

Posttranskriptionelle Regulation
bakterieller Photosynthesegene
durch die Ribonuklease E
und die *antisense* RNA
asPcrL

Inaugural Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

vorgelegt von

Carina Maria Reuscher

angefertigt am Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie

Fachbereich Biologie und Chemie

Justus-Liebig-Universität Gießen

Gießen, Mai 2020

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie des Fachbereich Biologie und Chemie der Justus-Liebig-Universität Gießen in der Zeit von September 2015 bis Mai 2020 unter der Leitung von Prof. Dr. Gabriele Klug angefertigt.

1. Gutachterin: Prof. Dr. Gabriele Klug

Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie
Justus-Liebig-Universität Gießen

2. Gutachter: Prof. Dr. Michael Niepmann

Institut für Biochemie
Justus-Liebig-Universität Gießen

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig 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. Ich stimme einer evtl. Überprüfung meiner Dissertation durch eine Antiplagiat-Software zu. 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.

Carina Reuscher

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
1 Einleitung.....	1
1.1 Genregulation auf transkriptioneller Ebene.....	1
1.2 Genregulation auf posttranskriptioneller Ebene	3
1.2.1 Posttranskriptionelle Regulation durch Ribonukleasen und phosphorolytische Spaltungen.....	7
1.2.2 RNase E und das Degradosom	7
1.2.3 RNase III	11
1.3 Regulierende <i>cis</i> -RNA-Elemente	12
1.4 sRNAs.....	14
1.4.1 Protein-bindende sRNA	14
1.4.2 <i>Trans</i> -kodierte regulatorische RNA	15
1.4.3 Hfq als Schlüsselprotein.....	17
1.4.4 <i>Cis</i> -kodierte regulatorische RNA	18
1.5 <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	21
1.6 Bakterielle Photosynthese.....	21
1.7 Anoxygene Photosynthese von <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	23
1.8 Regulation der Photosynthesegene	25
1.9 <i>puf</i> -Operon von <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	29
1.10 Zielsetzung	32
2 Material und Methoden.....	33
2.1 Material.....	33
2.1.1 Stämme.....	33
2.1.2 Plasmide	35
2.1.3 Oligonukleotide	36
2.1.4 Radioaktive Nukleotide.....	37
2.1.5 Enzyme.....	37
2.1.6 Größenstandards.....	37
2.1.7 Geräte	37
2.1.8 Molekularbiologische Kits	38
2.1.9 Labormaterial	38
2.1.10 Chemikalien	39
2.2 Mikrobiologische Methoden.....	40
2.2.1 Sterilisation.....	40
2.2.2 Kultivierung von <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	40
2.2.2.1 Anzucht auf Agarplatte.....	41
2.2.2.2 Anzucht in Flüssigkulturen.....	42

2.2.2.3	Aerobes Wachstum.....	42
2.2.2.4	Mikroaerobes Wachstum.....	42
2.2.2.5	Phototrophes Wachstum.....	42
2.2.2.6	Sauerstoff- <i>Shift</i> -Experimente	42
2.2.2.7	Inaktivierung der thermosensitiven RNase E	42
2.2.2.8	RNA-Stabilitätsassay.....	43
2.2.3	Kultivierung von <i>E. coli</i>	44
2.2.3.1	Anzucht auf Agarplatte.....	44
2.2.3.2	Anzucht in Flüssigkulturen.....	44
2.2.4	Überproduktion von rekombinanten Proteinen von <i>Rhodobacter</i> in <i>E. coli</i>	44
2.2.5	Glycerinkulturen.....	45
2.2.6	Bestimmung der optischen Dichte einer Bakterienkultur	45
2.2.7	Vollzellspektren von <i>R. sphaeroides</i>	46
2.2.8	Zellfreie Spektren von <i>R. sphaeroides</i>	46
2.2.9	Bestimmung des Bakteriochlorophyll- und Carotinoidgehalts	46
2.2.10	Quantifizierung der Lichtsammelkomplexe I und II.....	47
2.2.11	Herstellen elektrokompenter Zellen	48
2.2.12	Elektroporation von <i>E. coli</i>	48
2.2.13	Konjugation von <i>R. sphaeroides</i>	49
2.2.14	Bestimmung der Überlebenszahl	50
2.2.15	Hemmhoftest	50
2.3	Molekularbiologische Methoden.....	51
2.3.1	Isolation von DNA	51
2.3.1.1	Isolation von genomischer DNA aus <i>R. sphaeroides</i>	51
2.3.1.2	Plasmidisolation aus <i>E. coli</i> und <i>R. sphaeroides</i>	52
2.3.1.3	Plasmidisolation von <i>E. coli</i> und <i>R. sphaeroides</i> mittels Kit	53
2.3.2	Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels Polymerase-Kettenreaktion	53
2.3.3	Quantifizierung von Nukleinsäuren	54
2.3.4	Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren.....	55
2.3.4.1	DNA-Aufreinigung aus Agarosegelen	56
2.3.4.2	Polyacrylamidgelelektrophorese von RNA	56
2.3.5	Restriktion von DNA	56
2.3.6	Ligation von DNA.....	57
2.3.7	n-Butanol-Fällung	57
2.3.8	Isolierung von RNA	58
2.3.8.1	Aufreinigung von RNA mittels <i>hot phenol</i>	58
2.3.8.2	Aufreinigung von RNA mittels Trizol.....	59

2.3.9	DNase-Verdau	60
2.3.10	Detektion von Ribonukleinsäuren mittel Northern Blot Analyse	60
2.3.10.1	Northern Blot Analyse mittels Urea-Polyacrylamidgel	60
2.3.10.2	Northern Blot Analyse mittels Formaldehyd-Agarosegel	62
2.3.10.3	Hybridisierung	64
2.3.10.4	Waschen der Membranen.....	66
2.3.10.5	Detektion und Quantifizierung von Signalen	66
2.3.10.6	Ablösen von radioaktiv-markierten Sonden von der Membran.....	67
2.3.11	Labeln von DNA-Sonden.....	67
2.3.11.1	Labeln von Oligonukleotiden.....	67
2.3.11.2	Labeln von PCR-Produkten	68
2.3.12	Quantitative reverse Transkriptase-PCR.....	68
2.3.13	Bestimmung des Transkriptionsstarts durch 5'-RACE-PCR.....	70
2.3.14	Bestimmung des 3'-Terminus durch 3'-RACE-PCR.....	72
2.3.15	<i>In vitro</i> Transkription	73
2.3.16	RNase III Assay	75
2.3.17	EMSA.....	76
2.4	Proteinbiochemische Methoden	79
2.4.1	Aufreinigung rekombinanter Proteine.....	79
2.4.2	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford Assay.....	81
2.4.3	β -Galaktosidase Assay	82
2.4.4	Co-Immunopräzipitation	83
3	Ergebnisse.....	86
3.1	RNase E in <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	86
3.2	Lokalisation von asPcrL	98
3.3	Expressionsprofil von asPcrL.....	99
3.4	Phänotypische Charakterisierung der Überexpression von asPcrL.....	101
3.5	Auswirkung von asPcrL auf das <i>puf</i> -Operon	106
3.6	Einfluss der RNase E auf das <i>puf</i> -Operon	111
3.7	Einfluss verschiedener RNasen auf die Prozessierung des <i>puf</i> -Operons	113
3.8	Einfluss der RNase III auf das <i>puf</i> -Operon	115
3.9	Einfluss von Hfq auf das <i>puf</i> -Operons	121
4	Diskussion.....	128
4.1	Der Einfluss der RNase E auf das Transkriptom von <i>R. sphaeroides</i>	128
4.2	Expressionsprofil von asPcrL.....	133
4.3	Der Einfluss von asPcrL auf die <i>puf</i> -mRNA	134
4.4	Die Rolle der RNase III in der Interaktion von asPcrL und <i>pufL</i>	138

4.5	Die Rolle von Hfq in der Interaktion von asPcrL und <i>pufL</i>	142
4.6	Der Einfluss von regulatorischen <i>loops</i> auf die Expression der Photosynthesegene	144
5	Zusammenfassung.....	148
6	Summary	149
	Referenzen.....	150
	Curriculum Vitae.....	168
	Danksagung.....	170

Abkürzungsverzeichnis

% Prozent	FAD Flavin-Adenin-Dinukleotid
& und	Fe Eisen
°C Grad Celsius	g Gramm
μ mikro	GC Guanin/Cytosin
<i>ad</i> auffüllen auf	His Histidin
Abs Absorption	IP Immunopräzipitation
APS Ammoniumpersulfat	IPTG Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
asRNA <i>antisense</i> RNA	kb Kilobasenpaare
ATP Adenosintriphosphat	kDa Kilodalton
AU Adenin/Uracil	kV Kilovolt
BLAST <i>Basic local alignment search tool</i>	LH Lichtsammelkomplex
BLUF <i>sensor of blue-light using FAD</i>	LSD Lachssperma-DNA
bp Basenpaare	m Meter
BSA Bovines Serum Albumin	m ² Quadratmeter
cDNA <i>complementary</i> DNA	mg Milligramm
Ci Curie	ml Milliliter
CO ₂ Kohlenstoffdioxid	min Minuten
C-Terminus Carboxyl-Terminus	mRNA <i>messenger</i> RNA
CTP Cytosintriphosphat	N ₂ Stickstoff
DNA Desoxyribonukleinsäure	NADH Nicotinamidadenindinukleotid
DNase Desoxyribonuklease	NADPH
dNTP Desoxyribonukleosidtriphosphat	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
ds doppelsträngig	ng Nanogramm
dsRBD doppelsträngige RNA-binde Domäne	nm Nanometer
DTT Dithiothreitol	nt Nukleotide
EFC <i>extracytoplasmic function</i>	N-Terminus Amino-Terminus
EDTA Ethylendiamintetraessigsäure	OD Optische Dichte
EMSA <i>electro mobility shift assay</i>	ONPG O-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid
<i>et al. et altera</i> (und andere)	p pico
f femto	PCR <i>polymerase chain reaction</i>

PY *pepton-yeast*
Q Quinon
QH₂ Quinol
qRT *Quantitative Real Time*
RÄ *Rhodobacter*-Apfelsäure
RBS Ribosomenbindestelle
RC Reaktionszentrum
RNA Ribonukleinsäure
RNase Ribonuklease
ROS reaktive Sauerstoffspezies
Rpm *revolutions per minute*
rRNA *ribosomal RNA*
S Schwefel
SCHIC *sensor containing heme instead of cobalamin*
SDS Natriumlaurylsulfat
Sec Sekunde
Seq Sequenzierung
sRNA small RNA
U Uridin
UTR untranslatierte Region
UV ultraviolett
t Zeitpunkt
tRNA *transfer RNA*
tBOOH *tert*-Buthylhydroperoxid
V Volumen
W Watt

1 Einleitung

Lebewesen sind dauerhaft umweltbedingten Einflüssen und Schwankungen ausgesetzt. Daher verfügen sie über die Fähigkeit äußere Reize aus ihrer Umwelt wahrzunehmen, um auf diese reagieren zu können, da nur so lebenswichtige Funktionen aufrechterhalten werden können. Besonders Pflanzen und einzellige Organismen, einschließlich Bakterien, die ihre Umgebung nur im geringen Maße verändern können und durch ihre sessile Lebensform von dieser abhängiger sind als Tiere, müssen in der Lage sein, sich an die schnell wechselnden Faktoren ihrer Umwelt anzupassen (Chang und Stewart 1998; López-Maury *et al.* 2008). Die sich stets wechselnden Faktoren können in biotische und abiotische Faktoren unterteilt werden. Unter biotischen Faktoren versteht man neben der Konkurrenz um die Verfügbarkeit von Nährstoffen, auch das Vorhandensein von Kommensalen oder Parasiten. Änderungen in den abiotischen Faktoren spiegeln sich beispielsweise in Änderung der Temperatur, der Lichtintensität, der Feuchtigkeit, dem Sauerstoffgehalt oder der Osmolarität wider. Um adäquat auf Änderungen reagieren zu können, sind eine Reihe von hintereinander geschalteten Prozessen, wie die Aufnahme und Weiterleitung von Reizen, essentiell (Bahn *et al.* 2007). Mikroorganismen verfügen über zahlreiche Signaltransduktionssysteme, die ihnen essentielle selektive Vorteile verschaffen und eine schnelle Stimulus-gekoppelte Zellantwort ermöglichen, um die Genexpression an die sich wechselnden Umweltbedingungen anpassen zu können (Goudreau und Stock 1998). Änderungen in der Genexpression spielen eine zentrale Rolle in der Adaption an kurz- und langfristige Veränderungen der Umweltbedingungen und beinhalten eine vielschichtige Regulation, sowohl auf transkriptioneller, als auch auf posttranskriptioneller Ebene (López-Maury *et al.* 2008).

1.1 Genregulation auf transkriptioneller Ebene

Die Genexpression setzt sich aus einem komplexen Netzwerk zusammen und kann in zwei essentielle Hauptschritte unterteilt werden: die Transkription und die Translation. Anders als bei Eukaryoten, bei denen diese beiden Schritte örtlich und zeitlich getrennt voneinander ablaufen (Transkription im Zellkern, Translation im Cytoplasma), sind sie bei Prokaryoten eng miteinander verbunden. Sowohl die Ribosomen als auch die RNA-Polymerase können gleichzeitig an ein mRNA-Molekül binden. Diese enge Bindung wird unter anderem benötigt, da RNA-Moleküle in Bakterien meist nur eine kurze Halbwertszeit von wenigen Minuten besitzen. Anders als bei Eukaryoten, wird die RNA in Prokaryoten von einer einzigen RNA-Polymerase transkribiert, dessen *Core*-Enzym Sigmafaktoren (σ -Faktor) binden kann, um das

Holoenzym zu bilden. Die meisten Bakterien besitzen unterschiedliche Sigmafaktoren, die durch eine direkte Interaktion mit zwei konservierten Hexanukleotidabschnitten, die *upstream* des Transkriptionsstarts liegen (-35 und -10-Region für σ^{70} -Faktoren), die Bindung an spezifische Promotoren ermöglichen. Neben den *housekeeping* σ -Faktoren, die für die Transkriptionsinitiierung von vielen essentiellen Genen verantwortlich sind, deren Produkte in jeder Wachstumsphase benötigt werden, besitzen die meisten Bakterien noch weitere alternative σ -Faktoren. Diese gewährleisten die Transkriptionsinitiierung spezieller Gene, deren Produkte beispielsweise für die Flagellenassemblierung, die Chemotaxis und in Antwort auf verschiedene Stressoren benötigt werden (zusammengefasst in: Engstrom und Pfleger 2017; Bervoets und Charlier 2019). In *Rhodobacter sphaeroides* sind mehrere alternative Sigmafaktoren bekannt. Anders als in vielen anderen Gram-negativen Bakterien besitzen Alphaproteobakterien, zu denen auch *Rhodobacter* zählt, nicht den alternativen Sigmafaktor RpoS, der in der stationären Wachstumsphase und unter zahlreichen Stressbedingungen exprimiert wird. Die Stressantwort wird in Alphaproteobakterien stattdessen beispielsweise durch extracytoplasmatische-Funktions (EFC) Sigmafaktoren vermittelt, die die Transkription von Zielgenen induzieren, deren Produkte oft eine Funktion außerhalb des Cytoplasmas besitzen. Die EFC-Sigmafaktoren werden häufig zusammen mit Anti-Sigmafaktoren transkribiert, die die Sigmafaktoren negativ regulieren können. In *Rhodobacter sphaeroides* bindet der Anti-Sigmafaktor ChrR den gut untersuchten alternativen Sigmafaktor RpoE unter Normalbedingungen (Newman *et al.* 1999) und verhindert so die Komplexbildung mit der RNA-Polymerase (Newman *et al.* 2001; Anthony *et al.* 2004). Unter Singulett-Sauerstoffstress wird der Anti-Sigmafaktor von RpoE abgebaut (Nuss *et al.* 2013), sodass RpoE im Anschluss an die RNA-Polymerase binden und so die Stressantwort aktivieren kann (Anthony *et al.* 2004; Anthony *et al.* 2005). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass RpoE unter Singulett-Sauerstoffstress zusätzlich einen weiteren alternativen Sigmafaktor RpoH_{II} aktiviert (Nuss *et al.* 2009). Dieser gehört zusammen mit RpoH_I zu der Klasse der σ^{32} -Faktoren, die die Stressantwort nach Hitzebehandlung und oxidativem Stress aktivieren können und deren Regulons teilweise überlappen (Green und Donohue 2006; Nuss *et al.* 2010). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass RpoH_I- und RpoH_{II}-abhängige Gene unter einer Vielzahl von weiteren Stressbedingungen transkribiert werden, wie nach Behandlung mit organischen Peroxiden, Wasserstoffperoxid, Superoxid und Cadmiumchlorid (Billenkamp *et al.* 2015). RpoH_I und RpoH_{II} spielen zusätzlich eine wichtige Rolle beim Auswachsen der Kulturen im Anschluss an eine verlängerte stationäre Wachstumsphase. Unter unvorteilhaften Wachstumsbedingungen, wie Nährstoffmangel, gehen Bakterienkulturen von einer

exponentiellen Wachstumsphase, in der sie sich mit maximaler Geschwindigkeit teilen, in die stationäre über, in der die meisten Bakterien sich nicht mehr replizieren. Nach Inokulation in frisches Medium kehren die Zellen nach einiger Zeit zum exponentiellen Wachstum zurück. Microarraydaten konnten eine hohe Expression mehrerer RpoH_I- und RpoH_{II}-abhängiger Gene ausschließlich nach der Verdünnung der stationären Kulturen mit neuem Medium zeigen, während die Expression in der späten stationären Phase nicht zu beobachten war. Das Fehlen der beiden Sigmafaktoren führt zu einem Defizit in Wachstum und Überleben im Anschluss an eine lange stationäre Phase (Remes *et al.* 2017).

Neben σ -Faktoren gibt es noch weitere Faktoren, die die bakterielle Transkription beeinflussen können. Die meisten Gene und Operons von Bakterien durch *trans*-agierende Proteine reguliert, die durch eine direkte Bindung mit der DNA aktivierend oder reprimierend auf die Transkription wirken können. Die meisten bakteriellen Transkriptionsfaktoren binden die DNA meist über ein Helix-*turn*-Helix-Motiv (Huffman und Brennan 2002). In *Rhodobacter sphaeroides* sind mehrere solcher Transkriptionsfaktoren bekannt, die beispielsweise die Regulation der Photosynthesegene beeinflussen können (Kapitel 1.8).

Diese verschiedenen Mechanismen werden genutzt, um eine schnelle Adaption an sich wechselnde Umweltbedingungen und energieeffiziente Proteinsynthese zu ermöglichen, um das Überleben der Bakterien kurz- und langfristig zu sichern.

1.2 Genregulation auf posttranskriptioneller Ebene

Neben der Regulation auf transkriptioneller Ebene gibt es zusätzlich verschiedene Mechanismen, die die Genexpression auf posttranskriptioneller Ebene regulieren. Ein Schritt der Genregulation auf posttranskriptioneller Ebene findet während der Translation statt. Die Regulation der Translation hat eine sofortige Auswirkung auf das Proteom. Die Translation ist der letzte Schritt der Genexpression und kann in vier Schritte unterteilt werden: die Initiierung, die Elongation, die Termination und das Ribosomen-Recycling. Die Translation beginnt mit der Bindung der kleinen 30S Ribosomenuntereinheit an die Ribosomenbindestelle (RBS) der mRNA, sobald die RNA-Polymerase diesen Teil transkribiert hat. Diese kurze (8-10 nt lange) A/G-reiche Region wird als Shine-Dalgarno-Sequenz bezeichnet und geht dem Startcodon voraus. Die Shine-Dalgarno-Sequenz ist komplementär zur Anti-Shine-Dalgarno-Sequenz am 3'-Ende der 16S rRNA, die zusammen mit verschiedenen Proteinen die kleine Untereinheit der 70S Ribosomen bildet (Shine und Dalgarno 1974). Die Stärke der Ribosomenbindestelle bestimmt die Initiierung- und damit auch die Translationsrate. Die Stärke ist primär von der Nukleotidsequenz, dem Startcodon, der Länge der *spacer*-Sequenz zwischen der Shine-

Dalgarno-Sequenz und dem Startcodon und der Sekundärstruktur abhängig (Smit und van Duin 1990; Vellanoweth und Rabinowitz 1992). Dagegen können aber auch RNA-bindende Proteine (Dubey *et al.* 2005; Baker *et al.* 2007) oder RNAs (Kapitel 1.4), die den Zugang der Ribosomenbindestelle blockieren oder zugänglich machen, die Translation maßgeblich beeinflussen. Die Shine-Dalgarno-Sequenz-abhängige Initiierung wird durch die Initiierungsfaktoren IF1-IF3 unterstützt. IF2 ist eine GTPase, die die Initiator-tRNA Formylmethionin (fmet) rekrutiert. IF3 verhindert die frühzeitige Assoziation zwischen der großen und der kleinen Ribosomenuntereinheit und sorgt dafür, dass die Formylmethionin-tRNA vor der Elongator-Aminoacyl-tRNA ausgewählt wird. IF1 verstärkt die Wirkung von IF2 und IF3. Jedoch gibt es auch eine Reihe von mRNAs, die keine Shine-Dalgarno-Sequenz in ihrer 5'-untranslatierten Region (UTR) besitzen. Der Initiierungsprozess dieser Shine-Dalgarno-Sequenz-losen mRNAs ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Die 5'-UTRs dieser mRNAs sind jedoch meistens unstrukturiert und das Startcodon in einem einzelsträngigen Bereich lokalisiert. Daneben gibt es auch mRNA-Spezies, die keine 5'-UTR besitzen, diese *leader-less* mRNAs sind meistens mit der Stressantwort assoziiert und interagieren häufig direkt mit 70S Ribosomen und werden selektiv von IF2 rekrutiert. Dieser langsame, limitierende Schritt des Initiierungsprozesses ermöglicht die Entstehung eines Zeitfensters, das für die Regulation zwischen der Transkription und der aktiven Translation der mRNA notwendig ist. Die zwischen der Transkription und Translation stattfindende Regulation auf RNA-Ebene, ist essentiell für die optimale Zusammensetzung des Proteoms (zusammengefasst in Duval *et al.* 2015 und Rodnina 2018).

Die Stabilität von einzelnen Proteinen beeinflusst die Zusammensetzung des Proteoms ebenso. Da die meisten bakteriellen Proteine eine hohe Stabilität besitzen, würde die alleinige Regulation der Genexpression auf Transkriptionsebene zu viel Zeit in Anspruch nehmen, bis sich Änderungen im Proteom bemerkbar machen würden. Daher haben Bakterien Systeme entwickelt, um Proteine degradieren zu können. Die Proteolyse ist ein fundamentaler Prozess, der die Genexpression reguliert, indem nicht benötigte oder beschädigte Proteine aus dem Proteinpool entfernt werden. Sie kann in zwei Formen unterschieden werden: die generelle und die regulierte Proteolyse. Die generelle Proteolyse ist wichtig für die allgemeine Protein-Homöostase in der Zelle und sorgt für die Entfernung von missgefalteten oder defekten Proteinen. Bei der regulierten Proteolyse hingegen, werden spezifische Proteine als Reaktion auf ein Signal degradiert oder modifiziert. Da die Degradation irreversibel und kostenintensiv ist, ist die Erkennung des richtigen Substrats strikt reguliert. Die regulierte Proteolyse in Gram-negativen Bakterien wird durch fünf verschiedene ATP-abhängige Proteasen katalysiert,

welche eine hohe Selektivität, aber ein breites Substratspektrum besitzen. Die Erkennung des jeweiligen Substrats hängt von kurzen Substratsequenzen, den sogenannten Degradationstags oder Degrons, durch eine Substrat-bindende Domäne der Protease ab. Diese Degrons sind meist am Ende des N- oder C-Terminus lokalisiert, wodurch sie leicht zugänglich und einfach gebunden werden können. Durch die Substrat-bindende Domäne, die eine kleine Pore ausbildet, die für die meisten gefalteten Proteine nicht passierbar ist, wird eine willkürliche Degradation von Proteinen verhindert. Die katalytische Aktivität der Proteasen liegt im Inneren oligomerer Strukturen, die erst durch das Passieren der Substrat-bindenden Domäne erreicht werden kann. Unter Stressbedingungen wie Hitze oder oxidativem Stress nimmt die Menge an un- oder falsch gefalteten Proteinen zu, wodurch diese inaktiviert werden und zu unlöslichen Aggregaten aggregieren können. Um die Menge an defekten Proteinen minimieren zu können, bilden alle Zellen Netzwerke bestehend aus Proteasen, Chaperonen und zusätzlichen Faktoren aus, die als Qualitätskontrollsystem für Proteine fungieren. Diese Chaperone katalysieren die Neufaltung von missgefalteten Proteinen. Obwohl die Neufaltung der Proteine energieeffizienter, als die Degradation und die Neusynthese von Proteinen ist, werden unter Stressbedingungen, wenn die Menge an falsch gefalteten Proteinen zunimmt, ein großer Teil der Proteine durch Proteasen degradiert. Dabei konkurrieren die Chaperone und die Proteasen um die gleichen Substrate. Da mehr Chaperonmoleküle, als Proteasen in der Zelle vorliegen, werden die meisten defekten Proteine energieeffizient neu gefaltet. Zusätzlich besitzen die meisten Chaperone Proteinerkennungssequenzen, die häufiger vorkommen als die Erkennungssequenzen der Proteasen, sodass die Interaktion zwischen Protein und Chaperon favorisiert wird. Jedoch erlaubt die Degradation von Schlüsselenzymen eine schnelle und effektive Reaktion auf sich ändernde Umweltbedingungen. Daher werden gerade unter Stressbedingungen, bei denen eine schnelle Antwort benötigt wird, die Degradation von Schlüsselenzymen oder regulatorischer Proteine durch Proteasen katalysiert. Durch die regulierte Proteolyse können drei verschiedene Regulationsmechanismen beobachtet werden. Neben der Degradation und damit der Inaktivierung von Proteinen, können manche Proteine durch die Modifikation durch Proteasen stabilisiert oder aktiviert werden. In *R. sphaeroides* wird der bereits erwähnte alternative Sigmafaktor RpoE unter Normalbedingungen von dem Anti-Sigmafaktor ChrR gebunden, sodass er nicht mit der RNA-Polymerase interagieren kann. Erst durch die Singulett-Sauerstoffstress-induzierte Dissoziation von ChrR kann RpoE mit der Polymerase interagieren und die Expression Stress-induzierter Gene fördern. Die Aktivierung von RpoE wird durch die schnelle Degradation von ChrR, durch die Proteasen RSP_3242 (Homolog der *E. coli* DegS-Protease) und RSP_2710 (Homolog der *E. coli* RseP-Protease) gewährleistet.

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Degradation von ChrR von zwei weiteren Proteinen RSP_1090 und RSP 1091 abhängig ist, die jedoch keine Homologie zu anderen Proteasen aufweisen und daher davon ausgegangen wird, dass diese nicht direkt an der Proteolyse beteiligt sind (Glaeser *et al.* 2011; Nuss *et al.* 2013). Des Weiteren können Proteasen die Genexpression durch die Produktion interzellulärer Signale beeinflussen. Diese entstehen durch die Proteolyse von Vorläuferproteinen, die durch die Proteasen in funktionstüchtige Proteine oder Peptide gespalten werden. Die Proteolyse ist ein robuster Kontrollmechanismus, der für das *fine-tuning* der Genexpression benötigt wird und so das regulatorische Hauptelement, die transkriptionelle Regulation, komplementiert (zusammengefasst in Gur *et al.* 2011; Konovalova *et al.* 2014; Mahmoud und Chien 2018).

Neben der Stabilität von Proteinen, hat auch die Stabilität der mRNA einen großen Einfluss auf ihre Translation und somit auf das Proteom. mRNAs, die eine kurze Halbwertszeit besitzen, stehen für die Translation kürzer zur Verfügung, als solche, die eine längere Halbwertszeit aufweisen. Im Gegensatz zu eukaryotischen mRNAs, deren Halbwertszeit meist bei mehreren Stunden liegt, beträgt die Halbwertszeit von vielen bakteriellen mRNAs nur wenige Minuten. Die Stabilität der mRNA hängt von unterschiedlichen Faktoren ab. So wird jede mRNA früher oder später von RNA-abbauenden Enzymen degradiert. Jedoch können durch die Ausbildung von Sekundärstrukturen, stabilisierende Elemente, wie *stem-loops* an den 5'- beziehungsweise 3'-Enden entstehen, die diesen Prozess hinauszögern, wohingegen unstrukturierte einzelsträngige Bereiche diesen beschleunigen (Rauhut und Klug 1999). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass sich die Stabilität mRNAs unter verschiedenen Umweltbedingungen verändern kann. Die polyzistronische *puf*-mRNA aus *R. capsulatus* (Kapitel 1.9) wird beispielsweise unter dem Vorhandensein von Sauerstoff schneller degradiert, als wenn kein Sauerstoff zur Verfügung steht (Klug 1991). Wohingegen die mRNA des Kälteschock-Proteins CspA in *E. coli* unter abfallenden Temperaturen stabilisiert wird. Während bei 37°C nur eine geringe Menge von *cspA*-mRNA in der Zelle nachweisbar ist, konnte eine rasche Zunahme nach einer Inkubation bei 15°C beobachtet werden. Nach einem 1-stündigen Temperaturshift konnte 30-mal mehr *cspA*-mRNA nachgewiesen werden. Da die Transkription unter 15°C nur geringfügig erhöht war, wurden weiterführende Experimente durchgeführt, die zeigen konnten, dass der Anstieg der *cspA*-mRNA-Menge durch eine Veränderung in der Stabilität zustande kam. Bei 37°C weist die mRNA lediglich eine Halbwertszeit von 10 Sekunden auf, während sie sich bei 15°C auf 10 min verlängert (Goldenberg *et al.* 1996). RNAs werden durch verschiedene Ribonukleasen (RNasen) in ihre Einzelbausteine zerlegt, die dadurch für die Transkription erneut zur Verfügung stehen und recycelt werden können. RNasen tragen durch

die Degradation von defekten oder nicht länger benötigten RNAs zum normalen RNA-Umsatz bei. Des Weiteren sind sie essentiell für die Prozessierung von Vorläufermolekülen in reife, funktionsfähige RNAs und für die Prozessierung von polyzistronischen mRNAs verantwortlich, um die Regulation der individuellen mRNAs zu gewährleisten. Dabei werden die Prozessierung und die Degradation von den gleichen Enzymen durchgeführt, welches auf eine strikte Regulation der Enzyme hindeutet (Arraiano *et al.* 2010; Deutscher 2015).

1.2.1 Posttranskriptionelle Regulation durch Ribonukleasen und phosphorolytische Spaltungen

Ribonukleasen sind Enzyme, die die hydrolytische Spaltung der Phosphodiesterbindung von Ribonukleinsäuren katalysieren. Allgemein können Ribonukleasen in Endo- und Exonukleasen unterteilt werden. Endonukleasen katalysieren eine Molekül-interne Spaltung, während Exoribonukleasen Mononukleotide von einem Terminus beginnend abbauen (Hui *et al.* 2014).

Im Gegensatz zu eukaryotischen mRNAs, die nach der Transkription noch durch Anfügen einer 5'-Cap aus methyliertem Guanosin und eines Poly(A)-Schwanzes posttranskriptionell modifiziert werden, ist dies bei Bakterien nicht der Fall. Der 5'-Terminus beginnt mit einem Triphosphat, wohingegen am 3'-Terminus meist *stem-loop* Strukturen zu finden sind. Viele frühe Studien über die RNA-Degradation wurden mit den Modellorganismen *E. coli* und *Bacillus subtilis* durchgeführt. *Escherichia coli* ist ein Gram-negatives Bakterium und gehört zu den Gammaproteobakterien, während *Bacillus subtilis* zu den Gram-positiven Bakterien gehört. *Escherichia coli* besitzt mindestens 20 unterschiedliche Endo- und 3'-5'-Exonukleasen, jedoch keine 5'-3'-Exonuklease. Da der Abbau beginnend vom 3'-Ende durch stabilisierende *stem-loop*-Strukturen verhindert ist, wurde daraus geschlossen, dass die Degradation durch eine oder mehrere Molekül-interne Spaltungen einer Endoribonuklease katalysiert wird. Die daraus entstehenden, am 3'-Terminus ungeschützten 5'-Intermediate, können durch 3'-5'-Exonukleasen abgebaut werden. Die weiterhin stabilen 3'-Intermediate werden über erneute endonukleolytische und 3'-5'-exonukleolytische Spaltungen weiter degradiert. Die für diesen Prozess wichtigste Endonuklease in *E. coli* ist die essentielle RNase E (Belasco 2010; Kaberdin *et al.* 2011; Mackie 2013).

1.2.2 RNase E und das Degradosom

Die RNase E besitzt eine geringe Spezifität und spaltet einzelsträngige AU-reiche RNA-Moleküle (McDowall *et al.* 1994). In *E. coli* umfasst sie 1061 Aminosäuren und kann in zwei funktionelle Untereinheiten unterteilt werden. Der N-terminale Teil (Aminosäure 1 - 530) beinhaltet das katalytische Zentrum und ähnelt in Länge und Sequenz dessen Paralog der RNase

G. Durch Kristallisation konnte gezeigt werden, dass das aktive Zentrum der RNase E aus einem Homotetramer, mit einer Molekularmasse von ca. 260 kDa, besteht. Jedes Protomer besteht wiederum aus einer kleinen und einer großen Domäne. Das Tetramer besteht aus einem *dimer-of-dimers*, die Domänen jedes Dimers sind wie die Scheren und Griffe einer geöffneten Schere angeordnet. Die große Domäne kann in verschiedene Subdomänen unterteilt werden. Eine dieser Subdomänen ähnelt strukturell der RNase H-Familie, scheint aber keine katalytische Aktivität zu besitzen. In der RNase H-Region befindet sich eine S1-Domäne, die RNA-bindende Strukturen aufweist und eine zweite Region, die den 5'-Terminus der gebundenen RNA erkennt. Das 5'-Ende des RNA-Substrates liegt in einer Tasche, die aus den RNase H- und 5'-Erkennungssubdomänen gebildet wird. Die eigentliche katalytische Aktivität der RNase E, die in der DNase I-ähnlichen Domäne lokalisiert ist, beinhaltet einen nukleophilen Angriff auf das abzuspaltende Phosphat, durch eine von Wasser stammende Hydroxylgruppe, die zu einem Magnesiumion geleitet wird (Callaghan *et al.* 2005). Da die RNase E neben der Degradation von mRNA auch an der rRNA-Reifung und RNA-vermittelten Regulation beteiligt ist, wird vermutet, dass die jeweilige Funktion durch die Charakteristiken des jeweiligen Substrats bestimmt wird. Die RNase E favorisiert einzelsträngige AU-reiche RNAs, mit einer starken Präferenz für Uracil an der +2-Position des abzuspaltenden Phosphats (McDowall *et al.* 1994; Chao *et al.* 2017). Das 5'-Ende einer RNA beeinflusst zwar die katalytische Aktivität der RNase E jedoch nicht deren Bindungseigenschaften. Eine 5'-Hydroxylgruppe oder ein Triphosphat drosseln die Aktivität der RNase E, während Substrate, die ein Monophosphat an ihrem 5'-Ende tragen, die Aktivität der RNase E steigern. Durch die Bindung des RNA-Substrats an das geöffnete Apoenzym der RNase E, verändert sich dessen Konformation, wodurch das Substrat in die richtige Orientierung für die anschließende Spaltung gebracht wird. Trägt die RNA ein Triphosphat am 5'-Ende kann das Enzym nicht in die geschlossene Konformation übergehen, wodurch die katalytische Aktivität behindert wird (Callaghan *et al.* 2005; Koslover *et al.* 2008). Die Umwandlung vom 5'-Triphosphat zu einem -Monophosphat kann durch die RNA-Pyrophosphohydrolase RppH katalysiert werden, welche somit maßgeblich zur Stabilität einiger RNAs beiträgt und den ersten Schritt im Abbau markiert. Jedoch konnte auch gezeigt werden, dass die Deletion von *rppH*, die Stabilität der meisten RNAs nicht beeinflusst (Celesnik *et al.* 2007; Deana *et al.* 2008).

Zusätzlich konnte eine zweite große Gruppe von RNAs identifiziert werden, die unabhängig vom Status ihrer 5'-Enden von der RNase E gespalten werden können (Kime *et al.* 2010; Kime *et al.* 2014; Clarke *et al.* 2014). Eine gefaltete Duplex-Region des RNA-Substrats bindet an die Oberfläche der RNase H- und der kleinen Domäne (Bandyra *et al.* 2018). Dieser, auch als

bypass oder *internal entry* bezeichnete, zweite Erkennungsweg wird durch die Interaktion zwischen dem RNA-Substrat, dem N-Terminus und Arginin-reichen Segmenten im C-Terminus der RNase E begünstigt (Kaberdin *et al.* 2000; Callaghan *et al.* 2004). Mutanten, die entweder eine Punktmutation in der 5'-Erkennungsdomäne tragen oder in denen der komplette nicht-katalytisch-aktive Teil der RNase E deletiert ist, sind lebensfähig. Die Kombination aus beiden Mutationen hingegen ist letal. Diese Ergebnisse zeigen, dass sowohl der 5'-abhängige und der direkte Erkennungsweg existieren, sie einzeln betrachtet nicht essentiell sind und das Fehlen des jeweiligen anderen Weges kompensieren können (Garrey *et al.* 2009; Garrey und Mackie 2011).

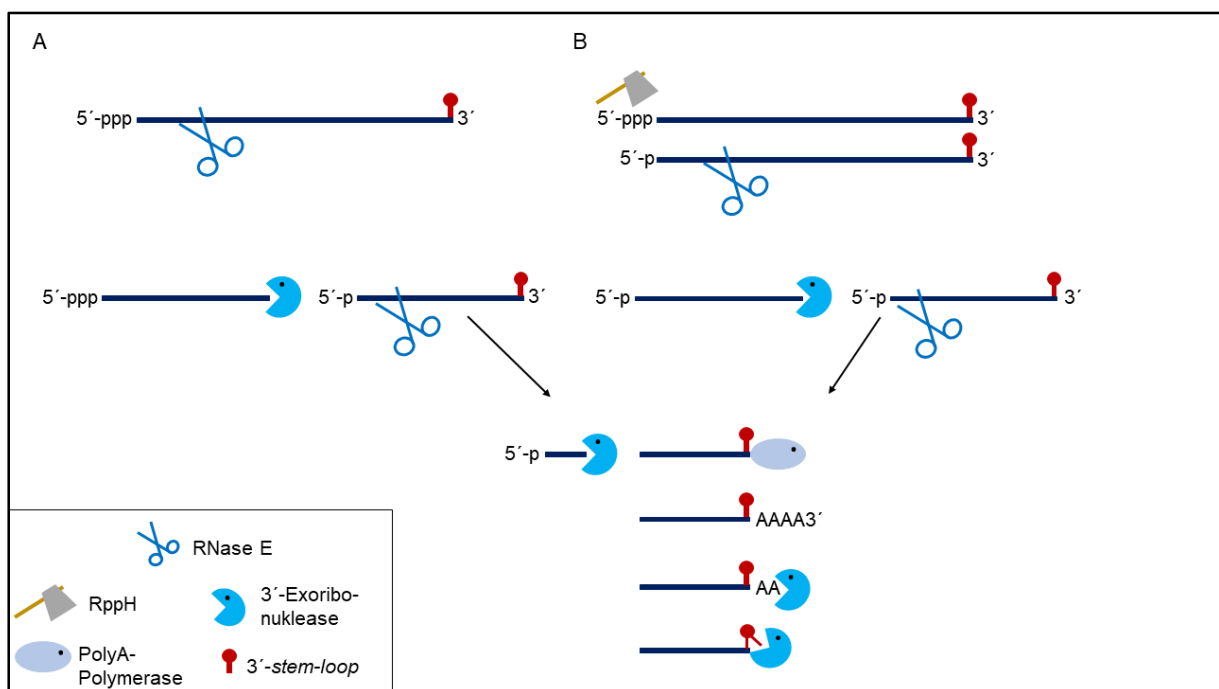


Abbildung 1: Schematischer Ablauf der RNase E-abhängigen RNA-Degradation in *E. coli*. (A) *Bypass* oder *internal entry* Erkennungsweg. Die RNase E spaltet ein RNA-Molekül intern. (B) 5'-abhängiger Erkennungsweg. Die Pyrophosphatase katalysiert die Umwandlung von 5'-Triphosphat zu -Monophosphat, wodurch die Aktivität der RNase E gegenüber dem RNA-Molekül gesteigert wird. Bei beiden Wegen werden die daraus entstandenen, am 3'-Terminus ungeschützten 5'-Intermediate, durch 3'-5'-Exonukleasen abgebaut. Die weiterhin stabilen 3'-Intermediate werden über erneute endonukleolytische und 3'-5'-exonukleolytische Spaltungen weiter degradiert. Die Poly(A)-Polymerase katalysiert die Polyadenylierung am 3'-Terminus des RNA-Moleküls, wodurch Exoribonukleasen die stabilisierenden Sekundärstrukturen am 3'-Ende überwinden können (modifiziert nach Belasco 2010).

Im Gegensatz zum hoch-konservierten N-terminalen Bereich ist der C-terminale Bereich dagegen wenig strukturiert und konserviert. Jedoch ist dieser Teil in *E. coli* und anderen Proteobakterien für die Bildung und Organisation des multienzymatischen RNA-Degradosomkomplex wichtig. In *E. coli* besteht das Degradosom neben der RNase E zusätzlich

aus der Polynukleotidphosphorylase (PNPase), einer ATP-abhängigen RNA-Helikase RhlB und einer Enolase (Carpousis *et al.* 1994; Miczak *et al.* 1996; Py *et al.* 1994; Py *et al.* 1996). Die Interaktion der vier Komponenten miteinander wird durch die RNase E vermittelt. Diese besitzt in ihrem unstrukturierten C-terminalen Bereich drei Protein-bindende Strukturen, an die die anderen Proteine binden können (Vanzo *et al.* 1998; Callaghan *et al.* 2004). Durch das Degradosom können auch stark strukturierte RNAs abgebaut werden. Die DEAD-Box RNA-Helikase RhlB ist in der Lage, unter dem Verbrauch von ATP kurze Basenfragmente von Duplex-formender RNA oder RNA-RNA-Interaktionen zu entwinden. Dadurch koordiniert die Helikase RhlB die Aktivität des Degradosoms, indem einzelsträngige RNA für die RNase E und die PNPase zur Verfügung gestellt wird (Khemici *et al.* 2005).

Sowohl die RNase E als auch die PNPase sind alleine funktionsfähig. Die PNPase liegt als Homotrimer vor, wobei jedes Protomer aus vier Domänen besteht: zwei PH-Domänen, die einen hexameren Ring und das darin gelegene katalytische Zentrum formen und zwei RNA-bindende KH/S1-Domänen (Shi *et al.* 2008). Eine ähnliche Organisation ist von dem archealen und eukaryotischen Exosom bekannt (Büttner *et al.* 2005), welches in Bakterien nicht vorkommt. Die RNA-bindenden KH/S1-Domänen sind nicht ausschließlich für die RNA-Bindung, sondern zusätzlich auch an der Anordnung des PNPase-Trimers beteiligt (Shi *et al.* 2008). Die PNPase ist eine 3'-Exoribonuklease, die die RNA reversibel phosphorolytisch spaltet. Neben der Degradation kann die PNPase RNA *in vivo* synthetisieren, indem sie Polynukleotide an das 3'-Ende einer RNA anbauen kann (Mohanty und Kushner 2000; Godefroy *et al.* 1970; Thang *et al.* 1967). Obwohl das Degradosom nicht essentiell ist, haben Mutanten, bei denen das Degradosom nicht assembliert werden kann, Defizite im Vergleich zum Wildtyp (Leroy *et al.* 2002). Dies kann auf die zahlreichen Regulationen auf posttranskriptioneller Ebene zurückzuführen sein (Marcaida *et al.* 2006).

Neben den Elementen der C-terminalen Domäne der RNase E, die für die Assemblierung des Degradosoms essentiell sind, konnte in der *E. coli* RNase E ein weiteres Element identifiziert werden. Dieses Segment-A besteht aus einer kurzen α -Helix und wird für die Lokalisation der RNase E an der Peripherie der Zelle benötigt. *In vitro* Experimente zeigte, dass dieses Segment für die Bindung der RNase E an Phospholipidvesikel essentiell ist. Die Deletion des Segmentes führte *in vivo* sowohl zu einer veränderten Lokalisation der *E. coli* RNase E als auch zu einem Wachstumsdefizit im Vergleich zum Wildtyp. Die Organisation des Segment ist in γ - und β -Proteobakterien konserviert, während in α -Proteobakterien andere Strukturen zu finden sind (Khemici *et al.* 2008).

1.2.3 RNase III

Neben der essentiellen RNase E und dem damit assoziierten RNA-abbauenden Degradosom sind in vielen Gram-negativen Bakterien noch weitere RNasen beschrieben, die wichtige Funktionen im mRNA-Umsatz und der Prozessierung übernehmen und eine andere Substratspezifität als die RNase E besitzen. Die neben der RNase E wichtigste Endoribonuklease ist die, als 25,6 kDa großes Homodimer vorliegende RNase III, die durch das *rnc*-Gen kodiert wird. Die RNase III ist sowohl in Bakterien als auch in Eukaryoten konserviert (Iino *et al.* 1991; Rotondo und Frendewey 1996; Filippov *et al.* 2000). Anders als die RNase E spaltet die RNase III in Abhängigkeit von 2-wertigem Magnesium spezifisch doppelsträngige RNA (dsRNA) an sogenannten *bulges*, die als ungepaarte Nukleotide in einer RNA-Duplex-Struktur lokalisiert sind. Die katalytische Aktivität liegt wie bei der RNase E im N-terminalen Bereich des Proteins und besitzt als RNase III-Signaturmotiv eine hoch konservierte neun Aminosäuren lange Region (Mian 1997). Im C-terminalen Bereich liegt eine dsRNA-bindende Domäne (dsRBD) vor, die essentiell für die Funktion der RNase III *in vivo* und auch in anderen RNA-bindenden Proteinen zu finden ist (St Johnston *et al.* 1992; Kharrat *et al.* 1995).

Obwohl die RNase III nicht essentiell für das Überleben für *E. coli* ist, zeigen *rnc*-Deletionsmutanten Defizite im Wachstum, die auf eine Veränderung in der Proteinbiosynthese zurückzuführen sein können (Talkad *et al.* 1978), da es zu einer fehlerhaften Prozessierung des 23S rRNA-Moleküls und damit einhergehend zu veränderten, aber funktionsfähigen 50S-Ribosomen kommt (King *et al.* 1984). Denn neben der Prozessierung von mRNAs ist die RNase III hauptsächlich an der Reifung von rRNAs beteiligt (Dunn und Studier 1973). In Bakterien werden die ribosomalen 16S, 23S und 5S rRNAs in einem langen 30S-Vorläufermolekül kotranskribiert, welches durch posttranskriptionelle Spaltung in die reifen Moleküle prozessiert wird (Deutscher 2009). Sowohl die 16S als auch die 23S rRNA-Sequenzen sind von Strukturen flankiert, die jeweils doppelsträngige *stem-loops* ausbilden. An diesen sogenannten *processing stalks* erfolgt die initiale Spaltung des Vorläufermoleküls durch die RNase III (Young und Steitz 1978; Bram *et al.* 1980). Allerdings kann die initiale Spaltung an den doppelsträngigen Sequenzen, in Abwesenheit der RNase III, von anderen Enzymen übernommen werden, die als *backup*-Enzyme fungieren, jedoch läuft die Reaktion langsamer ab. Daher ist auch in der RNase III-Deletionsmutante die Prozessierung des Vorläufermoleküls in 16S, 23S und 5S rRNAs zu beobachten (Deutscher 2009). In einem Polyacrylamidgel zeigt das 23S rRNA-Molekül der RNase III-Deletionsmutante jedoch ein verändertes Laufverhalten im Vergleich zu dem korrespondierenden Molekül im Wildtyp (Gegenheimer *et al.* 1977). Sowohl am 5'- als auch am 3'-Ende des 23S rRNA-Moleküls befinden sich Sequenzabschnitte, die ausschließlich durch

die RNase III abgespalten werden können (King *et al.* 1984). Im Anschluss an die initiale Spaltung durch die RNase III sind die RNase E und G an der finalen Reifung der 16S und 5S rRNA-Moleküle beteiligt. Durch die Spaltung durch die RNase III entsteht das 17S rRNA-Molekül, als Vorläufermolekül der 16S rRNA. Dieses wird im Anschluss durch die RNase E und deren Homolog, der RNase G, am 5'-Ende weiter prozessiert. Die RNase, welche für die Prozessierung des 3'-Endes verantwortlich ist, konnte noch nicht identifiziert werden (Li *et al.* 1999b). Das 9S rRNA-Molekül wird durch eine RNase E-abhängige Spaltung am 5'- und 3'-Ende in das 5S rRNA-Molekül prozessiert (Misra und Apirion 1979). Das 3'-Ende der 5S und 23S rRNA werden durch die RNase T prozessiert (Li und Deutscher 1995; Li *et al.* 1999a).

Bei einigen Bakterien inklusive *Rhodobacter capsulatus* konnte eine Besonderheit in der Prozessierung der rRNAs beobachtet werden. Das 23S rRNA-Molekül wird in weiteren Prozessierungsschritten in jeweils ein 14S, 16S, und 5,8S-ähnliches rRNA-Molekül weiterprozessiert. Während *backup*-Enzyme, ähnlich wie in *E. coli*, das Fehlen der RNase III kompensieren können und die Prozessierung des 30S-Vorläufermoleküls in 16S, 23S und 5S rRNA-Moleküle katalysieren, ist die RNase III für anschließende Prozessierung der 23S rRNA essentiell. Strukturanalysen zeigen, dass die 23S rRNA in *Rhodobacter capsulatus* an *stem-loop*-Strukturen gespalten werden, die in *E. coli* nicht existieren. Diese sogenannten *intervening sequences* sind spezifische Erkennungsstrukturen der RNase III (Kordes *et al.* 1994; Conrad *et al.* 1998). Neben der RNase III und RNase E (Klein und Evguenieva-Hackenberg 2002) ist in *Rhodobacter sphaeroides* darüber hinaus die 5'-Exoribonuklease J an der finalen Reifung der 14S, 16S und 5,8S-ähnlichen rRNA-Moleküle beteiligt. Die finale Prozessierung am 5'-Ende der drei rRNA-Fragmente wird durch die RNase J nach der Assemblierung der Ribosomen katalysiert (Rische und Klug 2012).

Die Entdeckung der RNasen vor über 60 Jahren gab schon früh Einsicht in die Aspekte der posttranskriptionellen Regulation von RNA. Darüber hinaus spielen RNA-Elemente in der Regulation eine wichtige Rolle, da sie durch unterschiedliche Mechanismen die Transkription, Translation, RNA-Konformation oder die RNA-Stabilität beeinflussen können.

1.3 Regulierende *cis*-RNA-Elemente

Die simpelsten regulatorischen RNA-Elemente sind in den 5'- oder seltener 3'-Regionen, einer RNA zu finden, welche durch externe Stimuli verschiedene Konformationen annehmen können. RNA-Thermometer repräsentieren die einfachste Form dieser sogenannten Riboswitches. Unter normalen Wachstumsbedingungen formen die regulatorischen Elemente in der 5'-UTR Strukturen aus, wodurch die Initiierung der Translation reprimiert wird. Erst

durch Aufschmelzen der Struktur nach Temperaturerhöhung wird die Ribosomenbindestelle zugänglich (zusammengefasst in Grundy und Henkin 2006; Serganov und Nudler 2013). Diese Art von regulatorischen Elementen werden beispielsweise genutzt, um Hitzeschock-assoziierte Gene zu regulieren (Morita *et al.* 1999). RNA-Thermometer sind darüber hinaus auch oft in Tier- und Humanpathogenen zu finden. In *Listeria monocytogenes* wird die Expression der Virulenzgene von dem Transkriptionsaktivator PrfA kontrolliert. Außerhalb des Wirtes bildet die 5'-UTR der *prfA*-mRNA starke Sekundärstrukturen aus, sodass die Ribosomenbindestelle nicht zugänglich ist. Während der Infektion des Wirts und der damit einhergehenden Erhöhung der Temperatur auf die Körpertemperatur des Wirts, schmilzt die Sekundärstruktur auf, PrfA wird translatiert und kann im Anschluss die Expression verschiedener Virulenzgene aktivieren (Johansson *et al.* 2002). Andere regulatorische Elemente in der 5'-UTR einer mRNA verändern ihre Struktur nach der direkten Bindung an Liganden, wodurch die Expression der mRNA beeinflusst werden kann. Typische Liganden sind beispielsweise Aminosäuren, Metalle, ATP, c-di-GMP oder S-Adenosylmethionin. Liganden-bindende Strukturen werden oftmals in mRNAs gefunden, deren Genprodukte an der Biosynthese oder dem Transport der gleichen Metaboliten involviert sind (zusammengefasst in Grundy und Henkin 2006; Serganov und Nudler 2013). Beispielsweise bindet Adenosylcobalamin an die 5'-UTR von *btuB*, welches ein Cobalmintransportprotein kodiert und inhibiert dadurch die Translation von *btuB* unter Vorhandensein von Adenosylcobalamin. Wenn unter Cobalaminmangel, der Ligand nicht an die 5'-UTR binden kann, kommt es zu einer Konformitätsänderung, wodurch das Cobalmintransportprotein synthetisiert und Cobalamin in die Zelle transportiert werden kann (Nahvi *et al.* 2002). Ein weiteres *cis*-regulierendes Element ist die Transkriptionsattenuation, die als erstes durch das Tryptophanoperon von *E. coli* beschrieben wurde. Die Strukturgene des Operons kodieren Proteine, die für die Tryptophansynthese benötigt werden, die in Abhängigkeit der Tryptophankonzentration in der Zelle transkribiert werden. Ein Tryptophan-bindendes Repressorprotein bindet unter hohen Tryptophankonzentrationen an die Operatorregion *downstream* der Promoterregion und verhindert so die Transkription der Strukturgene. Sinkt die Tryptophankonzentration in der Zelle ab, wird der Repressor inaktiv und kann nicht mehr an die Operatorsequenz binden. An die Operatorsequenz schließt sich eine *leader*-Sequenz an, die ein 14 Aminosäuren langes kleines Peptid kodiert, welches an Position 11 und 12 Tryptophanreste besitzt. Wenn Tryptophan für die Zelle zur Verfügung steht, ist die Translation und die Transkription der *leader*-Sequenz eng miteinander verbunden. *Downstream* der *leader*-Sequenz kommt es zur Ausbildung einer Haarnadelstruktur, der Attenuatorsequenz, wodurch die Transkription *upstream* der Strukturgene terminiert wird. Unter

niedrigen Tryptophankonzentrationen kommt es, durch den Mangel an Tryptophan-beladenden tRNAs, zu einem Innehalten der Ribosomen an Position 11 und 12 der *leader*-Sequenz und damit einhergehend zu einer Strukturänderung und zur Entstehung eines Antiterminators. Die Transkription *downstream* der *leader*-Sequenz wird nicht terminiert und die Strukturgene werden exprimiert. Die zusätzliche Regulation durch die Attenuatorsequenz gewährleistet das *fine-tuning* der Genexpression (Yanofsky *et al.* 1981).

Vor 20 Jahren konnte durch neue Methoden wie Tilling Arrays oder *Deep RNA-Sequencing* eine weitere Molekülklasse identifiziert werden, die einen maßgeblichen Einfluss auf die Regulation auf posttranskriptioneller Ebene hat. sRNAs können die Genexpression durch Veränderung der Transkription, Translation und der mRNA-Stabilität beeinflussen.

1.4 sRNAs

Kleine regulatorische RNAs (small RNAs, sRNAs) in Bakterien weisen meist eine Länge von 50 - 500 nt auf. Anders als mRNAs kodieren sie meist keine korrespondierende Proteine. Trotzdem haben sie einen großen Einfluss auf die Genexpression, durch verschiedene regulatorische Mechanismen, wobei die meisten sRNAs durch direkte Basenpaarung ihre Ziel-mRNAs beeinflussen. Anfangs wurden Computer-basierte Screeningverfahren zur Identifizierung von sRNAs genutzt. Diese beruhten auf der Analyse von intergenischen konservierten Regionen im Genom oder verwaisten Promoter- und Terminatorsequenzen. Neue Methoden wie Tilling Array und *Deep RNA-Sequencing* konnten die Computer-Analysen zwar ablösen, aber auch diese haben experimentelle Begrenzungen. So kann die genaue Anzahl der sRNAs in den einzelnen Bakterienstämmen noch nicht bestimmt werden. Lange Zeit wurden sRNAs, die innerhalb von kodierenden Sequenzen von internen Promotoren transkribiert werden, bei den Analysen übersehen. Eine weitere Herausforderung ist auch die Detektion von sRNAs, die nur unter bestimmten Wachstumsphasen oder unter bestimmten Stressbedingungen transkribiert werden (Waters und Storz 2009).

1.4.1 Protein-bindende sRNA

Zwar bindet die Mehrheit der sRNAs an mRNAs, dennoch konnten wenige sRNAs identifiziert werden, die durch Bindungen an Proteine die Genexpression regulieren können. Die 6S RNA, deren Transkription in der stationären Wachstumsphase induziert wird, ahmt eine offene Promoterstruktur nach, die durch die σ^{70} -gebundene RNA-Polymerase erkannt und gebunden wird. Durch diesen Mechanismus wird spezifisch die σ^{70} -gebundene RNA-Polymerase in der stationären Phase abgefangen und die Transkription der *housekeeping*-Gene unterbunden, wodurch gleichzeitig die Transkription von σ^S -assoziierten Genen gefördert wird. Nach

Verlassen der stationären Phase und mit dem Anstieg von freien Nukleotiden kann die 6S RNA als *template* für die Transkription genutzt werden, wodurch eine 14 - 20 nt lange RNA entsteht. Es wird vermutet, dass dieser Mechanismus genutzt wird, um die σ^{70} -gebundene RNA-Polymerase nach Beendigung der stationären Phase freizusetzen, um die Transkription der *housekeeping*-Gene wieder aufnehmen zu können (Trotochaud und Wassarman 2005; Wassarman und Saecker 2006; Gildehaus *et al.* 2007).

1.4.2 *Trans*-kodierte regulatorische RNA

mRNA-bindende sRNAs, in der Literatur auch *antisense* RNAs genannt (nicht zu verwechseln mit *cis*-kodierten oder echten *antisense* RNAs) können in zwei große Untergruppen unterteilt werden, die *trans*- oder *cis*-kodierten sRNAs. *Trans*-kodierte sRNAs können entweder durch eigene Promotoren oder zusammen mit anderen Genen kotranskribiert und im Anschluss durch RNasen aus der polyzistronischen RNA prozessiert werden. Die *trans*-kodierten sRNAs sind in einem anderen Teil des Genoms lokalisiert als ihre Ziel-mRNAs. Dadurch weisen sie nur eine begrenzte Komplementarität zu ihren Ziel-mRNAs auf, deren Expressionen meist durch eine direkte Basenpaarung reguliert werden. Meist bindet die sRNA über eine 6 - 8 Nukleotid lange *seed*-Region an das 5'-Ende der Ziel-mRNA. sRNAs können durch die Bindung die Expression der mRNA entweder aktivieren oder reprimieren, indem sie die Translation oder die Stabilität der mRNA beeinflussen (zusammengefasst in Waters und Storz 2009).

Die sRNA OxyS beispielsweise bindet ihre Ziel-mRNAs in der jeweiligen 5'-UTR. Die Expression der sRNA wird durch oxidativen Stress induziert. Ihre Induktion hat pleiotrope Effekte, da sie an mehrere Ziel-mRNAs binden kann und eine Rolle im Schutz gegen DNA-Schäden spielt. Durch eine direkte Bindung an die Ribosomenbindestelle reguliert OxyS die Translation ihrer Ziel-mRNA *fhlA*, welche einen Transkriptionsaktivator kodiert. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass OxyS eine zweite Sequenz, 42 Nukleotide *downstream* der ersten Bindestelle, innerhalb der kodierenden Sequenz von *fhlA* bindet. Diese zweite Bindung ist ebenfalls essentiell für die Inhibition der Translation. Durch die Bindungen von OxyS an *fhlA* wird die Initiation der Translation durch die Bindung der 30S Ribosomenuntereinheit unterbunden (Altuvia *et al.* 1998; Argaman und Altuvia 2000).

sRNA-mRNA-Komplexe werden häufig von der RNase E abgebaut. Die sRNA RhyB wird in *E. coli* unter Eisen-limitierenden Wachstumsbedingungen transkribiert und beeinflusst mehrere mRNAs, die Eisen-bindende Proteine kodieren. Über das RNA-Chaperon Hfq interagiert RhyB mit der RNase E, wodurch die Ziel-mRNA destabilisiert wird. Die Destabilisierung trägt jedoch kaum zur Regulation der Ziel-mRNA bei, wenn die Ribosomenbindestelle simultan durch die

sRNA geblockt wird, da die Proteinmenge auch ohne die Destabilisierung der mRNA abnimmt (Morita *et al.* 2005; Morita *et al.* 2006).

Darüber hinaus existieren auch sRNAs, die direkt an ihre Ziel-mRNA binden, ohne dabei die Shine-Dalgarno-Sequenz und somit die Initiierung der Translation zu blockieren. In *Salmonella* bindet die sRNA MicC ihre Ziel-mRNA *ompD*, unter der Bildung eines 12 Basenpaaren langen RNA-Duplexes, innerhalb der kodierenden Sequenz und initiiert eine RNase E-abhängige Spaltung des Komplexes (Pfeiffer *et al.* 2009).

Neben der negativen Regulation, können einige sRNAs die Expression ihrer Ziel-mRNA jedoch auch positiv beeinflussen und die Translation verstärken. Das Alpha-Toxin von *Staphylococcus* wird durch eine mRNA kodiert, die eine stark strukturierte 5'-UTR besitzt, wodurch die Shine-Dalgarno-Sequenz unter normalen Wachstumsbedingungen für die Ribosomen nicht zugänglich ist. Durch die Bindung der sRNA RNAIII an die 5'-UTR kommt es zu einer Änderung in der Sekundärstruktur, wodurch die Ribosomen Zugang zu der Shine-Dalgarno-Sequenz erlangen und die Translation des Alpha-Toxins initiiert werden kann (Morfeldt *et al.* 1995).

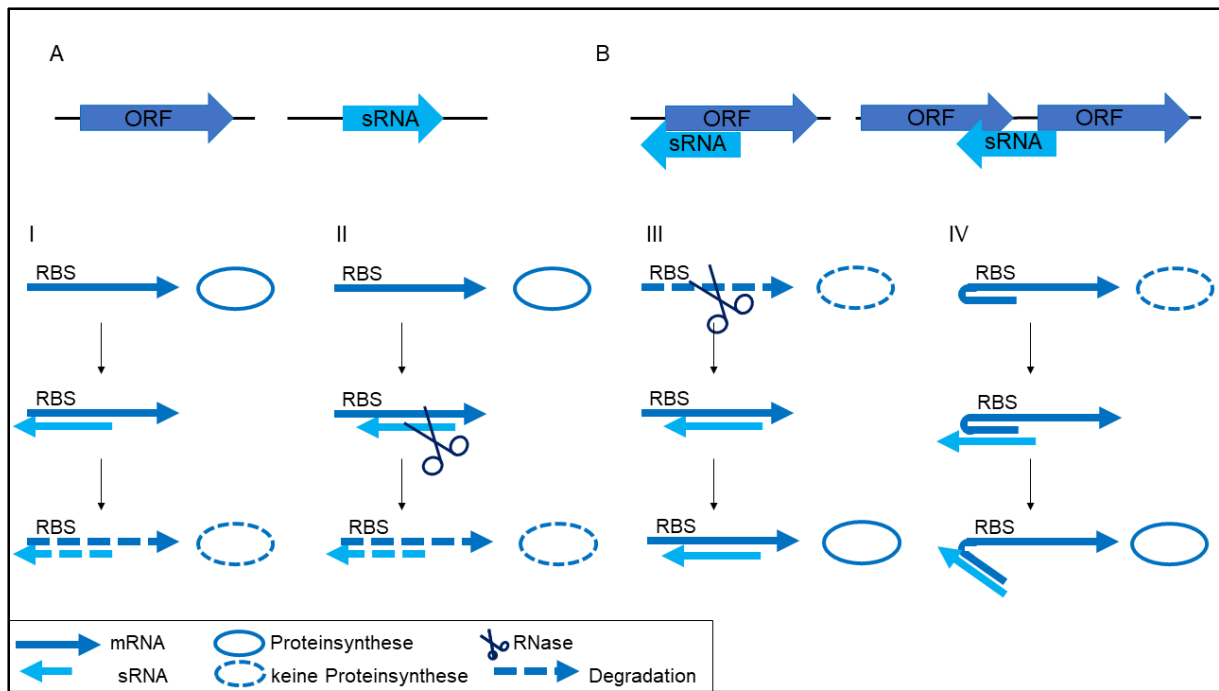


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Wirkmechanismen von kleinen regulatorischen RNAs. (A) *Trans*-kodierte sRNAs sind an anderen Genloci lokalisiert als ihre Ziel-mRNAs, während (B) *cis*-kodierte sRNAs auf dem Gegenstrang ihrer Ziel-mRNAs lokalisiert sind. Durch die direkte Basenpaarung regulieren kleine RNAs die Expression ihrer Ziel-mRNAs. (I) Durch Bindung in der 5'-UTR und der Blockierung der Ribosomenbindestelle (RBS) wird die Bindung der Ribosomen unterbunden und Translation inhibiert. Oft wird die mRNA dadurch zusätzlich destabilisiert und durch RNasen degradiert. (II) Durch die Bindung in der kodierenden Sequenz und die Rekrutierung der RNase E kann die mRNA degradiert werden, wodurch sie nicht länger für die Translation zur Verfügung steht und damit die Proteinsynthese negativ beeinflusst wird. (III) Gegenteilig dazu kann eine sRNA eine RNase-Schnittstelle blockieren, sodass die mRNA stabilisiert wird und translatiert werden kann. (IV) Sekundärstrukturen in der 5'-UTR der Ziel-mRNA, die die Ribosomenbindestelle unzugänglich machen, können durch die Bindung der sRNA aufgeschmolzen werden, sodass die mRNA translatiert werden kann (Abbildung verändert nach Waters und Storz 2009).

1.4.3 Hfq als Schlüsselprotein

Viele der *trans*-kodierten sRNAs, die nur eine geringe Komplementarität zu ihrer Ziel-mRNA besitzen, benötigen für ihre Funktion RNA-bindende Proteine wie Hfq, die die Bindung der beiden RNAs beschleunigen und stabilisieren. Hfq (*Host factor required for phage Q β RNA replication*) besteht aus 70 - 100 Aminosäuren und liegt als Hexamer vor (Franze de Fernandez *et al.* 1972). Hfq gehört zur Sm/Lsm-Proteinfamilie und ist in der Mehrheit der sequenzierten Bakterienarten zu finden (Sun *et al.* 2002). Wie eukaryotische oder archaeale Sm/Lsm-Proteine, spielt Hfq eine übergeordnete Rolle im RNA-Metabolismus (Valentin-Hansen *et al.* 2004; Wilusz und Wilusz 2005). Hfq beeinflusst die Stabilität von mRNAs oder sRNAs, unterstützt die Basenpaarung zwischen mRNAs und sRNAs und ist am Abbau des RNA-Komplexes, durch die Rekrutierung der RNase E, beteiligt (Vytvytska *et al.* 2000; Massé *et al.* 2003; Zhang *et al.*

2002a; Morita *et al.* 2005). Das hexamere Hfq bildet auf seiner Oberfläche vier Strukturen aus (Proximale Seite, Distale Seite, Rand und C-terminalen Schwanz), die für die Bindungen von sRNAs und mRNAs verantwortlich sind. Hfq-bindende sRNAs können durch ihre Bindungseigenschaften zu Hfq in zwei Gruppen unterteilt werden. Die Mehrheit der sRNAs (Gruppe I) bindet über Poly(U)-Sequenzen an den Hfq-Randbereich und dessen proximale Seite, sodass die Uridine in Taschen zwischen den einzelnen Monomeren feststecken. sRNAs mit einzelsträngigen Poly(U)-Strängen am 3'-Ende von Rho-unabhängigen Terminatorstrukturen können darüber mit mRNAs interagieren, die an die distale Seite von Hfq binden (Ishikawa *et al.* 2012; Sauer und Weichenrieder 2011). Weitere Bindungsstudien konnten zeigen, dass die mRNA-Bindungen an die distale Seite von Hfq über A-reiche Regionen, größere Sequenzvariationen zulassen, als an der proximalen Seite (Mikulecky *et al.* 2004). Die jeweiligen Bindemotive der distalen Seite unterscheiden sich in den einzelnen Bakterienarten. Auch einige sRNAs aus Gruppe II besitzen A-reiche Regionen, über die sie an die distale Hfq-Seite binden und mit mRNAs interagieren können, die an den Randbereich binden. AU-reiche Sequenzen von sRNAs können zusätzlich durch positiv-geladene Strukturen im Randbereich von Hfq gebunden werden (Sauer *et al.* 2012). Besonders sRNAs der Gruppe I benötigen die positiv-geladenen Randbereiche, um eine optimale Bindung an Hfq ausbilden zu können. Gleiche Ergebnisse konnten auch für mRNAs gezeigt werden, die mit sRNAs aus der Gruppe II interagieren (Schu *et al.* 2015). Der C-terminale Bereich von Hfq ist unregelmäßig und flexibel. Anders als bei den anderen Bindungsoberflächen ist die Bindung von sRNAs und mRNAs am C-terminalen Bereich nicht primär von speziellen Bindungstaschen abhängig, sondern entsteht eher durch innere ungeordnete Bereiche. Nur wenige sRNAs und mRNAs sind in der Lage, an die C-terminalen Strukturen von Hfq zu binden (Dimastrogiovanni *et al.* 2014). Hfq unterstützt die Bindung von sRNAs und mRNAs durch unterschiedliche Mechanismen. Durch Hfq können RNA-Strukturen verändert, die zu bindenden RNAs räumlich zueinander gebracht, negative Ladungen der RNAs neutralisiert und das weitere *annealing* der zwei RNAs erleichtert werden (Vogel und Luisi 2011).

1.4.4 *Cis*-kodierte regulatorische RNA

Neben den Hfq-abhängigen *trans*-kodierten sRNAs ist eine zweite große Gruppe von mRNA-bindenden sRNAs bekannt. Diese *cis*-kodierten sRNAs werden von eigenen Promotern vom komplementären DNA-Strang ihrer Ziel-mRNA transkribiert. Durch ihre vollständige Komplementarität zu ihren Ziel-mRNAs sind die meisten *cis*-transkribierten oder auch *true antisense* genannten RNAs (asRNAs) auch ohne die Bindung von Hfq funktionell. Es sind nur wenige Beispiele von *cis*-kodierte sRNAs bekannt, die in an Hfq binden.

Die meisten charakterisierten *antisense* RNAs sind in Bakteriophagen, Plasmiden und Transposons lokalisiert und regulieren die Kopienzahl dieser mobilen Elemente in der Zelle. Die dabei beschriebenen Mechanismen ähneln, denen der *trans*-kodierten sRNAs. Die Expression kann durch Inhibierung der Translation durch die Bindung an die Ribosomenbindestelle, Stabilisierung und Destabilisierung der mRNA, Attenuation oder zusätzlich durch die Inhibierung der Primerreifung reguliert werden (zusammengefasst in Brantl 2007, Abbildung 2). In dem Bakteriophagen λ wird die 77 nt lange asRNA OOP von dem Gegenstrang der Gene *cII-O* transkribiert, deren Genprodukte den lysogenen Zyklus fördern. Durch die direkte Bindung der asRNA OOP an die *cII-O*-mRNA wird die Degradation unter der Beteiligung der RNase III hervorgerufen, welches die Expression reprimiert und so den Übergang in die lytische Phase hervorruft (Krinke und Wulff 1987; Krinke und Wulff 1990; Krinke *et al.* 1991).

Auch im bakteriellen Chromosom konnte die Existenz von asRNAs nachgewiesen werden, deren Funktionen oft noch nicht vollständig verstanden sind. Einige dieser im Chromosom-lokalisierten asRNAs spielen eine wichtige Rolle in der Toxin-Antitoxin-Regulation, indem sie die Degradation ihrer Ziel-RNA fördern und dadurch die Translation von Proteinen reprimieren, die in großen Konzentrationen toxisch für die Zelle sind. Die Toxin-Antitoxin-Systeme werden anhand des Antitoxins klassifiziert. Sowohl in Typ I- als auch in Typ II-Systemen ist das Toxin ein Protein. Anders als in Typ II-Systemen, bei denen auch das Antitoxin ein Protein ist, ist das Antitoxin in den Typ I-Systemen ein RNA-Molekül und muss nicht translatiert werden, um funktional zu sein. Toxin-Antitoxin-Systeme, die von genetisch mobilen Elementen wie Plasmiden kodiert werden, dienen meistens dazu, den Erhalt des Elements zu sichern. Wenn das Plasmid während der Zellteilung nicht an die Tochterzelle weitergegeben wird, wird das instabile Antitoxin abgebaut, wodurch das stabilere Toxin akkumuliert und die Zelle stirbt, oder das Zellwachstum eingestellt wird. Dieser Mechanismus ist als post-segregationale Tötung bezeichnet. Dagegen spielen chromosomal kodierte Toxin-Antitoxin-Systeme oft eine Rolle im Schutz gegen das Eindringen von Fremd-DNA durch Phagen oder Plasmide und bei der Bildung von persistenten Zellen nach zellulärem Stress (zusammengefasst in Gerdes und Wagner 2007; Fozo *et al.* 2008; Unterholzner *et al.* 2013).

Das durch die SOS-Stressantwort induzierte Toxin TisB in *E. coli* wird durch das Antitoxin IstR-1 reguliert. Die sRNA IstR-1 wird konstitutiv exprimiert und enthält in ihrem unstrukturierten 5'-Terminus 21 Nukleotide, die komplementär zu der *tisB*-mRNA sind. Unter normalen Wachstumsbedingungen wird nur wenig *tisB*-mRNA transkribiert und durch die

direkte Bindung von IstR-1 an die *tisB*-mRNA wird der RNA-Duplex durch eine RNase III-abhängige Spaltung degradiert, wodurch die Toxinproduktion inhibiert wird. Die Transkription des LexA-abhängigen *tisB* wird durch DNA-Schäden stark induziert, wodurch IstR-1 austitriert und das TisB-Toxin produziert wird. Obwohl IstR-1 keine *cis*-kodierte sRNA ist, besitzt sie mit 21 Nukleotiden eine verlängerte Sequenz, die perfekt komplementär zu ihrer Ziel-mRNA ist. Zusätzlich zur IstR-1-Regulation ist ein weiteres regulatorisches Element beschrieben, wodurch die Expression von TisB kontrolliert wird. Das Primärtranskript von TisB verfügt über eine starke Sekundärstruktur in der 5'-UTR, die den Zugang der Ribosomen blockiert. Erst durch die Prozessierung durch eine bisher unbekannte RNase in eine verkürzte aktive Form der mRNA kann TisB translatiert werden, wodurch die Zellen ihr Wachstum stoppen und in einen Persistenzzustand übergehen (Vogel *et al.* 2004; Berghoff *et al.* 2017).

In *E. coli* konnte die erste asRNA charakterisiert werden, die ihre Ziel-mRNA stabilisiert. Die Expression der asRNA GadY wird in der stationären Wachstumsphase durch den alternativen Sigmafaktor RpoS aktiviert. GadY ist in der interzistronischen Region zwischen GadX und GadW lokalisiert, die Säurestress-gekoppelte Transkriptionsaktivatoren kodieren. GadY überspannt das 3'-Ende von GadX, wodurch eine RNase E-Schnittstelle verdeckt wird. So kommt es zu einer Akkumulation von GadX in der stationären Wachstumsphase, wodurch die Transkription von Säureresistenz-Genen aktiviert wird (Opdyke *et al.* 2004).

Die transkriptionelle Interferenz ist ein weiterer Mechanismus zur Regulation der Genexpression auf Transkriptionsebene. Durch sich gegenseitig beeinflussende Promotoren konnten unterschiedliche Mechanismen beobachtet werden, die zur transkriptionellen Interferenz beitragen. Durch die Kollision zweier auf einander zulaufenden RNA-Polymerasen kann es zu einer frühzeitigen Termination der Transkription kommen. Bei der Promoter-Okklusion inhibiert eine elongierende RNA-Polymerase, von einem starken Promoter kommend, die Initiierung der RNA-Polymerase an einer schwächeren Promotersequenz. Die Interferenz kann zusätzlich durch Pausierung der RNA-Polymerase beispielsweise durch Rho-abhängige Termination verstärkt werden. Beim *sitting duck*-Mechanismus wird eine an einen sensitiven Promoter-gebundene RNA-Polymerase durch die Kollision mit einer anderen elongierenden Polymerase entfernt, bevor die erste Polymerase die Elongation beginnen kann (zusammengefasst in Georg und Hess 2011).

Durch RNA-Seq-Studien konnten eine Vielzahl von *trans*- und *cis*-kodierten sRNAs in dem Modellorganismus *Rhodobacter sphaeroides* identifiziert werden, die durch unterschiedliche Mechanismen die Genexpression regulieren.

1.5 *Rhodobacter sphaeroides*

Der in dieser Arbeit behandelte Modellorganismus *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 ist ein Gram-negatives Bakterium und gehört innerhalb der Klasse der Alphaproteobakterien zu den Nichtschwefelpurpurbakterien. Das 0,2 - 0,5 µm lange Bakterium, ist lateral flagelliert und kommt in stehenden und fließenden Gewässern vor (Imhoff 2015). Das Genom setzt sich aus 2 Chromosomen und 5 Plasmiden zusammen, hat eine Gesamtgröße von 4,6 Megabasenpaaren und zeichnet sich durch einen hohen GC-Gehalt von bis zu 69 % aus (Mackenzie *et al.* 2001). Darüber hinaus ist *Rhodobacter* für seine große metabolische Vielfalt bekannt und kann zur Energiegewinnung unterschiedliche Stoffwechselwege nutzen (Imhoff 2015). Die Regulation der Stoffwechselwege ist abhängig von abiotischen Umweltfaktoren. Wenn Sauerstoff zur Verfügung steht, nutzt *Rhodobacter* die aerobe Atmung zur Energiegewinnung. In Anwesenheit von Licht und unter hohem Sauerstoffgehalt ist die Expression der Photosynthesegene reprimiert. Ohne Sauerstoff und in Anwesenheit von Licht wird die anoxygene Photosynthese zur ATP-Produktion genutzt. Unter anaeroben Bedingungen in der Abwesenheit von Licht kann die anaerobe Atmung genutzt werden, wenn alternative Elektronenakzeptoren zur Verfügung stehen, fehlen diese kommt es zur Gärung. Zusätzlich kann *Rhodobacter* atmosphärisches CO₂ und N₂ fixieren. Sowohl *R. sphaeroides* als auch *R. capsulatus* sind ausgezeichnete Modellorganismen für die Untersuchung der Licht- und sauerstoffabhängigen Genregulation und der damit einhergehenden Stressantwort nach photooxidativem Stress. Studien zur Prozessierung und Degradation der ribosomalen RNAs, verschiedenen mRNAs und sRNAs in *Rhodobacter* tragen einen erheblichen Teil zur Aufklärung der komplexen Regulation bei.

1.6 Bakterielle Photosynthese

Unter Phototrophie versteht man die Umwandlung, der aus dem Licht stammenden Energie, in chemische Energie, die für das Wachstum benötigt wird. Bei der Photosynthese wird atmosphärisches Kohlenstoffdioxid in Biomasse unter der Verwendung von Lichtenergie reduziert. Phototrophie ist der wichtigste biologische Stoffwechselprozess auf der Welt und es konnten zwei verschiedene Mechanismen für die Sammlung von Lichtenergie und deren Umwandlung in chemische Energie beschrieben werden (Bryant und Frigaard 2006). Der erste und simple Mechanismus beruht auf dem direkten Protonenaustoß aus den Zellen durch transmembrane Protonenpumpen, wie Bakteriorhodopsin und Proteorhodopsin, wodurch eine protonenmotorische Kraft entsteht, die zur ATP-Generation genutzt wird. Da die Nutzung von Rhodopsin keine Elektronentransportkette erfordert, sind Organismen, die diesen Mechanismus

nutzen zwar phototroph, betreiben aber per Definition keine Photosynthese (Lanyi 2004; Bryant und Frigaard 2006).

Im zweiten komplexeren Mechanismus, der von (Bakterio)chlorophyll-bindenden photochemischen Reaktionszentren abhängt, löst die Lichtenergie einen Elektronentransfer durch die Oxidation von Chlorophyll-Molekülen und die Reduktion eines Elektronenakzeptors aus. Durch einen zweiten lichtunabhängigen Elektronentransfer wird eine protonenmotorische Kraft aufgebaut, die zur ATP-Gewinnung genutzt werden kann. Dieser Mechanismus ist in Cyanobakterien, Proteobakterien, Chlorobi, Chlorofelxi und Firmicutes zu finden (Raymond 2008). Während alle bis jetzt identifizierten Cyanobakterien- und Chlorobispezies photoautotroph sind, sind innerhalb der Firmicutes, Proteobakterien und Chlorofelxi nur einige Vertreter phototroph (Bryant und Frigaard 2006). Die Photosynthesereaktion bei der Wasser als Elektronendonator genutzt wird, wodurch Sauerstoff entsteht wird als oxygene Photosynthese bezeichnet. Ihr gegenüber steht die anoxygene Photosynthese, bei der ein alternativer Elektronendonator wie zum Beispiel elementarer Wasserstoff, Schwefelverbindungen oder organische Verbindungen genutzt werden, wodurch es nicht zur Bildung von Sauerstoff kommt. Während Pflanzen, Algen und Cyanobakterien die oxygene Photosynthese zur Energiegewinnung nutzen, ist die anoxygene Photosynthese bei verschiedenen Bakterienspezies zu beobachten. Die anoxygene Photosynthese konnte für Grüne Schwefelbakterien, Purpurbakterien und filamentösen anoxygenen Bakterien beschrieben werden (zusammengefasst in (Hanada 2016; Martin *et al.* 2018). In Pflanzen und Algen findet die oxygene Photosynthese in speziellen Zellkompartimenten, den Chloroplasten, statt, die von einem Vorfahren der Cyanobakterien abstammen und von den Eukaryoten aufgenommen wurden (Endosymbiontentheorie). Aus diesem Grund nutzen Pflanzen, Algen und Cyanobakterien dieselben Mechanismen während der Photosynthese. Chlorophyll a ist das essentielle Photopigment, welches an zwei unterschiedliche photochemische Reaktionszentren, Photosystem I und II, bindet (Lea-Smith *et al.* 2016). Im Gegensatz dazu besitzen anoxygene phototrophe Bakterien Bakteriochlorophyll und benötigen nur eins der beiden Reaktionszentren. Die für die Photosynthese essentiellen Reaktionszentren können in zwei unterschiedliche Gruppen eingeteilt werden, die strukturell ähnlich sind und sich vermutlich einen evolutionären Ursprung teilen. Die Reaktionszentren der ersten Gruppe besitzen entweder homo- oder heterodimere Kerne mit 4-Eisen-4-Schwefel-Clustern als terminale Elektronenakzeptoren und produzieren schwache Oxidantien und starke Reduktionsmittel. Die Reaktionszentren Typ I sind in Cyanobakterien, Grünen Schwefelbakterien und Heliobakterien zu finden. Reaktionszentren Typ II sind ebenfalls in Cyanobakterien und darüber hinaus auch

in Purpurbakterien und filamentösen anoxygenen Bakterien zu finden. Sie besitzen heterodimere Kerne und nutzen Quinone als terminale Elektronenakzeptoren und produzieren starke Oxidantien und schwache Reduktionsmittel (Zeng *et al.* 2014). Neben den unterschiedlichen Reaktionszentren gibt es auch Unterschiede in den Lichtsammelkomplexen. Grüne Schwefelbakterien und filamentöse anoxygene Bakterien besitzen einen speziellen Lichtsammelkomplex, das Chlorosom, welches hauptsächlich Infrarotlicht im Bereich von 740 - 750 nm nutzt. Heliobakterien absorbieren hingegen Licht mit einer Wellenlänge von 786 - 792 nm und Purpurbakterien den Bereich um 800 - 1020 nm. Dadurch können verschiedene phototrophe Organismen in einem Habitat koexistieren, da sie unterschiedliche Lichtwellen benötigen (Hanada 2016). Der Aufbau und der Ablauf der anoxygenen Photosynthese wird speziell für *Rhodobacter sphaeroides* im nächsten Abschnitt beschrieben.

1.7 Anoxygene Photosynthese von *Rhodobacter sphaeroides*

In Abwesenheit von Sauerstoff und in Anwesenheit von Licht nutzt *Rhodobacter* die anoxygene Photosynthese zur Energiegewinnung. Der Photosyntheseapparat von *Rhodobacter* ist in nach Innen eingestülpten Membranen lokalisiert und wird erst bei einem geringen Sauerstofflevel in der Umgebung und bereits in Dunkelheit gebildet. In *R. sphaeroides* besteht der Photosyntheseapparat aus vier unterschiedlichen transmembranen Proteinkomplexen: den zentralen Reaktionszentren (RC), die mit den Lichtsammelkomplexen I (LH I) assoziiert sind, den Lichtsammelkomplexen II (LH II) und den Cytochrom_{b_c1}-Komplexen. Die Lichtsammelkomplexe binden nicht-kovalent Bakteriochlorophyll- und Carotinoidmoleküle. Während die Menge an Lichtsammelkomplexen II flexibel ist und von der Lichtintensität und dem Sauerstoffpartialdruck abhängt, werden die Lichtsammelkomplexe I zwar ebenfalls in Abhängigkeit vom Sauerstoffpartialdruck, aber in festgelegten stöchiometrischen Mengen zusammen mit den Reaktionszentren synthetisiert (zusammengefasst in Verméglio und Joliot P. 1999). Der LH I-RC-Komplex in *Rhodobacter sphaeroides* liegt als Dimer vor. Die Hälfte eines Dimers besteht jeweils aus einem Reaktionszentrum, welches von 14 LH I $\alpha\beta$ -Untereinheiten umgeben ist, mit jeweils zwei Bakteriochlorophyllmolekülen, die zwischen jedem $\alpha\beta$ -Paar in den transmembranen Helices lokalisiert sind (Qian *et al.* 2005). Anders als in anderen Bakterien wie *Rhodospirillum rubrum* oder *Thermochromatium tepidum*, bei denen das Reaktionszentrum komplett von Lichtsammelkomplexen I umschlossen wird, wird der Ring der Lichtsammelkomplexe bei *Rhodobacter sphaeroides* durch ein PufX-Polypeptid unterbrochen. Dadurch bildet sich ein Kanal im LHI-RC-PufX-Komplex, wodurch Quinone und Quinole an den Lichtsammelkomplexen I vorbei zu der Q_B-Seite des Reaktionszentrums gelangen (Qian *et al.* 2013; Olsen *et al.* 2014; Olsen *et al.* 2017). Das Reaktionszentrum besteht

aus drei Untereinheiten, die anhand ihres Sedimentationsverhaltens in L (*light*), M (*medium*) und H (*high*) benannt wurden. Die Untereinheiten binden vier Bakteriochlorophyll a-, zwei Bakteriopheophytin-, zwei Ubiquinonmoleküle und ein Eisenion als Cofaktoren. Diese Moleküle sind in zwei Zweigen arrangiert, die eine 2-fache Symmetrieachse besitzen (Allen *et al.* 1987). Zwei der vier Bakteriochlorophyllmoleküle stehen in unmittelbarer Nähe zueinander und werden als das Spezialpaar bezeichnet. Die Photosynthesereaktion beginnt mit der Absorption eines Photons durch die Lichtsammelkomplexe und die Weiterleitung der Exziton auf das Spezialpaar des Reaktionszentrums. Im Anschluss wird ein Elektron des angeregten Bakteriochlorophyllpaares über ein Bakteriochlorophyll- und Bakteriopheophytinmolekül auf das primäre Quinon übertragen. Das Elektron wird von dem primären Quinon (Q_A^-) auf ein zweites Quinon übertragen, wodurch ein, an das Reaktionszentrum-gebundenes, Semi-Quinon (Q_B^-) erzeugt wird. Durch eine zweite photochemische Reaktion im Reaktionszentrum wird das Semi-Quinon erneut reduziert und kann vom Reaktionszentrum freigesetzt werden. Dabei bindet es zwei Protonen aus dem Cytoplasma und gelangt in den Quinon-Pool. Der Elektronenflusszyklus wird durch die Oxidation des Quinols durch den Cytochrom_{bc1}-Komplex, wodurch die zwei Protonen in den periplasmatischen Raum abgegeben werden und die Übertragung der Elektronen des reduzierten Cytochrom_{c2} auf das anfängliche oxidierte Bakteriochlorophyllpaares, komplementiert. Durch diesen Zyklus werden Protonen vom Cytoplasma in den periplasmatischen Raum transportiert, wodurch ein Protonengradient aufgebaut wird. Durch die protonenmotorische Kraft wird die ATP-Synthase angetrieben und die ATP-Produktion katalysiert (zusammengefasst in Verméglio und Joliot P. 1999).

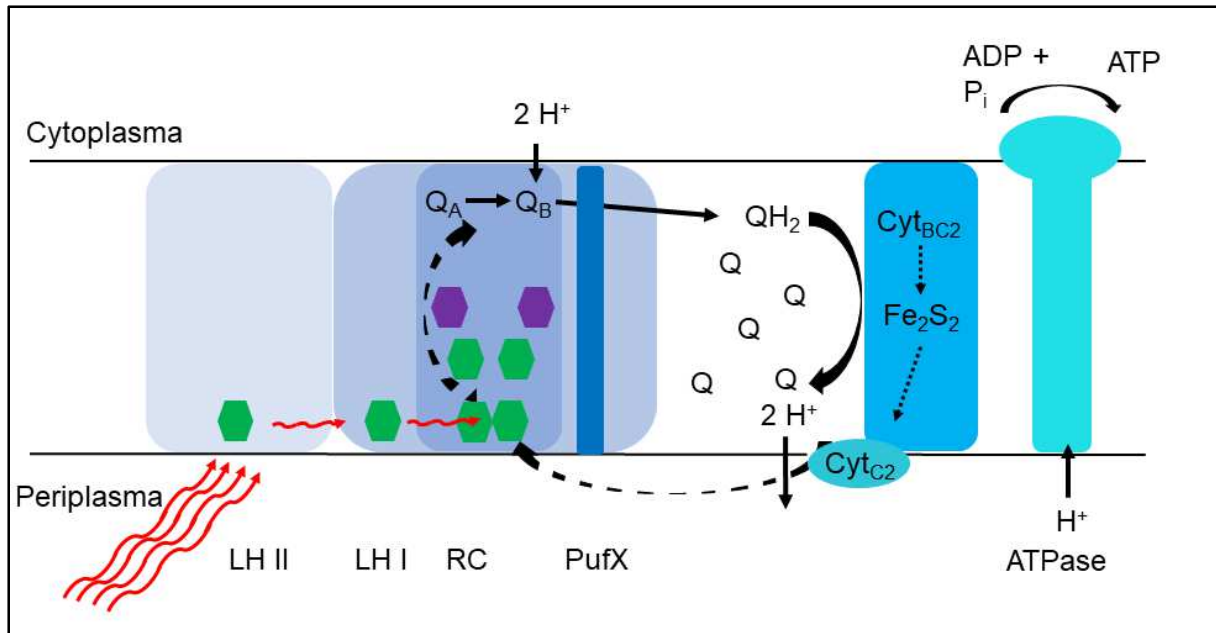


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Photosynthese in *R. sphaeroides*. Nach der Absorption der Photonen über den Lichtsammelkomplex II (LH II) werden Exzitons über den Lichtsammelkomplex I (LH I) zum Reaktionszentrum (RC) weitergeleitet. Dort wird das Bakteriochlorophyllspezialpaar (grüne Sechsecke) angeregt und ein Elektron über ein weiteres Bakteriochlorophyllpaar (grüne Sechsecke) und Bakteriopheophytin (lila Sechsecke) auf das primäre Quinon (Q_A) und im Anschluss auf das sekundäre Quinon (Q_B) übertragen. Nach einer weiteren Anregung, nimmt das reduzierte Quinon zwei Protonen (QH_2) aus dem Cytoplasma auf und gelangt in den Quinonpool. Das Quinol (QH_2) wird durch Cytochrom C_2 durch den Cytochrom BC_2 -Komplex oxidiert und die Protonen werden in das Periplasma abgegeben. Cytochrom C_2 reduziert im Anschluss das photo-oxidierte Bakteriochlorophyllspezialpaar. Der aufgebaute Protonengradient wird zur ATP-Synthese durch eine ATPase genutzt (Abbildung verändert nach Verméglio und Joliot P. 1999).

1.8 Regulation der Photosynthesegene

Sauerstoff als Nebenprodukt der oxygenen Photosynthese ist für alle Lebewesen, die strikt aerob leben, essentiell. Durch sein hohes Reaktionspotential kann Sauerstoff jedoch schädlich für lebende Zellen sein. Das zeitgleiche Vorhandensein von Sauerstoff, Licht und Pigmenten kann zu der Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) führen, die zu Schäden an der DNA, Lipiden und Proteinen führen können. Daher besitzen Organismen oft detoxifizierende Systeme, wie Superoxiddismutasen, Katalasen und Peroxidasen, um die reaktiven Sauerstoffspezies eliminieren zu können. Um der Entstehung der reaktiven Sauerstoffspezies entgegen zu wirken und die kostenintensive Synthese des Photosyntheseapparats unter nicht benötigten Bedingungen zu unterbinden, ist die Expression der Photosynthesegene strikt reguliert und hängt hauptsächlich vom Sauerstoffpartialdruck und der Lichtintensität ab (Gregor und Klug 1999; Zeilstra-Ryalls und Kaplan 2004). Die einzelnen Komponenten, die während der Photosynthese benötigt werden, sind in verschiedenen Operons kodiert, die auf

dem Chromosom in photosynthetischen Clustern lokalisiert sind. Dazu gehören die Gene der *bch*- und *crt*-Operons, deren Genprodukte an der Synthese der Bakteriochlorophyll- und Carotinoidmolekülen beteiligt sind. Das *puf*-Operon und *pufA*-Gen kodieren die Pigment-bindenden Proteine des Lichtsammelkomplexes I, die verschiedenen Untereinheiten des Reaktionszentrums und das *scaffold*-Protein PufX, welches für die richtige Assemblierung des LHI/RC-Komplexes wichtig ist. Anders als *Rhodobacter capsulatus*, der nur ein *puc*-Operon in seinem Genom trägt, besitzt *R. sphaeroides* zwei *puc*-Operons, die außerhalb des photosynthetischen Genclusters lokalisiert sind und die Pigment-bindenden Proteine des Lichtsammelkomplexes II kodieren. Die Expression dieser Photosynthesegene wird durch verschiedene Faktoren reguliert.

PpsR ist ein Homolog zu CrtJ aus *Rhodobacter capsulatus*, welches für die Repression von verschiedenen Photosynthesegenen unter aeroben Wachstumsbedingungen verantwortlich ist. Die Aminosäuresequenz beider Proteine ist zu 53% identisch und beinhaltet ein konserviertes Helix-turn-Helix-DNA-Bindemotiv in der C-terminalen Region. Deletionsmutanten von CrtJ und PpsR zeigen eine starke Induktion der Photosynthesegene unter aeroben Bedingungen, welches die Repressoraktivität unter aeroben Wachstumsbedingungen bestätigt (Penfold und Pemberton 1994). Weitere Experimente konnten zeigen, dass CrtJ unter oxidierenden Bedingungen stärker an die Promoterregion der Zielgene binden kann, als unter reduzierenden Bedingungen, was dafür spricht, dass CrtJ selbst, das Redoxpotential wahrnehmen kann, obwohl keine Metalle, Häme- oder Flavingruppen mit CrtJ oder PpsR assoziiert sind (Ponnampalam und Bauer 1997). Konservierte Cysteinreste in CrtJ sind essentiell für die Redoxstatus-abhängige Ausbildung von intramolekularen Disulfidbindungen (Masuda *et al.* 2002). In PpsR konnten ebenfalls zwei Cysteinreste identifiziert werden, die an der Ausbildung von Disulfidbrücken beteiligt sind. Unter hohem Sauerstoffpartialdruck bindet PpsR als Tetramer über diese intramolekularen Disulfidbindungen an das Bindemotiv TGT-N12-ACA direkt an die DNA *upstream* der Promoterregion und verhindert so die Bindung der RNA-Polymerase (Gomelsky und Kaplan 1995b). Bekannte *targets* für PpsR sind die Gene und Operons, die Proteine der Bakteriochlorophyll- (*bchl*) und Carotinoidsynthese (*crt*) und die Pigment-bindenden Proteine des Lichtsammelkomplexes II (*puc*) kodieren (Penfold und Pemberton 1994; Gomelsky und Kaplan 1995b). Neben Sauerstoff kann auch Licht die Expression von Photosynthesegenen regulieren. Blaulicht von einer Wellenlänge von 450 nm beispielsweise unterdrückt die Expression von Photosynthesegenen in *Rhodobacter sphaeroides* (Shimada *et al.* 1992) während es in *R. capsulatus* die Expression des *puf*- und *puc*-Operons nicht beeinflusst (Braatsch *et al.* 2002). PpsR-Deletionsmutanten können neben

der Redoxstatus-abhängigen Repression unter aeroben Wachstumsbedingungen, auch die lichtabhängige Repression bestimmter Ziel-Gene unter Blaulicht nicht regulieren (Gomelsky und Kaplan 1997). Im Gegensatz dazu zeigt die Deletion von CrtJ in *R. capsulatus* keine Auswirkungen auf die lichtabhängige Regulation, wodurch auf fundamentale Unterschiede zwischen den beiden Proteinen geschlossen wurde. In *R. sphaeroides* konnte ein Protein identifiziert werden, welches als Antirepressor von PpsR fungiert, zu dem es kein Homolog in *R. capsulatus* gibt (Gomelsky und Kaplan 1995a; Gomelsky und Kaplan 1997; Gomelsky und Kaplan 1998). AppA bindet an seinem N-terminalen Ende ein Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) und besitzt an seinem C-terminalen Ende eine Cystein-reiche Region, die für Disulfid-reduzierende Proteine wie Thioredoxin und Glutadoxin-Reduktasen bekannt ist (Gomelsky und Kaplan 1998). Eine Deletion von AppA führt zu einer stärkeren PpsR-abhängigen Repression unter mikroaeroben Bedingungen in Abwesenheit von Licht und zu einem Verlust der Regulation von PpsR durch Blaulicht (Braatsch *et al.* 2002). Sinkt der Sauerstoffpartialdruck unter einen bestimmten Schwellenwert, wird der Antirepressor AppA, in Abhängigkeit von PrrA, exprimiert. AppA reduziert die Disulfidbindungen in PpsR und formt einen stabilen Komplex mit dem Repressor, wodurch dieser nicht mehr an die DNA binden kann (Masuda und Bauer 2002). Durch das Flavin in der N-terminalen BLUF-Domäne (*sensor of blue-light using FAD*) von AppA (Gomelsky und Klug 2002; Han *et al.* 2004) wird unter Blaulichteinstrahlung die Formation des AppA-PpsR-Komplexes unterbunden, wodurch die Genexpression der Photosynthesegene in Abhängigkeit vom Redox- und Lichtstatus reguliert werden kann (Braatsch *et al.* 2004; Masuda und Bauer 2002). Die BLUF-Domäne ist nur unter Vorhandensein der C-terminalen AppA-Domäne, die selbst nicht in der Lage ist Blaulicht weiterzuleiten, funktionsfähig (Han *et al.* 2004). Diese C-terminale Domäne bindet ein Haem als Kofaktor, welches unter einem hohen Sauerstoffpartialdrucks oxidiert ist, wodurch die Bindung zwischen AppA und PpsR unterbunden wird. Während des Absinkens des Sauerstoffpartialdrucks wird das Haem reduziert, wodurch eine Bindung von AppA zu PpsR ermöglicht wird (Han *et al.* 2007). Neben AppA konnte noch ein weiterer Antirepressor von PpsR identifiziert werden (Gomelsky *et al.* 2003). Ähnlich wie für PpsR, sind auch für den Antirepressor PpaA Homologe in fast allen photosynthetischen Purpurbakterien zu finden, die *upstream* des PpsR-Lokus liegen (Cheng *et al.* 2014). Obwohl die Sequenzen der PpaA-Proteinfamilie Ähnlichkeiten mit einer SCHIC-Domäne (*sensor containing heme instead of cobalamin*) besitzen, konnten Vermeulen und Bauer (2015) zeigen, dass PpaA eine stärkere Affinität zu Cobalamin als zu Haem besitzt. Zusätzlich konnte eine stärkere Bindung zu Hydroxycobalamin, einem Nebenprodukt, welches bei der Photohydrolyse von

Adenosylcobalamin durch Lichtanregung entsteht, beobachtet werden, wodurch PpaA indirekt die Verfügbarkeit von Licht wahrnehmen kann.

FnrL ist ein Regulatorprotein, welches die Expression von bestimmten Genen unter mikroaeroben Wachstumsbedingungen aktivieren kann. Ähnlich wie PpsR besitzt es eine Helix-*turn*-Helix-DNA-Bindedomäne und bindet DNA über die FnrL-Konsensussequenz TTGAT-N4-ATCAA. Diese Konsensussequenz konnte *upstream* verschiedener Gene identifiziert werden, die Proteine kodieren, die in der Tetrapyrrol- und Bakteriochlorophyllsynthese beteiligt sind wie *hema*, *hemZ*, *hemN* und *bchE* und dem *puc*-Operon (Zeilstra-Ryalls und Kaplan 1995; Zeilstra-Ryalls und Kaplan 1998).

Neben FnrL, PpsR und AppA, ist zusätzlich das PrrA/PrrB-Zweikomponenten-System in der Aktivierung der Photosynthesegene nach der Senkung des Sauerstoffpartialdruckes beteiligt. Dieses System ist der Hauptredoxregulator und kann die Expression von bis zu 25% aller Gene regulieren (Eraso *et al.* 2008). Unter niedrigem Sauerstoffpartialdruck wird die Membran-gebundene Histidinkinase/Phosphatase PrrB autophosphoryliert und überträgt im Anschluss das Phosphat auf den Antwortregulator PrrA (Eraso und Kaplan 1996). Das phosphorylierte PrrA kann die Transkription mehrerer Gene, wie die des *puf*- und *puc*-Operons durch eine direkte Bindung an die DNA aktivieren (Eraso und Kaplan 1994; Eraso und Kaplan 1995; Du *et al.* 1998; Jones *et al.* 2005). Zusätzlich aktiviert PrrA auch die Expression von AppA (Gomelsky *et al.* 2008). Des Weiteren konnte eine sRNA identifiziert werden, deren Expression durch den Antwortregulator PrrA und FnrL induziert wird. PcrZ (*photosynthesis controlling sRNA Z*) beeinflusst die Expression des *puf*- und *puc*-Operons, *bchN*, *crtA*, *crtD* und *appA*, deren Produkte Funktionen in der Photosynthese besitzen. Während *bchN* und *puc2A* als direkte Ziele von PcrZ identifiziert werden konnten, konnte für *appA* keine eindeutige direkte Bindung nachgewiesen werden, was auf einen indirekten Effekt schließen lässt. Die Expression von PcrZ hat einen negativen Effekt auf die photosynthetischen Zielgene und wirkt somit deren Induktion durch Redoxstatus-abhängiger (Antwort)-Regulatoren entgegen. Da die Expression von PcrZ selbst von den selben (Antwort)-Regulatoren abhängig ist, liegt ein *incoherent feed-forward loop* vor, der eine sRNA beinhaltet (Mank *et al.* 2012; Mank *et al.* 2013). Vor kurzem konnte der zweite *incoherent feed-forward loop* identifiziert werden, der die Expression von Photosynthesegenen reguliert und eine sRNA beinhaltet. PcrX wird zusammen mit dem gut untersuchten *puf*-Operon kotranskribiert und beeinflusst durch eine direkte Bindung an die Ziel-mRNA *pufX*, die Stabilität des polyzistronischen *puf*-Operons (Eisenhardt *et al.* 2018).

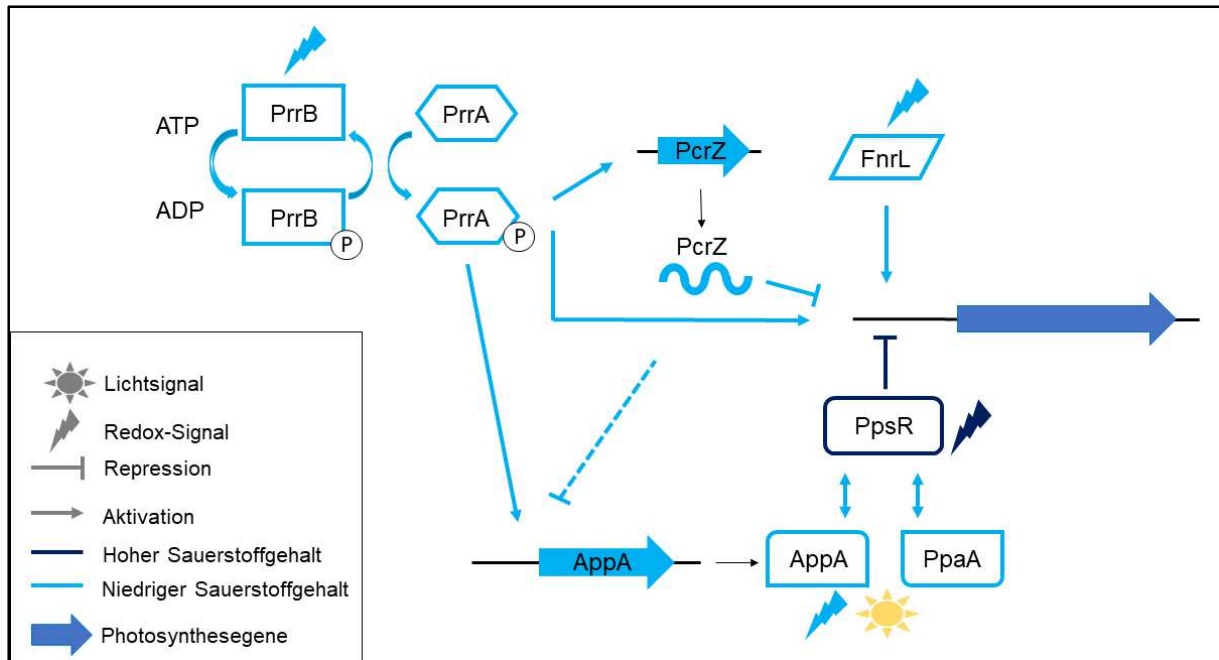


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Regulation der Photosynthesegene. Unter hohem Sauerstoffgehalt reprimiert PpsR die Expression einiger Photosynthesegene. Unter niedrigem Sauerstoffpartialdruck aktivieren PrrA, FnrL und die Antirepressoren AppA und PpaA die Expression der Photosynthesegene. Der Antwortregulator PrrA aktiviert zudem die Expression der sRNA PcrZ, welche durch direkte und indirekte Interaktionen, der Expression der Photosynthesegene entgegenwirkt (modifiziert nach Mank *et al.* 2012).

1.9 *puf*-Operon von *Rhodobacter sphaeroides*

Das polyzistronische *puf*-Operon aus *R. sphaeroides* besteht aus sechs verschiedenen Genen und einer regulatorischen sRNA (*pufQKBALMX-PcrX*), deren Produkte für die Assemblierung des Lichtsammelkomplexes I und des Reaktionszentrums benötigt werden. *pufB* und *pufA* kodieren die Pigment-bindenden Proteine des Lichtsammelkomplexes I, *pufL* und *pufM* die Pigment-bindenden Untereinheiten des Reaktionszentrums (Donohue *et al.* 1988), *pufQ* ein Protein welches den Porphyrinefflux reguliert (Chidgey *et al.* 2017; Qian *et al.* 2017), *pufX* ein *scaffold*-Protein, welches für die richtige Assemblierung zwischen dem Reaktionszentrum und dem Lichtsammelkomplex benötigt wird (Barz *et al.* 1995; Qian *et al.* 2013). Zusätzlich konnte zwischen *pufQ* und *pufB* ein weiteres Gen, *pufK*, identifiziert werden, welches für ein 20 Aminosäuren langes kleines Protein kodiert. Zwar konnten (Gong und Kaplan 1996) zeigen, dass die Deletion von *pufK* einen Einfluss auf die Translation von *pufB* *in vivo* hat, dies kann jedoch auf die Veränderung der RNA-Strukturen, die zu einer veränderten Stabilität der *pufB*-mRNA führt, zurückzuführen sein (Heck *et al.* 1996). Frühere Studien konnten aufzeigen, dass eine posttranskriptionelle Regulation des polyzistronische *puf*-Operons essentiell für die

korrekte Formation des Photosyntheseapparats ist. Das primäre 3,2 kb lange *pufQBALMX*-Fragment ist höchst instabil und besitzt eine Halbwertszeit von weniger als einer Minute unter mikroaeroben Bedingungen. In *R. capsulatus* wird die Prozessierung des Primärtranskripts durch die RNase E innerhalb der kodierenden Sequenz von *pufQ* initiiert, wodurch ein 2,7 kb langes *pufBALMX*-Fragment entsteht (Heck *et al.* 2000). Drei *stem-loop*-Strukturen *upstream* der kodierenden Sequenz von *pufB* verhindern die weitere Degradation des monophosphorylierten 5'-Endes durch die RNase E (Heck *et al.* 1996). Das *pufBALMX*-Fragment hat unter mikroaeroben Bedingungen eine Halbwertszeit von ca. 8 min, während es unter aeroben Bedingungen eine Halbwertszeit von ca. 3 min besitzt (Klug 1991). Dies ist auf eine gesteigerte Aktivität der RNase E unter aeroben Bedingungen zurückzuführen (Jäger *et al.* 2004). Durch eine zusätzliche RNase E-Schnittstelle in der kodierenden Sequenz von *pufL* kommt es zu einer weiteren Prozessierung in das 0,5 kb lange *pufBA*-Fragment (Fritsch *et al.* 1995). Weitere *stem-loop*-Strukturen am 3'-Ende von *pufA* stabilisieren das *pufBA*-Fragment, welches eine Halbwertszeit von ca. 33 min unter mikroaeroben Bedingungen aufweist, gegen einen 3'-5'-exonukleolytischen Abbau (Belasco *et al.* 1985). Die unterschiedlichen Stabilitäten des *puf*-Operons werden benötigt, um die Stöchiometrie zwischen dem Lichtsammelkomplex I und dem Reaktionszentrum gewährleisten zu können, die normalerweise bei 15:1 liegt (Klug *et al.* 1987). In *Rhodobacter sphaeroides* konnten durch Northern Blot Analysen die gleichen Prozessierungsfragmente und ähnliche Halbwertszeiten des *puf*-Operons wie in *R. capsulatus* beobachtet werden, welches für einen ähnlichen Prozessierungsmechanismus sprechen könnte. Durch jüngere RNA-Seq-Studien konnte des Weiteren die Existenz einer kleinen regulatorischen RNA nachgewiesen werden, die zusammen mit dem *puf*-Operon kotranskribiert wird. PcrX ist in der 3'-UTR von *pufX* lokalisiert und bildet die Terminatorstruktur für das komplette *puf*-Operon aus. Die sRNA wird durch die RNase E aus der polyzistronischen RNA herausprozessiert und kann im Anschluss an ihre Ziel-mRNA *pufX* binden. Eine Überexpression der sRNA führt zu einer Destabilisierung des *pufBALMX*-Fragmentes und damit zu einer Verringerung der Halbwertszeit unter mikroaeroben Bedingungen. BLAST-Analysen sagten die Existenz von PcrX in *R. capsulatus* voraus, welche durch eine *R. capsulatus*-spezifische Sonde gegen PcrX bestätigt werden konnte. Dadurch liegt die Vermutung nahe, dass in *R. capsulatus* ein ähnlicher Mechanismus zur Prozessierung des *pufBALMX*-Fragmentes, zusätzlich zu den bereits beschrieben, existiert (Eisenhardt *et al.* 2018).

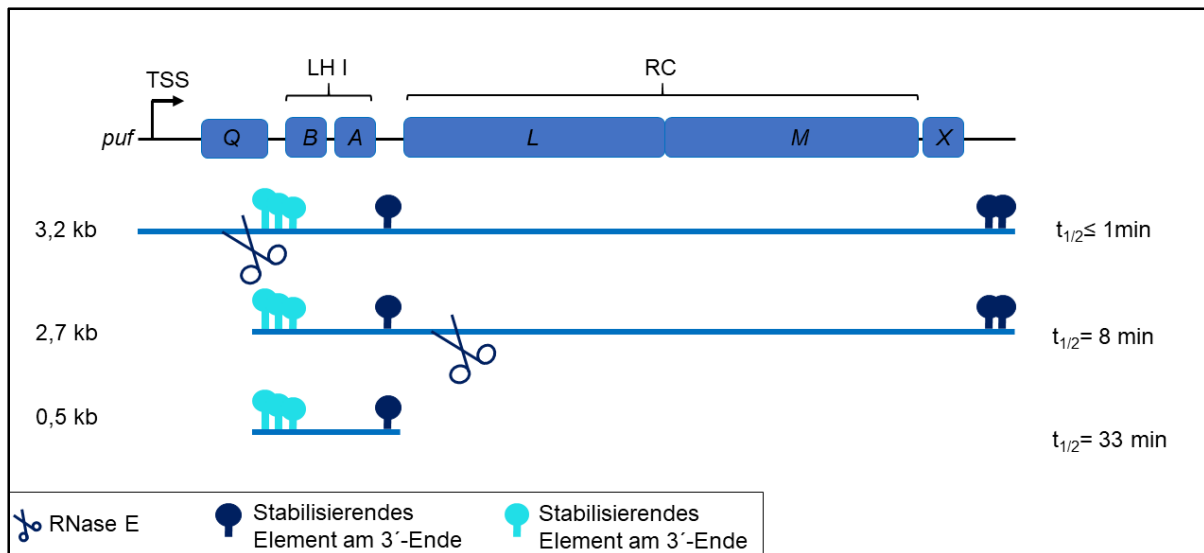


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Prozessierung der polyzistronischen *puf*-mRNA in *Rhodobacter capsulatus*. Durch RNase E-abhängige Prozessierungsstellen und die stabilisierenden Sekundärstrukturen an den 5'- und 3'-Enden sind gezeigt. Die unterschiedlichen Halbwertszeiten ($t_{1/2}$) des *puf*-Transkripts unterstützen das stöchiometrische Verhältnis der Lichtsammelkomplexe I (LH I) und dem Reaktionszentrum (RC) von 15:1 (verändert nach Heck *et al.* 2000).

1.10 Zielsetzung

Die Regulation der Photosynthesegene spielt eine wichtige Rolle für die ATP-Produktion unter anaeroben und die Vermeidung der ROS-Produktion unter aeroben Wachstumsbedingungen. An der Regulation sind maßgeblich verschiedene Proteinregulatoren beteiligt, die die Transkription direkt beeinflussen können. Neben der transkriptionellen ist jedoch auch die posttranskriptionelle Regulation, wie die durch RNasen-vermittelte Degradation und Prozessierung von RNA-Molekülen wichtig. Zur Untersuchung der regulatorischen Funktion der RNase E in *R. sphaeroides* wurde eine Substitutionsmutante erstellt, die das *rne-3071* Allel aus *E. coli* besitzt, wodurch ein thermosensitives Enzym synthetisiert wird. Um die Rolle der RNase E in der Prozessierung von unterschiedlichen RNA-Spezies untersuchen zu können, soll zunächst eine TIER-RNA-Seq-Analyse (*transiently inactivating an endoribonuclease followed by RNA-Seq*) und anschließend eine bioinformatische Bestimmung der Genom-weiten RNase E-Schnittstellen durchgeführt werden. Darüber hinaus soll die Stämme unter verschiedenen Wachstums- und Stressbedingungen untersucht werden, um einen Einblick zu bekommen, ob die Änderungen des Transkriptom Auswirkungen auf den Phänotyp der RNase E-Mutante im Vergleich zum Wildtyp haben.

Aus früheren Studien ist bereits bekannt, dass die RNase E-abhängige Prozessierung der *puf*-mRNA und die unterschiedlichen Stabilitäten der *puf*-mRNA-Fragmente in *R. capsulatus* essentiell für die korrekte Assemblierung des RC-LHI-Komplexes sind. In *Rhodobacter sphaeroides* konnten die gleichen Prozessierungsprodukte und ähnliche Halbwertszeiten wie in *R. capsulatus* beobachtet werden, welche auf einen ähnlichen Mechanismus in der Prozessierung schließen lassen. Jedoch konnten durch RNA-Seq-Analysen von Gesamt-RNA aus mikroaerob-kultivierten *Rhodobacter sphaeroides* Wildtypkulturen die *antisense* RNA asPcrL identifiziert werden, die mit dem *puf*-Operon assoziiert ist. Die RNA-Seq-Analysen zeigen, dass die antisense RNA sowohl die kodierende Sequenz als auch die 5'-UTR von *pufL* überspannt. Darüber hinaus konnte die Existenz von asPcrL in *R. capsulatus* nicht nachgewiesen werden. Da jüngere Studien zeigen, dass auch kleine regulatorische RNAs Funktionen in der Genregulation verschiedener Photosynthesegene übernehmen können, wurde in dieser Arbeit die Rolle von asPcrL untersucht. Neben Bestätigung der Existenz von asPcrL und der Untersuchung des Expressionsprofils soll die biologische Funktion von asPcrL in Hinblick auf die Prozessierung des *puf*-Operons untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

In diesem Kapitel der Arbeit sind alle verwendeten Stämme, Plasmide, Oligonukleotide, Enzyme, molekularbiologischen Kits, Antibiotika, Geräte und Chemikalien aufgelistet.

2.1.1 Stämme

Tabelle 1: In dieser Arbeit verwendete *Escherichia coli* Stämme

Stamm	Verwendung/Beschreibung	Herkunft
JM109	Klonierungsarbeiten und Plasmidreplikation <i>endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17 (r_K⁻, m_K⁺), relA1, supE44, Δ(lac-proAB), [F' traD36, proAB, laqI^qZΔM15]</i>	NEB
DH5α	Klonierungsarbeiten und Plasmidreplikation F ⁻ Φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 <i>recA1 endA1, hsdR17 (r_K⁻, m_K⁺), phoA supE44 thi-1 gryA96 relA1</i> λ ⁻ -Donorstamm für diparentale	NEB
S17-1	Konjugation von <i>R. sphaeroides recA, pro, hsdR</i> RP42(Tc::Mu)(Km::Tn7)	Simon <i>et al.</i> 1983
M15 (pREP4/ pQE-30[Rc rnc])	<i>Rhodobacter capsulatus</i> RNase III-Überexpressionsstamm	Conrad <i>et al.</i> 1998
JM 109 (pQE-Rs hfq)	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> Hfq-Überexpressionsstamm	(Mank 2013)

Tabelle 2: In dieser Arbeit verwendete *Rhodobacter sphaeroides* Stämme

Stamm	Verwendung/Beschreibung	Herkunft
2.4.1	Wildtyp	van Niel 1944
2.4.1 Δ <i>prra</i>	<i>prra</i> -Deletionsmutante in 2.4.1, Sp ^r	Eraso und Kaplan 1995
2.4.1 Δ <i>fnrl</i>	<i>fnrl</i> -Deletionsmutante in 2.4.1, Km ^r	Zeilstra-Ryalls und Kaplan 1995
2.4.1 Δ <i>appa</i>	<i>appa</i> -Deletionsmutante in 2.4.1, Km ^r	
2.4.1 Δ <i>hfq</i> ::ΩSp	<i>hfq</i> -Deletionsmutante in 2.4.1, Sp ^r	Glaeser <i>et al.</i> 2007
2.4.1 Hfq+	Komplementationsmutante Δ <i>hfq</i> mit pRK2.4.1 <i>hfq</i> , Sp ^r , Tc ^r	Glaeser <i>et al.</i> 2007
2.4.1 3xFLAG-Hfq+	Komplementationsmutante Δ <i>hfq</i> mit pRK2.4.1-3XFlag- <i>hfq</i> , Sp ^r , Tc ^r	Berghoff <i>et al.</i> 2011
2.4.1 <i>rne</i> ^{E.c. ts}	Substitution der 2.4.1 <i>rne</i> durch thermosensitive <i>rne</i> -3071 aus <i>E. coli</i> N3431, Sp ^r	Weber <i>et al.</i> 2016
2.4.1 Δ <i>rnc</i>	<i>rnc</i> -Deletionsmutante in 2.4.1, Km ^r	Rische-Grahl <i>et al.</i> 2014

2.4.1 Δrnj	<i>rnj</i> -Deletionsmutante in 2.4.1, Km ^r	Rische-Grahl <i>et al.</i> 2014
2.4.1 $\Delta rppH$	<i>rppH</i> -Deletionsmutante in 2.4.1, Km ^r	Rische 2012
2.4.1 Δrnr	<i>rnr</i> -Deletionsmutante in 2.4.1, Km ^r	Rische 2012
2.4.1 $\Delta ybey$	<i>ybey</i> -Deletionsmutante in 2.4.1, Gm ^r	Rische 2012
2.4.1 $\Delta rnc/rnj$	<i>Rnc/rnj</i> -Deletionsmutante in 2.4.1, Km ^r , Gm ^r	Rische-Grahl <i>et al.</i> 2014
2.4.1 $\Delta rnr/rnj$	<i>Rnr/rnj</i> -Deletionsmutante in 2.4.1, Km ^r , Gm ^r	Rische 2012
2.4.1 Δpuf	<i>puf</i> -Deletionsmutante in 2.4.1, Gm ^r	Diese Arbeit
2.4.1 pBBR:16S	2.4.1 mit pBBR_16S, Km ^r	Mank <i>et al.</i> 2012
2.4.1 pBBR:asPcrL	2.4.1 mit pBBR_16S_asPcrL_Terminator, Km ^r	Diese Arbeit
2.4.1 pBBR:5'-asPcrL	2.4.1 mit pBBR_16S_5'-asPcrL_Terminator, Km ^r	Diese Arbeit
2.4.1 pBBR:3'-asPcrL	2.4.1 mit pBBR_16S_3'-asPcrL_Terminator, Km ^r	Diese Arbeit
2.4.1 Δhfq pBBR:16S	2.4.1 Δhfq mit pBBR_16S, Sp ^r , Km ^r	Diese Arbeit
2.4.1 Δhfq pBBR:asPcrL	2.4.1 Δhfq + mit pBBR_16S_asPcrL_Terminator, Sp ^r , Tc ^r , Km ^r	Diese Arbeit
2.4.1 3xFLAGhfq+ pBBR:16S	2.4.1 3xFLAGhfq+ mit pBBR_16S, Sp ^r , Tc ^r , Km ^r	Diese Arbeit
2.4.1 3xFLAGhfq+ pBBR:asPcrL	2.4.1 3xFLAGhfq+ mit pBBR_16S_asPcrL_Terminator, Sp ^r , Tc ^r , Km ^r	Diese Arbeit
2.4.1 pPHU: <i>pufL</i>	2.4.1 mit pPHU_16S_ <i>pufL</i> :: <i>lacZ</i> , Tc ^r	Diese Arbeit
2.4.1 pBBR:16S + pPHU: <i>pufL</i>	2.4.1 mit pBBR_16S und pPHU_16S_ <i>pufL</i> :: <i>lacZ</i> , Tc ^r , Km ^r	Diese Arbeit
2.4.1 pBBR:asPcrL + pPHU: <i>pufL</i>	2.4.1 mit pBBR_16S_asPcrL_Terminator und pPHU_16S_ <i>pufL</i> :: <i>lacZ</i> , Tc ^r , Km ^r	Diese Arbeit
2.4.1 Δhfq pPHU: <i>pufL</i>	2.4.1 Δhfq mit pPHU_16S_ <i>pufL</i> :: <i>lacZ</i> , Sp ^r , Tc ^r	Diese Arbeit
2.4.1 Δhfq pBBR:16S + pPHU: <i>pufL</i>	2.4.1 Δhfq mit pBBR_16S und pPHU_16S_ <i>pufL</i> :: <i>lacZ</i> , Sp ^r , Km ^r , Tc ^r	Diese Arbeit
2.4.1 Δhfq pBBR:asPcrL + pPHU: <i>pufL</i>	2.4.1 Δhfq mit pBBR_16S_asPcrL_Terminator und pPHU_16S_ <i>pufL</i> :: <i>lacZ</i> , Sp ^r , Km ^r , Tc ^r	Diese Arbeit
2.4.1 Δpuf pBBR:asPcrL	2.4.1 Δpuf mit pBBR_16S_asPcrL_Terminator, Gm ^r , Km ^r	Diese Arbeit
2.4.1 Δrnc pPHU: <i>pufL</i>	2.4.1 Δrnc mit pPHU_16S_ <i>pufL</i> :: <i>lacZ</i> , Gm ^r , Tc ^r	Diese Arbeit

2.1.2 Plasmide

Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendete Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Herkunft
pJet 2.1	Klonierungsvektor, Amp ^r	Thermo Scientific
pDrive	Klonierungsvektor, Amp ^r , Km ^r	Quiagen
pPHU235	<i>Broad-host-range</i> transl. <i>lacZ</i> Fusionsvektor, Tc ^r	Hübner <i>et al.</i> 1991
pBBR1 MCS-5- <i>lacZ</i>	<i>Broad-host-range</i> transkript. <i>lacZ</i> Fusionsvektor, Gm ^r	Fried <i>et al.</i> 2012
pBBR1 MCS-3- <i>lacZ</i>	<i>Broad-host-range</i> transkript. <i>lacZ</i> Fusionsvektor, Tc ^r	Fried <i>et al.</i> 2012
pBBR1 MCS-2	<i>Broad-host-range</i> Klonierungsvektor, Km ^r	Kovach <i>et al.</i> 1995
pBBR_16S	Leervektorkontrolle, pBBR1MCS-2 mit 16S rRNA Promoter	Mank <i>et al.</i> 2012
pBBR_asPcrL	Überexpressionsplasmid für asRNA asPcrL, pBBR_16S mit 237 nt großem asPcrL-Fragment und Phagenterminator	Diese Arbeit
pBBR_5'-asPcrL	Überexpressionsplasmid für 5'-asPcrL, pBBR_16S mit 95 nt großem asPcrL-Fragment und Phagenterminator	Diese Arbeit
pBBR_3'-asPcrL	Überexpressionsplasmid für 3'-asPcrL, pBBR_16S mit 146 nt großem asPcrL-Fragment und Phagenterminator	Diese Arbeit
pDrive_pufL_ivT	pDrive-Vektor mit Teil der pufL-Sequenz für <i>run-off in vitro</i> Transkription	Diese Arbeit
pDrive_asPcrL_ivT	pDrive-Vektor mit asPcrL-Sequenz für <i>run-off in vitro</i> Transkription	Diese Arbeit
pDrive_5'-asPcrL_ivT	pDrive-Vektor mit Teil der asPcrL-Sequenz für <i>run-off in vitro</i> Transkription	Diese Arbeit
pDrive_3'-asPcrL_ivT	pDrive-Vektor mit Teil der asPcrL-Sequenz für <i>run-off in vitro</i> Transkription	Diese Arbeit
pRK415	<i>Broad-host-range</i> Klonierungsvektor, Tc ^r	Keen <i>et al.</i> 1988
pRK415_16S_Ω	<i>Broad-host-range</i> Klonierungsvektor mit 16S rRNA Promoter und Phagenterminator, Tc ^r	Weber 2017
pPHU: <i>pufL</i>	<i>Broad-host-range</i> transl. <i>lacZ</i> Fusionsvektor pPHU235 mit 16S rRNA Promoter und <i>pufL</i> -Sequenz, Tc ^r	Diese Arbeit
pPHU281	<i>Suicide</i> -Plasmid, Tc ^r	Hübner <i>et al.</i> 1991
pWKR209-CII	Plasmid mit Gentamycin-Resistenzkassette, Gm ^r	Masepohl <i>et al.</i> 1988
pPHU281_Δ <i>puf</i> ::Gm P1200	<i>Suicide</i> -Plasmid zur Deletion des <i>puf</i> -Operons <i>Broad-host-range</i> transkript. <i>lacZ</i> Fusionsvektor mit <i>puf</i> -Promoter, Tc ^r	Diese Arbeit Eisenhardt 2017
PasPcrL	<i>Broad-host-range</i> transkript. <i>lacZ</i> Fusionsvektor mit potentieller asPcrL-Promoterregion, Gm ^r	Diese Arbeit

2.1.3 Oligonukleotide

Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz (5' - 3')	Nutzung
<i>Puf</i> -up-for	TACTCTAGAGAAGTTTGCAACGCCCTGTT	Klonierung Δpuf
<i>Puf</i> -up-rev	GGATCCTCAGGCGCGGAAAATCAGC	Klonierung Δpuf
<i>Puf</i> -down-for	TACGGATCCATGGCTGACAAGACCATCTT CA	Klonierung Δpuf
<i>Puf</i> -down-rev	TACCTCGAGACAGTCAGCTCAACCACCCC	Klonierung Δpuf
<i>pufL</i> -for	TGGCTCGAGTCTGCCGCCAAGTACA	Klonierung pPHU_16S_pufL::lacZ
<i>pufL</i> -rev	TGGAAGCTTATTGATGCCTCCCGGG	Klonierung pPHU_16S_pufL::lacZ
asPcrL-for	ATCTCTAGAACCCAGAAGTCGAACAGGTT TCC	Klonierung pBBR_asPcrL
asPcrL-rev	ATCGGATCCCGCCGTCGCCGAGTAAT	Klonierung pBBR_asPcrL
5'-asPcrL-rev	ATCGGATCCGCACTGCTCAGCTTCGAGC	Klonierung pBBR_5'-asPcrL
3'-asPcrL-for	TCTAGACTCCGCTTGCAGTCGG	Klonierung pBBR_3'-asPcrL
Sonde- <i>pufL</i> -for	ACACCTACGGCAACTTCC	Northern Blot Sonde
Sonde- <i>pufL</i> -rev	ATCGAGTAGCCGACCAGA	Northern Blot Sonde
Sonde-asPcrL-for	ACCCAGAAGTCGAACAGGTTTCCGC	Northern Blot Sonde
Sonde-asPcrL-rev	GGGCCGACTGCAAGCGGAGA	Northern Blot Sonde
5S rRNA	CTTGAGACGCAGTACCATTG	Northern Blot Sonde
14S rRNA	CTTAGATGTTTCAGTTCCC	Northern Blot Sonde
ivT- <i>pufL</i> -for	TGGCTCGAGTCTGCCGCCAAGTACA	Klonierung pDrive_pufL_ivT
ivT- <i>pufL</i> -rev	TACGGATCCGAGATGAGTTGGGGGTCCA G	Klonierung pDrive_pufL_ivT
ivT-asPcrL-for	ATCTCTAGAACCCAGAAGTCGAACAGGTT TCC	Klonierung pDrive_asPcrL_ivT
ivT-asPcrL-rev	ATCGGATTCCGCCGTCGCCGAGTAAT	Klonierung pDrive_asPcrL_ivT
Phagen-Terminator for	CTTGGGGACCCTAGAGGTCCCCTTTTTTAT TTTG	Klonierung pBBR_asPcrL
Phagen-Terminator rev	AATTCAAATAAAAAAGGGGACCTCTAGG GTCCCCAAGGTAC	Klonierung pBBR_asPcrL
<i>rpoZ</i> for	ATCGCGGAAGAGACCCAGAG	qRT-PCR
<i>rpoZ</i> rev	GAGCAGCGCCATCTGATCCT	qRT-PCR
<i>sinI</i> for	GTAATACGACTCACTATAGGGCATCGCGT AATCACGCATGG	qRT-PCR
<i>sinI</i> rev	GGTGCTGGCTGCGACCGTT	qRT-PCR
RT- <i>pufL</i> for	ACACCTACGGCAACTTCC	qRT-PCR
RT- <i>pufL</i> rev	ATCGAGTAGCCGACCAGA	qRT-PCR
Oligo-dT-Anchor	GACCACGCGTATCGATGTGCGACTTTTTTTT TTTTTTTT	RACE-PCR

PCR Anchor GACCACGCGTATCGATGTCGAC RACE-PCR

2.1.4 Radioaktive Nukleotide

Tabelle 5: In dieser Arbeit verwendete radioaktive Nukleotide

Nukleotid	Konzentration [Ci/mmol]	Hersteller
[γ -P32]-ATP	3000	Hartmann Analytic
[α -P32]-CTP	3000	Hartmann Analytic
[α -P32]-UTP	3000	Hartmann Analytic

2.1.5 Enzyme

Tabelle 6: In dieser Arbeit verwendete Enzyme

Enzym	Hersteller
AMV Reverse Transkriptase (2 U/ μ l)	Promega
Antarctic-Phosphatase (5 U/ μ l)	NEB
Lysozym (1 mg/ml)	Boehringer
Phusion DNA Polymerase (2 U/ μ l)	Thermo Scientific
Poly A-Polymerase (5 U/ μ l)	NEB
Proteinase K (20 mg/ml)	Sigma Aldrich
Restriktionsendonukleasen (1 U/ μ l)	Thermo Scientific
RNase A (100 mg/ml)	Thermo Scientific
RiboLock (40 U/ μ l)	Thermo Scientific
T4 DNA Ligase (5 U/ μ l)	Thermo Scientific
T4 Polynukleotid-Kinase (10 U/ μ l)	NEB
T7 RNA Polymerase (5 U/ μ l)	NEB
Taq DNA Polymerase (1 U/ μ l)	Quiagen
Terminale Desoxyribonukleotidyl-Transferase (20 U/ μ l)	Thermo Scientific

2.1.6 Größenstandards

Tabelle 7: In dieser Arbeit verwendete Größenstandards

Chemikalie	Hersteller
GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder	Thermo Scientific
GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder	Thermo Scientific
RiboRuler low range RNA Ladder	Thermo Scientific

2.1.7 Geräte

Tabelle 8: In dieser Arbeit verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Elektroblotter, Perfect Blue Semi-dry Blotter	VWR PeqLab
Elektroporationspulser, MicroPulser™	BioRad
Geltrockner, Stab Gel Dryer GD5040	Scie-Plas
Heizblock	VWR PeqLab
Imaging Screen	Fuji/ BioRad

Kühlzentrifuge, Heraeus Fresco 17 centrifuge	Thermo Scientific
NanoDrop 1000	PeqLab
Phosphoimager, Personal Phospho Imager FX	BioRad
PCR-Cycler, T100™ Thermal Cycler	BioRad
qRT-PCR-Maschine, CFX Connect	BioRad
Rotationsofen, PerfectBlot	PeqLab
Screen Eraser K	BioRad
Sonifizierer, Sonoplus	Bandlin
Speedvac, Concentrator plus	Eppendorf
Szintillationszähler, Mini 900 Ratemeter	Thermo Scientific
Spektralphotometer Specord 50Plus	Analytik Jena
Ultrazentrifuge, Optima™ TLX Ultracentrifuge	Beckman Coulter
UV-Tisch, UVT-20 M/W	Herolab
Vakuumblotter	Appligene
Vakuumpumpe für Gelrockner, Diaphragm Pump	Vacuubrand GmbH
Vortexer, Vortex Genie 2™	Scientific Industries
Wasserbad	GFL
Wasserbadschüttler G76	New Brunswick Scientific
Zentrifuge, Heraeus Fresco 17 centrifuge	Thermo Scientific

2.1.8 Molekularbiologische Kits

Tabelle 9: Die in dieser Arbeit verwendete molekularbiologische Kits

Kit	Hersteller
Brilliant III Ultra-Fast Sybr® Green QRT-PCR Master Mix	Agilent
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche
Illustra™ MicroSpin™ G-25 Columns	GE Health Care
Illustra™ MicroSpin™ G-50 Columns	GE Health Care
innuPrep DOUBLEpure Kit	Analytik Jena
NucleoSpin® Plasmid EasyPure	Macherey-Nagel
Prime-a-Gene® Labeling System	Promega
TURBO DNA-free™ Kit	Invitrogen

2.1.9 Labormaterial

Tabelle 10: In dieser Arbeit verwendete Materialien

Material	Hersteller
Cryovial®	Simport
Einmalspritze, 50 ml	Sarstedt
Elektroporationsküvette 0,2 cm	Bridge
Nylonmembran, Roti®-Nylon plus, 0,45 µm	Roth
Rotilabo®-Spritzenfilter, 0,22 µm	Roth
Safelock Eppi, SafeSeal Gefäß 1,5 ml	Sarstedt
Safelock Eppi, SafeSeal Gefäß 2 ml	Sarstedt
PCR Tubes 0,2 ml	PeqLab
Polystyrolküvette 10 x 4 x 45 mm	Sarstedt
QRT-PCR Tubes, 0,2 ml Low Profile Thin-walled 8 Tube Strips	Thermo Scientific

QRT-PCR Tubes, Optical clear flat 8 Cap Strips	Thermo Scientific
Quarzküvette Suprasil® 10 mm Schichtdicke	Hellma
Whatman Papier	Albet LabScience

2.1.10 Chemikalien

Tabelle 11: In dieser Arbeit verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Agarose	Biozym Scientific GmbH
Anti-FLAG® M2 Magnetic Beads	Sigma-Aldrich
Bovines Serumalbumin Fraktion V	Roth
Bacto Agar	Roth
Borsäure	Roth
β-Mercaptoethanol	Roth
Bradford-Reagenz, Rotiquant	Roth
Desoxyribonukleosidtriphosphate	Thermo Scientific
DTT	Sigma Aldrich
Chloroform	Roth
EDTA	Roth
Eisessig	Roth
Formaldehyd 37%	Roth
Formamid	Roth
Glycerin	Roth
IPTG	Roth
Kaliumchlorid	Roth
Magnesiumchlorid	Roth
Methylenblau	Sigma Aldrich
ONPG	Serva
Paraquat Dichlorid Hydrat	Sigma Aldrich
Phenolwasser	AppliChem
Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1)	AppliChem
peqGOLD TriFast	PeqLab
SDS	Roth
Ribonukleosidtriphosphate	Thermo Scientific
Standard I-Agar	Roth
Standard I Nährmedium	Roth
<i>Tert</i> -Butylhydroperoxid	Sigma Aldrich
Tris	Roth
Wasserstoffperoxid	Roth
X-Gal	Roth

Tabelle 12: In dieser Arbeit verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Hersteller	Endkonzentration <i>E. coli</i> [$\mu\text{g/ml}$]	Endkonzentration <i>R. sphaeroides</i> [$\mu\text{g/ml}$]
Ampicillin Natriumsalz	Roth	20	-
Gentamycinsulfat	Roth	10	10
Kanamycinsulfat	Roth	25	25
Rifampicin	Serva	-	274,5
Spectinomycin	Alfa Aesar	10	15
Dichlorid Pentahydrat			
Tetrazyclin Hydrochlorid	Roth	20	1-2

2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.1 Sterilisation

Hitzeempfindliche Substanzen werden sterilfiltriert, während hitzebeständige Lösungen und Puffer 1 Stunde bei 121°C und 1 bar Überdruck autoklaviert werden. Glasware wird für 3 Stunden bei 180°C sterilisiert.

2.2.2 Kultivierung von *Rhodobacter sphaeroides*

Zur Kultivierung von *Rhodobacter sphaeroides* wird in dieser Arbeit ausschließlich RÄ-Minimalmedium (*Rhodobacter*-Apfelsäure Medium (Tabelle 13) genutzt. Einem Liter autoklavierten Medium werden vor Benutzung 8 ml sterilfiltrierte Vitaminlösung (Tabelle 14) und 20 ml autoklavierte Phosphatlösung (Tabelle 15) hinzugegeben. Zugefügte Antibiotika können als Selektionsmarker für verschiedene Stämme dienen und wurden ebenfalls nach dem Autoklavieren zugefügt.

Tabelle 13: Zusammensetzung für 1 l RÄ-Medium

Komponente	Menge
Apfelsäure	3g
Ammoniumsulfat	1,2 g
Magnesiumsulfat-7-Hydrat	0,2 g
Calciumchlorid-Dihydrat	0,07 g
Spurenelementlösung	1,5 ml
ddH ₂ O	ad 1 l
	Autoklavieren und bei Raumtemperatur lagern
Vitaminlösung	8 ml
Phosphatlösung	20 ml

Tabelle 14: Zusammensetzung für 1 l Vitaminlösung

Komponente	Menge
Nicotinsäure	0,2 g
Nicotinamid	0,2 g
Thiamin-Hydrochlorid	0,4 g
Biotin	0,008 g
ddH ₂ O	ad 1 l

Tabelle 15: Zusammensetzung für 1 l Phosphatlösung

Komponente	Menge
Dikaliumhydrogenphosphat	45 g
Kaliumdihydrogenphosphat	30 g
ddH ₂ O	ad 1 l

Tabelle 16: Zusammensetzung für 500 ml Spurenelementlösung

Komponente	Menge
Mangan(II)-chlorid Tetrahydrat	10 mg
Zinkchlorid	2,5 mg
Lithiumchlorid	2,5 mg
Kaliumbromid	1,25 mg
Kaliumiodid	1,25 mg
Kupfersulfat	0,075 mg
Natriummolybdat Dihydrat	0,5 mg
Cobalt(II)-chlorid Hexahydrat	2,5 mg
Zinn(II)-chlorid Dihydrat	0,25 mg
Bariumchlorid	0,25 mg
Aluminiumchlorid	0,5 mg
Boran	5 mg
EDTA	10 mg
Eisen(III)-citrat	250 mg
ddH ₂ O	ad 500 ml

2.2.2.1 Anzucht auf Agarplatte

Zur Herstellung von Agarplatten wird dem Flüssigmedium (Tabelle 13) 1,6% Bacto Agar (w/v) vor dem Autoklavieren hinzugegeben. Das autoklavierte Medium wird auf 50 - 60°C abgekühlt, mit Vitamin- und Phosphatlösung supplementiert und benötigte Antibiotika werden in entsprechender Konzentration hinzugefügt. Um Einzelkolonien zu erhalten, wird ein Vereinzelungsausstrich mittels Impföse durchgeführt oder die Zellen durch ausplattieren mit einem Drigalskispattel verteilt. Die Agarplatten werden bei Dunkelheit und 32°C für 2 - 4 Tage inkubiert.

2.2.2.2 Anzucht in Flüssigkulturen

Zum Beimpfen einer Flüssigkultur wird das Medium entweder mit einer Einzelkolonie von einer Agarplatte mittels sterilisierter Impföse oder mit 1 - 2 ml einer bereits angewachsenen Kultur inokuliert und bei 32°C bei 140 rpm inkubiert. Die Vorkulturen für die einzelnen Experimente dürfen vor Verdünnung höchstens eine $OD_{660} = 0,8$ und somit die stationäre Phase noch nicht erreicht haben. Wenn nicht explizit anders beschrieben, werden die Übernachtskulturen am Tag des Experiments auf eine $OD_{660} = 0,2$ verdünnt und bei 32°C inkubiert, bis die Zellen die exponentielle Phase erreichen ($OD_{660} = 0,4 - 0,6$). Da der Sauerstoffgehalt und die Lichtverhältnisse bei der Anzucht von *Rhodobacter* eine große Rolle spielen, werden in den folgenden Abschnitten die unterschiedlichen Wachstumsbedingungen, die während dieser Arbeit genutzt werden, genauer beschrieben.

2.2.2.3 Aerobes Wachstum

Um aerobe Wachstumsbedingungen zu erreichen, werden Erlenmeyerkolben mit Schikanen genutzt, höchstens mit 25% Gesamtvolumen befüllt und bei 32°C unter ständigem Schütteln bei 140 rpm inkubiert, somit kann ein Sauerstoffgehalt von 5 - 6 mg/ml gewährleistet werden.

2.2.2.4 Mikroaerobes Wachstum

Für mikroaerobes Wachstum werden normale Erlenmeyerkolben zu 80% mit Kultur befüllt, um einen Sauerstoffgehalt von 0,5 - 1 mg/l zu erhalten. Mikroaerobe Kulturen werden bei 32°C unter ständigem Schütteln bei 140 rpm inkubiert.

2.2.2.5 Phototrophes Wachstum

Zur Kultivierung von *Rhodobacter* unter phototrophen Bedingungen werden Meplatflaschen bis zum Rand gefüllt, luftdicht verschlossen und bei 32°C und 60W/m² belichtet.

2.2.2.6 Sauerstoff-Shift-Experimente

Um die Expression der photosynthetischen Gencluster zu induzieren, wird eine aerobe Vorkultur angesetzt und über Nacht inkubiert. Die bewachsene Kultur wird am Folgetag in einen normalen Erlenmeyerkolben überführt und mit RÄ-Medium aufgefüllt, bis der Kolben bis zu 80% gefüllt ist. Nach 60 - 90 Minuten unter ständigem Schütteln bei 140 rpm bei 32°C wird die Kultur auf eine $OD_{660} = 0,2$ verdünnt und entweder unter mikroaeroben oder unter phototropen Bedingungen inkubiert, bis die gewünschte Wachstumsphase erreicht ist.

2.2.2.7 Inaktivierung der thermosensitiven RNase E

Da es sich bei der RNase E um ein essenzielles Enzym handelt, ist eine klassische Deletion nicht zielführend. Die endogene RNase E aus *R. sphaeroides* wird durch das *rne-3071*-Allel

aus *E. coli* N3431 substituiert. Diese RNase E Variante ist unter 32°C funktionsfähig, verliert ihr Funktion jedoch, wenn die Zellen bei 42°C inkubiert werden. Der gewünschte Stamm wird unter mikroaeroben Bedingungen in einem 100-ml Erlenmeyerkolben bis zu einer OD₆₆₀= 0,4 - 0,6 inkubiert. 20 ml der Kulturen werden geerntet, bevor 40 ml der verbleibenden Kultur in ein 50-ml Erlenmeyerkolben überführt, für 20 Minuten bei 42°C und 140 rpm im Dunklen inkubiert und die Zellen im Anschluss geerntet werden.

2.2.2.8 RNA-Stabilitätsassay

Um die Halbwertszeit einer RNA bestimmen zu können, muss die Neusynthese der RNA gestoppt werden. Dies kann durch die Zugabe von Rifampicin erreicht werden. Rifampicin ist ein Antibiotikum, welches die DNA-abhängige RNA-Polymerase von Bakterien hemmt. Die Kulturen werden unter der gewünschten Wachstumsbedingung bis zum Erreichen einer OD₆₆₀= 0,5 inkubiert. Die Zellen werden vor (t= 0) und zu definierten Zeitpunkten nach der Rifampicinzugabe geerntet. Die finale Rifampicinkonzentration beträgt 0,2 mg/ml.

Um die Stabilität der RNA in der RNase E-Mutante untersuchen zu können, wird die Kultur in einem 500-ml Kolben unter mikroaeroben Bedingungen inkubiert, bis sie eine OD₆₆₀= 0,4 - 0,6 erreicht. Vor der Erwärmung der Kultur auf 42°C werden jeweils 40 ml Kultur in einen 50 ml Kolben überführt, damit eine Temperaturerhöhung auf 42°C innerhalb von 5 Minuten in einem Wasserbad gewährleistet werden kann. Nach 5 Minuten Hitzebehandlung wird die Nullprobe geerntet, anschließend den einzelnen Kulturen mit Rifampicin hinzugegeben und die Zellen zu definierten Zeitpunkten auf Eis geerntet. Zur besseren Durchführbarkeit des Experimentes wurden die Kulturen nacheinander in das Wasserbad überführt, auch die Zugabe von 160 µl Rifampicin (55 mg/ml) und das Ernten der Zellen erfolgte nacheinander (Tabelle 17).

Tabelle 17: Übersicht zur Durchführung des RNA-Stabilitätsmessung in der *rne*^{*E.c. ts*}. Eine Stoppuhr wurde gestartet, als die erste Kultur ins Wasserbad überführt wurde.

Zeitpunkte	Temperaturerhöhung auf 42°C	Rifampicinzugabe	Ernten
0 min	0,00 min	-	5,00 min
3 min	0,15 min	5,15 min	8,15 min
6 min	0,30 min	5,30 min	11,30 min
10 min	0,45 min	5,45 min	15,30 min
15 min	1,00 min	6,00 min	21,00 min
20 min	1,15 min	7,15 min	27,15 min

2.2.3 Kultivierung von *E. coli*

Escherichia coli wird im Zuge dieser Arbeit ausschließlich in autoklaviertem Standard I-Medium kultiviert. Benötigte Antibiotika und Chemikalien, die zur Selektion genutzt werden, wurden nach dem Autoklavieren frisch hinzugegeben.

2.2.3.1 Anzucht auf Agarplatte

Zur Herstellung von Agarplatten wird Standard I-Agar (Tabelle 18) genutzt. Das autoklavierte Medium wird auf 50-60°C abgekühlt und benötigte Antibiotika werden in entsprechender Konzentration hinzugefügt. Um Einzelkolonien zu erhalten wird ein Vereinzelausstrich mittels Impföse durchgeführt oder die Zellen mittels Drigalskispattel verteilt. Die Agarplatten werden bei Dunkelheit und 37°C und über Nacht inkubiert.

Tabelle 18: Zusammensetzung für 1 l Standard I-Agar

Komponente	Menge
Standard I Nähragar	25 g
ddH ₂ O	ad 1 l

2.2.3.2 Anzucht in Flüssigkulturen

Escherichia coli wird unter aeroben Bedingungen bei 37°C und 140 rpm im Dunklen über Nacht inkubiert. Dazu werden Erlenmeyerkolben zu 25% und Reagenzgläser mit 5 ml Standard I-Medium (Tabelle 19) befüllt. Zur Selektion benötigte Antibiotika werden frisch zum Medium zugesetzt. Einzelkolonien werden mit einer sterilen Impföse oder mit sterilen 200 µl-Pipettenspitzen in das Flüssigmedium überführt.

Tabelle 19: Zusammensetzung für 1 l Standard I-Medium

Komponente	Menge
Standard I Nährmedium	25 g
ddH ₂ O	ad 1 l

2.2.4 Überproduktion von rekombinanten Proteinen von *Rhodobacter* in *E. coli*

Um die Überproduktion eines gewünschten Fremdproteins in *E. coli* durchführen zu können, wird die korrespondierende Gensequenz in ein Expressionsplasmid eingebracht, welches für *E. coli* geeignet ist. Das Gen steht dabei unter der Kontrolle eines induzierbaren Promoters, wodurch die Genexpression durch Zugabe eines Induktors induziert werden kann. Zur Überproduktion der RNase III wird der Stamm *E. coli* M15 (pREP4/ pQE-30[*Rc rnc*]) und zur Überproduktion von Hfq der Stamm JM 109 (pQE-*Rs hfq*) genutzt. Auf den Plasmiden befinden

sich jeweils ein IPTG-induzierbarer Promoter sowie die Sequenz des *rnc*- beziehungsweise des *hfq*-Gens mit einem 6xHis-Tag und zusätzlich wird eine Resistenz gegen Ampicillin und Kanamycin vermittelt (Conrad *et al.* 1998). Eine Einzelkolonie wird in 20 ml Standard 1-Medium über Nacht bei 37°C und 180 rpm kultiviert. Am nächsten Morgen wird 1 Liter Standard 1-Medium, welches mit Kanamycin und Ampicillin versetzt ist, mit der Übernachtskultur innokuliert. Die Kultur wird bis zum Erreichen einer $OD_{600} = 0,6$ bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Durch die Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1mM im Medium) wird die Expression des Fremdgens induziert. Die Kultur wird erneut für 2 Stunden inkubiert. Im Anschluss wird die Kultur bei 5000 rpm für 20 Minuten abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wird in flüssigen Stickstoff gefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.5 Glycerinkulturen

Um Bakterien langfristig aufbewahren zu können werden Glycerinstocks hergestellt und diese bei -80°C gelagert. Zur Herstellung der Glycerinstocks werden 8 ml einer *R. sphaeroides* bzw. einer 4 ml *E. coli*-Kultur, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befindet, bei 4.000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Bakterienpellet in 1 ml des jeweiligen Mediums resuspendiert, um überschüssiges Antibiotikum zu beseitigen. Nach erneuter Zentrifugation wird der Überstand verworfen, die Zellen in 1 ml Medium aufgenommen, mit 0,5 ml autoklaviertem 80% Glycerin gemischt und in ein Cryovial überführt. Das Cryovial wird sofort in Flüssigstickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt. Zum Animpfen einer Agarplatte, kann die Glycerinkultur in einem Eisblock für kurze Zeit transportiert werden.

2.2.6 Bestimmung der optischen Dichte einer Bakterienkultur

Die optische Dichte wird photometrisch mit einem Spektralphotometer bestimmt. Gemessen wird die Streuung des einfallenden Lichts an den im Medium vorhandenen Partikeln. Die Verringerung der Lichtintensität durch die Streuung wird von einem Detektor erfasst. Die Optische Dichte wird zu Folge des Lambert-Beer'schen Gesetzes errechnet. Zur Messung werden 800 µl einer Bakterienkultur in eine Polysterol-Küvette überführt und gemessen. Uninokuliertes Medium dient als Leerwertkontrolle. *Escherichia coli*-Kulturen werden bei einer Wellenlänge von 600 nm, wohingegen *Rhodobacter*-Kulturen bei 660 nm gemessen werden, da bei dieser Wellenlänge kaum photosynthetische Pigment absorbieren. So kann eine recht exakte Bestimmung der Zellmenge, unabhängig von der Pigmentierung erfolgen.

2.2.7 Vollzellspektren von *R. sphaeroides*

Rhodobacter sphaeroides ist in der Lage verschiedene Pigmente zu synthetisieren, die eine wichtige Rolle während der Photosynthese einnehmen. Diese, an Proteine gebundenen Pigmente, sind in der Lage Licht von verschiedenen Wellenlängen zu absorbieren, wodurch ein für *R. sphaeroides* charakteristisches Absorptionsspektrum entsteht. Zur Bestimmung des Absorptionsspektrums werden 800 µl einer *Rhodobacter*-Kultur, die bis zu einer $OD_{660} = 0,6 - 0,8$ inkubiert wird, in eine Polystyrolküvette überführt und die Absorptionen zwischen den Wellenlängen 300 - 950 nm mit dem SPECORD 50 Spektralphotometer gemessen. Uninokuliertes Medium dient als Leerwertkontrolle. Die erhaltenen Werte werden auf den Wert bei 660 nm normalisiert.

2.2.8 Zellfreie Spektren von *R. sphaeroides*

Für die Herstellung zellfreier Spektren werden 30 ml einer *Rhodobacter*-Kultur, die sich in der späten exponentiellen Wachstumsphase ($OD_{660} = 0,6 - 0,8$) befindet in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen, das zur Hälfte mit Eis gefüllt ist, überführt und 10 min bei 10.000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wird in 1 ml 1x ICM-Puffer (Tabelle 20) gelöst und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Der Zellaufschluss erfolgt durch 3-maliges sonifizieren (jeweils 30 sec, 70% Intensität) auf Eis. Zwischen den einzelnen Sonifizierungsschritten wird jeweils 45 Sekunden pausiert, um einer Überhitzung der Lösung vorzubeugen. Zum Entfernen von Zellbestandteilen wird der Ansatz für 20 min bei 4°C und 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Der Proteingehalt wird mittels Bradford Assay bestimmt (Kapitel 2.4.2). 100 µg Protein werden in 400 µl Gesamtvolumen 1x ICM-Puffer aufgenommen. Die Absorptionsmessung erfolgt zwischen den Wellenlängen 300-950 nm mit einem SPECORD 50 Spektralphotometer. ICM-Puffer dient als Leewertkontrolle.

Tabelle 20: Zusammensetzung 10x ICM-Puffer

Komponente	Menge
250 mM EDTA	2 ml
1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,2	5ml
ddH ₂ O	ad 50 ml

2.2.9 Bestimmung des Bakteriochlorophyll- und Carotinoidgehalts

Zur Bestimmung des Bakteriochlorophyll- und Carotinoidgehalts von *R. sphaeroides* wird Aceton-Methanol-Extraktion durchgeführt. Dazu wird jeweils 1 ml einer Kultur, die sich in der

späten exponentiellen Wachstumsphase ($OD_{660} = 0,6 - 0,8$) befindet, in ein 1,5 ml-Eppendorfgefäß überführt, bei 13000 rpm und 4°C für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wird in 50 μl H_2O resuspendiert, 500 μl Aceton-Methanol-Gemisch (7:2) werden hinzugegeben und der Ansatz für 10 sec gevortext. Zum Entfernen der Zelltrümmer wird der Ansatz für 3 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird in eine Quarzküvette überführt. Die Absorption von Bakteriochlorophyll wird bei einer Wellenlänge von 770 nm und Carotinoide bei einer Wellenlänge von 484 nm im SPECORD 50 Spektralphotometer gemessen. Als Leerwertkontrolle dienen 500 μl Aceton/Methanol-Gemisch. Der Pigmentgehalt wird mit folgenden Formeln, unter Einbeziehung des jeweiligen Extinktionskoeffizienten, ermittelt.

$$\text{Konzentration Bakteriochlorophyll } \mu\text{M} = \frac{\text{Abs}_{770 \text{ nm}} \times 1000 \times V \text{ Aceton:Methanol (ml)}}{76 \times V \text{ Zellen (ml)} \times OD_{660}}$$

$$\text{Konzentration Carotinoide } \mu\text{M} = \frac{\text{Abs}_{484 \text{ nm}} \times 1000 \times V \text{ Aceton:Methanol (ml)}}{128 \times V \text{ Zellen (ml)} \times OD_{660}}$$

V= Volumen

2.2.10 Quantifizierung der Lichtsammelkomplexe I und II

Zur Quantifizierung der Lichtsammelkomplexe I und II von *R. sphaeroides* werden die Zellen unter mikroaeroben oder phototrophen Bedingungen inkubiert bis sie eine $OD_{660} = 0,6$ erreichen. 30 ml der Kultur werden in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen, das zu 50% mit Eis gefüllt ist, überführt und 15 min bei 8.000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wird in 500 μl 1x ICM-Puffer (Tabelle 20) resuspendiert und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Der Zellaufschluss erfolgt durch 3-maliger Sonifikation (30 sec, 70% Intensität) auf Eis. Um eine Überhitzung der Probe zu vermeiden wird zwischen den einzelnen Sonifikationzyklen 45 Sekunden pausiert. Zelltrümmer werden durch eine Zentrifugation bei 4°C , 20 min und 13.000 rpm entfernt. Der Überstand wird in ein frisches 1,5 ml- Reaktionsgefäß überführt und die Proteinkonzentration mittels Bradford Assay (Kapitel 2.4.2) bestimmt. 300 μl der Zelllösung werden mit 600 μl 1x ICM-Puffer gemischt, in eine Polystyrolküvette überführt und bei 820, 849, 878 und 900 nm im SPECORD 50 Spektralphotometer gemessen, wobei 1x ICM-Puffer als Leerwertkontrolle genutzt wird. Der Gehalt der Lichtsammelkomplexe wird mit folgenden Formeln ermittelt.

$$\text{Menge Lichtsammelkomplex I nmol/ mg Protein} = \frac{(73 \times (\text{Abs}_{878 \text{ nm}} - \text{Abs}_{820 \text{ nm}})/2)}{\text{mg eingesetztes Protein}}$$

$$\text{Menge Lichtsammelkomplex II nmol/ mg Protein} = \frac{(96 \times (\text{Abs}_{849 \text{ nm}} - \text{Abs}_{900 \text{ nm}})/3)}{\text{mg eingesetztes Protein}}$$

2.2.11 Herstellen elektrokompenter Zellen

Zum Herstellen von elektrokompenten Zellen wird der benötigte *E. coli*-Stamm auf eine Standard1-Agarplatte ohne Antibiotikum mittels Impföse aus einer Glycerinkultur ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am folgenden Abend wird eine Einzelkolonie in 10 ml Standard1-Medium überführt und bei 37°C und 180 rpm über Nacht inkubiert. Diese Vorkultur wird am nächsten Morgen in einen 2 l-Kolben, der zu 50% mit frischem Standard1-Medium gefüllt ist, gegeben und bei 37°C und 180 rpm inkubiert, bis eine OD₆₀₀ = 0,8 erreicht ist. Die Zellen werden 30 min auf Eis gekühlt und anschließend bei 5000 rpm und 4°C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 1 l kaltem destilliertem Wasser resuspendiert und die Zentrifugation wiederholt. Der Überstand wird erneut verworfen und das Zellpellet in 0,5 l kaltem destillierten Wasser gelöst und die Zentrifugation erneut wiederholt. Der Überstand wird erneut verworfen, die Zellen werden in 20 ml 10% kaltem Glycerol gelöst und die Zentrifugation wird ein letztes Mal wiederholt. Der Überstand wird verworfen und die Zellen werden in einem finalen Volumen von 3 ml 10% Glycerol aufgenommen. Jeweils 60 µl werden in 1,5 ml-Reaktionsgefäße aliquotiert und in flüssigem Stickstoff gefroren. Die Zellen können bei -80°C für mindestens 6 Monate gelagert werden.

2.2.12 Elektroporation von *E. coli*

Um ein Fremdplasmid in *E. coli* zu integrieren, werden elektrokompente *E. coli*-Zellen genutzt und eine Elektroporation durchgeführt. Dazu werden die bei -80°C gelagerten elektrokompenten *E. coli*-Zellen für 5 min auf Eis aufgetaut. Für eine Elektroporation werden 2 µl eines aufgereinigten Plasmids eingesetzt. Bei Ligationsprodukten werden 2 µl ungefällte Ligation beziehungsweise 10 µl gefällte Ligation (Kapitel 2.3.6) eingesetzt. Das Zell-DNA-Gemisch wird in eine Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation erfolgt bei 2.5kV. Die elektroporierten Zellen werden in 400 µl Standard1-Medium aufgenommen und bei 37°C und 180 rpm für 1 h inkubiert. Im Anschluss werden verschiedene Verdünnungen auf Standard1-Agarplatten mit dem gewünschten Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.13 Konjugation von *R. sphaeroides*

Genetische Manipulationen an *R. sphaeroides* werden mittels bakterieller Konjugation (horizontaler Gentransfer) durchgeführt, da die klassischen Transformationsmethoden nicht effizient sind. Für diese Arbeit wird ausschließlich die diparentale Konjugation genutzt. Dazu wird ein Plasmid, welches in *Rhodobacter* eingebracht werden soll, in den *E. coli* S17-1-Stamm durch Elektroporation transformiert. Auf dem eingebrachten Plasmid liegen unter anderem die *mob*-Gene, die für die Konjugation essenziell sind. Die *mob*-Proteine führen zu einem gezielten Doppelstrangbruch des Plasmids am *origin of transfer* (*oriT*) und initiieren den einzelsträngigen-Transfer des Plasmid in die Empfängerzelle. Der dazu nötige direkte Zell-Zellkontakt zwischen Donor- und Empfängerzelle wird durch F-Pili und andere Oberflächenproteine ermöglicht, die von den *tra*-Genen codiert werden. Der genutzte *E. coli*-Stamm S17-1 hat die sogenannten *tra*-Gene in seinem Chromosom integriert. Für die diparentale Konjugation wird 1 ml der gewünschten *R. sphaeroides*-Kultur, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befindet, in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und bei 4000 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 500 µl frischem RÄ-Medium resuspendiert und mit 200 µl frischer *E. coli*-Kultur versetzt. Die Zellen werden erneut bei 4000 rpm für 5 min zentrifugiert und das Pellet nach Abnehmen des Überstandes in 100 µl frischem RÄ-Medium gelöst. Die Zellen werden vorsichtig auf einen Membranfilter pipettiert, der auf einer PY-Agarplatte liegt (Tabelle 21). Die Zellen werden über Nacht bei 32°C inkubiert. Am nächsten Tag wird das Filterplättchen in ein 2 ml-Eppendorfgefäß überführt, welches 1 ml RÄ-Medium enthält. Die Zellen werden vorsichtig vom Filterplättchen gelöst und in verschiedenen Verdünnungsstufen auf RÄ-Agarplatten ausplattiert, die das benötigte Antibiotikum zur Selektion beinhalten. Die Platten werden bei 32°C im Dunklen inkubiert, bis Einzelkolonien auf den Platten gewachsen sind.

Tabelle 21: Zusammensetzung für 1 l PY-Medium

Komponente	Menge
Pepton	10 g [1%]
Hefeextrakt	0,5 g [0,5%]
1 M Calciumchlorid	2 ml [2 mM]
1 M Magnesiumchlorid	2 ml [2 mM]
0,5% Eisensulfat	2,4 ml [0,0012 mM]
ddH ₂ O	ad 800 ml
	pH 7,0 einstellen
ddH ₂ O	ad 1 l
Bacto Agar	8 g [1,6% w/v]

2.2.14 Bestimmung der Überlebenszahl

Um zu untersuchen, wie sich verschiedene Chemikalien und der damit verbundene Zellstress auf das Überleben von *R. sphaeroides* auswirkt, wird die Überlebenszahl ermittelt. Dazu werden die zu untersuchenden Stämme unter mikroaeroben Bedingungen kultiviert, bis eine $OD_{660} = 0,5$ erreicht ist. Die zu testenden Chemikalien werden in gewünschter Konzentration zu der Flüssigkultur gegeben und eine Stunde bei der benötigten Temperatur inkubiert. 100 μ l verschiedener Verdünnungen werden auf supplementierten RÄ-Agarplatten ausplattiert und die Agarplatten bei 32°C für 2 - 4 Tage im Dunklen inkubiert. Die Kolonienzahl einer unbehandelten Kultur dient als Kontrolle und wird als 100% festgelegt. Die Koloniezahlen der behandelten Kulturen werden auf die Kontrolle normalisiert und somit die Überlebensrate in Prozent ermittelt.

2.2.15 Hemmhofstest

Eine weitere Methode, um den Einfluss von verschiedenen Stressoren auf das Wachstum von *R. sphaeroides* zu untersuchen, ist die Bestimmung des Hemmhofs. Dabei wird der Stressor direkt auf die Agarplatte gegeben und verhindert so das Wachstum der Bakterien, wodurch ein Hemmhof um den Stressor herum entsteht. Je größer der Bakterienhemmhof ist, desto sensitiver reagieren die Bakterien auf den getesteten Stressor. Dazu werden je 15 ml supplementierter RÄ-Agar in Petrischalen gegeben und zum Aushärten bei Raumtemperatur inkubiert. Die zu untersuchenden Kulturen unter mikroaeroben Bedingungen kultiviert, bis die exponentielle Wachstumsphase erreicht ist. 800 μ l einer Kultur mit $OD_{660} = 0,4$ (wenn die OD abweicht muss das Volumen angepasst werden) werden mit 20 ml warmen supplementiertem Softagar (1:2 RÄ-Agar/RÄ-Flüssigmedium) gemischt und jeweils 5 ml auf die bereits vorher gegossenen 15 ml RÄ-Agarplatten verteilt. Mit einem Locher werden 0,5 mm große Whatman-Papierkreise ausgestanzt und im UV-Linker sterilisiert. 5 μ l der zu testenden Substanz werden in benötigter Konzentration auf den Filter gegeben und dieser mittig auf die ausgehärtete Agarplatte gelegt. Die Platten werden bei 32°C für 2 - 4 Tage in Dunkelheit inkubiert. Zur Untersuchung von photooxidativem Stress mittels Methylenblau werden die Platten zusätzlich mit 20 W/m² bei 32°C bestrahlt. Nach Inkubation wird der Durchmesser des Hemmhofs ausgemessen.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Isolation von DNA

2.3.1.1 Isolation von genomischer DNA aus *R. sphaeroides*

Chromosomale DNA aus *R. sphaeroides* wird vor allem als *template* für die Amplifikation von Zielsequenzen mittels PCR (Kapitel 2.3.2) benötigt. Zur Gewinnung von chromosomaler DNA aus *R. sphaeroides* werden 10 ml einer exponentiell gewachsenen Kultur bei 8.000 rpm, 10 min und 4°C geerntet. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet in 700 µl TE-Puffer (Tabelle 22) resuspendiert, dem 1 mg/ml Lysozym frisch hinzugegeben werden. Der Ansatz wird in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss werden 30 µl 10% SDS (Tabelle 23) und 16 µl Proteinase K (20 mg/ml) hinzugegeben und der Ansatz wird für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend werden 133 µl 5M NaCl-Lösung (Tabelle 25) und 110 µl 10% CTAB-Reagenz, welches in 0,7 M NaCl-Lösung gelöst wird (Tabelle 24), hinzugegeben und der Ansatz wird 10 min bei 65°C inkubiert. Im Anschluss wird 1 ml Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) dem Ansatz hinzugegeben, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und im Anschluss bei 13.000 rpm für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wird in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und mit 0,6 Volumenteilen Isopropanol versetzt. Zur Fällung der chromosomalen DNA wird der Ansatz für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 5.000 rpm für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig verworfen und das DNA-Pellet mit 200 µl 70% Ethanol gewaschen und die Zentrifugation wiederholt. Der Überstand wird erneut verworfen, das Zellpellet in der Speedvac für 7 min getrocknet und in 50 µl TE-Puffer aufgenommen. Die chromosomale DNA wird bei 4°C gelagert.

Tabelle 22: Zusammensetzung für TE-Puffer

Komponente	Menge
1 M Tris-HCl pH 8,0	1 ml [10 mM]
EDTA	0,04 g [1 mM]
ddH ₂ O	ad 100 ml

Tabelle 23: Zusammensetzung für 10% SDS-Lösung

Komponente	Menge
Natriumdodecylsulfat	100 g [10%]
ddH ₂ O	ad 1 l

Tabelle 24: Zusammensetzung für 10% CTAB in 0,7 M NaCl (w/v)

Komponente	Menge
Natriumchlorid	4,1 g [0,7 M]
Cetremoniumchlorid	10 g [10%]
ddH ₂ O	ad 100 ml
Bis zur Lösung unter rühren auf 65°C erhitzen	

Tabelle 25: Zusammensetzung für 5 M NaCl-Lösung

Komponente	Menge
Natriumchlorid	29,2 g [5 M]
ddH ₂ O	ad 100 ml

2.3.1.2 Plasmidisolation aus *E. coli* und *R. sphaeroides*

Zur Gewinnung von Plasmid-DNA aus *E. coli* und *R. sphaeroides* wird die alkalische Lyse genutzt. Dazu werden 2 ml einer *E. coli* Kultur, die sich in der stationären Wachstumsphase befindet, bzw. 8 ml einer *Rhodobacter* Kultur, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befindet, verwendet. Die Zellen werden bei 8.000 rpm für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wird in 100 µl Mini Prep Lösung I (Tabelle 26) resuspendiert und im Anschluss mit 200 µl Mini Prep Lösung II (Tabelle 27) versetzt und 6-mal invertiert. Zur Zelllyse wird der Ansatz bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert. Anschließend werden 150 µl Mini Prep Lösung III (Tabelle 28) hinzugegeben. Der Ansatz wird durch invertieren gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Durch 10 min Zentrifugation bei 4°C und 13.000 rpm werden Zellbestandteile abzentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und die Zentrifugation wiederholt. Der Überstand wird erneut in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und mit 1 ml kaltem 96% Ethanol vermischt. Die Fällung der Plasmid-DNA erfolgt für 30 min bei 13.000 rpm und Raumtemperatur. Im Anschluss an die Fällung wird der Überstand verworfen, das DNA-Pellet mit 200 µl 70% Ethanol gewaschen und erneut für 5 min bei 13.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet in der Speedvac für 7 min getrocknet und anschließend in 50 µl Roth-Wasser aufgenommen. Die Plasmid-DNA wird bei -20°C gelagert.

Tabelle 26: Zusammensetzung für Mini Prep Lösung I

Komponente	Menge
Glukose	0,9 g [50 mM]
1M Tris pH 8,0	2,5 ml [25 mM]
0,5 M EDTA	2 ml [10 mM]
ddH ₂ O	ad 100 ml
	Autoklavieren und bei 4°C lagern
	Zugabe von 4 µl/ml RNase A (100 mg/ml)

Tabelle 27: Zusammensetzung für Mini Prep Lösung II

Komponente	Menge
1 N NaOH	4 ml [0,2 N]
10% SDS	2 ml [1%]
ddH ₂ O	ad 20 ml
	Bei Raumtemperatur für 3 Wochen lagern

Tabelle 28: Zusammensetzung für Mini Prep Lösung III

Komponente	Menge
Kaliumacetat	29,4 g [3M]
Eisessig	Einstellen auf pH 5,6
ddH ₂ O	ad 100 ml
	Autoklavieren und bei 4°C lagern

2.3.1.3 Plasmid isolation von *E. coli* und *R. sphaeroides* mittels Kit

Zur Isolation von Plasmid-DNA, die im Anschluss sequenziert oder für weitere molekularbiologische Methoden genutzt wird, wird das NucleoSpin® Plasmid EasyPure von Macherey-Nagel nach Angaben des Herstellers genutzt.

2.3.2 Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels Polymerase-Kettenreaktion

Zur Vervielfältigung von DNA-Fragmenten wird die Polymerase-Kettenreaktion genutzt, der folgendes Prinzip zu Grunde liegt: Die *template* DNA wird zu Beginn bei 95 - 98°C aufgeschmolzen. Während des Abkühlens lagern sich die Primer an ihre komplementäre Zielsequenz der denaturierten DNA an und das Polymerase-Enzym elongiert das neu entstehende DNA-Fragment, indem das jeweilige Nukleotid an das 3'-Ende des Primers angehängt wird. In dieser Arbeit wurden die Taq- und die Phusion-Polymerase genutzt. Die Taq-Polymerase erzeugt *sticky ends* wohingegen Phusion-Polymerase *blunt ends* produziert. Die Phusionpolymerase zeichnet sich durch ihre *proof-reading* Eigenschaft aus und wird daher zu Klonierungszwecken genutzt.

Tabelle 29: Ansatz für eine Polymerase-Kettenreaktion mit der *Taq*-Polymerase

Komponente	Menge
10x Taq-Puffer	1 μ l
dNTS (10 mM)	0,4 μ l
Primer <i>forward</i> (10 μ M)	0,6 μ l
Primer <i>reverse</i> (10 μ M)	0,6 μ l
DNA- <i>Template</i> (100 ng/ μ l)	1 μ l
<i>Taq</i> -Polymerase (1U/ μ l)	0,2 μ l
Roth-H ₂ O	<i>ad</i> 10 μ l

Tabelle 30: Ansatz für eine Polymerrase-Kettenreaktion mit der Phusion-Polymerase

Komponente	Menge
5x GC-Puffer	2 μ l
dNTS (10 mM)	0,2 μ l
Primer <i>forward</i> (10 μ M)	0,5 μ l
Primer <i>reverse</i> (10 μ M)	0,5 μ l
DNA- <i>Template</i> (100 ng/ μ l)	0,6 μ l
Phusion-Polymerase (2U/ μ l)	0,1 μ l
Roth-H ₂ O	<i>ad</i> 10 μ l

Tabelle 31: Temperaturschema für eine Standard Taq-PCR

	Temperatur	Zeit	
Initiale Denaturierung	95°C	3 min	
Denaturierung	95°C	30 sec	} 35 Zyklen
Annealing	T _M -5°C	30 sec	
Elongation	72°C	1 kb/min	
Finale Elongation	72°C	5 min	
	T _M : Primer-spezifische Schmelztemperatur		

Tabelle 32: Temperaturschema für eine Standard Phusion-PCR

	Temperatur	Zeit	
Initiale Denaturierung	98°C	30 sec	
Denaturierung	98°C	10 sec	} 35 Zyklen
Annealing	T _M	20 sec	
Elongation	72°C	2 kb/min	
Finale Elongation	72°C	5 min	
	T _M : Primer-spezifische Schmelztemperatur		

2.3.3 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Zur Quantifizierung von Nukleinsäuren wird eine Absorptionsmessung bei 260 nm mittels NanoDrop durchgeführt. Eine Absorption von 1 bei 260 nm entspricht einer Konzentration von

50 ng/μl doppelsträngiger DNA beziehungsweise von 40 ng/μl RNA. Das Verhältnis der Absorption der Wellenlänge 260 nm (Nukleinsäuren) zu 280 nm (Proteine) gibt Aufschluss über die Reinheit bzw. Proteinverunreinigung der Nukleinsäure. Bei reiner DNA liegt das Verhältnis bei 1,8 während es bei reiner RNA bei 2,0 liegt.

2.3.4 Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren

Die Agarosegelelektrophorese wird genutzt um Nukleinsäure-Fragmente ihrer Länge nach aufzutrennen. Die an das Agarosegel angelegte Spannung führt dazu, dass Nukleinsäuren durch ihr negativ-geladenes Phosphatrückgrat zur Anode migrieren. Dabei migrieren kürzere Fragmente schneller durch die Quervernetzungen der Agarose als längere.

Für Fragmente von 1-20 kb werden 1% TAE-Gele (w/v) verwendet wohingegen kürze Fragmente durch 2% TBE-Gele (w/v) auftrennt werden. Zur Herstellung der Gele wird die benötigte Menge Agarose abgewogen, in der entsprechenden Menge Puffer (Tabelle 33 beziehungsweise Tabelle 34) gelöst und erhitzt, bis die Agarose komplett aufgeschmolzen ist. Die auf 50°C abgekühlte Agarose wird vorsichtig in den Gelschlitten gegossen und ein Kamm eingesetzt, der die Geltaschen formt. Nach Aushärtung der Agarose wird der Kamm entfernt und das Gel in eine Gelkammer überführt, die mit dem entsprechenden 1x Laufpuffer gefüllt ist. Die DNA Proben werden vor dem Lauf mit 0,1 Volumen 10x DNA-Ladepuffer (Tabelle 35) versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Als Größenstandard wird 1 kb DNA Ladder genutzt. Der Gellauf findet bei 120 V für 30 - 45 min statt. Im Anschluss wird das Gel in Ethidiumbromid gefärbt. Das unter UV-Licht fluoreszierende Ethidiumbromid interkaliert in Doppelsträngige Nukleinsäuren, sodass diese detektiert werden können.

Tabelle 33: Zusammensetzung für 10x TAE-Puffer

Komponente	Menge
Tris	48,4 g [0,4 M]
Eisessig	11,4 ml [0,2 M]
EDTA Dinatriumsalz	3,7 g [0,01 M]
ddH ₂ O	ad 1 l

Tabelle 34: Zusammensetzung für 10x TBE-Puffer

Komponente	Menge
Tris	121,1 g [1 M]
Borsäure	61,8 g [1 M]
EDTA Dinatriumsalz	7,4 g [0,02 M]
ddH ₂ O	ad 1 l

Tabelle 35: Zusammensetzung für 10x DNA-Ladepuffer

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

2.3.4.1 DNA-Aufreinigung aus Agarosegelen

Um DNA-Fragmente, wie PCR-Produkte oder Restriktionsfragmente, für weitere Reaktionen nutzen zu können, müssen sie nach der Gelelektrophorese aus dem Agarosegel aufgereinigt werden. Dazu wird das benötigte Fragment unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten und das Agarosestück in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt. Zur Aufreinigung wird das *InnuPREP DOUBLEpure* Kit nach Anweisungen des Herstellers genutzt.

2.3.4.2 Polyacrylamidgelelektrophorese von RNA

Bei der Polyacrylamidgelelektrophorese wird RNA ihrer Länge nach aufgetrennt. Die Methode wird genutzt, um die Qualität von RNA zu überprüfen. Dazu wird ein Urea-Polyacrylamidgel, wie in Kapitel 2.3.10.1 beschrieben, gegossen und 1 - 2 µg RNA auf das Gel geladen. Das Gel kann im Anschluss des Gellaufs mit Ethidiumbromid gefärbt und die RNA visualisiert werden.

2.3.5 Restriktion von DNA

Die Restriktion wird zur Analyse von Plasmiden oder zu Klonierungszwecken verwendet. Für Standard-Enzyme werden die vom Hersteller angegebenen Reaktionspuffer verwendet. Bei der Nutzung von FastDigest-Enzymen wird nach Angaben des Herstellers gearbeitet und die Enzyme nach der Inkubationszeit Hitze-inaktiviert.

Für die analytische Restriktion werden 300 - 500 ng (Tabelle 36), für die präparative Restriktion 1,5 µg (Tabelle 37) des Plasmids eingesetzt und bei der optimalen Temperatur des Enzyms für 1 h beziehungsweise 3 h inkubiert.

Tabelle 36: Ansatz für eine analytische Restriktion mit Standard-Enzymen

Komponente	Menge
10x Restriktionspuffer	1 µl
Plasmid	500 ng
Restriktionsenzym (10 U/µl)	0,2 µl
Roth-H ₂ O	ad 10 µl

Tabelle 37: Ansatz für eine präparative Restriktion mit Standard-Enzymen

Komponente	Menge
10x Restriktionspuffer	5 µl
Plasmid	1,5 µg
Restriktionsenzym (10 U/µl)	2 µl
Roth-H ₂ O	ad 50 µl

2.3.6 Ligation von DNA

Um zwei DNA-Fragmente miteinander zu verbinden wird die T4-Liase verwendet. Diese katalysiert unter Verbrauch von ATP die Bildung von Phosphodiester von 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylenden der DNA. PCR-Produkte weisen je nach verwendeter Polymerase *blunt ends* (Phusion) oder *sticky ends* (Taq) auf und können nur in die korrespondierenden Vektorsysteme ligiert werden. PCR-Produkte, die mit der Taq-Polymerase amplifiziert werden, können in den linearisierten pDrive-Vektor ligiert werden, wohingegen PCR-Produkte, die mit der Phusion-Polymerase amplifiziert werden, in den pJET1/2 ligiert werden können. Die Ligationen werden nach Herstellerangaben durchgeführt. Für ein DNA-Fragment, das nach einer Restriktion in einen ebenfalls geschnittenen Vektor ligiert werden soll, wird ein molares Verhältnis von Vektor zu Insert von 1:3, unter Berücksichtigung folgender Formel, gewählt.

$$\text{Menge Insert ng} = \frac{\text{Menge Vektor (ng)} \times \text{Größe Insert (bp)}}{\text{Größe Vektor (bp)}} \times 3$$

Dabei ist darauf zu achten, dass die Menge an Vektor-DNA 50 - 100 ng beträgt. Der Ligationsansatz wird für 14 h bei 16°C inkubiert und die Ligase in Anschluss bei 70°C für 10 min inaktiviert. Die Ligation kann im Anschluss durch eine n-Butanol-Fällung aufgereinigt oder direkt in elektrokompetente *E. coli*-Zellen transformiert werden.

Tabelle 38: Ansatz für die Ligation von zwei DNA-Produkten

Komponente	Menge
Restringierter Vektor	50-100 ng
Insert	X ng
10x Ligase-Puffer	2 µl
Ligase (5 U/µl)	1 µl
Roth-H ₂ O	ad 20 µl

2.3.7 n-Butanol-Fällung

Um den Ligationsansatz nach Abstoppen der Reaktion von überschüssigen Salzen zu befreien und das Gesamtvolumen zu verringern wird eine n-Butanol-Fällung durchgeführt. Der Ligationsansatz wird mit Roth-Wasser auf ein Gesamtvolumen von 50 µl aufgefüllt, mit 500 µl

n-Butanol gemischt und für 30 min bei 4°C und 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet mit 200 µl 75% Ethanol gewaschen und erneut für 5 min bei 4°C, 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abgenommen, das Pellet in der Speedvac für 7 min getrocknet und in 10 µl Roth-Wasser aufgenommen.

2.3.8 Isolierung von RNA

Zur Gewinnung von Gesamt-RNA aus Bakterienzellen werden zwei Methoden genutzt, die verschiedene Vor- und Nachteile besitzen. Bei der Isolation durch *hot phenol* kann es zur Kontamination von DNA und Phenolresten in der RNA kommen. Da bei der Trizol-Aufreinigung die Kontamination verringert sind, wird diese Methode genutzt, wenn die isolierte RNA anschließend für eine qRT-PCR eingesetzt wird. Jedoch konnte gezeigt werden, dass längere RNA-Spezies während dieser Methode abgereichert werden.

2.3.8.1 Aufreinigung von RNA mittels *hot phenol*

20 ml der benötigten Zellen werden in 50 ml-Zentrifugenröhrchen, die zur Hälfte mit Eis gefüllt sind, überführt und 10 min bei 10.000 rpm, 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet in kaltem RÄ-Medium resuspendiert, in ein 1,5 ml-*Safe-lock* Reaktionsgefäß überführt und im Anschluss nochmals für 10 min bei 10000 rpm und 4°C zentrifugiert. Zur Isolation mittel *hot phenol* wird das Zellpellet in 200 µl Resuspensionslösung (Tabelle 39) gelöst, anschließend 200 µl Lysispuffer (Tabelle 40) hinzugegeben und durch pipettieren vermischt. Die Zelllyse wird bei 65°C für 90 sec durchgeführt, dem Ansatz werden 400 µl auf 65°C erwärmtes Phenol-Wasser hinzugefügt und durch vortexen vermischt. Der Ansatz wird für 3 min bei 65°C inkubiert, im Anschluss in Flüssigstickstoff für mindestens 30 sec gefroren und für 10 min bei 13.000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Dadurch entstehen zwei Phasen, da Phenol und Wasser nicht mischbar sind. In der unteren organischen Phase des Phenols befinden sich denaturierte Proteine, während die RNA in der wässrigen Phase verbleibt. In der Interphase befinden sich zum Teil denaturierte Proteine und DNA. Die obere, wässrige Phase wird nach der Zentrifugation in ein neues 1,5 ml-*Safe-lock* Reaktionsgefäß überführt und die Schritte ab der Phenolzugabe noch zwei weitere Male wiederholt. Dem wässrigen Überstand werden im Anschluss 400 µl Chloroform : Isoamylalkohol (24:1) hinzugegeben, der Ansatz wird durch vortexen gemischt und bei 13.000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der wässrige Überstand wird in ein frisches 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und mit 2,5-fachen Volumen kaltem 96% Ethanol und 0,1-fachem Volumen 3M Natriumacetat pH 4,5 (Tabelle 41) vermischt. Der Ansatz wird entweder über Nacht bei -20°C oder für 3 min in flüssigem Stickstoff gefroren, bevor er für 30 min bei 13.000 rpm und 4°C gefällt wird. Der

Überstand wird vorsichtig abgenommen und das RNA-Pellet mit 200 µl 75% kaltem Ethanol gewaschen. Der Ansatz wird erneut für 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen. Die RNA wird in der Speedvac für 7 min getrocknet und im Anschluss wird das Pellet in 50 µl Roth-Wasser aufgenommen und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

Tabelle 39: Zusammensetzung für *hot phenol* Resuspensionspuffer

Komponente	Menge
Saccharose	8,22 g [0,3 M]
3 M Natriumacetat pH 4,5	270 µl [0,01 M]
ddH ₂ O	ad 80 ml

Tabelle 40: Zusammensetzung für *hot phenol* Lysispuffer

Komponente	Menge
20 % SDS-Lösung	8 ml [2%]
3 M Natriumacetat pH 4,5	270 µl [0,01 M]
ddH ₂ O	ad 80 ml

Tabelle 41: Zusammensetzung für 3 M Natriumacetat-Lösung pH 4,5

Komponente	Menge
Natriumacetat	24,6 g [0,01 M]
ddH ₂ O	ad 100 ml

2.3.8.2 Aufreinigung von RNA mittels Trizol

20 ml der benötigten Zellen werden in 50 ml-Zentrifugenröhrchen, die zur Hälfte mit Eis gefüllt sind, überführt und 10 min bei 10.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet in kaltem RÄ-Medium resuspendiert, in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und im Anschluss nochmals für 10 min bei 10.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wird in 1 ml peqGOLD TriFast resuspendiert und für 5 min auf Eis inkubiert. 200 µl Chloroform werden hinzugegeben, der Ansatz durch vortexen vermischt und für 15 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wird der Ansatz bei 13.000 rpm für 15 min bei 4°C zentrifugiert, die obere, wässrige Phase in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und 1 Volumenteil kaltes Isopropanol hinzugegeben. Die Fällung geschieht bei 20 min bei -20°C und anschließender Zentrifugation für 15 min bei 13.000 rpm, 4°C. Der Überstand wird verworfen, das RNA-Pellet mit 200 µl 70% Ethanol gewaschen und erneut bei 13.000 rpm für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird erneut verworfen und die verbleibende RNA in der

Speedvac für 7 min getrocknet. Die RNA wird in 50 µl Roth-Wasser aufgenommen und bei -20°C gelagert.

2.3.9 DNase-Verdau

Um störende DNA-Verunreinigungen aus RNA-Proben zu entfernen, die im Anschluss für eine qRT-PCR oder ein 5'/3'-RACE genutzt werden, wobei verbleibende DNA-Fragmente zu einem falschen Ergebnis führen könnten, wird die TURBO-DNase (Thermo Scientific) verwendet. Der Reaktionsansatz (Tabelle 42) wird für 30 - 60 min bei 37°C inkubiert. Im Anschluss werden 5 µl Stopp-Reagenz zum Ansatz hinzugegeben, dieser für weitere 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und für 3 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. 45 µl des Überstands werden in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, mit Roth-Wasser auf ein Gesamtvolumen von 200 µl aufgefüllt und mit 2,5-fachem Volumen 96% Ethanol und 0,1-fachem Volumen 3M Natriumacetat (pH 4,5) vermischt. Die Proben werden über Nacht bei -20°C gelagert. Die Fällung der RNA-Proben erfolgt für 30 min bei 13.000 rpm und 4°C. Der Überstand wird verworfen und das Pellet mit 200 µl 75% Ethanol gewaschen. Der Ansatz wird für 5 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand erneut verworfen. Das Pellet wird in der Speedvac für 7 min getrocknet, in 20 µl Roth-Wasser aufgenommen und bei -20°C gelagert.

Tabelle 42: Ansatz für die Entfernung von DNA aus RNA-Proben

Komponente	Menge
RNA	10 µg
10x DNase-Puffer	5 µl
Turbo-DNase (2U/µl)	1 µl
ddH ₂ O	ad 50 µl
	Bei 37°C für 1 h inkubieren
Stopp-Reagenz	5 µl

2.3.10 Detektion von Ribonukleinsäuren mittel Northern Blot Analyse

In dieser Arbeit werden Northern Blot Analysen zur Detektion verschiedener RNAs genutzt. Die RNA wird dabei elektrophoretisch aufgetrennt, im Anschluss auf eine Membran übertragen und durch komplementäre radioaktiv-markierte Sonden detektiert. sRNAs bis zu einer Größe von 500 nt werden über Urea-Polyacrylamidgelen aufgetrennt wohingegen mRNAs über Formaldehyd-Agarosegelen aufgetrennt werden.

2.3.10.1 Northern Blot Analyse mittels Urea-Polyacrylamidgel

Die 10%-Polyacrylamid-Gelmischung (Tabelle 43) wird zwischen eine quadratische und eine Ohrenplatte gegossen, die durch drei 1mm dicke Spacer und Klammern miteinander verbunden sind und mit 1% Agarose abgedichtet werden. Die Geltaschen entstehen durch Einstecken eines

Kammes in das gegossene Gel. Nach auspolymerisieren des Gels werden der Kamm und der untere Spacer entfernt und das Gel in eine vertikale Gelkammer eingespannt und diese mit 1x TBE-Laufpuffer (Tabelle 34) befüllt. Jeweils 10 µg der zu testenden RNA werden in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und mit 0,7-fachem Volumenanteil FU-Mix (Tabelle 44) gemischt. Da Sekundärstrukturen das Laufverhalten der RNA verändern können, wird die RNA bei 10 min, 65°C denaturiert und im Anschluss auf das Gel geladen. Der Gellauf wird bei 400 V für ca. 3 h durchgeführt und abgestoppt, wenn die Bromphenolblau-Lauffront aus dem Gel ausläuft. Die RNA wird durch einen Semidry Blot auf die Membran übertragen. Dazu werden 6 Whatman Papiere und eine Nylonmembran auf die Größe des Gels zugeschnitten und mit 1x TBE-Puffer befeuchtet. 3 Whatman Papiere werden übereinandergestapelt und auf die Anodenplatte des Blotters gelegt. Auf die Papiere wird die Membran und darauf das zurecht geschnittene Gel gelegt. Auf das Gel werden erneut 3 gestapelte Whatman Papiere gelegt und die Kathodenplatte des Semidry Blotters an der Anodenplatte befestigt. Der Transfer der RNA vom Gel auf die Membran erfolgt für 2,5 h bei 150 mA. Im Anschluss wird die RNA durch 2-maliges *cross linken* durch UV-Licht an die Membran gebunden.

Tabelle 43: Zusammensetzung für ein 10% Urea-Polyacrylamidgel

Komponente	Menge
Harnstoff	16,8 g [7 M]
Polyacrylamid (40%)	10 ml [10%]
10x TBE-Puffer	4 ml [1x]
Roth-H ₂ O	ad 40 ml
	Inkubation bei 37°C bis zu Lösung des Harnstoffs
10% APS	120 µl
TEMED	20 µl

Tabelle 44: Zusammensetzung für FU-Mix

Komponente	Menge
Harnstoff	3,6g [6M]
Deionisiertes Formamid	8 ml [80%]
10x TBE-Puffer	1 ml [10%]
Bromphenolblau	10 mg [0,1%]
Xylencyanol	10 mg [0,1%]
Roth-H ₂ O	ad 10 ml

2.3.10.2 Northern Blot Analyse mittels Formaldehyd-Agarosegel

Die Gelkammer, der Gelschlitten und der Taschenkamm werden einmal mit 1M NaOH und im Anschluss zweimal mit DEPC-Wasser gespült um RNase-Kontaminationen zu beseitigen. Die Gelmischung (Tabelle 45) wird in einen abgeklebten Gelschlitten gegossen. Die Taschen werden durch einen Kamm geformt, der in die flüssige Gelmischung gesteckt wird. Nach Aushärten des Gels werden der Kamm und die Klebestreifen entfernt, das Gel samt Gelschlitten in die Gelkammer gestellt und diese mit 1x MOPS-Puffer (Tabelle 46) aufgefüllt. Jeweils 10 µg der zu testenden RNA werden in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und in der Speedvac getrocknet. Das RNA-Pellet wird in 9 µl RNA-Probenpuffer (Tabelle 48) aufgenommen und für 10 min bei 65°C erhitzt, um die Sekundärstrukturen der RNA zu denaturieren. Im Anschluss werden die Proben mit 1 µl RNA-Ladepuffer (Tabelle 49) versetzt und auf das Gel geladen, wobei beachtet werden muss, dass die erste und die letzte Geltasche freizulassen sind. Der Gellauf wird für 3 h bei 120 V durchgeführt bis die Bromphenolblau-Lauffront ca. 10-12 cm weit gelaufen ist. Sobald die Proben in das Gel eingelaufen sind, wird die Peristaltische Pumpe gestartet, die den Puffer gleichmäßig in der Gelkammer verteilt. Nach dem Gellauf wird das Gel für 30 min in Denaturierungspuffer (Tabelle 50) und im Anschluss erneut für 30 min in Neutralisationspuffer (Tabelle 51) geschwenkt. Um die RNA auf die Membran zu übertragen, wird ein Vakuumblotter verwendet. Dazu wird ein Whatman Papier, das etwas größer als die Maske des Blotter zurechtgeschnitten, auf die poröse Platte des Blotters gelegt und mit DEPC-Wasser befeuchtet. Die Maske wird so auf die porösen Platte des Blotters gelegt, das diese das Whatman Papier überlappt. Eine Nylonmembran, die auf die gleiche Größe wie die Maske zugeschnitten wird, wird auf das Whatman Papier gelegt und mit 10x SSC-Puffer (Puffer 52) getränkt. Das Gel wird auf die Nylonmembran gelegt, so dass es mit den Rändern der Maske überlappt. Die obere Schale des Blotters wird mit 10x SSC-Puffer befüllt und ein Vakuum von 700 mbar für 1 h aufgebaut. Durch den SSC-Puffer, der durch das Gel hindurch in die untere Schale des Blotters gezogen wird, überträgt sich die RNA auf die Membran. Im Anschluss wird die RNA durch 2-maliges *cross linken* durch UV-Licht an die Membran gebunden.

Tabelle 45: Zusammensetzung für ein 1% Agarose-Formaldehydgel

Komponente	Menge
Agarose	1,1 g [1%]
DEPC-H ₂ O	80 ml
	Aufkochen und 7 min abkühlen lassen
10x MOPS-Puffer	11 ml [1x]
Formaldehyd (37%)	20 ml [6,7%]

Tabelle 46: Zusammensetzung für 10x MOPS-Puffer

Komponente	Menge
MOPS	41,9 g [200 mM]
EDTA	3,72 g [10 mM]
Natriumacetat-Tetrahydrat	8,2 g [50 mM]
DEPC-H ₂ O	ad 1 l

Tabelle 47: Zusammensetzung für 1 Liter DEPC-Wasser

Komponente	Menge
DEPC	1 ml [0,1%]
ddH ₂ O	ad 1 l
	Über Nacht unter dem Abzug ausdampfen lassen Autoklavieren, bei Raumtemperatur lagern

Tabelle 48: Zusammensetzung für RNA-Probenpuffer

Komponente	Menge
10x MOPS	50 µl [1x]
Formamid	250 µl [50%]
Formaldehyd (37%)	89 µl [8,5%]
DEPC-H ₂ O	111 µl

Tabelle 49: Zusammensetzung für 10x RNA-Ladepuffer

Komponente	Menge
Glycerin	6 ml [60%]
250 mM EDTA	0,4 µl [0,01M]
Bromphenolblau	10 mg [0,1%]
DEPC-H ₂ O	111 µl

Tabelle 50: Zusammensetzung für Denaturierungspuffer

Komponente	Menge
1 N NaOH	12,5 ml [0,05 N]
5 M NaCl	7,5 ml [0,15 M]
DEPC-H ₂ O	ad 250 ml

Tabelle 51: Zusammensetzung für Neutralisierungspuffer

Komponente	Menge
1 Tris pH7,5	25 ml [0,1 M]
5 M NaCl	7,5 ml [0,15 M]
DEPC-H ₂ O	ad 250 ml

Tabelle 52: Zusammensetzung für 1 l 20x SSC-Puffer

Komponente	Menge
Natriumchlorid	175,2 g [3M]
Natriumcitrat Dihydrat	77,42 g [0,3 M]
ddH ₂ O	ad 1 l

2.3.10.3 Hybridisierung

Um eine spezifische RNA auf der Northern Blot Membran detektieren zu können, werden radioaktiv-markierte Sonden genutzt. Je nach Länge der Sonde und der zu detektierenden RNA, werden verschiedene Puffersysteme für die Hybridisierung genutzt.

Für die Detektion von sRNAs wird die Membran mit dem Church-Puffersystem hybridisiert. Für radioaktiv-markierte Oligonukleotide wird Church *low*-Puffer (Tabelle 53) und für radioaktiv-markierte PCR-Produkte Church *medium*-Puffer (Tabelle 54) genutzt. Die Membran wird 1 h bei 42°C in 30 ml des jeweiligen Puffers in einem Rotationsofen prähybridisiert, bevor 5-10 µl der benötigten Sonde hinzugegeben werden. Die Hybridisierung der Membran mit der Sonde erfolgt über Nacht bei 42°C im Rotationsofen.

Tabelle 53: Zusammensetzung für Church *low*-Puffer

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

Tabelle 54: Zusammensetzung für Church *medium*-Puffer

Komponente	Menge
BSA	3g [1%]
1 M NaP-Puffer pH 7,2	150 ml [0,5 M]
250 mM EDTA	1,2 ml [1 mM]
20% SDS	105 ml [7%]
Formamid	45 ml [15%]

Tabelle 55: Zusammensetzung für 1 l NaP-Puffer pH 7,2

Komponente	Menge
Di-Natriumhydrogenphosphat Heptahydrat	134g [0,5 M]
85% Phosphorsäure	4 ml
ddH ₂ O	ad 1 l

Für die Detektion von mRNAs wird die Membran mit dem Denhardts-Puffersystem hybridisiert. Die Membran wird bei 52°C für 2,5 h im Prähybridisierungspuffer (Tabelle 56) inkubiert. Im Anschluss wird der Prähybridisierungspuffer verworfen und die Membran in dem Hybridisierungspuffer (Tabelle 57) über Nacht mit 10 µl der radioaktiv-markierten Sonde hybridisiert. 10 µl der Sonde werden direkt vor der Zugabe zu dem Puffer in 1 ml LSD für 5 min bei 95°C denaturiert.

Tabelle 56: Zusammensetzung für den Denhardts-Prähybridisierungspuffer

Komponente	Menge
DEPC-H ₂ O	2,28 ml
50x Denhardt-Lösung	1,54 ml
Glycin	200 mg
20x SSPE	5 ml
Formamid	10 ml
10% SDS-Lösung	200 µl
LSD (5mg/ml) *	1ml

* direkt vor Zugabe für 5 min auf 95°C erhitzen

Tabelle 57: Zusammensetzung für Denhardts-Hybridisierungspuffer

Komponente	Menge
DEPC-H ₂ O	1,64 ml
Dextransulfat	2,18 g
50x Denhardt-Lösung	0,44 ml
0,2 M NaPPi-Puffer	0,44 ml
20x SSPE	5,54 ml
Formamid	11,09 ml
10% SDS-Lösung	220 µl
LSD (5mg/ml) *	1ml

* direkt vor Zugabe mit der Sonde für 5 min auf 95°C erhitzen

Tabelle 58: Zusammensetzung Denhardt-Lösung

Komponente	Menge
Polyvinylpyrrolidin	1 g [1%]
Ficoll 400	1 ml [1%]
BSA	1 g [1%]
ddH ₂ O	ad 100 ml

Tabelle 59: Zusammensetzung NaPPi-Puffer

Komponente	Menge
Natriumdihydrogenphosphat	2,4 g [200 mM]
Natriumchlorid	17,4 g [3 M]
500 mM EDTA	4 ml [20 mM]
ddH ₂ O	ad 100 ml

2.3.10.4 Waschen der Membranen

Um überschüssige, ungebundene Sonde im Anschluss an die Hybridisierung zu entfernen, wird die Membran mit Waschpuffer behandelt. Die Zusammensetzung des Waschpuffers richtet sich nach dem für die Hybridisierung verwendeten Puffersystem.

Tabelle 60: Zusammensetzung für den Waschpuffer für einen Agarose Northern Blot

Komponente	Menge
20x SSC	50 ml
10% SDS	5 ml
ddH ₂ O	<i>ad</i> 1 l

Tabelle 61: Zusammensetzung für den Waschpuffer für einen Polyacrylamid Northern Blot

Komponente	Menge
20x SSC	250 ml
10% SDS	1 ml
ddH ₂ O	<i>ad</i> 1 l

Der Hybridisierungspuffer wird verworfen und 30 ml des jeweiligen Waschpuffers werden zu der Membran in das Hybridisierungsröhrchen gegeben und 10 min bei 42°C im Hybridisierungsofen inkubiert. Der Waschpuffer wird verworfen und der Waschschrift noch ein weiteres Mal wiederholt. Die Membran wird mit einer Pinzette aus dem Hybridisierungsröhrchen entnommen und auf saugfähigem Papier vollständig getrocknet. Die getrocknete Membran wird in eine Klarsichtfolie gelegt und diese an allen vier Seiten zugeschweißt. Die eingeschweißte Membran wird zusammen mit einem Phosphoimaging Screen in eine Kassette gelegt und je nach Abundanz der zu detektierenden RNA 1 - 5 Tage inkubiert. Zwischen jeder Benutzung wird der Screen für 15 min mit Weißlicht exponiert, um die Anregung der Kristalle zu reversieren.

2.3.10.5 Detektion und Quantifizierung von Signalen

Die an die Ziel-RNA gebundene radioaktiv-markierte Sonde regt durch ihre Strahlung Kristalle an, die sich in der Oberfläche des Screens befinden. Die Kristalle gehen dadurch in einen angeregten Zustand über, der durch einen HeNe-Laser im Phosphoimager detektiert werden kann. Zur Quantifizierung der RNA-Signale wird die Software Quantity One von Biorad benutzt. Dadurch können die Verhältnisse von einzelnen RNA-Signalen berechnet und miteinander verglichen werden.

2.3.10.6 Ablösen von radioaktiv-markierten Sonden von der Membran

Zum Ablösen der hybridisierten Sonden, wird die Membran in eine Glasschale gelegt, mit Strippingpuffer (Tabelle 62) beschichtet und für 20 min bei 95°C unter ständigem Schütteln aufgekocht. Im Anschluss kann die Membran bei Raumtemperatur gelagert oder wieder zur Hybridisierung mit einer neuen Sonde genutzt werden.

Tabelle 62: Zusammensetzung für 1 l Stripping-Puffer

Komponente	Menge
20x SSC	250 ml
10% SDS	10 ml
ddH ₂ O	ad 1 l

2.3.11 Labeln von DNA-Sonden

Radioaktiv-markierte DNA-Sonden, die komplementär zur Ziel-RNA sind und so an diese binden können, werden zur Detektion genutzt. Zur Markierung werden unterschiedliche Systeme genutzt, die von den Charakteristika der jeweiligen DNA abhängig sind.

2.3.11.1 Labeln von Oligonukleotiden

Einzelsträngige Oligonukleotide werden mittels Polynukleotidkinase (PNK) radioaktiv-markiert. Die PNK katalysiert den Transfer des γ -Phosphats eines [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP an das 5'-Hydroxylendes der DNA. Die Reaktion (Tabelle 63) wird für 1 h bei 37°C durchgeführt und im Anschluss durch die Zugabe von 40 μl STE-Puffer (Tabelle 64) gestoppt. Der Ansatz wird über ein Illustra™ MicroSpin™ G-25 Säulchen nach Angaben des Herstellers aufgereinigt, um überschüssiges Enzym und freie [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP zu entfernen. Die Sonde wird bei -20°C gelagert.

Tabelle 63: Ansatz für das Labeln eines Oligonukleotids

Komponente	Menge
Oligonukleotid (10 mM)	2 μl [2 mM]
10x PNK-Puffer	1 μl [1x]
PNK (10U/ μl)	1 μl
γ -ATP (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$)	3 μl [3 μCi]
Roth-H ₂ O	ad 10 μl

Tabelle 64: Zusammensetzung für STE-Puffer

Komponente	Menge
5M Natriumchlorid	2 ml [100 mM]
1 M Tris-HCl pH 8,0	1 ml [10 mM]
EDTA	0,04 g [1 mM]
ddH ₂ O	ad 100 ml

2.3.11.2 Labeln von PCR-Produkten

Doppelsträngige PCR-Produkte werden durch *random priming* radioaktiv-markiert. Dazu wird das Prime-a-Gene Kit (Promega) nach Angaben des Herstellers verwendet und die markierte Sonde im Anschluss über ein Illustra™ MicroSpin™ G-50 Säulchen nach Angaben des Herstellers aufgereinigt, um überschüssiges Enzym und freie dNTPs zu entfernen. Die Sonde wird bei -20°C gelagert.

2.3.12 Quantitative reverse Transkriptase-PCR

Die quantitative reverse Transkriptase-PCR wird genutzt, um die relative Menge einer Ziel-RNA bestimmen zu können, dazu wird das Brilliant III Ultra-Fast Sybr® Green QRT-PCR Kit von Agilent verwendet. Die Ziel-RNA wird im ersten Reaktionsschritt durch eine reverse Transkriptase in cDNA transkribiert. Im direkten Anschluss wird eine Polymerase-Kettenreaktion durchgeführt, wobei die neu synthetisierte cDNA als *template* DNA genutzt wird. Um die DNA-Menge während des PCR-Laufs messen zu können, wird der asymmetrische Cyanin-Farbstoff SYBR Green zu dem Reaktionsansatz hinzugegeben. SYBR Green interkaliert in die neu synthetisierten DNA-Stränge. Der so entstehende Farbstoff-DNA-Komplex absorbiert blaues Licht bei einer Wellenlänge von 494 nm und emittiert grünes Licht bei einer Wellenlänge von 521 nm. Durch Messung des Fluoreszenzsignals am Ende jedes PCR-Zyklus, können Rückschlüsse auf die Ausgangsmenge der RNA gezogen werden, da das Signal proportional zur Menge an DNA zunimmt. Neben der Menge der Ziel-RNA wird in einem separaten Lauf auch die Menge des *housekeeping*-Gens *rpoZ* bestimmt, welche zur Normalisierung benötigt wird. Da in einigen Deletionsmutanten die Expression des *housekeeping*-Gens stark beeinflusst ist, kann dieses nicht zu Normalisierung verwendet werden. Als Referenz wird ein vorher zugesetztes *in vitro* Transkript verwendet. Dazu wird vor der RNA-Isolation 1 ng kaltes *sinI*-*in vitro* Transkript zu dem geernteten Zellpellet gegeben. Die relative Expression (R) des Zielgens im Vergleich zum Referenz-Gen wird mit folgender Formel nach Pfaffl (2001) berechnet. Dabei ist E die Primereffizienz des verwendet Primerpaares und ΔCt gibt den Unterschied der Zyklen zwischen den zu vergleichenden Stämmen an, in welchem die Fluoreszenz des Farbstoff-DNA-Komplexes, einen Schwellenwerten überschreitet, an.

$$R = \frac{(E_{\text{Zielgen}})^{\Delta Ct_{\text{Zielgen}}(\text{Kontrollstamm} - \text{Probenstamm})}}{(E_{\text{Referenzgen}})^{\Delta Ct_{\text{Referenzgen}}(\text{Kontrollstamm} - \text{Probenstamm})}}$$

Um die Menge einer *antisense* RNA bestimmen zu können, muss darauf geachtet werden, dass eine 2-step qRT-PCR durchgeführt wird. Dabei darf bei der Synthese der cDNA nur der *reverse*

Primer der *antisense* RNA zum Ansatz hinzugegeben werden, da der *forward* Primer der *antisense* RNA, komplementär zur *sense* mRNA-Strang ist und so beide RNA-Spezies in cDNA umgeschrieben werden würden. Der *forward* Primer der *antisense* RNA darf erst nach Abschluss der cDNA-Synthese hinzugegeben werden, um eine gezielte Aussage über die Menge der *antisense* RNA treffen zu können.

Tabelle 65: Ansatz für eine 1-step qRT-PCR

Komponente	Menge
2x Master Mix	5 μ l
Primer <i>forward</i> (10 μ M)	0,5 μ l
Primer <i>reverse</i> (10 μ M)	0,5 μ l
DTT (100mM)	0,1 μ l
Reverse Transkriptase	0,4 μ l
DNA-freie RNA (20 ng/ μ l)	2 μ l
Roth-H ₂ O	ad 10 μ l

Tabelle 66: Temperaturschema für eine 1-step qRT-PCR

	Temperatur	Zeit	
Reverse Transkription	50°C	10 min	
Initiale Denaturierung	95°C	3 min	
Denaturierung	95°C	10 sec	} 40 Zyklen
Annealing	60°C	5 sec	
Elongation	60°C	10 sec	
Finale Elongation	72°C	10 min	
Schmelzkurve	65°C-99°C	1°C/1min	

Tabelle 67: Ansatz für eine 2-step qRT-PCR

Komponente	Menge
Master Mix	5 μ l
Primer <i>reverse</i> (10 μ M)	0,5 μ l
DTT (100 mM)	0,1 μ l
Reverse Transkriptase	0,4 μ l
DNA-freie RNA (20 ng/ μ l)	2 μ l
Roth-H ₂ O	ad 10 μ l

Tabelle 68: Temperaturschema für eine 2-step qRT-PCR

	Temperatur	Zeit	
Reverse Transkription	50°C	10 min	
Initiale Denaturierung	95°C	10 min	
Zugabe von 0,5 µl Primer <i>forward</i>			
Denaturierung	95°C	10 sec	} 40 Zyklen
Annealing	60°C	5 sec	
Elongation	60°C	10 sec	
Finale Elongation	72°C	10 min	
Schmelzkurve	65°C-99°C	1°C/1min	

2.3.13 Bestimmung des Transkriptionsstarts durch 5'-RACE-PCR

Zur Bestimmung des Transkriptionsstarts einer RNA wird die 5'-RACE-PCR (*rapid amplification of cDNA-ends with polymerase chain reaction*) genutzt. Dabei wird die Ziel-RNA durch eine Reverse Transkriptase in cDNA transkribiert. Für die reverse Transkriptase-Reaktion (Tabelle 69) wird der reverse Primer, an dem die Reaktion startet, so designt, dass er 150-200 nt *downstream* des zu erwartendem 5'-Ende bindet. Die cDNA wird mittels High Pure PCR Product Purification Kit über eine DNA-bindende Säule nach Angaben des Herstellers aufgereinigt, wobei 150 µl statt 100 µl Bindungspuffer verwendet werden. An das 3'-Ende der neu synthetisierten cDNA wird ein Poly(A)-Schwanz mittels Terminal-Deoxynucleotidyl-Transferase angehängt (Tabelle 70). Die cDNA wird durch PCR vervielfältigt, dazu wird der Zielsequenz-spezifische reverse Primer, der schon zur Synthese der cDNA und ein Oligo-dT-Anchor-Primer, der komplementär zum angehängten Poly(A)-Schwanzes ist, genutzt (Tabelle 71). Das entstandene PCR-Produkt wird als *template* für eine zweite PCR-Reaktion eingesetzt, bei der Primer genutzt werden, die jeweils um 50 nt zur Mitte der Sequenz versetzt sind (Tabelle 73). Die PCR-Produkte werden über ein Agarosegel aufgetrennt (Kapitel 2.3.4), aus dem Gel aufgereinigt (Kapitel 2.3.4.1), in ein geeignetes Vektorsystem kloniert und in *E. coli*-Zellen mittels Elektroporation transformiert. Die aus *E. coli* isolierten Plasmide werden sequenziert und gegen das Genom von *R. sphaeroides align*t.

Tabelle 69: Ansatz für die cDNA-Synthese

Komponente	Menge
RNA	2-5 µg
RACE Primer I (10 µM)	1,25 µl
Roth-H ₂ O	<i>ad</i> 10,5 µl
70°C für 5 min	
5x AMV Puffer	4 µl
dNTPs (10 mM)	2 µl
AMV Reverse Transkriptase (40U/µl)	2 µl
RiboLock (40U/µl)	0,2 µl
Roth-H ₂ O	1,7 µl
50°C für 10 min	
60°C für 15 min	
85°C für 5 min	

Tabelle 70: Ansatz für das Poly A-tailing der cDNA

Komponente	Menge
Aufgereinigte cDNA	19 µl
5x TdT-Puffer	5,5 µl
ATP (2 mM)	2,5 µl
94°C für 3 min	
TdT (20U/µl)	1 µl
37°C für 30 min	
70°C für 10 min	

Tabelle 71: Ansatz für die erste 5'-RACE-PCR

Komponente	Menge
10x Taq-Puffer	5 µl
dNTS (10 mM)	1 µl
Oligo dT-Anchor Primer (10 µM)	1,25 µl
RACE Primer I (10 µM)	1,25 µl
MgCl ₂ (25 mM)	3 µl
Poly A-tailed cDNA	5 µl
Taq-Polymerase (1 U/µl)	2,5 µl
Roth-H ₂ O	<i>ad</i> 50 µl

Tabelle 72: Temperaturschema für die erste und zweite 5'-RACE-PCR

	Temperatur	Zeit	
Initiale Denaturierung	95°C	3 min	} 35 Zyklen
Denaturierung	95°C	30 sec	
Annealing	56°C	45 sec	
Elongation	72°C	1 min	
Finale Elongation	72°C	7 min	

Tabelle 73: Ansatz für die zweite 5'-RACE-PCR

Komponente	Menge
10x Taq-Puffer	5 µl
dNTS (10 mM)	1 µl
PCR Anchor Primer (10 µM)	1,25 µl
RACE Primer II (10 µM)	1,25 µl
1. PCR-Produkt (1:10 verdünnt)	1 µl
Taq-Polymerase (1 U/µl)	2,5 µl
Roth-H ₂ O	ad 50 µl

2.3.14 Bestimmung des 3'-Terminus durch 3'-RACE-PCR

Um das 3'-Ende einer RNA zu bestimmen wird die 3'-RACE-PCR genutzt. Durch die Poly(A) Polymerase wird ein Poly(A)-Schwanz an die 3'-Enden der RNA angehängt (Tabelle 74). Im Anschluss wird der Ansatz auf insgesamt 200 µl mit Roth-Wasser aufgefüllt, mit 200 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) vermischt und für 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wird in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, mit 200 µl Chloroform/Isoamylalkohol vermischt und die Zentrifugation wird wiederholt. Der Überstand wird erneut in ein frisches 1,5-ml Reaktionsgefäß überführt und mit 1 Volumenanteil Isopropanol und 0,1 Volumenanteilen 3M Natriumacetat pH 4,5 (Tabelle 41) vermischt. Die Fällung der RNA wird für 15 min auf Eis und anschließender Zentrifugation für 30 min bei 13.000 rpm und 4°C durchgeführt. Der Überstand wird verworfen, das Pellet mit 200 µl 75% Ethanol gewaschen und für 5 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird erneut verworfen, die RNA in der Speedvac für 7 min getrocknet und anschließend in 50 µl Roth-Wasser resuspendiert. Die polyadenylierte RNA wird mittels reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben, die im Anschluss als *template* für eine PCR dient (Tabelle 76). Dafür wurde das Brilliant III Ultra-Fast Sybr® Green QRT-PCR Kit von Agilent verwendet. Dabei werden ein Oligo-dT-Anchor-Primer, der komplementär zum angefügten Poly(A)-Schwanzes und ein genspezifischer Primer, der komplementär zu einem Teil der Sequenz ist, die ca. 200 bp *upstream* des zu erwartenden 3'-Endes der Ziel-RNA liegt, genutzt. Das entstandene PCR-

Produkt wird mittels Gelelektrophorese aufgetrennt, aufgereinigt, in ein geeignetes Vektorsystem ligiert und in *E. coli*-Zellen mittels Elektroporation transformiert. Die aus *E. coli* isolierten Plasmide werden sequenziert und gegen das Genom von *R. sphaeroides* aligniert.

Tabelle 74: Ansatz für das Poly A-tailing der cDNA

Komponente	Menge
RNA	2-5 µg
10x Poly A Polymerase Puffer	2 µl
ATP (10 mM)	2 µl
Poly A Polymerase (5U/µl)	1 µl
	37°C für 30 min

Tabelle 75: Ansatz für die reverse Transkription für die Poly(A)-tailed RNA

Komponente	Menge
2x Master Mix	5 µl
Oligo dT-Anchor Primer (10 µM)	1,25 µl
RACE Primer I (10 µM)	1,25 µl
DTT (100 mM)	0,1 µl
Reverse Transkriptase	0,4 µl
Poly A-tailed RNA	2 µl
Roth-H ₂ O	ad 10 µl

Tabelle 76: Temperaturschema für die reverse Transkription der Poly(A)-tailed RNA

	Temperatur	Zeit	
Reverse Transkription	50°C	10 min	
Initiale Denaturierung	95°C	3 min	
Denaturierung	95°C	30 sec	} 35 Zyklen
Annealing	60°C	30 sec	
Elongation	72°C	1 min	
Finale Elongation	72°C	10 min	

2.3.15 *In vitro* Transkription

Die *in vitro* Transkription wird genutzt um synthetische RNA-Fragmente unter der Benutzung eines DNA-templates herzustellen. In dieser Arbeit wurde die benötigte DNA-Sequenz mittels PCR amplifiziert und in einen linearisierten pDrive-Vektor, *downstream* der T7-Promotersequenz ligiert, die als Startpunkt für die virale T7-Polymerase benötigt wird. Der resultierende Vektor wird vor der *run-off* Transkription durch eine geeignete Restriktionsendonuklease linearisiert. Dazu werden 5 µg, der mittels NucleoSpin® Plasmid EasyPure (Macherey-Nagel) isolierten Plasmid-DNA, nach Angaben des Herstellers geschnitten (Tabelle 77), das Enzym durch Hitze inaktiviert und im Anschluss mittels

InnuPREP DOUBLEpure Kit (Analytik Jena) aufgereinigt. Die *in vitro* Transkription kann zum einen mit „kalten“ (Tabelle 79) als auch mit radioaktiv-markierten [α -P³²]-UTP (Tabelle 78) erfolgen. Der *in vitro* Transkription-Ansatz wird für 6 h bei 37°C inkubiert. Um das DNA-*template* zu entfernen wird im Anschluss 1 μ l Turbo-DNase (2U/ μ l) hinzugegeben und der Ansatz weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Dem radioaktiv-markierten Ansatz werden 2 μ l entnommen und in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C gelagert. Der restliche Ansatz wird über ein Illustra™ MicroSpin™ G-50-Säulchen nach Angaben des Herstellers aufgereinigt, um überschüssige Nukleotide zu entfernen. Sowohl der „kalte“ als auch der radioaktiv-markierte Ansatz werden nach Ablauf der Reaktion beziehungsweise nach Aufreinigung auf ein Gesamtvolumen von 200 μ l mit Roth-Wasser aufgefüllt und mit 200 μ l kaltem Phenol vermischt. Die Phasentrennung geschieht durch eine Zentrifugation bei 13.000 rpm für 10 min. Die wässrige Phase wird in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, mit 200 μ l Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) vermischt und die Zentrifugation wiederholt. Die wässrige Phase wird in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und mit 2,5-fachem Volumen 96% Ethanol und 0,1-fachem Volumen 3M Natriumacetat (pH 4,5) vermischt. Die Proben werden über Nacht bei -20°C gelagert. Die Fällung der RNA-Proben erfolgt für 30 min bei 13.000 rpm und 4°C. Der Überstand wird verworfen und das Pellet mit 200 μ l 75% Ethanol gewaschen. Der Ansatz wird für 5 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand erneut verworfen. Das Pellet wird in der Speedvac für 7 min getrocknet, im Anschluss in 25 μ l Roth-Wasser aufgenommen und bei -20°C gelagert. Die „kalten“ *in vitro* Transkripte werden mittels photometrischer Messung am NanoDrop quantifiziert während die radioaktiv-markierten Transkripte mit Hilfe eines Szintillationszählers quantifiziert werden.

Die *in vitro* Transkripte werden im Anschluss auf ein 10% PAA-Gel aufgetragen, um deren Qualität und Reinheit überprüfen zu können.

Tabelle 77: Ansatz für eine präparative Restriktion für eine *in vitro* Transkriptionsreaktion

Komponente	Menge
Plasmid	5 μ g
10x FastDigest-Puffer	5 μ l
FastDigest-Enzym (10 U/ μ l)	5 μ l
Roth-H ₂ O	ad 50 μ l

Tabelle 78: Ansatz für eine radioaktiv-markierte *in vitro* Transkriptionsreaktion

Komponente	Menge
Template DNA	1 µg
MgCl ₂ (40 mM)	2 µl
DTT (100 mM)	2 µl
RiboLock (40 U/µl)	0,8 µl
rNTPs <i>low</i> U*	2,5 µl
10x T7 Polymerase-Puffer	2,5 µl
[α-P ³²]-UTP	3 µl
T7 Polymerase (50 U/µl)	1 µl
Roth-H ₂ O	<i>ad</i> 25 µl
	* 25 mM ATP/CTP/GTP + 5 mM UTP

Tabelle 79: Ansatz für eine kalte *in vitro* Transkriptionsreaktion

Komponente	Menge
Template DNA	1 µg
MgCl ₂ (40 mM)	2 µl
DTT (100 mM)	2 µl
RiboLock (40 U/µl)	0,8 µl
rNTPs (jedes 25 mM)	2,5 µl
10x T7 Polymerase-Puffer	2,5 µl
T7 Polymerase (50 U/µl)	1 µl
Roth-H ₂ O	<i>ad</i> 25 µl

2.3.16 RNase III Assay

Das RNase III *in vitro* Assay wird genutzt, um zu zeigen, ob die zu testende RNA von der RNase III prozessiert wird. Das radioaktiv-markierte *in vitro* Transkript wird entweder einzeln oder zusammen mit dem kalten komplementären *in vitro* Transkript für 5 min bei 37°C inkubiert. Im Anschluss werden 2 µl RNase III-Puffer (Tabelle 81) und die RNase III hinzugegeben und die Ansätze erneut bei 37°C inkubiert (Tabelle 80). Als Kontrolle dient ein Ansatz, der ohne die Zugabe von RNase III inkubiert wird. Die Reaktion wird durch die Zugabe von 7 µl FU-Mix zu verschiedenen Zeitpunkten gestoppt. Für das Gel wird die 6%-Polyacrylamid-Gelmischung (Tabelle 82) zwischen eine quadratische und eine Ohrenplatte gegossen, die durch drei 0,2 mm dicke Spacer und Klammern miteinander verbunden sind. Die Geltaschen entstehen durch Einstecken eines Kammes in das gegossene Gel. Nach Auspolymerisieren des Gels werden der Kamm und der untere Spacer entfernt und das Gel in eine vertikale Gelkammer eingespannt und diese mit 1x TBE-Laufpuffer befüllt. Die Proben werden für 10 min bei 65°C erhitzt und auf das 6% Urea-Polyacrylamidgel geladen. Der Gellauf wird bei 400 V für 2-3 h durchgeführt, bis die Bromphenolblau-Lauffront aus dem Gel herausläuft. Die Glasplatten werden vorsichtig voneinander getrennt und zwei 20x20 cm

zugeschnittene Whatman Papiere übereinander auf das Gel gelegt und angedrückt. Das Gel wird auf den Whatman Papieren auf den Gelrockner transferiert und bei 80°C für 45 min unter Vakuum getrocknet. Das getrocknete Gel wird im Anschluss über Nacht zusammen mit einem Screen in eine Kassette gelegt. Die Signale des radioaktiv-markierten *in vitro* Transkripts werden im Phosphoimager detektiert.

Tabelle 80: Ansatz für *in vitro* RNase III-Degradationsassay

Komponente	Menge
Radioaktiv-markiertes <i>in vitro</i> Transkript	100 fmol
Kaltes <i>in vitro</i> Transkript	1 pmol
RiboLock (40U/μl)	0,5 μl
ddH ₂ O	ad 7 μl
	Bei 37°C für 5 min inkubieren
5-RNase III Puffer	2 μl
RNase III	1 μl
	Bei 37°C inkubieren und mit FU-Mix abstoppen

Tabelle 81: Zusammensetzung 5x RNase III-Puffer

Komponente	Menge
1 M Tris pH 7,5	150 μl [150 mM]
1 M Magnesiumchlorid	50 μl [50 mM]
1 M Kaliumchlorid	650 μl [650 mM]
Glycerol	150 μl [150%]

Tabelle 82: Zusammensetzung für ein 6% Urea-Polyacrylamidgel

Komponente	Menge
Harnstoff	8,4 g [6 M]
Polyacrylamid	3 ml [6%]
10x TBE-Puffer	2 ml [1x]
Roth-H ₂ O	ad 20 ml
	Inkubation bei 37°C bis zu Lösung des Harnstoffs
10% APS	60 μl
TEMED	10 μl

2.3.17 EMSA

In dieser Arbeit wird der EMSA (*electro mobility shift assay*) genutzt, um die direkte Interaktion zwischen einem radioaktiv-markiertem *in vitro* Transkript und einem aufgereinigten Protein zu untersuchen. Das *in vitro* Transkript wird zusammen mit dem aufgereinigten Protein (in ansteigender Konzentration) inkubiert und im Anschluss über ein natives Polyacrylamidgel aufgetrennt. Durch die Bindungen der beiden Moleküle kommt es zur Änderung des

Laufverhaltens in dem Polyacrylamidgel, welches durch einen *shift* des gebundenen *in vitro* Transkript im Vergleich zur freien RNA in den oberen Teil Gels zu beobachten ist. Um eine unspezifische Bindung ausschließen zu können, kann ein Kompetitions-EMSA durchgeführt werden. Als Kompetitor dient ein kaltes *in vitro* Transkript, welches nicht mit dem aufgereinigten Protein interagieren soll. Als Positivkontrolle wird ein ebenfalls kaltes *in vitro* Transkript genutzt, welches die gleiche Sequenz besitzt, wie das zu testende radioaktiv-markierte *in vitro* Transkript, bei dem bereits eine Bindung beobachtet werden konnte. Die kalten *in vitro* Transkripte werden in aufsteigender Konzentration zu dem radioaktiv-markiertem *in vitro* Transkript und dem aufgereinigten Protein gegeben, inkubiert und im Anschluss über eine natives Polyacrylamidgel aufgetrennt. Können sowohl der Kompetitor, als auch das zu untersuchende *in vitro* Transkript an das aufgereinigte Protein binden, konkurrieren sie gegeneinander und der *shift* des radioaktiv-markierten *in vitro* Transkript geht mit aufsteigender Menge des Kompetitor zurück, was durch die Anstieg der freien RNA-Menge zu beobachten ist. Bindet der Kompetitor das aufgereinigte Protein hingegen nicht, ändert sich das Laufverhalten des geshifteten radioaktiv-markierten *in vitro* Transkripts, auch bei ansteigender Konzentration nicht.

Die 6% native Polyacrylamid-Gelmischung (Tabelle 83) wird zwischen eine quadratische und eine Ohrenplatte gegossen, die durch drei 0,2mm dicke Spacer und Klammern miteinander verbunden sind. Die Geltaschen entstehen durch das Einstecken eines Kammes in das gegossene Gel. Nach auspolymerisieren des Gels werden der Kamm und der untere Spacer entfernt und das Gel in ein vertikale Gelkammer eingespannt und diese mit 0,5x TBE-Laufpuffer befüllt. Vor der Beladung der Proben wird das Gel für eine Stunde bei 4°C und 100 V an eine Stromquelle angeschlossen. Das heiße *in vitro* Transkript wird bei 95°C für 2 min denaturiert und für 2 min auf Eis abgekühlt. Es werden 2 µl Struktur-Puffer (Tabelle 86) und 0,5 µl RiboLock® (40U/µl) hinzugegeben und der Ansatz für 5 min bei 32°C renaturiert, bevor im Anschluss 1 µl Proteinlösung mit unterschiedlicher Konzentration (0, 1, 10, 50, 100, 500, 1000 nM) hinzugegeben wird und der Ansatz für weitere 30 min bei 32°C inkubiert wird (Tabelle 84). Für den Kompetitions-EMSA werden 100 fmol des radioaktiv-markiertem *in vitro* Transkript und verschiedene Konzentrationen der kalten *in vitro* Transkripte jeweils für 2 min bei 95°C denaturiert. Im Anschluss wird den radioaktiv-markierten *in vitro* Transkripten 2 µl 5x Struktur-Puffer und 0,5 µl RiboLock® (40U/µl) hinzugegeben. Sowohl die radioaktiv-markierten als auch die kalten *in vitro* Transkripte werden für 5 min bei 32°C renaturiert. Im Anschluss wird jeweils 1 µl des kalten renaturierten *in vitro* Transkripts (10, 100, 1.000 fmol finale Konzentration) zu den radioaktiv-markierten Ansätzen geben. Den Ansätzen wird jeweils

1 μl aufgereinigtes Hfq-Protein (1000 ng/ μl) hinzugegeben und die Ansätze werden im Anschluss für 30 min bei 32°C inkubiert (Tabelle 85). Als Kontrolle dient radioaktiv-markiertes *in vitro* Transkript, welches mit und ohne die Zugabe von Hfq, in Abwesenheit der kalten *in vitro* Transkripte, inkubiert wird. Nach der Inkubation werden 2 μl nativer Probenpuffer (Tabelle 87) zu dem Ansatz hinzugegeben und die Proben werden auf ein natives 6% Polyacrylamidgel geladen. Die Auftrennung erfolgt bei 150 V für 3 Stunden bei 4°C. Im Anschluss werden die Glasplatten vorsichtig voneinander getrennt, zwei 20x20 cm zugeschnittene Whatman Papiere übereinander auf das Gel gelegt und angedrückt. Das Gel wird auf den Whatman Papieren auf den Gelrockner transferiert und bei 80°C für 45 min unter Vakuum getrocknet. Das getrocknete Gel wird im Anschluss über Nacht zusammen mit einem Screen in eine Kassette gelegt. Die Signale des radioaktiv-markierten *in vitro* Transkripts werden im Phosphoimager detektiert.

Tabelle 83: Zusammensetzung für ein natives 6% Polyacrylamidgel

Komponente	Menge
40% Polyacrylamid	3 ml [6%]
10x TBE-Puffer	0,5 ml [0,25x]
1 M Magnesiumchlorid	0,2 ml [10 mM]
Roth-H ₂ O	16,3 ml
10% APS	60 μl
TEMED	10 μl

Tabelle 84: Ansatz für EMSA-Reaktion

Komponente	Menge
Radioaktiv-markiertes <i>in vitro</i> Transkript	1 fmol
Roth-H ₂ O	ad 6,5 μl 2 min bei 95°C, 2 min auf Eis
5x Strukturpuffer	2 μl
RiboLock (40U/ μl)	0,5 μl 5 min bei 32°C
Hfq in aufsteigender Konz.	1 μl 30 min bei 32°C

Tabelle 85: Ansatz für einen Kompetitions-EMSA

Komponente	Menge
Radioaktiv-markiertes <i>in vitro</i> Transkript	1 fmol
Roth-H ₂ O	<i>ad</i> 5,5 µl
	2 min bei 95°C, 2 min auf Eis
5x Strukturpuffer	2 µl
RiboLock (40U/µl)	0,5 µl
	5 min bei 32°C
Hfq in aufsteigender Konz.	1 µl
Kaltes <i>in vitro</i> Transkript (100, 1000, 10.000 fmol)	1 µl
	30 min bei 32°C

Tabelle 86: Zusammensetzung für 5x Strukturpuffer

Komponente	Menge
1 M Magnesiumchlorid	25 µl [25 mM]
1 M Kaliumchlorid	300 µl [300 mM]
Roth-H ₂ O	<i>ad</i> 1 ml

Tabelle 87: Zusammensetzung für nativen RNA-Probenpuffer

Komponente	Menge
10x TBE-Puffer	5 µl [0,05x]
Glycerol	500 µl [50%]
Bromphenolblau	1 mg [0,1%]
Roth-H ₂ O	<i>ad</i> 1 ml

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Aufreinigung rekombinanter Proteine

Zur Aufreinigung rekombinanter Proteine von *Rhodobacter* aus *E. coli* wird die Nickel-Affinitätschromatographie genutzt. Die an die Zielproteine angefügten Histidinreste können eine nicht-kovalente Bindungen mit zweiwertigen Metallionen eingehen. Die Säulenmatrix besteht aus Agarose-Partikeln, die mit Nickel-Nitrilotriessigsäure-Resten beschichtet sind. Das an das Ni²⁺-Ion gebundene His-tag-Protein kann durch die Zugabe von Imidazol von der Säulenmatrix eluiert werden, da Imidazol als Strukturanalog das Histidin von der Matrix verdrängt. Zum Aufreinigen der RNase III von *Rhodobacter capsulatus* beziehungsweise Hfq von *R. sphaeroides* aus *E. coli* Zellen werden ca. 1,5 g der geernteten *E. coli*-Zellen in 15 ml His-tag-Aufschlusspuffer resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss werden die Zellen 5-mal für 30 sec sonifiziert. Um eine Überhitzung zu vermeiden wird zwischen

jedem Sonifizierungsschritt 1 min pausiert. Anschließend werden die Zellen für 20 min bei 12.000 rpm abzentrifugiert. Bevor der Überstand auf die ÄKTA geladen wird, wird er durch einen 25 mm GD/X Filter gefiltert, um größere Bestandteile aus der Lösung zu entfernen. Zur Affinitätschromatographie wird eine Nickel-NTA-Säule HisTrap High Performance (GE Health Care) genutzt. Unspezifisch gebundene Protein werden durch den Waschpuffer von der Säule entfernt. Im Anschluss daran wird das gebundene Protein mit Elutionspuffer von der Säule gelöst und in einzelnen Fraktionen aufgefangen. Um das Imidazol des Elutionspuffers zu entfernen, werden die Fraktionen, die das aufgereinigte Protein enthalten auf eine Gelfiltrationssäule Superdex™200 (GE Health Care) geladen und mit His-tag-Aufschlusspuffer eluiert. Die Proben werden bei -20°C gelagert.

Tabelle 88: Zusammensetzung für His-tag-Aufschlusspuffer für RNase III-Aufreinigung

Komponente	Menge
1 M Tris pH 7,5	6,057 g [50 mM]
1 M Natriumchlorid	14,61 g [250 mM]
ddH ₂ O	ad 1 l

Tabelle 89: Zusammensetzung für His-tag-Waschpuffer für RNase III-Aufreinigung

Komponente	Menge
1 M Tris pH 7,5	6,057 g [50 mM]
1 M Natriumchlorid	14,61 g [250 mM]
Imidazol	1,36 g [20 mM]
ddH ₂ O	ad 1 l

Tabelle 90: Zusammensetzung für His-tag-Elutionspuffer für RNase III-Aufreinigung

Komponente	Menge
1 M Tris pH 7,5	6,057 g [50 mM]
1 M Natriumchlorid	14,61 g [250 mM]
Imidazol	40,84 g [600 mM]
ddH ₂ O	ad 1 l

Tabelle 91: Zusammensetzung für His-tag-Aufschlusspuffer für Hfq-Aufreinigung

Komponente	Menge
1 M Tris pH 7,5	6,057 g [50 mM]
1 M Natriumchlorid	29,22 g [500 mM]
ddH ₂ O	ad 1 l

Tabelle 92: Zusammensetzung für His-tag-Waschpuffer für Hfq-Aufreinigung

Komponente	Menge
1 M Tris pH 7,5	6,057 g [50 mM]
1 M Natriumchlorid	29,22 g [500 mM]
Imidazol	0,68 g [10 mM]
ddH ₂ O	ad 1 l

Tabelle 93: Zusammensetzung für His-tag-Waschpuffer für Hfq-Aufreinigung

Komponente	Menge
1 M Tris pH 7,5	6,057 g [50 mM]
1 M Natriumchlorid	29,22 g [500 mM]
Imidazol	40,84 g [600 mM]
ddH ₂ O	ad 1 l

2.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford Assay

Zur Bestimmung des Proteingehalts einer Lösung wird ein Bradford Assay durchgeführt. Diese photometrische Methode beruht auf der Absorptionsänderung des Farbstoffes Coomassie-Brillant-Blau G250. Dieser weist in ungebundener, kationischer Form eine rote Färbung und ein Absorptionsmaximum bei 470 nm auf. In Verbindung mit Proteinen kommt es zu einer Komplexbildung und zu einer Stabilisierung der unprotonierten, anionischen Sulfonatform des Farbstoffes wobei sich das Absorptionsmaxima auf 595 nm verschiebt und der Farbstoff eine blaue Farbe annimmt. Durch Erstellen einer Eichkurve kann die Zunahme der Absorption bei 595 nm genutzt werden, um die unbekannte Proteinkonzentration in einer Probe zu quantifizieren.

Zum Erstellen der Eichkurve werden 2, 4, 8, 10 und 12 µg BSA-Standard eingesetzt. 5 µl der zu bestimmenden Proteinlösung werden mit 250 µl Bradford-Reagenz und 900 µl Roth-Wasser gemischt und bei Raumtemperatur für 15 min in Dunkelheit inkubiert. Als Leerwertkontrolle dienen 250 µl Bradford Reagenz und 900 µl Roth-Wasser ohne die Zugabe von Proteinen. Die Ansätze werden bei 595 nm im SPECORD 50 Spektralphotometer gemessen. Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Proben kann durch die Eichkurve wie folgt bestimmt werden.

Lineare Regression der Eichgerade $y=ax + b$

Konzentration Protein µg/µl = $[(Abs_{595}-b)/a]/Vf$

Vf= Verdünnungsfaktor

2.4.3 β -Galaktosidase Assay

Die Messung der β -Galaktosidaseaktivität wird in dieser Arbeit genutzt, um eine Aussage über die Promoteraktivität und über die Stabilität einer Ziel-mRNA treffen zu können. Zur Bestimmung der Promoteraktivität wird das pBBR-*lacZ*-Vektorsystem genutzt und eine transkriptionelles Fusionsplasmid hergestellt. Die potentielle Promoterregion wird vor das *lacZ*-Gen kloniert, welches über eine eigene Shine-Dalgarno-Sequenz und ein Startcodon verfügt. Wenn die potentielle Promoterregion aktiv ist, kann die *lacZ*-Sequenz transkribiert und die β -Galaktosidase translatiert werden. Zur Untersuchung der Stabilität einer mRNA wird ein translationales Fusionsplasmid mit dem pPHU234-6-Vektorsystem genutzt. Die Sequenz der Ziel-mRNA einschließlich der Ribosomenbindestelle und des Startcodons, aber exklusive des Stoppcodons werden zwischen die Sequenz eines Promoters und eines *lacZ*-Gens kloniert, welches nicht über eine Ribosomenbindestelle und Startcodon verfügt. Durch das Fehlen des Stoppcodons wird eine Fusion-mRNA, bestehend aus der Ziel-Sequenz und der *lacZ*-Sequenz, transkribiert. Die Translation der Fusions-mRNA hängt von der Ribosomenbindestelle und des Startcodons der Ziel-mRNA ab. Wird diese degradiert, kann die β -Galaktosidase nicht translatiert werden. Die hergestellten Fusionsplasmide werden über diparentale Konjugation in den zu testenden Stamm eingebracht. Der entstandene Stamm wird unter der benötigten Wachstumsbedingung kultiviert und in der exponentiellen Wachstumsphase werden 2 ml der Kultur bei 5 min, 10.000 rpm und 4°C geerntet. Zur Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität wird das Pellet in 750 μ l Z-Puffer (Tabelle 94), welcher frisch mit β -Mercaptoethanol (2,7 μ l/ml) versetzt wird, resuspendiert. Im Anschluss werden 10 μ l 0,1% SDS (Tabelle 97) und 20 μ l Chloroform hinzugegeben und der Ansatz durch vortexen für 10 sec gemischt. Der Ansatz wird für 5 min bei 28°C inkubiert. 200 μ l auf 28°C vorgewärmte ONPG-Lösung (Tabelle 95) werden zu dem Ansatz gegeben und für 5 min bei 28°C inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion werden 500 μ l 1 M Natriumcarbonatlösung (Tabelle 96) hinzugegeben. Zur Entfernung von Zelltrümmern wird der Ansatz für 3 min bei 13.000 und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wird in eine Polystyrolküvette überführt und im Spektralphotometer bei 420 nm und 550 nm gemessen. Die Aktivität der β -Galaktosidase wird nach Miller wie folgt berechnet.

$$\text{Miller Units} = \frac{1000 \times (\text{Abs}_{420} - 1,82 \times \text{Abs}_{550})}{(V \times t \times \text{OD}_{660})}$$

V= Volumen der Probe in ml

t= Inkubationszeit zwischen ONPG- und Natriumcarbonatzugabe

Tabelle 94: Zusammensetzung für 1 l Z-Puffer

Komponente	Menge
Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat	10,7 g
Natriumdihydratphosphat Dihydrat	6,24 g
Kaliumchlorid	0,75 g
Magnesiumchlorid Septahydrat	0,25 g
ddH ₂ O	ad 1 l
Frisch Mercaptoethanol (2,7 µl/ml) hinzugeben	

Tabelle 95: Zusammensetzung für ONPG-Lösung

Komponente	Menge
Natriumcarbonat	52,99 g
ddH ₂ O	ad 500 ml

Tabelle 96: Zusammensetzung für 1 M Natriumcarbonat

Komponente	Menge
Natriumcarbonat	52,99 g
ddH ₂ O	ad 500 ml

Tabelle 97: Zusammensetzung für 0,1% SDS-Lösung

Komponente	Menge
10% SDS	0,1 ml
ddH ₂ O	ad 10 ml

2.4.4 Co-Immunopräzipitation

Die Co-Immunopräzipitation (coIP) kann genutzt werden, um die Interaktion zwischen einem Protein und einer RNA *in vivo* zu untersuchen. Das Protein wird zu diesem Zweck an ein Protein-*tag* fusioniert, mit Hilfe dessen, das Protein aus dem Zellextrakt aufgereinigt werden kann. In dieser Arbeit wird ein *R. sphaeroides* Stamm genutzt, der ein Hfq-Protein exprimiert, welches mit einem 3xFLAG-*tag* versehen ist, wodurch das Protein durch Anti-FLAG® M2 Magnetic Beads aufgereinigt werden kann. Als Negativkontrolle wird ein *R. sphaeroides* Stamm genutzt, der das natürliche Hfq-Protein exprimiert. In beide Stämme wird zusätzlich ein Plasmid eingebracht, das zu einer Überexpression der *antisense* RNA asPcrL führt. Die Bakterienstämme werden unter mikroaeroben Bedingungen kultiviert bis sie eine OD₆₆₀ = 0,5 erreicht ist. Es werden jeweils 150 ml pro Stamm auf Eis geerntet und für 10 min bei 8.000 rpm

und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Bakterienpellet in 1 ml kaltem RÄ-Medium resuspendiert und in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Zentrifugation wird wiederholt und der Überstand verworfen. Das Pellet wird in 2 ml coIP-Puffer (Tabelle 98) resuspendiert und jeweils 1 ml in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Der Zellaufschluss erfolgt durch 4-malige Sonifikation (Intensität 70%, 30 sec) auf Eis. Um das Überhitzen der Proben zu vermeiden, wird zwischen den einzelnen Sonifikationsschritten jeweils 1 Minute pausiert. Die Zelltrümmer werden mittels Zentrifugation für 20 min bei 10.000 rpm und 4°C pelletiert. Der Überstand der jeweiligen Ansätze wird vereinigt und in 2 ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Membranbestandteile werden durch einen Ultrazentrifugationsschritt bei 58.000 rpm für 1h bei 4°C entfernt. Pro Ansatz werden jeweils 40 µl Anti-FLAG® M2 Magnetic Beads (Sigma-Aldrich) in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt und 2-mal mit 500 µl coIP-Puffer, durch 20-maliges auf- und abpipettieren, gewaschen. Um den Überstand zu entfernen, wird das Reaktionsgefäß in einen Magnetic Separator gestellt, wodurch sich die Beads am Gefäßrand ansammeln und der Überstand leicht mit einer Mikropipette entfernt werden kann. Nach der Ultrazentrifugation werden 180 µl des Überstandes in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und 200 µl 65°C warmes Phenol hinzugegeben. Der Ansatz wird durch vortexen gemischt und für 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die wässrige Phase wird in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, mit 200 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) vermischt und die Zentrifugation wiederholt. Die wässrige Phase wird erneut in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, mit 2,5-fachem Volumen 96% Ethanol und 0,1-fachem Volumen 3M Natriumacetat pH 4,5 (Tabelle 41) vermischt und die Proben über Nacht bei -20°C gelagert. Der restliche Überstand wird zu den gewaschenen Beads gegeben und für 2 Stunden unter kontinuierlichem Schütteln bei 4°C inkubiert. Im Anschluss wird das Reaktionsgefäß in den Magnetic Separator gestellt und des Zelllysats abgenommen. Um ungebundene RNA zu entfernen, werden die Beads mit 500 µl coIP-Puffer durch 20-maliges auf- und abpipettieren gewaschen und der Puffer im Anschluss verworfen. Der Waschschrift wird insgesamt 5-mal durchgeführt. Nach dem finalen Waschschrift werden die Beads in 400 µl coIP-Puffer aufgenommen, mit 400 µl vorgewärmtem Phenol gemischt und für 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die wässrige Phase wird in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, mit 400 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) vermischt und die Zentrifugation wiederholt. Die wässrige Phase wird in ein frisches 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und mit 2,5-fachem Volumen 96% Ethanol und 0,1-fachem Volumen 3M Natriumacetat pH 4,5 vermischt. Die Proben werden über Nacht bei -20°C gelagert. Die Fällung der RNA-Proben erfolgt für 30 min bei 13.000 rpm und 4°C. Der Überstand wird

verworfen und das Pellet mit 200 µl 75% Ethanol gewaschen. Der Ansatz wird für 5 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand erneut verworfen. Das Pellet wird in der Speedvac für 7 min getrocknet und in 44 µl Roth-Wasser aufgenommen. DNA-Verunreinigungen werden wie in Kapitel 2.3.9 beschrieben entfernt und die RNA im Anschluss bei -20°C gelagert.

Tabelle 98: Zusammensetzung für den coIP-Puffer

Komponente	Menge
1 M Tris pH 7,5	1 ml [20 mM]
1 M Kaliumchlorid	7,5 ml [150 mM]
1 M Magnesiumchlorid	50 µl [1 mM]
100 mM DTT	500 µl [1 mM]
Roth-H ₂ O	<i>ad</i> 50 ml

3 Ergebnisse

Die posttranskriptionelle Regulation spielt eine große und wichtige Rolle in der Entstehung des Transkriptoms. Neben der Translation sind auch RNasen und kleine regulatorische RNAs an der posttranskriptionellen Regulation beteiligt. Die Bedeutung von RNasen im RNA-Abbau konnte schon vor 60 Jahren festgestellt werden. In Gram-negativen Bakterien ist die RNase E eine essentielle RNase, die an der Degradation und Prozessierung verschiedener RNA-Spezies beteiligt ist.

3.1 RNase E in *Rhodobacter sphaeroides*

Um den Einfluss der RNase E auf das Transkriptom von *R. sphaeroides in vivo* zu untersuchen, wurde eine RNase E-Mutante benötigt. Da die RNase E in Gram-negativen Bakterien essentiell ist, ist eine klassische Deletion dieses Enzyms nicht möglich. Aus diesem Grund wurde eine Substitutionsmutante erstellt, die anstatt des endogenen *rne*-Gens aus *R. sphaeroides* 2.4.1 das *rne-3071* Allel aus dem *E. coli* N3431-Stamm besitzt (Goldblum und Apririon 1981). In dieser RNase E-Variante kommt es durch eine Punktmutation zu einem Aminosäureaustausch, wodurch ein temperatursensitives Enzym synthetisiert wird. Ab einer Temperatur von 42°C ist die RNase E inaktiv. Da die Substitutionsmutante bei 32°C lebensfähig ist und kultiviert werden konnte, ist davon auszugehen, dass die thermosensitive RNase E aus *E. coli*, die Funktion der endogene RNase E ersetzen kann. Jedoch fiel schon beim Betrachten von mikroaerob gewachsenen Kulturen auf, dass die Mutante eine hellere Färbung aufwies als der Wildtyp. Dies deutet darauf hin, dass es bereits unter normaler Wachstumstemperatur, ohne eine Inaktivierung des Enzyms durch Hitze, Unterschiede zwischen den zwei Enzymen gibt und die Funktion der endogenen RNase E nicht vollständig durch die *E. coli* RNase E ersetzt werden kann, beziehungsweise Unterschiede in der Funktionalität der beiden Enzyme vorliegen.

Um die Auswirkungen der Änderung des Transkriptoms auf die phänotypische Erscheinung zu untersuchen, wurden die Mutante und der Wildtyp sowohl mikroaerob als auch phototroph bei 32°C kultiviert. Der Bakteriochlorophyllgehalt wurde bestimmt und eine zellfreie-Absorptionsanalyse exponentiell-gewachsener Zellen durchgeführt. Sowohl der Bakteriochlorophyllgehalt, als auch die Absorptionsmaxima der Lichtsammelkomplexe I und II waren in der *rne^{E.c.ts}*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp unter den getesteten Wachstumsbedingungen reduziert. Unter mikroaeroben und phototrophen Bedingungen akkumuliert der Wildtyp 2,6-fach mehr Bakteriochlorophyll als die *rne^{E.c.ts}*-Mutante.

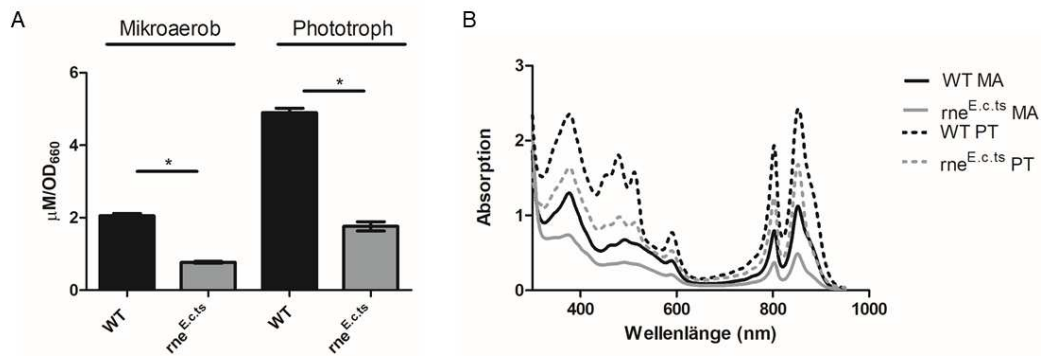


Abbildung 6: Die RNase E beeinflusst die Pigmentierung von *R. sphaeroides*. (A) Bestimmung des Bakteriochlorophyllgehalts des Wildtyps im Vergleich zur *rne^{E.c.ts}*-Mutante. Die Kulturen wurden unter mikroaeroben und phototrophen Bedingungen kultiviert und Proben in der späten exponentiellen Wachstumsphase geerntet. (B) Zellfreie-Absorptionsmessung des Wildtyps und der *rne^{E.c.ts}*-Mutante zwischen 600 und 900 nm. Die Kulturen wurden unter mikroaeroben (MA) und phototrophen (PT) Bedingungen kultiviert, in der späten exponentiellen Wachstumsphase geerntet und nach einem Zellaufschluss zur photometrischen Messung verwendet.

Um zu untersuchen, ob die Reduktion der Pigment-bindenden Proteine einen Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Mutante hat, wurden Wachstumsanalysen unter mikroaeroben und phototrophen Bedingungen durchgeführt. Während unter mikroaeroben Bedingungen kein Unterschied in der Wachstumsgeschwindigkeit und der Maximal-OD₆₆₀ beobachtet werden konnte, war das Wachstum der Mutante unter phototrophen Bedingungen stark beeinträchtigt. Während der Wildtyp eine Verdopplungszeit von ca. 12 Stunden besaß, verdoppelte sich die Mutante nur alle 34 Stunden. Auch in der Maximal-OD₆₆₀ konnten Unterschiede festgestellt werden. Während der Wildtyp nach 54 Stunden eine OD₆₆₀ = 1,6 erreichte, erreichte die Mutante nach 72 Stunden nur eine maximale OD₆₆₀ = 0,67 (Abbildung 7).

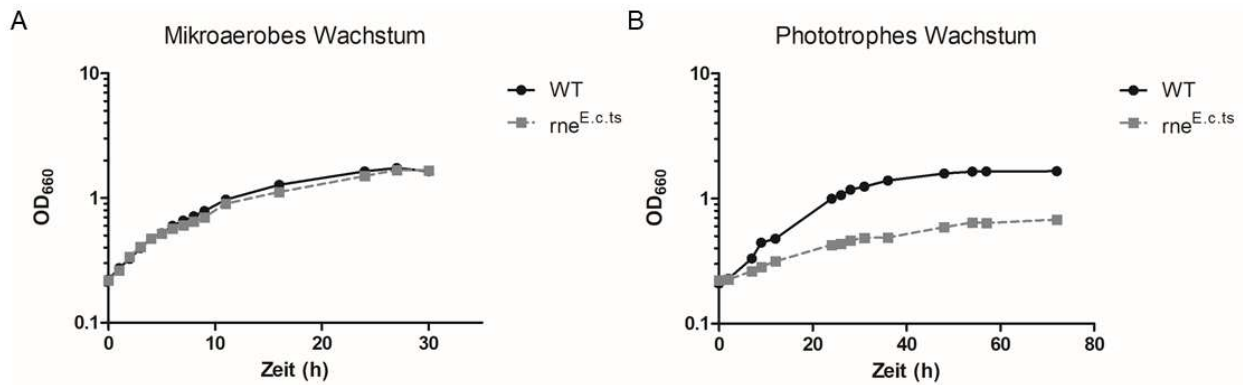


Abbildung 7: Die RNase E hat einen Einfluss auf das Wachstum unter phototropen Bedingungen. Wachstumsverhalten des Wildtypstamms im Vergleich zur *rne^{E.c.ts}*-Mutante. (A) Wachstumskurve des Wildtyps und der *rne^{E.c.ts}*-Mutante unter mikroaeroben Bedingungen. Der Mittelwert von biologischen Triplikaten wurde errechnet und gegen die Zeit auf einer semi-logarithmischen Skala aufgetragen. (B) Wachstumskurve des Wildtyps und der *rne^{E.c.ts}*-Mutante unter phototropen Bedingungen. Der Mittelwert von biologischen Triplikaten wurde errechnet und gegen die Zeit auf einer semi-logarithmischen Skala aufgetragen.

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Substitution der Wildtyp RNase E mit einer thermosensitiven Variante aus *E. coli* zu einer Veränderung in der Anpassung an oxidativen Stress führt. Sowohl unter tBOOH- als auch unter Paraquatstress fiel der Hemmfaktor der Mutante geringer aus als im Wildtyp. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Mutante resistenter gegenüber beiden Stressoren ist. Im Gegensatz dazu konnte beobachtet werden, dass unter photooxidativem Stress, welcher durch die Anwesenheit von Metylenblau unter Lichteinstrahlung stimuliert wird, das Wachstum der Mutante geringer ausfiel als das des Wildtyps (Abbildung 8).

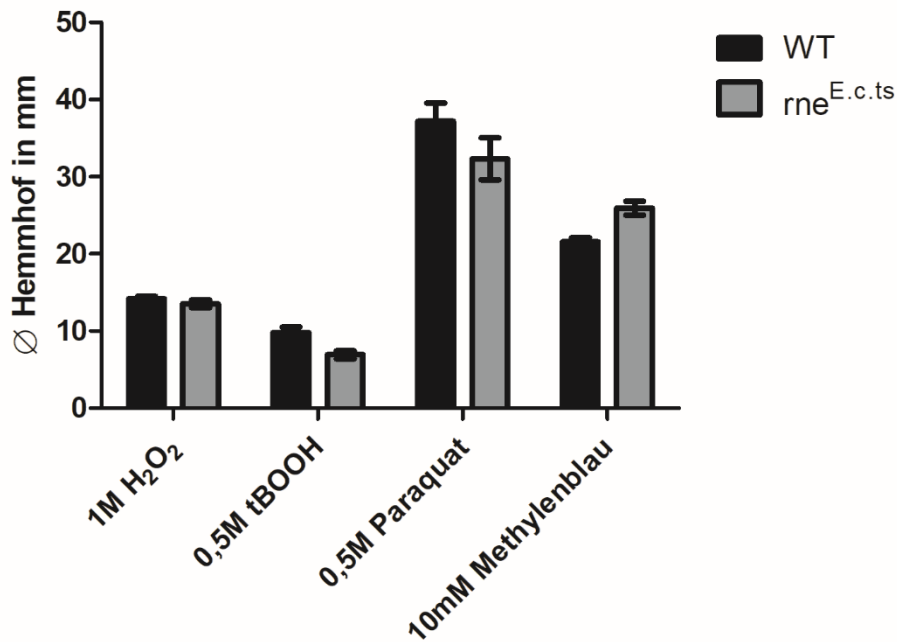


Abbildung 8: Die RNase E beeinflusst die Sensitivität gegenüber oxidativem Stress. Hemmhofstest des Wildtyps und der *rne^{E.c.ts}*-Mutante. Der Wildtyp und die *rne^{E.c.ts}*-Mutante wurden in Soft-Agarplatten gegossen und der jeweilige Stress auf ein Filterplättchen, welches auf dem Agar platziert wurde, appliziert. Die Platten wurden für 72 Stunden bei 32°C inkubiert. Der Durchmesser des beobachteten Hemmhofs wurde in mm gemessen. Der Mittelwert von biologischen Triplikaten und technischen Duplikaten wurde errechnet und die jeweilige Standardabweichung bestimmt.

Um die Bedeutung der RNase E im Hinblick auf die Prozessierungen und Degradationen im Hinblick auf verschiedene RNA-Spezies untersuchen zu können, wurden durch bioinformatische Analysen Transkriptom-weit die RNase E-Schnittstellen bestimmt. Für die TIER-Seq-Analyse (*transiently inactivating an endoribonuclease followed by RNA-Seq*) wurde der Wildtyp und die *rne^{E.c.ts}*-Mutante unter mikroaeroben Bedingungen bei 32°C bis zu einer OD₆₆₀ 0,5 kultiviert und Proben wurden für die RNA-Isolation gewonnen. Im Anschluss an die Probenentnahme wurden die verbleibenden Kulturen für 20 Minuten unter mikroaeroben Bedingungen bei 42°C inkubiert, um die RNase E in der Mutante zu inaktivieren. Nach dem 20-minütigen Temperaturshift wurden die Zellen ebenfalls für die RNA-Isolation genutzt. Bioinformatische Analysen zeigten, dass die RNase E einen großen Einfluss auf das Transkriptom in *Rhodobacter sphaeroides* besitzt. Die Ergebnisse der TIER-Seq-Studie bestätigten die Annahme, dass die thermosensitive RNase E-Variante die Funktion der endogenen RNase E nicht vollständig ersetzen kann. Bereits vor dem Temperaturshift auf 42°C konnten 19.000 5'-Enden detektiert werden, die in der Mutante im Vergleich zum Wildtyp angereichert waren.

Durch *5'-End-Mapping* konnten die RNase E-Schnittstellen im Genom von *R. sphaeroides* bestimmt werden. Dazu wurden die RNA-Seq-Ergebnisse des Wildtyps und der Mutante bei 32°C und 42°C miteinander verglichen. Wenn das 5'-Ende in allen vier Ansätzen detektierbar war, deutete das darauf hin, dass dieses 5'-Ende nicht durch einen Schnitt durch die RNase E entsteht. Wenn das 5'-Ende im Wildtyp unter 32°C und 42°C und in der *rne^{E.c.ts}*-Mutante jedoch nur unter 32°C detektierbar ist, deutet das darauf hin, dass dieses 5'-Ende durch die Spaltung der RNase E entsteht. Durch die Inaktivierung der RNase E in der Mutante bei 42°C, kann die RNase E-abhängige-Spaltung der RNA nicht durchgeführt werden und kein neues 5'-Ende entstehen. Durch diese Analyse konnten 23.000 5'-Enden, die in der Mutante unter 42°C angereichert waren, als RNase E-abhängige Schnittstellen identifiziert werden. 86% der RNase E-Schnittstellen sind dabei in kodierenden Sequenzen, 10% in der 5'-UTR, im Gegensatz dazu nur 2% in der 3'-UTR von mRNAs und jeweils 1% in rRNAs und sRNAs lokalisiert. Darüber hinaus konnte eine große Variation in der Menge der RNase E-Schnittstellen per Gen festgestellt werden. Trotz der Bedeutung der RNase E im RNA-Umsatz konnte über 2000 Gene identifiziert werden, die nicht durch die RNase E prozessiert oder degradiert werden. Zusätzlich wurden die angereicherten 5'-Enden in der Mutante bestimmt, wodurch weitere Aussagen über die Spezifität der RNase E getroffen werden konnte. Diese 5'-Enden entstehen, wenn Monophosphate am 5'-Ende von RNA-Molekülen entstehen, die von der RNase E favorisiert werden. Monophosphate entstehen entweder durch das Enzym RppH, welches die Abspaltung des Pyrophosphat katalysiert oder durch eine Schnittstelle einer anderen RNase, wie beispielsweise der RNase III oder auch RNase J. Die funktionstüchtige RNase E prozessiert das RNA-Molekül, welches ein Monophosphat trägt, direkt weiter, während das inaktive Enzym die Spaltung nicht mehr katalysieren kann, wodurch es zu einer Anreicherung des 5'-Endes in der Mutante unter 32°C oder 42° kommt. Durch eine Clusteranalyse konnten 10.000 5'-Enden detektiert werden, die in der Mutante im Vergleich zum Wildtyp angereichert waren. Die Verteilung der 5'-Enden, die in der Mutante angereichert sind, ähneln die der identifizierten RNase E-Schnittstellen. Jedoch konnte beobachtet werden, dass die in der Mutante angereicherten 5'-Enden mit 3% besonders häufig in rRNA-Spezies gefunden werden.

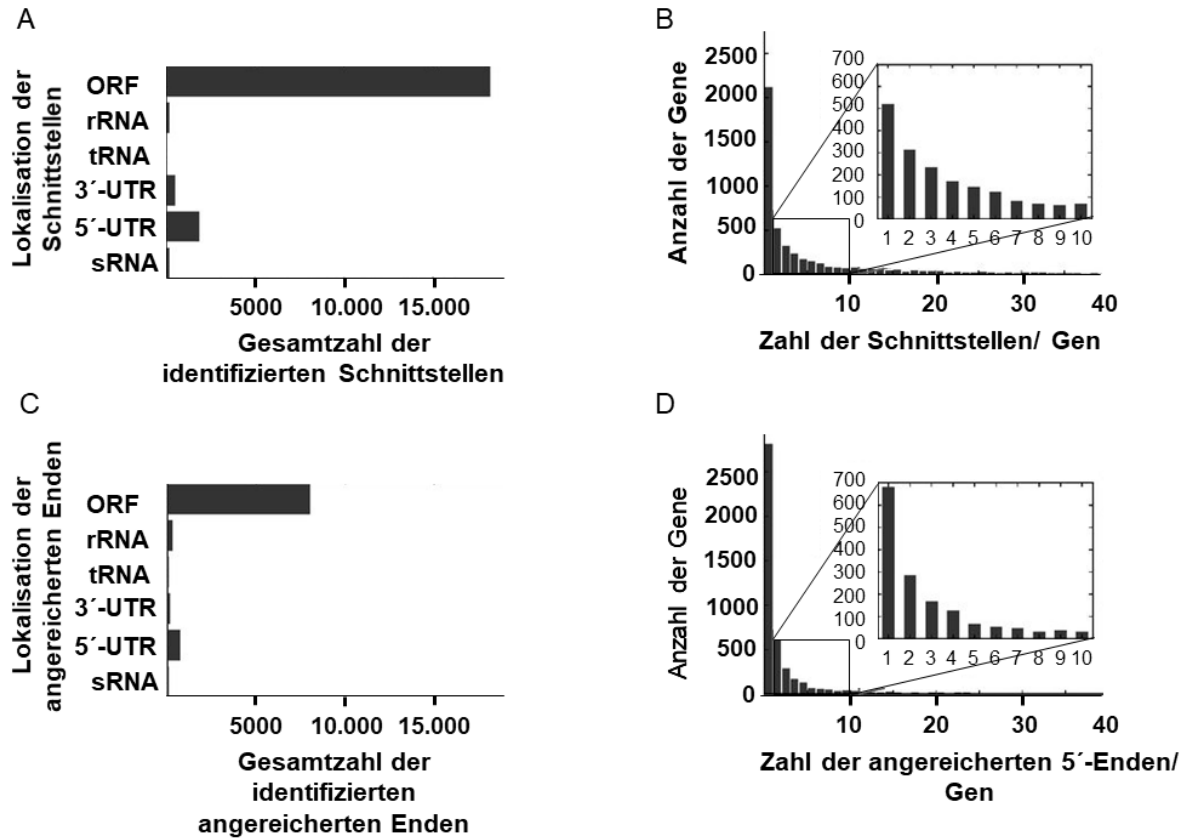


Abbildung 9: Statistische Auswertung der RNase E-Schnittstellen und in der RNase E-Mutante angereicherten 5'-Enden. (A+C) Summe der RNase E-Schnittstellen beziehungsweise in der Mutante angereicherten 5'-Enden verteilt auf unterschiedlichen RNA-Kategorien. (B+D) Histogramm zur Verteilung der Anzahl der RNase E-Schnittstellen beziehungsweise in der Mutante angereicherten 5'-Enden pro Gen. Die bioinformatischen Analysen wurden von Konrad Förstner durchgeführt.

Eine Motivanalyse durch MEME zeigte, dass 7.000 der 23.000 identifizierten RNase E-Schnittstellen AU-reiche Sequenzen an der Position der Schnittstelle aufwiesen. Für die in der Mutante angereicherten 5'-Enden konnte nur in einer kleinen Subfraktion (439 der 10.000 Stellen) ein Sequenzmotiv von UCGA detektiert werden.

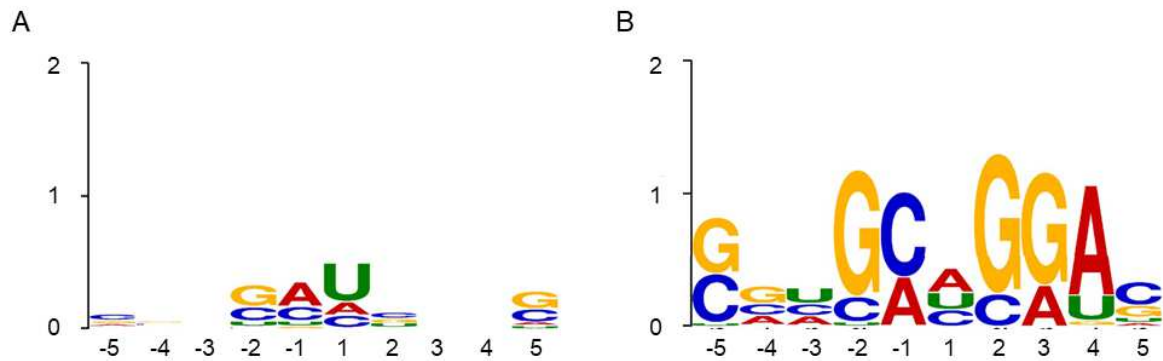


Abbildung 10: Sequenz-Motivanalyse. Die Sequenzmotiv-Analyse der identifizierten RNase E-Schnittstellen (A) und der in der RNase E angereicherten 5'-Enden (B) durchgeführt von Konrad Förstner.

Um die beobachteten phänotypischen Unterschiede in der RNase E-Mutante besser verstehen zu können, wurde die Abundanz und Prozessierung einiger ausgewählter sRNAs und mRNA genauer untersucht. Die beiden sRNAs SorX und SorY konnten bereits in früheren Studien charakterisiert und ihre Rollen in der Antwort auf oxidativen Stress beobachtet werden. Die sRNA SorX ist in der 3'-UTR einer mRNA lokalisiert und wird mit dieser zusammen kotranskribiert (Peng *et al.* 2016). In der Northern Blot Analyse konnte sowohl in den Wildtyp- als auch in den RNase E-Mutante-Proben unter 32°C und 42°C ein Signal für das 116 nt-lange Pre-SorX detektiert werden, welches in der Mutante unter 32°C akkumuliert. Dies spricht dafür, dass die initiale Prozessierung aus der 3'-UTR der mRNA von einer anderen RNase als die RNase E katalysiert wird. Auch die TIER-Seq-Daten bestätigen diese Beobachtung, da ein in der RNase E-Mutante angereichertes 5'-Ende unter 42°C bei Genomposition 2.598.182 detektiert werden kann. Jedoch ist sowohl in der Northern Blot Analyse als auch durch die TIER-Seq-Daten zu erkennen, dass das 75 nt-lange reife SorX in Abhängigkeit der RNase E entsteht. In der Northern Blot Analyse ist in den Wildtyp-Proben sowohl bei 32°C als auch bei 42°C ein starkes Signal für SorX detektierbar. In den Proben der RNase E Mutante hingegen, kann schon unter 32°C nur ein schwaches und unter 42°C gar kein Signal für SorX detektiert werden. Die TIER-Seq-Daten bestätigen eine RNase E-Schnittstelle in der 5'-Region von SorX bei einer Genomposition von 2.589.224.

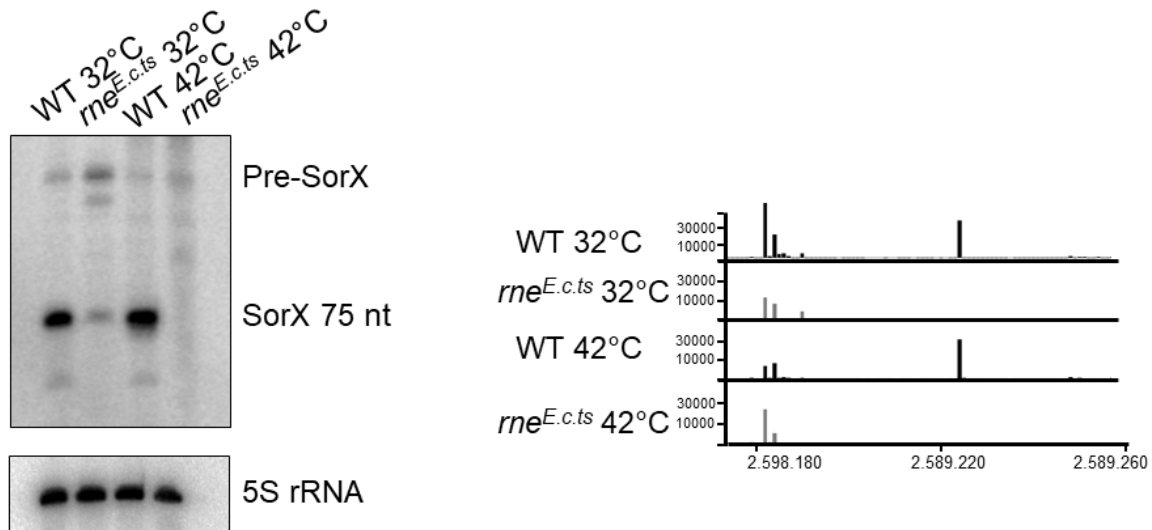


Abbildung 11: RNase E-abhängige Prozessierung der sRNA SorX. Northern Blot Analyse der Gesamt-RNA von *R. sphaeroides* 2.4.1 Wildtyp und der *rne^{E.c.ts}*-Mutante. Die Kulturen wurden unter mikroaeroben Bedingungen bei 32°C und für 20 Minuten bei 42°C kultiviert. Jeweils 10 µg der Gesamt-RNA wurden auf ein 10% Urea-Polyacrylamidgel geladen. Eine spezifische radioaktiv-markierte Sonde gegen SorX wurde zur Detektion genutzt. Die 5S rRNA diente als Ladekontrolle. Zusätzlich ist die Ansicht der 5'-Enden in Einzelnukleotid-Auflösung im Integrated Genome Browser gezeigt. Screenshot der angereicherten 5'-Enden im Wildtyp und der *rne^{E.c.ts}*-Mutante bei 32°C und nach einem 20-minütigen Temperaturshift auf 42°C, die durch bioinformatische RNA-Seq-Analyse der Gesamt-RNA bestimmt wurden.

Im Gegensatz zu SorX wird die sRNA SorY von einem eigenen Promoter transkribiert (Adnan *et al.* 2015). Die Northern Blot Analyse zeigte, dass die Expression von SorY durch den 20-minütigen Hitzestress sowohl in der Mutante als auch im Wildtyp induziert wird. Für die RNase E-Mutante konnte sowohl unter 32°C als auch bei 42°C ein stärkeres Signal für SorY als im Wildtyp detektiert werden. Die TIER-Seq-Daten zeigen ebenfalls eine Anreicherung des 5'-Endes von SorY in der Mutante unter beiden Temperaturen.

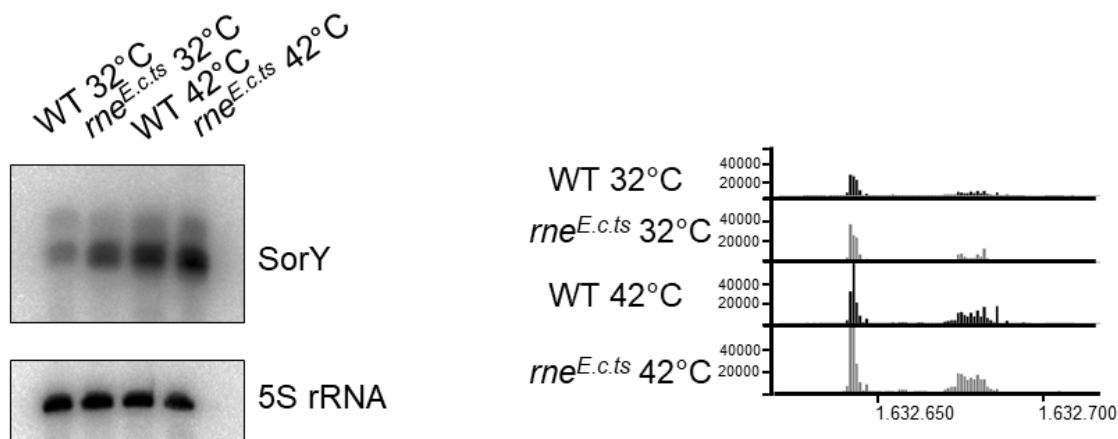


Abbildung 12: RNase E-abhängige Prozessierung der sRNA SorY. Northern Blot Analyse der Gesamt-RNA von *R. sphaeroides* 2.4.1 Wildtyp und der *rne^{E.c.ts}*-Mutante. Die Kulturen wurden unter mikroaeroben Bedingungen bei 32°C und für 20 Minuten bei 42°C kultiviert. Jeweils 10 µg der Gesamt-RNA wurden auf ein 10% Urea-Polyacrylamidgel geladen. Eine spezifische radioaktiv-markierte Sonde gegen SorY wurde zur Detektion genutzt. Die 5S rRNA diente als Ladekontrolle. Zusätzlich ist die Ansicht der 5'-Enden in Einzelnukleotid-Auflösung im Integrated Genome Browser gezeigt. Screenshot der angereicherten 5'-Enden im Wildtyp und der *rne^{E.c.ts}*-Mutante bei 32°C und nach einem 20 minütigen Temperaturshift auf 42°C, die durch bioinformatische RNA-Seq-Analyse der Gesamt-RNA bestimmt wurden.

Neben den beiden Stress-assoziierten sRNAs SorX und SorY konnte auch gezeigt werden, dass die in der 5'-UTR des *division cell wall (dwc)*-Clusters lokalisierte sRNA UpsM von der RNase E prozessiert wird (Weber *et al.* 2016). Das, durch die RNA-Seq-Daten, identifizierte 5'-Ende an Genomposition 694.635 stimmt mit dem Transkriptionsstart der sRNA überein. Ein weiteres 5'-Ende an Genomposition 694.720 ist hingegen in der Mutante bereits unter 32°C leicht abgereichert und unter 42°C nicht mehr detektierbar. Durch die Northern Blot Analyse konnten die Beobachtungen der TIER-Seq-Daten bestätigt werden. Das 206 nt lange UpsM-Fragment war sowohl in der Mutante als auch im Wildtyp unter beiden Temperaturen detektierbar. Im Wildtyp nahm die Signalintensität unter 42°C jedoch ab, während das 130 nt lange Prozessierungsfragment zunahm. Zwar konnte in der Mutante keine Abreicherung des 206 nt langen Primärtranskript, aber auch keine Prozessierung in das 130 nt lang Prozessierungsfragment beobachtet werden.

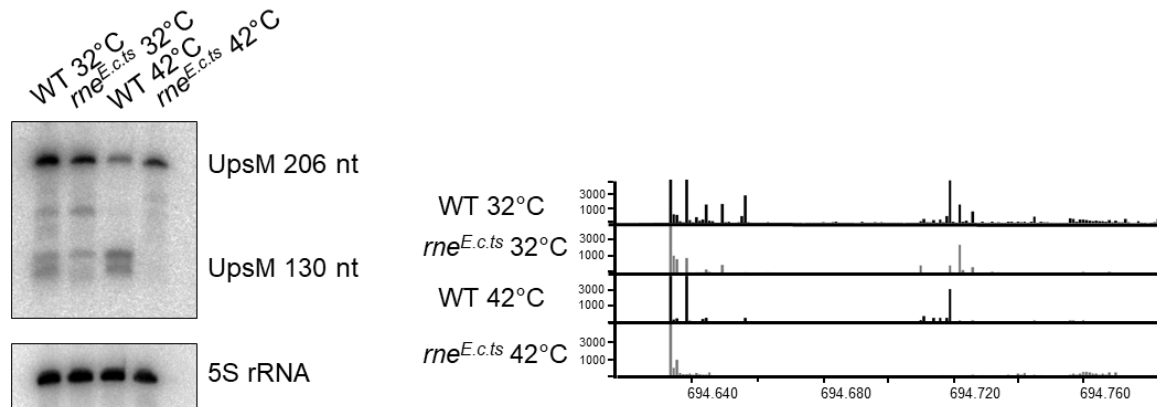


Abbildung 13: RNase E-abhängige Prozessierung der sRNA UpsM. Northern Blot Analyse der Gesamt-RNA von *R. sphaeroides* 2.4.1 Wildtyp und der *rne^{E.c.ts}*-Mutante. Die Kulturen wurden unter mikroaeroben Bedingungen bei 32°C und für 20 Minuten bei 42°C kultiviert. Jeweils 10 µg der Gesamt-RNA wurden auf ein 10% Urea-Polyacrylamidgel geladen. Eine spezifische radioaktiv-markierte Sonde gegen UpsM wurde zur Detektion genutzt. Die 5S rRNA diente als Ladekontrolle. Zusätzlich ist die Ansicht der 5'-Enden in Einzelnukleotid-Auflösung im Integrated Genome Browser gezeigt. Screenshot der angereicherten 5'-Enden im Wildtyp und der *rne^{E.c.ts}*-Mutante bei 32°C und nach einem 20-minütigen Temperaturshift auf 42°C, die durch bioinformatische RNA-Seq-Analyse der Gesamt-RNA bestimmt wurden.

Da neben der veränderten Stressresistenz auch eine Veränderung im phototropen Wachstum beobachtet werden konnte, wurde das bereits in der Vergangenheit gut charakterisierte *puf*-Operon im Hinblick auf RNase E-Schnittstellen untersucht. Die RNase E-abhängige Prozessierung konnte bereits für *R. capsulatus*, einem nahem Verwandten von *R. sphaeroides* nachgewiesen werden. Durch die TIER-Seq-Analyse konnten mehrere RNase E-Schnittstellen in der *puf*-mRNA von *R. sphaeroides* identifiziert werden. Eine AU-reiche Schnittstelle ist in der 5'-Region von *pufL* und eine weitere in der interzistronischen Region zwischen *pufA* und *pufL* lokalisiert. Gleichzeitig konnte eine RNase E-unabhängige Schnittstelle *upstream* der RNase E-Schnittstellen identifiziert werden, die in der RNase E-Mutante mit 700 *reads* im Vergleich zu Wildtyp mit 300 *reads* stark angereichert ist (Abbildung 14).

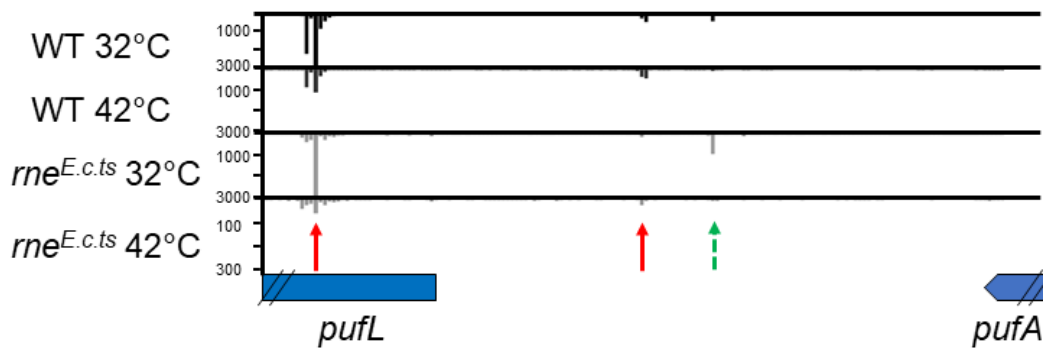


Abbildung 14: Identifizierung der RNase E-Schnittstellen im 5'-Ende von *pufL*. Ansicht auf die interzistronische Region von *pufAL* im Integrated Genome Browser. Screenshot der angereicherten 5'-Enden im Wildtyp und der *rne^{E.c.ts}*-Mutante bei 32°C und nach einer 20 minütigen Temperaturerhöhung auf 42°C, die durch bioinformatische RNA-Seq-Analyse der Gesamt-RNA bestimmt wurden. Die Skala für die *rne^{E.c.ts}*-Mutante bei 42°C wurde auf ein Maximum von 300 reads eingestellt, die der anderen Proben auf ein Maximum von 3000. Die roten, durchgehenden Pfeile markieren die RNase E-Schnittstellen während der grüne, gestrichelte Pfeil eine RNase E-unabhängige Schnittstelle zeigt.

In vorherigen Arbeiten konnten bereits die zwei sRNAs PcrZ (Mank *et al.* 2012) und PcrX (Eisenhardt *et al.* 2018) identifiziert werden, die einen direkten, regulatorischen Einfluss auf einige Photosynthesegene haben und deren Prozessierungen durch die RNase E katalysiert werden. Das 136 nt lange Primärtranskript von PcrZ wird von einem eigenen Promoter transkribiert und im Anschluss prozessiert, wodurch ein 55 nt langes Fragment entsteht. Durch die TIER-Seq-Analyse konnte an Genomposition 2.565.914 ein 5'-Ende identifiziert werden, welches in der RNase E-Mutante schon bei 32°C, im Vergleich zum Wildtyp, stark angereichert war. Unter 42°C ist dieses 5'-Ende zusätzlich zur Mutante auch im Wildtyp stark angereichert, was durch eine Destabilisierung der RNA durch die erhöhte Temperatur zu Stande kommen könnte. Anhand der Northern Blot Analyse konnten keine großen Unterschiede festgestellt werden. Sowohl im Wildtyp als auch in der Mutante sind die Signale für das Primärtranskript und das Prozessierungsprodukt unter 32°C und 42°C zu detektieren. Frühere Experimente konnten jedoch bereits zeigen, dass PcrZ eine sehr lange Halbwertszeit von über 160 min besitzt, was erklären könnte warum die 20-minütige Inaktivierung der RNase E nur wenig Einfluss auf die Abundanz von PcrZ hat.

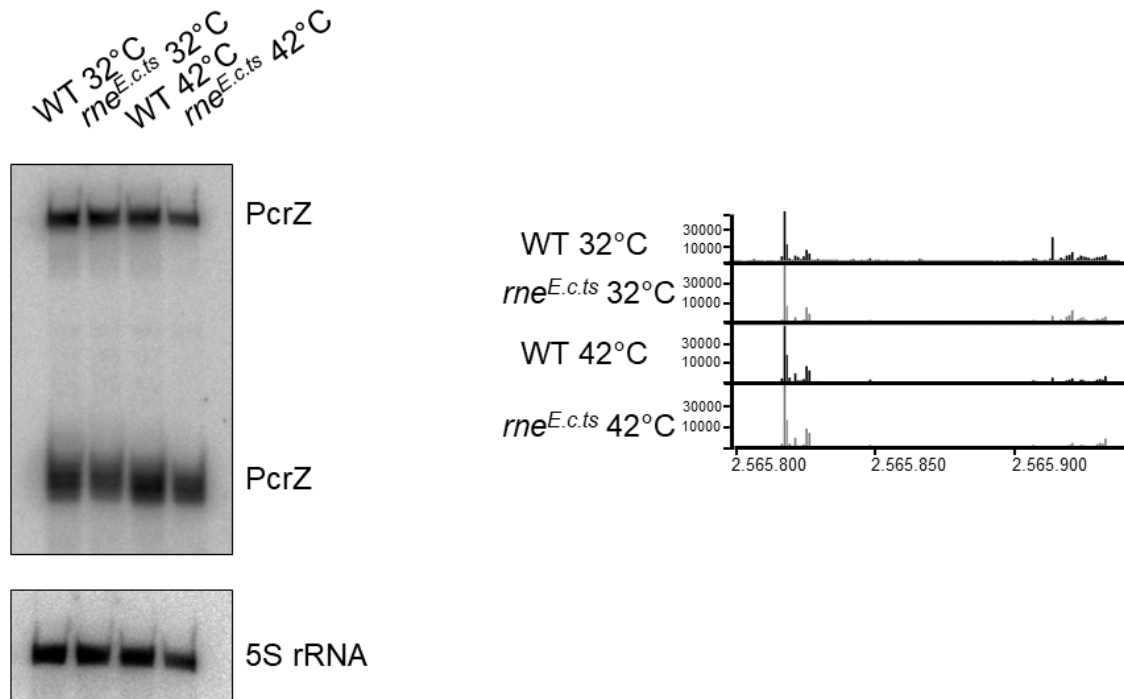


Abbildung 15: RNase E-abhängige Prozessierung der sRNA PcrZ. Northern Blot Analyse der Gesamt-RNA von *R. sphaeroides* 2.4.1 Wildtyp und der *rne^{E.c.ts}*-Mutante. Die Kulturen wurden unter mikroaeroben Bedingungen bei 32°C und für 20 Minuten bei 42°C kultiviert. Jeweils 10 µg der Gesamt-RNA wurden auf ein 10% Urea-Polyacrylamidgel geladen. Eine spezifische radioaktiv-markierte Sonde gegen PcrZ wurde zur Detektion genutzt. Die 5S rRNA diente als Ladekontrolle. Zusätzlich ist die Ansicht der 5'-Enden in Einzelnukleotid-Auflösung im Integrated Genome Browser gezeigt. Screenshot der angereicherten 5'-Enden im Wildtyp und der *rne^{E.c.ts}*-Mutante bei 32°C und nach einem 20-minütigen Temperaturshift auf 42°C, die durch bioinformatische RNA-Seq-Analyse der Gesamt-RNA bestimmt wurden.

PcrX konnte als zweite sRNA identifiziert werden, die einen Einfluss auf die Regulation der Photosynthesegene besitzt. Anders als PcrZ wird sie nicht von einem eigenen Promoter, sondern zusammen mit den anderen Genen des *puf*-Operons, transkribiert. PcrZ ist in der 3'-UTR *downstream* des letzten *puf*-Operons *pufX* lokalisiert. Durch die TIER-Seq-Analyse konnte ein 5'-Ende identifiziert werden, welches in der RNase E-Mutante bereits unter 32°C und auch unter 42°C im Vergleich zum Wildtyp stark abgereichert ist. Diese RNase E-Schnittstelle ist am 5'-Ende von PcrX an Genomposition 1.980.343 lokalisiert. Ein weiteres, in der Mutante unter 42°C abgereichertes 5'-Ende konnte an Genomposition 1.980.295 identifiziert werden, welches auf eine weitere RNase E-Schnittstelle in der Mitte der PcrX-Sequenz hindeutet. Auch die Northern Blot Analyse zeigt eine Reduktion des PcrX-Signals in der RNase E-Mutante unter beiden Temperaturen. Ähnlich wie PcrZ besitzt auch PcrX eine lange Halbwertszeit von über 200 Minuten, sodass auch bei PcrX die 20-minütige Inaktivierung der RNase E wenig Einfluss auf die Menge der RNA hat.

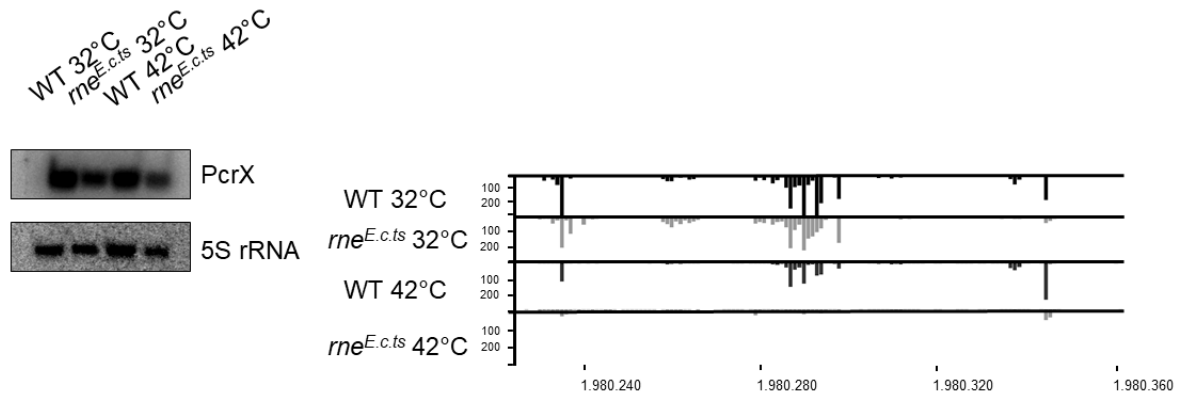


Abbildung 16: RNase E-abhängige Prozessierung der sRNA PcrX. Northern Blot Analyse der Gesamt-RNA von *R. sphaeroides* 2.4.1 Wildtyp und der *rne^{E.c.ts}*-Mutante. Die Kulturen wurden unter mikroaeroben Bedingungen bei 32°C und für 20 Minuten bei 42°C kultiviert. Jeweils 10 µg der Gesamt-RNA wurden auf ein 10% Urea-Polyacrylamidgel geladen. Eine spezifische radioaktiv-markierte Sonde gegen PcrX wurde zur Detektion genutzt. Die 5S rRNA diente als Ladekontrolle. Zusätzlich ist die Ansicht der 5'-Enden in Einzelnukleotid-Auflösung im Integrated Genome Browser gezeigt. Screenshot der angereicherten 5'-Enden im Wildtyp und der *rne^{E.c.ts}*-Mutante bei 32°C und nach einem 20-minütigen Temperaturshift auf 42°C, die durch bioinformatische RNA-Seq-Analyse der Gesamt-RNA bestimmt wurden.

Durch RNA-Seq-Studien konnte 2009 eine dritte sRNA identifiziert werden. Diese ist auf dem Gegenstrang des *puf*-Operon lokalisiert, welches die Proteine des Lichtsammelkomplex I (LH I) und des Reaktionszentrum (RC) kodiert. Durch den *antisense*-Charakter von asPcrL (*antisense photosynthesis controlling RNA pufL*) ist es wahrscheinlich, dass die asRNA ebenfalls an der Regulation der Photosynthesegene involviert ist.

3.2 Lokalisation von asPcrL

RNA-Seq-Studien von mikroaerob kultivierten *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 Kulturen zeigten die Existenz einer *antisense* RNA, die auf dem Gegenstrang der für das *puf*-Operon kodierenden Sequenz lokalisiert ist. Die *cis*-kodierte kleine RNA asPcrL, liegt komplementär zum 5'-Endes des *pufL*-Gens und der interzistronischen Region von *pufA* und *pufL* (Abbildung 17). Dabei überdeckt sie sowohl die Ribosomenbindestelle als auch eine durch TIER-Seq-Analysen identifizierte RNase E Schnittstelle (Kapitel 3.1) des *pufL*-Gens. Durch dSeq-Analysen beziehungsweise 5'-RACE konnte der Transkriptionsstart von asPcrL an der Genomposition 1.982.339 identifiziert beziehungsweise bestätigt werden. Das 3'-Ende von asPcrL liegt 186 bp *downstream* des 5'-Endes an Genomposition 1.982.525.

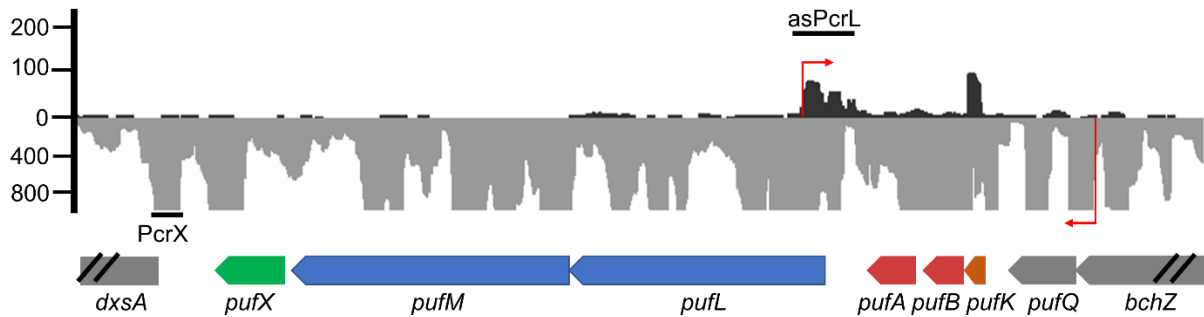


Abbildung 17: Identifizierung der antisense RNA asPcrL. Auf Gesamt-RNA-Seq-Studien basierte Ansicht auf das *puf*-Operon. Screenshot des Integrated Genome Browsers zeigt die Gesamt-*reads* der RNA-Seq-Analyse des *puf*-Operons auf dem Minusstrang und die *reads* von asPcrL auf dem Plusstrang. Die roten Pfeile markieren die jeweiligen Transkriptionsstarts.

3.3 Expressionsprofil von asPcrL

Zur Bestimmung der Promoterregion von asPcrL wurde ein bioinformatisches Prognoseprogramm (BPROM) verwendet, mit der allerdings keine Promotersequenz *upstream* von asPcrL vorhergesagt wurden. Daher wurde die Promoterregion durch eine Plasmid-basierte transkriptionelle Fusion bestimmt. 159 bp, die direkt *upstream* des 5'-Endes lokalisiert sind, wurden mittels PCR amplifiziert und in den Vektor pBBR-MCS5-*lacZ* *upstream* eines *lacZ*-Gens kloniert, welches über eine eigene Ribosomenbindestelle und ein Startcodon verfügt. Das resultierende Plasmid PasPcrL wurde in den *R. sphaeroides* 2.4.1 Wildtyp konjugiert, der resultierende Stamm unter aeroben, mikroaeroben beziehungsweise phototrophen Bedingungen kultiviert, die Zellen wurden in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet und für einen β -Galaktosidase Assay verwendet. Als Kontrolle wurde ein Wildtyp-Stamm verwendet, der den Vektor pBBR-MCS5-*lacZ* ohne die potentielle Promoterregion von asPcrL trägt. Unter allen getesteten Bedingungen konnte ein geringer Substratumsatz nachgewiesen werden, welcher auf eine schwache Promoteraktivität schließen lässt (Abbildung 18). Die schwache Promoteraktivität deckt sich mit den RNA-Seq-Daten, die ebenfalls darauf hindeuten, dass die Abundanz von asPcrL geringer ist als die der andern Gene des *puf*-Operons, deren nativer Promoter *upstream* des *pufQ*-Gens unter mikroaeroben Bedingungen eine 35-fach starke Aktivität zeigte (Abbildung 25B). Die Promoteraktivität unterscheidet sich innerhalb der getesteten Wachstumsbedingungen nur geringfügig, wobei die stärkste Aktivität unter aeroben Bedingungen zu beobachten ist und diese unter mikroaeroben und phototrophen Bedingungen leicht abnimmt. Dagegen konnte in der Kontrolle unter allen getesteten Bedingungen ein geringerer Substratumsatz von ca. 4 MU gemessen werden.

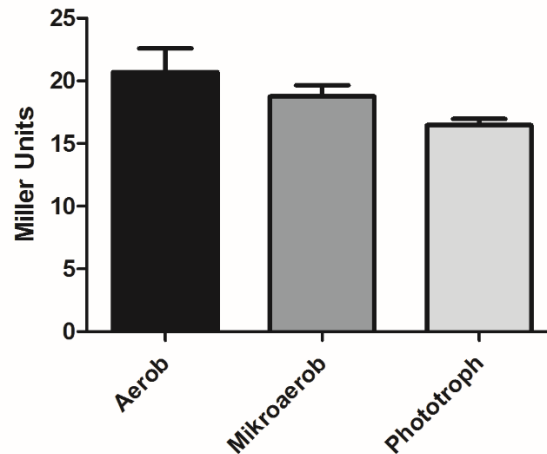


Abbildung 18: asPcrL wird von einem eigenen Promoter transkribiert. β -Galaktosidase Assay zur Bestimmung der Promoteraktivität von asPcrL. Das Plasmid PasPcrL wurde über diparentale Konjugation in den Wildtyp eingebracht. Der resultierende Stamm wurde unter aeroben, mikroaeroben beziehungsweise phototrophen Bedingungen kultiviert, Proben wurden in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet und für einen β -Galaktosidase Assay eingesetzt. Der Mittelwert aus biologischen Triplikaten und technischen Duplikaten ist in Miller Units mit Standardabweichung gezeigt.

Die Ergebnisse der Plasmid-basierten transkriptionellen Fusion zeigen, dass sich *upstream* der asPcrL-Sequenz ein schwacher Promoter befindet. Die Existenz von asPcrL sollte unter den zuvor untersuchten Wachstumsbedingungen durch eine Northern Blot Analyse (Abbildung 19A) bestätigt werden. Der Wildtyp wurde unter aeroben Bedingungen inkubiert und nach Probenentnahme in der frühen exponentiellen Wachstumsphase unter mikroaeroben und anschließend unter phototrophen Bedingungen kultiviert. Nach jeweils 30, 60, 90, 120 und 180 min wurde eine weitere Probe entnommen. Die Gesamt-RNA der Proben wurde für eine Northern Blot Analyse verwendet. Unter aeroben Wachstumsbedingungen ist asPcrL nicht detektierbar. Erst nach dem *shift* zu mikroaeroben Bedingungen ist asPcrL nachweisbar, wobei die Menge der RNA über die gemessenen Zeitpunkte zunimmt. Nach 180 Minuten mikroaerober Kultivierung sinkt die Menge an asPcrL leicht ab. Nach dem *shift* zu phototrophen Wachstumsbedingungen ist ein erneuter Anstieg der RNA-Menge zu beobachten. Das RNA-Level nimmt nach 180 Minuten erneut ab.

Die Expression von asPcrL ist von mehreren Regulatorproteinen abhängig. Durch eine Northern Blot Analyse (Abbildung 19B) konnte gezeigt werden, dass in Deletionsmutanten, die einen der Sauerstoff- und Licht-abhängigen Regulatoren nicht exprimieren können, die Expression von asPcrL stark eingeschränkt ist. Fehlt dem Stamm der aktivierende Antwortregulator PrrA ist die Menge von asPcrL unter dem Detektionslevel. Die Expression von asPcrL ist ebenfalls stark reduziert, wenn der Anti-Repressor AppA, der eine

antagonistische Wirkung auf den Repressor PpsR besitzt, oder der Aktivator FnrL deletiert sind. In der Vergangenheit konnte bereits gezeigt werden, dass die genannten Regulatoren ebenfalls die Expression des *puf*-Operons und anderer Photosynthesegene aktivieren können.

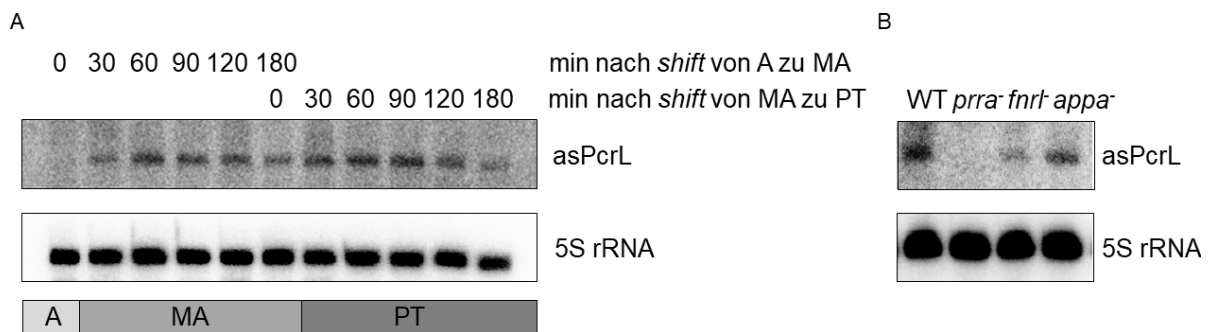


Abbildung 19: Expressionsprofil von asPcrL. (A) Northern Blot Analyse der Gesamt-RNA von *R. sphaeroides* 2.4.1. Die Kultur wurde unter aeroben (A) Bedingungen kultiviert, nach einer Probenentnahme ($t=0$) unter mikroaeroben (MA) und im Anschluss unter phototrophen (PT) Wachstumsbedingungen kultiviert. Proben wurden zu den aufgeführten Zeitpunkten geerntet. Jeweils $10\ \mu\text{g}$ der Gesamt-RNA wurden auf ein 10% Urea-Polyacrylamid-Gel geladen. Eine spezifische radioaktiv-markierte Sonde gegen asPcrL wurde zur Detektion genutzt. Die 5S rRNA dient als Ladekontrolle. (B) Northern Blot Analyse der Gesamt-RNA von *R. sphaeroides* 2.4.1 Wildtyp und unterschiedlichen Regulator-Deletionsmutanten. Die Kulturen wurden unter mikroaeroben Bedingungen kultiviert und in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet. Jeweils $10\ \mu\text{g}$ der Gesamt-RNA wurden auf ein 10% Urea-Polyacrylamidgel geladen. Eine spezifische radioaktiv-markierte Sonde gegen asPcrL wurde zur Detektion genutzt. Die 5S rRNA diente als Ladekontrolle.

3.4 Phänotypische Charakterisierung der Überexpression von asPcrL

Aufgrund des *antisense*-Charakters von asPcrL ist eine herkömmliche Deletion der Sequenz der sRNA nicht möglich, ohne dabei ebenfalls Abschnitte der kodierende Sequenz des *pufL*-Gens zu deletieren. Aus diesem Grund wurde eine Plasmid-basierte Überexpression von asPcrL genutzt, um dessen Funktion *in vivo* genauer zu untersuchen. Die Sequenz von asPcrL wurde amplifiziert und in den pRK415 Ω -Vektor ligiert, der einen Phagenterminator enthält. Im Anschluss wurde die asPcrL-Sequenz und der Phagenterminator in den pBBR:16S-Vektor kloniert, der die Sequenz des konstitutiven 16S rRNA-Promoters beinhaltet. Das resultierende Plasmid pBBR_asPcrL wurde mittels Konjugation in den Wildtypstamm von *R. sphaeroides* 2.4.1 überführt. Als Kontrolle diente ein Stamm, der das pBBR:16S-Plasmid ohne die asPcrL-Sequenz beinhaltet. Der Überexpressionsstamm 2.4.1_pBBR:asPcrL zeigt unter allen getesteten Wachstumsbedingungen höhere asPcrL-Expressionslevel als der Kontrollstamm

2.4.1_pBBR:16S (Abbildung 20). Interessanter Weise ist das stärkste Signal für asPcrL im Überexpressionsstamm unter aeroben Wachstumsbedingungen zu beobachten. Unter dieser Bedingung ist 3,4-fach bzw. 1,9-fach mehr asPcrL in den Zellen vorhanden als unter mikroaeroben bzw. phototrophen Bedingungen.

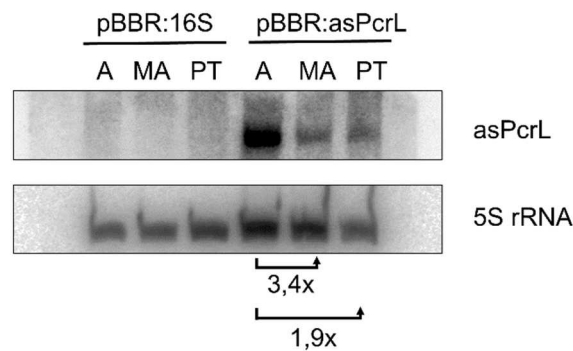


Abbildung 20: Expressionsprofil von asPcrL im Überexpressionsstamm 2.4.1_pBBR:asPcrL. Northern Blot Analyse der Gesamt-RNA von *R. sphaeroides* Leervektorkontrolle 2.4.1_pBBR:16S und dem Überexpressionsstamm 2.4.1_pBBR:asPcrL. Die Kulturen wurden unter aeroben (A), mikroaeroben (MA) und phototrophen (PT) Bedingungen kultiviert und in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet. Jeweils 10 µg der Gesamt-RNA wurden auf ein 10% Urea-Polyacrylamid-Gel geladen. Eine spezifische radioaktiv-markierte Sonde gegen asPcrL wurde zur Detektion genutzt. Die 5S rRNA diente als Ladekontrolle.

Während der Kultivierung beider Stämme unter mikroaeroben Bedingungen konnte beobachtet werden, dass der Überexpressionsstamm 2.4.1_pBBR:asPcrL eine hellere Färbung aufweist als der Kontrollstamm 2.4.1_pBBR:16S (Abbildung 21).

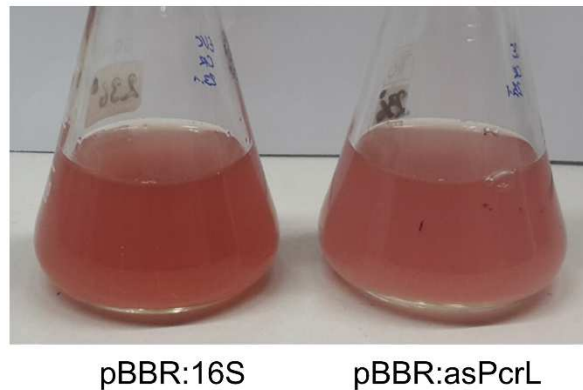


Abbildung 21: AsPcrL beeinflusst die Pigmentierung von *R. sphaeroides*. Photographie des Kontrollstamms 2.4.1_pBBR:16S und des Überexpressionsstamms 2.4.1_pBBR:asPcrL. Die Kulturen wurden unter mikroaeroben Bedingungen bis zur späten exponentiellen Wachstumsphase kultiviert. Der Überexpressionsstamm zeigt eine hellere Färbung als der Kontrollstamm.

Um diese Aussage zu verifizieren, wurde der Bakteriochlorophyll- sowie der Carotinoidgehalt der Stämme bestimmt. Die Stämme wurden über Nacht unter aeroben Bedingungen kultiviert, um die Akkumulation von photosynthetischen Komplexen zu verhindern. Am nächsten Tag wurden sie unter mikroaeroben bzw. phototrophen Bedingungen kultiviert. Die Probenentnahme erfolgte in der spät exponentiellen Wachstumsphase. Unter allen gemessenen Wachstumsbedingungen zeigt der Überexpressionsstamm eine Reduktion des Bakteriochlorophyll- und Carotinoidgehalts im Vergleich zum Kontrollstamm (Abbildung 22). Unter phototrophen Bedingungen wurden der Bakteriochlorophyll- und der Carotinoidgehalt zu unterschiedlichen Zeitpunkten gemessen. 6 Stunden nach dem *shift* von aeroben zu phototrophen Bedingungen weist der Kontrollstamm doppelt so viel Bakteriochlorophyll und 1,9-fach mehr Carotinoide auf als der Überexpressionsstamm. Nach 26 Stunden ist der Bakteriochlorophyllgehalt im Kontrollstamm nur 1,3-mal höher und der Carotinoidgehalt 1,2-mal höher als im Überexpressionsstamm.

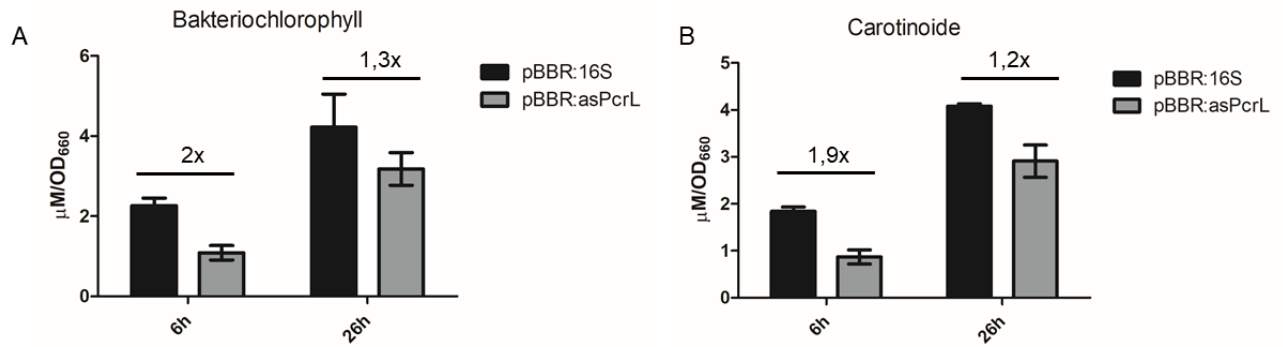


Abbildung 22: asPcrL beeinflusst den Pigmentgehalt. Bakteriochlorophyll- und Carotinoidgehalt des Überexpressionsstammes 2.4.1_pBBR:asPcrL im Vergleich zum Kontrollstamm 2.4.1_pBBR:16S. Die Kulturen wurden über Nacht unter aeroben Bedingungen kultiviert und für das Experiment auf phototrophes Wachstums umgestellt. Sechs beziehungsweise 26 Stunden nach dem *shift* wurden Proben entnommen und der Bakteriochlorophyll- und Carotinoidgehalt bestimmt. Der Mittelwert von biologischen Replikaten und die Standardabweichung wurden berechnet.

Da in *R. sphaeroides* alle Pigmente in der Zelle an pigmentbindende Proteine gebunden sind, wurden die Konzentrationen der Lichtsammelkomplexe I und II und die Absorption der Zellen photometrisch bestimmt. Die pigmentbindenden Proteine besitzen charakteristische Absorptionsmaxima. Der Lichtsammelkomplex II (LH II) besitzt zwei Absorptionsmaxima bei 800 nm und 855 nm, während der Lichtsammelkomplex I (LH I) ein Maximum bei 875 nm besitzt. Die Absorptionsmaxima des Reaktionszentrums bei 803 nm und 870 nm werden von der stärkeren Absorption der Lichtsammelkomplexe überdeckt. Da sich die Absorptionsmaxima des LH I und LH II überlappen, entsteht eine Absorptionsschulter bei 875 nm, die den LH I-Komplex repräsentiert. Während die Absorptionsmaxima des Lichtsammelkomplex II im Überexpressionsstamm und im Kontrollstamm unter mikroaeroben Wachstumsbedingungen nahezu identisch sind, ist die Schulter bei 875 nm im Überexpressionsstamm reduziert (Abbildung 23A). Zusätzlich wurden von beiden Stämmen die Konzentration der Lichtsammelkomplexe I und II bestimmt (Abbildung 23B). Während kein signifikanter Unterschied in der Konzentration des LH II gemessen werden konnte, ist der Gehalt an LH I im Überexpressionsstamm im Vergleich zum Kontrollstamm signifikant verringert (T-Test, $p=0,01$).

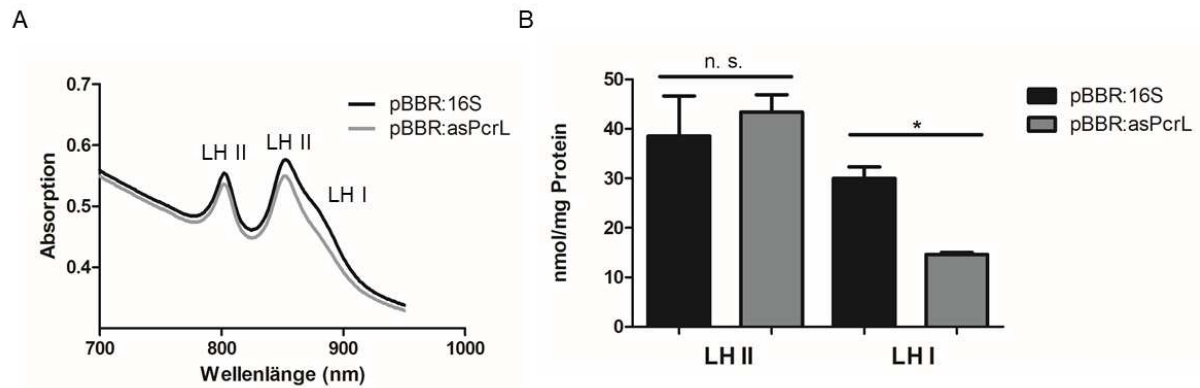


Abbildung 23: Verringerung der Menge des Lichtsammelkomplex I durch asPcrL. (A) Für die Messung der Gesamt-Zellspektren wurden die Kulturen 2.4.1_pBBR:16S und 2.4.1_pBBR:asPcrL über Nacht unter aeroben und am nächsten Tag unter mikroaeroben Bedingungen kultiviert. Die Probenentnahme fand in der späten exponentiellen Phase statt. Die Absorption wurde auf die OD_{660} normalisiert. Die gemessenen Absorptionsmaxima sind den Pigment-bindenden Proteinkomplexen zugeordnet. (B) Bestimmung der Konzentration der Lichtsammelkomplexe I und II im Kontrollstamm und dem Überexpressionsstamm. Die Kulturen wurden von aeroben zu mikroaeroben Bedingungen geschiftet und Proben in der spät exponentiellen Phase entnommen. Der Mittelwert von biologischen Triplikaten und die Standardabweichung wurde ermittelt.

Um das Wachstumsverhalten des Überexpressionsstammes im Vergleich zur Leervektorkontrolle untersuchen zu können, wurden Wachstumskurven für beide Stämme unter unterschiedlichen Wachstumsbedingungen erstellt. Die Kulturen wurden über Nacht unter aeroben Bedingungen kultiviert, um die Expression der Photosyntheseapparate zu unterdrücken. Die Übernachtskulturen wurden am nächsten Morgen für 90 Minuten unter mikroaeroben Bedingungen kultiviert, um die Expression der Photosynthesegene zu induzieren. Im Anschluss wurden sie auf eine OD_{660} 0,2 verdünnt und entweder unter mikroaeroben oder phototrophen Bedingungen kultiviert. Zu zuvor festgelegten Zeitpunkten wurde die OD_{660} der Kulturen bestimmt. Unter mikroaeroben Bedingungen ist zwischen den beiden Stämmen kein Unterschied im Wachstum festzustellen. Beide Stämme erreichen nach 28 Stunden eine Maximal- OD_{660} von 1,2. Unter phototrophen Bedingungen erreichen beide Stämme ebenfalls die gleiche Maximal- OD_{660} von 2, allerdings erreicht die Leervektorkontrolle diese bereits nach 28 Stunden, während der Überexpressionsstamm erst nach 34 Stunden in die stationäre Wachstumsphase übergeht. Der Überexpressionsstamm verweilt länger in der Lag-Phase als der Kontrollstamm und in der exponentiellen Wachstumsphase ist die Verdopplungszeit von 4,9 zu 5,6 Stunden verlängert.

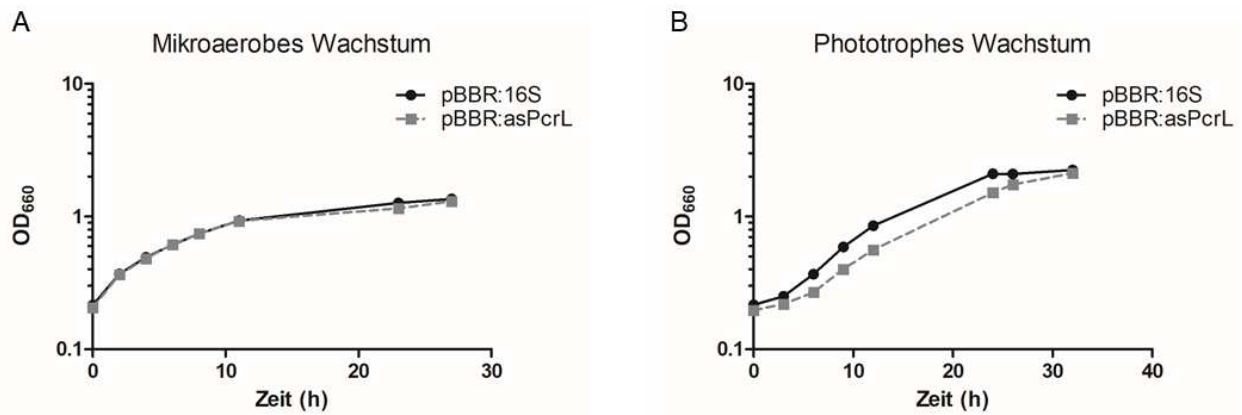


Abbildung 24: Wachstumsverhalten des Überexpressionsstamms im Vergleich zur Leervektorkontrolle. Wachstumskurve der Leervektorkontrolle 2.4.1_pBBR:16S und des Überexpressionsstamms 2.4.1_pBBR:asPcrL unter mikraeroben (A) und phototrophen (B) Bedingungen. Der Mittelwert von biologischen Triplikaten wurde errechnet und gegen die Zeit auf einer semi-logarithmischen Skala aufgetragen.

3.5 Auswirkung von asPcrL auf das *puf*-Operon

Da im vorangegangenen Kapitel gezeigt werden konnte, dass die Überexpression von asPcrL eine Auswirkung auf die Menge des Lichtsammelkomplex I und dadurch auch auf das Wachstum unter phototrophen Bedingungen hat, wurde im Anschluss die Transkriptmenge der *puf*-mRNA untersucht. Die beiden Pigment-bindenden Untereinheiten des Reaktionszentrums und die Pigment-bindenden Proteine des Lichtsammelkomplex I werden vom *puf*-Operon kodiert. Da die *antisense* RNA komplementär zur Sequenz des *pufL*-Gens ist, wurde gezielt die Menge dieser mRNA mittels qRT-PCR quantifiziert. Der Überexpressionsstamm und die Leervektorkontrolle wurden über Nacht unter aeroben Bedingungen kultiviert und am nächsten Tag unter mikraeroben Bedingungen kultiviert. Die Zellen wurden in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet und für eine RNA-Isolation genutzt. Für die qRT-PCR wurden *pufL*- und *rpoZ*-spezifische Primer verwendet. Das *housekeeping*-Gen *rpoZ* wurde zur Normalisierung genutzt. Das qRT-Ergebnis zeigt, dass das Level der *pufL*-mRNA im asPcrL-Überexpressionsstamm, im Vergleich zum Kontrollstamm, reduziert ist. Der \log_2 fold-change beträgt -1,3 (Abbildung 25 A).

Um zu untersuchen, ob asPcrL einen Einfluss auf den nativen *puf*-Promoter besitzt, wurde eine Plasmid-basierte transkriptionelle Fusion erstellt. Die Sequenz des nativen *puf*-Promoters wurde upstream eines *lacZ*-Gens kloniert, welches über eine eigene Ribosomenbindestelle und ein Startcodon verfügt. Dazu wurde ein 1200 bp langes DNA-Fragment upstream der kodierenden Sequenz von *pufQ* mittels PCR amplifiziert und in den Vektor pBBR-MCS3-*lacZ* ligiert (Dissertation Katrin Eisenhardt). Das daraus entstandene Plasmid P1200 wurde mittels diparentaler Konjugation in den Kontrollstamm und den Überexpressionsstamm eingebracht.

Die resultierenden Kulturen wurden unter mikroaeroben Bedingungen kultiviert und die entnommenen Proben für einen β -Galaktosidase Assay verwendet. Das Ergebnis des β -Galaktosidase Assay zeigt, dass der Überexpressionsstamm 20% weniger Substrat umgesetzt werden konnte als im Kontrollstamm. Jedoch ist der Unterschied nicht signifikant (T-Test: $p=0,15$).

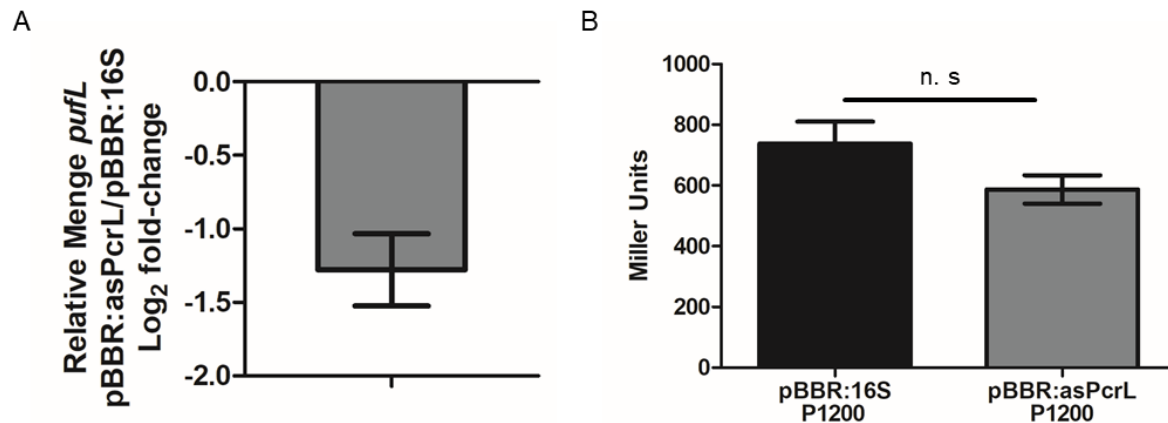


Abbildung 25: AsPcrL beeinflusst die Menge von *pufL* aber nicht die Aktivität des nativen *puf*-Promoters. (A) Bestimmung der relativen Menge der *pufL*-mRNA im Überexpressionsstamm und der Leervektorstamm. Die Kulturen wurden zu mikroaeroben Bedingungen geschiftet. Die qRT-PCR wurde mit *pufL*-spezifischen Primern durchgeführt und auf das *housekeeping*-Gen *rpoZ* normalisiert. Die *pufL*-Menge des Überexpressionsstammes wurde relativ zu der des Leervektorstammes berechnet und als \log_2 fold-change angegeben. Der Mittelwert aus biologischen Triplikaten und die Standardabweichung wurden errechnet. (B) β -Galaktosidase Assay zur Bestimmung der Promoteraktivität des nativen *puf*-Promoters. Das Plasmid P1200 wurde über diparentale Konjugation in den Überexpressionsstamm 2.4.1_pBBR:asPcrL und Leervektorkontrollstamm 2.4.1_pBBR:16S eingebracht. Die resultierenden Stämme wurden unter mikroaeroben Bedingungen kultiviert und Proben in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet und für einen β -Galaktosidase Assay eingesetzt. Der Mittelwert aus biologischen Triplikaten und technischen Duplikaten ist in Miller Units mit Standardabweichung gezeigt.

Da sich die Aktivität des nativen *puf*-Promoters in beiden Stämmen nicht stark voneinander unterscheidet, muss die Abreicherung der *pufL*-mRNA auf einem anderen Mechanismus beruhen. Aus diesem Grund wurde die Stabilität der *pufL*-mRNA im Überexpressionsstamm mit verschiedenen experimentellen Ansätzen im Vergleich zum Kontrollstamm untersucht. Es wurde eine Plasmid-basierte translationale Fusion genutzt, um den Einfluss von asPcrL auf die Stabilität von *pufL* zu untersuchen. Dazu wurde die kodierende Sequenz ohne das Stoppcodon von *pufL* und zusätzlich 200 bp upstream davon mittels PCR amplifiziert und über die angefügten Schnittstellen XhoI und HindIII zwischen die Sequenz des konstitutiven 16S rRNA-Promoters und eines *lacZ*-Gens in den pPHU351 kloniert. Das *lacZ*-Gen verfügt weder über eine Ribosomenbindestelle noch über ein Startcodon, sodass ein Fusionsprotein aus PufL und

LacZ entsteht. Das resultierende Plasmid pPHU:*pufL* wurde durch diparentale Konjugation in den Überexpressions- und in den Kontrollstamm eingebracht. Die entstandenen Kulturen wurden unter mikroaeroben Bedingungen kultiviert und die, in der exponentiellen Wachstumsphase geernteten Proben, für ein β -Galaktosidase Assay verwendet. Im Kontrollstamm konnte ein signifikant (T-Test; $p=0,008$) höherer Substratumsatz als im Überexpressionsstamm gemessen werden (Abbildung 26).

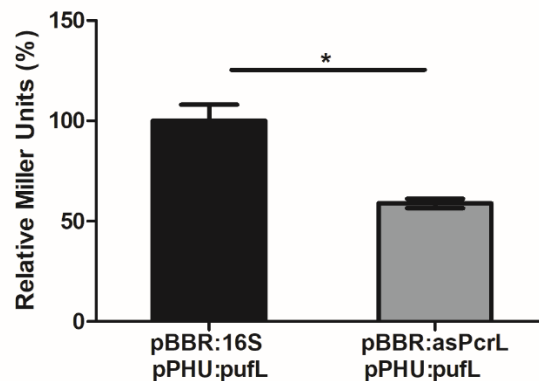


Abbildung 26: AsPcrL reprimiert die *pufL*-abhängige β -Galaktosidase-Expression. Das Plasmid pPHU:*pufL* wurde über diparentale Konjugation in den Überexpressionsstamm 2.4.1_pBBR:asPcrL und in den korrespondierenden Kontrollstamm 2.4.1_pBBR:16S eingebracht. Die resultierenden Stämme wurden unter mikroaeroben Bedingungen kultiviert, Proben in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet und für einen β -Galaktosidase-Assay eingesetzt. Der Mittelwert aus biologischen Triplikaten und technischen Duplikaten ist in Miller Units mit Standardabweichung gezeigt.

Um die Ergebnisse des β -Galaktosidase Assays zu bestätigen, wurde die Stabilität der *puf*-mRNA im Überexpressionsstamm im Vergleich zum Kontrollstamm *in vivo* untersucht. Die Kulturen wurden unter mikroaeroben Bedingungen kultiviert und in der exponentiellen Wachstumsphase das Antibiotikum Rifampicin zugesetzt, welches die bakterielle Transkription unterbindet. Direkt vor und zu festgelegten Zeitpunkten nach der Rifampicinzugabe wurden den Kulturen Proben entnommen und diese zur Isolation von Gesamt-RNA für eine Northern Blot Analyse genutzt. Die Northern Blot Analyse bestätigt die Ergebnisse der qRT-PCR. Es ist deutlich zu erkennen, dass im 2.4.1_pBBR:asPcrL-Stamm weniger *pufBALMX*-mRNA vorhanden ist als im 2.4.1_pBBR:16S-Kontrollstamm (Abbildung 27). Die Berechnung der Halbwertszeiten für das 2,7 kb lange *pufBALMX*-Fragment zeigt, dass dessen Stabilität durch asPcrL negativ beeinflusst wird. Im Kontrollstamm beträgt die Halbwertszeit 12 ± 2 min, wohingegen sie im pBBR:asPcrL-Stamm auf $7 \pm 0,5$ min reduziert ist.

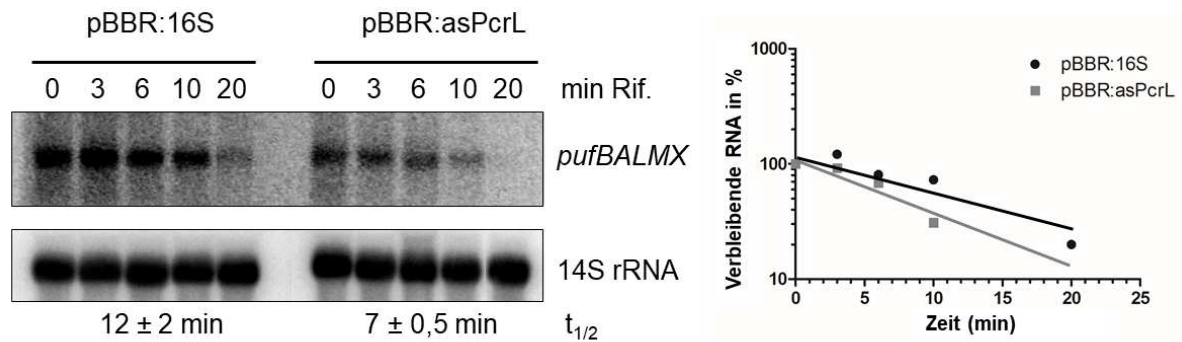


Abbildung 27: AsPcrL beeinflusst die Stabilität des *pufBALMX*-Fragments *in vivo*. Northern Blot Analyse zur Bestimmung der Halbwertszeiten der *pufBALMX*-mRNA. Die Kulturen 2.4.1_pBBR:16S und 2.4.1_pBBR:asPcrL wurden unter mikroaeroben Bedingungen kultiviert und die Transkription wurde durch die Zugabe von Rifampicin gestoppt. 10 μ g der Gesamt-RNA wurden auf ein 1% Formaldehyd-Agarosegel geladen. Eine *pufL*-spezifische radioaktiv-markierte Sonde wurde zur Detektion des *pufBALMX*-Fragments genutzt. Die 14S rRNA diente als Ladekontrolle. Die Intensität der asPcrL-Signale wurde mit Hilfe der Quantity One Software (Biorad) quantifiziert und auf das Signal der 5S rRNA normalisiert. Die Intensität der verbleibenden RNA wurde semi-logarithmisch gegen die Zeit aufgetragen. Der Mittelwert der Halbwertszeit von *pufBALMX* von biologischen Triplikaten wurde ermittelt und ist unter der Northern Blot Analyse angegeben.

Bei der Verifizierung der Überexpression von asPcrL im Überexpressionsstamm unter aeroben, mikroaeroben beziehungsweise phototrophen Wachstumsbedingungen (Abbildung 20) konnte eine Akkumulation von asPcrL unter aeroben Bedingungen beobachtet werden. Unter dieser Bedingung wird die Ziel-mRNA *pufL* nicht exprimiert. Um zu untersuchen, ob die Akkumulation von asPcrL durch die Abwesenheit der *target* mRNA oder durch den veränderten Sauerstoffgehalt zustande kommt, wurde eine *puf*-Deletionsmutante erstellt. Zur Erstellung der Deletionsmutante wurde ein 548 bp großes *up*-Fragment mittels PCR amplifiziert und über die angefügten Schnittstellen XbaI und BamHI in den pPHU281-Vektor ligiert, daraus resultierte der Vektor pPHU281_*up*. Im Anschluss wurde ein 619 bp großes *down*-Fragment amplifiziert und über die angefügten Schnittstellen BamHI und XhoI in den Vektor pPHU281_*up* ligiert. Der resultierende Vektor pPHU281_*up/down* wurde mit dem Restriktionsenzym BamHI zwischen dem *up*- und dem *down*-Fragment restringiert und eine Gentamycin-Resistenzkassette, aus dem Vektor pWKR209-CII stammend, wurde ebenfalls mit BamHI restringiert und in den Vektor pPHU281_*up/down* ligiert. Der daraus resultierende Vektor pPHU281_ Δ *puf*::Gm wurde zur diparentalen Konjugation vom *R. sphaeroides* Wildtyp genutzt. Zur Selektion wurden die Konjuganten auf mit Gentamycin versetztem RÄ-Medium ausplattiert. Durch die Insertion der Gentamycin-Kassette wurden 2359 bp der 2856 bp kodierenden Basen deletiert. Das Screening der Mutanten erfolgte im Spektralphotometer, da bei erfolgreicher Deletion des *puf*-Operons kein Absorptionsmaximum bei 875 nm beobachtet

werden kann. Zusätzlich wurde eine Northern Blot Analyse mit einer *pufBA*-spezifischen radioaktiv-markierter Sonde durchgeführt, um zu überprüfen, ob die Deletion des *puf*-Operons in den Konjuganten erfolgreich war. In allen getesteten Konjuganten konnte, im Vergleich zum Wildtyp, keine *puf*-mRNA nachgewiesen werden, welches eine erfolgreiche Deletion bestätigt (Abbildung 28).

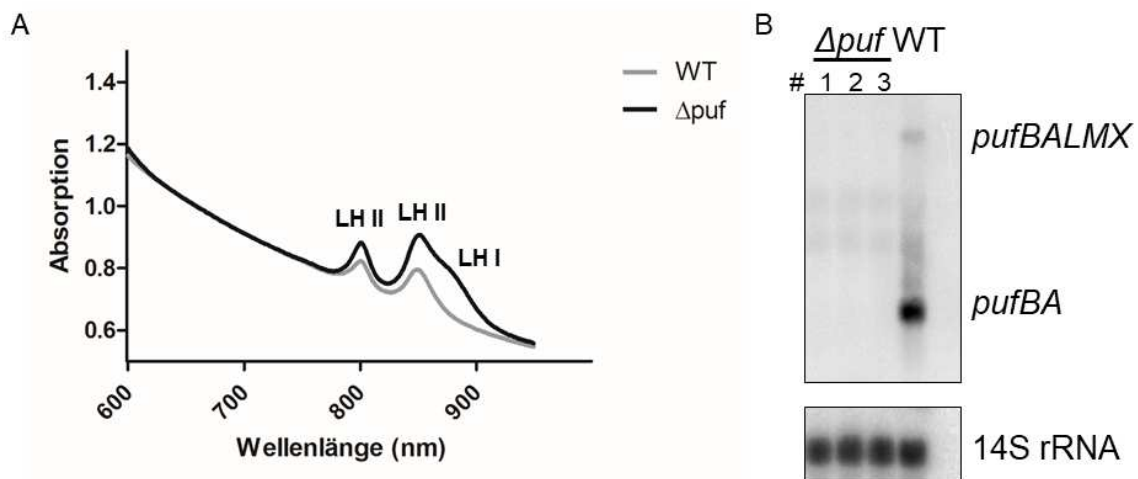


Abbildung 28: Nachweis der Deletion des *puf*-Operons im Δpuf -Stamm. (A) Gesamtzell-Absorptionsmessung des Wildtyps und der Δpuf -Mutante zwischen 600 und 900 nm. Die Kulturen wurden unter mikroaeroben Bedingungen kultiviert und in der späten exponentiellen Wachstumsphase zur photometrischen Messung verwendet. (B) Northern Blot Analyse des Wildtyps und drei Δpuf -Konjuganten. Jeweils 10 μg RNA wurden auf ein 1% Formaldehyd-Agarosegel geladen. Eine *pufBA*-spezifische Sonde wurde zur Detektion der *puf*-mRNA verwendet. Die 14S rRNA diente als Ladekontrolle.

Zur Untersuchung der Halbwertszeit von asPcrL in Anwesenheit der *puf*-mRNA wurde das Überexpressionsplasmid pBBR:asPcrL mittels diparentaler Konjugation in den Wildtyp- und in den Δpuf -Deletionsstamm konjugiert. Die resultierenden Stämme wurden unter mikroaeroben Wachstumsbedingungen kultiviert und die Transkription durch die Zugabe von Rifampicin in der exponentiellen Wachstumsphase gestoppt. Die isolierte Gesamt-RNA wurde für eine Northern Blot Analyse genutzt. Die Akkumulation von asPcrL, die bereits unter aeroben Bedingungen beobachtet werden konnte (Abbildung 20) ist auch in der Δpuf -Mutante zu erkennen (Abbildung 29). Die Akkumulation ist auf eine Veränderung der Stabilität von asPcrL in Abwesenheit der Ziel-mRNA *pufL* zurückzuführen. Die Halbwertszeit von asPcrL verlängert sich von 10 Minuten im Wildtyp auf 20 Minuten im Δpuf -Stamm.

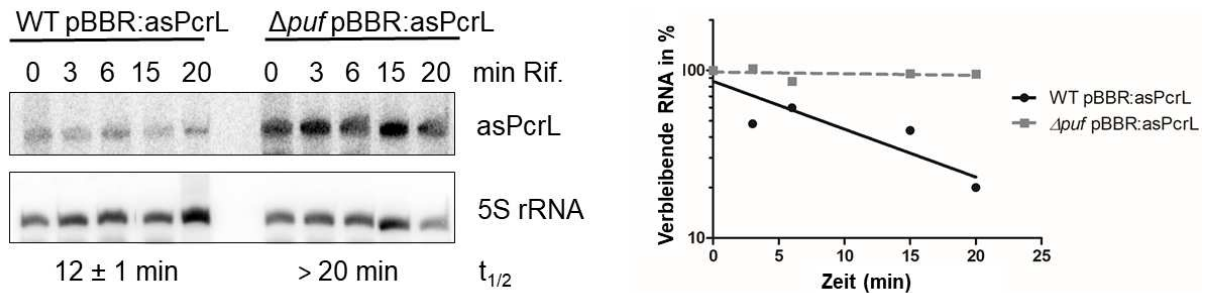


Abbildung 29: PufL destabilisiert asPcrL. Northern Blot Analyse zur Bestimmung der Halbwertszeit der Überexpression von asPcrL im Wildtyp und in der Δpuf -Mutante. Die Kulturen wurden unter mikroaeroben Bedingungen bis zu einer OD_{660} 0,5 kultiviert und die Transkription durch die Zugabe von Rifampicin gestoppt und Gesamt-RNA isoliert. Jeweils 10 μ g Gesamt-RNA wurde auch ein 10% Urea-Polyacrylamid-Gel geladen. Eine spezifische radioaktiv-markierte Sonde gegen asPcrL wurde zur Detektion verwendet. Die 5S rRNA diente als Ladekontrolle. Die Intensität der asPcrL-Signale wurde mit Hilfe der Quantity One Software (Biorad) quantifiziert und auf das Signal der 5S rRNA normalisiert. Die Intensität der verbleibenden RNA wurde semi-logarithmisch gegen die Zeit aufgetragen. Der Mittelwert der Halbwertszeit von asPcrL von biologischen Triplikaten wurde ermittelt und ist unter der Northern Blot Analyse angegeben.

3.6 Einfluss der RNase E auf das *puf*-Operon

In *Rhodobacter capsulatus*, einem nahen Verwandten von *R. sphaeroides*, ist die RNase E essentiell für die Prozessierung des *puf*-Operons. Eine Schnittstelle in der 5'-Region der *pufL*-Sequenz initialisiert den Abbau des *pufBALMX*-Fragments zu dem kürzeren *pufBA*-Fragment, welches durch *stem-loops* am 3'-Ende von *pufA* stabilisiert wird (Belasco *et al.* 1985; Fritsch *et al.* 1995). Aus diesem Grund wurde untersucht, ob die RNase E ebenfalls an der Prozessierung der *puf*-mRNA in *R. sphaeroides* beteiligt ist. Obwohl die Sequenzen der *pufL*-mRNA in beiden Stämmen zu 79% identisch sind, ist die aus *R. capsulatus* bekannte RNase E-Schnittstelle in *R. sphaeroides* nicht konserviert. Des Weiteren konnte eine RNA-Seq-Analyse der Gesamt-RNA von *R. capsulatus* die Existenz von asPcrL nicht bestätigen (Abbildung 30).

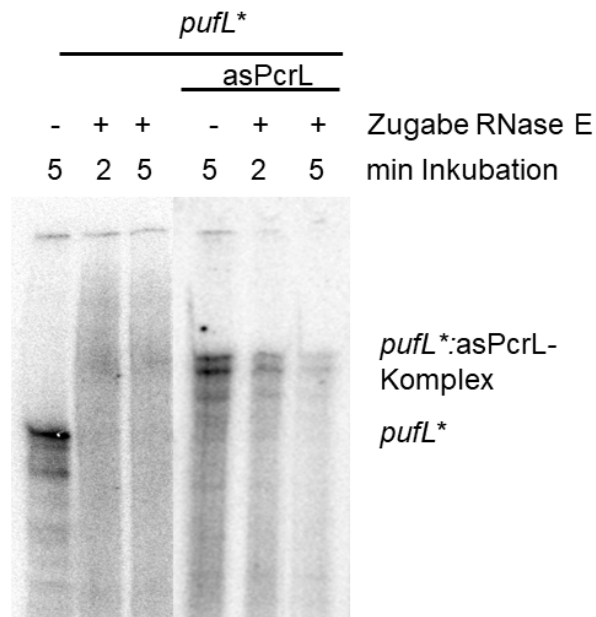


Abbildung 31: Die RNase E spaltet *pufL* auch in Abwesenheit von asPcrL. *In vitro* RNase E-Degradationsassays. 100 fmol radioaktiv-markiertes *pufL-in vitro* Transkript wurde zusammen mit 1 nmol kaltem asPcrL-*in vitro* Transkript unter Zugabe der aufgereinigten RNase E von *E. coli* inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von FU-Mix zu unterschiedlichen Zeitpunkten gestoppt. Als Kontrolle wurde das *pufL-in vitro* Transkript ohne die Zugabe von asPcrL in An- und Abwesenheit der RNase E inkubiert. Die Ansätze wurden auf ein 6% denaturierendes Polyacrylamidgel geladen.

3.7 Einfluss verschiedener RNasen auf die Prozessierung des *puf*-Operons

Ribonukleasen lassen sich in Exo- und Endoribonukleasen unterteilen. RNase III (*Δrnc*) und YbeY zählen zu den Endoribonukleasen, die die RNA-Spaltung innerhalb der Moleküle katalysieren. Dagegen handelt es sich bei der RNase J und RNase R um Exoribonukleasen, die die einzelnen Nukleotide der RNA, vom 5'- oder 3'-Ende ausgehend, abspalten. Die RNase R katalysiert den Abbau in 3'-5'-Richtung während die RNase J die RNA-Moleküle in 5'-3'-Richtung abbaut. Die RNA-Pyrophosphohydrolase RppH katalysiert die Umwandlung von 5'-Triphosphaten zu Monophosphaten, wodurch das RNA-Molekül destabilisiert wird (Belasco 2010). Um zu untersuchen, welche RNase an der Prozessierung der *pufL*-mRNA beteiligt ist, wurde die Prozessierung der *puf*-mRNA in verschiedenen RNase-Deletionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp untersucht. Dazu wurden die Kulturen unter aeroben oder mikroaeroben Bedingungen kultiviert und die gewonnene Gesamt-RNA für eine Northern Blot Analyse verwendet. Durch die Nutzung einer radioaktiv-markierten *pufBA*-spezifischen Sonde, konnte sowohl das *pufBALMX*- als auch das *pufBA*-Fragment unter mikroaeroben Bedingungen nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurde unter aeroben Bedingungen keine *puf*-mRNA detektiert, da deren Expression unter dieser Wachstumsbedingung reprimiert ist (Abbildung

32). Sowohl im Wildtyp als auch in allen getesteten Mutanten ist unter mikroaeroben Bedingungen das *pufBA*-Fragment nachweisbar. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die hier untersuchten RNasen entweder nicht an Prozessierung an der *puf*-mRNA beteiligt sind, oder die Funktion der fehlenden RNase von *backup*-Enzymen übernommen werden kann. Das *pufBALMX*-Fragment ist in allen Stämmen außer der RNase III- und der RNase III/J-Doppelmutante nachweisbar. Frühere Studien zeigten, dass einige Alphaproteobakterien die 23S rRNA durch die RNase III in die 14S, 5,8S-ähnliche und ein weiteres 16S rRNA-Molekül prozessiert wird. Durch das Fehlen der RNase III kann diese Prozessierung nicht stattfinden und es kommt zu einer Akkumulation der 23S rRNA, die auf einem 1%-Agarosegel das gleiche Laufverhalten wie das *pufBALMX*-Fragment aufweist. Durch diese Akkumulation kann die *pufBA*-Sonde an dieser Stelle nicht an das *pufBALMX*-Fragment binden und somit nicht detektiert werden. Zum Nachweis des *pufBALMX*-Fragments in der RNase III-Mutante wurde aus diesem Grund eine qRT-PCR durchgeführt (Kapitel 3.8).

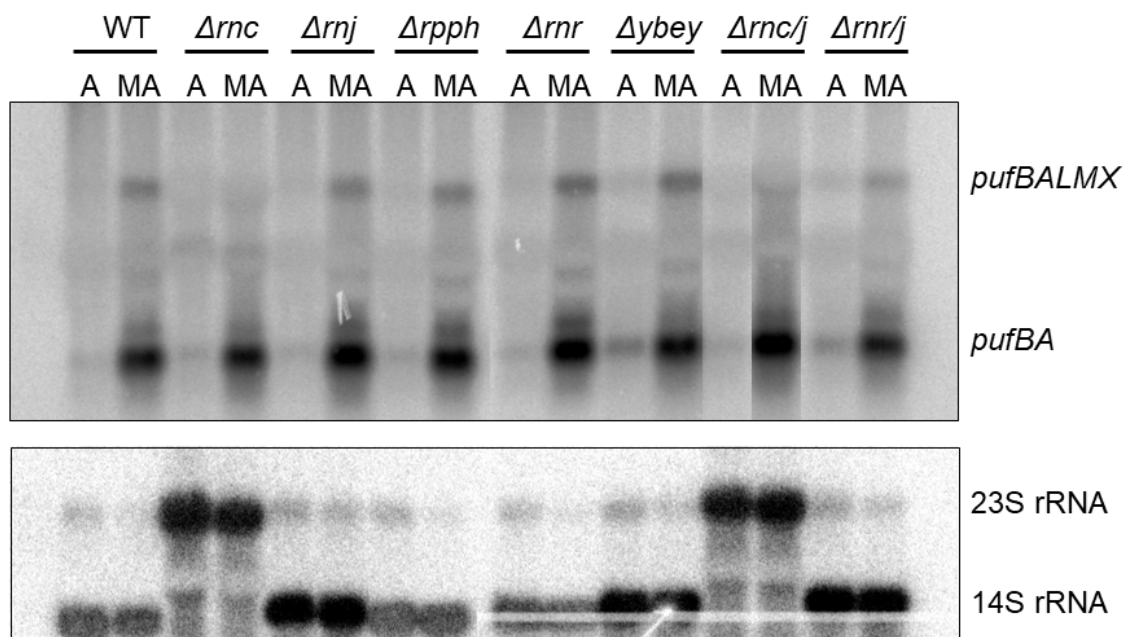


Abbildung 32: Keine der getesteten RNasen unterbindet die Prozessierung der *puf*-mRNA. Northern Blot Analyse der *puf*-mRNA im Wildtyp und verschiedenen RNase-Deletionsmutanten. Die verschiedenen Stämme wurden unter aeroben (A) oder mikroaeroben (MA) Bedingungen kultiviert. 10 μ g der Gesamt-RNA wurden auf ein 1% Formaldehyd-Agarosegel geladen. Eine *pufBA*-spezifische radioaktiv-markierte Sonde wurde zur Detektion des *pufBALMX*- und des *pufBA*-Fragments genutzt. Die 14S rRNA diente als Ladekontrolle.

Zusätzlich wurde das Expressionsmuster von asPcrL in den verschiedenen RNase-Deletionsmutanten untersucht (Abbildung 33). In allen untersuchten Stämmen ist ein Signal für asPcrL detektierbar. In der RNase III-Mutante ist ein leicht stärkeres Signal zu beobachten,

wohingegen die Signalstärke in der $\Delta rnr/j$ - und der $\Delta rppH$ -Mutante im Vergleich zum Wildtyp leicht abnimmt.

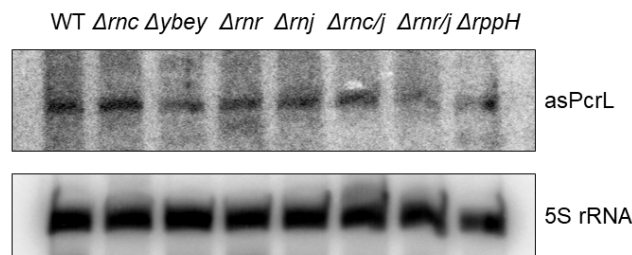


Abbildung 33: Keine der getesteten RNasen hat einen Einfluss auf die Expression von asPcrL. Northern Blot Analyse zur Detektion von asPcrL im Wildtyp und verschiedenen RNase-Deletionsmutanten. Die Kulturen wurden unter mikroaeroben Bedingungen bis zu einer OD_{660} 0,5 kultiviert und Gesamt-RNA isoliert. Jeweils 10 μ g Gesamt-RNA wurde auch ein 10% Urea-Polyacrylamid-Gel geladen. Eine spezifische radioaktiv-markierte Sonde gegen asPcrL wurde zur Detektion verwendet. Die 5S rRNA diente als Ladekontrolle.

3.8 Einfluss der RNase III auf das *puf*-Operon

Im vorherigen Kapitel konnte gezeigt werden, dass die RNase E einen Einfluss auf das *puf*-Operon besitzt und mehrere Schnittstellen in der *pufL*-mRNA lokalisiert sind. Jedoch deuten die *in vitro* Assays darauf hin, dass die RNase E *pufL* unabhängig von asPcrL spalten kann. Frühere Studien konnten darüber hinaus bereits zeigen, dass die RNase E einzelsträngige RNA-Substrate mit einem Monophosphat am 5'-Terminus der RNA bevorzugt. Die Endoribonuklease RNase III bevorzugt spezifisch doppelsträngige RNA und kann den gemeinsamen Abbau von mRNA und sRNA katalysieren (Nicholson 2014). Da durch die gestörte Prozessierung der 23S rRNA in der RNase III-Mutante das *pufBALMX*-Fragment nicht durch eine Northern Blot Analyse visualisiert werden konnte, wurde die Stabilität der *pufL*-RNA mittels qRT-PCR untersucht. Dazu wurden der Wildtypstamm und die RNase III-Mutante unter mikroaeroben Bedingungen kultiviert und in der exponentiellen Wachstumsphase vor und nach der Zugabe von Rifampicin, zu definierten Zeitpunkten, für die RNA-Isolation geerntet. Da die Expression des *house-keeping* Gens *rpoZ* in der RNase III-Mutante ebenfalls beeinflusst ist, wurde ein externes *in vitro* Transkript als *spike in* für die Normalisierung zu den Proben hinzugegeben. Die Deletion der RNase III stabilisiert die *pufL*-mRNA. Während im Wildtyp nach 6 min nur noch 45% der Ausgangsmenge der *pufL*-mRNA zu detektieren waren, konnten im Δrnc -Stammes noch 80% der Ausgangsmenge gemessen werden. Nach 15 Minuten sind im Wildtyp noch 20% der Ausgangsmenge zu detektieren, während in der Δrnc -Mutante noch ca. 50% vorhanden sind (Abbildung 34).

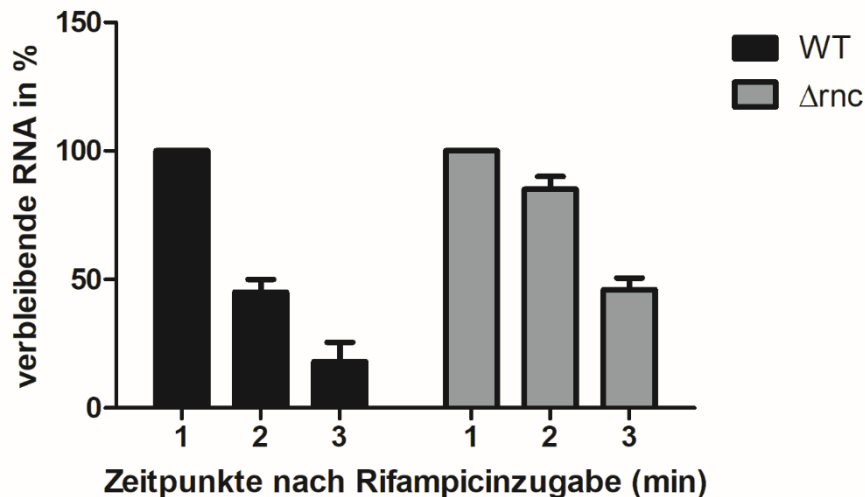


Abbildung 34: Die RNase III hat einen Einfluss auf die Stabilität von *pufL*. qRT-PCR zur Bestimmung der *pufL*-Menge nach Zugabe von Rifampicin. Der Wildtyp und die Δrnc -Mutante wurden unter mikroaeroben Bedingungen kultiviert und die Transkription in der exponentiellen Wachstumsphase durch die Zugabe von Rifampicin gestoppt. Proben wurden zu festgelegten Zeitpunkten geerntet. Vor der RNA-Isolation wurde 1 ng *sinI*-*in vitro* Transkript als *spike-in* hinzugegeben. Für die qRT-PCR wurden *pufL*-spezifische Primer genutzt und als Kontrolle wurde das hinzugefügte *in vitro* Transkript *sinI* amplifiziert. Die *pufL*-Menge wurde auf die Kontrolle normalisiert und gegen die Zeit aufgetragen. Die Mittelwerte aus biologischen Triplikaten und die Standardabweichung wurden berichtet.

Um zu untersuchen ob die RNase III das *pufBALMX*-Fragment innerhalb der *pufL*-Sequenz spalten kann, wurde das translationale Fusionsplasmid pPHU:*pufL* genutzt. Mittels parentaler Konjugation wurde das Plasmid in den Wildtyp und die Δrnc -Mutante eingebracht. Die entstandenen Stämme wurden unter mikroaeroben Bedingungen kultiviert und Proben für einen β -Galaktosidase Assay in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet. Im Δrnc -Stamm konnte ein signifikant höherer Substratumsatz (T-Test; $p=0,001$) nachgewiesen werden als im Wildtypstamm (Abbildung 35).

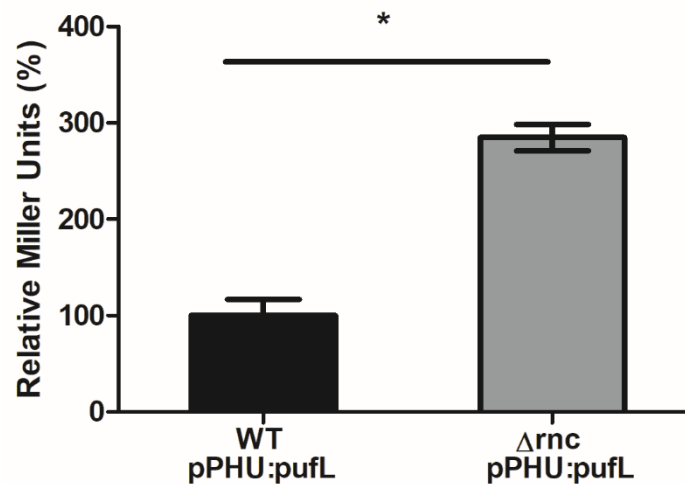


Abbildung 35: RNase III beeinflusst die *pufL*-abhängige β -Galaktosidase-Expression. β -Galaktosidase Assay im Wildtyp und der Δrnc -Mutante. Das Plasmid pPHU:*pufL* wurde über diparentale Konjugation in den Wildtyp und die Δrnc -Mutante eingebracht. Die resultierenden Stämme wurden unter mikroaeroben Bedingungen kultiviert, Proben in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet und für einen β -Galaktosidase Assay eingesetzt. Der Mittelwert aus biologischen Triplikaten und technischen Duplikaten ist in Miller Units mit Standardabweichung gezeigt.

In vitro Degradationsassays wurden verwendet, um zu untersuchen, ob die *pufL*-mRNA und asPcrL in Abhängigkeit voneinander abgebaut werden. Die RNase III von *R. capsulatus* wurde in *E. coli* Zellen produziert und durch eine Affinitätschromatographie und anschließende Gelfiltration aufgereinigt. Sowohl radioaktiv-markierte, als auch kalte *in vitro* Transkripte von asPcrL und *pufL* wurden für die RNase III-Degradationsassays verwendet. Sowohl das *pufL*-, als auch das asPcrL-radioaktiv-markierte *in vitro* Transkript, waren über die Zeit stabil, wenn sie mit RNase III, aber in Abwesenheit ihrer komplementären RNA, inkubiert wurden. Die Zugabe der jeweiligen komplementären kalten *in vitro* Transkripte, führt zu einer Bindung der beiden RNAs, welches durch einen *shift* des Laufverhaltens zu beobachten ist. Nach Inkubation mit der RNase III wird der RNA-Komplex über die Zeit abgebaut. Das Degradationsassay bestätigt die vorherigen Beobachtungen, dass die RNase III die Spaltung der *pufL*-mRNA katalysieren kann. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass diese Spaltung von asPcrL abhängt, da das *pufL*-*in vitro* Transkript bei alleiniger Inkubation mit der RNase III stabil bleibt (Abbildung 36).

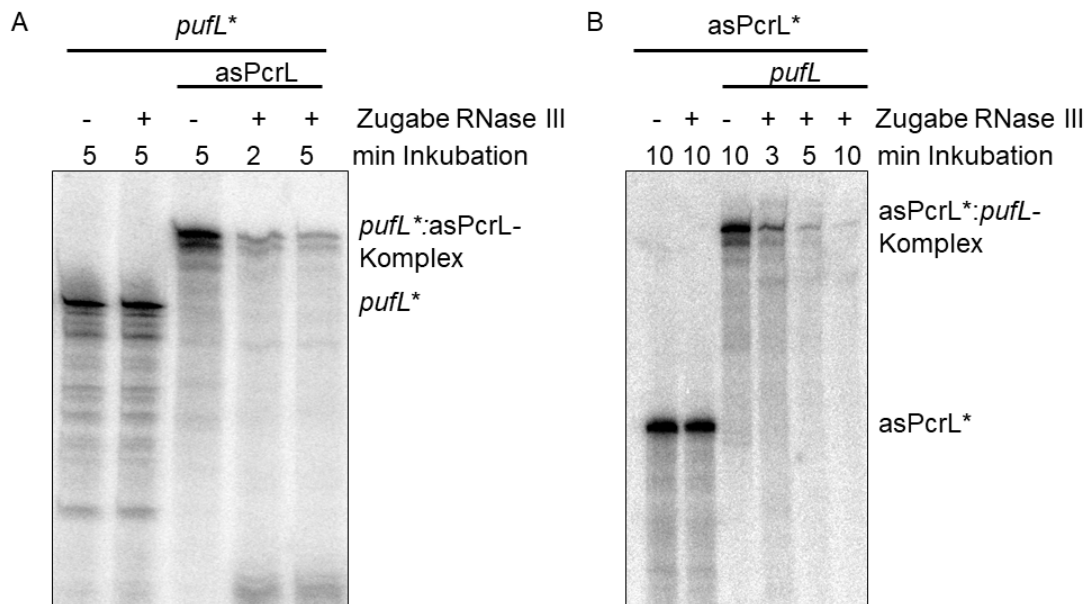


Abbildung 36: RNase III-Spaltung ist abhängig von der jeweilig komplementären RNA.

(A) 100 fmol Radioaktiv-markiertes *pufL*-*in vitro* Transkript wurde zusammen mit kaltem 1 nmol *asPcrL*-*in vitro* Transkript unter Zugabe der aufgereinigten RNase III von *R. capsulatus* inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von FU-Mix zu unterschiedlichen Zeitpunkten gestoppt. Als Kontrolle wurde das *pufL*-*in vitro* Transkript ohne die Zugabe von *asPcrL* in An- und Abwesenheit der RNase III inkubiert. Die Ansätze wurden auf ein 6% denaturierendes Polyacrylamidgel geladen. (B) 100 fmol radioaktiv-markiertes *asPcrL*-*in vitro* Transkript wurde zusammen mit 1 nmol kaltem *pufL*-*in vitro* Transkript unter Zugabe der aufgereinigten RNase III von *R. capsulatus* inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von FU-Mix zu unterschiedlichen Zeitpunkten gestoppt. Als Kontrolle wurde das *asPcrL*-*in vitro* Transkript ohne die Zugabe von *pufL* in An- und Abwesenheit der RNase III inkubiert. Die Ansätze wurden auf ein 6% denaturierendes Polyacrylamidgel geladen.

Um die Position der RNase III-Schnittstelle eingrenzen zu können, wurden verschieden lange *asPcrL*-Transkripte verwendet, die entweder das 5'-Ende von *pufL* (5'-*asPcrL*) oder die interzistronische Region zwischen *pufA* und *pufL* überspannen (3'-*asPcrL*). Sowohl das kalte 5'-*asPcrL*-, als auch das 3'-*asPcrL*-*in vitro* Transkript binden an das radioaktiv-markierte *in vitro* Transkript von *pufL* und es kommt zu einem *shift* des Signals in das obere Geldrittel. Die Degradation des *pufL*-*in vitro* Transkripts durch die RNase III kann nur nach die Zugabe des 3'-*asPcrL*-*in vitro* Transkripts über die Zeit beobachtet werden. Das 5'-*asPcrL*-*in vitro* Transkript scheint keinen Einfluss auf die Degradation zu haben, da das *pufL*-*in vitro* Transkript über die Zeit nicht abgebaut wird. Dadurch kann die Position der RNase III-Schnittstelle auf den interzistronischen Bereich zwischen *pufA* und *pufL* eingegrenzt werden (Abbildung 37).

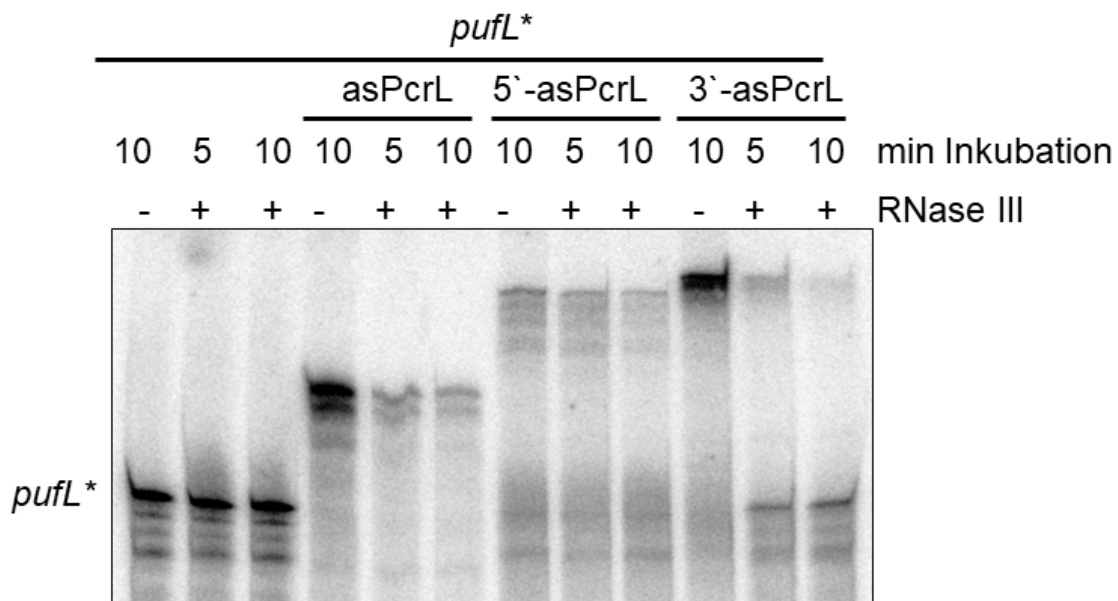


Abbildung 37: RNase III-Spaltung von *pufL* ist vom 3'-asPcrL-Fragment abhängig. *In vitro* RNase III-Degradationsassays. 100 fmol radioaktiv-markiertes *pufL*-*in vitro* Transkript wurde jeweils mit 1 nmol asPcrL, 1 nmol 5'-asPcrL oder 1 nmol 3'-asPcrL-*in vitro* Transkripten unter Zugabe der aufgereinigten RNase III von *R. capsulatus* inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von FU-Mix zu unterschiedlichen Zeitpunkten gestoppt. Als Kontrolle wurde das *pufL*-*in vitro* Transkript ohne die Zugabe von asPcrL in An- und Abwesenheit der RNase III inkubiert. Die Ansätze wurden auf ein 6% denaturierendes Polyacrylamidgel geladen.

5'-RACE-PCR und Primer-Extension wurden genutzt, um die 5'-Enden von *pufL* im Wildtyp und im Δrnc -Stamm zu bestimmen. Dazu wurden der Wildtyp und die Δrnc -Mutante unter mikroaeroben Bedingungen kultiviert und die aus der exponentiellen Wachstumsphase gewonnenen Proben zur Isolation der Gesamt-RNA genutzt. Die DNA-freie RNA wurde sowohl für die Primer-Extension als auch für die 5'-RACE-PCR genutzt. Die durch die 5'-RACE-PCR amplifizierten DNA-Fragmente wurden sequenziert und gegen die Sequenz von *pufL* aligned. Durch die 5'-RACE-PCR konnten sowohl für den Wildtyp als auch für die Δrnc -Mutante mehrere 5'-Enden identifiziert werden, die durch eine Prozessierung unterschiedlicher RNasen zustande kommen (Abbildung 38). Die 5'-Enden, die sowohl im Wildtyp als auch in der Mutante identifiziert werden konnten (Abbildung 38, schwarze Striche) entstehen wahrscheinlich unabhängig von der RNase III. Jedoch konnten zwei unterschiedliche 5'-Enden ausschließlich in der Δrnc -Mutante identifiziert werden. Eines in der kodierenden Sequenz von *pufA* und somit *upstream* des 3'-Endes von asPcrL und ein weiteres in der kodierenden Sequenz von *pufL* *downstream* des 5'-Endes von asPcrL (Abbildung 38, rote Striche). Des Weiteren

konnte im Wildtyp ein 5'-Ende identifiziert werden, welches nicht in der Δrnc -Mutante zu detektieren war. Dieses ist in der interzistronischen Region zwischen *pufA* und *pufL* lokalisiert.

Die Primer-Extension sollte zusätzlich genutzt werden, um zu untersuchen ob verschiedene 5'-Termini in der RNase III-Mutante im Vergleich zum Wildtyp auftreten. Durch die Primer-Extension konnten keine 5'-Enden identifiziert werden, da diese wahrscheinlich im Anschluss direkt weiter degradiert wurden, welches durch die vielen verschiedenen 5'-Termini der 5'-RACE bestätigt werden konnte.

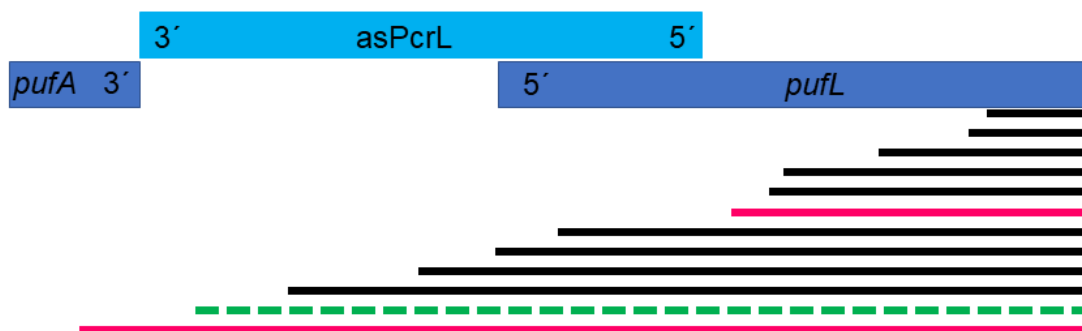


Abbildung 38: Akkumulation unterschiedlicher 5'-Enden der *pufL*-mRNA im Wildtyp und der Δrnc -Mutante. 5'-RACE zur Bestimmung der 5'-Enden der *pufL*-mRNA im Wildtyp und der Δrnc -Mutante. Die Stämme wurden unter mikroaeroben Bedingungen kultiviert und in der exponentiellen Wachstumsphase für eine RNA-Isolation geerntet. Die DNA-freie RNA wurde für eine 5'-RACE eingesetzt, die resultierenden DNA-Sequenzen mittels PCR vervielfältigt, in das pDrive-Vektorsystem ligiert und in *E. coli* transformiert. Die aus *E. coli* erhaltenden Plasmide wurden isoliert, sequenziert und die Sequenz gegen die *puf*-Sequenz *aligned* und zur graphischen Darstellung anhand des identifizierten 5'-Endes gegen die Position der *puf*-mRNA positioniert. Die Sequenzen, die in beiden Stämmen gefunden wurden, sind in schwarz dargestellt. Zwei 5'-Enden die ausschließlich in der Δrnc -Mutante gefunden wurden, sind in Rot dargestellt. Die grün-gestrichelte Linie zeigt das 5'-Ende, welches nur im Wildtyp detektiert werden konnte.

Um zu untersuchen, ob die phänotypischen Veränderungen des Überexpressionsstamms im Vergleich zur Leervektorkontrolle (Abbildung 23) auf die Prozessierung der RNase III innerhalb der interzistronischen Region von *pufA* und *pufL* zurückzuführen waren, wurden weitere Experimente mit verschiedenen Überexpressionsstämmen durchgeführt. Dazu wurde jeweils ein Überexpressionsplasmid konstruiert, welches entweder die Sequenz des 5'- oder des 3'-asPcrL-Fragments trug. Die Sequenzen vom 3'- beziehungsweise 5'-asPcrL-Fragments wurden amplifiziert und jeweils in den pRK415 Ω -Vektor ligiert, der einen Phagenterminator enthält. Im Anschluss wurde die jeweilige Sequenz und der Phagenterminator in den pBBR:16S-Vektor kloniert, der die Sequenz des konstitutiven 16S rRNA-Promoters beinhaltet.

Die resultierenden Plasmide pBBR:5'-asPcrL und pBBR:3'-asPcrL wurden mittels Konjugation in den Wildtypstamm von *R. sphaeroides* überführt. Die resultierenden Stämme wurden für eine Absorptions- und Pigmentanalyse im Vergleich zum Überexpressionsstamm 2.4.1_pBBR:asPcrL und der Leervektorkontrolle 2.4.1_pBBR:16S genutzt. Sowohl das Fehlen der charakteristischen Schulter des Lichtsammelkomplex I bei 875 nm als auch die Reduktion des Bakteriochlorophyllgehalts konnten ausschließlich in den Überexpressionsstämmen 2.4.1_pBBR:asPcrL und 2.4.1_pBBR:3'-asPcrL beobachtet werden. Die Überexpression pBBR:5'-asPcrL zeigt ein identisches Spektrum und einen identischen Bakteriochlorophyllgehalt wie die Leervektorkontrolle (Abbildung 39).

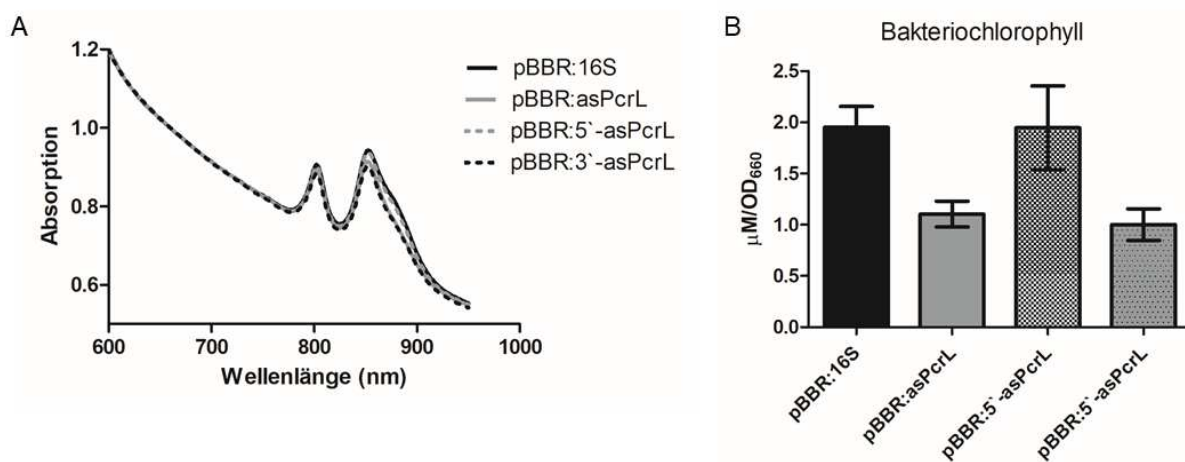


Abbildung 39: Das 3'-Ende von asPcrL ist essentiell für die phänotypische Änderung der Überexpression von asPcrL. (A) Gesamtzell-Absorptionsmessung zwischen 600 und 900 nm. Die Kulturen wurden über Nacht unter aeroben und am nächsten Tag unter mikroaeroben Wachstumsbedingungen kultiviert. Die Zellen wurden in der späten exponentiellen Wachstumsphase geerntet und zur photometrischen Messung verwendet. (B) Zur Messung des Bakteriochlorophyllgehalts wurden die Kulturen über Nacht unter aeroben und am nächsten Tag unter mikroaeroben Bedingungen kultiviert. Die Proben wurden in der späten exponentiellen Wachstumsphase geerntet. Die Pigmentextraktion wurde mit einem Aceton: Methanol(7:2)-Gemisch durchgeführt. Die Messung des Bakteriochlorophylls wurde in einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 770 nm durchgeführt. Die Mittelwerte von biologischen Triplikaten und die Standardabweichung wurde berechnet.

3.9 Einfluss von Hfq auf das *puf*-Operons

Frühere Studien konnten zeigen, dass das RNA-Chaperon Hfq die Bindung zwischen sRNAs und mRNA erleichtern und verstärken kann (Santiago-Frangos und Woodson 2018). Auch in *Rhodobacter sphaeroides* konnten verschiedene sRNA identifiziert werden, die an Hfq binden. Um zu untersuchen, ob Hfq einen Einfluss auf die Bindung von asPcrL und *pufL* hat, wurde die Stabilität der beiden RNAs in An- und Abwesenheit von Hfq untersucht. Dazu wurden der Wildtyp und die Δhfq -Mutante unter mikroaeroben Bedingungen kultiviert und die

Transkription durch die Zugabe von Rifampicin gestoppt. Die zu festgelegten Zeitpunkten geernteten Proben wurden für eine RNA-Isolation verwendet und die so gewonnenen RNA-Proben für Northern Blot Analysen genutzt. Die Northern Blot Analysen zeigten, dass sowohl die Stabilität von asPcrL, als auch die vom *pufBALMX*-Fragment in der Δhfq -Mutante stabiler ist als im Wildtyp. Die Halbwertszeit von asPcrL steigt von 7 min im Wildtyp auf 12 min in der Δhfq -Mutante unter mikroaeroben Bedingungen. Die Northern Blot Analyse für das *pufBALMX*-Fragment zeigte, einen Anstieg der Stabilität von 12 min im Wildtyp auf 21 min in Δhfq -Mutante. Sowohl die Stabilität der *puf*-mRNA als auch die von asPcrL werden von Hfq beeinflusst.

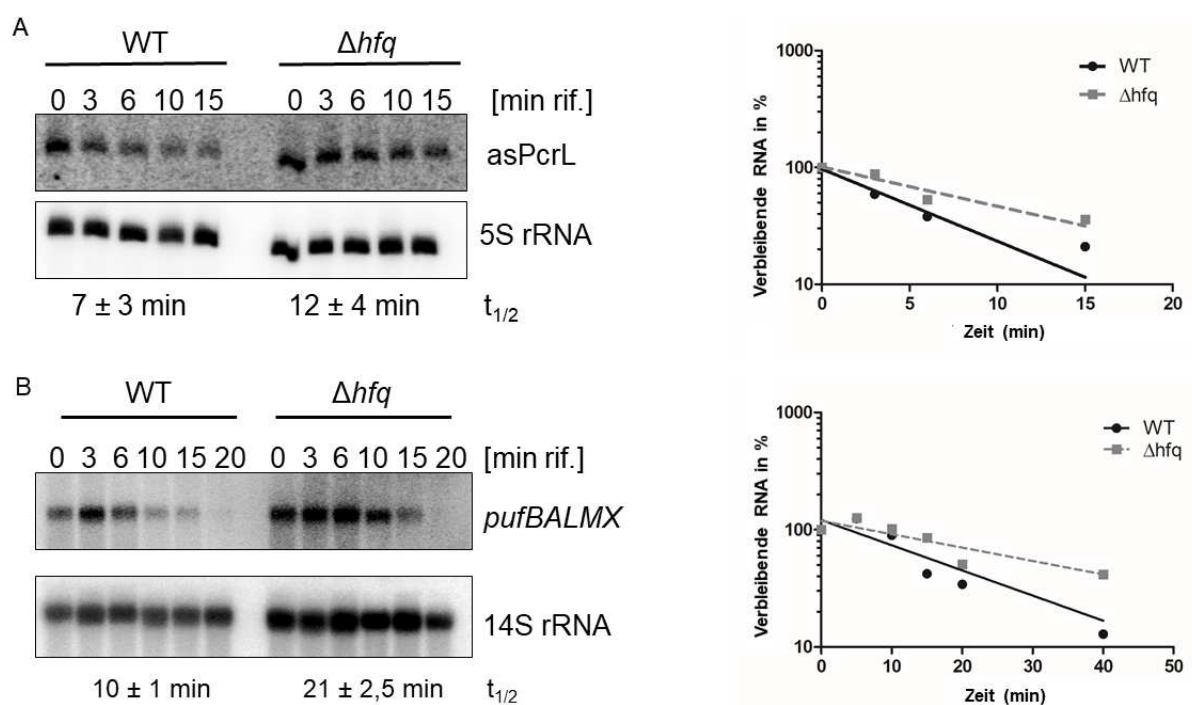


Abbildung 40: Hfq beeinflusst die Stabilität von asPcrL und des *pufBALMX*-Fragments.

Northern Blot Analyse zur Bestimmung der Halbwertszeit von *pufBALMX* und asPcrL in der Δhfq -Mutante im Vergleich zum Wildtyp. Der Wildtyp und die Δhfq -Mutante wurden unter mikroaeroben Bedingungen kultiviert und die Transkription in der exponentiellen Wachstumsphase durch die Zugabe von Rifampicin gestoppt. Die Zellen wurden zu festgelegten Zeitpunkten geerntet und für eine RNA-Isolation genutzt. Für die Northern Blot Analyse wurden 10 μ g Gesamt-RNA auf ein 10% Polyacrylamidgel (A) beziehungsweise auf ein 1% Formaldehyd-Agarosegel (B) aufgetragen. Zur Detektion wurde eine asPcrL- (A) oder eine *pufL*-spezifische (B) radioaktiv-markierte Sonde genutzt. Die 5S rRNA (A) oder die 14S rRNA (B) diente als Ladekontrolle. Die Intensität der Signale wurde mit Hilfe der Quantity One Software (Biorad) quantifiziert und auf das Signal der Ladekontrolle normalisiert. Die normalisierten Werte wurden semi-logarithmisch gegen die Zeit aufgetragen. Die Mittelwerte der Halbwertszeiten und die Standardabweichungen von asPcrL und *pufBALMX* von biologischen Triplikaten wurden ermittelt und sind unter der jeweiligen Northern Blot Analyse angegeben.

Um zu untersuchen, ob spezifisch die *pufL*-mRNA durch Hfq beeinflusst wird, wurde das translationale Fusionsplasmid pPHU:*pufL* verwendet. Das Plasmid wurde über diparentale Konjugation sowohl in den Wildtyp- als auch in den Δ *hfq*-Stamm eingebracht. Die resultierenden Stämme wurden unter mikroaeroben Bedingungen inkubiert und in der exponentiellen Wachstumsphase für einen β -Galaktosidase Assay geerntet. Die gemessenen Miller Units des Wildtypstammes wurden auf 100% gesetzt und die der Δ *hfq*-Mutante darauf normalisiert. In der Δ *hfq*-Mutante ist ein 1,7-fach höherer Substratumsatz vorhanden als im Wildtyp. Dieser Unterschied ist allerdings nicht signifikant (T-Test; $p=0,11$) (Abbildung 41).

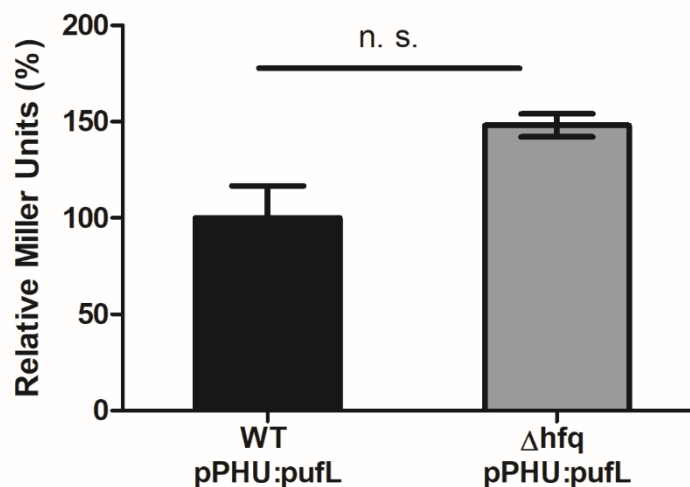


Abbildung 41: AsPcrL reprimiert die *pufL*-abhängige β -Galaktosidase-Expression. Das Plasmid pPHU:*pufL* wurde über diparentale Konjugation in den Wildtyp- und Δ *hfq*-Stamm eingebracht. Die resultierenden Stämme wurden unter mikroaeroben Bedingungen kultiviert, Proben in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet und für einen β -Galaktosidase Assay eingesetzt. Der Mittelwert aus biologischen Triplikaten und technischen Duplikaten ist in relativen Miller Units mit Standardabweichung gezeigt.

Es konnte gezeigt werden, dass die *pufL*-mRNA sowohl von Hfq als auch von asPcrL beeinflusst wird. Um den Einfluss von asPcrL auf *pufL* in der Abhängigkeit von Hfq zu untersuchen, wurde das Überexpressionsplasmid pBBR:asPcrL und der Leervektor pBBR:16S über diparentale Konjugation in die Δ *hfq*-Mutante eingebracht. Die resultierenden Stämme wurden unter aeroben Bedingungen über Nacht und am nächsten Tag unter mikroaeroben Bedingungen kultiviert, um die Transkription der Photosynthesegene zu induzieren. Als die Kulturen die späte exponentielle Wachstumsphase erreicht hatten, wurden sie zur Gesamtzell-Absorptionsmessung zwischen 600 und 900 nm am Photometer gemessen. Durch die Überexpression von asPcrL ist eine Reduktion der Absorptionsschulter bei 875 nm im Wildtyp zu beobachten. In der Δ *hfq*-Mutante ist keine Reduktion der Absorption zu beobachten. Die Absorptionsmessung des Δ *hfq*-Überexpressionsstammes zeigt das gleiche Profil wie die Δ *hfq*-

Leervektorkontrolle (Abbildung 42A). Im Wildtyp konnte durch das Einbringen des translationalen Fusionsplasmid pPHU:*pufL* gezeigt werden, dass die Überexpression von asPcrL zu einer Verringerung des Substratumsatzes um 40% führt. Um den Einfluss von asPcrL in Abhängigkeit von Hfq untersuchen zu können, wurde das translationale Fusionsplasmid pPHU:*pufL* mittels diparentaler Konjugation in die Stämme Δhfq _pBBR:16S und Δhfq _pBBR:asPcrL eingebracht. Die entstandenen Stämme wurden unter mikroaeroben Bedingungen bis zur exponentiellen Wachstumsphase kultiviert und für das β -Galaktosidase-Assay geerntet. Anders als im Wildtyp kann in der Δhfq -Mutante kein verringerter Substratumsatz im Überexpressionsstamm festgestellt werden. Der Überexpressionsstamm zeigt sogar eine Steigerung im Umsatz von 15 % im Vergleich zur Leervektorkontrolle, dieser Unterschied ist jedoch nicht signifikant (T-Test; $p = 0,3$). Der asPcrL-abhängige Einfluss auf *pufL* scheint neben der RNase III auch noch von Hfq abhängig zu sein (Abbildung 42B).

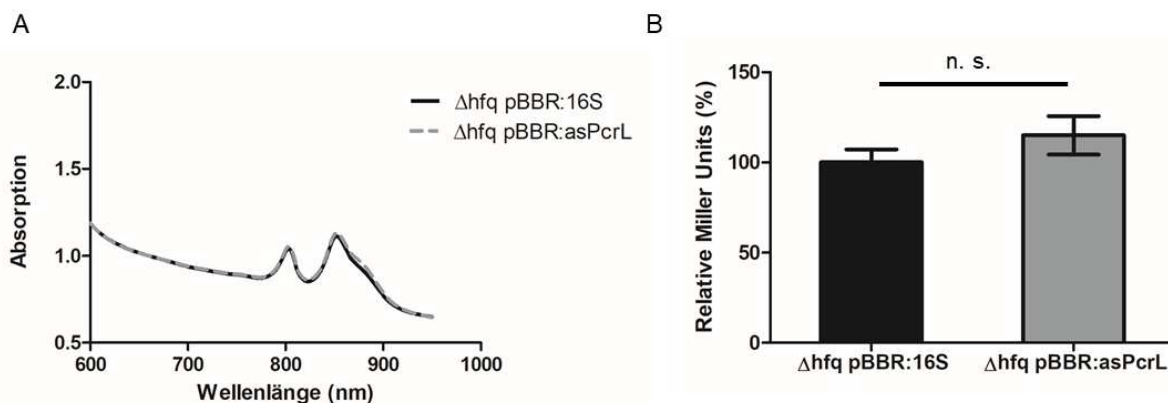


Abbildung 42: Der durch die Überexpression von asPcrL beobachtete Phänotyp ist Hfq abhängig. (A) Gesamtzell-Absorptionsmessung zwischen 600 und 900 nm. Die Kulturen wurden zu mikroaeroben Wachstumsbedingungen geschiftet und kultiviert. Die Zellen wurden in der späten exponentiellen Wachstumsphase geerntet und zur photometrischen Messung verwendet. (B) β -Galaktosidase Assay der Überexpression von asPcrL im Δhfq -Stamm. Sowohl das Plasmid pPHU:*pufL* als auch das Überexpressionsplasmid pBBR:asPcrL wurden über diparentale Konjugation in den Δhfq -Stamm eingebracht. Als Kontrolle wurde der Leervektor pBBR:16S über diparentale Konjugation in Δhfq _pPHU:*pufL* eingebracht. Die resultierenden Stämme wurden unter mikroaeroben Bedingungen kultiviert, Proben in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet und für einen β -Galaktosidase Assay eingesetzt. Der Mittelwert aus biologischen Triplikaten und technischen Duplikaten ist in relativen Miller Units mit Standardabweichung gezeigt.

Eine Co-Immunopräzipitation (coIP) wurde genutzt, um zu untersuchen, ob es sich um eine direkte Interaktion zwischen asPcrL und Hfq handelt oder ob der Einfluss auf die Stabilität der RNAs durch indirekte Effekte zustande kam. Dazu wurde ein Stamm genutzt, der ein 3xFLAG-

Hfq exprimiert. Als Kontrolle diente ein Stamm der das Wildtyp-Hfq exprimiert. Zusätzlich wurden das Überexpressionsplasmid pBBR:asPcrL und das Leervektorplasmid pBBR:16S durch diparentale Konjugation in die unterschiedlichen Hfq-Stämme eingebracht. Die resultierenden Stämme wurden unter mikroaeroben Bedingung kultiviert, für eine Co-Immunopräzipitation mit Anti-FLAG-Beads und im Anschluss für eine RNA-Isolation genutzt. Die Northern Blot Analyse zeigt, dass sowohl im Wildtyp-Hfq-Stamm als auch im 3xFLAG-Hfq-Stamm ein Signal für asPcrL in den Gesamt RNA-Proben zu detektieren war, wenn das Überexpressionsplasmid eingebracht wurde. In den coIP-RNA-Proben hingegen konnte nur im 3xFLAG-Hfq-Stamm ein Signal detektiert werden. Dies zeigt, dass asPcrL spezifisch an Hfq bindet und durch die Co-Immunopräzipitation durch die Anti-FLAG-Beads zusammen mit dem 3xFLAG-Hfq präzipitiert.

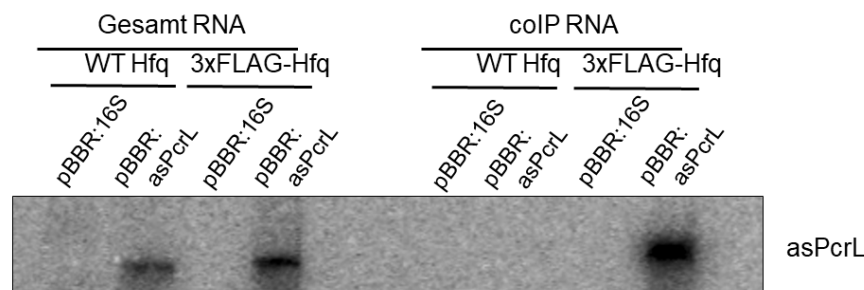


Abbildung 43: AsPcrL bindet *in vivo* an Hfq. Northern Blot Analyse von asPcrL nach Co-Immunopräzipitation mit Hfq. 10 μ g der Gesamt-RNA und die gesamte RNA der coIP-Proben wurden auf ein 10% Polyacrylamidgel aufgetragen. Zur Detektion wurde eine asPcrL-spezifische Sonde genutzt.

Um die Ergebnisse der Co-Immunopräzipitation zu bestätigen, wurde eine EMSA (*electromobility shift assay*)-Analyse durchgeführt. Dazu wurde das Hfq on *R. sphaeroides* in *E. coli* Zellen exprimiert und durch eine Affinitätschromatographie und anschließende Gelfiltration aufgereinigt. Unterschiedliche Konzentrationen (0, 1, 10, 50, 100, 500, 1000, 5000 nM) des aufgereinigten Hfq wurden mit jeweils 100 fmol radioaktiv-markiertem asPcrL-*in vitro* Transkript inkubiert und anschließend über ein natives 6% Polyacrylamidgel aufgetrennt. Bereits bei niedrigen Hfq-Konzentrationen bindet das freie *in vitro* Transkript von asPcrL an Hfq, wobei die Menge an freiem asPcrL-Transkript abnimmt. Durch die Bindung an Hfq verändert sich das Laufverhalten von asPcrL im Polyacrylamidgel und das Signal shiftet nach oben. Ab einer Hfq-Konzentration von 1000 nM bindet das *in vitro* Transkript vollständig an Hfq und es ist kein freies asPcrL mehr detektierbar. Um eine unspezifische Bindung von asPcrL an das RNA-bindende Hfq ausschließen zu können, wurde ein Konkurrenz-EMSA durchgeführt. Dazu wurde radioaktiv-markiertes asPcrL-*in vitro* Transkript mit 1 nM

aufgereinigtem Hfq inkubiert. Als Kompetitor wurde kaltes *sinI*-*in vitro* Transkript von *Sinorhizobium meliloti* und asPcrL in aufsteigenden Konzentration (1, 10, 100 pmol) hinzugegeben. Als Kontrolle diente radioaktiv-markiertes *in vitro* Transkript, welches in Abwesenheit von Hfq inkubiert wurde. Durch die Zugabe von 1 nM Hfq wird das *in vitro* Transkript gebunden und das Signal shiftet im Vergleich zur freien RNA nach oben. Die Zugabe des *sinI*-*in vitro* Transkript in verschiedenen Konzentrationen verändert das Laufverhalten des RNA-Hfq-Komplexes nicht. Da *sinI* nicht mit asPcrL um Hfq konkurrieren kann, bindet asPcrL vollständig an Hfq und es ist kein Signal für freies asPcrL *in vitro* Transkript zu beobachten. Nach der Zugabe von kaltem asPcrL, nimmt das Signal von freiem asPcrL mit ansteigender Konzentration von kaltem asPcrL zu, da sowohl das kalte als auch das radioaktiv-markierte asPcrL an Hfq binden können. Damit konnte gezeigt werden, dass Hfq nicht jede RNA bindet und die Bindung zu asPcrL spezifisch ist (Abbildung 44).

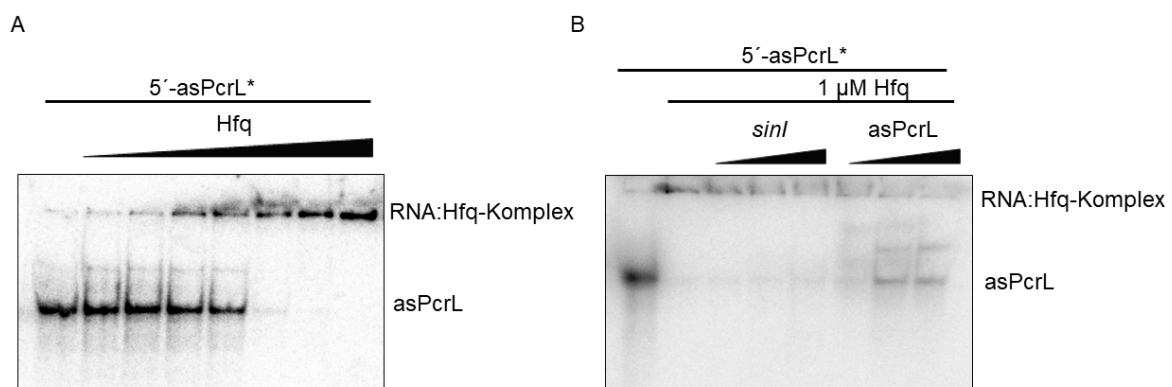


Abbildung 44: Hfq bindet *in vitro* spezifisch asPcrL. Interaktionsassay von asPcrL und Hfq mittels EMSA. (A) 100 fmol radioaktiv-markiertes asPcrL-*in vitro* Transkript wurde mit aufsteigenden Konzentrationen aufgereinigtem Hfq (0, 1, 10, 50, 100, 500, 1000, 5000 nM) inkubiert und über ein natives 6% Polyacrylamidgel aufgetrennt. (B) 100 fmol radioaktiv-markiertes asPcrL-*in vitro* Transkript wurden mit 1 µM aufgereinigtem Hfq und mit aufsteigenden Mengen an kaltem *sinI*- und asPcrL-*in vitro* Transkript inkubiert. Als Kontrolle diente radioaktiv-markiertes *in vitro* Transkript, welches ausschließlich mit und ohne Zugabe von Hfq inkubiert wurde. Die Proben wurden über ein natives 6% Polyacrylamidgel aufgetrennt.

Um zu untersuchen welcher Teil der asPcrL-Sequenz an Hfq bindet, wurde die EMSA-Analyse mit radioaktiv-markierten *in vitro* Transkripten der 5'- beziehungsweise 3'-asPcrL-Fragmente durchgeführt. Unterschiedliche Konzentrationen (0, 1, 10, 50, 100, 500, 1000 nM) des aufgereinigten Hfq wurden mit jeweils 100 fmol der radioaktiv-markiertem Transkripte inkubiert und anschließend über ein 6% Polyacrylamidgel aufgetrennt. Während das Signal für das freie 5'-asPcrL-Fragment bereits bei niedrigen Hfq-Konzentrationen von 1-50 nM

abnimmt, blieb das Signal für das frei 3'-asPcrL-Fragment unter diesen Hfq-Konzentrationen stabil. Erst ab einer Konzentration von 100 nM Hfq war eine deutliche Abnahme des freien 3'-asPcrL-Transkript zu beobachten. Während bei einer Hfq-Konzentration von 500 nM kein freies 5'-asPcrL-Transkript mehr zu detektieren war, konnte für das 3'-asPcrL-Transkript bei gleicher Konzentration noch freie RNA detektiert werden. Zwar bindet das 3'-asPcrL-Fragment bei hohen Konzentrationen ebenfalls an Hfq doch scheint das 5'-asPcrL-Fragment eine höhere Affinität zu Hfq zu besitzen als das 3'-asPcrL-Fragment (Abbildung 45).

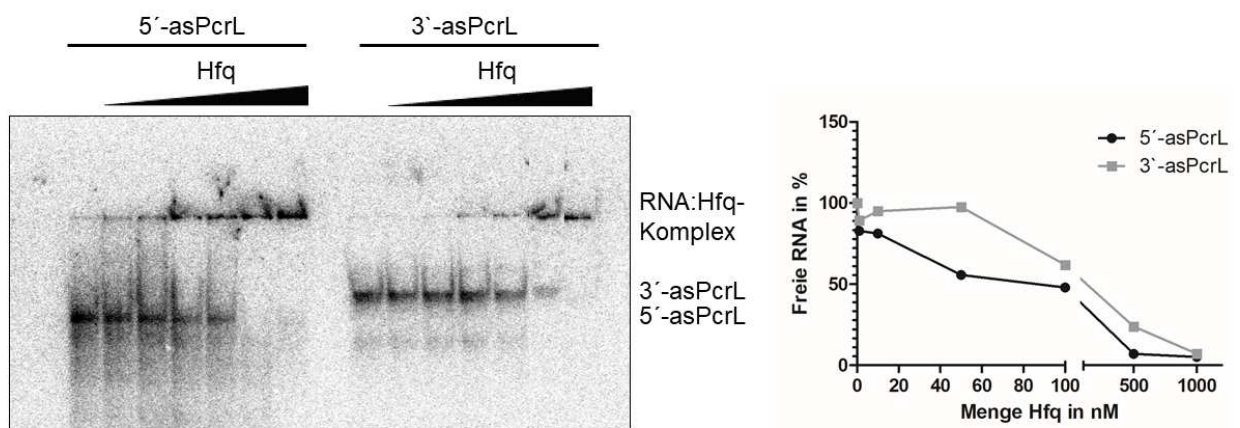


Abbildung 45: Das 5'-Ende von asPcrL hat *in vitro* eine höhere Affinität zu Hfq als das 3'-Ende. Interaktionsassay von asPcrL und Hfq mittels EMSA. 100 fmol radioaktiv-markierte 5'-asPcrL- oder 3'-asPcrL-*in vitro* Transkripte wurden mit aufsteigenden Konzentrationen aufgereinigtem Hfq inkubiert und über ein natives 6% Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Intensität der freien *in vitro* Transkripte wurde mit der Quantity One Software (Biorad) bestimmt und gegen die Menge des eingesetzten Hfq in nM aufgetragen.

4 Diskussion

Die posttranskriptionelle Regulation der Genexpression spielt eine wichtige Rolle in der Anpassung an unterschiedliche Umweltbedingungen. In dieser Arbeit wurde sowohl die Rolle der essentiellen RNase E, als auch die einer kleinen regulatorischen *antisense* RNA im Hinblick auf die Regulation der Expression und Prozessierung der Photosynthesegene in *Rhodobacter sphaeroides* untersucht.

4.1 Der Einfluss der RNase E auf das Transkriptom von *R. sphaeroides*

Um die Rolle der RNase E in der Prozessierung *in vivo* untersuchen zu können, wurde eine RNase E-Mutante (*rne*^{*E.c.ts*}) hergestellt (Peng *et al.* 2016). Da eine klassische Deletion letal ist, wurde eine Substitutionsmutante erstellt, die anstatt des endogenen *rne*-Gens aus *R. sphaeroides*, das *rne-3071* Allel aus dem *E. coli* N3431-Stamm besitzt. Dieses Gen enthält eine Punktmutation an der Nukleotidsequenzposition 742 (C →T), wodurch es zu einer Substitution des hydrophoben aromatischen Phenylalanins durch ein hydrophobes aliphatisches Leucin an Position 68 des Enzyms kommt. Durch diesen Aminosäureaustausch wird das Enzym thermosensitiv und kann bei einer Kultivierung bei 42°C inaktiviert werden (Goldblum und Apririon 1981; McDowall *et al.* 1993). Zwar zeigen Wachstumsexperimente unter mikroaeroben Bedingungen bei 32°C (Abbildung 7), dass das Enzym in *Rhodobacter sphaeroides* funktionsfähig ist, jedoch konnte interessanterweise ein starkes Wachstumsdefizit der RNase E-Mutante unter phototrophen Bedingungen bei 32°C beobachtet werden. Zusätzlich konnte in der Mutante sowohl unter mikroaeroben, als auch unter phototrophen Bedingungen eine Verminderung im Bakteriochlorophyllgehalt und in den Absorptionsspektren bei 32°C festgestellt werden (Abbildung 6). Auch das 5'-End-Mapping im Anschluss an eine RNA-Seq-Analyse, wodurch die 5'-Enden im Wildtyp und der RNase E-Mutante bestimmt wurden, zeigt, dass es bereits bei 32°C, wenn das Enzym noch nicht inaktiviert wurde, zu Unterschieden in der RNA-Prozessierung kommt. Diese Unterschiede können entstehen, wenn die RNase E aus *E. coli* die endogene RNase E aus *R. sphaeroides* nicht vollständig ersetzen kann. Die N-terminale Region, die die katalytische Aktivität beherbergt, weist in beiden Stämmen eine 46% Identität auf, während keine Ähnlichkeit in der Degradosom-Assemblierungsdomäne im C-Terminus vorliegt. Die RNase E-Enzyme können anhand ihrer nicht-katalytisch aktiven Domänen in verschiedene Klassen unterteilt werden. Während *E. coli* eine Typ I RNase E besitzt, wird die RNase E aus *Rhodobacter* zum Typ II gezählt (Ait-Bara und Carpousis 2015). Die RNase E Typ I aus *E. coli* bildet zusammen mit einer Enolase, der PNPase und der DEAD-

Box RNA-Helikase RhlB das Degradosom. Darüber hinaus konnten jedoch noch 18 weitere Proteine, wie beispielsweise Hfq (Ikeda *et al.* 2011), RNase II (Lu und Taghbalout 2014), die Poly(A)-Polymerase I und die RNase R (Carabetta *et al.* 2010) identifiziert werden, die unter unterschiedlichen Wachstumsbedingungen, mit der RNase E und dem Degradosom interagieren können. Die Typ II RNase E kommt in Alphaproteobakterien vor und besitzt im Vergleich zu Typ I Enzymen charakteristische Arginin-Prolin-Motive in der S1-Domäne. Ähnlich wie in *E. coli* (Carpousis 2007) ist auch in *Rhodobacter* die RNase E verantwortlich für die Assemblierung des Degradosoms. Jäger *et al.* (2001) konnten einen Proteinkomplex mit hohem Molekulargewicht isolieren, der *in vitro* degradative Aktivität gegenüber einigen RNAs besaß. Der aufgereinigte Komplex beinhaltete die RNase E mit 180 kDa, den Terminationsfaktor Rho und zwei DEAD-Box RNA-Helikasen mit 65 und 74 kDa. Die Enolase und die PNPase zählen im Vergleich zum *E. coli* Degradosom nicht zu den Hauptbestandteilen des Degradosoms aus *R. sphaeroides*. Auch in der Lokalisation weisen die Enzyme der verschiedenen Klassen deutliche Unterschiede auf. Die RNase E aus *E. coli* ist durch eine α -Helix-Struktur im C-Terminus in der cytoplasmatischen Membran verankert. Diese Struktur ist sowohl in γ - als auch in β -Proteobakterien konserviert, aber in α -Proteobakterien, zu denen *R. sphaeroides* gehört, nicht zu finden (Khemici *et al.* 2008). In dem Alphaproteobakterium *Caulobacter crescentus* ist die RNase E ungleichmäßig in der Zelle verteilt und mit der DNA assoziiert (Montero Llopis *et al.* 2010).

Durch eine Genom-weite Analyse der RNase E-Schnittstellen konnte gezeigt werden, dass die RNase E auch in *R. sphaeroides* eine wichtige Rolle im Umsatz und der Prozessierung von unterschiedlichen RNA-Spezies spielt, wobei die Verteilungen der RNase E-Schnittstellen in den einzelnen RNA-Spezies, den Verteilungen in *Salmonella enterica* ähneln (Chao *et al.* 2017). Die zusätzliche Analyse, der in der Mutante angereicherten 5'-Enden zeigt, dass diese besonders in rRNAs zu finden sind (Abbildung 9). Diese in der Mutante angereicherten 5'-Enden entstehen durch eine vorangegangene, RNase E-unabhängige, RNase-Tätigkeit. Dies zeigt, dass in *R. sphaeroides* die initiale Prozessierung und Reifung der rRNA vornehmlich von anderen RNasen durchgeführt wird (Kapitel 1.2.3). Die MEME-Analyse zeigt, dass die RNase E in *R. sphaeroides*, ähnlich wie für andere Organismen beobachtet, eine Präferenz für AU-reiche Regionen besitzt (Abbildung 10) (Chao *et al.* 2017). Anders als *E. coli* und *S. enterica*, die einen GC-Gehalt von 50% beziehungsweise 52% besitzen, zeichnet sich *R. sphaeroides* jedoch durch einen hohen GC-Gehalt von bis zu 69% aus.

Phänotypische Charakterisierungen der *rne^{E.c.ts}*-Mutante zeigten, dass diese sensitiver gegenüber photooxidativem Stress, aber beispielsweise resistenter gegenüber organischen Peroxiden ist, als der Wildtyp (Abbildung 8). Die genauen Mechanismen dahinter sind jedoch noch nicht verstanden. In *R. sphaeroides* sind verschiedene sRNAs bekannt, die an der Stress-induzierten Genregulation beteiligt sind. SorX ist in der 3'-UTR von RSP_0847, welches ein OmpR-Protein kodiert, lokalisiert und an der Stressantwort beteiligt. SorX vermittelt eine Resistenz gegen Hydroperoxide, die im Anschluss an Singulett-Sauerstoffstress entstehen können. Als direktes *target* konnte die *potA*-mRNA identifiziert werden, die eine Untereinheit eines Polyamintransporters kodiert. In *E. coli* konnte gezeigt werden, dass der PotABCD-Transporter für die Aufnahme von Spermidin verantwortlich ist, welches vorteilhaft für das Wachstum unter oxidativem Stress sein soll. Jedoch konnte für *R. sphaeroides* gezeigt werden, dass Spermidin im Medium, die Level der reaktiven Sauerstoffspezies erhöht und die Sensitivität des Wildtyps gegenüber tBOOH erhöht. Durch die direkte Bindung von SorX an die Ribosomenbindestelle von *potA*, wird die Translation der mRNA und so auch die Aufnahme des schädigenden Spermidin unter Stressbedingungen unterbunden, wodurch die ROS-Level in der Zelle minimiert werden können (Peng *et al.* 2016). Durch die RNA-Seq-Analyse konnten RNase E-Schnittstellen in der sRNA SorX identifiziert werden und die Northern Blot Analyse zeigt, dass das funktionelle 75 nt-lange SorX in der Mutante sowohl unter 32°C, als auch unter 42°C nicht aus dem Pre-SorX-Fragment herausprozessiert werden kann und so eventuell die physiologische Funktion der sRNA reprimiert wird (Abbildung 11). Auch das Expressionsprofil der zweiten Stress-induzierten sRNA, SorY, ist in der *rne^{E.c.ts}*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp sowohl unter 32°C als auch unter 42°C verändert (Abbildung 12). Durch die direkte Bindung von SorY an die *takP*-mRNA, die einen TRAP-T-Transporter kodiert, wird die Aufnahme von Malat über diesen Transporter und so die Nutzung des Citratzyklus minimiert. Durch die Expression von SorY wird die Metabolitenaufnahme unter photooxidativen Stressbedingungen reguliert und so dem oxidativem Stress entgegengewirkt. Unter oxidativem Stress nutzen Bakterien den Pentosephosphatweg anstelle der Glykolyse zur Energiekonservierung, um die durch den Citratzyklus entstehenden prooxidativen NADH-Moleküle zu minimieren und die Entstehung der schützenden NADPH-Moleküle zu fördern (Adnan *et al.* 2015). Durch die TIER-Seq-Analyse (*transiently inactivating an endoribonuclease followed by RNA-Seq*) konnte gezeigt werden, dass SorY ebenfalls eine RNase E-Schnittstelle beinhaltet (Abbildung 12), jedoch wurde bis jetzt nicht vollständig untersucht, ob die Anreicherung von SorY in der RNase E-Mutante durch posttranskriptionelle Mechanismen, oder durch eine gestörte Transkriptionsrate zustande kommt. Die Transkription

beider sRNAs hängt von den alternativen Sigmafaktoren RpoH_I und RpoH_{II} ab, jedoch ist die Induktion von SorX weniger stark als die von SorY (Nuss *et al.* 2010). Die Anreicherung von SorY könnte auf eine veränderte RpoH_I/RpoH_{II}-abhängige Transkriptionsrate hindeuten, wodurch eine höhere Toleranz gegenüber tBOOH und Paraquat vermittelt werden könnte. Jedoch weisen die mRNA-Sequenzen der alternativen Sigmafaktoren RpoE, RpoH_I und RpoH_{II} mit 64, 62 und 30 Schnittstellen pro kb eine besonders hohe Dichte an RNase E-abhängiger Schnittstellen auf (Förstner *et al.* 2018), wodurch deren Funktion in der *rne^{E.c. ts}*-Mutante verändert sein könnte. Da all diese alternativen Sigmafaktoren an der Stressantwort durch Singulett-Sauerstoffstress beteiligt sind, könnten diese Änderungen die höhere Sensitivität gegenüber Singulett-Sauerstoff erklären (Nuss *et al.* 2009; Nuss *et al.* 2010).

Zusätzlich wies die *rne^{E.c. ts}*-Mutante eine veränderte Pigmentierung und ein Wachstumsdefizit unter phototrophen Wachstumsbedingungen auf (Abbildung 7). Frühere Studien zeigen, dass die RNase E in *R. capsulatus* essentiell für die Prozessierung der *puf*-mRNA ist. Jeweils eine *rate-limiting* RNase E-Schnittstelle konnte in der *pufQ*- und *pufL*-Sequenz identifiziert werden. Zwar konnte in *R. sphaeroides* das gleiche Prozessierungsmuster der *puf*-mRNA, wie in *R. capsulatus* beobachtet werden (Li *et al.* 2004), jedoch zeigte eine BLAST-Analyse, dass die *rate-limiting* RNase E-Schnittstelle in *pufL*, die in *R. capsulatus* durch *in vitro* Assays identifiziert werden konnte (Fritsch *et al.* 1995), in *R. sphaeroides* nicht konserviert ist und die Nukleotidsequenz an dieser Position abweicht (Abbildung 30). Durch RNA-Seq-Analysen des Wildtyps und der *rne^{E.c. ts}*-Mutante konnten die globalen RNase E-Schnittstellen im Transkriptom von *R. sphaeroides* identifiziert werden. Dabei konnten in der 5'-Region von *pufL* eine RNase E-Schnittstellen in einer AU-reichen Sequenz lokalisiert werden, die zusätzlich vom 5'-Terminus der regulatorischen *antisense* RNA asPcrL überspannt wird (Abbildung 14). Durch den *antisense* Charakter von asPcrL wird angenommen, dass diese an der Regulation der *puf*-Expression beteiligt ist (Kapitel 4.2). Stabilitätsassays konnten eine Stabilisierung der *puf*-mRNA in der RNase E-Mutante nach einer Inaktivierung durch 42°C im Vergleich zum Wildtyp zeigen. Jedoch konnte dieses Experiment keinen Aufschluss darüber geben, an welcher Position des 2,7 kb langen *pufBALMX*-Fragments im Wildtyp eine Prozessierung stattfindet, die in der RNase E-Mutante inhibiert wird. Zwar präferiert die RNase E einzelsträngige AU-reiche Sequenzen, jedoch konnte schon früh gezeigt werden, dass einige sRNAs die RNase E rekrutieren und so die Degradation ihrer Ziel-mRNA fördern. Dabei bildet sich meist ein Komplex aus der RNase E, der sRNA und Hfq, welches zum einen die sRNA vor einem RNase E-abhängigen Abbau schützt und die Bindung von sRNA und mRNA unterstützt. In *E. coli* kann Hfq eine stabile Bindung mit der RNase E durch deren C-terminale

Region eingehen, die für den sRNA-abhängigen Abbau der Ziel-mRNA essentiell ist. Die sRNA SgrS bindet über Hfq an die RNase E und induziert so den Abbau der Ziel-mRNA (Morita *et al.* 2005). Ob die RNase E in *Rhodobacter* mit Hfq interagieren kann, wurde bis jetzt nicht experimentell gezeigt. Jedoch konnte auch gezeigt werden, dass einige sRNAs die Stabilität ihrer Ziel-mRNA in Abhängigkeit von Hfq positiv beeinflussen können, indem sie eine RNase-Schnittstelle maskieren (Papenfort *et al.* 2013; Fröhlich *et al.* 2013). Um zu untersuchen, ob die RNase E die asPcrL-abhängige Prozessierung von *pufL* katalysiert, wurde ein *in vitro* Degradationsassay genutzt. Dafür wurde ein radioaktiv-markiertes *in vitro* Transkript in An- und Abwesenheit von asPcrL und der Zugabe der aufgereinigten RNase E aus *E. coli* inkubiert und über ein denaturierendes Gel aufgetrennt. Das *in vitro* Degradationsassay konnte zeigen, dass die RNase E in der Lage ist, das *pufL*-Transkript in der Abwesenheit von asPcrL über die Zeit zu degradieren. Die Zugabe von asPcrL wiederum stabilisiert das *pufL*-Transkript, welches über die gleiche Zeit weniger stark degradiert wird (Abbildung 31). Zwar zeigen die RNA-Seq-Analyse und das Stabilitätsassay, dass die RNase E die Stabilität der *puf*-mRNA beeinflusst, doch das *in vitro* Degradationsassay zeigt eindeutig, dass die RNase E nicht an der asPcrL-abhängigen Destabilisierung des *pufBALMX*-Fragments beteiligt ist. Die Stabilisierung des langen *pufBALMX*-Fragments in der RNase E-Mutante könnte auch durch die sRNA PcrX vermittelt werden. Diese wird wie viele andere sRNAs in *R. sphaeroides* durch die RNase E prozessiert (Billenkamp *et al.* 2015; Weber *et al.* 2016; Förstner *et al.* 2018; Peng *et al.* 2016) und kann so an ihre Ziel-mRNA *pufX* im *pufBALMX*-Fragment binden und es destabilisieren. Durch die Inaktivierung der RNase E bei 42°C und der damit einhergehenden fehlenden Prozessierung von PcrX aus der 3'-UTR der polyzistronischen *puf*-mRNA, könnte das ganze *pufBALMX*-Fragment stabilisiert werden (Eisenhardt *et al.* 2018). Neben RNase E-Schnittstellen in *pufL* und PcrX konnte eine weitere Schnittstelle in PcrZ identifiziert werden. PcrZ ist eine weitere kleine regulatorische RNA, die die Expression der Photosynthesegene beeinflusst. Durch eine direkte Bindung an *bchN* beeinflusst PcrZ die Expression der Bakteriochlorophyllgene. Die Überexpression von PcrZ führt zu einer Verringerung der Bakteriochlorophyllmenge. Durch das Fehlen der RNase E könnte die Prozessierung und Degradation von PcrZ so gestört werden, dass es über die Zeit zu einer Akkumulation der sRNA kommt, welches die Herunterregulierung einiger Photosynthesekomponenten zur Folge haben könnte. Neben den Schnittstellen in den Sequenzen der Photosynthesegene konnten ebenfalls Schnittstellen in *appA*, *ppaA* und *firL* identifiziert werden, die für die Aktivierung der Transkription von verschiedenen Photosynthesegenen verantwortlich sind. Welcher Mechanismus im Speziellen für die Reduktion der

Bakteriochlorophyllmenge und den Wachstumsdefiziten unter phototrophen Bedingungen führt, konnte durch die globale Transkriptomanalyse schlussendlich nicht aufgeklärt werden und bedarf zusätzliche Untersuchungen in der Zukunft.

Insgesamt zeigen die Daten, dass die RNase E einen immensen Einfluss auf die Genregulation und somit auf das Proteom von *Rhodobacter sphaeroides* hat und Hinblick auf die Prozessierung von *pufL* die mRNA auch in Abwesenheit von asPcrL spalten kann.

4.2 Expressionsprofil von asPcrL

Die *antisense* RNA asPcrL wurde durch Gesamt-RNA-Seq-Studien von mikroaerob kultivierten *R. sphaeroides*-Kulturen identifiziert (Abbildung 17). Die Existenz von asPcrL konnte durch eine Northern Blot Analyse bestätigt werden, obwohl *upstream* der in den Seq-Studien gefundenen Sequenz durch Computervorhersagen keine Promotersequenz vorhergesagt werden konnte (Abbildung 19). Das genutzte Computerprogramm BPROM basiert auf Algorithmen, die spezifisch für σ^{70} -Promotoren von *E. coli* sind und Promotersequenzen, mit einer Genauigkeit von bis zu 80%, vorhersagt. Anders als *E. coli*, dessen GC-Gehalt bei 50,7% liegt, weist *R. sphaeroides* einen GC-Gehalt von bis zu 69% auf. Bereits identifizierte und experimentell bestätigte Promotersequenzen aus *Rhodobacter sphaeroides* weisen nur eine geringfügige Sequenzübereinstimmung mit *E. coli* auf (Remes *et al.* 2017), wodurch eine falsche Vorhersage getroffen sein könnte. Aus diesem Grund wurde eine Vektor-basierte transkriptionelle Fusion zur Bestimmung der Promoteraktivität genutzt. Die Auswertung zeigt eine schwache Promoteraktivität von ca. 20 Miller Units unter allen getesteten Bedingungen (Abbildung 18). Die schwache Promoteraktivität stimmt mit den Beobachtungen der RNA-Seq-Studien überein: für das *puf*-Operon konnten mehr als 10x mehr *reads* als für asPcrL detektiert werden. Die Ergebnisse zur Bestimmung der Promoteraktivität stehen allerdings im Kontrast zu dem Expressionsprofil von asPcrL, welches durch eine Northern Blot Analyse gezeigt wurde, bei der unter aeroben Bedingungen asPcrL nicht detektiert werden konnte. Das β -Galaktosidase Assay zeigt hingegen die stärkste Promoteraktivität unter aeroben Bedingungen. Die unterschiedlichen Beobachtungen können durch die verschiedenen Methoden zu Stande kommen. Bei der Plasmid-basierten transkriptionellen Fusion wird ein artifizielles System genutzt. Nur eine kurze DNA-Sequenz wird in das Plasmid kloniert, welches in die Zellen eingebracht wird. So kann beispielsweise durch das Fehlen wichtiger regulatorischer Sequenzabschnitte, oder durch unterschiedliche Kopienzahlen des Plasmids, die eigentliche Promoteraktivität *in vivo* falsch bestimmt werden. Aus diesem Grund wird den Ergebnissen der Northern Blot Analyse mehr Bedeutung

zugesprochen. Die Detektion von asPcrL konnte dadurch nur unter mikroaeroben und phototrophen Bedingungen erfolgen und die Expression ist von dem Antwortregulator PrrA, FnrL und dem Antirepressor AppA abhängig, die die Expression mehrerer Photosynthesegene unter mikroaeroben und phototrophen Wachstumsbedingungen induzieren (Abbildung 19). Ähnliche Expressionsprofile konnten sowohl für die sRNAs PcrZ und PcrX, als auch für das *puf*-Operon und weitere Photosynthesegene beobachtet werden (Zeilstra-Ryalls und Kaplan 1998; Jones *et al.* 2005; Mank *et al.* 2012; Eisenhardt *et al.* 2018). Die Tatsache, dass asPcrL unter den gleichen Bedingungen wie Photosynthesegene transkribiert wird, deutet auf eine mit ihnen verwandte Funktion hin.

4.3 Der Einfluss von asPcrL auf die *puf*-mRNA

Da asPcrL sowohl die kodierende Sequenz von *pufL*, als auch die interzistronische Region zwischen *pufA* und *pufL* überspannt, konnte für die Untersuchung der biologischen Funktion kein klassischer *Knockout* genutzt werden, da dieser gleichzeitig die Deletion der komplementären *sense*-mRNA mit sich ziehen würde. Da zusätzlich keine Promoter-Konsensussequenz gefunden werden konnte, konnte auch kein *gene silencing* durch gezielte Mutationen durchgeführt werden. Darüber hinaus könnten auch gezielte Mutationen, die zwar die Proteinsequenz nicht beeinflussen, die Sekundärstruktur der RNA und damit einhergehend auch die Stabilität der *pufBALMX*-mRNA beeinflussen. Daher wurde eine Plasmid-basierte Überexpression genutzt, um die biologische Funktion von asPcrL untersuchen zu können. Zur Bestätigung der Überproduktion wurde eine Northern Blot Analyse genutzt. Unter allen getesteten Bedingungen konnte im Überexpressionsstamm 2.4.1.pBBR:asPcrL höhere asPcrL-Level als im korrespondierenden Leervektorkontrollstamm 2.4.1.pBBR:16S beobachtet werden (Abbildung 20). Die Überexpression von asPcrL führt zu einer Reduktion der Pigmentierung im Vergleich zur Leervektorkontrolle. 6 Stunden nach der Umstellung von aeroben Wachstumsbedingungen, währenddessen die Expression der Photosynthesegene weitestgehend reprimiert ist, zu phototrophen Wachstumsbedingungen und damit zur Induktion der Expression der Gene, ist sowohl der Bakteriochlorophyll-, als auch der Carotinoidgehalt im Überexpressionsstamm im Vergleich zur Leervektorkontrolle um 50% reduziert (Abbildung 22). Da die Pigmente ausschließlich an die Pigment-bindenden Proteine der Lichtsammelkomplexe (LH) und des Reaktionszentrums (RC) gebunden sind, ist darauf zu schließen, dass einer oder mehrere dieser Komplexe ebenfalls in geringerer Menge vorliegen müssen. Das Vollzellabsorptionsspektrum zeigt eine spezifische Reduktion des Lichtsammelkomplexes I, wohingegen die Absorption des Lichtsammelkomplexes II nicht durch die Überexpression von asPcrL beeinflusst wird (Abbildung 23). Das gleiche

Absorptionsspektrum konnte in einem *R. capsulatus*-Stamm beobachtet werden, in dem die Gene für die zwei Untereinheiten L und M des Reaktionszentrums deletiert wurden (Klug und Cohen 1988). Die Reduktion der Reaktionszentren geht folglich mit einer Änderung der Lichtsammelkomplexes I-bedingten Absorption einher. Die Assemblierung des RC-LH I-Komplexes beginnt mit der Bildung der RC-Untereinheit H, die von *puhA* kodiert wird. Bereits in aerob kultivierten Kulturen ist die RC-Untereinheit H nachweisbar. Bevor sich die Proteine für die Lichtsammelkomplexe I bilden, welche sich um das Reaktionszentrum zusammenschließen, interagiert das Reaktionszentrum mit dem Polypeptid PufX (Pugh *et al.* 1998). In Zellen bei denen das Verhältnis von Lichtsammelkomplex zu Reaktionszentrum, welches normalerweise 14:1 ist, verändert ist, sodass 29 Lichtsammelkomplexe I im Vergleich zu einem Reaktionszentrum gebildet werden, zeigen eine Veränderung in der Assemblierung der Lichtsammelkomplexe. Durch die überschüssigen Lichtsammelkomplexe, die nicht um ein Reaktionszentrum assembliert werden können, bilden sich leere oder unvollständige, beispielsweise in Spiralen angeordnete Lichtsammelkomplexe (Olsen *et al.* 2014). Bis jetzt wurde nicht experimentell gezeigt, ob diese „leeren“ Lichtsammelkomplexe die gleiche Absorption besitzen, wie Lichtsammelkomplexe, die sich um ein Reaktionszentrum herum gebildet haben, jedoch könnte so die Verringerung des Lichtsammelkomplexes I erklärt werden. Zwar konnte gezeigt werden, dass diese „leeren“ Lichtsammelkomplexe aktiv sind und die Lichtenergie an das Reaktionszentrum weiterleiten können (Olsen *et al.* 2014), jedoch ist anzunehmen, dass durch die fehlenden Reaktionszentren ein Defizit in der Energiekonservierung entsteht, welches das langsamere Wachstum des Überexpressionsstammes im Vergleich zum Kontrollstamm erklärt. 26 Stunden nach der Umstellung von aeroben zu phototrophen Bedingungen ist der Bakteriochlorophyll- und der Carotinoidgehalt des Überexpressionsstammes und der Leervektorkontrolle jedoch nahezu identisch und beide Stämme erreichen die gleiche maximale OD₆₆₀ (Abbildung 22). Dies kann auf die Untereinheit H des Reaktionszentrums zurückzuführen sein, die unabhängig von den, durch das *puf*-Operon kodierten Untereinheiten L und M, konstitutiv exprimiert wird, und den Startpunkt für die Assemblierung des RC-LH I-Komplexes markiert. Es wird vermutet, dass PuhA selbst die Translation der anderen Photosyntheseproteine beeinflussen kann. Sobald alle H-Untereinheiten von den Pigment-bindenden Untereinheiten gebunden sind, wird die Translation der Proteine gestoppt. In dem Leervektorstamm, bei dem die stöchiometrischen Verhältnisse zwischen Lichtsammelkomplex I und den L- und M-Untereinheiten des Reaktionszentrums nicht verändert sind, kann die Assemblierung schneller ablaufen als im Überexpressionsstamm, in dem dieses Verhältnis gestört ist. Wenn der

Leervektorkontrollstamm, die maximale Menge an Photosynthesekomplexen synthetisiert hat, wird die Syntheserate herunterreguliert, während die Synthese des Überexpressionsstammes ein längeres Zeitintervall in Anspruch nimmt. Während dieser Zeit kann durch das Fehlen von Komponenten des Photosyntheseapparates unter phototrophen Wachstumsbedingungen nicht die maximale Energiekonservierung bewerkstelligt werden, wodurch es zu einem Wachstumsdefizit kommt, während bei mikroaeroben Wachstumsbedingungen, bei der die aerobe Atmung zur Energiekonservierung genutzt wird und die Ausbildung der Photosynthesekomplexe nicht benötigt wird, ein identisches Wachstum beobachtet werden konnte.

Antisense RNAs können durch verschiedene Mechanismen ihre Ziel-mRNAs auf posttranskriptioneller Ebene beeinflussen. Die transkriptionelle Interferenz kommt durch die räumliche Nähe zweier Promotoren zustande, die sich in der Stärke der Promoteraktivität unterscheiden, wobei der stärkere Promoter die Aktivität des schwächeren beeinflussen kann. Die beiden interagierenden Promotoren können unterschiedlich zueinander angeordnet sein. Die beiden Promotoren können sich direkt überlappen, wenn die RNA-Polymerase-Bindestellen in der gleichen DNA-Sequenz lokalisiert sind. Die Promotoren können hintereinander liegen, sodass die Transkription der beiden Gene in die gleiche Richtung verläuft. Die Promotoren können jedoch auch hintereinander liegen, während die Transkription der beiden Gene in die entgegengesetzte Richtung verläuft (Shearwin *et al.* 2005). Callen *et al.* (2004) konnten zeigen, dass transkriptionelle Interferenz für den *switch* zwischen dem lysogenen und lytischen Zyklus des Coliphagen 186 verantwortlich ist. Durch den *sitting duck*-Mechanismus wird die Aktivität von pL durch die konvergente Transkription ausgehend von pR reprimiert, da die Initiierung der Polymerase an pL unterbunden wird. Die beiden Promotoren liegen 62 bp auseinander und deren Transkription verläuft in die entgegengesetzte Richtung. Die Aktivität des lytischen Promoters pR ist 10-mal stärker als die des lysogenen pL Promoters. Die von pR-ausgehende Transkription, inhibiert die vom pL-ausgehende Transkription. Erst durch einen Repressor, dessen mRNA in der lysogenen Phase pL-abhängig transkribiert wird und die Aktivität von pR herabsetzen kann, kann die transkriptionelle Interferenz aufgehoben werden (Dodd und Egan 2002; Callen *et al.* 2004). Solch eine Promoteranordnung ist auch bei asPcrL und dem *puf*-Operon zu beobachten. Da das *puf*-Operon als polyzistronische mRNA transkribiert wird, ist die Promoterregion ca. 700 bp *upstream* vom Startcodon von *pufQ* lokalisiert (Adams *et al.* 1989), sodass die Promotoren des *puf*-Operons und asPcrL ca. 1600 bp auseinander liegen. Die transkriptionelle Interferenz beruht meist auf dem Prinzip, der räumlichen Nähe der beiden entgegenkommenden Polymerasen, welches zu

einer Reprimierung der Genexpression führen kann. Da mehrere Ergebnisse zeigen, dass asPcrL durch eine Plasmid-basierte Überexpression in *trans* eine Änderung des Phänotypen bewirken kann, ist davon auszugehen, dass die Regulation nicht über transkriptionelle Interferenz vermittelt wird. Auch die Schwäche des asPcrL-Promoters spricht gegen diese Art von Regulation, da meist ein starker, aggressiver Promoter einen schwachen, sensitiven Promoter reprimiert.

Die Vielzahl von sRNAs und asRNAs reguliert die Expression ihrer Zielgene durch eine direkte Basenpaarung. Durch diese wird die Expression der Ziel-mRNA in den meisten Fällen reprimiert. Ein Plasmid-basiertes translationales Fusionsassay wurde genutzt, um den Einfluss von asPcrL auf die *pufL*-RNA zu untersuchen. Dafür wurde die kodierende Sequenz von *pufL* ohne Stoppcodon, aber inklusive der eigenen Ribosomenbindestelle, vor ein *lacZ*-Gen kloniert, welches kein eigenes Startcodon und Ribosomenbindestelle besitzt, wodurch eine Fusions-mRNA aus *pufL* und *lacZ* entsteht. Durch das fehlende Startcodon und Ribosomenbindestelle ist die Translation von *lacZ* abhängig von der Translationsinitiation *upstream* der kodierenden Region von *pufL*. Ein β -Galaktosidaseassay konnte zeigen, dass die Plasmid-basierte Überexpression von asPcrL in *trans* zu einem geringeren Substratumsatz führt (Abbildung 26). Wenn das Substrat ONPG im Überfluss vorhanden ist, ist der Substratumsatz proportional zur in der Zelle vorhandenen β -Galaktosidasemenge. Im Überexpressionsstamm 2.4.1_pBBR:asPcrL wurde folglich weniger β -Galaktosidase synthetisiert, als im Kontrollstamm 2.4.1_pBBR:16S. Verschiedene Mechanismen sind bekannt, wie sRNAs und asRNAs die Synthesemenge von Proteinen beeinflussen können. Durch die direkte Bindung der sRNAs in der 5'-UTR kann die Ribosomenbindestelle blockiert werden, wodurch die Assemblierung der Ribosomen und damit einhergehend die Translation unterbunden wird (Ma und Simons 1990; Koraimann *et al.* 1991; del Solar *et al.* 1997; López-Aguilar *et al.* 2015). In einigen Beispielen kann auch ohne direkte Blockierung der Ribosomenbindestelle, die Translation der Ziel-mRNA reprimiert werden. Beispielsweise reprimiert die sRNA GcvB ihre Ziel-mRNA *gltI* durch eine Bindung in der 5'-UTR bis zu 57 Nukleotide *upstream* des Startcodons (Sharma *et al.* 2007; Večerek *et al.* 2007). Auch durch die Destabilisierung der Ziel-mRNA, kann die Translation reprimiert werden, da das Transkript nicht länger für die Translation zur Verfügung steht. Besonders die RNase E und die RNase III sind in diesem Prozess involviert. Einige Interaktionen zwischen der sRNA und der mRNA führen zu einer Kombination aus blockierter Ribosomenbindestelle und anschließender Degradation, wobei die Inhibierung der Ribosomenbindestelle den Großteil zur Proteinreduktion beiträgt und die Destabilisierung die Regulation irreversibel macht (Morita *et al.* 2006). Da asPcrL sowohl die

kodierende als auch die interzistronische Sequenz inklusive Ribosomenbindestelle von *pufL* überspannt, kann keiner der beschriebenen Mechanismen zur Reduzierung der Proteinmenge *per se* ausgeschlossen werden. Stabilitätsassays konnten zeigen, dass eine Überexpression von asPcrL zu einer Destabilisierung des *pufBALMX*-Fragmentes beiträgt. Die Halbwertszeit sinkt im Überexpressionsstamm im Vergleich zum Kontrollstamm von 12 min auf 7 min (Abbildung 27). Ähnliche Ergebnisse konnten für PcrX beobachtet werden. PcrX destabilisiert ebenfalls das *pufBALMX*-Fragment über eine direkte Bindung an die *pufX*-mRNA. Die dabei involvierte RNase ist bis jetzt nicht bekannt (Eisenhardt *et al.* 2018).

4.4 Die Rolle der RNase III in der Interaktion von asPcrL und *pufL*

Um die RNase, die bei der asPcrL-abhängigen Destabilisierung des *pufBALMX*-Fragmentes involviert ist, zu identifizieren, wurde die Gesamt-RNA von verschiedenen RNase-Deletionsmutanten isoliert und durch einen Northern Blot analysiert. Sowohl die untersuchten Exoribonukleasen RNase J und RNase R, die Endonuklease YbeY und die Pyrophosphohydrolase RppH zeigen keine Unterschiede in den *puf*-typischen Prozessierungsfragmenten auf und wurden daher als potentielle Interaktionspartner ausgeschlossen (Abbildung 32).

Die RNase III ist ein hoch konserviertes Enzym und konnte in fast allen sequenzierten Bakterienstämmen detektiert werden. Sie katalysiert die Spaltung von doppelsträngigen RNAs (dsRNA) und ist an der Reifung und Prozessierung von sRNAs und ihren Ziel-mRNAs beteiligt (Court *et al.* 2013). Das eukaryotische RNase III-Ortholog Dicer initiiert die RNA-Interferenz, indem es dsRNA in ca. 22 bp kurze si-RNAs prozessiert. Dadurch können Ziel-mRNAs durch den RISC-Multiproteinkomplex abgebaut werden (Bernstein *et al.* 2001; Zhang *et al.* 2002b). Die homodimere RNase III besitzt eine N-terminale katalytische Domäne und eine C-terminale dsRNA-Bindedomäne. Neben der Prozessierung von sRNA und mRNA ist die RNase III auch in der Reifung von rRNA und tRNA beteiligt (zusammengefasst in Nicholson 2014). In *E. coli* werden die 16S, 23S, 5S rRNA-Moleküle zusammen mit tRNA-Molekülen kotranskribiert. Das lange Vorläufermolekül wird von der RNase III in die reifen Moleküle prozessiert (Srivastava und Schlessinger 1990). In einigen Bakterien wie *Salmonella* spp., *Agrobacterium tumefaciens*, einigen Cyanobakterien und *Rhodobacter*-Stämmen enthält das 23S rRNA-Molekül weitere sogenannte *intervening sequences*, die eine RNase III-abhängige Prozessierung in ein 14S, ein weiteres 16S und ein 5,8S-ähnliches rRNA-Molekül hervorrufen (Kordes *et al.* 1994). Durch das Fehlen der RNase III in *Rhodobacter sphaeroides* und der damit einhergehenden Störung in der rRNA-Prozessierung, kann die Northern Blot Analyse nicht genutzt werden, um die

Prozessierung und Stabilität des *pufBALMX*-Fragmentes zu untersuchen, da das unprozessierte 23S rRNA-Vorläufermolekül in einem denaturierenden Agarosegel die gleiche Laufeigenschaft, wie das *pufBALMX*-Fragment besitzt (Abbildung 32). Da in den Zellen mehr rRNA als mRNA vorliegt, überlagert das unprozessierte 23S rRNA-Vorläufermolekül das *pufBALMX*-Fragment, welches dadurch nicht durch eine spezifische radioaktiv-markierte Sonde detektiert werden kann. Aus diesem Grund wurde die Stabilität des *pufBALMX*-Fragments mit einer qRT-PCR nachgewiesen. Die RNase III scheint einen Einfluss auf die Prozessierung des *pufBALMX*-Fragmentes zu haben, da dieses in der Δrnc -Mutante, über die Zeit, stabiler ist als im Wildtyp (Abbildung 34). Um das Ergebnis zu verifizieren, wurde das Plasmid-basierte translationale Fusionsassay genutzt. Durch das *in vitro* β -Galaktosidase Assay konnte in der Δrnc -Mutante ein höherer Substratumsatz als im Wildtyp gemessen werden, was für eine Stabilisierung der *pufL-lacZ*-Fusion-mRNA in Abwesenheit der RNase III spricht (Abbildung 35). Um zu untersuchen ob die RNase III an der asPcrL-abhängigen Degradation der *pufL*-mRNA beteiligt ist, wurde eine *in vitro* Degradationsassay mit der aufgereinigten RNase III aus *R. capsulatus* durchgeführt. Dazu wurde ein radioaktiv-markiertes *in vitro* Transkript von *pufL* in An- und Abwesenheit von asPcrL unter der Zugabe der aufgereinigten RNase III inkubiert und über ein denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die RNase III kann das *pufL-in vitro* Transkript nur degradieren, wenn asPcrL dazugegeben wurde. Ohne die Zugabe bleibt das *pufL-in vitro* Transkript über die Zeit stabil. Das gleiche Ergebnis konnte beobachtet werden, wenn ein radioaktiv-markiertes *in vitro* Transkript von asPcrL genutzt wurde. Eine Degradation konnte nur beobachtet werden, wenn *pufL* zum Ansatz dazugegeben wurde, ohne die Zugabe konnte die RNase III asPcrL nicht spalten (Abbildung 36). Verschiedene *in vivo*-Experimente deuteten ebenfalls auf einen gemeinsamen Abbau von asPcrL und *pufL* hin.

Bei der Verifizierung der Plasmid-basierten Überexpression von asPcrL unter verschiedenen Wachstumsbedingungen konnte interessanter Weise unter aeroben Bedingungen das stärkste Signal für asPcrL detektiert werden, obwohl es im Wildtyp unter dieser Bedingung nicht gebildet wird (Abbildung 20). Die Akkumulation von asPcrL unter aeroben Bedingungen kann entweder durch eine gesteigerte Promotoraktivität, oder durch die Stabilisierung des Transkripts zustande kommen. Zwar konnten frühere Ergebnisse zeigen, dass die Aktivität des 16S-Promoters unter aeroben Bedingungen ca. 20% stärker ist als unter mikroaeroben Bedingungen, dies allein erklärt jedoch nicht die 3,4x höhere Transkriptmenge unter aeroben im Vergleich zu mikroaeroben Bedingungen. Die Akkumulation von asPcrL kommt wahrscheinlich durch eine Erhöhung der RNA-Stabilität zustande. Frühere Studien zeigen, dass

einige sRNA in Abwesenheit ihrer Ziel-mRNAs stabilisiert werden können. Um zu überprüfen, ob die gesteigerte Stabilität von asPcrL unter aeroben Bedingungen durch das Fehlen ihrer Ziel-mRNA, die unter diesen Wachstumsbedingungen nicht exprimiert wird zustande kommt, wurde ein *puf*-Deletionsstamm erstellt. Da dieser Stamm asPcrL ebenfalls nicht exprimieren kann, wurde das Überexpressionsplasmid pBBR_asPcrL über diparentale Konjugation in den Δpuf -Stamm und als Kontrolle in den Wildtyp, der das *puf*-Operon unter mikroaeroben Bedingungen normal exprimieren kann, eingebracht. Stabilitätsassays zeigten, dass die Halbwertszeit von asPcrL ansteigt, wenn die *puf*-mRNA nicht exprimiert werden kann (Abbildung 29). Dies bestätigt die gemeinsame Degradierung von asPcrL und *pufL* *in vivo*, die bereits *in vitro* durch die RNase III beobachtet werden konnte.

Durch das *in vitro* Degradationsassay konnte zwar der asPcrL-abhängige Abbau von *pufL* beobachtet werden, doch konnte keine genaue RNase III-Schnittstelle identifiziert werden. Die RNase III ist in der Lage, doppelsträngige RNA *in vitro* zu kleinen Oligonukleotiden abzubauen (Rotondo und Frendewey 1996). Um die Region, in der die RNase III die Degradation von *pufL* und asPcrL initiiert, eingrenzen zu können, wurden verschieden lange asPcrL-*in vitro* Transkripte hergestellt. Das 5'-asPcrL-Fragment umfasst die ersten 100 bp von asPcrL und ist komplementär zur kodierenden Sequenz von *pufL*. Das 3'-asPcrL-Fragment dagegen umfasst die letzten 100 bp von asPcrL und ist komplementär zur interzistronischen Region *pufA* und *pufL* inklusive der Ribosomenbindestelle von *pufL*. *In vitro* Degradationsassays zeigten, dass sowohl das *full length* asPcrL, als auch das 3'-asPcrL-*in vitro* Transkript, die Degradation des *pufL*-*in vitro* Transkripts durch die RNase III initiieren können, während das *pufL*-*in vitro* Transkript auch mit der Zugabe vom 5'-asPcrL-Fragment stabil blieb (Abbildung 37). Die RNase III-Schnittstelle ist daher in der interzistronischen Region von *pufA* und *pufL* lokalisiert. Die RNA-Seq-Analyse mit der RNase E-Mutante und dem Wildtyp konnte ein 5'-Ende in der interzistronischen Region zwischen *pufA* und *pufL* identifizieren, welches unabhängig von der RNase E zustande kommt (Abbildung 46). Dieses 5'-Ende ist in der RNase E-Mutante unter 32°C im Vergleich zum Wildtyp stark angereichert. Die Anreicherung ist auf die beeinträchtigte Funktion der RNase E zurückzuführen. Die RNase E favorisiert RNA-Substrate mit einem Monophosphat am 5'-Terminus, durch eine vorangegangene Spaltung der RNA durch eine andere Endoribonuklease, wie beispielsweise der RNase III, entsteht ein RNA-Fragment welches nicht durch ein Triphosphat am 5'-Terminus geschützt wird, wodurch die RNase E diese Fragmente im Anschluss an die vorhergegangene Spaltung direkt weiter abbauen kann. Während im Wildtyp die anschließende Spaltung von der RNase E katalysiert werden kann, kommt es in der RNase E-Mutante zur Anreicherung des 5'-Endes. Zur Bestimmung der 5'-

Enden im Wildtyp und der RNase III-Mutante wurde eine 5'-RACE-PCR durchgeführt. Sowohl im Wildtyp, als auch in der Mutante konnten mehrere 5'-Enden, die in beiden Stämmen vorkommen, detektiert werden (Abbildung 38). Die unterschiedlichen Enden zeigen, dass es nach einer initialen Spaltung zu einem rasanten Abbau des *pufLMX*-Fragmentes kommt, da keine stabilisierenden Strukturen zu finden sind, die der Degradation entgegenwirken könnten.

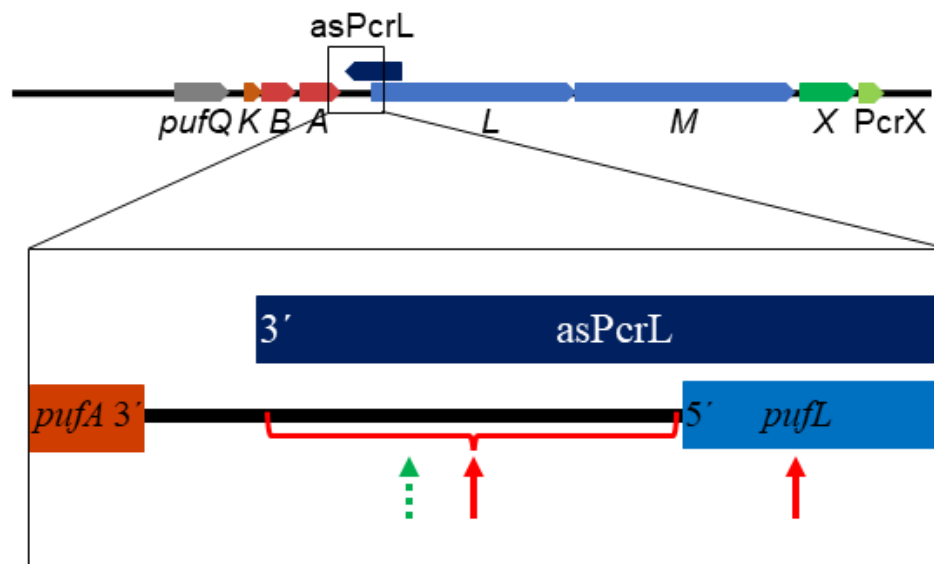


Abbildung 46: Schematische Darstellung der Lokalisation der RNase-Schnittstellen in der interzistronischen Region zwischen *pufAL* und in der kodierenden Sequenz von *pufL*. Die durch die RNA-Seq-Analyse identifizierten RNase E-Schnittstellen sind in roten Pfeilen und die RNase E-unabhängige Schnittstelle durch einen grünen gestrichelten Pfeil dargestellt. Die rote Akkolade zeigt die Region in der die asPcrL-abhängige Prozessierung der mRNA durch die RNase III katalysiert wird, die durch *in vitro* Degradationsexperimente identifiziert werden konnte.

Überexpressionen des 5'-asPcrL oder des 3'-asPcrL-Fragmentes zeigten, dass der beobachtete Phänotyp des *full length* asPcrL vom 3'-Ende abhängig ist. Die Überexpression des 5'-Endes, welches komplementär zur kodierenden Region von *pufL* ist, verhält sich wie die Leervektorkontrolle, es sind keine Unterschiede im Bakteriochlorophyllgehalt und im Absorptionsspektrum zu beobachten (Abbildung 39). Das 3'-asPcrL-Fragment hingegen ist komplementär zur interzistronischen Region von *pufA* und *pufL*, die Komplexbildung in dieser Region ist essentiell für die Prozessierung durch die RNase III. Oft geht die Degradation der mRNA mit dem Blocken der Translation einher. Ob asPcrL tatsächlich die Translation blockt, konnte experimentell nicht gezeigt werden. Da das 3'-Ende, welches für die phänotypischen Änderungen des Überexpressionsstammes im Vergleich zum Leervektorstamm essentiell ist,

auch die Ribosomenbindestelle von *pufL* überspannt, kann das Blocken der Translation nicht ausgeschlossen werden. Zwar besitzen Ribosomen starke RNA-Helikase-Aktivität und könnten den asRNA-RNA-Duplex auflösen (Takyar *et al.* 2005), jedoch nur wenn die Ribosomen sich an die RNA anlagern können. Zusätzlich kann durch das Fehlen der initiierten Ribosomen die RNA nicht geschützt und die Degradation durch RNasen erleichtert werden (Iost und Dreyfus 1995).

Ein ähnlicher Mechanismus konnte bereits für die sRNA MicA in *Salmonella typhimurium* beschrieben werden. Die Expression von MicA wird in der stationären Phase induziert und reprimiert durch die direkte Bindung an die Ziel-mRNAs die Expression verschiedener äußerer Membranproteine. Die Proteinsynthese wird durch das Blocken der Ribosomenbindestelle und einer gleichzeitigen Degradation der mRNA herunter reguliert. *In vitro* Degradationsassays zeigten, dass MicA nur in Anwesenheit der Ziel-mRNAs *ompA* und *lamB* durch die RNase III degradiert werden kann und dass die *ompA*-mRNA *in vivo* stabilisiert wird, wenn MicA nicht anwesend ist. Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass die aufgereinigte RNase E MicA in Abwesenheit der Ziel-mRNAs degradieren kann (Viegas *et al.* 2011).

4.5 Die Rolle von Hfq in der Interaktion von asPcrL und *pufL*

Das RNA-Chaperon Hfq ist essentiell für viele sRNA-mRNA-Interaktionen. In *E. coli* besitzt Hfq vier verschiedene RNA-bindende Strukturen. Bis zu 20% der mRNAs in *E. coli* und *Salmonella* und verschiedene sRNAs sind mit Hfq assoziiert (Zhang *et al.* 2003; Sittka *et al.* 2008). Das Hfq von *R. sphaeroides* zeigt eine starke Sequenzübereinstimmung in den RNA-bindenden Motiven Sm1 und Sm2 im Vergleich zu anderen Alphaproteobakterien, *E. coli* und *S. aureus*. Berghoff *et al.* (2011) konnten zeigen, dass eine Deletion von Hfq zu pleiotropen Effekten führt. Zwar zeigt der Deletionsstamm keine große Veränderung in der Wachstumsrate, jedoch weist er eine Veränderung in der Zellmorphologie auf. Durch Unregelmäßigkeiten in der Zellteilung kommt es zu einer Akkumulation von Minizellen. Ähnlich wie in der RNase E-Mutante ist auch die Hfq-Mutante sensitiver gegenüber photooxidativem Stress im Vergleich zum Wildtyp. Zwar konnte kein Unterschied in der Proteinmenge des alternativen Sigmafaktors RpoE, jedoch eine Reduktion in der Aktivität, gemessen werden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Pigmentierung in der Δhfq -Mutante gestört ist, sowohl die charakteristischen Absorptionsmaxima für den LH I- und LH II-Komplex, als auch der Bakteriochlorophyllgehalt waren verringert, welches auf eine Verringerung der *puf*- und *puc*-Mengen zurückzuführen sein kann. Durch eine Co-Immunopräzipitation konnten eine Reihe von sRNAs identifiziert werden, die zusammen mit Hfq assoziiert sind (Berghoff *et al.* 2011) und deren regulatorische Funktion

von Hfq abhängt (Billenkamp *et al.* 2015; Weber *et al.* 2016; Müller *et al.* 2016). Zwar konnten durch die coIP weder die *puf*-mRNA noch asPcrL detektiert werden, dennoch führt die Deletion von Hfq zu einer Verlängerung in der Halbwertszeit von asPcrL und des *pufBALMX*-Fragmentes. Auch die Hfq-abhängige sRNA Pos19 konnte 2011, in der ursprünglichen coIP nicht detektiert werden. *In vivo* Reporter-Experimente zeigten jedoch, dass die Interaktion zwischen der sRNA Pos19 und der mRNA 0557 Hfq-abhängig sind. Die direkte Interaktion von Pos19 und Hfq konnte durch die Wiederholung der coIP mit einem Stamm, der zusätzlich zum 3xFLAG-Hfq auch das Pos19-Überexpressionsplasmid besaß, gezeigt werden (Müller *et al.* 2016). Um zu untersuchen, ob asPcrL ebenfalls an Hfq binden kann, wurde die coIP mit einem Stamm wiederholt, der das Überexpressionsplasmid von asPcrL und das 3xFLAG-Hfq trug. Wie für die sRNA Pos19 konnte so die direkte Bindung von asPcrL an Hfq gezeigt werden (Abbildung 43). Um die Bindung von asPcrL zu validieren, wurde eine Interaktionsstudie mit radioaktiv-markiertem asPcrL-*in vitro* Transkript und aufgereinigtem Hfq mittels EMSA durchgeführt. Dadurch konnte die spezifische Interaktion zwischen Hfq und asPcrL bestätigt werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass das 5'-asPcrL-Fragment mit einer höheren Affinität als das 3'-asPcrL-Fragment an Hfq bindet (Abbildung 44). Zwar konnten durch Hfq-coIPs mit anschließender RNA-Seq-Studie eine Reihe von *antisense* RNAs detektiert werden, die mit Hfq assoziiert sind (Sittka *et al.* 2008; Li *et al.* 2013; Berghoff *et al.* 2011; Bilusic *et al.* 2014), doch sind die zugrundeliegenden Mechanismen bisweilen nicht vollständig geklärt. Durch die perfekte Komplementarität zwischen der *antisense* RNA und ihrer Ziel-mRNA, wurde angenommen, dass die regulatorische Funktion Hfq-unabhängig ist. Jedoch konnte gezeigt werden, dass die 69 bp lange *antisense* RNA-OUT die Expression der Transposase-mRNA RNA-IN durch die Blockierung der Ribosomenbindestelle reprimiert. Durch eine Deletion von Hfq nimmt der Einfluss der RNA-OUT auf die RNA-IN und damit auf die Transposase-Expression ab (Ross *et al.* 2013; Ross *et al.* 2010). Ein weiteres Beispiel konnte für ein IS200 Element beschrieben werden. Diese Elemente sind in *Enterobacteriaceae* weit verbreitet und auch in anderen Eubakteria und Archaeen zu finden und kodieren meist inaktive Transposons. IS200 besitzt einen einzigen ORF, der das Transposase-Protein TnpA kodiert. Die Expression von *tnpA* ist von der *antisense* RNA art200 abhängig (Ellis *et al.* 2015). Hfq beeinflusst dabei die Expression der mRNA *tnpA* jedoch unabhängig von art200.

Um den Einfluss von Hfq auf die Expression von *pufL* in Abhängigkeit von asPcrL untersuchen zu können, wurde das Plasmid-basierte translationale Fusionsassay genutzt. Anders als im Wildtypstamm, in dem die Überexpression von asPcrL zu einer Verringerung des Substratumsatzes und damit zu einer Verringerung der β -Galaktosidasemenge kommt, konnte

in der Δhfq -Mutante keine Verringerung im Vergleich zur Leervektorkontrolle beobachtet werden (Abbildung 41). Auch die Änderung der Absorptionsmaxima des LH I-Komplexes in der Überexpression im Wildtypstamm, konnte in der Hfq-Mutante nicht gezeigt werden (Abbildung 42). Wie genau Hfq die asPcrL-abhängige Reprimierung der Expression von *pufL* beeinflusst, ist unklar. Für die Regulation der Genexpression von *pufL* ist das 3'-Ende von asPcrL essentiell, welches eine RNase III-Schnittstelle und die Ribosomenbindestelle überdeckt. Da sowohl asPcrL als auch das *pufBALMX*-Fragment in Abwesenheit von Hfq stabilisiert werden, deutet dies darauf hin, dass Hfq in den Abbauprozess der RNAs involviert ist. Bekannt ist, dass Hfq zusammen mit der RNase E die Degradation der mRNA in Abhängigkeit der korrespondierenden sRNA katalysieren kann (Ikeda *et al.* 2011; Morita *et al.* 2005). Der gemeinsame Abbau von asPcrL und *pufL* wird jedoch durch die RNase III initiiert. Eine globale Protein-Protein-Interaktionsstudie mit Hfq in *E. coli* konnte die direkte Interaktion von Hfq und einigen RNasen zeigen, die RNase III konnte jedoch nicht zusammen mit Hfq aufgereinigt werden (Caillet *et al.* 2019). Auch die *in vitro* Degradationsassays in dieser Arbeit zeigen, dass die RNase III Hfq nicht benötigt, um asPcrL und *pufL* zu degradieren.

Zusätzlich muss auch erwähnt werden, dass es nicht ausgeschlossen werden kann, dass mit Hfq-assoziiertes asPcrL weitere Ziel-mRNAs in *trans* besitzt, für deren Interaktion Hfq benötigt werden könnte. Gleiches wurde schon für die sRNA GadY postuliert. Auch diese *antisense* RNA konnte zusammen mit Hfq isoliert werden. Der Mechanismus, der der Hfq-Abhängigkeit zugrunde liegt, konnte für GadY nicht aufgeklärt werden. Die Autoren geben jedoch zu bedenken, dass Hfq-gebundenes GadY, neben seiner *cis*-kodierte Ziel-mRNA *gadX*, auch zusätzliche Ziel-mRNAs in *trans* haben könnte, für die die Hfq-Anhängigkeit notwendig wäre (Opdyke *et al.* 2004).

4.6 Der Einfluss von regulatorischen *loops* auf die Expression der Photosynthesegene

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die *antisense* RNA asPcrL einen regulatorischen Einfluss auf die Expression von *pufL* und damit auf die Assemblierung des Photosyntheseapparats in *R. sphaeroides* hat. Der Mechanismus ist im folgenden Modell zusammengefasst.

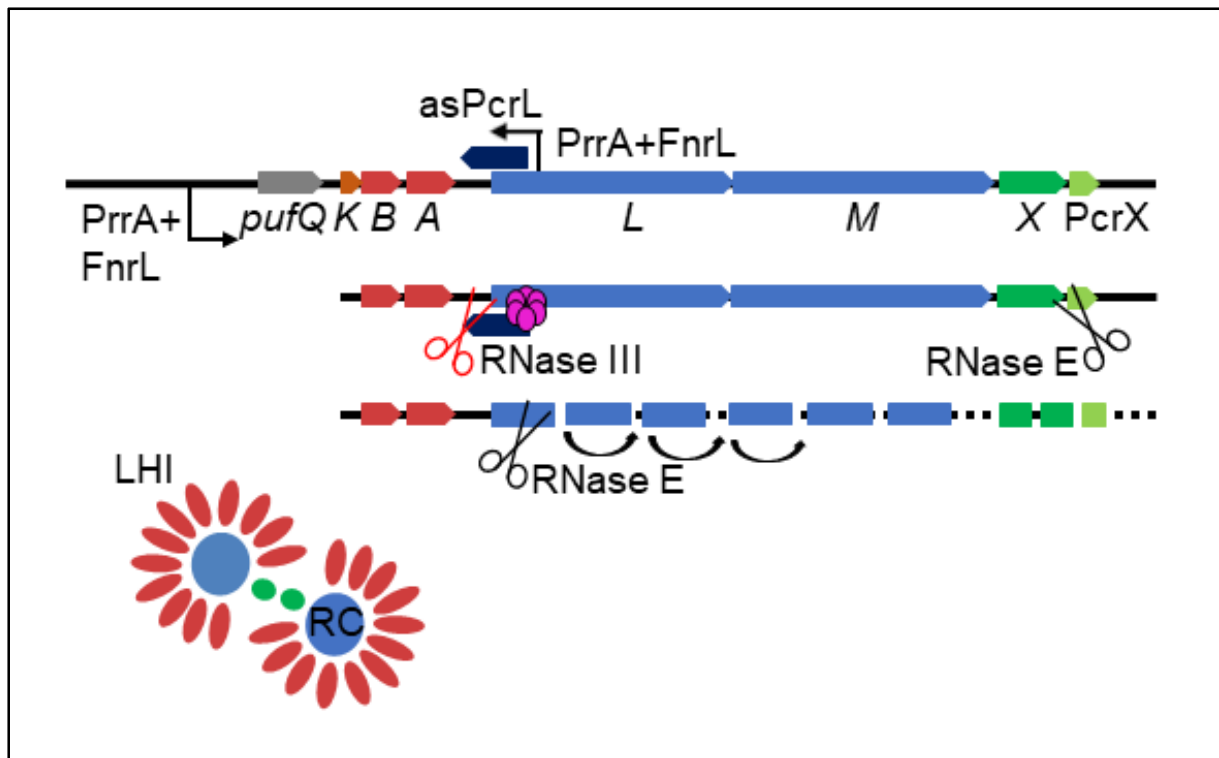


Abbildung 47: Schematisches Modell zum Wirkmechanismus von asPcrL auf das *puf*-Operon von *R. sphaeroides*. Die antisense RNA asPcrL (Dunkelblau) bindet an ihre Ziel-mRNA *pufL* und induziert eine RNase III abhängige Spaltung in der interzistronischen Region zwischen *pufA* und *pufL*. Durch die RNase E wird das *pufLMX*-Fragment im Anschluss degradiert. Durch *stem-loops* am 3'-Ende von *pufA* wird das *pufBA*-Fragment vor einem exonukleolytischen Abbau geschützt. Durch die unterschiedlichen Stabilitäten der *puf*-mRNA wird das stöchiometrische Verhältnis zwischen Lichtsammelkomplex I (rot) und Reaktionszentrum (blau) gewährleistet. Die korrespondierenden Gene und Proteine sind jeweils in der gleichen Farbe dargestellt.

Neben asPcrL konnten bereits zwei weitere sRNA identifiziert werden, die Teil regulatorischer Netzwerke sind. Regulatorische Netzwerke sind in allen Organismen zu finden. Ein spezielles Netzwerk ist der *feed forward loop*. Dabei aktiviert ein Transkriptionsfaktor X einen weiteren Transkriptionsfaktor Y, die dann beide das Ziel-Gen Z beeinflussen können. Daher kommt es zu drei Transkriptionsinteraktionen, von denen jede aktivierend oder reprimierend sein kann. Dadurch können insgesamt acht verschiedene aktivierende und oder reprimierende Konfigurationen des *feed forward loops* entstehen. Diese acht möglichen Konfigurationen werden in vier *coherent* und vier *incoherent feed forward loops* unterteilt. Bei den *coherent feed forward loops* ist die Auswirkung der direkten Regulation von X auf Z, die gleiche wie die indirekte Regulation von X über Y auf Z, sodass das Zielgen Z entweder aktiviert oder reprimiert wird. Bei *incoherent feed forward loops* dagegen, wirkt die direkte Regulation von X auf Z entgegengesetzt der indirekten Regulation von X über Y auf Z. Durch *incoherent feed forward loops* wird ein Mechanismus für die Zelle bereitgestellt, durch den die Expression eines

Zielgens beschleunigt und so eine akkurate Adaption an sich wechselnde Umweltbedingungen gewährleistet werden kann (Mangan und Alon 2003; Jin 2013).

Die sRNA PcrZ ist Teil eines *feed forward loops*. PcrZ wird von einem eigenen Promoter transkribiert und das Primärtranskript hat eine Länge von 136 nt. Ähnlich wie die Expression der *puf*- und *puc*-Gene, nimmt die Expression von PcrZ unter mikroaeroben im Vergleich zur aeroben Wachstumsbedingung zu. Die Expression von PcrZ ist stark von dem Antwortregulator PrrA abhängig und auch der Aktivator FnrL beeinflusst die Expression von PcrZ ebenfalls positiv. Die Überexpression von PcrZ führt zu einer Reduktion der Bakteriochlorophyllmenge und der Absorption der Lichtsammelkomplexe. Die selbe Reduktion konnte auch in der Δhfq -Mutante beobachtet werden, was für eine Hfq-unabhängige Funktion von PcrZ spricht. Jedoch zeigt nur die Überexpression der kompletten PcrZ-Sequenz eine Veränderung des Photosyntheseapparats, die Überexpression des Prozessierungsprodukts hat keinerlei Effekt. Microarray-Studien zeigten, dass die Überexpression von PcrZ einen Einfluss auf 4,8% der Gene von *R. sphaeroides* hat. Die Mehrheit dieser Gene wurde durch die Überexpression von PcrZ herunter reguliert und viele dieser Gene kodieren Proteine, die für die anoxygene Photosynthese benötigt werden. Beispielsweise konnte eine Reprimierung des *puc*-Operons und für mehrere Gene, die Proteine der Bakteriochlorophyllsynthese und Carotinoidsynthese kodieren, wie *crtA* und *crtD*, beobachtet werden. Die direkte Bindung von PcrZ an *bchN*, wodurch die Region des Translationsstarts überlappt wird und die Bindung an *puc2A*, in der kodierenden Sequenz, konnte nachgewiesen werden. Auch die Expression von *appA* wird durch die Überexpression von PcrZ herunter reguliert. AppA wirkt als Antirepressor auf PpsR, welcher unter aeroben Bedingungen die Expression einiger Photosynthesegene unterdrückt. Durch die Aktivierung von PcrZ unter mikroaeroben Bedingungen wird folglich die Repression einiger Photosynthesegene verstärkt. Da PrrA die Expression von photosynthetischen Genen aktiviert, aber gleichzeitig durch die Expression von PcrZ, die Repression durch die fehlende Inaktivierung von PpsR fördert, ist PcrZ Teil eines *mixed incoherent feed forward loop* Typ I. Auch die zweite identifizierte sRNA PcrX ist Teil eines solchen *loops* und besitzt einen regulatorischen Einfluss auf die Photosynthesegene. PcrX ist in der 3'-UTR des *puf*-Operons lokalisiert und wird mit den anderen Genen des *puf*-Operons kotranskribiert. Durch einen Schnitt am 5'-Ende von PcrX, der von der RNase E katalysiert wird, wird PcrX aus der polyzistronischen *puf*-mRNA herausprozessiert. PcrX kann direkt an die mRNA von *pufX* binden und beeinflusst so die Stabilität des *pufBALMX*-Fragmentes. Wie bei PcrZ ist die regulatorische Funktion von PcrX unabhängig von Hfq. Da PcrX unter der gleichen transkriptionellen Kontrolle steht, wie die anderen Gene des *puf*-Operons und nach der

Expression einen negativen Effekt auf das *puf*-Operon ausüben kann, gehört auch diese sRNA zu einem *mixed incoherent feed forward loop*. Anders als PcrZ, welches nicht in *R. capsulatus* identifiziert werden konnte, ist PcrX auch in diesem *Rhodobacter*-Stamm zu finden. Die Expression der in dieser Arbeit charakterisierten *antisense* RNA asPcrL, wird von PrrA, FnrL und AppA beeinflusst. Durch eine direkte Bindung an ihrer Ziel-mRNA *pufL*, kommt es zu einer initialen Spaltung der beiden RNAs durch die RNase III, wodurch das *pufLMX*-Fragment im Anschluss durch weitere Spaltungen der RNase E abgebaut und deren Expression reprimiert wird. Damit konnte eine dritte regulatorische kleine RNA identifiziert werden, die Teil eines *incoherent feed forward loop* ist und an der Regulation beziehungsweise an der Feinregulation der Expression der Photosynthesegene beteiligt ist. Durch die asPcrL-abhängige Prozessierung der *puf*-mRNA wird das, für die größtmögliche Photosyntheseleistung benötigte Verhältnis von Lichtsammelkomplex I zu Reaktionszentrum unterstützt.

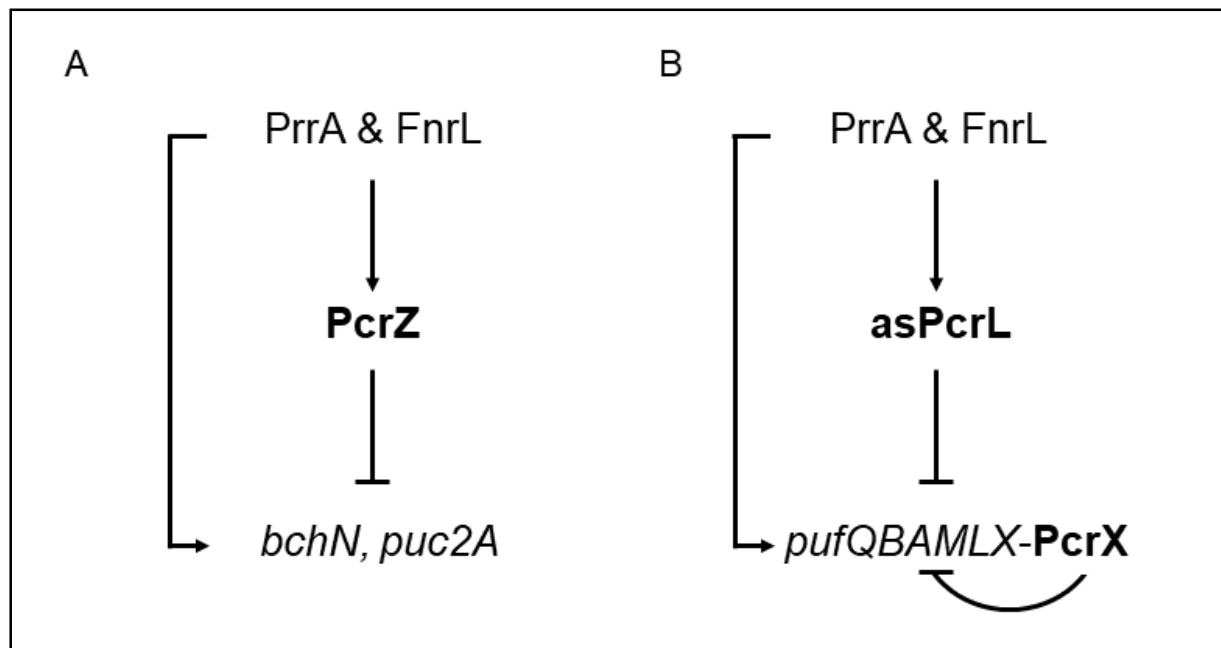


Abbildung 48: Übersicht über die identifizierten *mixed incoherent feed forward loops*, die die Expression der Photosynthesegene von *R. sphaeroides* beeinflussen. Die Expression der sRNAs PcrZ, PcrX und asPcrL hängt von den selben Transkriptionsfaktoren ab, wie deren Ziel-mRNAs. Durch die Induktion der Expression der sRNAs wird die Expression der Ziel-mRNA verringert. asPcrL konnte damit als dritte sRNA identifiziert werden, die durch Feinregulation die Expression der Photosynthesegene beeinflusst.

5 Zusammenfassung

Bakterien müssen auf sich ständig ändernde Umweltbedingungen reagieren und ihr Transkriptom entsprechend anpassen können. Dies wird nicht nur durch die Regulation der Transkriptionsrate der RNAs, sondern auch durch die posttranskriptionelle Regulation erreicht. Da RNasen die Degradation und Prozessierung der unterschiedlichen RNA-Spezies katalysieren, spielen sie eine wichtige Rolle in der posttranskriptionellen Regulation. In dieser Arbeit wurde die RNase E-Mutante *rne*^{*E.c.ts*} charakterisiert, die statt der endogenen RNase E aus *R. sphaeroides*, ein *rne*-Allel aus *E. coli* trägt, wodurch ein thermosensitives Enzym gebildet wird, welches bei einer Inkubation bei 42°C inaktiviert werden kann. Durch RNA-Sequenzierung und anschließende bioinformatische Analysen, konnten die Genom-weiten RNase E-Schnittstellen und die, in der Mutante angereicherten, 5'-Enden bestimmt werden. Dadurch konnte die Bedeutung der RNase E-abhängigen RNA-Reifung und des RNA-Umsatzes in unterschiedlichen mRNAs, rRNAs und sRNAs bestimmt werden. Eine phänotypische Charakterisierung der *rne*^{*E.c.ts*}-Mutante im Vergleich zum Wildtyp zeigte, dass die Mutante unter phototrophen Bedingungen ein starkes Wachstumsdefizit aufwies, während dieser unter chemotrophen Bedingungen nicht beobachtet werden konnte. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die RNase E-Mutante sensitiver gegenüber oxidativem Stress ist, als der Wildtyp. Neben den RNasen sind auch kleine nicht-kodierende RNAs, die die Expression ihrer Ziel-mRNAs regulieren können, an der posttranskriptionellen Regulation der Genexpression beteiligt. In früheren Studien konnten bereits die zwei sRNAs PcrZ und PcrX identifiziert werden, die jeweils Teil eines *incoherent feed-forward loops* sind und die Expression der Photosynthesegene regulieren können. In dieser Arbeit konnte mit asPcrL die erste *antisense* RNA identifiziert werden, die die Expression der Photosynthesegene in *R. sphaeroides* beeinflusst. asPcrL ist auf dem Gegenstrang des *puf*-Operons lokalisiert, welches unter anderem die Pigment-bindenden Proteine des Reaktionszentrums (*pufLM*) und des Lichtsammelkomplexes I (*pufBA*) kodiert. Dabei überspannt asPcrL das 5'-Ende von *pufL* und einen Teil der interzistronischen Region von *pufAL*. Eine Überexpression der asRNA führt zu einem Wachstumsdefizit unter phototrophen Bedingungen und zu einer Reduktion der für die Photosynthese benötigten Pigmente. Durch die direkte Bindung an ihre Ziel-mRNA *pufL* wird das *pufBALMX*-Fragment *in vivo* destabilisiert. *In vivo* und *in vitro* Experimente zeigen, dass die *pufL*-mRNA durch die RNase III in Abhängigkeit von asPcrL prozessiert wird. Da die Expression von asPcrL von denselben Proteinregulatoren wie das *puf*-Operon aktiviert wird, konnte mit asPcrL die dritte sRNA identifiziert werden, die Teil eines *incoherent feed-forward loops* ist und das *fine-tuning* der Expression der Photosynthesegene beeinflusst.

6 Summary

Bacteria have to react to constantly changing environmental conditions and adapt their transcriptome accordingly. This is achieved not only through the regulation of the transcription rate of the RNAs but also through post-transcriptional regulation. RNases, which catalyze the degradation and processing of the different RNA species, play an important role in post-transcriptional regulation. In this work, the RNase E mutant *rne*^{*E.c.ts*} was characterized. This mutant strain carries an *rne*-allele from *E. coli* instead of the endogenous *rne*-allele from *R. sphaeroides*. Furthermore the *rne*-allele from *E. coli* codes for a thermosensitive RNase E enzyme, which can be inactivated by an incubation at 42°C. By applying RNA sequencing and subsequent bioinformatic analyzes, the genome-wide RNase E cleavage sites and the 5'-ends enriched in the mutant strain could be determined. As a result, the importance of RNase E-dependent RNA maturation and RNA turnover for different mRNA, rRNAs and sRNAs could be revealed. Phenotypic characterization of the *rne*^{*E.c.ts*} mutant compared to the wild type showed a strong growth deficit of the mutant under phototrophic conditions, whereas this could not be observed under chemotrophic conditions. Furthermore, it could be shown that the *rne*^{*E.c.ts*} mutant is more sensitive to oxidative stress than the wild type. In addition to the RNases, small non-coding RNAs, which can regulate the expression of their target mRNAs by different mechanisms, are also involved in the post-transcriptional regulation of gene expression. Previous studies have already identified two sRNAs, PcrZ and PcrX, each of which is part of an incoherent feed-forward loop. Both can regulate the expression of the photosynthetic genes. In the present work, asPcrL was identified as the first antisense RNA that influences the expression of the photosynthetic genes in *R. sphaeroides*. asPcrL is transcribed from the opposite strand of the *puf* operon, which encodes the pigment-binding proteins of the reaction center (*pufLM*) and light-harvesting complex I (*pufBA*). AsPcrL spans the 5' end of *pufL* and a part of the intercistronic region of *pufAL*. Overexpression of the asRNA leads to a growth deficit under phototrophic conditions and to a reduction in the pigments required for photosynthesis. The direct binding of asPcrL to its target mRNA *pufL* leads to the destabilization of the *pufBALMX*-fragment *in vivo*. *In vivo* and *in vitro* experiments show that the *pufL* mRNA is processed by RNase III depending on asPcrL. Since the expression of asPcrL is activated by the same protein regulators as the *puf* operon, asPcrL the third sRNA, which is part of an incoherent feed-forward loop and influences the fine-tuning of the expression of the photosynthetic gene

Referenzen

- Adams, C.W., Forrest, M.E., Cohen, S.N., and Beatty, J.T. (1989) Structural and functional analysis of transcriptional control of the *Rhodobacter capsulatus puf* operon. *Journal of Bacteriology*, **171**,473–482.
- Adnan, F., Weber, L., and Klug, G. (2015) The sRNA SorY confers resistance during photooxidative stress by affecting a metabolite transporter in *Rhodobacter sphaeroides*. *RNA biology*, **12**,569–577.
- Ait-Bara, S., and Carpousis, A.J. (2015) RNA degradosomes in bacteria and chloroplasts: classification, distribution and evolution of RNase E homologs. *Molecular microbiology*, **97**,1021–1135.
- Allen, J.P., Feher, G., Yeates, T.O., Komiya, H., and Rees, D.C. (1987) Structure of the reaction center from *Rhodobacter sphaeroides* R-26: the cofactors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **84**,5730–5734.
- Altuvia, S., Zhang, A., Argaman, L., Tiwari, A., and Storz, G. (1998) The *Escherichia coli* OxyS regulatory RNA represses *fhlA* translation by blocking ribosome binding. *The EMBO journal*, **17**,6069–6075.
- Anthony, J.R., Newman, J.D., and Donohue, T.J. (2004) Interactions between the *Rhodobacter sphaeroides* ECF sigma factor, σE , and its anti-sigma factor, ChrR. *Journal of molecular biology*, **341**,345–360.
- Anthony, J.R., Warczak, K.L., and Donohue, T.J. (2005) A transcriptional response to singlet oxygen, a toxic byproduct of photosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**,6502–6507.
- Argaman, L., and Altuvia, S. (2000) *fhlA* repression by OxyS RNA: kissing complex formation at two sites results in a stable antisense-target RNA complex. *Journal of molecular biology*, **300**,1101–1112.
- Arraiano, C.M., Andrade, J.M., Domingues, S., Guinote, I.B., Malecki, M., and Matos, R.G., *et al.* (2010) The critical role of RNA processing and degradation in the control of gene expression. *FEMS microbiology reviews*, **34**,883–923.
- Bahn, Y.-S., Xue, C., Idnurm, A., Rutherford, J.C., Heitman, J., and Cardenas, M.E. (2007) Sensing the environment: lessons from fungi. *Nature reviews. Microbiology*, **5**,57–69.
- Baker, C.S., Eöry, L.A., Yakhnin, H., Mercante, J., Romeo, T., and Babitzke, P. (2007) CsrA inhibits translation initiation of *Escherichia coli hfq* by binding to a single site overlapping the Shine-Dalgarno sequence. *Journal of Bacteriology*, **189**,5472–5481.
- Bandyra, K.J., Wandzik, J.M., and Luisi, B.F. (2018) Substrate recognition and autoinhibition in the Central Ribonuclease RNase E. *Molecular Cell*, **72**,275-285.e4.
- Barz, W.P., Francia, F., Venturoli, G., Melandri, B.A., Verméglio, A., and Oesterhelt, D. (1995) Role of PufX protein in photosynthetic growth of *Rhodobacter sphaeroides*. 1. PufX is required for efficient light-driven electron transfer and photophosphorylation under anaerobic conditions. *Biochemistry*, **34**,15235–15247.

- Belasco, J.G. (2010) All Things Must Pass: Contrasts and commonalities in eukaryotic and bacterial mRNA decay. *Nature reviews. Molecular cell biology*, **11**,467–478.
- Belasco, J.G., Beatty, J.T., Adams, C.W., Gabain, A. von, and Cohen, S.N. (1985) Differential expression of photosynthesis genes in *R. capsulata* results from segmental differences in stability within the polycistronic *rxsA* transcript. *Cell*, **40**,171–181.
- 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*. *Molecular microbiology*, **80**,1479–1495.
- Berghoff, B.A., Hoekzema, M., Aulbach, L., and Wagner, E.G.H. (2017) Two regulatory RNA elements affect TisB-dependent depolarization and persister formation. *Molecular microbiology*, **103**,1020–1033.
- Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M., and Hannon, G.J. (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, **409**,363–366.
- Bervoets, I., and Charlier, D. (2019) Diversity, versatility and complexity of bacterial gene regulation mechanisms: opportunities and drawbacks for applications in synthetic biology. *FEMS microbiology reviews*, **43**,304–339.
- Billenkamp, F., Peng, T., Berghoff, B.A., and Klug, G. (2015) A cluster of four homologous small RNAs modulates C1 metabolism and the pyruvate dehydrogenase complex in *Rhodobacter sphaeroides* under various stress conditions. *Journal of Bacteriology*, **197**,1839–1852.
- Bilusic, I., Popitsch, N., Rescheneder, P., Schroeder, R., and Lybecker, M. (2014) Revisiting the coding potential of the *E. coli* genome through Hfq co-immunoprecipitation. *RNA biology*, **11**,641–654.
- Braatsch, S., Gomelsky, M., Kuphal, S., and Klug, G. (2002) A single flavoprotein, AppA, integrates both redox and light signals in *Rhodobacter sphaeroides*. *Molecular microbiology*, **45**,827–836.
- Braatsch, S., Moskvina, O.V., Klug, G., and Gomelsky, M. (2004) Responses of the *Rhodobacter sphaeroides* transcriptome to blue light under semiaerobic conditions. *Journal of Bacteriology*, **186**,7726–7735.
- Bram, R.J., Young, R.A., and Steitz, J.A. (1980) The ribonuclease III site flanking 23S sequences in the 30S ribosomal precursor RNA of *E. coli*. *Cell*, **19**,393–401.
- Brantl, S. (2007) Regulatory mechanisms employed by *cis*-encoded antisense RNAs. *Current Opinion in Microbiology*, **10**,102–109.
- Bryant, D.A., and Frigaard, N.-U. (2006) Prokaryotic photosynthesis and phototrophy illuminated. *Trends in microbiology*, **14**,488–496.
- Büttner, K., Wenig, K., and Hopfner, K.-P. (2005) Structural framework for the mechanism of archaeal exosomes in RNA processing. *Molecular Cell*, **20**,461–471.
- Caillet, J., Baron, B., Boni, I.V., Caillet-Saguy, C., and Hajnsdorf, E. (2019) Identification of protein-protein and ribonucleoprotein complexes containing Hfq. *Scientific Reports*, **9**,1–12.

- Callaghan, A.J., Aurikko, J.P., Ilag, L.L., Günter Grossmann, J., Chandran, V., and Kühnel, K., *et al.* (2004) Studies of the RNA degradosome-organizing domain of the *Escherichia coli* ribonuclease RNase E. *Journal of molecular biology*, **340**,965–979.
- Callaghan, A.J., Marcaida, M.J., Stead, J.A., McDowall, K.J., Scott, W.G., and Luisi, B.F. (2005) Structure of *Escherichia coli* RNase E catalytic domain and implications for RNA turnover. *Nature*, **437**,1187–1191.
- Callen, B.P., Shearwin, K.E., and Egan, J.B. (2004) Transcriptional interference between convergent promoters caused by elongation over the promoter. *Molecular Cell*, **14**,647–656.
- Carabetta, V.J., Silhavy, T.J., and Cristea, I.M. (2010) The response regulator SprE (RssB) is required for maintaining poly(A) polymerase I-degradosome association during stationary phase. *Journal of Bacteriology*, **192**,3713–3721.
- Carpousis, A.J. (2007) The RNA degradosome of *Escherichia coli*: an mRNA-degrading machine assembled on RNase E. *Annual review of microbiology*, **61**,71–87.
- Carpousis, A.J., van Houwe, G., Ehretsmann, C., and Krisch, H.M. (1994) Copurification of *E. coli* RNAase E and PNPase: Evidence for a specific association between two enzymes important in RNA processing and degradation. *Cell*, **76**,889–900.
- Celesnik, H., Deana, A., and Belasco, J.G. (2007) Initiation of RNA decay in *Escherichia coli* by 5' pyrophosphate removal. *Molecular Cell*, **27**,79–90.
- Chang, C., and Stewart, R.C. (1998) The two-component system. Regulation of diverse signaling pathways in prokaryotes and eukaryotes. *Plant physiology*, **117**,723–731.
- Chao, Y., Li, L., Girodat, D., Förstner, K.U., Said, N., and Corcoran, C., *et al.* (2017) *In vivo* cleavage map illuminates the central role of RNase E in coding and non-coding RNA pathways. *Molecular Cell*, **65**,39–51.
- Cheng, Z., Li, K., Hammad, L.A., Karty, J.A., and Bauer, C.E. (2014) Vitamin B12 regulates photosystem gene expression via the CrtJ antirepressor AerR in *Rhodobacter capsulatus*. *Molecular microbiology*, **91**,649–664.
- Chidgey, J.W., Jackson, P.J., Dickman, M.J., and Hunter, C.N. (2017) PufQ regulates porphyrin flux at the haem/bacteriochlorophyll branchpoint of tetrapyrrole biosynthesis via interactions with ferredoxin. *Molecular microbiology*, **106**,961–975.
- Clarke, J.E., Kime, L., Romero A, D., and McDowall, K.J. (2014) Direct entry by RNase E is a major pathway for the degradation and processing of RNA in *Escherichia coli*. *Nucleic acids research*, **42**,11733–11751.
- Conrad, C., Rauhut, R., and Klug, G. (1998) Different cleavage specificities of RNases III from *Rhodobacter capsulatus* and *Escherichia coli*. *Nucleic acids research*, **26**,4446–4453.
- Court, D.L., Gan, J., Liang, Y.-H., Shaw, G.X., Tropea, J.E., Costantino, N., Waugh, D.S., and Ji, X. (2013) RNase III: Genetics and function; structure and mechanism. *Annual review of genetics*, **47**,405–431.
- Deana, A., Celesnik, H., and Belasco, J.G. (2008) The bacterial enzyme RppH triggers messenger RNA degradation by 5' pyrophosphate removal. *Nature*, **451**,355–358.

- del Solar, G., Acebo, P., and Espinosa, M. (1997) Replication control of plasmid pLS1: the antisense RNA II and the compact maII region are involved in translational regulation of the initiator RepB synthesis. *Molecular microbiology*, **23**,95–108.
- Deutscher, M.P. (2009) Chapter 9 Maturation and degradation of ribosomal RNA in bacteria. In *Molecular biology of RNA processing and decay in prokaryotes*. Condon, C. (ed). Amsterdam: Elsevier Academic Press, 369–391.
- Deutscher, M.P. (2015) How bacterial cells keep ribonucleases under control. *FEMS microbiology reviews*, **39**,350–361.
- Dimastrogiovanni, D., Fröhlich, K.S., Bandyra, K.J., Bruce, H.A., Hohensee, S., Vogel, J., and Luisi, B.F. (2014) Recognition of the small regulatory RNA RydC by the bacterial Hfq protein. *eLife*, **3**,1–19.
- Dodd, I.B., and Egan, J.B. (2002) Action at a distance in CI repressor regulation of the bacteriophage 186 genetic switch. *Molecular microbiology*, **45**,697–710.
- Donohue, T.J., Kiley, P.J., and Kaplan, S. (1988) The *puf* operon region of *Rhodobacter sphaeroides*. *Photosynthesis Research*, **19**,39–61.
- Du, S., Bird, T.H., and Bauer, C.E. (1998) DNA binding characteristics of RegA. A constitutively active anaerobic activator of photosynthesis gene expression in *Rhodobacter capsulatus*. *The Journal of biological chemistry*, **273**,18509–18513.
- Dubey, A.K., Baker, C.S., Romeo, T., and Babitzke, P. (2005) RNA sequence and secondary structure participate in high-affinity CsrA-RNA interaction. *RNA (New York, N.Y.)*, **11**,1579–1587.
- Dunn, J.J., and Studier, F.W. (1973) T7 early RNAs and *Escherichia coli* ribosomal RNAs are cut from large precursor RNAs *in vivo* by ribonuclease 3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **70**,3296–3300.
- Duval, M., Simonetti, A., Caldelari, I., and Marzi, S. (2015) Multiple ways to regulate translation initiation in bacteria: Mechanisms, regulatory circuits, dynamics. *Biochimie*, **114**,18–29.
- Eisenhardt, K.M.H. (2017) Small regulatory RNAs promoting the oxidative stress response and adaptive metabolic changes in *Rhodobacter sphaeroides*. Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Eisenhardt, K.M.H., Reuscher, C.M., and Klug, G. (2018) PcrX, an sRNA derived from the 3'-UTR of the *Rhodobacter sphaeroides puf* operon modulates expression of *puf* genes encoding proteins of the bacterial photosynthetic apparatus. *Molecular microbiology*, **110**,325–334.
- Ellis, M.J., Trussler, R.S., and Haniford, D.B. (2015) A *cis*-encoded sRNA, Hfq and mRNA secondary structure act independently to suppress IS200 transposition. *Nucleic acids research*, **43**,6511–6527.
- Engstrom, M.D., and Pflieger, B.F. (2017) Transcription control engineering and applications in synthetic biology. *Synthetic and Systems Biotechnology*, **2**,176–191.

- Eraso, J.M., and Kaplan, S. (1994) *prpA*, a putative response regulator involved in oxygen regulation of photosynthesis gene expression in *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of Bacteriology*, **176**,32–43.
- Eraso, J.M., and Kaplan, S. (1995) Oxygen-insensitive synthesis of the photosynthetic membranes of *Rhodobacter sphaeroides*: a mutant histidine kinase. *Journal of Bacteriology*, **177**,2695–2706.
- Eraso, J.M., and Kaplan, S. (1996) Complex regulatory activities associated with the histidine kinase PrrB in expression of photosynthesis genes in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *Journal of Bacteriology*, **178**,7037–7046.
- Eraso, J.M., Roh, J.H., Zeng, X., Callister, S.J., Lipton, M.S., and Kaplan, S. (2008) Role of the global transcriptional regulator PrrA in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1: combined transcriptome and proteome analysis. *Journal of Bacteriology*, **190**,4831–4848.
- Filippov, V., Solovyev, V., Filippova, M., and Gill, S.S. (2000) A novel type of RNase III family proteins in eukaryotes. *Gene*, **245**,213–221.
- Förstner, K.U., Reuscher, C.M., Haberzettl, K., Weber, L., and Klug, G. (2018) RNase E cleavage shapes the transcriptome of *Rhodobacter sphaeroides* and strongly impacts phototrophic growth. *Life science alliance*, **1**,1-11.
- Fozo, E.M., Hemm, M.R., and Storz, G. (2008) Small toxic proteins and the antisense RNAs that repress them. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, **72**,579-89, Table of Contents.
- Franze de Fernandez, M.T., Hayward, W.S., and August, J.T. (1972) Bacterial proteins required for replication of phage Q ribonucleic acid. Purification and properties of host factor I, a ribonucleic acid-binding protein. *The Journal of biological chemistry*, **247**,824–831.
- Fried, L., Lassak, J., and Jung, K. (2012) A comprehensive toolbox for the rapid construction of *lacZ* fusion reporters. *Journal of microbiological methods*, **91**,537–543.
- Fritsch, J., Rothfuchs, R., Rauhut, R., and Klug, G. (1995) Identification of an mRNA element promoting rate-limiting cleavage of the polycistronic *puf* mRNA in *Rhodobacter capsulatus* by an enzyme similar to RNase E. *Molecular microbiology*, **15**,1017–1029.
- Fröhlich, K.S., Papenfort, K., Fekete, A., and Vogel, J. (2013) A small RNA activates CFA synthase by isoform-specific mRNA stabilization. *The EMBO journal*, **32**,2963–2979.
- Garrey, S.M., Blech, M., Riffell, J.L., Hankins, J.S., Stickney, L.M., and Diver, M., *et al.* (2009) Substrate Binding and Active Site Residues in RNases E and G role of the 5'-Sensor. *Journal of Biological Chemistry*, **284**,31843–31850.
- Garrey, S.M., and Mackie, G.A. (2011) Roles of the 5'-phosphate sensor domain in RNase E. *Molecular microbiology*, **80**,1613–1624.
- Gegenheimer, P., Watson, N., and Apirion, D. (1977) Multiple pathways for primary processing of ribosomal RNA in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, **252**,3064–3073.

- Georg, J., and Hess, W.R. (2011) *cis*-antisense RNA, another level of gene regulation in bacteria. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, **75**,286–300.
- Gerdes, K., and Wagner, E.G.H. (2007) RNA antitoxins. *Current Opinion in Microbiology*, **10**,117–124.
- Gildehaus, N., Neußer, T., Wurm, R., and Wagner, R. (2007) Studies on the function of the riboregulator 6S RNA from *E. coli*: RNA polymerase binding, inhibition of *in vitro* transcription and synthesis of RNA-directed *de novo* transcripts. *Nucleic acids research*, **35**,1885–1896.
- Glaeser, J., Nuss, A.M., Berghoff, B.A., and Klug, G. (2011) Singlet oxygen stress in microorganisms. *Advances in microbial physiology*, **58**,141–173.
- Glaeser, J., Zobawa, M., Lottspeich, F., and Klug, G. (2007) Protein synthesis patterns reveal a complex regulatory response to singlet oxygen in *Rhodobacter*. *Journal of proteome research*, **6**,2460–2471.
- Godefroy, T., Cohn, M., and Grunberg-Manago, M. (1970) Kinetics of polymerization and phosphorolysis reactions of *E. coli* polynucleotide phosphorylase. Role of oligonucleotides in polymerization. *European journal of biochemistry*, **12**,236–249.
- Goldblum, K., and Apririon, D. (1981) Inactivation of the ribonucleic acid-processing enzyme ribonuclease E blocks cell division. *Journal of Bacteriology*, **146**,128–132.
- Goldenberg, D., Azar, I., and Oppenheim, A.B. (1996) Differential mRNA stability of the *cspA* gene in the cold-shock response of *Escherichia coli*. *Molecular microbiology*, **19**,241–248.
- Gomelsky, L., Moskvina, O.V., Stenzel, R.A., Jones, D.F., Donohue, T.J., and Gomelsky, M. (2008) Hierarchical regulation of photosynthesis gene expression by the oxygen-responsive PrrBA and AppA-PpsR systems of *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of Bacteriology*, **190**,8106–8114.
- Gomelsky, L., Sram, J., Moskvina, O.V., Horne, I.M., Dodd, H.N., and Pemberton, J.M., *et al.* (2003) Identification and *in vivo* characterization of PpaA, a regulator of photosystem formation in *Rhodobacter sphaeroides*. *Microbiology (Reading, England)*, **149**,377–388.
- Gomelsky, M., and Kaplan, S. (1995a) *appA*, a novel gene encoding a *trans*-acting factor involved in the regulation of photosynthesis gene expression in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *Journal of Bacteriology*, **177**,4609–4618.
- Gomelsky, M., and Kaplan, S. (1995b) Genetic evidence that PpsR from *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 functions as a repressor of *puc* and *bchF* expression. *Journal of Bacteriology*, **177**,1634–1637.
- Gomelsky, M., and Kaplan, S. (1997) Molecular genetic analysis suggesting interactions between AppA and PpsR in regulation of photosynthesis gene expression in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *Journal of Bacteriology*, **179**,128–134.
- Gomelsky, M., and Kaplan, S. (1998) AppA, a redox regulator of photosystem formation in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1, is a flavoprotein. Identification of a novel fad binding domain. *The Journal of biological chemistry*, **273**,35319–35325.

- Gomelsky, M., and Klug, G. (2002) BLUF: a novel FAD-binding domain involved in sensory transduction in microorganisms. *Trends in biochemical sciences*, **27**,497–500.
- Gong, L., and Kaplan, S. (1996) Translational control of *puf* operon expression in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *Microbiology (Reading, England)*, **142**,2057–2069.
- Goudreau, P.N., and Stock, A.M. (1998) Signal transduction in bacteria: molecular mechanisms of stimulus—response coupling. *Current Opinion in Microbiology*, **1**,160–169.
- Green, H.A., and Donohue, T.J. (2006) Activity of *Rhodobacter sphaeroides* RpoHIII, a second member of the heat shock sigma factor family. *Journal of Bacteriology*, **188**,5712–5721.
- Gregor, J., and Klug, G. (1999) Regulation of bacterial photosynthesis genes by oxygen and light. *FEMS microbiology letters*, **179**,1–9.
- Grundy, F.J., and Henkin, T.M. (2006) From ribosome to riboswitch: control of gene expression in bacteria by RNA structural rearrangements. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, **41**,329–338.
- Gur, E., Biran, D., and Ron, E.Z. (2011) Regulated proteolysis in Gram-negative bacteria--how and when? *Nature reviews. Microbiology*, **9**,839–848.
- Han, Y., Braatsch, S., Osterloh, L., and Klug, G. (2004) A eukaryotic BLUF domain mediates light-dependent gene expression in the purple bacterium *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**,12306–12311.
- Han, Y., Meyer, M.H.F., Keusgen, M., and Klug, G. (2007) A haem cofactor is required for redox and light signalling by the AppA protein of *Rhodobacter sphaeroides*. *Molecular microbiology*, **64**,1090–1104.
- Hanada, S. (2016) Anoxygenic photosynthesis -A photochemical reaction that does not contribute to oxygen reproduction. *Microbes and environments*, **31**,1–3.
- Heck, C., Balzer, A., Fuhrmann, O., and Klug, G. (2000) Initial events in the degradation of the polycistronic *puf* mRNA in *Rhodobacter capsulatus* and consequences for further processing steps. *Molecular microbiology*, **35**,90–100.
- Heck, C., Rothfuchs, R., Jäger, A., Rauhut, R., and Klug, G. (1996) Effect of the *pufQ-pufB* intercistronic region on *puf* mRNA stability in *Rhodobacter capsulatus*. *Molecular microbiology*, **20**,1165–1178.
- Hübner, P., Willison, J.C., Vignais, P.M., and Bickle, T.A. (1991) Expression of regulatory *nif* genes in *Rhodobacter capsulatus*. *Journal of Bacteriology*, **173**,2993–2999.
- Huffman, J.L., and Brennan, R.G. (2002) Prokaryotic transcription regulators: more than just the helix-turn-helix motif. *Current Opinion in Structural Biology*, **12**,98–106.
- Hui, M.P., Foley, P.L., and Belasco, J.G. (2014) Messenger RNA degradation in bacterial cells. *Annual review of genetics*, **48**,537–559.

- Iino, Y., Sugimoto, A., and Yamamoto, M. (1991) *S. pombe pac1+*, whose overexpression inhibits sexual development, encodes a ribonuclease III-like RNase. *The EMBO journal*, **10**,221–226.
- 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*. *Molecular microbiology*, **79**,419–432.
- Imhoff, J.F. (2015) *Rhodobacter*. In *Bergey's manual of systematics of Archaea and Bacteria*. Whitman (ed). Chichester, UK: John Wiley & Sons, Inc, 1–12.
- Iost, I., and Dreyfus, M. (1995) The stability of *Escherichia coli lacZ* mRNA depends upon the simultaneity of its synthesis and translation. *The EMBO journal*, **14**,3252–3261.
- Ishikawa, H., Otaka, H., Maki, K., Morita, T., and Aiba, H. (2012) The functional Hfq-binding module of bacterial sRNAs consists of a double or single hairpin preceded by a U-rich sequence and followed by a 3' poly(U) tail. *RNA (New York, N.Y.)*, **18**,1062–1074.
- Jäger, S., Fuhrmann, O., Heck, C., Hebermehl, M., Schiltz, E., Rauhut, R., and Klug, G. (2001) An mRNA degrading complex in *Rhodobacter capsulatus*. *Nucleic acids research*, **29**,4581–4588.
- Jäger, S., Hebermehl, M., Schiltz, E., and Klug, G. (2004) Composition and activity of the *Rhodobacter capsulatus* degradosome vary under different oxygen concentrations. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, **7**,148–154.
- Jin, G. (2013) Feed Forward Loop. In *Encyclopedia of Systems Biology*. Dubitzky, W., Wolkenhauer, O., Cho, K.-H., and Yokota, H. (eds) . New York, NY, s.l.: Springer New York, 737–738.
- Johansson, J., Mandin, P., Renzoni, A., Chiaruttini, C., Springer, M., and Cossart, P. (2002) An RNA Thermosensor Controls Expression of Virulence Genes in *Listeria monocytogenes*. *Cell*, **110**,551–561.
- Jones, D.F., Stenzel, R.A., and Donohue, T.J. (2005) Mutational analysis of the C-terminal domain of the *Rhodobacter sphaeroides* response regulator PrrA. *Microbiology (Reading, England)*, **151**,4103–4110.
- Kaberdin, V.R., Singh, D., and Lin-Chao, S. (2011) Composition and conservation of the mRNA-degrading machinery in bacteria. *Journal of Biomedical Science*, **18**,23.
- Kaberdin, V.R., Walsh, A.P., Jakobsen, T., McDowall, K.J., and Gabain, A. von (2000) Enhanced cleavage of RNA mediated by an interaction between substrates and the arginine-rich domain of *E. coli* ribonuclease E11. Edited by I. B. Holland. *Journal of molecular biology*, **301**,257–264.
- Keen, N.T., Tamaki, S., Kobayashi, D., and Trollinger, D. (1988) Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in Gram-negative bacteria. *Gene*, **70**,191–197.
- Kharrat, A., Macias, M.J., Gibson, T.J., Nilges, M., and Pastore, A. (1995) Structure of the dsRNA binding domain of *E. coli* RNase III. *The EMBO journal*, **14**,3572–3584.
- Khemici, V., Poljak, L., Luisi, B.F., and Carpousis, A.J. (2008) The RNase E of *Escherichia coli* is a membrane-binding protein. *Molecular microbiology*, **70**,799–813.

- Khemici, V., Poljak, L., Toesca, I., and Carpousis, A.J. (2005) Evidence *in vivo* that the DEAD-box RNA helicase RhlB facilitates the degradation of ribosome-free mRNA by RNase E. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**,6913–6918.
- Kime, L., Clarke, J.E., Romero A, D., Grasby, J.A., and McDowall, K.J. (2014) Adjacent single-stranded regions mediate processing of tRNA precursors by RNase E direct entry. *Nucleic acids research*, **42**,4577–4589.
- Kime, L., Jourdan, S.S., Stead, J.A., Hidalgo-Sastre, A., and McDowall, K.J. (2010) Rapid cleavage of RNA by RNase E in the absence of 5' monophosphate stimulation. *Molecular microbiology*, **76**,590–604.
- King, T.C., Sirdeshmukh, R., and Schlessinger, D. (1984) RNase III cleavage is obligate for maturation but not for function of *Escherichia coli* pre-23S rRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **81**,185–188.
- Klein, F., and Evguenieva-Hackenberg, E. (2002) RNase E is involved in 5'-end 23S rRNA processing in α -Proteobacteria. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **299**,780–786.
- Klug, G. (1991) Endonucleolytic degradation of *puf* mRNA in *Rhodobacter capsulatus* is influenced by oxygen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **88**,1765–1769.
- Klug, G., Adams, C.W., Belasco, J., Doerge, B., and Cohen, S.N. (1987) Biological consequences of segmental alterations in mRNA stability: effects of deletion of the intercistronic hairpin loop region of the *Rhodobacter capsulatus puf* operon. *The EMBO journal*, **6**,3515–3520.
- Klug, G., and Cohen, S.N. (1988) Pleiotropic effects of localized *Rhodobacter capsulatus puf* operon deletions on production of light-absorbing pigment-protein complexes. *Journal of Bacteriology*, **170**,5814–5821.
- Konovalova, A., Søggaard-Andersen, L., and Kroos, L. (2014) Regulated proteolysis in bacterial development. *FEMS microbiology reviews*, **38**,493–522.
- Koraimann, G., Koraimann, C., Koronakis, V., Schlager, S., and Högenauer, G. (1991) Repression and derepression of conjugation of plasmid R1 by wild-type and mutated finP antisense RNA. *Molecular microbiology*, **5**,77–87.
- Kordes, E., Jock, S., Fritsch, J., Bosch, F., and Klug, G. (1994) Cloning of a gene involved in rRNA precursor processing and 23S rRNA cleavage in *Rhodobacter capsulatus*. *Journal of Bacteriology*, **176**,1121–1127.
- Koslover, D.J., Callaghan, A.J., Marcaida, M.J., Garman, E.F., Martick, M., Scott, W.G., and Luisi, B.F. (2008) The crystal structure of the *Escherichia coli* RNase E apoprotein and a mechanism for RNA degradation. *Structure (London, England : 1993)*, **16**,1238–1244.
- Kovach, M.E., Elzer, P.H., Steven Hill, D., Robertson, G.T., Farris, M.A., Roop, R.M., and Peterson, K.M. (1995) Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene*, **166**,175–176.

- Krinke, L., Mahoney, M., and Wulff, D.L. (1991) The role of the OOP antisense RNA in coliphage lambda development. *Molecular microbiology*, **5**,1265–1272.
- Krinke, L., and Wulff, D.L. (1987) OOP RNA, produced from multicopy plasmids, inhibits lambda *cII* gene expression through an RNase III-dependent mechanism. *Genes & Development*, **1**,1005–1013.
- Krinke, L., and Wulff, D.L. (1990) RNase III-dependent hydrolysis of lambda *cII-O* gene mRNA mediated by lambda OOP antisense RNA. *Genes & Development*, **4**,2223–2233.
- Lanyi, J.K. (2004) Bacteriorhodopsin. *Annual review of physiology*, **66**,665–688.
- Lea-Smith, D.J., Bombelli, P., Vasudevan, R., and Howe, C.J. (2016) Photosynthetic, respiratory and extracellular electron transport pathways in cyanobacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, **1857**,247–255.
- Leroy, A., Vanzo, N.F., Sousa, S., Dreyfus, M., and Carpousis, A.J. (2002) Function in *Escherichia coli* of the non-catalytic part of RNase E: role in the degradation of ribosome-free mRNA. *Molecular microbiology*, **45**,1231–1243.
- Li, K., Pasternak, C., Härtig, E., Haberzettl, K., Maxwell, A., and Klug, G. (2004) Thioredoxin can influence gene expression by affecting gyrase activity. *Nucleic acids research*, **32**,4563–4575.
- Li, S.-K., Ng, P.K.-S., Qin, H., Lau, J.K.-Y., Lau, J.P.-Y., Tsui, S.K.-W., Chan, T.-F., and Lau, T.C.-K. (2013) Identification of small RNAs in *Mycobacterium smegmatis* using heterologous Hfq. *RNA (New York, N.Y.)*, **19**,74–84.
- Li, Z., and Deutscher, M.P. (1995) The tRNA processing enzyme RNase T is essential for maturation of 5S RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **92**,6883–6886.
- Li, Z., Pandit, S., and Deutscher, M.P. (1999a) Maturation of 23S ribosomal RNA requires the exoribonuclease RNase T. *RNA (New York, N.Y.)*, **5**,139–146.
- Li, Z., Pandit, S., and Deutscher, M.P. (1999b) RNase G (CafA protein) and RNase E are both required for the 5' maturation of 16S ribosomal RNA. *The EMBO journal*, **18**,2878–2885.
- López-Aguilar, C., Romero-López, C., Espinosa, M., Berzal-Herranz, A., and Del Solar, G. (2015) The 5'-tail of antisense RNAII of pMV158 plays a critical role in binding to the target mRNA and in translation inhibition of *repB*. *Frontiers in genetics*, **6**,225.
- López-Maury, L., Marguerat, S., and Bähler, J. (2008) Tuning gene expression to changing environments: from rapid responses to evolutionary adaptation. *Nature reviews. Genetics*, **9**,583–593.
- Lu, F., and Taghbalout, A. (2014) The *Escherichia coli* major exoribonuclease RNase II is a component of the RNA degradosome. *Bioscience reports*, **34**,879-891.
- Ma, C., and Simons, R.W. (1990) The IS10 antisense RNA blocks ribosome binding at the transposase translation initiation site. *The EMBO journal*, **9**,1267–1274.

- Mackenzie, C., Choudhary, M., Larimer, F.W., Predki, P.F., Stilwagen, S., and Armitage, J.P., *et al.* (2001) The home stretch, a first analysis of the nearly completed genome of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *Photosynthesis Research*, **70**,19–41.
- Mackie, G.A. (2013) RNase E: at the interface of bacterial RNA processing and decay. *Nature Reviews Microbiology*, **11**,45–57.
- Mahmoud, S.A., and Chien, P. (2018) Regulated Proteolysis in Bacteria. *Annual review of biochemistry*, **87**,677–696.
- Mangan, S., and Alon, U. (2003) Structure and function of the feed-forward loop network motif. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**,11980–11985.
- Mank, N.N. (2013) PcrZ: a small noncoding RNA regulates photosynthesis gene expression in *Rhodobacter sphaeroides*. Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Mank, N.N., Berghoff, B.A., Hermanns, Y.N., and Klug, G. (2012) Regulation of bacterial photosynthesis genes by the small noncoding RNA PcrZ. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **109**,16306–16311.
- Mank, N.N., Berghoff, B.A., and Klug, G. (2013) A mixed incoherent feed-forward loop contributes to the regulation of bacterial photosynthesis genes. *RNA biology*, **10**,347–352.
- Marcaida, M.J., DePristo, M.A., Chandran, V., Carpousis, A.J., and Luisi, B.F. (2006) The RNA degradosome: life in the fast lane of adaptive molecular evolution. *Trends in biochemical sciences*, **31**,359–365.
- Martin, W.F., Bryant, D.A., and Beatty, J.T. (2018) A physiological perspective on the origin and evolution of photosynthesis. *FEMS microbiology reviews*, **42**,205–231.
- Masepohl, B., Klipp, W., and Pühler, A. (1988) Genetic characterization and sequence analysis of the duplicated *nifA/nifB* gene region of *Rhodobacter capsulatus*. *Molecular and General Genetics MGG*, **212**,27–37.
- Massé, E., Escorcía, F.E., and Gottesman, S. (2003) Coupled degradation of a small regulatory RNA and its mRNA targets in *Escherichia coli*. *Genes & Development*, **17**,2374–2383.
- Masuda, S., and Bauer, C.E. (2002) AppA is a blue light photoreceptor that antirepresses photosynthesis gene expression in *Rhodobacter sphaeroides*. *Cell*, **110**,613–623.
- Masuda, S., Dong, C., Swem, D., Setterdahl, A.T., Knaff, D.B., and Bauer, C.E. (2002) Repression of photosynthesis gene expression by formation of a disulfide bond in CrtJ. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**,7078–7083.
- McDowall, K.J., Hernandez, R.G., Lin-Chao, S., and Cohen, S.N. (1993) The *ams-1* and *rne-3071* temperature-sensitive mutations in the *ams* gene are in close proximity to each other and cause substitutions within a domain that resembles a product of the *Escherichia coli mre* locus. *Journal of Bacteriology*, **175**,4245–4249.

- McDowall, K.J., Lin-Chao, S., and Cohen, S.N. (1994) A+U content rather than a particular nucleotide order determines the specificity of RNase E cleavage. *The Journal of biological chemistry*, **269**,10790–10796.
- Mian, I.S. (1997) Comparative sequence analysis of ribonucleases HII, III, II PH and D. *Nucleic acids research*, **25**,3187–3195.
- Miczak, A., Kaberdin, V.R., Wei, C.L., and Lin-Chao, S. (1996) Proteins associated with RNase E in a multicomponent ribonucleolytic complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**,3865–3869.
- Mikulecky, P.J., Kaw, M.K., Brescia, C.C., Takach, J.C., Sledjeski, D.D., and Feig, A.L. (2004) *Escherichia coli* Hfq has distinct interaction surfaces for DsrA, *rpoS* and poly(A) RNAs. *Nature structural & molecular biology*, **11**,1206–1214.
- Misra, T.K., and Apirion, D. (1979) RNase E, an RNA processing enzyme from *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry*, **254**,11154–11159.
- Mohanty, B.K., and Kushner, S.R. (2000) Polynucleotide phosphorylase functions both as a 3' → 5' exonuclease and a poly(A) polymerase in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **97**,11966–11971.
- Montero Llopis, P., Jackson, A.F., Sliusarenko, O., Surovtsev, I., Heinritz, J., Emonet, T., and Jacobs-Wagner, C. (2010) Spatial organization of the flow of genetic information in bacteria. *Nature*, **466**,77–81.
- Morfeldt, E., Taylor, D., Gabain, A. von, and Arvidson, S. (1995) Activation of alpha-toxin translation in *Staphylococcus aureus* by the trans-encoded antisense RNA, RNAIII. *The EMBO journal*, **14**,4569–4577.
- Morita, M.T., Tanaka, Y., Kodama, T.S., Kyogoku, Y., Yanagi, H., and Yura, T. (1999) Translational induction of heat shock transcription factor sigma32: evidence for a built-in RNA thermosensor. *Genes & Development*, **13**,655–665.
- Morita, T., Maki, K., and Aiba, H. (2005) RNase E-based ribonucleoprotein complexes: mechanical basis of mRNA destabilization mediated by bacterial noncoding RNAs. *Genes & Development*, **19**,2176–2186.
- Morita, T., Mochizuki, Y., and Aiba, H. (2006) Translational repression is sufficient for gene silencing by bacterial small noncoding RNAs in the absence of mRNA destruction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**,4858–4863.
- Müller, K.M.H., Berghoff, B.A., Eisenhardt, B.D., Remes, B., and Klug, G. (2016) Characteristics of Pos19 – A small coding RNA in the oxidative stress response of *Rhodobacter sphaeroides*. *PloS one*, **11**,1–19.
- Nahvi, A., Sudarsan, N., Ebert, M.S., Zou, X., Brown, K.L., and Breaker, R.R. (2002) Genetic control by a metabolite binding mRNA. *Chemistry & Biology*, **9**,1043–1049.
- Newman, J.D., Anthony, J.R., and Donohue, T.J. (2001) The importance of zinc-binding to the function of *Rhodobacter sphaeroides* ChrR as an anti-sigma factor. *Journal of molecular biology*, **313**,485–499.

- Newman, J.D., Falkowski, M.J., Schilke, B.A., Anthony, L.C., and Donohue, T.J. (1999) The *Rhodobacter sphaeroides* ECF sigma factor, sigma(E), and the target promoters *cycA* P3 and *rpoE* P1. *Journal of molecular biology*, **294**,307–320.
- Nicholson, A.W. (2014) Ribonuclease III mechanisms of double-stranded RNA cleavage. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*, **5**,31–48.
- Nuss, A.M., Adnan, F., Weber, L., Berghoff, B.A., Glaeser, J., and Klug, G. (2013) DegS and RseP homologous proteases are involved in singlet oxygen dependent activation of RpoE in *Rhodobacter sphaeroides*. *PloS one*, **8**,1-15.
- Nuss, A.M., Glaeser, J., Berghoff, B.A., and Klug, G. (2010) Overlapping alternative sigma factor regulons in the response to singlet oxygen in *Rhodobacter sphaeroides* ∇ \dagger . *Journal of Bacteriology*, **192**,2613–2623.
- Nuss, A.M., Glaeser, J., and Klug, G. (2009) RpoH(II) activates oxidative-stress defense systems and is controlled by RpoE in the singlet oxygen-dependent response in *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of Bacteriology*, **191**,220–230.
- Olsen, J.D., Adams, P.G., Jackson, P.J., Dickman, M.J., Qian, P., and Hunter, C.N. (2014) Aberrant assembly complexes of the reaction center light-harvesting 1 PufX (RC-LH1-PufX) core complex of *Rhodobacter sphaeroides* imaged by atomic force microscopy. *The Journal of biological chemistry*, **289**,29927–29936.
- Olsen, J.D., Martin, E.C., and Hunter, C.N. (2017) The PufX quinone channel enables the light-harvesting 1 antenna to bind more carotenoids for light collection and photoprotection. *FEBS letters*, **591**,573–580.
- Opdyke, J.A., Kang, J.-G., and Storz, G. (2004) GadY, a small-RNA regulator of acid response genes in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, **186**,6698–6705.
- Papenfort, K., Sun, Y., Miyakoshi, M., Vanderpool, C.K., and Vogel, J. (2013) Small RNA-mediated activation of sugar phosphatase mRNA regulates glucose homeostasis. *Cell*, **153**,426–437.
- Penfold, R.J., and Pemberton, J.M. (1994) Sequencing, chromosomal inactivation, and functional expression in *Escherichia coli* of *ppsR*, a gene which represses carotenoid and bacteriochlorophyll synthesis in *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of Bacteriology*, **176**,2869–2876.
- Peng, T., Berghoff, B.A., Oh, J.-I., Weber, L., Schirmer, J., Schwarz, J., Glaeser, J., and Klug, G. (2016) Regulation of a polyamine transporter by the conserved 3' UTR-derived sRNA SorX confers resistance to singlet oxygen and organic hydroperoxides in *Rhodobacter sphaeroides*. *RNA biology*, **13**,988–999.
- Pfaffl, M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, **29**,1-6.
- Pfeiffer, V., Papenfort, K., Lucchini, S., Hinton, J.C.D., and Vogel, J. (2009) Coding sequence targeting by MicC RNA reveals bacterial mRNA silencing downstream of translational initiation. *Nature structural & molecular biology*, **16**,840–846.

- Ponnampalam, S.N., and Bauer, C.E. (1997) DNA binding characteristics of CrtJ. A redox-responding repressor of bacteriochlorophyll, carotenoid, and light harvesting-II gene expression in *Rhodobacter capsulatus*. *The Journal of biological chemistry*, **272**,18391–18396.
- Pugh, R.J., McGlynn, P., Jones, M.R., and Hunter, C.N. (1998) The LH1–RC core complex of *Rhodobacter sphaeroides*: interaction between components, time-dependent assembly, and topology of the PufX protein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, **1366**,301–316.
- Py, B., Causton, H., Mudd, E.A., and Higgins, C.F. (1994) A protein complex mediating mRNA degradation in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology*, **14**,717–729.
- Py, B., Higgins, C.F., Krisch, H.M., and Carpousis, A.J. (1996) A DEAD-box RNA helicase in the *Escherichia coli* RNA degradosome. *Nature*, **381**,169–172.
- Qian, P., Martin, E.C., Ng, I.W., and Hunter, C.N. (2017) The C-terminus of PufX plays a key role in dimerisation and assembly of the reaction center light-harvesting 1 complex from *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, **1858**,795–803.
- Qian, P., Neil Hunter, C., and Bullough, P.A. (2005) The 8.5Å projection structure of the core RC–LH1–PufX dimer of *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of molecular biology*, **349**,948–960.
- Qian, P., Papiz, M.Z., Jackson, P.J., Brindley, A.A., Ng, I.W., and Olsen, J.D., *et al.* (2013) Three-dimensional structure of the *Rhodobacter sphaeroides* RC-LH1-PufX complex: dimerization and quinone channels promoted by PufX. *Biochemistry*, **52**,7575–7585.
- Rauhut, R., and Klug, G. (1999) mRNA degradation in bacteria. *FEMS microbiology reviews*, **23**,353–370.
- Raymond, J. (2008) Coloring in the tree of life. *Trends in microbiology*, **16**,41–43.
- Remes, B., Rische-Grahl, T., Müller, K.M.H., Förstner, K.U., Yu, S.-H., and Weber, L., *et al.* (2017) An RpoHI-dependent response promotes outgrowth after extended stationary phase in the alphaproteobacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of Bacteriology*, **199**,1–13.
- Rische, T. (2012) Untersuchungen zur ribonukleolytischen Aktivität und zur Funktion der RNase J aus *Rhodobacter sphaeroides*. Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Rische, T., and Klug, G. (2012) The ordered processing of intervening sequences in 23S rRNA of *Rhodobacter sphaeroides* requires RNase J. *RNA biology*, **9**,343–350.
- Rische-Grahl, T., Weber, L., Remes, B., Förstner, K.U., and Klug, G. (2014) RNase J is required for processing of a small number of RNAs in *Rhodobacter sphaeroides*. *RNA biology*, **11**,855–864.
- Rodnina, M.V. (2018) Translation in Prokaryotes. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, **10**,1–22.
- Ross, J.A., Ellis, M.J., Hossain, S., and Haniford, D.B. (2013) Hfq restructures RNA-IN and RNA-OUT and facilitates antisense pairing in the Tn10/IS10 system. *RNA (New York, N.Y.)*, **19**,670–684.

- Ross, J.A., Wardle, S.J., and Haniford, D.B. (2010) Tn10/IS10 transposition is downregulated at the level of transposase expression by the RNA-binding protein Hfq. *Molecular microbiology*, **78**,607–621.
- Rotondo, G., and Frendewey, D. (1996) Purification and characterization of the Pac I ribonuclease of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic acids research*, **24**,2377–2386.
- Santiago-Frangos, A., and Woodson, S.A. (2018) Hfq chaperone brings speed dating to bacterial sRNA. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*, **9**,1-24.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **109**,9396–9401.
- Sauer, E., and Weichenrieder, O. (2011) Structural basis for RNA 3'-end recognition by Hfq. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108**,13065–13070.
- Schu, D.J., Zhang, A., Gottesman, S., and Storz, G. (2015) Alternative Hfq-sRNA interaction modes dictate alternative mRNA recognition. *The EMBO journal*, **34**,2557–2573.
- Serganov, A., and Nudler, E. (2013) A decade of riboswitches. *Cell*, **152**,17–24.
- Sharma, C.M., Darfeuille, F., Plantinga, T.H., and Vogel, J. (2007) A small RNA regulates multiple ABC transporter mRNAs by targeting C/A-rich elements inside and upstream of ribosome-binding sites. *Genes & Development*, **21**,2804–2817.
- Shearwin, K.E., Callen, B.P., and Egan, J.B. (2005) Transcriptional interference--a crash course. *Trends in genetics : TIG*, **21**,339–345.
- Shi, Z., Yang, W.-Z., Lin-Chao, S., Chak, K.-F., and Yuan, H.S. (2008) Crystal structure of *Escherichia coli* PNPase: central channel residues are involved in processive RNA degradation. *RNA (New York, N.Y.)*, **14**,2361–2371.
- Shimada, H., Iba, K., and Takamiya, K. (1992) Blue-light irradiation reduces the expression of *puf* and *puc* operons of *Rhodobacter sphaeroides* under semi-aerobic conditions. *Plant and Cell Physiology*, **33**,471–475.
- Shine, J., and Dalgarno, L. (1974) The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **71**,1342–1346.
- Simon, R., Priefer, U., and Pühler, A. (1983) A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: Transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Bio/Technology*, **1**,784–791.
- Sittka, A., Lucchini, S., Papenfort, K., Sharma, C.M., Rolle, K., Binnewies, T.T., Hinton, J.C.D., and Vogel, J. (2008) Deep sequencing analysis of small noncoding RNA and mRNA targets of the global post-transcriptional regulator, Hfq. *PLoS genetics*, **4**,1-20.

- Smit, M.H. de, and van Duin, J. (1990) Secondary structure of the ribosome binding site determines translational efficiency: a quantitative analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **87**,7668–7672.
- Srivastava, A.K., and Schlessinger, D. (1990) Mechanism and regulation of bacterial ribosomal RNA processing. *Annual review of microbiology*, **44**,105–129.
- St Johnston, D., Brown, N.H., Gall, J.G., and Jantsch, M. (1992) A conserved double-stranded RNA-binding domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **89**,10979–10983.
- Sun, X., Zhulin, I., and Wartell, R.M. (2002) Predicted structure and phyletic distribution of the RNA-binding protein Hfq. *Nucleic acids research*, **30**,3662–3671.
- Takyar, S., Hickerson, R.P., and Noller, H.F. (2005) mRNA helicase activity of the ribosome. *Cell*, **120**,49–58.
- Talkad, V., Achord, D., and Kennell, D. (1978) Altered mRNA metabolism in ribonuclease III-deficient strains of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, **135**,528–541.
- Thang, M.N., Thang, D.C., and Grunberg-Manago, M. (1967) An altered polynucleotide phosphorylase in *E. coli* mutant Q13. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **28**,374–379.
- Trotochaud, A.E., and Wassarman, K.M. (2005) A highly conserved 6S RNA structure is required for regulation of transcription. *Nature structural & molecular biology*, **12**,313–319.
- Unterholzner, S.J., Poppenberger, B., and Rozhon, W. (2013) Toxin-antitoxin systems: Biology, identification, and application. *Mobile genetic elements*, **3**,e26219.
- Valentin-Hansen, P., Eriksen, M., and Udesen, C. (2004) MicroReview: The bacterial Sm-like protein Hfq: a key player in RNA transactions. *Molecular microbiology*, **51**,1525–1533.
- van Niel, C.B. (1944) The culture, general physiology, morphology, and classification of the non-sulfur purple and brown bacteria. *Bacteriological reviews*, **8**,1–118.
- Vanzo, N.F., Li, Y.S., Py, B., Blum, E., Higgins, C.F., Raynal, L.C., Krisch, H.M., and Carpousis, A.J. (1998) Ribonuclease E organizes the protein interactions in the *Escherichia coli* RNA degradosome. *Genes & Development*, **12**,2770–2781.
- Večerek, B., Moll, I., and Bläsi, U. (2007) Control of Fur synthesis by the non-coding RNA RyhB and iron-responsive decoding. *The EMBO journal*, **26**,965–975.
- Vellanoweth, R.L., and Rabinowitz, J.C. (1992) The influence of ribosome-binding-site elements on translational efficiency in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* *in vivo*. *Molecular microbiology*, **6**,1105–1114.
- Verméglio, A., and Joliot P. (1999) The photosynthetic apparatus of *Rhodobacter sphaeroides*. *Trends in microbiology*, **7**,435–440.
- Vermeulen, A.J., and Bauer, C.E. (2015) Members of the PpaA/AerR antirepressor family bind cobalamin. *Journal of Bacteriology*, **197**,2694–2703.

- Viegas, S.C., Silva, I.J., Saramago, M., Domingues, S., and Arraiano, C.M. (2011) Regulation of the small regulatory RNA MicA by ribonuclease III: a target-dependent pathway. *Nucleic acids research*, **39**,2918–2930.
- Vogel, J., Argaman, L., Wagner, E.G.H., and Altuvia, S. (2004) The small RNA IstR inhibits synthesis of an SOS-induced toxic peptide. *Current Biology*, **14**,2271–2276.
- Vogel, J., and Luisi, B.F. (2011) Hfq and its constellation of RNA. *Nature Reviews Microbiology*, **9**,578–589.
- Vytvytska, O., Moll, I., Kaberdin, V.R., Gabain, A. von, and Bläsi, U. (2000) Hfq (HF1) stimulates *ompA* mRNA decay by interfering with ribosome binding. *Genes & Development*, **14**,1109–1118.
- Wassarman, K.M., and Saecker, R.M. (2006) Synthesis-mediated release of a small RNA inhibitor of RNA polymerase. *Science (New York, N.Y.)*, **314**,1601–1603.
- Waters, L.S., and Storz, G. (2009) Regulatory RNAs in Bacteria. *Cell*, **136**,615–628.
- Weber, L. (2017) SorY und UpsM, funktionelle Charakterisierung zweier sRNAs in *Rhodobacter sphaeroides*. Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Weber, L., Thoelken, C., Volk, M., Remes, B., Lechner, M., and Klug, G. (2016) The conserved *dcw* gene cluster of *R. sphaeroides* is preceded by an uncommonly extended 5' leader featuring the sRNA UpsM. *PloS one*, **11**,1-18.
- Wilusz, C.J., and Wilusz, J. (2005) Eukaryotic Lsm proteins: lessons from bacteria. *Nature Structural & Molecular Biology*, **12**,1031–1036.
- Yanofsky, C., Platt, T., Crawford, I.P., Nichols, B.P., Christie, G.E., Horowitz, H., VanCleemput, M., and Wu, A.M. (1981) The complete nucleotide sequence of the tryptophan operon of *Escherichia coli*. *Nucleic acids research*, **9**,6647–6668.
- Young, R.A., and Steitz, J.A. (1978) Complementary sequences 1700 nucleotides apart form a ribonuclease III cleavage site in *Escherichia coli* ribosomal precursor RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **75**,3593–3597.
- Zeilstra-Ryalls, J.H., and Kaplan, S. (1995) Aerobic and anaerobic regulation in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1: the role of the *fnrL* gene. *Journal of Bacteriology*, **177**,6422–6431.
- Zeilstra-Ryalls, J.H., and Kaplan, S. (1998) Role of the *fnrL* gene in photosystem gene expression and photosynthetic growth of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *Journal of Bacteriology*, **180**,1496–1503.
- Zeilstra-Ryalls, J.H., and Kaplan, S. (2004) Oxygen intervention in the regulation of gene expression: the photosynthetic bacterial paradigm. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, **61**,417–436.
- Zeng, Y., Feng, F., Medová, H., Dean, J., and Koblížek, M. (2014) Functional type 2 photosynthetic reaction centers found in the rare bacterial phylum *Gemmatimonadetes*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **111**,7795–7800.

- Zhang, A., Wassarman, K.M., Ortega, J., Steven, A.C., and Storz, G. (2002a) The Sm-like Hfq protein increases OxyS RNA interaction with target mRNAs. *Molecular 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. *Molecular microbiology*, **50**,1111–1124.
- Zhang, H., Kolb, F.A., Brondani, V., Billy, E., and Filipowicz, W. (2002b) Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP. *The EMBO journal*, **21**,5875–5885.

Curriculum Vitae

Publikationen

Förstner KU., Reuscher CM., Haberzettl K., Weber L. and Klug G. (2018) RNase E cleavage shapes the transcriptome of *Rhodobacter sphaeroides* and strongly impacts phototrophic growth. *Life Science Alliance* 1 (4).

Eisenhart KMH., Reuscher CM. and Klug G. (2018) PcrX, an sRNA derived from the 3'-UTR of the *Rhodobacter sphaeroides* *puf* operon modulates expression of *puf* genes encoding proteins of the bacterial photosynthetic apparatus. *Molecular microbiology* 110 (3), S. 325–334.

Wissenschaftliche Beiträge bei Konferenzen

- 03/2016 The involvement of the antisense RNA RSaspufL in the regulated formation of photosynthesis complexes in *Rhodobacter sphaeroides*, VAAM-Jahrestagung, Jena – Poster
- 03/2017 The involvement of the antisense RNA RSaspufL in the regulated formation of photosynthesis complexes in *Rhodobacter sphaeroides*, VAAM-Jahrestagung, Würzburg – Poster
- 03/2018 The involvement of the antisense RNA RSaspufL in the regulated formation of photosynthesis complexes in *Rhodobacter sphaeroides*, 5th meeting of Regulating with RNA in Bacteria and Archaea – Poster
- 04/2018 The involvement of the antisense RNA RSaspufL in the regulated formation of photosynthesis complexes in *Rhodobacter sphaeroides*, VAAM-Jahrestagung, Wolfsburg – Vortrag
- 07/2018 The involvement of the antisense RNA RSaspufL in the regulated formation of photosynthesis complexes in *Rhodobacter sphaeroides*, Meeting of Sensory and Regulatory RNAs in Prokaryotes 2018, Gießen – Vortrag
- 03/2019 The involvement of the antisense RNA RSaspufL in the regulated formation of photosynthesis complexes in *Rhodobacter sphaeroides*, VAAM-Jahrestagung, Mainz – Vortrag
- 07/2019 The involvement of the antisense RNA RSaspufL in the regulated formation of photosynthesis complexes in *Rhodobacter sphaeroides*, Meeting of Sensory and Regulatory RNAs in Prokaryotes 2019, Freiburg – Poster
- 03/2020 Antisense RNA asPcrL regulates expression of photosynthesis genes in *Rhodobacter sphaeroides* by promoting RNase III-dependent turn-over of *puf*-mRNA, VAAM-Jahrestagung Leipzig – Poster

Danksagung

Als Erstes möchte ich mich bei Prof. Dr. Gabriele Klug für die Betreuung während meiner Doktorarbeit in den letzten Jahren bedanken. Danke, dass du mir immer mit Rat beiseite gestanden, mich motiviert und gefordert hast. Die Zeit in deiner Arbeitsgruppe hat mir stets Freude bereitet und ich bin gerne ein Teil von ihr gewesen.

Danke an Prof. Dr. Michael Niepmann für die Übernahme der Zweitkorrektur meiner Arbeit.

Auch vielen Dank an Prof. Dr. Sylvia Schnell und Prof. Dr. Kai Thormann für die Teilnahme an meiner Prüfungskommission.

Des Weiteren möchte ich mich bei Prof. Dr. Konrad Förstner für die exzellente Zusammenarbeit und die bioinformatischen Analysen im RNase E-Projekt bedanken.

Ein großer Dank gilt auch meinen Kollegen, die mich die letzten Jahre begleitet haben, mich im September 2015 so herzlich aufgenommen und mich zum Durchhalten motiviert haben, sodass Aufgeben nie eine Option darstellte.

Katrin (Müller) Eisenhardt, mein Power-Pas-Girl. Du warst von Anfang an immer für mich da. Nicht nur im Labor, sondern auch in privaten Angelegenheiten warst du immer eine große Hilfe und ohne dich hätte ich es nicht so weit geschafft.

Lennart! Keinen Namen habe ich in den letzten 4,5 Jahren öfter empört gerufen als deinen. Die ersten zwei Wochen warst du noch nett und zurückhaltend doch dann gings los. Danke für Alles: für deine Problemlösungsansätze, ungefragten Weisheiten, die Aufnahme und Übergabe von „Korn und Sprite“ und die Einführung in das Gießener Nachtleben. Im gleichen Atemzug ist natürlich auch deine wunderbare Mitbewohnerin Julia zu nennen, die mich schon an Tag 2 in Gießen für verrückt erklärte. Danke Julia für all die tollen Stunden abseits vom Labor und für das viele Lachen, wenn wir zusammen sind.

Auch bei Lennarts besserer Hälfte Dr. B. möchte ich mich bedanken. Danke, dass du als Einziger hier meinen hervorragenden Musikgeschmack teilst. Danke für die morgendlichen Kaffeerunden im Care und für die Turbo-DNase, du weist was Forscherinnen-Herzen höherschlagen lässt. Danke auch für die Hilfestellungen im Labor, außer Lennart war auch anwesend. Zu zweit wart ihr eine Katastrophe, aber das ist dir sicher egal.

Andrea von Zett, kleine Katrin und Susann auch wenn wir teilweise nicht lange miteinander gearbeitet haben möchte ich mich für die gemeinsamen Erlebnisse und schönen Stunden zusammen im Labor und darüber hinaus bedanken.

Bei Juliano, meinem Laborehemann, möchte ich mich vor allem für das „Leihen“ jeglicher Puffer, Lösungen und Equipment bedanken. Darüber hinaus aber natürlich auch für die tolle Zusammenarbeit in L236 (Bestes Labor!) und für den ganzen Quatsch den wir zusammen gemacht haben. Ach ja und natürlich fürs Abschleppen.

Mathieuuli, dass ich dich hier erwähne, hätte am Anfang keiner geglaubt, aber dann haben wir uns ja doch ganz gut aneinander gewöhnt. Auch dir möchte ich für die schönen Stunden in L236 danken und dich dran erinnern, dass ich dich einmal souverän bei Expolding Kittens geschlagen habe.

Niklas, danke für unsere tolle Zusammenarbeit an dem pas2-Projekt und dafür, dass du mir den Mut gegeben hast an mich selbst zu glauben.

Andrea und Kerstin möchte ich für ihre Hilfe und Geduld bei der Durchführung für einige meiner Experimente danken. Ihr beide habt mit euren sehr unterschiedlichen Arten dazu beigetragen, dass L236 ein Zuhause für mich war.

Danke an Andreas, der mir in doch auch manchmal schwierigen Zeiten mit seinen Anmerkungen und niedergeschriebenen Anweisungen oft ein Lächeln ins Gesicht gezaubert hat.

Carmen möchte ich für die schnellen Abwicklungen bei den Bestellungen und dafür, dass ich nicht immer als Einzige am Meckern war, danken.

Ein weiterer Dank geht an die Kolleginnen aus dem Sekretariat, die mir immer bei administrativen Aufgaben behilflich waren.

Danke an Janek, meinen besten Masterstudent *ever*, der mich mit den verrücktesten Fragen und Vermutungen gelöchert und mir so noch einiges beigebracht hat. Auch bei meinen anderen Studenten Janina, Steffi und Julian möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit bedanken. Auch bei Silvan und Maxi, die ich zwar nicht selbst betreut habe, möchte ich mich für die Verbesserung der Laboratmosphäre bedanken.

Gleiches gilt auch für die anderen Mitglieder der AG Klug, die leider nicht das Glück hatten in L236 zu arbeiten. Danke Mathew und Timon für den wissenschaftlichen Input und das Korrekturlesen meiner Arbeiten. Auch Jonas möchte ich für das Lesen und Verbessern meiner Arbeit danken.

Auch den anderen Arbeitsgruppen des Instituts möchte ich gerne für den Zusammenhalt danken. Bei den Chefs Kai und Elena für die wissenschaftlichen Diskussionen und Anregungen zur meiner Arbeit. Den Mitarbeitern der AG Hackenberg: Julia, Henry und Susanne für die tolle Zusammenarbeit während den letzten Jahren. Robina und Saina, ihr seid auf jeden Fall auch mehr als „nur“ Kollegen für mich geworden. Mit eurem lebensfrohen, freundlichen und manchmal auch chaotischen Dasein bereichert ihr mein Leben. Zusätzlich möchte ich mich bei Kai für die Aufnahme als „Austausch-Wissenschaftler“ in die Thromann-AG und seinen Mitarbeitern bedanken: Timmy für das Aufreinigen meiner Proteinen, Meike für das Scannen meiner Festplatte. Flo, Suse, Ulrike, John, Vanessa und Nicole einfach für die nette Atmosphäre. Max und Marco für die tolle Zeit am Institut und für unseren Kopenhagen/Malmö-Urlaub, nur kochen will ich mit euch zusammen nicht mehr. Bork möchte ich neben der Hilfe im Labor auch für die gemeinsamen Unternehmungen außerhalb des Labors danken. Du planst definitiv die besten Kneipentouren und wenn Daniel nicht gerade schläft, macht das Arbeiten mit ihm viel Spaß.

Und ein „Tut mir Leid“ an alle fürs Stifte und Materialien mopsen.

Auch den Freunden aus den anderen Instituten wie Oli, Andy und Marvin möchte ich für die schöne gemeinsame Zeit und das ein oder andere Kaltgetränk zu Sommer- oder Wintertagen danken.

Danke Max für die schönen VAAMs.

Anna, wenn wir Moleküle wären, wärest du meine komplementäre RNA. Auch wenn wir beide Temperaturen über 28°C meiden, bin ich mir sicher, dass auch 65°C uns nicht voneinander schmelzen könnten. Wir waren ein fantastisches dynamisches Duo und ich hoffe sehr, dass wir das auch noch ein Weilchen sein und noch einiges miteinander erleben werden #Vandalismusoderkunst. Danke, dass du immer da warst und für die vielen tollen Stunden in ganz Europa.

Natürlich möchte ich auch meinen Freunden außerhalb des Instituts dafür danken, dass sie schon immer für mich da waren. Auch wenn ich die Kellerkids nicht mehr allzu oft zu Gesicht bekomme, ist es jedes Mal eine großes Fest, wenn wir uns alle zusammen wiedersehen und ich möchte euch nicht missen.

Meinen lieben Ädels möchte ich für die letzten zwei Jahre danken. Unsere Treffen sind für mich jedes Mal wie ein kleiner Kurzurlaub, indem ich den Alltagsstress vergessen kann. Danke für jede Einzelne von euch.

Anna Maier Hofstetter, mein Gürkchen, danke für dich und die tollen Ausflüge die wir mit und ohne deinen kleinen Chaoten unternommen haben und hoffentlich noch unternommen werden.

Lolo, was ich über uns sagen könnte, würde jeglichen Rahmen dieser Danksagung sprengen. Danke und Nuss you!

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinen Eltern und meiner Schwester bedanken. Danke, dass ihr mich immer unterstützt habt und mich einfach habt machen lassen. Danke für das Singen in der Kindheit, das Aufmuntern, wenn es mir schlecht ging, das Ertragen meines Gemeckers und Danke für das Lachen am Läster-Essentisch der Familie Reuscher. Ich hab euch lieb.

PS: Lieber Darius, meinst du das ist immer noch Anfängerglück?