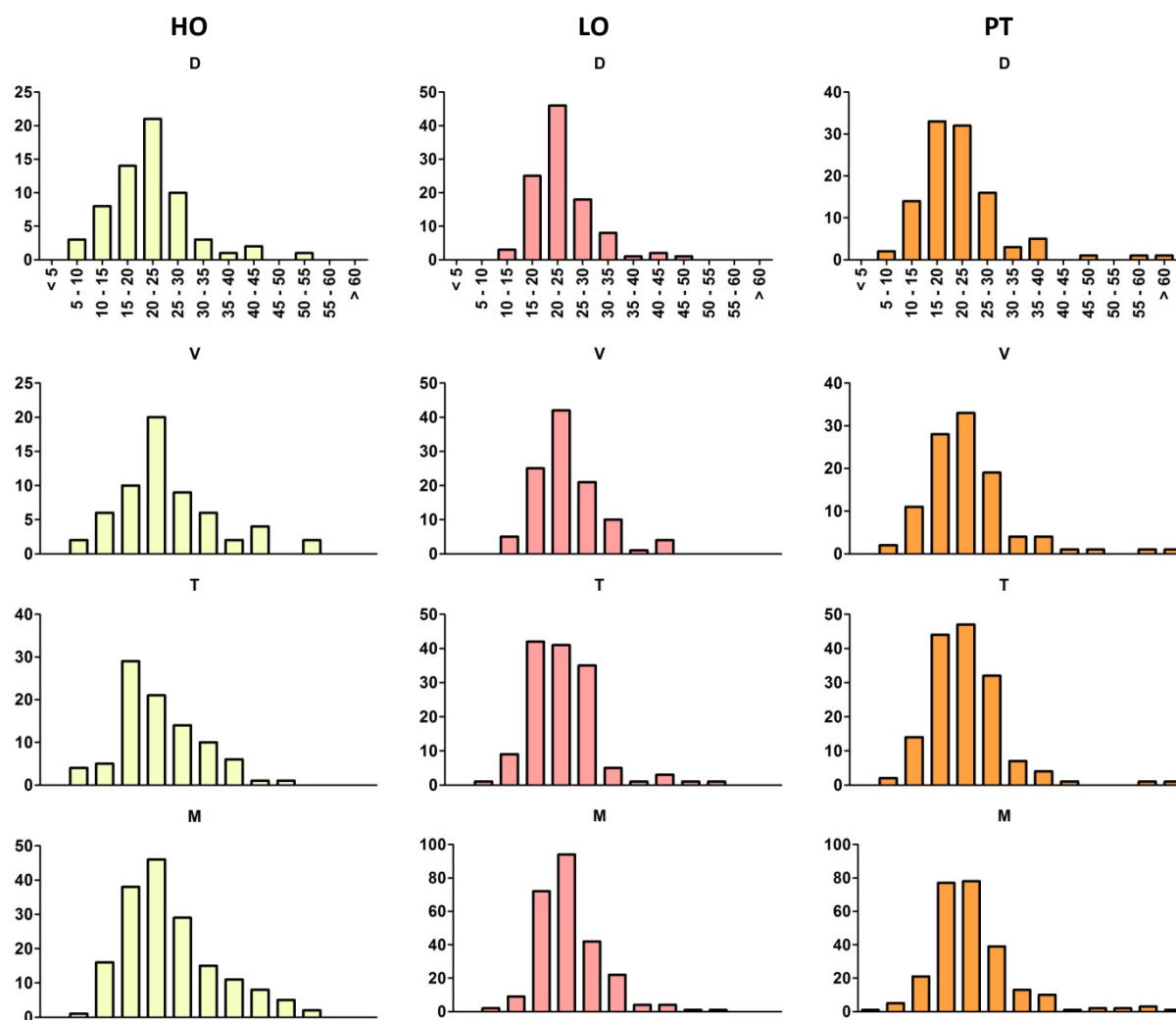


Abbildung 3.6 Verteilung der Halbwertszeiten in den Kategorien D, V, T und M unter aeroben (HO), microaeroben (LO) und phototropen (PT) Bedingungen. Die Ordinate zeigt die Anzahl an Transkripten, die Abszisse die Halbwertszeiten, aufgeteilt in 5-Minuten Intervalle. Jeder Balken zeigt die Anzahl an Transkripten mit einer Halbwertszeit im jeweiligen Zeitintervall. Die genaue Anzahl, wie vielen Transkripten einer Kategorie pro Bedingungen eine Halbwertszeit zugeordnet werden konnte, ist Tabelle 3-2 zu entnehmen. Die Skalierung der Ordinate ist auf Grund der unterschiedlichen Anzahl an bestimmten Halbwertszeiten pro Bedingungen individuell angepasst.

Kategorien: D „Zellteilung“, V „Abwehrmechanismen“, T „Signaltransduktion“, M „Zellhülle, äußere Membran“.

Die Verteilung der Halbwertszeiten in den ersten vier Kategorien D „Zellteilung“, V „Abwehrmechanismen“, T „Signaltransduktion“ und M „Zellhülle, äußere Membran“ der Oberkategorie „Zelluläre Prozesse“ ist in Abbildung 3.6 dargestellt.

Kategorie D: Unter aeroben und microaeroben Bedingungen hatten hier die meisten Transkripte eine Halbwertszeit von 20 bis 25 Minuten, bei microaerober Kultivierung war dies die deutliche Mehrheit. Unter phototropen waren wiederum ähnliche viele Transkripte mit Halbwertszeiten in den beiden Bereichen von 15 bis 25 Minuten vorhanden. Unter microaeroben Bedingungen zeigte sich eine geringe Bandbreite an Halbwertszeiten, so gab es keine kürzeren Halbwertszeiten als 10 Minuten und keine längeren als 50 Minuten. Unter phototropen Bedingungen waren in dieser Kategorie die längsten Halbwertszeiten bis über 60 Minuten festzustellen.

Kategorie V: In dieser Kategorie hatten unter allen drei Bedingungen die meisten Transkripte Halbwertszeiten zwischen 20 und 25 Minuten. Es zeigten sich jedoch auch in dieser Kategorie unter

phototrophen Bedingungen fast ebenso viele Transkripte mit etwas kürzeren Halbwertszeiten von 15 bis 20 Minuten. Wie in Kategorie D zeigte sich unter microaeroben Bedingungen die geringste Bandbreite an Halbwertszeiten und auch hier zeigten sich die längsten Halbwertszeiten unter phototrophen Bedingungen.

Kategorie T: Unter microaeroben Bedingungen fiel die ähnliche Anzahl an Transkripten mit Halbwertszeiten zwischen 15 und 30 Minuten auf. Bei phototrophen Wachstumsbedingungen hatten ebenfalls ähnliche viele Transkripte Halbwertszeiten zwischen 15 und 25 Minuten, etwas weniger zwischen 25 und 30 Minuten. Unter aeroben Bedingungen hatten die meisten Transkripte Halbwertszeiten von 15 bis 20 Minuten. Ebenfalls zeigten sich auch hier wieder die längsten Halbwertszeiten bei phototropher Kultivierung.

Kategorie M: Die meisten Transkripte hatten unter allen Bedingungen Halbwertszeiten zwischen 20 und 25 Minuten. Unter phototrophen Bedingungen lagen jedoch wieder fast ebenso viele Transkripte im Bereich zwischen 15 und 20 Minuten. Auffällig war in dieser Kategorie, dass unter phototrophen Bedingungen das gesamte Spektrum an Halbwertszeiten von unter fünf bis über 60 Minuten abgedeckt war.

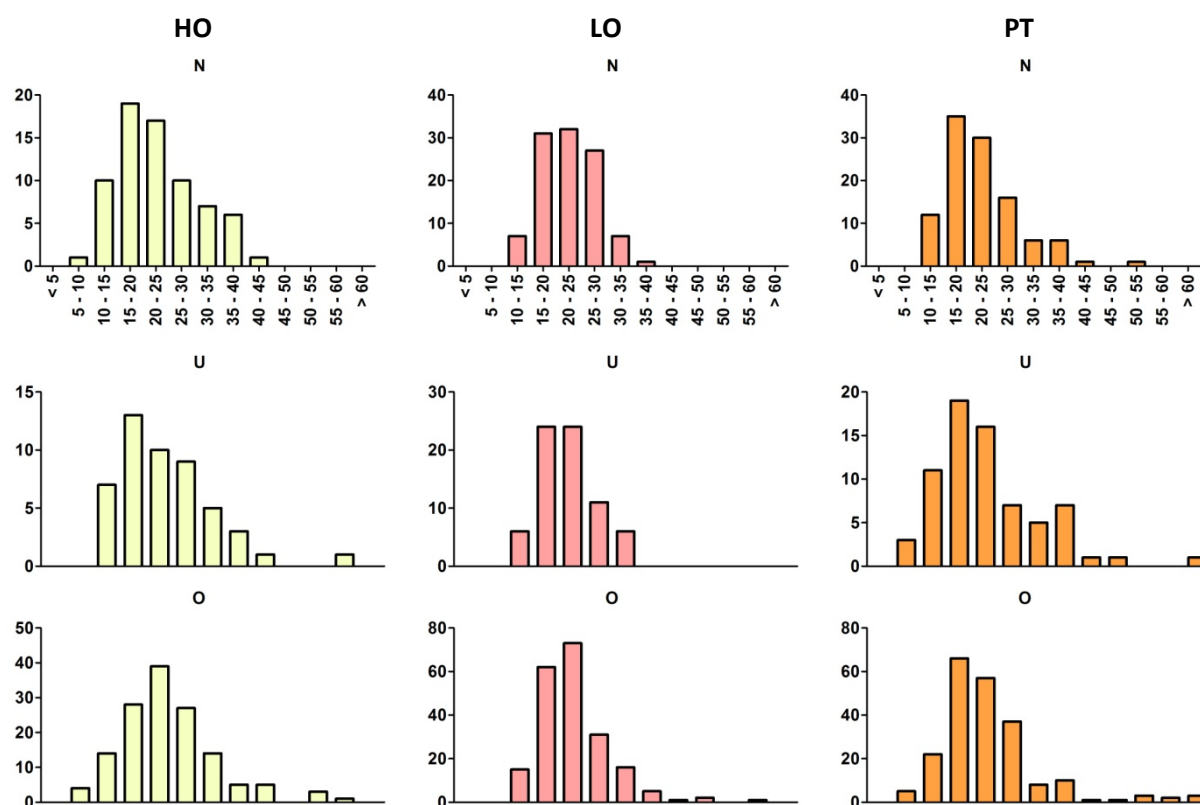


Abbildung 3.7 Verteilung der Halbwertszeiten in den Kategorien N, U und O unter aeroben (HO), microaeroben (LO) und phototrophen (PT) Bedingungen. Die Ordinate zeigt die Anzahl an Transkripten, die Abszisse die Halbwertszeiten, aufgeteilt in 5-Minuten Intervalle. Jeder Balken zeigt die Anzahl an Transkripten mit einer Halbwertszeit im jeweiligen Zeitintervall. Die genaue Anzahl, wie vielen Transkripten einer Kategorie pro Bedingungen eine Halbwertszeit zugeordnet werden konnte, ist Tabelle 3-2 zu entnehmen. Die Skalierung der Ordinate ist auf Grund der unterschiedlichen Anzahl an bestimmten Halbwertszeiten pro Bedingungen individuell angepasst.

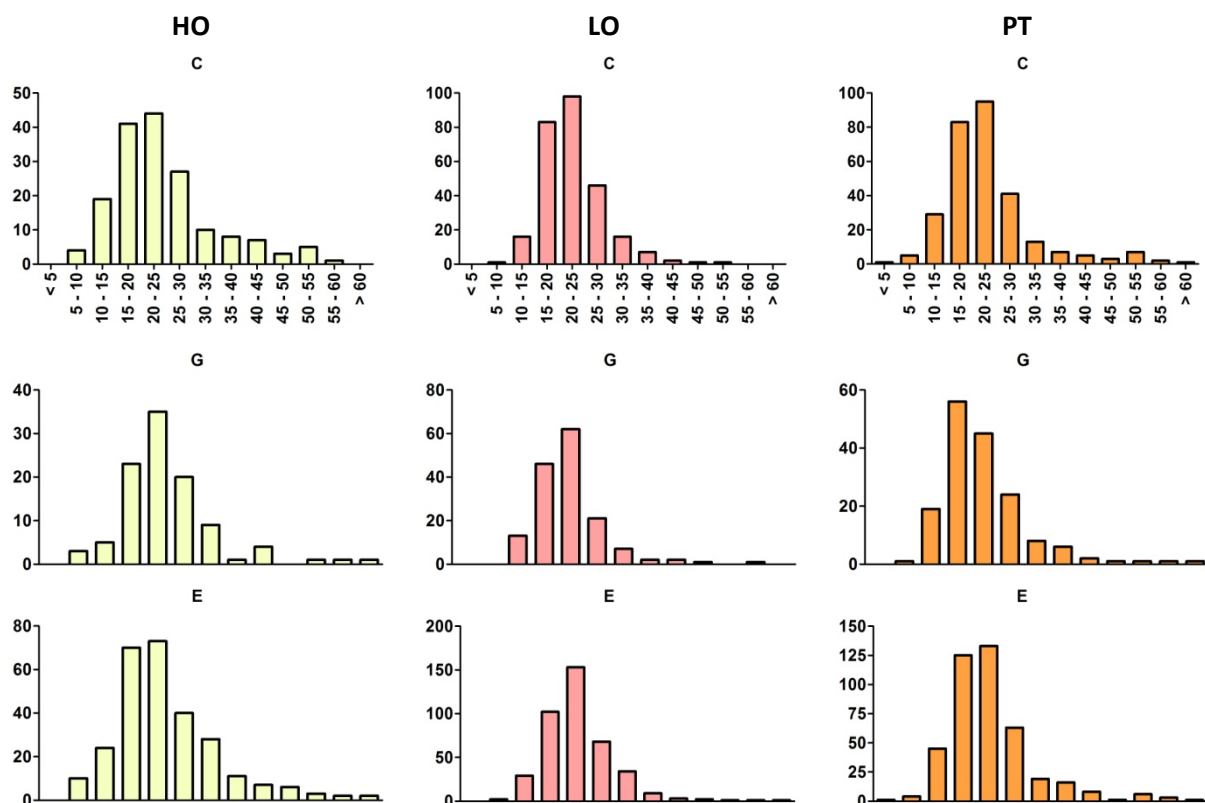
Kategorien: N „Zellmotilität, Sekretion“, U „Intrazellulärer Transport, Sekretion“, O „Posttranslationale Modifikationen, Protein *turnover*, Chaperone“.

Die Halbwertszeitenprofile der verbliebenen drei Kategorien N „Zellmotilität, Sekretion“, U „Intrazellulärer Transport, Sekretion“ und O „Posttranslationale Modifikation, Protein turnover, Chaperone“ der Oberkategorie „Zelluläre Prozesse“ sind in Abbildung 3.7 abgebildet.

Kategorie N: Unter aeroben und phototrophen Bedingungen hatten die meisten Transkripte Halbwertszeiten zwischen 15 und 20 Minuten, unter microaeroben zwischen 20 und 25 Minuten. Unter microaeroben Bedingungen war die Verteilung in den Bereichen zwischen 15 und 30 Minuten jedoch nahezu gleich. Zudem war die Bandbreite an Halbwertszeiten bei microaerobem Wachstum im Vergleich zu den beiden anderen Bedingungen kleiner, so hatten die Transkripte in dieser Kategorie Halbwertszeiten zwischen zehn und 40 Minuten.

Kategorie U: In dieser Kategorie fiel zunächst die ebenfalls sehr geringe Bandbreite an Halbwertszeiten unter microaeroben Bedingungen auf. So kamen hier nur Halbwertszeiten zwischen 10 und 35 Minuten vor, die meisten Transkripte hatten dabei eine Halbwertszeit zwischen 15 und 25 Minuten. Unter aeroben und phototrophen Bedingungen gab es sowohl kürzere als auch längere Halbwertszeiten. Mehrheitlich hatten die Transkripte unter diesen beiden Bedingungen Halbwertszeiten zwischen 15 und 20 Minuten. Wie unter microaeroben Bedingungen kamen unter aeroben keine kürzeren Halbwertszeiten als zehn Minuten vor. Unter aeroben und phototrophen Bedingungen zeigten sich in dieser Kategorie die längsten Halbwertszeiten zwischen 55 bis über 60 Minuten.

Kategorie O: Unter aeroben und microaeroben Bedingungen hatten die meisten Transkripte eine Halbwertszeit zwischen 20 und 25 Minuten, unter phototrophen zwischen 15 und 20 Minuten. Bei microaerobem Wachstum zeigten jedoch ebenfalls viele Transkripte eine solche kürzere Halbwertszeit, jedoch keine Halbwertszeiten unter 10 Minuten. Die längsten Halbwertszeiten zeigten sich auch hier wieder unter phototrophen Bedingungen.



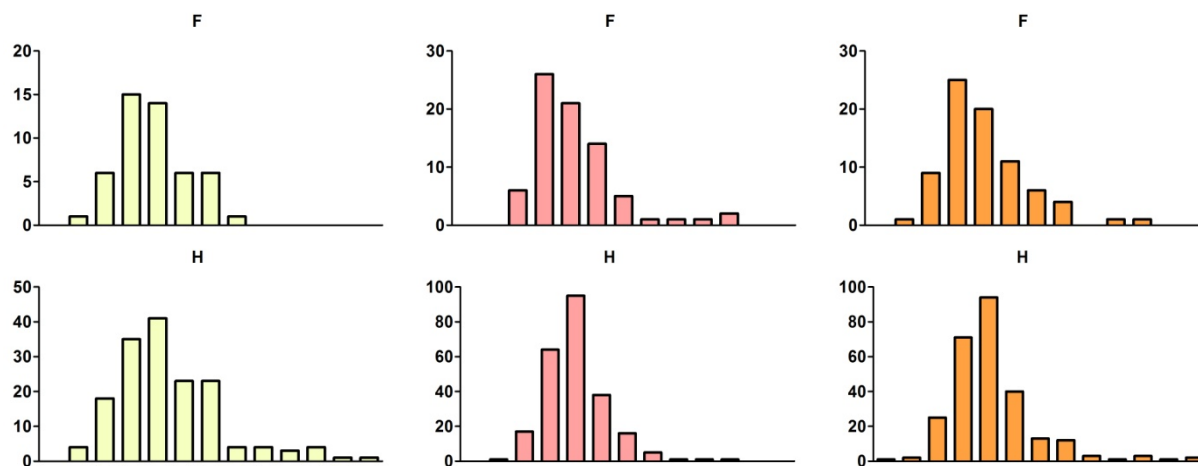


Abbildung 3.8 Verteilung der Halbwertszeiten in den Kategorien C, G, E, F und H unter aeroben (HO), microaeroben (LO) und phototropen (PT) Bedingungen. Die Ordinate zeigt die Anzahl an Transkripten, die Abszisse die Halbwertszeiten, aufgeteilt in 5-Minuten Intervalle. Jeder Balken zeigt die Anzahl an Transkripten mit einer Halbwertszeit im jeweiligen Zeitintervall. Die genaue Anzahl, wie vielen Transkripten einer Kategorie pro Bedingungen eine Halbwertszeit zugeordnet werden konnte, ist Tabelle 3-2 zu entnehmen. Die Skalierung der Ordinate ist auf Grund der unterschiedlichen Anzahl an bestimmten Halbwertszeiten pro Bedingungen individuell angepasst.

Kategorien: C „Energiegewinnung und Umwandlung“, G „Kohlenhydrattransport und –Metabolismus“, E „Aminosäuretransport und –Metabolismus“, F „Nukleotidtransport und – Metabolismus“, H „Coenzymmetabolismus“.

Abbildung 3.8 zeigt die Verteilung der Halbwertszeiten in den Kategorien C „Energiegewinnung und Umwandlung“, G „Kohlenhydrattransport und –Metabolismus“, E „Aminosäuretransport und – Metabolismus“, F „Nukleotidtransport und – Metabolismus“ und H „Coenzymmetabolismus“.

Kategorie C: Unter allen Bedingungen hatten die meisten Transkripte hier eine Halbwertszeit von 20 bis 25 Minuten. Unter allen drei Bedingungen zeigten sich aber ähnlich viele Transkripte mit Halbwertszeiten zwischen 15 und 20 Minuten. Bei der weiteren Verteilung der Halbwertszeiten auf die übrigen Zeitintervalle waren unter den drei Bedingungen keine deutlichen Unterschiede feststellbar. Es ist jedoch zu bemerken, dass unter aeroben Bedingungen für deutlich weniger Transkripte eine Halbwertszeit bestimmt werden konnte als unter den beiden anderen Bedingungen.

Kategorie G: Phototrophe Wachstumsbedingungen führten bei den Transkripten in dieser Kategorie mehrheitlich zu Halbwertszeiten zwischen 15 und 20 Minuten. Aerobe und microaerobe Bedingungen jedoch zu etwas längeren Halbwertszeiten zwischen 20 und 25 Minuten. Bei microaerobem Wachstum zeigten sich keine kürzeren Halbwertszeiten als zehn Minuten.

Kategorie E: Unter allen drei Bedingungen hatte die Mehrheit der Transkripte Halbwertszeiten zwischen 20 und 25 Minuten. Unter aeroben und phototropen Bedingungen hatten allerdings auch fast gleich viele Transkripte Halbwertszeiten zwischen 15 und 20 Minuten. Auch in dieser Kategorie konnten unter aeroben Bedingungen vergleichsweise deutlich weniger Halbwertszeiten bestimmt werden.

Kategorie F: Mehrheitlich hatten unter allen Bedingungen die Transkripte Halbwertszeiten zwischen 15 und 20 Minuten. Diesmal hatten unter aeroben Bedingungen jedoch auch ähnlich viele Transkripte etwas längere Halbwertszeiten zwischen 20 und 25 Minuten. Auffallend war in dieser Kategorie die vergleichsweise geringe Bandbreite an Halbwertszeiten unter aeroben Bedingungen.

Kategorie H: Auch in dieser Kategorie lagen die Halbwertszeiten unter allen Bedingungen mehrheitlich im Bereich zwischen 20 und 25 Minuten. Unter aeroben Bedingungen hatten jedoch

auch wieder ähnlich viele Transkripte eine etwas kürzere Halbwertszeit zwischen 15 und 20 Minuten. Unter microaeroben und phototrophen Bedingungen waren die Abstände in der Anzahl jeweils deutlicher.

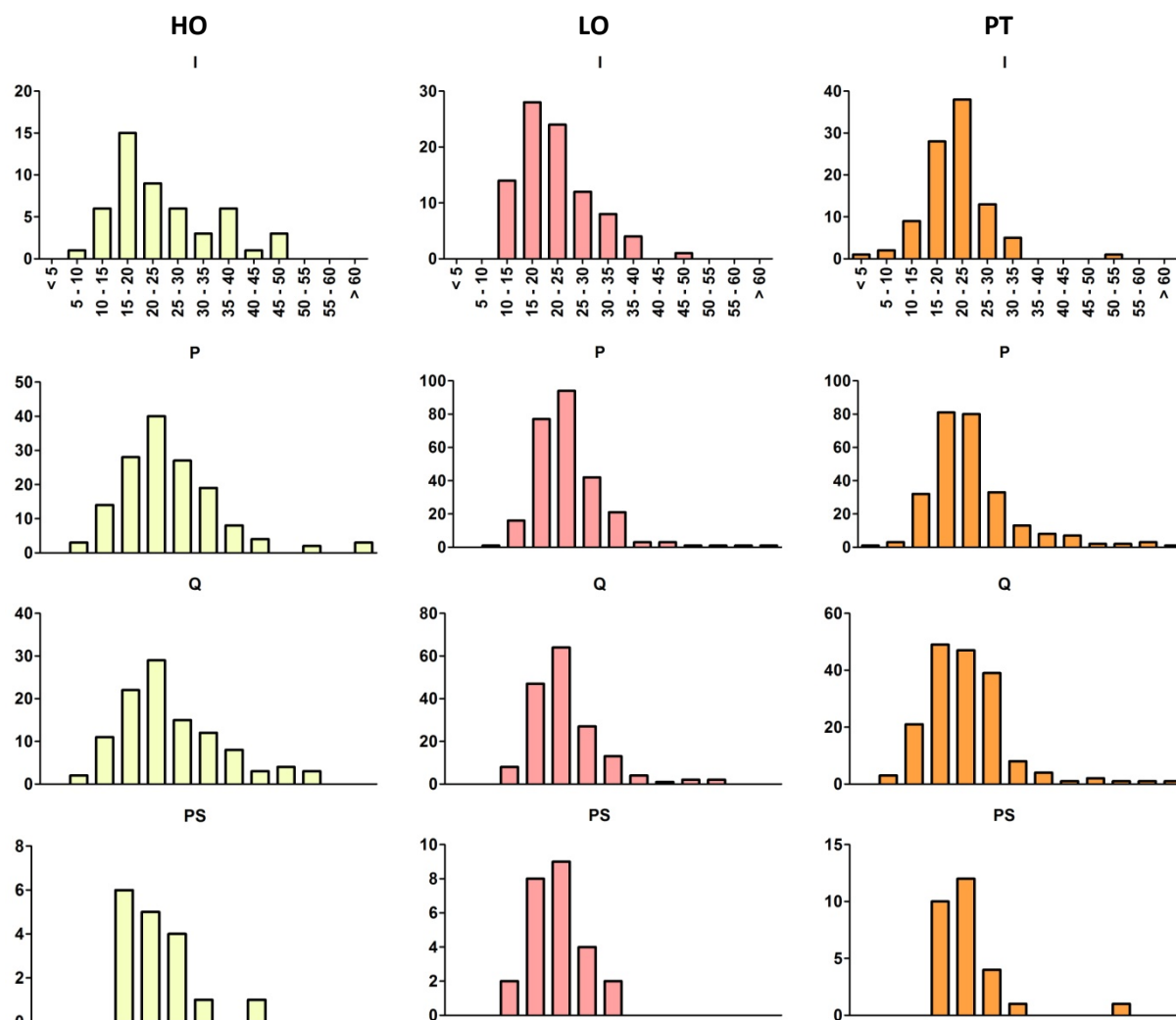


Abbildung 3.9 Verteilung der Halbwertszeiten in den Kategorien I, P, Q und PS unter aeroben (HO), microaeroben (LO) und phototrophen (PT) Bedingungen. Die Ordinate zeigt die Anzahl an Transkripten, die Abszisse die Halbwertszeiten, aufgeteilt in 5-Minuten Intervalle. Jeder Balken zeigt die Anzahl an Transkripten mit einer Halbwertszeit im jeweiligen Zeitintervall. Die genaue Anzahl, wie vielen Transkripten einer Kategorie pro Bedingungen eine Halbwertszeit zugeordnet werden konnte, ist Tabelle 3-2 zu entnehmen. Die Skalierung der Ordinate ist auf Grund der unterschiedlichen Anzahl an bestimmten Halbwertszeiten pro Bedingungen individuell angepasst.

Kategorien: I „Fettsäurestoffwechsel“, P „Transport anorganischer Ionen und –Metabolismus“, Q „Biosynthese von Sekundärmetaboliten, Transport und Katabolismus“, PS „Photosynthese“.

Abbildung 3.9 zeigt die Profile der Halbwertszeiten der Kategorien I „Fettsäurestoffwechsel“, P „Transport anorganischer Ionen und –Metabolismus“, Q „Biosynthese von Sekundärmetaboliten, Transport und Katabolismus“ und PS „Photosynthese“ aus der Oberkategorie „Stoffwechsel“.

Kategorie I: In dieser Kategorie hatten unter phototrophen Bedingungen die meisten Transkripte eine Halbwertszeit von 20 bis 25 Minuten, während unter aeroben und microaeroben Bedingungen die meisten Transkripte eine zwischen 15 und 20 Minuten hatten. Allerdings hatten unter phototrophen Bedingungen insgesamt weniger Transkripte eine noch längere Halbwertszeit, dafür

aber mehr eine kürzere bis unter 5 Minuten. Unter den beiden anderen Bedingungen gab es dahingehend vergleichsweise mehr Transkripte mit längeren Halbwertszeiten.

Kategorie P: Unter aeroben und microaeroben Bedingungen lagen die meisten Halbwertszeiten im Bereich zwischen 20 und 25 Minuten, unter phototrophen zwischen 15 und 20 Minuten. Jedoch hatten unter phototrophen Bedingungen ebenfalls viele Transkripte eine Halbwertszeit von 20 bis 25 Minuten. Unter allen Bedingungen war eine große Bandbreite an Halbwertszeiten zu erkennen.

Kategorie Q: Auffällig in dieser Kategorie war unter phototrophen Bedingungen die recht ähnliche Anzahl an Transkripten in den drei Halbwertszeitenbereichen zwischen 15 und 30 Minuten, wodurch in den anderen Zeitintervallen folglich weniger Transkripte vorhanden waren. Unter den beiden anderen Bedingungen war der Unterschied vom Zeitintervall mit den meisten Transkripten (20 bis 25 Minuten) zum folgenden größer.

Kategorie PS: Aufgrund der wenigen berechneten Halbwertszeiten in dieser Kategorie zeigte sich unter allen Bedingungen nur eine geringe Bandbreite an Halbwertszeiten. Unter phototrophen und microaeroben Bedingungen hatten die meisten Transkripte eine Halbwertszeit von 20 bis 25 Minuten, unter aeroben Bedingungen zwischen 15 und 20 Minuten. Zu bemerken waren unter phototrophen Bedingungen ein Transkript mit einer Halbwertszeit zwischen 50 und 55 Minuten.

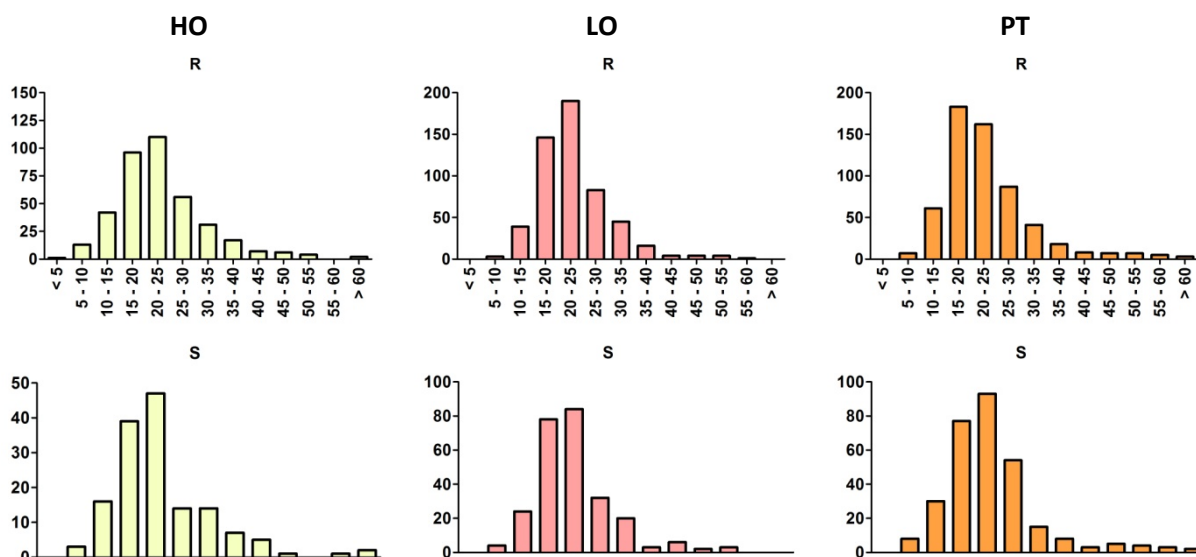


Abbildung 3.10 Verteilung der Halbwertszeiten in den Kategorien R und S unter aeroben (HO), microaeroben (LO) und phototrophen (PT) Bedingungen. Die Ordinate zeigt die Anzahl an Transkripten, die Abszisse die Halbwertszeiten, aufgeteilt in 5-Minuten Intervalle. Jeder Balken zeigt die Anzahl an Transkripten mit einer Halbwertszeit im jeweiligen Zeitintervall. Die genaue Anzahl, wie vielen Transkripten einer Kategorie pro Bedingungen eine Halbwertszeit zugeordnet werden konnte, ist Tabelle 3-2 zu entnehmen. Die Skalierung der Ordinate ist auf Grund der unterschiedlichen Anzahl an bestimmten Halbwertszeiten pro Bedingungen individuell angepasst.

Kategorien: R „Nur generelle Funktionsvorhersage“, S „Funktion unbekannt“.

Die Verteilung der Halbwertszeiten in den letzten beiden Kategorien R „Nur generelle Funktionsvorhersage“ und S „Funktion unbekannt“ ist in Abbildung 3.10 dargestellt.

Kategorie R: In dieser Kategorie konnte für sehr viele Transkripte eine Halbwertszeit bestimmt werden und so zeigte sich auch unter allen Bedingungen eine große Bandbreite an Halbwertszeiten. Unter aeroben und microaeroben Bedingungen hatten die meisten Transkripte eine Halbwertszeit zwischen 20 und 25 Minuten, unter phototrophen zwischen 15 und 20 Minuten.

Kategorie S: Die meisten Transkripte hatten in dieser Kategorie unter allen Bedingungen Halbwertszeiten von 20 bis 25 Minuten. Unter microaeroben Bedingungen waren jedoch ebenfalls sehr viele Transkripte im Halbwertszeitenbereich zwischen 15 und 20 Minuten vorhanden.

3.2.3. VERGLEICH DER HALBWERTSZEITEN IN DEN FUNKTIONELLEN KATEGORIEN UNTER JEWEILS ZWEI WACHSTUMSBEDINGUNGEN

Im Folgenden sollten alle Gene untersucht werden, für deren Transkripte unter mindestens zwei Bedingungen Halbwertszeiten vorlagen. Verglichen wurden hierfür die Halbwertszeiten unter phototrophen mit denen unter microaeroben Bedingungen (PT/LO) und unter aeroben Bedingungen (PT/HO), sowie die Halbwertszeiten unter aeroben Bedingungen mit denen unter microaeroben. Tabelle 3-5 zeigt, wie viele Transkripte jeweils miteinander verglichen werden konnten.

Tabelle 3-5: Vergleich der Halbwertszeiten unter jeweils zwei Wachstumsbedingungen. Verglichen werden die Halbwertszeiten unter den Bedingungen phototroph und microaerob (PT/LO), phototroph und aerob (PT/HO) sowie aerob und microaerob (HO/LO). Angegeben ist die Anzahl der Transkripte, für die jeweils unter den verglichenen Bedingungen berechnete Halbwertszeiten existieren.

Verglichene Bedingungen	Anzahl Transkripte mit Halbwertszeit
PT/LO	1326
PT/HO	872
HO/LO	813

Diese Transkripte mit Halbwertszeiten in beiden untersuchten Bedingungen wurden anschließend wieder den bereits beschriebenen funktionellen Kategorien zugeordnet. Die vollständigen Ergebnisse befinden sich in den Excel-Dateien „COG_Vergleich_PT_LO“, „COG_Vergleich_PT_HO“ und „COG_Vergleich_HO_LO“ auf der CD im Anhang.

Im Anschluss an diesen Abschnitt findet sich eine kurze Zusammenfassung der im Folgenden ausführlich beschriebenen Ergebnisse (3.2.3.1)

Die Abbildungen Abbildung 3.11 bis Abbildung 3.31 zeigen den Vergleich der Halbwertszeiten für die Transkripte in den 21 funktionellen Gruppen, für die sowohl unter phototrophen als auch unter microaeroben Bedingungen Halbwertszeiten bestimmt werden konnten. In den Tabellen Tabelle 3-6 bis Tabelle 3-26 sind jeweils 4 Gene der jeweiligen Kategorie aufgeführt, deren Transkripthalbwertszeiten sich am stärksten unterschieden. Die vollständigen Daten hierzu sind ebenfalls den oben genannten Excel-Dateien auf der CD im Anhang zu entnehmen.

Kategorie J „Translation, Ribosomenstruktur und Biogenese“:

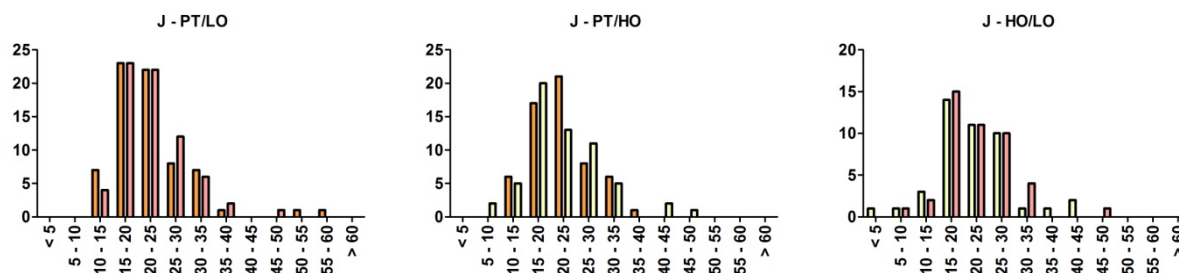


Abbildung 3.11: Vergleich der Halbwertszeiten unter phototrophen und microaeroben (PT/LO), unter phototrophen und aeroben (PT/HO) und unter aeroben und microaeroben Bedingungen (HO/LO) in der funktionellen COG Kategorie J „Translation, Ribosomenstruktur und Biogenese“. In diesen Vergleich wurden nur solche Transkripte mit einbezogen, für die unter beiden Bedingungen Halbwertszeiten berechnet wurden. Die Ordinate zeigt die Anzahl an Transkripten, die Abszisse die Halbwertszeiten, aufgeteilt in 5-Minuten Intervalle. Jeder Balken zeigt die Anzahl an Transkripten mit einer Halbwertszeit im jeweiligen Zeitintervall. Die Skalierung der Ordinate ist der jeweiligen Anzahl an Transkripten mit bestimmten Halbwertszeiten pro Vergleich angepasst.

PT/LO: Beim Vergleich der Halbwertszeiten unter phototrophen und microaeroben Bedingungen zeigte sich, dass phototrophe Bedingungen vergleichsweise zu mehr Transkripten mit Halbwertszeiten zwischen zehn und 15 Minuten führten als microaerobe. Umgekehrt hatten mehr Transkripte bei microaerobem Wachstum längere Halbwertszeiten von 25 bis 30 Minuten. Jedoch waren unter phototrophen Bedingungen bei diesem Vergleich auch mehr Transkripte mit sehr langen Halbwertszeiten zwischen 50 und 60 Minuten zu verzeichnen gewesen.

PT/HO: Bei diesem Vergleich zeigten sich etwas deutlichere Unterschiede. Vergleichsweise hatten bei aerobem Wachstum mehr Transkripte kurze Halbwertszeiten zwischen fünf und 20 Minuten. Im Intervall von 20 bis 25 Minuten waren mehr Transkripte aus dem phototrophen Datensatz zu verzeichnen. Bei diesem Vergleich zeigten sich hingegen die längsten Halbwertszeiten nur bei aerobem Wachstum.

HO/LO: Verglich man die Halbwertszeiten unter aeroben und microaeroben Bedingungen, zeigten sich kaum Unterschiede, da nur relativ wenige Halbwertszeiten unter beiden Bedingungen bestimmt werden konnten. Nur im sehr kurzlebigen Bereich zeigten sich etwas mehr Transkripte aus dem aeroben Datensatz.

Tabelle 3-6: Liste der Transkripte in Kategorie J mit den deutlichsten Unterschieden in den Halbwertszeiten unter phototrophen und microaeroben Bedingungen (PT/LO), unter phototrophen und aeroben Bedingungen (PT/HO) und unter microaeroben und aeroben Bedingungen (HO/LO). Dargestellt sind vier Gene, deren Transkripte die deutlichsten Unterschiede in ihren Halbwertszeiten unter den beiden Bedingungen zeigen. Der FC (*fold change*) gibt den Faktor an, mit dem sich die mittlere Halbwertszeit unter einer Bedingung von der unter der anderen unterscheidet (Halbwertszeiten in Minuten).

PT/LO				
Gennummer	Genname/Beschreibung	PT	LO	FC
RSP_0021	<i>rpsI</i> , 30S ribosomal protein S9	50,8	19,4	2,6
RSP_3526	Amidase	34,5	18,7	1,8
RSP_1338	<i>ubiE</i> , methyltransferase	16,2	28,7	-1,8
RSP_0624	hypothetical protein	17,1	39,7	-2,3
PT/HO				
		PT	HO	FC
RSP_3526	Amidase	34,5	14,2	2,4
RSP_1937	<i>InfC</i> , Translation initiation factor IF-3	33,4	22,2	1,5
RSP_1989	<i>valS</i> , Putative valyl-tRNA synthetase	13,5	31,6	-2,3
RSP_2270	<i>gatA</i> , glutamyl-tRNA amidotransferase subunit A	16,6	42,4	-2,6
HO/LO				
		HO	LO	FC
RSP_2860	<i>rpsB</i> , 30S ribosomal protein S2	39,0	19,6	2,0
RSP_1811	<i>glnD</i> , PII uridylyl-transferase	20,5	11,6	1,8
RSP_6147	rRNA methyltransferase RsmB-like	4,5	8,4	-1,9
RSP_0494	<i>hypF</i> , hydrogenase maturation factor F	14,1	31,2	-2,2

Kategorie K „Transkription“:

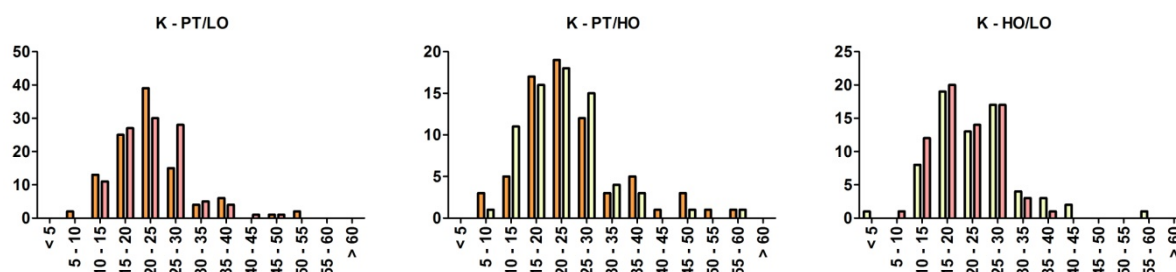


Abbildung 3.12: Vergleich der Halbwertszeiten unter phototrophen und microaeroben (PT/LO), unter phototrophen und aeroben (PT/HO) und unter aeroben und microaeroben Bedingungen (HO/LO) in der funktionellen COG Kategorie K „Transkription“. In diesen Vergleich wurden nur solche Transkripte mit einbezogen, für die unter beiden Bedingungen Halbwertszeiten berechnet wurden. Die Ordinate zeigt die Anzahl an Transkripten, die Abszisse die Halbwertszeiten, aufgeteilt in 5-Minuten Intervalle. Jeder Balken zeigt die Anzahl an Transkripten mit einer Halbwertszeit im jeweiligen Zeitintervall. Die Skalierung der Ordinate ist der jeweiligen Anzahl an Transkripten mit bestimmten Halbwertszeiten pro Vergleich angepasst.

PT/LO: Während in Kategorie K beim Vergleich phototropher mit microaeroben Wachstumsbedingungen die Verteilung in den unteren Halbwertszeitenbereichen bis 20 Minuten ähnlich war, zeigten sich die deutlichsten Unterschiede bei den Transkripten mit Halbwertszeiten zwischen 20 und 30 Minuten. Phototrophes Wachstum führte zu mehr Transkripten mit Halbwertszeiten zwischen 20 und 25 Minuten und microaerobes führte zu mehr Transkripten im Bereich von 25 bis 30 Minuten. In den langlebigeren Bereichen waren keine deutlichen Unterschiede zwischen den Wachstumsbedingungen zu erkennen.

PT/HO: Unter aeroben Bedingungen waren im Vergleich mehr Transkripte mit Halbwertszeiten zwischen zehn und 15 Minuten und ebenfalls mehr Transkripte mit Halbwertszeiten von 25 bis 30 Minuten zu verzeichnen. In den Zeitintervallen von 15 bis 25 Minuten waren unter beiden Bedingungen fast gleich viele Transkripte verzeichnen, jedoch etwas mehr aus dem phototrophen Datensatz. Im phototrophen Datensatz fanden sich sowohl mehr Transkripte mit kurzen Halbwertszeiten von fünf bis zehn Minuten als auch solche mit langen über 30 Minuten.

HO/LO: Beim Vergleich dieser beiden Bedingungen waren keine großen Unterschiede in der Verteilung der Transkripte auf die Halbwertszeitenbereiche feststellbar gewesen. Unter microaeroben Bedingungen hatten etwas mehr Transkripte eine kurze Halbwertszeit unter 15 Minuten. In den langlebigeren Bereichen über 30 Minuten hatten unter aeroben Bedingungen mehr Transkripte Halbwertszeiten dieser Größenordnung als unter microaeroben Bedingungen. So zeigten sich in dieser Kategorie unter aeroben Bedingungen vergleichsweise etwas längere Halbwertszeiten als unter microaeroben.

Tabelle 3-7: Liste der Transkripte in Kategorie K mit den deutlichsten Unterschieden in den Halbwertszeiten unter phototrophen und microaeroben Bedingungen (PT/LO), unter phototrophen und aeroben Bedingungen (PT/HO) und unter microaeroben und aeroben Bedingungen (HO/LO). Dargestellt sind vier Gene, deren Transkripte die deutlichsten Unterschiede in ihren Halbwertszeiten unter den beiden Bedingungen zeigen. Der FC (*fold change*) gibt den Faktor an, mit dem sich die mittlere Halbwertszeit unter einer Bedingung von der unter der anderen unterscheidet (Halbwertszeiten in Minuten).

PT/LO				
Gennummer	Genname/Beschreibung	PT	LO	FC
RSP_4019	transcriptional regulator, LysR family	27,4	12,5	2,2
RSP_3317	transcriptional regulator, TetR family	54,7	26,7	2,1
RSP_2324	transcriptional regulator, RpiR family	8,0	24,0	-3,0
RSP_0641	transcriptional regulator, XRE family	10,1	34,1	-3,4
PT/HO				
		PT	HO	FC
RSP_2130	two component, sigma54 specific transcriptional regulator, fis family	27,6	6,1	4,5
RSP_0665	<i>ftsH</i> , FtsH	38,7	10,0	3,9
RSP_0927	<i>lyrS</i> , transcriptional regulator, LyrR family	8,7	24,8	-2,8
RSP_3042	<i>dorX</i> , DMSO reductase regulatory protein DorX	12,4	37,3	-3,0
HO/LO				
		HO	LO	FC
RSP_3732	ABC sugar transporter, periplasmic binding protein	40,1	13,5	3,0
RSP_3582	<i>gvpN</i> , ATPase	29,7	13,4	2,2
RSP_3929	<i>atpD</i> , H ⁺ -transporting two-sector ATPase, alpha/beta subunit	39,6	18,5	2,1
RSP_3771	hypothetical protein	12,9	29,8	-2,3

Kategorie L „DNA Replikation, Rekombination, Reparatur“:

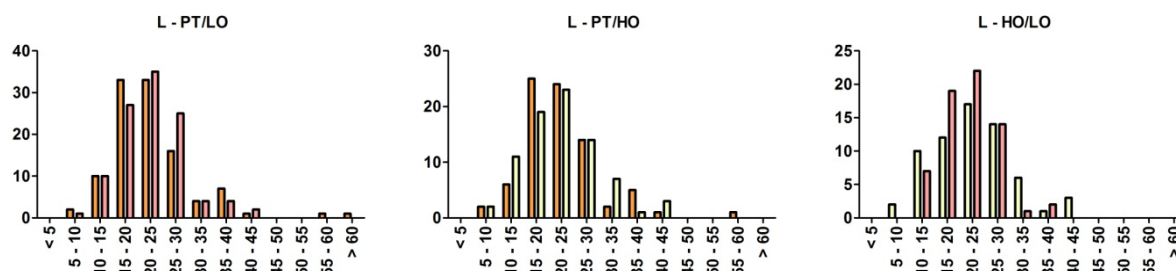


Abbildung 3.13: Vergleich der Halbwertszeiten unter phototropen und microaeroben (PT/LO), unter phototropen und aeroben (PT/HO) und unter aeroben und microaeroben Bedingungen (HO/LO) in der funktionellen COG Kategorie L „DNA Replikation, Rekombination, Reparatur“. In diesen Vergleich wurden nur solche Transkripte mit einbezogen, für die unter beiden Bedingungen Halbwertszeiten berechnet wurden. Die Ordinate zeigt die Anzahl an Transkripten, die Abszisse die Halbwertszeiten, aufgeteilt in 5-Minuten Intervalle. Jeder Balken zeigt die Anzahl an Transkripten mit einer Halbwertszeit im jeweiligen Zeitintervall. Die Skalierung der Ordinate ist der jeweiligen Anzahl an Transkripten mit bestimmten Halbwertszeiten pro Vergleich angepasst.

PT/LO: In Kategorie L zeigten sich beim PT/LO Vergleich die deutlichsten Unterschiede im Bereich zwischen 15 und 30 Minuten. Mehrheitlich hatten die meisten Transkripte hier unter beiden Bedingungen Halbwertszeiten zwischen 20 und 25 Minuten. Bei phototropem Wachstum hatten mehr Transkripte eine Halbwertszeit zwischen 15 und 20 Minuten. Im Bereich zwischen 25 und 30 Minuten hatten hier unter microaeroben Bedingungen mehr Transkripte ihre Halbwertszeit als unter phototropen Bedingungen. Unter phototropen Bedingungen gab es wieder Transkripte mit sehr langen Halbwertszeiten von 55 bis über 60 Minuten.

PT/HO: Beim Vergleich phototropher und aerober Bedingungen hatten gleich viele Transkripte eine Halbwertszeit zwischen fünf und zehn Minuten. Unterschiede zeigten sich in den beiden folgenden Intervallen. Zwischen zehn und 15 Minuten hatten mehr Transkripte aus dem aeroben Datensatz Halbwertszeiten als aus dem phototropen. Halbwertszeiten zwischen 15 und 20 Minuten hatten hingegen mehr Transkripte aus dem phototropen Datensatz. Halbwertszeiten von 30 bis 35 Minuten hatten mehr Transkripte aerobem Wachstum.

HO/LO: Unter aeroben Bedingungen war wieder eine höhere Bandbreite an Halbwertszeiten der Transkripte zu beobachten. So hatten mehr Transkripte unter aeroben Bedingungen Halbwertszeiten unter 15 Minuten und über 30 Minuten als unter microaeroben Bedingungen. In den Bereichen zwischen 15 und 30 Minuten waren hingegen mehr Transkripte aus dem microaeroben Datensatz zu verzeichnen gewesen. Die größten Unterschiede lagen hier im Bereich zwischen 15 und 20 Minuten und im Bereich zwischen 20 und 25 Minuten.

Tabelle 3-8: Liste der Transkripte in Kategorie L mit den deutlichsten Unterschieden in den Halbwertszeiten unter phototrophen und microaeroben Bedingungen (PT/LO), unter phototrophen und aeroben Bedingungen (PT/HO) und unter microaeroben und aeroben Bedingungen (HO/LO). Dargestellt sind vier Gene, deren Transkripte die deutlichsten Unterschiede in ihren Halbwertszeiten unter den beiden Bedingungen zeigen. Der FC (*fold change*) gibt den Faktor an, mit dem sich die mittlere Halbwertszeit unter einer Bedingung von der unter der anderen unterscheidet (Halbwertszeiten in Minuten).

PT/LO				
Gennummer	Genname/Beschreibung	PT	LO	FC
RSP_3520	ABC peptide transporter, fused ATPase domains	56,1	23,6	2,4
RSP_2696	ABC transporter, fused ATPase and inner membrane subunits	21,6	10,1	2,1
RSP_0094	<i>smoK</i> , ABC sorbitol/mannitol transporter, ATPase subunit	17,1	43,1	-2,5
RSP_2895	putative ABC transporter, fused ATPase subunits	13,2	38,5	-2,9
PT/HO				
		PT	HO	FC
RSP_2130	two component, sigma54 specific transcriptional regulator, fis family	27,6	6,1	4,5
RSP_0665	<i>ftsH</i> , FtsH	38,7	10,0	3,9
RSP_1743	ATPase, AAA family	8,6	15,9	-1,8
RSP_3568	<i>znuC</i> , ABC zinc transporter, ATPase subunit ZnuC	14,6	29,0	-2,0
HO/LO				
		HO	LO	FC
RSP_2405	ABC cobalamin/Fe ³⁺ -siderophore transporter, ATPase subunit	40,8	15,9	2,6
RSP_2482	TonB-dependent receptor protein	33,3	13,9	2,4
RSP_1527	Helicase, UvrD/Rep family	13,2	27,0	-2,1
RSP_2895	putative ABC transporter, fused ATPase subunits	8,7	38,5	-4,4

Kategorie D „Zellteilung“:

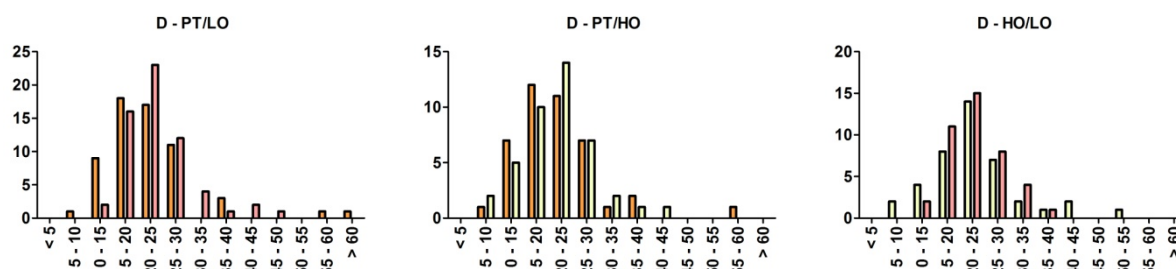


Abbildung 3.14: Vergleich der Halbwertszeiten unter phototrophen und microaeroben (PT/LO), unter phototrophen und aeroben (PT/HO) und unter aeroben und microaeroben Bedingungen (HO/LO) in der funktionellen COG Kategorie D „Zellteilung“. In diesen Vergleich wurden nur solche Transkripte mit einbezogen, für die unter beiden Bedingungen Halbwertszeiten berechnet wurden. Die Ordinate zeigt die Anzahl an Transkripten, die Abszisse die Halbwertszeiten, aufgeteilt in 5-Minuten Intervalle. Jeder Balken zeigt die Anzahl an Transkripten mit einer Halbwertszeit im jeweiligen Zeitintervall. Die Skalierung der Ordinate ist der jeweiligen Anzahl an Transkripten mit bestimmten Halbwertszeiten pro Vergleich angepasst.

PT/LO: In Kategorie D zeigte sich, dass unter phototrophen Bedingungen die meisten Transkripte vermehrt kürzere Halbwertszeiten verglichen mit denen unter microaeroben Bedingungen hatten.

Deutlich war dies im Bereich von zehn bis 15 Minuten. Zwischen 15 und 20 Minuten war die Verteilung ähnlich. Im folgenden Zeitintervall von 20 bis 25 Minuten lag die Verteilung zwischen den Transkripten aus phototrophen und microaeroben Wachstumsbedingungen wieder umgekehrt. Hier waren mehr Transkripte aus dem microaeroben Datensatz vertreten. In den höheren Halbwertszeitenbereichen waren mehr Transkripte aus dem microaeroben Datensatz zu verzeichnen, jedoch zeigten auch hier wieder unter phototrophen Bedingungen zwei Transkripte eine Halbwertszeit von 55 bis über 60 Minuten.

PT/HO: Unter phototrophen Bedingungen waren hier ebenfalls tendenziell mehr Transkripte mit kürzeren Halbwertszeiten zu finden als unter aeroben Bedingungen. Die Verteilung der Halbwertszeiten war hier vergleichbar mit der beim PT/LO Vergleich. Jedoch konnten insgesamt weniger Transkripte miteinander verglichen werden, weswegen die Unterschiede geringer ausfielen.

HO/LO: Unter aeroben Bedingungen gab es eine größere Bandbreite an Halbwertszeiten als unter microaeroben Bedingungen. Es ist jedoch auch hier zu beachten, dass die Anzahl an Transkripten mit Halbwertszeiten unter beiden Bedingungen nicht hoch war. Unter aeroben Bedingungen hatten etwas mehr Transkripte sowohl eine kurze Halbwertszeit zwischen fünf und 15 Minuten als auch eine längere von über 40 Minuten. In den Intervallen zwischen 15 und 35 Minuten lagen tendenziell mehr Transkripte aus dem microaeroben Datensatz vor, die Unterschiede waren jedoch gering.

Tabelle 3-9: Liste der Transkripte in Kategorie D mit den deutlichsten Unterschieden in den Halbwertszeiten unter phototrophen und microaeroben Bedingungen (PT/LO), unter phototrophen und aeroben Bedingungen (PT/HO) und unter microaeroben und aeroben Bedingungen (HO/LO). Dargestellt sind vier Gene, deren Transkripte die deutlichsten Unterschiede in ihren Halbwertszeiten unter den beiden Bedingungen zeigen. Der FC (*fold change*) gibt den Faktor an, mit dem sich die mittlere Halbwertszeit unter einer Bedingung von der unter der anderen unterscheidet (Halbwertszeiten in Minuten).

PT/LO				
Gennummer	Genname/Beschreibung	PT	LO	FC
RSP_3520	ABC peptide transporter, fused ATPase domains	56,1	23,6	2,4
RSP_2696	ABC transporter, fused ATPase and inner membrane subunits	21,6	10,1	2,1
RSP_2895	putative ABC transporter, fused ATPase subunits	13,2	38,5	-2,9
RSP_0933	hypothetical protein	15,4	45,3	-2,9
PT/HO				
		PT	HO	FC
RSP_2274	ABC branched amino acid transporter family, ATPase subunit	35,9	20,3	1,8
RSP_0416	putative calcium-binding EF-hand domain protein	14,6	8,3	1,8
RSP_3568	<i>znuC</i> , ABC zinc transporter, ATPase subunit ZnuC	14,6	29,0	-2,0
RSP_1907	Putative Flp pilus assembly protein ATPase CpaE	9,6	22,7	-2,4
HO/LO				
		HO	LO	FC
RSP_2405	ABC cobalamin/Fe ³⁺ -siderophore transporter, ATPase subunit	40,8	15,9	2,6
RSP_2696	ABC transporter, fused ATPase and inner membrane subunits	23,5	10,1	2,3
RSP_0976	<i>sdhA</i> , succinate dehydrogenase	7,9	21,1	-2,7
RSP_2895	putative ABC transporter, fused ATPase subunits	8,7	38,5	-4,4

Kategorie V „Abwehrmechanismen“:

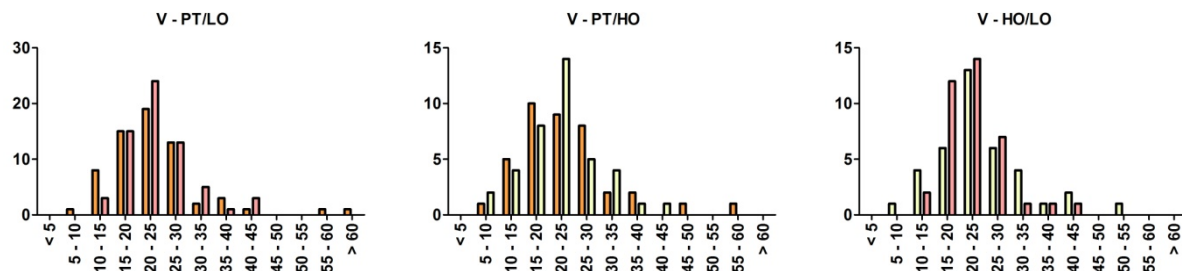


Abbildung 3.15: Vergleich der Halbwertszeiten unter phototrophen und microaeroben (PT/LO), unter phototrophen und aeroben (PT/HO) und unter aeroben und microaeroben Bedingungen (HO/LO) in der funktionellen COG Kategorie V „Abwehrmechanismen“. In diesen Vergleich wurden nur solche Transkripte mit einbezogen, für die unter beiden Bedingungen Halbwertszeiten berechnet wurden. Die Ordinate zeigt die Anzahl an Transkripten, die Abszisse die Halbwertszeiten, aufgeteilt in 5-Minuten Intervalle. Jeder Balken zeigt die Anzahl an Transkripten mit einer Halbwertszeit im jeweiligen Zeitintervall. Die Skalierung der Ordinate ist der jeweiligen Anzahl an Transkripten mit bestimmten Halbwertszeiten pro Vergleich angepasst.

PT/LO: In Kategorie V fiel beim diesem Vergleich auf, dass in den Zeitintervallen 15 bis 20 Minuten und 25 bis 30 Minuten unter beiden Bedingungen gleich viele Transkripte diese Halbwertszeiten hatten. Unterschiede zeigten sich zwischen fünf und zehn Minuten, hier hatten mehr Transkripte aus dem phototrophen Datensatz diese Halbwertszeit. Halbwertszeiten zwischen 20 und 25 Minuten wiederum hatten mehr Transkripte unter microaeroben Bedingungen. In den langlebigeren Halbwertszeitenbereichen war die Verteilung wieder ähnlich. Auch hier zeigten sich wieder sehr langlebige Transkripte mit Halbwertszeiten von 55 bis über 60 Minuten im phototrophen Datensatz.

PT/HO: Der deutlichste Unterschied zwischen den beiden Bedingungen zeigte sich im Bereich zwischen 20 und 25 Minuten. Hier hatten mehr Transkripte aus dem aeroben Datensatz Halbwertszeiten als aus dem phototrophen. Im Halbwertszeitenbereich zwischen 25 und 30 Minuten lagen mehr Transkripte aus dem phototrophen Datensatz. Aufgrund der relativ geringen Anzahl an Transkripten mit berechneten Halbwertszeiten in dieser Kategorie fielen die Unterschiede in den übrigen Zeitintervallen recht gering aus. Es zeigte sich jedoch auch hier wieder ein Transkript mit hoher Halbwertszeit zwischen 55 und 60 Minuten im phototrophen Datensatz.

HO/LO: Während unter microaeroben Bedingungen in den mittleren Halbwertszeitenbereichen zwischen 15 und 30 Minuten mehr Transkripte vorlagen als unter aeroben, zeigten insgesamt mehr Transkripte bei aerobem Wachstum sowohl kürzere als auch längere Halbwertszeiten unter 15 bzw. über 30 Minuten. Die größten Unterschiede in dieser Kategorie zeigten sich bei den Transkripten mit Halbwertszeiten zwischen 15 und 20 Minuten

Tabelle 3-10: Liste der Transkripte in Kategorie V mit den deutlichsten Unterschieden in den Halbwertszeiten unter phototrophen und microaeroben Bedingungen (PT/LO), unter phototrophen und aeroben Bedingungen (PT/HO) und unter microaeroben und aeroben Bedingungen (HO/LO). Dargestellt sind vier Gene, deren Transkripte die deutlichsten Unterschiede in ihren Halbwertszeiten unter den beiden Bedingungen zeigen. Der FC (*fold change*) gibt den Faktor an, mit dem sich die mittlere Halbwertszeit unter einer Bedingung von der unter der anderen unterscheidet (Halbwertszeiten in Minuten).

PT/LO				
Gennummer	Genname/Beschreibung	PT	LO	FC
RSP_3520	ABC peptide transporter, fused ATPase domains	56,1	23,6	2,4
RSP_2696	ABC transporter, fused ATPase and inner membrane subunits	21,6	10,1	2,1
RSP_2895	putative ABC transporter, fused ATPase subunits	13,2	38,5	-2,9
RSP_0461	multidrug/cation efflux pump, membrane fusion protein (MFP) family	8,7	41,2	-4,8
PT/HO				
		PT	HO	FC
RSP_3891	ABC di/oligopeptide transporter, inner membrane subunit	16,4	6,4	2,6
RSP_1120	protein secretion protein, HlyD family, membrane fusion protein	47,2	26,6	1,8
RSP_3568	<i>znuC</i> , ABC zinc transporter, ATPase subunit	14,6	29,0	-2,0
RSP_6248	ZnuC	13,4	31,2	-2,3
	putative class I holin			
HO/LO				
		HO	LO	FC
RSP_2405	ABC cobalamin/Fe ³⁺ -siderophore transporter, ATPase subunit	40,8	15,9	2,6
RSP_2696	ABC transporter, fused ATPase and inner membrane subunits	23,5	10,1	2,3
RSP_0461	multidrug/cation efflux pump, membrane fusion protein (MFP) family	12,3	41,2	-3,3
RSP_2895	putative ABC transporter, fused ATPase subunits	8,7	38,5	-4,4

Kategorie T „Signaltransduktion“:

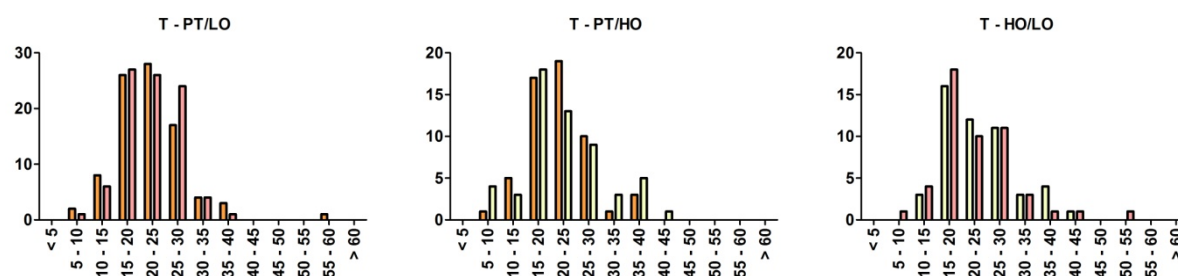


Abbildung 3.16: Vergleich der Halbwertszeiten unter phototrophen und microaeroben (PT/LO), unter phototrophen und aeroben (PT/HO) und unter aeroben und microaeroben Bedingungen (HO/LO) in der funktionellen COG Kategorie T „Signaltransduktion“. In diesen Vergleich wurden nur solche Transkripte mit einbezogen, für die unter beiden Bedingungen Halbwertszeiten berechnet wurden. Die Ordinate zeigt die Anzahl an Transkripten, die Abszisse die Halbwertszeiten, aufgeteilt in 5-Minuten Intervalle. Jeder Balken zeigt die Anzahl an Transkripten mit einer Halbwertszeit im jeweiligen Zeitintervall. Die Skalierung der Ordinate ist der jeweiligen Anzahl an Transkripten mit bestimmten Halbwertszeiten pro Vergleich angepasst.

PT/LO: Beim Vergleich der Halbwertszeiten unter phototrophen und microaeroben Bedingungen war in Kategorie T die Verteilung an Transkripten in den beiden Zeitintervallen von 15 bis 25 Minuten recht ähnlich. Deutliche Unterschiede zeigten sich hier wieder in den kürzeren und längeren Bereichen. So hatten zusammengenommen mehr Transkripte unter phototrophen Wachstumsbedingungen eine Halbwertszeit zwischen fünf und 15 Minuten als unter microaeroben. Im Bereich zwischen 25 und 30 war dies umgekehrt. Auch in dieser Kategorie war wieder ein Transkript mit einer Halbwertszeit zwischen 55 und 60 Minuten aus dem phototrophen Datensatz zu verzeichnen.

PT/HO: In dieser Kategorie waren die Unterschiede zwischen phototrophen und aeroben Bedingungen nur sehr gering. Der deutlichste Unterschied zeigte sich im Intervall 20 bis 25 Minuten, diese Halbwertszeit hatten mehr Transkripte bei phototrophem Wachstum. Tendenziell zeigten allerdings bei aerober Kultivierung mehr Transkripte längere Halbwertszeiten als bei phototropher.

HO/LO: Bei diesem Vergleich waren die Unterschiede in der Verteilung der Halbwertszeiten noch geringer als bei den anderen beiden Vergleichen, was unter anderem auch an der geringen Anzahl an Transkripten mit bestimmten Halbwertszeiten lag. Tendenziell hatten unter microaeroben Bedingungen etwas mehr Transkripte Halbwertszeiten zwischen fünf und 20 Minuten, dafür waren es unter aeroben Bedingungen etwas mehr in den Halbwertszeitenbereichen zwischen 20 und 45 Minuten.

Tabelle 3-11: Liste der Transkripte in Kategorie T mit den deutlichsten Unterschieden in den Halbwertszeiten unter phototrophen und microaeroben Bedingungen (PT/LO), unter phototrophen und aeroben Bedingungen (PT/HO) und unter microaeroben und aeroben Bedingungen (HO/LO). Dargestellt sind vier Gene, deren Transkripte die deutlichsten Unterschiede in ihren Halbwertszeiten unter den beiden Bedingungen zeigen. Der FC (*fold change*) gibt den Faktor an, mit dem sich die mittlere Halbwertszeit unter einer Bedingung von der unter der anderen unterscheidet (Halbwertszeiten in Minuten).

PT/LO				
Gennummer	Genname/Beschreibung	PT	LO	FC
RSP_2438	<i>cheX</i> , Putative CheX protein	18,5	9,4	2,0
RSP_1953	Transcriptional regulator, CRP/FNR family	26,9	14,6	1,8
RSP_3129	serine/threonine protein kinase	11,1	20,6	-1,9
RSP_2229	Chemotaxis multidomain, CheB methylesterase/CheR, Methylase	12,4	25,5	-2,0
PT/HO				
		PT	HO	FC
RSP_2130	two component, sigma54 specific transcriptional regulator, fis family	27,6	6,1	4,5
RSP_3982	hypothetical protein	20,4	8,7	2,3
RSP_1587	<i>cheR2</i> , Chemotaxis methyltransferase, CheR2(EC:2.1.1.80)	16,2	35,8	-2,2
RSP_3042	<i>dorX</i> , DMSO reductase regulatory protein DorX	12,4	37,3	-3,0
HO/LO				
		HO	LO	FC
RSP_0327	<i>nrrR</i> , Crp-Fnr regulatory protein (NnrR)	26,8	12,6	2,1
RSP_2438	<i>cheX</i> , Putative CheX protein	18,5	9,4	2,0
RSP_3303	<i>mcpG</i> , Putative methyl accepting chemotaxis protein, McpG	16,1	27,1	-1,7
RSP_1859	<i>ppdK</i> , pyruvate phosphate dikinase	27,9	50,9	-1,8

Kategorie M „Zellhülle, äußere Membran“:

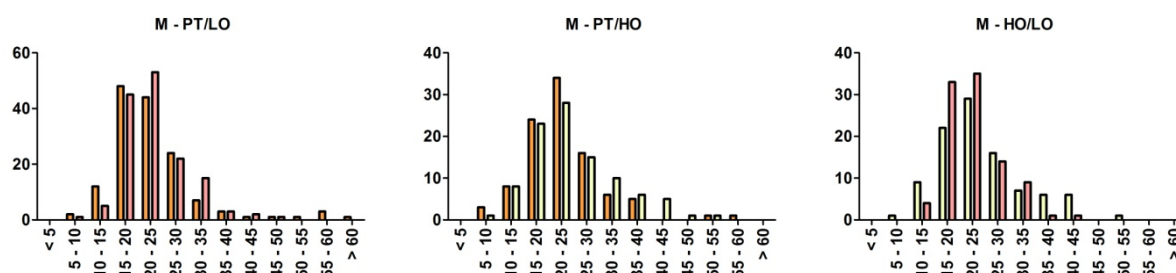


Abbildung 3.17: Vergleich der Halbwertszeiten unter phototrophen und microaeroben (PT/LO), unter phototrophen und aeroben (PT/HO) und unter aeroben und microaeroben Bedingungen (HO/LO) in der funktionellen COG Kategorie M „Zellhülle, äußere Membran“. In diesen Vergleich wurden nur solche Transkripte mit einbezogen, für die unter beiden Bedingungen Halbwertszeiten berechnet wurden. Die Ordinate zeigt die Anzahl an Transkripten, die Abszisse die Halbwertszeiten, aufgeteilt in 5-Minuten Intervalle. Jeder Balken zeigt die Anzahl an Transkripten mit einer Halbwertszeit im jeweiligen Zeitintervall. Die Skalierung der Ordinate ist der jeweiligen Anzahl an Transkripten mit bestimmten Halbwertszeiten pro Vergleich angepasst.

PT/LO: In Kategorie M waren die Unterschiede zwischen phototrophen und microaeroben Bedingungen augenscheinlich nur gering. Allerdings konnten in dieser Kategorie für mehr Transkripte

Halbwertszeiten bestimmt werden. Die deutlichsten Unterschiede zeigten sich in den Bereichen zwischen zehn und 15 Minuten, zwischen 20 und 25 Minuten und zwischen 30 und 35 Minuten. In beiden letzteren Intervallen lagen mehr Transkripte aus dem microaeroben Datensatz, in ersterem mehr aus dem phototrophen. Die langlebigsten Transkripte mit Halbwertszeiten zwischen 50 bis über 60 Minuten traten im phototrophen Datensatz auf.

PT/HO: Der deutlichste Unterschied zwischen den Wachstumsbedingungen war wieder im Zeitintervall von 20 bis 25 Minuten festzustellen. In diesem Bereich der Halbwertszeit lagen unter phototrophen Bedingungen mehr. Ein weiterer leichter Unterschied zeigte sich im Halbwertszeitenbereich von 30 bis 35 Minuten, hier waren umgekehrt mehr Transkripte aus dem aeroben Datensatz zu verzeichnen. In den übrigen Zeitintervallen waren die Unterschiede zwischen den Wachstumsbedingungen nur sehr gering.

HO/LO: Bei diesem Vergleich konnte man leichte Tendenzen beobachten, dass aerobe Wachstumsbedingungen wieder zu einer größeren Bandbreite an Halbwertszeiten führten als microaerobe. Unterschiede zeigten sich diesbezüglich im kurz- und im langlebigen Halbwertszeitenbereich. So hatten unter aeroben Bedingungen mehr Transkripte Halbwertszeiten zwischen fünf und 15 Minuten und ebenfalls mehr von 30 bis 55 Minuten als unter microaeroben Bedingungen. Zwischen 15 und 25 Minuten waren mehr Transkripte aus dem microaeroben Datensatz zu verzeichnen als aus dem aeroben.

Tabelle 3-12: Liste der Transkripte in Kategorie M mit den deutlichsten Unterschieden in den Halbwertszeiten unter phototrophen und microaeroben Bedingungen (PT/LO), unter phototrophen und aeroben Bedingungen (PT/HO) und unter microaeroben und aeroben Bedingungen (HO/LO). Dargestellt sind vier Gene, deren Transkripte die deutlichsten Unterschiede in ihren Halbwertszeiten unter den beiden Bedingungen zeigen. Der FC (*fold change*) gibt den Faktor an, mit dem sich die mittlere Halbwertszeit unter einer Bedingung von der unter der anderen unterscheidet (Halbwertszeiten in Minuten).

PT/LO				
Gennummer	Genname/Beschreibung	PT	LO	FC
RSP_3520	ABC peptide transporter, fused ATPase domains	56,1	23,6	2,4
RSP_2696	ABC transporter, fused ATPase and inner membrane subunits	21,6	10,1	2,1
RSP_2324	transcriptional regulator, RpiR family	8,0	24,0	-3,0
RSP_0461	multidrug/cation efflux pump, membrane fusion protein (MFP) family	8,7	41,2	-4,8
PT/HO				
		PT	HO	FC
RSP_3026	Transcriptional regulator, MocR family	54,8	27,2	2,0
RSP_3461	N-carbamyl-D-amino acid amidohydrolase	32,5	17,9	1,8
RSP_0823	SHMT, serine hydroxymethyltransferase protein	17,1	42,1	-2,5
RSP_0515	hypothetical protein	9,9	32,9	-3,3
HO/LO				
		HO	LO	FC
RSP_2496	hypothetical protein	44,3	17,0	2,6
RSP_2405	ABC cobalamin/Fe ³⁺ -siderophore transporter, ATPase subunit	40,8	15,9	2,6
RSP_0461	multidrug/cation efflux pump, membrane fusion protein (MFP) family	12,3	41,2	-3,3
RSP_2895	putative ABC transporter, fused ATPase subunits	8,7	38,5	-4,4

Kategorie N „Zellmotilität, Sekretion“:

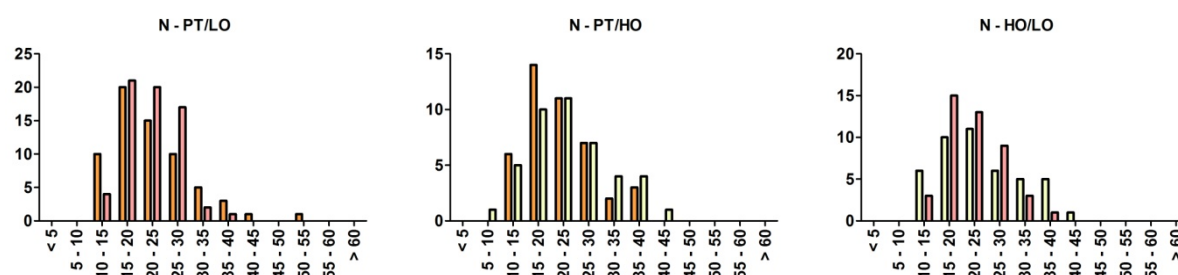


Abbildung 3.18: Vergleich der Halbwertszeiten unter phototrophen und microaeroben (PT/LO), unter phototrophen und aeroben (PT/HO) und unter aeroben und microaeroben Bedingungen (HO/LO) in der funktionellen COG Kategorie N „Zellmotilität, Sekretion“. In diesen Vergleich wurden nur solche Transkripte mit einbezogen, für die unter beiden Bedingungen Halbwertszeiten berechnet wurden. Die Ordinate zeigt die Anzahl an Transkripten, die Abszisse die Halbwertszeiten, aufgeteilt in 5-Minuten Intervalle. Jeder Balken zeigt die Anzahl an Transkripten mit einer Halbwertszeit im jeweiligen Zeitintervall. Die Skalierung der Ordinate ist der jeweiligen Anzahl an Transkripten mit bestimmten Halbwertszeiten pro Vergleich angepasst.

PT/LO: In Kategorie N waren unter beiden Bedingungen keine Transkripte mit Halbwertszeiten unter zehn Minuten vorhanden. Eine Halbwertszeit zwischen zehn und 15 Minuten hatten mehr

Transkripte unter phototrophen Bedingungen. Umgekehrt hatten unter microaeroben Bedingungen mehr Transkripte eine Halbwertszeit zwischen 20 und 30 Minuten. Auch in dieser Kategorie zeigte wieder ein Transkript bei phototrophen Wachstum eine Halbwertszeit zwischen 50 und 55 Minuten.

PT/HO: Beim Vergleich der Halbwertszeiten unter phototrophen und aeroben Bedingungen waren die Unterschiede zwischen den Bedingungen ebenfalls wieder recht gering, nur im Bereich der Halbwertszeiten zwischen 15 und 20 Minuten fiel der Unterschied mit mehr Transkripten aus dem phototrophen Datensatz gegenüber dem aeroben deutlicher aus. Kurzlebiger waren unter beiden Bedingungen zusammengenommen jeweils sechs Transkripte. Tendenziell waren die Transkripte unter aeroben Bedingungen etwas stabiler. Es konnten insgesamt jedoch nur wenige Halbwertszeiten bestimmt werden.

HO/LO: Es konnten ebenfalls insgesamt nur wenige Halbwertszeiten unter beiden Wachstumsbedingungen bestimmt werden, dennoch konnte man leichte Unterschiede beobachten. In den kurzen und langen Halbwertszeitenbereichen waren wieder tendenziell mehr Transkripte aus dem aeroben Datensatz zu verzeichnen, während in den mittleren Zeitintervallen von 15 bis 30 Minuten mehr Transkripte aus dem microaeroben Datensatz vorhanden waren. Die größten Unterschiede zeigten sich zwischen zehn und 15 Minuten und im Intervall zwischen 35 und 40 Minuten.

Tabelle 3-13: Liste der Transkripte in Kategorie N mit den deutlichsten Unterschieden in den Halbwertszeiten unter phototrophen und microaeroben Bedingungen (PT/LO), unter phototrophen und aeroben Bedingungen (PT/HO) und unter microaeroben und aeroben Bedingungen (HO/LO). Dargestellt sind vier Gene, deren Transkripte die deutlichsten Unterschiede in ihren Halbwertszeiten unter den beiden Bedingungen zeigen. Der FC (*fold change*) gibt den Faktor an, mit dem sich die mittlere Halbwertszeit unter einer Bedingung von der unter der anderen unterscheidet (Halbwertszeiten in Minuten).

PT/LO				
Gennummer	Genname/Beschreibung	PT	LO	FC
RSP_1321	<i>fliR</i> , Flagellar biosynthesis pathway, component FlIR	42,8	14,3	3,0
RSP_1316	<i>motA</i> , flagellar motor protein	50,3	18,8	2,7
RSP_2299	<i>atpD</i> , ATP synthase subunit B(EC:3.6.3.14)	15,1	28,9	-1,9
RSP_2229	Chemotaxis multidomain, CheB methylesterase/CheR, Methylase	12,4	25,5	-2,0
PT/HO				
		PT	HO	FC
RSP_2130	two component, sigma54 specific transcriptional regulator, fis family	27,6	6,1	4,5
RSP_0078	<i>flgG</i> , Flagellar distal rod protein	25,4	11,6	2,2
RSP_1587	<i>cheR2</i> , Chemotaxis methyltransferase, CheR2	16,2	35,8	-2,2
RSP_3929	<i>atpD</i> , H ⁺ -transporting two-sector ATPase, alpha/beta subunit	16,9	39,6	-2,4
HO/LO				
		HO	LO	FC
RSP_1325	putative flagellar basal-body P-ring formation protein FlgA	37,7	14,3	2,6
RSP_3929	<i>atpD</i> , H ⁺ -transporting two-sector ATPase, alpha/beta subunit	39,6	18,5	2,1
RSP_3303	<i>mcpG</i> , Putative methyl accepting chemotaxis protein, McpG	16,1	27,1	-1,7
RSP_1302	<i>motB</i> , putative chemotaxis MotB protein	13,0	32,9	-2,5

Kategorie U „Intrazellulärer Transport, Sekretion“:

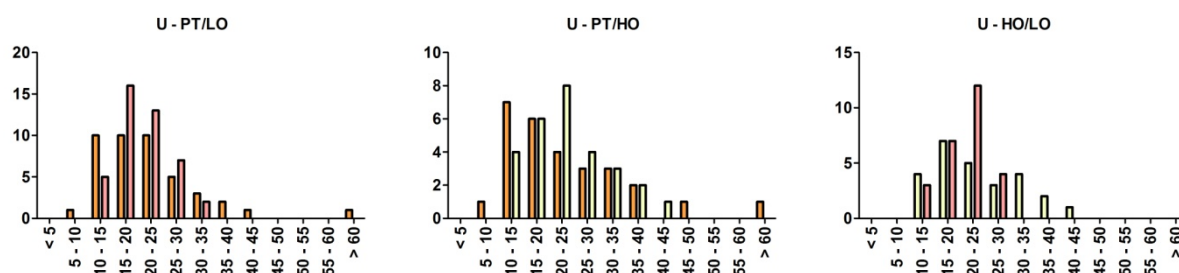


Abbildung 3.19: Vergleich der Halbwertszeiten unter phototrophen und microaeroben (PT/LO), unter phototrophen und aeroben (PT/HO) und unter aeroben und microaeroben Bedingungen (HO/LO) in der funktionellen COG Kategorie U „Intrazellulärer Transport, Sekretion“. In diesen Vergleich wurden nur solche Transkripte mit einbezogen, für die unter beiden Bedingungen Halbwertszeiten berechnet wurden. Die Ordinate zeigt die Anzahl an Transkripten, die Abszisse die Halbwertszeiten, aufgeteilt in 5-Minuten Intervalle. Jeder Balken zeigt die Anzahl an Transkripten mit einer Halbwertszeit im jeweiligen Zeitintervall. Die Skalierung der Ordinate ist der jeweiligen Anzahl an Transkripten mit bestimmten Halbwertszeiten pro Vergleich angepasst.

PT/LO: Beim Vergleich der Halbwertszeiten unter phototrophen und microaeroben Bedingungen fiel in Kategorie U die Verteilung bei phototrophem Wachstum von gleich vielen Transkripten in den drei Intervallen von zehn bis 25 Minuten auf. So zeigten sich in diesen drei Intervallen auch trotz der geringen Anzahl an bestimmten Halbwertszeiten deutliche Unterschiede. Unter phototrophen Bedingungen hatten wieder mehr Transkripte kürzere Halbwertszeiten als unter microaeroben Bedingungen. Allerdings waren auch wieder Transkripte mit langen Halbwertszeiten bei phototrophem Wachstum vorhanden, bei microaerobem hingegen nicht.

PT/HO: Es zeigten sich auf Grund der geringen Anzahl bestimmter Halbwertszeiten nur sehr geringe Unterschiede. Insgesamt gesehen zeigten die Transkripte unter aeroben Bedingungen tendenziell längere Halbwertszeiten. So hatten unter phototrophen Bedingungen etwas mehr Transkripte eine Halbwertszeit im Bereich zwischen fünf und 15 Minuten als unter aeroben Bedingungen. Bei aerobem Wachstum hatten hingegen etwas mehr Transkripte eine Halbwertszeit von 20 bis 25 Minuten als bei phototrophem. Längere Halbwertszeiten von 45 bis 50 bzw. über 60 Minuten zeigten sich unter phototrophen Bedingungen, unter aeroben hingegen nicht.

HO/LO: Ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Bedingungen zeigte sich im Halbwertszeitenbereich zwischen 20 und 25 Minuten. In diesem Bereich lagen unter aeroben Bedingungen mehr als doppelt so viele Transkripte als unter microaeroben. In den kurzlebigeren Bereichen war die Verteilung unter beiden Bedingungen ähnlich. Ein Unterschied zeigte sich aber dementsprechend im langlebigeren Bereich. Deutlich mehr Transkripte aus dem aeroben Datensatz hatten Halbwertszeiten von 25 bis 45 Minuten, unter microaeroben Bedingungen wurden keine längeren Halbwertszeiten als 30 Minuten verzeichnet.

Tabelle 3-14: Liste der Transkripte in Kategorie U mit den deutlichsten Unterschieden in den Halbwertszeiten unter phototrophen und microaeroben Bedingungen (PT/LO), unter phototrophen und aeroben Bedingungen (PT/HO) und unter microaeroben und aeroben Bedingungen (HO/LO). Dargestellt sind vier Gene, deren Transkripte die deutlichsten Unterschiede in ihren Halbwertszeiten unter den beiden Bedingungen zeigen. Der FC (*fold change*) gibt den Faktor an, mit dem sich die mittlere Halbwertszeit unter einer Bedingung von der unter der anderen unterscheidet (Halbwertszeiten in Minuten).

PT/LO				
Gennummer	Genname/Beschreibung	PT	LO	FC
RSP_1321	<i>fliR</i> , Flagellar biosynthesis pathway, component FliR	42,8	14,3	3,0
RSP_1900	hypothetical protein	60,0	20,4	2,9
RSP_1735	<i>secY</i> , preprotein translocase SecY	17,6	31,7	-1,8
RSP_2299	<i>atpD</i> , ATP synthase subunit B	15,1	28,9	-1,9
PT/HO				
		PT	HO	FC
RSP_1901	Hypothetical protein with TPR repeat	46,7	22,7	2,1
RSP_2854	Cation/multidrug efflux pump, Membrane fusion protein (MFP) family	31,4	18,9	1,7
RSP_3929	<i>atpD</i> , H ⁺ -transporting two-sector ATPase, alpha/beta subunit	16,9	39,6	-2,4
RSP_1907	Putative Flp pilus assembly protein ATPase CpaE	9,6	22,7	-2,4
HO/LO				
		HO	LO	FC
RSP_3929	<i>atpD</i> , H ⁺ -transporting two-sector ATPase, alpha/beta subunit	39,6	18,5	2,1
RSP_1900	hypothetical protein	40,0	20,4	2,0
RSP_0400	hypothetical protein	16,5	23,7	-1,4
RSP_3056	TonB dependent-iron siderophore receptor	12,0	19,9	-1,7

Kategorie O „Posttranslationale Modifikation, Protein turnover, Chaperone“:

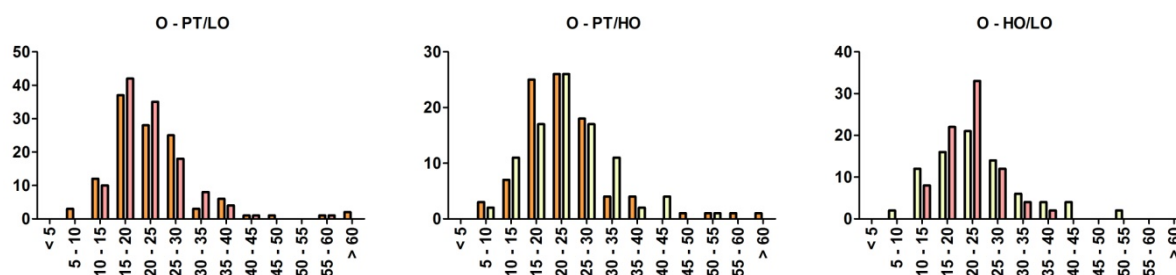


Abbildung 3.20: Vergleich der Halbwertszeiten unter phototrophen und microaeroben (PT/LO), unter phototrophen und aeroben (PT/HO) und unter aeroben und microaeroben Bedingungen (HO/LO) in der funktionellen COG Kategorie O „Posttranslationale Modifikation, Protein turnover, Chaperone“. In diesen Vergleich wurden nur solche Transkripte mit einbezogen, für die unter beiden Bedingungen Halbwertszeiten berechnet wurden. Die Ordinate zeigt die Anzahl an Transkripten, die Abszisse die Halbwertszeiten, aufgeteilt in 5-Minuten Intervalle. Jeder Balken zeigt die Anzahl an Transkripten mit einer Halbwertszeit im jeweiligen Zeitintervall. Die Skalierung der Ordinate ist der jeweiligen Anzahl an Transkripten mit bestimmten Halbwertszeiten pro Vergleich angepasst.

PT/LO: In Kategorie O zeigten sich zwischen phototrophen und microaeroben Bedingungen nur geringe Unterschiede. Unter phototrophen Bedingungen gab es tendenziell etwas mehr Transkripte mit kurzen Halbwertszeiten bis 15 Minuten und ebenfalls etwas mehr Transkripte mit längeren

Halbwertszeiten über 25 Minuten. In den mittellangen Halbwertszeitenbereichen zwischen 15 und 25 Minuten lagen demnach mehr Transkripte aus dem microaeroben Datensatz.

PT/HO: Beim Vergleich der Halbwertszeiten unter phototrophen Bedingungen mit denen unter aeroben zeigten sich hingegen deutlichere Unterschiede. Die deutlichsten Unterschiede traten in den Intervallen 15 bis 20 Minuten und 30 bis 35 Minuten auf. Phototrophe Wachstumsbedingungen führten zu vergleichsweise kürzeren Halbwertszeiten als aerobe. In den kurzen Halbwertszeitenbereichen bis 15 Minuten war dieser Unterschied jedoch nicht auszumachen. Ebenfalls waren die längsten Halbwertszeiten wieder bei phototrophem Wachstum zu verzeichnen.

HO/LO: Hier war zwischen den Bedingungen ein deutlicher Unterschied in der Verteilung der Halbwertszeiten zu beobachten. Es zeigte sich auch hier eine höhere Zahl an Transkripten aus dem aeroben Datensatz in sowohl den kurzen als auch in den langen Halbwertszeiten und dafür mehr Transkripte aus dem microaeroben Datensatz in den mittleren Halbwertszeitenbereichen.

Tabelle 3-15: Liste der Transkripte in Kategorie O mit den deutlichsten Unterschieden in den Halbwertszeiten unter phototrophen und microaeroben Bedingungen (PT/LO), unter phototrophen und aeroben Bedingungen (PT/HO) und unter microaeroben und aeroben Bedingungen (HO/LO). Dargestellt sind vier Gene, deren Transkripte die deutlichsten Unterschiede in ihren Halbwertszeiten unter den beiden Bedingungen zeigen. Der FC (*fold change*) gibt den Faktor an, mit dem sich die mittlere Halbwertszeit unter einer Bedingung von der unter der anderen unterscheidet (Halbwertszeiten in Minuten).

PT/LO				
Genummer	Genname/Beschreibung	PT	LO	FC
RSP_1900	hypothetical protein	60,0	20,4	2,9
RSP_3556	xdhC, xanthine dehydrogenase chaperone/MPT insertion protein	46,9	17,0	2,8
RSP_2895	putative ABC transporter, fused ATPase subunits	13,2	38,5	-2,9
RSP_2157	ABC transporter, inner membrane subunit	16,8	56,8	-3,4
PT/HO				
		PT	HO	FC
RSP_2130	two component, sigma54 specific transcriptional regulator, fis family	27,6	6,1	4,5
RSP_0665	<i>ftsH</i> , FtsH	38,7	10,0	3,9
RSP_0900	FAD-dependent pyridine nucleotide- disulphide oxidoreductase	18,8	42,5	-2,3
RSP_2973	Peroxiredoxin	9,7	26,1	-2,7
HO/LO				
		HO	LO	FC
RSP_1325	putative flagellar basal-body P-ring formation protein FlgA	37,7	14,3	2,6
RSP_2405	ABC cobalamin/Fe3+-siderophore transporter, ATPase subunit	40,8	15,9	2,6
RSP_0303	<i>ureF</i> , Urease accessory protein UreF	10,1	24,1	-2,4
RSP_2895	putative ABC transporter, fused ATPase subunits	8,7	38,5	-4,4

COG Kategorie C „Energiegewinnung und Umwandlung“:

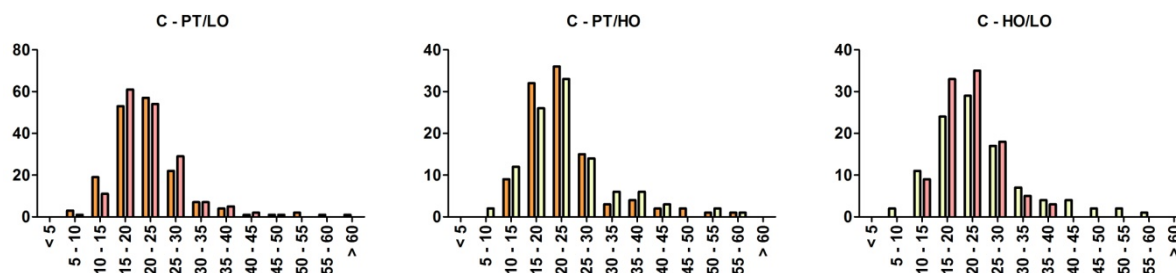


Abbildung 3.21: Vergleich der Halbwertszeiten unter phototrophen und microaeroben (PT/LO), unter phototrophen und aeroben (PT/HO) und unter aeroben und microaeroben Bedingungen (HO/LO) in der funktionellen COG Kategorie C „Energiegewinnung und Umwandlung“. In diesen Vergleich wurden nur solche Transkripte mit einbezogen, für die unter beiden Bedingungen Halbwertszeiten berechnet wurden. Die Ordinate zeigt die Anzahl an Transkripten, die Abszisse die Halbwertszeiten, aufgeteilt in 5-Minuten Intervalle. Jeder Balken zeigt die Anzahl an Transkripten mit einer Halbwertszeit im jeweiligen Zeitintervall. Die Skalierung der Ordinate ist der jeweiligen Anzahl an Transkripten mit bestimmten Halbwertszeiten pro Vergleich angepasst.

PT/LO: In Kategorie C zeigten sich zwischen phototrophen und microaeroben Wachstumsbedingungen keine deutlichen Unterschiede. Wieder waren unter phototrophen Bedingungen mehr Transkripte mit kürzeren Halbwertszeiten bis 15 Minuten zu verzeichnen als unter microaeroben. Die Verteilung in den Zeitintervallen von 15 bis 30 Minuten war unter beiden Bedingungen recht ähnlich. Zwischen 15 und 20 Minuten und zwischen 25 und 30 Minuten waren etwas mehr Transkripte aus dem microaeroben Datensatz zu verzeichnen als aus dem phototrophen. Auch in dieser Kategorie führten wieder phototrophe Wachstumsbedingungen zu sehr stabilen Transkripten mit Halbwertszeiten über 50 Minuten.

PT/HO: Für den Vergleich phototropher Wachstumsbedingungen mit aeroben konnten im Vergleich zu PT/LO insgesamt weniger Halbwertszeiten bestimmt werden, so fielen hier die Unterschiede etwas geringer aus. Stärkere Unterschiede waren in den beiden Intervallen 15 bis 20 Minuten und 20 bis 25 Minuten auszumachen. Phototrophe Bedingungen führten hier jeweils zu etwas mehr Transkripten mit einer solchen Halbwertszeit als aerobe. In den sowohl den kürzeren Bereichen bis 15 Minuten und den längeren über 30 Minuten waren hingegen etwas mehr Transkripte aus dem aeroben Datensatz zu verzeichnen. Unter beiden Bedingungen waren jedoch lange Halbwertszeiten bis 60 Minuten festzustellen.

HO/LO: Auch hier zeigte sich wieder, dass aerobe Bedingungen vergleichsweise zu mehr Transkripten mit kurzen und ebenfalls zu mehr Transkripten mit langen Halbwertszeiten führten. So zeigten sich in den Intervallen von 15 bis 30 Minuten mehr Transkripte aus dem microaeroben Datensatz, während in den kürzeren und längeren Halbwertszeitenbereichen mehr Transkripte aus dem aeroben vorhanden waren. Halbwertszeiten von über 40 Minuten konnten nur bei aeroben Wachstumsbedingungen beobachtet werden.

Tabelle 3-16: Liste der Transkripte in Kategorie C mit den deutlichsten Unterschieden in den Halbwertszeiten unter phototrophen und microaeroben Bedingungen (PT/LO), unter phototrophen und aeroben Bedingungen (PT/HO) und unter microaeroben und aeroben Bedingungen (HO/LO). Dargestellt sind vier Gene, deren Transkripte die deutlichsten Unterschiede in ihren Halbwertszeiten unter den beiden Bedingungen zeigen. Der FC (*fold change*) gibt den Faktor an, mit dem sich die mittlere Halbwertszeit unter einer Bedingung von der unter der anderen unterscheidet (Halbwertszeiten in Minuten).

PT/LO				
Gennummer	Genname/Beschreibung	PT	LO	FC
RSP_3520	ABC peptide transporter, fused ATPase domains	56,1	23,6	2,4
RSP_2525	<i>nuoJ</i> , NADH dehydrogenase subunit J	54,6	23,0	2,4
RSP_2895	putative ABC transporter, fused ATPase subunits	13,2	38,5	-2,9
RSP_0133	Na ⁺ /H ⁺ antiporter, NhaC family	6,5	20,0	-3,1
PT/HO				
		PT	HO	FC
RSP_2138	<i>fumC</i> , Fumarate lyase	35,3	19,2	1,8
RSP_0103	<i>nuoE</i> , ATP synthase subunit E	26,8	15,0	1,8
RSP_0900	FAD-dependent pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase	18,8	42,5	-2,3
RSP_3929	<i>atpD</i> , H ⁺ -transporting two-sector ATPase, alpha/beta subunit	16,9	39,6	-2,4
HO/LO				
		HO	LO	FC
RSP_2405	ABC cobalamin/Fe ³⁺ -siderophore transporter, ATPase subunit	40,8	15,9	2,6
RSP_2525	<i>nuoJ</i> , NADH dehydrogenase subunit J	56,4	23,0	2,4
RSP_0976	<i>sdhA</i> , succinate dehydrogenase	7,9	21,1	-2,7
RSP_2895	putative ABC transporter, fused ATPase subunits	8,7	38,5	-4,4

Kategorie G „Kohlenhydrattransport und –Metabolismus“:

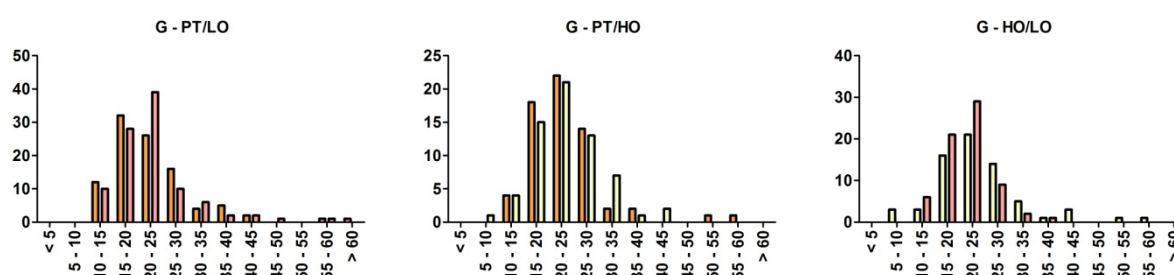


Abbildung 3.22: Vergleich der Halbwertszeiten unter phototrophen und microaeroben (PT/LO), unter phototrophen und aeroben (PT/HO) und unter aeroben und microaeroben Bedingungen (HO/LO) in der funktionellen COG Kategorie G „Kohlenhydrattransport und –Metabolismus“. In diesen Vergleich wurden nur solche Transkripte mit einbezogen, für die unter beiden Bedingungen Halbwertszeiten berechnet wurden. Die Ordinate zeigt die Anzahl an Transkripten, die Abszisse die Halbwertszeiten, aufgeteilt in 5-Minuten Intervalle. Jeder Balken zeigt die Anzahl an Transkripten mit einer Halbwertszeit im jeweiligen Zeitintervall. Die Skalierung der Ordinate ist der jeweiligen Anzahl an Transkripten mit bestimmten Halbwertszeiten pro Vergleich angepasst.

PT/LO: In Kategorie G zeigte sich der deutlichste Unterschied zwischen phototrophen und microaeroben Bedingungen bei den Halbwertszeiten zwischen 20 und 25 Minuten. Hier waren im microaeroben Datensatz mehr Transkripte zu verzeichnen als im phototrophen. Größtenteils waren

in den anderen Zeitintervallen jedoch mehr Transkripte aus dem phototrophen Datensatz vorhanden als aus dem microaeroben. In den langlebigeren Halbwertszeitenbereichen war die Verteilung wieder recht ähnlich. Sehr langlebige Transkripte waren unter beiden Bedingungen vorhanden.

PT/HO: Unter aeroben Bedingungen hatten die Transkripte im Vergleich zu phototrophen Wachstum tendenziell längere Halbwertszeiten. Leichte Unterschiede zeigten sich bei diesem Vergleich im von Intervall 15 bis 20 Minuten, hier waren etwas mehr Transkripte aus dem phototrophen Datensatz vorhanden, und im Intervall von 30 bis 35 Minuten, in dem mehr Transkripte aus dem aeroben Datensatz vorlagen. Zwei Transkripte zeigten bei phototrophen Wachstum wieder Halbwertszeiten zwischen 50 und 60 Minuten.

HO/LO: Es zeigte sich unter aeroben Bedingungen wieder eine größere Bandbreite an Halbwertszeiten von fünf bis über 60 Minuten, während die Transkripte unter microaeroben Bedingungen lediglich Halbwertszeiten zwischen zehn und 40 Minuten aufzeigten. Dementsprechend hatten bei microaerober Kultivierung mehr Transkripte Halbwertszeiten im mittleren Bereich zwischen 10 und 25 Minuten.

Tabelle 3-17: Liste der Transkripte in Kategorie G mit den deutlichsten Unterschieden in den Halbwertszeiten unter phototrophen und microaeroben Bedingungen (PT/LO), unter phototrophen und aeroben Bedingungen (PT/HO) und unter microaeroben und aeroben Bedingungen (HO/LO). Dargestellt sind vier Gene, deren Transkripte die deutlichsten Unterschiede in ihren Halbwertszeiten unter den beiden Bedingungen zeigen. Der FC (*fold change*) gibt den Faktor an, mit dem sich die mittlere Halbwertszeit unter einer Bedingung von der unter der anderen unterscheidet (Halbwertszeiten in Minuten).

PT/LO				
Gennummer	Genname/Beschreibung	PT	LO	FC
RSP_3288	<i>ugpE</i> , ABC glycerol-3-phosphate transporter, inner membrane subunit UgpE	35,2	13,0	2,7
RSP_3520	ABC peptide transporter, fused ATPase domains	56,1	23,6	2,4
RSP_2895	putative ABC transporter, fused ATPase subunits	13,2	38,5	-2,9
RSP_2157	ABC transporter, inner membrane subunit	16,8	56,8	-3,4
PT/HO				
		PT	HO	FC
RSP_3336	ABC spermidine/putrescine transporter, inner membrane subunit	52,0	23,8	2,2
RSP_2274	ABC branched amino acid transporter family, ATPase subunit	35,9	20,3	1,8
RSP_3274	ABC multidrug/carbohydrate efflux transporter, ATPase subunit	16,0	28,4	-1,8
RSP_3568	<i>znuC</i> , ABC zinc transporter, ATPase subunit ZnuC	14,6	29,0	-2,0
HO/LO				
		HO	LO	FC
RSP_3732	ABC sugar transporter, periplasmic binding protein	40,1	13,5	3,0
RSP_2405	ABC cobalamin/Fe ³⁺ -siderophore transporter, ATPase subunit	40,8	15,9	2,6
RSP_0343	putative ABC sugar transporter, inner membrane subunit	8,0	19,6	-2,4
RSP_2895	putative ABC transporter, fused ATPase subunits	8,7	38,5	-4,4

COG Kategorie E „Aminosäuretransport und –Metabolismus“:

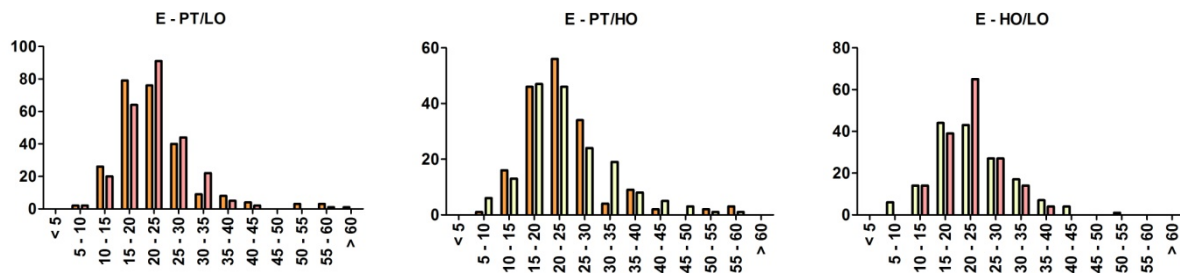


Abbildung 3.23: Vergleich der Halbwertszeiten unter phototrophen und microaeroben (PT/LO), unter phototrophen und aeroben (PT/HO) und unter aeroben und microaeroben Bedingungen (HO/LO) in der funktionellen COG Kategorie E „Aminosäuretransport und –Metabolismus“. In diesen Vergleich wurden nur solche Transkripte mit einbezogen, für die unter beiden Bedingungen Halbwertszeiten berechnet wurden. Die Ordinate zeigt die Anzahl an Transkripten, die Abszisse die Halbwertszeiten, aufgeteilt in 5-Minuten Intervalle. Jeder Balken zeigt die Anzahl an Transkripten mit einer Halbwertszeit im jeweiligen Zeitintervall. Die Skalierung der Ordinate ist der jeweiligen Anzahl an Transkripten mit bestimmten Halbwertszeiten pro Vergleich angepasst.

PT/LO: In Kategorie E traten die deutlichsten Unterschiede wieder in den Bereichen zwischen 15 und 25 Minuten und zwischen 30 und 35 Minuten auf. Unter phototrophen Bedingungen hatten mehr Transkripte eine Halbwertszeit von 15 bis 20 Minuten, unter microaeroben Bedingungen waren es etwas weniger. Im Bereich zwischen 20 und 25 Minuten waren die Verhältnisse umgekehrt. Halbwertszeiten zwischen 30 und 35 Minuten hatten ebenfalls mehr Transkripte unter microaeroben Bedingungen. Längere Halbwertszeiten waren auch hier wieder tendenziell eher unter phototrophen Bedingungen zu beobachten.

PT/HO: Der deutlichste Unterschied zwischen phototrophen und aeroben Wachstumsbedingungen zeigte sich bei den Transkripten mit Halbwertszeiten zwischen 30 und 35 Minuten, hier führten aerobe Bedingungen zu mehr Transkripten in diesem Halbwertszeitenbereich. Kürzere Halbwertszeiten hatten tendenziell mehr Transkripte aus dem phototrophen Datensatz, allerdings führte aerobe Kultivierung bei diesem Vergleich bei mehr Transkripten zu kurzen Halbwertszeiten bis 15 Minuten. In den langlebigen Bereichen über 35 Minuten war die Verteilung relativ inhomogen, jedoch führten beide Wachstumsbedingungen zu stabilen Transkripten mit hohen Halbwertszeiten bis 60 Minuten.

HO/LO: Insgesamt fielen die Unterschiede in den Intervallen recht gering aus. Allerdings führte auch in dieser Kategorie eine aerobe Kultivierung wieder zu einer größeren Bandbreite an Halbwertszeiten als microaerobe Bedingungen. Dadurch zeigten sich die deutlichsten Unterschiede sowohl im kurz- und im langlebigen Bereich, wo mehr Transkripte aus dem aeroben Datensatz vorhanden waren, als auch im mittleren Bereich zwischen 20 und 30 Minuten, wo sich demzufolge mehr Transkripte aus dem microaeroben Datensatz zeigten.

Tabelle 3-18: Liste der Transkripte in Kategorie E mit den deutlichsten Unterschieden in den Halbwertszeiten unter phototrophen und microaeroben Bedingungen (PT/LO), unter phototrophen und aeroben Bedingungen (PT/HO) und unter microaeroben und aeroben Bedingungen (HO/LO). Dargestellt sind vier Gene, deren Transkripte die deutlichsten Unterschiede in ihren Halbwertszeiten unter den beiden Bedingungen zeigen. Der FC (*fold change*) gibt den Faktor an, mit dem sich die mittlere Halbwertszeit unter einer Bedingung von der unter der anderen unterscheidet (Halbwertszeiten in Minuten).

PT/LO				
Gennummer	Genname/Beschreibung	PT	LO	FC
RSP_3053	Possible dioxygenase/glyoxalase family protein <i>ugpE</i> , ABC glycerol-3-phosphate transporter, inner membrane subunit	55,0	20,3	2,7
RSP_3288	UgpE ABC transporter, inner membrane	35,2	13,0	2,7
RSP_2157	subunit	16,8	56,8	-3,4
RSP_3054	hypothetical protein	8,1	28,3	-3,5
PT/HO				
		PT	HO	FC
RSP_2130	two component, sigma54 specific transcriptional regulator, fis family	27,6	6,1	4,5
RSP_3053	Possible dioxygenase/glyoxalase family protein	55,0	19,7	2,8
RSP_4211	<i>gapA-1</i> , Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, type I	25,3	59,8	-2,4
RSP_0823	SHMT, serine hydroxymethyltransferase protein	17,1	42,1	-2,5
HO/LO				
		HO	LO	FC
RSP_1665	putative RhtB family transporter	38,1	13,5	2,8
RSP_2405	ABC cobalamin/Fe ³⁺ -siderophore transporter, ATPase subunit	40,8	15,9	2,6
RSP_0008	possible transporter, DME family, DMT superfamily	8,2	23,5	-2,9
RSP_2895	putative ABC transporter, fused ATPase subunits	8,7	38,5	-4,4

Kategorie F „Nukleotidtransport und –Metabolismus“:

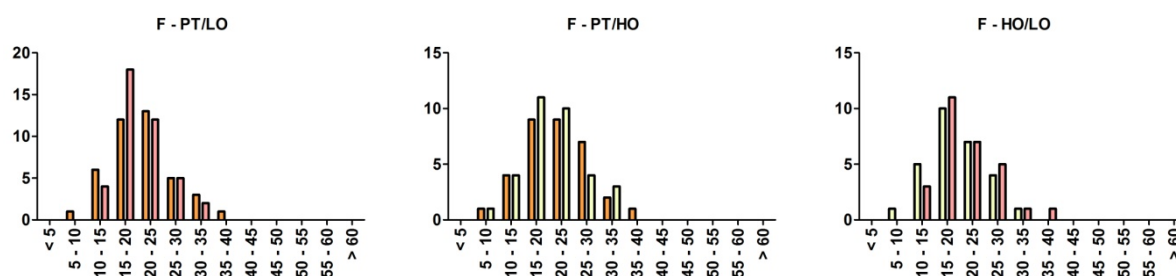


Abbildung 3.24: Vergleich der Halbwertszeiten unter phototropen und microaeroben (PT/LO), unter phototropen und aeroben (PT/HO) und unter aeroben und microaeroben Bedingungen (HO/LO) in der funktionellen COG Kategorie F „Nukleotidtransport und –Metabolismus“. In diesen Vergleich wurden nur solche Transkripte mit einbezogen, für die unter beiden Bedingungen Halbwertszeiten berechnet wurden. Die Ordinate zeigt die Anzahl an Transkripten, die Abszisse die Halbwertszeiten, aufgeteilt in 5-Minuten Intervalle. Jeder Balken zeigt die Anzahl an Transkripten mit einer Halbwertszeit im jeweiligen Zeitintervall. Die Skalierung der Ordinate ist der jeweiligen Anzahl an Transkripten mit bestimmten Halbwertszeiten pro Vergleich angepasst.

In Kategorie F konnte unter allen Bedingungen nur eine relativ geringe Zahl an Halbwertszeiten bestimmt werden, sodass die Unterschiede zwischen den Bedingungen ebenfalls nur gering ausfielen. Auffällig war, dass keine Bedingungen zu einer längeren Halbwertszeit als zwischen 35 und 40 Minuten führte.

PT/LO: Der deutlichste Unterschied zeigte sich im Halbwertszeitenbereich von 15 bis 20 Minuten. Halbwertszeiten in diesem Bereich hatten mehr Transkripte bei microaeroben Wachstumsbedingungen. Phototrophe Bedingungen führten tendenziell zu etwas kürzeren Halbwertszeiten.

PT/HO: Die Unterschiede in dieser Kategorie waren bei diesem Vergleich nur sehr gering. Im Vergleich führten phototrophe Bedingungen zu eher etwas längeren Halbwertszeiten.

HO/LO: Es ließ sich eine leichte Tendenz hin zu längeren Halbwertszeiten unter microaeroben Bedingungen feststellen. So zeigten etwas Transkripte aus dem aeroben Datensatz Halbwertszeiten im Bereich von fünf bis 15 Minuten, währende in den mittleren Bereichen in etwa gleich viele Transkripte und im höheren Halbwertszeitenbereich etwas mehr Transkripte aus dem microaeroben Datensatz festzustellen waren.

Tabelle 3-19: Liste der Transkripte in Kategorie F mit den deutlichsten Unterschieden in den Halbwertszeiten unter phototrophen und microaeroben Bedingungen (PT/LO), unter phototrophen und aeroben Bedingungen (PT/HO) und unter microaeroben und aeroben Bedingungen (HO/LO). Dargestellt sind vier Gene, deren Transkripte die deutlichsten Unterschiede in ihren Halbwertszeiten unter den beiden Bedingungen zeigen. Der FC (*fold change*) gibt den Faktor an, mit dem sich die mittlere Halbwertszeit unter einer Bedingung von der unter der anderen unterscheidet (Halbwertszeiten in Minuten).

PT/LO				
Gennummer	Genname/Beschreibung	PT	LO	FC
RSP_1736	<i>adk</i> , Adenylate kinase	33,5	18,1	1,9
RSP_2138	<i>fumC</i> , Fumarate lyase	35,3	19,6	1,8
RSP_2245	<i>hisH</i> , imidazole glycerol phosphate synthase subunit HisH	14,2	26,1	-1,8
RSP_0276	Isopentenyl-diphosphate delta-isomerase	13,3	34,9	-2,6
PT/HO				
		PT	HO	FC
RSP_1002	<i>pyrB</i> , aspartate carbamoyltransferase catalytic subunit	28,7	13,3	2,2
RSP_2894	<i>ndk</i> , Nucleoside diphosphate kinase	24,2	13,1	1,8
RSP_0663	Formate-tetrahydrofolate ligase	15,9	27,2	-1,7
RSP_1743	ATPase, AAA family	8,6	15,9	-1,8
HO/LO				
		HO	LO	FC
RSP_0578	Adenylate kinase	22,1	12,1	1,8
RSP_0709	<i>cpdB</i> , 2',3'-cyclic-nucleotide 2'-phosphodiesterase	28,4	15,8	1,8
RSP_1002	<i>pyrB</i> , aspartate carbamoyltransferase catalytic subunit	13,3	26,3	-2,0
RSP_2301	<i>prsA</i> , Phosphoribosyl pyrophosphate synthetase	12,4	28,8	-2,3

Kategorie H „Coenzymmetabolismus“:

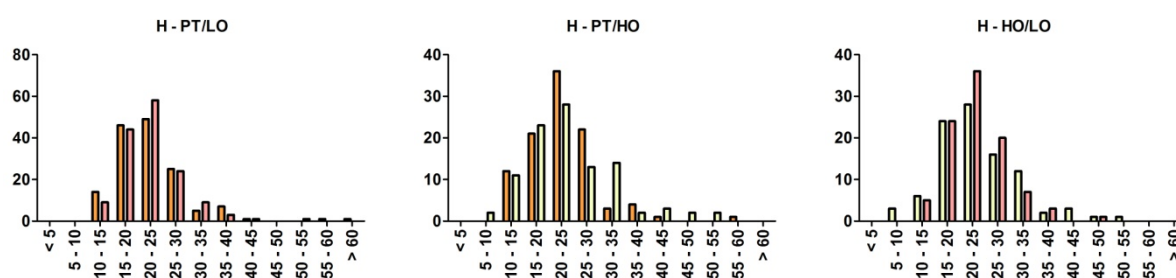


Abbildung 3.25: Vergleich der Halbwertszeiten unter phototrophen und microaeroben (PT/LO), unter phototrophen und aeroben (PT/HO) und unter aeroben und microaeroben Bedingungen (HO/LO) in der funktionellen COG Kategorie H „Coenzymmetabolismus“. In diesen Vergleich wurden nur solche Transkripte mit einbezogen, für die unter beiden Bedingungen Halbwertszeiten berechnet wurden. Die Ordinate zeigt die Anzahl an Transkripten, die Abszisse die Halbwertszeiten, aufgeteilt in 5-Minuten Intervalle. Jeder Balken zeigt die Anzahl an Transkripten mit einer Halbwertszeit im jeweiligen Zeitintervall. Die Skalierung der Ordinate ist der jeweiligen Anzahl an Transkripten mit bestimmten Halbwertszeiten pro Vergleich angepasst.

PT/LO: Unter beiden Wachstumsbedingungen gab es in Kategorie H keine Transkripte mit kürzeren Halbwertszeiten als zehn Minuten. Die Unterschiede waren zwischen den Wachstumsbedingungen recht gering. Etwas mehr Transkripte hatten unter phototrophen Bedingungen Halbwertszeiten

zwischen zehn und 20 Minuten als unter microaeroben Bedingungen. Lediglich im Bereich von 20 bis 25 Minuten war der Unterschied etwas größer. Hier waren unter phototrophen Bedingungen weniger Transkripte als unter microaeroben Bedingungen.

PT/HO: Aerobes Wachstum führte verglichen mit phototrophem zu stabileren Transkripten. In den Halbwertszeitenbereichen bis 20 Minuten war die Anzahl an Transkripten unter beiden Bedingungen recht ähnlich. Deutliche Unterschiede zeigten sich dann aber in den drei Intervallen von 20 bis 35 Minuten. Unter phototrophen Bedingungen hatten mehr Transkripte Halbwertszeiten zwischen 20 und 30 Minuten, während aerobe Bedingungen zu mehr Transkripten mit Halbwertszeiten zwischen 30 und 35 Minuten führten.

HO/LO: Auch in dieser Kategorie wiederholte sich das Bild, dass in den kürzeren als auch in den längeren Halbwertszeitenbereichen mehr Transkripte aus dem aeroben Datensatz vorhanden waren. Die größten Unterschiede zwischen den beiden Bedingungen zeigten sich in den Bereichen zwischen 20 und 25 Minuten, sowie im Bereich zwischen 30 und 35 Minuten. Hier waren mehr Transkripte aus dem microaeroben Datensatz vorhanden. Im kurzlebigen und im langlebigen Bereich waren folglich mehr Transkripte aus dem aeroben Datensatz zu verzeichnen.

Tabelle 3-20: Liste der Transkripte in Kategorie H mit den deutlichsten Unterschieden in den Halbwertszeiten unter phototrophen und microaeroben Bedingungen (PT/LO), unter phototrophen und aeroben Bedingungen (PT/HO) und unter microaeroben und aeroben Bedingungen (HO/LO). Dargestellt sind vier Gene, deren Transkripte die deutlichsten Unterschiede in ihren Halbwertszeiten unter den beiden Bedingungen zeigen. Der FC (*fold change*) gibt den Faktor an, mit dem sich die mittlere Halbwertszeit unter einer Bedingung von der unter der anderen unterscheidet (Halbwertszeiten in Minuten).

PT/LO				
Gennummer	Genname/Beschreibung	PT	LO	FC
RSP_3520	ABC peptide transporter, fused ATPase domains	56,1	23,6	2,4
RSP_2696	ABC transporter, fused ATPase and inner membrane subunits	21,6	10,1	2,1
RSP_0094	<i>smoK</i> , ABC sorbitol/mannitol transporter, ATPase subunit	17,1	43,1	-2,5
RSP_2895	putative ABC transporter, fused ATPase subunits	13,2	38,5	-2,9
PT/HO				
		PT	HO	FC
RSP_1072	<i>moaD</i> , putative molybdopterin MPT converting factor, subunit 1 protein	23,1	9,3	2,5
RSP_2274	ABC branched amino acid transporter family, ATPase subunit	35,9	20,3	1,8
RSP_1599	AMP-binding protein	25,9	49,4	-1,9
RSP_3568	<i>znuC</i> , ABC zinc transporter, ATPase subunit ZnuC	14,6	29,0	-2,0
HO/LO				
		HO	LO	FC
RSP_1041	malonyl-CoA synthase	47,8	15,4	3,1
RSP_2405	ABC cobalamin/Fe ³⁺ -siderophore transporter, ATPase subunit	40,8	15,9	2,6
RSP_0976	<i>sdhA</i> , succinate dehydrogenase	7,9	21,1	-2,7
RSP_2895	putative ABC transporter, fused ATPase subunits	8,7	38,5	-4,4

Kategorie I „Fettsäurestoffwechsel“:

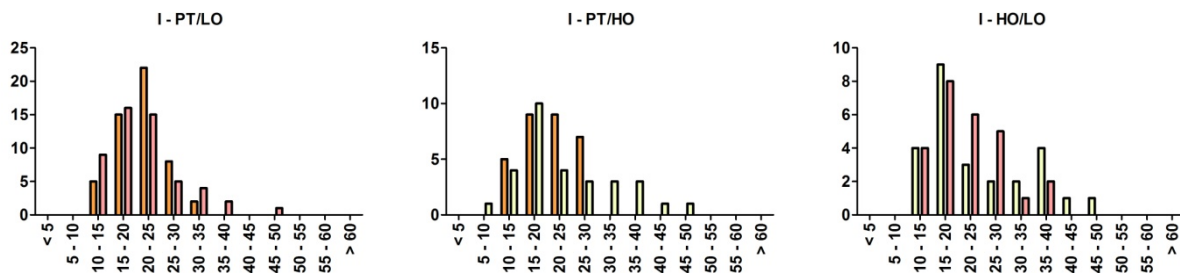


Abbildung 3.26: Vergleich der Halbwertszeiten unter phototrophen und microaeroben (PT/LO), unter phototrophen und aeroben (PT/HO) und unter aeroben und microaeroben Bedingungen (HO/LO) in der funktionellen COG Kategorie I „Fettsäurestoffwechsel“. In diesen Vergleich wurden nur solche Transkripte mit einbezogen, für die unter beiden Bedingungen Halbwertszeiten berechnet wurden. Die Ordinate zeigt die Anzahl an Transkripten, die Abszisse die Halbwertszeiten, aufgeteilt in 5-Minuten Intervalle. Jeder Balken zeigt die Anzahl an Transkripten mit einer Halbwertszeit im jeweiligen Zeitintervall. Die Skalierung der Ordinate ist der jeweiligen Anzahl an Transkripten mit bestimmten Halbwertszeiten pro Vergleich angepasst.

PT/LO: In Kategorie I hatten unter phototrophen Bedingungen mehr Transkripte eine Halbwertszeit zwischen 20 und 25 Minuten als unter microaeroben Bedingungen. Transkripte mit kürzeren Halbwertszeiten zwischen zehn und 20 Minuten waren mehr im microaeroben Datensatz zu verzeichnen gewesen als im phototrophen. Im Gegensatz zu den zuvor geschilderten Kategorien führten hier microaerobe Bedingungen zu stabileren Transkripten mit Halbwertszeiten über 50 Minuten.

PT/HO: Zwar lagen unter beiden Bedingungen nicht für sehr viele Transkripte Halbwertszeiten vor, jedoch zeigten sich eindeutige Unterschiede. In den Halbwertszeitenbereichen bis 20 Minuten waren die Unterschiede der Zahlen an Transkripten in den Zeitintervallen zwischen den Bedingungen noch relativ gering, in den beiden Intervallen 20 bis 25 und 25 bis 30 Minuten waren unter phototrophen Bedingungen mehr Transkripte mit diesen Halbwertszeiten zu verzeichnen. Sehr auffällig war in dieser Kategorie dann die Tatsache, dass unter phototrophen Bedingungen keine Transkripte bei diesem Vergleich Halbwertszeiten über 30 Minuten hatten. Somit zeigten die Transkripte in dieser Kategorie unter aeroben Bedingungen längere Halbwertszeiten als unter phototrophen Bedingungen.

HO/LO: Auch bei diesem Vergleich konnten nur sehr wenige Halbwertszeiten bestimmt werden. Es zeigten sich dennoch leichte Unterschiede. Zu bemerken war zunächst, dass es unter beiden Bedingungen keine Halbwertszeiten kürzer als 15 Minuten gab. Die größten Unterschiede in dieser Kategorie zeigten sich zwischen 20 und 30 Minuten, hier waren unter microaeroben Bedingungen mehr als doppelt so viele Transkripte zu verzeichnen wie bei aerobem Wachstum. Unter aeroben Bedingungen hingegen hatten mehr Transkripte eine lange Halbwertszeit von 30 bis 50 Minuten.

Tabelle 3-21: Liste der Transkripte in Kategorie I mit den deutlichsten Unterschieden in den Halbwertszeiten unter phototrophen und microaeroben Bedingungen (PT/LO), unter phototrophen und aeroben Bedingungen (PT/HO) und unter microaeroben und aeroben Bedingungen (HO/LO). Dargestellt sind vier Gene, deren Transkripte die deutlichsten Unterschiede in ihren Halbwertszeiten unter den beiden Bedingungen zeigen. Der FC (*fold change*) gibt den Faktor an, mit dem sich die mittlere Halbwertszeit unter einer Bedingung von der unter der anderen unterscheidet (Halbwertszeiten in Minuten).

PT/LO				
Gennummer	Genname/Beschreibung	PT	LO	FC
RSP_0742	probable acyl-CoA dehydrogenase	28,4	13,7	2,1
RSP_2199	putative acyl-CoA dehydrogenase	19,9	10,0	2,0
RSP_2692	acyltransferase domain (LPS)	20,3	48,4	-2,4
RSP_0276	Isopentenyl-diphosphate delta-isomerase	13,3	34,9	-2,6
PT/HO				
		PT	HO	FC
RSP_0025	probable NAD(P)-dependent oxidoreductase	19,5	8,7	2,2
RSP_0720	<i>pssA</i> , CDP-alcohol phosphatidyltransferase	23,9	15,3	1,6
RSP_0289	<i>bchM</i> , Mg-protoporphyrin IX methyl transferase	28,4	43,8	-1,5
RSP_1599	AMP-binding protein	25,9	49,4	-1,9
HO/LO				
		HO	LO	FC
RSP_1041	malonyl-CoA synthase	47,8	15,4	3,1
RSP_3827	Phospholipid/glycerol acyltransferase	37,8	18,7	2,0
RSP_0961	<i>MeaA</i> , similar to methylmalonyl-CoA mutase	22,1	35,5	-1,6
RSP_3283	myo-inositol 2-dehydrogenase	17,4	38,6	-2,2

Kategorie P „Transport anorganischer Ionen und -Metabolismus“:

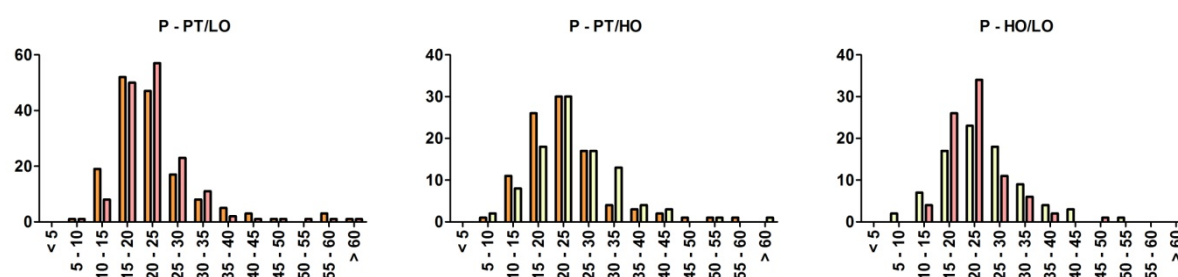


Abbildung 3.27: Vergleich der Halbwertszeiten unter phototrophen und microaeroben (PT/LO), unter phototrophen und aeroben (PT/HO) und unter aeroben und microaeroben Bedingungen (HO/LO) in der funktionellen COG Kategorie P „Transport anorganischer Ionen und -Metabolismus“. In diesen Vergleich wurden nur solche Transkripte mit einbezogen, für die unter beiden Bedingungen Halbwertszeiten berechnet wurden. Die Ordinate zeigt die Anzahl an Transkripten, die Abszisse die Halbwertszeiten, aufgeteilt in 5-Minuten Intervalle. Jeder Balken zeigt die Anzahl an Transkripten mit einer Halbwertszeit im jeweiligen Zeitintervall. Die Skalierung der Ordinate ist der jeweiligen Anzahl an Transkripten mit bestimmten Halbwertszeiten pro Vergleich angepasst.

PT/LO: In Kategorie P zeigten sich die deutlichsten Unterschiede zwischen den beiden Wachstumsbedingungen bei den Transkripten mit Halbwertszeiten zwischen zehn und 15 Minuten und zwischen 20 und 30 Minuten. In ersterem Zeitintervall waren mehr Transkripte aus dem phototrophen Datensatz vertreten als aus dem microaeroben. In letzteren Zeitintervallen war dieses

Verhältnis wieder umgekehrt. Transkripte mit hohen Halbwertszeiten waren unter beiden Bedingungen zu verzeichnen.

PT/HO: Aerobe Wachstumsbedingungen führten im Vergleich zu längeren Halbwertszeiten. Unterschiede zeigten sich bei den Transkripten mit Halbwertszeiten von 15 bis 20 Minuten und bei denen im Bereich von 30 bis 35 Minuten. In ersterem Intervall hatten unter phototrophen Bedingungen mehr Transkripte eine solche Halbwertszeit als unter aeroben Bedingungen. Umgekehrt zeigten mehr Transkripte unter aeroben Bedingungen eine Halbwertszeit von 30 bis 35 Minuten. Der Anteil an stabilen Transkripten mit langen Halbwertszeiten war unter beiden Bedingungen ähnlich.

HO/LO: Bei diesem Vergleich zeigten sich deutlichere Unterschiede. Hier waren in den kurzen Bereichen bis 15 Minuten mehr Transkripte aus dem aeroben Datensatz zu verzeichnen. In den mittleren Halbwertszeitenbereichen von 15 bis 25 Minuten waren unter microaeroben Bedingungen jedoch deutlich mehr Transkripte vorhanden. In den längeren Bereichen waren dann wiederum mehr aus dem aeroben Datensatz.

Tabelle 3-22: Liste der Transkripte in Kategorie P mit den deutlichsten Unterschieden in den Halbwertszeiten unter phototrophen und microaeroben Bedingungen (PT/LO), unter phototrophen und aeroben Bedingungen (PT/HO) und unter microaeroben und aeroben Bedingungen (HO/LO). Dargestellt sind vier Gene, deren Transkripte die deutlichsten Unterschiede in ihren Halbwertszeiten unter den beiden Bedingungen zeigen. Der FC (*fold change*) gibt den Faktor an, mit dem sich die mittlere Halbwertszeit unter einer Bedingung von der unter der anderen unterscheidet (Halbwertszeiten in Minuten).

PT/LO				
Gennummer	Genname/Beschreibung	PT	LO	FC
RSP_2693	Superoxide dismutase, Fe-Mn family	57,5	20,4	2,8
RSP_3288	<i>ugpE</i> , ABC glycerol-3-phosphate transporter, inner membrane subunit UgpE	35,2	13,0	2,7
RSP_2895	putative ABC transporter, fused ATPase subunits	13,2	38,5	-2,9
RSP_2157	ABC transporter, inner membrane subunit	16,8	56,8	-3,4
PT/HO				
		PT	HO	FC
RSP_3567	<i>znuB</i> , ABC zinc transporter, inner membrane subunit ZnuB	48,7	18,3	2,7
RSP_3891	ABC di/oligopeptide transporter, inner membrane subunit	16,4	6,4	2,6
RSP_1546	<i>bfr</i> , Bacterioferritin	20,7	60,0	-2,9
RSP_4190	Heme oxygenase	7,7	22,6	-2,9
HO/LO				
		HO	LO	FC
RSP_2405	ABC cobalamin/Fe ³⁺ -siderophore transporter, ATPase subunit	40,8	15,9	2,6
RSP_2696	ABC transporter, fused ATPase and inner membrane subunits	23,5	10,1	2,3
RSP_3698	<i>cysT</i> , ABC sulfate/thiosulfate transporter, inner membrane subunit CysT	15,3	33,8	-2,2
RSP_2895	putative ABC transporter, fused ATPase subunits	8,7	38,5	-4,4

Kategorie Q „Biosynthese von Sekundärmetaboliten, Transport und Katabolismus“:

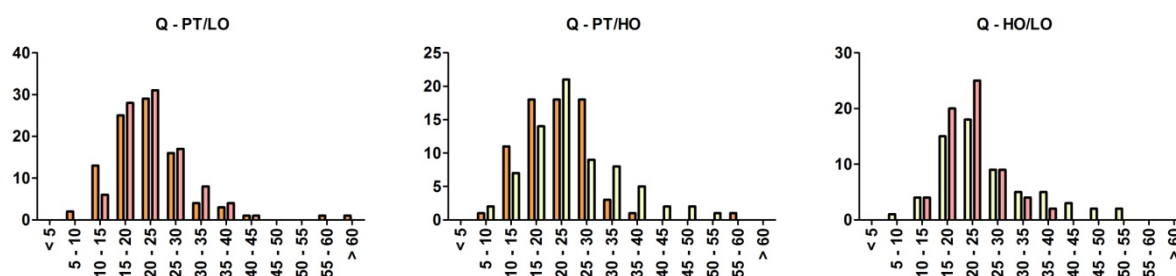


Abbildung 3.28: Vergleich der Halbwertszeiten unter phototrophen und microaeroben (PT/LO), unter phototrophen und aeroben (PT/HO) und unter aeroben und microaeroben Bedingungen (HO/LO) in der funktionellen COG Kategorie Q „Biosynthese von Sekundärmetaboliten, Transport und Katabolismus“. In diesen Vergleich wurden nur solche Transkripte mit einbezogen, für die unter beiden Bedingungen Halbwertszeiten berechnet wurden. Die Ordinate zeigt die Anzahl an Transkripten, die Abszisse die Halbwertszeiten, aufgeteilt in 5-Minuten Intervalle. Jeder Balken zeigt die Anzahl an Transkripten mit einer Halbwertszeit im jeweiligen Zeitintervall. Die Skalierung der Ordinate ist der jeweiligen Anzahl an Transkripten mit bestimmten Halbwertszeiten pro Vergleich angepasst.

PT/LO: In Kategorie Q waren die Unterschiede in der Verteilung der Halbwertszeiten verglichen unter den beiden Bedingungen recht gering. Der größte Unterschied zeigte sich hier im Bereich zwischen zehn und 15 Minuten. Hier waren mehr Transkripte im phototrophen Datensatz vertreten als im microaeroben. Auch in dieser Kategorie führten phototrophe Wachstumsbedingungen wieder zu zwei Transkripten mit sehr hohen Halbwertszeiten über 55 Minuten.

PT/HO: Im Gegensatz zum PT/LO Vergleich zeigten sich hier relativ deutliche Unterschiede. Phototrophe Bedingungen führten zu vergleichsweise mehr Transkripten mit Halbwertszeiten zwischen zehn und 20 Minuten und ebenfalls zu mehr mit längeren Halbwertszeiten zwischen 25 und 30 Minuten. Im Intervall dazwischen lagen etwas mehr Transkripte aus dem aeroben Datensatz. Unter aeroben Bedingungen hatten dann auffallend mehr Transkripte eine lange Halbwertszeit von 30 bis 60 Minuten.

HO/LO: Hier zeigte sich tendenziell wieder das bisher für diesen Vergleich mehrmals beobachtete Schema in der Verteilung der Halbwertszeiten, dass es unter aeroben Bedingungen vergleichsweise zu etwas mehr Transkripten mit kurzen als auch zu mehr Transkripten mit langen Halbwertszeiten kommt und microaerobe Bedingungen zu mehr Transkripten mit mittellangen Halbwertszeiten führen.

Tabelle 3-23: Liste der Transkripte in Kategorie Q mit den deutlichsten Unterschieden in den Halbwertszeiten unter phototrophen und microaeroben Bedingungen (PT/LO), unter phototrophen und aeroben Bedingungen (PT/HO) und unter microaeroben und aeroben Bedingungen (HO/LO). Dargestellt sind vier Gene, deren Transkripte die deutlichsten Unterschiede in ihren Halbwertszeiten unter den beiden Bedingungen zeigen. Der FC (*fold change*) gibt den Faktor an, mit dem sich die mittlere Halbwertszeit unter einer Bedingung von der unter der anderen unterscheidet (Halbwertszeiten in Minuten).

PT/LO				
Gennummer	Genname/Beschreibung	PT	LO	FC
RSP_3520	ABC peptide transporter, fused ATPase domains	56,1	23,6	2,4
RSP_2696	ABC transporter, fused ATPase and inner membrane subunits	21,6	10,1	2,1
RSP_2895	putative ABC transporter, fused ATPase subunits	13,2	38,5	-2,9
RSP_3054	hypothetical protein	8,1	28,3	-3,5
PT/HO				
		PT	HO	FC
RSP_2130	two component, sigma54 specific transcriptional regulator, fis family	27,6	6,1	4,5
RSP_3370	TRAP-T family transporter, DctM (12 TMs) subunit	27,6	10,1	2,7
RSP_2320	TRAP-T family transporter, periplasmic binding protein	13,4	27,4	-2,1
RSP_3527	Probable acetylpolyamine aminohydrolase	13,5	31,1	-2,3
HO/LO				
		HO	LO	FC
RSP_1041	malonyl-CoA synthase	47,8	15,4	3,1
RSP_2405	ABC cobalamin/Fe ³⁺ -siderophore transporter, ATPase subunit	40,8	15,9	2,6
RSP_3889	Short-chain dehydrogenase/reductase	17,0	32,6	-1,9
RSP_2895	putative ABC transporter, fused ATPase subunits	8,7	38,5	-4,4

Kategorie PS „Photosynthese“:

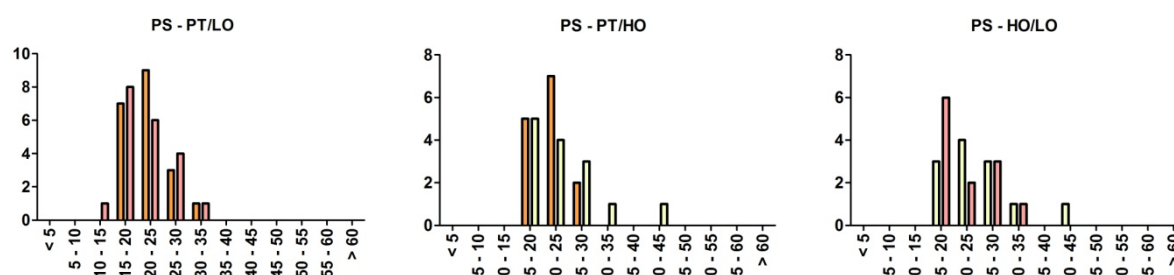


Abbildung 3.29: Vergleich der Halbwertszeiten unter phototrophen und microaeroben (PT/LO), unter phototrophen und aeroben (PT/HO) und unter aeroben und microaeroben Bedingungen (HO/LO) in der funktionellen COG Kategorie PS „Photosynthese“. In diesen Vergleich wurden nur solche Transkripte mit einbezogen, für die unter beiden Bedingungen Halbwertszeiten berechnet wurden. Die Ordinate zeigt die Anzahl an Transkripten, die Abszisse die Halbwertszeiten, aufgeteilt in 5-Minuten Intervalle. Jeder Balken zeigt die Anzahl an Transkripten mit einer Halbwertszeit im jeweiligen Zeitintervall. Die Skalierung der Ordinate ist der jeweiligen Anzahl an Transkripten mit bestimmten Halbwertszeiten pro Vergleich angepasst.

PT/LO: Angesichts der Tatsache, dass in Kategorie PS nur sehr wenige Transkripte vorkamen, waren die Unterschiede bei allen Vergleichen nur marginal. Der deutlichste Unterschied zeigte sich im Halbwertszeitenbereich zwischen 20 und 25 Minuten.

PT/HO: Tendenziell hatten hier unter phototrophen Bedingungen geringfügig mehr Transkripte eine Halbwertszeit von 20 bis 25 Minuten, während die Anzahl an Transkripten im Bereich von 15 bis 20 sehr ähnlich war. Auffällig waren in dieser Kategorie noch zwei Transkripte aus dem aeroben Datensatz mit Halbwertszeiten zwischen 30 und 35 Minuten sowie zwischen 40 und 45 Minuten. Unter phototrophen Bedingungen konnten hier keine Transkripte in diesen Halbwertszeitenbereichen verzeichnet werden.

HO/LO: Am deutlichsten fiel der Unterschied hier im Bereich zwischen 15 und 20 Minuten aus, hier waren unter microaeroben Bedingungen doppelt so viele Transkripte vertreten wie unter aeroben Bedingungen, hingegen waren im Bereich zwischen 20 und 25 Minuten doppelt so viele Transkripte aus dem aeroben Datensatz zu verzeichnen gewesen.

Tabelle 3-24: Liste der Transkripte in Kategorie PS mit den deutlichsten Unterschieden in den Halbwertszeiten unter phototrophen und microaeroben Bedingungen (PT/LO), unter phototrophen und aeroben Bedingungen (PT/HO) und unter microaeroben und aeroben Bedingungen (HO/LO). Dargestellt sind vier Gene, deren Transkripte die deutlichsten Unterschiede in ihren Halbwertszeiten unter den beiden Bedingungen zeigen. Der FC (*fold change*) gibt den Faktor an, mit dem sich die mittlere Halbwertszeit unter einer Bedingung von der unter der anderen unterscheidet (Halbwertszeiten in Minuten).

PT/LO				
Gennummer	Genname/Beschreibung	PT	LO	FC
RSP_0284	<i>bchF</i> , 2-vinyl bacteriochlorophyllide hydratase	30,1	18,4	1,6
RSP_0281	<i>bchE</i> , Magnesium-protoporphyrin IX monomethylester oxidative cyclase, 66 kDa subunit(<i>bchE</i>)	20,7	13,1	1,6
RSP_0287	<i>bchH</i> , Magnesium-chelatase subunit H	19,7	26,5	-1,3
RSP_0270	<i>crtB</i> , Squalene/phytoene synthase	15,5	24,0	-1,5
PT/HO				
		PT	HO	FC
RSP_0288	<i>bchL</i> , Light-independent protochlorophyllide reductase iron protein	21,1	15,1	1,4
RSP_0260	<i>bchZ</i> , putative chlorophyllide reductase, BchZ subunit	20,6	15,3	1,3
RSP_0289	<i>bchM</i> , Mg-protoporphyrin IX methyl transferase(EC:2.1.1.11)	28,4	43,8	-1,5
RSP_0287	<i>bchH</i> , Magnesium-chelatase subunit H	19,7	33,3	-1,7
HO/LO				
		HO	LO	FC
RSP_0289	<i>bchM</i> , Mg-protoporphyrin IX methyl transferase	43,8	30,1	1,5
RSP_0286	<i>bchB</i> , light-independent protochlorophyllide reductase subunit B	23,1	16,4	1,4
RSP_0282	<i>ppsR</i> , Transcriptional regulator, PpsR	17,8	18,2	-1,0
RSP_0260	<i>bchZ</i> , putative chlorophyllide reductase, BchZ subunit(EC:1.18.-)	15,3	19,1	-1,2

Kategorie R „Nur generelle Funktionsvorhersage“:

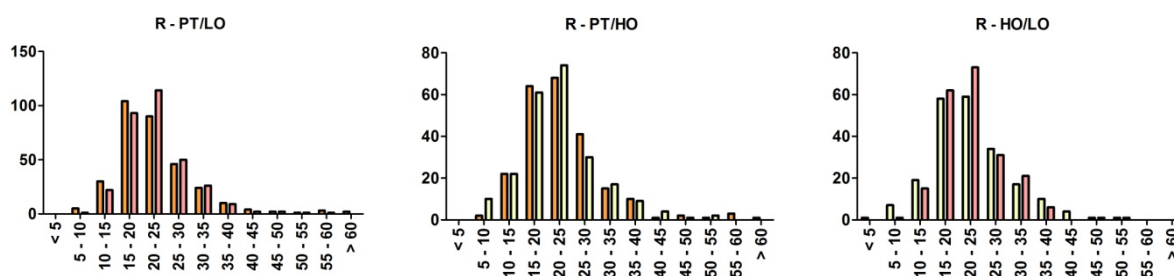


Abbildung 3.30: Vergleich der Halbwertszeiten unter phototrophen und microaeroben (PT/LO), unter phototrophen und aeroben (PT/HO) und unter aeroben und microaeroben Bedingungen (HO/LO) in der funktionellen COG Kategorie R „Nur generelle Funktionsvorhersage“. In diesen Vergleich wurden nur solche Transkripte mit einbezogen, für die unter beiden Bedingungen Halbwertszeiten berechnet wurden. Die Ordinate zeigt die Anzahl an Transkripten, die Abszisse die Halbwertszeiten, aufgeteilt in 5-Minuten Intervalle. Jeder Balken zeigt die Anzahl an Transkripten mit einer Halbwertszeit im jeweiligen Zeitintervall. Die Skalierung der Ordinate ist der jeweiligen Anzahl an Transkripten mit bestimmten Halbwertszeiten pro Vergleich angepasst.

PT/LO: Aufgrund der vielen zugeordneten Transkripte waren die Unterschiede in Kategorie R deutlicher. Auch hier waren in den unteren Halbwertszeitenbereichen wieder mehr Transkripte aus dem phototrophen Datensatz vertreten als aus dem microaeroben. In den etwas langlebigeren Bereichen zwischen 20 und 35 Minuten waren wiederum mehr Transkripte aus dem microaeroben Datensatz vertreten.

PT/HO: Die Unterschiede zwischen den Wachstumsbedingungen in dieser Kategorie fielen relativ gering aus. Am deutlichsten zeigten sich hier noch Unterschiede im Bereich von fünf bis zehn Minuten und zwischen 25 und 30 Minuten. Hier hatten mehr Transkripte unter aeroben Bedingungen eine Halbwertszeit dieser Länge. In letztgenanntem Zeitintervall hatten hingegen mehr Transkripte unter phototrophen Bedingungen eine solche Halbwertszeit. Stabile Transkripte waren unter beiden Bedingungen vorhanden, die längsten Halbwertszeiten von 55 bis über 60 Minuten gingen allerdings auch hier wieder auf den phototrophen Datensatz zurück.

HO/LO: Unter aeroben Bedingungen hatten im Gegensatz zu microaeroben Bedingungen mehr mit sehr kurzen Halbwertszeiten unter 10 Minuten. Wie zuvor beobachtet gab es dafür unter microaeroben Bedingungen jedoch etwas mehr Transkripte mit mittel langen Halbwertszeiten, deutlichster Unterschied hier zwischen 20 und 25 Minuten.

Tabelle 3-25: Liste der Transkripte in Kategorie R mit den deutlichsten Unterschieden in den Halbwertszeiten unter phototrophen und microaeroben Bedingungen (PT/LO), unter phototrophen und aeroben Bedingungen (PT/HO) und unter microaeroben und aeroben Bedingungen (HO/LO). Dargestellt sind vier Gene, deren Transkripte die deutlichsten Unterschiede in ihren Halbwertszeiten unter den beiden Bedingungen zeigen. Der FC (*fold change*) gibt den Faktor an, mit dem sich die mittlere Halbwertszeit unter einer Bedingung von der unter der anderen unterscheidet (Halbwertszeiten in Minuten).

PT/LO				
Gennummer	Genname/Beschreibung	PT	LO	FC
RSP_3520	ABC peptide transporter, fused ATPase domains	56,1	23,6	2,4
RSP_4202	Predicted transporter	45,5	19,2	2,4
RSP_0641	transcriptional regulator, XRE family	10,1	34,1	-3,4
RSP_3054	hypothetical protein	8,1	28,3	-3,5
PT/HO				
		PT	HO	FC
RSP_2130	two component, sigma54 specific transcriptional regulator, fis family	27,6	6,1	4,5
RSP_0665	<i>ftsH</i> , FtsH	38,7	10,0	3,9
RSP_1006	hypothetical protein	10,3	22,8	-2,2
RSP_0900	FAD-dependent pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase	18,8	42,5	-2,3
HO/LO				
		HO	LO	FC
RSP_1665	putative RhtB family transporter	38,1	13,5	2,8
RSP_2405	ABC cobalamin/Fe ³⁺ -siderophore transporter, ATPase subunit	40,8	15,9	2,6
RSP_0008	possible transporter, DME family, DMT superfamily	8,2	23,5	-2,9
RSP_2895	putative ABC transporter, fused ATPase subunits	8,7	38,5	-4,4

Kategorie S „Funktion unbekannt“:

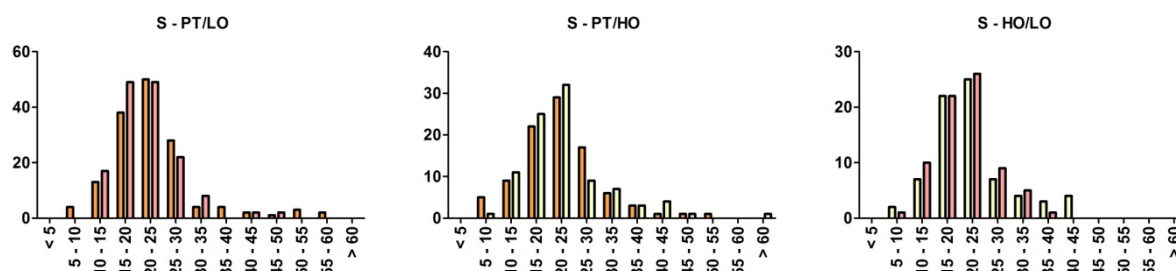


Abbildung 3.31: Vergleich der Halbwertszeiten unter phototrophen und microaeroben (PT/LO), unter phototrophen und aeroben (PT/HO) und unter aeroben und microaeroben Bedingungen (HO/LO) in der funktionellen COG Kategorie S „Funktion unbekannt“. In diesen Vergleich wurden nur solche Transkripte mit einbezogen, für die unter beiden Bedingungen Halbwertszeiten berechnet wurden. Die Ordinate zeigt die Anzahl an Transkripten, die Abszisse die Halbwertszeiten, aufgeteilt in 5-Minuten Intervalle. Jeder Balken zeigt die Anzahl an Transkripten mit einer Halbwertszeit im jeweiligen Zeitintervall. Die Skalierung der Ordinate ist der jeweiligen Anzahl an Transkripten mit bestimmten Halbwertszeiten pro Vergleich angepasst.

PT/LO: In der letzten Kategorie S zeigten sich unter den beiden Bedingungen die deutlichsten Unterschiede im Bereich zwischen 15 und 20 Minuten und sowohl in den sehr kurzlebigen und

langlebigen Bereichen. So führten phototrophe Bedingungen zu mehr Transkripten in den Extremen der Bereiche, während microaerobe Bedingungen tendenziell zu mehr mittellangen Halbwertszeiten führten.

PT/HO: Die Verteilung der Transkripte auf die Halbwertszeitenintervalle war in Kategorie S unter beiden Bedingungen ähnlich. Leichte Unterschiede gab es hier nur bei Transkripten mit Halbwertszeiten zwischen fünf und zehn Minuten und zwischen 25 und 30 Minuten. In beiden Intervallen waren mehr Transkripte aus dem phototrophen Datensatz vorhanden. In den anderen Intervallen lagen geringfügig mehr Transkripte aus dem aeroben vor.

HO/LO: Zwischen den beiden Bedingungen waren keine deutlichen Unterschiede in der Verteilung der Halbwertszeiten zu erkennen. Einzig auffällig waren etwas mehr Transkripte unter aeroben Bedingungen mit Halbwertszeiten über 35 bis 45 Minuten.

Tabelle 3-26: Liste der Transkripte in Kategorie S mit den deutlichsten Unterschieden in den Halbwertszeiten unter phototrophen und microaeroben Bedingungen (PT/LO), unter phototrophen und aeroben Bedingungen (PT/HO) und unter microaeroben und aeroben Bedingungen (HO/LO). Dargestellt sind vier Gene, deren Transkripte die deutlichsten Unterschiede in ihren Halbwertszeiten unter den beiden Bedingungen zeigen. Der FC (*fold change*) gibt den Faktor an, mit dem sich die mittlere Halbwertszeit unter einer Bedingung von der unter der anderen unterscheidet (Halbwertszeiten in Minuten).

PT/LO				
Gennummer	Genname/Beschreibung	PT	LO	FC
RSP_2198	hypothetical protein	58,5	18,5	3,2
RSP_1948	Protein of unknown function, HesB/YadR/YfhF	50,9	17,7	2,9
RSP_1770	hypothetical protein	7,1	22,4	-3,1
RSP_0641	transcriptional regulator, XRE family	10,1	34,1	-3,4
PT/HO				
		PT	HO	FC
RSP_2997	putative head portal protein	30,4	14,0	2,2
RSP_1549	hypothetical protein	45,0	22,4	2,0
RSP_2351	hypothetical protein	8,4	27,1	-3,2
RSP_0515	hypothetical protein	9,9	32,9	-3,3
HO/LO				
		HO	LO	FC
RSP_2405	ABC cobalamin/Fe ³⁺ -siderophore transporter, ATPase subunit	40,8	15,9	2,6
RSP_3485	hypothetical protein	31,0	14,5	2,1
RSP_1852	hypothetical protein	18,7	38,5	-2,1
RSP_0008	possible transporter, DME family, DMT superfamily	8,2	23,5	-2,9

3.2.3.1. ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE AUS ABSCHNITT 3.2.3

Beim Vergleich der Verteilung der Halbwertszeiten unter phototrophen und unter microaeroben Bedingungen, fiel vornehmlich auf, dass es im direkten Vergleich unter phototrophen Bedingungen sowohl mehr Transkripte mit sehr langen als auch Transkripte mit sehr kurzen Halbwertszeiten gab. Phototrophe Bedingungen schienen also zu einer größeren Bandbreite an Halbwertszeiten geführt zu haben, als microaerobe Wachstumsbedingungen. So gab es in den meisten funktionellen Kategorien in den Halbwertszeitenbereichen unter 15 und über 30 Minuten mehr Transkripte aus dem phototrophen Datensatz als aus dem microaeroben. Der Umkehrschluss dieser Beobachtung ist die

Tatsache, dass unter microaeroben Bedingungen die Transkripte vermehrt Halbwertszeiten im Bereich zwischen 15 und 30 Minuten hatten. Am deutlichsten zeigten sich diese Tendenzen in den Kategorien D „Zellteilung“, V „Abwehrmechanismen“, U „Intrazellulärer Transport, Sekretion“ und Q „Biosynthese von Sekundärmetaboliten, Transport und Katabolismus“. Eine Ausnahme stellte Kategorie I „Lipidstoffwechsel“ dar. Für die Transkripte dieser Kategorie führten phototrophe Bedingungen umgekehrt zu vergleichsweise mehr mittellangen Halbwertszeiten, während microaerobes Wachstum zu sowohl mehr kurzen als auch langen Halbwertszeiten führte.

Verglich man die Verteilung der Halbwertszeiten unter phototrophen und unter aeroben Bedingungen, zeigte sich unter beiden Bedingungen eine ähnliche Anzahl an Transkripten mit kurzen bzw. langen Halbwertszeiten unter 15 bzw. über 30 Minuten. Dabei gab es nur leichte Unterschiede in der Anzahl an Transkripten in den langlebigeren Halbwertszeitenbereichen. Die deutlichsten Unterschiede gab es in den Kategorien J „Translation“, T „Signaltransduktion“, H „Coenzymmetabolismus“ und vor allem I „Fettsäurestoffwechsel“. In all diesen Kategorien führten aerobe Wachstumsbedingungen zu mehr langlebigen Transkripten als phototrophe Bedingungen. Umgekehrt hatten in den Kategorien L „DNA Replikation, Rekombination, Reparatur“, D „Zellteilung“ V „Abwehrmechanismen“ und U „Intrazellulärer Transport, Sekretion“ bei phototrophen Wachstum mehr Transkripte Halbwertszeiten über 30 Minuten als bei aerobem. In den Bereichen mittellanger Halbwertszeiten zwischen 15 und 30 Minuten war die Verteilung über die Kategorien hinweg sehr inhomogen, sodass keine klaren Tendenzen festzustellen waren. Bei diesem Vergleich stachen die Kategorien U und I am deutlichsten heraus. In Kategorie U hatten im Vergleich die Transkripte aus dem phototrophen Datensatz die größte Bandbreite an Halbwertszeiten, so waren hier Halbwertszeiten von unter zehn bis über 60 Minuten festzustellen, unter aeroben Bedingungen hatten die Transkripte hingegen Halbwertszeiten von zehn bis 45 Minuten. In Kategorie I bestätigte sich die Beobachtung, dass es unter phototrophen Bedingungen im direkten Vergleich keine Transkripte mit längerer Halbwertszeit als 30 Minuten gab. Unter aeroben Bedingungen waren Halbwertszeiten bis 50 Minuten zu verzeichnen gewesen.

Wie aus den Ergebnissen der Vergleiche PT/LO und PT/HO bereits zu schließen war, zeigte sich beim Vergleich der Halbwertszeiten unter aeroben und unter microaeroben Bedingungen, dass es bei aerobem Wachstum zu einer größeren Bandbreite an Halbwertszeiten kam. So gab es in den meisten Kategorien unter aeroben Bedingungen mehr Transkripte mit sowohl kurzen Halbwertszeiten unter 15 Minuten, als auch mehr Transkripte mit langen Halbwertszeiten über 30 Minuten als unter microaeroben Bedingungen. Dementsprechend zeigten die Transkripte unter microaeroben Bedingungen vermehrt Halbwertszeiten zwischen 15 und 30 Minuten. Eine Ausnahme zu diesen Beobachtungen stellte die Kategorien T „Signaltransduktion“ dar. Hier gab es unter microaeroben Bedingungen etwas mehr kurzlebige und stabile Transkripte als unter aeroben.

3.2.4. DIREKTER VERGLEICH DER HALBWERTSZEITEN UNTER JEWEILS ZWEI WACHSTUMSBEDINGUNGEN

Die bereits im Abschnitt 3.2.3 beschriebene Liste mit Genen, für deren Transkripte unter jeweils zwei Bedingungen eine Halbwertszeit berechnet werden konnte, wurde anschließend an die oben beschriebene, breit angelegte Analyse, auf die größten Unterschiede in den einzelnen Transkripthalbwertszeiten untersucht.

Hierfür wurden vor allem diejenigen Gene betrachtet, deren Transkripthalbwertszeiten sich unter den untersuchten Bedingungen um einen Faktor von mindestens zwei unterschieden.

Beim Vergleich phototroph mit microaerob hatten 49 Transkripte unter phototrophen Bedingungen eine maximal halb so lange Halbwertszeit und 44 Transkripte eine mindestens doppelt so lange Halbwertszeit wie dieselben Transkripte unter microaeroben Bedingungen.

Unter phototrophen Bedingungen hatten im Vergleich zu aeroben 41 Transkripte eine maximal halb so lange Halbwertszeit und 31 Transkripte hatten eine mindestens doppelt so lange Halbwertszeit.

Im Vergleich der Transkripthalbwertszeiten unter aerobe Bedingungen mit microaeroben hatten 25 Transkripte unter aeroben Bedingungen eine höchstens halb so lange Halbwertszeit und 36 Transkripte waren mindestens doppelt so stabil wie unter microaeroben Bedingungen.

Eine vollständige List dieses Vergleiches, befindet sich in der Excel-Datei „HWZ_Vergleich_HO_LO_PT“ auf der CD im Anhang.

Eine Einteilung der Gene mit den deutlichsten Unterschieden der Transkripthalbwertszeiten in die funktionellen COG Kategorien, ist auf Grund der sehr geringen Anzahl und bezüglich der Tatsache, dass ein Gen mehr als nur einem COG zugeordnet sein kann (siehe Seite 51) als wenig sinnvoll zu erachten. Zudem war aus den vorhergehenden Analysen bereits zu erahnen, dass es sich bei den deutlichsten Unterschieden nicht um eine auf eine gesamte COG Kategorie generalisierbare Tatsache handeln muss, da vor allem unter phototrophen und aeroben Bedingungen in einigen Kategorien ein großer Anteil an kurzlebigen Transkripten aber auch einige sehr langlebige zu beobachten waren.

Daher wurden die Gene mit den deutlichsten Unterschieden manuell auf Auffälligkeiten untersucht.

Die Tabellen Tabelle 3-27, Tabelle 3-28 und Tabelle 3-29 zeigen jeweils die zehn Gene, deren Transkripte sich bei den drei Vergleichen, gemessen an ihren Transkripthalbwertszeiten, am stärksten unterschieden.

Tabelle 3-27 Liste der Transkripte mit den deutlichsten Unterschieden in den Halbwertszeiten (HWZ) unter phototrophen (PT) und microaeroben (LO) Bedingungen. Dargestellt sind zehn Gene, deren Transkripte die deutlichsten Unterschiede in ihren Halbwertszeiten unter den beiden Bedingungen zeigen. FC (PT/LO) gibt den Faktor an, mit dem sich die mittlere Halbwertszeit (MW) unter phototrophen Bedingungen von der unter microaeroben Bedingungen unterscheidet (Halbwertszeiten in Minuten).

Gennummer	Genname/Beschreibung	HWZ 1	HWZ 2	MW	HWZ 1	HWZ 2	MW	FC
Transkripte stabiler unter phototrophen Bedingungen								
		PT			LO			
RSP_2479	put. phage host specificity protein	33,8	28,6	31,2	4,3	6,0	5,1	6,1
asRSP1670	asRNA zu RSP_1670 (<i>spoT/relA</i>)	55,2	60,0	57,6	16,0	13,8	14,9	3,9
RSP_2198	hyp. protein	60,0	57,1	58,5	14,7	22,4	18,5	3,2
RSP_1321	<i>fliR</i> , flagellar biosynth. pathway, component FliR	36,3	49,3	42,8	14,3	14,3	14,3	3,0
RSP_1900	hyp. protein	60,0	60,0	60,0	16,6	24,1	20,4	2,9
Transkripte stabiler unter microaeroben Bedingungen								
RSP_0641	transcriptional regulator, XRE family	8,3	11,8	10,1	33,6	34,6	34,1	-3,4
RSP_3054	hyp. protein	8,2	8,0	8,1	26,2	30,5	28,3	-3,5
RSP_0461	multidrug/cation efflux pump, membrane fusion protein	9,9	7,4	8,7	31,9	50,5	41,2	-4,8
RSsh1	pred. sRNA	6,9	5,3	6,1	40,2	50,2	45,2	-7,4
asRSP3594	asRNA zu RSP_3594	3,6	3,2	3,4	38,1	25,6	31,8	-9,3

Bei einer augenscheinlichen Betrachtung der Liste mit Genen deren Transkriptionshalbwertszeiten sich um mindestens einen Faktor 2/-2 unterschieden, fielen beim Vergleich PT/LO mehrere Gene der Flagellensynthese und Flagellenprotein-kodierende Gene auf, deren Transkripte unter phototrophen Bedingungen mindestens doppelt so stabil waren wie unter microaeroben Bedingungen, so z.B. das in Tabelle 3-27 genannte RSP_1321 *fliR*, sowie RSP_0057 *fliJ* und RSP_1316 *motA*. Bei solchen Genen, deren Transkripte sich in der Halbwertszeit etwas weniger als um einen Faktor 2 unterschieden, sprangen dabei noch weiter RSP_0053 *fliF1*, und RSP_0074 *flgK* ins Auge, aber auch Gene der Chemotaxis wie RSP_2438 *cheX* und RSP_2439 *cheD*.

Es ist zu vermerken, dass ab einem Faktor von $\sim(\pm)1,7$ die Unterschiede jedoch nicht mehr beachtet wurden, da sich die beiden Halbwertszeiten dabei nicht mehr stark genug unterschieden. Ab diesem Unterschied käme man hier in einen Bereich der Halbwertszeiten, in dem beide mit der unter 3.2 in Formel 7 dargestellten Annahme als „gleich“ angesehen werden würden.

Des Weiteren hatte eine *antisense* RNA zu RSP_1670 unter phototrophen Bedingungen ebenfalls eine deutlich längere Halbwertszeit als unter microaeroben Bedingungen (siehe Tabelle 3-27). Diese RNA liegt im Genom *antisense* zu RSP_1670, dieses Gen kodiert ein Protein der RelA/SpoT Familie. In Bakterien wird durch Enzyme dieser Familie der Level des Alarmons (p)ppGpp (Guaanosin-3',5'-bispyrophosphat/triphosphat) kontrolliert. Diese mögliche *antisense* RNA ist bis zum heutigen Tage noch nicht charakterisiert, woher eine Funktionsvorhersage noch nicht möglich ist. Für RSP_1670 selber konnten keine Halbwertszeiten berechnet werden.

Umgekehrt hatten unter microaeroben Bedingungen ebenfalls eine *antisense* RNA und eine sRNA deutlich längere Halbwertszeiten als unter phototrophen Wachstumsbedingungen (siehe Tabelle 3-27). asRSP3594 liegt *antisense* zu RSP_3594, welches ein Anti-Frost-Protein kodiert. Diese *antisense* RNA ist ebenfalls bisher nicht näher untersucht worden und für RSP_3594 lagen ebenso keine Halbwertszeitendaten vor. RSsh1 ist eine kleine RNA, deren beiden Fragmente (68 und 42 nt) von Hfq stabilisiert werden (Berghoff et al., 2011). Eine physiologische Rolle konnte bisher jedoch noch nicht bestimmt werden. Eine unter phototrophen Bedingungen ebenfalls kürzere Halbwertszeit hat das *fur/mur* Transkript. Fur/Mur ist ein Eisen- bzw. Mangan-Aufnahme Regulator, welchem eine wichtige Rolle im Eisenmetabolismus in *R. sphaeroides* zukommt (Peuser et al., 2011).

Überraschenderweise zeigte ebenfalls das Transkript eines Chemotaxisgens unter phototrophen Bedingungen eine nur halb so lange Halbwertszeit wie unter microaeroben Bedingungen. RSP_2229 kodiert ein Chemotaxis Multidomänenprotein (CheB Methylsterase/CheR methylase). Zusätzlich zeigten auch die Transkripte zweier Gene, die mit der Flagellenbiosynthese und Flagellenproteinen in Verbindung stehen (RSP_3881 *flgF*, RSP_3880 *flbT*), unter phototrophen Bedingungen kürzere Halbwertszeiten als unter microaeroben.

Tabelle 3-28 Liste der Transkripte mit den deutlichsten Unterschieden in den Halbwertszeiten (HWZ) unter phototrophen (PT) und aeroben (HO) Bedingungen. Dargestellt sind zehn Gene, deren Transkripte die deutlichsten Unterschiede in ihren Halbwertszeiten unter den beiden Bedingungen zeigen. FC (PT/HO) gibt den Faktor an, mit dem sich die mittlere Halbwertszeit (MW) unter phototrophen Bedingungen von der unter aeroben Bedingungen unterscheidet (Halbwertszeiten in Minuten).

Gennummer	Genname/Beschreibung	HWZ 1	HWZ 2	MW	HWZ 1	HWZ 2	MW	FC
Transkripte stabiler unter phototrophen Bedingungen								
		PT			HO			
RSP_2130	two component, sigma54 specific transcriptional regulator, fis family	33,4	21,7	27,6	5,5	6,6	6,1	4,5
RSP_0665	<i>ftsH</i> , cell division protease FtsH	40,5	36,9	38,7	12,2	7,9	10,0	3,9
RSP_4275	sigma24, Fecl	50,6	39,5	45,0	15,1	14,3	14,7	3,1
RSP_4263	conserved hyp. protein	60,0	60,0	60,0	22,1	18,7	20,4	2,9
RSP_3053	possible dioxygenase/ glyoxalase family protein	50,1	60,0	55,0	18,0	21,4	19,7	2,8
Transkripte stabiler unter aeroben Bedingungen								
RSP_0588	hyp. protein	11,1	13,9	12,5	47,1	36,9	42,0	-3,4
RSP_0515	hyp. protein	10,3	9,4	9,9	28,6	37,3	32,9	-3,3
RSP_2351	hyp. protein	7,4	9,4	8,4	28,2	25,9	27,1	-3,2
RSP_6233	gas vesicle operon protein	21,5	18,1	19,8	60,0	59,3	59,7	-3,0
RSP_3042	<i>dorX</i> , DMSO reductase regulatory protein DorX	13,9	10,9	12,4	40,9	33,6	37,3	-3,0

Einen starken Unterschied in den Halbwertszeiten zeigte beim Vergleich der Halbwertszeiten unter phototrophen und aeroben Bedingungen (PT/HO) das *ftsH* Transkript, welches unter phototrophen Bedingungen fast viermal so stabil war wie unter aeroben (siehe Tabelle 3-28). FtsH ist eine membrangebundene Protease, welche an den Vorgängen der Zellteilung beteiligt ist. Wie schon beim Vergleich mit microaeroben Bedingungen (s.o.), waren bei phototrophem Wachstum zwei Transkripte von Flagellen-assoziierten Genen stabiler als bei aerobem. Dies waren RSP_0078 *flgG*, welches ein distales Stabprotein des Flagellenmotors kodiert und RSP_6093 *flgJ*, das das Flagellenprotein FlgJ kodiert. Des Weiteren zeigte das Transkript des alternativen Sigmafaktors RpoH_{II} (RSP_0601) unter phototrophen Bedingungen eine mehr als doppelt so lange Halbwertszeit wie unter aeroben Bedingungen. RpoH_{II} ist Teil einer Sigmafaktorkaskade in der Stressantwort auf Singulettauerstoff in *R. sphaeroides* (Nuss et al., 2009).

Mit *flbT* (RSP_3880) und *cher2* (RSP_1587) zeigten ebenfalls wieder zwei Transkripte von Flagellen- bzw. Chemotaxis-assoziierten Genen kürzere Halbwertszeiten bei phototrophem Wachstum als bei aerobem. Desweiteren zeigte das Transkript einer Häm-Oxygenase (RSP_4190) unter phototrophen Bedingungen eine fast dreifach kürzere Halbwertszeit als bei aerobem Wachstum.

Tabelle 3-29 Liste der Transkripte mit den deutlichsten Unterschieden in den Halbwertszeiten (HWZ) unter aeroben (HO) und microaeroben (LO) Bedingungen. Dargestellt sind zehn Gene, deren Transkripte die deutlichsten Unterschiede in ihren Halbwertszeiten unter den beiden Bedingungen zeigen. FC (HO/LO) gibt den Faktor an, mit dem sich die mittlere Halbwertszeit (MW) unter aeroben Bedingungen von der unter microaeroben Bedingungen unterscheidet (Halbwertszeiten in Minuten).

Gennummer	Genname/Beschreibung	HWZ 1	HWZ 2	MW	HWZ 1	HWZ 2	MW	FC
Transkripte stabiler unter aeroben Bedingungen								
		HO			LO			
RSP_1863	Phospho glucomutase/ phosphomanno mutase	38,9	57,3	48,1	15,8	14,1	15,0	3,2
RSP_1041	malonyl-CoA synthase	41,2	54,4	47,8	16,1	14,8	15,4	3,1
RSP_3732	ABC sugar transporter, periplasmic binding protein	47,8	32,5	40,1	13,4	13,6	13,5	3,0
RSP_2641	hyp. protein	54,1	60,0	57,0	17,6	21,1	19,4	2,9
RSP_1665	putative RhtB family transporter	34,5	41,7	38,1	13,1	13,9	13,5	2,8
Transkripte stabiler unter microaeroben Bedingungen								
RSP_0461	multidrug/cation efflux pump, membrane fusion protein	13,4	11,2	12,3	31,9	50,5	41,2	-3,3
RSP_2043	hyp. protein	12,4	15,6	14,0	60,0	60,0	60,0	-4,3
RSP_2895	putative ABC transporter, fused ATPase subunits	8,9	8,5	8,7	32,4	44,6	38,5	-4,4
RSsh1	pred. sRNA	10,3	9,2	9,7	40,2	50,2	45,2	-4,6
RSP_3539	Hemolysin-type calcium- binding region, RTX	4,5	4,5	4,5	18,6	27,2	22,9	-5,0

Unter aeroben Bedingungen zeigten sich erneut einige Transkripte von Flagellen- und Chemotaxisgenen stabiler als unter microaeroben Bedingungen. So war das Transkript von RSP_1325, ein FlgA Homolog welches an der Bildung des P-Ringes des Flagellenmotors Teil hat, bei aerober Kultivierung fast dreimal so stabil wie bei microaeroben. Ähnlich stabil wie unter phototrophen Bedingungen war das das Transkript für das Flagellenprotein FljJ (RSP_0057) unter aeroben Bedingungen und mit einer mittleren Halbwertszeit von 31,6 Minuten doppelt so stabil wie unter microaeroben Bedingungen. Ähnlich verhielt es sich mit dem Transkript von *cheX*, das wie unter phototrophen Bedingungen auch, bei aerobem Wachstum ebenfalls stabiler war als bei microaeroben.

Ebenfalls ähnlich zu phototrophen Bedingungen zeigte sich die Halbwertszeit der kleinen RNA RSsh1 unter aeroben Bedingungen. Mit knapp zehn gegenüber 45 Minuten war RSsh1 unter aeroben Bedingungen deutlich kurzlebiger als unter microaeroben. Interessanterweise zeigte das Transkript der an der Zellteilung involvierten Protease FtsH unter microaeroben Bedingungen eine Halbwertszeit von knapp 20 Minuten. Wie bereits beschrieben hatte dasselbe Transkript unter phototrophen Bedingungen die längste Halbwertszeit der drei Bedingungen von etwa 40 Minuten und unter aeroben die kürzeste von zehn Minuten.

Eine Auflistung der bei obigen Vergleichen beschriebenen, aber nicht in den Tabellen Tabelle 3-27, Tabelle 3-28 und Tabelle 3-29 aufgeführten Genen, ist in Tabelle 3-30 gezeigt.

Tabelle 3-30: Auflistung potenziell interessanter Gene, deren Transkriptionshalbwertszeiten sich unter zwei Wachstumsbedingungen stark unterscheiden. Halbwertszeiten in Minuten, n.d. nicht bestimmt, Wachstumsbedingungen: HO aerob; LO microaerob; PT phototroph.

Gennummer	Genname/Beschreibung	HO	LO	PT
RSP_0053	<i>fliF1</i> , Flagellar FliF M-ring protein	n.d.	22,8	39,9
RSP_0057	<i>fliJ</i> , Flagellar protein FliJ	31,2	15,5	31,6
RSP_0074	<i>flgK1</i> , FlgK flagellar hook-associated protein 1	n.d.	17,7	30,7
RSP_0078	<i>flgG</i> , Flagellar distal rod protein	11,6	n.d.	25,4
RSP_1321	<i>fliR</i> , Flagellar biosynthesis pathway, component FliR	n.d.	14,3	42,8
RSP_0601	<i>rpoH2</i> , RNA polymerase sigma factor	19,5	n.d.	49,0
RSP_1316	<i>motA</i> , flagellar motor protein	n.d.	18,8	50,3
RSP_1325	putative flagellar basal-body P-ring formation protein FlgA	37,7	14,3	n.d.
RSP_1587	<i>cheR2</i> , Chemotaxis methyltransferase, CheR2	35,8	n.d.	16,2
RSP_2229	Chemotaxis multidomain, CheB methyltransferase/CheR, Methylase	n.d.	25,5	12,4
RSP_2438	<i>cheX</i> , Putative CheX protein	18,5	9,4	18,5
RSP_2439	<i>cheD</i> , putative chemotaxis protein, CheD	n.d.	21,0	34,9
RSP_2440	<i>mcpA</i> , Methyl accepting chemotaxis protein	29,9	n.d.	17,8
RSP_3880	<i>flbT</i> , possible flbT, flagellar biosynthesis regulatory protein	36,2	29,2	17,1
RSP_3881	<i>flgF</i> , possible flagellar basal-body ROD protein FlgF	16,5	19,1	10,7
RSP_4190	Heme oxygenase	22,6	20,4	7,7

3.3. VERIFIZIERUNG DER MICROARRAY-DATEN MITTELS NORTHERN BLOT UND QRT PCR

Zur Ermittlung, wie vertrauenswürdig die Halbwertszeiten sind, welche anhand der Daten der Microarrays errechnet worden waren, wurden die Halbwertszeiten ausgesuchter Transkripte mittels *real time* RT-PCR und *Northern blot* Analyse erneut bestimmt. Die Bestimmung mittels zweier anderer Methoden sollte Aufschluss über die Reproduzierbarkeit der Microarrays liefern.

Eine Auswahl geeigneter Gene, deren Transkriptionshalbwertszeiten überprüft werden sollten, erfolgte unter Zuhilfenahme von Daten einer RNA-Sequenzierung (RNA-seq) des Gesamttranskriptom von *R. sphaeroides*. Da die qRT PCR eine sehr sensitive Methode ist, ist die Abundanz eines Transkriptes für eine Analyse nicht von vorrangiger Bedeutung. Bei der *Northern blot* Analyse hingegen findet keine vorhergehende Amplifikation der zu untersuchenden RNA statt und somit ist die Abundanz eines Transkriptes maßgeblich für seine Detektierbarkeit. Um einen ersten Eindruck zu erlangen, bei welchen Transkripten eine Detektion mittels *Northern blot* wahrscheinlich ist, wurden die Daten der RNA-Sequenzierung herangezogen.

Diese Daten entstanden im Rahmen eines Projektes an unserem Institut zur globalen Identifizierung von Transkriptionsstartstellen (TSS *transcription start sites*) im Genom von *R. sphaeroides* (bisher nicht veröffentlicht). Die Daten basieren auf dem Transkriptom microaerob gewachsener *R. sphaeroides* 2.4.1 WT Kulturen in der frühen exponentiellen Wachstumsphase (OD_{660nm} 0,4). Nach Isolierung der Gesamt-RNA wurde ein Teil der RNA mit dem Enzym 5'-Terminatorexonuklease (Tex) behandelt. Dieses Enzym ist eine 5'-3'-Exonuklease, welche RNA Substrate degradiert, die an ihrem 5'-Ende ein Monophosphat tragen. RNA-Spezies mit einem Triphosphat am 5'-Ende werden hingegen nicht abgebaut. Die Behandlung der RNA Proben mit diesem Enzym hat demnach eine Anreicherung von Primärtranskripten zur Folge, da alle prozessierten RNA Moleküle degradiert werden (Sharma et al., 2010). Die Erstellung der cDNA Bibliotheken für TEX-behandelte und nicht-TEX-behandelte RNA

Proben erfolgte durch die Firma Vertis Biotechnology AG, die Sequenzierung der cDNA Bibliotheken erfolgte auf einer *Illumina* Sequenzier-Plattform (Genome Analyzer IIx).

Durch eine visuelle Betrachtung der RNA-seq-Daten mit dem Programm *Integrated Genome Browser* (IGB, Affymetrix⁵) lassen sich Aussagen über Abundanzen treffen und ob das Transkript von Interesse möglicherweise Teil eines polycistronischen Transkriptes ist bzw. wie lang die 5'- und 3'-UTRs sind. Abbildung 3.32 zeigt die Auswahl von 4 Genen, deren Transkripte monocistronisch sind, was an der deutlichen Akkumulation von *reads* im 5'-Bereich zu erkennen ist, und die eine möglichst hohe Anzahl an *reads* in den Tex-behandelten Proben aufweisen. Die Transkripte von RSP_0386, RSP_6107, RSP_6236 und RSP_2693 ließen sich, wie dargestellt mittels *Northern blot* nachweisen.

RSP_0386 (Abbildung 3.32a) kodiert ein Kälteschockprotein der CspA-Familie, und hat, wie aus Tabelle 3-31 ersichtlich ist unter aeroben Bedingungen eine anhand der Microarraydaten ermittelte Transkripthalbwertszeit von 20,2 min, unter microaeroben Bedingungen 21,6 min und unter phototrophen 24,6 min. Das Transkript zeigte auch im Tex-behandelten Datensatz eine starke Akkumulation von *reads* am 5'-Ende von über 2000. Laut den RNA-seq Daten liegt der Transkriptionsstart von RSP_0386 bei der Koordinate 2.119.793, die kodierende Sequenz (*coding sequence*, CDS) beginnt bei 2.119.519 und endet bei 2.119.725. Damit entspricht die Länge der CDS mit 207 nt der Angabe aus der Kyoto Enzyklopädie für Gene und Genome (KEGG⁶). Anhand der RNA-seq-Daten lässt sich ein mögliches Ende des Transkriptes bei einer Koordinate von 2.119.793 bzw. bei 2.119.886 ausmachen. Dies würde einer Länge des Transkriptes von 387 bzw. 480 nt entsprechen. Im *phosphoimage* des *Northern blots* erkannte man eine klare Bande auf einer Höhe, die etwa einer Transkriptlänge von etwa 400 nt entspricht und eine feinere Bande etwas unterhalb. Die Größenbestimmung erfolgte mittels Hybridisierung derselben Membran mit einer 5S rRNA-spezifischen Sonde. Die Hybridisierung mit einer Sonde gegen die 14S rRNA erfolgte auf einer anderen Membran jedoch desselben *blots*, wodurch die Position der RNA vergleichbar ist.

RSP_6107 (Abbildung 3.32b) ist als hypothetisches Protein annotiert, das dazugehörige Transkript hat laut den Microarraydaten eine Halbwertszeit von 22,2 min, 31,0 min und 39,02 min unter aeroben, microaeroben und phototrophen Bedingungen und zeigte ebenfalls im Tex-behandelten Datensatz der RNA-seq eine Akkumulation von etwa 700 *reads* am 5'-Ende. Der Transkriptionsstart liegt bei einer Koordinate von 1.973.009, die CDS beginnt bei 1.973.045 und endet bei 1.973.371. Zwei mögliche Enden des Transkriptes sind in den RNA-seq Daten bei den Koordinaten 1.973.371 bzw. 1.973.521 erkennbar. Die CDS entspricht mit einer Länge von 327 nt der Angabe bei KEGG. Somit kommen, nach diesen Daten zu urteilen Transkriptlängen von 363 bzw. 513 nt in Frage. Im *phosphoimage* der dazugehörigen *Northern blot* Membran war eine prominente Bande auf einer Höhe erkennbar, die einer Größe von etwa 500 nt entspricht.

⁵ <http://bioviz.org/igb/>

⁶ <http://www.genome.jp/kegg/>

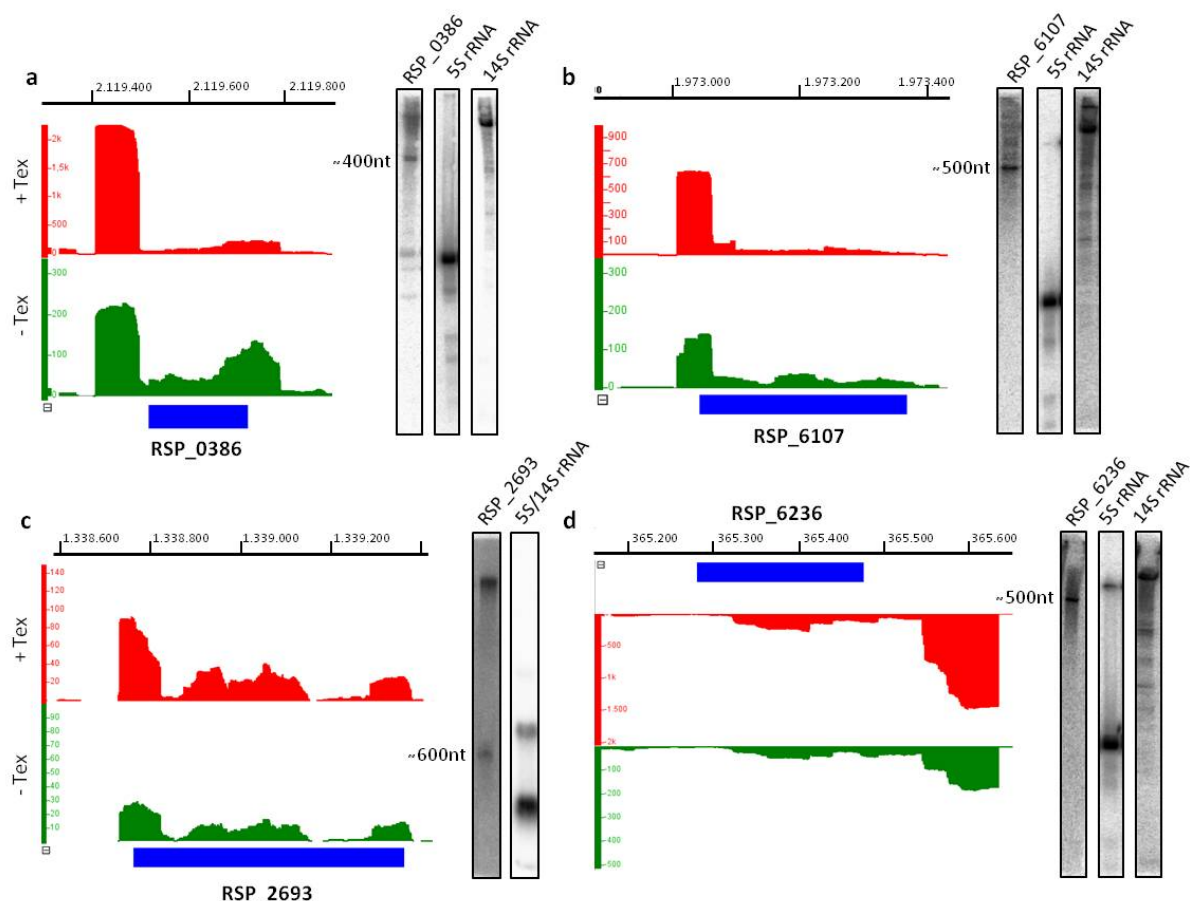


Abbildung 3.32 Ausschnitte des *integrated genome browsers* der 4 Genloci von RSP_0386, RSP_6107, RSP_2693 auf Chromosom 1 (a-c) und RSP_6236 auf Chromosom 2 und das jeweilige *phosphoimaging*-Signal der *Northern blot* Analyse. Die normalisierten Werte der reads sind der jeweiligen Nukleotid-Position auf Chromosom 1 bzw. 2 zugeordnet. Dargestellt sind die *reads* aus Datensätzen mit (+Tex, rot) und ohne Tex-Behandlung (-Tex, grün), für eine einfachere Visualisierung wurde dabei auf eine gleiche Skalierung der Anzahl an *reads* verzichtet. Die Genomannotation ist blau dargestellt. Die Transkripte dieser Gene waren abundant genug, um sich mittels *Northern blot* nachweisen zu lassen. Die Transkripte von RSP_0386 (a), RSP_6107 (b) und RSP_6236 (d) wurden auf Membranen detektiert, auf die ein 8%iges PAA-Harnstoff-Gel geblottet wurde, das RSP_2693 (c) Transkript zeigt sich auf einer Membran eines Agarosegel-Blottes. Die Größenangaben neben den *phosphoimages* sind Schätzwerte basierend auf den Signalen einer Hybridisierung derselben Membranen mit einem Sondenmix gegen die 5S (115 nt) und 14S rRNA (1200 nt).

Die Detektierbarkeit des Transkriptes von RSP_2693 (Abbildung 3.32 c), eine Superoxid-Dismutase der Fe-Mn Familie, konnte bereits nachgewiesen werden (Li et al., 2003) und zeigte auch hier eine deutliche Bande auf Höhe von ca. 600 bis 700 nt und eine etwas stärkere Bande, welche deutlich höher lief. Die TSS von RSP_2693 liegt bei einer Nukleotid-Position von 1.338.728, das Ende des Transkriptes bei 1.339.401. Die CDS beginnt bei 1.338.763 und endet bei 1.339.362, was einer Länge von 600 nt entspricht. Das Transkript ist laut RNA-seq 673 nt lang, wie man es auch im *Northern blot* erkennen konnte. Die mRNA von RSP_2693 hat laut Microarraydaten eine Halbwertszeit von 20,4 min bei microaerobem und 57,5 min bei phototrophen Wachstum. Für aerobe Bedingungen liegen aus dem Microarray keine Daten vor.

RSP_6236 (Abbildung 3.32 d) ist ebenfalls als hypothetisches Protein annotiert. Für aerobe Bedingungen sind ebenso keine Halbwertszeiten verfügbar, unter microaeroben und phototrophen Bedingungen hat das Transkript Halbwertszeiten von 16,3 min respektive 26,5 min. Das Transkript von RSP_6236 erschien im *Northern blot phosphoimage* größer als die annotierten 243 nt erwarten ließen. Die RNA-seq Daten lassen vermuten, dass die Transkriptionsstartstelle 160 nt vor der

kodierenden Sequenz bei der Koordinate 365.638 liegt. Ein klares Ende des Transkriptes ist in den RNA-seq-Daten nicht unmittelbar auszumachen. Das Ende der CDS liegt bei einer Nukleotid-Position von 365.281, was einer Länge von 357 nt entspräche. Nimmt man den Abbruch der *reads* bei der Koordinate 365.133 auch als Ende des Transkriptes und so ergäbe sich eine Länge von 505 nt. Im *Northern blot* erkannte man eine Bande auf einer Höhe von über 500 nt.

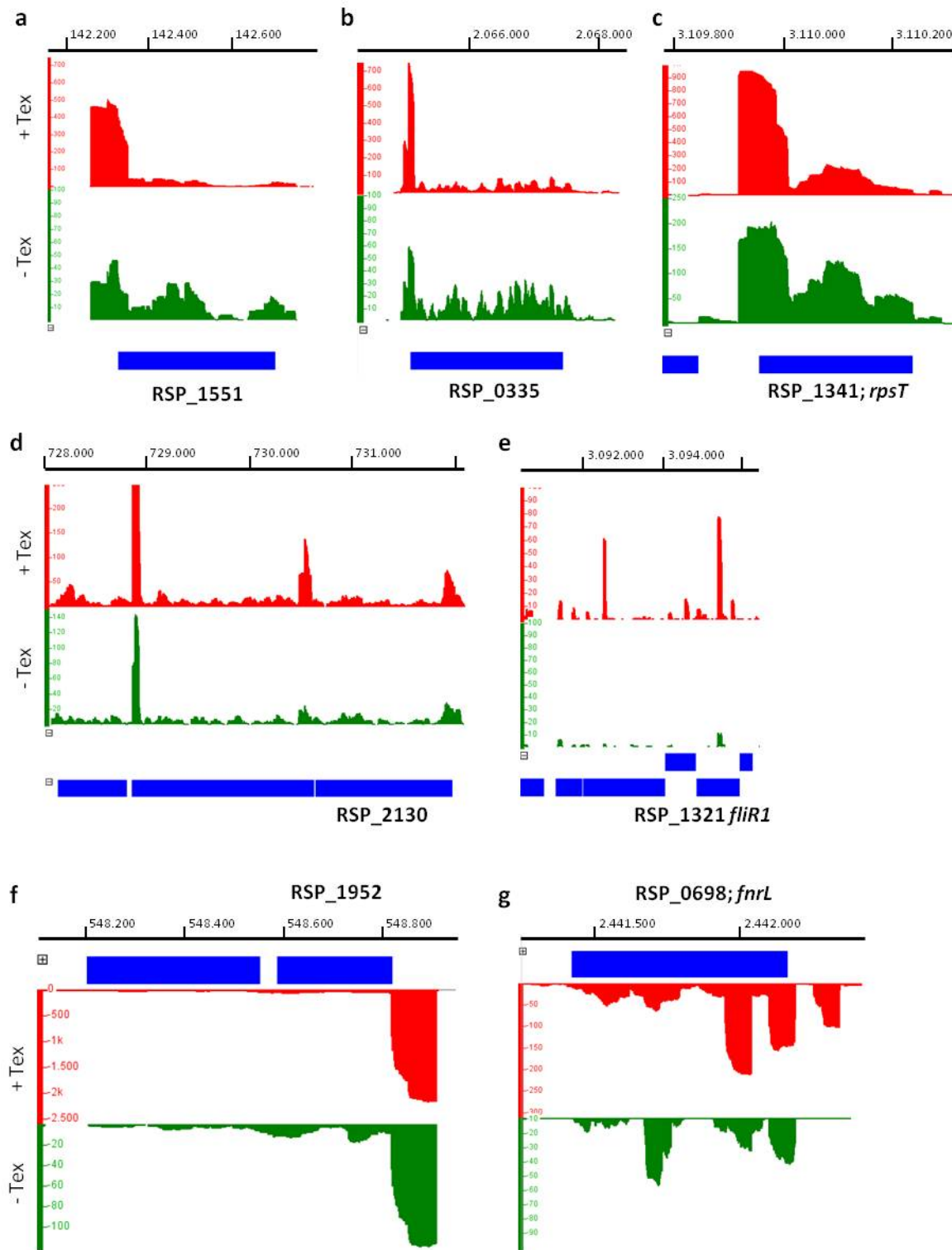


Abbildung 3.33: RNA-seq Daten weiterer Gene, welche für die Verifizierung der Microarray Daten ausgesucht wurden, dargestellt im IGB. Die normalisierten reads der RNA-seq Analyse sind der jeweiligen Nukleotid-Position auf Chromosom 1 zugeordnet. Dargestellt sind die *reads* aus Datensätzen mit (+Tex, rot) und ohne Tex-Behandlung (-Tex, grün), für eine einfachere Visualisierung wurde dabei auf eine gleiche Skalierung verzichtet. Die Genomanotation ist blau dargestellt. Der jeweilige Genlocus von RSP_1551, RSP_0335, RSP_1341 (*rpsT*), RSP_2130 und RSP_1321 (*fliR1*) (a-e) befindet sich auf dem Plusstrang von Chromosom 1, der von RSP_1952 und RSP_0698 (*fnrL*) (f und g) auf dem Minusstrang.

Für eine weitergehende Validierung wurden 7 zusätzliche Gene ausgesucht. Die Transkripte dieser Gene konnten jedoch nicht durch *Northern blot* detektiert werden, eine Halbwertszeitenberechnung war allerdings mittels *real time* RT PCR möglich. Abbildung 3.33 zeigt nun Ausschnitte aus dem IGB. Bis auf RSP_1952 (f) liegen alle Transkripte augenscheinlich monocistronisch vor. RSP_1952, annotiert als Kälteschockbindeprotein der CspA-Familie, liegt als bicistronisches Operon mit RSP_1951 auf dem Minusstrang von Chromosom 1. Für RSP_1952 wurden im Microarray eine Halbwertszeit des Transkriptes von 42,9 min unter microaeroben und 20,6 min unter phototrophen Bedingungen berechnet. Für RSP_1951 liegen nur Daten für microaerobe Bedingungen vor; hier zeigt sich eine mittlere Halbwertszeit von 24,0 min.

Wie alle übrigen ausgewählten Gene liegt der Genlocus von RSP_1551 (a) auf dem Plusstrang von Chromosom 1. RSP_1551 kodiert ein putatives Glyoxylase-Familie Protein und das entsprechende Transkript hat eine Halbwertszeit von 29,8 min und 15,7 min bei aerobem und microaerobem Wachstum. Für phototrophes Wachstum konnte keine Halbwertszeit aus den Microarraydaten ermittelt werden.

RSP_0335 (b) kodiert eine Diguanylatcyclase/Diesterase. Für aerobe und microaerobe Bedingungen liegen aus dem Microarraydaten für Halbwertszeiten von 38,5 min und 24,4 min vor.

RSP_1341 (c) ist mit dem Gennamen *rpsT* annotiert, welches die kleine Untereinheit des ribosomalen Proteins s20 kodiert. Das Transkript weist Halbwertszeiten von 20,6 min und 18,6 min unter microaeroben und phototrophen Bedingungen auf.

RSP_2130 (d) könnte Teil eines polycistronischen Operons mit RSP_2129 sein, hat aber einen eigenen Transkriptionsstart, wie aus der dem RNA-seq-Datensatz mit Tex-Behandlung ersichtlich ist, da hier eine Anhäufung von *reads* unmittelbar am 5'-Ende von RSP_2130 vorliegt. RSP_2130 kodiert einen Sigma54-spezifischen Transkriptionsregulator der Fis-Familie. Unter aeroben Bedingungen ist das Transkript mit einer Halbwertszeit von 6,1 min deutlich kurzlebiger als unter phototrophen Bedingungen mit 27,6 min. Für microaerobe Bedingungen liegen keine Daten vor.

RSP_1321 (e), *fliR*, kodiert ein Protein aus dem Flagellen Biosyntheseweg. Laut RNA-seq ist das Transkript nicht sehr abundant und könnte mit RSP_1320 (*flhA*) und RSP_1322 (*flhB*) in einem Operon liegen. Alle drei Gene sind mit dem Flagellen Biosyntheseweg assoziiert. Eine leichte Akkumulation von *reads* am 5'-Ende von RSP_1321 könnte jedoch auf einen internen Transkriptionsstart hindeuten. Laut Microarraydaten ist das Transkript von RSP_1321 unter phototrophen Bedingungen mit einer Halbwertszeit von 43,8 min auffällig stabiler als unter microaeroben Bedingungen, wo es eine Halbwertszeit von nur 14,3 min aufzeigt. Für RSP_1322 sind keine Daten vorhanden. Das RSP_1320 Transkript hat laut Microarray eine Halbwertszeit von 22,4 min unter phototrophen Bedingungen, für die beiden anderen Wachstumsbedingungen liegen ebenfalls keine Daten vor.

RSP_0698 (g), kodiert das für photosynthetisches und anaerobes Wachstum essentielle Protein FnrL (Zeilstra-Ryalls & Kaplan, 1995). Wie aus der RNA-Sequenzierung ersichtlich, liegt vor und sowie unmittelbar am 5'-Ende, sowie etwas weiter *downstream* starke Ansammlungen von *reads*. Dass mehrere *read*-Akkumulationen auftreten kann ein Zeichen für alternative Transkriptionsstartstellen

sein. Das *fnrL* Transkript hat eine Halbwertszeit von 28,9 min unter microaeroben Bedingungen und von 26,2 min unter phototrophen Bedingungen. Für aerobe Bedingungen liegen keine Microarraydaten vor.

Zu eigentlichen Verifizierung der Microarraydaten wurden die Halbwertszeiten der in Abbildung 3.32 gezeigten Transkripte mittels *Northern blot* Analyse bestimmt. Hierfür wurden für die drei Wachstumsbedingungen aerob (HO), microaerob (LO) und phototroph (PT) wie unter 2.2.3 beschrieben Experimente durchgeführt. Die Auftrennung der Gesamt-RNA aus diesen Experimenten erfolgte für die Detektion von RSP_0386, RSP_6107 und RSP_6236 über 8%ige PAA-Urea Gele (2.3.4.2) und für RSP_2693 über 1%ige Agarose-Formaldehyd-Gele (2.3.4.1). Die Abbildungen Abbildung 3.34, Abbildung 3.35, Abbildung 3.36 und Abbildung 3.37 zeigen nun die *phosphoimages* jeweils eines der biologischen Duplikate, für die die Halbwertszeiten der vier Transkripte bestimmt wurden. Für alle Transkripte war eine deutliche Abnahme der Intensität der Banden und damit eine Abnahme der Abundanz nach Zugabe von Rifampicin zu erkennen, die Abundanz der 5S rRNA Banden blieb hingegen über den beobachteten Zeitraum konstant. Die Intensitäten der einzelnen Banden wurden quantifiziert und gegen die der 5S rRNA Banden normalisiert. Im Folgenden wurden aus den normalisierten Werten der Signale zu den Zeitpunkten 0, 5, 10, 20, 35 und 45 min jeweils die logarithmierten Verhältnisse [FC (log2)] zum normalisierten Wert der 0 min Signale gebildet. Diese Werte sind für jede Bedingung und für jedes Duplikat in einem Diagramm gegen die Zeit aufgetragen und in den Abbildungen Abbildung 3.35, Abbildung 3.36 und Abbildung 3.37 jeweils unter den *Northern blot* Abbildungen dargestellt. Aus der Steigung, die sich aus diesen Werten ergibt wurde wie unter 0 beschrieben, die Halbwertszeiten berechnet. Die Werte, welche nicht zur Berechnung der Steigung berücksichtigt wurden, sind in den Diagrammen durch offene Kreise symbolisiert.

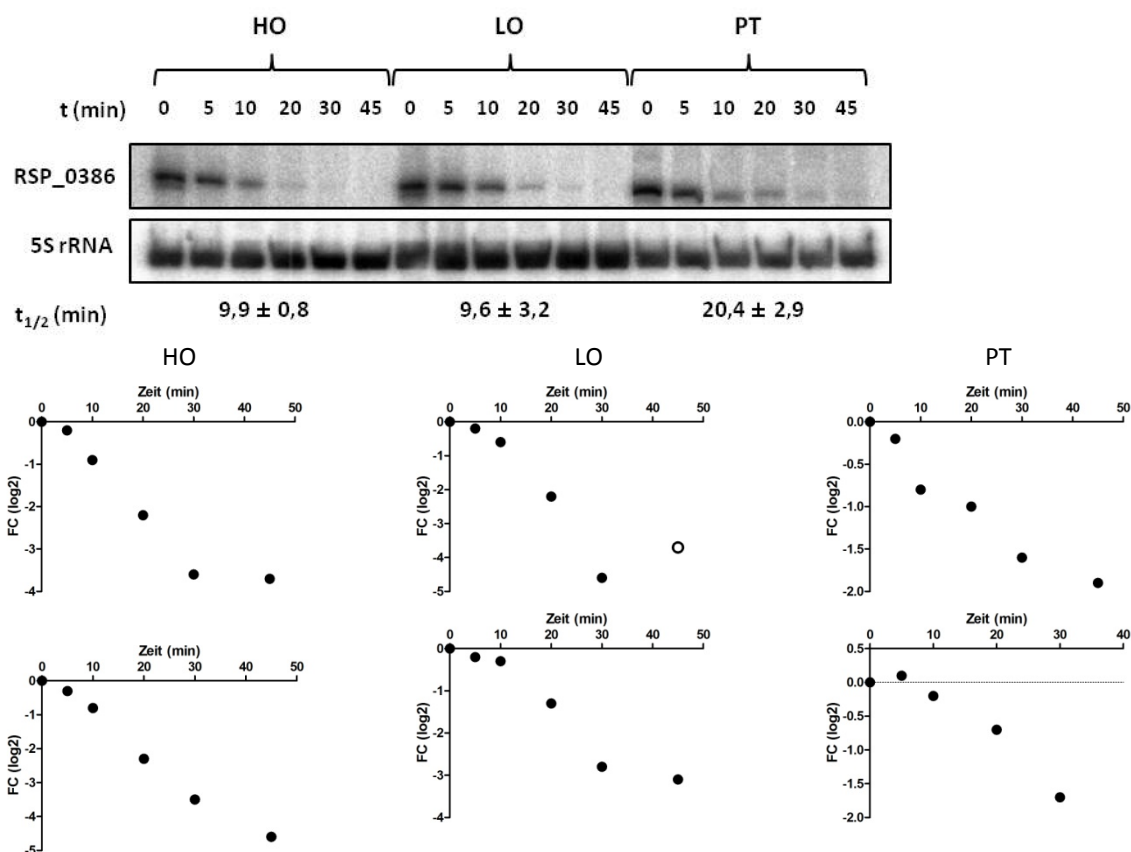


Abbildung 3.34: Ermittlung der Halbwertszeiten des Transkriptes von RSP_0386 unter aeroben, microaeroben und phototrophen Bedingungen mittels Northern blot. *R. sphaeroides* WT 2.4.1 Flüssigkulturen wurden unter aeroben (HO), microaeroben (LO) und phototrophen (PT) Bedingungen angezogen. In der exponentiellen Wachstumsphase wurde durch die Zugabe von 0,2 mg/ml Rifampicin die Transkription gestoppt. Folgend wurden Proben zu den Zeitpunkten 0, 5, 10, 20, 30 und 45 Minuten genommen, die Gesamt-RNA extrahiert und jeweils 20 µg RNA in einem 8% Polyacrylamid-Harnstoff-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und Nylonmembranen geblottet. Diese wurden mit einer transkriptspezifischen RNA-Sonde hybridisiert. Als Ladekontrolle diente das Signal einer 5S rRNA-spezifischen Sonde. Die *phosphoimaging*-Signale wurden anschließend quantifiziert und gegen die Signale der Ladekontrolle normalisiert. Für die Berechnung der Halbwertszeiten wurden dann die logarithmierten Verhältnisse [FC (log₂)] der normalisierten Werte der jeweiligen Zeitpunkte zum normalisierten Wert des Zeitpunktes 0 min gebildet. Aus diesen Werten, aufgetragen gegen die Zeit, wurde anschließend jeweils die Steigung berechnet. Die Halbwertszeit errechnete sich dann aus dem negativen Kehrwert der Steigung. In die Berechnung der Steigung flossen nur die Werte ein, die in etwa auf einer Geraden lagen (geschlossene Kreise), diejenigen, die stark abwichen wurden nicht berücksichtigt (offene Kreise). Die angegebenen Halbwertszeiten (t_{1/2}) sind Mittelwerte aus biologischen Duplikaten, der Fehler gibt die Abweichung vom Mittelwert an.

Für die Quantifizierung von RSP_0386 (Abbildung 3.34) wurde die obere Bande herangezogen, da die untere Bande bereits in der 5 min Probe nicht mehr detektierbar war. Für das Transkript wurden in den biologischen Duplikaten unter aeroben Bedingungen Halbwertszeiten von 10,8 min und 9,1 min errechnet, im Mittel 9,9 ± 0,8 min. Für die Berechnung der Steigung konnten in beiden Duplikaten alle Werte verwendet werden. Unter microaeroben Bedingungen ergaben sich 6,4 min und 12,8 min (9,6 ± 3,2 min), dabei zeigte in einem der Duplikate der Wert der 45 min Probe eine geringere Abnahme des Signals auf und wurde deshalb nicht zur Berechnung der Steigung mit einbezogen. Die Halbwertszeiten unter phototrophen Bedingungen betragen 23,3 min und 17,5 min (20,4 ± 2,9 min), auch hier lagen alle Werte zur Steigungsberechnung in etwa auf einer Geraden.

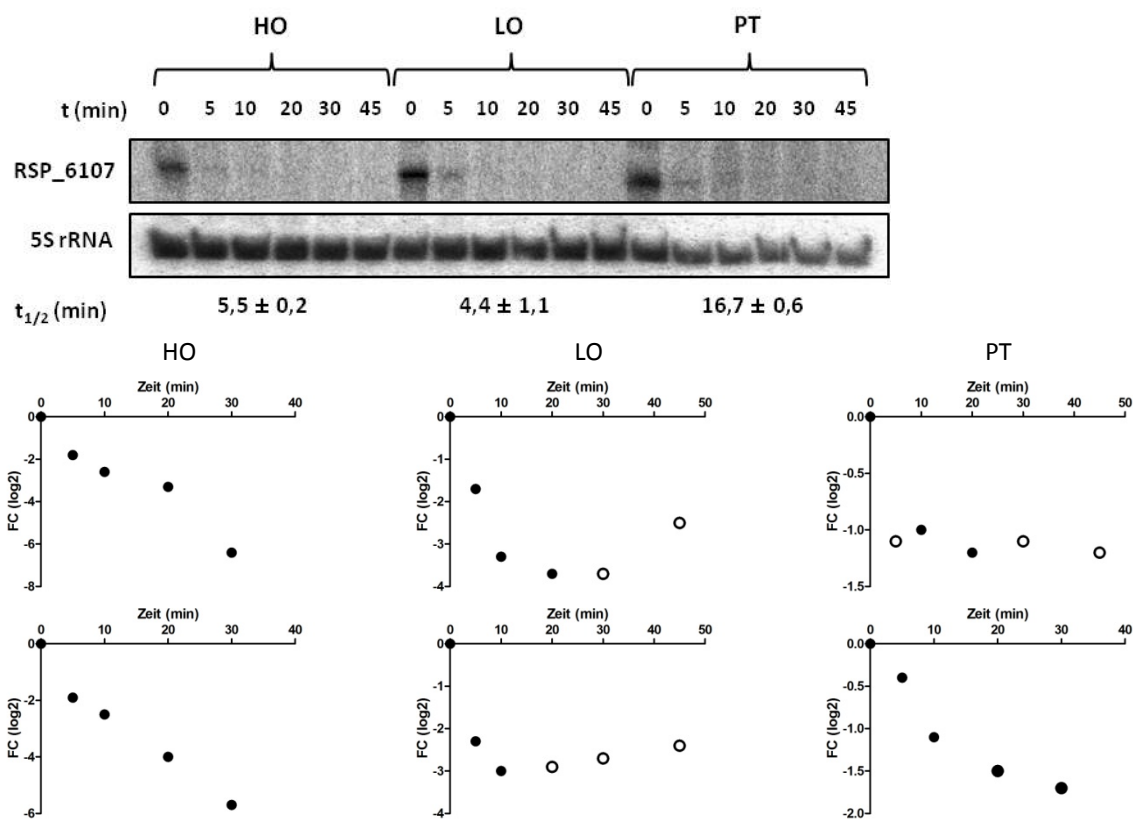


Abbildung 3.35: Ermittlung der Halbwertszeiten des Transkriptes von RSP_6107 unter aeroben, microaeroben und phototropen Bedingungen mittels Northern blot. *R. sphaeroides* WT 2.4.1 Flüssigkulturen wurden unter aeroben (HO), microaeroben (LO) und phototropen (PT) Bedingungen angezogen. In der exponentiellen Wachstumsphase wurde durch die Zugabe von 0,2 mg/ml Rifampicin die Transkription gestoppt. Folgend wurden Proben zu den Zeitpunkten 0, 5, 10, 20, 30 und 45 Minuten genommen, die Gesamt-RNA extrahiert und jeweils 20 µg RNA in einem 8% Polyacrylamid-Harnstoff-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und Nylonmembranen geblottet. Diese wurden mit einer transkriptspezifischen RNA-Sonde hybridisiert. Als Ladekontrolle diente das Signal einer 5S rRNA-spezifischen Sonde. Die *phosphoimaging*-Signale wurden anschließend quantifiziert und gegen die Signale der Ladekontrolle normalisiert. Für die Berechnung der Halbwertszeiten wurden dann die logarithmierten Verhältnisse [FC (log₂)] der normalisierten Werte der jeweiligen Zeitpunkte zum normalisierten Wert des Zeitpunktes 0 min gebildet. Aus diesen Werten, aufgetragen gegen die Zeit, wurde anschließend jeweils die Steigung berechnet. Die Halbwertszeit errechnete sich dann aus dem negativen Kehrwert der Steigung. In die Berechnung der Steigung flossen nur die Werte ein, die in etwa auf einer Geraden lagen (geschlossene Kreise), diejenigen, die stark abwichen wurden nicht berücksichtigt (offene Kreise). Die angegebenen Halbwertszeiten (t_{1/2}) sind Mittelwerte aus biologischen Duplikaten, der Fehler gibt die Abweichung vom Mittelwert an.

Deutlich zu erkennen war eine schnelle Abnahme der Bande von RSP_6107 (Abbildung 3.35). Hierfür ergaben sich Halbwertszeiten von 5,3 min und 5,7 min (5,5 ± 0,2 min) unter aeroben, sowie 5,5 min und 3,3 min (4,4 ± 1,1 min) unter microaeroben Bedingungen. Für die Berechnung der Steigung konnten aus dem aeroben Datensatz alle FC-Werte verwendet werden, für die microaeroben Proben hingegen konnten nur die FC-Werte nach 5, 10 und für ein Duplikat 20 min herangezogen werden, da die Werte der späteren Zeitpunkte geringere Abnahmen aufzeigten, was somit wieder einer Zunahme entspräche. Unter phototropen Bedingungen war das Transkript mit Halbwertszeiten von 16,1 min und 17,3 min (16,7 ± 0,6 min) stabiler. Für ein Duplikat konnten alle FC-Werte zur Berechnung der Steigung genutzt werden, im anderen Fall fielen jedoch der 5 min-Wert, sowie die 30- und 45 min-Werte heraus.

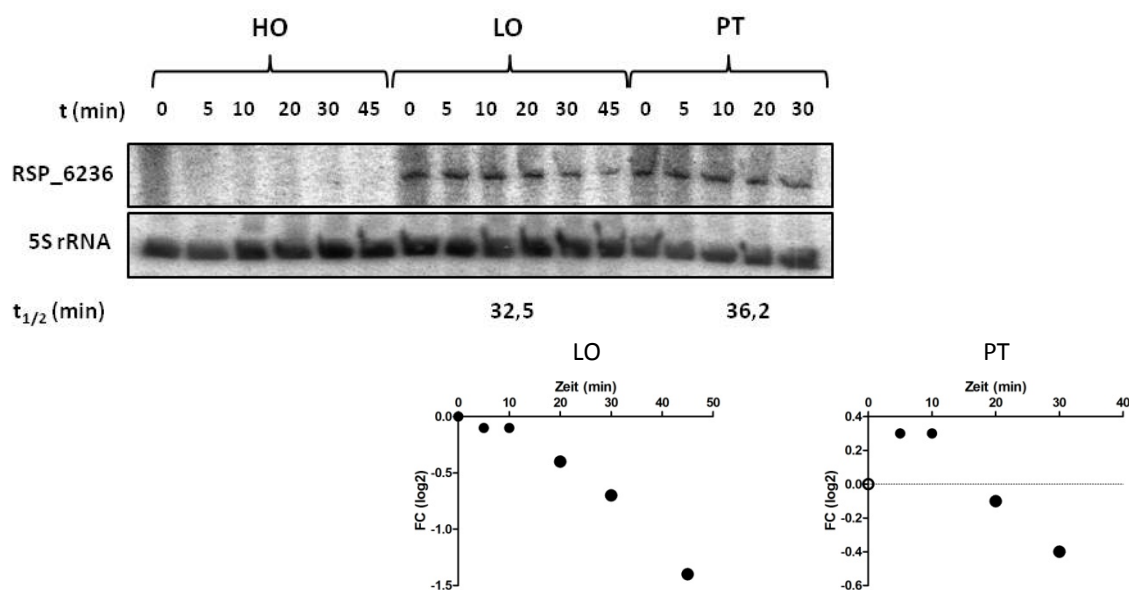


Abbildung 3.36: Ermittlung der Halbwertszeiten des Transkriptes von RSP_6236 unter aeroben, microaeroben und phototrophen Bedingungen mittels *Northern blot*. *R. sphaeroides* WT 2.4.1 Flüssigkulturen wurden unter aeroben (HO), microaeroben (LO) und phototrophen (PT) Bedingungen angezogen. In der exponentiellen Wachstumsphase wurde durch die Zugabe von 0,2 mg/ml Rifampicin die Transkription gestoppt. Folgend wurden Proben zu den Zeitpunkten 0, 5, 10, 20, 30 (und 45) Minuten genommen, die Gesamt-RNA extrahiert und jeweils 20 µg RNA in einem 8% Polyacrylamid-Harnstoff-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nylonmembranen geblottet. Diese wurden mit einer transkriptspezifischen RNA-Sonde hybridisiert. Als Ladekontrolle diente das Signal einer 5S rRNA-spezifischen Sonde. Die *phosphoimaging*-Signale wurden anschließend quantifiziert und gegen die Signale der Ladekontrolle normalisiert. Für die Berechnung der Halbwertszeiten wurden dann die logarithmierten Verhältnisse [FC (log₂)] der normalisierten Werte der jeweiligen Zeitpunkte zum normalisierten Wert des Zeitpunktes 0 min gebildet. Aus diesen Werten, aufgetragen gegen die Zeit, wurde anschließend jeweils die Steigung berechnet. Die Halbwertszeit errechnete sich dann aus dem negativen Kehrwert der Steigung. In die Berechnung der Steigung flossen nur die Werte ein, die in etwa auf einer Geraden lagen (geschlossene Kreise), diejenigen, die stark abwichen wurden nicht berücksichtigt (offene Kreise). Die angegebenen Halbwertszeiten ($t_{1/2}$) sind Mittelwerte aus biologischen Duplikaten, der Fehler gibt die Abweichung vom Mittelwert an.

Wie auch aus den Microarray Daten ließen sich durch *Northern blot* keine Daten für RSP_6236 unter aeroben Bedingungen gewinnen, das Transkript war hier nicht detektierbar (Abbildung 3.36). Erkennbar war jedoch eine hohe Stabilität des Transkriptes unter microaeroben und phototrophen Bedingungen, da die Bandenintensität im *phosphoimage* kaum abnahm. Nach der Quantifizierung ergaben sich Halbwertszeiten von 32,5 min unter microaeroben Bedingungen und 36,2 min unter phototrophen. Es existierten für die *Northern blot* Analyse lediglich Einzelwerte, da das Transkript nur in einem der biologischen Duplikate auf der Membran zu detektieren war. Für die microaeroben Werte war eine stete Abnahme der Signale über den gesamten Probenzeitraum zu beobachten. Unter phototrophen Bedingungen zeigte sich jedoch zuerst ein positives Verhältnis der Werte nach 5 und 10 min im Vergleich zum 0 min-Wert. Durch Weglassen des 0 min-Wertes jedoch war eine konstante Abnahme der FC-Werte zu beobachten, weswegen für die Berechnung der Steigung nur diese Werte verwendet wurden.

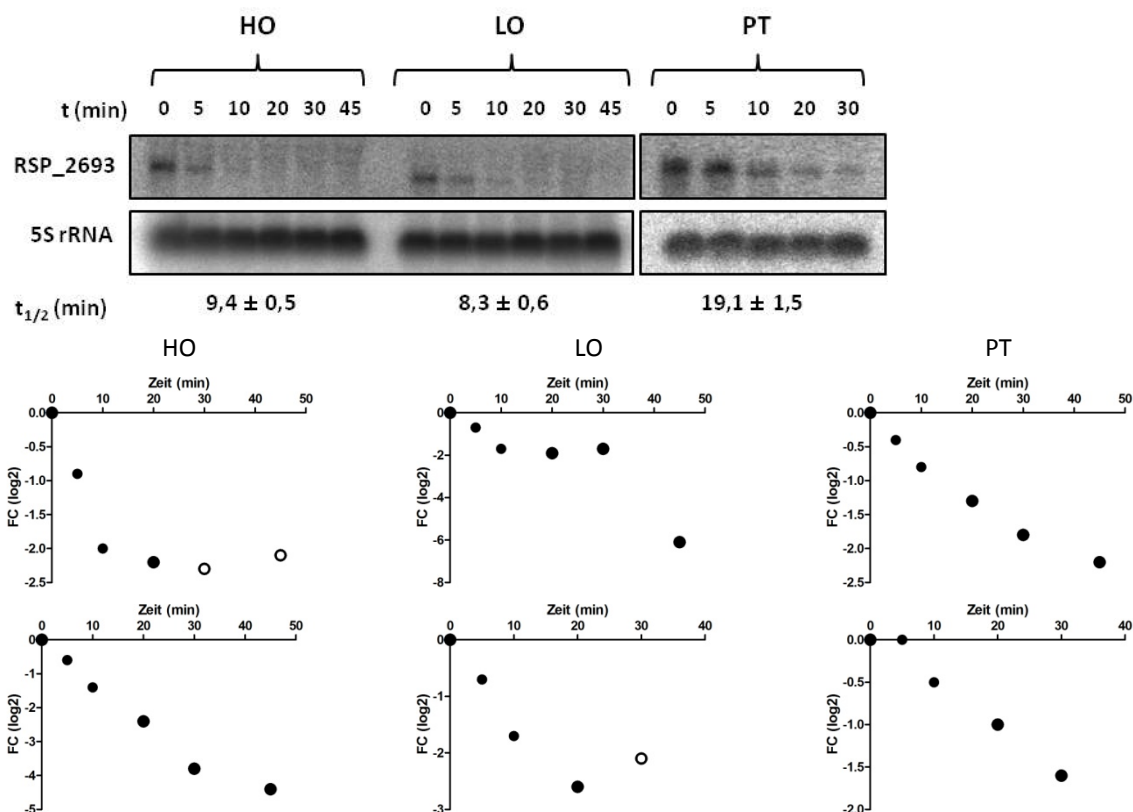


Abbildung 3.37: Ermittlung der Halbwertszeiten des Transkriptes von RSP_2693 unter aeroben, microaeroben und phototrophen Bedingungen mittels Northern blot. *R. sphaeroides* WT 2.4.1 Flüssigkulturen wurden unter aeroben (HO), microaeroben (LO) und phototrophen (PT) Bedingungen angezogen. In der exponentiellen Wachstumsphase wurde durch die Zugabe von 0,2 mg/ml Rifampicin die Transkription gestoppt. Folgend wurden Proben zu den Zeitpunkten 0, 5, 10, 20, 30 und 45 Minuten genommen, die Gesamt-RNA extrahiert und jeweils 20 µg RNA in einem 1% Agarose-Formaldehyd-Gel aufgetrennt und auf Nylonmembranen geblottet. Diese wurden mit einer transkriptspezifischen DNA-Sonde hybridisiert. Als Ladekontrolle diente das Signal einer 5S rRNA-spezifischen Sonde. Die *phosphoimaging*-Signale wurden anschließend quantifiziert und gegen die Signale der Ladekontrolle normalisiert. Für die Berechnung der Halbwertszeiten wurden dann die logarithmierten Verhältnisse der normalisierten Werte [FC (log₂)] der jeweiligen Zeitpunkte zum normalisierten Wert des Zeitpunktes 0 min gebildet. Aus diesen Werten, aufgetragen gegen die Zeit, wurde anschließend jeweils die Steigung berechnet. Die Halbwertszeit errechnete sich dann aus dem negativen Kehrwert der Steigung. In die Berechnung der Steigung flossen nur die Werte ein, die in etwa auf einer Geraden lagen (geschlossene Kreise), diejenigen, die stark abwichen wurden nicht berücksichtigt (offene Kreise). Die angegebenen Halbwertszeiten ($t_{1/2}$) sind Mittelwerte aus biologischen Duplikaten, der Fehler gibt die Abweichung vom Mittelwert an.

Wie oben beschrieben zeigten sich für RSP_2693 zwei Banden auf der *Northern blot* Membran. Bei Betrachtung der Halbwertszeiten Membranen zeigte sich jedoch, dass nur die untere Bande auf etwa 600 nt Höhe auch durch Zugabe von Rifampicin an Intensität verlor. Die Berechnungen der Halbwertszeiten wurden folglich für diese Banden durchgeführt (Abbildung 3.37). So errechneten sich für das Transkript Halbwertszeiten von 8,9 min und 9,9 min ($8,3 \pm 0,6$ min) unter aeroben Wachstumsbedingungen. Hierfür wurden bei einem Duplikat die FC-Werte der Zeitpunkte 30 und 45 min zur Steigungsberechnung weggelassen. Für microaerobe Bedingungen ergaben sich Halbwertszeiten von 8,8 min und 7,7 min ($8,3 \pm 0,6$ min). Für eines der Duplikate lagen keine Werte für die 45 min Probe vor und der Wert der 30 min Probe zeigte eine geringere Abnahme als nach 20 min und wurde somit nicht berücksichtigt. Das Transkript hatte unter phototrophen Bedingungen Halbwertszeiten von 20,5 min und 17,6 min ($19,1 \pm 1,5$ min). Für diesen Datensatz konnten in beiden Duplikaten alle FC-Werte zur Steigungsberechnung verwendet werden.

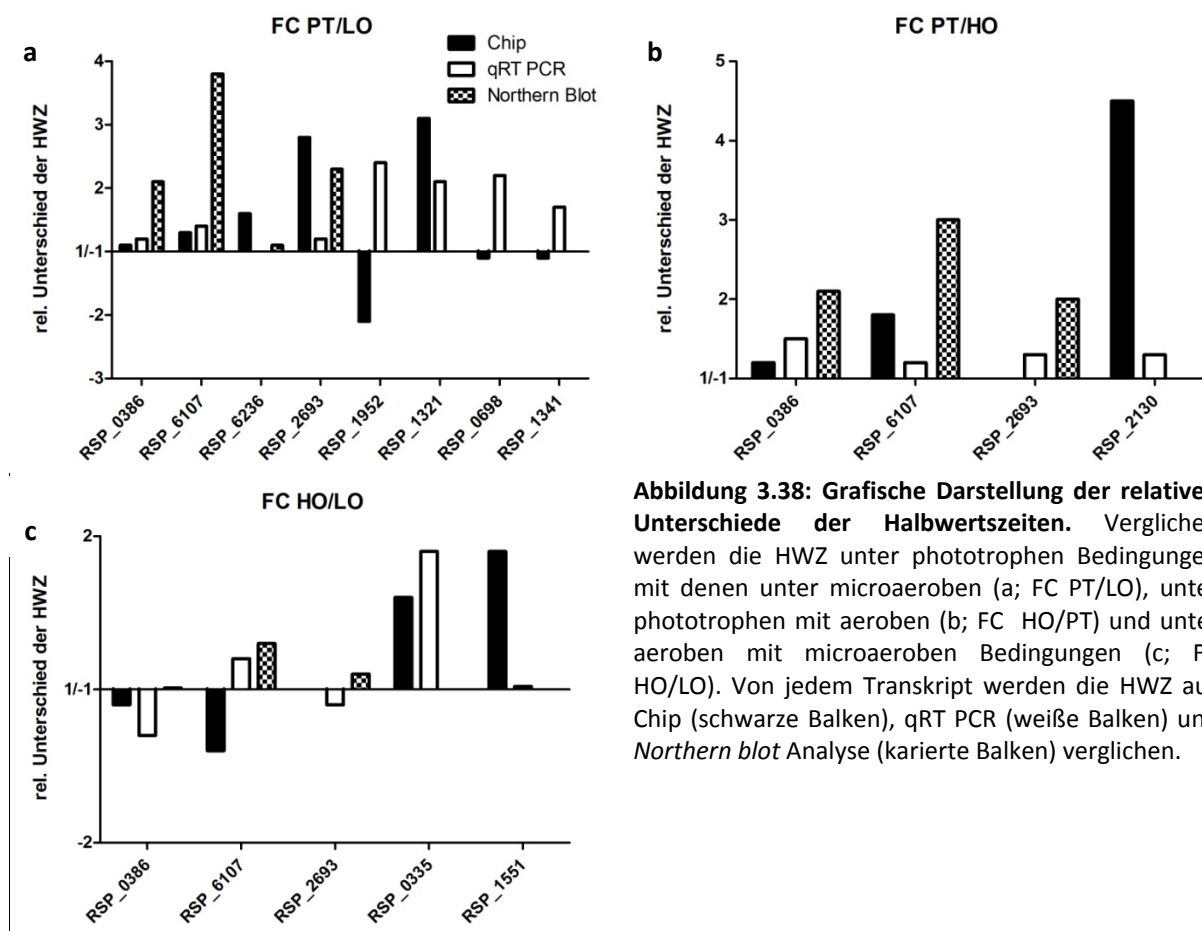
Für diejenigen Gene, deren Transkripte nicht auf *Northern blot* Membranen detektiert werden konnten, wurden die mRNA Halbwertszeiten mittels *real time* RT-PCR (qRT PCR) ermittelt, wie unter 2.5.3 beschrieben. Auch hier wurden die Halbwertszeiten aus biologischen Duplikaten berechnet. Tabelle 3-31 zeigt eine Zusammenfassung der mit allen drei Methoden bestimmten Halbwertszeiten der Transkripte der elf ausgewählten Gene unter den drei untersuchten Bedingungen. Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, lagen nicht für alle Gene/Transkripte Daten vor (leere Felder). Im Falle der Microarrays war dies darauf zurückzuführen, dass entweder eines oder beide Duplikate für die jeweilige Bedingung negative Halbwertszeiten lieferten und somit nicht auswertbar waren oder die Halbwertszeiten der Duplikate waren zu unterschiedlich und wichen mehr als 25% vom Mittelwert ab.

Es ist zu erkennen, dass die aus den qRT PCR Daten errechneten Halbwertszeiten teilweise erheblich kürzer waren als die aus den Microarraydaten und den *Northern blots*. Die längsten Halbwertszeiten wurden mit Ausnahme von RSP_6236 in den Microarrays bestimmt. Im Vergleich etwas kürzer waren die Werte aus der *Northern blot* Analyse.

Tabelle 3-31: Vergleich der Halbwertszeiten ermittelt durch Microarrays, qRT-PCR und *Northern blot*. Angegeben sind die mittleren Halbwertszeiten unter den Bedingungen aerob (HO), microaerob (LO) und phototroph (PT) ermittelt durch Microarray (Chip), qRT PCR und *Northern blot*. Angaben in Minuten, Mittelwerte aus biologischen Duplikaten, Fehler geben die Mittelabweichung an. Bei leeren Feldern existieren keine Daten (siehe Text).

	HO			LO			PT		
	Chip	qRT PCR	<i>Northern blot</i>	Chip	qRT PCR	<i>Northern blot</i>	Chip	qRT PCR	<i>Northern blot</i>
RSP_0386	20,2	5,2 ±0,1	9,9 ±0,8	21,6	6,5 ±0,8	9,6 ±3,2	24,6	7,5 ±1,1	20,4 ±2,9
RSP_6107	22,2	3,3 ±0,1	5,5 ±0,2	31,0	2,7 ±0,05	4,4 ±1,1	39,0	3,9 ±0,3	16,7 ±0,6
RSP_6236				16,3		32,5	26,5		36,2
RSP_2693		5,9 ±0,9	9,4 ±0,5	20,4	6,5 ±0,6	8,3 ±0,6	57,5	7,6 ±0,4	19,1 ±1,5
RSP_1551	29,8	5,2 ±2,5		15,7	5,1 ±0,2			10,6 ±0,9	
RSP_1952		4,9 ±0,5		42,9	3,0 ±0,1		20,6	7,2 ±2,0	
RSP_0335	38,5	4,8 ±1,0		24,4	2,5 ±0,04			4,9 ±0,8	
RSP_2130	6,1	3,9 ±0,2			2,6 ±0,03		27,6	5,2 ±0,7	
RSP_1321		4,2 ±0,1		14,3	2,3 ±0,1		43,8	4,8 ±0,6	
<i>fliR1</i>									
RSP_0698		5,4 ±0,8		28,9	2,6 ±0,1		26,2	5,6 ±0,5	
<i>fnrL</i>									
RSP_1341		4,7 ±0,7		20,6	3,6 ±0,7		18,6	6,1 ±0,2	
<i>rpsT</i>									

Ein direkter Vergleich der so ermittelten Halbwertszeiten stellte sich als schwierig dar. Aus diesem Grund wurden für eine leichtere Vergleichbarkeit die Verhältnisse der Halbwertszeiten (FC; *fold change*) unter den unterschiedlichen Bedingungen gebildet. Verglichen wurden hierfür jeweils die Halbwertszeiten unter phototrophen Bedingungen mit denen unter microaeroben (PT/LO) bzw. aeroben (PT/HO) und Halbwertszeiten unter aeroben mit microaeroben Bedingungen (HO/LO). Dies geschah jeweils für die Daten aus Microarray, qRT PCR und *Northern blot*. Die Ergebnisse dieser Vergleiche sind in Abbildung 3.38 dargestellt.



Beim Vergleich der relativen Unterschiede der Halbwertszeiten der RSP_0386 mRNA unter phototrophen Bedingungen mit den Halbwertszeiten unter microaeroben Bedingungen (Abbildung 3.38 a), erkannte man in allen drei Untersuchungsmethoden dieselbe Tendenz, dass das Transkript unter phototrophen Bedingungen langlebiger war als unter microaeroben Bedingungen. Dieses Ergebnis fiel im Microarray Ergebnis mit einer 1,1-fachen Zunahme am geringsten aus, in den qRT PCR Daten war eine 1,2-fache Veränderung zu verzeichnen. Am stärksten war die Zunahme in der *Northern blot* Berechnung, hier war die Halbwertszeit unter phototrophen Bedingungen mit einem Wert von 2,1 doppelt so lange wie unter microaeroben. Ein ähnliches Bild ergab sich beim Vergleich der phototrophen Halbwertszeiten mit denen unter aeroben Bedingungen (Abbildung 3.38 b). Auch hier war das RSP_0386 Transkript bei phototrophen Wachstum stabiler. Die mittels *Northern blot* bestimmten Halbwertszeiten lieferten auch hier wieder mit einem Wert von 2,1 eine mehr als doppelt so lange Halbwertszeit. Mit qRT PCR ermittelte sich ein Wert von 1,5, im Microarray lag die Veränderung bei 1,2. Vergleicht man die Halbwertszeiten unter aeroben Bedingungen mit denen unter microaeroben (Abbildung 3.38 c), so zeigte sich unter aeroben Bedingungen eine geringere Stabilität. Im Microarray war die Halbwertszeit des Transkriptes mit einem Wert von -1,1 nahezu unverändert, in der qRT PCR 1,3-fach kürzer und im *Northern blot* zeigte sich keine Veränderung. Beide Methoden bestätigten folglich auch hier die durch die Microarrays ermittelten Tendenzen. Für die mRNA von RSP_6107 ergab sich unter phototrophen Bedingungen eine ebenfalls verlängerte Halbwertszeit im Vergleich zu microaeroben Bedingungen (Abbildung 3.38 a). Für die relativen Unterschiede der Halbwertszeiten errechneten sich hier Werte von 1,3 im Chip, 1,4 in der qRT PCR und 3,8 im *Northern blot*. Beim Vergleich phototroph mit aerob (Abbildung 3.38 b) bestätigten sich ebenfalls die Tendenzen der Daten der Microarray Analyse einer um 1,8-fach längeren Halbwertszeit

unter phototrophen Bedingungen. Die qRT PCR wies hier einen 1,2-fachen Unterschied auf, die *Northern blot* Analyse einen 3-fachen. Nicht bestätigen hingegen ließ sich die Tendenz der Daten für den Vergleich von aeroben mit microaeroben Bedingungen (Abbildung 3.38 c). Die Microarraydaten zeigten hier eine 1,4-fach verkürzte Halbwertszeit unter aeroben Bedingungen. Sowohl qRT PCR als auch *Northern blot* zeigten hier ein umgekehrtes Verhältnis. So war die Halbwertszeit des Transkriptes unter aeroben Bedingungen 1,2-fach (qRT PCR) bzw. 1,3-fach (*Northern blot*) länger. Die Daten aus den Microarrays bestätigten sich für RSP_6107 somit nur zum Teil.

Da für RSP_6236 unter aeroben Bedingungen keine Daten vorlagen, ließen sich folglich nur die Unterschiede der phototrophen zu microaeroben Halbwertszeiten berechnen (Abbildung 3.38 a). Hier standen auch nur Daten aus der *Northern blot* Analyse für eine Verifizierung zur Verfügung. Die Daten aus den Microarrays wurden durch die *Northern blots* tendenziell gestützt. So war die Halbwertszeit unter phototrophen Bedingungen in den Microarray Daten 1,6-fach länger. Der *Northern blot* zeigte hier mit einer 1,1-fach längeren Halbwertszeit zwar nur einen marginalen, aber tendenziell ähnlichen Unterschied auf.

Auch für RSP_2693 waren keine Daten für aerobe Bedingungen aus den Microarrays verfügbar. Eine Validierung der Ergebnisse konnte hier nur für das Verhältnis der Halbwertszeiten unter phototrophen gegenüber denen unter microaeroben Bedingungen erfolgen. Laut diesen Daten war die Halbwertszeit des Transkriptes bei phototrophen Wachstum 2,8-fach länger als bei microaerobem (Abbildung 3.38 a). Dies wurde vor allem durch die *Northern blot* Daten bestätigt, hier zeigte sich eine 2,3-fach längere Halbwertszeit. Die qRT PCR Ergebnisse bestätigten diesen Befund tendenziell mit einer 1,2-fach längeren Halbwertszeit. Die Abbildung 3.38 b und c zeigen nun, wie sich die errechneten Verhältnisse aus qRT PCR und *Northern blot* in Bezug auf dieses Transkript zueinander verhielten. Beim Vergleich der Halbwertszeiten unter phototrophen Bedingungen zu aeroben zeigten beide Methoden dieselbe Tendenz; hier war das Transkript unter phototrophen Bedingungen mit einem Verhältnis der Halbwertszeiten von 1,3 und 2,0 langlebiger als unter aeroben Bedingungen. Beim Vergleich der unter aeroben Bedingungen ermittelten Halbwertszeiten zu den unter microaeroben zeigten sich zwischen qRT PCR und *Northern blot* nur sehr geringfügige Veränderungen. Die qRT PCR zeigte hier eine um 1,1-fach verminderte Halbwertszeit unter aeroben Bedingungen, die *Northern blot* Analyse wies eine 1,1 verlängerte Halbwertszeit auf. Was die Daten der Microarrays angeht, konnten hier beide alternativen Methoden die Tendenz bestätigen. Untereinander verglichen zeigten beide Datensätze eine ähnliche Tendenz.

Nicht bestätigt werden konnte das Verhältnis der Halbwertszeiten der RSP_1952 mRNA. Diese war laut den Chip Daten unter phototrophen Bedingungen weniger stabil als unter microaeroben, hier zeigte sich eine 2,1-fach verringerte Halbwertszeit (Abbildung 3.38 a). Wie bereits erwähnt, war eine Überprüfung mittels *Northern blot* nicht möglich. Die qRT PCR zeigte hier jedoch mit einer 2,4-fach längeren Halbwertszeit ein entgegengesetztes Verhältnis.

Ebenso wenig ließen sich die Verhältnisse der Halbwertszeiten der RSP_0698 und RSP_1341 Transkripte unter phototrophen und microaeroben Bedingungen bestätigen (Abbildung 3.38 a). Hier waren laut Microarrays geringfügig kürzere Halbwertszeiten unter phototrophen Bedingungen verzeichnet worden (jeweils -1,1-fach). Die qRT PCR Daten zeigten hingegen mit 2,2- und 1,7-fach längeren Halbwertszeiten in eine andere Richtung.

Das Transkript von RSP_1551 zeigte beim Vergleich der Daten aus den Microarrays unter aeroben Bedingungen mit denen unter microaeroben eine knapp doppelt so lange Halbwertszeit (1,9-fach; Abbildung 3.38). Die qRT PCR Daten zeigten diesbezüglich keinen Unterschied. Für phototrophe Bedingungen waren keine Daten verfügbar.

Durch qRT PCR konnte hingegen der Befund bestätigt werden, dass das Transkript von RSP_1321 unter phototrophen Bedingungen eine mehr als doppelt so lange Halbwertszeit aufwies wie unter microaeroben Bedingungen (Abbildung 3.38 a). Die Microarrays zeigten hier eine 3,1-mal längere Halbwertszeit, bestätigt durch eine 2,1-mal längere in den qRT PCR Daten.

Tendenziell bestätigen ließ sich das Verhältnis der Halbwertszeiten der mRNA von RSP_2130 verglichen unter phototrophen Bedingungen mit aeroben (Abbildung 3.38 b). Die Daten aus den Microarray zeigten hier eine 4,5-mal längere Halbwertszeit unter phototrophen Bedingungen. Die qRT PCR Daten gingen hier in dieselbe Richtung, wenn auch mit einem Wert von 1,3 nur schwach.

Bestätigt werden konnte der relative Unterschied der Halbwertszeiten des RSP_0335 Transkriptes unter aeroben und microaeroben Bedingungen (Abbildung 3.38 c). Laut Microarrays war die Halbwertszeit unter phototrophen Bedingungen 1,6-mal länger als unter microaeroben. Ein Wert von einer 1,9-fach verlängerten Halbwertszeit, bestimmt mittels qRT PCR bestätigte dies.

Die oben beschriebenen Beobachtungen sind in Abbildung 3.39 nochmals in Form einer *heatmap* zusammengefasst. Konnte das tendenzielle Verhältnis der Halbwertszeit eines Transkriptes unter einer Wachstumsbedingung verglichen mit der unter einer anderen, wie es mit den Daten aus den Microarrays berechnet wurde, durch qRT PCR und oder *Northern blot* verifiziert werden, so ist dies in der *heatmap* grün dargestellt. Konnte das Ergebnis nicht bestätigt werden, erscheint dies rot. Konnte ein Verhältnis der Halbwertszeiten nicht gebildet werden, da im Microarray für eine der beiden verglichenen Bedingungen keine Daten vorlagen, ist dies schwarz dargestellt. Eine Ausnahme für diesen Fall besteht darin, wenn für diese Bedingungen Halbwertszeiten sowohl mit qRT PCR als auch mit *Northern blot* berechnet werden konnten. Ein positives Ergebnis erscheint in diesem Fall hellgrün, bzw. hellrot bei negativem Ausgang (s. RSP_2693 in Abbildung 3.39).

Für vier der elf ausgesuchten Transkripte, RSP_1551, RSP_1952, RSP_0692 und RSP_1341, konnten die Verhältnisse der Halbwertszeiten zueinander nicht bestätigt werden. Für alle übrigen sieben mRNAs konnten die Ergebnisse der Microarrays in einer oder mehreren der untersuchten Kategorien (PT/LO, PT/HO, HO/LO) bestätigt werden. Für RSP_6107 konnte das Verhältnis der Halbwertszeiten von phototroph zu microaerob (PT/LO) und phototroph zu aerob (PT/HO) bestätigt werden, nicht so das Verhältnis von aerob zu microaerob. Das PT/LO Verhältnis der Halbwertszeiten des RSP_2693 Transkriptes bestätigte sich ebenso. Im Falle der mRNA von RSP_2693 konnte ebenfalls das PT/LO Verhältnis der Halbwertszeiten bestätigt werden. Aus den Microarray standen keine Daten für aerobe Wachstumsbedingungen zur Verfügung, beim Vergleich der qRT PCR und *Northern blot* Daten jedoch konnte mit beiden Methoden ein tendenziell ähnliches PT/HO Verhältnis berechnet werden, nicht jedoch das HO/LO Verhältnis.

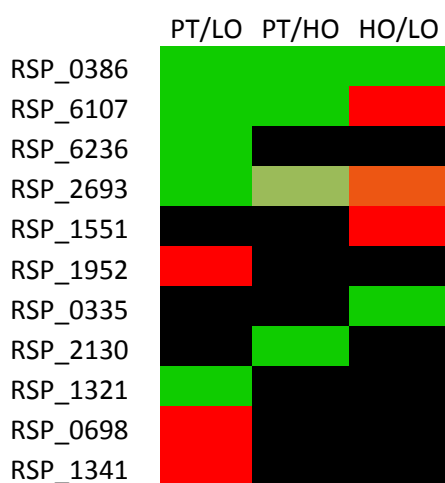


Abbildung 3.39: Darstellung der Validierungsergebnisse in Form einer *heatmap*. Ließen sich die aus den Microarraydaten bestimmten Verhältnisse der Halbwertszeiten mittels qRT PCR und/oder *Northern blot* verifizieren, erscheint dies in der *heatmap* für das jeweilige Gen grün. Konnte das Ergebnis nicht bestätigt werden, erscheint das Feld rot. Leicht Grün bzw. leicht Rot zeigt eine positive (grün) bzw. negative (rot) Übereinstimmung der qRT PCR und *Northern blot* Daten. Schwarz: keine Daten vorhanden.

Die jeweils aus den Microarrays berechenbaren Verhältnisse der Halbwertszeiten der Transkripte von RSP_0335 (HO/LO), RSP_2130 (PT/HO) und RSP_1321 (PT/LO) konnten ebenfalls bestätigt werden.

4. DISKUSSION

4.1. AUFARBEITUNG DER ROHDATEN

Für die Normalisierung der Rohdaten wurden wie unter 2.4.7 und 3.1 beschrieben zwei Methoden verwendet. Zum einen eine Median-basierte und zum anderen eine Normalisierungsmethode, die auf RNA *spike-ins* beruhte. Bei der Betrachtung der MM- und MA-Plots zeigten sich dann recht deutliche Unterschiede zwischen beiden Methoden, sodass für alle weiterfolgenden Analysen die Median-normalisierten Daten verwendet wurden, da hier die R^2 -Werte sämtlich höher lagen.

Warum die RNA *spike-in* Normalisierung nicht zu einem zufriedenstellenden Ergebnis geführt hat, liegt unter Umständen darin begründet, dass für eine gleichmäßige Normalisierung zu wenige Datenpunkte zur Verfügung standen. Dies würde die sehr ungleichmäßige Verteilung der Datenpunktwolken in den SIN MA-Plots erklären.

Das Vorhandensein und Zustandekommen der mitunter deutlich erkennbaren *cluster* unterhalb der Hauptwolke in einigen MA-Plots, welche bei beiden Normalisierungsmethoden auftraten, ist schwer zu erklären. Wie aus der Analyse der Sonden, die zu diesen Signalen geführt haben hervorgeht, handelt es sich dabei nicht um einen genspezifischen Satz an Sonden und es ist in den meisten Fällen auch nur eine Sonde pro Gen. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass diese Signale auf Kontrollspots des Microarrays zurückgehen und eine Zuordnung der Signale zu den jeweiligen Sonden durch die *feature extraction* Software von Agilent fehlerhaft verlaufen ist. Andererseits könnte der *slide* von der falschen Seite eingelesen worden sein, was zu einer Vertauschung der Signale geführt hätte und die Zuordnung aus diesem Grund nicht korrekt durchgeführt werden konnte (Dr. B. Samans, persönliche Kommunikation). Diese Erklärung kann jedoch nahezu ausgeschlossen werden, wie aus den Qualitätsreports der *feature extraction* Software hervorgeht, wo unter anderem die Anpassung des Koordinatensystems der Sonden (das sogenannte *grid*) an die *spots* auf jedem Array überprüft wird (Daten nicht gezeigt). Dieses Argument bekräftigt auch die gute Soll-Ist-Wert Korrelation der RNA *spike-ins*, die mit R^2 -Werten über 0,8 in allen Arrays in hohen Bereichen lagen. Bei einer falschen Zuordnung bzw. eines fehlerhaften Scans wäre eine solche Korrelation nicht möglich.

4.2. HALBWERTSZEITEN IN RHODOBACTER SPHAEROIDES

Bei der Berechnung der Transkripthalbwertszeiten in *R. sphaeroides* unter den drei Wachstumsbedingungen aerob, microaerob und phototroph zeigte sich eine große Bandbreite an Halbwertszeiten. Die kürzesten Halbwertszeiten wurden für einige Transkripte mit unter fünf Minuten berechnet, die längsten mit über 60 Minuten. Der überwiegende Teil der Transkripte hatte Halbwertszeiten im Bereich von 15 bis 30 Minuten (siehe Tabelle 3-4) und unter allen drei Bedingungen lagen die Mediane zwischen 21 und 22 Minuten (siehe Tabelle 3-1). Aus diesen Beobachtungen lässt sich schlussfolgern, dass zum einen die in dieser Arbeit durch Microarrays bestimmten Halbwertszeiten vergleichsweise lang sind und dass zum anderen zwischen den drei untersuchten Bedingungen bei globaler Betrachtung kein deutlicher Unterschied in den Halbwertszeiten feststellbar ist.

Im Kontext früherer Transkriptomstudien zur Ermittlung von mRNA Halbwertszeiten in diversen anderen Organismen, sind diese hier ermittelten Halbwertszeiten für Prokaryoten als sehr lang anzusehen. Die durchschnittliche Transkriptstabilität in Prokaryoten liegt ungefähr bei fünf Minuten,

wie in einigen Studien der letzten Jahre gezeigt wurde. Für den Gram negativen Modellorganismus *E. coli* wurden mittels Microarrays Halbwertszeiten zwischen einer und 18 Minuten berechnet, mit Mittelwerten im Bereich von fünf Minuten (Bernstein et al., 2002). Ebenfalls in dieser Größenordnung lagen die Halbwertszeiten der mRNAs in der frühen stationären Phase im Gram positiven Modellorganismus *Bacillus subtilis*, hier lag der Median der Halbwertszeiten bei fünf Minuten (Hambraeus et al., 2003). Noch kürzere Halbwertszeiten mit einem Median von nur 2,5 Minuten wurden für *Bacillus cereus* mittels RNA Sequenzierung bestimmt (Kristoffersen et al., 2012). Ähnliche kurze Halbwertszeiten konnten im langsam wachsenden marinen Cyanobakterium *Prochlorococcus* bestimmt werden (Steglich et al., 2010). Wiederum etwas längere Halbwertszeiten zeigten sich mit Medianen von 5,3 und 5,1 Minuten in den Archeen *Sulfolobus solfataricus* und *Sulfolobus acidocaldarius* (Andersson et al., 2006) und mit zehn Minuten in *Halobacterium salinarum* (Hundt et al., 2007). Eine mittlere Halbwertszeit von 9,5 Minuten zeigten ebenfalls die Transkripte in *Mycobacterium tuberculosis* in der exponentiellen Wachstumsphase (Rustad et al., 2013). Ein Extrembeispiel für kurze Halbwertszeiten stellt mit einem Median von unter einer Minute sicherlich *Streptococcus pyogenes* dar (Chen et al., 2013).

Mit den genannten Median Halbwertszeiten von über 20 Minuten bewegt sich *R. sphaeroides* in etwa im Bereich der Halbwertszeiten wie sie für den Eukaryoten *Saccharomyces cerevisiae* bestimmt wurden (Wang et al., 2002).

Dadurch dass zwischen den drei unterschiedlichen Bedingungen bei globaler Betrachtung keine Unterschiede in der mittleren Halbwertszeit beobachtet wurden, zeigt sich, dass die Wachstumsbedingungen keinen Einfluss auf die Stabilität des Transkriptom als Ganzes haben. So ist unter keiner Bedingung eine generelle Stabilisierung bzw. Destabilisierung des Transkriptom auszumachen.

Bei der Betrachtung der großen Datenmenge an Halbwertszeiten von mehreren Tausend Transkripten würden veränderte Halbwertszeiten von nur wenigen Transkripten keinen erkennbaren Einfluss auf die mittlere Halbwertszeit unter einer Bedingung haben. Auch kann die Auswirkung der Wachstumsbedingung bei dieser globalen Betrachtung maskiert sein, wenn z.B. einerseits einige Transkripte stabilisiert und andererseits andere Transkripte destabilisiert sind.

Dieser Befund schließt also insgesamt nicht aus, dass nicht doch individuelle Transkripte in ihrer Halbwertszeit beeinflusst sein können.

Bei Betrachtung der durch die Microarrays errechneten Halbwertszeiten und der durch *Northern blot* und qRT PCR ermittelten, fällt auf, dass die im beschriebenen Kontext langen Halbwertszeiten in den Microarraydaten womöglich ihre Ursache in der Methode haben. Aus den in Tabelle 3-31 gelisteten Daten wird deutlich, dass zwischen den durch die drei Methoden ermittelten Halbwertszeiten teils erheblich Unterschiede herrschen. Dabei fällt auch auf, dass auch die Methoden der qRT PCR und des *Northern blots* durchaus nicht unbedingt zum selben Ergebnis führen, womit ein rein auf die Microarrays zurückzuführender, methodischer Effekt auszuschließen ist. Vielmehr wird aus diesen Daten deutlich, dass alle drei Methoden einen eigenen Effekt auf das letztendliche Ergebnis haben und die errechneten Halbwertszeiten folglich vornehmlich nur qualitativ zu betrachten sind, da eine direkte, quantitative Vergleichbarkeit damit nicht gegeben ist (siehe auch Abschnitt 3.3 und 4.3).

In früheren Studien deckten sich die durch Microarrays und *Northern blot*, sowie qRT PCR ermittelten Halbwertszeiten relativ gut (Bernstein et al., 2002, Andersson et al., 2006). Es ist jedoch kein unbekanntes Phänomen, dass Halbwertszeiten, die auf Microarraydaten basieren teilweise länger sein können als solche, die auf *Northern blot*- oder qRT PCR-Analysen zurückgehen (Hambraeus et al.,

2003, Hundt et al., 2007, Steglich et al., 2010). Eine mögliche Erklärung dieses Befundes kann eine Übersättigung der Signale im Microarray durch sehr stark exprimierte Gene sein, wie Steglich et al. vermuten. Dafür spricht der auch in dieser Arbeit gemachte Befund, dass solche Gene, die dem A-Wert nach zu urteilen sehr abundant sind, tendenziell zu einer geringeren Veränderung führen. Dies zeigt sich vor allem in den MA-Plots (Abbildung 3.1, Abbildung 3.2, Abbildung 3.3) darin, dass die Wolken in den höheren A-Wert-Bereichen abflachen, was einen geringeren M-Wert zur Folge hat. Dieser Effekt kann unter Umständen auch durch den Vorgang der Normalisierung verstärkt werden. Hambraeus et al. erklären die Diskrepanzen von teilweise doppelt so langen Halbwertszeiten im Microarray als im *Northern blot* dadurch, dass es während der RNA Degradation zu einer Akkumulation von Abbauprodukten kommen kann, sodass neben der mRNA voller Länge auch die Abbauprodukte theoretisch detektiert werden (Hambraeus et al., 2003). Im *Northern blot* wird hingegen nur das mRNA Fragment mit voller Länge quantifiziert. Dass es zu solchen Abbauprodukten kommt, erkennt man auch bei den in dieser Arbeit mittels *Northern blot* überprüften mRNAs (siehe Abbildung 3.32). Besonders im *phosphoimage* von RSP_0386 fallen neben dem Hauptfragment mehrere kürzere Fragmente auf. Am deutlichsten ist hier ein nur geringfügig kürzeres Abbauprodukt (Abbildung 3.34). In diesem Fall ist es nicht unwahrscheinlich, dass auch dieses Fragment im Microarray detektiert wird, was zu einer möglichen Verzerrung der ermittelten Halbwertszeit führen kann. Dass die Diskrepanz zwischen qRT PCR und Microarray-ermittelten Daten eine methodische Ursache hat, argumentieren auch Esquerré et al. Mittels qRT PCR wird die Halbwertszeit eines mRNA Moleküls nur anhand eines kleinen Bereiches von etwa 100 nt bestimmt, während im Microarray mehrere, längere Sonden genutzt werden, die einen größeren Bereich des Transkriptes abdecken. Dies kann unter Umständen zu Unterschieden in der Berechnung der Halbwertszeiten führen (Esquerre et al., 2014). Eine mögliche unspezifische Kreuzhybridisierung eines stabileren Transkriptes an Sonden auf dem Microarray könnte ebenfalls längere Halbwertszeiten in den Microarraydaten erklären.

Ein Grund, warum sich die Halbwertszeiten aus Microarray- und qRT PCR-Daten so stark unterscheiden, ist womöglich auch darauf zurückzuführen, dass Ratios, die aus qRT PCR-Daten errechnet werden, erfahrungsgemäß größer sind als solche, die auf Microarraydaten zurückgehen. Dieser Effekt wurde bei den in der AG Klug genutzten *R. sphaeroides* Microarrays bereits mehrmals beobachtet (Peuser et al., 2011, Mank et al., 2012). Da die Halbwertszeiten aus Steigungen hervorgehen, welche wiederum aus den Ratios berechnet werden (siehe 2.5) führen die verhältnismäßig höheren Ratios in der qRT PCR zu steileren Steigungen, was folglich zu kürzeren Halbwertszeiten führt. Die Ratios in den Microarrays fallen geringer aus, demnach sind die Steigungen flacher und somit die Halbwertszeiten länger.

Tatsächlich ist bekannt, dass die Level an Veränderungen durch Microarrays generell geringer ausfallen (Yuen et al., 2002, Morey et al., 2006). Gründe für eine zu gering eingeschätzte Veränderung können auf einen höheren Hintergrund im Microarray zurückzuführen sein, oder auf unspezifische Hybridisierungen, was eine Überschätzung der nicht induzierten Transkripte zur Folge hätte, bzw. auf Sättigungseffekte der Sonden, was möglicherweise dazu führt, dass der Level an Induktion unterschätzt wird.

4.2.1. HALBWERTSZEITEN IN BEZUG AUF DIE FUNKTION

Frühere Studien zeigten, dass eine mögliche Korrelation zwischen der Halbwertszeit eines Transkriptes und der Funktion des Genproduktes bestehen könnte (Bernstein et al., 2002, Selinger et al., 2003, Andersson et al., 2006, Hundt et al., 2007, Steglich et al., 2010). Aus diesem Grund wurden wie unter 3.2.1 beschrieben alle Gene basierend auf ihrer Zugehörigkeit zu einer funktionellen Gruppe in Kategorien eingeteilt. Von allen Halbwertszeiten der Transkripte einer Kategorie wurde in einem ersten Schritt wieder der Median gebildet (Abschnitt 3.2.2.1). Der Vergleich der Mediane aller funktionellen Kategorien ist in Abbildung 3.4 gezeigt. Wie hieraus ersichtlich ist, wichen auch innerhalb einer Bedingung die Mediane der COG Kategorien vom globalen Median nur um etwas mehr als eine Minute ab. Die deutlichsten Unterschiede sowohl zwischen den Kategorien unter einer Bedingung als auch im Vergleich zu den anderen Bedingungen beliefen sich auf unter drei Minuten. Demnach waren auch bei dieser differenzierteren Betrachtung keine deutlichen Unterschiede sowohl innerhalb einer Wachstumsbedingung als auch zwischen den drei Wachstumsbedingungen festzustellen. Diesen Ergebnissen nach zu urteilen folgen daraus zwei Dinge: Zum einen sind in *R. sphaeroides* die Transkripte einer funktionellen Kategorie nicht insgesamt stabiler bzw. instabiler als die einer anderen funktionellen Kategorie. Zum anderen führen unterschiedliche Wachstumsbedingungen auch nicht zu einer generellen De- bzw. Stabilisierung aller Transkripte einer funktionellen Kategorie.

Das Ergebnis der Median-Untersuchung lässt jedoch noch keine Rückschlüsse auf die Stabilität einzelner Transkripte zu und auch keine Aussage darüber, ob unter den drei Wachstumsbedingungen einige Transkripte einer Kategorie lang- und andere kurzlebiger sind. Wie schon bei der Betrachtung der globalen Medianwerte erwähnt, können solche Effekte bei der Betrachtung vieler Daten kaschiert sein. Dies kann auf insgesamt zu wenige Transkripte, die in ihrer Stabilität beeinflusst sind zurückgehen, oder aber auch auf eine gewisse Kompensation, wenn einige Transkripte de- und andere stabilisiert werden.

Auf Grund dieses maskierenden Charakters einer Untersuchung des globalen Mittelwertes bzw. der Mediane wurde folgend überprüft, ob eine bestimmte Gruppe an Halbwertszeiten, eingeteilt in vier gleich große Gruppen von je 15 Minuten, in einer Kategorie möglicherweise über- oder unterrepräsentiert war (Abschnitt 3.2.2.2). Dadurch sollte ein erster Eindruck erhalten werden, wie sich die Halbwertszeiten in den einzelnen Kategorien verteilen und ob eventuell Transkripte mit beispielsweise eher kurzen Halbwertszeiten vermehrt einer bestimmten Kategorie zugeordnet werden können. Bei dieser Überprüfung zeigten sich nun leichte Tendenzen und Unterschiede sowohl zwischen den Kategorien unter einer Bedingung als auch zwischen den Bedingungen.

Eine ausführlichere Betrachtung, wie sich die Halbwertszeiten dann in den einzelnen Kategorien unter jeder Bedingung verteilen, erfolgte in Abschnitt 3.2.2.3. Hierfür wurden alle Halbwertszeiten jeder Kategorie in Intervalle von je fünf Minuten eingeteilt, sodass die Anzahl an Transkripten mit einer Halbwertszeit in diesem Intervall dann Aufschluss über die Verteilung gab. Wie aus den Medianwerten und den prozentualen Anteilen bereits zu schließen war, zeigte sich bei der Verteilung der Halbwertszeiten, dass die überwiegende Zahl an Transkripten Halbwertszeiten zwischen 15 und 30 Minuten hatten. Unterschiede zeigten sich hier in den Kategorien meist nur dahingehend, in welchem der drei Zeitintervalle von 15 bis 30 Minuten die meisten Transkripte vertreten waren.

Generell ließ sich aber die Tendenz erkennen, dass sich in denjenigen Kategorien mit Überrepräsentation kurzer Halbwertszeiten die meisten Transkripte im Bereich zwischen 15 und 20 Minuten und ebenfalls vergleichsweise viele in den Intervallen darunter zeigten. Dies findet man

beispielsweise in den Kategorien J und F unter aeroben Bedingungen. Solche Kategorien, die eine Überrepräsentation langer Halbwertszeiten aufwiesen und somit eher stabilere Transkripte beinhalten, zeigten Tendenzuell, dass die meisten Transkripte eher in den Halbwertszeitenbereichen zwischen 20 und 30 Minuten zu finden waren.

Wie schon durch die prozentualen Anteile der Halbwertszeiten erkennbar war, führten microaerobe Bedingungen zu sehr vielen Transkripten mit einer Halbwertszeit zwischen 15 und 30 Minuten. Auch aus den Halbwertszeitenprofilen war ersichtlich, dass unter dieser Bedingung sowohl deutlich weniger Transkripte mit sehr kurzen Halbwertszeiten als auch sehr wenige Transkripte mit sehr langen Halbwertszeiten auftraten. So waren in fast der Hälfte der Kategorien keine Halbwertszeiten unter zehn Minuten zu erkennen und in vielen ebenfalls nur eine sehr geringe Zahl an Transkripten mit hohen Halbwertszeiten. Folglich zeigten sich in den allermeisten Kategorien die Mehrheit der Transkripte in den Halbwertszeitenbereichen zwischen 15 und 30 Minuten mit teils großem Abstand zu der Anzahl in den anderen Intervallen, deutlichste Beispiele hierzu sieht man in den Kategorien N und U.

Jedoch waren unter microaeroben Bedingungen anhand der Profile ebenfalls keine deutlichen Unterschiede zwischen den Kategorien zu erkennen

Im Vergleich zu microaeroben ließ sich unter aeroben und phototrophen Bedingungen hingegen bereits durch die prozentualen Anteile als auch durch die Halbwertszeitenprofile erkennen, dass die Bandbreite der Halbwertszeiten nahezu in allen Kategorien größer war. Halbwertszeiten von unter zehn bis über 60 Minuten kamen in vielen Kategorien unter beiden Bedingungen vor. Die Unterschiede in der Verteilung der Halbwertszeiten waren jedoch sowohl unter phototrophen als auch unter aeroben Bedingungen zwischen den einzelnen Kategorien nicht so stark, als dass eindeutige Unterschiede deutlich herausstachen.

Transkripte mit kurzen Halbwertszeiten sind beispielsweise in *E. coli* solchen funktionellen Kategorien wie der Aminosäuresynthese zugeordnet (Bernstein et al., 2002). Diese würde der Kategorie E „Aminosäuretransport und Metabolismus“ entsprechen. Diese Kategorie war jedoch unter keiner Bedingung in *R. sphaeroides* auffällig. Solche Transkripte von Genen, die mit dem Aufbau und der Erhaltung der Zellhülle (entspricht Kategorie M) in Verbindung stehen, waren in *E. coli* überdurchschnittlich stabil. In *R. sphaeroides* waren die Transkripte in dieser Kategorie dahingehend ebenfalls nicht auffallend. Unter microaeroben Bedingungen zeigte sich hingegen eine leichte Unterrepräsentation der kurzen Halbwertszeiten bis 15 Minuten.

In *Prochlorococcus* und *E. coli* ebenfalls als eher stabile Transkripte beschrieben, sind solche von Genen der Translation, und in *E. coli* ebenfalls der posttranslationalen Modifikation (Selinger et al., 2003, Steglich et al., 2010), also Kategorien J und O. In Anbetracht der Überrepräsentation langlebiger Transkripte in *R. sphaeroides* in Kategorie J unter phototrophen Bedingungen und der ausschließlich photoautotrophen Lebensweise von *Prochlorococcus* könnte hier ein Zusammenhang bestehen. Damit übereinstimmend waren Transkripte mit Halbwertszeiten zwischen 15 und 30 Minuten im aeroben Datensatz überrepräsentiert. Anhand der Verteilung der Halbwertszeiten konnte dieser Trend unter phototrophen Bedingungen für *R. sphaeroides* jedoch nicht eindeutig bestätigt werden.

Der Verteilung nach zu urteilen, tendierten die Transkripte in Kategorie J eher zu kürzeren Halbwertszeiten. In *Halobacterium salinarum* und *Sulfolobus solfataricus* wurden damit in Übereinstimmung ebenfalls eher kurze Halbwertszeiten der Transkripte in dieser Kategorie beschrieben (Andersson et al., 2006, Hundt et al., 2007). Die tendenziell eher kürzeren Halbwertszeiten der Transkripte in Kategorie J in *R. sphaeroides* unter aeroben Bedingungen und die

positive Korrelation mit den in *H. salinarum* und *S. solfataricus* gemachten Beobachtungen steht ebenfalls in Einklang mit der obligat aeroben Lebensweise von *H. salinarum*.

Bezüglich der posttranslationalen Modifikation konnte sich dies unter phototrophen Bedingungen ebenfalls nur anhand der Überrepräsentation der langlebigen Transkripte in dieser Kategorie bestätigen. Dahingehende Auffälligkeiten waren unter aeroben und microaeroben Bedingungen nicht zu beobachten.

Andersson et al. machten 2006 in ihrer Studie mit *S. solfataricus* und *S. acidocaldarius* die generelle Beobachtung, dass Transkripte, die Proteine kodieren, welche an wachstumsrelevanten Prozessen beteiligt sind, z. B. Transkription, tRNA Synthese, Translation und zentrale metabolische Prozesse generell schneller abgebaut wurden, während solche, die an der Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase, wie beispielsweise Ionentransport etc. eher stabil waren. Die längsten Halbwertszeiten stellten sie in der Kategorie des anorganischen Ionentransportes fest. Unter aeroben Bedingungen war in *R. sphaeroides* der Anteil an Transkripten mit Halbwertszeiten zwischen 30 und 45 Minuten dem auch entsprechend ebenfalls überdurchschnittlich hoch.

Zu den in der Literatur als eher instabil beschriebenen Transkripten zählen zudem auch solche aus den Kategorien des Energiemetabolismus (Kategorie C) und der Signaltransduktion (Kategorie T) (Andersson et al., 2006, Hundt et al., 2007). Unter aeroben und phototrophen Bedingungen waren hingegen die sehr stabilen Transkripte mit Halbwertszeiten von 45 bis 60 Minuten überrepräsentiert. Bei der Verteilung zeigten sich unter allen Bedingungen die meisten Transkripte im Bereich zwischen 20 und 25 Minuten, die zweitmeisten zwischen 15 und 20 Minuten. Auch dahingehend waren die Transkripte in dieser Kategorie nicht als auffällig kurzlebig anzusehen. Auf den Verteilungen unter den einzelnen Bedingungen basierend, kann die Aussage getroffen werden, dass es unter aeroben Bedingungen eher zu vermehrt kurzen Halbwertszeiten kam, unter phototrophen Bedingungen eher zu längeren.

Wie sich aus diesen Vergleichen zeigt, ist ein Interspezies-Vergleich in Bezug auf ein ähnliches Muster, welche Transkripte aus welchen funktionellen, metabolischen Gruppen ähnliche Halbwertszeiten aufweisen, recht schwierig. Aus den hier aufgeführten Studien und den Daten aus dieser Arbeit ist ersichtlich, dass es diesbezüglich teilweise doch zu recht deutlichen Unterschieden zwischen den Spezies kommt, was nicht zuletzt sicherlich auch den unterschiedlichen Wachstumsbedingungen geschuldet ist. Dass die Wachstumsbedingungen einen Einfluss auf die Transkripthalbwertszeiten haben, ist bereits aus den hier diskutierten Daten hervorgegangen. Der folgende Abschnitt behandelt den direkten Vergleich der Halbwertszeiten unter jeweils zwei Wachstumsbedingungen.

4.2.2. EINFLUSS DER WACHSTUMSBEDINGUNG AUF DIE TRANSKRIPTHALBWERTSZEITEN

Wie aus Tabelle 3-5 und Tabelle 3-1 hervorgeht, reduzierte sich beim direkten Vergleich der Transkripte, für die unter jeweils zwei Bedingungen Halbwertszeiten berechnet wurden, die Anzahl an Transkripten pro Vergleich nochmals etwas. Mit über 800 Transkripten pro Vergleich war die Anzahl jedoch immer noch groß genug, um eine verlässliche Aussage treffen zu können. Es ist aber zu beachten, dass durch die reduzierte Anzahl in einigen Kategorien nicht alle Transkripte berücksichtigt sind, welche bei den Einzelbetrachtungen noch mit einbezogen wurden. So kann es in manchem Fällen zu Tendenzen kommen, deren Aussage nicht unbedingt einen generellen Trend widerspiegeln

muss. Beispielhaft wäre hier die Kategorie J zu nennen; im Vergleich PT/HO (Abbildung 3.11) sieht man hier unter phototrophen Bedingungen keine Halbwertszeit länger als 40 Minuten, unter aeroben Bedingungen schon. Jedoch ist aus dem PT/LO Vergleich bereits ersichtlich, dass es durchaus Transkripte mit längeren Halbwertszeiten im phototrophen Datensatz gibt, was sich auch durch die Einzelbetrachtung (Abbildung 3.5) bestätigt.

Wie bereits im Abschnitt 3.2.3.1 kurz zusammengefasst, zeigte sich beim Vergleich der Halbwertszeiten unter phototrophen und microaeroben Bedingungen, dass phototrophe Wachstumsbedingungen im direkten Vergleich zu mehr kürzeren Halbwertszeiten führten als microaerobe Bedingungen. Es zeigte sich zudem aber auch, dass es ebenfalls zu etwas mehr Transkripten mit langen Halbwertszeiten über 30 Minuten kam. Dementsprechend hatten die Transkripte unter microaeroben Bedingungen vermehrt Halbwertszeiten im mittleren Bereich zwischen 15 und 30 Minuten. Dies bestätigt auch in diesem Vergleich die bereits beschriebene Beobachtung, dass phototrophes Wachstum zu einer größeren Bandbreite an Halbwertszeiten führte. Am deutlichsten zeigte sich dies im direkten Vergleich in den Kategorien D, V, U und Q und spiegelt damit auch die Befunde der Einzelbetrachtungen wider. Beim Vergleich mit den Halbwertszeiten unter aeroben Bedingungen zeigte sich, wie auch bei den Einzelbetrachtungen gesehen, eine recht ähnliche Verteilung. Unter beiden Bedingungen gab es ähnlich viele Transkripte mit kurzen Halbwertszeiten und ebenfalls einige Transkripte mit langen Halbwertszeiten. Unterschiede zwischen phototrophen und aeroben Wachstumsbedingungen zeigten sich in den Kategorien J, T, H und I, in denen unter aeroben Bedingungen tendenziell eher längere Halbwertszeiten zu beobachten waren. Umgekehrt zeigten sich unter phototrophen Bedingungen längere Halbwertszeiten in den Kategorien L, D und V. Verglich man die Verteilung der Halbwertszeiten unter aeroben und microaeroben Bedingungen, zeichnete sich ein ähnliches Bild wie beim PT/LO Vergleich, dass unter aeroben Bedingungen eine größere Bandbreite an Halbwertszeiten auftraten und microaerobe Bedingungen wie gesehen zu vermehrt Halbwertszeiten zwischen 15 und 30 Minuten führten.

Demnach sind zusammengefasst die Kategorien D, L, V, J, T, H, U und I von Interesse.

4.2.2.1. HALBWERTSZEITEN IN ABHÄNGIGKEIT VON DER WACHSTUMSRATE – KATEGORIEN L UND D

Die Kategorien L „DNA Replikation, Rekombination, Reparatur“ und D „Zellteilung“ können dahingehend zusammen betrachtet werden, da sie im Grunde mit der Wachstumsrate in Zusammenhang stehen. Die Geschwindigkeit, mit der sich Bakterien teilen, ist durch die metabolische Aktivität beeinflusst, welche unter anderem maßgeblich von den Umweltbedingungen abhängt.

Die drei in dieser Arbeit beschriebenen Wachstumsbedingungen aerob, microaerob und phototroph haben, maßgeblich durch die verschiedenen Arten des Energiestoffwechsels, einen Einfluss auf die Wachstumsrate von *R. sphaeroides*. Durch die aerobe Atmung steht am meisten Energie zur Verfügung und die Zellen wachsen und teilen sich hierbei am schnellsten. *R. sphaeroides* zeigt unter aeroben Wachstumsbedingungen in der exponentiellen Phase eine Verdopplungszeit von etwa 2,5 Stunden. Unter microaeroben Bedingungen ist sie mit ca. drei Stunden etwas langsamer, hier steht zwar immer noch Sauerstoff zur Atmung zur Verfügung, jedoch deutlich weniger als unter aeroben Bedingungen. Am langsamsten wächst *R. sphaeroides* unter phototrophen Bedingungen, da hier lediglich anoxygene Photosynthese betrieben wird. Die Generationszeit ist bei der verwendeten

Lichtintensität hier mit sechs bis acht Stunden mehr als doppelt so lange wie unter den beiden anderen Bedingungen.

Dass die Wachstumsrate einen Einfluss auf die Stabilität von Transkripten hat, ist bereits mehrfach beschrieben worden. Tatsächlich ist die Regulation der mRNA Degradation ein effizientes Mittel, sich an wechselnde Umweltbedingungen anzupassen. So ist es gerade unter Mangelbedingungen oder unter Bedingungen, die generell zu einer langsamen Wachstumsrate führen, für Zellen energieeffizienter, die Verfügbarkeit von Transkripten für die Translationsmaschinerie über die Transkripthalbwertszeit zu steuern, als über die aufwendige *de novo* Genexpression (Takayama & Kjelleberg, 2000).

Bereits 1984 wurde in *E. coli* der Effekt der Wachstumsrate auf die Halbwertszeiten von vier mRNA Spezies gezeigt. Dabei waren zwei der vier Transkripte deutlich von der Teilungsrate abhängig, die zwei anderen untersuchten Transkripte hingegen zeigten über ein breites Spektrum an Verdopplungszeiten hinweg eine konstant bleibende Halbwertszeit (Nilsson et al., 1984). Dies zeigte bereits damals, dass es möglich ist, die Syntheserate von bestimmten Proteinen über die Halbwertszeit des Transkriptes in Antwort auf die Veränderung der Wachstumsrate zu steuern. Auch für ein weiteres Transkript (*fumA*) konnte eine direkte Abhängigkeit der Halbwertszeit von der Wachstumsrate gezeigt werden (Lin et al., 2012). In beiden Publikationen erhöhte sich die Halbwertszeit mit steigender Teilungsrate. Der gegenteilige Effekt wurde in einer transkriptomweiten Studie in *Lactococcus lactis* beobachtet, hier nahm die Halbwertszeit bei abnehmender Wachstumsrate zu (Dressaire et al., 2013). In *M. tuberculosis* wurde ebenfalls eine Korrelation der mRNA Stabilitäten mit der Wachstumsrate beschrieben, so ging mit einer Verringerung der Wachstumsrate, hervorgerufen durch Temperaturabnahme oder Hypoxie, ebenfalls eine Zunahme der Halbwertszeiten einher (Rustad et al., 2013). In *E. coli* hingegen konnte auf Transkriptomebene zunächst kein Einfluss der Wachstumsrate auf die durchschnittliche Halbwertszeit der mRNAs festgestellt werden (Bernstein et al., 2002). Es konnte jedoch später ein Zusammenhang hergestellt werden. In kontinuierlich wachsenden *E. coli* Kulturen nahm der Median der Halbwertszeiten mit steigender Wachstumsrate ab. Dies zeigte, dass der mRNA Umsatz bei sehr niedrigen Teilungsraten ebenfalls langsamer ist (Esquerre et al., 2014). Die Destabilisierung vieler, jedoch nicht aller, Transkripte korrelierte in dieser Studie gut mit der hochregulierten Transkription von Genen, welche Komponenten der mRNA Degradationsmaschinerie kodieren.

Insgesamt konnte in bisherigen Studien also durchaus gezeigt werden, dass die Kontrolle der Transkriptstabilität eine wichtige Rolle in der Feinjustierung der Genexpression bei Veränderungen der Wachstumsgeschwindigkeit spielt.

Wie bereits Rustad et al. in *M. tuberculosis* beschrieben haben, sind besonders langlebige Transkripte nicht speziell einer funktionellen Kategorie zuzuordnen, sondern verteilen sich über ein breites Spektrum dieser Kategorien (Rustad et al., 2013). Wie in diesem Abschnitt einleitend erwähnt, zeigten sich in den Kategorien L, D, V und U unter phototrophen Bedingungen tendenziell längere Halbwertszeiten, wenn man diese mit den Halbwertszeiten unter aeroben Bedingungen verglich. Anders ausgedrückt stellt dieser Vergleich der Wachstumsbedingungen also auch einen Vergleich der Wachstumsraten dar. Wie auch schon in *M. tuberculosis* beschrieben, waren auch in *R. sphaeroides* die Transkripte des DNA-Stoffwechsels, also Replikation und insbesondere Reparatur und Rekombination betroffen.

In Kategorie L „DNA Replikation, Rekombination, Reparatur“ zeigten sich also unter phototrophen im Vergleich zu aeroben Bedingungen etwas mehr längere Halbwertszeiten. Dies war auch schon bei der

Überrepräsentation der kurzlebigeren Transkripte und der Unterrepräsentation der stabileren Transkripte unter aeroben Bedingungen beobachtet worden.

Den deutlichsten Unterschied zeigte das Transkript von RSP_2130 mit einer 4,5-fach längeren Halbwertszeit unter phototrophen Bedingungen gegenüber aeroben. RSP_2130 kodiert einen Sigma54-spezifischen Transkriptionsregulator der Fis-Familie, das Verhältnis der beiden Halbwertszeiten zueinander konnte ebenfalls in dieser Arbeit durch qRT-PCR bestätigt werden (Tabelle 3-31, Abbildung 3.39). Sigma Faktoren der Sigma54-Klasse benötigen im Gegensatz zu Sigma70-Faktoren eine ATP-abhängige Aktivierung, bevor dsDNA aufgeschmolzen werden kann und die Transkription beginnt (Wedel & Kustu, 1995). Viele Sigma54-abhängig transkribierte Genprodukte sind an der Stickstofffixierung beteiligt, jedoch gibt es fast ebenso viele Ausnahmen. In *E. coli* ist in etwa die Hälfte aller Sigma54-abhängigen Operons Teil des Stickstoffmetabolismus. Da Stickstofffixierung Energie und Intermediate des zentralen Metabolismus verbraucht, ist die andere Hälfte der Genprodukte der Sigma54-abhängig transkribierten Gene möglicherweise daran beteiligt, zu vermeiden, dass zu viele Energie- und Metabolitreserven verbraucht werden (Reitzer & Schneider, 2001). Wie erwähnt, benötigt die Transkription Sigma54-abhängiger Gene eine Aktivierung durch spezifische Transkriptionsaktivatoren. Diese Transkriptionsaktivatoren binden an spezifischen Sequenzen an die DNA und sind effektiv unabhängig von der Distanz und der Orientierung zum RNA-Polymerasekomplex und ähneln damit eukaryotischen *enhancer*-Elementen (Reitzer & Magasanik, 1986, Buck et al., 2000, Reitzer & Schneider, 2001). Die Aktivatoren interagieren mit Sigma54 von diesen Bindestellen aus. Diese Interaktion benötigt teilweise die Hilfe von DNA-biegenden Proteinen. Beispiele dieser DNA-Biegungsproteine in *E. coli* sind HU (*histone like protein*), IHF (*integration host factor*) und Fis. Fis wurde zuerst als „Faktor der Inversions-Stimulation“ (*factor for inversion stimulation*) der homologen ortsspezifischen Hin und Gin DNA-Rekombinase in *Salmonella* und Phage Mu identifiziert, erfüllt aber auch weitere Funktionen wie Transkriptionsaktivierung von rRNA und tRNA Operons, Repression der eigenen Synthese und *oriC*-gerichtete DNA-Replikation (Finkel & Johnson, 1992). Eine Bindung von Fis an DNA kann zu einer Beugung der DNA von 50-90° führen, was eine oben beschriebene Transkriptionsaktivierung erleichtern kann (Opel et al., 2004). Das RSP_2130 Protein enthält mehrere konservierte Domänen, die eine Funktion als *response regulator* nahelegen: eine CheY-ähnliche *receiver*-Domäne, welche von der zugehörigen Histidinkinase phosphoryliert wird, eine AAA+Superfamilie-ähnliche ATPase-Domäne (*ATPases Associated with a wide variety of cellular Activities*) und die beschriebene Fis-ähnliche DNA-bindende und -biegende Domäne (NCBI Gendatenbank). Im genetischen Kontext liegt RSP_2130, wie aus Abbildung 3.33 ersichtlich ist, eventuell in einem Operon mit RSP_2129, welches wiederum eine C4-Dicarboxylat-Transport Sensorhistidinkinase kodiert, welche zur NtrC Familie gehört. Ein ähnliches System wird ebenfalls von den Genen RSP_1611 (*dctB*, Sensorhistidinkinase) und RSP_1612 (*dctD*, *response regulator*) kodiert. Ein Alignment der Nukleotidsequenzen der vier Gene (RSP_2129 und RSP_1611, RSP_2130 und RSP_1612) ergab keine signifikante Ähnlichkeit (NCBI nBlast, (Zhang et al., 2000)), wodurch eine Genduplikation höchstwahrscheinlich ausgeschlossen ist. Da sich die Proteine jedoch in ihrer Funktion ähneln, besteht die Möglichkeit, dass es in *R. sphaeroides* zwei Systeme für eine ähnliche Aufgabe gibt.

Das Dicarboxylat Transportersystem (Dct) besteht aus dem Transporter DctA und dem Zwei-Komponenten-Regulationssystem DctB/DctD und ist für den Import von Dicarboxylaten wie Aspartat, Fumarat, Malat und Succinat verantwortlich. Diese Kohlenstoffverbindungen stellen wichtige Energie- und Kohlenstofflieferanten in sowohl aerobem als auch anaerobem Stoffwechsel dar. Bei aerobem Wachstum werden diese Substrate im TCA-Zyklus zu CO₂ oxidiert, bei anaerobem Wachstum dient beispielsweise Fumarat als terminaler Elektronenakzeptor bei der anaeroben

Atmung. Viele anaerobe, fermentierende Bakterien nutzen Dicarboxylate als einzige Energiequelle durch Decarboxylierung (Dimroth & Schink, 1998). In stickstofffixierenden Rhizobien stellt Succinat beispielsweise eines der effektivsten Substrate dar, die den energieaufwendigen Prozess der Stickstofffixierung deutlich steigern (Yurgel & Kahn, 2004). Über die Rolle des Dicarboxylat-Transportersystems gibt es in *R. sphaeroides* in der Literatur bisher jedoch noch keine Beispiele. Aus *Pseudomonas aeruginosa* ist jedoch bekannt, dass neben dem DctBDA-System jedoch ein zweites Dct-System vorhanden ist, das eine ähnliche Rolle erfüllt, der Transport jedoch ATP-unabhängig über TRAP-Transporter funktioniert, das DctPQM-System (Valentini et al., 2011). Dieses existiert ebenfalls in *R. sphaeroides* (RSP_1613 und RSP_1614). Der Transporter DctA scheint hingegen zu fehlen.

Welche physiologische Rolle nun das DctBDA/PQM- und das RSP_2129/RSP_2130 System in *R. sphaeroides* erfüllen, ist demnach offen. Halbwertszeiten zu den Transkripten RSP_1611-14 liegen jedoch nicht vor, wodurch hierzu keine Aussagen getroffen werden kann. Die deutlich erhöhte Halbwertszeit zumindest des mutmaßlichen *response regulators* RSP_2130 unter phototrophen Bedingungen spricht jedoch für eine möglicherweise verstärkte Translationsaktivität und damit eine größere Rolle im phototrophen, anaeroben Stoffwechsel und stellt eine interessantes Ziel für weitergehende Untersuchungen dar. Wie aus den RNA-seq Daten ersichtlich ist (Abbildung 3.33), liegt RSP_2130 möglicherweise unter der Kontrolle eines eigenen Promotors und besitzt einen eigenen Transkriptionsstart. Somit besteht die Möglichkeit, das über 1300 nt lange Fragment mittels *Northern blot* detektieren zu können. Wie aus den RNA-seq Daten ebenfalls ersichtlich ist, ist das Transkript jedoch nicht sehr abundant, zumindest unter microaeroben Bedingungen. Es besteht dahingehend jedoch die Vermutung, dass das RSP_2130 Transkript unter phototrophen Bedingungen neben der erhöhten Halbwertszeit auch eine höhere Abundanz aufweisen könnte, was eine Detektion mittels *Northern blot* vereinfachen würde. Eine *Northern blot* Analyse könnte ebenfalls Aufschluss über die Abundanz und die Halbwertszeit von RSP_2129 liefern.

Aufgrund der vermuteten Rolle im Dicarboxylatstoffwechsel ist eine Zuordnung zur Kategorie der DNA-Replikation, Rekombination und Reparatur jedoch eher zweifelhaft. RSP_2130 findet sich allerdings auch in den passenderen Kategorien K, T und E.

Unter phototrophen Bedingungen mit knapp 40 Minuten gegenüber zehn unter aeroben und knapp 20 unter microaeroben Bedingungen deutlich stabiler war in Kategorie L das Transkript von RSP_0665 *ftsH*. FtsH ist eine cytoplasmatische, ATP-abhängige Membranprotease. Diese Protease ist in vielen Bakterien konserviert und erfüllt mannigfaltige Aufgaben, von der Qualitätskontrolle von Membranproteinen, über Zellteilung bis hin zur Hitzestressantwort. In *E. coli* ist FtsH essentiell und hauptsächlich an der Lyse-Lysogenie-Entscheidung des Phagen λ und an der Hitzestressantwort beteiligt (Herman et al., 1995, Tomoyasu et al., 1995). In *Caulobacter crescentus* ist FtsH ebenfalls an der Hitzestressantwort beteiligt, spielt aber auch eine Rolle in der Entwicklung und im Zellzyklus. *ftsH*-Mutanten sind nicht in der Lage, den Stiel richtig auszubilden, zudem zeigen sie einen schweren Zellteilungsphänotyp. Ist FtsH nicht vorhanden, differenzieren sich Schwärmerzellen schneller in gestielte Zellen, wenngleich auch der gesamte Zellzyklus länger ist (Fischer et al., 2002). FtsH ist auch in *B. subtilis* unter anderem ebenfalls am Zellzyklus und an der Zellteilung beteiligt. Hier führte eine Deletion von *ftsH* zu filamentösem Wachstum und es konnte weiter gezeigt werden, dass während der Zellteilung FtsH am Septum zwischen zwei teilenden Zellen akkumuliert und sich in sporulierenden Zellen an den Zellpolen ansammelt (Wehrl et al., 2000). Neuere Studien schreiben FtsH ebenfalls eine Rolle bei der Biofilmbildung in *B. subtilis* und *Lactobacillus plantarum* zu (Bove et al., 2012, Yepes et al., 2012).

Die Rolle von FtsH in *R. sphaeroides* ist bisher nicht untersucht worden. Laut RNA-seq Daten hat *ftsH* einen eigenen Transkriptionsstart und liegt höchstwahrscheinlich monocistronisch vor. Unter microaeroben Bedingungen liegen im Tex-behandelten Datensatz ca. 140 *reads* vor, was eine Überprüfung mittels *Northern blot* womöglich schwierig gestalten könnte (zur Erklärung der Tex-Behandlung siehe Abschnitt 3.3). Die Tatsache, dass aber das *ftsH* Transkript mit abnehmender Wachstumsrate und von aeroben über microaerobe zu phototrophen Bedingungen hin stabiler wird, machen dieses Gen zu einem interessanten Ziel für weitergehende Untersuchungen. Diese könnten über die tatsächliche Funktion Aufschluss geben und ob FtsH in *R. sphaeroides* an der DNA Replikation bzw. Reparatur und Rekombination beteiligt ist, was eine Zuordnung in Kategorie L bestätigen würde, oder aber tatsächlich ebenfalls bei der Zellteilung eine Rolle spielt und sich damit besser in Kategorie D einsortieren würde. Eine Einsortierung in Kategorie L liegt vermutlich darin begründet, dass die ATPase-Untereinheit von FtsH ebenfalls zum beschriebenen AAA+ Typ und zur Gruppe der ASCE ATPasen (*additional strand, catalytic E*) gehört. Dieser Typ an ATPasen findet sich nicht nur in Proteasen und Chaperonen, wie beispielsweise FtsH, sondern auch in Helicasen. Nach der COG-ID zu urteilen fand hier die Zuordnung anhand dieser ATPase Untereinheit zu den Helicasen statt und daher eine Einsortierung in Kategorie L.

In Kategorie L zeigten unter aeroben Bedingungen des Weiteren keine weiteren Transkripte eine mehr als doppelt so lange Halbwertszeit wie unter phototrophen Bedingungen.

Beim PT/LO Vergleich hatten sowohl in Kategorie L als auch D unter phototrophen Bedingungen die Transkripte der Gene RSP_3520 und RSP_2696 mehr als doppelt so lange Halbwertszeiten. Bei beiden Genen handelt es sich laut COG Datenbank um Untereinheiten von zwei ATPasen, welche mutmaßlich an der Zellteilung beteiligt sind. Direkt annotiert sind sie laut KEGG- und NCBI⁷-Datenbanken als verschmolzene ATPase-Untereinheit eines ABC-Nickel/Peptidtransporters (RSP_3520) und verschmolzene ATPase/Transmembran Untereinheit ebenfalls eines ABC-Transporters (RSP_2696), welcher am Aufbau von Eisen-Schwefel-*clustern* (Fe-S-*cluster*) beteiligt ist. Das NikABCDE Transportersystem in *E. coli* wird unter anaeroben Bedingungen synthetisiert, um den erhöhten Bedarf an Nickel zu decken, welcher als Cofaktor für NiFe-Hydrogenasen fungiert (Navarro et al., 1993). RSP_3520 befindet sich vermutlich ebenfalls in einem Operon zusammen mit zwei bzw. vier weiteren Genen (RSP_3522, RSP_3523, RSP_3524, RSP_3525), welche ebenfalls alle ABC-Peptidtransporteruntereinheiten kodieren. Dies legt die Möglichkeit nahe, dass es sich hierbei möglicherweise um *nikABCDE* Homologe handeln könnte. Für RSP_3523 konnten ebenfalls Halbwertszeiten bestimmt werden. Mit einer mittleren Halbwertszeit von 41,2 Minuten ist das Transkript unter phototrophen Bedingungen ebenfalls sehr stabil, wie jenes von RSP_3520 (56,1 Minuten). Unter microaeroben Bedingungen konnten für alle Transkripte des mutmaßlichen Operons die Halbwertszeiten bestimmt werden und lagen mit Zeiten zwischen 13,8 und 32,4 Minuten sämtlich unter den Halbwertszeiten unter phototrophen Bedingungen. Unter aeroben Bedingungen konnte nur die Halbwertszeit des RSP_3520 Transkriptes bestimmt werden, welches mit 41,5 Minuten ähnlich stabil war. Die mögliche Funktion eines Nickel/Peptidtransporters legt nun eher eine Zuordnung in Kategorien E „Aminosäuretransport und Metabolismus“ bzw. P „Transport anorganischer Ionen und Metabolismus“ nahe. Tatsächlich findet sich RSP_3520 auch in diesen Kategorien. Dass zumindest zwei der Komponenten des möglichen ABC-Transporters unter phototrophen Bedingungen längere Halbwertszeiten aufweisen als unter microaeroben Bedingungen, könnte ein Indiz für eine verstärkte Translation des Transkriptes sein (siehe Einleitung

⁷ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

und (Deana & Belasco, 2005, Pedersen et al., 2011)). Über die Abundanz der Transkripte und demzufolge über die Expressionsrate des möglichen Operons lässt sich jedoch anhand der vorliegenden Daten keine Aussage treffen. Die ebenfalls lange Halbwertszeit unter aeroben Bedingungen wirft ebenfalls die Frage auf, ob das Gen auch unter aeroben Bedingungen transkribiert wird und die lange Halbwertszeit ebenfalls durch den Translationsprozess hervorgerufen wird, oder ob die Verfügbarkeit des Transkriptes nicht durch verstärkte Genexpression sondern durch höhere Stabilität des Transkriptes gewährleistet wird. Eine höhere Abundanz und Stabilität des (polycistronischen) Transkriptes unter phototrophen Bedingungen spräche für eine ähnliche Rolle in *R. sphaeroides* wie in *E. coli*, der Befund unter aeroben Bedingungen stünde dem jedoch eventuell entgegen.

RSP_2696 kodiert wie erwähnt ebenfalls die ATPase-Untereinheit eines ABC-Transporters, welcher Teil eines Systems zum Aufbau von Fe-S-clustern ist und somit die Zuordnung in die Kategorie der Zellteilung ebenfalls unwahrscheinlich ist. Eine Zuordnung in Kategorie O „Posttranslationale Modifikation, Protein turnover, Chaperone“ oder Kategorie H „Coenzymmetabolismus“ ist der tatsächlichen Funktion nach wahrscheinlicher.

Bei der näheren Betrachtung der in Kategorie D enthaltenen Gene stellte sich heraus, dass mehr als die Hälfte der COG-ID „COG2884“ zugeordnet sind, „predicted ATPase involved in cell division“, der Annotation und Genbeschreibung nach aber sämtlich die ATPase-Untereinheiten von diversen ABC-Transportern kodieren. Diese Klasse von ATPasen stellt eine der größten und konserviertesten Superfamilien dar und kommt in großer Zahl in allen Organismen vor. Fast immer stehen sie mit Transportern in Verbindung, wo sie den Transport mannigfaltiger Substrate antreiben (Holland & Blight, 1999). Die Zuordnung in die Kategorien L und D mag darin begründet liegen, dass die ATPase-Untereinheit konservierte Sequenzmotive mit ATPasen teilt, welche tatsächlich an der aktiven Teilung bakterieller Chromosomen und Plasmide beteiligt sind (Koonin, 1993, Hirano, 2002). Im PT/LO Vergleich zeigten zudem zwei weitere Transkripte von Genen von ABC-Transporter-ATPase-Untereinheiten unter phototrophen Bedingungen vergleichsweise kürzere Halbwertszeiten (RSP_2895, RSP_0094 *smoK*). Die Zuordnung dieser Gene in Kategorien L und D ist ihrer annotierten Funktion nach daher fragwürdig. Aufgrund dieser Zuordnungen vieler Gene für Untereinheiten von Transportern besonders in Kategorie D, ist eine Aussage bezüglich der veränderten Transkripthalbwertszeiten von Genen der DNA Replikation und der Zellteilung demnach nur mit starken Einschränkungen zu treffen.

4.2.2.2. HALBWERTSZEITEN IN KATEGORIE J

Die tendenziell längeren Halbwertszeiten der Transkripte in Kategorie J „Translation, Ribosomenstruktur und Biogenese“ unter aeroben Bedingungen im Vergleich zu microaeroben und phototrophen liegt wahrscheinlich ebenfalls in der unterschiedlichen Wachstumsrate begründet. Durch die höhere Teilungsrate unter aeroben Bedingungen ist allgemein auch die Stoffwechselrate erhöht, was mit einer erhöhten Proteinbiosynthese einhergeht. Dass die Transkripte beispielsweise von tRNA Synthetasen (z.B. RSP_1989 *valS*) längere Halbwertszeiten aufweisen, kann auf eine verstärkte Translationsaktivität solcher Transkripte zurückzuführen sein, was den erhöhten Bedarf an tRNAs widerspiegeln kann. Auch am Beispiel von RSP_2270 *gatA*, einer Untereinheit der Glutamyl-tRNA Amidotransferase, sieht man deutlich eine Abnahme der Halbwertszeit von 42 Minuten unter aeroben Bedingungen über 27 Minuten unter microaeroben auf 16 Minuten unter phototrophen Bedingungen.

Ob dies einen generellen Trend darstellt, ist ob der Tatsache dass es auch zum Beispiel in der Gruppe der Transkripte ribosomaler Proteine sowohl kürzere als auch längere Halbwertszeiten unter aeroben Bedingungen im Vergleich zu den beiden anderen Bedingungen gibt, schwer zu beurteilen. Auch bei der Einzelbetrachtung zeigten sich unter aeroben Bedingungen ebenfalls mehrere Transkripte mit sehr kurzen Halbwertszeiten.

4.2.2.3. HALBWERTSZEITEN IN KATEGORIE V

Kategorie V „Abwehrmechanismen“ zeichnete sich dadurch aus, dass es beim PT/LO Vergleich unter phototrophen Bedingungen etwas mehr Transkripte mit kurzen Halbwertszeiten und ebenfalls mehr Transkripte mit längeren gab als unter microaeroben Bedingungen. Beim Vergleich mit aeroben Bedingungen führte phototrophes Wachstum tendenziell zu längeren Halbwertszeiten. Die meisten Gene in dieser Kategorie kodieren ebenfalls Untereinheiten von ABC-Transportern, meistens ATPase-Untereinheiten. Die meisten ABC-Transporter sind hier vom „*multidrug efflux pump*“-Typ. Diese Transporter tragen in gram-negativen Bakterien maßgeblich zu einer intrinsischen Resistenz gegen diverse Giftstoffe wie beispielsweise Antibiotika, Detergenzien und auch Farbstoffe bei und eine Pumpe kann dabei mehrere verschiedene Verbindungen aus der Zelle pumpen (Nikaido, 1996). In vielen pathogenen Bakterien sind solche Pumpen und Transporter ebenfalls an der Bildung von Resistenzen gegen verschiedenste Antibiotika beteiligt (MDR; *multidrug resistance*), indem sie die intrazelluläre Konzentration an Antibiotika gering halten und somit die Akkumulation von möglicherweise resistenzbildenden Mutationen begünstigen (Sun et al., 2014).

Die deutlichsten Unterschiede in dieser Kategorie zeigten die Transkripte von RSP_0461 und RSP_2895. Beide Gene kodieren ebenfalls Komponenten von Transportern, eine verschmolzene ATPase-Untereinheit eines ABC-Transporters (RSP_2895) und ein Membranfusionsprotein einer *multidrug/cation efflux* Pumpe (RSP_0461). Die Transkripte beider Gene sind unter aeroben und unter phototrophen Bedingungen deutlich kurzlebiger als unter microaeroben Bedingungen (siehe Tabelle 3-10). Über beide Gene ist in *R. sphaeroides* bisher nichts bekannt. Auch in dieser Kategorie aufgeführt sind die beiden bereits beschriebenen Gene RSP_3520 und RSP_2696. Interessant ist diese Kategorie dadurch, dass Rifampicin ebenfalls einen Einfluss auf die Expression und Aktivierung von *multidrug efflux* Pumpen und Transportern haben kann (Louw et al., 2011). Da jedoch alle Kulturen mit derselben Konzentration an Rifampicin behandelt wurden, ist der beobachtete Unterschied in den Halbwertszeiten der Transkripte in dieser Kategorie aller Wahrscheinlichkeit nach auf die Unterschiede in der Teilungsrate zurückzuführen. So könnte die höhere Teilungsrate bei aerobem Wachstum zu einer Verdünnung des Antibiotikums führen, weshalb Gene solcher Abwehrmechanismen unter Umständen schwächer exprimiert sind bzw. eine Regulation ebenfalls über die Transkripthalbwertszeit gesteuert wird.

4.2.2.4. HALBWERTSZEITEN IN KATEGORIE T

Beim direkten Vergleich der Transkripte in Kategorie T „Signaltransduktion“ zeigten sich unter aeroben Bedingungen etwas mehr längere Halbwertszeiten als unter phototrophen Bedingungen. Dies zeigte sich jedoch nicht in den Einzelbetrachtungen, hier waren tendenziell etwas mehr Transkripte unter phototrophen Bedingungen langlebiger. Dies kann aber auch der höheren Anzahl an bestimmten Halbwertszeiten geschuldet sein. Den deutlichsten Unterschied zwischen aerober

und phototropher Kultivierung zeigte das auch in dieser Kategorie einsortierte und bereits erläuterte Transkript von RSP_2130. Den größten Teil dieser Kategorie machen *response regulator* und Transkriptionsfaktoren aus. So zeigte auch das Transkript von RSP_3042 *dorX*, welches ein Regulatorprotein der DMSO Reduktase kodiert, eine um das Dreifache verlängerte Halbwertszeit unter aeroben Bedingungen verglichen mit der Halbwertszeit unter phototrophen Bedingungen. *R. sphaeroides* kann unter anaeroben Bedingungen atmen, wenn Dimethylsulfoxid (DMSO) oder Trimethylamin-N-Oxid (TMAO) als alternativer, terminaler Elektronenakzeptor zur Verfügung steht (McEwan, 1994). Die Reduktion beider Stoffe findet durch die periplasmatische DMSO-Reduktase DMSOR statt, welche durch das *dorCBA* Operon kodiert wird (Mouncey et al., 1997). Die Expression der *dor* Gene ist redoxabhängig und damit direkt vom Sauerstoffpartialdruck. Das Redoxsignal bei aerobem Wachstum wird durch die Cco Oxidase und das Ferredoxin-ähnliche Protein RdxB direkt oder indirekt an FnrL weitergegeben, welches in inaktiver Form gehalten wird. So ist die Expression von *dorSR* und *dorCBA* folglich nur gering und DMSOR wird nicht gebildet. Bei sinkendem Sauerstoffpartialdruck steigt die Expression von *dorS*, DorS registriert ebenfalls das Redoxsignal des Cco-RdxB Systems und autophosphoryliert, wodurch die Expression von *dorS* und *dorR* weiter durch den *response regulator* DorR gesteigert wird. Bei Anwesenheit von DMSO wird dann das *dorCBA* Operon durch DorR und durch das DorXY System exprimiert und DMSOR wird in Folge synthetisiert. Da aber auch DMSOR für eine normale *dorCBA* Expression erforderlich ist, wird vermutet, dass auch DMSOR ebenfalls das Redoxsignal selbst oder über DorXY, DorSR oder beide Systeme weitergegeben um die *dor* Expression weiter zu modulieren (Mouncey & Kaplan, 1998). Eine mögliche Erklärung für die in dieser Arbeit beobachtete Abnahme der Stabilität des *dorX* Transkriptes mit sinkendem Sauerstoffpartialdruck, lässt sich womöglich so erklären, dass die niedrige Expressionsrate der Regulatorgene *dorSR* und *dorXY* zu einer geringen Abundanz der Transkripte führt, eine ausreichende Synthese der Proteine auch bei hohem Sauerstoffpartialdruck aber kostengünstiger durch eine verlängerte Halbwertszeit der Transkripte erreicht wird. Dies würde gewährleisten, dass die unter diesen Bedingungen nur in geringem Maße benötigten Regulatorproteine trotz basaler Expressionsrate dennoch ohne hohen energetischen Aufwand in ausreichender Menge synthetisiert werden können. Bei Abnahme des Sauerstoffgehaltes steigt dann wie beschrieben die Expressionsrate, was zu einer höheren Abundanz führt, wodurch eine Stabilisierung der Transkripte nicht mehr unbedingt vonnöten ist, da die Kontrolle der Syntheserate der Regulatorproteine primär auf Ebene der Genexpression stattfindet und die Zelle so schneller auf sich verändernde Bedingungen reagieren kann. Da unter aeroben Bedingungen nur Halbwertszeitendaten für *dorX* vorliegen, nicht aber für *dorSR* und *dorY* ist eine weitergehende Überprüfung dieser Hypothese unabdingbar. Einen ersten Hinweis für eine Korrelation der Abundanzen der Transkripte und der Halbwertszeiten könnten hierzu beispielsweise qRT PCR Daten liefern.

Beim HO/LO Vergleich zeigte das Transkript von RSP_0327 *nnrR* unter aeroben Bedingungen eine etwas mehr als doppelt so lange Halbwertszeit. NnrR ist ein Transkriptionsregulator der Fnr/CRP Familie und spielt in einem nahen Verwandten von *R. sphaeroides*, dem denitrifizierenden Bakterium *R. sphaeroides* 2.4.3 eine spezifische Rolle bei der Regulation von Genen, deren Produkte direkt für die Produktion bzw. Reduktion von Stickstoffmonoxid verantwortlich sind. Im nicht-denitrifizierenden *R. sphaeroides* 2.4.1 wird das vorhandene NnrR Homolog prinzipiell nicht benötigt, es wird jedoch vermutet, dass es hier die Expression von Genen steuert, die mit der Stressantwort gegen reaktive Sauerstoffspezies (ROS, *reactive oxygen species*) in Verbindung stehen (Tosques et al., 1996). Da eine aerobe Lebensweise mit einer größeren Gefahr durch ROS verbunden ist, könnte die verlängerte Halbwertszeit dieses Transkriptes unter aeroben gegenüber microaeroben Bedingungen

ein Hinweis auf die Richtigkeit dieser Vermutung sein, da wie erwähnt eine längere Halbwertszeit auch von einer stärkeren Translationsaktivität ausgehen kann.

Eine ebenfalls stärker veränderte Halbwertszeit zeigte das Transkript von RSP_1587 *cheR2*. Unter phototrophen Bedingungen war diese mRNA nicht halb so stabil wie unter aeroben Bedingungen. CheR2 ist eine Methyltransferase aus dem komplexen Regelnetzwerk der bakteriellen Chemotaxis. Wie aus Tabelle 3-30 hervorgeht, gehören einige Chemotaxisgene und Gene der Flagellensynthese zu solchen Genen, deren Transkripte sich in dieser Analyse in ihren Halbwertszeiten unter zwei verschiedenen Wachstumsbedingungen mit am deutlichsten unterscheiden. *R. sphaeroides* besitzt in Gegensatz zu *E. coli* zwei chemosensorische Signalwege. Die Komponenten dieser Signalwege werden von zwei Operons und diversen Genen in anderen Loci außerhalb dieser Operons kodiert. Das *che* Operon 2 ist dabei verantwortlich für den ersten Signalweg, der durch Transmembranrezeptoren extrazelluläre Signalstoffe detektiert, die vom *che* Operon 3 kodierten Proteine des zweiten Signalweges befinden sich als lösliche Chemorezeptoren in *clustern* im Cytoplasma und detektieren intrazelluläre Veränderungen (Hamblin et al., 1997, Martin et al., 2001a, Martin et al., 2001b, Porter et al., 2002). Die Genprodukte beider Operons steuern letztendlich das Verhalten des Flagellums Fla1 (Shah et al., 2000, Porter et al., 2002). Die Rolle eines dritten Chemotaxisoperons, *che* Operon 1, war lange nicht klar, da diese Gene unter Laborbedingungen nicht exprimiert sind. Mittlerweile ist aber bekannt, dass die Produkte dieses Operons die Rotation des unter Laborbedingungen ebenfalls nicht genutzten Flagellums Fla2 kontrollieren (del Campo et al., 2007), (Review in (Porter et al., 2011)). In Zusammenhang mit diesem System steht auch eine weitere Besonderheit von *R. sphaeroides*. So weist *R. sphaeroides* durch die Ausbildung von intrazellulären Membraninvaginationen (ICMs, *intracytoplasmic membranes*) bei phototrophen Wachstum eine andere Zellarchitektur auf als bei aerobem Wachstum (Kiley & Kaplan, 1988, Tucker et al., 2010), was möglicherweise zu einer Beeinflussung der Diffusion der Signalmoleküle führen kann.

Die Chemotaxisgene sind unter allen Bedingungen exprimiert, unterscheiden sich aber im Level (Shah et al., 2000, Roh et al., 2004, Kojadinovic et al., 2013). Zum Beispiel ist das *che* Operon 2 während aerobem Wachstum deutlich stärker exprimiert als bei phototrophen (Shah et al., 2000). Dies deutet darauf hin, dass die Expression der beiden Chemotaxis-Operons durch die herrschenden Umweltbedingungen kontrolliert wird und die Zellen ihr Chemotaxissystem dementsprechend anpassen können. Neben den *che* Genen zeigen ebenfalls die Gene der MCP-ähnlichen Rezeptorproteine je nach Umweltbedingungen eine veränderte Expression (Harrison et al., 1999). Die Expression der Flagellengene ist streng hierarchisch (Poggio et al., 2005) und in *R. sphaeroides* abhängig vom alternativen Sigmafaktoren Sigma54, welcher die Expression der Gene des Flagellenhakens und des Basalkörpers steuert und vom Flagellen-spezifischen Sigmafaktor Sigma28 (FliA) und vom Antisigmafaktor FliM. Sigma28 reguliert die Expression der Gene des Flagellenfilaments und des *che* Operons 2 (Poggio et al., 2002, Martin et al., 2006). Die *che* Operon 3 Expression wird ebenfalls von einem Sigma54 Homolog reguliert. Die unterschiedliche Regulation all dieser Operons versetzt *R. sphaeroides* in die Lage, das chemotaktische Verhalten an die momentan herrschenden Umweltbedingungen anzupassen. Inwiefern jedoch eine Regulation über die Halbwertszeiten der Transkripte in diesem sehr komplexen Regulationsnetzwerk stattfindet, ist bisher nicht bekannt. Bei der Betrachtung der berechneten Halbwertszeiten der Transkripte der *che* Operons (Tabelle 4-1) zeigt sich dahingehend jedoch bisher kein ersichtlicher Zusammenhang, ob auch eine Regulation auf Basis der Transkriptstabilität stattfindet und nicht nur auf Basis der Genexpression. Da jedoch nur für wenige Transkripte tatsächlich eine Halbwertszeit in den

Microarrays bestimmt werden konnte, wäre eine weitergehende Analyse notwendig, auch in Hinblick auf veränderte Transkripthalbwertszeiten einiger Gene der Flagellensynthese.

Tabelle 4-1: Transkripthalbwertszeiten der drei *che*-Operons in *R. sphaeroides*.

Die Auflistung erfolgt nach Reihenfolge des Gens im Operon. Halbwertszeiten in Minuten, bei leeren Feldern konnten keine Halbwertszeiten bestimmt werden,

Wachstumsbedingungen: HO aerob; LO microaerob; PT phototroph

Gennummer	Genname/Beschreibung	HO	LO	PT
<i>che</i> Operon 1				
RSP_2439	<i>cheD</i> , putative chemotaxis protein, CheD		21,0	34,9
RSP_2438	<i>cheX</i> , putative CheX protein	18,5	9,4	18,5
RSP_2437	<i>cheY1</i> , Chemotaxis response regulator, CheY1			
RSP_2436	<i>cheA1</i> , Chemotaxis histidine protein kinase, CheA1			17,7
RSP_2435	<i>cheW1</i> , putative chemotaxis scaffold protein, CheW1			22,4
RSP_2434	<i>cheR1</i> , putative MCP methyltransferase, CheR1	19,7		16,7
RSP_2433	<i>cheY2</i> , Chemotaxis response regulator, CheY2		11,3	
RSP_2432	hypothetical protein	23,5		14,5
<i>che</i> Operon 2				
RSP_1582	putative sulfate transporter/antisigma-factor antagonist			
RSP_1583	<i>cheY3</i> , Chemotaxis response regulator, CheY3			
RSP_1584	<i>cheA2</i> , Chemotaxis histidine protein kinase		22,5	17,0
RSP_1585	<i>cheW2</i> , Chemotaxis protein, CheW2			
RSP_1586	<i>cheW3</i> , Chemotaxis protein, CheW3			
RSP_1587	<i>cheR2</i> , Chemotaxis methyltransferase, CheR2	35,8		16,2
RSP_1588	<i>cheB1</i> , Chemotaxis methylesterase, CheB1	24,9		31,3
RSP_1589	<i>tlpC</i> , Transducer-like protein, TlpC	22,0		20,2
<i>che</i> Operon 2				
RSP_0049	<i>cheA4</i> , Chemotaxis histidine protein kinase, CheA4	17,6	16,2	25,6
RSP_0048	<i>cheR3</i> , MCP methyltransferase, CheR3	23,6	28,2	21,5
RSP_0047	<i>cheB2</i> , Chemotaxis methylesterase, CheB2	23,1		27,1
RSP_0046	<i>cheW4</i> , Chemotaxis protein, CheW4	22,7		23,1
RSP_0045	<i>ppfA</i> , partitioning factor PpfA		15,8	18,3
RSP_0044	<i>tlpT</i> , putative cytoplasmic chemoreceptor, TlpT	21,8		
RSP_0043	<i>cheY6</i> , Chemotaxis response regulator, CheY6		15,7	
RSP_0042	<i>cheA3</i> , Chemotaxis histidine protein kinase, CheA3		22,7	

Auch in Kategorie L und in den Kategorien N und U, welche ebenfalls mit der Zellmotilität in Verbindung stehen, befindet sich das bereits beschriebene Transkript von RSP_2130 mit der über vierfach längeren Halbwertszeit unter phototrophen Bedingungen gegenüber aeroben. Ob es hier eine Verbindung zur Chemotaxis und der Regulation der Expression dieser und der Flagellengene gibt, ist nicht bekannt. Da aber wie beschrieben Sigma54 bei deren Expression beteiligt ist und das RSP_2130 Protein als Transkriptionsaktivator fungiert, ist eine mögliche Interaktion nicht vollkommen auszuschließen. Als Teil eines Zweikomponentensystems und als Transkriptionsaktivator von Sigma54-regulierten Genen kann RSP_2130 jedoch auch bei bisher unbekanntem Substrat eine indirekte Rolle in der Regulation der Chemotaxis spielen und stellt so auch in diesem Zusammenhang ein interessantes Ziel für weitergehende Untersuchungen dar.

4.2.2.5. HALBWERTSZEITEN IN KATEGORIE U

Die zur Chemotaxis und Zellmotilität ähnliche Kategorie U „Intrazellulärer Transport, Sekretion“ zeichnete sich in den Vergleichen durch eine höhere Bandbreite an Halbwertszeiten unter aeroben

und phototrophen als unter microaeroben Bedingungen aus. Die meisten Gene in dieser Kategorie gehören ebenfalls zur Chemotaxis und zur Flagellensynthese. Dass es unter aeroben und phototrophen Bedingungen hier bei den Transkripten zu vermehrt kurzen und langen Halbwertszeiten kommt, ist vermutlich größtenteils dadurch zu erklären, dass in dieser Kategorie nur für eine recht geringe Zahl an Transkripten Halbwertszeiten bestimmt werden konnten (vergleiche Tabelle 3-2). Die deutlichsten Unterschiede zeigten auch hier wieder Transkripte von Flagellen- und Chemotaxis-assoziierten Genen und mit RSP_3932 und RSP_2299 beispielsweise auch Gene von ATPase-Untereinheiten, die mit allgemeinen Sekretionsvorgängen in Verbindung stehen.

4.2.2.6. HALBWERTSZEITEN IN KATEGORIE H

Kategorie H „Coenzymmetabolismus“ gehört zu den Kategorien, in denen die Transkripte unter aeroben Bedingungen tendenziell längere Halbwertszeiten aufwiesen als unter phototrophen Bedingungen. In dieser Kategorie befinden sich ebenfalls einige Gene für ABC-Transporter und der Kategorie entsprechend viele Gene für die Synthese von Coenzymen, wie beispielsweise für die Molybdäncofaktor (MoCo)-Synthese. Der deutlichsten Unterschied beim PT/HO Vergleich zeigte sich beim Transkript der kleinen Untereinheit der Molybdopterinbiosynthese *moaD*, jedoch war dieses Transkript unter phototrophen Bedingungen stabiler. Molybdän ist ein Cofaktor in vielen Enzymen, sogenannte Molybdoenzyme, welche grundlegende Reaktionen im Stickstoff-, Schwefel- und Kohlenstoffmetabolismus katalysieren (Hille, 1996). Man unterscheidet zwei unterschiedliche Typen von Molybdoenzymen: Die Molybdännitrogenase mit einem einzigartigen Molybdän-Eisen-Schwefel-*cluster* im aktiven Zentrum (FeMoCo) und alle anderen Molybdoenzyme, die als Oxidoreduktasen entweder eine Oxo-Gruppe oder zwei Elektronen vom oder auf das Substrat übertragen (Hille, 1996, Iobbi-Nivol & Leimkuhler, 2013). In diesen Enzymen ist das Molybdän mit einem Pterinmolekül koordiniert und wird deshalb Molybdopterin (MPT) genannt (Rajagopalan & Johnson, 1992). Ein Beispiel eines solchen Enzyms ist die DMSO-Reduktase. Ein wichtiger Schritt in der MPT Synthese wird vom Enzym MPT-Synthase katalysiert, welches von den Genen *moaD* und *moaE* kodiert wird (Review in (Iobbi-Nivol & Leimkuhler, 2013)). In *E. coli* ist die Expression des *moa* Locus stark Molybdät-abhängig und unter anaeroben Bedingungen verstärkt, wird aber gleichzeitig auch von aktiven Molybdäncofaktor-Enzymen unterdrückt (Baker & Boxer, 1991). Die Molybdät-abhängige Expression wird dabei vom Molybdät-bindenden Transkriptionsregulator ModE reguliert, welcher dabei ebenfalls die Expression des *mod* Operons unterdrückt, welches das hoch-affine Molybdät-Aufnahmesystem kodiert (Anderson et al., 2000). Der *moa* Locus in *R. sphaeroides* enthält im Gegensatz zu *E. coli* (*moaABCDE*) nur die beiden Gene *moaD* und *moaE*. Als *moaA* sind zwei Gene an unterschiedlichen Loci auf dem Chromosom annotiert, RSP_3050 und RSP_0235, deren Nukleotidsequenzen zu 76% identisch sind (nBLAST, max score 663, total score 684, query cover 96%, ident. 76%, (Altschul et al., 1997)). Ob beide Genprodukte oder nur eines eine Rolle in der MoCo-Synthese spielen ist nicht bekannt. RSP_2000 kodiert aller Wahrscheinlichkeit nach ein MoaC-ähnliches Protein (KEGG pathways, *sulfur relay system*⁸), *moaB* scheint jedoch zu fehlen. Welche Gene sämtlich an der MoCo-Synthese beteiligt sind und wie sie reguliert werden ist in *R. sphaeroides* bisher wenig bekannt. Eine verstärkte Expression der MoCo-Gene ist jedoch wahrscheinlich, da diese Cofaktoren in vielen Enzymen des anaeroben Stoffwechsels, wie beispielsweise Nitrogenase und DMSO-Reduktase, benötigt werden. Die längere Halbwertszeit des *moaD* Transkriptes unter

⁸ http://www.genome.jp/tmp/mark_pathway140438315510402/rsp04122.png

phototrophen Bedingungen verglichen mit der Halbwertszeit unter aeroben Bedingungen, deutet dabei möglicherweise ebenfalls auf eine veränderte Expression bzw. eine veränderte Regulation hin. Die beiden Transkripte des *moa* Operons liegen aller Wahrscheinlichkeit nach als bicistronisches Transkript vor und so liegt die Halbwertszeit des *moaE* Transkriptes zumindest unter phototrophen Bedingungen mit 27 Minuten in einem ähnlichen Bereich wie die des *moaD* Transkriptes (23 Minuten). Unter aeroben Bedingungen konnte jedoch für *moaE* keine Transkripthalbwertszeit bestimmt werden. Für einen weiteren Vergleich der Halbwertszeiten der übrigen *moa* Transkripte liegen jedoch zu wenige Daten vor um hier eine Aussage treffen zu können. Eine Überprüfung der Transkripthalbwertszeiten von *moaDE* wäre mittels *Northern blot* prinzipiell möglich, da die Größe des bicistronischen Transkriptes mit unter 1000 nt in einem detektierbaren Bereich liegt, bezüglich der Abundanz liegen jedoch unter phototrophen Bedingungen keine Daten vor. Unter microaeroben Bedingungen ist das Transkript allerdings laut RNA-seq-Daten nicht sehr abundant. Bei einer augenscheinlichen Betrachtung weiterer Gene des Molybdänstoffwechsels (*mod*, *mog*, *moe*) zeigten sich des Weiteren jedoch zwischen aeroben und phototrophen Bedingungen keine deutlichen Tendenzen in der Halbwertszeit der Transkripte (siehe auch Excel-Tabelle HWZ_Vergleich_HO_LO_PT auf der CD im Anhang).

Auch in dieser Kategorie kamen die Gene RSP_3520 und RSP_2696 vor, deren Transkripte unter phototrophen Bedingungen stabiler waren als unter microaeroben Bedingungen. Die Funktion dieser beiden Gene wurde bereits im Abschnitt über die Kategorien L und D diskutiert. Da beide Gene mutmaßlich Teil des Nickelstoffwechsels (RSP_3520) bzw. des Systems zum Aufbau von Fe-S-*clustern* (RSP_2696) sind, ist eine Einsortierung in Kategorie H sinnvoll. Eine Aussage darüber, warum auch Transkripte von Genen für den Aufbau von Fe-S-*clustern* unter phototrophen Bedingungen stabiler zu sein scheinen, ist jedoch anhand nur weniger Transkripte nicht generell zu treffen und auch in Bezug darauf, dass Fe-S-*cluster* als Cofaktoren im aeroben Stoffwechsel vorkommen, zum Beispiel in der Atmungskette und im Photosystem, ist eine Veränderung der Transkripthalbwertszeiten nur schwer zu erklären und bedarf weiterer intensiver Untersuchungen.

Ein weiterer Unterschied zeigte sich beim PT/LO Vergleich bei der Halbwertszeit des Transkriptes von *smoK*, welches unter microaeroben Bedingungen doppelt so stabil war. *smoK* kodiert die ATPase Untereinheit eines ABC-Transporters für Mannitol und Sorbitol. Zumindest der *R. sphaeroides* Stamm Si4 ist in der Lage, Zuckeralkohole als Kohlenstoffquelle zu nutzen (Schneider & Giffhorn, 1989). Auch der Stamm 2.4.1 besitzt mehrere Gene für diesen Stoffwechselweg, organisiert in vermutlich einem großen Operon: *smoC*, ein Operon-Regulator, vier Untereinheiten eines ABC-Transporters für Mannitol/Sorbitol, *smoEFGK* und direkt folgend die Gene für die Sorbitol-Dehydrogenase *smoS* und die Mannitol-Dehydrogenase *mtIK*. Die drei folgenden Gene eines Transporters für Sorbitol/Mannitol der TRAP-T-Familie, *smoM*, RSP_6094 und RSP_0099 haben keinen Teil am Sorbitol/Mannitol Transport und sind daher falsch annotiert und wurden infolgedessen umbenannt in *takPQM* und transportieren bewiesenermaßen α -Ketosäuren (Thomas et al., 2006, Gonin et al., 2007). Anhand aller verfügbaren Halbwertszeiten der *smo* Transkripte ist eine Aussage über eine mögliche Regulation über die Stabilitäten schwierig, vor allem da es sich aller Wahrscheinlichkeit nach um ein polycistronisches Transkript handelt und sich die Halbwertszeiten der einzelnen Transkripte dennoch teilweise unterscheiden. Für eine klarere Aussage müssten die Halbwertszeiten erneut bestimmt werden. Da aber über eine mögliche Prozessierung des Transkriptes nichts bekannt ist, die RNA-seq-Daten unter microaeroben Bedingungen auf eine geringe Abundanz hindeuten und das Primärtranskript, wenn es nicht prozessiert wird, für eine *Northern blot* Analyse zu groß ist, ist dies schwierig. Zudem liegen aus *R. sphaeroides* 2.4.1 noch keine Daten zum Sorbitol/Mannitol-Stoffwechsel vor.

4.2.2.7. HALBWERTSZEITEN IN KATEGORIE I

In der Kategorie des Lipidstoffwechsels I zeigte sich zu den Tendenzen in den meisten anderen Kategorien ein umgekehrtes Verhältnis. So führten aerobe und microaerobe Bedingungen zu mehr Transkripten mit längeren Halbwertszeiten als phototrophe Bedingungen. Diese Tendenz war schon bei der Untersuchung auf Über- und Unterrepräsentation der Halbwertszeiten bestimmter Dauer aufgefallen und zeigte sich auch deutlich bei der Betrachtung der Verteilung der Halbwertszeiten unter den drei Bedingungen. Eine Erklärung für diese generelle Beobachtung könnte auch bei diesem Stoffwechselweg die unterschiedlichen Wachstumsraten unter den drei Bedingungen sein. Eine hohe Stoffwechselaktivität und eine schnelle Teilungsrate, wie beim aeroben Wachstum, erfordert eine erhöhte Synthese beispielsweise an Membranlipiden. Wie bereits mehrfach erwähnt kann eine erhöhte Translationsaktivität zu einer Stabilisierung der translatierten mRNAs beitragen. Die Kontrolle der Synthese bzw. des Lipidstoffwechsels findet hier womöglich nicht nur hauptsächlich auf Ebene der Transkription statt. Die längeren Halbwertszeiten könnten daher auch aus einem erhöhten Bedarf an diesen Transkripten resultieren. Mit sinkender Wachstumsrate würde dann dementsprechend auch die Notwendigkeit der Neusynthese von Phospholipiden sinken. Unter phototrophen Bedingungen, unter denen die Teilungsrate von den drei Bedingungen am geringsten ist und zudem weniger Energie zur Verfügung steht, muss der energieintensive Stoffwechselweg der Fettsäurebiosynthese dann strenger kontrolliert werden. Eine kurze Halbwertszeit der Transkripte dieses Biosyntheseprozesses trägt dann dafür Sorge, dass die Transkripte nur so lange in der Zelle für die Translation zur Verfügung stehen, wie sie unbedingt benötigt werden, die Kontrolle der Genexpression erfolgt hier dann hauptsächlich auf Ebene der Transkription. Im langsam wachsenden *M. tuberculosis* gehörten Kategorien des Lipidstoffwechsels ebenfalls zu denen mit kurzen Halbwertszeiten (Rustad et al., 2013). In der Tat zeigt sich auch in *R. sphaeroides* eine Abnahme der Phospholipidsynthese bei anhaltendem phototrophen Wachstum (Chory et al., 1984). Es ist jedoch zu beachten, dass es mit steigender Expression der Photosynthesegene beim Übergang chemoorganotropher, aerober Lebensweise zur phototrophen wie beschrieben zur Ausbildung der intracytoplasmatischen Membranen kommt (Kiley & Kaplan, 1988, Tucker et al., 2010). Bei besagtem Übergang kommt es kurzfristig zu einer Zunahme der netto Phospholipidsynthese, welche aber wie beschrieben bei anaerober, phototropher Lebensweise wieder abnimmt (Chory et al., 1984).

Ein Gen (RSP_0276) dessen Transkript unter microaeroben Bedingungen deutlich langlebiger ist als unter phototrophen, kodiert eine Isopentenylidiphosphatisomerase (IPPI). Dieses Enzym katalysiert einen Schlüsselschritt in der Isoprenoidbiosynthese, die Interkonversion von Isopentenylidiphosphat (IPP) in Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) und umgekehrt. Diese Reaktion ist ein früher Schritt beispielsweise in der Biosynthese von Carotinoiden, einer Unterfamilie der Isoprenoide (Berthelot et al., 2012, Paniagua-Michel et al., 2012). Carotinoiden kommt in der bakteriellen Photosynthese die essentielle Funktion der sogenannten Photoprotektion zu, wobei sie die durch die Übertragung von Lichtenergie angeregten Bacteriochlorophyllmoleküle *quenchen* können, sodass überschüssige Energie nicht auf molekularen Sauerstoff fehlübertragen wird, wodurch kein Singulett-Sauerstoff gebildet wird (Borland et al., 1988). Des Weiteren sind Carotinoide auch in Lage, entstandenen Singulett-Sauerstoff direkt zu *quenchen* (Foote et al., 1970). Aufgrund ihrer hauptsächlich entgiftenden Funktion, befinden sich Carotinoidmoleküle sowohl in den Reaktionszentren als auch in den Lichtsammelkomplexen des Photosyntheseapparates. *R. sphaeroides* verdankt seine charakteristische Färbung somit der großen Anzahl der gebundenen Carotinoide. Wie bereits angemerkt bildet *R. sphaeroides* bei absinkendem Sauerstoffpartialdruck intracytoplasmatische Membranen aus, in denen sich die Pigment-Protein-Komplexe befinden. Mit dieser Ausbildung an

ICMs geht bei sinkendem Sauerstoffgehalt auch eine zunehmende Pigmentierung der Zellen einher (Cohen-Bazire et al., 1957). Das Gen RSP_0276 liegt mitten in einem polycistronischen Genlocus von *R. sphaeroides*, der auch als photosynthetisches Gencluster bezeichnet wird (Choudhary & Kaplan, 2000). In diesem Gencluster liegen die meisten Gene der Strukturproteine des Lichtsammelkomplex I und der Reaktionszentren (*puf*, *puh*), Gene für regulatorische Proteine (*ppaA*, *tspO*, *ppsR*), sowie für die Bacteriochlorophyll- (*bch*) und Carotinoidsynthese (*crt*). RSP_0276 gehört nicht zu den *crt* Genen, befindet sich aber in unmittelbarer Nähe zu *bchODI* und besitzt den RNA-seq-Daten zur Folge aber wahrscheinlich einen eigenen Transkriptionsstart. Die Expression der Photosynthesegene und damit der Aufbau der Photosynthesekomplexe unterliegt hauptsächlich der sauerstoffabhängigen Regulation durch das PrrB/PrrA-Zweikomponentensystem, durch das FnrL Protein und durch das sauerstoff- und lichtabhängige AppA/PpsR Repressor/Antirepressorsystem (Eraso & Kaplan, 1994, Zeilstra-Ryalls & Kaplan, 1995, Gomelsky & Kaplan, 1997, Braatsch et al., 2002). Daher ist anzunehmen, dass auch die Expression von RSP_0276 in einer sauerstoffabhängigen Weise erfolgt und somit auch sehr frühe Schritte in der Carotinoidsynthese davon betroffen sind. Der obigen Theorie zur Folge, nimmt die Expression der IPP-Isomerase mit sinkendem Sauerstoffgehalt zu und die Verfügbarkeit des Transkriptes in der Zelle wird somit durch eine gesteigerte Transkriptionsaktivität gesteuert und nicht über die Stabilität des Transkriptes. Dies würde die kürzere Halbwertszeit unter phototrophen Bedingungen erklären. Unter aeroben Bedingungen liegen jedoch keine Halbwertszeitendaten vor, um diese Theorie weiter zu untermauern. Eine geringere Expression bei hohem Sauerstoffgehalt würde demzufolge dafür sprechen. Eine Untersuchung zur Expression dieses Gens ist bisher allerdings noch nicht geschehen. Es bleibt auch zu bemerken, dass die vom RSP_0276 Genprodukt katalysierte Isomerisierung von IPP und DMAPP im Stoffwechselweg der Isoprenoidsynthese nicht nur einen frühen Schritt in der Carotinoidsynthese darstellt. Isoprene sind ebenfalls als Seitenketten wichtige Komponenten von Ubiquinonen, welche als Elektronenüberträger sowohl bei der oxidativen Phosphorylierung als auch bei der Photophosphorylierung vorkommen. Teil an dieser Synthese haben ebenfalls Genprodukte aus dem photosynthetischen Gencluster (*crtE*, *bchP*). Auf Grund der wichtigen Funktion dieses Enzyms, seiner Lokalisierung im photosynthetischen Gencluster und der damit wahrscheinlich sauerstoffabhängig regulierten Expression und der eindeutigen Veränderung der Transkriptstabilität, stellt dieses Gen ein lohnendes Ziel für weitergehende Analysen dar, besonders in Hinblick auf die beschriebenen Charakteristika anderer mRNAs der Photosynthesegene (siehe nächster Abschnitt).

4.2.2.8. HALBWERTSZEITEN IN KATEGORIE PS

Die Regulation der Expression der Photosynthesegene ist wie unter 1.2 beschrieben abhängig von Sauerstoff und Licht. Es ist bekannt, dass zusätzlich zur transkriptionellen Genregulation bei einigen Transkripten eine Regulation auf posttranskriptionaler Ebene stattfindet. Die Ergebnisse, die für das *puf* und das *puc* Operon in *R. capsulatus* gewonnen wurden, sind nahezu vollständig auf die homologen Operons in *R. sphaeroides* übertragbar. Es ist hierbei zu erwähnen, dass in *R. sphaeroides* im Gegensatz zu *R. capsulatus* die RNase E Schnittstelle im 5' Bereich von *pufL* fehlt. Der Mechanismus der RNase E vermittelten, von Sauerstoff beeinflussten Prozessierung in *R. sphaeroides* und die Rolle einer *antisense* RNA zu *pufL* ist in der AG Klug momentan unter Untersuchung. Des Weiteren konnte in *R. capsulatus* ebenfalls gezeigt werden, dass die Stabilität der *pufBA* mRNA nicht von Sauerstoff beeinflusst wird und die Halbwertszeit unter aeroben und microaeroben Bedingungen ähnlich ist.

Mittels *Northern blot* wurden in *R. sphaeroides* Halbwertszeiten der Transkripte des *puf* Operons bestimmt (siehe Anhang, Abbildung 7.2). Vergleichbar mit *R. capsulatus* wurde für die *pufBA* mRNA unter microaeroben Bedingungen eine Halbwertszeit von etwa 36 Minuten bestimmt, unter aeroben Bedingungen um 26 Minuten und unter phototrophen Bedingungen um knapp 30 Minuten. Ebenfalls vergleichbar zeigte die *pufBALMX* mRNA Halbwertszeiten von ca. 11 Minuten unter microaeroben Bedingungen und war unter aeroben Bedingungen mit fünf Minuten ebenfalls nur knapp halb so stabil. Ein deutlicher Unterschied war unter phototrophen Bedingungen zu beobachten, so war die Halbwertszeit des großen Fragmentes hier mit über 30 Minuten deutlich länger war als unter den beiden anderen Bedingungen.

Wie aus Tabelle 4-2 hervorgeht, beliefen sich die Halbwertszeiten für *pufB* und *pufA* in den Microarrays ebenfalls auf Zeiten zwischen 22 und 26 Minuten unter allen getesteten Bedingungen und liegen damit im Bereich der Erwartungen. Dass die Halbwertszeiten hier etwas niedriger liegen als die mittels *Northern blot* bestimmten, was konträr zu den im Abschnitt 4.2 gemachten Beobachtungen ist, mag sich dadurch erklären, dass an die Sonden für *pufB* bzw. *pufA* auch das große *pufBALMX* Fragment bindet, welches eine andere Halbwertszeit aufweist. Zwar ist das *pufBA* Fragment deutlich abundanter und stellt damit die vorherrschende mRNA Spezies dar, die an die Sonden bindet, dennoch ist eine Art Konkurrenz um die Bindung an diese Sonden wahrscheinlich, was das Ergebnis der Halbwertszeitenberechnung beeinflussen kann.

Tabelle 4-2: Mittels Microarray bestimmte Halbwertszeiten der Transkripte des *puf*-Operons.
Halbwertszeiten in Minuten, bei leeren Feldern konnten keine Halbwertszeiten bestimmt werden,
Wachstumsbedingungen: HO aerob; LO microaerob; PT phototroph

Genname	HO	LO	PT
<i>pufB</i>	24,8	24,3	22,0
<i>pufA</i>	26,3	22,9	
<i>pufL</i>	20,0		
<i>pufM</i>		23,0	27,4
<i>pufX</i>		15,0	

Unter diesem Aspekt sind die ebenfalls recht langen Halbwertszeiten der mRNAs des langen Transkriptes (*pufLMX*) nur schwer zu erklären. Da die stabilere *pufBA* mRNA nicht an die Sonden für *pufL*, *M* und *X* binden sollte, entspricht hier nur der Wert für *pufM* unter phototrophen Bedingungen den Erwartungen. Die Halbwertszeit von 15 Minuten unter microaeroben Bedingungen ist ebenfalls in einem zu erwartenden Bereich, steht aber in Kontrast zu 23 Minuten des *pufM* Transkriptes. Beide Halbwertszeiten sollten sich hier doch ähnlich sein. Dass unter aeroben Bedingungen für *pufM* und *X* keine Halbwertszeiten bestimmt werden konnten, kann auch an der geringen Abundanz dieses Fragmentes auf Grund der verminderten Expression liegen. Warum jedoch eine Halbwertszeit für *pufL* bestimmt werden konnte, zudem eine so hohe, ist fragwürdig. Von Auswertungen von *Northern blot* Signalen ist jedoch auch bekannt, dass eine Berechnung der Halbwertszeiten von mRNAs mit nur sehr geringer Abundanz und sehr kurzer Halbwertszeit nicht immer mit allen Zeitwerten korrekt durchführbar ist (siehe *pufBALMX* Signal unter aeroben Bedingungen in Abbildung 7.2). Die Signale der späteren Zeitpunkte können zu einer Verfälschung des Ergebnisses beitragen. Zudem ist eine Berechnung sehr kurzer Halbwertszeiten mit den für die Microarrays gewählten Zeitpunkten von bis zu 30 Minuten ebenfalls erschwert. In diesem Fall wären kürzer gestaffelte Zeitpunkte der Probenahme nach Rifampicinzugabe von Vorteil. Aus Gründen der Praktikabilität und der erleichterten Berechnung längerer Halbwertszeiten wurde dabei aber in diesem Fall darauf verzichtet.

In Zusammenhang mit längeren Halbwertszeiten von Transkripten, die in Operons weiter entfernt von der Transkriptionsstartstelle liegen, steht auch der Befund, dass es zu Unterschieden in der Stabilität, Verzögertem Beginn des Abbaus und erhöhtem Transkriptlevel nach Rifampicinzugabe kommt, wie Steglich et al. in *Prochlorococcus* beobachtet haben (Steglich et al., 2010). Auch in *E. coli* wurde in einigen Operons eine erhöhte Stabilität von Genen beschrieben, die sich weiter vom Transkriptionsstart entfernt befinden (Selinger et al., 2003). Da dies jedoch im Falle der Transkripte von *pufLMX* erwiesenermaßen nicht zutreffend ist, kann nur vermutet werden, dass zum einen die Lokalisation von Transkripten in polycistronischen Operons und zum anderen eine Prozessierungen dieser polycistronischen Transkripte in Microarrays zu nicht vorhersehbaren Signalen führen, die eine Berechnung von Ratios bzw. Halbwertszeiten als schwierig gestalten. In diesem besonderen Fall ist eine Halbwertszeitenberechnung mittels Microarray eventuell nicht das Mittel der Wahl und eine Analyse via *Northern blot* stellt auf Grund der besseren Visualisierung von Prozessierungsprodukten eine zu präferierende Methode dar.

In beiden *Rhodobacter*-Spezies wird das Transkript von *pucBA* ebenfalls vom Sauerstoffgehalt beeinflusst, wenn auch in geringerem Maße als die *puf* Transkripte. Die *puc* Gene kodieren die pigmentbindenden Proteine der Lichtsammelkomplexe II (LHII) und liegen in zwei polycistronischen Operons außerhalb des Photosynthesegenclusters (Choudhary & Kaplan, 2000). In *R. capsulatus* hat die *pucBA* mRNA unter microaeroben Bedingungen eine Halbwertszeit von 29 Minuten und unter aeroben von 18 Minuten. In *R. sphaeroides* verhält es sich ähnlich, wie *Northern blot* Daten für microaerobe Bedingungen zeigen (siehe Anhang, Abbildung 7.1). Die Regulation dieses Operons erfolgt in sauerstoffabhängiger Weise demnach hauptsächlich durch eine Veränderung der Expressionsrate und die Abundanz der Transkripte hängt nur geringfügig von der Stabilität ab. Auch die Daten der Microarrays zeigen dies. Unter aeroben Bedingungen konnte nur die Halbwertszeit von *pucA* mit 22 Minuten bestimmt werden, die von *pucB* jedoch nicht, was auf eine geringe Abundanz unter aeroben Bedingungen zurückführbar sein kann. Die Halbwertszeiten unter microaeroben und phototrophen Bedingungen liegen mit knapp 21 und 22 Minuten im gleichen Bereich. Es ist jedoch zu beachten, dass eine Sonde für *pucB* zu denjenigen Sonden gehört, deren M- und A-Wert zur Bildung der unter 3.1 beschriebenen cluster in den MA-Plots beitragen (siehe auch Anhang, Tabelle 7-1, cluster 3).

Die übrigen Gene des photosynthetischen Genclusters, welche die Kategorie PS ausmachen, zeigten nur sehr geringe Unterschiede in den Transkripthalbwertszeiten. Die meisten Unterschiede sind hier zu gering, um sie tatsächlich als Auswirkungen der Wachstumsbedingungen zu betrachten (siehe auch 3.2.4), was mit bereits gemachten Beobachtungen übereinstimmt, dass auch viele Transkripte wie beispielsweise *puhA* (nicht-pigmentbindende Untereinheit des RC) unabhängig vom Sauerstoffgehalt abgebaut werden (Klug, 1991).

Die augenscheinlich längeren Halbwertszeiten bei den Vergleich mit aeroben Bedingungen (PT/HO und HO/LO) sind zum einen auf die nur sehr geringe Anzahl an bestimmten Halbwertszeiten pro Vergleich zurückzuführen und zum anderen auf die oben beschriebene Möglichkeit, dass die Halbwertszeiten unter aeroben Bedingungen auf Grund der niedrigen Abundanzen der Transkripte nicht immer zuverlässig zu bestimmen sind bzw. sehr kurz sind.

4.2.2.9. HALBWERTSZEITEN KLEINER, NICHT-KODIERENDER RNAs

Bei der Betrachtung der Transkripte, deren Halbwertszeiten unter den drei Bedingungen am stärksten verändert waren, fielen auch drei kleine, nicht-kodierende RNAs auf (Abschnitt 3.2.4). Bei

zweiten handelt es sich um *antisense* RNAs (asRNAs). asRSP1670 liegt *antisense* zu RSP_1670, das ein Protein der RelA/SpoT Familie kodiert, das wiederum den Level des Alarmons (p)ppGpp kontrolliert. asRSP3594 liegt auf dem Gegenstrang zu RSP_3594, das ein Anti-Frost-Protein kodiert.

Beide asRNAs sind unter phototrophen Bedingungen deutlich stabiler als unter microaeroben Bedingungen, sind bisher jedoch noch nicht näher untersucht. Wie in der Einleitung bereits erwähnt, binden asRNAs mit 100% Komplementarität ihre Ziel-mRNA und bilden dadurch lange, doppelsträngige Bereiche. Diese doppelsträngigen Bereiche sind oft Angriffspunkte für RNase III. Eine solche Spaltung kann den kompletten Abbau des mRNA/sRNA Duplexes initiieren (Arraiano et al., 2010). Die Bindung einer asRNA an ihre Ziel-mRNA kann jedoch auch zu einer Vielzahl anderer Effekte führen, die nicht einen direkten Abbau des Duplex zur Folge haben (Review in (Georg & Hess, 2011)). Eine Bindung im 5' Bereich der mRNA kann die Translation frühzeitig unterbrechen oder ganz unterbinden. Eine Bindung im 3' Bereich hingegen kann zum Abbruch der Transkription führen. Eine weitere Möglichkeit ist auch die Maskierung von RNase E Schnittstellen, was zu einer Stabilisierung der mRNA führt. asRSP1670 bindet relativ zentral in der kodierenden Sequenz, während asRSP3594 am äußersten 3' Ende bindet. Da jedoch beide asRNAs noch nicht näher untersucht sind und zudem keine Halbwertszeiten zu den Zielgenen vorliegen, ist eine Aussage bezüglich der möglichen Funktion an dieser Stelle nicht zu treffen. Auf Grund der sehr stark veränderten Halbwertszeiten unter unterschiedlichen Bedingungen stellen beide asRNAs und ihre Ziel-mRNAs interessante Ziele für weitere Untersuchungen dar.

Eine weitere sRNA, die deutliche Unterschiede in den Halbwertszeiten aufweist, ist RSsh1. Diese sRNA ist unter microaeroben Bedingungen mit 45 Minuten sehr stabil, jedoch sowohl unter aeroben als auch phototrophen Bedingungen mit Halbwertszeiten unter zehn Minuten deutlich instabiler. Früheren Analysen zur Folge wird diese sRNA vom RNA Chaperon Hfq gebunden und es lassen sich im *Northern blot* zwei Fragmente detektieren. Des Weiteren ist die Expression von RSsh1 abhängig von der Wachstumsphase (Berghoff et al., 2011). Darüber hinaus ist diese sRNA noch nicht weiter charakterisiert worden und mögliche Ziele sind ebenfalls nicht identifiziert. Eine Abhängigkeit der Expression von der Wachstumsphase, eine Interaktion mit Hfq und deutlich veränderte Halbwertszeiten des Transkriptes abhängig von den Wachstumsbedingungen sind jedoch gute Voraussetzungen für eine eingehendere Charakterisierung dieser sRNA.

4.3. VERIFIZIERUNG DER MICROARRAYDATEN

Für eine Abschätzung, inwieweit die Daten, die mittels der drei Microarrays gewonnen wurden vertrauenswürdig sind, wurden Halbwertszeiten von einigen ausgewählten Transkripten durch qRT PCR und *Northern blot* bestimmt und anschließend verglichen. Die Auswahl der Gene, deren Transkripte dahingehend überprüft werden sollten, wurden wie unter 3.3 beschrieben unter der Zuhilfenahme der Daten einer RNA-Sequenzierung ausgewählt. Durch die Darstellung der Transkriptabundanzen in diesen Daten wurde die Auswahl dahingehend erleichtert, dass man solche Gene auswählen konnte, deren Transkripte mutmaßlich abundant genug sind, um sie auf *Northern blot* Membranen detektieren zu können. Des Weiteren ließ sich durch diese Daten erkennen, welche Gene einen eigenen Transkriptionsstart besitzen und ob sie monocistronisch vorliegen. Monocistronische mRNAs sind auf Grund der eher geringeren Größe tendenziell einfacher zu detektieren. Von den anfänglich ausgesuchten Genen konnten die Transkripte der in den Abbildungen Abbildung 3.32, Abbildung 3.34, Abbildung 3.35, Abbildung 3.36 und Abbildung 3.37 dargestellten Gene von RSP_0386, RSP_6107, RSP_2693 und RSP_6236 mittels *Northern blot*

detektiert und die Halbwertszeiten bestimmt werden. In den *phosphoimages* (Abbildung 3.32) erkennt man bei RSP_0386, RSP_6107 und vor allem RSP_2693 höher laufende Banden. Prinzipiell können solche Banden auf unprozessierte Primärtranskripte zurückgehen, ist in den hier gezeigten Fällen auf Basis der RNA-seq Daten aber auszuschließen, da im Tex-behandelten Datensatz keine Transkripte dieser Größen erkennbar sind und diese Gene monocistronisch vorliegen (für eine Beschreibung der Tex-Behandlung siehe Abschnitt 3.3). Im Falle der niedriger laufenden Banden im *Northern blot* von RSP_0386 handelt es sich möglicherweise um Abbauprodukte, die von der Sonde noch detektiert werden. Bei den höheren Banden kann es sich um unspezifische Signale handeln. Gerade Signale, die auf sehr große Transkripte hinweisen, können auf unspezifische Bindungen an chromosomale DNA zurückgehen, die ihrer Größe nach entsprechend weit oben im Gel laufen und eventuell mit auf die Membran geblottet werden. Ein vorhergehender DNase-Verdau der RNA kann Fehlhybridisierungen an solche DNA Sequenzen verhindern, was in diesen Fällen jedoch nicht geschehen ist. Bei einigen Test-Hybridisierungen mit anderen Sonden zeigte ein solcher DNase-Verdau jedoch keinen Unterschied (Daten nicht gezeigt), weswegen solche unspezifischen Signale nicht zwangsläufig auf Fehlhybridisierungen an DNA zurückgehen müssen. Eine weitere Möglichkeit stellt auch eine Fehlhybridisierung an die sehr abundanten rRNA Spezies dar. Wie an der obersten Bande im *phosphoimage* von RSP_0386 erkennbar ist, liegt diese Bande in etwa auf derselben Höhe wie die Bande der 14S rRNA (Abbildung 3.32). Es wurden zwar alle Sonden dahingehend mittels nBLAST getestet, und keine zeigte eine potenzielle Kreuzreaktion mit den rRNA Sequenzen, auf Grund der sehr hohen Abundanz dieser RNA Spezies und der verdächtigen Höhe ist dies aber nicht vollkommen auszuschließen. Nichtsdestotrotz zeigte sich aber in allen *Northern blots* eine prominente Bande auf einer Höhe, die basierend auf den RNA-seq Daten in Frage kommt. Und all diese Banden zeigten in den *Northern blots* zur eigentlichen Halbwertszeitenbestimmung ein eindeutiges Abbauverhalten, woraus zu schließen ist, dass es sich dabei um spezifische Signale handelte.

Auch die berechneten Halbwertszeiten der untersuchten Transkripte passten in den Duplikaten mit einer Ausnahme sehr gut zusammen. So sind die mittels *Northern blot* bestimmten Halbwertszeiten der Transkripte von RSP_0386, RSP_6107 und RSP_6236 auf Grund der nur geringen Abweichung der Duplikate als relativ vertrauenswürdig anzusehen. Auch die dargestellten Abbauprofile passen gut zueinander. Lediglich in Bezug auf die kurzen Halbwertszeiten des RSP_6107 Transkriptes unter aeroben und microaeroben Bedingungen, könnten geringere Zeitabstände der Probennahme zukünftig zu genaueren Ergebnissen führen. Im Fall von RSP_6236 konnten jedoch nicht für beide Duplikatserien Halbwertszeiten berechnet werden, da die Hybridisierung mit der entsprechenden Sonde nur für die Proben einer Duplikatserie auf einer *Northern blot* Membran zu einem detektierbaren Signal führte. Dies kann auf einen Fehler beim eigentlichen Blotvorgang zurückzuführen sein, da auch eine wiederholte Hybridisierung nicht zum Erfolg führte, eine fehlerhafte Hybridisierung damit also auszuschließen ist. Da auf der Membran der anderen Duplikatserie Signale erkennbar waren, ist eine fehlerhafte Sonde auch aller Wahrscheinlichkeit nach auszuschließen. Um hier eine genauere Aussage treffen zu können und um auszuschließen, dass das detektierte Signale nicht auf eine unspezifische Bindung zurückgeht, müsste das Experiment und der *Northern blot* hierfür wiederholt werden. Die Höhe, auf der die Bande zu sehen ist, entspricht jedoch der erwarteten Größe des Transkriptes, wie die RNA-seq Daten verdeutlichen. Eine Wiederholung ist auch dahingehend nötig, um die Halbwertszeiten doppelt zu bestimmen. Dass unter aeroben Bedingungen keine Banden zu erkennen waren spricht für eine zu geringe Abundanz des Transkriptes auf Grund nur geringer bzw. keiner Expression unter aeroben Bedingungen und bestätigt damit indirekt die Daten aus den Microarrays, in denen unter dieser Bedingung nur sehr abweichende

Halbwertszeiten berechnet werden konnten, was womöglich auf eine zu geringe Abundanz zurückzuführen ist.

Auch die Halbwertszeitenberechnungen mittels qRT PCR führten in den Duplikaten zu gut zueinander passenden Ergebnissen.

Wie bereits unter 4.2 beschrieben, unterschieden sich die Halbwertszeiten, die durch die drei Methoden berechnet wurden selbst für ein Transkript unter denselben Bedingungen teilweise erheblich. Die Gründe für diese Diskrepanzen sind im Abschnitt 4.2 bereits diskutiert worden.

Auf Grund dieser beobachteten Unterschiede konnte kein direkter Vergleich der Halbwertszeiten zur Validierung der Microarraydaten erfolgen, sondern lediglich ein qualitativer Vergleich. So wurde der Unterschied in Form des Verhältnisses (*FC, fold change*) der Halbwertszeiten eines Transkriptes unter jeweils einer Bedingung zur anderen für jede Methode getrennt berechnet, sodass dann diese Verhältnisse verglichen werden konnten (siehe Abbildung 3.38 und Abbildung 3.39). Wie aus Abbildung 3.39 hervorgeht, konnten die Verhältnisse der Halbwertszeiten in den Microarrays zum überwiegenden Teil durch qRT PCR und *Northern blot* bestätigt werden. Beim Vergleich der Halbwertszeiten ist jedoch zu bemerken, dass die Verhältnisse bei manchen Vergleichen sehr gering sind und keine deutliche Tendenz erkennbar ist, was eine eindeutige Verifizierung erschwert. Am Beispiel von RSP_0386 und RSP_6107 zeigten sich in den Microarrays unter phototrophen und microaeroben Bedingungen nur sehr geringe Unterschiede, welche in ähnlichem Maße durch die qRT PCR bestätigt wurden, die *Northern blot* Analysen hingegen zeigten aber deutlichere Unterschiede auf. Die Tendenzen bestätigten sich hier, es ist aber zu vermuten, dass sich die Halbwertszeiten tatsächlich wie im *Northern blot* gesehen deutlicher unterscheiden. Für RSP_6107 konnte beispielsweise das Verhältnis im HO/LO Vergleich nicht bestätigt werden, jedoch ist zum einen das Verhältnis der durch die Microarrays berechneten Halbwertszeiten mit einem Faktor von 1,4 nicht sehr groß, zum anderen aber sind die durch qRT PCR und *Northern blot* bestimmten Halbwertszeiten auch nur sehr geringfügig unterschiedlich. Da die Tendenzen in eine andere Richtung zeigen, ist eine nicht-bestätigte Verifizierung hier zwar in Abbildung 3.39 dargestellt, die Aussage ist jedoch auf Grund der sehr geringen Unterschiede nur bedingt anzuerkennen. Selbiges gilt auch für die ermittelten Verhältnisse der Halbwertszeiten im HO/LO Vergleich von RSP_0386 und RSP_2693, da die Unterschiede für eine klare Aussage sehr gering sind. Ähnlich verhält es sich mit der Verifizierung der Verhältnisse der Halbwertszeiten von RSP_2130 unter phototrophen und aeroben Bedingungen. Hier wiesen die Microarraydaten auf einen deutlichen Unterschied hin, der sich jedoch in den qRT PCR Daten als nur gering erwies. Eine Verifizierung mittels *Northern blot* wäre hier sinnvoll, zumal dieses Gen wie im Abschnitt 4.2.2.1 erläutert ein potentiell interessantes Ziel für weitere Analysen darstellt.

Die beobachteten Diskrepanzen gehen zum Teil auch möglicherweise auf die in den Microarrays recht weit gesetzten Grenzen zurück, welche Halbwertszeiten unter einer Bedingung noch als gleich angesehen werden (siehe 3.2). Dadurch kann es unter Umständen zu größeren oder auch kleineren Unterschieden kommen als sich in den anderen Methoden zeigen

Zusammenfassend stellten sich die Ergebnisse der Microarraydaten nach diesen Analysen zum größten Teil als valide dar.

Da die Verifizierung jedoch nicht zu 100% gelungen ist und sich einige wenige Verhältnisse der Halbwertszeiten zueinander durch die beiden anderen Methoden nicht bestätigten, ist es ratsam, Aussagen die auf Basis der Microarraydaten getroffen werden in einzelnen Fällen nochmals nach Möglichkeit durch eine *Northern blot* Analyse zu überprüfen. Die Präferenz des *Northern blots* rührt

daher, dass mit dieser Methode das gesamte Transkript betrachtet wird, man erkennt ob die mRNA von Interesse Teil eines polycistronischen Transkriptes ist und dass mögliche Prozessierungsprodukte erkennbar sind. Zusammengenommen lässt dies eine zuverlässigere Berechnung der Halbwertszeit zu als die Betrachtung nur eines kleinen Fragmentes des Transkriptes mittels qRT PCR.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Ein wichtiger Schritt der Genexpression findet auf Ebene der posttranskriptionalen Regulation durch Prozessierung und Degradation von RNA statt. Die Zeit, in der eine *messenger* RNA der Zelle zur Translation zur Verfügung steht hat einen maßgeblichen Einfluss auf die Menge des kodierten Proteins. So eröffnet eine Einflussnahme auf die Stabilität eines Transkriptes dem Organismus eine weitere Möglichkeit, sich optimal an seine Umwelt anzupassen. Die Halbwertszeit eines Transkriptes kann sich erwiesenermaßen in Antwort auf Veränderungen der Umweltbedingungen ändern, wie beispielsweise unter Kälteschockbedingungen in *Escherichia coli* oder beim Aufbau des Photosyntheseapparates bei sinkendem Sauerstoffgehalt in *Rhodobacter capsulatus* gezeigt werden konnte.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein transkriptomweiter Vergleich der Halbwertszeiten von über 4000 Transkripten in *Rhodobacter sphaeroides* durchgeführt. Hauptaugenmerk lag dabei auf der Betrachtung der Unterschiede, die sich aus den drei Wachstumsbedingungen aerob, microaerob und phototroph ergaben. Hierfür wurden drei Transkriptomchips erstellt um die RNA von *R. sphaeroides* Kulturen zu untersuchen, die unter den genannten Bedingungen angezogen wurden und deren Transkription durch das Antibiotikum Rifampicin unterbunden wurde. Durch diese Methode konnten von 1461 Transkripten aus den aerob gewachsenen Kulturen Halbwertszeiten bestimmt werden. Für die microaeroben Kulturen gelang dies von 2222 Transkripten und für die phototrophen Kulturen von 2353 Transkripten.

Die errechneten Halbwertszeiten lagen dabei in einem Bereich zwischen weniger als fünf Minuten und über einer Stunde. Der Median der Halbwertszeiten lag je nach Bedingung zwischen 21 und 22 Minuten. Damit sind die Transkripthalbwegszeiten in *R. sphaeroides* bei globaler Betrachtung deutlich länger als in anderen, bisher untersuchten Prokaryoten und liegen in etwa im Bereich der mRNA Halbwertszeiten des Eukaryoten *Saccharomyces cerevisiae*. So lange Halbwertszeiten sind für einige Transkripte in *R. sphaeroides* bekannt, dennoch lässt sich hier ein methodischer Einfluss nicht vollkommen ausschließen. Aus diesem Ergebnis kann auch geschlossen werden, dass unterschiedliche Wachstumsbedingungen nicht zu einer gleichmäßigen Stabilisierung bzw. Destabilisierung des gesamten Transkriptoms führten.

Für eine nähere Untersuchung, ob die Transkripthalbwertszeit mit der Funktion des Genproduktes in Zusammenhang steht und ob die Wachstumsbedingung darauf einen Einfluss hat, wurden alle Gene von *R. sphaeroides* in funktionelle Kategorien eingeteilt. Auch hier zeigten sich keine Unterschiede in den Medianwerten der Halbwertszeiten in den einzelnen Kategorien unter einer Bedingung. Verschiedene Wachstumsbedingungen veränderten den Medianwert einer Kategorie ebenfalls nur geringfügig.

Beim Vergleich der Verteilung der Halbwertszeiten in den einzelnen Kategorien fanden sich unter aeroben Bedingungen jedoch überdurchschnittlich viele Transkripte mit kurzen Halbwertszeiten in der Kategorie, die Gene für die Translation und Ribosomenstruktur umfassen sowie in der Kategorie mit Genen der Zellteilung. Viele Transkripte mit hohen Halbwertszeiten fanden sich in den Kategorien des Transports anorganischer Ionen und der der Biosynthese und des Transports von Sekundärmetaboliten.

Microaerobe Bedingungen führten zu einer Überrepräsentation von Transkripten mit kurzen Halbwertszeiten in den Kategorien des Lipidstoffwechsels und der Transkription. Transkripte der Kategorie des Nukleotidstoffwechsels hatten unter dieser Bedingung eher lange Halbwertszeiten.

Interessanterweise gab es in der Kategorie des intrazellulären Transports und der Sekretion unter phototrophen Bedingungen sowohl überdurchschnittlich viele Transkripte mit kurzen Halbwertszeiten als auch viele mit langen Halbwertszeiten.

Dies spiegelte einen gewissen Trend wider, wie sich auch beim direkten Vergleich der Halbwertszeiten in den funktionellen Kategorien zeigte. Im Vergleich zu microaeroben Bedingungen führten sowohl phototrophe als auch aerobe Wachstumsbedingungen in vielen Kategorien zu mehr Transkripten mit kurzen Halbwertszeiten und auch zu mehr Transkripten mit langen Halbwertszeiten. Die Verteilung der Halbwertszeiten war unter phototrophen und aeroben Bedingungen überwiegend gleich. Unterschiede zeigten sich aber in den Kategorien der Translation, der Signaltransduktion, des Coenzymmetabolismus und des Lipidstoffwechsels, in denen aerobe Bedingungen zu tendenziell mehr Transkripten mit langen Halbwertszeiten führten. Unter phototrophen Bedingungen waren mehr Transkripte mit langen Halbwertszeiten in den Kategorien der DNA Replikation und Reparatur sowie in den Kategorien der Zellteilung und der Abwehrmechanismen zu verzeichnen gewesen. Die deutlichsten Unterschiede zwischen den Wachstumsbedingungen zeigten sich letztendlich aber bei nur relativ wenigen Transkripten.

So lässt sich zusammenfassend die Aussage treffen, dass zum einen die Stabilität des Transkriptoms von *R. sphaeroides* größer ist als die der Transkriptome anderer bereits untersuchter Prokaryoten. Zum anderen zeigt sich auch, dass unterschiedliche Wachstumsbedingungen in *R. sphaeroides* nicht zu einer globalen Veränderung der Transkriptstabilitäten führen. Auch sind dadurch keine ganzen funktionellen Kategorien an Genen gleichmäßig betroffen. Sehr wohl aber sind einzelne Transkripte in vielen Kategorien zum Teil sehr stark in ihrer Stabilität durch unterschiedliche Wachstumsbedingungen verändert.

Diese Arbeit legt den Grundstein zur Analyse, in welchem Umfang eine Genregulation über die Veränderung von Transkriptstabilitäten unter aerober, microaerober und phototropher Lebensweise stattfindet, um optimal an die momentan herrschende Wachstumsbedingungen angepasst zu sein. Von den Transkripten mit stark veränderten Halbwertszeiten stellen einige interessante Ziele für weitergehende Untersuchungen dar.

6. REFERENZEN

- Altschul, S.F., T.L. Madden, A.A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller & D.J. Lipman, (1997)** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research* 25: 3389-3402.
- Anderson, L.A., E. McNairn, T. Lubke, R.N. Pau & D.H. Boxer, (2000)** ModE-dependent molybdate regulation of the molybdenum cofactor operon moa in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 182: 7035-7043.
- Andersson, A.F., M. Lundgren, S. Eriksson, M. Rosenlund, R. Bernander & P. Nilsson, (2006)** Global analysis of mRNA stability in the archaeon *Sulfolobus*. *Genome biology* 7: R99.
- Anupama, K., J.K. Leela & J. Gowrishankar, (2011)** Two pathways for RNase E action in *Escherichia coli* in vivo and bypass of its essentiality in mutants defective for Rho-dependent transcription termination. *Molecular microbiology* 82: 1330-1348.
- Arnold, T.E., J. Yu & J.G. Belasco, (1998)** mRNA stabilization by the ompA 5' untranslated region: two protective elements hinder distinct pathways for mRNA degradation. *RNA (New York, N.Y.)* 4: 319-330.
- Arraiano, C.M., J.M. Andrade, S. Domingues, I.B. Guinote, M. Malecki, R.G. Matos, R.N. Moreira, V. Pobre, F.P. Reis, M. Saramago, I.J. Silva & S.C. Viegas, (2010)** The critical role of RNA processing and degradation in the control of gene expression. *FEMS microbiology reviews* 34: 883-923.
- Babitzke, P. & S.R. Kushner, (1991)** The Ams (altered mRNA stability) protein and ribonuclease E are encoded by the same structural gene of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88: 1-5.
- Baker, K.E. & G.A. Mackie, (2003)** Ectopic RNase E sites promote bypass of 5'-end-dependent mRNA decay in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* 47: 75-88.
- Baker, K.P. & D.H. Boxer, (1991)** Regulation of the chlA locus of *Escherichia coli* K12: involvement of molybdenum cofactor. *Molecular microbiology* 5: 901-907.
- Bandyra, K.J., N. Said, V. Pfeiffer, M.W. Gorna, J. Vogel & B.F. Luisi, (2012)** The seed region of a small RNA drives the controlled destruction of the target mRNA by the endoribonuclease RNase E. *Molecular cell* 47: 943-953.
- Bauer, C.E. & B.L. Marrs, (1988)** *Rhodobacter capsulatus* puf operon encodes a regulatory protein (PufQ) for bacteriochlorophyll biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85: 7074-7078.
- Belasco, J.G., (2010)** All things must pass: contrasts and commonalities in eukaryotic and bacterial mRNA decay. *Nature reviews. Molecular cell biology* 11: 467-478.
- Belasco, J.G., J.T. Beatty, C.W. Adams, A. von Gabain & S.N. Cohen, (1985)** Differential expression of photosynthesis genes in *R. capsulata* results from segmental differences in stability within the polycistronic rxcA transcript. *Cell* 40: 171-181.
- Berghoff, B.A., J. Glaeser, C.M. Sharma, J. Vogel & G. Klug, (2009)** Photooxidative stress-induced and abundant small RNAs in *Rhodobacter sphaeroides*. *Molecular microbiology* 74: 1497-1512.
- Berghoff, B.A., J. Glaeser, C.M. Sharma, M. Zobawa, F. Lottspeich, J. Vogel & G. Klug, (2011)** Contribution of Hfq to photooxidative stress resistance and global regulation in *Rhodobacter sphaeroides*. *Molecular microbiology* 80: 1479-1495.
- Bernstein, J.A., A.B. Khodursky, P.H. Lin, S. Lin-Chao & S.N. Cohen, (2002)** Global analysis of mRNA decay and abundance in *Escherichia coli* at single-gene resolution using two-color fluorescent DNA microarrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 9697-9702.

- Bernstein, J.A., P.H. Lin, S.N. Cohen & S. Lin-Chao, (2004)** Global analysis of Escherichia coli RNA degradosome function using DNA microarrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 2758-2763.
- Berthelot, K., Y. Estevez, A. Deffieux & F. Peruch, (2012)** Isopentenyl diphosphate isomerase: A checkpoint to isoprenoid biosynthesis. *Biochimie* 94: 1621-1634.
- Blum, E., A.J. Carpousis & C.F. Higgins, (1999)** Polyadenylation promotes degradation of 3'-structured RNA by the Escherichia coli mRNA degradosome in vitro. *The Journal of biological chemistry* 274: 4009-4016.
- Borland, C.F., D.J. McGarvey, A.R. Morgan & T.G. Truscott, (1988)** Laser flash photolysis of purpurins: novel potential photosensitizers of interest in photodynamic therapy. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology* 2: 427-434.
- Bouvet, P. & J.G. Belasco, (1992)** Control of RNase E-mediated RNA degradation by 5'-terminal base pairing in E. coli. *Nature* 360: 488-491.
- Bouvier, M. & A.J. Carpousis, (2011)** A tale of two mRNA degradation pathways mediated by RNase E. *Molecular microbiology* 82: 1305-1310.
- Bove, P., V. Capozzi, C. Garofalo, A. Rieu, G. Spano & D. Fiocco, (2012)** Inactivation of the ftsH gene of Lactobacillus plantarum WCFS1: effects on growth, stress tolerance, cell surface properties and biofilm formation. *Microbiological research* 167: 187-193.
- Braatsch, S., M. Gomelsky, S. Kuphal & G. Klug, (2002)** A single flavoprotein, AppA, integrates both redox and light signals in Rhodospirillum rubrum. *Molecular microbiology* 45: 827-836.
- Buck, M., M.T. Gallegos, D.J. Studholme, Y. Guo & J.D. Gralla, (2000)** The bacterial enhancer-dependent sigma(54) (sigma(N)) transcription factor. *Journal of bacteriology* 182: 4129-4136.
- Callaghan, A.J., M.J. Marcaida, J.A. Stead, K.J. McDowall, W.G. Scott & B.F. Luisi, (2005)** Structure of Escherichia coli RNase E catalytic domain and implications for RNA turnover. *Nature* 437: 1187-1191.
- Campos-Guillen, J., P. Bralley, G.H. Jones, D.H. Bechhofer & G. Olmedo-Alvarez, (2005)** Addition of poly(A) and heteropolymeric 3' ends in Bacillus subtilis wild-type and polynucleotide phosphorylase-deficient strains. *Journal of bacteriology* 187: 4698-4706.
- Caron, M.P., D.A. Lafontaine & E. Masse, (2010)** Small RNA-mediated regulation at the level of transcript stability. *RNA biology* 7: 140-144.
- Carpousis, A.J., (2007)** The RNA degradosome of Escherichia coli: an mRNA-degrading machine assembled on RNase E. *Annual review of microbiology* 61: 71-87.
- Chen, C.Y., J.T. Beatty, S.N. Cohen & J.G. Belasco, (1988)** An intercistronic stem-loop structure functions as an mRNA decay terminator necessary but insufficient for puf mRNA stability. *Cell* 52: 609-619.
- Chen, Z., A. Itzek, H. Malke, J.J. Ferretti & J. Kreth, (2013)** Multiple roles of RNase Y in Streptococcus pyogenes mRNA processing and degradation. *Journal of bacteriology* 195: 2585-2594.
- Chory, J., T.J. Donohue, A.R. Varga, L.A. Staehelin & S. Kaplan, (1984)** Induction of the photosynthetic membranes of Rhodospirillum rubrum: biochemical and morphological studies. *Journal of bacteriology* 159: 540-554.
- Choudhary, M., Y.X. Fu, C. Mackenzie & S. Kaplan, (2004)** DNA sequence duplication in Rhodospirillum rubrum 2.4.1: evidence of an ancient partnership between chromosomes I and II. *Journal of bacteriology* 186: 2019-2027.
- Choudhary, M. & S. Kaplan, (2000)** DNA sequence analysis of the photosynthesis region of Rhodospirillum rubrum 2.4.1. *Nucleic acids research* 28: 862-867.

- Cohen-Bazire, G., W.R. Siström & R.Y. Stanier, (1957)** Kinetic studies of pigment synthesis by non-sulfur purple bacteria. *Journal of cellular physiology* 49: 25-68.
- Condon, C., (2007)** Maturation and degradation of RNA in bacteria. *Current opinion in microbiology* 10: 271-278.
- Condon, C. & D.H. Bechhofer, (2011)** Regulated RNA stability in the Gram positives. *Current opinion in microbiology* 14: 148-154.
- Condon, C. & H. Putzer, (2002)** The phylogenetic distribution of bacterial ribonucleases. *Nucleic acids research* 30: 5339-5346.
- Condon, C., H. Putzer, D. Luo & M. Grunberg-Manago, (1997)** Processing of the *Bacillus subtilis* thrS leader mRNA is RNase E-dependent in *Escherichia coli*. *Journal of molecular biology* 268: 235-242.
- Deana, A. & J.G. Belasco, (2005)** Lost in translation: the influence of ribosomes on bacterial mRNA decay. *Genes & development* 19: 2526-2533.
- Deana, A., H. Celesnik & J.G. Belasco, (2008)** The bacterial enzyme RppH triggers messenger RNA degradation by 5' pyrophosphate removal. *Nature* 451: 355-358.
- del Campo, A.M., T. Ballado, J. de la Mora, S. Poggio, L. Camarena & G. Dreyfus, (2007)** Chemotactic control of the two flagellar systems of *Rhodobacter sphaeroides* is mediated by different sets of CheY and FlIM proteins. *Journal of bacteriology* 189: 8397-8401.
- Dimroth, P. & B. Schink, (1998)** Energy conservation in the decarboxylation of dicarboxylic acids by fermenting bacteria. *Archives of microbiology* 170: 69-77.
- Dorleans, A., I. Li de la Sierra-Gallay, J. Piton, L. Zig, L. Gilet, H. Putzer & C. Condon, (2011)** Molecular basis for the recognition and cleavage of RNA by the bifunctional 5'-3' exo/endoribonuclease RNase J. *Structure (London, England : 1993)* 19: 1252-1261.
- Dressaire, C., F. Picard, E. Redon, P. Loubiere, I. Queinnec, L. Girbal & M. Coccagn-Bousquet, (2013)** Role of mRNA stability during bacterial adaptation. *PLoS one* 8: e59059.
- Drews, G., (1984)** G. Drews: Mikrobiologisches Praktikum. 4. Aufl. 265 Seiten, 54 Abb. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo 1983. Preis: 29,80 DM. *Food / Nahrung* 28: 1004-1004.
- Emory, S.A., P. Bouvet & J.G. Belasco, (1992)** A 5'-terminal stem-loop structure can stabilize mRNA in *Escherichia coli*. *Genes & development* 6: 135-148.
- Eraso, J.M. & S. Kaplan, (1994)** prrA, a putative response regulator involved in oxygen regulation of photosynthesis gene expression in *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of bacteriology* 176: 32-43.
- Esquerre, T., S. Laguerre, C. Turlan, A.J. Carpousis, L. Girbal & M. Coccagn-Bousquet, (2014)** Dual role of transcription and transcript stability in the regulation of gene expression in *Escherichia coli* cells cultured on glucose at different growth rates. *Nucleic acids research* 42: 2460-2472.
- Even, S., O. Pellegrini, L. Zig, V. Labas, J. Vinh, D. Brechemmier-Baey & H. Putzer, (2005)** Ribonucleases J1 and J2: two novel endoribonucleases in *B. subtilis* with functional homology to *E. coli* RNase E. *Nucleic acids research* 33: 2141-2152.
- Evguenieva-Hackenberg, E. & G. Klug, (2000)** RNase III processing of intervening sequences found in helix 9 of 23S rRNA in the alpha subclass of Proteobacteria. *Journal of bacteriology* 182: 4719-4729.
- Farchaus, J.W., W.P. Barz, H. Grunberg & D. Oesterhelt, (1992)** Studies on the expression of the pufX polypeptide and its requirement for photoheterotrophic growth in *Rhodobacter sphaeroides*. *The EMBO journal* 11: 2779-2788.
- Finkel, S.E. & R.C. Johnson, (1992)** The Fis protein: it's not just for DNA inversion anymore. *Molecular microbiology* 6: 3257-3265.

- Fischer, B., G. Rummel, P. Aldridge & U. Jenal, (2002)** The FtsH protease is involved in development, stress response and heat shock control in *Caulobacter crescentus*. *Molecular microbiology* 44: 461-478.
- Foote, C.S., Y.C. Chang & R.W. Denny, (1970)** Chemistry of singlet oxygen. X. Carotenoid quenching parallels biological protection. *Journal of the American Chemical Society* 92: 5216-5218.
- Fritsch, J., R. Rothfuchs, R. Rauhut & G. Klug, (1995)** Identification of an mRNA element promoting rate-limiting cleavage of the polycistronic *puf* mRNA in *Rhodobacter capsulatus* by an enzyme similar to RNase E. *Molecular microbiology* 15: 1017-1029.
- Fulcher, T.K., J.T. Beatty & M.R. Jones, (1998)** Demonstration of the key role played by the PufX protein in the functional and structural organization of native and hybrid bacterial photosynthetic core complexes. *Journal of bacteriology* 180: 642-646.
- Garrey, S.M. & G.A. Mackie, (2011)** Roles of the 5'-phosphate sensor domain in RNase E. *Molecular microbiology* 80: 1613-1624.
- Georg, J. & W.R. Hess, (2011)** cis-antisense RNA, another level of gene regulation in bacteria. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 75: 286-300.
- Giuliodori, A.M., F. Di Pietro, S. Marzi, B. Masquida, R. Wagner, P. Romby, C.O. Gualerzi & C.L. Pon, (2010)** The *cspA* mRNA is a thermosensor that modulates translation of the cold-shock protein CspA. *Molecular cell* 37: 21-33.
- Goldenberg, D., I. Azar & A.B. Oppenheim, (1996)** Differential mRNA stability of the *cspA* gene in the cold-shock response of *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* 19: 241-248.
- Gomelsky, M. & S. Kaplan, (1997)** Molecular genetic analysis suggesting interactions between AppA and PpsR in regulation of photosynthesis gene expression in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *Journal of bacteriology* 179: 128-134.
- Gonin, S., P. Arnoux, B. Pierru, J. Lavergne, B. Alonso, M. Sabaty & D. Pignol, (2007)** Crystal structures of an Extracytoplasmic Solute Receptor from a TRAP transporter in its open and closed forms reveal a helix-swapped dimer requiring a cation for alpha-keto acid binding. *BMC structural biology* 7: 11.
- Hamblin, P.A., B.A. Maguire, R.N. Grishanin & J.P. Armitage, (1997)** Evidence for two chemosensory pathways in *Rhodobacter sphaeroides*. *Molecular microbiology* 26: 1083-1096.
- Hambraeus, G., C. von Wachenfeldt & L. Hederstedt, (2003)** Genome-wide survey of mRNA half-lives in *Bacillus subtilis* identifies extremely stable mRNAs. *Molecular genetics and genomics : MGG* 269: 706-714.
- Hankins, J.S., C. Zappavigna, A. Prud'homme-Genereux & G.A. Mackie, (2007)** Role of RNA structure and susceptibility to RNase E in regulation of a cold shock mRNA, *cspA* mRNA. *Journal of bacteriology* 189: 4353-4358.
- Hansen, M.J., L.H. Chen, M.L. Fejzo & J.G. Belasco, (1994)** The *ompA* 5' untranslated region impedes a major pathway for mRNA degradation in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* 12: 707-716.
- Happ, H.N., S. Braatsch, V. Broschek, L. Osterloh & G. Klug, (2005)** Light-dependent regulation of photosynthesis genes in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 is coordinately controlled by photosynthetic electron transport via the PrrBA two-component system and the photoreceptor AppA. *Molecular microbiology* 58: 903-914.
- Harrison, D.M., J. Skidmore, J.P. Armitage & J.R. Maddock, (1999)** Localization and environmental regulation of MCP-like proteins in *Rhodobacter sphaeroides*. *Molecular microbiology* 31: 885-892.
- Hartmann, G., K.O. Honikel, F. Knusel & J. Nuesch, (1967)** The specific inhibition of the DNA-directed RNA synthesis by rifamycin. *Biochimica et biophysica acta* 145: 843-844.

- Heck, C., A. Balzer, O. Fuhrmann & G. Klug, (2000)** Initial events in the degradation of the polycistronic puf mRNA in *Rhodobacter capsulatus* and consequences for further processing steps. *Molecular microbiology* 35: 90-100.
- Heck, C., R. Rothfuchs, A. Jager, R. Rauhut & G. Klug, (1996)** Effect of the pufQ-pufB intercistronic region on puf mRNA stability in *Rhodobacter capsulatus*. *Molecular microbiology* 20: 1165-1178.
- Herman, C., D. Thevenet, R. D'Ari & P. Bouloc, (1995)** Degradation of sigma 32, the heat shock regulator in *Escherichia coli*, is governed by HflB. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 3516-3520.
- Hille, R., (1996)** The Mononuclear Molybdenum Enzymes. *Chemical reviews* 96: 2757-2816.
- Hirano, T., (2002)** The ABCs of SMC proteins: two-armed ATPases for chromosome condensation, cohesion, and repair. *Genes & development* 16: 399-414.
- Holland, I.B. & M.A. Blight, (1999)** ABC-ATPases, adaptable energy generators fuelling transmembrane movement of a variety of molecules in organisms from bacteria to humans. *Journal of molecular biology* 293: 381-399.
- Hundt, S., A. Zaigler, C. Lange, J. Soppa & G. Klug, (2007)** Global analysis of mRNA decay in *Halobacterium salinarum* NRC-1 at single-gene resolution using DNA microarrays. *Journal of bacteriology* 189: 6936-6944.
- Imhoff, J., (2001)** *The phototrophic alpha-proteobacteria. The prokaryotes: An evolving electronic resource for the microbiological community.* M. Dworkin.
- Iobbi-Nivol, C. & S. Leimkuhler, (2013)** Molybdenum enzymes, their maturation and molybdenum cofactor biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochimica et biophysica acta* 1827: 1086-1101.
- Jager, S., E. Evguenieva-Hackenberg & G. Klug, (2004a)** Temperature-dependent processing of the cspA mRNA in *Rhodobacter capsulatus*. *Microbiology* 150: 687-695.
- Jager, S., O. Fuhrmann, C. Heck, M. Hebermehl, E. Schiltz, R. Rauhut & G. Klug, (2001)** An mRNA degrading complex in *Rhodobacter capsulatus*. *Nucleic acids research* 29: 4581-4588.
- Jager, S., M. Hebermehl, E. Schiltz & G. Klug, (2004b)** Composition and activity of the *Rhodobacter capsulatus* degradosome vary under different oxygen concentrations. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* 7: 148-154.
- Jiang, X. & J.G. Belasco, (2004)** Catalytic activation of multimeric RNase E and RNase G by 5'-monophosphorylated RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 9211-9216.
- Jiang, X., A. Diwa & J.G. Belasco, (2000)** Regions of RNase E important for 5'-end-dependent RNA cleavage and autoregulated synthesis. *Journal of bacteriology* 182: 2468-2475.
- Jourdan, S.S. & K.J. McDowall, (2008)** Sensing of 5' monophosphate by *Escherichia coli* RNase G can significantly enhance association with RNA and stimulate the decay of functional mRNA transcripts in vivo. *Molecular microbiology* 67: 102-115.
- Jurgen, B., T. Schweder & M. Hecker, (1998)** The stability of mRNA from the *gsiB* gene of *Bacillus subtilis* is dependent on the presence of a strong ribosome binding site. *Molecular & general genetics : MGG* 258: 538-545.
- Kaberdin, V.R., D. Singh & S. Lin-Chao, (2011)** Composition and conservation of the mRNA-degrading machinery in bacteria. *Journal of biomedical science* 18: 23.
- Kiley, P.J. & S. Kaplan, (1988)** Molecular genetics of photosynthetic membrane biosynthesis in *Rhodobacter sphaeroides*. *Microbiological reviews* 52: 50-69.

- Kime, L., S.S. Jourdan, J.A. Stead, A. Hidalgo-Sastre & K.J. McDowall, (2010)** Rapid cleavage of RNA by RNase E in the absence of 5' monophosphate stimulation. *Molecular microbiology* 76: 590-604.
- Klug, G., (1991)** Endonucleolytic degradation of puf mRNA in *Rhodobacter capsulatus* is influenced by oxygen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88: 1765-1769.
- Klug, G., (1993)** The role of mRNA degradation in the regulated expression of bacterial photosynthesis genes. *Molecular microbiology* 9: 1-7.
- Klug, G., C.W. Adams, J. Belasco, B. Doerge & S.N. Cohen, (1987)** Biological consequences of segmental alterations in mRNA stability: effects of deletion of the intercistronic hairpin loop region of the *Rhodobacter capsulatus* puf operon. *The EMBO journal* 6: 3515-3520.
- Klug, G. & S.N. Cohen, (1990)** Combined actions of multiple hairpin loop structures and sites of rate-limiting endonucleolytic cleavage determine differential degradation rates of individual segments within polycistronic puf operon mRNA. *Journal of bacteriology* 172: 5140-5146.
- Kojadinovic, M., J.P. Armitage, M.J. Tindall & G.H. Wadhams, (2013)** Response kinetics in the complex chemotaxis signalling pathway of *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society* 10: 20121001.
- Komarova, A.V., L.S. Tchufistova, M. Dreyfus & I.V. Boni, (2005)** AU-rich sequences within 5' untranslated leaders enhance translation and stabilize mRNA in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 187: 1344-1349.
- Koonin, E.V., (1993)** A superfamily of ATPases with diverse functions containing either classical or deviant ATP-binding motif. *Journal of molecular biology* 229: 1165-1174.
- Koslover, D.J., A.J. Callaghan, M.J. Marcaida, E.F. Garman, M. Martick, W.G. Scott & B.F. Luisi, (2008)** The crystal structure of the *Escherichia coli* RNase E apoprotein and a mechanism for RNA degradation. *Structure (London, England : 1993)* 16: 1238-1244.
- Kristoffersen, S.M., C. Haase, M.R. Weil, K.D. Passalacqua, F. Niazi, S.K. Hutchison, B. Desany, A.B. Kolsto, N.J. Tourasse, T.D. Read & O.A. Okstad, (2012)** Global mRNA decay analysis at single nucleotide resolution reveals segmental and positional degradation patterns in a Gram-positive bacterium. *Genome biology* 13: R30.
- Laalami, S. & H. Putzer, (2011)** mRNA degradation and maturation in prokaryotes: the global players. *BioMolecular Concepts* 2.
- Laalami, S., L. Zig & H. Putzer, (2014)** Initiation of mRNA decay in bacteria. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 71: 1799-1828.
- Lalaouna, D., M. Simoneau-Roy, D. Lafontaine & E. Masse, (2013)** Regulatory RNAs and target mRNA decay in prokaryotes. *Biochimica et biophysica acta* 1829: 742-747.
- Leroy, A., N.F. Vanzo, S. Sousa, M. Dreyfus & A.J. Carpousis, (2002)** Function in *Escherichia coli* of the non-catalytic part of RNase E: role in the degradation of ribosome-free mRNA. *Molecular microbiology* 45: 1231-1243.
- Li de la Sierra-Gallay, I., L. Zig, A. Jamalli & H. Putzer, (2008)** Structural insights into the dual activity of RNase E. *Nature structural & molecular biology* 15: 206-212.
- Li, K., C. Pasternak & G. Klug, (2003)** Expression of the *trxA* gene for thioredoxin 1 in *Rhodobacter sphaeroides* during oxidative stress. *Archives of microbiology* 180: 484-489.
- Lin, H.H., C.H. Lin, S.M. Hwang & C.P. Tseng, (2012)** High growth rate downregulates *fumA* mRNA transcription but is dramatically compensated by its mRNA stability in *Escherichia coli*. *Current microbiology* 64: 412-417.

- Liou, G.G., H.Y. Chang, C.S. Lin & S. Lin-Chao, (2002)** DEAD box RhlB RNA helicase physically associates with exoribonuclease PNPase to degrade double-stranded RNA independent of the degradosome-assembling region of RNase E. *The Journal of biological chemistry* 277: 41157-41162.
- Louw, G.E., R.M. Warren, N.C. Gey van Pittius, R. Leon, A. Jimenez, R. Hernandez-Pando, C.R. McEvoy, M. Grobbelaar, M. Murray, P.D. van Helden & T.C. Victor, (2011)** Rifampicin reduces susceptibility to ofloxacin in rifampicin-resistant Mycobacterium tuberculosis through efflux. *American journal of respiratory and critical care medicine* 184: 269-276.
- Mackie, G.A., (1998)** Ribonuclease E is a 5'-end-dependent endonuclease. *Nature* 395: 720-723.
- Mackie, G.A., (2013)** RNase E: at the interface of bacterial RNA processing and decay. *Nature reviews. Microbiology* 11: 45-57.
- Mader, U., S. Hennig, M. Hecker & G. Homuth, (2004)** Transcriptional organization and posttranscriptional regulation of the Bacillus subtilis branched-chain amino acid biosynthesis genes. *Journal of bacteriology* 186: 2240-2252.
- Mader, U., L. Zig, J. Kretschmer, G. Homuth & H. Putzer, (2008)** mRNA processing by RNases J1 and J2 affects Bacillus subtilis gene expression on a global scale. *Molecular microbiology* 70: 183-196.
- Madigan, M.T., (1995)** *Microbiology of Nitrogen Fixation by anoxygenic Photosynthetic bacteria. Anoxygenic photosynthetic bacteria.* Heidelberg, Springer.
- Mank, N.N., B.A. Berghoff, Y.N. Hermanns & G. Klug, (2012)** Regulation of bacterial photosynthesis genes by the small noncoding RNA PcrZ. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109: 16306-16311.
- Martin, A.C., M. Gould, E. Byles, M.A. Roberts & J.P. Armitage, (2006)** Two chemosensory operons of Rhodobacter sphaeroides are regulated independently by sigma 28 and sigma 54. *Journal of bacteriology* 188: 7932-7940.
- Martin, A.C., G.H. Wadhams & J.P. Armitage, (2001a)** The roles of the multiple CheW and CheA homologues in chemotaxis and in chemoreceptor localization in Rhodobacter sphaeroides. *Molecular microbiology* 40: 1261-1272.
- Martin, A.C., G.H. Wadhams, D.S. Shah, S.L. Porter, J.C. Mantotta, T.J. Craig, P.H. Verdult, H. Jones & J.P. Armitage, (2001b)** CheR- and CheB-dependent chemosensory adaptation system of Rhodobacter sphaeroides. *Journal of bacteriology* 183: 7135-7144.
- Masse, E., F.E. Escorcia & S. Gottesman, (2003)** Coupled degradation of a small regulatory RNA and its mRNA targets in Escherichia coli. *Genes & development* 17: 2374-2383.
- Masse, E. & S. Gottesman, (2002)** A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in Escherichia coli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 4620-4625.
- Mathy, N., L. Benard, O. Pellegrini, R. Daou, T. Wen & C. Condon, (2007)** 5'-to-3' exoribonuclease activity in bacteria: role of RNase J1 in rRNA maturation and 5' stability of mRNA. *Cell* 129: 681-692.
- Mathy, N., A. Hebert, P. Mervelet, L. Benard, A. Dorleans, I. Li de la Sierra-Gallay, P. Noirot, H. Putzer & C. Condon, (2010)** Bacillus subtilis ribonucleases J1 and J2 form a complex with altered enzyme behaviour. *Molecular microbiology* 75: 489-498.
- McEwan, A.G., (1994)** Photosynthetic electron transport and anaerobic metabolism in purple non-sulfur phototrophic bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 66: 151-164.
- Meinken, C., (2003)** Expression of the glycolytic gapA operon in Bacillus subtilis: differential syntheses of proteins encoded by the operon. *Microbiology* 149: 751-761.

- Misra, T.K. & D. Apirion, (1979)** RNase E, an RNA processing enzyme from *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry* 254: 11154-11159.
- Mohanty, B.K. & S.R. Kushner, (2000)** Polynucleotide phosphorylase functions both as a 3' right-arrow 5' exonuclease and a poly(A) polymerase in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 11966-11971.
- Morey, J.S., J.C. Ryan & F.M. Van Dolah, (2006)** Microarray validation: factors influencing correlation between oligonucleotide microarrays and real-time PCR. *Biological procedures online* 8: 175-193.
- Mouncey, N.J., M. Choudhary & S. Kaplan, (1997)** Characterization of genes encoding dimethyl sulfoxide reductase of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1T: an essential metabolic gene function encoded on chromosome II. *Journal of bacteriology* 179: 7617-7624.
- Mouncey, N.J. & S. Kaplan, (1998)** Redox-dependent gene regulation in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1(T): effects on dimethyl sulfoxide reductase (dor) gene expression. *Journal of bacteriology* 180: 5612-5618.
- Navarro, C., L.F. Wu & M.A. Mandrand-Berthelot, (1993)** The *nik* operon of *Escherichia coli* encodes a periplasmic binding-protein-dependent transport system for nickel. *Molecular microbiology* 9: 1181-1191.
- Newbury, S.F., N.H. Smith & C.F. Higgins, (1987a)** Differential mRNA stability controls relative gene expression within a polycistronic operon. *Cell* 51: 1131-1143.
- Newbury, S.F., N.H. Smith, E.C. Robinson, I.D. Hiles & C.F. Higgins, (1987b)** Stabilization of translationally active mRNA by prokaryotic REP sequences. *Cell* 48: 297-310.
- Nikaido, H., (1996)** Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria. *Journal of bacteriology* 178: 5853-5859.
- Nilsson, G., J.G. Belasco, S.N. Cohen & A. von Gabain, (1984)** Growth-rate dependent regulation of mRNA stability in *Escherichia coli*. *Nature* 312: 75-77.
- Nilsson, G., J.G. Belasco, S.N. Cohen & A. von Gabain, (1987)** Effect of premature termination of translation on mRNA stability depends on the site of ribosome release. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84: 4890-4894.
- Nuss, A.M., J. Glaeser & G. Klug, (2009)** RpoH(II) activates oxidative-stress defense systems and is controlled by RpoE in the singlet oxygen-dependent response in *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of bacteriology* 191: 220-230.
- Opel, M.L., K.A. Aeling, W.M. Holmes, R.C. Johnson, C.J. Benham & G.W. Hatfield, (2004)** Activation of transcription initiation from a stable RNA promoter by a Fis protein-mediated DNA structural transmission mechanism. *Molecular microbiology* 53: 665-674.
- Paniagua-Michel, J., J. Olmos-Soto & M.A. Ruiz, (2012)** Pathways of carotenoid biosynthesis in bacteria and microalgae. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 892: 1-12.
- Pedersen, M., S. Nissen, N. Mitarai, S. Lo Svenningsen, K. Sneppen & S. Pedersen, (2011)** The functional half-life of an mRNA depends on the ribosome spacing in an early coding region. *Journal of molecular biology* 407: 35-44.
- Peuser, V., S. Metz & G. Klug, (2011)** Response of the photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* to iron limitation and the role of a Fur orthologue in this response. *Environmental microbiology reports* 3: 397-404.
- Pfaffl, M.W., (2001)** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research* 29: e45.
- Pfeiffer, V., K. Papenfort, S. Lucchini, J.C. Hinton & J. Vogel, (2009)** Coding sequence targeting by MicC RNA reveals bacterial mRNA silencing downstream of translational initiation. *Nature structural & molecular biology* 16: 840-846.

- Pingoud, A. & G. Meiss, (2005)** Ribonucleases.
- Poggio, S., A. Osorio, G. Dreyfus & L. Camarena, (2002)** The four different sigma(54) factors of *Rhodobacter sphaeroides* are not functionally interchangeable. *Molecular microbiology* 46: 75-85.
- Poggio, S., A. Osorio, G. Dreyfus & L. Camarena, (2005)** The flagellar hierarchy of *Rhodobacter sphaeroides* is controlled by the concerted action of two enhancer-binding proteins. *Molecular microbiology* 58: 969-983.
- Porter, S.L., G.H. Wadhams & J.P. Armitage, (2011)** Signal processing in complex chemotaxis pathways. *Nature reviews. Microbiology* 9: 153-165.
- Porter, S.L., A.V. Warren, A.C. Martin & J.P. Armitage, (2002)** The third chemotaxis locus of *Rhodobacter sphaeroides* is essential for chemotaxis. *Molecular microbiology* 46: 1081-1094.
- Prevost, K., G. Desnoyers, J.F. Jacques, F. Lavoie & E. Masse, (2011)** Small RNA-induced mRNA degradation achieved through both translation block and activated cleavage. *Genes & development* 25: 385-396.
- Prud'homme-Genereux, A., R.K. Beran, I. Iost, C.S. Ramey, G.A. Mackie & R.W. Simons, (2004)** Physical and functional interactions among RNase E, polynucleotide phosphorylase and the cold-shock protein, CsdA: evidence for a 'cold shock degradosome'. *Molecular microbiology* 54: 1409-1421.
- Qian, P., C.N. Hunter & P.A. Bullough, (2005)** The 8.5Å projection structure of the core RC-LH1-PufX dimer of *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of molecular biology* 349: 948-960.
- Rajagopalan, K.V. & J.L. Johnson, (1992)** The pterin molybdenum cofactors. *The Journal of biological chemistry* 267: 10199-10202.
- Rauhut, R., A. Jager, C. Conrad & G. Klug, (1996)** Identification and analysis of the *rnc* gene for RNase III in *Rhodobacter capsulatus*. *Nucleic acids research* 24: 1246-1251.
- Rauhut, R. & G. Klug, (1999)** mRNA degradation in bacteria. *FEMS microbiology reviews* 23: 353-370.
- Regnier, P. & E. Hajnsdorf, (2009)** Poly(A)-assisted RNA decay and modulators of RNA stability. *Progress in molecular biology and translational science* 85: 137-185.
- Reitzer, L. & B.L. Schneider, (2001)** Metabolic context and possible physiological themes of sigma(54)-dependent genes in *Escherichia coli*. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 65: 422-444, table of contents.
- Reitzer, L.J. & B. Magasanik, (1986)** Transcription of *glnA* in *E. coli* is stimulated by activator bound to sites far from the promoter. *Cell* 45: 785-792.
- Rische-Grahl, T., L. Weber, B. Remes, K.U. Forstner & G. Klug, (2014)** RNase J is required for processing of a small number of RNAs in *Rhodobacter sphaeroides*. *RNA biology* 11.
- Rische, T. & G. Klug, (2012)** The ordered processing of intervening sequences in 23S rRNA of *Rhodobacter sphaeroides* requires RNase J. *RNA biology* 9: 343-350.
- Roh, J.H., W.E. Smith & S. Kaplan, (2004)** Effects of oxygen and light intensity on transcriptome expression in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. Redox active gene expression profile. *The Journal of biological chemistry* 279: 9146-9155.
- Rustad, T.R., K.J. Minch, W. Brabant, J.K. Winkler, D.J. Reiss, N.S. Baliga & D.R. Sherman, (2013)** Global analysis of mRNA stability in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nucleic acids research* 41: 509-517.
- Schneider, K.H. & F. Giffhorn, (1989)** Purification and properties of a polyol dehydrogenase from the phototrophic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *European journal of biochemistry / FEBS* 184: 15-19.

- Selinger, D.W., R.M. Saxena, K.J. Cheung, G.M. Church & C. Rosenow, (2003) Global RNA half-life analysis in *Escherichia coli* reveals positional patterns of transcript degradation. *Genome research* 13: 216-223.
- Shah, D.S., S.L. Porter, A.C. Martin, P.A. Hamblin & J.P. Armitage, (2000) Fine tuning bacterial chemotaxis: analysis of *Rhodobacter sphaeroides* behaviour under aerobic and anaerobic conditions by mutation of the major chemotaxis operons and cheY genes. *The EMBO journal* 19: 4601-4613.
- Shahbadian, K., A. Jamalli, L. Zig & H. Putzer, (2009) RNase Y, a novel endoribonuclease, initiates riboswitch turnover in *Bacillus subtilis*. *The EMBO journal* 28: 3523-3533.
- Sharma, C.M., S. Hoffmann, F. Darfeuille, J. Reignier, S. Findeiss, A. Sittka, S. Chabas, K. Reiche, J. Hackermuller, R. Reinhardt, P.F. Stadler & J. Vogel, (2010) The primary transcriptome of the major human pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 464: 250-255.
- Sharp, J.S. & D.H. Bechhofer, (2003) Effect of translational signals on mRNA decay in *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology* 185: 5372-5379.
- Smyth, G.K. & T. Speed, (2003) Normalization of cDNA microarray data. *Methods (San Diego, Calif.)* 31: 265-273.
- Steglich, C., D. Lindell, M. Futschik, T. Rector, R. Steen & S.W. Chisholm, (2010) Short RNA half-lives in the slow-growing marine cyanobacterium *Prochlorococcus*. *Genome biology* 11: R54.
- Sun, J., Z. Deng & A. Yan, (2014) Bacterial multidrug efflux pumps: Mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. *Biochemical and biophysical research communications*.
- Suwanto, A. & S. Kaplan, (1989) Physical and genetic mapping of the *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 genome: genome size, fragment identification, and gene localization. *Journal of bacteriology* 171: 5840-5849.
- Tabita, F.R., (1995) *The biochemistry and metabolic Regulation of Carbon Metabolism and CO₂ fixation in purple bacteria. Anoxygenic photosynthetic bacteria*. Heidelberg, Springer.
- Takayama, K. & S. Kjelleberg, (2000) The role of RNA stability during bacterial stress responses and starvation. *Environmental microbiology* 2: 355-365.
- Tatusov, R.L., (1997) A Genomic Perspective on Protein Families. *Science* 278: 631-637.
- Tatusov, R.L., N.D. Fedorova, J.D. Jackson, A.R. Jacobs, B. Kiryutin, E.V. Koonin, D.M. Krylov, R. Mazumder, S.L. Mekhedov, A.N. Nikolskaya, B.S. Rao, S. Smirnov, A.V. Sverdlov, S. Vasudevan, Y.I. Wolf, J.J. Yin & D.A. Natale, (2003) The COG database: an updated version includes eukaryotes. *BMC bioinformatics* 4: 41.
- Taverniti, V., F. Forti, D. Ghisotti & H. Putzer, (2011) *Mycobacterium smegmatis* RNase J is a 5'-3' exo-/endoribonuclease and both RNase J and RNase E are involved in ribosomal RNA maturation. *Molecular microbiology* 82: 1260-1276.
- Thomas, G.H., T. Southworth, M.R. Leon-Kempis, A. Leech & D.J. Kelly, (2006) Novel ligands for the extracellular solute receptors of two bacterial TRAP transporters. *Microbiology* 152: 187-198.
- Tomoyasu, T., J. Gamer, B. Bukau, M. Kanemori, H. Mori, A.J. Rutman, A.B. Oppenheim, T. Yura, K. Yamanaka, H. Niki & et al., (1995) *Escherichia coli* FtsH is a membrane-bound, ATP-dependent protease which degrades the heat-shock transcription factor sigma 32. *The EMBO journal* 14: 2551-2560.
- Tosques, I.E., J. Shi & J.P. Shapleigh, (1996) Cloning and characterization of nnrR, whose product is required for the expression of proteins involved in nitric oxide metabolism in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.3. *Journal of bacteriology* 178: 4958-4964.
- Tucker, J.D., C.A. Siebert, M. Escalante, P.G. Adams, J.D. Olsen, C. Otto, D.L. Stokes & C.N. Hunter, (2010) Membrane invagination in *Rhodobacter sphaeroides* is initiated at curved regions of the cytoplasmic

- membrane, then forms both budded and fully detached spherical vesicles. *Molecular microbiology* 76: 833-847.
- Valentini, M., N. Storelli & K. Lapouge, (2011)** Identification of C(4)-dicarboxylate transport systems in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of bacteriology* 193: 4307-4316.
- van Niel, C.B., (1944)** THE CULTURE, GENERAL PHYSIOLOGY, MORPHOLOGY, AND CLASSIFICATION OF THE NON-SULFUR PURPLE AND BROWN BACTERIA. *Bacteriological reviews* 8: 1-118.
- Vecerek, B., I. Moll & U. Blasi, (2005)** Translational autocontrol of the *Escherichia coli* hfq RNA chaperone gene. *RNA (New York, N.Y.)* 11: 976-984.
- von Gabain, A., J.G. Belasco, J.L. Schottel, A.C. Chang & S.N. Cohen, (1983)** Decay of mRNA in *Escherichia coli*: investigation of the fate of specific segments of transcripts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80: 653-657.
- Wagner, L.A., R.F. Gesteland, T.J. Dayhuff & R.B. Weiss, (1994)** An efficient Shine-Dalgarno sequence but not translation is necessary for lacZ mRNA stability in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 176: 1683-1688.
- Wang, Y., C.L. Liu, J.D. Storey, R.J. Tibshirani, D. Herschlag & P.O. Brown, (2002)** Precision and functional specificity in mRNA decay. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. pp. 5860-5865.
- Wedel, A. & S. Kustu, (1995)** The bacterial enhancer-binding protein NTRC is a molecular machine: ATP hydrolysis is coupled to transcriptional activation. *Genes & development* 9: 2042-2052.
- Wehrl, W., M. Niederweis & W. Schumann, (2000)** The FtsH protein accumulates at the septum of *Bacillus subtilis* during cell division and sporulation. *Journal of bacteriology* 182: 3870-3873.
- Xu, F., S. Lin-Chao & S.N. Cohen, (1993)** The *Escherichia coli* pcnB gene promotes adenylation of antisense RNAI of ColE1-type plasmids in vivo and degradation of RNAI decay intermediates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 6756-6760.
- Yamanaka, K. & M. Inouye, (2001)** Selective mRNA degradation by polynucleotide phosphorylase in cold shock adaptation in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 183: 2808-2816.
- Yepes, A., J. Schneider, B. Mielich, G. Koch, J.C. Garcia-Betancur, K.S. Ramamurthi, H. Vlamakis & D. Lopez, (2012)** The biofilm formation defect of a *Bacillus subtilis* flotillin-defective mutant involves the protease FtsH. *Molecular microbiology* 86: 457-471.
- Yuen, T., E. Wurmbach, R.L. Pfeffer, B.J. Ebersole & S.C. Sealfon, (2002)** Accuracy and calibration of commercial oligonucleotide and custom cDNA microarrays. *Nucleic acids research* 30: e48.
- Yurgel, S.N. & M.L. Kahn, (2004)** Dicarboxylate transport by rhizobia. *FEMS microbiology reviews* 28: 489-501.
- Zeilstra-Ryalls, J.H. & S. Kaplan, (1995)** Aerobic and anaerobic regulation in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1: the role of the fnrL gene. *Journal of bacteriology* 177: 6422-6431.
- Zeilstra-Ryalls, J.H. & S. Kaplan, (2004)** Oxygen intervention in the regulation of gene expression: the photosynthetic bacterial paradigm. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 61: 417-436.
- Zhang, Z., S. Schwartz, L. Wagner & W. Miller, (2000)** A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of computational biology : a journal of computational molecular cell biology* 7: 203-214.

7. ANHANG

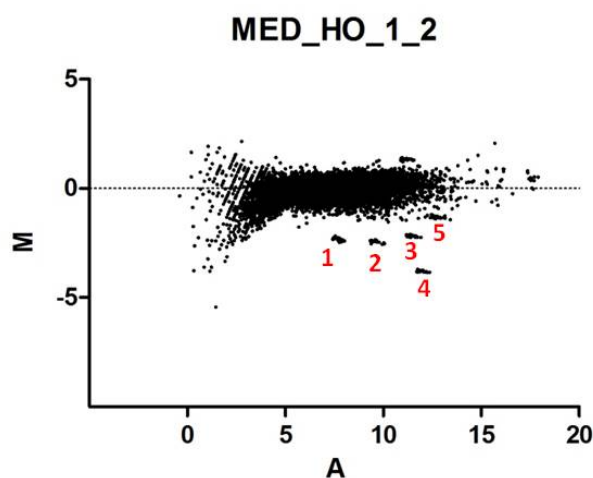


Abbildung 7.1: Nummerierung der Cluster in den MA-Plots beispielhaft gezeigt am MA-Plot der Median-normalisierten Daten des arrays HO_1_2.

Tabelle 7-1: Liste der Gene, die den Sonden der 5 Cluster in den MED_MA-Plots zugeordnet sind. Die Nummerierung der cluster ist Abbildung 7.1 zu entnehmen.

Gennummer	Genbezeichnung	Genname
Cluster 1		
RSP_0234	TlpL, putative cytoplasmic chemoreceptor	<i>tlpL</i>
RSP_0314	LHII beta, light-harvesting B800/850 protein	<i>pucB</i>
RSP_0565	putative phosphatidylcholine synthase	
RSP_0644	ABC transporter, inner membrane subunit	
RSP_0747	Short-chain dehydrogenase/reductase(EC:1.1.1.36)	
RSP_1010	possible esterase/lipase/thioesterase	
RSP_1166	NTP pyrophosphohydrolase	<i>mutT</i>
RSP_1421	hypothetical protein	
RSP_1944	Uroporphyrin-III C-methyltransferase/siroheme synthase	
RSP_1970	Phosphoribosylglycinamide formyltransferase	
RSP_1989	Putative valyl-tRNA synthetase(EC:6.1.1.9)	<i>valS</i>
RSP_2587	ABC multidrug efflux transporter, inner membrane subunit	
RSP_2735	6-phosphogluconolactonase(EC:3.1.1.31)	<i>pgl</i>
RSP_2740	putative Glucose/sorbose dehydrogenase	
RSP_2751	hypothetical protein	
RSP_2905	dimethyladenosine transferase(EC:2.1.1.-)	<i>ksgA</i>
RSP_3105	PAS sensor protein	
RSP_3529	hypothetical protein	
RSP_3611	hypothetical protein	
RSP_3691	putative cytoplasmic protein	
RSP_3909	conserved hypothetical protein	
RSP_4171	hypothetical protein	
RSP_RF0077	(miscRNA)	<i>Cobalamin</i>

Gennummer	Genbezeichnung	Genname
Cluster 2		
RSP_3514	transcriptional regulator, AraC family	
RSP_3593	HupR response regulator	
RSP_3624	SAM-dependent methyltransferase	
RSP_3949	TRAP-T family transporter, DctQ (4TMs) subunit	
RSP_3983	circadian clock KaiB-like protein	<i>kaiB2</i>
RSP_4041	NADH dehydrogenase subunit I(EC:1.6.5.3,EC:1.6.99.3)	<i>nuoI</i>
RSP_4190	Heme oxygenase	
RSP_6091	hypothetical protein	
RSP_6197	hypothetical protein	
RSP_6200	hypothetical protein	
RSP_6248	putative class I holin	
RSP_7197	Putative transporter, Major facilitator superfamily (MFS)	
RSP_7379	SAM-dependent methyltransferase	
RSP_RF0071	ABC sugar (glycerol) transporter, periplasmic binding protein	
Cluster 3		
RSP_0195	NADH-ubiquinone oxidoreductase(EC:1.6.99.3)	
RSP_0314	LHII beta, light-harvesting B800/850 protein	<i>pucB</i>
RSP_0589	hypothetical protein	
RSP_0850	hypothetical protein	
RSP_1044	50S ribosomal protein L19	<i>rplS</i>
RSP_1108	tRNA pseudouridine synthase B	<i>truB</i>
RSP_1252	2-nitropropane dioxygenase-like protein	
RSP_1301	putative peptidase	
RSP_1304	flagellar hook-associated protein	
RSP_1414	hypothetical protein	
RSP_1905	Putative Flp pilus assembly protein ATPase CpaF	
RSP_2262	hypothetical protein	
RSP_2270	glutamyl-tRNA amidotransferase subunit A(EC:6.3.5.-)	<i>gata</i>
RSP_2307	putative manganese-dependent inorganic pyrophosphatase(EC:3.6.1.1)	
RSP_2320	TRAP-T family transporter, periplasmic binding protein	
RSP_2366	ABC sugar (ribose) transporter, fused ATPase subunits	
RSP_2642	hypothetical protein	
RSP_2679	ATP-dependent DNA ligase	
RSP_2742	hypothetical protein	
RSP_2816	hypothetical protein	
RSP_2999	hypothetical protein	
RSP_3442	2-hydroxyacid dehydrogenase	
RSP_4185	Rep B partitioning protein/ParB-like protein	<i>repB</i>
RSP_6094	TRAP-T family sorbitol/mannitol transporter, DctM (12TMs) subunit	
RSP_RF0074	(miscRNA)	Cobalamin
Cluster 4		
RSP_0242	probable kyurenine hydrolase(EC:3.7.1.3)	
RSP_0617	hypothetical protein	

Gennummer	Genbezeichnung	Genname
RSP_0706	prephenate dehydratase	<i>pheA</i>
RSP_1012	succinate-semialdehyde dehydrogenase(EC:1.2.1.16)	<i>gabD4</i>
RSP_1584	Chemotaxis histidine protein kinase(EC:2.7.3.-)	<i>cheA2</i>
RSP_1735	preprotein translocase SecY	<i>secY</i>
RSP_1754	hypothetical protein	
RSP_1846	hypothetical protein	
RSP_2357	hypothetical protein	
RSP_2504	phosphoglycolate phosphatase(EC:3.1.3.18)	<i>gph</i>
RSP_2670	putative FAD-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase(EC:1.1.99.5)	<i>glpD</i>
RSP_2768	hypothetical protein(EC:2.1.1.13)	
RSP_2776	Acyl carrier protein, AcpP	<i>acpP</i>
RSP_3092	hypothetical protein	
RSP_3273	ABC multidrug/carbohydrate efflux transporter, inner membrane subunit	
RSP_3301	keto-hydroxyglutarate-aldolase/keto-deoxy- phosphogluconate aldolase(EC:4.1.2.14)	<i>eda</i>
RSP_3537	alcohol dehydrogenase, zinc-containing(EC:1.1.1.1)	
RSP_6057	hypothetical protein	
RSP_6166	hypothetical membrane protein	
RSP_6168	ABC Cobalt transporter, periplasmic binding protein CbiN	

Cluster 5

RSP_0026	Probable epimerase/dehydratase	
RSP_0055	flagellar protein FliH	<i>fliH</i>
RSP_0079	flagellar proximal rod protein FlgF	<i>flgF</i>
RSP_0091	ABC sorbitol/mannitol transporter, periplasmic binding protein	<i>smoE</i>
RSP_0118	Cytochrome c oxidase, subunit IIc(EC:1.9.3.1)	
RSP_0181	ABC nitrate/sulfonate/bicarbonate transporter, inner membrane subunit	
RSP_0294	hypothetical protein	
RSP_0389	Dihydrofolate reductase	<i>folA</i>
RSP_0407	D-lactate dehydrogenase	
RSP_0413	two component diguanylate cyclase	
RSP_0518	putative glycosyltransferase protein	
RSP_0647	phosphomethylpyrimidine kinase(EC:2.7.4.7)	<i>thiD</i>
RSP_0699	coproporphyrinogen III oxidase	<i>hemZ</i>
RSP_0766	hypothetical protein	
RSP_0885	Thiosulfate sulfurtransferase, Rhodanese-like(EC:2.8.1.1,EC:2.8.1.2)	<i>SseA</i>
RSP_0994	NADH dehydrogenase subunit N	<i>phaD</i>
RSP_1163	transcription elongation factor NusA	<i>nusA</i>
RSP_1196	SAM-dependent methyltransferase	
RSP_1284	Phosphoribulokinase(EC:2.7.1.19)	<i>prkA</i>
RSP_1742	Serine protease, trypsin family	
RSP_2004	anthranilate synthase component I(EC:4.1.3.27)	<i>trpE</i>
RSP_2143	DNA photolyase, Cryptochrome 1 apoprotein (Blue light photoreceptor)(EC:4.1.99.3)	
RSP_2149	Alanyl-transfer RNA synthetase domain protein	
RSP_2387	hypothetical protein	
RSP_2417	hypothetical protein	

Gennummer	Genbezeichnung	Genname
RSP_2423	putative Heat shock protein 15 (HSP15)	
RSP_2522	NADH dehydrogenase subunit H(EC:1.6.5.3)	<i>nuoH</i>
RSP_2538	Short-chain dehydrogenase/reductase(EC:1.1.1.100)	<i>fabG</i>
RSP_2579	cytochrome c553i	<i>cycB</i>
RSP_2590	hypothetical protein	<i>0</i>
RSP_2646	0	<i>edd</i>
RSP_2730	Transcriptional regulator, ArsR family	
RSP_2932	Histidine utilization repressor, gntR family	<i>hutC</i>
RSP_3105	PAS sensor protein	
RSP_3174	Nucleoside transporter, NCS1 family	
RSP_3294	ABC branched-chain amino acid transporter, inner membrane subunit	
RSP_3366	D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase(EC:1.1.1.26)	
RSP_3395	ABC opine/polyamine transporter, inner membrane subunit	
RSP_3487	hypothetical protein	
RSP_3640	hypothetical protein	
RSP_3869	ABC molybdate transporter, ATPase subunit ModC(EC:3.6.3.29)	<i>modC</i>

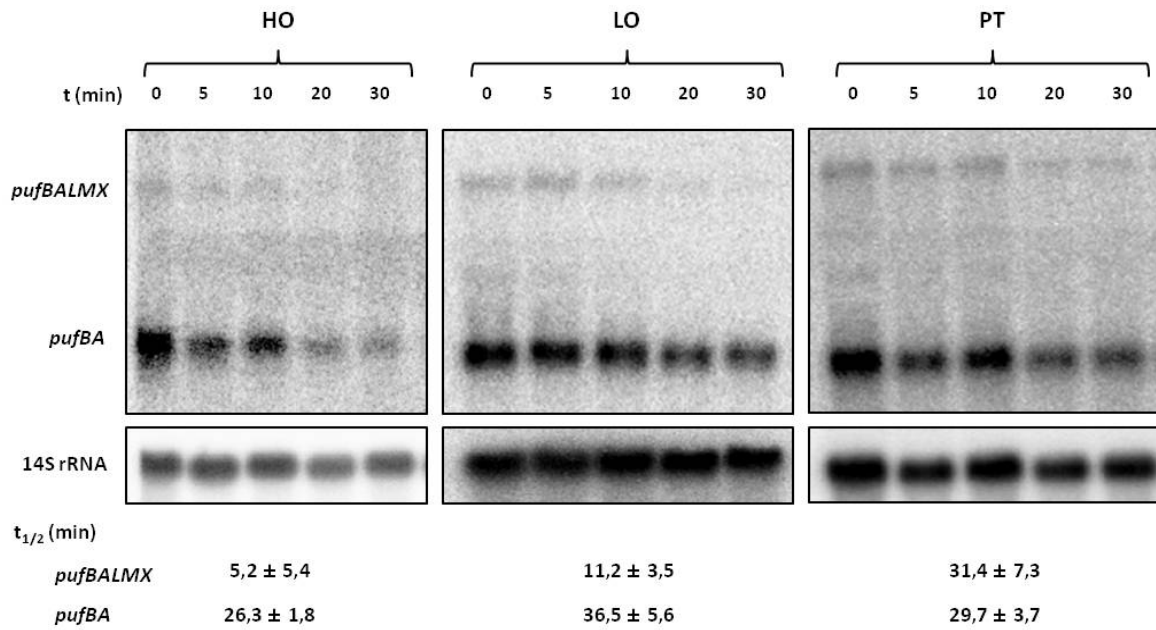


Abbildung 7.2: Ermittlung der Halbwertszeiten der Transkriptes von *pufBALMX* und *pufBA* unter aeroben, microaeroben und phototropen Bedingungen mittels Northern blot.

R. sphaeroides WT 2.4.1 Flüssigkulturen wurden unter aeroben (HO), microaeroben (LO) und phototropen (PT) Bedingungen angezogen. In der exponentiellen Wachstumsphase wurde durch die Zugabe von 0,2 mg/ml Rifampicin die Transkription gestoppt. Folgend wurden Proben zu den Zeitpunkten 0, 5, 10, 20 und 30 Minuten genommen, die Gesamt-RNA extrahiert und jeweils 10 µg RNA in einem 1% Agarose-Formaldehyd-Gel aufgetrennt und auf Nylonmembranen gebロットet. Diese wurden mit einer transkriptspezifischen DNA-Sonde hybridisiert. Als Ladekontrolle diente das Signal einer 14S rRNA-spezifischen Sonde. Die *phosphoimaging*-Signale wurden anschließend quantifiziert und gegen die Signale der Ladekontrolle normalisiert. Für die Berechnung der Halbwertszeiten wurden dann die logarithmierten Verhältnisse der normalisierten Werte [FC (log2)] der jeweiligen Zeitpunkte zum normalisierten Wert des Zeitpunktes 0 min gebildet. Aus diesen Werten, aufgetragen gegen die Zeit, wurde anschließend jeweils die Steigung berechnet. Die Halbwertszeit errechnete sich dann aus dem negativen Kehrwert der Steigung. Die angegebenen Halbwertszeiten sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Einzelerperimenten, der Fehler gibt die Standardabweichung an.

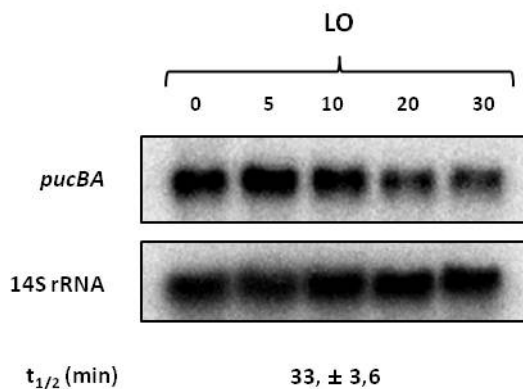


Abbildung 7.3: Ermittlung der Halbwertszeit des *pucBA* Transkriptes unter microaeroben Bedingungen (LO) in *R. sphaeroides* mittels Northern blot.

Die Kultivierung und Probenernte zur Bestimmung der Halbwertszeiten wurde wie in Abbildung 7.2 beschrieben durchgeführt.

Die angegebene Halbwertszeit ist ein Mittelwert aus drei unabhängigen Einzelerperimenten, der Fehler gibt die Standardabweichung an.

7.1. DATENTRÄGER MIT DEN DATEIEN DER MICROARRAY-ANALYSE

Der beigefügte Datenträger enthält in verschiedenen Ordnern die Daten der Microarray-Analysen. Der Ordner „Microarray Rohdaten“ enthält die unveränderten Rohdaten der drei Microarrays für die Proben der aeroben, microaeroben und phototrophen Kulturen in Form von .txt Dateien, die sogenannte GAL-Datei für die Zuordnung der Gene zu den Sondennummern und die Sequenzen der Sonden in einer Microsoft Excel-Datei sowie die Sequenzen aller Gene und intergenischer Regionen und sRNAs, die zur Erstellung der Sonden genutzt wurden. Der Ordner „Normalisierte Daten“ enthält sowohl die *spike-in* normalisierten als auch die Median-normalisierten Daten in jeweils einer separaten Excel-Datei, als auch sämtliche Daten in einer. Die Auswertungen der Microarrays, auf die sich sämtliche Ergebnisse dieser Dissertation beziehen befinden sich im Ordner „Microarray Auswertungen“ in vier separaten Excel-Dateien. Ebenfalls beigefügt sind im Ordner „Agilent Manuals“ die Handbücher für das *labeling*-Kit, für das *spike-in* Kit, ein Kommentar für die Anwendung beider Kits für prokaryotische RNA sowie die Anleitung für die *feature extraction* Software.

Danksagung

Mein Dank gilt...

...*Prof. Dr. Gabriele Klug*, für die hilfreiche Unterstützung während der Arbeit im Labor und während der Zeit des Schreibens. Für die immer offene Tür und manch motivierendes Wort in auch mal schwierigen Zeiten. Ihr kompetenter Rat und ihre Hilfe kamen mir in zahlreichen Angelegenheiten sehr zugute.

...*PD Dr. Elena Evguenieva-Hackenberg*, für die bereitwillige Übernahme der Zweitkorrektur dieser Arbeit und für die freundliche Beantwortung von Fragen zu allen Bereichen der RNA Welt.

...*Dr. Birgit Samans*, für die wertvolle Normalisierung der Rohdaten von einigen Microarrays und für die unschätzbare Hilfe bei der Bewältigung so großer Datenmengen.

...*Nils*, meinem Bucht-Kollegen und Freund, für die tolle gemeinsame Doktorarbeitszeit, in der man neben wissenschaftlichen Themen auch über Nerd-Themen diskutieren konnte, für mittägliche Ausflüge zum DVD-Kaufen in die Mall und abendliche Stunden im McFit und für die gemeinsame Arbeit mit dem ganzen „heißen Scheiß“. Die überragenden Tagungsabende mit „Mädchengang“ werde ich auch nie vergessen.

...*Bernhard*, meinem ersten Ansprechpartner für mathematische Fragen, aber vor allem für viele fachliche Unterhaltungen und Diskussionen über Ergebnisse und Nicht-Ergebnisse. Danke auch für die Nachfolge von Nils und Verena für die Ausflüge in die Muckibude. Und für großartige WG- und Geburtstagsfeiern!

...*Lennart*, dem „Socializer“, für viele wissenschaftliche Diskussionen - auch mal über Frauen und so. Über Probleme und die gemeinsame Erkenntnis, dass es manchmal „halt doof“ ist. Danke auch für immer wieder gute Ideen, gerne mal bei einem Bierchen (oder zwei).

...*Tom*, der mir mit seiner hohen Fachkompetenz in RNA- und Proteinfagen wertvolle Hilfe für diese Arbeit geben konnte und den ich immer wieder wegen Blaumarker und DNA-ladder belästigen durfte.

...*Julia*, für viele gemeinsame Aktivitäten und für ihre Anekdoten, die immer für gute Stimmung sorgten und mich zum Lachen brachten und mich den Stress manchmal vergessen ließen.

...*Fabian*, für konstruktiven wissenschaftlichen Austausch und die Hinweise auf Sonderangebote von Senseo-Kaffeepads.

...*Angelika & Carmen*, für die Hilfe bei den $t_{1/2}$ Experimenten und für viele nette Gespräche im und um den Sozialraum.

...*Ulrike Lenz*, nicht nur für viel organisatorische Hilfe, vor allem für viele nette Gespräche, ein immer offenes Ohr und die Unterstützung in einer schwierigen Zeit.

...*Kerstin*, für den Ruhepol in 236, für literweise RÄ nur für mich und kontinuierliche Stresskulturen und für die netten Gespräche auch mal früh am Morgen.

...*Sabrina*, für ihr herzliches und hilfsbereites Wesen und ihre herausragenden Bastelkünste.

...*Adnan & Tao*, für den Einblick in andere Kulturen und viele nette und lustige Gespräche.

...*Nils S.*, für die Einführung in R und die freundliche Hilfe bei der Auswertung der ersten Microarrays.

...allen anderen Kollegen, Hiwis, Praktikanten, Studenten und den Ehemaligen Bork, Sebastian F., Verena und Kristin, für den ständigen wissenschaftlichen Austausch, für die gute Arbeitsatmosphäre, für lustige, ausgelassene Freizeitaktivitäten und allgemein eine meist schöne Promotionszeit.

...*Sebmetz*, meinem ersten Betreuer in der Mibi und *tabletop-buddy*. Für die großartige Zeit, als er noch im Labor über die Gänge eilte und die darüber hinaus gewachsene gute Freundschaft.

...allen Freunden auch außerhalb des Labors für die Unterstützung und offene Ohren in stressigen und arbeitsreichen Zeiten und dafür, dass irgendwann keine Fragen mehr kamen, wann ich denn endlich fertig bin.

...den Mitarbeitern des „Strahlencentrums“ (Zentrale Biotechnische Betriebseinheit) für die nette Unterstützung, wenn unser *Imager* mal wieder den Geist aufgegeben hatte.

Mein grenzenloser Dank gilt meiner Familie, die mich immer in allen Belangen und Bereichen liebevoll und tatkräftig unterstützt, aufgebaut und motiviert hat. Ohne sie wäre mein Werdegang in dieser Form nicht möglich gewesen.

Darüber hinaus möchte ich meiner Schwester Uta für ihr besonderes Einfühlungsvermögen danken. Dass sie immer die richtigen Worte fand, um mich aufzubauen und mich immer wieder auf Kurs brachte. Vielen Dank für Deine stete Unterstützung und unser super Verhältnis!

Mein Dank gilt auch meiner Freundin Nora, die mich immer durch ihre klaren und klugen Worte aufgemuntert und motiviert hat. Die mir vor allem in der letzten Zeit immer beistand und mich geduldig aus so manchem Loch herausgeholt hat, mir aber auch meine Freiräume gelassen hat. Danke!