

Funktion und Lokalisation von Hfq in *Synechocystis* sp. PCC6803

Inauguraldissertation

zur Erlangung des

Doktorgrades der Naturwissenschaften

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

des Fachbereichs Biologie und Chemie

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Diplom Biologe Nils Schürgers

geboren am 27.09.1979 in Hamburg

Teile der vorliegenden Arbeit wurden in der folgenden Publikation veröffentlicht:

Schuergers N., Ruppert U., Watanabe S., Nürnberg D.J., Lochnit G., Dienst D., Mullineaux C.W., Wilde A. (2014). **Binding of the RNA chaperone Hfq to the type IV pilus base is crucial for its function in *Synechocystis* sp. PCC 6803.** *Molecular Microbiology*, 92(4), 840–52. doi:10.1111/mmi.12595

1. Gutachter/in: Prof. Dr. Annegret Wilde

Institut für Molekulare Genetik

Albert-Ludwigs-Universität Freiburg

2. Gutachter/in: Prof. Dr. Gabriele Klug

Institut für Pflanzenphysiologie

Justus-Liebig-Universität Gießen

Selbständigkeitserklärung

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.

Freiburg, den

Abstract

In many bacteria, the RNA-chaperon Hfq functions in post-transcriptional regulation of gene expression by small non-coding RNAs. Cyanobacteria harbour a subfamily of Hfq homologs that is structurally conserved but exhibits divergent RNA-binding sites. In *Synechocystis* sp. PCC6803, the inactivation of *hfq* (*ssr3341*) leads to a decreased accumulation of a small set of RNAs and abrogates the assembly of type IV pili, which are crucial for phototactic motility. In this work, the properties and the subcellular localization of Hfq as well as their implications for differential transcript accumulation and phototactic behaviour were investigated in this model organism.

A transcriptome-wide microarray analysis revealed that alongside the known mRNAs two small non-coding RNAs as well as two of the three CRISPR/cas-systems are down-regulated in an Hfq-dependent manner. Furthermore, mutational analysis demonstrated that several conserved amino acids on the proximal surface of the Hfq hexamer but not the structurally conserved RNA-binding sites are essential for Hfq-function. While RNA-binding seems to be unlikely co-immunoprecipitation and yeast two-hybrid experiments confirmed that the secretion ATPase PilB1 – the motor-protein of the type IV pilus extension - is an interaction partner of Hfq. Fluorescence microscopy revealed that Hfq is localized to the cytoplasmic membrane in a PilB1-dependent manner. Concomitantly, Hfq-dependent transcript accumulation is abrogated in a *pilB1* or *pilC* mutant, indicating that localization of the Hfq-PilB1-complex to the pilus base is essential for motility and RNA accumulation. Taken together, the results suggest that Hfq might regulate the activity of PilB secretion ATPases in cyanobacteria by an evolutionary conserved mechanism based on protein-protein-interaction.

Zusammenfassung

In vielen Bakterien spielt das RNA-Chaperon Hfq eine wichtige Rolle für die posttranskriptionelle Regulation der Genexpression durch kleine nicht-kodierende RNAs. Cyanobakterielle Hfq-Homologe bilden eine besondere Unterfamilie, die zwar strukturell konserviert ist, aber RNA-Bindestellen mit divergierenden Eigenschaften aufweist. In *Synechocystis* sp. PCC6803 führt die Inaktivierung von *hfq* (*ssr3341*) zu einer Reduktion einer kleinen Zahl von RNAs und zu einem Defekt der Biogenese der Type IV Pili, die essentiell für die phototaktische Motilität sind. In dieser Arbeit wurden die Eigenschaften und die subzelluläre Lokalisation von Hfq, sowie deren Auswirkungen auf die differentielle Transkriptakkumulation und das phototaktische Verhalten in diesem Modellorganismus untersucht.

Eine Transkriptom-weite Microarray-Analyse zeigte, dass neben den bekannten mRNAs zwei kleine nicht-kodierende RNAs und zwei der drei CRISPR/cas-Systeme Hfq-abhängig herunterreguliert werden. Weiterhin konnte durch Mutationsstudien demonstriert werden, dass konservierte Aminosäuren auf der proximalen Oberfläche des Hfq-Hexamers, nicht aber die strukturell konservierten RNA-Bindestellen für die Funktion von Hfq essentiell sind. Während eine RNA-Bindung nicht wahrscheinlich ist, bestätigten eine Co-Immunopräzipitation und Hefe-Zwei-Hybrid-Experimente, dass Hfq mit der Sekretions-ATPase PilB1, dem Motorprotein der Typ IV Pilus Assemblierung, interagiert. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen belegten, dass Hfq in Abhängigkeit von PilB1 an der Cytoplasmamembran lokalisiert ist. Gleichfalls führte die Inaktivierung von *pilB1* und *pilC* zu einem Verlust der Hfq-abhängigen Transkriptakkumulation. Demzufolge muss davon ausgegangen werden, dass die Lokalisation des Hfq-PilB1-Komplexes an die Pilusbasis essentiell für die Motilität und RNA-Akkumulation ist. Zusammengefasst deuten die Ergebnisse darauf hin, dass Hfq die Aktivität der PilB Sekretions-ATPasen in Cyanobakterien durch einen evolutionär konservierten Mechanismus auf Ebene der Protein-Protein-Interaktion reguliert.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Überblick.....	1
1.2	Die phototaktische Motilität von <i>Synechocystis</i>	2
1.2.1	Phototaxis.....	3
1.2.2	Type IV Pili.....	4
1.2.3	Die Sekretions-ATPasen.....	7
1.2.4	Regulation der Pilusbiogenese und Phototaxis.....	8
1.3	Das RNA-Chaperon Hfq.....	9
1.3.1	Struktur und RNA-Bindung.....	10
1.3.2	Hfq-abhängige posttranskriptionelle Genregulation.....	14
1.3.3	Protein-Interaktionspartner und Lokalisation.....	17
1.3.4	Hfq und sRNAs in Cyanobakterien.....	18
1.4	Zielsetzung dieser Arbeit.....	20
2	Material & Methoden	21
2.1	Verwendete Materialien.....	21
2.1.1	Chemikalien und Geräte.....	21
2.1.2	Software und Datenbanken.....	21
2.1.3	Mikroorganismen.....	21
2.1.4	Verwendete Plasmide.....	23
2.1.5	Synthetische Oligonukleotide.....	23
2.2	Kultivierungsbedingungen und Medien.....	26
2.2.1	Kultivierung von <i>Synechocystis</i>	26
2.2.2	Kultivierung von <i>E. coli</i>	27
2.2.3	Phototaxis-Assay.....	27
2.3	Molekularbiologische Methoden.....	28
2.3.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	28
2.3.2	Transformation von <i>E. coli</i>	28
2.3.3	Transformation von <i>Synechocystis</i>	29
2.3.4	Konjugation von <i>Synechocystis</i>	29
2.3.5	Polymerase Chain Reaktion (PCR).....	30
2.3.6	Restriktionsverdau und Dephosphorylierung.....	31
2.3.7	Ligation von DNA.....	31
2.3.8	Gelelektrophorese und Extraktion von DNA.....	31
2.4	Klonierungsstrategien & Konstruktion von Plasmiden.....	32
2.4.1	pVZ- <i>hfq</i> #AA.....	32

2.4.2	pUR- <i>hfq</i> #AA.....	33
2.4.3	pSK-FLAG- <i>hfq</i>	33
2.4.4	pVZ-eYFP-Hfq und pVZ-Hfq-eYFP.....	33
2.4.5	pVZ- <i>hfq</i> #AA-eYFP.....	34
2.4.6	pSK-PilB1-sfGFP.....	34
2.4.7	pUR-FLAG- <i>sycr1</i>	35
2.4.8	prey-Plasmide für Y2H-Interaktionsstudien.....	35
2.4.9	<i>bait</i> -Plasmide für Y2H-Interaktionsstudien.....	35
2.4.10	Inaktivierung von <i>slr0845</i>	36
2.4.11	Inaktivierung von <i>pilB1</i> und <i>pilC</i>	36
2.5	RNA-Methoden.....	36
2.5.1	Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>Synechocystis</i>	37
2.5.2	Denaturierende Elektrophorese von RNA in Formaldehyd-Agarosegelen.....	37
2.5.3	Denaturierende Harnstoff-PAGE von RNA.....	38
2.5.4	Northern Blot.....	38
2.5.5	Synthese radioaktiv markierter Sonden.....	39
2.5.6	Northern Blot Hybridisierung.....	39
2.5.7	Microarray-Hybridisierung & Auswertung.....	40
2.6	Biochemische Methoden.....	41
2.6.1	Bestimmung des Chlorophyllgehalts.....	41
2.6.2	Co-Immunopräzipitation von Hfq-Interaktionspartnern.....	41
2.6.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	42
2.6.4	Immunoblot-Analyse (Western-Blot).....	43
2.6.5	Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	44
2.6.6	Protein-Interaktionsstudien mit dem Hefe-Zwei-Hybrid-System (Y2H).....	44
2.6.7	Fluoreszenzmikroskopie.....	45
3	Resultate.....	46
3.1	Analyse der Hfq-abhängigen Transkriptakkumulation.....	46
3.1.1	Microarray-Analyse zur Identifizierung Hfq-abhängiger sRNAs.....	46
3.1.2	Verifizierung der Hfq-abhängigen Akkumulation von ncRNAs.....	51
3.2	Hfq und das <i>Sycr1</i> -Regulon.....	56
3.2.1	Analyse der cAMP/ <i>Sycr1</i> -abhängigen Transkriptakkumulation.....	56
3.2.2	Komplementationsversuch mit FLAG- <i>Sycr1</i>	57
3.3	RNA-Bindestellen und funktionelle AS von Hfq.....	59
3.3.1	Hfq-abhängige ncRNAs binden nicht mit hoher Affinität an Hfq.....	59
3.3.2	Atypische Hfq-Homologe sind in fast allen Cyanobakterien konserviert.....	62
3.3.3	Die RNA-Bindungsstellen sind nicht essentiell für die Funktion von <i>Synechocystis</i> Hfq.....	63

3.3.4	AS des proximalen Rings sind essentiell für die Hfq-Funktion.....	66
3.4	Protein-Interaktionspartner von Hfq.....	70
3.4.1	Hfq interagiert mit der T4P Sekretions-ATPase PilB1.....	70
3.4.2	Hfq interagiert mit dem Protein Slr0845.....	71
3.5	Die Hfq-PilB1-Interaktion.....	74
3.5.1	PilB1 besitzt eine konservierte putative Zink-Finger Domäne am C-Terminus.....	74
3.5.2	Hfq bindet direkt an die putative Zink-Finger Domäne.....	77
3.6	Subzelluläre Lokalisation von Hfq.....	79
3.6.1	Hfq lokalisiert an der Zellperipherie.....	80
3.6.2	Die PilB1-Interaktion ist essentiell für die Lokalisation und Funktion von Hfq.....	82
3.6.3	AS des proximalen Rings sind essentiell für die Lokalisation.....	84
3.6.4	Hfq und PilB1 zeigen eine Co-Lokalisation.....	85
4	Diskussion.....	87
4.1	Das Hfq-Regulon.....	87
4.1.1	Zwei putative sRNAs und CRISPR/Cas-Loci werden Hfq-abhängig reguliert.....	87
4.1.2	Hfq reguliert die Komposition von Zellfortsätzen.....	91
4.1.3	Das Hfq Regulon ist deckungsgleich mit dem cAMP/Sycr1 Regulon.....	97
4.1.4	Die RNA-Bindetaschen sind für die Hfq-Funktion in <i>Synechocystis</i> entbehrlich.....	99
4.2	Die PilB1-Interaktion.....	101
4.2.1	Der “proximale Ring” ist essentiell für die Hfq-PilB1-Interaktion.....	101
4.2.2	Die Interaktion wird über eine putative Zink-Finger-Domäne von PilB1 vermittelt.....	103
4.2.3	Die Lokalisation an die Pilus-Basis ist essentiell für die Hfq-Funktion.....	104
4.2.4	Die interagierenden Oberflächen sind in Cyanobakterien konserviert.....	105
4.3	Fazit.....	105
4.3.1	Funktionelle Implikationen der Membranlokalisation.....	105
4.3.2	Hypothetisches Modell der Hfq-abhängigen Regulation in <i>Synechocystis</i>	106
4.3.3	Ausblick.....	109
5	Literaturverzeichnis.....	110
	Abkürzungsverzeichnis.....	124
	Danksagung.....	128

1 Einleitung

1.1 Überblick

Cyanobakterien bilden ein Phylum innerhalb der Gram-negativen Bakterien, dessen Vertreter in vielfältigen morphologischen Formen in beinahe allen Ökosystemen anzutreffen sind. Sie spielen auf Grund ihrer Befähigung zur oxygenen Photosynthese und Fixierung von molekularem Stickstoff eine herausragende Rolle für den Kohlenstoff- und Stickstoffkreislauf in aquatischen Habitaten. Darüber hinaus ist diese erdgeschichtlich sehr alte Gruppe für die Sauerstoffanreicherung der Atmosphäre verantwortlich und stellte nach der Endosymbiontentheorie die Vorläufer der pflanzlichen Chloroplasten (Whitton und Potts, 2000).

Das einzellige, motile Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC6803 (hiernach *Synechocystis*) wurde 1968 aus einem Süßwassersee in Kalifornien isoliert (Stanier *et al.*, 1971). Eine besondere Bedeutung für die Forschung erlangte es, da es der erste photosynthetische Organismus war, dessen Genom vollständig sequenziert wurde (Kaneko *et al.*, 1996). Dabei zeigte sich, dass das Chromosom von 3,57 Mb sowie die vier großen (44-120 kb) und drei kleinen (2,3-5,2 kb) Plasmide zusammengenommen für über 3700 Gene kodieren. Es lässt es sich auf Grund seiner natürlichen Kompetenz leicht genetisch manipulieren (Grigorieva und Shestakov, 1982) und ist neben der photoautotrophen Lebensweise auch zu heterotrophem Wachstum in der Lage (Anderson und McIntosh, 1991). Daher hat sich *Synechocystis* als wichtiger Modellorganismus für die Erforschung des Stoffwechsels und speziell der Photosynthese sowie der Regulation und Adaption an veränderte Umweltbedingungen etabliert.

In Prokaryoten wurden vor allem in den letzten Jahren kleine, nicht-kodierende RNAs identifiziert, die über Basenpaarungen mit verschiedenen Ziel-RNAs die Genexpression modulieren können (Gottesman und Storz, 2011). Dabei zeigte sich, dass in vielen bakteriellen Spezies das RNA-Chaperon Hfq eine elementare Rolle bei der posttranskriptionellen Genregulation durch kleine *trans*-kodierte regulatorische RNAs (sRNAs) spielt

(Vogel und Luisi, 2011). Das Aufkommen fortschrittlicher Techniken, die das Sequenzieren komplexer Transkriptome ermöglichte (*next-generation sequencing*; RNA-seq), führte zur Identifizierung einer Vielzahl von nicht-kodierenden RNAs in praktisch allen untersuchten Organismen (Wang *et al.*, 2009). Infolgedessen sind auch die posttranskriptionelle Genregulation und die Funktion von Hfq als Vermittler von RNA-Interaktionen verstärkt in den Fokus der Forschung gerückt. Auch in *Synechocystis* wurden über 300 putative sRNAs detektiert (Mitschke *et al.*, 2011) und die Bedeutung von Hfq für Regulation der Motilität erkannt (Dienst *et al.*, 2008). Trotz Aufklärung der Struktur des Hfq-Proteins von *Synechocystis* und einer eingehenden Analyse einer Δhfq Mutante blieb bislang dennoch ungeklärt, durch welche molekularen Mechanismen Hfq die Motilität in diesem Modellorganismus beeinflusst.

1.2 Die phototaktische Motilität von *Synechocystis*

Viele Cyanobakterien sind zur aktiven Fortbewegung befähigt. Neben der Ausbreitung (und im Falle von symbiontischen Cyanobakterien dem Aufsuchen von Wirtsorganismen) bietet die aktive Bewegung vor allem auch die Möglichkeit, bei geänderten Umweltbedingungen in ein vorteilhaftes Mikromilieu auszuweichen. Da Licht für die photosynthetischen Cyanobakterien einen essenziellen Faktor darstellt, ist vor allem die Phototaxis, d.h. die gerichtete Bewegung entlang eines Lichtgradienten ein hervorstechendes Merkmal dieser Organismen, welches seit vielen Dekaden untersucht wird (Nultsch, 1973; Häder, 1987). Hierzu bedienen diese Bakterien sich unterschiedlicher "Bewegungsapparate". Viele filamentöse Cyanobakterien bewegen sich in Richtung der Längsachse des Filaments gleitend über feste Oberflächen (*gliding motility*), während einige marine *Synechococcus*-Arten sich schwimmend fortbewegen können (Read *et al.*, 2007; Ehlers und Oster, 2012). Die molekularen Mechanismen dieser Bewegungsapparate sind aber weitgehend unbekannt. Vor allem Arten der Ordnung *Chroococcales*, zu der auch *Synechocystis* gehört, können sich dagegen durch kurze ruckartige Bewegungen (*twitching motility*)¹ entlang fester Oberflächen fortbewegen (Stanier *et al.*, 1971). Für diese Art der

¹ Auf Grund der makroskopisch gleichförmig anmutenden Bewegung wird die *twitching motility* vor allem in der älteren Literatur ebenfalls als *gliding motility* bezeichnet, obwohl ihr ein grundlegend anderer molekularer Mechanismus zu Grunde liegt.

Motilität sind retraktile Typ IV Pili (T4P) an der Zelloberfläche verantwortlich, deren Extension durch die Sekretions-ATPase PilB1 angetrieben wird. Die komplexe Regulation der Phototaxis, an der u.a. Photorezeptoren und sekundäre Botenstoffe beteiligt sind, ist aber nur teilweise verstanden.

1.2.1 Phototaxis

Synechocystis-Zellen bewegen sich mittels *twitching motility* bei diffuser Lichteinstrahlung ebenso wie in Dunkelheit und zeigen unter unidirektionaler Lichteinstrahlung phototaktisches Verhalten. Geschwindigkeit wie auch Orientierung der phototaktischen Bewegung sind abhängig von der Intensität und der Wellenlänge des eingestrahlt Lichts. Während im Bereich des sichtbaren Lichts die Bewegungsgeschwindigkeit und Orientierung der Zellen in Richtung der Lichtquelle (positive Phototaxis) unter Rotlicht (~660nm) ihr Maximum erreicht und unter Blaulicht (~460nm) keine Phototaxis zu beobachten ist, bewegen sich Zellen unter UV-A Einstrahlung (~360nm) weg von der Lichtquelle (negative Phototaxis) (Choi *et al.*, 1999). Das phototaktische Verhalten lässt sich dabei in drei Phasen untergliedern (Bhaya *et al.*, 2006; Burriesci und Bhaya, 2008). Einzelzellen bewegen sich langsam und zeigen ein schwach ausgeprägtes phototaktisches Verhalten (Phase I), welches sich mit zunehmender Zelldichte verstärkt und zu einer Ansammlung von Zellen in Lichtrichtung führt (Phase II). Bei ausreichender Zelldichte bewegen sich Gruppen von Zellen in makroskopisch sichtbaren fingerartigen Ausläufern mit erhöhter Geschwindigkeit entlang des Lichtgradienten (Phase III). Neben der grundlegenden Bedeutung der nachfolgend besprochenen T4P sind sehr wahrscheinlich die Sekretion von Extrazellulären Polymeren Substanzen (EPS) zur Optimierung der Eigenschaften der zu überquerenden Oberfläche sowie evtl. auch ein direkter Zell-Zell-Kontakt oder eine Form von *quorum sensing* für den Übergang in die Phase III notwendig (Burriesci und Bhaya, 2008; Ursell *et al.*, 2013). Die Fortbewegung ist nicht direkt an die Photosynthese gekoppelt und die Energie wird wahrscheinlich durch oxidative Phosphorylierung, d.h. Zellatmung, bereitgestellt (Choi *et al.*, 1999). Entsprechend steigert die Zugabe von Glukose zum Medium die phototaktische Motilität durch die vermehrte Energiebereitstellung und/oder erhöhte EPS-Produktion (Bhaya *et al.*, 2006).

1.2.2 Type IV Pili

Die Zelloberfläche vieler einzelliger Cyanobakterien ist dicht mit haarähnlichen Anhängen, sogenannten Pili, besetzt (T. Vaara, 1982). Diese können bei *Synechocystis* in die ~6-8 nm dicken und >2 µm langen, flexiblen *thick pili* und die zahlreicheren, bürstenartigen ~2-3nm starken und 0,5-1 µm langen *thin pili* unterschieden werden (Abb. 1) (Bhaya *et al.*, 2000). Nur die *thick pili* sind essenziell für die *twitching motility* von *Synechocystis* (Bhaya *et al.*, 1999). Ihr Aufbau aus Pilin-Untereinheiten sowie die an der Biogenese beteiligten Proteine sind homolog zu den T4P anderer Gram-negativer Bakterien (Bhaya *et al.*, 2000; Yoshihara *et al.*, 2001).

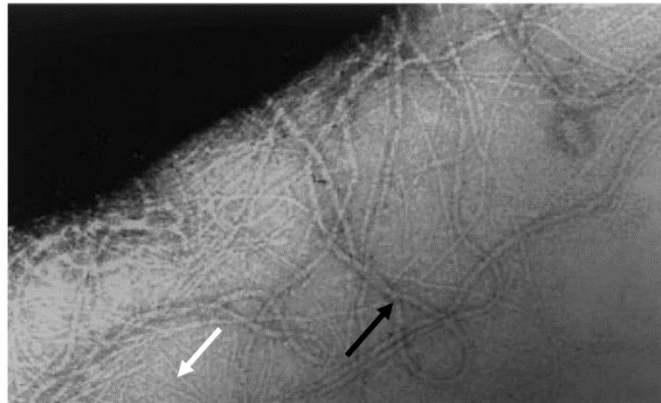


Abb. 1: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme der Pili von *Synechocystis*. Die *thick pili* (schwarzer Pfeil) und *thin pili* (weißer Pfeil) sind markiert (Aufnahme aus Bhaya *et al.*, 2000).

Eine Vielzahl von Studien und Vergleiche mit der gut untersuchten *twitching motility* von *Pseudomonas aeruginosa* (von hier an *P. aeruginosa*) ergeben dabei folgendes Model für die Funktionsweise der T4P in *Synechocystis* (Abb. 2) (Yoshihara und Ikeuchi, 2004; Burrows, 2012). Die strukturelle Hauptuntereinheit der T4P bildet das als *major pilin* bezeichnete Protein PilA1. Dieses wird ebenso wie die weiteren (potentiellen) Pilusuntereinheiten – die *minor pilins* PilA2-PilA11² – als Präpilin synthetisiert und in der Cytoplasmamembran verankert. Nachdem der N-Terminus (das sogenannte *leader peptide*) durch die Präpilinpeptidase PilD innerhalb einer Präpilin-spezifischen Signalsequenz ab-

² Die Funktion der verschiedenen *minor pilins* in *Synechocystis* ist unbekannt und es ist nicht geklärt, ob sie in den Pilus integriert werden. Für die *twitching motility* sind lediglich PilA9-PilA11 essentiell.

getrennt wird, polymerisieren die PilA-Untereinheiten in Folge einer Konformationsänderung des integralen Membranproteins PilC außerhalb der inneren Membran. Dieser energieabhängige Schritt wird durch die Sekretions-ATPase PilB1³ (siehe 1.2.3) angetrieben. Der sich verlängernde Pilus wird durch einen Porenkomplex aus PilQ und weiteren Proteinen über die äußere Membran transportiert und kann sich (über einen unbekannt Mechanismus) an eine feste Oberfläche heften. Die eigentliche Bewegung der Zelle in Richtung des Anheftungspunktes erfolgt durch die anschließende Depolymerisation und Verkürzung des Pilus mittels einer zweiten Sekretions-ATPase, welche sich aus PilT1 und/oder PilT2 Monomeren zusammensetzt.

Neben der Motilität sind die T4P in *Synechocystis* noch an der Aufnahme exogener DNA im Rahmen der natürlichen Kompetenz beteiligt (Yoshihara *et al.*, 2001) und spielen wahrscheinlich ebenfalls eine Rolle bei der Anheftung an andere Zellen und abiotische Oberflächen, der Biofilmbildung, der Infektion durch Phagen und bei der Elektronenübertragung durch sogenannte "nanowires" (Mattick, 2002; Gorby *et al.*, 2006).

³ Neben *pilB1* (*slr0063*) kodiert auch *pilB2* (*slr0079*) für ein PilB-Homolog. Dieses ist für die Pilusbiogenese und Motilität aber nicht relevant.

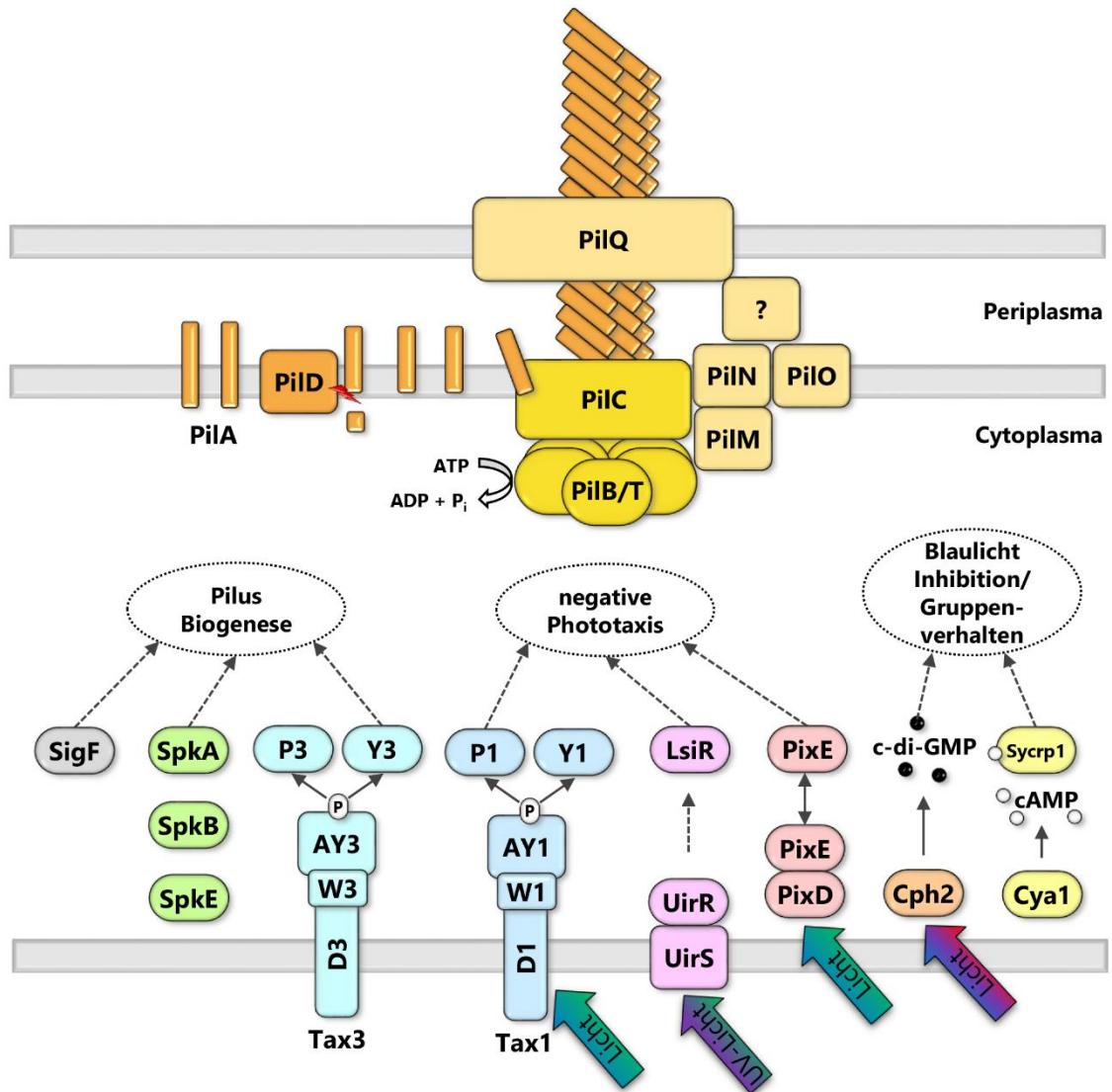


Abb. 2: Modell der Type IV Pili und der regulatorischen Proteine in *Synechocystis*. Die Lokalisation und die Interaktion der einzelnen Komponenten wurden aus Vergleichen mit den T4P und Chemotaxisproteinen anderer Gram-negativer Bakterien abgeleitet (vgl. 1.2.2). Die Gene für Proteine der Pilus-Basis (gelb) und des Porenkomplexes (beige) sind in vielen Cyanobakterien jeweils in einem Operon organisiert. Bisher wurde kein PilP-Homolog in *Synechocystis* identifiziert, welches den Proteinkomplex der Cytoplasmamembran mit der Pore in der äußeren Membran verbindet. Die Sekretions-ATPase PilB1 ist für die Extension und PilT1 für die Retraktion des Pilus verantwortlich (vgl. 1.2.3). Eine Erläuterung der regulatorischen Proteine findet sich in Abschnitt 1.2.4. Die Pfeile sind entsprechend der durch Photoconversion hervorgerufenen unterschiedlichen Absorptionsmaxima der Photorezeptoren eingefärbt.

1.2.3 Die Sekretions-ATPasen

Die Sekretions-ATPasen PilB und PilT gehören zu der Familie der *type II/IV secretion NTPases*⁴ (Planet *et al.*, 2001). Proteine dieser Familie sind die molekularen Motoren für den Proteintransport über die äußere Membran durch Typ II- und Typ IV Sekretions-systeme (T2SS bzw. T4SS) und der Assemblierung der T4P in Gram-negativen Bakterien, wie auch der Assemblierung der Flagellen von Archaeen durch evolutionär verwandte Sekretionsapparate (Peabody, 2003). Kristallstrukturanalysen haben gezeigt, dass diese Proteine aus einer N-terminalen Domäne (NTD) und einer C-terminalen Domäne (CTD) aufgebaut sind und zu ringförmigen Hexameren assemblieren (Yeo *et al.*, 2000; Robien *et al.*, 2003; Yamagata und Tainer, 2007). Innerhalb der GspE/PilB - Unterfamilie lassen sich weiterhin die hoch konservierten N2 und C1 Subdomänen, die an der Domänen-Interaktion beteiligt sind und eine ATP-Bindestelle formen, von den variablen N1- und C2-Subdomänen unterscheiden (Robien *et al.*, 2003). Die cytoplasmatischen Sekretions-NTPasen interagieren mit einem oder mehreren integralen Membranproteinen des Sekretionsapparats an der inneren Membran (Sandkvist *et al.*, 1995; Py *et al.*, 2001; Crowther *et al.*, 2004), wobei im Falle der T4P wahrscheinlich eine dynamisch wechselnde Interaktion von PilB oder PilT mit dem integralen Membranproteinkomplex um PilC erfolgt (Chiang *et al.*, 2005; Bulyha *et al.*, 2009). Ihre Funktion als molekularer Motor erfordert die Bindung und Hydrolyse von ATP nahe der N2-C1-Kontaktfläche. Diese führt zu einer Konformationsänderung des Proteins, die über die N1-Domäne auf den Membranproteinkomplex übertragen wird und in dessen Folge eine hydrophobe Pilin Untereinheit aus der inneren Membran in den sich verlängernden (Pseudo-)Pilus integriert wird (Crowther *et al.*, 2005; Craig *et al.*, 2006; Yamagata und Tainer, 2007). Eine spezifische Funktion für die variable C2-Domäne wurde bisher nicht beschrieben.

⁴ PFAM: PF00437 (T2SE); oftmals auch als *traffic ATPases* bezeichnet

1.2.4 Regulation der Pilusbiogenese und Phototaxis

Eine Vielzahl an Photorezeptoren, Proteinkinasen, sekundären Botenstoffen und weiteren Faktoren sind an der Signaltransduktion, welche die Pilusbiogenese und die Motilität steuert, beteiligt (Abb. 2). Bedingt durch die Komplexität der Regulation wird diese aber nur in Ansätzen verstanden.

Der alternative σ -Faktor SigF ist sowohl für die Biogenese der T4P als auch der *thin pili* essenziell (Bhaya *et al.*, 1999) und für die Transkription des Pilin PilA1 verantwortlich (Asayama und Imamura, 2008). Darüber hinaus wurden mehrere Serin/Threonin-Kinasen (SpkA, SpkB und SpkE) mit der Transkription der Präpiline und deren posttranslativ- onaler Modifikation in Verbindung gebracht (Kamei *et al.*, 2001; Kamei *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2004; Panichkin *et al.*, 2006).

Das Genom von *Synechocystis* codiert drei verschiedene Signaltransduktionssysteme (*tax1-3*), die Homologien zu den Chemotaxis-Rezeptoren aufweisen, welche in vielen Bakterien die Richtung der Flagellenrotation in Abhängigkeit eines chemischen Stimulus regulieren (einen detaillierten Überblick über die Chemotaxis bietet Porter *et al.*, 2011). Die cyanobakteriellen Systeme setzen sich aus dem Membranrezeptor TaxD, dem CheW-Homolog TaxW, der Hybrid-Histidinkinase TaxAY, sowie den Antwortregulatoren (*response regulators*) TaxY und TaxP zusammen. Gezielte Geninaktivierung zeigte, dass das Tax3-System die Pilusassemblierung reguliert und das Tax1-System für die positive Phototaxis erforderlich ist (Yoshihara *et al.*, 2000; Bhaya, Takahashi, und Grossman, 2001; Yoshihara *et al.*, 2002). Während unbekannt ist, welches Signal TaxD1 rezipiert, kann für TaxD3 eine Rolle als Blaulicht-Photorezeptor angenommen werden (Yoshihara *et al.*, 2004). Eine Funktion des Tax2-System in der Motilität von *Synechocystis* ist nicht bekannt.

Ebenfalls an der Regulation der negativen Phototaxis sind die Lichtrezeptoren UirS und PixD beteiligt. UirS aktiviert unter UV-Einstrahlung über eine Signalkaskade den *response regulator* LsiR, welcher die Umkehr von positiver zu negativer Phototaxis bewirkt (Song *et al.*, 2011). Durch Oligomerisierung reguliert der Blaulicht-Sensor PixD den *response regulator* PixE, der ebenfalls an einer Umkehr der Phototaxis beteiligt ist (Okajima *et al.*, 2005; Yuan und Bauer, 2008).

Darüber hinaus sind die sekundären Botenstoffe cAMP (*cyclic adenosine monophosphate*), sowie c-di-GMP (*cyclic diguanylate monophosphate*) an der Regulation der Motilität beteiligt. Sowohl die cAMP synthetisierende Adenylatzyklase Cya1, als auch der cAMP bindende Transkriptionsfaktor Sycrp1 sind essenziell für das phototaktische Verhalten von *Synechocystis* (Terauchi und Ohmori, 1999; Yoshimura, Yoshihara, *et al.*, 2002). In einer Δ sycrp1-Mutante ist insbesondere die Transkription von zwei Operons (*slr1667-slr1668*; *slr2015-slr2018*) beeinträchtigt (Yoshimura, Yanagisawa, *et al.*, 2002), und es ist bekannt, dass die durch *slr2015-slr2017* kodierten *minor pilins* PilA9, PilA10 und PilA11 für die Phototaxis unabdingbar sind (Bhaya *et al.*, 2000). Interessanterweise besitzen sowohl Δ *pilA9-11*-Mutanten, als auch eine Δ sycrp1-Mutante *thin pili* und *thick pili* auf der Zelloberfläche (Yoshimura, Yoshihara, *et al.*, 2002; Yoshihara und Ikeuchi, 2004). Zudem zeigen Δ sycrp1 und Δ cya1-Mutanten auf Zellebene weiterhin phototaktisches Verhalten, sind aber unfähig, in die makroskopisch sichtbare Phase 3 der Phototaxis einzutreten (Bhaya *et al.*, 2006). Der sekundäre Botenstoff c-di-GMP ist an der negativen Regulation der Phototaxis durch Blaulicht beteiligt. Ein Anstieg des zellulären c-di-GMP Spiegels durch die Blaulicht-abhängige Diguanylatzyklase-Aktivität des Photorezeptors Cph2 inhibiert die Phototaxis durch einen unbekanntem Mechanismus (Savakis *et al.*, 2012).

1.3 Das RNA-Chaperon Hfq

Bereits 1968 wurde Hfq als Protein charakterisiert, welches einzelsträngige RNA bindet und für die Replikation des Bakteriophagen Q β in *Escherichia coli* (*E. coli*) notwendig ist, woher sich auch der Name *host factor for RNA bacteriophage Q-beta* ableitet⁵ (Franze de Fernandez *et al.*, 1968; Shapiro *et al.*, 1968; Franze de Fernandez *et al.*, 1972). Es kristallisierte sich allerdings erst im Laufe der letzten 15 Jahre heraus, dass Hfq zur weitverbreiteten Familie der RNA-bindenden LSM-Proteine ("*like Sm*") gehört und in vielen bakteriellen Phyla eine wichtige Rolle innerhalb der posttranskriptionellen Genregulation

⁵ Hfq wird vor allem in frühen Publikationen auch als HF-I (*host factor I*) bezeichnet.

durch kleine *trans*-codierte RNAs spielt. Neben der Bindung von RNAs ist aber auch die Interaktion von Hfq mit anderen Proteinen an dieser Art der Genregulation beteiligt.

1.3.1 Struktur und RNA-Bindung

Hfq gehört zur evolutionär sehr alten Familie der LSm-Proteine, die in allen drei Domänen des Lebens konserviert sind, und deren charakteristisches Merkmal die Assemblierung zu ringförmigen Oligomeren mit der Fähigkeit zur RNA-Bindung ist. Damit einher geht ihre wesentliche Rolle bei der Prozessierung und Degradierung von RNAs (Beggs, 2005; Wilusz und Wilusz, 2005). Die prototypischen Vertreter dieser Familie sind die eukaryotischen Sm-Proteine, welche zu Heteroheptameren assemblieren und zusammen mit den snRNAs (*small nuclear RNAs*) als zentrale Bestandteile der Spleißosomen an der Reifung eukaryotischer prä-mRNAs mitwirken. Die Quartärstruktur und RNA-Bindungseigenschaften der LSm-Proteine werden durch zwei als Sm1 und Sm2 bezeichnete Sequenzmotive und der durch diese bedingten hoch konservierten Tertiärstruktur, dem sogenannten *Sm-fold*, bestimmt (Hermann *et al.*, 1995; Khusial *et al.*, 2005). Diese Struktur besteht aus einer N-terminalen α -Helix (α_1), gefolgt von einem fünfsträngigen, antiparallelen β -Faltblatt (β_{1-5}), welches eine β -barrel Topologie aufweist (Abb. 3 a). Dabei umfasst das Sm1 Motiv die Faltblätter β_{1-3} und das durch eine nicht konservierte Aminosäuresequenz variabler Länge verbundene Sm2 Motiv die Faltblätter β_{4-5} . Während Aminosäuren (AS) des Sm1 wie auch des Sm2- Motivs an der RNA-Bindung beteiligt sind (Abb. 4.), spielen Interaktionen zwischen AS der Sm2 Motive benachbarter Monomere wahrscheinlich eine entscheidende Rolle für die Oligomerisierung des Apoproteins (Abb. 3 b) (Kambach *et al.*, 1999; Collins *et al.*, 2001).

Verschiedene Studien zeigten, dass ungefähr die Hälfte aller sequenzierten Bakteriengenome für Hfq-Homologe kodieren (Sun *et al.*, 2002; Valentin-Hansen *et al.*, 2004) und diese strukturell und funktionell mit den LSm-Proteinen aus Eukaryoten und Archaeen verwandt sind (Møller *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2002). Im Gegensatz zu anderen LSm-Proteinen weisen die bakteriellen Hfq-Proteine aber eine abweichende AS-Konservierung innerhalb des Sm2-Sequenzmotivs auf und assemblieren zu Homohexameren. Diese haben einen Durchmesser von $\sim 70 \text{ \AA}$ und eine Dicke von $\sim 25 \text{ \AA}$ und umschließen eine

zentrale Pore von $\sim 8\text{-}12 \text{ \AA}$ (Brennan und Link, 2007). In *E. coli* und vielen anderen Bakterien ist das Hfq Protein zudem um eine variable C-terminale Region verlängert. Deren Einfluss auf die RNA-Bindung und Riboregulation ist allerdings umstritten (Vecerek *et al.*, 2008; Olsen *et al.*, 2010).

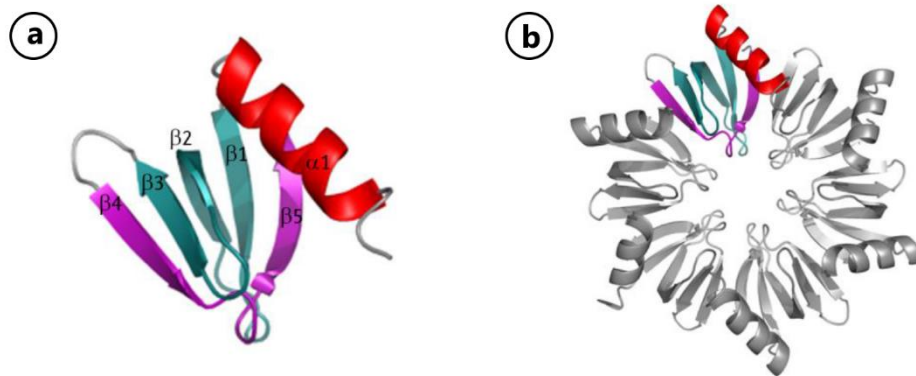


Abb. 3: Struktur bakterieller Hfq Proteine. Bändermodell eines *E. coli* Hfq (a) Monomers und des (b) Hexamers (PDB: 1HK9)⁶. Neben der α -Helix (rot) sind die Sm1- (blau) und Sm2- (violett) Sequenzmotive eingefärbt.

Das ringförmige Hfq-Hexamer besitzt drei Oberflächen zur Bindung von RNAs. Dies sind zum einen die proximale Seite, an welcher die N-terminale α -Helix exponiert ist, die gegenüberliegende distale Seite sowie der laterale Außenbereich des Ringes (Abb. 4 a, b). Die Co-Kristallisation⁷ von Hfq-RNA Komplexen und Mutationsanalysen von einzelnen, an der RNA-Bindung beteiligten AS trugen wesentlich zum Verständnis dieser Interaktionen bei. Durch die Strukturanalyse von *Staphylococcus aureus* (hiernach *S. aureus*) Hfq mit einem AU₅G Oligoribonukleotid konnte gezeigt werden, dass einzelsträngige, AU-reiche RNA-Sequenzen auf der proximalen Seite gebunden werden (Schumacher *et al.*, 2002). Die meisten der an der RNA-Bindung beteiligten AS sind Teil der Sm1 und Sm2-Motive und in den Schleifen zwischen β_2 und β_3 sowie β_4 und β_5 lokalisiert. Dabei bindet jede Hfq-Untereinheit ein einzelnes Nukleotid, so dass sich die RNA kreisförmig um die zentrale Pore anlagert. Diese "proximale Bindungstasche" spielt eine wesentliche Rolle bei

⁶ Sämtliche Proteinstrukturen wurden mit PyMOL generiert.

⁷ Der Verständlichkeit halber wird in dieser Arbeit oftmals das lateinische Präfix „Co“ anstelle der deutschen Wortzusammensetzung „Ko-“ verwendet.

der Erkennung und Bindung der Uridin-reichen 3'-Enden, über die viele sRNAs in Folge einer Rho-unabhängigen Termination verfügen (Sauer und Weichenrieder, 2011). Entsprechend beeinträchtigen die Verkürzung der Uridin-reichen 3'-Enden von sRNAs (Otaka *et al.*, 2011) sowie die gezielte Mutation einzelner AS der proximalen Bindungstasche die Bindung von sRNAs durch Hfq (Mikulecky *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2013). Darüber hinaus sind geladene AS auf der lateralen Außenfläche des Hexamers ebenfalls an der sRNA-Bindung durch Hfq beteiligt (Mikulecky *et al.*, 2004; Sauer *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2013). Die distale Seite von Hfq ist dagegen essenziell für die Bindung von mRNAs und Poly(A)-reichen RNAs (Mikulecky *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2013). Die Kristallstruktur von *E. coli* Hfq im Komplex mit einem Poly(A) Oligoribonukleotid (Link *et al.*, 2009) und die Sequenzanalyse verschiedener Hfq-abhängig regulierter mRNAs (Beisel *et al.*, 2012; Salim *et al.*, 2012) führten zu der Auffassung, dass für die RNA-Bindung auf der distalen Seite von Hfq Poly(A-R-N)⁸-Sequenzmotive eine entscheidende Rolle spielen.

⁸ A = Adenin, R = Purin; N = beliebiges Nukleotid

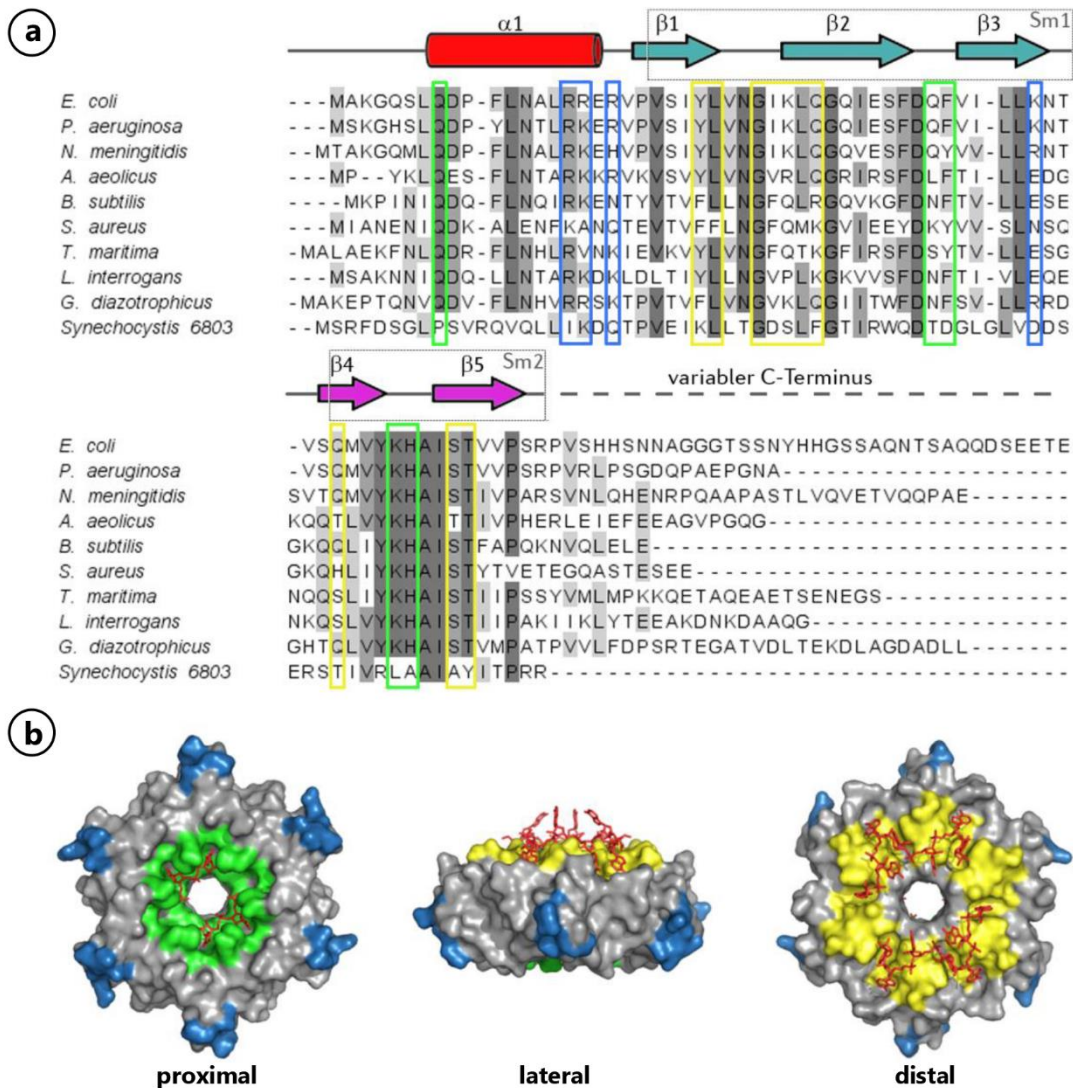


Abb. 4: Sequenzvergleich und RNA-Bindestellen bakterieller Hfq Proteine. (a) AS-Sequenz-Alignment⁹ bakterieller Hfq Proteine. Zunehmende Sequenzidentität ist durch dunklere Grauschattierung gekennzeichnet. Die Sekundärstruktur von *E. coli* Hfq (UniProt: P0A6X3) ist dem Alignment vorangestellt und die Sm-Sequenzmotive sind durch graue Rahmen gekennzeichnet. AS Positionen, welche nach Wang *et al.* (2013) und Sauer *et al.* (2012) an der RNA-Bindung in *E. coli* Hfq beteiligt sind, wurden farbig eingerahmt (grün = proximale Bindestelle, blau = laterale Bindestelle, gelb = distale Bindestelle). **(b)** Oberflächenmodell des Hfq-Hexamers im Komplex mit AU₆A und A₇ RNAs (PDB: 4HT9). Die RNA-Bindestellen sind farblich hervorgehoben.

⁹ Soweit nicht anders angegeben wurden alle Sequenz-Alignments mit Clusta1W2 erstellt und mit Jal-View visualisiert.

1.3.2 Hfq-abhängige posttranskriptionelle Genregulation

Prokaryoten nutzen eine Vielzahl von Regulationsmechanismen, die auf nicht-kodierenden RNAs (*non-coding* RNAs; ncRNAs) oder den nicht-kodierenden Bereichen von mRNAs (*untranslated region*; UTRs) beruhen und ebenfalls auf Ebene der RNA ihre Wirkung entfalten (Waters und Storz, 2009; Gottesman und Storz, 2011). Hierunter fallen die crRNAs der CRISPR/Cas-Systeme¹⁰, die exogene RNA- oder DNA-Moleküle spezifisch erkennen und degradieren können, regulatorische Bereiche innerhalb der nicht translatierten Regionen von mRNAs, wie *Riboswitches* und RNA-Thermometer, sowie kleine regulatorische RNAs die ihre Funktion über die Bindung von Proteinen oder anderen RNAs ausüben. Bei den letztgenannten RNAs, die über Basenpaarungen mit Ziel-RNAs ihre Funktion erfüllen, unterscheidet man *cis*-codierte *antisense* RNAs (asRNAs) von den *trans*-kodierte kleinen regulatorischen RNAs (*small* RNAs; sRNA). Während die asRNAs zumeist vollständig komplementär zu einer einzigen Ziel mRNA sind, erkennen die kleinen (50-500nt), häufig hoch strukturierten sRNAs oftmals unterschiedliche Ziel-mRNAs über kurze Sequenzabschnitte (*seed region*) und können lediglich imperfekte Basenpaarungen mit diesen eingehen.

Das RNA Chaperon Hfq ist eine zentrale Komponente in der posttranskriptionellen Genregulation durch diese *trans*-kodierte sRNAs. Es bindet sowohl sRNAs, wie auch ihre Ziel mRNAs und ist für die Basenpaarungen zwischen den beiden RNA-Strängen mit eingeschränkter Komplementarität in vielen Fällen zwingend notwendig. Mechanistisch kann dies sowohl durch Strukturänderung der gebundenen RNAs (Geissmann und Touati, 2004; Ribeiro *et al.*, 2012) als auch durch eine Erhöhung der lokalen Konzentration und Steigerung der Assoziationsrate der interagierenden RNAs erklärt werden (Brescia *et al.*, 2003; Soper *et al.*, 2011). Die Regulation der Genexpression durch Hfq-abhängige sRNAs kommt auf verschiedenen Wegen auf Ebene der Translation und der RNA Stabilität zustande (Aiba, 2007; Fröhlich und Vogel, 2009). Einerseits kann die Bildung einer sRNA:mRNA-Duplex, welche in den meisten Fällen innerhalb der ribosomalen Bindestelle (RBS) der 5'-UTR der mRNA erfolgt, die Bindung der ribosomalen 30S-

¹⁰ Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats und CRISPR-associated (*cas*) Gene

Untereinheit und damit die Translationsinitiation und die Proteinbiosynthese verhindern (Abb. 5 a). Strukturänderungen der 5'-UTR in Folge der Duplexbildung können andererseits die RBS überhaupt erst für die Ribosomen zugänglich machen und hierdurch die Genexpression erhöhen (Abb. 5 b). Darüber hinaus können Ribonuklease (RNase)-Schnittstellen in den Hfq:RNA-Komplexen oder einer sRNA:mRNA-Duplex maskiert bzw. für die Degradation durch RNasen präsentiert werden (Abb. 5 c, d). So werden beispielsweise einige sRNAs durch Hfq stabilisiert, während mRNAs oftmals nach der Bildung einer sRNA:mRNA-Duplex (z.T. zusammen mit der korrespondierenden sRNA) durch RNase E degradiert werden (Massé *et al.*, 2003; Prévost *et al.*, 2011). Hfq kann die RNA-Degradation außerdem durch die Regulation der Polyadenylierung und des daran gekoppelten exonukleolytischen Abbaus in 3'-5' Richtung beeinflussen (Abb. 5 e) (Hajnsdorf und Régnier, 2000; Folichon *et al.*, 2003; Mohanty *et al.*, 2004; Folichon *et al.*, 2005).

Die Hfq-abhängige posttranskriptionelle Genregulation wurde überwiegend in Gram-negativen Proteobakterien untersucht. Hfq bindet über 30 % der ca. 100 bekannten sRNAs in den Modellorganismen *E. coli* und *Salmonella enterica* sowie eine große Zahl an mRNAs (Zhang *et al.*, 2003; Sittka *et al.*, 2008). Die Inaktivierung von *hfq* in diesen Bakterien führt zu pleiotropen physiologischen Effekten, wie z. B. verminderten Wachstumsraten, eingeschränkter Stresstoleranz, defekter Motilität, veränderter Biofilmbildung sowie einer attenuierten Pathogenität in den meisten virulenten Stämmen (Chao und Vogel, 2010; Sobrero und Valverde, 2012). Auf Grund der begrenzten Anzahl experimenteller Studien war die Rolle von Hfq in Gram-positiven Bakterien lange ungewiss. Mittlerweile wurden jedoch auch in dieser Bakteriengruppe die Bindung von sRNAs durch Hfq und Hfq-abhängige Genregulation gezeigt (Nielsen *et al.*, 2010; Dambach *et al.*, 2013) und eine Funktion von Hfq innerhalb der Stresstoleranz und Virulenz nachgewiesen (Christiansen *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2010). Für die Ähnlichkeit der Gram-negativen und Gram-positiven Hfq-Homologe spricht zudem, dass eine *E. coli* Δhfq Mutante durch die heterologe Expression von *Listeria monocytogenes* Hfq komplementiert werden kann (Nielsen *et al.*, 2010). Auf der anderen Seite kodieren eine ganze Reihe von sRNA exprimierenden Prokaryoten, wie z. B. *Helicobacter pylori*, *Streptococcus pneumoniae* oder *Prochlorococcus* sp. MED4, kein *hfq* Homolog. Das weist darauf hin, dass Hfq nicht generell

für die Funktion von sRNAs benötigt wird (Axmann *et al.*, 2005; Kumar *et al.*, 2010; Sharma *et al.*, 2010)

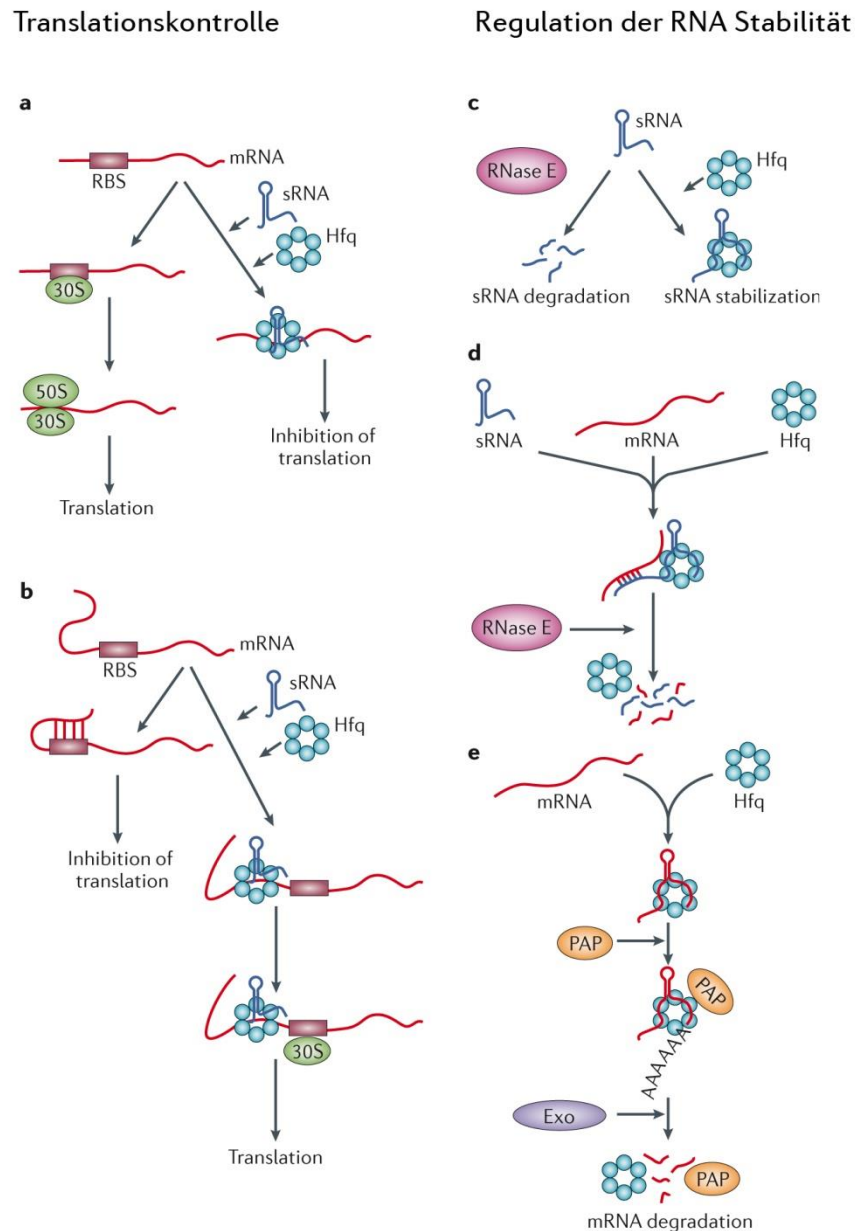


Abb. 5: Verschiedene Funktionen von Hfq innerhalb der posttranskriptionellen Genregulation.

(a) Eine Hfq-abhängige sRNA kann durch Basenpaarung mit der RBS einer Ziel-mRNA die Bindung der ribosomalen Untereinheiten blockieren und so die Translation verhindern. **(b)** Sekundärstrukturen innerhalb der 5'-UTR einer Ziel-mRNA, welche die Ribosomenbindung blockieren, können durch Basenpaarung mit einer Hfq-abhängigen sRNA aufgehoben werden, so dass es zur aktiven Translation kommt. **(c)** Hfq kann Ribonuklease-Schnittstellen (zumeist einzelsträngige RNase E-Schnittstellen innerhalb der sRNAs) maskieren **(d)** oder aber Schnittstellen in sRNA:mRNA-Duplexen für Ribonukleasen zugänglich machen und so eine (Co-)Degradation der RNA(s) begünstigen. **(e)** Hfq kann die Polyadenylierung von mRNAs durch Poly(A)-Polymerase stimulieren und so den daran gekoppelten exonukleolytischen Abbau hervorrufen. Abbildung aus Vogel und Luisi (2011).

1.3.3 Protein-Interaktionspartner und Lokalisation

Im Gegensatz zu den Untersuchungen der Bindung von RNA durch Hfq, gibt es vergleichsweise wenige Arbeiten zur Interaktion von Hfq mit anderen Proteinen. Lediglich durch Studien in *E. coli* ist bekannt, dass Hfq mit einer ganzen Reihe von Proteinen interagiert, die am RNA-Metabolismus beteiligt sind. So rekrutiert Hfq RNase E und andere Proteine des Degradosoms, um gebundene RNAs zu degradieren (Morita *et al.*, 2005; Worrall *et al.*, 2008; Ikeda *et al.*, 2011), und reguliert im Komplex mit Poly(A)-Polymerase (PAP I) und Polynukleotid-Phosphorylase (PNPase) die Polyadenylierung und den Abbau von mRNAs und sRNAs (Mohanty *et al.*, 2004; De Lay und Gottesman, 2011). Hfq ist ebenfalls an der Regulation der Transkription beteiligt. So beeinflusst Hfq die Termination der Rho-abhängigen Transkription durch Interaktion mit dem Faktor Rho (Rabhi *et al.*, 2011) und interagiert mit der RNA-Polymerase über das ribosomale Protein S1 (Sukhodolets und Garges, 2003; Windbichler *et al.*, 2008). Des Weiteren wurde durch umfangreiche Interaktionsstudien klar, dass Hfq direkt oder indirekt mit über 30 Proteinen in diversen (Multi-)Proteinkomplexen interagiert (Butland *et al.*, 2005; Arifuzzaman *et al.*, 2006). Die molekularen Grundlagen dieser Interaktionen sind aber bisher noch weitgehend unbekannt. Während für RNase E, PAP I und PNPase eine Interaktion mit Hfq selbst nach einem rigorosen RNase-Verdau nachgewiesen werden konnte, so beeinflusst die Anwesenheit von RNA dennoch die Ausbildung der o.g. Hfq-Protein-Komplexe *in vitro*. Insbesondere ist nicht geklärt, welche Bindungsstellen und AS von Hfq an diesen Proteininteraktionen beteiligt sind.

Verschiedene Studien, in denen die subzelluläre Lokalisation von Hfq in *E. coli* untersucht wurde, kamen zu keinem eindeutigen Ergebnis. Während in frühen Studien eine Lokalisation im Bereich des Nukleoids oder im umgebenden Zytoplasma beschrieben wurde (Kajitani *et al.*, 1994; Azam *et al.*, 2000), ergab eine spätere Studie, dass ein großer Teil der Hfq-Proteine mit der Zellmembran assoziiert ist (Diestra *et al.*, 2009). Aktuelle Untersuchungen zeigen eine Co-Lokalisation von Hfq mit anderen Proteinen des RNA-Metabolismus in spiralförmigen Strukturen entlang der Zellperipherie (Taghbalout *et al.*, 2014). Die Lokalisation von Hfq an der bakteriellen Membran wird auch durch die Beobachtung gestützt, dass die Hfq-abhängige Regulation des *ptsG* Transkripts von der Membranlokalisierung der mRNA und der co-translationalen Translokation des Proteins

abhängig ist (Kawamoto *et al.*, 2005). Allerdings ist weiter ungeklärt, welche Faktoren zu einer spezifischen und möglicherweise dynamischen subzellulären Lokalisation von Hfq beitragen.

1.3.4 Hfq und sRNAs in Cyanobakterien

Die Sequenzen bekannter Hfq-Homologe aus Cyanobakterien sind intern hoch konserviert, unterscheiden sich aber substantiell von den Sequenzen anderer bakterieller Hfq Proteine (Valentin-Hansen *et al.*, 2004). Die Auflösung der Kristallstruktur von Hfq aus *Synechocystis* und *Nostoc* sp. PCC 7120 zeigte jedoch, dass die cyanobakteriellen Hfq-Proteine eine klassische Sm-Faltung aufweisen und die typische homohexamere Ringstruktur eingehen (Bøggild *et al.*, 2009). Die elektrochemischen Eigenschaften der Proteinoberfläche und insbesondere der proximalen RNA-Bindungstasche von *Synechocystis* Hfq unterscheiden sich wiederum von den Eigenschaften der bisher untersuchten Hfq-Proteine. Weiterhin bindet das Protein bekannte Hfq-bindende sRNAs aus Enterobakterien nur mit sehr geringer Affinität und ist nicht geeignet, eine *E. coli hfq* Mutante zu komplementieren (Bøggild *et al.*, 2009). Die erste umfassende Analyse der Funktion von Hfq in einem Cyanobakterium wurde von Dr. Dennis Dienst in dem Modellorganismus *Synechocystis* durchgeführt (Dienst *et al.*, 2008; Dienst, 2010). Auffälliges Merkmal einer Δhfq -Mutante waren die Abwesenheit der T4P und die Abnahme der *thin pili* an der Zelloberfläche sowie der damit einhergehende Verlust der phototaktischen Motilität und natürlichen Kompetenz (Abb. 6 a, b). Darüber hinaus konnte durch Microarray-Analysen eine veränderte, zumeist reduzierte Transkriptakkumulation von 31 mRNAs in der Δhfq -Mutante nachgewiesen werden. Darunter befanden sich die Transkripte des *slr2015-slr2018* Operons (PilA9-PilA11) sowie weitere Transkripte, die durch den cAMP-abhängigen Transkriptionsfaktor Sycr1 kontrolliert werden und damit einen direkten Bezug zur Motilität (nicht aber zur Pilusbiogenese) haben (vgl. 1.2.4). Außerdem wurden durch ein *tilingarray* zwei Hfq-abhängige putative sRNAs (Hpr1 und Hpr3) identifiziert, deren Akkumulation und im Fall von Hpr3 auch Prozessierung Hfq-abhängig sind (Abb. 6 c). Zwar konnte in einem Gelshift-Experiment eine Interaktion zwischen Hpr3 und Hfq nachgewiesen werden, deren Affinität lag aber um mehrere Größenordnungen unter der Affinität bekannter sRNA-Hfq Interaktionen aus *E. coli*. Die Untersuchung von $\Delta hpr1$

und $\Delta hpr3$ Deletionsmutanten bzw. einem Hpr3 Überexpressor legen aber nahe, dass sie nicht an der Regulation der Motilität und Pilusbiogenese beteiligt sind (teilweise unveröffentlichte Daten). Auch eine anderweitige Funktion dieser sRNAs ist nicht bekannt. Neben den beiden genannten Hprs sind in den letzten Jahren viele weitere sRNAs in *Synechocystis* identifiziert worden (Georg *et al.*, 2009; Voss *et al.*, 2009; Mitschke *et al.*, 2011). An welchen Regulationsvorgängen diese beteiligt sind und inwieweit Hfq dabei eine Rolle spielt, ist aber weitgehend ungeklärt.

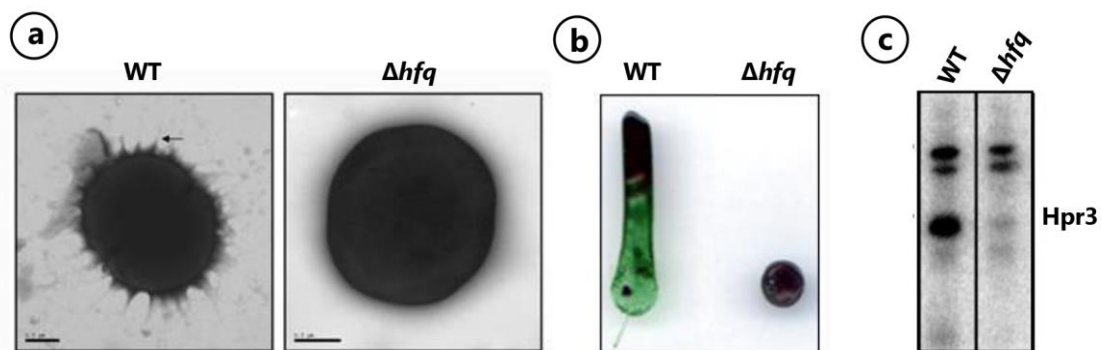


Abb. 6: Phänotyp einer Δhfq Mutante von *Synechocystis*. (a) Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von negativkontrastierten Zellen zeigen den Verlust der T4P an der Zelloberfläche der Δhfq Mutante (schwarzer Balken = 0,5 μm). (b) Der Verlust der phototaktischen Motilität im Δhfq Stamm lässt sich in einem Phototaxis-Assay nachweisen (c) Die veränderte Transkriptakkumulation der sRNA Hpr3 im Northern Blot (Abb. a, c: modifiziert nach Dienst (2010)).

Die einzige weitere funktionelle Analyse eines cyanobakteriellen Hfq-Homologs erfolgte in dem filamentösen, stickstofffixierenden Cyanobakterium *Nostoc* sp. PCC7120. In diesem Stamm ist Hfq an der Regulation der Stickstoffassimilation beteiligt und die Deletion von *hfq* führte im Gegensatz zum Wildtyp (hiernach WT) zu einer Differenzierung von Heterozysten¹¹ in Anwesenheit von Nitrat (Puerta-Fernández und Vioque, 2011). Im Vergleich zu den weit reichenden Effekten einer Inaktivierung von *hfq* in vielen anderen Bakterien, zeigen Δhfq Mutanten in Cyanobakterien nur zu relativ geringen phänotypischen Veränderungen. Insgesamt ist es daher fraglich, inwieweit Hfq innerhalb der Cyanobakterien eine zentrale Rolle für die posttranskriptionelle Genregulation spielt und ob die Fähigkeit zur RNA-Bindung konserviert ist.

¹¹ Differenzierte Zellen innerhalb eines Filaments, die auf die Fixierung von molekularem Stickstoff spezialisiert sind.

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Die bisherigen Studien zur Funktion des RNA-Chaperons Hfq in *Synechocystis* legten nahe, dass die phototaktische Motilität bzw. die Pilusbiogenese der T4P in diesem Organismus durch einen Hfq-abhängigen posttranskriptionellen Regulationsmechanismus gesteuert wird. Es war allerdings nicht bekannt, welche regulatorischen sRNAs daran beteiligt sind. Ebenso wenig war geklärt, welche Ziel-Gene eines solchen Regulationsprozesses letztendlich den Verlust der T4P verursachen.

Ausgangspunkt dieser Arbeit war daher die Analyse eines Transkriptom-weiten Microarrays zur Detektion von Hfq-abhängigen sRNAs, die den Einfluss von Hfq auf die phototaktische Motilität erklären können. Angesichts der atypischen Eigenschaften der putativen RNA-Bindestellen von *Synechocystis* Hfq stellte des Weiteren die Identifizierung von funktionellen AS ein zentrales Ziel dieser Arbeit dar. Dafür wurden verschiedene Hfq-Varianten mit AS-Austauschmutationen charakterisiert.

Weiterhin wurde nach möglichen Protein-Interaktionspartnern von Hfq gesucht, da nicht auszuschließen war, dass solche einen entscheidenden Einfluss auf die Hfq-Funktion haben. Dabei konnte eine Assoziation von Hfq mit der Sekretions-ATPase PilB1 nachgewiesen werden. In Folge dessen sollten die funktionelle Relevanz dieser Interaktion, sowie ihr Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation von fluoreszenzmarkierten Hfq-Varianten genauer untersucht werden.

2 Material & Methoden

2.1 Verwendete Materialien

2.1.1 Chemikalien und Geräte

Für alle Puffer und Lösungen wurde ausschließlich Wasser (H₂O) verwendet, welches durch ein *Milli-Q Integral Water Purification System* von MERCK MILLIPORE (Darmstadt) gereinigt wurde. Soweit nicht gesondert angegeben, wurden die verwendeten Chemikalien und Reagenzien von den Firmen CARL ROTH (Karlsruhe) oder SIGMA-ALDRICH (Taufkirchen) bezogen. Die Namen und Bezugsquellen von Enzymen und Kits sind in den entsprechenden Unterkapiteln angegeben. Soweit dies notwendig erschien, werden dort auch die Namen, Spezifikationen und Bezugsquellen von Geräten und Verbrauchsmaterialien genannt. Es besteht eine große Wahrscheinlichkeit, dass genannte Unternehmen zum Zeitpunkt der Drucklegung von den Mutterkonzernen der deutschen Niederlassungen von GE HEALTHCARE (Solingen) oder THERMO FISCHER SCIENTIFIC (Schwerte) übernommen worden sind ;)

2.1.2 Software und Datenbanken

DNA und Proteinsequenzen einzelner Gene wurden von CyanoBase (www.genome.microbedb.jp/cyanobase) oder der Protein Knowledgebase (UniProt) (www.uniprot.org/) bezogen. Proteinstrukturen stammen aus der Protein Data Bank (PDB) (www.rcsb.org/pdb). Für genomweite Analysen wurde auf die die Integrated Microbial Genomes (IMG) bzw. die NCBI GenBank Datenbank zurückgegriffen. Verwendete Software ist in Tab. 1 aufgeführt und ihre Verwendung im Text vermerkt.

2.1.3 Mikroorganismen

Zu Beginn der Arbeit vorliegende *Synechocystis* Stämme und kommerziell erwerbliche *E. coli* und *Saccharomyces cerevisiae* (Hefe-) Stämme sind in Tab. 2 aufgeführt.

Tab. 1: Verwendete Software

Name	Adresse	Referenz
PyMOL	www.pymol.org/	The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5.0.4 Schrödinger, LLC
ConSurf	www.consurf.tau.ac.il/	Ashkenazy <i>et al.</i> (2010)
Phyre2	www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/	Kelley und Sternberg (2009)
BLAST	www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi	Altschul <i>et al.</i> (1990); Camacho <i>et al.</i> (2009)
HMMER	www.hmmerr.janelia.org/	HMMER 3.0, Howard Hughes Medical Institute, distributed under GPLv3
JalView	www.jalview.org/	Waterhouse <i>et al.</i> (2009)
ClustalW2	www.clustal.org/	Larkin <i>et al.</i> (2007)
InterPro	www.ebi.ac.uk/interpro/	Jones <i>et al.</i> (2014)
MEME	www.meme.nbcr.net/meme/	Bailey und Elkan (1994)

Tab. 2: Verwendete Mikroorganismen

Name	Beschreibung/relevanter Genotyp	Referenz
<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803		
WT	Motiler und durch natürliche Kompetenz transformierbarer Wildtyp Stamm, welcher ursprünglich von Prof. S. V. Shestakov (Lehrstuhl für Genetik, Staatliche Universität Moskau, Russland) zur Verfügung gestellt wurde	Kaneko <i>et al.</i> , 1996 Trautmann <i>et al.</i> , 2012
Δhfq	Insertionsmutante; <i>ssr3341</i> , Cm ^R	Dienst <i>et al.</i> , 2008
$\Delta ycf34$ x FLAG-ycf34	Insertionsmutante; <i>ssr1425</i> mit chromosomaler P _{petJ} -FLAG- <i>Ycf34</i> -Expressionskassette im pSK-Ort; Km ^R , Cm ^R	Wallner <i>et al.</i> 2012
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
PJ69-4a	<i>MATa trp1-901 leu2-3, 112 ura3-52 his-200 gal4Δ gal80Δ LYS2 :: GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2 :: GAL7-lacZ</i>	James <i>et al.</i> , 1996
PJ69-4α	<i>MATα trp1-901 leu2-3, 112 ura3-52 his-200 gal4Δ gal80Δ LYS2 :: GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2 :: GAL7-lacZ</i>	James <i>et al.</i> , 1996
<i>Escherichia coli</i>		
DH5α	<i>recA1, endA1, hsdR17(rk⁻, mk⁺), supE44, thi-1, gyrA96, relA, phoA (phi) 80d lacZ(ΔM15)Δ(lacZYA-argF) U1690</i>	Hanahan, 1983
J53 (RP4)	R ⁺ , <i>met, pro</i> (RP4: <i>Amp, Tc, Km, Tra⁺, IncP</i>)	Wolk <i>et al.</i> , 1984

2.1.4 Verwendete Plasmide

Zu Beginn dieser Arbeit vorliegende sowie kommerziell erwerbliche Plasmide sind in Tab. 3 aufgeführt.

Tab. 3: Verwendete Plasmide

Name	Beschreibung/relevanter Genotyp	Referenz
pJET1.2	<i>blunt</i> -Klonierungsvektor; Amp ^R	THERMO FISCHER S.
pUC4K	Klonierungsvektor; Amp ^R , Km ^R	Vieira und Messing (1982)
pDrive	TA-Klonierungsvektor; Amp ^R , Km ^R	QIAGEN
pDrive-hfq	pDrive-Derivat mit 1111bp <i>hfq</i> Insert; Amp ^R , Km ^R	Dienst <i>et al.</i> (2008)
pVZ321	mobilisierbarer <i>shuttle</i> -Vektor; IncQ, <i>mob</i> ⁺ , Km ^R , Cm ^R	Zinchenko <i>et al.</i> , 1999
pVZ321-Strep	pVZ321 Derivat mit <i>aadA</i> -Kassette in <i>Xba</i> I; IncQ, <i>mob</i> ⁺ , Km ^R , Cm ^R , Strep ^R	unveröffentlicht
pUR	pVZ321-Derivat für die P _{<i>petJ</i>} gesteuerte Expression von FLAG-Fusionsproteinen; IncQ, <i>mob</i> ⁺ , Km ^R , Strep ^R	Wiegard <i>et al.</i> (2013)
pSK9	Vektor für die chromosomale Integration einer P _{<i>petJ</i>} gesteuerte Expressionkassette; Cm ^R , Amp ^R	Kuchmina <i>et al.</i> (2012)
pSK9-Km	pSK9-Derivat mit <i>nptII</i> in <i>Eco</i> RI; Km ^R , Amp ^R	unveröffentlicht
pSDC01	pSK9-Derivat mit <i>oop</i> -Terminator in <i>Bgl</i> II; Cm ^R	Savakis <i>et al.</i> (2012)
pSK-FLAG-ycf34	pSK9-Derivat für die P _{<i>petJ</i>} gesteuerte Expression eines FLAG-Ycf34-Fusionsproteins; Km ^R , Amp ^R	Wallner <i>et al.</i> (2012)
pXG10-SF	Vektor mit <i>linker-gfp</i> Sequenz; Cm ^R	Corcoran <i>et al.</i> (2012)
pEYFP-His ₆ -Sp ^R	Expressionsvektor mit <i>eyfp</i> aus pEYFP (CLONETECH); Strep ^R , Km ^R	Birungi <i>et al.</i> (2010)
pGAD424	GAL4 Aktivierungsdomäne Vektor; GAL4(768–881)AD, <i>leu2</i> , Amp ^R	CLONETECH
pGBTK	GAL4 DNA-Bindedomäne Vektor; GAL4(1-147)DNA-BD, <i>trp1</i> , Km ^R	Yoshimura <i>et al.</i> (2004)

2.1.5 Synthetische Oligonukleotide

Synthetische Oligonukleotide wurden von SIGMA-ALDRICH, EUROFINS MWG OPERON (Ebersberg) oder GATC BIOTECH (Konstanz) bezogen und sind in Tab. 4 aufgeführt.

Tab. 4: Synthetische DNA-Oligonukleotide

Name	Sequence (5'→3')
DNA-Oligonukleotidsonden	
5S-rev	ACTTGGCATCGGACTATTGT
CRISPR1repeat	GTTTCAGTCCCGATCGCCGGGATTAGTAGAAGGAAAG
CRISPR1Spacer2	CTGATAGATCGTAGCGGAATGCTATGGGATGCCTTAGTT
CRISPR2 5Strich	TTAACGATTTGTTACGTACTGAAAACATAACAATAA
CRISPR2repeat	GTTTCAGTCCCTGACGGGGAAAAGAGGGTGTGAAC
CRISPR2Spacer6	TTGTCGAGCTTAGTAGTGTGGTTTCTTTGCCGGATAACG
CRISPR3repeat	AGGTTTCCAATCAATTAATTTCTCTACGAGTGGAGAC
CRISPR3Spacer15	AACCAAAATGAGTTAATCTATCACGCATATTAATTTAAT
<i>in vitro</i> Transkriptsonden	
Hpr11-P-fw	ATGAGGGCAGGATTCAAAAA
Hpr11-rev-T7	TAATACGACTCACTATAGGGTTCGGAAACTAACCTGTGC
Hpr3Y-fw	GAAATTCGGGATGTTTT
Hpr3-rev-T7	TAATACGACTCACTATAGGGGCACAACGAAGGCTTGCCGA
Hpr8-P-fw	TTCTAGGATGGGACTGTGC
Hpr8-rev-T7	TAATACGACTCACTATAGGGTCCAAGGCCTAGAAGCAAAA
slr1667-fw	CCCTAGTCGGTTTTGGCTCT
slr1668-rev-T7	TAATACGACTCACTATAGGGGGCACTTGTTCGGCAATAAT
ssr2848-fw	GCCCTCAAGCGGAAAATTAC
ssr2848-rev-T7	TAATACGACTCACTATAGGGATCGATAGGCGACGGACATA
Klonierungen	
M13-fw	GAGCGGATAACAATTTACACAGG
M13-rev	GCCAGGGTTTTCCCAGTCACGA
a44g	CAGTGTCCGCAAGTACGGCTTTTGATCAAGGATC
a44g_as	GATCCTTGATCAAAGCCGTACTTGGCGGACACTG
g91a_g92a_g93c	GTGGAAATCAAACACTAACAACGAACGATTCCCTCTTCGGCACCATT
g91a_g92a_g93c_as	AATGGTGCCGAAGAGGGAATCGTTTCGTTAGTAGTTTGATTTCCAC
a127g_c128a	CACCATTCGTTGGCAAGATGACGATGGCCTAGGGCTA
a127g_c128a_as	TAGCCCTAGGCCATCGTCATCTTGCCAACGAATGGTG
g130a_t132a	TCGTTGGCAAGATACCAAAGGCCTAGGGCTAGTCG
g130a_t132a_as	CGACTAGCCCTAGGCCTTTGGTATCTTGCCAACGA
hfq-EcoRI-fw	CAGAATTCAGCAGATTTGATAGC
hfq-BamHI-rev	GAGGATCCCTAACGGCGGGGAG
hfq-NdeI-fw	GCATATGAGCAGATTTGATAGCGGA

Name	Sequence (5'→3')
hfq-BglII-rev	GAGATCTTTCTTGGATGCTCATGGG
FLAG-fw	TATGGATTATAAAGATCATGATGGCGATTATAAAGATCATGATATTGAT-TATAAAGATGATGATGATAAAGG
FLAG-rev	TACCTTTATCATCATCATCTTTATAATCAATATCATGATCTT-TATAATCGCCATCATGATCTTTATAATCCA
synHfq_Ec_f	GCGAATTCATGAGCAGATTTGATAGC
synHfq_Ba_r	GCGGATCCCTAACGGCGGGGAGTAATG
synPilB_Sm_f	GCCCCGGGGATGACATCTTCCTCCTC
synPilB_366_Ps_r	GCCTGCAGTTACCGGGCGGCCAATTCCC
synPilB_367_Sm_f	GCCCCGGGGCCCTATGGCTTAATGTTGG
synPilB_Ps_r	GCCTGCAGTTAGCTAAACCGGGAAGTC
synPilB_633_Sm_f	GCCCCGGGGACCGACTGGAGTCAGAAATGCG
synPilB_A1-r	CAGCCGTACGAGCGGTTAAAGCACTC
synPilB_A1-f	CCGCTCGTACGGCTGCGGCGGAACTGC
synPilB_A2-r	ATGGCATAGGGAGCATCAAGCCATTCC
synPilB_A2-f	GATGCTCCCTATGCCATGACTTCCCGG
hfqYFPNde	CCATATGAGCAGATTTGATAGC
hfqYFPXho	CCTCGAGACGGCGGGGAGTAATG
eYFPXho	GCCTCGAGGTGAGCAAGGGCGAGGAG
eYFPBglII	GCAGATCTTTACTTGTACAGCTCGTC
NdeI-eYFP-fw	CACATATGGTGAGCAAGGGC
eYFP-EcoRI-rev	GGAATTCCTTGTACAGCTCGTCCATG
hfq-Eco-fw	CAGAATTCAGCAGATTTGATAGC
hfq-BamHI-rev	GAGGATCCCTAACGGCGGGGAG
XhoI-L-sfGFP-fw	CTCGAGGGATCCGCTGGCTCCG
BglII-L-sfGFP-rev	AGATCTTTATTTGTAGAGCTCATCCATGC
NdeI-pilB-fw	CATATGACATCTTCCTCCTCTTCC
XhoI-pilB-rev	CTCGAGGCTAAACCGGGAAGTCATGC
sycrp1-EcoRI-fw	ACTGCGGAATTCGGCACTAGTCCCCA
sycrp1-BamHI-rev	GCTGACGGATCCTCAGGAAATTAGATCTTC
sll1533-fw	GCTAAGCTTTCCAGCCAAAC
delta0845-BglII-rev	GACAGATTTCTCCGAGATCTATCGTTGAGGGGAAGATGG
delta0845-BglII-fw	TTCCCCTCAACGATAGATCTCGGAGGAAATCTGTCCCCTA
sll0823-rev	TGCTGGGACTAATGGGGATA

2.2 Kultivierungsbedingungen und Medien

2.2.1 Kultivierung von *Synechocystis*

Die Kultivierung von *Synechocystis* erfolgte bei 30°C in BG11-Flüssigmedium (Rippka *et al.*, 1979) unter Zusatz von 10 mM TES-Puffer (pH 8,0). Wenn nicht anders angegeben wurden die Kulturen im Erlenmeyerkolben unter ständigem Schütteln (150 rpm) bei einer konstanten Belichtung mit Weißlicht von ca. 50 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ angezogen (Leuchtmittel: Phillips MASTER TL-D Super 80 18W/840 oder Osram EL40 SS W/37). Für Versuche mit Stämmen, die ein rekombinantes Genprodukt unter Kontrolle des Cu^{2+} -reprimierbaren *petJ* Promotors exprimieren sollten, wurde CuSO_4 -freies BG11 Medium verwendet. Die Selektion von Mutanten und die Stammhaltung erfolgte in Zellkulturschalen auf BG11-Festmedium (BG11, 0,75 % (w/v) Agar, 0,15 % (w/v) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$). Entsprechend der in den verschiedenen *Synechocystis* Mutanten verwendeten Selektionsmarker wurden den Medien Antibiotika in folgenden Konzentrationen beigemischt: 40 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Kanamycin (Km), 7 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Chloramphenicol (Cm), 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Streptomycin (Strep), 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Zeomycin (Zeo). Für die Stammsammlung wurden alle neu generierten Stämme in 1 ml Kryomedium (0,5x BG11, 8 % (v/v) DMSO) resuspendiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

BG11-Kulturmedium (autoklaviert)

10 ml l⁻¹ 100 x BG11-Stammlösung
 1 ml l⁻¹ Na_2CO_3 Stammlösung
 1 ml l⁻¹ $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3 \text{ H}_2\text{O}$ Stammlösung
 1 ml l⁻¹ Fe (III) $(\text{NH}_4)_2$ -Citrat Stammlösung
 1 ml l⁻¹ Spurenelemente-Mix
 10 ml l⁻¹ TES-Puffer (pH 8,0)

Spurenelemente-Mix (sterilfiltriert)

2,86 g l⁻¹ H_3BO_3
 1,81 g l⁻¹ $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$
 0,222 g l⁻¹ $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$
 0,390 g l⁻¹ $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$
 0,079 g l⁻¹ $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$
 0,049 g l⁻¹ $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$

100 x BG11-Stammlösung (autoklaviert)

25 mM $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$
 3 mM $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ (Zitronensäure)
 1,77 M NaNO_3
 30 mM $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$
 0,3 mM Na_2 -EDTA

Weitere Stammlösungen

190 mM Na_2CO_3 (autoklaviert)
 180 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3 \text{ H}_2\text{O}$ (autoklaviert)
 30 mM Fe (III) $(\text{NH}_4)_2$ -Citrat (sterilfiltriert)
 1 M TES-Puffer (pH 8,0)

Antibiotika-Stammlösungen (sterilfiltriert)

40 mg ml ⁻¹	Kanamycin
7 mg ml ⁻¹	Chloramphenicol (in Ethanol)
10 mg ml ⁻¹	Streptomycin
10 mg ml ⁻¹	Zeomycin

2.2.2 Kultivierung von *E. coli*

E. coli Kulturen wurden in *lysogeny broth* Medium (LB) nach Lennox (CARL ROTH) bei 37°C kultiviert. Die Anzucht erfolgte entweder als Flüssigkultur unter ständigem Schütteln (220 rpm) oder auf LB-Festmedium (LB, 1,5 % Agar) im Brutschrank. Entsprechend der plasmid-kodierten Resistenzen wurden den Medien Antibiotika in den nachfolgend genannten Konzentrationen beigemischt: 20 µg ml⁻¹ Km, 24 µg ml⁻¹ Cm, 20 µg ml⁻¹ Strep, 100 µg ml⁻¹ Ampicillin (Amp).

Antibiotika-Stammlösungen (sterilfiltriert)

20 mg ml ⁻¹	Kanamycin
24 mg ml ⁻¹	Chloramphenicol (in Ethanol)
20 mg ml ⁻¹	Streptomycin
100 mg ml ⁻¹	Ampicillin (in 50 % Ethanol)

2.2.3 Phototaxis-Assay

Motilität und phototaktisches Verhalten verschiedener *Synechocystis* Mutanten wurde auf modifiziertem BG11-Festmedium (0,5 % (w/v) Agar, 0,2 % (w/v) Glukose, 10 mM TES, 0,15 % (w/v) Na₂S₂O₃) in einem Lichtgradienten untersucht. Dafür wurden jeweils 3 µl Zellsuspension in gleichmäßigen Abständen auf eine quadratische BG11 Platte aufgetropft und nach 2-3 d Inkubation unter diffusem Weißlicht ($\sim 50 \mu\text{E m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) für 7-10 d unidirektional belichtet ($< 5 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). Die entsprechenden Lichtverhältnisse wurden erreicht, indem die Platten in einer intransparenten Box mit einer einzelnen seitlichen Öffnung verpackt wurden.

2.3 Molekularbiologische Methoden

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

Plasmid-DNA für Klonierungsexperimente wurde durch die alkalische Lyse nach Birnboim und Doly (1979) gewonnen. Zellen einer 5 ml Übernachtskultur wurden durch Zentrifugation (10 min, 3500 g, 4°C) geerntet, in 350 µl Puffer P1 resuspendiert und in ein Eppendorfggefäß überführt. Die alkalische Lyse erfolgte durch Zugabe von 350 µl Puffer P2 und vorsichtigem Mischen. Nach 5 min Inkubation bei RT wurden die Ansätze durch 350 µl Puffer P3 neutralisiert und 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden chromosomale DNA und Proteine abzentrifugiert (15 min, 16.000 g, 4°C), der Überstand in ein neues Eppendorfggefäß überführt und die Plasmid-DNA durch Zugabe von 0,7x Volumen Isopropanol bei -20°C für 2h gefällt. Die Plasmid-DNA wurde durch 30 min Zentrifugation bei 4°C und 16.000 g sedimentiert, mit 500 µl eiskaltem 75 %igem Ethanol gewaschen und erneut abzentrifugiert (5 min, 16.000 g, 4°C). Das erhaltene DNA-Pellet wurde anschließend bei RT getrocknet, in 30 bis 50 µl H₂O resuspendiert und bei -20°C gelagert. Für die Präparation größerer Mengen von *low-copy* Plasmiden auf Basis des pVZ-Vektors wurden mehrere Ansätze parallel verarbeitet, die gewonnene Plasmid-DNA anschließend vereinigt und durch eine erneute Isopropanolfällung aufkonzentriert.

Puffer P1 (pH 8,0)

50 mM Tris-HCl; 10 mM Na₂EDTA; 100 µg ml⁻¹ RNase A

Puffer P2

200 mM NaOH; 1 % (w/v) SDS

Puffer P3 (pH 5,5)

Kaliumacetat 3 M

2.3.2 Transformation von *E. coli*

Im Rahmen der verschiedenen Klonierungsstrategien wurden neu generierte Plasmide mittels Hitzeschock in chemisch kompetente *E. coli* DH5α Zellen eingeführt. Hierfür wurde der vollständige Ligationsansatz (siehe 2.3.7) mit 200 µl frisch auf Eis aufgetauten, chemisch kompetenten Zellen (nach der Methode von Hanahan (1983)) gemischt und nach 15 min Inkubation für 2 min einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt. Nach weiteren

5 min auf Eis wurden die Zellen in 0,8 ml LB-Medium bei 37°C inkubiert. Die Inkubationsdauer für *high-copy* Plasmide betrug 45 min, für *low-copy* Plasmide hingegen 90 min. Anschließend wurden 100 µl der Kultur auf LB-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht (ü.N.) inkubiert. Transformanten wurden auf neue LB-Platten überimpft und mittels Colony-PCR (siehe 2.3.5) bzw. Restriktionsanalyse (siehe 2.3.6) überprüft.

2.3.3 Transformation von *Synechocystis*

Für die Transformation von *Synechocystis* nach Grigorieva und Shestakov (1982) wurden 10 ml einer exponentiell wachsenden Flüssigkultur ($OD_{750nm} \sim 0,6-0,8$) durch Zentrifugation für 5 min bei 3000 g und RT geerntet und zusammen mit 1 µg Plasmid-DNA in ca. 100 µl des Überstands resuspendiert. Nach 4 h Inkubation bei RT unter indirektem Tageslicht wurden die Zellen auf BG11-Festmedium ausplattiert und für 2 d bei 30°C unter Weißlicht ($\sim 40 \mu E m^{-2} s^{-1}$) inkubiert. Anschließend wurden am Rand der Zellkulturschale 400 µl des selektiven Antibiotikums mit 1/5 der unter 2.2.1 angegebenen Standardkonzentration unter das Medium gegeben. Sobald nach 10-15 d Transformanten entlang eines schmalen Bandes optimaler Antibiotikumkonzentration sichtbar wurden, wurden diese sukzessiv auf BG11-Festmedium mit steigender Antibiotikumkonzentration überimpft bis die Standardkonzentration erreicht wurde. Abschließend wurde die korrekte homologe Rekombination und vollständige Segregation der Mutante durch eine PCR bestätigt.

2.3.4 Konjugation von *Synechocystis*

Der Transfer von Plasmiden auf Basis des autonom replizierenden Vektors pVZ321 aus *E. coli* DH5a Stämmen in *Synechocystis* wurde über eine „Drei-Eltern-Kreuzung“ mit Hilfe des konjugativen Plasmids RP4 aus *E. coli* J53-RP4 durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden je 250 µl einer Übernachtskultur der beiden *E. coli* Stämme in 10 ml LB-Medium ohne Antibiotikum bei 37°C für 180 min vermehrt, durch Zentrifugation für 5 min bei RT und 1000 g geerntet und in 1 ml LB resuspendiert. Anschließend wurden die beiden *E. coli*- Stämme im Verhältnis 1:1 gemischt, erneut bei RT und 1000 g für 5 min abzentrifugiert, das Pellet in 100 µl LB aufgenommen und für 1 h bei 30°C ohne zu schütteln

inkubiert. Nach Zugabe von ca. 1 ml einer WT *Synechocystis*-Kultur (OD_{750nm} 0,6-1,0) zum *E. coli*-Ansatz wurde das Bakterienpellet bei RT und 1000 g für 5 min abzentrifugiert und in 30 μ l BG11 resuspendiert. Dieser Konjugationsansatz wurde auf eine HATF-Nitrocellulose Membran (SCHLEICHER & SCHÜLL, Dassel) aufgetropft, welche auf BG11/LB-Festmedium (BG11 mit 5 % (v/v) LB-Medium) auflag. Nach 2 d Inkubation bei 30°C unter Weißlicht ($\sim 40 \mu E m^{-2} s^{-1}$) wurden die Zellen mit 100 μ l BG11 vom HAFT-Filter gewaschen und Transkonjuganten auf BG11-Festmedium mit der Hälfte der unter 2.2.1 angegebenen Antibiotikakonzentration selektioniert. Nach ca. 2 Wochen wurden resistente Klone auf BG11-Platten mit normaler Antibiotikakonzentration überimpft.

2.3.5 Polymerase Chain Reaktion (PCR)

Die fehlerfreie Amplifikation von DNA für Klonierungen sowie die Amplifikation von PCR-Fragmenten ohne A-Überhang für die Synthese von RNA-Sonden mittels *in vitro* Transkription erfolgte durch Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase (THERMO FISCHER SCIENTIFIC) in 50 μ l Ansätzen. Alle anderen PCR-Reaktionen wurden mit Dream-Taq Polymerase (THERMO FISCHER SCIENTIFIC) in 20 μ l Ansätzen durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen wurden entsprechend der Schmelztemperatur der Primer, der erwarteten Länge des PCR Produkts und der verwendeten Polymerasen nach Angaben der Hersteller variiert. Für die Generierung von Mutationen durch „*error-prone-PCR*“ wurden zusätzlich die Mg^{2+} -Konzentration erhöht, die Nukleotidzusammensetzung verändert und dem Ansatz $MnCl_2$ zugesetzt (5 mM $MgCl_2$; 0,2 mM dATP und dGTP; 1 mM dCTP und dTTP; 0,3 mM $MnCl_2$; 5U Dream Taq). PCR-Produkte wurden für die weitere Verwendung mit Hilfe des *QIAquick PCR Purification Kits* (QIAGEN) nach Herstellerprotokoll gereinigt. Zur Überprüfung wurden die PCR-Produkte anschließend elektrophoretisch aufgetrennt und bei Bedarf für die weitere Verwendung extrahiert (siehe 2.3.8).

Zur Überprüfung transformierter Einzelkolonien, der so genannten „*colony PCR*“ wurden *E. coli* Zellen direkt zum Dream-Taq-Reaktionsansatz gegeben, während *Synechocystis* Zellen vorher für 5 min bei 98°C in H_2O lysiert und ein Aliquot des Lysats zum Reaktionsansatz pipettiert wurden.

2.3.6 Restriktionsverdau und Dephosphorylierung

Die Restriktion von DNA erfolgte mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen (THERMO FISCHER SCIENTIFIC). Wenn nicht anders angegeben wurde $\sim 1 \mu\text{g}$ DNA unter Verwendung der vom Hersteller angegebenen Puffer, Enzymmengen und Reaktionsbedingungen in $20 \mu\text{l}$ Reaktionsansätzen für 2 h inkubiert. Um die Rezirkulierung einfach geschnittener Plasmid-Vektoren zu verhindern, wurden diese unter Verwendung von Calf Intestinal Alkaline Phosphatase oder FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (beide THERMO FISCHER SCIENTIFIC) dephosphoryliert. Dazu wurden den Herstellerangaben entsprechende Mengen Enzym direkt in den Restriktionsansatz pipettiert und das Enzym anschließend durch 5-minütiges Erhitzen auf 75°C inaktiviert. DNA-Fragmente wurden anschließend mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und für die weitere Verwendung extrahiert (siehe 2.3.8).

2.3.7 Ligation von DNA

Die Ligation von DNA-Fragmenten in Plasmidvektoren erfolgte mit T4-DNA-Ligase (THERMO FISCHER SCIENTIFIC). Hierzu wurden 25-100 ng Plasmid DNA und die 5-fache molare Menge *insert*-DNA zum Reaktionsansatz (2,5 U T4-DNA-Ligase, 1x T4-DNA-Ligase Reaktionspuffer, ad $20 \mu\text{l}$ H_2O) hinzugegeben und bei 4°C ü.N. inkubiert. Die Ligation von PCR-Produkten in den Klonierungsvektor pJET1.2 erfolgte mit dem *CloneJET PCR Cloning Kit* (THERMO FISCHER SCIENTIFIC) nach Angaben des Herstellers.

2.3.8 Gelelektrophorese und Extraktion von DNA

Für die elektrophoretische Auftrennung von DNA wurden horizontale Agarosegele gegossen. Für DNA-Fragmente $>250 \text{ bp}$ wurden 0,8 % (w/v) Agarosegele und für kleinere DNA-Fragmente 3 % (w/v) NuSieve Agarosegele mit 1x TAE-Puffer und $0,2 \mu\text{g ml}^{-1}$ Ethidiumbromid gegossen. Nach dem Zusatz von 1x Ladepuffer erfolgte die Auftrennung in 1x TAE-Puffer bei einer konstanten Spannung von $5-10 \text{ V cm}^{-1}$ in horizontalen PerfectBlue Gelkammern (PEQLAB). Als Größenstandard diente eine *GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder* oder eine *GeneRuler Ultra Low Range DNA Ladder* (beide THERMO FISCHER SCIENTIFIC). Die Auftrennung wurde unter UV-Licht mit einem DeVision G Geldoku-

mentationssystem (DECON) analysiert, und DNA-Fragmente wurden bei Bedarf mit einem Skalpell ausgeschnitten, mit einem *QIAEX II Gel Extraction Kit* (QIAGEN) aus dem Gel extrahiert und in 30 µl H₂O aufgenommen.

50x TAE buffer (pH 8,3)

2 M TRIS; 1 M Essigsäure; 50 mM EDTA

6 x Ladepuffer

30 % (v/v) Glycerol; 0,25 % (w/v) Bromphenolblau; 0,25 % (w/v) Xylencyanol; 1 mM EDTA

2.4 Klonierungsstrategien & Konstruktion von Plasmiden

2.4.1 pVZ-hfq#AA

Die Konstruktion von Hfq-Varianten mit zielgerichteten AS-Austauschmutationen (Q15R, G31N, T43D, D44K) basierte auf der *overlap-extension*-PCR Methode (Ho *et al.*, 1989). Als Matritze diente der Vektor pDrive-hfq, der ein 1111bp DNA-Fragment mit dem *hfq* ORF und den angrenzenden Promotor- und Terminatorregionen enthielt (Tab. 3). Zunächst wurden in zwei separaten PCR-Reaktionen mit jeweils einem vektorspezifischen Primer (M13-fw bzw. M13-rev) und einem genspezifischen Primer, welcher die gewünschte Mutation enthielt (Q15R: a44g, a44g_as; G31N: g91a_g92a_g93c, g91a_g92a_g93c_as; T43D: a127g_c128a, a127g_c128a_as, D44K: g130a_t132a, g130a_t132a_as), die entsprechenden Nukleotid-Triplets mutiert. Anschließend wurden beide PCR-Produkte in einer dritten PCR-Reaktion mit den Primern M13-fw und M13-rev fusioniert. Das resultierende PCR-Fragment wurde in den Klonierungsvektor pJET1.2 subkloniert und zur Überprüfung sequenziert. Ein DNA-Fragment mit dem mutierten *hfq* Gen und den flankierenden Bereichen wurde mit den Restriktionsendonukleasen *Pst*I und *Sal*I aus dem pJET1.2-Vektor ausgeschnitten und den ebenso geschnittenen, konjugativen Vektor pVZ321 ligiert. Die resultierenden Plasmide (pVZ-hfqQ15R; pVZ-hfqG31N; pVZ-hfqT43D; pVZ-hfqD44K) wurden durch Konjugation in einen *Synechocystis* Δ *hfq*-Stamm transferiert und Exkonjuganten auf BG11-Festmedium mit Kanamycin selektioniert.

2.4.2 pUR-hfq#AA

Für die Generierung von zufälligen Nukleotidaustauschen innerhalb der kodierenden Sequenz von *hfq* wurde diese aus chromosomaler DNA durch eine *error-prone*-PCR (vgl. 2.3.5) mit den Primern hfq-EcoRI-fw und hfq-BamHI-rev amplifiziert. Die (mutierten) PCR-Produkte wurden in den Klonierungsvektor pJET1.2 subkloniert. Anschließend wurde Plasmid-DNA aus allen resultierenden *E. coli* Klonen in einem einzigen Ansatz isoliert und mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *BamHI* verdaut. Die Ligation des *hfq*-kodierenden Fragments in den ebenfalls *EcoRI* und *BamHI* geschnittenen Expressionsvektor pUR (Tab. 3) führte zu einer Plasmid-Bibliothek (pUR-*hfq*#AA), in welcher zufällig mutierte *hfq*-Sequenzen am 5'-Ende von einer 3xFLAG-Sequenz und dem kupfersensitiven *petJ*-Promotor und am 3'-Ende vom *oop*-Terminator des λ Phagen flankiert wurden.

2.4.3 pSK-FLAG-hfq

Für die Co-Immunopräzipitation von Hfq-Interaktionspartnern wurde eine FLAG-Hfq Expressionskassette in einen neutralen Ort des *Synechocystis* Δhfq -Stammes inseriert. Dafür wurde die kodierende Sequenz von *hfq* inkl. des 200 bp stromabwärts gelegenen Bereichs durch die Primer hfq-NdeI-fw und hfq-BglII-rev amplifiziert und in den Klonierungsvektor pJET1.2 subkloniert. Anschließend wurde das Fragment mit den Restriktionsendonukleasen *NdeI* und *BglII* aus dem pJET1.2-Vektor ausgeschnitten und in den ebenso geschnittenen, integrativen Vektor pSK9-Km (Tab. 3) ligiert. Nachfolgend wurden Aliquots der Oligonukleotide FLAG-fw und FLAG-rev gemischt, durch 5 min Erhitzen und langsames Abkühlen auf RT hybridisiert und in den mittels *NdeI* linearisierten pSK-hfq Vektor ligiert (pSK-FLAG-hfq). Dieses Konstrukt wurde sequenziert, mittels Elektroporation (Thiel und Poo, 1989) in die *Synechocystis* Δhfq Mutante transferiert und resultierende Klone wurden auf BG11-Festmedium mit Km selektioniert.

2.4.4 pVZ-eYFP-Hfq und pVZ-Hfq-eYFP

Für Lokalisationsstudien wurde Hfq mit dem *enhanced Yellow Fluorescent Protein* (eYFP) fusioniert. Für die C-terminale Fusion von eYFP an Hfq wurde *hfq* mit den Primern hfqYFPNde und hfqYFPXho aus chromosomaler DNA von *Synechocystis* und *eyfp* mit

den Primern eYFPXho und eYFPBglII aus dem Plasmid pEYFP-His₆-Sp^R (Tab. 3) amplifiziert und in den Klonierungsvektor pJET1.2 subkloniert. Anschließend wurden nacheinander das *eyfp*-Fragment über die angefügten *XhoI* und *BglII*-Restriktionsschnittstellen und das *hfq*-Fragment über die angefügten *NdeI* und *XhoI*-Restriktionsschnittstellen ausgeschnitten und in den pSK9 basierten Expressionsvektor pSDC01 (Tab. 3) ligiert. Die Expressionskassette mit der *hfq-eyfp* Fusion unter Kontrolle des *petJ*-Promotors wurde mit der Restriktionsendonuklease *PvuII* ausgeschnitten und in eine *SmaI*-Schnittstelle des konjugativen Vektors pVZ321-Km (Tab. 3) ligiert (pVZ-Hfq-eYFP). Für die N-terminale Fusion wurde *hfq* mit den hfq-Eco-fw und hfq-BamHI-rev und *eyfp* mit den Primern NdeI-eYFP-fw und eYFP-EcoRI-rev amplifiziert und in den Klonierungsvektor pJET1.2 subkloniert. Anschließend wurden nacheinander das *eyfp*-Fragment über die angefügten *NdeI* und *EcoRI*-Restriktionsschnittstellen und das *hfq*-Fragment über die angefügten *EcoRI* und *BamHI*-Restriktionsschnittstellen ausgeschnitten und in den entsprechend geschnittenen Expressionsvektor pUR (Tab. 3) ligiert (pVZ-eYFP-Hfq). Beide Konstrukte wurden durch Konjugation in verschiedene *Synechocystis* Stämme transferiert und Exkonjuganten auf BG11-Festmedium mit Strep selektioniert.

2.4.5 pVZ-hfq#AA-eYFP

Zur Untersuchung der Lokalisation der nicht funktionellen Hfq AS-Mutanten wurden zuerst die mutierten *hfq* Sequenzen mit den Primern hfqYFPNde und hfqYFPXho aus den entsprechenden Konstrukten (siehe 2.4.2) amplifiziert und in den Klonierungsvektor pJET1.2 subkloniert. Anschließend wurden nach dem unter 2.4.2 für die C-terminale eYFP-Fusion beschriebenen Verfahren vorgegangen und die Konstrukte (pVZ-hfq#AA-eYFP) nach der Überprüfung mittels Sequenzierung durch Konjugation in einen *Synechocystis* Δhfq -Stamm transferiert.

2.4.6 pSK-PilB1-sfGFP

Für Lokalisationsstudien wurde PilB1 mit dem *superfolder Green Fluorescent Protein* (sfGFP) fusioniert. Dafür wurde die *gfp* Sequenz inkl. eines 12 AS großen N-terminalen linker mit den Primern XhoI-L-sfGFP-fw und BglII-L-sfGFP-rev aus dem Plasmid pXG10-SF und die *pilB1* Sequenz mit den Primern NdeI-pilB-fw und XhoI-pilB-rev aus

chromosomaler *Synechocystis* DNA amplifiziert. Diese Fragmente wurden anschließend wie unter 2.4.4 beschrieben in den integrativen Expressionsvektor pSDC01 kloniert (pSK-PilB1-sfGFP).

2.4.7 pUR-FLAG-*sycrp1*

Für Komplementationsstudien wurde der Transkriptionsfaktor *Sycrp1* als FLAG-Fusionsprotein *in trans* überexprimiert. Dafür wurde *sycrp1* mit den Primern *sycrp1*-EcoRI-fw und *sycrp1*-BamHI-rev amplifiziert und in den Klonierungsvektor pJET1.2 subkloniert. Nach Verdau mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *BamHI* wurde das *sycrp1* Fragment in den ebenfalls *EcoRI* und *BamHI* geschnittenen Expressionsvektor pUR ligiert (pUR-FLAG-*sycrp1*). Das mittels Sequenzierung überprüfte Konstrukt wurde konjugativ in verschiedene *Synechocystis* Stämme transferiert.

2.4.8 prey-Plasmide für Y2H-Interaktionsstudien

Für die Y2H-Interaktionsstudien wurden WT Hfq wie auch die nicht-funktionellen Hfq-AS-Mutanten in voller Länge mit der Gal4-Aktivierungsdomäne fusioniert. Dafür wurde *hfq* aus chromosomaler DNA bzw. aus den entsprechenden Konstrukten (siehe 2.4.2) mit den Primern *hfq*-Eco-fw und *hfq*-BamHI-rev amplifiziert, in den Klonierungsvektor pJET1.2 subkloniert, über die angefügten *EcoRI* und *BamHI*-Restriktionsschnittstellen ausgeschnitten und in den entsprechend geschnittenen Vektor pGAD424 (Tab. 3) ligiert. Die Konstrukte wurden mittels Sequenzierung überprüft und zur Transformation des Hefestamms PJ69-4α (Tab. 2) genutzt (siehe 2.6.6).

2.4.9 bait-Plasmide für Y2H-Interaktionsstudien

Für die Y2H-Interaktionsstudien wurde WT Hfq wie auch verschiedene Domänen der Motor ATPase PilB1 mit der Gal4-DNA-Bindedomäne fusioniert. Dafür wurden *hfq* in voller Länge sowie die entsprechenden PilB1-Domänen mit geeigneten Primern aus chromosomaler DNA von *Synechocystis* amplifiziert (PilB1-N: *synPilB_Sm_f* und *synPilB_366_Ps_r*; PilB1-C: *synPilB_367_Sm_f* und *synPilB_Ps_r*; PilB1-C^{ZF}: *synPilB_633_Sm_f* und *synPilB_Ps_r*) und in den Klonierungsvektor pJET1.2 subkloniert.

Der Austausch der konservierten Cysteine in der PilB1-C2^{ZF} Domäne erfolgte durch Inverse PCR mit den Primern synPilB_A1-r und synPilB_A1-f sowie synPilB_A2-r und synPilB_A2-f. Die kodierenden Sequenzen wurden anschließend über die angefügten *Sma*I und *Pst*I-Restriktionsschnittstellen ausgeschnitten und in den entsprechend geschnittenen Vektor pGBTK (Tab. 3). Die Konstrukte wurden mittels Sequenzierung überprüft und zur Transformation des Hefestamms PJ69-4a (Tab. 2) genutzt (siehe 2.6.6).

2.4.10 Inaktivierung von *slr0845*

Die flankierenden 5'- und 3'-Bereiche des ORF *slr0845* wurden mit den Primern sll1533-fw und delta0845-BglII-rev bzw. delta0845-BglII-fw und sll0823-rev amplifiziert, via *overlap-extension*-PCR mit den Primern sll1533-fw und sll0823-rev fusioniert und in den TA-Klonierungsvektor pDrive kloniert. Anschließend wurde dieser über die *Bgl*II-Schnittstelle linearisiert und die *Bam*HI geschnittene Km-Resistenzkassette aus dem Vektor pUC4K in die Schnittstelle ligiert. Nach Überprüfung der Sequenz des Konstrukts (pDrive- Δ *slr0845*) wurde dieses durch Transformation in einen *Synechocystis* WT Stamm eingebracht.

2.4.11 Inaktivierung von *pilB1* und *pilC*

Für die Generierung der Insertionsmutanten Δ *pilB1* und Δ *pilC* wurde *Synechocystis* WT bzw. Δ *hfq* x Hfq-eYFP Stamm mit genomischer DNA aus *slr0063::zeo* oder *pilC::aadA* Mutanten des *Synechocystis*-Stamms GT transformiert. Diese DNA wurde von Roman Sobotka (Department of Phototrophic Microorganisms, Academy of Sciences, Trebon) bereitgestellt.

2.5 RNA-Methoden

Um eine Kontamination der Proben mit RNasen zu verhindern und einer möglichen autokatalytischen Degradierung der RNA entgegenzuwirken, wurden, wenn nicht anders angegeben, ausschließlich sterile, vorgekühlte Einweggefäße sowie Pipettenspitzen mit Filter und DEPC-behandeltes H₂O verwendet.

2.5.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus *Synechocystis*

Für die Extraktion von Gesamt-RNA wurde die PTGX-Methode von Pinto *et al.* (2009) leicht abgewandelt. Zunächst wurden Zellen aus ca. 30 ml Flüssigkultur mit ca. 0,7 Volumen Eis gemischt und abzentrifugiert (3.5000 g, 10 min, 4°C), in etwas Überstand resuspendiert und in einem 2 ml Reaktionsgefäß erneut abzentrifugiert (12.000 g, 5 sec, 4°C). Anschließend wurden die Zellen sofort in 1 ml PTGX durch ausgiebiges Vortexen aufgelöst und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Der weitere Zellaufschluss erfolgte durch Erhitzen auf 95°C für 10 min bei wiederholtem Vortexen. Nach 5 min Inkubation auf Eis wurde 100 µl 1-Bromo-3-chloropropan zugesetzt, erneut für 30 sec gevortext und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Phasentrennung durch Zentrifugation bei 4°C und 16.000 g für 10 min. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und die darin gelöste RNA durch die Zugabe von 1x Volumen eines Gemischs von in Wasser gesättigtem Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol (pH 4,5-5) im Verhältnis 25:24:1 und anschließender Zentrifugation bei 4°C und 16.000 g für 5 min nachextrahiert. Nach Zugabe von 1x Volumen Isopropanol zum wässrigen Überstand wurde die RNA für 2 h bei -20°C präzipitiert und das Präzipitat bei 4°C und 16.000 g für 30 min abzentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet mit 400 µl eiskaltem 75 % Ethanol gewaschen, erneut für 5 min zentrifugiert, der Überstand restlos entnommen und das Pellet nach kurzem Lufttrocknen in 30 µl H₂O resuspendiert.

2.5.2 Denaturierende Elektrophorese von RNA in Formaldehyd-Agarosegelen

Die elektrophoretische Auftrennung von Gesamt-RNA erfolgte in denaturierenden Agarosegelen (1,3 % (w/v) Agarose; 5 % (v/v) Formaldehyd-Lösung (37 %); 1x MEN-Puffer) bei einer konstanten Spannung von 5 V cm⁻¹ in 1x MEN-Puffer in einem PerfectBlue Gel-system (PEQLAB). Vor der Auftrennung wurden die RNA-Proben mit 1x RNA-Ladepuffer(+) versetzt und bei 95°C für 5 min denaturiert und 1 min auf Eis abgekühlt. Als Größenmarker diente eine RiboRuler High bzw. *Low Range RNA Ladder* (THERMO FISCHER SCIENTIFIC). Die Auftrennung wurde unter UV-Licht mit einem Geldokumentationssystem (siehe 2.3.8) analysiert.

10x MEN-Puffer (pH 7,0)

200 mM MOPS; 10 mM EDTA; 50 mM Natriumacetat

2x RNA-Ladepuffer(+)

2,5 % (w/v) SDS; 95 % (v/v) Formamid (deionisiert); 0,5 mM Na₂-EDTA; 0,1 % (w/v) Xylencyanol; 0,1 % (w/v) Bromphenolblau; 0,4 % (w/v) Ethidiumbromid

2.5.3 Denaturierende Harnstoff-PAGE von RNA

Für die Analyse von sRNAs und anderen kleinen Transkripten (<500nt) wurde Gesamt-RNA durch denaturierende Harnstoff-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) in einer vertikalen PerfectBlue Twin Gelapparatur (PEQLAB) aufgetrennt. Der Gellauf erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 10 mA in 1x TBE-Puffer. Vor der Auftrennung wurden die RNA-Proben mit 1x RNA-Ladepuffer(-) versetzt und bei 95°C für 5 min denaturiert und 1 min auf Eis abgekühlt. Als Größenstandard wurde eine *RiboRuler Low Range RNA Ladder* (THERMO FISCHER SCIENTIFIC) verwendet. Nach dem Lauf wurden die Gele 20 min mit Ethidiumbromid (0,2 µg ml⁻¹ in 0,5x TBE) gefärbt, überschüssiges Ethidiumbromid durch 10 min Waschen in 0,5x TBE wieder entfernt und die Auftrennung unter UV-Licht mit einem Geldokumentationssystem (siehe 2.3.8) analysiert.

Harnstoff-Polyacrylamidgel (10 ml)

1 ml 10x TBE-Puffer
 5 g Harnstoff
 2,5 ml Rotiphorese Gel 40 (19:1) (CARL ROTH)
 ad 9,9 ml ddH₂O
 100 µl APS
 10 µl TEMED

10x TBE

Rotiphorese 10x TBE Buffer (CARL ROTH)

2x RNA-Ladepuffer(-)

2,5 % (w/v) SDS; 95 % (v/v) Formamid (deionisiert); 0,5 mM Na₂-EDTA; 0,1 % (w/v) Xylencyanol; 0,1 % (w/v) Bromphenolblau

2.5.4 Northern Blot

Es wurden Aliquots der Gesamt-RNA wie oben beschrieben aufgetrennt und anschließend auf eine positiv geladene Hybond-N⁺ Nylonmembran (GE HEALTHCARE) transferriert. Der Transfer erfolgte für Agarosegele durch Kapillar-Blotting ü.N. mit 10x SSC als

Transferpuffer und für Polyacrylamidgele durch ein *Semi-Dry*-Verfahren mit einem PerfectBlue 'Semi-Dry'-Elektroblotter (PEQLAB). Für das *Semi-Dry*-Verfahren wurden Membran, Filterpapier und Gel für 10 min in 0,5x TBE-Puffer (siehe 2.5.3) äquilibriert und die RNA anschließend bei einer konstanten Stromstärke von 10 mA cm⁻² V für 45 min transferiert. Durch UV-Bestrahlung mit 120 mJ cm⁻² (CX-2000 Crosslinker; UVP) wurde die RNA mit der Membran quervernetzt.

10x SSC Puffer (pH 7,0)

1,5 M NaCl; 150 mM Natriumcitrat

2.5.5 Synthese radioaktiv markierter Sonden

Die Synthese der mit [α -³²P]dCTP radioaktiv markierten dsDNA-Sonden erfolgte mit dem *Rediprime II DNA Labeling Kit* (GE HEALTHCARE) nach Angaben des Herstellers. Für RNA-Sonden wurden, ebenfalls nach Herstellerangaben, *in vitro* Transkripte mit einem *MAXIscript T7 Kit* (GE HEALTHCARE) synthetisiert und mittels [α -³²P]UTP markiert. Als Matrize dienten DNA-Fragmente, welche mittels PCR aus genomischer *Synechocystis* DNA amplifiziert, elektrophoretisch aufgetrennt und aus dem Gel extrahiert wurden. Matrizen-DNA für die *in vitro* Transkription wurde dabei durch einen Überhang des reversen Primers während der Amplifikation eine T7-Promotor-Sequenz angefügt. In einigen Fällen wurden synthetisch hergestellte DNA-Oligonukleotide als Sonden eingesetzt. Dazu wurden 10 U T4 Polynukleotid Kinase (THERMO FISCHER SCIENTIFIC), 2 μ l 10x Puffer A, 3 μ l [γ -³²P]dATP und 2,5 μ l DNA-Oligonukleotid (10 μ M) in einem 20 μ l Reaktionsansatz für 30 min bei 37°C inkubiert und die Reaktion durch 1 μ l EDTA (0,5 M) gestoppt. Alle markierten Sonden wurden über Illustra MicroSpin G-25 Columns (GE HEALTHCARE) aufgereinigt, um nicht inkorporierte Nukleotide zu entfernen.

2.5.6 Northern Blot Hybridisierung

Die Hybridisierung der Northern Blot Membranen mit radioaktiv markierten Sonden erfolgte in Church-Puffer im Hybridisierungssofen unter ständiger Rotation. Dabei betrug die Temperatur für dsDNA- und RNA-Sonden 65°C und für DNA-Oligonukleotidsonden 45°C. Die unspezifisch gebundenen Sonden wurden durch stringentes Waschen mit

SDS/SSC-Puffer von den Membranen entfernt. Bei dsDNA- und RNA-Sonden für 15 min bei RT in Waschlösung I und anschließend bei 65°C für jeweils 15 min in Waschlösung I und II, bei DNA-Oligonukleotidsonden für 15 min bei RT in Waschlösung III und anschließend bei 45°C für jeweils 15 min in Waschlösung III und IV. Abschließend wurde die Membran in Plastikfolie eingeschweißt. Die Detektion der Hybridisierungssignale erfolgte mit einem Phosphoimager (Molecular Imager PharoFX System; Bio-Rad Laboratories) unter Verwendung der Software Quantity One (Bio-Rad Laboratories).

Church-Puffer (pH 7,2)

50 % (v/v) Formamid (deionisiert)
 7 % (w/v) SDS
 250 mM NaCl
 120 mM NaPO₄

Waschlösung I

0,5 % (w/v) SDS in 2x SSC

Waschlösung III

1 % (w/v) SDS in 2x SSC

Waschlösung II

0,1 % (w/v) SDS in 0,1x SSC

Waschlösung IV

0,5 % (w/v) SDS in 1x SSC

2.5.7 Microarray-Hybridisierung & Auswertung

Vor der Hybridisierung wurde Gesamt-RNA mit TURBO DNase (LIFE TECHNOLOGIES) nach Angaben des Herstellers behandelt. 3 µg RNA wurden anschließend mit 2,4 µl Cy3 und 2 µl Labeling Solution des *ULS labeling kit for Agilent gene expression arrays* (KREATECH) bei 85 °C für 15 min inkubiert und nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. 1,65 µg RNA mit einer Markierungseffizienz zwischen 2-3 % wurde daraufhin wie vom Hersteller für *4x44k one color microarrays* (AGILENT) vorgesehen fragmentiert und hybridisiert. Das Auslesen der Signale und die Datenerfassung erfolgten mit einem AGILENT G2565CA Microarray Scanner und der zugehörigen Feature-Extraktion Software. Die (Quantil-)Normalisierung der Medianwerte und statistische Auswertung der differentiellen Transkriptakkumulation erfolgte durch *Limma (linear models for microarray data)* mit der Software R nach einem Skript welches von Dr. Jens Georg (AG Hess, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg) zur Verfügung gestellt wurde.

2.6 Biochemische Methoden

2.6.1 Bestimmung des Chlorophyllgehalts

Die Bestimmung des Chlorophyllgehalts aus Zellextrakten erfolgte nach der Methode von MacKinney (1941). Hierfür wurde Chlorophyll aus 10 µl Extrakt in 990 µl 80 %igen Aceton (Verdünnungsfaktor = 100) durch 30 min Inkubation bei 4°C im Dunkeln extrahiert. Anschließend wurden unlösliche Bestandteile abzentrifugiert (16000 g, 5 min, 4°C) und die Absorption des Chlorophyll_a bei 665 nm (A_{665}) gegen eine 80 % (v/v) Aceton-Lösung vermessen. Die Berechnung des Chlorophyllgehalts erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Chlorophyll}_a [\mu\text{g ml}^{-1}] = A_{665\text{nm}} \cdot 100 / 86,86 \cdot 100 (\text{Verdünnungsfaktor})$$

2.6.2 Co-Immunopräzipitation von Hfq-Interaktionspartnern

Alle Puffer wurden auf Eis gekühlt und alle Schritte bei 4°C bzw. auf Eis durchgeführt. Es wurden jeweils 500 ml Flüssigkultur in Cu²⁺-freiem BG11-Medium unter Zusatz von 0,2 % Glukose und Begasung mit 5 % CO₂ (in Luft) in Photobioreaktoren („Blubberkolben“) angezogen. Nach mehrmaligem Verdünnen wurden die Zellen in der stationären Wachstumsphase (OD₇₅₀ ~ 3.0) durch Zentrifugation (3500 g, 10 min, 4°C) geerntet, in 10 ml CoIP-Puffer gewaschen, erneut zentrifugiert (3500 g, 10 min, 4°C) und das Zellpellet in 2x Volumen CoIP-Puffer resuspendiert, welchem ein Inhibitorcocktail (Protease- und RNase-Inhibitoren) zugesetzt wurde. 1 ml Aliquots der Zellsuspension wurden mit jeweils 800 µl Glasperlen (Ø = 0.1-0.11 mm und 0.25-0.5 mm im Verhältnis 1:1) in einer Schwingmühle (RETSCH) für 10 min bei 25.000 Hz aufgeschlossen und nach dem zweimaligen Abzentrifugieren (3000 g, 3 min, 4°C) der Zelltrümmer und Glasperlen wieder vereinigt. Nach Messung des Chlorophyllgehalts (siehe 2.6.1) wurde das Gesamtextrakt durch Zugabe von n-Dodecyl-β-D-Maltoside im Verhältnis 20:1 (Detergenz zu Chlorophyll) und Inkubation für 40 min auf Eis solubilisiert. Ab hier wurden Aliquots aller folgenden Schritte für die spätere Analyse in gleiche Volumina 2x SDS-Ladepuffer bzw. 1 ml IPGX aufgenommen. Die festen Bestandteile des Zellextrakts wurden durch Zentrifugation (16000 g, 30 min, 4°C) sedimentiert und das lösliche Extrakt mit 100 µl ANTI-FLAG M2 Affinity Gel (SIGMA-ALDRICH) in einem Rotator (18 rpm min⁻¹) bei 4°C für 2 h inkubiert. Die Affinitätsmatrix wurde anschließend durch Zentrifugation (800 g, 5 min, 4°C)

sedimentiert und dreimal mit 1 ml CoIP-Puffer gewaschen. Das gewaschene Pellet wurde in 200 µl H₂O aufgenommen und jeweils zur Hälfte in 100 µl 2x SDS-Ladepuffer bzw. 1 ml IPGX überführt. Die entnommenen Proteinproben wurden mittels SDS-PAGE analysiert (siehe 2.6.3), und aus den PGTX-Proben wurde RNA isoliert (siehe 2.5.1).

CoIP-Puffer (sterilfiltriert) (pH 7,0)

50 mM HEPES; 5 mM MgCl₂; 25 mM CaCl₂; 150 mM NaCl; 10 % (v/v); Glycerol; 0,1 % (w/v) Tween 20

Inhibitorcocktail

5 mg ml⁻¹ ε-Amino-n-capronsäure; 250 µg ml⁻¹ AEBSF; 625 µg ml⁻¹ p-Benzamidin-Hydrochlorid; 20 U ml⁻¹ RiboLock RNase Inhibitor (THERMO FISCHER SCIENTIFIC)

2.6.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde auf Basis des Tricin-Puffersystems nach Schägger (2006) oder des Glycin-Puffersystems nach Laemmli (1970) durchgeführt. Vor dem Auftragen wurden die Proteinproben mit 1x Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95°C oder im Falle von solubilisierten Zellextrakten für 40 min bei 50°C denaturiert und die Proteinaggregate abzentrifugiert (16000 g, 5 min, RT). Die Auftrennung in vertikalen Mini-PROTEAN Tetra Cell - Elektrophorese-Kammern (BIO-RAD) erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 20 mA (Schägger) oder einer konstanten Spannung von 150 V (Laemmli). Zur Abschätzung des apparenten Molekulargewichts wurden 8 µl Protein Marker VI (10-245) prestained (APPLICHEM) aufgetragen. Nach erfolgter Auftrennung wurden die Proteine entweder auf eine PVDF-Membran transferiert (siehe 2.6.4), oder die Gele wurden für 15 min in Fixierlösung (50 % (v/v) Ethanol; 10 % (v/v) Essigsäure) inkubiert, für 1 h in Coomassie-Lösung gefärbt, in 10 %iger Essigsäure entfärbt und mit Hilfe eines Scanners dokumentiert.

4x Probenpuffer

250 mM Tris/HCl (pH 6,8); 40 % (w/v) Glycerol; 8 % (w/v) SDS; 0,4 M DTT; 0,4 % (w/v) Bromphenolblau

Coomassie-Lösung

0,25 % (w/v) Coomassie blue R-250; 50 % (v/v) Methanol; 7,5 % (v/v) Essigsäure

2.6.4 Immunoblot-Analyse (Western-Blot)

Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden durch ein *Semi-Dry*-Verfahren mit einem PerfectBlue 'Semi-Dry'-Elektroblotter (PEQLAB) auf eine PVDF-Membran transferiert und dadurch immobilisiert. Dafür wurde die Membran für 2 min in Methanol aktiviert und nach zweimaligem Spülen mit H₂O genau wie auch Gel, Membran und Filterpapier für 10 min in den entsprechenden Puffern RotiBlot 1 (CARL ROTH) äquilibriert. Die Blotting-Apparatur wurde nach Herstellerangaben zusammengebaut und der Transfer bei konstant 5 V für 90 min durchgeführt. Anschließend wurden freien Bindestellen auf der PVDF-Membran durch Inkubation für 1 h in einer 5 %igen Milchpulverlösung in TBS-T abgesättigt und die Membran mit TBS-T gewaschen (3x 10 min, RT). Für den spezifischen Nachweis von FLAG-Fusionsproteinen wurde die Membran mit Anti-FLAG Antikörpern bei 4°C üN inkubiert und erneut gewaschen. HRP-gekoppelte Antikörper wurden direkt detektiert, während Membranen mit nicht-gekoppelte Antikörpern erneut gewaschen und mit einem sekundären Antikörper 1 h bei RT inkubiert wurden. Im Anschluss erfolgte die Entwicklung: Entweder mittels CheLuminate-HRP PicoDetect (APPLICHEM) Substraten nach Herstellerangaben, wobei Chemilumineszenz durch das kurzzeitige Belichten (ca. 1 min) eines Hyperfilm-Röntgenfilms (GE HEALTHCARE) detektiert wurde, andernfalls durch die chromogene Reaktion (10-30 min bei RT) der alkalischen Phosphatase mit 66 µl BCIP-Lösung und 115 µl NBT-Lösung in 10 ml AP-Puffer. Der Farbniederschlag wurde mit einem optischen Scanner dokumentiert.

TBS-T

100 mM Tris/HCl (pH 7,5); 150 mM NaCl; 0,1 % (w/v) Tween 20

HRP-gekoppelter FLAG-Antikörper

Monoclonal ANTI-FLAG M2-Peroxidase (HRP) antibody (SIGMA-ALDRICH) 1:3000 in TBS-T

FLAG-Antikörper

ANTI-FLAG antibody produced in rabbit (SIGMA-ALDRICH) 1:5000 in TBS-T

AP-gekoppelter sekundärer Antikörper

Anti-Rabbit IgG-Alkaline Phosphatase antibody produced in goat (SIGMA-ALDRICH) 1:20000 in TBS-T

BCIP-Lösung

10 mg ml⁻¹ BCIP in H₂O

NBT-Lösung

10 mg ml⁻¹ NBT in 70 % (v/v) DMF

AP-Puffer

100 mM Tris/HCl (pH 9,5); 100 mM NaCl; 5 mM MgCl₂

2.6.5 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Proteinkonzentrationen von Zellextrakten wurden nach der Methode von Lowry bestimmt. Dazu wurden zunächst Duplikate von je 5 µl Zellextrakt sowie bekannte Mengen von BSA (0-100 µg) in 1 ml H₂O verdünnt. Nach Zugabe von je Probe 25 µl 2 % DOC und 30 µl 40 % TCA wurden die Proteine durch Zentrifugation (16000 g, 10 min, 4°C) gefällt und in 1 ml frisch angesetzter Lösung C resuspendiert. Anschließend wurden die Proben mit 100 µl einer 1:1 Lösung von Folin & Ciocalteu's Phenol-Reagenz (CARL ROTH) in H₂O versetzt und die Absorption der Lösungen nach 45 min Inkubation bei RT im Dunklen bei 750nm bestimmt. Aus den gemittelten Absorptionswerten der Duplikate wurde mit Hilfe einer BSA-Eichgerade die Proteinkonzentration berechnet.

Lösung C

2 % K-Na-Tartat; 1 % CuSO₄ x 5H₂O; 0,1 M NaOH, 2 % Na₂CO₃

2.6.6 Protein-Interaktionsstudien mit dem Hefe-Zwei-Hybrid-System (Y2H)

Die Transformation der Hefestämme und die Spezifitätstests wurden von Dr. Satoru Watanabe (Department of Bioscience, Tokyo University of Agriculture, Japan) durchgeführt. Dazu wurden zunächst die haploiden Hefestämme entgegengesetzter Paarungstypen mit den entsprechenden Plasmiden nach der PEG/LiAc/ssDNA-Methode (Gietz *et al.*, 1995) unter Auslassung von 10 % DMSO transformiert (PJ69-4a mit pGBTK-basierten *bait*-Plasmiden, PJ69-4a mit den pGAD424-basierten *prey*-Plasmiden). Anschließend erfolgte die Paarung der Transformanden für 5 h bei 30°C auf YPAD-Festmedium (1 % Hefeextrakt, 2 % Pepton, 0.004 % Adeninsulfat, 2 % Glukose) und die Selektion diploider Zellen auf *synthetic complete* (SC) Festmedium ohne Leucin und Tryptophan (SC-LW) bei 30°C für 3-7 Tage (Amberg *et al.*, 2005). Die Spezifische Interaktion der exprimierten Fusionsproteine wurde unter ansonsten gleichen Bedingungen durch zusätzliches Weglassen von Adenin (SC-LWA) getestet.

2.6.7 Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzaufnahmen wurden von Prof. Conrad Mullineaux (School of Biological and Chemical Sciences, Queen Mary University of London, Großbritannien) mit einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop TCS SP5 (LEICA) bei RT durchgeführt. Für alle Bilder wurde ein Öl-Immersion-Objektiv mit einer numerischen Apertur von 1.4 verwendet. Bei der Visualisierung von Zellen, die ausschließlich ein eYFP-Fusionsprotein exprimierten, wurde bei einer Anregungswellenlänge (λ_A) von 496 nm simultan die Emission (λ_E) von eYFP bei 520-540 nm und von Chlorophyll bei 670-720 nm aufgenommen. Die Co-Lokalisation von PilB1-sfGFP und Hfq-eYFP wurde nacheinander detektiert (sfGFP: $\lambda_A = 488$ nm; $\lambda_E = 503-515$ nm) (eYFP: $\lambda_A = 514$ nm; $\lambda_E = 520-540$ nm). Intensitätswerte wurden mit ImageJ (National Institutes of Health) quantifiziert.

3 Resultate

3.1 Analyse der Hfq-abhängigen Transkriptakkumulation

3.1.1 Microarray-Analyse zur Identifizierung Hfq-abhängiger sRNAs

Untersuchungen zur veränderten Transkriptakkumulation in der Δhfq Mutante wurde bereits von Dienst *et al.* (2008; 2010) durchgeführt. Diese Analysen beruhen auf einem Microarray und einem *Tiling-Array*, deren Sonden zusammengenommen die Transkripte der annotierten ORFs und einen Teilbereich (ca. 40 %) der intergenischen Regionen (IGR) des *Synechocystis* Chromosoms abdeckten. Im Rahmen dieser Arbeiten wurden vor allem mRNAs identifiziert, deren Abundanz in Δhfq im Vergleich zum WT abnahm. Wahrscheinlich auf Grund der fehlenden Abdeckung vieler IGRs wurden allerdings nur zwei Hfq-abhängige putative sRNAs (Hpr1; Hpr3) nachgewiesen. Der Einfluss von Hfq auf die Akkumulation von plasmidkodierten Transkripten konnte ebenfalls nicht aufgeklärt werden. In Folge einer umfassenden Analyse des Transkriptom von *Synechocystis* durch RNA-seq (Mitschke *et al.*, 2011) steht mittlerweile ein neues Microarray-Design zur Verfügung, welches sowohl chromosomal als auch plasmidkodierte ORFs und die Mehrzahl aller detektierten ncRNAs abdeckt. Dieses wurde eingesetzt um erstmals den Einfluss von Hfq auf das gesamte Transkriptom von *Synechocystis* zu erfassen. Für einige Hfq-abhängige akkumulierende RNAs wurde eine Regulation durch den Transkriptionsfaktor Sycrp1 beschrieben (Dienst *et al.*, 2008). Um die Wechselbeziehung der beiden Regulons besser zu verstehen, wurde in einem unabhängigen Microarray zusätzlich die Transkriptakkumulation einer $\Delta sycrp1$ Mutante¹² analysiert.

Für die Microarray-Analyse wurde Gesamt-RNA aus je drei (zwei) WT und Δhfq ($\Delta sycrp1$) Flüssigkulturen der logarithmischen Wachstumsphase ($OD_{750nm} = 0,6$) isoliert, direkt mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 markiert und die Replikate getrennt hybridisiert.

¹² Die *sycrp1::Km* Insertionsmutante wurde in Zusammenarbeit mit Frau Olga Siadat (AG Wilde, JLU Freiburg) im Rahmen ihrer Dissertation konstruiert.

Sonden mit einer *fold change* (FC) $\geq \pm 2$ und einem p-Wert $\leq 0,3^{13}$ wurden als signifikant eingestuft und für das jeweilige RNA *feature* (Gen, ncRNA, hypothetische UTR etc.) gemittelt. In der Δhfq Mutante zeigten 40 RNA *features* eine z.T. stark verringerte Akkumulation (Tab. 5) und 8 RNA *features* eine moderate Erhöhung der Transkriptmenge (Tab. 6). Bei der Hybridisierung des $\Delta sycr1$ Microarrays kam es zu einem nicht abschließend geklärten technischen Fehler, der ein extrem niedriges Signal/Hintergrund-Verhältnis der Fluoreszenzsignale zur Folge hatte. Für einen Großteil der RNAs war daher keine Aussage über die Transkriptakkumulation möglich. Insbesondere stark akkumulierende Transkripte, deren Signale sich deutlich vom Hintergrund unterschieden, konnten jedoch detektiert und zum Teil als differenziell reguliert erkannt werden. Für ein besseres Verständnis der cAMP/Sycr1-regulierten Transkription wurden die Microarray-Ergebnisse zusätzlich mit den bekannten Sycr1-Bindestellen verglichen (Tab. 5).

Tab. 5: (nächste Seite) RNAs mit reduzierter Transkriptakkumulation in Δhfq . Vergleich der Transkriptakkumulation gegenüber dem WT während der logarithmischen Wachstumsphase ($OD_{750nm} = 0,6$). Co-transkribierte Gene von bekannten Operons sowie benachbarte, gleichartig regulierte Gene (putative Operons) sind gruppiert und durch gepunktete Linien getrennt. * Sofern eine signifikante Veränderung der Transkriptakkumulation in der Analyse von Dienst *et al.* (2008, 2010) festgestellt wurde, ist die entsprechende *fold change* in Klammern angegeben. ** *fold change* der Transkripte in einer $\Delta sycr1$ Mutante gegenüber dem WT, sowie Hinweise auf eine cAMP/Sycr1-abhängige Regulation der entsprechenden Gene/Operons: (Y) Verringerte Akkumulation in einer $\Delta sycr1$ -Mutante (Yoshimura *et al.*, 2002); (O), (H) Verifizierte Bindung von Sycr1 stromaufwärts des Gen-Locus durch Omagari *et al.* (2008) oder Hedger *et al.* (2009).

¹³ Der hohe p-Wert war vertretbar, da i) alle so ermittelten Sonden Teil eines hypothetischen polycistronischen Transkripts waren, welches durch mindestens eine Sonde mit einem p-Wert von $\leq 0,05$ als differenziell akkumulierend erkannt wurde und ii) die *fold changes* der mRNA-Sonden mit p-Werten zwischen 0,05 und 0,3 weitgehend mit den Werten von Dienst *et al.* (2008) übereinstimmen.

Gen	Genprodukt	FC [log ₂]*	InterPro Klassifizierung	Sycrp1**	
chromosomale mRNAs					
<i>slr1667</i>	<i>cccS</i>	hypothetical protein	-5,70 (-5,61)	-	-2,27 (Y,H,O)
<i>slr1668</i>	<i>cccP</i>	periplasmic protein	-3,76 (-4,86)	PapD-like	
<i>ssr2786</i>		hypothetical protein	-3,08	-	
<i>ssr2848</i>		unknown protein	-3,05 (-3,65)	-	(O)
<i>NC-298</i>	<i>Hpr2</i>	hypothetical protein	-2,56 (-4,11)	-	-2,08
<i>NC-520</i>		hypothetical 5'-UTR	-2,26	-	
<i>slr2015</i>	<i>pilA9</i>	type 4 pilin-like protein	-1,41 (-2,01)	Prokaryotic N-terminal methylation site	-3,15 (Y)
<i>slr2016</i>	<i>pilA10</i>	type 4 pilin-like protein	-1,47 (-2,47)	Prokaryotic N-terminal methylation site	
<i>slr2017</i>	<i>pilA11</i>	type 4 pilin-like protein	-1,60	Prokaryotic N-terminal methylation site	
<i>slr2018</i>		unknown protein	-1,57 (-2,17)	-	
<i>slr0442</i>		unknown protein	-1,93 (-1,72)	-	(Y,H,O)
<i>slr1764</i>	<i>capA</i>	similar to tellurium resistance protein TerE	-1,70 (-1,77)	TerD domain	
<i>slr0226</i>		unknown protein	-1,53	-	-1,17
<i>slr1788</i>		unknown protein	-1,50	-	
<i>slr1789</i>		unknown protein	-1,19	-	
<i>NC-189</i>		hypothetical 5'-UTR	-1,43	-	
<i>slr0105</i>		hypothetical protein	-1,07	CobQ/MinD/ParA nucleotide binding domain	
<i>slr0106</i>		unknown protein	-1,06 (-1,18)	Rho termination factor, N-terminal	
<i>slr0179</i>		hypothetical protein	-1,32	Dynamin, GTPase domain	
<i>slr0869</i>		hypothetical protein	-1,20	Dynamin, GTPase domain	(O)
<i>slr0870</i>		hypothetical protein	-1,23	KGK	
<i>sll0327</i>		unknown protein	-1,20	-	
<i>sll1292</i>	<i>taxY2</i>	two-component response regulator CheY subfamily	-1,19	Signal transduction response regulator, receiver domain	
<i>sll1429</i>		unknown protein	-1,05 (-1,32)	Restriction endonuclease type IV, Mrr	
putative sRNAs					
<i>NC-232/NC-247</i>	<i>Hpr11</i>		-4,19	-	-3,37 (O)
<i>NC-425</i>	<i>Hpr8/SyR14</i>		-2,17	-	-1,31
CRISPR/Cas Systems					
CRISPR3	crRNAs		-3,98	-	-2,49
CRISPR2	crRNAs		-3,64	-	-2,39
<i>NC-16</i>		hypothetical 5'-UTR	-1,38	-	
<i>sll7067</i>	<i>cmr2/cas10</i>	unknown protein	-1,27	-	
<i>sll7065</i>	<i>csm3/cas7</i>	unknown protein	-1,10	Protein of unknown function, RAMP	
<i>sll7064</i>		unknown protein	-1,25	CRISPR-associated protein A791736	
<i>sll7063</i>	<i>cas7</i>	unknown protein	-1,33	CRISPR-associated RAMP BGP1436	
<i>sll7062</i>	<i>csm6</i>	unknown protein	-1,55	CRISPR-associated protein APE2256	
<i>sll7075</i>	<i>cas6-2b</i>	unknown protein	-1,31	-	
<i>sll7070</i>		unknown protein	-1,29	-	
<i>sll7089</i>	<i>cmr3</i>	unknown protein	-1,13	CRISPR-associated protein, Cmr3	
<i>sll7087</i>	<i>cmr4</i>	unknown protein	-1,11	CRISPR-associated RAMP Cmr4	
<i>sll7086</i>		unknown protein	-1,27	-	
<i>sll7085</i>	<i>cmr6</i>	unknown protein	-1,49	Protein of unknown function, RAMP	

Negativ regulierte Transkripte

Es zeigte sich, dass der überwiegende Teil der differenziell akkumulierenden Transkripte in Δhfq eine im Vergleich zum WT geringere Abundanz aufweist. In Übereinstimmung mit den früheren Analysen von Dienst *et al.* (2008) finden sich unter den am stärksten reduzierten chromosomalen mRNAs die Transkripte der (putativen) Operons *slr1667-ssr2786* und *slr2015-2018* bzw. der Gene *ssr2848* und *slr0442*. Für diese Loci wurde eine Bindung des cAMP-abhängigen Transkriptionsfaktors Sycrp1 an die Promotorregion vorhergesagt und die Sycrp1-abhängige Regulation teilweise auch verifiziert (siehe Tab. 5 „Sycrp1“). Zudem war auch die Menge des *hpr2*-Transkripts stark vermindert. Der Sequenz fehlt zwar ein Startcodon, sie kodiert aber in einem möglichen Leserahmen mit Homologien zu einem kleinen, in diversen Cyanobakterien konserviertem Protein und ist daher eher als kryptisches, proteinkodierendes Gen und nicht als sRNA einzustufen (Dienst, 2010). Interessanterweise ist die Transkriptakkumulation von Hpr2 in der $\Delta sycrp1$ -Mutante ebenfalls vermindert. Ein Sequenzvergleich der Promotorregion mit der Konsensussequenz aller bis dato validierten Sycrp1-Bindestellen ergab zwei mögliche Sycrp1-Bindestellen 47 bp bzw. 63 bp stromaufwärts des Hpr2 Transkriptionsstarts (nicht gezeigt). Neben diesen bereits bekannten Hfq-abhängigen Transkripten wurden einige neue mRNAs identifiziert, deren Akkumulation in Δhfq negativ betroffen war. Allerdings ist die genaue Funktion dieser Gene nicht bekannt und für keines wurde ein Einfluss auf die Phototaxis beschrieben. Bemerkenswerterweise finden sich jedoch mit *slr0226* und dem Operon *slr0869-slr0870* zwei weitere Kandidaten des Sycrp1 Regulons darunter. Eine eingehendere Beschreibung der am stärksten regulierten Transkripte und die Verifikation der Hfq-abhängigen Regulation dieser mRNAs findet sich bei Dienst (2008, 2010) und wird hier nicht genauer betrachtet.

Die Transkriptmenge von zwei RNAs, welche auf Grund der verfügbaren Transkriptomdaten, genomischen Lokalisation und der Abwesenheit von Protein-kodierenden Leserahmen als putative sRNAs eingestuft wurden, war in Δhfq ebenfalls stark reduziert. Entsprechend der von Dienst eingeführten Nomenklatur werden diese im weiteren Text

als Hpr8¹⁴ und Hpr11 (*Hfq-dependent, putative sRNA*) bezeichnet. Für Hpr1 konnte - wahrscheinlich auf Grund der geringen Signalintensität - keine signifikante Änderung der Transkriptakkumulation festgestellt werden, und Hpr3 wird durch das verwendete Microarray nicht detektiert.

Das neue Microarray umfasste auch Sonden für Gene, welche auf den Plasmiden von *Synechocystis* lokalisiert sind. Auffällig war, dass lediglich für Transkripte des Plasmids pSYS-A – nicht jedoch für diejenigen der anderen Plasmide - eine Hfq-abhängige Regulation beobachtet wurde. Interessanterweise ist ausschließlich die Akkumulation von crRNAs, welche durch Prozessierung aus den prä-crRNAs der Loci CRISPR2 und CRISPR3 herkommen, sowie von mRNAs der benachbarten *cas*-Gene betroffen. Unter den letztgenannte finden sich insbesondere die Transkripte derjenigen *cas*-Gene, welche für Homologe des CRISPR/Cas Effektor-Komplexes kodieren und deren Proteinprodukte mit den crRNAs interagieren (Makarova *et al.*, 2011; Scholz *et al.*, 2013).

Positiv regulierte Transkripte

Für einige wenige Transkripte konnte in Δhfq eine moderat erhöhte Abundanz detektiert werden (siehe Tab. 6). Darunter befinden sich keine putativen sRNAs, im Gegensatz zu den negativ regulierten Transkripten aber mehrere asRNAs. Am stärksten reguliert waren hierbei die asRNAs *slr0144-as1* und *slr2099-as3*. Es konnte allerdings keine signifikante Veränderung der komplementären (Ziel-)mRNAs nachgewiesen werden. Auch wurde die Akkumulation weder dieser beiden asRNAs noch der komplementären mRNAs in den Untersuchungen von Dienst durch Hfq signifikant beeinflusst. Ebenso wurden auch die anderen positiv regulierten Transkripte, die zudem nur eine relativ niedrige *fold change* aufwiesen, nicht in den vorherigen Untersuchungen detektiert. Zudem findet sich für keine der positiv regulierten RNAs ein Hinweis auf eine Sycrp1-abhängige Transkription.

¹⁴ Nach der Nomenklatur von Voss *et al.* (2009) wird Hpr8 als SyR14 (*Synechocystis* ncRNA) bezeichnet. Um die Bezeichnung einheitlich zu halten und die Hfq-Abhängigkeit herauszustellen, wird in dieser Arbeit aber die Nomenklatur von Dienst (2010) verwendet.

Tab. 6: RNAs mit erhöhter Transkriptakkumulation in Δhfq . Vergleich der Transkriptakkumulation gegenüber dem WT während der logarithmischen Wachstumsphase ($OD_{750nm} = 0,6$). Zur Erläuterung siehe Tab. 5.

Gen	Genprodukt	FC (\log_2)	InterPro Klassifizierung	Sycrp1
<i>slr0144-as1</i>	asRNA	1,61	-	
<i>slr2099-as3</i>	asRNA	1,43	-	
<i>sll1201</i>	hypothetical protein	1,31	hypothetical protein CHP01784	
<i>sll1675</i>	hypothetical protein	1,29	Glyoxalase/fosfomycin resistance/dioxygenase	
<i>sll1825</i>	hypothetical protein	1,23	Short-chain dehydrogenase/reductase SDR	
<i>sll0574-as2</i>	asRNA	1,18	-	
<i>ssr2153</i>	unknown protein	1,09	-	
<i>sll0260</i>	hypothetical protein	1,07	CBS domain; FAD-binding, type 2	

3.1.2 Verifizierung der Hfq-abhängigen Akkumulation von ncRNAs

Hpr11

Hpr11 wird auf dem chromosomalen [-]-Strang zwischen den auf dem [+] -Strang gelegenen Genen *slr1822* (Endonuklease III) und *slr1732* (Hypothetisches Protein) kodiert (Abb. 7 a). Mit einer FC von -4,19 ist es die im Δhfq -Stamm am stärksten regulierte sRNA. Die hohe Anzahl der cDNA *reads* (Mitschke *et al.*, 2011) wie auch die hohe Intensität der Microarray Signale¹⁵ legen zudem nahe, dass es eine der am stärksten exprimierten sRNAs in *Synechocystis* ist. Dementsprechend konnte mit einer transkriptspezifischen Sonde im Northern Blot eine abundante RNA-Bande von ungefähr 80 nt im WT nachgewiesen werden, während das Transkript in der Δhfq Mutante kaum mehr nachweisbar war (Abb. 7 b). Eine cAMP/Sycrp1-abhängige Regulation von Hpr11 ist sehr wahrscheinlich. Zum einen war Hpr11 auch in der $\Delta sycrp1$ -Mutante negativ reguliert, und darüber hinaus konnten Omagari *et al.* (2008) eine vorhergesagte Sycrp1 Bindestelle 56 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts von Hpr11 durch ein *Gel-Shift* Experiment verifizieren.

¹⁵ Die Signalintensitäten der Hpr11-Sonden im WT entsprechen ca. 30-50 % derjenigen der am stärksten akkumulierenden tRNA und sie fallen in das oberste 0,3 %-Quantil der im *Microarray* gemessenen Signalintensitäten.

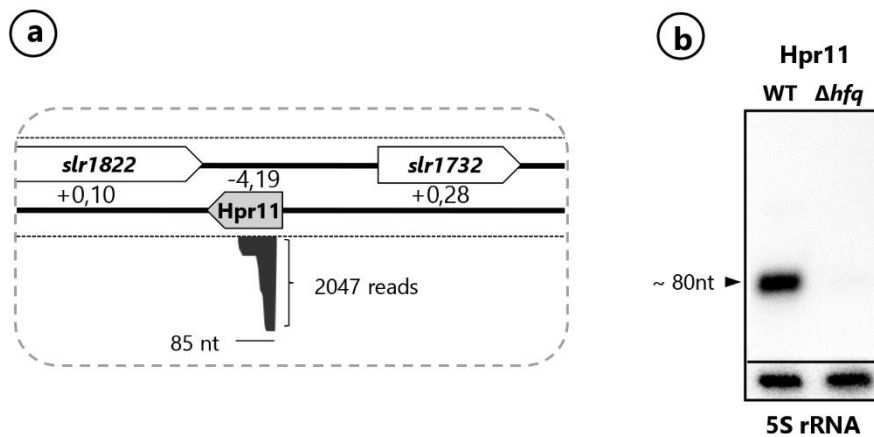


Abb. 7: Northern Blot Verifikation der Hfq-abhängigen Akkumulation von Hpr11. (a) Schematische Repräsentation des *hpr11* Locus. Oberhalb ([+]-Strang) und unterhalb ([-]-Strang) der gestrichelten Linie sind im gleichen Maßstab die Anreicherung von cDNA *reads* aus einer RNA-seq (Mitschke *et al.*, 2011) dargestellt. Daneben ist die maximale Anreicherung und Ausdehnung der *reads* angegeben. Die logarithmischen Zahlenwerte des im Microarray ermittelten *fold change* sind für die einzelnen Gene angegeben. (b) Northern Blot Analyse mit radioaktiv markierter Hpr11-Sonde. 8 µg Gesamt-RNA aus einer Flüssigkultur in der logarithmischen Wachstumsphase ($OD_{750nm} = 0,6$) wurden durch eine 10 % Harnstoff-PAGE aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Eine Hybridisierung mit einer 5S rRNA Sonde diente zur Ladekontrolle. Die Größe des detektierten Transkripts wurde durch Überlagerung der Membran mit den Gelbanden einer *Low Range Riboruler RNA Ladder* abgeschätzt.

Hpr8

Die kodierende Sequenz von Hpr8 liegt auf dem chromosomalen [+] -Strang zwischen den Genen *slr1213* (*AraC subfamily response regulator uirR*) und *slr1214* (*PatA-type response regulator lsiR*) (Abb. 8 a). Die Northern Blot Hybridisierung mit einer Hpr8-Sonde zeigte, dass im WT drei Banden von ungefähr 90, 200 und 500 nt Länge akkumulieren (Abb. 8 b). Im Δhfq -Stamm akkumulierten die beiden großen Banden im geringeren Maße, während die kleine Bande im Gegensatz zum WT gar nicht auftrat. Dies spricht für eine Hfq-abhängige Prozessierung und/oder Stabilisierung von Hpr8. Obwohl die Transkriptomdaten für die starke Akkumulation einer kleinen sRNA sprechen, ist es wahrscheinlich, dass diese zusammen mit dem stromabwärts gelegenen *lsiR* (*slr1214*) co-transkribiert wird. So aktiviert die Bindung von UirR an die Promotorregion von *hpr8* die Expression von *lsiR* in Folge von UV-Stress (Song *et al.*, 2011). Außerdem zeigen beide Transkripte in verschiedenen Microarray-Studien jeweils ein gleichartiges Verhalten (Daten nicht gezeigt). Somit kommt für Hpr8 auch eine Funktion als *cis*-regulatorisches Element der 5'-UTR von *lsiR* infrage. Zur Detektion eines potentiellen Co-Transkripts,

wurde die Akkumulation von Hpr8 in Kulturen, die vor Isolation der Gesamt-RNA für jeweils 2 h verschiedenen Lichtbedingungen ausgesetzt waren, analysiert (Abb. 8 c). Im Einklang mit der Rolle von UirR als UV-lichtgesteuertem Transkriptionsfaktor war Hpr8 sowohl nach UV- wie auch allgemeinem Lichtstress hochreguliert und durch Dunkelheit nicht betroffen. Es war jedoch kein längeres Co-Transkript von *hpr8* und *slr1214* zu detektieren.

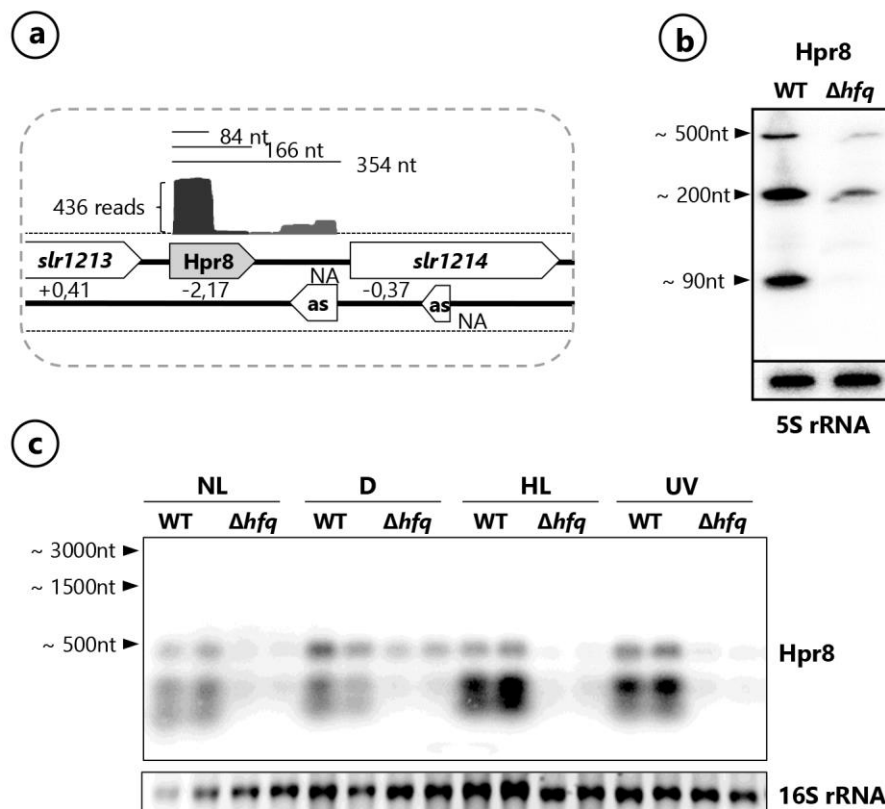


Abb. 8: Northern Blot Verifikation der Hfq-abhängigen Akkumulation von Hpr8. (a) Schematische Repräsentation des *hpr8*-Locus und (b) Northern Blot Analyse der Hpr8 Akkumulation in WT und Δhfq . Vergleiche Abb. 7 a, b für eine genauere Beschreibung. (c) Northern Blot Analyse der Hpr8-Akkumulation unter verschiedenen Lichtbedingungen. Es sind jeweils biologische Duplikate von WT und Δhfq Kulturen dargestellt. Flüssigkulturen ($OD_{750nm} = 0,6$) wurden für jeweils 2h unter „Normal“-Licht (NL) ($\sim 50 \mu E m^{-2} s^{-1}$), Dunkelheit (D), Lichtstress (HL) ($\sim 175 \mu E m^{-2} s^{-1}$) und UV-Stress ($\sim 85 \mu E m^{-2} s^{-1}$) inkubiert und Gesamt-RNA (3 μg) auf einem 1,3 % denaturierendem Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer radioaktiv markierten Hpr8-Sonde hybridisiert. Die Gel-Bande der 16S rRNA diente zur Ladekontrolle. Die Größe des detektierten Transkripts wurde durch Überlagerung der Membran mit den Gelbanden einer *High Range Riboruler RNA Ladder* abgeschätzt.

crRNAs

Um den Einfluss von Hfq auf die crRNAs zu untersuchen, wurde die Akkumulation von Transkripten aller drei CRISPR Loci mittels Northern Blot analysiert. Dafür wurde mit einer Sonde gegen einen spezifischen *spacer* jeweils eine abundante crRNAs und mit einer Sonde gegen die sich wiederholenden *repeat* Sequenzen die Gesamtheit der prä-crRNAs des entsprechenden CRISPR Locus detektiert. Für CRISPR2 wurde RNA zusätzlich mit einer Sonde gegen die distinkte *leader* Sequenz hybridisiert. Wie aus Abb. 9 b hervorgeht ist die Akkumulation des CRISPR1 *spacer2* in der Δhfq -Mutante nicht verringert und die Menge der verschiedenen Prozessierungsstufen der prä-crRNAs sogar leicht erhöht. Für die Transkripte der CRISPR2 und CRISPR2-Loci ist dagegen in Einklang mit den *Microarray* Daten eine Verminderung der crRNA Akkumulation in der Δhfq -Mutante nachweisbar. Dabei unterscheidet sich jedoch der Einfluss von Hfq auf die Akkumulation zwischen den verschiedenen Loci. Für CRISPR2 ist keine Veränderung der Akkumulation der *leader* Sequenz oder der prä-crRNA auszumachen, und auch die Menge der Vorstufen (>50 nt) der von *spacer 6* (C2S6) abgeleiteten crRNA ist in Δhfq nur geringfügig niedriger als im WT. Lediglich die (kleine) reife crRNA ist in Δhfq nicht mehr nachweisbar, und es scheint als sei ausschließlich ein später Prozessierungsschritt oder die Stabilisierung der crRNA von Hfq abhängig zu sein. Im Gegensatz dazu sind im Vergleich zum WT in der Δhfq -Mutante nur sehr schwache Signale von CRISPR3 kodierten prä-crRNA zu erkennen. Entsprechend sind die Abundanz der von *spacer 15* (C3S15) abgeleiteten Vorstufen in Δhfq stark reduziert und die reife crRNA sowie einige Prozessierungsprodukte überhaupt nicht nachzuweisen.

Die unterschiedliche Transkriptakkumulation von CRISPR2 kodierten prä-crRNAs und crRNAs wie auch die Abwesenheit einzelner Prozessierungsprodukte von CRISPR2 und CRISPR3 kodierten crRNAs lassen darauf schließen, dass die Prozessierung und nicht die Transkription der CRISPR-Loci Hfq-abhängig ist.

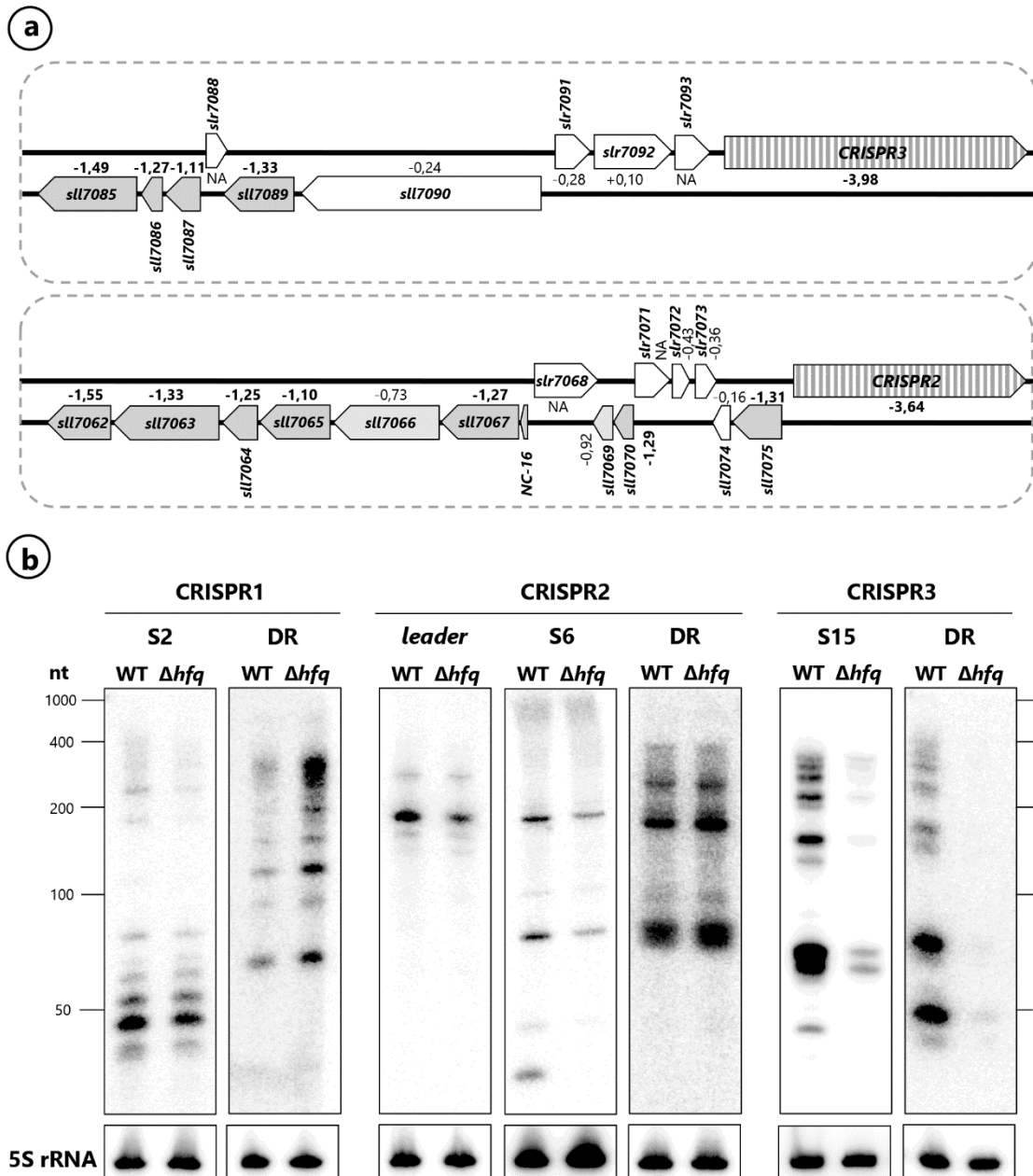


Abb. 9: Northern Blot Analyse der Akkumulation von crRNAs in Δhfq . (a) Schematische Repräsentation der CRISPR2 und CRISPR3 Loci. Die logarithmischen Zahlenwerte des im Microarray ermittelte *fold change* sind für die einzelnen Gene angegeben. Hfq-regulierte Gene sind grau (FC > 1) bzw. hellgrau (FC 0,5 - 1) und nicht regulierte Gene (FC < 0,5) weiß dargestellt. (b) Vergleichende Northern Blot Analyse von (prä-)crRNAs der drei verschiedenen CRISPR Loci in WT und Δhfq . 5 μ g Gesamt-RNA aus einer Flüssigkultur in der logarithmischen Wachstumsphase ($OD_{750nm} = 0,6$) wurden durch eine 10 % Harnstoff-PAGE aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Es wurden radioaktiv markierte DNA-Oligonukleotidsonden zur Detektion der jeweiligen *direct repeat* (DR), spezifischer *spacer* (S) und der CRISPR2 *leader*-Sequenz eingesetzt. Eine 5S rRNA Hybridisierung diente als Ladekontrolle. Die Größe der detektierten Banden wurde durch Überlagerung der Membran mit einer *Low Range Riboruler RNA Ladder* abgeschätzt.

3.2 Hfq und das Sycrp1-Regulon

3.2.1 Analyse der cAMP/Sycrp1-abhängigen Transkriptakkumulation

Die Synthese des *second messenger* cAMP durch die Adenylat-Cylase Cya1 und der Transkriptionsfaktor Sycrp1 (*Synechocystis* cAMP-receptor protein) sind für das phototaktische Verhalten von *Synechocystis* unabdingbar (Terauchi und Ohmori, 1999; Yoshimura, Yoshihara, *et al.*, 2002). Der cAMP/Sycrp1-Komplex reguliert jedoch nicht die Pilusbiogenese oder Motilität auf Zellebene, sondern scheint an der Steuerung des Gruppenverhaltens von motilen Biofilmen beteiligt zu sein (Bhaya *et al.*, 2006).

Unter Berücksichtigung aller bisher verfügbaren Daten ist davon auszugehen, dass knapp über die Hälfte der in der Δhfq Mutante negativ regulierten Transkripte direkt oder indirekt durch Sycrp1 reguliert werden (vgl. Tab. 5). Es lässt sich daher mutmaßen, dass die veränderte Transkriptakkumulation in Δhfq generell auf eine Beeinträchtigung der cAMP/Sycrp1-gesteuerten Genexpression zurückzuführen ist. Um dem nachzugehen, wurde die Akkumulation von Sycrp1-abhängigen mRNAs sowie Hpr8 und einer CRISPR3 crRNA, für die bisher keine Sycrp1-abhängige Regulation nachgewiesen wurden, in Δhfq und $\Delta sycrp1$ verglichen. Wie aus der Northern Blot Analyse von Gesamt-RNA hervorgeht, ist die Akkumulation der beiden mRNAs mit der ausgeprägtesten Transkriptreduktion in Δhfq (slr1667 und ssr2848) wie auch der beiden ncRNAs in Δhfq und $\Delta sycrp1$ in gleichem Maße verringert (Abb. 10). Insbesondere hervorzuheben ist, dass das kleine, putative Prozessierungsprodukt von Hpr8 nicht in $\Delta sycrp1$ akkumulierte, und die Veränderung der Transkriptakkumulation in Δhfq und $\Delta sycrp1$ absolut identisch war. Auch stimmen diese Ergebnisse mit dem $\Delta sycrp1$ -Microarray überein, in welchem für CRISPR2 crRNAs, Hpr11 und slr0226 ebenfalls eine Verringerung der Transkriptmengen festgestellt wurde. Somit ist es wahrscheinlich, dass die veränderte Transkriptakkumulation in der Δhfq Mutante in weiten Teilen auf eine Störung der cAMP/Sycrp1 abhängigen Genexpression zurückzuführen ist.

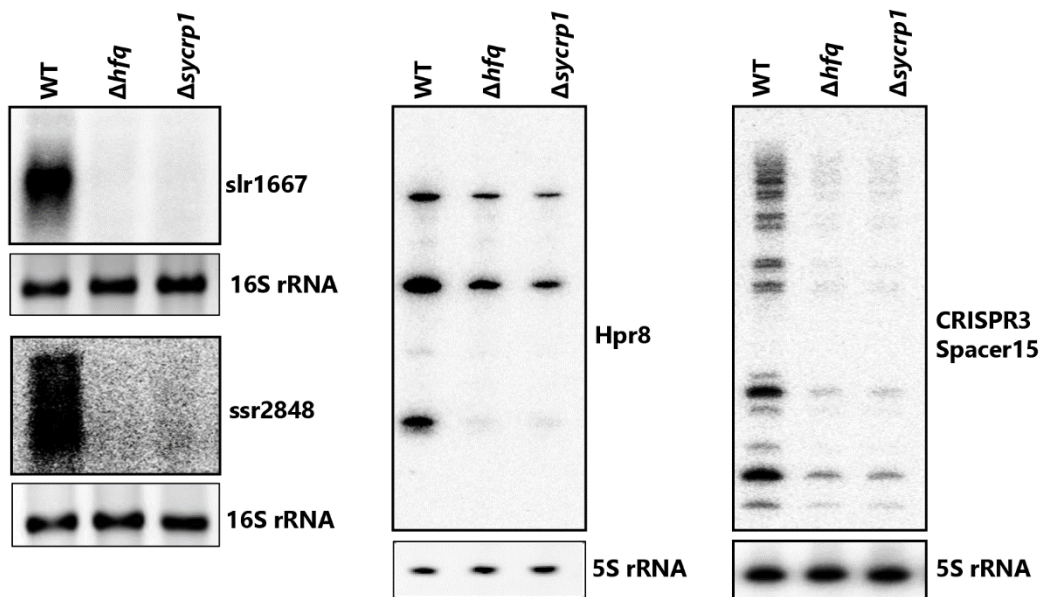


Abb. 10: Vergleich der Hfq- und Sycr1-abhängigen Transkriptakkumulation. Northern Blot Analyse ausgewählter Transkripte. Gesamt-RNA wurde aus Flüssigkulturen in der logarithmischen Wachstumsphase ($OD_{750nm} = 0,6$) isoliert. Für die Detektion der mRNAs *slr1667* und *ssr2848* wurden 3 μ g RNA auf einem 1,3 % denaturierendem Agarosegel und für die ncRNAs *Hpr8* und *C3S15* 5 μ g RNA auf einem 10 % Harnstoff-PAGE aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Nylonmembran erfolgte die Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden. Die Gel-Bande der 16S rRNA bzw. eine Hybridisierung mit einer 5S rRNA Sonde diente zur Ladekontrolle.

3.2.2 Komplementationsversuch mit FLAG-Sycr1

Eine solche Dysfunktion könnte potentiell durch eine Hfq-abhängige Regulation der *sycr1*- bzw. *cya1*-Expression erklärt werden. In den verfügbaren Microarray-Daten finden sich jedoch keine Hinweise auf eine Verringerung der entsprechenden Transkripte in der Δhfq Mutante. Außerdem waren frühere Versuche von Dienst (2010) zur Wiederherstellung der Phototaxis in einer Δhfq Mutante durch die Zugabe von exogenem cAMP¹⁶, sowie die Überexpression der *sycr1* RNA nicht erfolgreich. Dabei wurde in Ermangelung eines Sycr1-Antikörpers allerdings keine Analyse auf Proteinebene durchgeführt. Um einen Einfluss von Hfq auf die Translation von Sycr1 auszuschließen, sollte in einem analogen Experiment daher zusätzlich die Expression eines funktionellen Sycr1-Proteins in der Δhfq Mutante verifiziert werden. Zu diesem Zweck wurde das Plasmid pUR-FLAG-*sycr1* mittels Konjugation sowohl in die Δhfq - als auch in die

¹⁶ Die Gabe von exogenem cAMP ist ausreichend, um das phototaktische Verhalten in einer $\Delta cya1$ Mutante wiederherzustellen (Bhaya *et al.*, 2006).

Δ *sycrp1*-Mutante eingebracht (Δ *hfq* x FLAG-*sycrp1* und Δ *sycrp1* x FLAG-*sycrp1*). Dies erlaubte die induzierbare Expression eines Sycrp1-Fusionsproteins mit N-terminalem FLAG-Epitop.

Die Untersuchung des phototaktischen Verhaltens der resultierenden Stämme zeigte, dass das Fusionsprotein unter Expressionsbedingungen das phototaktische Verhalten von Δ *sycrp1*, nicht aber von Δ *hfq* wiederherstellen konnte (siehe Abb. 11 a). Im Vergleich mit einem *Synechocystis* WT Stamm, der lediglich einen Leervektor ohne FLAG-Expressions-kassette enthielt, zeigte Δ *sycrp1* x FLAG-*sycrp1* sogar eine leicht erhöhte Geschwindigkeit im Phototaxis-Assay. Eine Wiederholung des Experiments mit unabhängigen Klonen bestätigte die hier gezeigten Ergebnisse.

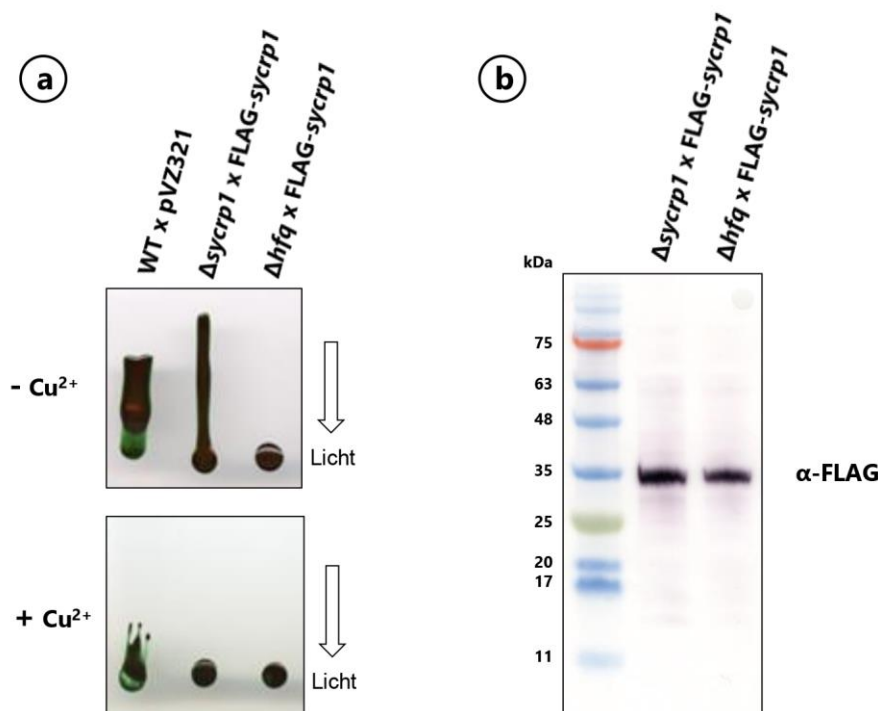


Abb. 11: Versuch der Komplementierung von Δ *hfq* durch FLAG-Sycrp1. Es wurden Δ *hfq* und Δ *sycrp1* Stämme die ein FLAG-Sycrp1 Fusionsprotein unter Kontrolle des durch Kupfer reprimierbaren *petJ*-Promotors exprimiert. **(a)** Phototaxis-Assay auf 0,5 % BG11-Platten ohne Kupfer und unter Zusatz von 2 μ M CuSO₄ **(b)** Western-Blot-Analyse der Proteinexpression. 15 μ l Gesamtextrakt aus Flüssigkulturen (BG11 + 0,2 % Glukose; OD_{750nm} = 1,0) wurde auf einem 4-16 % Tris-Tricine-SDS-Gradientengel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Detektion des Fusionsproteins (~29kD) erfolgte mit einem FLAG-Antikörper. Als Größenstandard diente ein *Prestained Protein Marker VI* (APPLICHEM).

Des Weiteren wurde die FLAG-Sycrp1 Expression in Δhfq x FLAG-*sycrp1* und $\Delta sycrp1$ x FLAG-*sycrp1* untersucht. Eine vergleichende Western-Blot-Analyse von Zellextrakten zeigte, dass das Fusionsprotein in beiden Stämmen in voller Länge translatiert wird und sich das Expressionsniveau nicht wesentlich unterscheidet (siehe Abb. 11 b). Folglich kann der Defekt in der Phototaxis der Δhfq -Mutante nicht durch eine Hfq-abhängige posttranskriptionelle Regulation der Sycrp1-Translation erklärt werden.

3.3 RNA-Bindestellen und funktionelle AS von Hfq

3.3.1 Hfq-abhängige ncRNAs binden nicht mit hoher Affinität an Hfq

In verschiedenen bakteriellen Spezies konnte eine stabile Assoziation von ncRNAs mit Hfq durch Co-Immunopräzipitation nachgewiesen werden (Zhang *et al.*, 2003; Torres-Quesada *et al.*, 2010; Berghoff *et al.*, 2011). In einem vergleichbaren Experiment wurde versucht die Bindung von ncRNAs, welche in *Synechocystis* Hfq-abhängig akkumulieren, an affinitätsgereinigtem Hfq zu verifizieren.

Für die spezifische Aufreinigung wurde ein rekombinantes Hfq Fusionsprotein mit einem N-terminalen 3xFLAG-Epitop eingesetzt. Zu diesem Zweck wurde die Δhfq Mutante mittels Elektroporation mit dem integrativen Vektor pSK-FLAG-*hfq* transformiert. Der resultierende Stamm Δhfq x FLAG-Hfq ermöglichte die Expression von FLAG-Hfq unter Kontrolle des Cu^{2+} -reprimierbaren *petJ*-Promotors (*PpetJ*) von einem neutralen Ort im Chromosom. Die Funktionalität des FLAG-Hfq Proteins wurde zunächst mit einem Phototaxis-Assay überprüft. In Abb. 12 a ist zu erkennen, dass der Stamm Δhfq x FLAG-*hfq* bei Induktion der FLAG-Hfq Expression unter Kupfermangel phototaktische Motilität zeigt, und das Fusionsprotein somit in der Lage ist, den nicht motilen Phänotyp der Δhfq Mutante zu komplementieren. Um die unspezifische Anreicherung von ncRNAs durch das 3xFLAG-Epitop oder die verwendete Affinitätsmatrix auszuschließen, wurde die Co-Immunopräzipitation ebenfalls mit einem Kontrollstamm durchgeführt. Dieser exprierte das kleine Photosynthese-Hilfsprotein Ycf34 mit N-terminalen 3xFLAG Epitop unter Kontrolle von *PpetJ* vom gleichen chromosomalen Integrationsort (siehe Tab. 2). Für die Co-Immunopräzipitation Hfq-gebundener ncRNAs wurden die beiden o.g.

Stämme in kupferfreiem Medium angezogen, in der stationären Phase ($OD_{750nm} \sim 3,0$) geerntet und die Fusionsproteine durch eine anti-FLAG-Affinitätsmatrix aus den solubilierten Zellextrakten erfolgreich aufgereinigt (Abb. 12 b). Gesamt-RNA wurde aus Aliquots verschiedener Aufreinigungsschritte isoliert und die Akkumulation der Hfq-abhängigen sRNAs Hpr3, Hpr8, Hpr11 und der crRNA C2S6 durch Northern Blot Analyse untersucht (Abb. 12 c). Die Beobachtung, dass alle Transkripte im Stamm Δhfq x FLAG-*hfq* detektiert werden konnten und die Transkriptmenge sich nicht oder nur minimal von derjenigen im Kontrollstamm unterscheidet, weist darauf hin, dass FLAG-Hfq auch auf Ebene der Transkriptakkumulation funktionell ist. Es konnte jedoch keine spezifische Aufreinigung von Hfq-gebundenen ncRNAs in der Elutionsfraktion nachgewiesen werden. Lediglich für Hpr11 wurde ein schwaches Signal detektiert, welches aber in Anbetracht der allgemein starken Hpr11 Transkriptakkumulation und der gleichzeitigen Aufreinigung von Hpr11 mit dem FLAG-Ycf34 Kontrollprotein als unspezifisch einzustufen ist. Somit kann zumindest für die untersuchten ncRNAs eine hochaffine Bindung an Hfq nicht bestätigt werden.

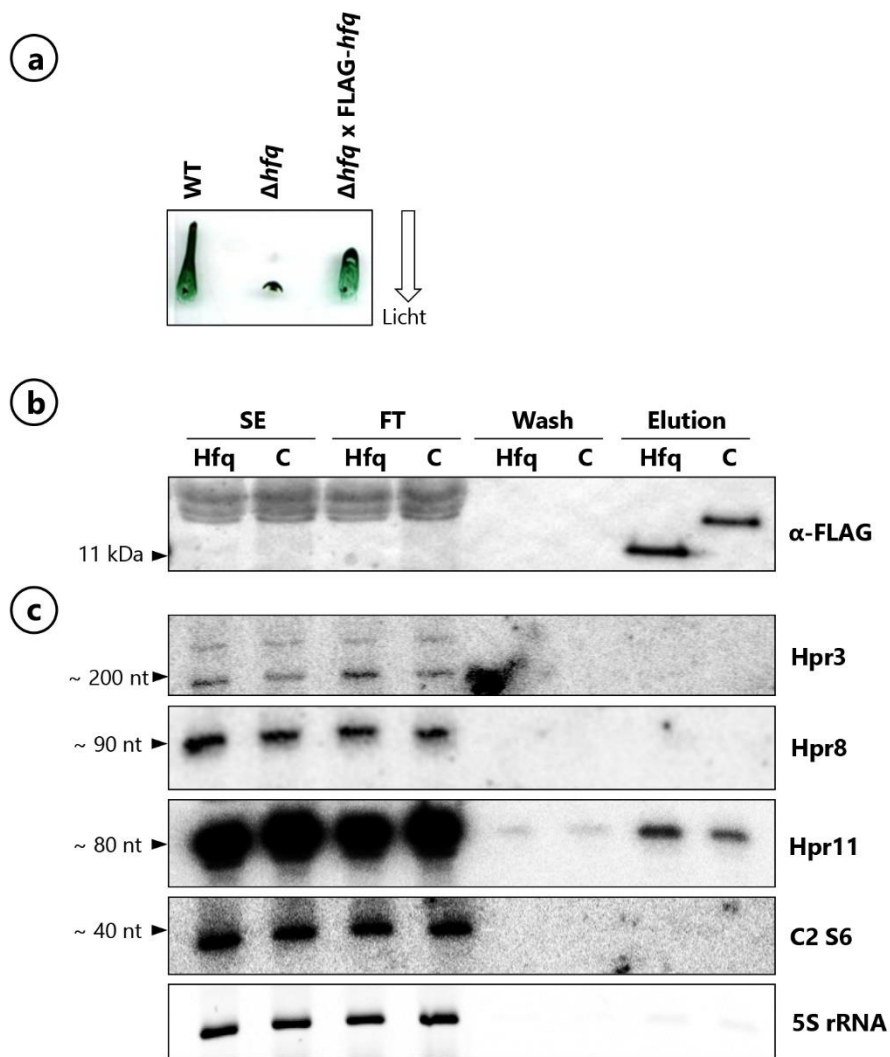


Abb. 12: Co-Immunopräzipitation von ncRNAs durch FLAG-Hfq. **(a)** Die Expression eines rekombinanten FLAG-Hfq-Fusionsproteins auf Cu^{2+} -freien Phototaxis-Platten komplementiert den nicht-motilen Phänotyp der Δhfq Mutante. **(b)** Co-Immunopräzipitationsexperiment mit $\Delta hfq \times \text{FLAG-hfq}$ und einem $\Delta ycf34 \times \text{FLAG-ycf34}$ Kontrollstamm. Die Zellen wurden in 500 ml BG11 - Cu^{2+} unter Zusatz von 0,2 % Glukose und Begasung mit 3 % CO_2 bis $\text{OD}_{750\text{nm}} \sim 3.0$ angezogen und FLAG-Fusionsproteine mit einer anti-FLAG Affinitätsmatrix aus solubilisiertem Extrakt aufgereinigt. Es wurden jeweils Proben des solubilisierten Extrakts (SE), des Durchflusses (FT), der Waschfraktion (Wash) sowie die gesamte Affinitätsmatrix analysiert. Die Aufreinigung von FLAG-Hfq (10,5 kDa) und FLAG-Ycf34 (12,3 kDa) wurde nach Auftrennung von 1/40 der entnommenen Aliquots in einer 16 % Tris-Tricine-PAGE durch Western Blot Analyse mit einem FLAG Antikörper verifiziert. **(c)** Aus den restlichen Proben wurde Gesamt-RNA extrahiert und die Anreicherung von ncRNAs nach Auftrennung in einer 10 % Harnstoff-PAGE durch Northern Blot Analyse mit Transkript-spezifischen, radioaktiv markierten Sonden untersucht.

3.3.2 Atypische Hfq-Homologe sind in fast allen Cyanobakterien konserviert

Auf Grund der im Vergleich zu anderen Bakterien divergierenden AS-Zusammensetzung wurden cyanobakterielle Hfq-Homologe in der ersten systematischen Analyse der phylogenetischen Verbreitung von Hfq durch Sun *et al.* (2002) übersehen. Erst später wurden Hfq kodierende Gene in einigen Cyanobakterien identifiziert (Valentin-Hansen *et al.*, 2004) und die Struktur der Hfq Proteine aus *Synechocystis* und *Nostoc* sp. PCC7120 aufgeklärt (Bøggild *et al.*, 2009). Es erfolgte jedoch keine umfassende Analyse der Konservierung von cyanobakteriellen Hfq Proteinen durch die jeweiligen Autoren. Ferner wurden in der Zwischenzeit weitere Strukturen von Hfq im Komplex mit RNA aufgeklärt und die Anzahl der sequenzierten cyanobakteriellen Genome durch die Veröffentlichung des CyanoGEBA Datensatzes (Shih *et al.*, 2013) beinahe verdoppelt. Um die Hfq-Funktion in *Synechocystis* genauer zu beleuchten, erfolgte daher ein systematischer Vergleich der strukturellen Konservierung von funktionellen AS zwischen cyanobakteriellen und bakteriellen Hfq-Proteinen im Allgemeinen. Dafür wurden zunächst *hfq* Gene in Cyanobakterien mittels BLAST Suche identifiziert¹⁷. Es zeigte sich, dass 115 von 132 Genomen jeweils für ein Hfq-Homolog kodieren, von denen die Mehrzahl eine Länge von 70-74 AS aufwies (vgl. Schuergers *et al.* (2014)). Einige Homologe besaßen darüber hinaus variable N- oder C-terminale Sequenzerweiterungen von ~7-20 AS. Vor allem in obligaten Symbionten und Vertretern des Genus *Prochlorococcus* (mit Ausnahme der Stämme MIT 9303 und MIT 9312) wurde kein Homolog gefunden. Ausgehend von einem multiplen Sequenz-Alignment dieser Proteine wurde die Konservierung der einzelnen AS mit ConSurf berechnet (Abb. 13 a) und mit der allgemeine Sequenzkonservierung von bakteriellen Hfq-Proteinen anhand der Oberflächenmodelle von *Synechocystis* Hfq und *E. coli* Hfq verglichen¹⁸ (Abb. 13 b). Es ist bemerkenswert, dass in den cyanobakteriellen Hfq Proteinen mit Ausnahme von G36 alle der am stärksten konservierten AS zur proximalen Oberfläche des Hexamers beitragen. Diese AS der N-terminalen α -Helix und des

¹⁷ Standard PSI-BLAST – Als Startsequenzen dienten annotierten cyanobakteriellen Hfq-Homologen (*Taxonomy ID*: 1117; KEGG Orthology K03666).

¹⁸ Als Basis für die Berechnung der allgemeine Konservierung dienten Cluster (90 % Identität) aller UniProtKB Einträge für Hfq (InterPro Family: 005001). Um eine Verfälschung durch überrepräsentierte Sequenzen naher Verwandtschaft zu vermeiden erfolgte eine Normalisierung auf Basis des phylogenetischen Stammbaums der Hfq-Homologe (*neighbour joining* BLOSSUM 62)

invariablen WQD-Motifs liegen in unmittelbarer räumlicher Nähe und bilden eine – nur von dem vorstehenden N-Terminus unterbrochene - kreisförmige Fläche rund um die proximalen RNA-Bindungstaschen (zur Abgrenzung von der restlichen Oberfläche wird dieser Bereich im weiteren Verlauf dieser Arbeit als „proximaler Ring“ bezeichnet). Die Konservierung im Bereich der proximalen RNA-Bindung ist dagegen gering. Dies betrifft vor allem positiv geladene AS im Sm2 Motiv, welche das Phosphat-Rückgrat binden, sowie Reste der β_2 - β_3 Schleife, welche die Nukleinbase stabilisieren könnten. Im Unterschied dazu sind die entsprechenden AS rund um die zentrale Pore, die in *E. coli* und *S. aureus* an der Bindung von Uracil-Nukleotiden beteiligt sind (Schumacher *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2013), allgemein hoch konserviert.

Eine Diskrepanz der Konservierung kann man auch für die AS der distalen RNA-Bindungsstelle beobachten. Insbesondere die Positionen der Serin- und Threoninreste innerhalb des β_5 -Faltblatts¹⁹, die in allen bekannten Hfq-RNA-Kristallstrukturen Wasserstoffbrückenbindungen mit einer RNA-Nukleinbase eingehen, sind in Cyanobakterien durch ein Alanin (A64) substituiert bzw. nicht konserviert (T65). Eine Konservierung von mehreren benachbarten, positiv geladenen AS, wie sie für die laterale RNA-Bindestelle charakteristisch ist, konnte ebenso wenig beobachtet werden.

Zusammengenommen lässt sich somit feststellen, dass die in verschiedenen Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien strukturell und funktionell charakterisierten RNA-Bindungsstellen in Cyanobakterien auf Ebene der AS-Sequenz nicht konserviert sind.

3.3.3 Die RNA-Bindungsstellen sind nicht essentiell für die Funktion von *Synechocystis* Hfq

Bereits in vorherigen Arbeiten war es nicht möglich, eine hoch affine Bindung von *Synechocystis* Hfq an sRNAs zu belegen (Bøggild *et al.*, 2009; Dienst, 2010). Die Autoren führten dies u.a. auf die negative Oberflächenladung der proximalen RNA-Bindetaschen zurück. Darüber hinaus gelang es in dieser Arbeit ebenso wenig, eine spezifische Bindung

¹⁹ S60, T61 in *E. coli* Hfq; S61, T62 in *S. aureus* und *B. subtilis* (Link *et al.*, 2009; Someya *et al.*, 2012; Horstmann *et al.*, 2012)

von ncRNAs an Hfq nachzuweisen. Unter Berücksichtigung der fehlenden Sequenzkonservierung muss daher die RNA-Bindung insbesondere durch die RNA-Bindungsstellen angezweifelt werden. Um diese Annahme zu bestätigen, wurden verschiedene Hfq Varianten mit Einzel-AS Austauschmutationen konstruiert. Die proximale RNA-Bindetasche wurde in den Hfq-Varianten T43D und D44K über das Einbringen veränderter Ladungen mutiert. In G31N wurde der am stärksten konservierte Bereich der distalen RNA-Bindetasche über eine Veränderung der sterischen Konformation umgeformt. Darüber hinaus wurde auch der hoch konservierte proximale Ring mutiert. Dies erfolgte über den Austausch Q15R, da dieser die Interaktionsfähigkeit der konservierten Oberfläche maßgeblich beeinflussen sollte (persönliche Kommunikation Cheryl Kerfeld - US Department of Energy, Joint Genome Institute, USA). Da die Δhfq Mutante nicht transformierbar war, wurden diese Hfq-Varianten mit Hilfe der konjugierbaren Vektoren pVZ-*hfq*#AA in die Δhfq Mutante transferiert und auf ihre Fähigkeit, den Phänotypen zu komplementieren, getestet. Die Expression der mutierten Hfq-Varianten führte in allen vier Stämmen zur Wiederherstellung der phototaktischen Motilität (Abb. 13 c). Da ein direkter Zusammenhang zwischen Motilität und veränderter Transkriptakkumulation in der Δhfq Mutante bisher nicht bewiesen ist, wurde auch die Transkriptmenge und Prozessierung der Hfq-abhängigen sRNA Hpr8 untersucht²⁰. Wie aus einer Northern-Blot-Analyse hervorgeht, akkumulieren Hpr8 sowie das putative Prozessierungsprodukt in den Stämmen, welche die mutierten Hfq-Varianten exprimieren, auf WT Niveau (Abb. 13 d). Diese Daten stützen die Annahme, dass die putativen RNA-Bindetaschen keine RNA binden und generell nicht von grundlegender Bedeutung für die Funktion von Hfq in *Synechocystis* sind. Aber auch der Q15R Austausch des konservierten proximalen Rings wirkte sich nicht auf die Hfq-Funktion aus.

²⁰ Die Wahl fiel auf Hpr8, da keine Sycrp1-Bindestelle in der *hpr8* Promotorregion gefunden wurde und die Transkriptakkumulation offenkundig mit der Hfq-abhängigen Prozessierung im Zusammenhang stand. Die Transkriptakkumulation in den nachfolgend beschriebenen Experimenten wurden aber teilweise auch für *ssr2848*, *slr2015* und *slr1667* bestimmt. Diese bestätigten in allen untersuchten Fällen die Ergebnisse für Hpr8.

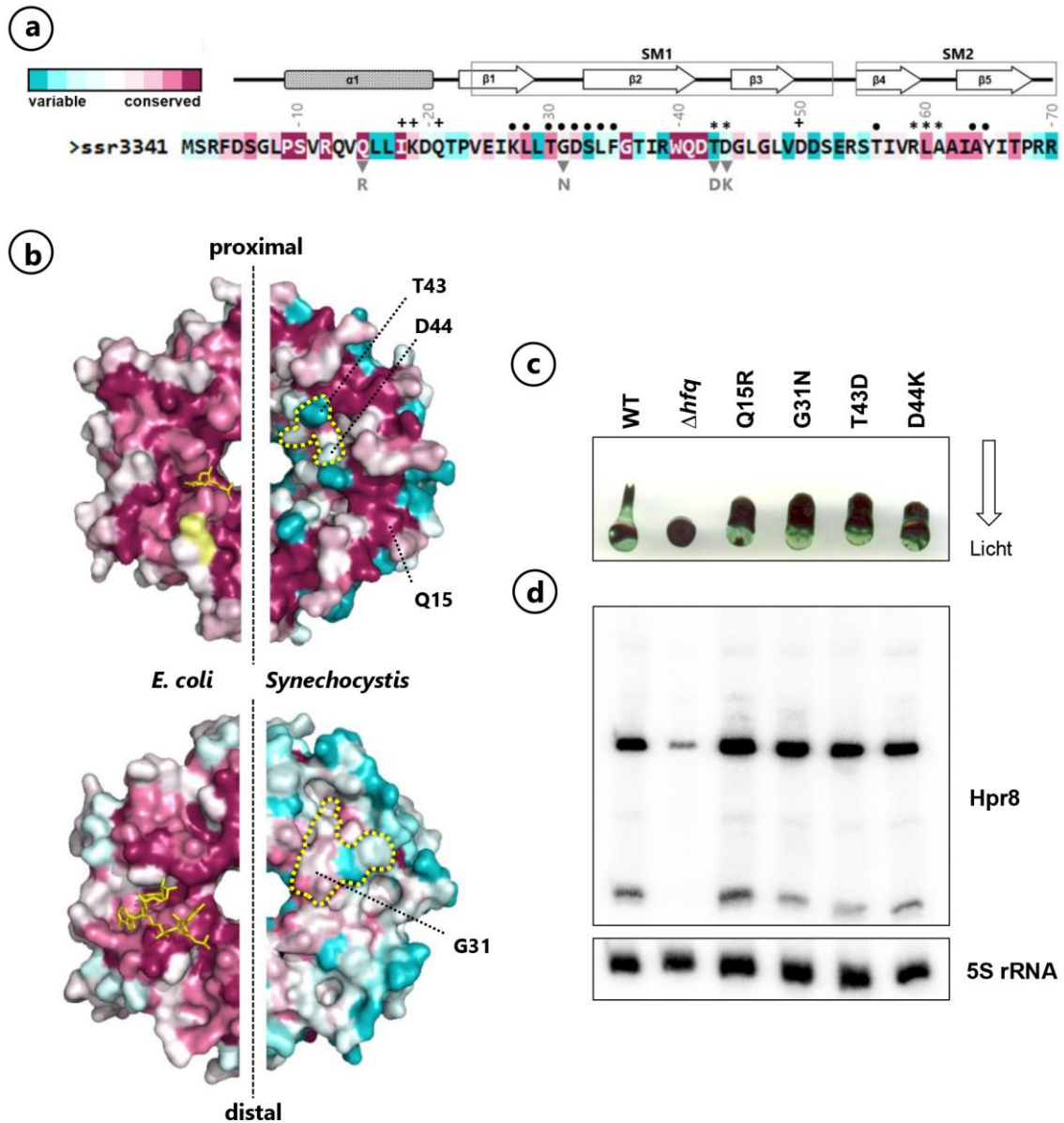


Abb. 13: Konservierung von funktionellen AS und Mutationsanalyse der putativen RNA-Bindetaschen. (a) Die entsprechend der Konservierung in Cyanobakterien eingefärbte AS-Sequenz von Hfq aus *Synechocystis*. Die Sekundärstruktur (PDB: 3hfo) und AS-Austauschmutationen sind schematisch dargestellt. Die Positionen von AS, die in Hfq-Proteinen anderer Bakterien an der RNA-Bindung beteiligt sind (vgl. Abb. 4), wurden durch folgende Symbole markiert: * proximale RNA-Bindetasche; • distale RNA-Bindetasche; + laterale RNA-Bindestelle. (b) AS-Konservierung von cyanobakteriellen Hfq-Homologen dargestellt auf dem Oberflächenmodell von *Synechocystis* Hfq im Vergleich mit der generellen Konservierung bakterieller Hfq-Homologe anhand von *E. coli* Hfq (PDB: 4ht9). Für *E. coli* Hfq ist ein einzelnes gebundenes U (proximal) bzw. ein AAA-Oligonukleotid (distal) und für *Synechocystis* die Lage der entsprechenden Bindetasche gezeigt (gelb). (c) AS-Austauschmutanten von Hfq. *Synechocystis* Stämmen die ausschließlich eine mutierte Hfq-Variante exprimieren, zeigen gerichtete Bewegung zur Lichtquelle im Phototaxis-Assay. (d) Northern Blot Analyse mit radioaktiv markierter Hpr8-Sonde nach Auftrennung von 10 μ g Gesamt-RNA in einer 10 % Harnstoff-PAGE. Eine 5S rRNA Hybridisierung diente zur Ladekontrolle.

3.3.4 AS des proximalen Rings sind essentiell für die Hfq-Funktion

Zufallsbasierte Mutagenese zur Identifizierung funktioneller AS

Da die klassischen RNA-Bindetaschen offenbar nicht relevant für die Hfq-Funktion in *Synechocystis* sind, sollten für ein besseres Verständnis des Regulationsmechanismus zunächst funktionelle Strukturelemente ermittelt werden. Dazu wurde eine zufallsbasierter Mutagenese des *hfq* Gens durchgeführt und in resultierenden Mutanten nach Einzel-AS-Austauschen gesucht, welche die Hfq-Funktion unterbinden. Eine schematische Darstellung dieses Screenings ist in Abb. 14 dargestellt.

Zunächst wurde die genomische *hfq* Sequenz mittels *error prone*-PCR mutiert (Abb. 14 a) und in den mobilisierbaren Expressionsvektor pUR kloniert (Abb. 14 b). Dies ermöglichte die Expression der Hfq-Varianten durch den regulierbaren *petJ*-Promotor sowie die Detektion über die Fusion eines N-terminalen FLAG-Epitops. Diese pUR-*hfq*#AA Derivate wurden konjugativ in den Δhfq Stamm transferiert und die Motilität der Exkonjuganten direkt auf Selektionsplatten mit niedriger Agarosekonzentration (0,5 %) überprüft (Abb. 14 c). Eine - auf Grund der unscharfen Koloniegrenzen nicht näher bestimmte - Mehrzahl der Klone zeigte motiles Verhalten und exprimierte somit ein funktionelles Hfq Protein. Daneben konnten aber 116 nicht-motile Klone identifiziert werden. Um sicherzustellen, dass die eingefügt Mutation nicht zu einem vorzeitigen Translationsstop oder einer instabilen Proteinfaltung führt, wurde die Expression der mutierten Hfq-Proteine in diesen Klonen überprüft. In 38 Klonen konnte die Expression eines Fusionsproteins der korrekten Größe über das FLAG-Epitop im Western Blot verifiziert werden (Abb. 14 d). Eine anschließende Sequenzanalyse ergab, dass 8 dieser Klone für ein Hfq-Protein mit einer einzelnen AS-Austauschmutation kodierten (Abb. 14 e). In den anderen Klonen, die nicht weiter analysiert wurden, waren dagegen zwei oder mehr AS mutiert. Die zufallsbasierte Mutagenese führte somit zu folgenden nicht funktionellen AS-Austauschen: R3S, P9T, Q15H, I18F, R39H, W40R, D42N und V58E.

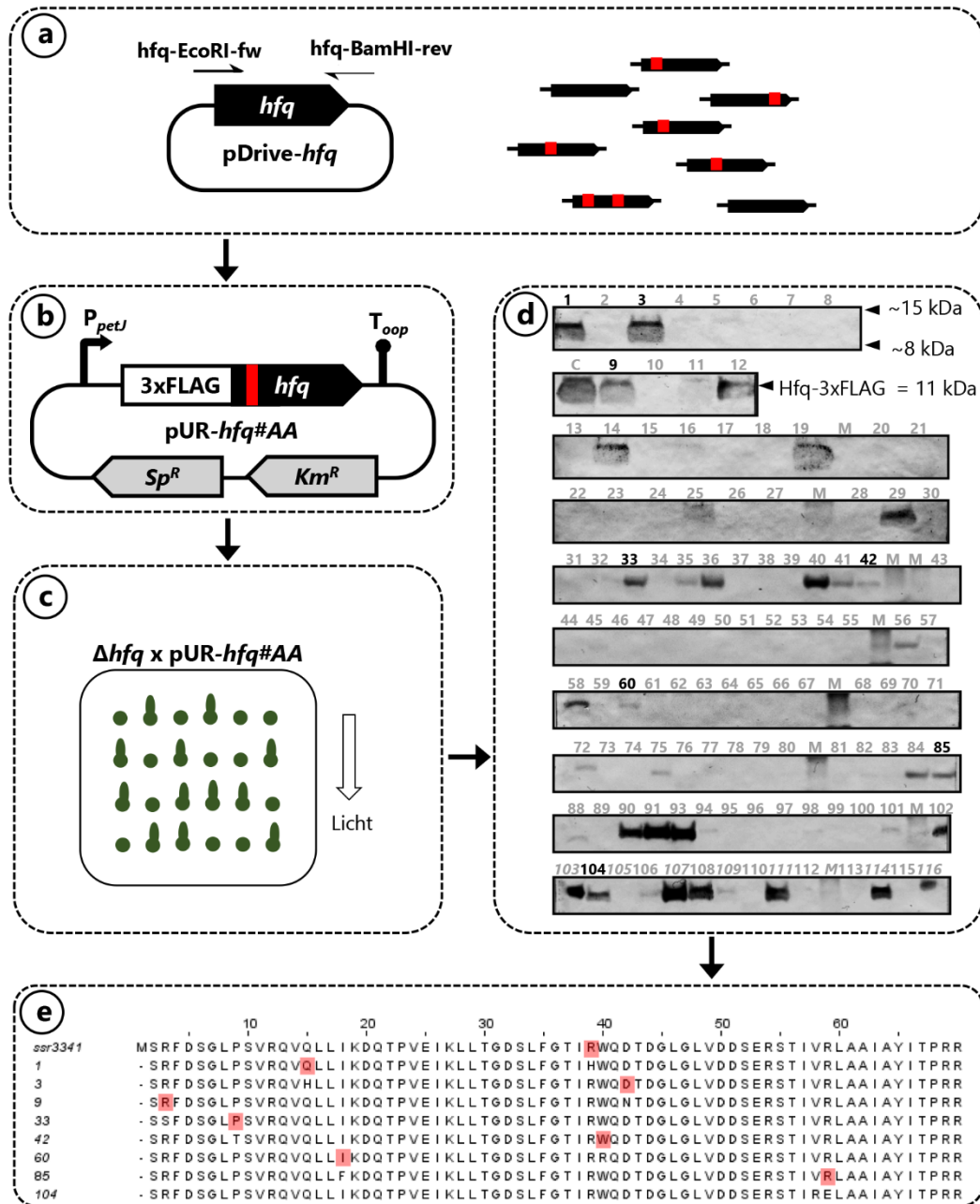


Abb. 14: Strategie zur Identifizierung funktioneller AS. (a) Zufällige Nukleotidaustauschmutationen wurden durch eine *error prone PCR* in *hfq* eingeführt. (b) Mutierte *hfq* Sequenzen wurden in den FLAG-Expressionsvektor pUR kloniert und dieser in Δhfq konjugiert. (c) Die Motilität der Exkonjuganten wurde auf BG11-Festmedium (0,5 % Agar) überprüft. (d) In nicht-motilen Klonen wurde die stabile Expression des FLAG-Hfq Fusionsproteins durch Western-Blot Analyse überprüft. Dafür wurden Zellextrakte auf einem 12 % SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und das Fusionsprotein mit einem FLAG-Antikörper detektiert. (e) Eine Sequenzierung zeigte, dass acht der stabil exprimierten, nicht funktionellen Fusionsproteine eine einzelne AS-Austauschmutation aufwiesen.

Charakterisierung der nicht-funktionellen Hfq-Varianten

Die Stämme mit den o.g. AS-Austauschmutationen wurden anschließend genauer überprüft. Für sieben Hfq-Varianten konnte durch ein Phototaxis-Assay der völlige Verlust des motilen Verhaltens bestätigt werden (Abb. 15 a). Zusätzlich konnten in einer Northern Blot-Analyse für diese Stämme eine verminderte Akkumulation und eine fehlende Prozessierung von Hpr8 – vergleichbar mit dem Δhfq -Stamm – nachgewiesen werden (Abb. 15 b). Abweichend von der anfänglichen Beobachtung konnte R3S den Δhfq -Phänotyp teilweise komplementieren und zeigte lediglich eine verringerte phototaktische Motilität. Obwohl die Akkumulation von Hpr8 im Ganzen eher derjenigen der nicht-funktionellen Hfq-Varianten entsprach, konnte für R3S dennoch eine schwache Bande auf Höhe des Hpr8 Prozessierungsprodukts detektiert werden. Auffällig ist auch, dass Q15H den Δhfq Phänotyp nicht komplementieren konnte, während der oben gezeigte Austausch Q15R die Funktion nicht beeinträchtigte. Dies mag darauf zurückzuführen sein, dass der Imidazolring des Histidins größere sterische Einschränkungen für evtl. auftretende Makromolekül-Interaktionen mit sich bringt. Bemerkenswerterweise sind abgesehen von R39 alle hier identifizierten AS in cyanobakteriellen Hfq-Homologen hoch konserviert und mit Ausnahme von V58 entlang einer Furche auf der Oberfläche exponiert (Abb. 15 c). Unter Berücksichtigung der vorausgegangenen Untersuchungen ist somit anzunehmen, dass nicht die bekannten RNA-Bindestellen, sondern der proximale Ring die entscheidende funktionelle Oberfläche von *Synechocystis* Hfq darstellt.

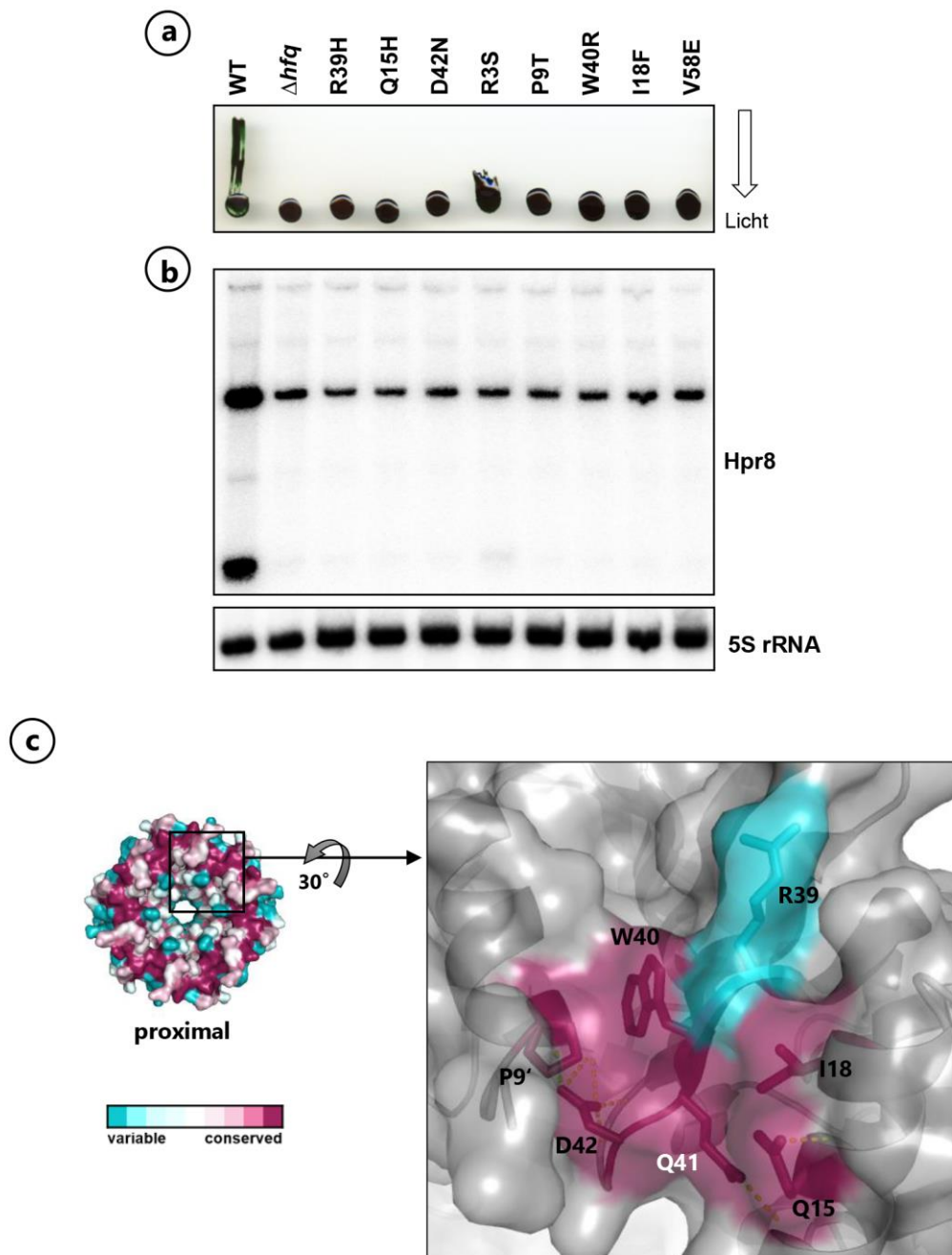


Abb. 15: Analyse der nicht-funktionellen Hfq-Varianten mit Einzel-AS-Austauschmutationen. (a) Phototaxis-Assay der Hfq-Varianten. Es wurden jeweils 3 μ l einer Zellsuspension auf Phototaxisplatten aufgetropft und für 10 d unidirektional belichtet. **(b)** Northern Blot Analyse des Hpr8 Transkripts. 10 μ g Gesamt-RNA aus einer Flüssigkultur in der logarithmischen Wachstumsphase ($OD_{750nm} = 0,6$) wurden durch eine 10 % Harnstoff-PAGE aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Eine 5S rRNA Hybridisierung diente als Ladekontrolle. **(c)** Oberflächenmodell der proximalen Seite von *Synechocystis* Hfq. Mit Ausnahme von V58E sind die Seitenketten aller identifizierten funktionellen AS an der proximalen Oberfläche exponiert (siehe Ausschnitt). Q41 ist die einzige AS dieser Region, die im vorausgehenden Screening nicht identifiziert wurde.

3.4 Protein-Interaktionspartner von Hfq

3.4.1 Hfq interagiert mit der T4P Sekretions-ATPase PilB1

Die putativen RNA-Bindungstaschen spielen augenscheinlich keine Rolle für die Funktion von *Synechocystis* Hfq und es konnte keine Bindung von ncRNAs an Hfq nachgewiesen werden (vgl. 3.3.1 und 3.3.3). Zudem ist die Ladungsverteilung der Proteinoberfläche für die RNA-Bindung ungeeignet (Bøggild *et al.*, 2009). Vor diesem Hintergrund ist zu mutmaßen, dass Hfq in *Synechocystis* im Gegensatz zu kanonischen Hfq Proteinen eine Funktion abseits der Bindung von RNA erfüllt. So könnte die Agglomeration von hoch konservierten, funktionell kritischen AS auf einer Seite des Hfq Hexamers im proximalen Ring (vgl. 3.3.4) eine potentielle Interaktionsfläche für Protein-Protein Wechselwirkungen darstellen. Um dieser Hypothese nachzugehen, wurde mittels Co-Immunopräzipitation versucht, Komplexe von Hfq mit Proteininteraktionspartnern aus solubilisierten Zellextrakten zu isolieren. Die Aufreinigung erfolgte aus 500 ml Kulturen des Stammes Δhfq x FLAG-*hfq* sowie des Kontrollstammes $\Delta ycf34$ x FLAG-*ycf34* parallel zu der Co-Immunopräzipitation von ncRNAs (siehe 3.3.1). Es wurden jedoch Aliquots der verschiedenen Aufreinigungsschritte und $\frac{1}{4}$ der Elutionsfraktion durch eine 16 %-Tris-Tricine-SDS-PAGE aufgetrennt. Aufgereinigte Proteine wurden durch eine Coomassie-Färbung visualisiert (Abb. 16 a) und die Anreicherung der FLAG-Fusionsproteine durch einen spezifischen Antikörper kontrolliert (Abb. 16 b). In der FLAG-Hfq Elutionsfraktion, nicht aber in der Kontrolle konnte eine abundante Proteinbande mit einem apparenten Molekulargewicht von knapp unter 75 kDa nachgewiesen werden. Diese konnte durch massenspektrometrische Analyse in der Arbeitsgruppe von PD G. Lochnit (Protein Analytik, Medizinische Fakultät, Universität Giessen) eindeutig als PilB1 (75,1 kDa; ORF *slr0063*) identifiziert werden.

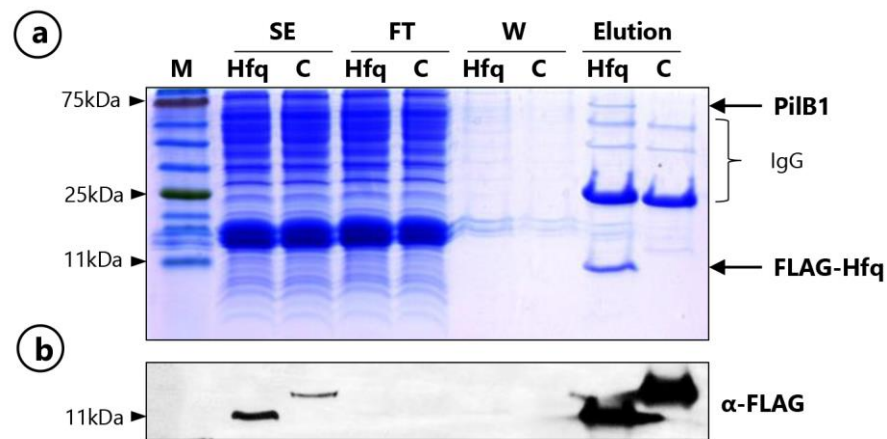


Abb. 16: Co-Immunopräzipitation von PilB1 mit FLAG-Hfq. Co-Immunopräzipitationsexperiment mit Δhfq x FLAG-Hfq und einem $\Delta ycf34$ x FLAG-Ycf34 Kontrollstamm. Die Zellen wurden in 500 ml BG11 - Cu^{2+} unter Zusatz von 0,2 % Glukose und Begasung mit 3 % CO_2 bis $\text{OD}_{750\text{nm}} \sim 3.0$ angezogen. FLAG-Fusionsproteine wurden mit einer anti-FLAG Affinitätsmatrix aus solubilisiertem Extrakt aufgereinigt. **(a)** Es wurden jeweils 1/40 der entnommenen Aliquots des solubilisierten Extrakts (SE), des Durchfluss (FT) und der Waschfraktion (W) sowie 1/4 der Affinitätsmatrix durch eine 16 % Tris-Tricine-PAGE aufgetrennt und Proteine durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Als Größenstandard diente ein *Prestained Protein Marker VI* (APPLICHEM). **(b)** Zur Kontrolle der Aufreinigung wurden 1/40 der entnommenen Aliquots separat aufgetrennt und FLAG-Hfq (10,5 kDa) und FLAG-Ycf34 (12,3 kDa) im Western-Blot mit einem HRP-gekoppelten FLAG Antikörper nachgewiesen.

3.4.2 Hfq interagiert mit dem Protein Slr0845

Direkt unterhalb der leichten IgG Ketten und daher teilweise von diesen überlagert konnte nach einer Silberfärbung des 16 %-Tris-Tricine-SDS-Polyacrylamidgel eine weitere Bande in der FLAG-Hfq Elutionsfraktion detektiert werden. Nach einer Auftrennung durch eine 7,5 % Glycin-SDS-PAGE wurde deutlich, dass neben PilB1 ein weiteres Protein mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 20 kDa ausschließlich mit FLAG-Hfq co-aufgereinigt wurde (Abb. 17 a). Die massenspektrometrische Analyse ergab, dass es sich dabei um das Proteinprodukt des ORF *slr0845* (21,8 kDa) handelte. Die Funktion dieses als „*hypothetical*“ annotierten Proteins ist unbekannt. Auch eine Analyse der AS-Sequenz ergab keine Übereinstimmung mit konservierten Domänen (nicht gezeigt). Im Rahmen einer phylogenetischen Analyse von cyanobakteriellen Proteinen konnte gezeigt werden, dass Slr0845 in allen Vertretern der Klade B vorkommt, außerhalb der Cyanobakterien jedoch nicht konserviert ist (Gupta und Mathews, 2010).

Da keine Rückschlüsse auf die Proteinfunktion und die Auswirkungen einer möglichen Interaktion mit Hfq vorlagen, wurde *slr0845* durch die Insertion einer Km-Kassette in den

Leserahmen inaktiviert (Abb. 17 b) und die Motilität der resultierenden $\Delta slr0845$ Mutante untersucht. Ein Phototaxis-Assay ergab, dass drei unabhängige $\Delta slr0845$ Klone unter Weißlicht (Abb. 17 c), wie auch unter anderen Lichtbedingungen (nicht gezeigt) ein dem WT entsprechendes phototaktisches Verhalten zeigten. Ein Vergleich der genomischen Lokalisation von *slr0845* Homologen in Cyanobakterien ergab jedoch einen Hinweis auf eine mögliche Funktion des Proteins. In 42 von 58 cyanobakteriellen Genomen, die für ein Slr0845-Homolog kodieren²¹, ist der Leserahmen direkt stromabwärts von einem *pil*-Gencluster lokalisiert, der für Proteine der Pilusbasis kodiert (Abb. 17 d). Eine solche Organisation spricht dafür, dass Slr0845 eine Rolle innerhalb der Pilusbiogenese bzw. für die Regulation der Motilität spielt. Die mögliche Co-Expression von PilB- und Slr0845-Homologen in Cyanobakterien könnte auch ein Hinweis darauf sein, dass die beiden Proteine miteinander interagieren und in der hier durchgeführten Co-Immuno-präzipitation Slr0845 durch eine Assoziation mit PilB1 nur indirekt mit Hfq aufgereinigt wurde. Auf Grund dieser Überlegung und des motilen Phänotyps der $\Delta slr0845$ Mutante scheint eine essentielle Rolle von Slr0845 für die Hfq-Funktion unwahrscheinlich. Das Protein wurde daher in dieser Arbeit nicht weiter untersucht.

²¹ BLAST Suche mit E-value von $1e^{-20}$ als Toleranzgrenze gegen Integrated Microbial Genomes (IMG) Datenbank (Stand 20.03.14)

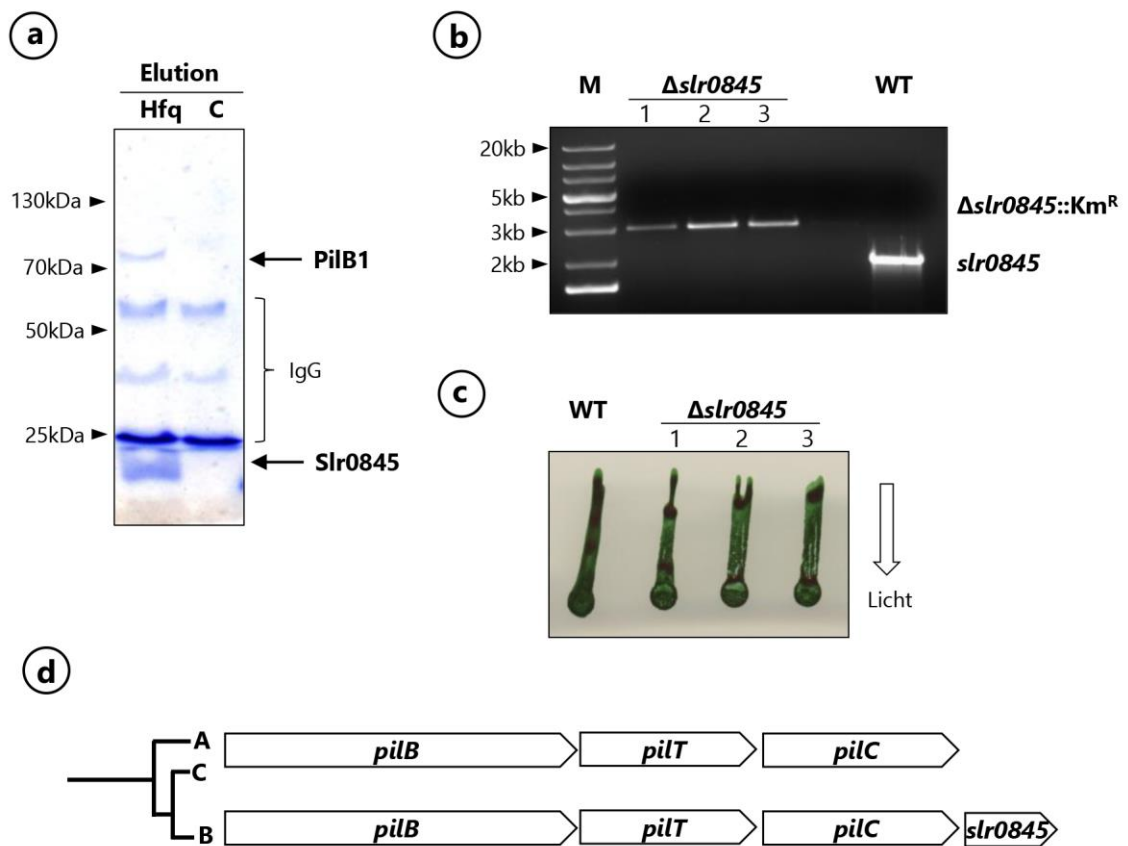


Abb. 17: Co-Immunopräzipitation von Slr0845 mit FLAG-Hfq und Inaktivierung von *slr0845*. (a) 1/4 der Affinitätsmatrix aus dem in 3.4.1 beschriebenen Co-Immunopräzipitationsexperiment wurde in einer 7,5 % Glycin-SDS-PAGE aufgetrennt und Proteine wurden durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Als Größenstandard diente ein *Prestained Protein Marker VI* (APPLICHEM) (b) PCR-Produkte (Primer: sll1533-fw/ sll0823-rev) aus drei Klonen von $\Delta slr0845$ und des WT auf einem ethidiumbromidgefärbten 0,8 % Agarosegel zum Nachweis der vollständigen Segregation. (c) Phototaxis-Assay der $\Delta slr0845$ Klone unter unidirektionalem Weißlicht. (d) Schematische Darstellung der Konservierung und der typischen Lokalisation von *slr0845* innerhalb des putativen *pilB-pilT-pilC*-Operons in den verschiedenen cyanobakteriellen Kläden.

3.5 Die Hfq-PilB1-Interaktion

Yoshihara *et al.* (2001) zeigten, dass PilB1 essentiell für die Biogenese von T4P in *Synechocystis* ist. Eine $\Delta pilB1$ Mutante war nicht motil und konnte keine Pili an der Zelloberfläche ausbilden. In Anbetracht der beobachteten Interaktion zwischen Hfq und PilB1 könnten daher der Verlust der Motilität und der Pili in der Δhfq Mutante auf einen Einfluss von Hfq auf die PilB1-Funktion zurückgeführt werden. Aus diesem Grund wurde die Interaktion der beiden Proteine ausführlicher untersucht.

3.5.1 PilB1 besitzt eine konservierte putative Zink-Finger Domäne am C-Terminus

Um Anhaltspunkte für den Mechanismus der PilB1-Hfq-Interaktion zu finden, wurde die Struktur von PilB1 durch eine vergleichende Sequenzanalyse genauer charakterisiert. Dafür wurde zunächst die Struktur des Proteins mit Hilfe des Phyre² Webservers analysiert um den Domänenaufbau von PilB1 mit größtmöglicher Genauigkeit zu erfassen. Dies ermöglichte die Modellierung der AS 231-632 (confidence 100 %; coverage 55 %) auf Basis einer bekannten Kristallstruktur der T2S Sekretions-ATPasen EspE aus *Vibrio cholera* (Abb. 18 a, b). Ausgehend von diesem Modell erfolgte ein strukturbasierter Sequenzvergleich mit einer weiteren Sekretions-ATPase bekannter Struktur aus *Archaeoglobus fulgidus*. Erwartungsgemäß sind die an der ATP-Spaltung beteiligten Subdomänen N2 und C1 und speziell die charakteristischen Sequenzmotive, welche die Nukleotid-Bindetasche bilden, in PilB1 konserviert (Abb. 18 a). Ebenso sind alle vier Cysteine des für die PilB/GspE-Proteinfamilie typischen Metallkationen-koordinierenden C_M-Motivs vorhanden (Robien *et al.*, 2003). Dagegen weisen die Subdomänen N1 und C2 nur eine geringe Ähnlichkeit mit den homologen ATPasen auf. Insbesondere der verlängerte N-Terminus sowie die letzten 40 AS des C-Terminus weisen keinerlei Übereinstimmungen mit den anderen Sekretions-ATPasen auf. Auf Grund der zuverlässigen Modellierung der konservierten „Kern“-Domänen N2-C1 ist für PilB1 die Ausbildung einer hexameren Ringstruktur annehmbar, wie sie für homologe Proteine beschrieben wurde (Abb. 18 b). Dieser Ring würde über die N1-Domäne mit den integralen Membranproteinen des Translokationsapparates interagieren, während die C2-Domäne dem Cytoplasma zugewandt wäre.

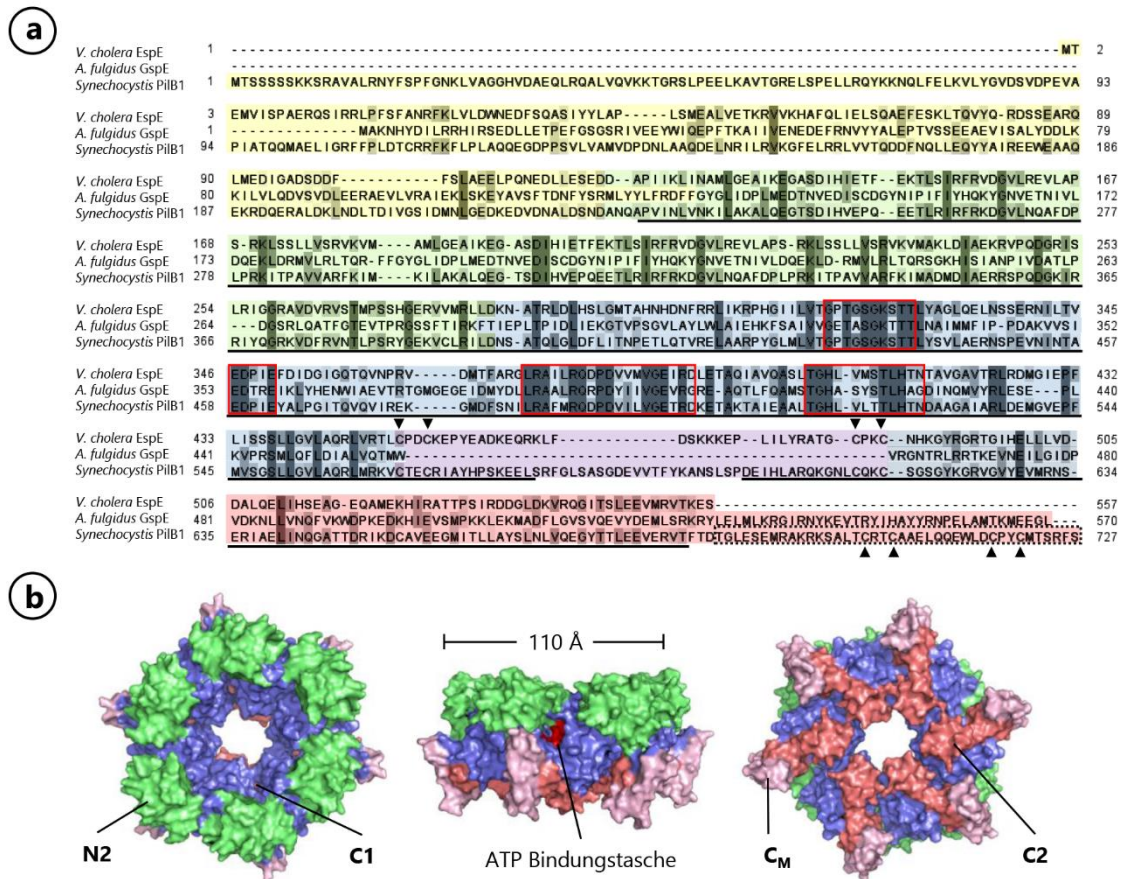


Abb. 18: Domänenaufbau und Strukturmodell von PilB1. Die Sekundär- und Tertiärstruktur von PilB1 wurde mittels Phyre2 modelliert und darauf aufbauend die Quartärstruktur mit PyMo1 visualisiert **(a)** Sequenzvergleich von PilB1 mit *Vibrio cholera* EspE (UniProt: P37093) und *Archaeoglobus fulgidus* GspE (UniProt: O29598). Das Sequenzalignment wurde anhand der berechneten Sekundärstruktur editiert. Subdomänen N1 (gelb), N2 (grün), C1 (blau), C_M (violett), C2 (rot); konservierte Sequenzmotive der ATP-Bindungstasche (rote Box); (Zink-)koordinierende Cysteine (schwarze Dreiecke) und die modellierten Sequenzabschnitte von PilB1 (schwarzer Unterstrich) sind hervorgehoben. **(b)** Modell von *Synechocystis* PilB1 auf Basis der hexameren Kristallstruktur von *V. cholera* EspE (PDB: 4KSR).

Die Suche nach PilB-Homologen²² innerhalb der Cyanobakterien und ein anschließender Sequenzvergleich (vgl. Schuergers *et al.* (2014)) zeigten, dass mit Ausnahme einiger obligat symbiontischer Spezies (*Prochloron didemni*, *Cyanobacterium* UCYN-A) und einiger mariner *Prochlorococcus* und *Synechococcus* Arten alle Spezies zumeist für ein PilB-Homolog kodieren. Während die N2-C1 Subdomänen der cyanobakteriellen PilB-Proteine ein hohes Maß an Konservierung aufweisen, unterscheiden sich die N1-Domänen der

²² PSI-BLAST – Als Startsequenzen dienten annotierte cyanobakterielle PilB-Homologe (Taxonomy ID: 1117; KEGG Orthology K02652) und als Toleranzgrenze ein E-value von 1e⁻⁷⁰.

Prochlorococcus und *Synechococcus* Arten grundlegend von denen anderer Cyanobakterien (Abb. 19). Mit Ausnahme der meisten Vertreter des Phylum *Prochlorococcus* beinhaltet die Subdomäne C2 in allen PilB-Homologen eine C-terminale Region von ca. 40 AS mit vier invariablen Cysteinen in einem CXXC-X₁₀-CPYC Motiv (Abb. 19, vgl. auch Abb. 18 a). Interessanterweise findet sich dieses Motiv in den Arten *Prochlorococcus* MIT 9303 und MIT 9313, die auch die einzigen beiden *Prochlorococcus*-Spezies sind, die für Hfq kodieren. Obwohl diese Region keine Homologie zu anderen bakteriellen Proteinen aufweist, ähnelt sie bekannten Zink-Finger-Motiven (Krishna *et al.*, 2003) und hat sehr wahrscheinlich eine Funktion in der Koordinierung eines Zn²⁺-Kation. Aus einem Vergleich der Konservierung von PilB und Hfq in Cyanobakterien (vgl. 3.3.2) ergibt sich somit ein Kookkurrenz von Hfq mit dieser putativen C-terminalen Zink-Finger-Domäne (Abb. 19).

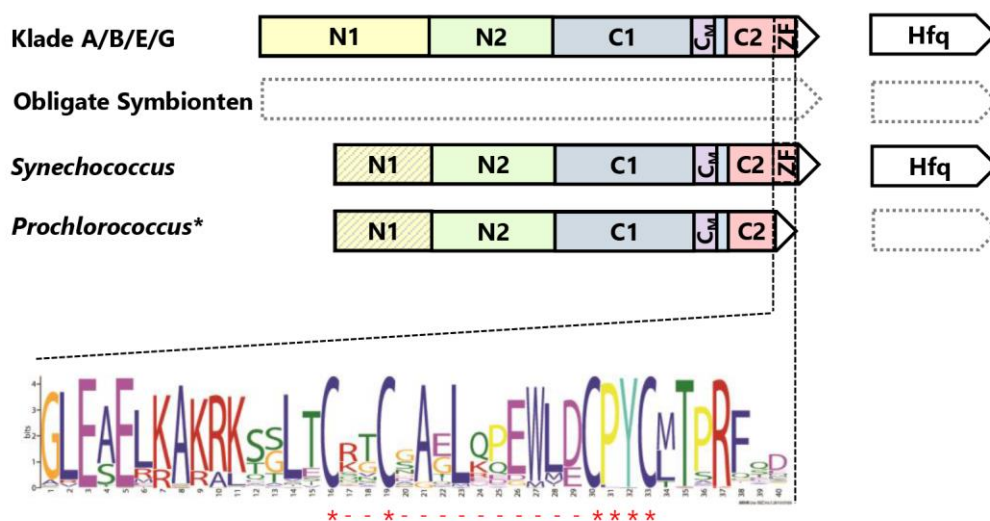


Abb. 19: Gleichzeitiges Auftreten von Hfq und einem putativen Zink-Finger Motiv in PilB1-Homologen. Konservierung von PilB1-Homologen in cyanobakteriellen Genomen wurden durch ein PSI-BLAST ermittelt und mit dem Vorkommen von Hfq-Homologen verglichen. Die Domänen sind analog zu Abb. 18 eingefärbt. Das Sequenzmotiv wurde mit MEME erstellt. Die CXXC-X₁₀-CPYC Sequenz ist durch rote Symbole hervorgehoben. (*) Die Konservierung von PilB1 und Hfq in den Stämmen MIT9303 und MIT9313 entspricht den *Synechococcus*-Arten.

3.5.2 Hfq bindet direkt an die putative Zink-Finger Domäne

Die Co-Immunoprecipitation von PilB1 mit Hfq lässt sich nicht zwangsläufig auf eine direkte Interaktion zurückführen. Ebenso könnte sie durch einen weiteren Interaktionspartner wie z.B. Slr0845 in einem Multiproteinkomplex vermittelt werden. Um eine direkte Interaktion zu bestätigen und die beteiligten Interaktionsflächen einzugrenzen, wurde die Assoziation von Hfq und PilB1 daher in einem Y2H-System genauer charakterisiert. Basierend auf strukturellen und funktionellen Überlegungen sollten dabei insbesondere die Bedeutung der putativen Zink-Finger-Domäne von PilB1 und des proximalen äußeren Rings von Hfq aufgeklärt werden. Diese Untersuchungen erfolgten in Zusammenarbeit mit Dr. Satoru Watanabe (Department of Bioscience, Tokyo University of Agriculture, Japan).

Dazu wurden WT Hfq und die zuvor beschriebenen nicht-funktionellen Hfq-Varianten (siehe 3.3.4) als *prey* Proteine und verschiedene Domänen von PilB1 als *bait* Proteine eingesetzt. Neben der N-terminalen Domäne (PilB1-N; AS 1-366) und der C-terminalen Domäne (PilB1-C; AS 267-627) wurden ein Fragment mit der kleinen, putativen Zink-Finger-Finger Domäne (PilB1-C2^{ZF}; 633-627) sowie eine mutierte Variante dieser Domäne (PilB1-C2^{ZFM}) kloniert (Abb. 20 a). In dieser Variante wurden alle vier Cysteine gegen Alanin ausgetauscht, so dass die angenommene Fähigkeit zur Koordination eines Metallkations verloren geht. Als Positivkontrolle wurde zusätzlich Hfq, welches in Form der Hexameruntereinheiten bekanntermaßen mit sich selber interagiert, als *bait* Protein genutzt.

In dem hier verwendeten Y2H-System wurde zuerst das Wachstum von diploiden Hefezellen auf Selektionsmedium ohne Tryptophan (Trp) und Leucin (Leu) getestet. Dies diente der Kontrolle der erfolgreichen Kreuzung der haploiden Hefestämme (*leu⁻*, *trp⁻*), welche zuvor mit den pGAD424-basierten *prey*-Vektoren (*leu2*) oder pGBTK-basierten *bait*-Vektoren (*trp1*) transformiert wurden. Selektives Wachstum auf Medium, dem zusätzlich Adenin (Ade) fehlte, zeigt dagegen eine Interaktion der entsprechenden *bait* und *prey*-Fusionsproteine an, da eine solche die Expression von *ade2* über das räumliche Zusammenbringen der fusionierten Gal4-Aktivierungsdomäne und der Gal4-DNA-Bindedomäne aktiviert. Um die Autoaktivierung von *ade2* auszuschließen, wurden zusätzlich Hefestämme eingesetzt, welche lediglich mit einem „Leervektor“ transformiert wurden.

Zuerst wurde die Interaktion von Hfq mit den verschiedenen *bait* Proteinen getestet (Abb. 20 b). Erwartungsgemäß konnte eine Interaktion von Hfq-Monomeren untereinander festgestellt werden. Darüber hinaus war klar erkennbar, dass Hfq direkt mit der C-terminalen Domäne von PilB1 interagiert, während keine Interaktion mit der N-terminalen Domäne festgestellt werden konnte. Im Besonderen konnte gezeigt werden, dass die putative Zink-Finger-Domäne für die Interaktion ausreichend ist und der Austausch der konservierten Cysteine zu einem Ausbleiben der Interaktion mit Hfq führt.

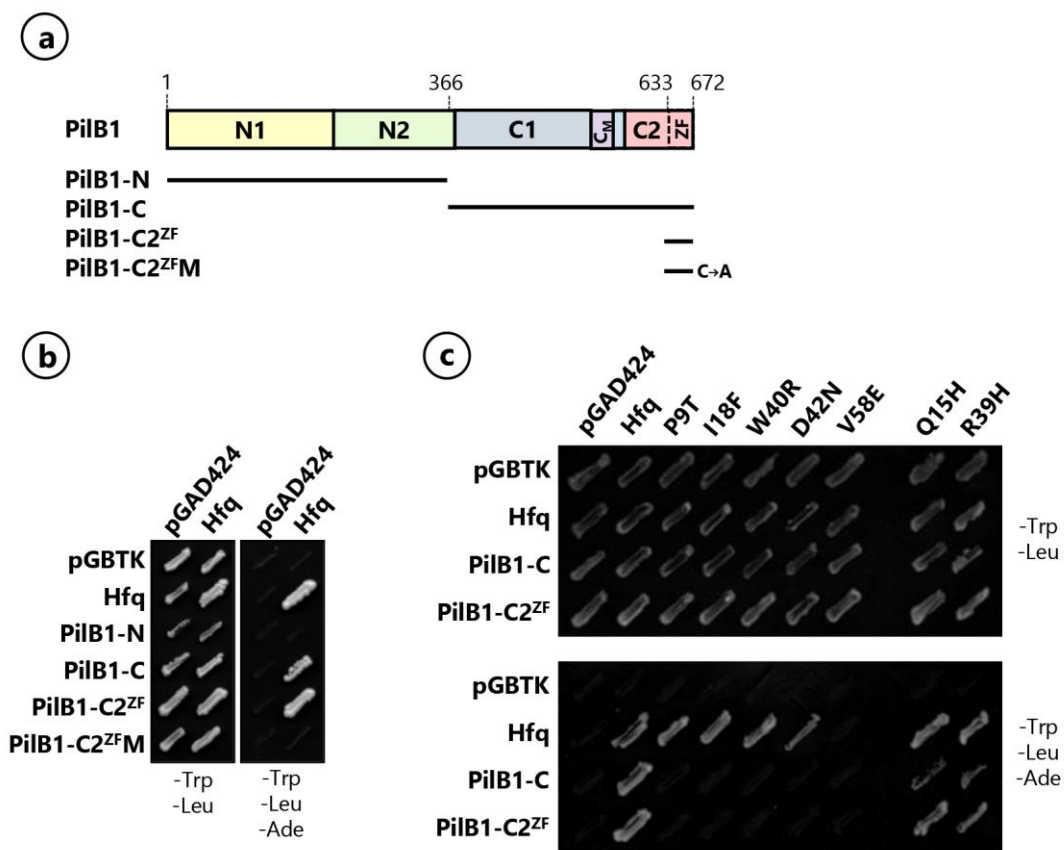


Abb. 20: Y2H-Analyse der Hfq-PilB1-Interaktion. (a) Schematische Darstellung der PilB1-Domänen, die als *bait*-Proteine eingesetzt wurden. **(b)** Y2H-Analyse der Interaktion von Hfq mit den verschiedenen PilB1-Domänen und anderen Hfq-Untereinheiten. Selektives Wachstum von diploiden Hefestämmen, die *prey*- und *bait*-Vektoren (pGAD424 und pGBTK) enthielten, erfolgte bei 30°C auf SC-Medium ohne Tryptophan (Trp) und Leucin (Leu). Zum Test der spezifischen Interaktion wurde zusätzlich Adenin (Ade) weggelassen. **(c)** Protein-Protein-Interaktion von nicht-funktionellen Hfq-Varianten mit WT Hfq und C-terminalen PilB1-Domänen wie oben beschrieben.

Nachfolgend wurde untersucht, ob die nicht-funktionellen Hfq Varianten weiterhin zu Multimeren assoziieren oder ob ihrer Fähigkeit zur PilB1-Bindung beeinträchtigt ist. Wie in Abb. 20 c zu sehen ist, beeinflussen die AS-Austausche P9T, Q15H, I18F, R39H, W40R und D42N nicht die Interaktion mit WT Hfq. Daher kann angenommen werden, dass diese Hfq-Varianten stabil exprimiert werden und die entsprechenden AS unerheblich für die Hexamerbildung sind. Gegensätzlich verhält sich die Mutation V58E, die zu einem Verlust der Interaktion der Untereinheiten führt. Dies könnte auf eine verminderte Stabilität dieser Hfq-Variante zurückzuführen sein. Der Verlust der Interaktion steht allerdings auch in Einklang mit der strukturellen Funktion des Sm2-Sequenzmotives (zu welchem V58 beiträgt) bei der Multimerisierung der SM Proteine (vgl. 1.3.1). Die Analyse der Interaktion mit PilB1 ergab, dass mit Ausnahme der Mutanten R39H und Q15H keine der Hfq-Varianten an PilB1-C, oder PilB1-C^{ZF} binden. Da abgesehen von V58E eine ausreichende Proteinexpression für alle Hfq-Varianten angenommen werden kann, ist ein direkter Einfluss der Mutationen P9T, I18F, W40R und D42N auf die Interaktion nahelegend.

Zusammengenommen konnten durch die Y2H-Analyse die bereits durch Co-Immuno-präzipitation nachgewiesene Hfq-PilB1-Interaktion validiert und eine direkte Interaktion belegt werden. Darüber hinaus zeigte sich, dass die putative Zink-Finger-Domäne von PilB1 als „Minimalfragment“ ausreichend für die Interaktion ist. Zugleich sind konservierte, für die Funktion relevante AS auf der proximalen Hfq-Oberfläche an der Interaktion beteiligt.

3.6 Subzelluläre Lokalisation von Hfq

Die Lokalisation einzelner Proteine ist oftmals von funktioneller Bedeutung, und es zeigte sich in einigen neueren Studien, dass dies auch auf Hfq zutreffen könnte (vgl. 1.3.3). Da über die subzelluläre Verteilung von Hfq in *Synechocystis* bisher keine Erkenntnisse vorlagen, wurde die Lokalisation durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen ermittelt. Die hier gezeigten konfokalen Aufnahmen entstanden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Conrad Mullineaux (School of Biological and Chemical Sciences, Queen Mary University of London, Großbritannien).

3.6.1 Hfq lokalisiert an der Zellperipherie

Die Y2H Analysen wiesen auf eine wichtige Rolle von AS auf der proximalen (N-terminalen) Seite des Hfq-Hexamers für die Hfq-PilB1-Interaktion hin (vgl. 3.5.2). Da das ~27 kDa große eYFP-Protein die Interaktion mutmaßlich beeinträchtigen könnte, wurden daher N- und C-terminal eYFP-fluoreszenzmarkierte Hfq-Proteine über die konjugativen Vektoren (pVZ-eYFP-Hfq und pVZ-Hfq-eYFP) in die Δhfq Mutante eingebracht und überexprimiert.

Zunächst wurde überprüft ob die Fusionsproteine den Phänotyp der Δhfq Mutante komplementieren konnten. In einem Phototaxis-Assay zeigte der Stamm phototaktische Motilität, der das C-terminale Hfq-eYFP Fusionsprotein exprimierte, während das N-terminale eYFP-Hfq Fusionsprotein die Motilität nicht wiederherstellen konnte (Abb. 21 a). In Übereinstimmung hiermit ergab eine Northern Blot Analyse, dass die Akkumulation der sRNA Hpr8 sowie ihres putativen Prozessierungsprodukts lediglich in Δhfq x Hfq-eYFP mit dem WT vergleichbar ist (Abb. 21 b). Die Transkriptakkumulation im Stamm Δhfq x eYFP-Hfq gleicht dagegen derjenigen der Δhfq Mutante. Anschließend wurden Zellen, die auf Phototaxisplatten angezogen wurden, mit einem konvokalen Fluoreszenzmikroskop analysiert. Es konnte in beiden Stämmen intensive eYFP Fluoreszenz beobachtet werden (Abb. 21 c). Dies verdeutlicht, dass das N-terminale eYFP-Hfq Protein exprimiert wird, aber nicht funktionell ist. Bemerkenswerterweise zeigt das funktionelle Hfq-eYFP Protein eine distinkte Lokalisation in Form von Punkten erhöhter Fluoreszenz entlang der Zellperipherie. Zusätzlich wurde in vielen Zellen ebenfalls an der Zellperipherie ein einzelner Fleck hoher Intensität beobachtet. Dagegen konnten nur minimale Fluoreszenzsignale im Cytoplasma detektiert werden. Im Gegensatz dazu war im Stamm Δhfq x eYFP-Hfq eine intensive, gleichmäßige Fluoreszenzverteilung im Cytoplasma sichtbar. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass Hfq in *Synechocystis* an oder nahe der bakteriellen Zellhülle lokalisiert ist. Ferner korreliert der Verlust der spezifische Lokalisation durch einen N-terminalen eYFP-tag mit dem Verlust der Motilität und der korrekten Prozessierung der sRNA Hpr8.

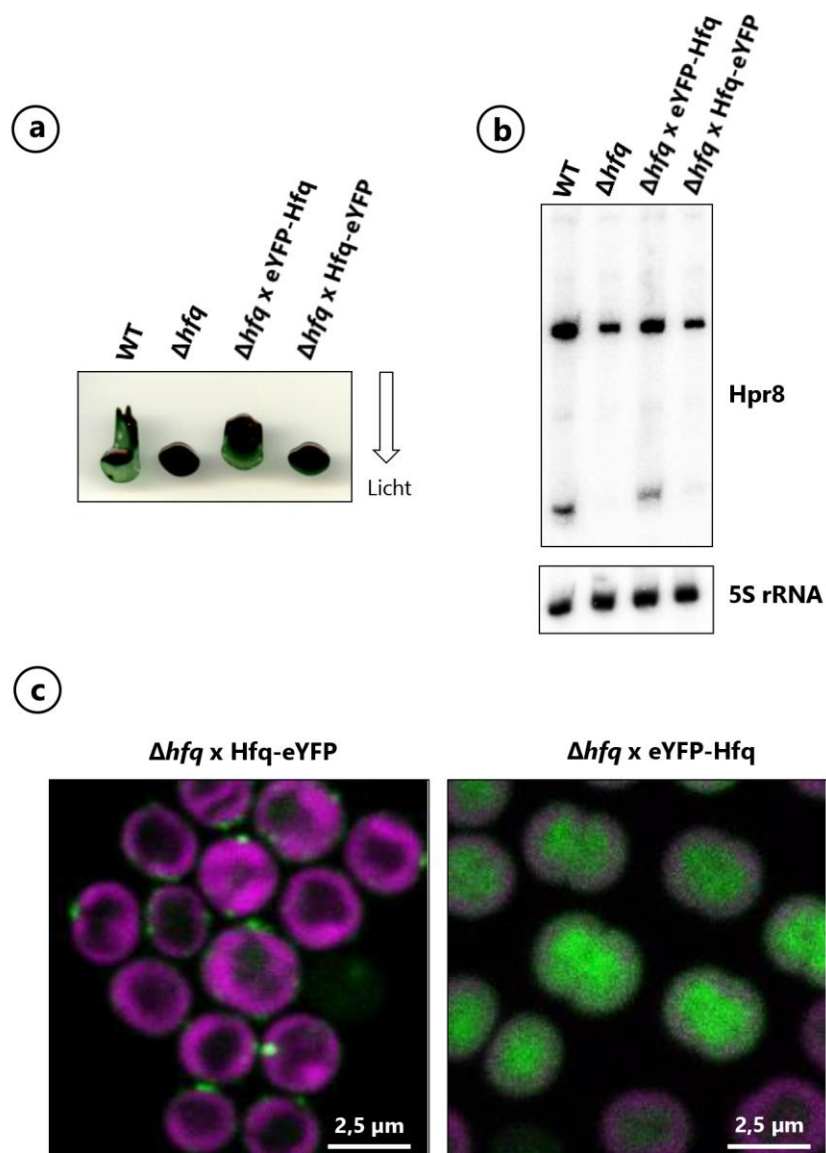


Abb. 21: Komplementation der Δhfq Mutante mit N- und C-terminalen eYFP-fluoreszenzmarkierten Hfq-Proteinen und ihre subzelluläre Lokalisation. Für die Überexpression der N-terminalen (eYFP-Hfq) und C-terminalen (Hfq-eYFP) Fusionsproteine wurden die Versuche jeweils mit Cu^{2+} -freiem Medium durchgeführt. **(a)** Nur Hfq-eYFP komplementiert den nicht-motilen Phänotyp der Δhfq Mutante im Phototaxis-Assay. **(b)** Northern Blot Analyse mit radioaktiv markierter Hpr8-Sonde nach Auftrennung von 10 μg Gesamt-RNA durch eine 10 % Harnstoff-PAGE. Eine Hybridisierung mit einer 5S rRNA diente zur Ladekontrolle. **(c)** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zeigen die subzelluläre Lokalisation der Fusionsproteine. Hierfür wurden Zellen von BG11-Festmedium in frischem BG11 verdünnt, auf einen Agaroseblock aufgetropft und direkt mikroskopiert. Chlorophyll Fluoreszenz ist in magenta und eYFP-Fluoreszenz in grün dargestellt.

3.6.2 Die PilB1-Interaktion ist essentiell für die Lokalisation und Funktion von Hfq

PilB-Homologe in anderen Prokaryoten erfüllen ihre Funktion über die Bindung an ein integrales Membranprotein der Cytoplasmamembran (PilC-Homologe), welches die Basis des entsprechenden T4P oder T2SS bildet (Korotkov *et al.*, 2012). Die spezifische Lokalisation von Hfq an der Zellperipherie könnte in Anbetracht der gezeigten Hfq-PilB1-Interaktion somit auf eine PilB1-vermittelte Bindung von Hfq an die Pilusbasis hindeuten. In einem solchen Fall wäre die Lokalisation von Hfq direkt von PilB1 abhängig. Um dieser Hypothese nachzugehen, wurde in dem Stamm Δhfq x Hfq- eYFP der *pilB1* Locus durch Insertion einer Zeomycin-Resistenzkassette inaktiviert und der Stamm auf eine veränderte Hfq-Lokalisation untersucht (Abb. 22 a).

Tatsächlich zeigen fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen, dass die intrazelluläre Verteilung des Hfq-eYFP-Fusionsproteins in Form von kleinen Punkten entlang der Zellmembran im Stamm $\Delta pilB1/\Delta hfq$ x Hfq- eYFP nicht mehr nachweisbar ist. Stattdessen ist die gesamte eYFP-Fluoreszenz pro Zelle fast ausschließlich in einem einzelnen Fleck hoher Intensität konzentriert (der zumeist an der Zellperipherie lokalisiert). Die beobachtete Veränderung der Verteilung und Intensität der Fluoreszenzsignale wurde quantifiziert und ist statistisch hoch signifikant (Tab. 7). Demzufolge ist das Hfq-eYFP-Fusionsprotein zum einen PilB1-abhängig entlang der Zellperipherie lokalisiert, während es darüber hinaus PilB1-unabhängig aggregiert.

Es stellt sich weiterhin die Frage inwieweit sich die PilB1-Interaktion bzw. die damit verbundene Lokalisation auf die Hfq-Funktion auswirkt. Daher wurde die Hpr8-Akkumulation im Stamm $\Delta pilB1/\Delta hfq$ x Hfq- eYFP wie auch in einer $\Delta pilB1$ und einer $\Delta pilC$ Mutante untersucht. Letztgenannte wurde in die Analyse miteinbezogen, da PilB1 wahrscheinlich über PilC mit der Pilusbasis interagiert und die Membranlokalisation von PilB1 in einer $\Delta pilC$ Mutante vermutlich verloren ginge (siehe auch 1.2.3). Interessanterweise gleicht die Hpr8-Akkumulation in diesen Stämmen der Δhfq Mutante, und es konnte kein Prozessierungsprodukt detektiert werden (Abb. 22 b). Es scheint, als sei Hfq ausschließlich in Folge der PilB1-abhängigen Membranlokalisation befähigt, die Hpr8-Prozessierung und Akkumulation zu beeinflussen. Die PilB1-unabhängig aggregierte Form von Hfq-eYFP ist dagegen (zumindest in Bezug auf die Hpr8-Prozessierung) nicht

funktionell. Im Einklang mit der fundamentalen Rolle von PilB1 und PilC für die Pilusbiogenese zeigten diese Mutanten auch kein motiles Verhalten im Phototaxis-Assay (Abb. 22 c).

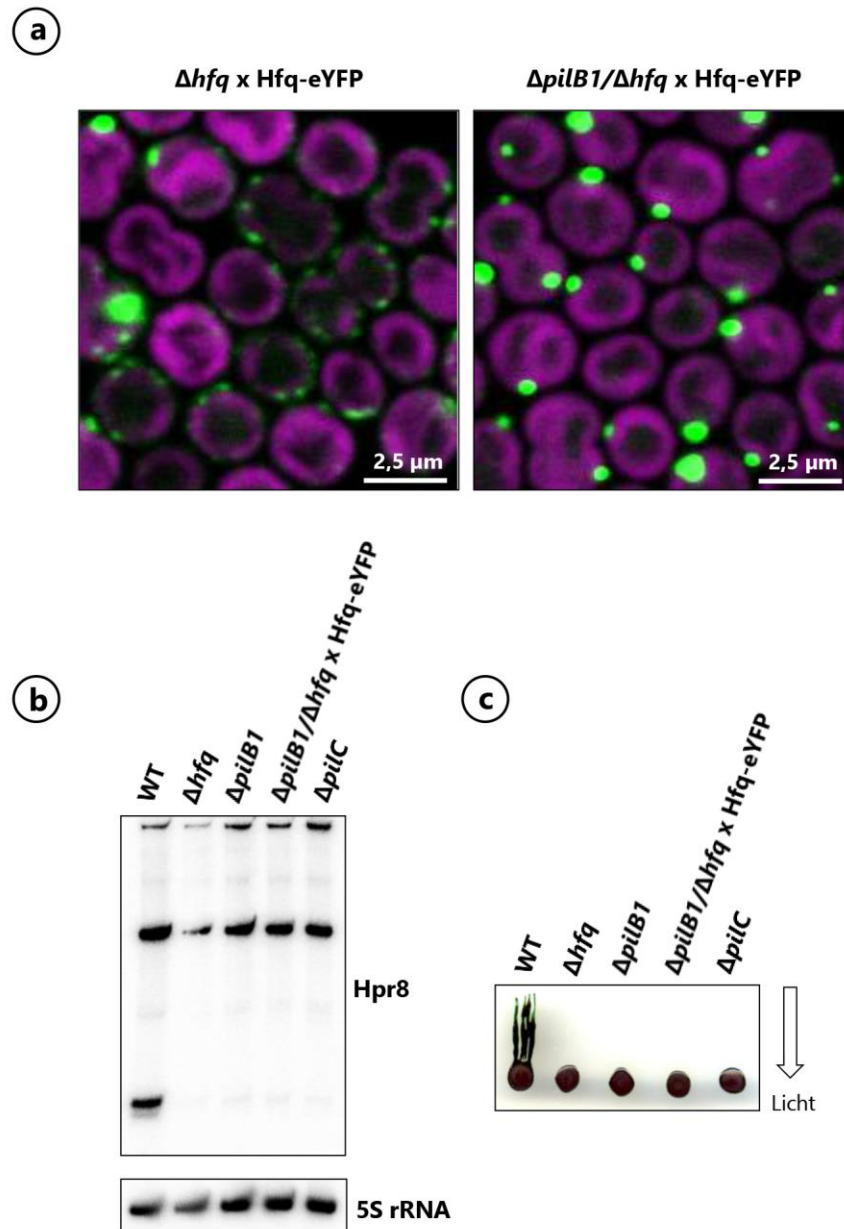


Abb. 22: Bedeutung der Hfq-PilB1-Interaktion für die Lokalisation und Funktion von Hfq. (a) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zeigen eine veränderte Lokalisation des Hfq-eYFP Fusionsproteins in einer $\Delta pilB1$ Mutante. Chlorophyll Fluoreszenz ist in magenta und eYFP-Fluoreszenz in grün dargestellt. (b) Northern Blot Analyse mit radioaktiv markierter Hpr8-Sonde nach Auftrennung von $10 \mu g$ Gesamt-RNA in einer 10 % Harnstoff-PAGE. Eine Hybridisierung mit einer 5S rRNA diente zur Ladekontrolle. (c) Phototaxis-Assay

Tab. 7: Fluoreszenzverteilung von Hfq-eYFP in Δhfq und $\Delta pilB1/\Delta hfq$. Durchschnittswerte und Standardabweichung. Es wurden jeweils 30+ Zellen ausgewertet. Der Intensitätswert im $\Delta pilB1$ -Stamm ist als Minimum anzusehen, da viele Signale gesättigt waren. Die Unterschiede sind in beiden Fällen signifikant (t-test, $p < 10^{-10}$)

Stamm	Punkte/Zelle	Intensität/Zelle
Δhfq x Hfq-eYFP	$3,3 \pm 2,1$	51 ± 41
$\Delta pilB1/\Delta hfq$ x Hfq-eYFP	$0,85 \pm 0,69$	$> 240 \pm 180$

3.6.3 AS des proximalen Rings sind essentiell für die Lokalisation

Um den Zusammenhang zwischen Funktion und Lokalisation von Hfq in *Synechocystis* genauer zu untersuchen, wurde die Lokalisation der nicht-funktionellen Hfq-Varianten analysiert. Dafür wurden die verschiedenen Hfq-Mutanten analog zum WT durch die Fusion eines C-terminalen eYFP-Proteins fluoreszenzmarkiert und in der Δhfq Mutante überexprimiert (vgl.3.6.1). Wie aus den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen hervorgeht, war die Lokalisation der mutierten Hfq Proteine in den Stämmen im Vergleich zum WT verändert (Abb. 23).

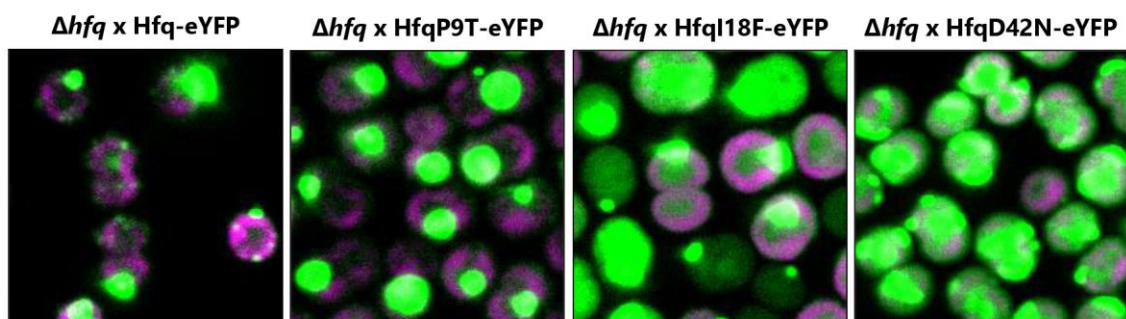


Abb. 23: Lokalisation der nicht-funktionellen Hfq-Varianten. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *in trans* exprimierten WT Hfq und Hfq-AS-Austauschmutanten mit einer C-terminalen eYFP Fusion in einem Δhfq Stamm. Die Zellen wurden auf BG11-Platten ohne Kupfer angezogen, um die Expression des Fusionsproteins zu induzieren. Chlorophyll Fluoreszenz ist in magenta und eYFP-Fluoreszenz in grün dargestellt.

Die im WT Hfq-Stamm beobachtete punktförmige Fluoreszenzverteilung entlang der Zellperipherie ist in den Mutanten P9T und I18F nicht mehr zu beobachten. Die Mutanten I18F und D42N zeigen zusätzlich eine intensive, gleichmäßige Fluoreszenzverteilung

im Cytoplasma. Dahingegen ist in der Mutante P9T nur ein einzelner Fleck hoher Intensität sichtbar. Ein Vergleich der Fluoreszenzverteilung zwischen der Mutante P9T (\emptyset Punkte = $1,06 \pm 0,33$ (SD, n = 71)) und WT Hfq (\emptyset Punkte = $3,69 \pm 2,44$ (SD, n = 78)) ähnelt stark den oben beschriebenen Unterschieden zwischen $\Delta pilB1$ und WT-Hfq.

3.6.4 Hfq und PilB1 zeigen eine Co-Lokalisation

Als weiteren Nachweis für die PilB1-vermittelte Bindung von Hfq an die Basis der T4P wurde die Lokalisation der beiden Proteine in einem Stamm untersucht, der neben Hfq-eYFP ein fluoreszenzmarkiertes PilB1-Fusionsprotein exprimiert. Dafür wurden zunächst ein WT Stamm mit dem Vektor pSK-sfGFP-PilB1 transformiert und in einem der resultierenden Transformanten das native *pilB1* Gen ausgeschaltet ($\Delta pilB1$ x sfGFP). Fluoreszenzaufnahmen belegten eine stabile Proteinexpression (nicht gezeigt). Mit einem Phototaxis-Assay konnte gezeigt werden, dass der Stamm motil und das Fusionsprotein daher funktionell war (Abb. 24 a). Dieser Stamm wurde daraufhin mit dem Vektor pVZ-HFq-eYFP transformiert. Da die Absorptions- und Emissionsmaxima der beiden Fluoreszenzproteine eYFP und sfGFP nahe beieinander liegen, wurde zunächst die Lokalisation der beiden Proteine PilB1-sfGFP und Hfq-eYFP in den Stämmen $\Delta pilB1$ x sfGFP, Δhfq x Hfq-eYFP und $\Delta pilB1$ x PilB1sfGFP x Hfq-eYFP getrennt visualisiert (Abb. 24 b). Im Ergebnis war unter den verwendeten Einstellungen eine klare Unterscheidung der Signale möglich. Der direkte Vergleich der Lokalisation im Stamm $\Delta pilB1$ x PilB1sfGFP x Hfq-eYFP ergab, dass beide Proteine entlang der Zellmembran lokalisieren und dass sich die Fluoreszenzsignale (im Rahmen des optischen Auflösungsvermögens) vielfach, aber nicht immer exakt überlappen (Abb. 24 c). Außerdem wurde deutlich, dass sich die Verteilung der eYFP-Fluoreszenzsignale in diesem Stamm von derjenigen im Stamm Δhfq x Hfq-eYFP unterscheidet. Eine wesentlich höhere Zahl schwacher Fluoreszenzsignale ist entlang der gesamten Membran verteilt, während gleichzeitig auch Fluoreszenz im Cytoplasma auszumachen ist.

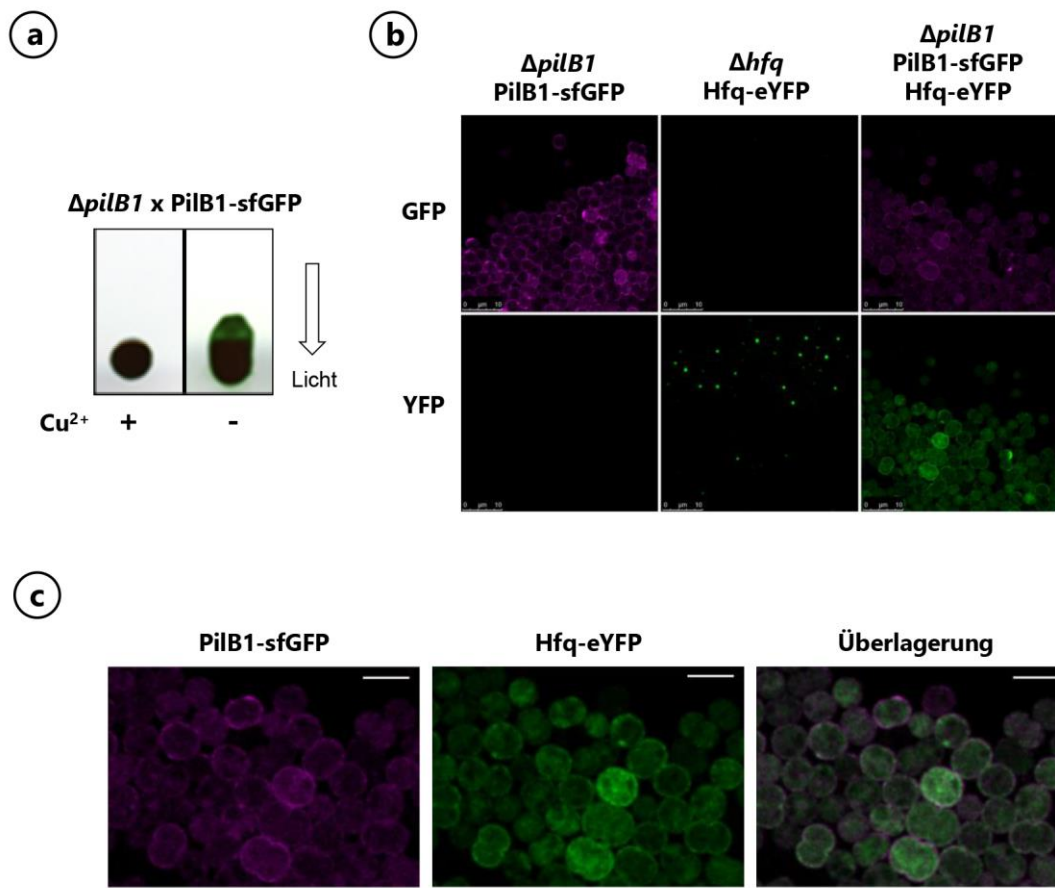


Abb. 24: Co-Lokalisation von PilB1-sfGFP und Hfq-eYFP. Für die Co-Expression der fluoreszenzmarkierten Fusionsproteine wurde ein $\Delta pilB1$ Stamm mit pSK-PilB1-sfGFP komplementiert und anschließend mit pVZ-hfq-eYFP transformiert. **(a)** Das PilB1-sfGFP Fusionsprotein, welches unter Kontrolle des Kupfer-reprimierbaren *petJ*-Promotors steht, ist funktionell und komplementiert die $\Delta pilB1$ Mutante im Phototaxis-Assay ($Cu^{2+} = 0,3 \mu M CuSO_4$) **(b)** Getrennte Visualisierung von PilB1-sfGFP und Hfq-eYFP ist unter den gewählten Einstellungen möglich (GFP Anregung: 488 nm, Emission: 503-515 nm; YFP Anregung: 514 nm, Emission: 520-540 nm) **(c)** Co-Lokalisation von PilB1-sfGFP und Hfq-eYFP, die in einem $\Delta pilB1$ Stamm exprimiert wurden.

4 Diskussion

Ursprüngliches Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung des Hfq-Proteins aus *Synechocystis* bezüglich seiner postulierten Funktion für die posttranskriptionelle Regulation der phototaktischen Motilität. Dafür sollten Hfq-abhängige sRNAs identifiziert und der Mechanismus der RNA-Bindung durch die atypische Oberfläche des Hfq-Hexamers aufgeklärt werden. Während der Nachweis einer Hfq-RNA-Interaktion nicht gelang, stellte sich im Verlauf der Arbeit jedoch heraus, dass Hfq mit der Sekretions-ATPase PilB1 interagiert und diese Assoziation essentiell für die Hfq-abhängige Transkriptakkumulation und Motilität ist. Auch wenn eine negative Beweisführung naturgemäß schwierig ist, soll hier unter anderem mit Einbeziehung vorläufiger experimenteller Ergebnisse ausführlicher diskutiert werden, warum (i) die Hfq-abhängige Transkriptakkumulation nicht geeignet ist, den Defekt der Pilusbiogenese einer *Synechocystis* Δhfq Mutante zu erklären und (ii) Hfq vermutlich keine direkte Rolle für die posttranskriptionelle Regulation der Genexpression spielt. Darüber hinaus soll (iii) ein Modell vorgestellt werden, das den Phänotyp der Δhfq Mutante auf Basis der Hfq-PilB1-Interaktion erklären kann.

4.1 Das Hfq-Regulon

4.1.1 Zwei putative sRNAs und CRISPR/Cas-Loci werden Hfq-abhängig reguliert

Eine neue Microarray-Analyse sollte – angesichts der umfangreiche Abdeckung des gesamten Transkriptoms von *Synechocystis* – vor allem helfen, weitere Hfq-abhängige sRNAs zu identifizieren. Ein Vergleich der Ergebnisse mit den Daten von Dienst *et al.* (2008; 2010) zeigt eine hohe Übereinstimmung der Microarray-Analysen in Bezug auf die negativ regulierten chromosomalen mRNAs. So wurden mit Ausnahme des (wahrscheinlich) polycistronischen *sll1239-sll1241* Transkripts alle von Dienst experimentell als Hfq-

abhängig verifizierten mRNAs unabhängig identifiziert²³. Umgekehrt wurden mit Ausnahme der *slr0226*-mRNA alle Transkripte mit einer FC < -1,5 auch in den vorausgegangenen Analysen als differentiell akkumulierend erkannt. Dabei war die relative Abnahme der mRNA-Abundanz mit den vorliegenden Werten vergleichbar. Dies spricht für eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und einen stabilen Einfluss von Hfq auf die Transkriptakkumulation während der untersuchten logarithmischen Wachstumsphase. Da keine Übereinstimmung bei der Hfq-abhängigen Anreicherung, d.h. positiven Regulation von Transkripten festzustellen war, muss im Umkehrschluss angenommen werden, dass diese auf unspezifische Schwankungen der Genexpression oder Transkriptstabilität zurückzuführen sind. Dafür spricht auch, dass (i) nur eine geringe Anzahl von Transkripten betroffen war, (ii) die positiven Änderungen der RNA-Mengen vergleichsweise gering ausfielen und (iii) für die meisten mRNA Transkripte nur einzelne Sonden eine signifikante Änderung aufwiesen.

Obwohl das verwendete neue Microarray-Design Sonden für weit über 100 putative sRNAs beinhaltet, wurden lediglich Hpr8 und Hpr11 als differentiell akkumulierend erkannt. Zusammen mit den bereits beschriebenen sRNAs Hpr1 und Hpr3 lassen sich somit gerade einmal vier sRNAs mit Hfq in Verbindung bringen. Für *E. coli* werden in der Literatur hingegen regelmäßig ungefähr 30 % der ca. 100 bekannten sRNAs als Hfq-abhängig beschrieben. Allerdings muss bedacht werden, dass in vielen Bakterien wie z.B. *E. coli*, *Rhodobacter sphaeroides* und *Listeria monocytogenes* Hfq-abhängige sRNAs oftmals an der Regulation der Stressantwort beteiligt sind (Christiansen *et al.*, 2004; Guisbert *et al.*, 2007; Berghoff *et al.*, 2011). Insofern könnte die geringe Zahl der in *Synechocystis* identifizierten Hfq-abhängigen sRNAs darauf zurückzuführen sein, dass die Transkriptakkumulation unter Standardbedingungen in der logarithmischen Wachstumsphase untersucht wurde. Allerdings konnte für *Synechocystis* die Assemblierung von T4P unter

²³ Es muss aber darauf hingewiesen werden, dass die Sonden für *sll1239-sll1241* zusammengenommen eine FC von -1,25 zeigten, aber bedingt durch größere Abweichung innerhalb der Replikate (p-Werte > 0,3) nicht in die Auswertung einfließen. Die *Microarray*-Daten widersprechen somit nicht den früheren Ergebnissen.

vergleichbaren Bedingungen gezeigt werden (Bhaya *et al.*, 2000), während eine Δhfq Mutante augenscheinlich auch unter diesen Bedingungen nicht piliert ist²⁴. Entsprechend sollte eine sRNA mit einer Relevanz für die Pilusbiogenese auch unter den gewählten Bedingungen exprimiert werden. Eine vorläufige Untersuchung von *hpr11* Mutanten²⁵ und von Frau Olga Siadat (AG Wilde, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg) durchgeführte, bisher nicht veröffentlichte Experimente mit *hpr8* Mutanten ergaben allerdings, dass weder die Deletion, noch die Überexpression dieser sRNAs die Pilusbiogenese grundlegend beeinträchtigten. Gleichfalls erbrachte eine bioinformatische Analyse der möglichen Ziel-mRNAs keinen Hinweis auf eine Interaktion mit Transkripten, welche an der Regulation des phototaktischen Verhaltens beteiligt sind²⁶. Obwohl kein Co-Transkript von *hpr8* und dem stromabwärts gelegenen *lsiR* detektiert werden konnte (Abb. 8 c), zeigten die Versuche von Frau Olga Siadat dennoch, dass für Hpr8 eine Funktion als *cis*-regulatorisches Element dieses UV- bzw. Starklicht-abhängigen Regulators der negativen Phototaxis wahrscheinlich ist (vgl. auch 1.2.4). Eine mögliche Funktion von Hpr11 ist dagegen nicht bekannt.

Insbesondere unter Berücksichtigung des hohen Expressionsniveaus der CRISPR2- und CRISPR3-Loci im WT (Scholz *et al.*, 2013), stellt die Hfq-abhängige Regulation der beiden CRISPR/Cas-Systeme vom Subtyp III eine der wesentlichen Veränderungen auf Transkriptionsebene dar. Interessanterweise sind in beiden Systemen sowohl die crRNAs als auch mit diesen assoziierte *cas* Gene in der Δhfq Mutante herunterreguliert. Der CRISPR1-Locus vom Subtyp I-D ist dagegen vermutlich nicht betroffen. Im Northern Blot konnte zwar eine leicht erhöhte Akkumulation von *repeat* Sequenzen der prä-crRNAs festgestellt werden. Dies wurde aber nicht durch die Microarray Daten bestätigt und hatte auch keinen Effekt auf die Akkumulation der reifen crRNAs.

²⁴ Dies wurde nicht mikroskopisch nachgewiesen. Die Mutante ist aber gerade auch in der logarithmischen Wachstumsphase nicht transformierbar. Ebenso wie in anderen nicht pilierten Mutanten aggregiert ein durch Zentrifugation gewonnenes Zellpellet von Δhfq aus der logarithmischen Wachstumsphase im Gegensatz zum WT nicht.

²⁵ Die veränderte Transkriptakkumulation der untersuchten Deletions- und Überexpressorstämme wurden noch nicht durch Northern-Blot-Analysen bestätigt.

²⁶ Es wurde eine *target prediction* mit IntaRNA (<http://rna.informatik.uni-freiburg.de/IntaRNA/Input.jsp>) durchgeführt. Diese lässt Rückschlüsse auf thermodynamisch bevorzugte RNA-RNA Interaktionen zu.

Die unveränderte Akkumulation der *leader*- und *direct-repeat* Sequenzen von CRISPR2 im Northern Blot belegen, dass das Transkriptionsniveau des entsprechenden CRISPR Locus nicht reguliert wird. Das Fehlen der ca. 40 nt großen C2S6 crRNA Bande spricht vielmehr dafür, dass die Prozessierung bzw. die Stabilisierung der prä-crRNA Hfq-abhängig ist. Dies könnte auf eine direkte Rolle von Hfq bei der Reifung von crRNAs hinweisen. Es wurde jedoch in dem nachfolgenden Co-Immunopräzipitationsexperiment keine Bindung von C2S6 an Hfq nachgewiesen. Insofern scheint es wahrscheinlicher, dass die beobachtete Reduzierung der crRNA-Abundanz auf eine Hfq-abhängige Regulation der *cas* Gene zurückzuführen ist. Im Falle des CRISPR2-Locus könnten hierbei das putative *sll7067-sll7062* Operon eine Rolle spielen. Dieses kodiert u.a. für *cas10* und *cas7* (*csm3*-Typ) Homologe, was dafür spricht, dass die kodierten Proteine einen CASCADE-artigen Effektor Komplex (CSM) bilden, wie er für *Staphylococcus epidermidis* und *Sulfolobus solfataricus* beschrieben wurde (Hatoum-Aslan *et al.*, 2011; Rouillon *et al.*, 2013). Von *S. solfataricus* ist bekannt, dass dieser CSM-Komplex an der Reifung der crRNAs beteiligt ist und dass die Inaktivierung einiger beteiligter *cas* Gene die weitere Prozessierung einer 71nt prä-crRNA verhindert (Hatoum-Aslan *et al.*, 2011). Ein gleichartiger Prozessierungsdefekt in der *Synechocystis* Δhfq Mutante würde das im Northern Blot beobachtete Bandenmuster erklären.

Im Falle des CRISPR3-Locus kann eine Hfq-abhängige Regulation der Transkription der langen prä-crRNA nicht ausgeschlossen werden, da neben der crRNAs auch die Akkumulation der *repeat* Sequenzen verringert war. Die Abwesenheit der ca. 50 nt C3S15 Bande (Abb. 9 b) weist aber darauf hin, dass die Prozessierung oder Stabilisierung der crRNAs ebenfalls betroffen ist. Ähnlich wie für CRISPR2 könnten auch hier die assoziierten, Hfq-abhängigen *cas* Gene *sll7090-sll7085* (*cmr2-cmr6*) – die in diesem Fall wahrscheinlich für einen, dem CSM-Komplex analogen CMR-Effektor-Komplex kodieren (Cocozaki *et al.*, 2012)– für diese Prozessierung verantwortlich sein. So konnten bereits Scholz *et al.* (2013) zeigen, dass die Akkumulation der CRISPR3 prä-RNA und ihrer Prozessierungsprodukte in einer $\Delta cmr2$ Mutante stark verringert war.

Im Zusammenhang mit der differenziellen Transkriptakkumulation der Δhfq Mutante muss auch erwähnt werden, dass dieselbe Gruppe von Genen regelmäßig auch in anderen nicht-motilen Mutanten negativ reguliert war (Daten nicht gezeigt). Zumindest

im Falle des in unserer Arbeitsgruppe analysierten nicht-motilen *Synechocystis* GT-Stamms kann dies nicht auf eine Mutation des *hfq* oder *sycrp1* Locus zurückgeführt werden (Trautmann *et al.*, 2012). Es ist wahrscheinlich, dass verschiedene Mutationen in den betroffenen Stämmen die Assemblierung des T4P-Apparats verhindern. Dies steht in Einklang mit dem beobachteten Defekt der Akkumulation von Hpr8 in einer $\Delta pilB1$ oder $\Delta pilC$ Mutante (Abb. 22 b) und spricht dafür, dass ein fehlerhafter Aufbau der Pilus-Basis das gesamte Hfq-Regulon negativ beeinflusst.

4.1.2 Hfq reguliert die Komposition von Zellfortsätzen

Ein Großteil der Hfq-regulierten Gene konnten bisher nicht mit spezifischen zellulären Funktionen in Verbindung gebracht werden. Anhand der unten aufgeführten Beispiele soll hier dargelegt werden, dass die Hfq-abhängigen Transkripte eine Rolle für den Aufbau der Zelloberfläche und des Gruppenverhaltens von *Synechocystis* spielen, aber im Gegensatz zu bestehenden Hypothesen wahrscheinlich nicht an der Pilusbiogenese beteiligt sind.

minor pilins

Neben der strukturellen Haupt-Untereinheit, dem *major pilin*, enthalten die meisten T4P in geringerer Anzahl sogenannte *minor pilins*, die die Funktion der T4P maßgeblich beeinflussen können (Brown *et al.*, 2010). Das bestimmende Sequenzmerkmal dieser Präpilin Proteine, die trotz großer struktureller Gemeinsamkeiten nur eine sehr geringe Sequenzkonservierung aufweisen, ist ihre charakteristische Signalsequenz. Diese ist durch einen positiv geladenen N-Terminus - als *leader peptide* bezeichnet -, eine konservierte Prepilinpeptidase-Schnittstelle ($G^{\wedge}FxxxE$)²⁷ sowie eine hydrophobe Transmembrandomäne gekennzeichnet (für eine umfassende Darstellung siehe Giltner *et al.*, 2012).

Unter den am stärksten reduzierten Transkripten in der Δhfq Mutante befindet sich das Operon *slr2015-slr2018*, dessen Proteinprodukte PilA9-PilA11 am N-terminus eine Präpilin-typische Signalsequenz aufweisen (Yoshihara und Ikeuchi, 2004). Sie sind neben

²⁷ Für die Prozessierung ist lediglich der Glycin-Rest (G) unabdingbar (Rawlings und Barrett, 1994). Phenylalanin (F) ist oftmals durch andere, zumeist aromatische AS substituiert und Glutamat (E) ist in manchen Präpilinen überhaupt nicht konserviert.

dem *major pilin* PilA1 die einzigen bekannten Präpiline, die für das phototaktische Verhalten essentiell sind (Bhaya *et al.*, 2000; Bhaya, Takahashi, Shahi, *et al.*, 2001; Yoshihara *et al.*, 2001). Es ist aber nicht beschrieben, ob sie einen Einfluss auf die Motilität von Einzelzellen haben²⁸. Da ihre Inaktivierung nicht zum Verlust der *thick pili* führten, kann eine Funktion für die Pilusbiogenese allerdings ausgeschlossen werden (Yoshihara und Ikeuchi, 2004).

Eine Sequenzanalyse ergab, dass die Hfq-abhängigen Gene *slr0442* und *slr0226*, wie auch das nicht durch Hfq regulierte *sll1268* Gen über weite Bereiche homolog sind²⁹. Interessanterweise kodieren alle drei für Proteine, die ebenfalls über einen positiv geladenen N-terminus, eine potentielle Prepilinpeptidase-Schnittstelle und einen anschließenden hydrophoben Bereich verfügen (Abb. 25). Weiterhin zeigt der N-terminale Bereich von Slr0226 eine gewisse Ähnlichkeit mit den *minor pilins* vom PilX-Typ³⁰. Eine eingehende Sequenzanalyse ergab, dass die Sequenzübereinstimmungen von Slr0442, Slr0226 und Slr1268, sowie von weiteren cyanobakteriellen Homologen mit den konservierten AS-Positionen der PilX-Proteine korrelieren (nicht gezeigt). Folglich ist davon auszugehen, dass es sich bei den hier genannten Proteinen um eine cyanobakterielle Variante von PilX-ähnlichen Pilin-Proteinen handelt. Eine essentielle Funktion für die Pilusbiogenese ist allerdings unwahrscheinlich, da im Rahmen einer Transposon-Mutagenese zur Auffindung motilitäts-relevanter Gene keines dieser Gene identifiziert wurde³¹ (Bhaya, Takahashi, Shahi, *et al.*, 2001). Möglicherweise spielen sie aber eine Rolle für die Adhäsion und Bildung von Zellaggregaten durch die Quervernetzung von T4P, wie sie für PilX in *Neisseria meningitidis* beschrieben wurde (Helaine *et al.*, 2007).

²⁸ Es ist ein allgemeines Problem bei der Erforschung der Motilität von *Synechocystis*, dass viele Mutanten auf Grund des Verlusts der phototaktischen Motilität als nicht motil beschrieben wurden, ohne dass die Motilität der Einzelzellen mikroskopisch untersucht wurde.

²⁹ BLAST Suche mit Slr0226; 98 % bzw. 86 % *coverage* für Slr0442 und Sll1268; beide e-Wert von $2e^{-24}$.

³⁰ Conserved Domain Database: PilX_N (PF14341), e-Wert $1e^{-05}$; PilX (COG4726), e-Wert $3,69e^{-04}$.

³¹ Andere Gene waren in der Transposon-Bibliothek dahingegen zu einem großen Teil durch mehrere Insertionsmutanten repräsentiert. Es ist allerdings auch nicht auszuschließen, dass die Gene eine funktionelle Redundanz aufweisen und daher kein einzelnes Gen als essentiell ausgemacht wurde.

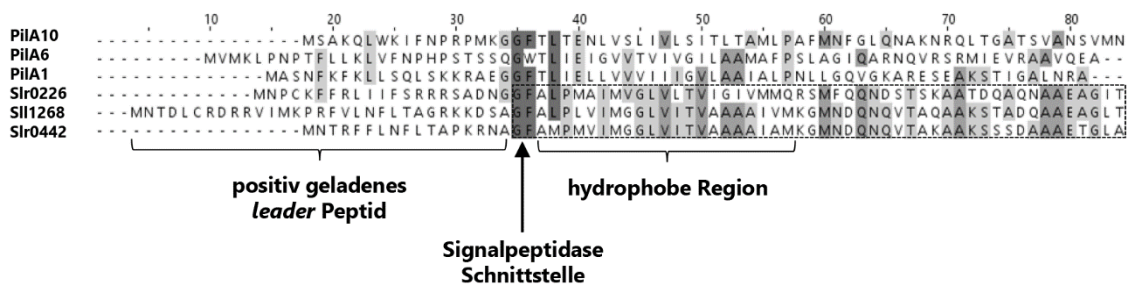


Abb. 25: Analyse der N-terminalen Sequenzabschnitte von (putativen) Präpilinen. Zunehmende Sequenzübereinstimmungen sind durch dunklere Grauschattierungen gekennzeichnet. Charakteristische Sequenzmerkmale der Präpiline sind eingezeichnet. Der konservierte Bereich mit Homologie zur N-terminalen Domäne der PilX-Proteine ist eingerahmt. Nettoladung bei pH 7,0: +3 für Slr0441, +4 für Slr0226; +5 für Sll1268.

σ -Fimbriae

In einer Publikation von Yoshimura *et al.* (2010) wurde insbesondere Slr1668 als essentieller Faktor für die Biogenese der T4P in *Synechocystis* beschrieben. Somit könnte die Hfq-abhängige Regulation dieses Operons den Verlust der T4P und den nicht-motilen Phänotyp erklären. Im Folgenden soll jedoch etwas detaillierter erläutert werden, warum die postulierte Rolle von Slr1668 für die T4P-Biogenese angezweifelt werden muss.

Eine genauere Untersuchung der AS-Sequenz zeigte, dass Slr1667 eine *Spore coat protein U*-Domäne (SCPU; PF05229) und Slr1668 eine PapD-N Domäne enthält (PF00345) (Dienst, 2010). Diese Domänen finden sich typischerweise in Proteinen, die in Gram negativen Bakterien an der Biogenese von Fimbriae über den *chaperon/usher-pathway* beteiligt sind. Die entsprechenden Gene sind dabei fast ausnahmslos in Operons organisiert, die mindestens für eine Fimbriae-Untereinheit, ein Chaperon und ein Membranprotein zur Translokation der Untereinheiten (dem sogenannten *usher*) kodieren (Nuccio und Bäuml, 2007). Bei der Assemblierung dieser Pili wird das Signalpeptid einer Fimbriae-Untereinheit während des Transports über die Cytoplasmamembran abgespalten und die Untereinheit im Periplasma mit Hilfe des Chaperons gefaltet und stabilisiert. Nach Bindung an das *usher* Protein, welches eine Pore in der äußeren Membran bildet, wird das Chaperon verdrängt und die Untereinheit in ein Filament an der Zelloberfläche integriert (Waksman und Hultgren, 2009). Entsprechend der konservierten Domänen könnten

slr1667 eine Fimbriae-Untereinheit und *slr1668* das korrespondierende Chaperon kodieren. In Einklang mit dieser Hypothese konnte gezeigt werden, dass (i) Slr1667 ein putatives Signalpeptid besitzt, welches abgespalten wird, (ii) Slr1667 und Slr1668 interagieren, (iii) Slr1668 im Bereich der Zellperipherie lokalisiert ist sowie (iv) Slr1667 ausschließlich in Abhängigkeit von Slr1668 über die äußere Membran sekretiert wird und auf der Zelloberfläche lokalisiert (Sato *et al.*, 2007; Yoshimura *et al.*, 2010). Wahrscheinlich aufgrund des Fehlens eines *usher* Homologs im *slr1667-slr1668* Operon wurden die Proteinprodukte aber bisher nicht mit der Assemblierung von Fimbriae-artigen Strukturen an der Oberfläche von *Synechocystis* durch den *chaperon/usher-pathway* in Verbindung gebracht. Im Rahmen einer phylogenetischen Studie wurde jedoch mit *slr0019* ein *usher*-Homolog aus der Gruppe der σ -Fimbriae in *Synechocystis* identifiziert (Nuccio und Bäumler, 2007). Durch einen iterativen PSI-BLAST konnten homologe Gene in weiteren Cyanobakterien detektiert werden (Abb. 26 a). Bemerkenswerterweise sind diese immer in unmittelbarer Nachbarschaft zu *slr1667* und *slr1668* Homologen zu finden und bilden somit „klassische“ *chaperon/usher* Loci. Diesem Konservierungsmuster entsprechend bestätigten vorläufige Untersuchungen einer Δ *slr0019* Mutante, dass Slr1667 in Abwesenheit des putativen *usher* Proteins nicht mehr extrazellulär lokalisiert (Abb. 26 b). Die Mutation hatte jedoch keinen Effekt auf die Sekretion des *major pilin* PilA1 oder die phototaktische Motilität von *Synechocystis* (Abb. 26 c). Dies steht im Widerspruch zu den früheren Untersuchungen von Yoshimura *et al.* (2010), die in Δ *slr1668* (und Δ *slr1667*) Mutanten den Verlust (bzw. eine Reduktion) der *thick pili* beobachten konnten. Zwar wäre es denkbar, dass Slr1668 unabhängig von Slr0019 und der Sekretion von Slr1667 eine Funktion bei der Biogenese der *thick pili* ausübt, doch scheint dies unwahrscheinlich, da die drastische Verringerung der *slr1667-slr1668* Transkriptakkumulation in einer Δ *syrcp1* nicht zum Verlust der *thick pili* an der Zelloberfläche führt (Yoshimura, Yoshihara, *et al.*, 2002). Denkbar wäre dagegen, dass die Akkumulation von falsch gefalteten Slr1667 Proteinen im Periplasma der Δ *slr1668* Mutante zu einer Stressantwort führt und somit die Biogenese der *thick pili* indirekt beeinflusst. Darüber hinaus muss bedacht werden, dass Yoshimura *et al.* (2010) die Analyse der Mutanten nicht durch Komplen-

tierungsversuche abgesichert haben. Ebenso haben die Autoren der Studie trotz des vielfach diskutierten Zusammenhangs zwischen *slr1667-slr1668* und der Motilität keinerlei Untersuchungen in den Mutanten hierzu publiziert.

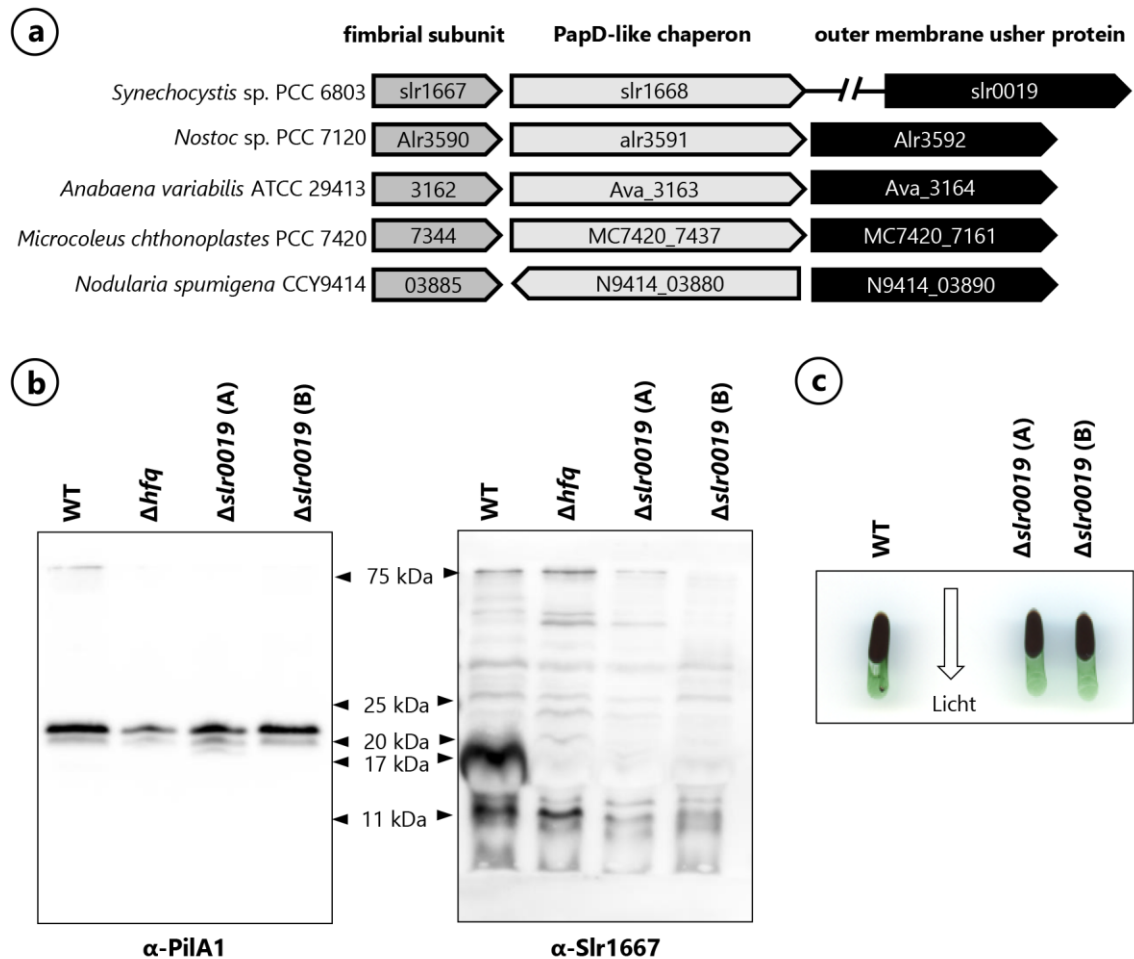


Abb. 26: Die Sekretion von Slr1667 über den *chaperon/usher pathway* ist nicht essentiell für die Motilität von *Synechocystis*. (a) Schematische Darstellung der Organisation von homologen Genen des *chaperon/usher pathway* in verschiedenen Cyanobakterien. (b) Aliquots der Pilifraktion aus *Synechocystis* Kulturen von BG11-Festmedium wurden jeweils auf einem 4-16 % Tris-Tricine SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PDVF-Membran transferiert. PilA1 (15,2 kDa)³² und Slr1667 (18,4 kDa) wurden mit einem spezifischen Antikörper detektiert. Die Anwesenheit von PilA1 in der Δhfq Probe kann darauf zurückgeführt werden, dass ein kleiner Teil der Zellen während der Abtrennung der Pili aufgeschlossen wurde. Es wurden zwei verschiedene Klone (A und B) analysiert. (c) Die Inaktivierung des *usher* Proteins beeinträchtigt nicht das phototaktische Verhalten.

³² Dies ist das theoretische Molekulargewicht des prozessierten Proteins. Das höhere apparente Molekulargewicht lässt sich wahrscheinlich auf eine posttranslationale Glykolisierung der PilA1 Untereinheiten zurückführen (Kim *et al.*, 2009).

Als Fazit aus dem Vorhergehenden kann festgehalten werden, dass die Hfq-abhängige Regulation des *slr1667-slr1168* Locus nicht zur Erklärung des Δhfq Phänotyps herangezogen werden kann, da eine essentielle Rolle der Gene für die Biogenese der *thick pili* höchst zweifelhaft ist und keinesfalls als gesichert angenommen werden darf. Abgesehen davon weist die Homologie von *slr1667-slr1168* und *slr0019* zu Genen des *chaperonusher-pathway* auf eine Rolle bei der Assemblierung von Oberflächenstrukturen hin. So sind σ -Fimbriae in *Acinetobacter baumannii* an der Biofilmbildung und der Adhärenz an abiotische Oberflächen beteiligt, während sie in *M. xanthus* (in aggregierter Form) einen Bestandteil des Sporenmantels bilden (Gollop *et al.*, 1991; Tomaras *et al.*, 2003). Es wäre daher denkbar, dass Slr1667 die Hauptuntereinheit der bisher nicht näher charakterisierten *thin pili* von *Synechocystis* darstellt.

CRISPR/cas-Systeme

CRISPR/Cas-Systeme kommen in der Mehrheit aller Archaeen und vielen Bakterien vor und bilden ein adaptives Immunsystem gegen Phagen und extrazelluläre genetische Elemente (Barrangou und Marraffini, 2014). In *Synechocystis* wie auch in anderen natürlich kompetenten Bakterien sind die T4P an der Aufnahme exogener DNA beteiligt (Yoshihara *et al.*, 2001; Chen und Dubnau, 2004). Zusätzlich ist die Retraktion der T4P ein Voraussetzung für den Infektionsprozess einiger Bakteriophagen (Burrows, 2005). Es ist davon auszugehen, dass insbesondere während der phototaktischen Motilität von *Synechocystis* auf Grund der hohen Zelldichte und der aktiven Fortbewegung die Aufnahme von exogenen Nukleinsäuren stark begünstigt ist (Sutherland *et al.*, 2004; Bakkali, 2013). Insofern scheint eine Hfq-abhängige Co-Regulation von CRISPR/Cas-Systemen und Pilusbiogenese in einem mechanistischen Kontext zu stehen.

Darüber hinaus wurde eine regulatorische Funktion von CRISPR/Cas-Systemen für das Gruppenverhalten einiger Gram-negativer Bakterien beschrieben. So ist z.B. in *M. xanthus* ein CRISPR-Locus an der Steuerung von Aggregation und Sporulation beteiligt (Boysen *et al.*, 2002; Viswanathan *et al.*, 2007), während in *Campylobacter jejuni* Cas9 die Virulenz und Motilität beeinflusst (Louwen *et al.*, 2013). Eine regulatorische Funktion wäre auch in *Synechocystis* denkbar, und es stellt sich die Frage ob die Hfq-abhängigen CRISPR/Cas-Systeme den Verlust der Motilität in der Δhfq Mutante erklären können. Arbeiten von Ingeborg Scholz (AG Hess, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg) zeigten

jedoch, dass die Deletion der CRISPR *arrays* sich nicht auf die Motilität auswirkte (Ulrike Ruppert, persönliche Kommunikation). Auf Grund dessen ist eine Regulation höchstens auf Ebene der *cas*-Gene vorstellbar. In diesem Zusammenhang muss auch angemerkt werden, dass diese die einzigen Hfq-abhängig regulierten Proteine mit vorhergesagter Ribonuklease-Aktivität kodieren. Dementsprechend sind Hfq-abhängige Cas-Proteine möglicherweise auch für die Prozessierung von Hpr8 und Hpr3 verantwortlich.

4.1.3 Das Hfq Regulon ist deckungsgleich mit dem cAMP/Sycrp1 Regulon

Bereits Dienst *et al.* (2008) wiesen auf eine teilweise Überlappung der Hfq-abhängigen Transkriptakkumulation mit dem Sycrp1-Regulon hin, welches mittels einer vergleichendem Microarray-Analyse einer Δ *sycrp1* Mutante identifiziert wurde (Yoshimura, Yanagisawa, *et al.*, 2002). Die Autoren argumentierten jedoch auf Grund von Diskrepanzen zwischen den betrachteten Microarray-Daten und der unterschiedlichen Pilierung der Δ *hfq* und der Δ *sycrp1*-Mutante, dass Hfq wahrscheinlich unabhängig von der cAMP/Sycrp1-gesteuerten Transkription einen Teil des Sycrp1-Regulons posttranskriptionell reguliert. Die Abweichungen der Daten sind aber möglicherweise auf technische Unterschiede der Microarray-Experimente oder auf divergierende *Synechocystis* Stämme zurückzuführen.

Die hier durchgeführten Untersuchungen zur Transkriptakkumulation einer Δ *sycrp1*-Mutante sowie der Vergleich mit experimentell validierten Sycrp1-Bindestellen im Genom von *Synechocystis* sprechen demgegenüber für einen globalen Zusammenhang zwischen den beiden Regulationsmechanismen. Insbesondere unter Berücksichtigung der weiter unten diskutierten Interaktion von Hfq und PilB1 ist es möglich, den Verlust der T4P in Δ *hfq* unabhängig von der veränderte Transkriptakkumulation zu erklären und diese auf einen Defekt der cAMP/Sycrp1-abhängigen Transkription zurückzuführen. Dies soll nachfolgend erläutert werden.

Mit wenigen Ausnahmen wurden für Transkripte, die in zwei unabhängigen Microarray-Experimenten als Hfq-abhängig detektiert wurden, Sycrp1-Bindestellen in der Promotorregion identifiziert. Dies trifft insbesondere für die am stärksten betroffenen RNAs zu, deren relative Abnahme in den Δ *hfq* und Δ *sycrp1* Mutanten zudem korreliert. Eine Besonderheit der Riboregulation durch sRNAs ist auch die Fähigkeit, die in einem Operon

organisierten Gene diskoordiniert zu regulieren. Dabei führt die sRNA-mRNA-Bindung oftmals zu einer stark veränderten Akkumulation einzelner Prozessierungsprodukte des polycistronischen Transkripts. (Massé und Gottesman, 2002; Kalamorz *et al.*, 2007; Desnoyers *et al.*, 2009). Auffällig bei der Analyse der Microarray Daten war hingegen, dass die vielen benachbarte Gene gleichermaßen betroffenen waren, d.h. polycistronische Transkripte offenbar in ihrer Gesamtheit Hfq-abhängig reguliert werden. Zwar kann eine derartig koordinierte Regulation durch sRNAs nicht ausgeschlossen werden (Rice *et al.*, 2012). Da sie jedoch ausnahmslos für alle betroffenen (putativen) Operons beobachtet wurde, ist sie eher auf die Regulation durch einen Transkriptionsfaktor zurückzuführen. In *E. coli* kann das Sycrp1 Homolog CRP die Transkription von entgegengesetzten Genen stromaufwärts und stromabwärts seiner Zielsequenz regulieren (El-Robh und Busby, 2002). Auch in der Δhfq Mutante wurde zum Teil eine Veränderung der Transkriptakkumulation von benachbarten, aber gegensätzlich orientierten Genen beobachtet (Dienst, 2010). Dies ist kaum durch einen posttranskriptionellen Regulationsvorgang zu erklären und kann ebenfalls als Hinweis auf eine direkte Regulation der Transkription durch Sycrp1 gewertet werden.

Von besonderer Aussagekraft ist aber die Erkenntnis, dass die Abnahme der Akkumulation und vor allem der Prozessierungsdefekt von Hpr8 und C3S15 in der $\Delta sycrp1$ und Δhfq Mutante identisch sind (vgl. Abb 9 b und Abb. 10). Berücksichtigt man die Sycrp1 – Bindestellen im Promotorbereich von Hpr1 und Hpr11 ergibt sich damit das Bild, dass zur Zeit lediglich für eine einzelne sRNA (Hpr3) keine Sycrp1-abhängige Regulation vorausgesagt oder validiert ist. Hpr3 ist aber neben Hpr8 und den crRNAs das einzige Transkript mit einem Hfq-abhängigen Prozessierungsdefekt, der noch dazu in allen Fällen dem gleichen Muster folgt³³. Daher muss in Betracht gezogen werden, dass Hpr3 genau wie Hpr8 durch eine Sycrp1-abhängig transkribierte Ribonuklease prozessiert wird. Wie bereits erwähnt (vgl. 4.1.2 „CRISPR/cas“) kommen hierfür insbesondere die Cas-Proteine in Betracht.

³³ Ebenso wie Hpr8 und die crRNAs zeigte auch Hpr3 in einer Δhfq Mutante eine reduzierte Akkumulation und eine mangelnde Prozessierung oder Stabilisierung der kleinsten Prozessierungsprodukts (Dienst, 2010).

Die Expression eines funktionellen Sycrp1-FLAG Fusionsproteins führte nicht zur Wiederherstellung der phototaktischen Motilität der Δhfq Mutante (Abb. 11 a). Daher kann ausgeschlossen werden, dass der Phänotyp allein durch einen epistatischen Effekt von Hfq auf Sycrp1 hervorgerufen wird. Die große Übereinstimmung zwischen Hfq- und Sycrp1-regulierter Transkriptakkumulation könnte daher besser durch einen Einfluss von Hfq auf die Adenylatzyklase Cya1 erklärt werden. Die Microarray-Daten geben jedoch keinen Hinweis auf eine solche Regulation auf Ebene der Transkription oder Transkriptstabilität. Insofern ist eine Aktivierung der Adenylatzyklase auf Proteinebene wahrscheinlicher.

4.1.4 Die RNA-Bindetaschen sind für die Hfq-Funktion in *Synechocystis* entscheidend

Während die proximale RNA-Bindetasche in den Hfq-Homologen der meisten bakteriellen Phyla hoch konserviert ist, sind unter entsprechenden AS rund um die zentrale Pore in Cyanobakterien lediglich einige Reste des Sm2-Motivs moderat konserviert. Interessanterweise sind diese AS-Positionen (R59, L60, A61) Teil der Sm2 *signature sequence*, die sich in Cyanobakterien grundlegend von der archetypischen [Y/F]KHAI Sequenz anderer Bakterien unterscheidet (Bøggild *et al.*, 2009). Auch führte der gerichtete Austausch von AS (T43D, D44K), welche einen Teil der strukturell konservierte proximale RNA-Bindetasche bilden, nicht zum Verlust der Hfq-Funktion in *Synechocystis*. Darüber hinaus wurde im Rahmen der zufallsbasierten Mutagenese auch keine der o.g. AS als essentiell erkannt. Eine Mutation von AS der proximalen RNA-Bindetasche in *E. coli* Hfq führte dagegen *in vivo* wie auch *in vitro* zum Verlust der sRNA-Bindung und zu einer eingeschränkten Riboregulation (Mikulecky *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2013). Folglich ist die proximale RNA-Bindetasche in *Synechocystis* nicht essentiell für die Hfq-Funktion. Die überwiegend negative Oberflächenladung wurde zudem von (Bøggild *et al.*, 2009) als Argument gegen eine RNA-Bindung auf der proximalen Seite angeführt.

Es zeigte sich, dass auch die gerichtete Mutation der distalen RNA-Bindestelle (G31N) die Hfq-Funktion weder auf Ebene der Transkriptakkumulation noch hinsichtlich der Motilität beeinträchtigte. Diesbezüglich muss allerdings Folgendes angemerkt werden:

Die AS G31 wurde ursprünglich auf Grund der generellen Konservierung in Hfq-Proteinen (siehe Abb. 4) und ihrer Beteiligung an einem potentiell RNA-bindenden *nest*-Motiv in *Synechocystis* Hfq als vielversprechender Kandidat für die gerichtete Mutagenese der distalen RNA-Bindetasche ausgewählt (Dienst, 2010). Die unlängst publizierten Ergebnisse von Zhang *et al.* (2013) ergaben jedoch, dass der Austausch des entsprechenden Glycin-Rests in *E. coli* Hfq (G29A) ebenfalls keinen Einfluss auf die RNA-Bindung oder die Riboregulation hatte. Allerdings wurde bei der Suche nach nicht-funktionellen Hfq-Varianten durch zufallsbasierten Mutagenese auch keine andere AS der distalen RNA-Bindestelle als essentiell erkannt. Bemerkenswert war überdies, dass generell kein einziger Austausch von AS der distalen Seite des Hexamers zu einem Verlust der Hfq-Funktion führte. Auch finden sich innerhalb der Cyanobakterien keine hoch konservierten AS, die zu dieser Oberfläche beitragen. Dies steht in Einklang mit der Feststellung, dass *Synechocystis* Hfq nicht mit hoher Affinität an Poly(A)-RNA bindet (Dienst, 2010), wohingegen teilweise hoch konservierte AS der distalen Seite von sowohl *E. coli* als auch *S. aureus* Hfq an der Poly(A)-Bindung beteiligt sind (Link *et al.*, 2009; Horstmann *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013). Daraus lässt sich schließen, dass die distale Oberfläche insgesamt keine wesentliche Rolle für die Hfq-Funktion spielt.

In einem Versuch zur Affinitätsaufreinigung von Hfq-gebundenen RNAs konnte keine spezifische Bindung der Hfq-abhängig regulierten sRNAs oder crRNAs nachgewiesen werden (Abb. 12). In Ermangelung einer Positivkontrolle und der begrenzten Anzahl an getesteten Transkripten kann hierdurch jedoch keine definitive Aussage über die Fähigkeit zur RNA-Bindung von *Synechocystis* getroffen werden. In einem vergleichbaren Experiment erbrachte allerdings auch die Sequenzierung einer cDNA-Bibliothek der Hfq-Elutionsfraktion keinen Beleg für eine spezifische Anreicherung von Hfq-abhängigen RNAs. Ebenso wenig konnte eine Hfq-RNA-Interaktion durch eine *in vivo* Quervernetzung und der anschließenden radioaktiven Markierung von proteingebundenen RNAs nachgewiesen werden (beides unveröffentlichte Ergebnisse). *Gel-shift* Experimente zeigten zudem das *Synechocystis* Hfq nur mit extrem geringer Affinität an Hpr3 wie auch an die enterobakteriellen sRNAs MicA, RprA und Spot 42 bindet (Bøggild *et al.*, 2009;

Dienst, 2010)³⁴. Dieselben Autoren berichteten außerdem, dass die heterologe Expression von *Synechocystis* bzw. *E. coli* Hfq in einer Δhfq Mutante des jeweils anderen Organismus den entsprechenden Phänotyp der Mutante nicht zu komplementieren vermochte.

Zusammengefasst lässt sich feststellen, dass die Sequenzkonservierung, die Mutageneseexperimente sowie eine Vielzahl von weiteren Belegen dafür sprechen, dass *Synechocystis* Hfq keine RNA-Bindungen über die in anderen Hfq-Proteinen konservierten RNA-Bindestellen eingeht. Auch wenn eine stringente negative Beweisführung praktisch unmöglich ist, muss in Anbetracht der Datenlage eine Funktion des Proteins als RNA-Chaperon generell angezweifelt werden.

4.2 Die PilB1-Interaktion

4.2.1 Der „proximale Ring“ ist essentiell für die Hfq-PilB1-Interaktion

Alle hoch konservierten AS-Reste in cyanobakteriellen Hfq Proteinen tragen zur proximalen Oberfläche außerhalb der zentralen Pore des Hexamers bei. Da mit Ausnahme von V58E auch alle nicht-funktionellen AS-Austausche in dieser Region zu finden sind, ist anzunehmen, dass dieser „proximale Ring“ die funktionell essentielle Proteinregion von *Synechocystis* Hfq darstellt. Die Mutagenese von AS in dieser Region in *E. coli* Hfq führte zu keinen eindeutigen Ergebnissen bezüglich ihrer Rolle für die RNA-Bindung und Riboregulation. Einige AS wurden jedoch mit der Stabilisierung des Hexamers in Verbindung gebracht (Mikulecky *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2013). Übereinstimmend mit der Funktion des Sm2-Motivs für die Assemblierung von LSM-Proteinen (Kambach *et al.*, 1999; Collins *et al.*, 2001) führte die V58E-Mutation zu einem Ausbleiben der Interaktion von Hfq-Monomeren im Y2H-Experiment. Dagegen konnte für alle anderen Mutanten

³⁴ Eine Retardierung der sRNA-Banden war in allen Fällen erst bei Hfq-Konzentrationen von $>2,5 \mu\text{M}$ zu erkennen. In ähnlichen Experimenten mit enterobakteriellen Hfq Proteinen reichten hierfür dagegen oftmals 1-10 nM (Geissmann und Touati, 2004; Sittka *et al.*, 2008). Insbesondere unter Berücksichtigung der im Vergleich zu den eingesetzten Proteinmengen unzureichenden Menge an unspezifischer Kompetitor-RNA muss daher die Aussagekraft der Experimente mit *Synechocystis* in Frage gestellt werden.

eine Interaktion der Monomere nachgewiesen werden. Somit kann der Verlust der Funktion in diesen Hfq-Varianten nicht generell auf eine Beeinträchtigung der Hexamerbildung zurückgeführt werden.

Es zeigte sich vielmehr, dass *Synechocystis* Hfq mit der Sekretions-ATPase PilB1 interagiert und dass diese Interaktion in den Hfq-Varianten P9T, I18F, W40R und D42N verloren ging. Lediglich die Mutationen R39H und Q15H beeinträchtigten die Hfq-Funktion unabhängig von der Interaktion mit PilB1 (Abb. 20 c). Allerdings sind alle betroffenen AS in der Kristallstruktur von Hfq in unmittelbarer Nachbarschaft entlang einer Furche auf der proximalen Oberfläche positioniert und gehen z.T. Wechselwirkungen miteinander ein. Der Funktionsverlust der beiden letztgenannten Mutationen ist daher wahrscheinlich nicht auf einen gänzlich verschiedenen molekularen Mechanismus zurückzuführen. Vorstellbar wäre hingegen, dass in R39H und Q15H eine Konformationsänderung in Folge der Interaktion in einem der beiden Proteine beeinträchtigt ist.

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen bestätigten diese Ergebnisse. So ging die punktförmige Lokalisation entlang der Zellmembran in den Hfq-Varianten P9T, I18F und D42N verloren. Dies entsprach dem Effekt, den eine Inaktivierung von *pilB1* zur Folge hatte. Tatsächlich war die Fluoreszenzverteilung in der P9T und der $\Delta pilB1$ Mutante nicht zu unterscheiden. Auf der anderen Seite zeigten die Mutanten I18F und D42N zusätzlich eine intensive diffuse Fluoreszenz im Cytoplasma. Da D42 gleich mehrere Wasserstoffbrücken ausbildet, die sowohl die Schleife zwischen β_2 und β_3 als auch die Interaktion zwischen benachbarten Hexameren stabilisieren, könnte die Mutation die Faltung und Hexamerbildung beeinträchtigen. Entsprechend würde die diffuse Fluoreszenz von cytoplasmatischen Hfq-Monomeren herrühren. Dies wäre im Einklang mit der verringerten Intensität der lokalen Fluoreszenzmaxima, die sich evtl. auf die Polymerisation der Hexamere zu supramolekularen Strukturen, wie sie für *E. coli* Hfq und andere LSm-Proteine beobachtet worden sind, zurückführen lässt (Arluison *et al.*, 2006). Da die Y2H-Experimente zeigen, dass die Monomer-Monomer-Interaktion in den Hfq-Varianten D42N und I18F nicht völlig aufgehoben ist und eine starke Überexpression des Fusionsproteins erfolgt, ist aber nicht davon auszugehen, dass allein eine Destabilisierung des Hexamers für den Funktionsverlust verantwortlich ist.

Auch wenn ein Einfluss einzelner AS auf die Stabilität des Hexamers nicht ausgeschlossen werden kann, so sprechen die Ergebnisse doch dafür, dass die konservierten AS des proximalen Rings die Interaktionsfläche für die stabile Assoziation von Hfq mit PilB1 darstellen und dass diese Interaktion essentiell für die Funktion des Proteins ist. Hierin ist evtl. auch der Grund zu sehen, warum die N-terminale (proximal-ausgerichtete) Fusion des sperrigen eYFP Fluoreszenzproteins zu einem Verlust der Hfq-Funktion führt. Eine zusätzliche Funktion des proximalen Rings für die Bindung von RNA kann zwar nicht gänzlich ausgeschlossen werden, scheint auf Grund des fehlenden Nachweises einer generellen Bindung von RNA durch *Synechocystis* Hfq aber unwahrscheinlich. Zudem sind keine der AS (Lysin, Tyrosin, Tryptophan, Threonin) die in Hfq und anderen Proteinen besonders häufig an Wechselwirkungen mit RNA-Molekülen beteiligt sind, Teil des proximalen Rings. Dafür finden sich hier mit Prolin und Aspartat zwei konservierte AS die in RNA-Bindestellen allgemein unterrepräsentiert sind (Jones *et al.*, 2001; vgl. auch Abb. 4 a).

4.2.2 Die Interaktion wird über eine putative Zink-Finger-Domäne von PilB1 vermittelt

Die Y2H-Versuche belegten, dass eine kurze, nur ca. 40 AS lange Domäne am C-Terminus von PilB1 für die Interaktion mit Hfq ausreichend ist. Es ist nicht ausgeschlossen, dass die konservierten Cysteine dieser Domäne ein anderes Metallion als Zink koordinieren oder in Form von Disulfidbrücken vorliegen. Auf Grund des invariablen Auftretens von zwei CXXC-Motiven in einem spezifischen Abstand handelt es sich aber wahrscheinlich um eine Zink-Finger-Domäne³⁵ (Krishna *et al.*, 2003). Dies ist auch insofern naheliegend, als dass Zink-Finger neben ihrer klassischen Rolle als DNA-Bindedomänen oftmals auch als Vermittler von Protein-Protein-Interaktionen fungieren (Gamsjaeger *et al.*, 2007). Insbesondere Zink-Finger, die ihr Zinkion ausschließlich über reaktive Thiolgruppen von Cysteinen koordinieren, können auch als Redox-Sensoren dienen. Dabei führt eine Thiol/Disulfid-Austauschreaktion zu größeren Strukturveränderungen, welche die Proteinfunktion modulieren (Ilbert *et al.*, 2006). Interessant in diesem Zusammenhang

³⁵ Obwohl eine genaue Zuordnung nicht möglich ist, weist die Domäne insbesondere Ähnlichkeiten zur Architektur der *zinc-ribbon* Domänen auf.

ist, dass die variablen AS in einem CXXC Motiv eine untergeordnete Rolle für die Struktur der entsprechenden Zink-Finger haben, die unmittelbare Umgebung der Cysteine aber entscheidend für die Reaktivität der Thiolgruppen ist (Foloppe und Nilsson, 2004; Cremers und Jakob, 2013). Daher könnte der hohe Grad der Konservierung des CPYC-Motivs³⁶ und der umgebenden AS ein Hinweis darauf sein, dass die Hfq-PilB1-Interaktion ein Redox-regulierter Vorgang ist.

Auch wenn die Struktur der putativen Zink-Finger-Domäne nicht bekannt ist, deutet das PilB1-Strukturmodell darauf hin, dass diese auf der dem Cytoplasma zugewandten Seite des PilB1-Hexamers exponiert ist. Die symmetrischer Anordnung und die räumliche Ausdehnung des modellierten Teil der C2-Domäne innerhalb des Hexamers (Abb. 18 b) lassen vermuten, dass die einzelnen Untereinheiten eines Hfq-Hexamers jeweils mit einer der putativen Zink-Finger-Domänen des PilB1-Hexamers interagieren können, so dass die beiden ringförmigen Proteine sich im Verhältnis 1:1 zusammenlagern.

4.2.3 Die Lokalisation an die Pilus-Basis ist essentiell für die Hfq-Funktion

Einer der wesentlichen Erkenntnisse dieser Arbeit ist, dass die Interaktion mit der Sekretions-ATPase PilB1 nicht nur für die Funktion von Hfq auf Ebene der Transkriptakkumulation als auch bezüglich der Motilität essentiell ist. Sie entscheidet vielmehr auch über die korrekte Lokalisation an der Zellperipherie. In *E. coli* konnte eine direkte Interaktion eines PilB-Homologs mit dem integralen Membranprotein PilC, welches die Plattform für die Interaktion diverser Proteine der Pilus-Basis bildet, nachgewiesen werden (Crowther *et al.*, 2004). Demgemäß geht auch in einem $\Delta pilC$ Stamm von *P. aeruginosa* die korrekte Lokalisation von PilB an der Cytoplasmamembran verloren (Chiang *et al.*, 2005). In Anbetracht des ähnlichen Aufbaus der T4P-Apparate von *Synechocystis* und anderen Gram-negativen Bakterien (Yoshihara und Ikeuchi, 2004; Burrows, 2012) ist daher davon auszugehen, dass der Hfq-PilB1-Komplex über eine Bindung an PilC mit der Pilus-Basis assoziiert ist. Weiterhin zeigt auch ein $\Delta pilC$ Stamm einen Defekt in der Hfq-abhängigen Akkumulation und Prozessierung von Hpr8. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass nicht

³⁶ Im CXXC-Redoxzentrum der Thioredoxin-Superfamilie ist das Motiv CPYC besonders geeignet, das Redoxpotential des N-terminalen Cysteins zu erhöhen (Mössner *et al.*, 1999; Quan *et al.*, 2007).

allein die Hfq-PilB1-Interaktion, sondern auch die korrekte Lokalisation an die Pilus-Basis (bzw. die Cytoplasmamembran) ausschlaggebend für die korrekte Hfq-Funktion ist. Zwar ist nicht ausgeschlossen, dass der Effekt indirekt über eine Destabilisierung des PilB1-Proteins in $\Delta pilC$ zustande kommt. Dies scheint jedoch unwahrscheinlich, da PilB im Zuge von dynamischen Änderungen der Lokalisation auch im Cytoplasma stabil sein sollte (Bulyha *et al.*, 2009 und unveröffentlichte Ergebnisse). Diese Ergebnisse lassen sich aber auch dahingehend interpretieren, dass die Hfq-PilB1-Interaktion für die Funktion der Sekretions-ATPase essentiell ist und die Pilusbiogenese wiederum die Akkumulation der Hfq-abhängigen Transkripte reguliert.

4.2.4 Die interagierenden Oberflächen sind in Cyanobakterien konserviert

Die ausgeprägte Sequenzkonservierung der interagierenden Oberflächen von Hfq und PilB1-Proteinen innerhalb der Cyanobakterien ist ein Hinweis darauf, dass die Interaktion der beiden Proteine in *Synechocystis* kein Einzelfall ist. Dafür sprechen neben dem gemeinsame Auftreten von Hfq mit der putativen Zinkfinger-Domäne von PilB1 in allen cyanobakteriellen Genomen auch noch einige weitere Indizien. So lokalisiert *Synechocystis* Hfq-eYFP auch in *Synechocystis* sp. PCC6714 entlang der Zellperipherie (nicht gezeigt) und in *Synechococcus elongatus* PCC7942 führt die Inaktivierung von *hfq* zum Verlust der natürlichen Kompetenz, was auf einen Verlust der T4P hindeutet (Chen, 2007). Daher ist es wahrscheinlich, dass die Hfq-PilB-Interaktion innerhalb der Cyanobakterien weit verbreitet ist. Möglicherweise handelt es sich hierbei um einen evolutionär konservierter Mechanismus zur Regulation der Sekretions-ATPase.

4.3 Fazit

4.3.1 Funktionelle Implikationen der Membranlokalisation

Hfq spielt in zahlreichen Bakterien eine wichtige Rolle bei der Regulation von Proteinen der äußeren Membran (Vogel und Papenfort, 2006), und es gibt eine Vielzahl an Studien, die Hfq mit der Motilität und Biofilmbildung in Verbindung bringen (Sonnleitner *et al.*, 2003; Monteiro *et al.*, 2012; Thomason *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2014). Weiterhin gibt es Belege, dass die Hfq-abhängige Regulation von sekretierten Proteinen unmittelbar an der

Membran stattfindet. Beispielsweise ist in *E. coli* die Hfq-abhängige Regulation der *ptsG* mRNA mit der Membranlokalisation des Transkripts und der Sekretion des naszierenden Peptids verbunden (Kawamoto *et al.*, 2005; Diestra *et al.*, 2009). Gleichfalls wird Hfq in *Salmonella* für die Sekretion von Proteinen via Signalsequenzen in deren 5'-UTRs benötigt (Niemann *et al.*, 2013). Welche Funktion eine mögliche Membranlokalisation von Hfq in diesen Fällen hat und wie diese vermittelt wird, ist aber nicht geklärt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *Synechocystis* Hfq mit PilB1 interagiert und die Lokalisation des Hfq-PilB1-Komplexes an die Pilusbasis essentiell für die Motilität und die Transkriptakkumulation ist. Allerdings konnte bisher in keinem einzigen Experiment eine RNA-Bindung durch Hfq nachgewiesen werden. Darüber hinaus spricht eine Vielzahl von Hinweisen dafür, dass die Hfq-abhängige Transkriptakkumulation direkt auf einen Verlust der cAMP/Sycr1-abhängigen Transkriptionskontrolle zurückzuführen ist, d.h. dass Hfq epistatisch gegenüber Sycr1 wirkt. Ein solcher Defekt kann allerdings nicht die Abwesenheit der T4P an der Zelloberfläche einer Δhfq Mutante erklären. Außerdem waren die Überexpression eines funktionellen Sycr1 Proteins bzw. die externe Gabe von cAMP (Dienst, 2010) nicht ausreichend, um das phototaktische Verhalten wiederherzustellen. Angesichts dieser Befunde ist der Einfluss von *Synechocystis* Hfq auf die Pilusbiogenese am besten durch Protein-Protein-Wechselwirkungen mit PilB1 zu erklären. Eine solche Funktion ist aber grundlegend verschieden von allen bisher beschriebenen Hfq-basierten Regulationsmechanismen auf RNA-Ebene. Es stellt sich daher die Frage, auf welchem Weg Hfq die cAMP/Sycr1-abhängige Transkription kontrolliert.

4.3.2 Hypothetisches Modell der Hfq-abhängigen Regulation in *Synechocystis*

Der Aufbau des T4P-Apparats ist weitgehend homolog zu den Typ II Sekretionssystemen (Korotkov *et al.*, 2012). Entsprechend wurde T4P auch mit der Sekretion von Proteinen jenseits der Piline in Verbindung gebracht. So ist z.B. in *Francisella tularensis* und *Vibrio cholerae* die Sekretion von löslichen Proteinen, die eine Rolle bei der Virulenz und Wirtskolonisierung spielen, von den T4P abhängig (Kirn *et al.*, 2003; Hager *et al.*, 2006). In den meisten Cyanobakterien sind neben den PilB1-Homologen auch die Gene für die anderen Komponenten des T4P-Apparats konserviert (nicht gezeigt). Andererseits assemblieren

längst nicht alle Spezies T4P an der Zelloberfläche³⁷ (Samuel *et al.*, 2001; Palenik *et al.*, 2003). Daher ist auch in Cyanobakterien eine Funktion des T4P-Apparates für die Proteinsekretion wahrscheinlich. So berichteten Schatz *et al.* (2013), dass die Biofilmbildung in *Synechococcus elongatus* PCC7942 durch einen extrazellulären Faktor reguliert wird, der in einer $\Delta pilB$ oder $\Delta pilC$ Mutante nicht mehr in das Kulturmedium sekretiert wird. Nimmt man auch für *Synechocystis* eine Funktion des T4P-Apparats für die Proteinsekretion an, so ließe sich der Phänotyp der Δhfq Mutante durch folgendes hypothetisches Modell erklären (Abb. 27):

Der *second messenger* cAMP wird generell mit der intrazellulären Weiterleitung von extrazellulärer Signalen in Verbindung gebracht. Insofern könnte ein via T4P sekretiertes Protein eine Signalfunktion ausüben, das über die Aktivierung der Adenylatzyklase Cya1 die Transkription von cAMP/Sycrp1-abhängigen Genen induziert. Dabei könnte es sich um ein lösliches Protein oder kleines Peptid handeln. Aber auch eine Signalübertragung über exponierte Pilusdomänen wäre theoretisch vorstellbar. Analog zu den aus anderen Bakterien bekannten *quorum sensing* Systemen wäre ein solcher Mechanismus geeignet, die Zelldichte der Population zu ermitteln. Dies ist in Hinblick auf den beschriebenen Phänotyp der $\Delta cya1$ und $\Delta sycrp1$ Mutanten interessant (Bhaya *et al.*, 2006). Diese assemblieren funktionelle Pili und zeigen *twitching motility* auf Einzelzellebene, sind aber nicht in der Lage, im Verband mit anderen Zellen in die makroskopisch sichtbare Phase der Phototaxis überzugehen. Ein solcher Phänotyp ließe sich sehr gut durch die Beeinträchtigung der Zell-Zell-Kommunikation und einem dementsprechend veränderten Aufbau der Zelloberfläche erklären.

³⁷ Dies gilt insbesondere für die marinen Spezies der Gattung *Synechococcus* und *Prochlorococcus* (persönliche Kommunikation Prof. Debbie Lindell)

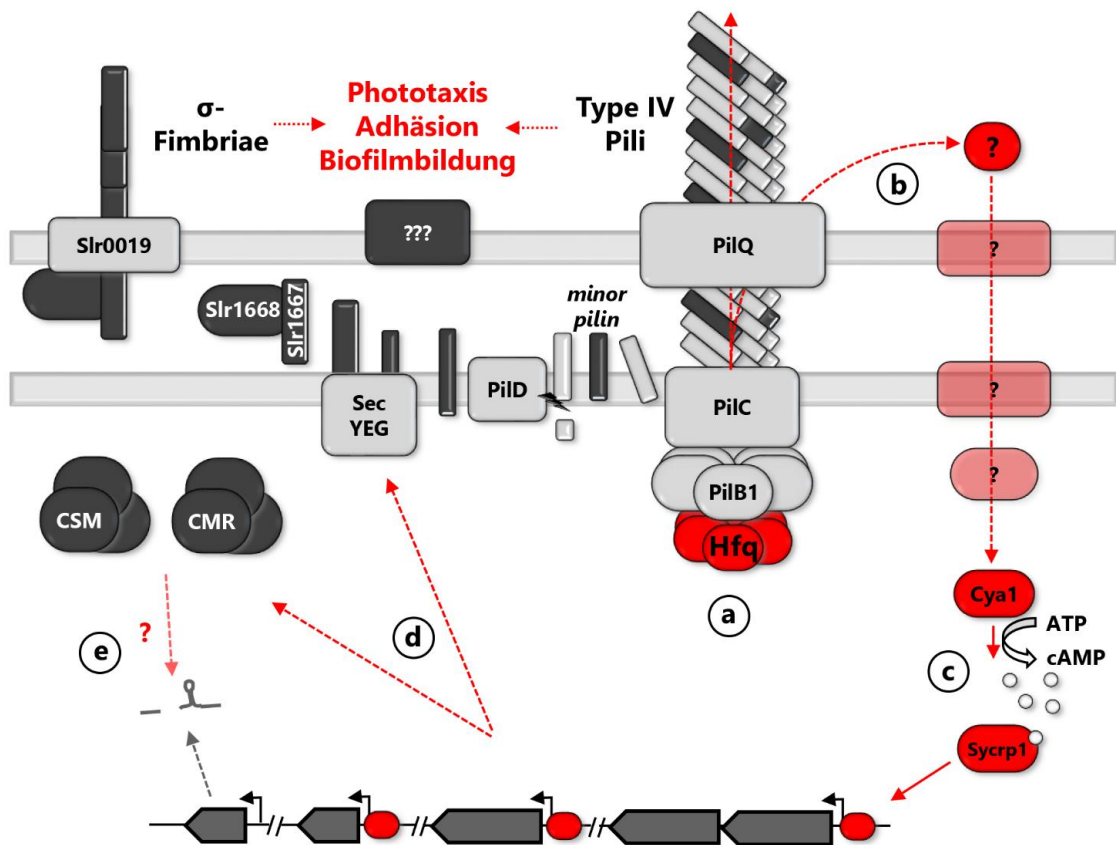


Abb. 27 Hypothesisches Modell der Hfq-Funktion in *Synechocystis*. (a) Die Bindung von Hfq an PilB1 ist Voraussetzung für die Sekretion von Präpilinen und anderen Proteinen über den T4P-Apparat. (b) Ein auf diesem Weg sekretiertes Protein/Peptid aktiviert über einen unbekannt Signalweg die Adenylatzyklase Cya1. (c) Der Transkriptionsfaktor Sycrp1 aktiviert in Folge des erhöhten cAMP-Spiegels die Transkription spezifischer Gene. (d) Die Expression spezifischer *minor pilins*, der *chaperon/usher-pathways*, der Cas-Effektorkomplexe sowie weiterer unbekannter Proteine und sRNAs führt zu einer Veränderung der Zelloberfläche und moduliert das Gruppenverhalten. (e) Die Cas-Effektorkomplexe prozessieren bzw. stabilisieren neben den crRNAs möglicherweise die sRNAs Hrp3 und Hpr8.

Ein Zusammenhang zwischen Hfq und der cAMP/Sycrp1-abhängigen Transkriptionskontrolle ist auch im Hinblick auf den Phänotyp einer *Nostoc* sp. PCC7120 Δhfq Mutante interessant. Diese zeigt eine reduzierte Transkriptakkumulation von Genen für die Nitratassimilation und differenziert Heterocysten in Anwesenheit von Nitrat. In diesem Stamm wurde eine Bindestelle für das Sycrp1-Homolog AnCrpA vor einem putativen Nitrattransporter vorhergesagt (Xu und Su, 2009). Ebenso konnte gezeigt werden, dass mehrere Gene mit einer Funktion bei der Stickstofffixierung und Heterocystenbildung AnCrpA-abhängig reguliert werden (Suzuki *et al.*, 2007). Auch konnte in Spezies der Familie *Nostocaceae* ein Erhöhung des intrazellulären cAMP-Gehalts in Folge von Stickstoffmangel gemessen werden (Hood *et al.*, 1979; Francko und Wetzel, 1981).

4.3.3 Ausblick

Bisherige Studien zu Protein-Protein Interaktionen lieferten Hinweise auf eine umfangreiche Wechselwirkung des RNA-Chaperons aus *E. coli* mit anderen Proteinen des RNA-Metabolismus wie RNase E (Morita *et al.*, 2005; Ikeda *et al.*, 2011), PAP I (Mohanty *et al.*, 2004), PNPase (De Lay und Gottesman, 2011) oder dem Terminationsfaktor Rho (Rabhi *et al.*, 2011). In diesen Arbeiten zeigte sich aber auch, dass Hfq seine Wirkung über die lokale Erhöhung der RNA-Konzentration oder Veränderungen der RNA-Struktur entfaltet. Ein direkter Einfluss auf die Aktivität der Bindepartner wurde dagegen nicht beschrieben. In jüngster Zeit wurde *E. coli* Hfq in einem Komplex mit der Katalase HP11 co-kristallisiert (Yonekura *et al.*, 2013). Die Interaktion mit diesem Enzym, welches nicht am RNA-Metabolismus beteiligt ist, wirkt sich aber ebenfalls nicht auf dessen Aktivität aus. Die in dieser Arbeit begründete Vermutung, dass *Synechocystis* Hfq seine Funktion abseits der posttranskriptionellen Regulation durch sRNAs auf Ebene der Hfq-PilB1-Interaktion ausübt, wäre ein Novum in der Erforschung dieses Proteins. Um diese Funktion letztendlich zu validieren und den molekularen Mechanismus besser zu verstehen, sind daher *in vitro* Experimente in Planung. Diese sollen klären, ob Hfq über die Bindung an die putative Zinkfinger-Domäne die ATPase-Aktivität von PilB1 regulieren kann und/oder die Hexamerbildung des Proteins beeinflusst. Daneben würde eine eingehende Untersuchung der cAMP/Sycr1-basierten Transkriptionskontrolle in Abhängigkeit von extrazellulären Faktoren in den Δsycr1 und Δhfq Mutanten helfen, das vorgeschlagene Modell zur Hfq-abhängigen Regulation zu evaluieren. Sollte sich bewahrheiten, dass via T4P sekretierte Proteine das Gruppenverhalten in *Synechocystis* steuern, wäre dies eine neuartige Form des *quorum sensing*, die gegebenenfalls geeignet wäre, das komplexe Verhalten vor allem vieler filamentöser Cyanobakterien besser zu verstehen.

5 Literaturverzeichnis

- Aiba, H. (2007) Mechanism of RNA silencing by Hfq-binding small RNAs. *Curr Opin Microbiol* **10**: 134–139.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**: 403–410.
- Amberg, D.C., Burke, D.J., and Strathern, J.N. (2005) *Methods in Yeast Genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual, 2005 Edition*. .
- Anderson, S.L., and McIntosh, L. (1991) Light-activated heterotrophic growth of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803: a blue-light-requiring process. *J Bacteriol* **173**: 2761–2767.
- Arifuzzaman, M., Maeda, M., Itoh, A., Nishikata, K., Takita, C., Saito, R., et al. (2006) Large-scale identification of protein-protein interaction of *Escherichia coli* K-12. *Genome Res* **16**: 686–691.
- Arluison, V., Mura, C., Guzmán, M.R., Liquier, J., Pellegrini, O., Gingery, M., et al. (2006) Three-dimensional structures of fibrillar Sm proteins: Hfq and other Sm-like proteins. *J Mol Biol* **356**: 86–96.
- Asayama, M., and Imamura, S. (2008) Stringent promoter recognition and autoregulation by the group 3 σ -factor SigF in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Nucleic Acids Res* **36**: 5297–5305.
- Ashkenazy, H., Erez, E., Martz, E., Pupko, T., and Ben-Tal, N. (2010) ConSurf 2010: calculating evolutionary conservation in sequence and structure of proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Res* **38**: W529–W533.
- Axmann, I.M., Kensche, P., Vogel, J., Kohl, S., Herzel, H., and Hess, W.R. (2005) Identification of cyanobacterial non-coding RNAs by comparative genome analysis. *Genome Biol* **6**: R73.
- Azam, T.A., Hiraga, S., and Ishihama, A. (2000) Two types of localization of the DNA-binding proteins within the *Escherichia coli* nucleoid. *Genes Cells* **5**: 613–626.
- Bailey, T.L., and Elkan, C. (1994) Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol* **2**: 28–36.
- Bakkali, M. (2013) Could DNA uptake be a side effect of bacterial adhesion and twitching motility? *Arch Microbiol* **195**: 279–289.
- Barrangou, R., and Marraffini, L.A. (2014) CRISPR-Cas Systems: Prokaryotes Upgrade to Adaptive Immunity. *Mol Cell* **54**: 234–244.
- Beggs, J.D. (2005) Lsm proteins and RNA processing. *Biochem Soc Trans* **33**: 433–438.
- Beisel, C.L., Updegrove, T.B., Janson, B.J., and Storz, G. (2012) Multiple factors dictate target selection by Hfq-binding small RNAs. *EMBO J* **31**: 1961–1974.
- Berghoff, B.A., Glaeser, J., Sharma, C.M., Zobawa, M., Lottspeich, F., Vogel, J., and Klug, G. (2011) Contribution of Hfq to photooxidative stress resistance and global regulation in *Rhodobacter sphaeroides*. *Mol Microbiol* **80**: 1479–1495.

- Bhaya, D., Bianco, N.R., Bryant, D., and Grossman, A. (2000) Type IV pilus biogenesis and motility in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *Mol Microbiol* **37**: 941–951.
- Bhaya, D., Nakasugi, K., Fazeli, F., and Burriesci, M.S. (2006) Phototaxis and impaired motility in adenylyl cyclase and cyclase receptor protein mutants of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J Bacteriol* **188**: 7306–7310.
- Bhaya, D., Takahashi, A., and Grossman, A.R. (2001) Light regulation of type IV pilus-dependent motility by chemosensor-like elements in *Synechocystis* PCC6803. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 7540–7545.
- Bhaya, D., Takahashi, A., Shahi, P., and Grossman, A.R. (2001) Novel Motility Mutants of *Synechocystis* Strain PCC 6803 Generated by In Vitro Transposon Mutagenesis. *J Bacteriol* **183**: 6140–6143.
- Bhaya, D., Watanabe, N., Ogawa, T., and Grossman, A.R. (1999) The role of an alternative sigma factor in motility and pilus formation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 3188–3193.
- Birnboim, H.C., and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**: 1513–1523.
- Birungi, M., Folea, M., Battchikova, N., Xu, M., Mi, H., Ogawa, T., *et al.* (2010) Possibilities of subunit localization with fluorescent protein tags and electron microscopy exemplified by a cyanobacterial NDH-1 study. *Biochim Biophys Acta* **1797**: 1681–1686.
- Bøggild, A., Overgaard, M., Valentin-Hansen, P., and Brodersen, D.E. (2009) Cyanobacteria contain a structural homologue of the Hfq protein with altered RNA-binding properties. *FEBS J* **276**: 3904–3915.
- Boysen, A., Ellehauge, E., Julien, B., and Søgaard-Andersen, L. (2002) The DevT protein stimulates synthesis of FruA, a signal transduction protein required for fruiting body morphogenesis in *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* **184**: 1540–1546.
- Brennan, R.G., and Link, T.M. (2007) Hfq structure, function and ligand binding. *Curr Opin Microbiol* **10**: 125–133.
- Brescia, C.C., Mikulecky, P.J., Feig, A.L., and Sledjeski, D.D. (2003) Identification of the Hfq-binding site on DsrA RNA: Hfq binds without altering DsrA secondary structure. *RNA* **9**: 33–43.
- Brown, D.R., Helaine, S., Carbonnelle, E., and Pelicic, V. (2010) Systematic functional analysis reveals that a set of seven genes is involved in fine-tuning of the multiple functions mediated by type IV pili in *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun* **78**: 3053–3063.
- Bulyha, I., Schmidt, C., Lenz, P., Jakovljevic, V., Höne, A., Maier, B., *et al.* (2009) Regulation of the type IV pili molecular machine by dynamic localization of two motor proteins. *Mol Microbiol* **74**: 691–706.
- Burriesci, M., and Bhaya, D. (2008) Tracking phototactic responses and modeling motility of *Synechocystis* sp. strain PCC6803. *J Photochem Photobiol B* **91**: 77–86.
- Burrows, L.L. (2005) Weapons of mass retraction. *Mol Microbiol* **57**: 878–888.
- Burrows, L.L. (2012) *Pseudomonas aeruginosa* Twitching Motility: Type IV Pili in Action. *Annu Rev Microbiol* **66**: 493–520.

- Butland, G., Peregrín-Alvarez, J.M., Li, J., Yang, W., Yang, X., Canadien, V., *et al.* (2005) Interaction network containing conserved and essential protein complexes in *Escherichia coli*. *Nature* **433**: 531–537.
- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., and Madden, T.L. (2009) BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics* **10**: 421.
- Chao, Y., and Vogel, J. (2010) The role of Hfq in bacterial pathogens. *Curr Opin Microbiol* **13**: 24–33.
- Chen, I., and Dubnau, D. (2004) DNA uptake during bacterial transformation. *Nat Rev Microbiol* **2**: 241–249.
- Chen, Y. (2007) Functional genomics of the unicellular cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Doctoral thesis* Texas A&M University.
- Chiang, P., Habash, M., and Burrows, L.L. (2005) Disparate subcellular localization patterns of *Pseudomonas aeruginosa* Type IV pilus ATPases involved in twitching motility. *J Bacteriol* **187**: 829–839.
- Choi, J.S., Chung, Y.H., Moon, Y.J., Kim, C., Watanabe, M., Song, P.S., *et al.* (1999) Photomovement of the gliding cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Photochem Photobiol* **70**: 95–102.
- Christiansen, J.K., Larsen, M.H., Ingmer, H., Søgaaard-Andersen, L., Kallipolitis, B.H., and C, D.F. (2004) The RNA-binding protein Hfq of *Listeria monocytogenes*: role in stress tolerance and virulence. *J Bacteriol* **186**: 3355–3362.
- Cocozaki, A.I., Ramia, N.F., Shao, Y., Hale, C.R., Terns, R.M., Terns, M.P., and Li, H. (2012) Structure of the Cmr2 subunit of the CRISPR-Cas RNA silencing complex. *Structure* **20**: 545–553.
- Collins, B.M., Harrop, S.J., Kornfeld, G.D., Dawes, I.W., Curmi, P.M., and Mabbutt, B.C. (2001) Crystal structure of a heptameric Sm-like protein complex from archaea: implications for the structure and evolution of snRNPs. *J Mol Biol* **309**: 915–923.
- Craig, L., Volkman, N., Arvai, A.S., Pique, M.E., Yeager, M., Egelman, E.H., and Tainer, J. a. (2006) Type IV Pilus Structure by Cryo-Electron Microscopy and Crystallography: Implications for Pilus Assembly and Functions. *Mol Cell* **23**: 651–662.
- Cremers, C.M., and Jakob, U. (2013) Oxidant sensing by reversible disulfide bond formation. *J Biol Chem* **288**: 26489–26496.
- Crowther, L.J., Anantha, R.P., and Donnenberg, M.S. (2004) The inner membrane subassembly of the enteropathogenic *Escherichia coli* bundle-forming pilus machine. *Mol Microbiol* **52**: 67–79.
- Crowther, L.J., Yamagata, A., Craig, L., Tainer, J.A., and Donnenberg, M.S. (2005) The ATPase activity of BfpD is greatly enhanced by zinc and allosteric interactions with other Bfp proteins. *J Biol Chem* **280**: 24839–24848.
- Dambach, M., Irnov, I., and Winkler, W.C. (2013) Association of RNAs with *Bacillus subtilis* Hfq. *PLoS One* **8**: e55156.
- Desnoyers, G., Morissette, A., Prévost, K., and Massé, E. (2009) Small RNA-induced differential degradation of the polycistronic mRNA iscRSUA. *EMBO J* **28**: 1551–1561.

- Dienst, D. (2010) Untersuchungen zu Funktion und Struktur des Regulatorproteins Hfq in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Doctoral Thesis* Humboldt-Universität zu Berlin.
- Dienst, D., Dühring, U., Mollenkopf, H.J., Vogel, J., Golecki, J., Hess, W.R., and Wilde, A. (2008) The cyanobacterial homologue of the RNA chaperone Hfq is essential for motility of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Microbiology* **154**: 3134–3143.
- Diestra, E., Cayrol, B., Arluison, V., and Risco, C. (2009) Cellular electron microscopy imaging reveals the localization of the Hfq protein close to the bacterial membrane. *PLoS One* **4**: e8301.
- Ehlers, K., and Oster, G. (2012) On the Mysterious Propulsion of *Synechococcus*. *PLoS One* **7**: e36081.
- El-Robh, M.S., and Busby, S.J.W. (2002) The *Escherichia coli* cAMP receptor protein bound at a single target can activate transcription initiation at divergent promoters: a systematic study that exploits new promoter probe plasmids. *Biochem J* **368**: 835–843.
- Folichon, M., Allemand, F., Régnier, P., and Hajnsdorf, E. (2005) Stimulation of poly(A) synthesis by *Escherichia coli* poly(A) polymerase I is correlated with Hfq binding to poly(A) tails. *FEBS J* **272**: 454–463.
- Folichon, M., Arluison, V., Pellegrini, O., Huntzinger, E., Régnier, P., and Hajnsdorf, E. (2003) The poly(A) binding protein Hfq protects RNA from RNase E and exoribonucleolytic degradation. *Nucleic Acids Res* **31**: 7302–7310.
- Foloppe, N., and Nilsson, L. (2004) The glutaredoxin -C-P-Y-C- motif: influence of peripheral residues. *Structure* **12**: 289–300.
- Francko, D.A., and Wetzel, R.G. (1981) Dynamics of cellular and extracellular cyclic AMP in *Anabaena flos aquae* (Cyanophyta): Intrinsic culture variability and correlation with metabolic variables. *J Phycol* **17**: 129–134.
- Franze de Fernandez, M., Eoyang, L., and August, J. (1968) Factor fraction required for the synthesis of bacteriophage Qbeta-RNA. *Nature* **219**: 588–590.
- Franze de Fernandez, M., Hayward, W., and August, J. (1972) Bacterial proteins required for replication of phage Q ribonucleic acid. Purification and properties of host factor I, a ribonucleic acid-binding protein. *J Biol Chem* **247**: 824–831.
- Fröhlich, K.S., and Vogel, J. (2009) Activation of gene expression by small RNA. *Curr Opin Microbiol* **12**: 674–682.
- Gamsjaeger, R., Liew, C.K., Loughlin, F.E., Crossley, M., and Mackay, J.P. (2007) Sticky fingers: zinc-fingers as protein-recognition motifs. *Trends Biochem Sci* **32**: 63–70.
- Geissmann, T.A., and Touati, D. (2004) Hfq, a new chaperoning role: binding to messenger RNA determines access for small RNA regulator. *EMBO J* **23**: 396–405.
- Georg, J., Voss, B., Scholz, I., Mitschke, J., Wilde, A., and Hess, W.R. (2009) Evidence for a major role of antisense RNAs in cyanobacterial gene regulation. *Mol Syst Biol* **5**: 305.
- Gietz, R.D., Schiestl, R.H., Willems, A.R., and Woods, R.A. (1995) Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast* **11**: 355–360.

- Giltner, C.L., Nguyen, Y., and Burrows, L.L. (2012) Type IV pilin proteins: versatile molecular modules. *Microbiol Mol Biol Rev* **76**: 740–772.
- Gollop, R., Inouye, M., and Inouye, S. (1991) Protein U, a late-developmental spore coat protein of *Myxococcus xanthus*, is a secretory protein. *J Bacteriol* **173**: 3597–3600.
- Gorby, Y.A., Yanina, S., McLean, J.S., Rosso, K.M., Moyles, D., Dohnalkova, A., *et al.* (2006) Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 11358–11363.
- Gottesman, S., and Storz, G. (2011) Bacterial small RNA regulators: versatile roles and rapidly evolving variations. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**: 1–16.
- Grigorieva, G., and Shestakov, S. (1982) Transformation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEMS Microbiol Lett* **13**: 367–370.
- Guisbert, E., Rhodius, V.A., Ahuja, N., Witkin, E., and Gross, C.A. (2007) Hfq modulates the σ^E -mediated envelope stress response and the σ^{32} -mediated cytoplasmic stress response in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **189**: 1963–1973.
- Gupta, R.S., and Mathews, D.W. (2010) Signature proteins for the major clades of Cyanobacteria. *BMC Evol Biol* **10**: 24.
- Häder, D.P. (1987) Photosensory behavior in procaryotes. *Microbiol Rev* **51**: 1–21.
- Hager, A.J., Bolton, D.L., Pelletier, M.R., Brittnacher, M.J., Gallagher, L.A., Kaul, R., *et al.* (2006) Type IV pili-mediated secretion modulates *Francisella virulence*. *Mol Microbiol* **62**: 227–237.
- Hajnsdorf, E., and Régnier, P. (2000) Host factor Hfq of *Escherichia coli* stimulates elongation of poly(A) tails by poly(A) polymerase I. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 1501–1505.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557–580.
- Hatoum-Aslan, A., Maniv, I., and Marraffini, L. a (2011) Mature clustered, regularly interspaced, short palindromic repeats RNA (crRNA) length is measured by a ruler mechanism anchored at the precursor processing site. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 21218–21222.
- Hedger, J., Holmquist, P.C., Leigh, K.A., Saraff, K., Pomykal, C., and Summers, M.L. (2009) Illumination stimulates cAMP receptor protein-dependent transcriptional activation from regulatory regions containing class I and class II promoter elements in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Microbiology* **155**: 2994–3004.
- Helaine, S., Dyer, D.H., Nassif, X., Pelicic, V., and Forest, K.T. (2007) 3D structure/function analysis of PilX reveals how minor pilins can modulate the virulence properties of type IV pili. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 15888–15893.
- Hermann, H., Fabrizio, P., Raker, V.A., Foulaki, K., Hornig, H., Brahms, H., and Lührmann, R. (1995) snRNP Sm proteins share two evolutionarily conserved sequence motifs which are involved in Sm protein-protein interactions. *EMBO J* **14**: 2076–2088.
- Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K., and Pease, L.R. (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**: 51–59.

- Hood, E.E., Armour, S., Ownby, J.D., Handa, A.K., and Bressan, R.A. (1979) Effect of nitrogen starvation on the level of adenosine 3',5'-monophosphate in *Anabaena variabilis*. *Biochim Biophys Acta* **588**: 193–200.
- Horstmann, N., Orans, J., Valentin-Hansen, P., Shelburne, S.A., and Brennan, R.G. (2012) Structural mechanism of *Staphylococcus aureus* Hfq binding to an RNA A-tract. *Nucleic Acids Res* **40**: 11023–11035.
- Ikeda, Y., Yagi, M., Morita, T., and Aiba, H. (2011) Hfq binding at RhlB-recognition region of RNase E is crucial for the rapid degradation of target mRNAs mediated by sRNAs in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **79**: 419–432.
- Ilbert, M., Graf, P.C.F., and Jakob, U. (2006) Zinc center as redox switch--new function for an old motif. *Antioxid Redox Signal* **8**: 835–846.
- James, P., Halladay, J., and Craig, E.A. (1996) Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* **144**: 1425–1436.
- Jones, P., Binns, D., Chang, H.Y., Fraser, M., Li, W., McAnulla, C., *et al.* (2014) InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics* **30**: 1236–1240.
- Jones, S., Daley, D.T., Luscombe, N.M., Berman, H.M., and Thornton, J.M. (2001) Protein-RNA interactions: a structural analysis. *Nucleic Acids Res* **29**: 943–954.
- Kajitani, M., Kato, A., Wada, A., Inokuchi, Y., and Ishihama, A. (1994) Regulation of the *Escherichia coli* hfq gene encoding the host factor for phage Q beta. *J Bacteriol* **176**: 531–534.
- Kalamorz, F., Reichenbach, B., März, W., Rak, B., and Görke, B. (2007) Feedback control of glucosamine-6-phosphate synthase GlmS expression depends on the small RNA GlmZ and involves the novel protein YhbJ in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **65**: 1518–1533.
- Kambach, C., Walke, S., Young, R., Avis, J.M., la Fortelle, E. de, Raker, V.A., *et al.* (1999) Crystal structures of two Sm protein complexes and their implications for the assembly of the spliceosomal snRNPs. *Cell* **96**: 375–387.
- Kamei, A., Yoshihara, S., Yuasa, T., Geng, X., and Ikeuchi, M. (2003) Biochemical and functional characterization of a eukaryotic-type protein kinase, SpkB, in the cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Curr Microbiol* **46**: 296–301.
- Kamei, A., Yuasa, T., Orikawa, K., Geng, X.X., and Ikeuchi, M. (2001) A eukaryotic-type protein kinase, SpkA, is required for normal motility of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J Bacteriol* **183**: 1505–1510.
- Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Nakamura, Y., *et al.* (1996) Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res* **3**: 109–136.
- Kawamoto, H., Morita, T., Shimizu, A., Inada, T., and Aiba, H. (2005) Implication of membrane localization of target mRNA in the action of a small RNA: mechanism of post-transcriptional regulation of glucose transporter in *Escherichia coli*. *Genes Dev* **19**: 328–338.
- Kelley, L.A., and Sternberg, M.J.E. (2009) Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat Protoc* **4**: 363–371.

- Khusial, P., Plaag, R., and Zieve, G.W. (2005) LSm proteins form heptameric rings that bind to RNA via repeating motifs. *Trends Biochem Sci* **30**: 522–528.
- Kim, Y.H., Kim, J.Y., Kim, S. Y., Lee, J.H., Lee, J.S., Chung, Y.H., *et al.* (2009) Alteration in the glycan pattern of pilin in a nonmotile mutant of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Proteomics* **9**: 1075–1086.
- Kim, Y.H., Park, Y.M., Kim, S.J., Park, Y.I., Choi, J.S., and Chung, Y.H. (2004) The role of Slr1443 in pilus biogenesis in *Synechocystis* sp. PCC 6803: involvement in post-translational modification of pilins. *Biochem Biophys Res Commun* **315**: 179–186.
- Kirn, T.J., Bose, N., and Taylor, R.K. (2003) Secretion of a soluble colonization factor by the TCP type 4 pilus biogenesis pathway in *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol* **49**: 81–92.
- Korotkov, K. V., Sandkvist, M., and Hol, W.G.J. (2012) The type II secretion system: biogenesis, molecular architecture and mechanism. *Nat Rev Microbiol* .
- Krishna, S.S., Majumdar, I., and Grishin, N. V (2003) Structural classification of zinc fingers: survey and summary. *Nucleic Acids Res* **31**: 532–550.
- Kuchmina, E., Wallner, T., Kryazhov, S., Zinchenko, V. V, and Wilde, A. (2012) An expression system for regulated protein production in *Synechocystis* sp. PCC 6803 and its application for construction of a conditional knockout of the ferroxidase enzyme. *J Biotechnol* **162**: 75–80.
- Kumar, R., Shah, P., Swiatlo, E., Burgess, S.C., Lawrence, M.L., and Nanduri, B. (2010) Identification of novel non-coding small RNAs from *Streptococcus pneumoniae* TIGR4 using high-resolution genome tiling arrays. *BMC Genomics* **11**: 350.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–685.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., *et al.* (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**: 2947–2948.
- De Lay, N., and Gottesman, S. (2011) Role of polynucleotide phosphorylase in sRNA function in *Escherichia coli*. *RNA* **17**: 1172–1189.
- Link, T.M., Valentin-Hansen, P., and Brennan, R.G. (2009) Structure of *Escherichia coli* Hfq bound to polyriboadenylate RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 19292–19297.
- Liu, Y., Wu, N., Dong, J., Gao, Y., Zhang, X., Mu, C., *et al.* (2010) Hfq is a global regulator that controls the pathogenicity of *Staphylococcus aureus*. *PLoS One* **5**: e13069.
- Louwen, R., Horst-Kreft, D., Boer, A.G. de, Graaf, L. van der, Knegt, G. de, Hamersma, M., *et al.* (2013) A novel link between *Campylobacter jejuni* bacteriophage defence, virulence and Guillain-Barré syndrome. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **32**: 207–226.
- MacKinney, G. (1941) Absorption of light by chlorophyll solutions. *J Biol Chem* **140**: 315–322.
- Makarova, K.S., Haft, D.H., Barrangou, R., Brouns, S.J.J., Charpentier, E., Horvath, P., *et al.* (2011) Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol* **9**: 467–477.

- Massé, E., Escorcia, F.E., and Gottesman, S. (2003) Coupled degradation of a small regulatory RNA and its mRNA targets in *Escherichia coli*. *Genes Dev* **17**: 2374–2383.
- Massé, E., and Gottesman, S. (2002) A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 4620–4625.
- Mattick, J.S. (2002) Type IV pili and twitching motility. *Annu Rev Microbiol* **56**: 289–314.
- Mikulecky, P.J., Kaw, M.K., Brescia, C.C., Takach, J.C., Sledjeski, D.D., and Feig, A.L. (2004) *Escherichia coli* Hfq has distinct interaction surfaces for DsrA, rpoS and poly(A) RNAs. *Nat Struct Mol Biol* **11**: 1206–1214.
- Mitschke, J., Georg, J., Scholz, I., Sharma, C.M., Dienst, D., Bantscheff, J., et al. (2011) An experimentally anchored map of transcriptional start sites in the model cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 2124–2129.
- Mohanty, B.K., Maples, V.F., and Kushner, S.R. (2004) The Sm-like protein Hfq regulates polyadenylation dependent mRNA decay in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **54**: 905–920.
- Møller, T., Franch, T., Højrup, P., Keene, D.R., Bächinger, H.P., Brennan, R.G., and Valentin-Hansen, P. (2002) Hfq: a bacterial Sm-like protein that mediates RNA-RNA interaction. *Mol Cell* **9**: 23–30.
- Monteiro, C., Papenfort, K., Hentrich, K., Ahmad, I., Guyon, S. Le, Reimann, R., et al. (2012) Hfq and Hfq-dependent small RNAs are major contributors to multicellular development in *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*. *RNA Biol* **9**: 489–502.
- Morita, T., Maki, K., and Aiba, H. (2005) RNase E-based ribonucleoprotein complexes: mechanical basis of mRNA destabilization mediated by bacterial noncoding RNAs. *Genes Dev* **19**: 2176–2186.
- Mössner, E., Huber-Wunderlich, M., Rietsch, A., Beckwith, J., Glockshuber, R., and Aslund, F. (1999) Importance of redox potential for the in vivo function of the cytoplasmic disulfide reductant thioredoxin from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **274**: 25254–25259.
- Nielsen, J.S., Lei, L.K., Ebersbach, T., Olsen, A.S., Klitgaard, J.K., Valentin-Hansen, P., and Kallipolitis, B.H. (2010) Defining a role for Hfq in Gram-positive bacteria: evidence for Hfq-dependent antisense regulation in *Listeria monocytogenes*. *Nucleic Acids Res* **38**: 907–919.
- Niemann, G.S., Brown, R.N., Mushamiri, I.T., Nguyen, N.T., Taiwo, R., Stufkens, A., et al. (2013) RNA type III secretion signals that require Hfq. *J Bacteriol* **195**: 2119–2125.
- Nuccio, S.P., and Bäumlner, A.J. (2007) Evolution of the chaperone/usher assembly pathway: fimbrial classification goes Greek. *Microbiol Mol Biol Rev* **71**: 551–575.
- Nultsch, W. (1973) Phototaxis and Photokinesis in Bacteria and Blue-Green Algae. In *Behaviour of Microorganisms*. pp. 70–81.
- Okajima, K., Yoshihara, S., Fukushima, Y., Geng, X., Katayama, M., Higashi, S., et al. (2005) Biochemical and functional characterization of BLUF-type flavin-binding proteins of two species of cyanobacteria. *J Biochem* **137**: 741–750.
- Olsen, A.S., Møller-Jensen, J., Brennan, R.G., and Valentin-Hansen, P. (2010) C-terminally truncated derivatives of *Escherichia coli* Hfq are proficient in riboregulation. *J Mol Biol* **404**: 173–182.

- Omagari, K., Yoshimura, H., Suzuki, T., Takano, M., Ohmori, M., and Sarai, A. (2008) DeltaG-based prediction and experimental confirmation of SYCRP1-binding sites on the *Synechocystis* genome. *FEBS J* **275**: 4786–4795.
- Otaka, H., Ishikawa, H., Morita, T., and Aiba, H. (2011) PolyU tail of rho-independent terminator of bacterial small RNAs is essential for Hfq action. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 13059–13064.
- Palenik, B., Brahamsha, B., Larimer, F.W., Land, M., Hauser, L., Chain, P., *et al.* (2003) The genome of a motile marine *Synechococcus*. *Nature* **424**: 1037–1042.
- Panichkin, V.B., Arakawa-Kobayashi, S., Kanaseki, T., Suzuki, I., Los, D. a, Shestakov, S. V, and Murata, N. (2006) Serine/threonine protein kinase SpkA in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 is a regulator of expression of three putative pilA operons, formation of thick pili, and cell motility. *J Bacteriol* **188**: 7696–7699.
- Peabody, C.R. (2003) Type II protein secretion and its relationship to bacterial type IV pili and archaeal flagella. *Microbiology* **149**: 3051–3072.
- Pinto, F.L., Thapper, A., Sontheim, W., and Lindblad, P. (2009) Analysis of current and alternative phenol based RNA extraction methodologies for cyanobacteria. *BMC Mol Biol* **10**: 79.
- Planet, P.J., Kachlany, S.C., DeSalle, R., and Figurski, D.H. (2001) Phylogeny of genes for secretion NTPases: identification of the widespread tadA subfamily and development of a diagnostic key for gene classification. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 2503–2508.
- Porter, S.L., Wadhams, G.H., and Armitage, J.P. (2011) Signal processing in complex chemotaxis pathways. *Nat Rev Microbiol* **9**: 153–165.
- Prévost, K., Desnoyers, G., Jacques, J.-F., Lavoie, F., and Massé, E. (2011) Small RNA-induced mRNA degradation achieved through both translation block and activated cleavage. *Genes Dev* **25**: 385–396.
- Puerta-Fernández, E., and Vioque, A. (2011) Hfq is required for optimal nitrate assimilation in the Cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J Bacteriol* **193**: 3546–3555.
- Py, B., Loiseau, L., and Barras, F. (2001) An inner membrane platform in the type II secretion machinery of Gram-negative bacteria. *EMBO Rep* **2**: 244–248.
- Quan, S., Schneider, I., Pan, J., Hacht, A. Von, and Bardwell, J.C.A. (2007) The CXXC motif is more than a redox rheostat. *J Biol Chem* **282**: 28823–28833.
- Rabhi, M., Espéli, O., Schwartz, A., Cayrol, B., Rahmouni, A.R., Arluison, V., and Boudvillain, M. (2011) The Sm-like RNA chaperone Hfq mediates transcription antitermination at Rho-dependent terminators. *EMBO J* **30**: 2805–2816.
- Rawlings, N.D., and Barrett, A.J. (1994) Families of cysteine peptidases. *Methods Enzymol* **244**: 461–486.
- Read, N., Connell, S., and Adams, D.G. (2007) Nanoscale visualization of a fibrillar array in the cell wall of filamentous cyanobacteria and its implications for gliding motility. *J Bacteriol* **189**: 7361–7366.
- Ribeiro, E.D.A., Beich-Frandsen, M., Konarev, P. V, Shang, W., Vecerek, B., Kontaxis, G., *et al.* (2012) Structural flexibility of RNA as molecular basis for Hfq chaperone function. *Nucleic Acids Res* **40**: 8072–8084.

- Rice, J.B., Balasubramanian, D., and Vanderpool, C.K. (2012) Small RNA binding-site multiplicity involved in translational regulation of a polycistronic mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: E2691–2698.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J.B., Herdman, M., and Stanier, R.Y. (1979) Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J Gen Microbiol* **111**: 1–61.
- Robien, M.A., Krumm, B.E., Sandkvist, M., and Hol, W.G. (2003) Crystal structure of the extracellular protein secretion NTPase EpsE of *Vibrio cholerae*. *J Mol Biol* **333**: 657–674.
- Rouillon, C., Zhou, M., Zhang, J., Politis, A., Beilsten-Edmands, V., Cannone, G., *et al.* (2013) Structure of the CRISPR interference complex CSM reveals key similarities with cascade. *Mol Cell* **52**: 124–134.
- Salim, N.N., Faner, M.A., Philip, J.A., and Feig, A.L. (2012) Requirement of upstream Hfq-binding (ARN)_x elements in glmS and the Hfq C-terminal region for GlnS upregulation by sRNAs GlnZ and GlnY. *Nucleic Acids Res* **40**: 8021–32.
- Samuel, A.D., Petersen, J.D., and Reese, T.S. (2001) Envelope structure of *Synechococcus* sp. WH8113, a nonflagellated swimming cyanobacterium. *BMC Microbiol* **1**: 4.
- Sandkvist, M., Bagdasarian, M., Howard, S.P., and DiRita, V.J. (1995) Interaction between the autokinase EpsE and EpsL in the cytoplasmic membrane is required for extracellular secretion in *Vibrio cholerae*. *EMBO J* **14**: 1664–1673.
- Sato, S., Shimoda, Y., Muraki, A., Kohara, M., Nakamura, Y., and Tabata, S. (2007) A large-scale protein protein interaction analysis in *Synechocystis* sp. PCC6803. *DNA Res* **14**: 207–216.
- Sauer, E., Schmidt, S., and Weichenrieder, O. (2012) Small RNA binding to the lateral surface of Hfq hexamers and structural rearrangements upon mRNA target recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 9396–9401.
- Sauer, E., and Weichenrieder, O. (2011) Structural basis for RNA 3'-end recognition by Hfq. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 13065–13070.
- Savakis, P., De Causmaecker, S., Angerer, V., Ruppert, U., Anders, K., Essen, L.O., and Wilde, A. (2012) Light-induced alteration of c-di-GMP level controls motility of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Mol Microbiol* **85**: 239–251.
- Schägger, H. (2006) Tricine-SDS-PAGE. *Nat Protoc* **1**: 16–22.
- Schatz, D., Nagar, E., Sendersky, E., Parnasa, R., Zilberman, S., Carmeli, S., *et al.* (2013) Self-suppression of biofilm formation in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus*. *Environ Microbiol* **15**: 1786–1794.
- Scholz, I., Lange, S.J., Hein, S., Hess, W.R., and Backofen, R. (2013) CRISPR-Cas Systems in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 Exhibit Distinct Processing Pathways Involving at Least Two Cas6 and a Cmr2 Protein. *PLoS One* **8**: e56470.
- Schuergers, N., Ruppert, U., Watanabe, S., Nürnberg, D.J., Lochnit, G., Dienst, D., *et al.* (2014) Binding of the RNA chaperone Hfq to the type IV pilus base is crucial for its function in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Mol Microbiol* **92**: 840–852.

- Schumacher, M.A., Pearson, R.F., Møller, T., Valentin-Hansen, P., and Brennan, R.G. (2002) Structures of the pleiotropic translational regulator Hfq and an Hfq-RNA complex: a bacterial Sm-like protein. *EMBO J* **21**: 3546–3556.
- Shapiro, L., Franze de Fernandez, M., and August, J. (1968) Resolution of two factors required in the Q-beta-RNA polymerase reaction. *Nature* **220**: 478–480.
- Sharma, C.M., Hoffmann, S., Darfeuille, F., Reignier, J., Findeiss, S., Sittka, A., et al. (2010) The primary transcriptome of the major human pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* **464**: 250–255.
- Shih, P.M., Wu, D., Latifi, A., Axen, S.D., Fewer, D.P., Talla, E., et al. (2013) Improving the coverage of the cyanobacterial phylum using diversity-driven genome sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 1053–1058.
- Sittka, A., Lucchini, S., Papenfort, K., Sharma, C.M., Rolle, K., Binnewies, T.T., et al. (2008) Deep sequencing analysis of small noncoding RNA and mRNA targets of the global post-transcriptional regulator, Hfq. *PLoS Genet* **4**: e1000163.
- Sobrero, P., and Valverde, C. (2012) The bacterial protein Hfq: much more than a mere RNA-binding factor. *Crit Rev Microbiol* **38**: 276–299.
- Someya, T., Baba, S., Fujimoto, M., Kawai, G., Kumasaka, T., and Nakamura, K. (2012) Crystal structure of Hfq from *Bacillus subtilis* in complex with SELEX-derived RNA aptamer: insight into RNA-binding properties of bacterial Hfq. *Nucleic Acids Res* **40**: 1856–1867.
- Song, J.Y., Cho, H.S., Cho, J. II, Jeon, J.S., Lagarias, J.C., and Park, Y. II (2011) Near-UV cyanobacteriochrome signaling system elicits negative phototaxis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 10780–10785.
- Sonnleitner, E., Hagens, S., Rosenau, F., Wilhelm, S., Habel, A., Jäger, K.-E., and Bläsi, U. (2003) Reduced virulence of a hfq mutant of *Pseudomonas aeruginosa* O1. *Microb Pathog* **35**: 217–228.
- Soper, T.J., Doxzen, K., and Woodson, S. a (2011) Major role for mRNA binding and restructuring in sRNA recruitment by Hfq. *RNA* **17**: 1544–1550.
- Stanier, R.Y., Kunisawa, R., Mandel, M., and Cohen-Bazire, G. (1971) Purification and properties of unicellular blue-green algae (order *Chroococcales*). *Bacteriol Rev* **35**: 171–205.
- Sukhodolets, M. V, and Garges, S. (2003) Interaction of *Escherichia coli* RNA polymerase with the ribosomal protein S1 and the Sm-like ATPase Hfq. *Biochemistry* **42**: 8022–8034.
- Sun, X., Zhulin, I., and Wartell, R.M. (2002) Predicted structure and phyletic distribution of the RNA-binding protein Hfq. *Nucleic Acids Res* **30**: 3662–3671.
- Sutherland, I.W., Hughes, K.A., Skillman, L.C., and Tait, K. (2004) The interaction of phage and biofilms. *FEMS Microbiol Lett* **232**: 1–6.
- Suzuki, T., Yoshimura, H., Ehira, S., Ikeuchi, M., and Ohmori, M. (2007) AnCrpA, a cAMP receptor protein, regulates nif-related gene expression in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120 grown with nitrate. *FEBS Lett* **581**: 21–28.

- T. Vaara (1982) The outermost surface structures in chroococcacean cyanobacteria. *Can J Microbiol* **28**: 929–941.
- Taghbalout, A., Yang, Q., and Arluison, V. (2014) The *Escherichia coli* RNA processing and degradation machinery is compartmentalized within an organized cellular network. *Biochem J* **458**: 11–22.
- Terauchi, K., and Ohmori, M. (1999) An adenylate cyclase, Cya1, regulates cell motility in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Cell Physiol* **40**: 248–251.
- Thiel, T., and Poo, H. (1989) Transformation of a filamentous cyanobacterium by electroporation. *J Bacteriol* **171**: 5743–5746.
- Thomason, M.K., Fontaine, F., De Lay, N., and Storz, G. (2012) A small RNA that regulates motility and biofilm formation in response to changes in nutrient availability in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **84**: 17–35.
- Tomaras, A.P., Dorsey, C.W., Edelman, R.E., and Actis, L.A. (2003) Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. *Microbiology* **149**: 3473–3484.
- Torres-Quesada, O., Oruezabal, R.I., Peregrina, A., Jofré, E., Lloret, J., Rivilla, R., *et al.* (2010) The *Sinorhizobium meliloti* RNA chaperone Hfq influences central carbon metabolism and the symbiotic interaction with alfalfa. *BMC Microbiol* **10**: 71.
- Trautmann, D., Voss, B., Wilde, A., Al-Babili, S., and Hess, W.R. (2012) Microevolution in cyanobacteria: re-sequencing a motile strain of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *DNA Res* **19**: 435–448.
- Ursell, T., Chau, R.M.W., Wisen, S., Bhaya, D., and Huang, K.C. (2013) Motility enhancement through surface modification is sufficient for cyanobacterial community organization during phototaxis. *PLoS Comput Biol* **9**: e1003205.
- Valentin-Hansen, P., Eriksen, M., and Udesen, C. (2004) The bacterial Sm-like protein Hfq: a key player in RNA transactions. *Mol Microbiol* **51**: 1525–1533.
- Vecerek, B., Rajkowitsch, L., Sonnleitner, E., Schroeder, R., and Bläsi, U. (2008) The C-terminal domain of *Escherichia coli* Hfq is required for regulation. *Nucleic Acids Res* **36**: 133–143.
- Vieira, J., and Messing, J. (1982) The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* **19**: 259–268.
- Viswanathan, P., Murphy, K., Julien, B., Garza, A.G., and Kroos, L. (2007) Regulation of dev, an operon that includes genes essential for *Myxococcus xanthus* development and CRISPR-associated genes and repeats. *J Bacteriol* **189**: 3738–3750.
- Vogel, J., and Luisi, B.F. (2011) Hfq and its constellation of RNA. *Nat Rev Microbiol* **9**: 578–589.
- Vogel, J., and Papenfort, K. (2006) Small non-coding RNAs and the bacterial outer membrane. *Curr Opin Microbiol* **9**: 605–611.
- Voss, B., Georg, J., Schön, V., Ude, S., and Hess, W.R. (2009) Biocomputational prediction of non-coding RNAs in model cyanobacteria. *BMC Genomics* **10**: 123.

- Waksman, G., and Hultgren, S.J. (2009) Structural biology of the chaperone-usher pathway of pilus biogenesis. *Nat Rev Microbiol* **7**: 765–774.
- Wallner, T., Hagiwara, Y., Bernát, G., Sobotka, R., Reijerse, E.J., Frankenberg-Dinkel, N., and Wilde, A. (2012) Inactivation of the conserved open reading frame ycf34 of *Synechocystis* sp. PCC 6803 interferes with the photosynthetic electron transport chain. *Biochim Biophys Acta* **1817**: 2016–2026.
- Wang, M.C., Chien, H.F., Tsai, Y.L., Liu, M.C., and Liaw, S.-J. (2014) The RNA chaperone Hfq is involved in stress tolerance and virulence in uropathogenic *Proteus mirabilis*. *PLoS One* **9**: e85626.
- Wang, W., Wang, L., Wu, J., Gong, Q., and Shi, Y. (2013) Hfq-bridged ternary complex is important for translation activation of rpoS by DsrA. *Nucleic Acids Res* **41**: 5938–5948.
- Wang, Z., Gerstein, M., and Snyder, M. (2009) RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet* **10**: 57–63.
- Waterhouse, A.M., Procter, J.B., Martin, D.M.A., Clamp, M., and Barton, G.J. (2009) Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* **25**: 1189–1191.
- Waters, L.S., and Storz, G. (2009) Regulatory RNAs in bacteria. *Cell* **136**: 615–628.
- Whitton, B.A., and Potts, M. (2000) *Ecology of cyanobacteria: their diversity in space and time*. Kluwer Academic Press, .
- Wiegand, A., Dörrich, A.K., Deinzer, H.T., Beck, C., Wilde, A., Holtzendorff, J., and Axmann, I.M. (2013) Biochemical analysis of three putative KaiC clock proteins from *Synechocystis* sp. PCC 6803 suggests their functional divergence. *Microbiology* **159**: 948–958.
- Wilusz, C.J., and Wilusz, J. (2005) Eukaryotic Lsm proteins: lessons from bacteria. *Nat Struct Mol Biol* **12**: 1031–1036.
- Windbichler, N., Von Pelchrzim, F., Mayer, O., Csaszar, E., and Schroeder, R. (2008) Isolation of small RNA-binding proteins from *E. coli*: evidence for frequent interaction of RNAs with RNA polymerase. *Rna Biol* **5**: 30–40.
- Wolk, C.P., Vonshak, A., Kehoe, P., and Elhai, J. (1984) Construction of shuttle vectors capable of conjugative transfer from *Escherichia coli* to nitrogen-fixing filamentous cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**: 1561–1565.
- Worrall, J.A.R., Górna, M., Crump, N.T., Phillips, L.G., Tuck, A.C., Price, A.J., et al. (2008) Reconstitution and analysis of the multienzyme *Escherichia coli* RNA degradosome. *J Mol Biol* **382**: 870–883.
- Xu, M., and Su, Z. (2009) Computational prediction of cAMP receptor protein (CRP) binding sites in cyanobacterial genomes. *BMC Genomics* **10**: 23.
- Yamagata, A., and Tainer, J.A. (2007) Hexameric structures of the archaeal secretion ATPase GspE and implications for a universal secretion mechanism. *EMBO J* **26**: 878–890.
- Yeo, H.J., Savvides, S.N., Herr, A.B., Lanka, E., and Waksman, G. (2000) Crystal structure of the hexameric traffic ATPase of the *Helicobacter pylori* type IV secretion system. *Mol Cell* **6**: 1461–1472.

- Yonekura, K., Watanabe, M., Kageyama, Y., Hirata, K., Yamamoto, M., and Maki-Yonekura, S. (2013) Post-transcriptional regulator Hfq binds catalase HP11: crystal structure of the complex. *PLoS One* **8**: e78216.
- Yoshihara, S., Geng, X., and Ikeuchi, M. (2002) pilG Gene cluster and split pilL genes involved in pilus biogenesis, motility and genetic transformation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Cell Physiol* **43**: 513–521.
- Yoshihara, S., Geng, X., Okamoto, S., Yura, K., Murata, T., Go, M., *et al.* (2001) Mutational analysis of genes involved in pilus structure, motility and transformation competency in the unicellular motile cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Cell Physiol* **42**: 63–73.
- Yoshihara, S., and Ikeuchi, M. (2004) Phototactic motility in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Photochem Photobiol Sci* **3**: 512–518.
- Yoshihara, S., Katayama, M., Geng, X., and Ikeuchi, M. (2004) Cyanobacterial phytochrome-like PixJ1 holoprotein shows novel reversible photoconversion between blue- and green-absorbing forms. *Plant Cell Physiol* **45**: 1729–1737.
- Yoshihara, S., Suzuki, F., Fujita, H., Geng, X.X., and Ikeuchi, M. (2000) Novel putative photoreceptor and regulatory genes required for the positive phototactic movement of the unicellular motile cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Cell Physiol* **41**: 1299–1304.
- Yoshimura, H., Kaneko, Y., Ehira, S., Yoshihara, S., Ikeuchi, M., and Ohmori, M. (2010) CccS and CccP are involved in construction of cell surface components in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Plant Cell Physiol* **51**: 1163–1172.
- Yoshimura, H., Yanagisawa, S., Kanehisa, M., and Ohmori, M. (2002) Screening for the target gene of cyanobacterial cAMP receptor protein SYCRP1. *Mol Microbiol* **43**: 843–853.
- Yoshimura, H., Yoshihara, S., Okamoto, S., Ikeuchi, M., and Ohmori, M. (2002) A cAMP receptor protein, SYCRP1, is responsible for the cell motility of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Cell Physiol* **43**: 460–463.
- Yoshimura, M., Asai, K., Sadaie, Y., and Yoshikawa, H. (2004) Interaction of *Bacillus subtilis* extracytoplasmic function (ECF) sigma factors with the N-terminal regions of their potential anti-sigma factors. *Microbiology* **150**: 591–599.
- Yuan, H., and Bauer, C.E. (2008) PixE promotes dark oligomerization of the BLUF photoreceptor PixD. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 11715–11719.
- Zhang, A., Schu, D.J., Tjaden, B.C., Storz, G., and Gottesman, S. (2013) Mutations in interaction surfaces differentially impact *E. coli* Hfq association with small RNAs and their mRNA targets. *J Mol Biol* **425**: 3678–3697.
- Zhang, A., Wassarman, K.M., Ortega, J., Steven, A.C., and Storz, G. (2002) The Sm-like Hfq protein increases OxyS RNA interaction with target mRNAs. *Mol Cell* **9**: 11–22.
- Zhang, A., Wassarman, K.M., Rosenow, C., Tjaden, B.C., Storz, G., and Gottesman, S. (2003) Global analysis of small RNA and mRNA targets of Hfq. *Mol Microbiol* **50**: 1111–1124.
- Zinchenko, V.V., Piven, I.V., Melnik, V.A., and Shestakov, S.V. (1999) Vectors for the complementation analysis of cyanobacterial mutants. *Russ J Genet* **35**: 228–232.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	Mikro 10 ⁻⁶
Å	Ångström
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)benzensulfonylfluorid
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
asRNA	Antisense-RNA
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	<i>complementary</i> DNA; komplementäre DNA
Cm	Chloramphenicol
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cy3	Cyanin-Farbstoff
d	<i>day</i> ; Tag(e)
d.h.	das heißt
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DEPC	Diethylcarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> ; Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DOC	(Natrium-)Desoxycholat

dsDNA	Doppelstrang-DNA
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	<i>et alia</i> ; und andere
EtBr	Ethidiumbromid
FC	<i>fold change</i> ; quantitative Veränderung
g	Gravitationskonstante
h	Stunde(n)
HEPES	Hydroxyethylpiperazinethanesulfonsäure
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> ; Meerrettich-Peroxidase
IgG	Immunglobulin G
IGR	intergenische Region
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
Km	Kanamycin
l	Liter
LB	<i>lysogeny broth</i>
log	Logarithmus
m	Milli (10^{-3})
M	Molar
mA	Miliampere
Mb	Megabasen
MEN	MOPS-EDTA-Natrium-Acetat-Puffer
min	Minuten(n)
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mRNA	<i>messenger RNA</i> ; Boten-RNA
MW	<i>molecular weight</i> ; molekulare Masse
n	Nano (10^{-9})
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
ncRNA	<i>non-coding RNA</i> ; nicht-kodierende RNA
nt	Nukleotid(e)
OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i> ; offener Leserahmen
p	Pico (10^{-12})

PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCC	Pasteur Culture Collection
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> ; Polymerasekettenreaktion
pH	<i>potentia Hydrogenii</i>
RBS	Ribosomenbindungsstelle
RNA	<i>ribonucleic acid</i> ; Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>rounds per minute</i> ; Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
SDS	Natriumdodecylsulfat
snRNA	<i>small nucleolar RNA</i>
sp.	<i>species</i> ; Spezies
sRNA	<i>small non-coding RNA</i> ; kleine regulatorische RNA
Strep	Streptomycin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS-T	Tris- <i>buffered saline</i> Puffer mit Tween 20
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N, N-Tetramethylethylendiamin
TES	Tris(hydroxymethyl)methylaminoethansulfonsäure
Tricin	N-Tris-(hydroxymethyl)-methyl-glycin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
Tween 20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
U	<i>unit</i> ; Einheit
u.a.	unter anderem
UTP	Uridintriphosphat
UTR	<i>untranslated region</i> ; nicht-translatierter Bereich
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumenteil pro Gesamtvolumen

w/v	Massenanteil pro Gesamtvolumen
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

Danksagung

Insbesondere gilt mein Dank Prof. Dr. Annegret Wilde. Danke für das Vertrauen, die gute Betreuung, die vielen interessanten und lehrreichen Diskussionen und vor allem auch für die Fähigkeit mich immer wieder zu motivieren und die Freude an der Wissenschaft in mir wach zu halten! Danke auch für die unkomplizierte Hilfe in Zeiten der Wohnungsnot!

Ein ganz großes Dankeschön an alle jetzigen und ehemaligen Mitarbeiter der AG Wilde die immer mit einer helfenden Hand und guten Ratschlägen zur Stelle waren und für gute Laune und eine angenehme Atmosphäre im Labor gesorgt haben. Hervorheben möchte ich dabei Ulrike Ruppert und Werner Bigott auf Grund ihrer tatkräftigen Unterstützung bei der Generierung der unzähligen Mutanten.

Ebenso möchte ich den (ehemaligen) Mitgliedern der AG Klug aus Gießen für ihre Bereitschaft danken, immer wieder (auch nach Feierabend) neue Ideen und Experimente zum Thema RNA und Hfq zu diskutieren.

Dank gebührt auch Prof. Conrad Mullineaux für die vielen Arbeitsstunden am konvokalen Mikroskop und die vielen Ratschläge zur Visualisierung fluoreszenzmarkierter Proteine sowie Dr. Satoru Watanabe, der mit viel Enthusiasmus und fundierten Kenntnissen von Y2H-Analysen zur Aufklärung der Hfq-PilB1-Interaktion beitrug.

Und zum Schluss möchte ich mich vor allem bei denen bedanken, die über all die Jahre immer für mich da waren und mir damit ermöglicht haben dieses Ziel zu erreichen: Danke Helga & Matthias!