
**Untersuchungen zur ribonukleolytischen Aktivität
und zur Funktion der RNase J
aus *Rhodobacter sphaeroides***

Inaugural Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

– Dr. rer. nat. –

vorgelegt von

Dipl. Biol. Tom Karsten Rische

geboren am 17.03.1979 in Altdöbern

angefertigt am Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie

Fachbereich Biologie und Chemie

Justus-Liebig-Universität Gießen

Gießen, Mai 2012

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie, Fachbereich Biologie und Chemie der Justus-Liebig-Universität Gießen, in der Zeit von Juni 2007 bis Mai 2012 unter der Leitung von Prof. Dr. Gabriele Klug angefertigt.

1. Gutachterin:

Prof. Dr. Gabriele Klug

Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie

Justus-Liebig-Universität Gießen

Heinrich-Buff-Ring 26-32, 35392 Gießen

2. Gutachter:

Prof. Dr. Roland Hartmann

Institut für Pharmazeutische Chemie

Philipps-Universität Marburg

Marbacher Weg 6 (Bau C), 35032 Marburg

Erklärung

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

(Tom Rische)

1	Einleitung	1
1.1	Ribonukleasen	1
1.2	mRNA-Degradation als Regulator der Genexpression	2
1.2.1	RNase E und die Initiierung der mRNA-Degradation	4
1.2.2	3'-Exoribonukleasen und der Abbau von mRNA-Fragmenten	7
1.2.3	RNA-degradierende Multiprotein-Komplexe	8
1.2.4	Regulatorischer Einfluss kleiner RNAs auf die RNA-Degradation	10
1.2.5	RNase J1 und RNase Y, zwei Alternativen zur RNase E in Gram-positiven Organismen	10
1.3	RNA-Prozessierung.....	13
1.3.1	Prozessierung der ribosomalen RNA.....	13
1.3.2	<i>Intervening sequences</i> (IVS) und die Fragmentierung ribosomaler RNA	14
1.3.3	Prozessierung von tRNA.....	16
1.3.4	Prozessierung kleiner RNAs (sRNA).....	16
1.4	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	17
1.5	Zielsetzung der Arbeit	18
2	Material und Methoden.....	19
2.1	Material.....	19
2.1.1	Bakterienstämme.....	19
2.1.2	Plasmide	19
2.1.3	Oligonukleotide.....	19
2.1.4	Standardpuffer	21
2.1.5	Antibiotika	21
2.1.6	Radioaktive Nukleotide.....	21
2.1.7	Enzyme	22
2.1.8	Molekularbiologische Kits, Reagenzien und Größenstandards	22
2.2	Mikrobiologische Methoden.....	23
2.2.1	Kultivierung von <i>Rhodobacter sphaeroides</i> 2.4.1.....	23
2.2.2	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	23
2.2.3	Bestimmung der Gesamtzellzahl einer Flüssigkultur.....	24
2.2.4	Expression rekombinanter Protein in <i>Escherichia coli</i>	24
2.2.5	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen zur Elektrottransformation	24
2.2.6	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen zur Hitzeschock-Transformation.....	24
2.2.7	Elektrottransformation von <i>E. coli</i> JM109 und S17-1	24
2.2.8	Hitzeschock-Transformation von <i>E. coli</i> M15 [pREP4].....	25
2.2.9	Konjugation von Plasmid-DNA nach <i>R. sphaeroides</i>	25
2.3	Molekularbiologische Methoden	25
2.3.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	25
2.3.2	Isolierung von chromosomaler DNA aus <i>R. sphaeroides</i>	26
2.3.3	Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>R. sphaeroides</i>	26
2.3.4	Phenol/Chloroform-Extraktion	26
2.3.5	Ethanol-Präzipitation	27
2.3.6	Isopropanol-Präzipitation	27
2.3.7	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)	27
2.3.8	<i>Overlay</i> -PCR zur ortsspezifischen Mutagenese von Proteinen	27
2.3.9	Gen-Deletion in <i>R. sphaeroides</i>	28
2.3.10	Quantifizierung von Nukleinsäuren	28
2.4	Gelelektrophoresen	28
2.4.1	Agarosegele zur Auftrennung von DNA	28
2.4.2	Extraktion von DNA aus Agarose-Gelen	28
2.4.3	TBE/PAA-Gele zur Auftrennung kurzer DNA-Fragmente.....	29
2.4.4	Denaturierende TBE/PAA-Gele zur Auftrennung von RNA und cDNA.....	29
2.4.4.1	Denaturierende TBE/PAA-Gele für RNA-Degradationsassays.....	29
2.4.4.2	Denaturierende TBE/PAA-Gele für <i>Northern Blot</i> Analysen	29
2.4.4.3	Sequenzier-Gele	30

2.4.4.4	Präparative Gelelektrophorese von denaturierenden Harnstoff/PAA-Gelen	30
2.4.5	Dünnschichtchromatographie	30
2.4.6	SDS-Polyacrylamidgele zur Auftrennung von Proteinen	31
2.5	RNA-Methoden	31
2.5.1	<i>In vitro</i> Transkription.....	31
2.5.2	5'-Endmarkierung von RNA-Transkripten	32
2.5.2.1	5'-Endmarkierung mit der T ₄ Polynukleotidkinase	32
2.5.2.2	5'-Endmarkierung durch <i>in vitro</i> Transkription mit [γ -P ³²]-GTP	32
2.5.3	3'-Endmarkierung von RNA-Transkripten	33
2.5.4	Quantifizierung der radioaktiv markierten RNA.....	33
2.5.5	RNA-Degradationsassays	34
2.5.6	<i>In vitro</i> Prozessierung von Polysomen	34
2.5.7	<i>Primer Extension</i> Analyse.....	34
2.5.8	<i>RNase Protection Assays</i>	35
2.5.9	Sequenzier-Reaktionen	35
2.5.10	<i>Northern Blot</i> Analyse	36
2.5.11	Differentielle 5'-RACE	36
2.5.12	<i>RNASeq</i> Transkriptom Analyse.....	37
2.6	Protein - Methoden	38
2.6.1	Proteinmengenbestimmung	38
2.6.2	Nachweis von Proteinen durch Silberfärbung.....	39
2.6.3	Herstellung eines RNase J~His ₆ spezifischen Antiserums	39
2.6.4	<i>Western Blot</i> Analyse	39
2.6.4.1	Elektro- <i>blotting</i>	40
2.6.4.2	<i>Ponceau</i> Färbung	40
2.6.4.3	Antikörper Bindung	40
2.6.4.4	Peroxidase vermittelte <i>Western Blot</i> Entwicklung.....	41
2.6.5	Aufreinigung rekombinanter Proteine mittels Nickel-Affinitätschromatographie	41
2.6.6	Herstellung eines Extrakts löslicher Proteine aus <i>R. sphaeroides</i>	42
2.6.7	<i>Pull-Down</i> Assays	42
2.6.7.1	<i>In vitro Pull-Down</i> Assays.....	42
2.6.7.1	<i>In vivo Pull-Down</i> Assays.....	43
2.6.8	Größenausschlußchromatographie.....	43
2.6.9	Polysomenisolierung aus <i>R. sphaeroides</i>	43
3	Ergebnisse	45
3.1	<i>In silico</i> Identifizierung eines RNase J homologen Proteins in <i>Rhodobacter sphaeroides</i> 2.4.1	45
3.2	Expression und Aufreinigung der rekombinanten RNase J~His ₆	47
3.2.1	Überexpression und affinitätschromatographische Aufreinigung RNase J~His ₆	47
3.2.2	Größenausschlußchromatographie der RNase J~His ₆	48
3.2.3	Aufreinigung der mutierten Varianten RNase J-DH80KA~His ₆ und RNase J-S369L~His ₆	49
3.3	Untersuchungen zur ribonukleolytischen Aktivität der RNase J~His ₆	50
3.3.1	Ribonukleolytische Aktivität der RNase J~His ₆ Gelfiltrationsfraktionen	50
3.3.2	Ribonukleolytische Aktivität mutierter Varianten der RNase J~His ₆	51
3.3.3	Identifizierung der RNA-Degradationsprodukte durch RNase J~His ₆	52
3.3.4	5'-3' Orientierung der exoribonukleolytischen Aktivität der RNase J~His ₆	53
3.3.5	Einfluss des 5'-terminalen Phosphorylierungsstatus auf die exoribonukleolytische Aktivität der RNase J~His ₆	54
3.3.6	Einfluss monovalenter Ionen auf die ribonukleolytische Aktivität der RNase J~His ₆	55
3.3.7	Einfluss divalenter Kationen auf die ribonukleolytische Aktivität der RNase J~His ₆	56
3.3.8	Endoribonukleolytische Aktivität der RNase J~His ₆	56
3.4	Konstruktion und Verifizierung der RNase J Deletionsmutante Δ <i>rnj</i>	58
3.5	Wachstumsverhalten der RNase J Deletionsmutante Δ <i>rnj</i>	59
3.6	Effekt der RNase J Deletion auf die 5.8Slike RNA-Prozessierung	59
3.7	Komplementation der Deletionsmutante Δ <i>rnj</i>	60
3.7.1	Validierung der RNase J Deletion und deren Komplementation mittels <i>Western Blot</i> Analyse	60

3.7.2	Effekt der komplementierenden RNase J Varianten auf die 5.8Slike RNA-Prozessierung in <i>Δrnj</i>	61
3.8	Untersuchungen zur Prozessierung der ribosomalen RNA durch RNase J.....	62
3.8.1	<i>Primer Extension</i> Analyse der ribosomalen RNAs von <i>R. sphaeroides</i>	62
3.8.2	<i>Primer Extension</i> Analyse der polysomalen rRNA nach <i>in vitro</i> Prozessierung.....	63
3.8.3	<i>Northern Blot</i> Analyse der polysomalen 5.8Slike RNA nach <i>in vitro</i> Prozessierung.....	64
3.8.4	Bestimmung der 3'-Ende der 23S rRNA-Fragmente mittels <i>RNase Protection Assays</i>	65
3.9	RNASeq Transkriptomanalyse von <i>R. sphaeroides</i> und <i>Δrnj</i>	66
3.9.1	Beschreibung der RNASeq Datensätze von <i>R. sphaeroides</i> und <i>Δrnj</i>	66
3.9.2	Auswertung der RNASeq Datensätze.....	66
3.9.3	Untersuchungen zur Abstammung der 23Sint RNA-Akkumulation.....	69
3.10	Lokalisation und Interaktionspartner der RNase J.....	70
3.10.1	<i>Pull-Down</i> Experimente mit RNase J~His ₆	70
3.10.2	Lokalisation der RNase J.....	72
4	Diskussion.....	73
4.1	Das RNase J homologe Protein RSP_2534 in <i>R. sphaeroides</i>	73
4.2	<i>In vitro</i> Aktivität der RNase J~His ₆ von <i>R. sphaeroides</i>	75
4.3	<i>In vivo</i> Untersuchungen zur RNase J in <i>R. sphaeroides</i>	78
4.4	Prozessierung der 23S rRNA-Fragmente in <i>R. sphaeroides</i> durch RNase J.....	79
4.5	Weitere <i>targets</i> der RNase J in <i>R. sphaeroides</i>	83
4.6	Interaktionspartner und Lokalisation der RNase J von <i>R. sphaeroides</i>	84
5	Zusammenfassung.....	87
6	Referenzen.....	88
7	Abkürzungsverzeichnis.....	97
8	Anhang.....	98

1 Einleitung

Ribonukleinsäuren (RNA) sind multifunktionelle Makromoleküle, die im Zentrum aller biologischer Prozesse pro- und eukaryotischer Zellen stehen. Als mRNAs (*messenger*) und tRNAs (*transfer*) vermitteln diese Moleküle die Aufschlüsselung des genetischen Codes für ein Protein zwischen dem Erbinformationsspeicher DNA und den proteinsynthetisierenden Ribosomen. Die Ribosomen selbst sind dabei Ribonukleoprotein-Komplexe, welche zum überwiegenden Teil aus Ribonukleinsäuren bestehen. Die katalytische Aktivität dieser Ribozyme obliegt hier ausschließlich der RNA-Komponente. Zusätzlich existiert eine Vielzahl weiterer RNAs in einer Zelle, die entweder eigenständig oder mit Proteinen assembliert, spezifische Aufgaben im Zellmetabolismus übernimmt. Die vielfältigen Funktionen dieser RNA-Moleküle unterliegen dabei einem komplexen System regulatorischer Mechanismen. Neben einer transkriptiven Kontrolle der RNA-Synthese durch die RNA-Polymerase spielen dabei auch die Abbau-Prozesse von RNA-Molekülen durch die Ribonukleasen (RNasen) eine entscheidende Rolle. So ist in Bakterien, mit ihrer hohen Zellteilungsrate während des exponentiellen Wachstums, eine fortwährende Synthese und Degradation von mRNA notwendig, um den verschiedenen metabolischen Anforderungen während des Wachstums und der Zellteilung gerecht zu werden. Die Degradation der RNA hat hierbei keineswegs nur eine essentielle Recycling-Funktion durch die erneute Freisetzung von zuvor eingebauten Ribonukleotiden, vielmehr ist die mRNA-Degradation ein regulierter Vorgang, der es einem Organismus ermöglicht, seine Genexpression schnell und gezielt an veränderte Umweltbedingungen anzupassen. Eine weitere wesentliche Rolle kommt RNasen bei der sogenannten RNA-Prozessierung zu. Die meisten RNAs liegen nach ihrer Transkription durch die RNA-Polymerase zunächst als Primärtranskripte vor und besitzen RNA-Bereiche, welche nicht für die Erfüllung einer biologischen Funktion benötigt werden oder die Ausführung dieser Funktion sogar verhindern bzw. erschweren. RNasen sind für die Entfernung derartiger RNA-Regionen verantwortlich, was als RNA-Prozessierung oder auch RNA-Reifung bezeichnet wird.

1.1 Ribonukleasen

Ribonukleasen sind definitionsgemäß Enzyme, die eine hydrolytische Spaltung von Phosphodiester-Bindungen in Ribonukleinsäure-Molekülen katalysieren. Diese Enzyme können dabei in Endo- und Exoribonukleasen unterteilt werden. Endoribonukleasen katalysieren eine interne Spaltung von RNA-Molekülen, während Exoribonukleasen, vom 5'- oder 3'-Terminus beginnend, ein RNA-Molekül unter Freisetzung von einzelnen Nukleosid-Monophosphaten abbauen. Für den bestuntersuchten bakteriellen Modellorganismus *Escherichia coli* sind mehr als 20 verschiedene Enzyme mit einer ribonukleolytischen Funktion bekannt. Einige dieser RNasen sind dabei ubiquitär und finden sich in fast allen Bakterienspezies wieder, während das Vorkommen anderer RNasen weniger stark verbreitet ist und sich auf einzelne Bakterienklassen beschränkt (modifiziert nach Kaberdin et al., 2011). So werden von den rund 20 bekannten RNasen in *E. coli* lediglich acht ebenfalls im Genom von *Bacillus subtilis* kodiert. Dieses, hinsichtlich seines RNA-Metabolismus ebenfalls gut untersuchte, Gram-positive Bakterium besitzt hingegen mindestens 10 verschiedene ribonukleolytische Enzyme, für die keine Homologe in *E. coli* existieren (Condon, 2007). In Tabelle 1 sind die wichtigsten Ribonukleasen dieser beiden Modellorganismen zusammengefasst, einschließlich ihrer wesentlichen Funktionen im RNA-Metabolismus. Auf die einzelnen Enzyme wird im Verlauf dieser Einleitung an geeigneter Stelle näher eingegangen, jedoch verdeutlicht die Auflistung einige wichtige generelle Aspekte des degradativen

RNA-Metabolismus in Bakterien. 1. Einige Ribonukleasen sind essentiell notwendig für die Lebensfähigkeit einer Zelle. 2. Zwischen den phylogenetisch voneinander entfernt liegenden Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien haben sich unterschiedliche Proteine als essentielle RNasen etabliert. 3. RNasen sind in ihrer Funktion zumeist nicht auf die Degradation oder Prozessierung von RNA beschränkt, sondern können in beiden Vorgängen involviert sein, wenn auch in unterschiedlichem Umfang. 4. In Anbetracht der überschaubaren Anzahl an Ribonukleasen und der Vielzahl unterschiedlichster RNA-Transkripte innerhalb einer Zelle wird deutlich, dass eine kontrollierte RNA-Degradation und Prozessierung eine Reihe weiterer regulatorischer Faktoren erfordert. Die Zugänglichkeit einer RNA für eine bestimmte RNase hat dabei einen entscheidenden Einfluss auf das spezifische Schicksal dieser RNA. Diese Zugänglichkeit ist unter anderem abhängig von den intrinsischen Sekundärstrukturen einer RNA, die sich sowohl am 5'- und 3'-Ende befinden, aber auch in internen Bereichen liegen können. Desweiteren können translatierende Ribosomen, RNA-bindende Proteine oder auch kleine regulatorische RNAs einen Einfluss auf die RNA-Degradation ausüben.

Tabelle 1: Wichtige bakterielle Ribonukleasen in *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis*. Unterstrichen sind die Gene, welche eine in dem jeweiligen Organismus essentielle RNase kodieren.

	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	Funktion
Endoribonukleasen			
RNase E	<u><i>rne</i></u>	--	mRNA-Degradation, RNA-Prozessierung
RNase III	<i>rnc</i>	<u><i>rncS</i></u>	mRNA-Degradation, RNA-Prozessierung
RNase P	<u><i>rnpAB</i></u>	<u><i>rnpAB</i></u>	mRNA-Degradation, RNA-Prozessierung
RNase J1/J2	--	<u><i>rnjA/rnjB</i></u>	mRNA-Degradation, RNA-Prozessierung
RNase Y	--	<u><i>ymdA</i></u>	mRNA-Degradation
RNase Z	<i>elaC</i>	<u><i>rnz</i></u>	RNA-Prozessierung
3' -> 5' Exoribonukleasen			
RNase II	<i>rnb</i>	--	mRNA-Degradation
RNase R	<i>rnr</i>	<i>rnr</i>	mRNA-Degradation
PNPase	<i>pnp</i>	<i>pnpA</i>	mRNA-Degradation
OligoRNase	<u><i>orn</i></u>	--	mRNA-Degradation
5' -> 3' Exoribonukleasen			
RNase J1/J2	--	<u><i>rnjA/rnjB</i></u>	mRNA-Degradation , RNA-Prozessierung

1.2 mRNA-Degradation als Regulator der Genexpression

Die mRNA steht als Vermittler zwischen dem relativ statischen Erbinformationsspeicher DNA und den proteinsynthetisierenden Ribosomen im Zentrum aller genregulatorischen Mechanismen einer Zelle. Neben der transkriptiven und translativen Regulation leistet dabei auch die RNA-Degradation einen entscheidenden Beitrag zur permanenten Anpassung eines Organismus an die ihn umgebende Umwelt. Der Abbau von mRNA beeinflusst dabei direkt die Syntheserate der entsprechenden Proteine, da die Translation durch Ribosomen in direkter Abhängigkeit zur Verfügbarkeit von mRNA steht. Aufgrund der fehlenden Kompartimentierung einer Bakterienzelle und der engen Kopplung von Transkription und Translation, durch die sogenannten Polysomen, ist eine sehr schnelle Neusynthese von Proteinen möglich. Die durchschnittliche Halbwertszeit von mRNA in Bakterien liegt im Bereich von drei bis acht Minuten (Bernstein et al., 2002), dementsprechend unterliegt auch die Proteinausstattung in bakteriellen Zellen einer relativ kurzen Translationsphase. Die kurze Lebensdauer von mRNA bietet dadurch Bakterien eine äußerst flexible Möglichkeit, sich schnell an verändernde Umwelteinflüsse anzupassen (Rauhut & Klug, 1999).

Dass die Degradation einer spezifischen mRNA in der Zelle kein konstitutiv stattfindender Prozess ist und lediglich statistisch nach einer gewissen Zeit jede mRNA betrifft, wird darin deutlich, dass trotz der durchschnittlichen Lebensdauer einer bakteriellen mRNA von wenigen Minuten, die Halbwertszeiten unterschiedlicher individueller Transkripte zwischen wenigen Sekunden und fast einer Stunde liegen können. Außerdem kann die Halbwertszeit eines spezifischen mRNA-Transkriptes unter verschiedenen Umweltbedingungen variieren. So beträgt die Halbwertszeit der polycistronischen 2.7 kb mRNA des *puf*-Operons von *Rhodobacter capsulatus* unter semiaeroben Bedingungen etwa acht Minuten, hingegen unter aeroben Bedingungen lediglich drei Minuten. Das *puf*-Operon kodiert Proteine des Photosyntheseapparates und die verkürzte Halbwertszeit dieser mRNA unter erhöhtem Sauerstoffpartialdruck verhindert eine überflüssigen Synthese dieser Proteine, da *R. capsulatus* unter aeroben Bedingungen zur Atmung übergeht und nicht auf eine Energiegewinnung über den Photosynthese-Apparat angewiesen ist (Klug, 1991). Ein anderes Beispiel ist die *cspA* mRNA in *E. coli*, diese mRNA kodiert ein *cold-shock regulator protein* und besitzt während des Wachstums bei 37°C eine Halbwertszeit von etwa 10 sec, hingegen ergibt sich eine Halbwertszeit von etwa 10 min für die *cspA* mRNA bei einer Wachstumstemperatur von 15°C (Goldenberg et al., 1996). Eine temperatur- und mediumabhängige Stabilität wurde auch für die, das ribosomale Protein S15 kodierende, *rpsO* mRNA in *E. coli* beobachtet (Le Derout et al., 2002).

Die Genregulation auf der post-transkriptionalen Ebene durch eine spezifische RNA-Degradation kann jedoch auch individuelle Bereiche einer polycistronischen mRNA betreffen. Polycistronische mRNAs sind ein Charakteristikum von Bakterien. Hierbei werden zumeist alle benötigten Gene für einen spezifischen Stoffwechselweg zusammenhängend in einem langen RNA-Transkript abgeschrieben. Eine individuelle Induktion der einzelnen Gene ist dadurch überflüssig und es wird einem bakteriellen Organismus eine schnelle adaptive Antwort auf veränderte Umweltbedingungen ermöglicht. Das bereits erwähnte *puf*-Operon von *R. capsulatus* kann etwas vereinfacht in die in der 5'-Hälfte gelegenen proteinkodierenden Bereiche *pufB* und *A*, sowie in die sich in der 3'-Hälfte befindlichen *pufL*, *M* und *X* Gene unterteilt werden. *pufB* und *A* kodieren pigmentbindende Proteine für den Lichtsammelkomplex I, *pufL* und *M* kodieren hingegen Proteine für das photosynthetische Reaktionszentrum. Das benötigte stöchiometrische Verhältnis dieser Proteine (PufB & PufA : PufL & PufM) für eine funktionelle Photosynthese in der Zelle beträgt dabei 15:1. Das von *pufX* kodierte Protein wird als intrinsischer Faktor des Photosynthese-Komplexes bezeichnet. Unter anaeroben Bedingungen beträgt die Halbwertszeit des *pufBALMX* Transkriptes etwa acht Minuten. Ein in der *pufL* Region liegendes destabilisierendes RNA-Element vermittelt hierbei eine Spaltung durch RNase E, was zur selektiven Degradation der 3'-Region in diesem Operon und zum Verbleib der PufB und PufA kodierenden mRNA Hälfte führt, welche eine durchschnittliche Halbwertszeit von 33 min aufweist (Fritsch et al., 1995). Die längere Verfügbarkeit der verbleibenden *puf* mRNA für translatierende Ribosomen kann hierdurch, zumindest teilweise, für das stöchiometrische Verhältnis der kodierten Proteine in der Zelle verantwortlich gemacht werden (Klug et al., 1987). Die erhöhte Stabilität des 5'-Bereiches der mRNA gegenüber einer Degradation wird dabei einzelnen intercistronischen Haarnadel-Schleifen-Strukturen (*hairpin loops*) zugeschrieben, welche am 5'- und am 3'- Ende des langlebigen RNA-Transkriptes liegen (Klug & Cohen, 1990, Heck et al., 1996).

Eine ähnliche Feinregulierung der Expression von Proteinen auf Basis selektiver Degradation polycistronischer mRNA-Regionen wurde für eine Vielzahl weiterer Operons beschrieben. Insbesondere in *B. subtilis* sind eine Vielzahl von Genen für spezifische Stoffwechselwege in polycistronischen Operons organisiert. Die im folgenden genannten Beispiele stammen alle aus diesem Gram-positiven Bakterium. Das *bkd* Operon in *B. subtilis* dient der Anpassung der Zellmembran-Fluidität bei niedriger Wachstumstemperatur durch Modifikationen an den

eingelagerten Membranlipiden. Auch für dieses heptacistronische Operon ergeben sich unterschiedliche Stabilitäten einzelner RNA-Bereiche. Inwieweit dies mit dem stöchiometrischen Verhältnis der entsprechenden Proteine in der Zelle korreliert, ist jedoch nicht geklärt (Nickel et al., 2004). Das *gapA* Operon von *B. subtilis* kodiert eine Reihe von Proteinen, die für die Glykolyse und Glukoneogenese notwendig sind, unter anderem die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase. Das Promotor-proximale Gen *CggR* in diesem Operon kodiert hierbei den eigenen Transkriptions-Repressor dieser polycistronischen mRNA. Unter induzierenden Wachstumsbedingungen ist die Halbwertszeit dieses Repressor-kodierenden Segmentes um ein Vielfaches geringer als das verbleibende, die glykolytischen Enzyme kodierende 3'-Segment (Meinken et al., 2003). Weitere Beispiele für selektiv degradierte polycistronische mRNAs sind das Hitze-Schock Operon *dnaK* und das *ilv-leu* Operon, welches Proteine für die Synthese der *branched-chain amino acids* (Leu, Iso, Val) kodiert (Homuth et al., 1999, Mäder et al., 2004).

Hinsichtlich der mRNA-Degradation kann man eine funktionelle von einer „chemischen“ Degradation unterscheiden, wobei beide Vorgänge zeitlich eng miteinander verknüpft sind. Die funktionelle oder auch initiale Spaltung einer mRNA wird in Gram-negativen Bakterien weitestgehend der RNase E zugeschrieben und ist der entscheidende Schritt auf der genregulativen Ebene der RNA-Degradation, da diese mRNA-Spaltung zumindest mit einem partiellen Verlust der Translatierbarkeit einer mRNA oder eines RNA-Abschnittes einhergeht. In einer Art Kaskade folgen daraufhin weitere, *downstream* gelegene interne Spaltungen durch RNase E, worauf die entstehenden Fragmente von verschiedenen 3'-Exoribonukleasen vollständig zu Mononukleotiden abgebaut werden, was als eine „chemische“ mRNA-Degradation betrachtet werden kann (Abbildung 1-1). Das ursprüngliche 3'-Ende einer intakten mRNA ist hierbei zumindest vorübergehend vor einer Degradation geschützt, da den 3'-Exoribonukleasen durch *hairpin*-Strukturen keine Bindung an dieses Ende ermöglicht wird (1.2.2).

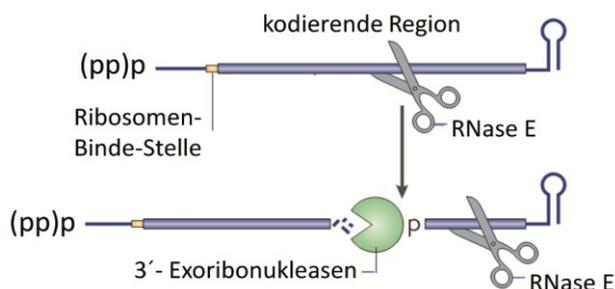


Abbildung 1-1: Prinzipieller Ablauf der mRNA Degradation in Gram-negativen Bakterien.

Der initialen Spaltung einer mRNA durch RNase E folgen weitere degradierende Prozesse durch 3'-Exoribonukleasen oder erneute endonukleolytische Spaltungen der RNase E. Der ursprüngliche 3'-Terminus einer mRNA ist hierbei häufig zunächst durch eine *hairpin*-Struktur vor einem exoribonukleolytischen Abbau geschützt (modifiziert nach Belasco, 2010).

1.2.1 RNase E und die Initiierung der mRNA-Degradation

Die RNase E ist ein mehr als 1.000 Aminosäuren langes Protein und kann in eine N-terminale katalytische Domäne und einen relativ unstrukturierten C-terminalen Bereich unterteilt werden. Der C-terminale Bereich dieses Enzyms dient vorrangig der Interaktion mit anderen Proteinen und ist entscheidend an der Assemblierung von RNA-degradierenden Multi-Protein-Komplexen beteiligt (1.2.3). Als Endoribonuklease spaltet RNase E ein RNA-Molekül in internen Bereichen, es zeigt hierbei jedoch keine echte Sequenzspezifität, wie es beispielsweise für DNA-Restriktionsendonukleasen bekannt ist. Vielmehr wird von einer Präferenz der RNase E für Schnittstellen in einzelsträngigen AU-reichen Regionen in unmittelbarer Nachbarschaft zu *hairpin*-Strukturen gesprochen (Kaberdin, 2003). Derartige Motive gelten als destabilisierende Elemente in einer RNA und sind das Ziel der initialen

Degradation durch RNase E. Die Zugänglichkeit für die RNase E zu einem solchen Motiv in einer spezifischen mRNA ist dabei von der individuellen Translationsrate einer mRNA beeinflusst.

Prinzipiell ist eine großflächige Abdeckung einer RNA durch protektive Ribosomen (~30 nt/Ribosom) möglich, da ein Transkript gleichzeitig von mehreren aufeinander folgenden Ribosomen translatiert werden kann. Diese Translationseinheiten werden als Polysomen oder Ergosomen bezeichnet (Staehelin et al., 1963). mRNAs mit einer hohen Translationsrate, beispielsweise aufgrund einer sehr affinen Ribosomenbindestelle (*shine-dalgarno sequence*), werden hierbei durch die Ribosomen vor einer ribonukleolytischen Spaltung geschützt, da der RNase E kein Zugang zu ihrem Substrat ermöglicht wird (Abbildung 1-2). Von einer aktiv regulierten mRNA-Degradation kann in diesen Fällen nur bedingt gesprochen werden, da es letztlich translatorische Regulationsmechanismen (kleine RNAs, *riboswitches*, RNA-Bindeproteine) sind, die über die eventuell stattfindende Degradation einer mRNA entscheiden (Deana et al., 2005, Kaberdin & Bläsi, 2006).

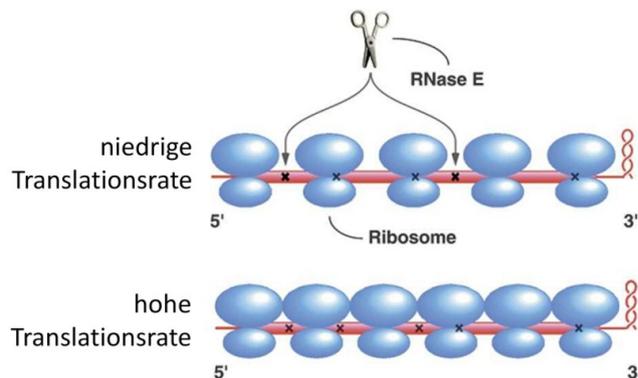


Abbildung 1-2: Einfluss der Translationsrate einer mRNA auf die initiale Spaltung durch RNase E.

Verschiedene translatorische Regulationsmechanismen können die Anzahl protektiver Ribosomen auf einer polyribosomalen mRNA (Polysom) beeinflussen. Diese Ribosomen verhindern dabei den Zugang der RNase E zu potentiellen Schnittstellen (x) und können somit eine Degradation hinauszögern (modifiziert nach Deana & Belasco, 2005).

Neben dem oben erwähnten protektiven Einfluss der Ribosomen gibt es jedoch auch andere Faktoren, die die Degradationsrate einer mRNA durch die RNase E beeinflussen. Trotz der Tatsache dass RNase E eine Endoribonuklease ist, zeigt dieses Enzym eine nicht unerhebliche Abhängigkeit der ribonukleolytischen Aktivität gegenüber dem, zum Teil weit entfernt von der eigentlichen Schnittstelle liegenden, 5'-Terminus einer RNA. Das wurde unter anderem bei Studien zur Degradation der *rpsT* mRNA in *E. coli* deutlich. Die *rpsT* mRNA kodiert das ribosomale Protein S20 und ist eines der bestuntersuchten natürlichen Substrate der RNase E. Eine zirkularisierte Form *rpsT* mRNA und das *rpsT* Transkript mit einem triphosphorylierten 5'-Ende werden *in vitro* deutlich ineffizienter durch die RNase E gespalten als das identische RNA-Substrat mit einem monophosphorylierten 5'-Ende, vorausgesetzt dem terminalen 5'-Ende folgt ein etwa 2-4 nt langer einzelsträngiger Bereich (Mackie, 1998, Mackie, 2000). Die Kristallstruktur der katalytischen Hälfte der RNase E führte zu einer Erklärung dieser Präferenz für ein 5'-monophosphoryliertes RNA-Substrat. Die RNase E besitzt offenbar eine separierte 5'-Sensor-Domäne, welche zusätzlich zu dem katalytischen Zentrum die Bindung mit einem RNA-Substrat eingehen kann (Callaghan et al., 2005). Die enzymatische Basis für die beobachtete Präferenz der RNase E für RNA-Substrate mit einem monophosphorylierten 5'-Ende ist bisher jedoch nicht eindeutig geklärt. Je nach Studie wurde dabei von einem positiven allosterischen Effekt auf die katalytische Aktivität der RNase E durch die gleichzeitige Bindung des monophosphorylierten 5'-Endes gesprochen (Jiang & Belasco, 2004) oder es wurde eine generell erhöhte Substrat-Affinität durch die parallele Bindung eines entsprechenden 5'-Endes beobachtet (Jourdan & McDowall, 2008). Neben starken strukturellen Veränderungen in der katalytischen N-terminalen Domäne der RNase E während der sukzessiven Bindung zweier Bereiche einer RNA, erfordert diese Art der Spaltung auch eine hohe Flexibilität des RNA-Substrates, da dieses Substrat eine quasi-zirkuläre Form annehmen muss (*looping*-Modell; Abbildung 1-3). Diese

Flexibilität ist nicht für jedes mRNA-Substrat in gleichem Umfang gewährleistet, da verschiedene Sekundärstrukturen zwischen dem 5'-Ende und der Schnittstelle liegen können. Aus diesem Grund wird vermutet, dass die variierende Flexibilität unterschiedlicher mRNAs zu einer selektiven Degradation durch RNase E beiträgt (Callaghan et al., 2005).

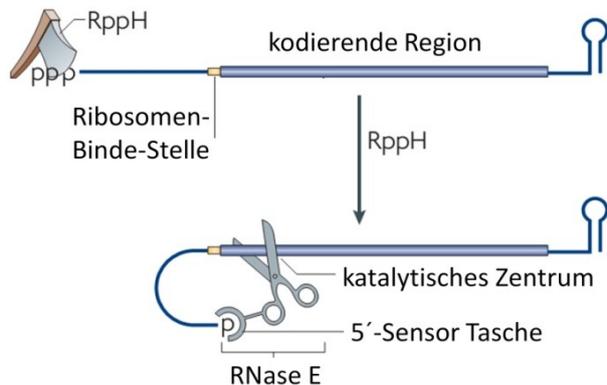


Abbildung 1-3: Schematische Darstellung der 5'-Ende abhängigen mRNA-Degradation durch RNase E (looping model).

Die Entfernung des Pyrophosphates am 5'-Ende eines mRNA Primärtranskriptes durch RppH ermöglicht oder verstärkt die interne Spaltung durch die RNase E. Die RNase E bindet dabei sowohl am monophosphorylierten 5'-Ende als auch in der entsprechenden Schnittstellenregion einer mRNA (modifiziert nach Belasco, 2010).

Da alle Primärtranskripte in Bakterien ein triphosphoryliertes 5'-Ende besitzen, muss im Zusammenhang mit dem protektiven Charakter eines triphosphorylierten 5'-Endes, gegenüber einer Spaltung durch RNase E, die RNA-Pyrophospho-Hydrolase (RppH) erwähnt werden. Dieses Enzym gehört zur Proteinfamilie der Nudix-Phosphohydrolasen und entfernt das γ - und β -Phosphat am 5'-Ende einer RNA und schafft somit ein bevorzugtes RNase E Substrat. In *E. coli* konnte hierbei gezeigt werden, dass die Pyrophosphat-Entfernung durch RppH einen deutlich positiven Einfluss auf der Abbaurate der RNAI und der *rpsT* mRNA durch RNase E besitzt. Inwieweit diese Art *trigger*-Mechanismus jedoch eine grundsätzliche Relevanz für die mRNA-Degradation in Bakterien besitzt, ist noch nicht geklärt. RppH ist nicht essentiell und eine nicht funktionelle RppH Mutante in *E. coli* ergab nur bei etwa 10 % der mRNA Gesamttranskripte eine veränderte Stabilität. Andererseits könnten noch weitere bisher nicht näher beschriebene Mitglieder der Nudix-Hydrolasen Proteinfamilie in *E. coli* an der 5'-Ende-abhängigen RNA-Degradation beteiligt sein (Deana et al., 2008, Celesnik et al., 2007).

Da eine Reihe von Studien zur RNase E zeigten, dass dieses Enzym offensichtlich auch ohne Zugang zum 5'-Terminus einer mRNA diese effizient spalten kann, wird noch von einem weiteren parallel existierendem Regulations-Mechanismus für die initiale mRNA-Degradation durch RNase E in Bakterien ausgegangen. Hierfür sind offensichtlich zusätzliche intrinsische RNA-Motive neben den erwähnten AU-reichen Regionen der Schnittstelle notwendig (Kime et al., 2010, Baker & Mackie, 2003). Interessanterweise scheint bei diesem *direct entry* Modus der RNase E eine Interaktion des RNA-Substrates mit der katalytisch nicht aktiven C-terminalen Domäne der RNase E eine Rolle zu spielen (Bouvier & Carpousis, 2011). Prinzipiell erweitern alternative Modi einer Spaltung durch RNase E das Spektrum der potentiellen mRNA *targets* in einer Zelle. Das ist notwendig, da das nicht translatierte 5'-Ende einer mRNA auch die strukturelle Basis für viele translatorische Regulationsmechanismen bietet und damit häufig stark strukturierte 5'-RNA-Bereiche verbunden sind. Eine strikte Abhängigkeit der RNase E von einem einzelsträngigen 5'-Ende könnte in diesen Fällen zu einer unverhältnismäßig langen Halbwertszeit derartig regulierter RNAs führen.

1.2.2 3'-Exoribonukleasen und der Abbau von mRNA-Fragmenten

Prinzipiell ist das 3'-Ende einer intakten bakteriellen mRNA zunächst durch eine stabile, unmittelbar am 3'-Terminus liegende Sekundärstruktur, zumeist die *hairpin*-Struktur des Rho-unabhängigen Transkriptionsterminators, vor einem 3'-exoribonukleolytischen Abbau geschützt, da die Exoribonukleasen ohne einen einzelsträngigen Bereich keine Bindung mit dem 3'-Ende der RNA eingehen können. Die Spaltung einer mRNA durch RNase E führt jedoch zur Bildung eines Fragmentes mit einem ungeschützten 3'-Ende, welches sehr schnell von den 3'- Exoribonukleasen RNase II, RNase R und der PNPase in *E. coli* abgebaut werden kann (Abbildung 1-4). Alle drei Enzyme werden auch als prozessive 3'-Exoribonukleasen bezeichnet, da sie nach erfolgreicher Bindung am 3'-Terminus eines RNA-Substrates dieses nicht mehr freigeben und eine schnelle und fortlaufende RNA-Degradation erst abbrechen, wenn sie auf ein Hindernis in Form einer stabilen RNA-Struktur stoßen oder das verbleibende RNA-Fragment nur noch 2-5 Nukleotide besitzt (Zuo & Deutscher, 2001).

Eine möglichst zeitnahe und vollständige Degradation von mRNA-Fragmenten mit einer intakten Ribosomenbindestelle ist notwendig, um eine Anreicherung der verkürzten *non-sense* mRNA Transkripte und der damit verbundenen Translation aberranter Proteine zu verhindern. Derartige Proteine wären zum einen eine Verschwendung zellulärer Metabolite wie tRNAs, Aminosäuren, ATPs und GTPs, zum anderen könnte die Aggregation falsch gefalteter, da unvollständig translatierter Proteine, einen möglicherweise toxischen Effekt in der Zelle hervorrufen.

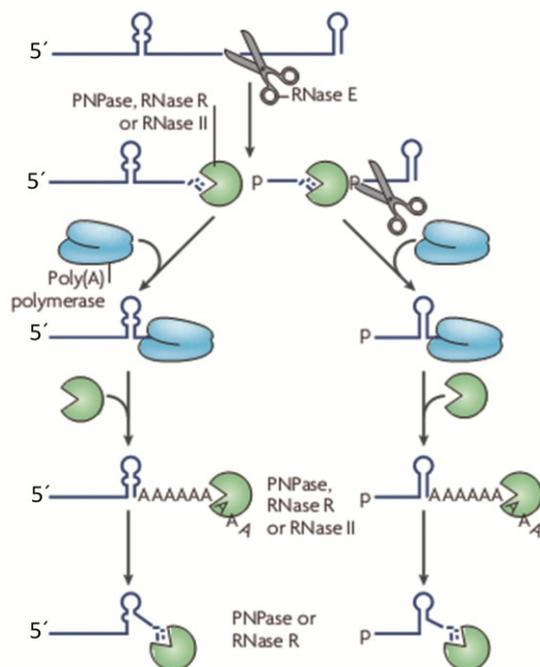


Abbildung 1-4: 3'-Exoribonukleolytischer mRNA Abbau. Die Spaltungen durch RNase E führen zur Freisetzung einzelsträngiger 3'-Enden, die von prozessiven 3'-Exoribonukleasen abgebaut werden können. Beim Erreichen stabiler RNA-Sekundärstrukturen kommt es häufig zum Verlust der Substratbindung und damit zum Abbruch der Degradation. Die Poly(A)-Polymerase polymerisiert daraufhin an das blockierte 3'-Ende einzelsträngige poly-Adenin-Anhänge, die eine erneute Bindung der Exoribonukleasen und damit einen fortschreitenden Abbau der mRNA ermöglichen (modifiziert nach Belasco, 2010).

Die Enzymausstattung in *E. coli* mit den drei prozessiven 3'- Exoribonukleasen RNase II, RNase R und der PNPase scheint in gewisser Weise redundant zu sein, da *E. coli* Mutanten, denen eines dieser drei Enzyme fehlt, kein verändertes Wachstum gegenüber dem Wildtyp aufweisen. Demnach können die verbleibenden beiden Ribonukleasen die fehlende Funktion kompensieren (Deutscher, 2006). Das ist insofern überraschend, da sich die *in vitro* Aktivitäten dieser 3'- Exoribonukleasen doch recht deutlich unterscheiden. So kann die RNase II nur einzelsträngige RNA-Bereiche abbauen und deren fortschreitende Degradation wird durch *upstream* gelegene helikale RNA-Strukturen strikt blockiert. Die RNase R hingegen besitzt eine intrinsische RNA-Helikase Funktion und kann auch doppelsträngige Bereiche einer RNA zumindest teilweise auftrennen und abbauen, vorausgesetzt das 3'-Ende bietet

einen etwa 10 nt langen einzelsträngigen Bereich zur Substratbindung (Cheng & Deutscher, 2005). Auch die PNPase ist in der Lage, strukturierte RNA-Bereiche abzubauen, vermutlich jedoch nur assembliert mit weiteren Degradation-unterstützenden Proteinen (1.2.3). Eine verzögerte 3'-exoribonukleolytische Degradation aufgrund besonders stabiler RNA-Sekundärstrukturen ist im Falle von polycistronischen mRNAs eine entscheidende Voraussetzung für deren selektiven Abbau und die damit verbundene regulierte Gen-Expression. Der Abbau derartiger Strukturen erfolgt letztlich mit Hilfe der Poly(A)-Polymerase (PAP1). Dieses Enzym synthetisiert unmittelbar *downstream* von stabilen *hairpin* Strukturen Poly(A)-Schwänze. Diese einzelsträngigen RNA-Bereiche ermöglichen die Bindung der RNase R oder der PNPase an das 3'-Ende des RNA-Fragmentes und dessen anschließende Degradation (Mohanty & Kushner, 2006, Khemici & Carpousis, 2004). In einem Wechselspiel von Polyadenylierung und exonukleolytischer Degradation können hierdurch auch größere Sekundärstrukturen abgebaut werden (Abbildung 1-4). Bisher ist nicht geklärt, welche Faktoren verhindern, dass die Poly(A)-Polymerase auch intakte mRNAs polyadenyliert und diese somit theoretisch vorzeitig für 3'-Exoribonukleasen zugänglich macht. Eine Erklärung ist, dass die PAP1 Aktivität, ähnlich der RNase E, einen Sensor für das monophosphorylierte 5'-Ende eines RNA-Fragmentes besitzt und erst nach der initialen Spaltung durch RNase E das entstandene *downstream* gelegene Fragment polyadenyliert (Condon, 2007). In diesem Zusammenhang muss auch eine alternative Rolle der RNase II in der mRNA-Degradation in Betracht gezogen werden. In einer *E. coli* RNase II Deletionsmutante zeigten mehr als 30 % der Gesamttranskripte eine deutlich reduzierte Stabilität. Das lässt vermuten, dass diese Exoribonuklease einen protektiven Einfluss auf das 3'-Ende verschiedener mRNAs hat, indem es polyadenylierte Einzelstrangregionen abbaut und damit die Zugänglichkeit für die anderen Exoribonukleasen RNase R und PNPase erschwert (Mohanty & Kushner, 2003).

Die 3'-Exoribonukleasen RNase R, RNase II und PNPase sind relativ ineffektiv gegenüber der Degradation besonders kurzer RNA-Oligonukleotide mit einer Länge von 2-5 Nukleotiden. Die finale Degradation dieser Fragmente zu Einzelnukleotiden obliegt der Oligoribonuklease. Diese Exoribonuklease ist in *E. coli* essentiell und in einer konditionellen OligoRNase Mutante von *E. coli* akkumulieren entsprechende 2-5 nt lange RNA-Fragmente. Inwieweit diese Akkumulationen jedoch für den lethalen Effekt einer OligoRNase-Deletion in *E. coli* verantwortlich sind, ist nicht geklärt (Ghosh & Deutscher, 1999). Generell leistet eine vollständige ribonukleolytische Zersetzung von RNA-Transkripten in einzelne Nukleotide einen wesentlichen Beitrag zur Erhaltung des intrazellulären Nukleotid-Levels. Die entstandenen Einzel-Nukleotide können anschließend relativ schnell und ressourcenschonend durch verschiedene Nukleotid-Recycling Stoffwechselwege zu Nucleosidtriphosphaten aufbereitet werden, was eine energieaufwendigere *de-novo* Synthese überflüssig macht.

1.2.3 RNA-degradierende Multiprotein-Komplexe

Wie bereits beschrieben, ist die Degradation einer mRNA ein sukzessiver Prozess, der die Teilnahme von endo- und exoribonukleolytischen Enzymen erfordert. Die zeitnahe Abfolge der einzelnen, degradierenden Prozesse ist dabei wesentliche Voraussetzung, um die Translation einer mRNA bzw. die Akkumulation verkürzter mRNA-Fragmente zu verhindern. Dahingehend ist es nicht überraschend, dass bei Ko-Immunopräzipitationen mit der RNase E RNA-degradierende Multiprotein-Komplexe identifiziert wurden, welche unter anderem endo- als auch exoribonukleolytische Proteine in sich vereinen. Derartige Komplexe werden als Degradosomen bezeichnet, wobei als primäre Komponenten des Degradosoms von *E. coli* die RNase E, die

Polynukleotid-Phosphorylase (PNPase), die DEAD-Box RNA-Helikase RhlB und das glykolytische Enzym Enolase gelten (Carpousis, 2007). Als Grundgerüst der Protein-Protein-Interaktion für derartige Komplexe dient der C-terminale Bereich der RNase E, der keine katalytische Funktion besitzt. Dieser Bereich scheint keine spezifische Proteinfaltung zu besitzen, enthält jedoch eine Reihe von konservierten, 15 - 40 Aminosäure-langen Mikro-Domänen, die als Bindestellen für die oben erwähnten Proteine dienen können (Marcaida et al., 2006). Es wird angenommen, dass die räumliche Nähe der Endoribonuklease RNase E und der Exoribonuklease PNPase in einem Komplex dazu beiträgt, schnell und effizient die verbleibenden mRNA-Fragmente nach einer initialen Spaltung durch RNase E zu degradieren. Die DEAD-Box RNA-Helikase ermöglicht hierbei die Degradation komplexerer RNA-Strukturen durch die Auftrennung helikaler Strukturen unter Verbrauch von ATP (Liou et al., 2002). Die Funktion der Enolase in diesem Komplex ist dabei weitestgehend unklar. Auch die generelle biologische Bedeutung des Degradosoms für die mRNA-Degradation ist relativ undurchsichtig. So ist der Besitz der für die Assemblierung notwendigen C-terminalen Hälfte der RNase E nicht essentiell und dessen Fehlen hat nur einen sehr geringen Einfluss auf die globale RNA-Stabilität (Ow et al., 2000). DNA-Mikroarray-Analysen mit verschiedenen *E. coli* Mutanten ergaben hingegen, dass allein die Deletion der PNPase-Binderegion in der C-terminalen Domäne der RNase E den gleichen Effekt auf Transkripte der Glykolyse und des Cystein-Biosynthese Stoffwechsels hat, wie eine direkte Deletion der PNPase (Bernstein et al., 2004).

Innerhalb der Enterobakterien-Gruppe ist das Vorkommen von Degradosom-Komplexen weitverbreitet und deren Zusammensetzung scheint weitestgehend konserviert zu sein (Kaberdin et al., 2011). Die Komposition der Proteine in Degradosom ähnlichen Komplexen anderer Bakterien-Gruppen weist jedoch eine hohe Variabilität auf. So besteht ein mRNA-degradierender Komplex in *R. capsulatus* vorrangig aus RNase E und zwei RNA-Helikasen, wobei zusätzlich der Transkriptionsterminator *Rho* assoziiert ist. Die PNPase als erwartete Exoribonuklease geht in diesem Fall nur eine sehr schwache Interaktion mit dem Komplex ein (Jäger et al., 2001). Ein Degradosom ähnlicher Komplex des psychrotrophen γ -Proteobakteriums *Pseudomonas syringae* enthält ebenfalls die RNase E und eine DEAD-Box RNA-Helikase, jedoch wurde als zugehörige Exoribonuklease nicht die PNPase, sondern die RNase R identifiziert. Die RNase R gilt generell als effizienter in der Degradation von RNA-Sekundärstrukturen im Vergleich zur PNPase. Aufgrund der erhöhten Stabilität von strukturierter RNA unter niedrigen Temperaturen, könnte sich ein Austausch dieser beiden Exonukleasen zugunsten der RNase R für das psychrotrophe Bakterium *P. syringae* als vorteilhaft erweisen (Purusharth et al., 2005, Cheng et al., 2005). Neben der vielfältigen Zusammensetzung Degradosom ähnlicher Komplexe in unterschiedlichen Organismen können die Degradosom-assoziierten Komponenten auch innerhalb eines Organismus, als Folge veränderter Umweltbedingungen, variieren. Die Zusammensetzung des oben erwähnten Degradosoms von *R. capsulatus* zeigt beispielsweise eine Abhängigkeit zum Sauerstoffpartial-Druck in einer wachsenden Kultur, nicht jedoch zur Wachstumstemperatur. Hohe Sauerstoffkonzentrationen führen dabei zu einer deutlich verstärkten Assoziation des *Rho* Transkription-Terminations Faktors mit dem Komplex und auch der Anteil der beiden RNA-Helikasen als Degradosom-Komponenten variiert zwischen isolierten Komplexen aus aerob bzw. semiaerob gewachsenen Kulturen. *In vitro* Untersuchungen zur ribonukleolytischen Aktivität dieser Komplex-Varianten weisen darüber hinaus auf eine unterschiedliche Effizienz in der Degradation eines *in vivo* sauerstoffabhängigen RNA-Transkriptes hin (Jäger et al., 2004). In *E. coli* führt eine Temperaturerniedrigung zur Assemblierung der RNA-Helikase CsdA mit dem Degradosom, die CsdA Helikase ersetzt dabei die konventionelle RNA-Helikase RhlB in einem, an niedrige Temperaturen angepasstem RNA-Metabolismus (Prud'homme-Genereux et al., 2004).

Ein stabiler RNA-degradierender Komplex ohne Beteiligung der RNase E konnte ebenfalls in *E. coli* beobachtet werden. Hierbei bildet die Polynukleotid-Phosphorylase mit der DEAD-Box RNA-Helikase RhlB einen eigenständigen Komplex, der es ebenfalls ermöglicht, RNA-Strukturen aufzutrennen und abzubauen (Lin & Lin-Chao, 2005, Liou et al., 2002).

Die C-terminale Hälfte der RNase E besitzt zusätzlich zu den Mikro-Domänen für die Degradosom-Assemblierung eine als Segment A bezeichnete Region, welche eine amphipathische α -Helix ausbildet. Diese Helix ermöglicht der RNase E eine Bindung in der Phospholipid-Membran (Khemici et al., 2008). Die biologische Konsequenz einer membrangebundenen RNase E, einschließlich der dazugehörigen Degradosom-Komponenten, ist noch nicht geklärt (Taghbalout & Rothfield, 2007, Taghbalout & Rothfield, 2008). So ist nicht bekannt, ob die RNA-Degradation/Prozessierung zumindest teilweise ebenfalls an der inneren cytoplasmatischen Membran stattfindet oder ob es sich bei den membran-gebundenen Degradosomen um eine Art inaktiver Reserve für die im Cytoplasma vorhandenen RNA-degradierenden Proteine handelt.

1.2.4 Regulatorischer Einfluss kleiner RNAs auf die RNA-Degradation

Kleine regulatorische RNAs (sRNAs; 50 - 200 nt) in Bakterien leisten einen entscheidenden Beitrag zur adäquaten Stressantwort auf diverse Umwelt-Reize (Eisen- oder Nährstoffmangel, oxidativer Stress, *Quorum sensing*), wobei die Mechanismen der Regulation äußerst vielfältig sind. Ein nicht unwesentlicher Teil der Stressantwort-Mechanismen scheint dabei auf veränderte mRNA-Stabilitäten durch Basenpaarung einer kleinen RNA mit einer oder mehrerer *target* mRNAs zu beruhen. Die Hybridisierung einer kleinen RNA in der nicht translatierten 5'-Region einer mRNA (5'-UTR) verhindert dabei häufig die Ausbildung des ribosomalen 30S Initiation Komplexes und führt zu einer translationalen Repression. Die erleichterte Degradation der nicht translatierten mRNA, aufgrund des Fehlens protektiver Ribosomen, durch RNase E und folgende Exoribonukleasen wird hierbei zumeist als sekundärer Effekt einer translationalen Kontrolle betrachtet, welcher die Kontrolle aufgrund der irreversiblen Degradation einer mRNA verstärkt.

In einigen Fällen kann die RNA-Degradation jedoch auch als primärer Effekt der Bindung einer kleinen RNA betrachtet werden, insbesondere dann, wenn regulatorische RNAs in der kodierenden Region einer mRNA binden und damit zumindest teilweise ein translationsinhibitorischer Effekt ausgeschlossen werden kann (Caron et al., 2010). Die MicC RNA bindet innerhalb der proteinkodierenden Sequenz der *ompD* mRNA (*outer membrane protein*) von *Salmonella* und vermittelt einen degradosomabhängigen Abbau dieser mRNA. Die Ursache für die zielgerichtete initiale Spaltung durch RNase E in diesem Fall ist nicht eindeutig geklärt. Als eine Möglichkeit wird die direkte Rekrutierung der RNase E an die Schnittstelle durch MicC und das RNA Chaperone Hfq in Betracht gezogen (Pfeiffer et al., 2009). RyhB ist eine sRNA, die unter eisenlimitierten Wachstumsbedingungen exprimiert wird und die Expression nicht essentieller eisenhaltiger Proteine in Enterobakterien spezifisch unterbindet (Jacques et al., 2006). Diese sRNA bindet unter anderem in dem polycistronischen Operon *iscRSUA*, welches Proteine für die Fe-S-Cluster Biosynthese kodiert. Die Bindung in der intercistronischen Region zwischen *iscR* und *iscS* führt zur Veränderung der intrinsischen RNA-Struktur und generiert hierbei eine RNase E Schnittstelle, welche zum selektiven Abbau der *downstream* gelegenen RNA-Regionen führt (Desnoyers et al., 2009).

1.2.5 RNase J1 und RNase Y, zwei Alternativen zur RNase E in Gram-positiven Organismen

Die meisten Gram-positiven Bakterien besitzen keine zur RNase E homologen Enzyme. In diesen Organismen haben sich ganz offensichtlich alternative Mechanismen für die Degradation von RNA-

Transkripten entwickelt. Zwei Proteine, RNase J1 und die RNase Y, spielen dabei entscheidende Rollen im RNA-Metabolismus der Gram-positiven Bakterien.

Die paralogen Proteine RNase J1 und J2 wurden zunächst als Endonukleasen in *B. subtilis* identifiziert, welche in der *leader* Sequenz der Aminoacyl-Threonin-Synthetase (*thrS*) mRNA schneiden (Even et al., 2005). Derartige *leader* Sequenzen enthalten wichtige RNA-Motive für einen, als *transcription attenuation* bezeichneten Genregulationsmechanismus. In *B. subtilis* dienen derartige Mechanismen der kontrollierten Proteinexpression mehrerer tRNA-Synthetasen. Die Bindung einer spezifischen, nicht aminoacylierten tRNA in der *leader* 5'-UTR (*untranslated region*) der entsprechenden tRNA Synthetase mRNA, führt dabei zur Ausbildung einer Antiterminator-Struktur, welche es der RNA-Polymerase ermöglicht, die eigentliche Transkription des *downstream* gelegenen Synthetase Gens durchzuführen (Henkin & Yanofsky, 2002). Die Spaltung der RNase J1/J2 in der *leader* Region hat dabei offensichtlich einen stabilisierenden Einfluss auf das *downstream* gelegene Synthetase-Gen. Interessanterweise wird die *thrS* mRNA aus *B. subtilis* während einer ektopischen Expression in *E. coli* durch die RNase E an der identischen Position gespalten (Condon et al., 1997). Dies ließ zunächst vermuten, dass mit den RNasen J1/J2 möglicherweise funktionelle Homologe zur RNase E in *B. subtilis* gefunden wurden. Interessanterweise ergab eine Studie zur Prozessierung der 16S rRNA in *B. subtilis*, dass RNase J1 zusätzlich eine exoribonukleolytische Aktivität besitzt, die eine bis dahin in Prokaryoten nicht beschriebene 5' - 3' Orientierung aufweist. (Mathy et al., 2007). Das Vorhandensein eines Enzyms, welches RNA vom 5'-Ende ausgehend exoribonukleolytisch abbaut, konnte ein in *B. subtilis* bereits seit langem bekanntes und als „*protection at a distance*“ bezeichnetes Phänomen in der RNA-Degradation erstmalig plausibel erklären. Hierbei werden *downstream* von immobilisierten Ribosomen, von RNA-Bindeproteinen oder von stabilen RNA-Sekundärstrukturen gelegene RNA-Bereiche über teilweise mehrere Kilobasen hinweg vor einer Degradation geschützt. Die *upstream* von diesen Stabilisatoren gelegenen RNA-Regionen sind hingegen äußerst instabil (Condon, 2007, Sharp & Bechhofer, 2005). Dies ist ein ganz entscheidender Unterschied zur mRNA-Degradation in *E. coli*, hier werden nicht translatierte mRNAs relativ schnell, nach initialer Spaltung durch RNase E, von der oben beschriebenen 3'-prozessierenden Degradationsmaschinerie erfasst und abgebaut.

Wie bereits erwähnt, besitzt *B. subtilis* die zwei paralogen Enzyme RNase J1 und J2, von denen jedoch nur RNase J1 essentiell ist (Kobayashi et al., 2003, Mäder et al., 2008). Die 5'-3' exoribonukleolytische Aktivität der RNase J1 ist gegenüber der RNase J2 um mehr als das 300-fache erhöht, während sich die endoribonukleolytische Aktivität zwischen den einzelnen Enzymen kaum unterscheidet (Mathy et al., 2010). Verschiedene Studien haben außerdem gezeigt, dass die exoribonukleolytische Aktivität der RNase J1 nahezu vollständig durch ein triphosphoryliertes 5'-Ende blockiert ist, während die endonukleolytische Aktivität keinerlei Abhängigkeit zu dem 5'-Ende einer RNA aufweist (Deikus et al., 2008, Li de la Sierra-Gallay et al., 2008). Eine RNase J Doppelmutante von *B. subtilis*, mit dezimierter RNase J1 Expression und einem deletierten RNase J2 Gen, zeigt einen globalen Unterschied auf dem mRNA Transkript-Level im Vergleich zum Wildtyp. Von der RNase J1/J2 Depletion/Deletion sind dabei etwa 650 verschiedene Transkripte betroffen, die zu etwa gleichen Teilen hoch bzw. herunter reguliert sind, was auf eine globale Beteiligung der RNase J am mRNA-Metabolismus hinweist. Inwieweit hierbei der RNase J auch eine Rolle bei der initialen Degradation von mRNA zukommt, ist jedoch noch nicht geklärt. In der RNase J Doppelmutante von *B. subtilis* kommt es zu einer auffälligen Anhäufung von 3'-mRNA-Fragmenten. Da diese 3'-mRNA-Enden häufig Transkription-Terminatoren in Form von stabilen *hairpin*-Strukturen besitzen, scheint eine wesentliche Aufgabe der RNase J die Degradation derartiger strukturierter RNA-Fragmente zu sein (Mäder et al., 2008). Ein besonders anschauliches Beispiel für ein spezifisches

target der degradierenden, exoribonukleolytischen Funktion der RNase J1 in *B. subtilis* ist die Glukosamin-6-Phosphat Synthase mRNA (*glmS*). Die nicht translatierte 5'-Region dieser mRNA bildet ein Ribozym aus. Die Bindung von Glukosamin-6-Phosphat in der 5'-UTR stimuliert eine autokatalytische Spaltung, wobei ein 5'-monophosphoryliertes *upstream* Fragment einschließlich der *glmS* kodierenden Region gebildet wird. Dieses wird von der RNase J1 *in vivo* abgebaut (Collins et al., 2007).

Streptococcus pyogenes besitzt ebenfalls zwei RNase J Paraloge, wobei beide in diesem humanpathogenen Organismus essentiell sind. Die kontrollierte, zeitlich versetzte Degradation zweier verschiedener mRNA-Klassen, *class I* und *class II*, ist in *S. pyogenes* von RNase J1 und J2 abhängig (Bugrysheva & Scott, 2010).

Die RNase Y ist eine Endoribonuklease, die ebenfalls erst kürzlich in *B. subtilis* näher beschrieben wurde. Dieses Enzym spaltet, ähnlich zur RNase E, innerhalb AU-reicher Regionen in unmittelbarer Nähe von RNA-Sekundärstrukturen und zeigt hinsichtlich der endoribonukleolytischen Aktivität eine Präferenz für 5'-monophosphorylierte RNA-Transkripte. Die Depletion dieses essentiellen Enzyms führt in *B. subtilis* zu mehr als einer Verdopplung der generellen Stabilität des Gesamt-RNA-Transkript Levels. *In vivo* initiiert RNase Y dabei unter anderem den Abbau aller zehn S-Adenosylmethionin-abhängigen *riboswitches* sowie die Degradation der *rpoS* mRNA (Shahbabian et al., 2009, Yao & Bechhofer, 2010). Die RNase Y ist die zentrale Komponente eines Degradosom ähnlichen Komplexes in *B. subtilis*, wobei auch Interaktionen der RNase J1/J2 mit diesem Komplex nachgewiesen wurden (Commichau et al., 2009).

Mit Hilfe hochauflösender DNA-Tiling Arrays wurde gezeigt, dass die stringente Depletion jeweils einer der beiden RNasen, RNase J1 oder RNase Y, die Stabilität von RNA-Transkripten jeweilig unterschiedlicher funktioneller Kategorien betrifft und dass offensichtlich beide RNasen eine Rolle in der initialen mRNA-Degradation übernehmen können (Durand et al., 2012).

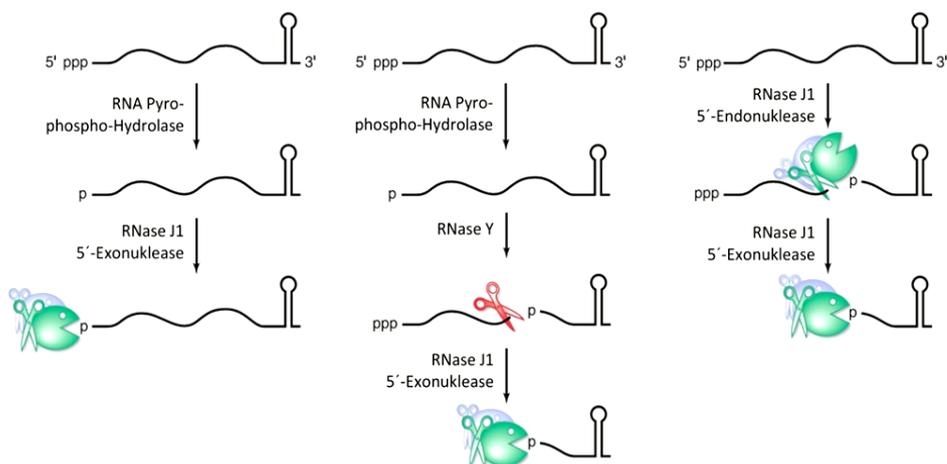


Abbildung 1-5: Verschiedene Möglichkeiten der 5'-3' Degradation von mRNA in *B. subtilis*.

Die RNase J1 (grün) ist eine Exoribonuklease (Pacman) und eine Endoribonuklease (Schere) und bildet *in vivo* einen Komplex mit der paralogen RNase J2 (hellblau). Die RNase Y (Schere; rot) ist eine Endoribonuklease. Nähere Erläuterungen siehe Text (modifiziert nach Bechhofer, 2011).

Generell gibt es verschiedene Szenarien für eine 5'-3' exoribonukleolytische mRNA-Degradation in *B. subtilis* (Abbildung 1-5). Da sowohl RNase J1 und RNase Y eine Präferenz für 5'-monophosphorylierte RNA-Transkripte aufweisen, könnte eine der in *B. subtilis* kodierten RNA-Pyrophospho-Hydrolasen ein entscheidender *trigger*-Faktor sein (Richards et al., 2011). Das monophosphorylierte 5'-Ende erleichtert entweder den 5'-3' exoribonukleolytischen Abbau durch die RNase J1 oder eine interne Spaltung durch die RNase Y (Abb. 1-5, links & Mitte). Der *downstream*

der RNase Y Schnittstelle gelegene RNA-Bereich kann ebenfalls durch die RNase J1 abgebaut werden (Abb. 1-5, Mitte). Da RNase J1 und J2 eine vom 5'-Ende unabhängige endoribonukleolytische Aktivität besitzen, ist theoretisch eine interne mRNA-Spaltung durch RNase J1/J2 ohne eine vorangehende Dephosphorylierung des 5'-Endes möglich (Abb. 1-5, rechts).

1.3 RNA-Prozessierung

Neben ihrer mRNA-degradierenden Funktion zur Steuerung der Proteinsynthese, kommt den RNasen eine weitere essentielle Rolle zu, welche als RNA-Prozessierung oder auch RNA-Reifung bezeichnet wird. Diese Prozessierung findet dabei vorrangig an den sogenannten stabilen RNAs einer Zelle statt. Hierzu zählen die ribosomalen und die *transfer* RNAs (rRNA und tRNA). Derartige RNA-Moleküle liegen nach ihrer Transkription durch die RNA-Polymerase als zumeist nicht funktionelles Primärtranskript vor. Eine Reihe von Prozessierungsschritten durch diverse RNasen führt letztlich zu deren Umwandlung in ihre physiologische, aktive Form. Auch kleine, regulatorische RNAs (sRNAs) können eine Prozessierung erfahren und werden in Abschnitt 1.3.4 beispielhaft erwähnt.

1.3.1 Prozessierung der ribosomalen RNA

Die ribosomale RNA ist der Hauptbestandteil der Ribosomen und als Ribozym obliegt der RNA-Komponente auch die katalytische Aktivität der Proteinsynthese in diesem makromolekularen Ribonukleoprotein-Komplex. Die drei bakteriellen rRNAs (16S, 23S und 5S) werden als ein zusammenhängendes, polycistronisches RNA-Molekül transkribiert. Neben diesen rRNAs besitzen die primären Transkripte häufig auch noch tRNAs, welche zwischen der 16S und der 23S, sowie *downstream* der 5S rRNA liegen können (Abbildung 1-7).

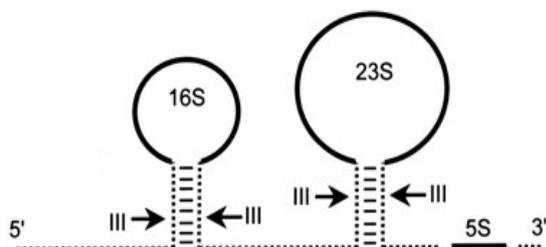


Abbildung 1-6 Stark vereinfachte Darstellung eines bakteriellen rRNA-Primärtranskriptes.

Die Spaltung des polycistronischen Transkriptes durch RNase III an helikalen RNA-Strukturen, *processing stalks*, führt zur Freisetzung der drei einzelnen rRNA-Vorstufen (modifiziert nach Evguenieva-Hackenberg, 2005).

Eine primäre Separierung in die drei rRNA-Untereinheiten erfolgt nach Spaltungen durch die RNase III an helikalen RNA-Strukturen, sogenannten *processing stalks*, welche sich aufgrund komplementärer Sequenzen an den jeweils flankierenden 5'- und 3'- Bereichen der 16S und 23S rRNA ausbilden (Bram et al., 1980, Young & Steitz, 1978) (Abbildung 1-6). Die RNase III ist die einzige bakterielle RNA-Doppelstrang spezifische Endoribonuklease und schneidet ausschließlich in helikalen RNA-Strukturen. Dieses Enzym besitzt hierbei auch eine gewisse sequentielle Präferenz, eine typische Konsensus-Sequenz lässt sich jedoch nicht beobachten

(Conrad et al., 1998, Pertzev & Nicholson, 2006). Die an der anschließenden Prozessierung beteiligten RNasen unterscheiden sich teilweise erheblich zwischen einzelnen Bakterien-Gruppen und sollen hier nur kurz für *E. coli* genannt werden (Deutscher, 2009, Taverniti et al., 2011). Selbst für diesen bestuntersuchten bakteriellen Modellorganismus konnten bisher nicht alle Enzyme identifiziert werden, welche an der 5'- und 3'-Reifung der ribosomalen RNAs beteiligt sind. Im Falle der 16S rRNA ist bekannt, dass nach deren primärer Separierung durch RNase III ein 17S Vorläufermolekül entsteht. Dessen um etwa 180 Nukleotide verlängertes 5'-Ende wird durch die schrittweise endonukleolytische Aktivität der RNase E und der RNase G auf das native 5'-Ende verkürzt (Li et al., 1999). An dem unreifen 3'-Ende der 16S rRNA verbleiben nach der primären Prozessierung durch

RNase III etwa 30 Nukleotide, die von einem bisher unbekanntem Enzym entfernt werden. Im Falle der 23S rRNA konnten bisherige Untersuchungen nicht klären, welches Enzym die verbleibenden 3-7 Nukleotide am 5'-Ende nach der RNase III Spaltung entfernt. Die finale 3'-Reifung wird durch die Exoribonuklease RNase T durchgeführt (Li et al., 1999). Das Vorläufermolekül der 5S rRNA wird als 9S RNA bezeichnet. Dieses Molekül wird am 5'- und am 3'-Ende durch RNase E verkürzt, wobei jeweils 3 Nukleotide an beiden Enden verbleiben (Misra & Apirion, 1979, Ghora & Apirion, 1978). Die finale Prozessierung dieses sogenannten p5S Moleküls erfolgt am 3'-Ende durch die RNase T, das 5'-prozessierende Enzym ist bisher nicht identifiziert.

1.3.2 Intervening sequences (IVS) und die Fragmentierung ribosomaler RNA

Neben dieser Standard-Prozessierung bei der ribosomalen RNA-Reifung findet in einigen Organismen eine zusätzliche Prozessierung statt. Hierbei werden rRNA-Segmente, sogenannte *intervening sequences* (IVS), aus der 18S/16S oder 28S/23S rRNA herausgeschnitten, ohne dass die dabei freigelegten 5'- und 3'-Enden erneut ligiert werden. Die Ribosomen dieser Organismen enthalten daraus resultierend fragmentierte rRNA-Moleküle. Diese fragmentierten rRNAs sind im Cytoplasma einiger Protisten und Insekten, wie auch in den Mitochondrien und Chloroplasten von Grünalgen und *Zea Mays* zu finden (Gray & Schnare, 1996). In Bakterien weisen vorrangig die α -, γ - und ϵ -Proteobakterien rRNA-Fragmentierungen auf, jedoch tritt diese beispielsweise auch in einigen *Clostridium* Stämmen und dem Spirochäten *Leptospira* auf. In Archaea ist eine derartige Fragmentierung bisher nicht beobachtet worden. Die Positionen der Fragmentierungsstellen beschränken sich auf einige Bereiche innerhalb der rRNA-Moleküle und gleichen sich teilweise in Eukaryoten und Prokaryoten (Evguenieva-Hackenberg, 2005). Generell liegen die Fragmentierungsstellen in variablen, wenig konservierten rRNA-Regionen, denen keine entscheidende strukturelle oder gar katalytische Funktion im Ribosom zukommt. Die bakteriellen *intervening sequences* sind in ihrer Sequenz und ihrer Länge sehr variabel (50 - 700 Nukleotiden), bilden jedoch zumeist helikale Strukturen aus. Auf Basis der konservierten Sekundärstruktur der ribosomalen RNA führen die verschiedenen Insertionen von IVSs zumeist zu einer Verlängerung von bereits vorhandenen Helices. Für die 16S rRNA sind bisher drei unterschiedliche Positionen von IVSs beschrieben worden, in der 23S rRNA liegen alle fünf der bisher bekannten IVSs in der 5'-Hälfte dieser RNA.

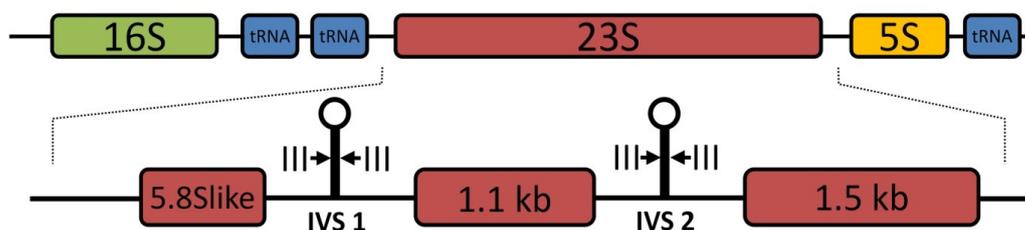


Abbildung 1-7 Schematische Darstellung des polycistronischen Primärtranskripts der rRNA von *R. sphaeroides* und der Fragmentierung der 23S rRNA.

(Oben) Das Primärtranskript enthält die drei ribosomalen RNAs (16S, 23S und 5S, farbige Balken) sowie drei kotranskribierte tRNAs (blaue Balken). Im Zuge der ersten Prozessierungsschritte spalten RNase III und RNase E in den dazwischen liegenden *spacer* Regionen (schwarze Linie). Nach dieser RNA-Separierung erfolgt eine individuelle Reifung der freigelegten 5'- und 3'-Enden durch diverse RNasen. **(Unten)** Die 23S rRNA erfährt eine weitere Prozessierung, die in drei nicht zusammenhängenden Fragmenten resultiert, der 5.8Slike, der 1.1kb und 1.5kb RNA. Hierbei spaltet RNase III (III) zunächst in den helikalen Strukturen der *intervening sequences* (IVS 1/2). Die entstehenden 5'- und 3'-Enden werden anschließend durch weitere RNasen verkürzt.

In *Rhodobacter sphaeroides* ist die 23S rRNA in drei Fragmente unterteilt, welche aus Spaltungen zweier IVSs resultieren. Diese liegen jeweils in der Helix 9 (IVS 1) und der Helix 46 (IVS 2). Die Nummerierung der Helices basiert dabei auf der Bestimmung der 23S rRNA-Sekundärstruktur von *E. coli* durch Noller, (Noller et al., 1981). Eine schematische Darstellung dieser rRNA-Fragmentierung, sowie ein genereller Überblick über das rRNA-Operon von *R. sphaeroides* ist in Abbildung 1-7 gezeigt. Für die initiale Spaltung der 23S rRNA-Fragmente ist, wie bereits bei der Separierung der einzelnen rRNAs, die RNase III verantwortlich (Conrad et al., 1998, Kordes et al., 1994, Evguenieva-Hackenberg & Klug, 2000). Die hierbei freigesetzten IVSs sind extrem kurzlebig und werden exoribonukleolytisch abgebaut (Klein & Evguenieva-Hackenberg, 2002). Die entstandenen Vorläufermoleküle der 5.8Slike, 1.1kb und 1.5kb rRNA werden anschließend an ihren 5'- und 3'- Enden weiter verkürzt, wobei nicht alle daran beteiligten RNasen bisher bekannt sind. Im Falle der 5'-Prozessierung der 1.1 kb RNA in *R. capsulatus* haben *in vitro* Studien gezeigt, dass die Spaltung durch RNase E zu einem intermediären 5'-Ende führt, welches etwa 10 Nukleotide *upstream* zum nativen Ende liegt (Klein et al., 2002). In *Sinorhizobium meliloti*, einem α -Proteobakterium, welches zwei 23S rRNA-Fragmente besitzt, akkumulieren Vorläufermoleküle der beiden Fragmente in einer RNase J miniTn5-Insertionsmutante (Madhugiri & Evguenieva-Hackenberg, 2009). Das für die finale 5'-Prozessierung verantwortliche Enzym der drei 23S rRNA-Fragmente in *R. sphaeroides* konnte während der hier vorliegenden Arbeit als RNase J identifiziert werden (Rische & Klug, 2012).

Die generelle Abstammung und Funktion der IVSs ist bisher ungeklärt. Die Existenz von komplementären Enden in den IVSs ähnelt den *inverted repeats* von genetisch mobilen Transposon-Elementen. Da vergleichbare Sequenzen jedoch nicht in anderen Gen-Bereichen von Organismen mit IVSs gefunden wurden, ist nicht verstanden, warum sich derartige Transposon-Insertionen auf die ribosomale DNA beschränken. Zudem besitzen die meisten bakteriellen Genome mehrere rDNA Operons und eine einzelne Transposon-Insertion in einem dieser rDNA Operons sollte sich theoretisch nicht im Gesamtchromosom manifestieren. Es stellt sich damit die Frage, warum ein Organismus hunderte Nukleotide zunächst polymerisiert, um sie unmittelbar danach wieder zu degradieren. Das ist umso mehr erstaunlich, da die Synthese der ribosomalen RNA während des exponentiellen Wachstums fast 50 % der gesamten Transkriptionsaktivität einer Zelle beansprucht und eine unmittelbar anschließende Degradation äußerst überflüssig zu sein scheint. Eine hierfür mögliche Erklärung ist, dass die IVSs eine Art regulatorische Funktion auf den Pool verfügbarer RNasen in einer Zelle besitzen. Die oben erwähnten Prozessierungs- und Degradationsschritte der IVSs erfordern die Beteiligung verschiedener Endo- und Exo-RNasen, diese Enzyme stehen damit dem degradierenden RNA-Metabolismus in der Zelle nicht zur Verfügung. Eine ähnliche Regulierung wird auch der Polyadenylierung von mRNA-Transkripten in *E. coli* zugeschrieben, welche die intrazellulären Level der PNPase und der RNase E beeinflusst (Mohanty & Kushner, 2002). Einen möglichen Vorteil, der indirekt aus den IVSs resultiert, könnten jedoch auch die entstandenen rRNA-Fragmente bieten. Der Abbau der Ribosomen und die damit einhergehende Degradation der ribosomalen RNA ist wesentlicher Bestandteil der bakteriellen Stressantwort beim Übergang in die stationäre Wachstumsphase. Endonukleolytische Spaltungen initiieren hierbei, ähnlich der mRNA-Degradation, den systematischen Abbau einer rRNA. Die dabei freigelegten ribosomalen RNA 3'-Enden ermöglichen prozessiven 3'-Exoribonukleasen eine Bindung für eine weiterführende Degradation. Die bereits freiliegenden 3'-Enden der natürlich vorkommenden rRNA-Fragmente könnten hierbei eine schnellere Umstellung des zellulären Stoffwechsels ermöglichen (Basturea et al., 2011, Evguenieva-Hackenberg, 2005).

1.3.3 Prozessierung von tRNA

Die tRNA ist das Bindeglied für die Translation des mRNA Nukleinsäure-Codes in die entsprechende Aminosäuresequenz durch die Ribosomen. Auch tRNAs werden zunächst als Vorläufermoleküle transkribiert und erfordern eine schrittweise, ribonukleolytische Prozessierung, um in ein funktionelles Molekül umgewandelt zu werden. Die Biosynthese von tRNAs ist keineswegs auf die im folgenden kurz beschriebene Prozessierung durch RNasen beschränkt. Vielmehr erfahren diese tRNA-Moleküle im Verlauf der Reifung eine ganze Reihe von Nukleotid-Modifikationen, welche unter anderem Einfluss auf die komplexe Tertiärstruktur dieser Moleküle haben. Als eine Art Modifikation kann hierbei auch die finale Beladung (Amino-Acylierung) des 3'-terminalen Adenins in der tRNA durch die tRNA-Synthetase mit einer entsprechenden Aminosäure angesehen werden.

Die Vorläufermoleküle der tRNAs sind entweder ein ko-transkribierter Bestandteil von rRNA und mRNA-Primärtranskripten oder sie können als eigenständige mono- oder multimere tRNA-Vorstufen transkribiert werden. Die primäre Separierung der tRNA-Einzelmoleküle wird entweder von der RNase III oder der RNase E vollbracht. Die anschließende Reifung des 5'-Endes wird stets von dem Ribonukleoprotein RNase P vollzogen. Die Reifungsprozesse am 3'-Ende unterscheiden sich zwischen verschiedenen Organismen und sind teilweise abhängig von dem individuellen tRNA-Vorläufermolekül. Entscheidend ist hierbei, inwieweit eine für die Amino-Acylierung notwendige terminale 3'-CCA Sequenz am Akzeptorstamm des tRNA-Moleküls bereits in der RNA-Sequenz enthalten ist oder ob diese Sequenz nachträglich angehängt werden muss. In *E. coli* besitzen alle tRNA-Gene bereits die notwendige 3'-CCA Sequenz, hier erfolgt die Entfernung von *downstream* gelegenen Nukleotiden (durchschnittlich 15 nt) vorrangig durch die Exoribonukleasen RNase T und RNase PH, wobei RNase PH definitionsgemäß eine Phosphorylase ist (Li & Deutscher, 1996). Die 3'-Prozessierung von tRNAs ohne 3'-CCA erfolgt mit Hilfe der RNase Z. Diese Endoribonuklease schneidet das Vorläufermolekül am 3'-Ende zunächst hinter der sogenannten Diskriminator-Base, anschließend polymerisiert die Nukleotidyl-Transferase die CCA-Sequenz an das 3'-Ende (Pellegrini et al., 2003).

1.3.4 Prozessierung kleiner RNAs (sRNA)

Eine notwendige Prozessierung von RNAs beschränkt sich nicht nur auf die oben erwähnten klassischen stabilen RNAs. Die 6S RNA ist eine nicht proteinkodierende RNA (ncRNA), welche ganz entscheidend an der globalen Umstellung der bakteriellen Genexpression beim Übergang vom exponentiellen zum stationären Wachstum beteiligt ist. Hierbei bindet diese RNA sehr spezifisch den *housekeeping* Sigma-Faktor 70, einschließlich der RNA-Polymerase, und ermöglicht eine effektive Transkription von Sigma S abhängigen Promotoren. Das Primärtranskript besitzt eine etwa 250 nt lange, *upstream* vom nativen 5'-Ende gelegene RNA-Region, welche von der RNase E und der RNase G entfernt wird. Die degradierende Prozessierung mehrerer 100, *downstream* vom nativen 3'-Ende gelegener Nukleotide wird von einer bisher nicht identifizierten Exonuklease vollzogen (Chae et al., 2010). Die regulatorische sRNA ArcZ akkumuliert in *Salmonella enterica* während der stationären Wachstumsphase. Diese sRNA wird als ein etwa 120 nt langes Primärtranskript transkribiert, welches eine Halbwertszeit von etwa 3 min besitzt. Nach einer Prozessierung am 5'-Ende bleibt lediglich das 3'-Fragment dieser sRNA mit einer Halbwertszeit von etwa 30 min in der Zelle erhalten. Dieses etwa 50 nt lange 3'-Fragment besitzt die *target*-bindende *seed* Region und eine Hfq-Bindedomäne. Als Prozessierungsschritt wird hierbei eine endonukleolytische Spaltung durch die RNase E vermutet (Papenfert et al., 2009). Auch die MicX sRNA in *Vibrio cholerae* liegt zunächst als 350 nt langes Primärtranskript vor. In zwei RNase E abhängigen Prozessierungsschritten entsteht daraus zunächst ein langlebigeres 241 nt langes Intermediat und anschließend die reife, 189 nt lange MicX sRNA. Die

endonukleolytische Spaltung ist hierbei offenbar nur in Gegenwart des RNA Chaperone Hfq möglich. Interessanterweise scheint die Prozessierung der MicX sRNA prinzipiell keinen Einfluss auf ihre biologische Aktivität, sprich die Bindung spezifischer mRNA Regionen, zu haben, vielmehr trägt die Prozessierung zu einer erhöhten Stabilität dieser regulatorischen sRNA bei (Davis & Waldor, 2007).

1.4 *Rhodobacter sphaeroides*

Rhodobacter sphaeroides ist ein Gram-negatives Bakterium und gehört zur α -3-Unterkategorie der Proteobakterien. Als natürliches Habitat dieses etwa 0,2 - 0,5 μm langen, stäbchenförmigen Bakteriums gelten lichte, stehende oder fließende Oberflächengewässer, sowie das Kapillarwasser oberflächennaher Böden. Die Mitglieder der α -3-Proteobakterien zeichnen sich durch eine enorme Vielfalt möglicher Wege zur Energiegewinnung aus. *R. sphaeroides* ist ein weitverbreiteter Modellorganismus für Untersuchungen zu den genregulatorischen Mechanismen, welche für den Übergang von einer aeroben Atmung zur anoxygenen Photosynthese verantwortlich sind. Dass hierbei auch die mRNA-Degradation eine entscheidende Rolle spielt, konnte durch intensive Studien zu dem *puf*-Operon in dem nahe verwandten α -3-Proteobakterium *R. capsulatus* gezeigt werden. Auch andere Aspekte bezüglich der RNA-Degradation wurden in *R. capsulatus* bereits näher untersucht, hierzu zählen die Charakterisierung der RNase III, die Prozessierung der 23S rRNA oder die Identifizierung von degradosomähnlichen Komplexen in diesem Organismus. *R. sphaeroides* ist zudem ein Modellorganismus für intensive Untersuchungen zu dem Einfluss kleiner, regulatorischer RNAs bei der photo-oxidativen Stressantwort (Berghoff et al., 2011).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Alle wesentlichen Ribonukleasen aus *E. coli* sind auch in dem Genom von *R. sphaeroides* kodiert und es kann davon ausgegangen werden, dass deren unmittelbare Funktionen mit denen der Enzyme aus *E. coli* übereinstimmen. Demnach kommt auch der RNase E in *R. sphaeroides* eine zentrale Rolle im degradierenden RNA-Metabolismus zu. Interessanterweise besitzt *R. sphaeroides* jedoch auch ein der RNase J homologes Gen. Die Untersuchungen zu dieser, in Gram-positiven Bakterien essentiellen Ribonuklease beschränken sich bisher vorrangig auf Organismen, welche keine RNase E besitzen. Das Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es, die Aktivität der RNase J aus *R. sphaeroides* zu charakterisieren und einen Einblick in deren biologische Funktionen in einem Organismus zu erhalten, welcher die RNase J als auch die RNase E besitzt. Hinsichtlich der Untersuchungen zu Funktionen der RNase J waren dabei deren mögliche Beteiligung an der RNA-Prozessierung als auch an der mRNA-Degradation von Interesse.

Für eine Charakterisierung der RNase J von *R. sphaeroides* sollte dieses Enzym zunächst rekombinant aufgereinigt werden. Anschließend sollte mit Hilfe von *in vitro* RNA-Degradations-Studien untersucht werden, ob dieses Protein eine RNA-degradierende Aktivität besitzt bzw. inwiefern diese Aktivität mit der beschriebenen exo- und endoribonukleolytischen Aktivität der RNase J aus *B. subtilis* vergleichbar ist.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der Identifizierung natürlicher Substrate der RNase J in *R. sphaeroides*. Hierfür sollte eine Deletionsmutante der RNase J konstruiert werden und die Auswirkungen dieser Deletion auf Ebene der zellulären RNA-Transkripte in *R. sphaeroides*, unter anderem mit Hilfe einer RNASeq Transkriptom-Analyse, untersucht werden. Mögliche Effekte einer RNase J Deletion auf spezifische RNAs sollten in anschließenden *in vitro* Degradations-Experimenten eingehender untersucht werden.

Ebenfalls von Interesse war die Identifizierung möglicher Protein-Interaktionspartner der RNase J in *R. sphaeroides* mit Hilfe von *Pull-Down* Experimenten.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Bakterienstämme

Bei den in der folgenden Tabelle aufgeführten Bakterienstämmen, handelt es sich um die in dieser Arbeit verwendeten Ausgangsstämme. Gentechnisch veränderte Derivate dieser Stämme werden im Verlauf dieser Arbeit beschrieben.

Stamm	Verwendung	Beschreibung/Herkunft
<i>E. coli</i>		
M15 [pREP-4]	Überexpression rekombinanter Proteine	Derivat von <i>E. coli</i> K12 mit Plasmid pREP4; (Km ^r) (Qiagen, Hilden)
JM 109	Plasmid-Replikationsvektor für Klonierungsarbeiten	e14 ^r (McrA), <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> (r _K ⁻ m _K ⁺), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , Δ(<i>lac-proAB</i>), [F', <i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>lacI</i> ^q ΔM15]
S17-1	Donorstamm der biparentalen Konjugation mit <i>R. sphaeroides</i>	<i>recA</i> , <i>pro</i> , <i>hsdR</i> , RP4 ² -(Tc::Mu)(Km::Tn7); Tp ^r , Str ^r , Sp ^r
<i>R. sphaeroides</i>		
2.4.1	Wildtyp	(van Niel, 1944)

2.1.2 Plasmide

Die in der folgenden Tabelle aufgeführten Plasmide dienten als Ausgangsvektoren für unterschiedliche molekularbiologische und biochemische Anwendungen. Die mit entsprechenden Klonierungsstrategien erhaltenen Derivate dieser Plasmide werden im Verlauf dieser Arbeit beschrieben.

Plasmid	Verwendung/Beschreibung/Herkunft
pQE70	Überexpressionsplasmid für <i>E. coli</i> zur IPTG-induzierten Expression rekombinanter Proteine mit C-terminalen <i>hexa</i> -Histidin- <i>tag</i> , Ap ^r (Qiagen, Hilden)
pDrive	Klonierungsvektor, Ap ^r , Tc ^r (Qiagen, Hilden)
pJET1.2	Klonierungsvektor, Ap ^r (Fermentas, St. Leon-Rot)
pPHU281	<i>suicide</i> Vektor zur Herstellung von Deletionsmutanten in <i>R. sphaeroides</i> mittels homologer Rekombination, Tc ^r (Hübner et al., 1991)
pRK415	<i>broad host range</i> Vektor für Proteobakterien, dient der Ko-Expression oder Komplementation von Proteinen in <i>R. sphaeroides</i> , Tc ^r (Keen et al., 1988)
pREP4	Plasmid zur konstitutiven Expression eines <i>lac</i> Operon Repressorproteins (Qiagen)

2.1.3 Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von Biomers (Ulm) oder Eurofins/MWG/Operon (Heidelberg) bezogen. Für Klonierungsstrategien entscheidende Sequenzen, sowie eventuelle T₇ RNA-Polymerase Promotoren sind in den unten aufgeführten Oligonukleotiden hervorgehoben.

Oligonukleotid	Sequenz	Anmerkung
rekombinante Proteinexpression und Mutagenese		
RSP_2534_QE70_fwd	CAAGGATCTGGCATGCGTGCAAACCG	SphI
RSP_2534_QE70_rev	GACAGGAAAGGGAGAGATCTGCCTTC	BglII
RNJ_SDM_A	AGAAATTAAGCATGCGTGCAAACCG	SphI
RNJ_SDM_D	GATGGTGATGAGATCTGCCTTCC	BglII
RNJ_DH80KA_B	AGCGCGCCGATAGCCTTCTCGTGGG	
RNJ_DH80KA_C	ATGCCACGAGAAGGCTATCGGCGCG	Asp,His -->Lys, Ala
RNJ_S369L_B	AGCGTGGCCTAGGACGTGATAGAGC	
RNJ_S369L_C	TATCACGTCCTAGGCCACGCTAAC	Ser --> Leu
Knock-Out und Komplementation		
RSP_2534_KO_up_f	GGATTTTCGGAATCCCACCACCTTCG	EcoRI
RSP_2534_KO_up_r	CGTGGGCATGGGGATCCAGATCGC	BamHI
RSP_2534_KO_dw_f	GCTGTCTGGGATCCTGGAAGAGGAGC	BamHI
RSP_2534_KO_dw_r	CGTTGGTCAGCATGCTCCACTTGG	SphI
RSP_2534his6_415_f	CAATTTACACAGGTACCATTAAAGAGG	KpnI
RSP_2534his6_415_r	TCAGTAATTGAATTCAGTGATGGTGATGG	EcoRI
KanR2_fwd	CATGAACAATAAACTGTCTGC	
KanR2_rev	GAAGATGCGTGATCTGATCC	
RNJ-Frag_del_f	CGGCTGAAGTTCGAAGAGCACG	
RNJ-Frag_del_r	TGTCGATATATCCGCCACCTGC	
Templates für die manuelle Sequenzierung		
RSP_4350_seq_fwd	CCAAGTCTAGTACAACCTGACCG	23S rDNA Sequenz
RSP_4350_seq_rev	TGCTTTGTTCCGGGTCTATTGC	
RSP_4357_seq_fwd	GATAGGCTTGATCTGACCC	5S rDNA Sequenz
RSP_4357_seq_rev	GACAGGATCCTGGTTGCGG	
RSP_4347_seq_fwd	TTCCTGTCTTGTGGGTACG	16S rDNA Sequenz
RSP_4347_seq_rev	TGAAGGGATATGGGGACGGC	
Primer Extension		
RSP_5.8S_PE	CCATGGATCAAAGCCCATTCC	
RSP_1.1kb_PE	GCTGGTCCGCGTTCGCTCG	
RSP_1.5kb_PE	GTCTCTACCCTGTTTGTGCGC	
RSP_4357_PE	GGCGACCTACTCTCCCACG	
RSP_4347_PE	CAAAGGGCACGTTCCCACG	
RNA-Sonden für die RNase Protection Assays		
RSP_5.8S_RPA_T7	TAATACGACTCACTATAGGGTCCGTTGGATAACAATAGC	T7
RSP_5.8S_RPA_r	CGTTTGGTGATGCCTAGG	
RSP_1.1kb_RPA_T7	TAATACGACTCACTATAGGGGCGCCCTACCGCTTCG	T7
RSP_1.1kb_RPA_r	GGGAAAGCATGTGGGACG	
RSP_1.5kb_RPA_T7	TAATACGACTCACTATAGGGCCGGAGAAGAAACGACAAC	T7
RSP_1.5kb_RPA_r	GGACCAGTTGTCGTGCC	
Northern Blot		
RSP_5.8S_NB	GTCCTTCATCGCCTCTTGCTG	
RSP_4045_NB	GGCAGGCCTCAGGCGCGCCCTTG	
RSP_0959_NB	GGATGAAGGGCTCCTCCTCGCCGGG	
RSP_1173_NB	CTTGTCTTGGCGGTGACCGACAC	
16Sint_Frag_NB	CCAATCCGAACTGAGACAGC	
23Sint_Frag_NB	CGTCCCCTTCGATGCCT	
5'-RACE		
RNA-Adapter-Oligo	GAUAUGCGCGAAUUCUGUAGAACGAACACUAGAAGAAA	(Argaman et al., 2001)
Anti-Adapter Primer	GCGCGAAUUCUGUAGA	

2.1.4 Standardpuffer

<p>1x PBS Puffer</p> <p>137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na₂HPO₄ 2 mM KH₂PO₄ pH 7,4</p>	<p>1x STE Puffer</p> <p>150 mM NaCl 10 mM Tris/HCl 1 mM EDTA pH 8,0</p>	<p>1x TAE Puffer</p> <p>40 mM Tris/Acetat 1 mM EDTA pH 8,5</p>
<p>1x TBE Puffer</p> <p>89 mM Tris 89 mM Borat 2,5 mM EDTA pH 8,3</p>	<p>1x TBS Puffer</p> <p>200 mM NaCl 50 mM Tris/HCl pH 7,5</p>	<p>20x SSC Puffer</p> <p>3 M NaCl 300 mM Na₃-Citrat pH 7,0</p>
<p>1x Laemmli Puffer</p> <p>25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS pH 8,2</p>	<p>4x SDS-PAA-Sammelgel Puffer</p> <p>0,5 M Tris 0,4 % (w/v) SDS pH 8,8</p>	<p>4x SDS-PAA-Trenngel Puffer</p> <p>1,5 M Tris 0,4 % (w/v) SDS pH 6,8</p>
<p>4x Auftragspuffer für SDS-PAA-Gele</p> <p>15 % (v/v) Glycerin 4 % (w/v) SDS 20 % (v/v) β Mercaptoethanol 0,05 % (w/v) Bromphenolblau 1x SDS-PAA-Sammelgel P.</p>	<p>2x FU-Mix (RNA Auftragspuffer)</p> <p>6 M Harnstoff 80 % (v/v) Formamid 1x TBE Puffer 0,1 % (w/v) Bromphenolblau 0,1 % (w/v) Xylencyanol</p>	

2.1.5 Antibiotika

Antibiotikum	Abkürzung	Stammlösung [mg/ml]	Endkonzentration [µg/ml]	
			<i>E. coli</i>	<i>R. sphaeroides</i>
Ampicillin (Roth)	Ap	100 in ddH ₂ O	200	--
Kanamycin (Serva)	Km	10 in ddH ₂ O	25	25
Tetrazyklin (Roth)	Tc	10 in 75 % EtOH	15	1,5

Antibiotika wurden sterilfiltriert (0,22 µm Sterilfilter, Nalgene) und nach Bedarf in den angegebenen Konzentrationen zur Bakterienanzucht zugegeben.

2.1.6 Radioaktive Nukleotide

[γ- ³² P]-ATP, 3000 Ci/mmol	Hartman Analytic
[γ- ³² P]-GTP, 3000 Ci/mmol	Hartman Analytic
[α- ³² P]-UTP, 3000 Ci/mmol	Hartman Analytic
5'-[α- ³² P]-pCp, 3000 Ci/mmol	Hartman Analytic

2.1.7 Enzyme

Bezeichnung	Hersteller
ACCUZYME DNA Polymerase	Bioline
Alkalische Phosphatase (<i>calf intestine phosphatase</i>)	NEB
AMV Reverse Transkriptase	Promega
BIO-X-ACT-long DNA Polymerase	Bioline
DNase I (120-200 u/μl)	Invitrogen
Lysozym	Boehringer
Nuklease P ₁	Sigma-Aldrich
Pyrophosphatase (<i>tobacco acid pyrophosphatase</i>)	Epicentre
Restriktionsendonukleasen	NEB/Fermentas
RNase A	Qiagen
RNasin (RNase Inhibitor)	Fermentas
T ₄ Polynukleotid-Kinase	Fermentas
T ₄ DNA Ligase	NEB
T ₇ RNA Polymerase	NEB

2.1.8 Molekularbiologische Kits, Reagenzien und Größenstandards

Bezeichnung	Hersteller
T ₇ Sequencing Kit	USB
<i>HybSpeed RNase Protection Assay Kit</i>	Ambion
<i>One Step RT PCR Kit</i>	Qiagen
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	Qiagen
Ribonukleosidtriphosphate (NTPs)	Roth
<i>Lumi-Light Western Blotting Substrate</i>	Roche
Roti®-NanoQuant (Bradford Reagenz)	Roth
Pheny-Methyl-Sulfonyl-Fluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich
<i>Ponceau S ready-to-use</i>	Sigma-Aldrich
Röntgenfilm Entwickler-und Fixier-Lösung	ADEFO
<i>Sequencing Kit7 gel solutions</i>	AppliChem
1 kb DNA <i>ladder</i> plus	Fermentas
RNA <i>decade</i> Marker	Ambion
<i>prestained broad-range</i> Marker (Protein)	NEB
<i>low range Silver Stain SDS-PAGE Standard</i> (Protein)	Bio-Rad

2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.1 Kultivierung von *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1

Die Flüssigkultivierung von *R. sphaeroides* fand unter mikroaeroben Bedingungen in RÄ-Medium statt. Hierfür wurden Erlenmeyerkolben zu 70 % mit RÄ-Medium gefüllt und unter Schütteln (140 rpm) bei 32°C im Dunkeln inkubiert. Der Sauerstoffgehalt beträgt hierbei etwa 1 mg l^{-1} (etwa $30 \text{ } \mu\text{M}$). Zur Herstellung von Einzelkolonien wurde Zellmaterial mit einer Impföse auf RÄ-Agarplatten ausgestrichen oder Verdünnungen einer Flüssigkultur wurden mit einem Drigalskispatel ausplattiert und für etwa 48 h bei 32°C inkubiert. Je nach Erfordernis wurden dem Medium die entsprechenden Mengen an Antibiotika zugegeben.

RÄ-Medium:
(Drews, 1983) 30 g Malat; 0,2 g $\text{MgSO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$; 1,2 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,07 g $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$
+ 1,5 ml Spurenelementlösung
ad 1 l ddH₂O, auf pH 6,9 einstellen, autoklavieren
+ 8 ml Vitaminlösung
+ 20 ml Phosphatlösung

RÄ-Agar: 30 g Malat; 0,2 g $\text{MgSO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$; 1,2 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,07 g $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$
+ 1,5 ml Spurenelementlösung
+ 16 g Bacto Agar (Difco, Heidelberg)
ad 1 l ddH₂O, auf pH 6,9 einstellen, autoklavieren

Vor dem Gießen der RÄ-Agarplatten wurde das Medium, wenn nötig, in der Mikrowelle erneut aufgeköcht. Die Supplementierung mit Vitamin- und Phosphatlösung (8 ml l^{-1} bzw. 20 ml l^{-1}), sowie die Zugabe etwaiger Antibiotika erfolgte vor Wiedererstarren des RÄ-Agars bei etwa 50°C.

Spurenelementlösung: 500 mg Fe(II)-Citrat; 20 mg $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$; 5 mg ZnCl_2 ; 5 mg LiCl;
2,5 mg KI; 2,5g KBr; 0,15 mg CuSO_4 ; 1 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$; 6 mg
 $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$; 0,5 mg $\text{SnCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$; 0,5 mg BaCl_2 ; 1 mg AlCl_3 ; 10 mg
 H_3BO_4 ; 10 mg EDTA, ad 1 l ddH₂O
Phosphatlösung: 45 g K_2HPO_4 ; 35 g KH_2PO_4 , ad 1l ddH₂O
Vitaminlösung: 200 mg Niacin; 400 mg Thiamin-HCl; 200 mg Nicotinamid; 8 mg
Biotin, ad 1 l ddH₂O

2.2.2 Kultivierung von *Escherichia coli*

Die Flüssigkulturen von *E. coli* wurden bei 37°C unter Schütteln (180 rpm) in Erlenmeyerkolben mit etwa 20 - 30 % ihres Volumen an Standard I Medium inkubiert. Zur Herstellung von Einzelkolonien wurde Zellmaterial mit einer Impföse auf Standard I Agarplatten ausgestrichen oder es wurden Verdünnungen einer Flüssigkultur mit einem Drigalskispatel ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Je nach Erfordernis wurden dem Medium die entsprechenden Mengen an Antibiotika zugeben.

Standard I Medium: 25 g Standard Nährmedium I in 1 l ddH₂O, autoklavieren
Standard I Agar: 25 g Standard Nähragar I in 1 l ddH₂O, autoklavieren

Vor dem Gießen der Standard I Agarplatten wurde das Medium, wenn nötig, in der Mikrowelle erneut aufgeköcht. Die Zugabe etwaiger Antibiotika erfolgte vor Wiedererstarren des Standard I Agars bei etwa 50°C.

2.2.3 Bestimmung der Gesamtzellzahl einer Flüssigkultur

Um die Gesamtzellzahl einer Kultur, z.B. für Wachstumsraten, zu bestimmen, wurde die optische Dichte (*E. coli*: OD₆₀₀; *R. sphaeroides*: OD₆₆₀) einer Flüssigkultur gemessen. Ab einer optischen Dichte von 0,8 wurden die zu messenden Proben verdünnt, um einen zuverlässigen Messbereich des Photometers sicher zu stellen. Folgender Zusammenhang besteht zwischen der gemessenen OD und der Gesamtzellzahl:

E. coli: 1 OD₆₀₀ entspricht etwa $7,5 \times 10^8$ Zellen ml⁻¹
R. sphaeroides: 1 OD₆₆₀ entspricht etwa 2×10^9 Zellen ml⁻¹

2.2.4 Expression rekombinanter Protein in *Escherichia coli*

Die Überexpression rekombinanter Proteine in *E. coli* basierte auf dem pQE70 Vektor der Firma Qiagen. Hierbei wurde das Gen des Proteins *downstream* zu einem T₅-Promotor kloniert, welcher unter der Kontrolle eines *lac* Operators steht. Das Stop-Codon des Gens liegt nach erfolgreicher Klonierung hinter einer zusätzlichen *hexa*-Histidin-*tag* kodierenden Sequenz. Als Expressionsstamm für rekombinante Proteine wurde *E. coli* M15 [pREP4] verwendet. Für eine Überexpression rekombinanter Proteine wurden zunächst 15 ml Standard I Medium mit Ampicillin und Kanamycin mit einer Einzelkolonie eines entsprechend transformierten *E. coli* M15 [pREP4] angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit dieser Übernachtskultur wurden 500 ml vorgewärmtes Standard I Medium, ohne Antibiotikum, 1,5%ig angeimpft und bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 bei 37°C inkubiert. Daraufhin erfolgte die Induktion der Überexpression durch Zugabe von IPTG (Endkonz.: 1 mM) und die Kultur wurde für weitere 3 - 4 h bei 37°C inkubiert. Anschließend sind die Zellen geerntet (8.000 g, 15 min, 4°C) und das Zellpellet mit PBS gewaschen worden. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Zellsediment bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert.

2.2.5 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen zur Elektrotransformation

Zweimal 500 ml vorgewärmtes Standard I-Medium in jeweils einem 2l-Erlenmeyerkolben wurden 1%ig mit einer Übernachtskultur von *E. coli* (JM109 oder S17-1) angeimpft und bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ zwischen 0,6 und 1,0 wurden die Zellen zunächst für 15 min auf Eis gekühlt und abgeerntet (4.000 g; 15 min; 4°C). Die Zellsedimente wurden in jeweils 500 ml sterilem Wasser (Roth) resuspendiert und erneut sedimentiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit jeweils 250 ml sterilem Wasser, wurden die beiden Zellsedimente in 20 ml 10%igem Glycerin vereint. Nach einer weiteren Zentrifugation (4.000 g; 15 min; 4°C) wurde das Zellsediment in 3 ml 10%igem Glycerin resuspendiert, in 50 - 150 µl Aliquots aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.6 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen zur Hitzeschock-Transformation

Die Herstellung kompetenter Zellen des *E. coli* Stammes M15[pREP4] zur Hitzeschock-Transformation erfolgte entsprechend den Anweisungen des Handbuchs „The QIAexpressionist™“ (Qiagen, Juni 2003).

2.2.7 Elektrotransformation von *E. coli* JM109 und S17-1

40 µl elektrokompenter *E. coli* Zellen (2.2.5) wurden auf Eis aufgetaut und mit 1 bis 3 µl Plasmid-DNA (5 - 100 ng) vorsichtig gemischt. Nach Überführung dieses Ansatzes in eine Elektrotransformationsküvette und deren Einsetzen in einen *E. coli* Pulser (BioRad), wurde ein 5 ms andauernder

Spannungsimpuls von 2,4 kV angelegt. Die Zellen wurden daraufhin sofort in 1 ml Standard I-Medium aufgenommen und für 60 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden jeweils 100 µl verschiedener Verdünnungsstufen $10^0 - 10^{-5}$ auf Standard I-Platten mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert.

2.2.8 Hitzeschock-Transformation von *E. coli* M15 [pREP4]

200 µl Hitzeschock-kompetenter Zellen (2.2.6) wurden auf Eis aufgetaut und mit 50 - 100 ng Plasmid-DNA gemischt. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis und einem anschließenden Hitzeschock für 90 sec bei 42°C wurden die Zellen erneut für 5 min auf Eis gelagert. Die Suspension wurde in 1 ml Standard I Medium aufgenommen und für 1 h unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden jeweils 100 µl verschiedener Verdünnungsstufen $10^0 - 10^{-5}$ auf Standard I-Platten mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert.

2.2.9 Konjugation von Plasmid-DNA nach *R. sphaeroides*

Die Übertragung von Plasmid-DNA nach *R. sphaeroides* erfolgte mittels Konjugation. Hierfür wurde zunächst das zu konjugierende Plasmid in den *E. coli* Stamm S17-1 transformiert (2.2.7). Dieser transformierte Stamm diente anschließend als Donor des Plasmids in einer diparentalen Konjugation mit *R. sphaeroides* als Rezipienten. 1,5 ml einer *R. sphaeroides* Übernachtskultur, gemischt mit 150 µl einer S17-1 Übernachtskultur, wurden zusammen geerntet (5.000 g; 5 min) und in 1 ml RÄ-Medium vorsichtig gewaschen. Nach erneuter Zellernte (5.000 g; 5 min) wurde das Sediment vorsichtig in 100 µl RÄ-Medium aufgenommen und auf einen sterilen Membranfilter überführt, wobei dieser Filter zuvor auf eine PY-Platte (*peptone yeast*) platziert wurde. Dieser Ansatz wurde anschließend für etwa 3 - 4 h bei 32°C inkubiert. Daraufhin wurde die Filtermembran mit 500 µl RÄ-Medium abgespült. Von dieser Zellsuspension wurden je 100 µl der Verdünnungsstufen 10^0 bis 10^{-3} auf RÄ-Platten mit entsprechenden Antibiotika-Zusätzen ausplattiert und für 3 - 4 Tage bei 32°C inkubiert.

2.3 Molekularbiologische Methoden

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

Alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmide wurden aus *E. coli* Zellen nach dem Prinzip der alkalischen Lyse isoliert (Birnboim & Doly, 1979). Hierfür wurden 1,5 ml einer Übernachtskultur geerntet (8.000 g, 10 min, 4°C) und das Zellsediment in 200 µl Lösung I resuspendiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 200 µl der Lösung II und eine 15-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Nach Zugabe von 200 µl eiskalter Lösung III und einer 20-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zelltrümmer, aggregiertes Protein, denaturierte chromosomale DNA und ausgefallenes Kalium-Dodecylsulfat mit 15.000 g für 15 min bei 4°C abzentrifugiert. Daraufhin wurde die Plasmid-DNA im Überstand mit Isopropanol gefällt (2.3.6).

<u>Lösung I</u>		<u>Lösung II</u> (frisch angesetzt)	
50 mM	Glucose	200 mM	NaOH
10 mM	EDTA	1 % (w/v)	SDS
25 mM	Tris/HCl pH 8	<u>Lösung III</u>	
2 µg/ml	RNase A	3 M	Kaliumacetat pH 5,6

2.3.2 Isolierung von chromosomaler DNA aus *R. sphaeroides*

Zur Isolierung chromosomaler DNA aus *R. sphaeroides* wurden 20 ml einer mikro-aerob gewachsenen Übernachtskultur (OD_{660} 0,8) geerntet (5.000 g, 5 min) und das Zellsediment in 567 μ l TE-Puffer aufgenommen. Darauf folgten die Zugabe von 30 μ l einer 10%igen (w/v) SDS-Lösung und 13 μ l Proteinase K (20 mg ml⁻¹), welche zur Lyse sowie zum Abbau des Zellproteins während einer 1 - 2 stündigen Inkubation bei 37°C führten. Nach einer gründlichen Durchmischung mit 100 μ l 5 M NaCl wurden 80 μ l CTAB/NaCl-Lösung hinzugefügt und dieser Ansatz für 10 min bei 65°C inkubiert. In einem ersten Waschschrift mit 1Vol Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) und anschließender Zentrifugation (15.000 g, 10 min) wurden bereits größere Mengen von Proteinresten und Zelltrümmern entfernt. Der obere wässrige Überstand wurde abgenommen und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die eigentliche Reinigung der DNA erfolgte anschließend mittels Phenol/Chloroform Extraktion (2.3.4) und Isopropanol Fällung (2.3.6).

TE-Puffer: 10 mM Tris/HCl; 1 mM EDTA; pH 7,5

CTAB/NaCl-Lösung: 10 % CTAB (w/v; Sigma-Aldrich, Seelze); 0,7 M NaCl

2.3.3 Isolierung von Gesamt-RNA aus *R. sphaeroides*

Die Hot-Phenol Methode diente der Isolierung von RNA aus *R. sphaeroides*. Das Zellpellet einer 40 ml Kultur (OD_{660} 0,4 - 0,8) wurde zunächst in 150 μ l gekühltem Resuspensions-Puffer aufgenommen. Nach Zugabe von 250 μ l Lyse-Puffer und Vortexen wurde die Zellsuspension für 90 sec bei 65°C inkubiert. Auf dieses Zelllysate wurden 500 μ l 65°C warmes, wassergesättigtes Phenol gegeben. Nach kräftigem Vortexen wurde dieser Ansatz für 3 min bei 65°C im Wasserbad inkubiert. Hiernach wurde das Reaktionsgefäß für 30 sec in flüssigen Stickstoff überführt und im Anschluss für 15 min bei 15.000 g in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Nach erfolgter Phasentrennung wurde der wässrige Überstand, zu diesem Zeitpunkt stark rötlich gefärbt, in eine neues Reaktionsgefäß überführt. Die erneute Zugabe von 500 μ l 65°C warmen, wassergesättigten Phenols, einschließlich der Inkubation im Wasserbad, dem Stickstoffbad und der Zentrifugation, wurde mindestens noch zweimal wiederholt, bis sich keinerlei rötliche Verfärbungen des wässrigen Überstandes mehr ergaben. Zum Auswaschen der Phenolreste wurde die wässrige Phase anschließend mit 500 μ l Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) gemischt und 5 min bei 15.000 g zentrifugiert. Die obere Phase wurde kontaminationsfrei abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die darin enthaltenen Nukleinsäuren wurden mittels Ethanol gefällt (2.3.5).

Resuspensions-Puffer: 300 mM Saccharose; 10 mM Natriumacetat (pH 4,5); gekühlt

Lyse-Puffer: 2 % SDS; 10 mM Natriumacetat (pH 4,5)

2.3.4 Phenol/Chloroform-Extraktion

Reste von Proteinen in verdünnten Nukleinsäure-Lösungen, z.B. nach einer PCR (2.3.7) oder *in vitro* Transkriptionen (2.5.1) wurden durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion entfernt. Hierfür wurde die Lösung auf mindestens 100 μ l mit ddH₂O aufgefüllt und anschließend das gleiche Volumen an Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) hinzugegeben. Nach guter Durchmischung wurde für 20 min mit 15.000 g bei Raumtemperatur zentrifugiert, dabei kam es zu einer Phasentrennung. In der unteren organischen Phase und insbesondere an der Interphase befand sich das denaturierte Protein und in der darüber liegenden wässrigen Phase die gelösten Nukleinsäuren. Dieser Überstand wurde

vorsichtig abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß überführt und zur Entfernung von gelöstem Phenol in dem gleichen Volumen an Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) ausgeschüttelt und erneut zentrifugiert (15.000 *g*, 20 min). Die hiernach im Überstand enthaltene DNA oder RNA wurde mittels Ethanol oder Isopropanol-Präzipitation gefällt.

2.3.5 Ethanol-Präzipitation

Die Ethanol-Präzipitation wurde zur Isolierung von Gesamt-DNA und RNA aus *R. sphaeroides* angewandt. Der Nukleinsäure-Lösung wurden zunächst ein 1/10 ihres Volumens an 3 M Natriumacetat (DNA: pH 5,1; RNA: pH 4,5) zugegeben. Die Fällung erfolgte nach Zugabe des 2,5-fachen Volumens an 96 % Ethanol für etwa 30 min auf Eis oder über Nacht bei -20°C. Die ausgefallenen Nukleinsäuren wurden zentrifugiert (15.000 *g*, 10 min, 4°C), das Präzipitat mit 70%igem Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert, in der Vakuumzentrifuge getrocknet und in ddH₂O aufgenommen. Bis zur Weiterverwendung wurden die Proben bei -20°C gelagert.

2.3.6 Isopropanol-Präzipitation

Diese Methode wurde sowohl bei der Aufreinigung von *in vitro* transkribierter RNA, als auch der Plasmid-Isolierung aus *E. coli* Zellen angewendet und ist insbesondere für die Fällung von Nukleinsäuren in größeren Flüssigkeitsvolumina geeignet, da ein geringeres Volumen an Isopropanol (gegenüber Ethanol) für eine effektive Präzipitation ausreicht. Dem Ansatz wurden 1/10 seines Volumens an 3 M Natriumacetat (pH 4,5) und das 0,7-fache Volumen an Isopropanol (99 %) zugegeben. Dieser Fällungsansatz wurde für mindestens 15 min bei RT stehen gelassen. Das Waschen und Trocknen des Präzipitats erfolgte analog zur Ethanol-Präzipitation.

2.3.7 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Die PCR wurde zur gezielten Vermehrung spezifischer DNA-Abschnitte genutzt, welche beispielsweise für die Klonierung von Proteinexpressions-Vektoren oder als *template* für die RNA *in vitro* Transkription benötigt wurden. Die in dieser Arbeit verwendeten DNA-Polymerasen: BioXact-long (Bioline), ACCUZYME (Bioline) und DeepVent (NEB) wurden entsprechend der Herstellerangaben eingesetzt. Als DNA-Matrizen dienten dabei sowohl chromosomale als auch Plasmid-DNA.

2.3.8 Overlay-PCR zur ortsspezifischen Mutagenese von Proteinen

Die *overlay* PCR diente dem gezielten Austausch einzelner Aminosäuren eines rekombinant in *E. coli* exprimierten Proteins. Die Wildtyp-Sequenz des Proteins lag hierbei bereits in einem entsprechenden Expressionsplasmid pQE70 vor. Zur Veränderung der gewünschten Nukleotide auf dem Expressionsplasmid wurden für diesen Bereich zwei zueinander vollständig komplementäre Primer (B & C) konstruiert, welche die gewünschte, veränderte Nukleotid-Sequenz enthalten (2.1.3). Ausgehend von jeweils einem der beiden Primer und einem entsprechenden äußeren Primer (A + B & C + D) wurden der 5'- bzw. 3'-Teil des Gens separat amplifiziert. Beide Fragmente wurden aufgereinigt und in einer weiteren PCR zusammen als zweiteiliges *template* eingesetzt. Als Primer dienten bei dieser PCR lediglich die beiden äußeren genflankierenden Primer (A + D). Das resultierende PCR-Produkt bestand aus den beiden vereinigten Fragmenten, einschließlich der gewünschten Punktmutation und wurde in einen entsprechenden Expressionsvektor kloniert.

2.3.9 Gen-Deletion in *R. sphaeroides*

Die gezielte Inaktivierung eines Gens in *R. sphaeroides* erfolgte durch Insertion einer Km^r -Kassette auf Basis einer doppelt-homologen Rekombination. Hierfür wurden zunächst zwei etwa 500 bp lange, flankierende Fragmente des Gens amplifiziert. Das *up*-Fragment enthielt dabei etwa 300 bp der *upstream* Region, sowie die ersten 200 bp des Gens. Das *down*-Fragment entsprach den letzten ungefähr 200 bp des Gens, sowie den ersten 300 bp der unmittelbaren *downstream* Region. Beide Fragmente wurden aufeinander folgend mit 5'-3'-Orientierung in einen *suicide* Vektor pPHU281 (Tc^r) kloniert. Anschließend wurde zwischen beiden Fragmenten eine Kanamycin Resistenz-Kassette eingefügt. Das fertige pPHU281-Konstrukt (Tc^r, Km^r) wurde daraufhin mittels diparentaler Konjugation in *R. sphaeroides* eingebracht (2.2.9). Die Selektion auf positive Deletionsmutanten erfolgte zunächst über das Wachstum der Konjuganten auf Kanamycin-haltigen RÄ-Agar-Platten. Da pPHU281 in *R. sphaeroides* nur nach einer chromosomalen Insertion replizieren kann, verweist das Wachstum auf Kanamycin prinzipiell auf eine homologe Rekombination des pPHU-Konstruktes. Zur Unterscheidung einer doppelten von der ebenfalls möglichen einfachen homologen Rekombination, wurden Kanamycin-resistente Konjuganten zusätzlich auf eine Tetrazyklin-Resistenz selektiert. Eine derartige Resistenz ist nur durch eine einfache, homologe Rekombination des vollständigen pPHU281-Konstruktes in das Chromosom erklärbar und im Falle der Gen-Deletion unerwünscht. Nur Klone, welche kein Wachstum auf Tetrazyklin zeigten, wurden für eine nähere PCR-Analyse mit Deletions-spezifischen Primern herangezogen.

2.3.10 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Zur Konzentrationsbestimmung gelöster Nukleinsäuren wurde eine photometrische Messung der Proben am *NanoDrop* (PeqLab) durchgeführt.

2.4 Gelelektrophoresen

2.4.1 Agarosegele zur Auftrennung von DNA

Die Agarose-Gelelektrophoresen wurden zur qualitativen Beurteilung von Plasmid-Präparationen und zur Auftrennung von Restriktions- und PCR-Produkten, größer als 500 bp, verwendet. 0,8 bis 1,5 % (w/v) Agarose in 1 x TAE-Puffer wurden unter Aufkochen in der Mikrowelle gelöst und in einen Flachbettschlitten gegossen. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit DNA-Auftragspuffer versetzt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte für etwa 1 h bei 80 mA in 1 x TAE-Puffer. Im Anschluss an den Gellauf wurde das Gel für etwa 15 min in einer Ethidiumbromid-Lösung ($2 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$) geschüttelt und für weitere 10 min in Wasser gewaschen. Das Ethidiumbromid interkaliert dabei zwischen die Basen doppelsträngiger DNA, und es kommt, unter Anregung dieses Komplexes mit UV-Licht, zur Emission von Fluoreszenzlicht, welches mit einer DCC-Kamera aufgenommen wurde.

2.4.2 Extraktion von DNA aus Agarose-Gelen

Präparative Agarose-Gele wurden für maximal 2 min in einer Ethidiumbromid-Lösung gefärbt. Während einer kurzzeitigen Betrachtung des Gels unter UV-Licht mit geringer Intensität wurde die gewünschte Bande mit Hilfe eines Skalpell markiert. Daraufhin wurde das entsprechende Gelstück vollständig ausgeschnitten und mehrfach mit ddH₂O gewaschen. Nach kurzem Einfrieren wurde das Gelstück in „halb-aufgetautem“ Zustand zerkleinert und auf einen improvisierten Glaswolle-Filter in einem Eppendorfgefäß gegeben. Nach einer 2-minütigen Zentrifugation mit 15.000 g befand sich das gewünschte DNA-Fragment in dem wässrigen Filtrat. Die DNA wurde anschließend mit

Phenol/Chloroform extrahiert (2.3.4) und mit Ethanol gefällt (2.3.5).

2.4.3 TBE/PAA-Gele zur Auftrennung kurzer DNA-Fragmente

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten mit einer erwarteten Größe unter 500 bp, wurden vertikale Minigelsysteme mit 1 mm dicken, 10%igen TBE/PAA-Gelen (PAA, Polyacrylamid) und einem 1 x TBE Puffersystem verwendet. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit DNA-Auftragspuffer versetzt. Die anschließende elektrophoretische Auftrennung erfolgte für max. 1,5 h bei 150 V. Auch bei diesen Gelen diente die Ethidiumbromid-Färbung der Visualisierung der aufgetrennten DNA (2.4.1).

2.4.4 Denaturierende TBE/PAA-Gele zur Auftrennung von RNA und cDNA

In dieser Arbeit wurden denaturierende Harnstoff/PAA-Gele in verschiedenen Ausführungen genutzt. Vor dem Gießen der Gele wurden entsprechende *spacer* und verwendete Glasplatten gründlich gereinigt, wobei die Ohrenplatte des Glasplatten-Sets regelmäßig silanisiert wurde.

2.4.4.1 Denaturierende TBE/PAA-Gele für RNA-Degradationsassays

Für die Auftrennung von Ansätzen der RNA-Degradationsassays wurden 10%ige PAA-Gele mit 8 M Harnstoff, des Formates 18 x 18 cm x 0,4 mm Dicke, gegossen. Die Elektrophorese erfolgte in 1 x TBE-Puffer bei 500 V für etwa 45 min. Als Orientierung diente stets die Lauffront des im RNA-Auftragspuffer enthaltenen Bromphenolblaus. Da in dieser Arbeit vorrangig Einzelnukleotide als Degradationsprodukte auftraten, wurde die Gelelektrophorese gestoppt, sobald sich die Bromphenolblau-Bande etwa 6 cm vor dem Gel-Ende befand, um ein Auslaufen dieser Nukleotide zu verhindern. Das Gel wurde anschließend auf ein *Whatman*-Papier übertragen und auf einem Vakuumtrockner bei 80°C für 1 h bis 1,5 h getrocknet. Das getrocknete Gel wurde auf einem *Phosphorimaging screen* über Nacht exponiert. Dieser *screen* wurde anschließend in einem *Phosphorimager (Molecular Imager FX, BioRad)* ausgelesen.

9,6 g	Harnstoff
2 ml	10x TBE-Puffer
5 ml	Acryl/Bisacrylamid (37,5:1)
100 µl	APS (6 % w/v)
10 µl	TEMED
ad 20 ml	ddH ₂ O

2.4.4.2 Denaturierende TBE/PAA-Gele für *Northern Blot* Analysen

Die Gele für *Northern Blot* Analysen hatten das Format 18 x 18 cm x 0,8 mm Dicke. Die Polyacrylamid-Konzentration betrug 10 %, mit 7 M Harnstoff. Vor dem Auftragen der RNA-Proben (7,5 µg/Spur) wurden diese in entsprechendem Volumen 2 x FU-Mix aufgenommen und für 10 min bei 65°C denaturiert. In manchen Fällen wurden die Gele auch für eine Ethidiumbromid-Färbung (2.4.1) der aufgetrennten RNA genutzt, die aufgetragene RNA Menge betrug hierbei maximal 2 µg. Die Elektrophorese erfolgte in 1 x TBE-Puffer und nach einer 10-minütigen Einlaufphase bei 100 V wurden die Gele bei 250 V für etwa 2,5 h gefahren. Die anschließende Vorgehensweise für eine *Northern Blot* Analyse ist im Abschnitt 2.5.10 beschrieben.

16,8 g	Harnstoff
4 ml	10 x TBE-Puffer
5 ml	Acryl/Bisacrylamid (37,5:1)
200 µl	6 % (w/v) APS
20 µl	TEMED

2.4.4.3 Sequenzier-Gele

Die Auftrennung der Proben aus den *Primer Extension* Analysen, sowie den *RNase Protection* Assays, einschließlich der entsprechenden Sequenzier-Reaktionen, erfolgte auf 40 x 20 cm x 0,4 mm Sequenzier-Gelen. Für eine bessere Auftrennung und Reproduzierbarkeit dieser Gele wurden die vorgemischten Komponenten des *Sequencing Kit-7* der Firma AppliChem genutzt. Die Elektrophorese erfolgte nach einer Vorlaufzeit von etwa 1 h mit 1 x TBE-Puffer bei 38 W. Während dieser Zeit wurde die optimale Temperatur für die Elektrophorese von 50°C erreicht. Für eine gleichmäßige Wärmeverteilung im Gel wurde eine zusätzliche Metallplatte auf eine der Glasplatten platziert. Die Laufzeit der Elektrophorese richtete sich nach der erwarteten Größe der aufgetragenen Proben und variierte zwischen 2,5 - 4 h. In vereinzelt Fällen wurden auch Proben der RNA-Degradationsassays auf 10%igen Sequenziergelen aufgetrennt. Um das Auslaufen kleiner Degradationsprodukte zu verhindern, betrug die Laufzeit hierbei maximal 1 h bei 38 W. In diesen Fällen befand sich die Lauffront des Bromphenolblaus nach der Elektrophorese nicht näher als 15 cm vor dem Gel-Ende. Nach Beendigung des Lauf wurden die Gele wie in (2.4.4.1) beschrieben weiter behandelt, wobei die Trocknungsdauer mindestens 1,5 h betrug.

2.4.4.4 Präparative Gelelektrophorese von denaturierenden Harnstoff/PAA-Gelen

Sämtliche radioaktiv markierte RNA Transkripte wurden mittels präparativer Gelelektrophorese aufgereinigt. Die verwendeten Gele unterschieden sich hierbei lediglich in der Größe der Taschen von einem typischen PAA-Harnstoff-Gel für die RNA Degradationsstudien (2.4.4.1). Die Dauer der Elektrophorese belief sich auf etwa 2 h bei 500 V, um sicher zu stellen, dass sich nicht inkorporierte, radioaktive Nukleotide der Markierungsreaktionen bereits im Anoden-Puffer und nicht mehr im Gel befanden. Nach Entfernen der Ohrenplatte wurde das Gel zweilagig in herkömmliche Frischhaltefolie eingewickelt und auf einem Röntgenfilm für etwa 15 min exponiert. Der entwickelte Röntgenfilm konnte anschließend zur Identifizierung der auszuschneidenden RNA-Banden auf dem Gel genutzt werden. Die Banden wurden möglichst kleinflächig ausgeschnitten und in 200 µl RNA-Elutionspuffer in einem Eppendorfgefäß überführt. Nach einer 2-stündigen Inkubation bei Raumtemperatur und gelegentlichem Vortexen wurde das Reaktionsgefäß kurz zentrifugiert (15.000 g, 2 min) und das Eluat in neues Reaktionsgefäß gegeben. Die Gelstücke wurde noch zweimal mit jeweils 200 µl RNA-Elutionspuffer, wie beschrieben, behandelt. Die entsprechenden Eluate wurden dabei jeweils vereint und abschließend einer Phenol/Chloroform-Extraktion unterzogen. Die Fällung der RNA erfolgte anschließend mit Isopropanol.

RNA-Elutionspuffer

500 mM	Natriumacetat
1 mM	EDTA
2,5 % (v/v)	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)

2.4.5 Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie diente der Unterscheidung verschiedener Nukleotide, welche als Degradationsprodukte in RNA-Degradationsassays auftraten. Als stationäre Phase wurden 0,1 mm Cellulose MN 300 Polyethylenimin-Platten (MN 300 PEI; Marchery-Nagel) verwendet und als Laufmittel diente 0,9 M Guanidiniumchlorid (GdmCl). Die Proben eines RNA-Degradationsassays wurden jeweils in 2 µl-Schritten punktgenau auf einer PEI-Platte aufgetragen. Nach einer 10-minütigen Trocknungsphase bei Raumtemperatur wurde die Platte zunächst für weitere 10 min in 99 % Methanol eingelegt. Nach erneuter Trocknung wurde die Platte in einer Dünnschicht-

Chromatographie Kammer aufrecht platziert. In dieser Kammer wurden bereits zuvor 0,9 M GdmCl auf eine Höhe von 1 cm vorgelegt. Der Chromatographie-Lauf erfolgte in der geschlossenen Kammer für etwa 1 h bis zur vollständigen Sättigung des Trägermaterials mit dem Laufpuffer. Anschließend wurde die PEI-Platte bei Raumtemperatur getrocknet, in Klarsichtfolie eingewickelt und auf einem *Phosphorimaging screen* über Nacht exponiert. Das Auslesen des *screens* erfolgte auf einem Molecular Imager FX (Biorad).

2.4.6 SDS-Polyacrylamidgele zur Auftrennung von Proteinen

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, basierend auf der diskontinuierlichen Zonenelektrophorese nach Laemmli, diente der Auftrennung von Proteingemischen (Laemmli, 1970). Das in dieser Arbeit verwendete Gelelektrophorese-System bestand aus 15 x 18 x 0,8 mm Gelen (H x B x T), wobei das Trenngel etwa 2/3 der Höhe einnahm. Die verwendeten Acryl/Bisacrylamid-Konzentrationen im Trenngel beliefen sich je nach Bedarf auf 8 bis 12 %, die Konzentration im Sammelgel betrug stets 5 %. Zur Vorbereitung der Proteinproben wurden diese mit entsprechenden Mengen des 4 x Auftragspuffer für SDS-PAA-Gele versetzt und für 5 - 10 min bei 95°C denaturiert, anschließend erfolgte der Gelauftrag. Die Gelelektrophorese erfolgte in 1 x Laemmli-Puffer bei maximal 270 V für 2 - 3 h.

Trenngel		Sammelgel	
6,25 ml	4 x Puffer für SDS-PAA-Trenngele	4,0 ml	4 x Puffer für SDS-PAA-Sammelgele
5 -7,5 ml	40 % Acryl/Bisacrylamid (37,5:1)	2 ml	40 % Acryl/Bisacrylamid (37,5:1)
200 µl	6 % (w/v) APS	120 µl	6 % (w/v) APS
20 µl	TEMED	12 µl	TEMED
ad 25 ml	ddH ₂ O	ad 9,8 ml	ddH ₂ O

2.5 RNA-Methoden

2.5.1 *In vitro* Transkription

Die *in vitro* Transkription diente der Herstellung diverser radioaktiv markierter RNA-Substrate für RNA-Degradationsstudien und den Sonden für die *RNase Protection Assays*. Entsprechend der Art der gewünschten radioaktiven Markierung unterscheiden sich die jeweiligen *in vitro* Transkriptionsansätze voneinander. Generell wurde für alle Transkriptionen die T₇-RNA-Polymerase verwendet, als *templates* dienten doppelsträngige PCR-Produkte oder linearisierte Plasmide. In diesen Transkriptionsvorlagen liegt der T₇ spezifische Promoter unmittelbar vor der *sense* Sequenz der gewünschten RNA. Die Reaktionsansätze für eine *in vitro* Transkription von „kalter“ und intern radioaktiv markierter RNA setzten sich wie folgt zusammen:

intern markierte <i>in vitro</i> Transkripte			„kalte“ <i>in vitro</i> Transkripte		
x	µl	<i>template</i>	x	µl	<i>template</i>
2,5	µl	10 x T ₇ RNA-Pol. Puffer	2,5	µl	10 x T ₇ RNA-Pol. Puffer
2	µl	MgCl ₂ (40 mM)	2	µl	MgCl ₂ (40 mM)
1	µl	DTT (100 mM)	1	µl	DTT (100 mM)
2	µl	<i>low</i> U-Mix	2	µl	NTPs (total 100 mM)
0,5	µl	RNasin (40 u/µl)	0,5	µl	RNasin (40 u/µl)
3	µl	[α- ³² P]-UTP	1,5	µl	T ₇ RNA-Pol. (50 u/µl)
1,5	µl	T ₇ RNA-Pol. (50 u/µl)	ad 25	µl	ddH ₂ O
ad 25	µl	ddH ₂ O			

template: Plasmid: 4 µg, PCR-Produkt: 1,5 µg
low U-Mix: ATP, CTP, GTP je 25 mM, UTP 5 mM
[α-P32]-UTP: (3000 Ci/mmol; 10 µCi/µl)

Diese Ansätze wurden für maximal 3 h bei 37°C inkubiert. Radioaktive Ansätze wurden nach Zugabe von 25 µl 2 x FU-Mix für 5 min bei 65°C denaturiert und anschließend über präparative Gelelektrophorese aufgereinigt. Nicht radioaktive Reaktionsansätze wurden zunächst mit Phenol/Chloroform extrahiert, mit Isopropanol gefällt und einem DNase I Verdau unterzogen. Nach erneuter Phenol Extraktion des *in vitro* Transkriptes und der Isopropanol-Fällung fand eine qualitative Beurteilung der Proben auf denaturierenden TBE/PAA-Gelen statt.

2.5.2 5'-Endmarkierung von RNA-Transkripten

Zwei verschiedene radioaktive 5'-Endmarkierungen wurden in dieser Arbeit angewendet. Beide Methoden führen zu jeweils unterschiedlichen Positionen des [³²P] am 5'-Ende der *in vitro* Transkripte.

2.5.2.1 5'-Endmarkierung mit der T₄ Polynukleotidkinase

Das Enzym Polynukleotidkinase katalysiert unter anderem die Übertragung eines γ-Phosphatrestes von [γ-P³²]-ATP auf die endständige 5'-Hydroxylgruppe von RNA. Für diese Art der Endmarkierung wurde das aufgereinigte, kalte *in vitro* Transkript zunächst dephosphoryliert. Hierfür wurde eine Phosphatase (*calf intestine phosphatase*, CIP) von New England Biolabs entsprechend der Herstellerangaben eingesetzt. Nach Phenolextraktion des dephosphorylierten RNA-Transkriptes, wurde dieses mit [γ-P³²]-ATP und einer Polynukleotidkinase inkubiert. Ein entsprechender Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

X	µl	RNA (50 pmol)
2	µl	10 x T ₄ PNK Puffer (NEB)
3	µl	[γ-P ³²]-ATP (3000 Ci/mmol; 10 µCi/µl)
1,5	µl	T4-PNK (10 u/µl)
ad 20	µl	ad 20 µl ddH ₂ O

Dieser Ansatz wurde für 1 bis 1,5 h bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 20 µl 2 x FU-Mix und Denaturierung durch Erhitzen bei 65°C für 5 min wurde die radioaktiv markierte RNA durch präparative Gelelektrophorese aufgereinigt.

DNA-Oligonukleotid-Sonden für *Northern Blot* Analysen wurden ebenfalls mit der T₄ Polynukleotidkinase markiert. Hierfür wurden 20 pmol Oligonukleotid-Sonde und 2 µl [γ-P³²]-ATP (3000 Ci/mmol; 10 µCi/µl) eingesetzt. Nach einer 1-stündigen Inkubation bei 37°C wurden diese Ansätze mittels G25-Säulen (GE Healthcare) entsprechend den Herstellerangaben aufgereinigt.

2.5.2.2 5'-Endmarkierung durch *in vitro* Transkription mit [γ-P³²]-GTP

Die Promotorsequenz der T₇ RNA-Polymerase erzwingt den Einbau eines GTP als erstes Nukleotid des entstehenden *in vitro* Transkripts. Wird in einem *in vitro* Transkriptionsansatz [γ-P³²]-GTP verwendet, so wird dieses in gewissem Umfang an der Nukleotid-Position 1 eingebaut und es entsteht ein 5'-radioaktiv markiertes RNA-Transkript mit einem triphosphorylierten 5'-Ende. Die spezifische Aktivität des resultierenden RNA-Transkriptes ist jedoch deutlich geringer als bei den beiden oben erwähnten Markierungsvarianten. Ein entsprechender Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

X	μl	template
2,5	μl	10 x T ₇ RNA-Polymerase-Puffer
2	μl	MgCl ₂ (40 mM)
1	μl	DTT (100 mM)
2	μl	low G-Mix
0,5	μl	RNasin (40 u/μl)
3	μl	[γ-P ³²]-GTP (3000 Ci/mmol; 10 μCi/μl)
1,5	μl	T ₇ RNA-Pol. (50 u/μl)
ad 25	μl	ddH ₂ O

template: Plasmid: 4 μg; PCR-Produkt: 1,5 μg

low G-Mix: ATP, CTP, UTP je 25 mM, GTP 5 mM

Dieser Ansatz wurde für maximal 3 h bei 37°C inkubiert und nach Zugabe von 25 μl 2 x FU-Mix für 5 min bei 65°C denaturiert und mittels präparativer Gelelektrophorese aufgereinigt.

2.5.3 3'-Endmarkierung von RNA-Transkripten

Die T₄ RNA-Ligase wurde verwendet, um am 3'-Ende radioaktiv markierte RNA zu erzeugen. Dieses Enzym katalysiert die Ligation von 5'-[P³²]-pCp an das 3'-Hydroxyl-Ende von RNA. Für eine entsprechende Markierung wurde aufgereinigtes „kaltes“ *in vitro* Transkript mit 5'-[P³²]-pCp und der T₄ RNA-Ligase-1 von NEB inkubiert. Ein derartiger Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

x	μl	RNA (100 pmol)
3	μl	10 x T ₄ RNA-Ligase-1 Puffer (1 mM ATP; NEB)
3	μl	DMSO (99 %; Fermentas)
2,5	μl	pCp (3000 Ci/mmol; 10 μCi/μl)
1,5	μl	T ₄ RNA-Ligase-1 (10 u/μl; NEB)
ad 30	μl	ddH ₂ O

Dieser Ansatz wurde für 15 h bei 16°C inkubiert und daraufhin nach Zugabe von 30 μl 2 x FU-Mix für 5 min bei 65°C denaturiert und mittels präparativer Gelelektrophorese aufgereinigt.

2.5.4 Quantifizierung der radioaktiv markierten RNA

Die Quantifizierung radioaktiv markierter RNA erfolgte mit Hilfe eines Szintillations-Zählers (LS 6500 Beckman Coulter) durch Messung der Tscherenkow-Strahlung. Die spezifische Aktivität intern markierter RNA wurde hierbei über die Einbaurrate des eingesetzten [α-³²P]-UTP errechnet. Die Ermittlung der spezifischen Aktivität der 5'- und 3'-markierten RNA-Substrate erfolgte auf indirekterem Weg über eine Szintillations-Messung der ausgeschnittenen RNA-Banden des präparativen Gels. Die gemessene Radioaktivität wurde hierbei auf die eingesetzte Menge an RNA bezogen, abzüglich eines 20%igen Verlustes durch Degradation während der Markierungsreaktion. Eine genaue Quantifizierung des 5'-markierten Produktes nach *in vitro* Transkription mit [γ-P³²]-GTP konnte während dieser Arbeit nicht durchgeführt werden. Dieses markierte Nukleotid kann sowohl an Position 1 als auch intern in eine RNA inkorporiert werden. Im letzteren Fall geht hierbei jedoch das markierende [γ-P³²] „verloren“, eine Ermittlung der Einbaurrate dieses [γ-P³²]-GTP ist dadurch nur mit unverhältnismäßig hohem Aufwand möglich. Aus diesem Grund beruhte die Abschätzung der spezifischen Aktivität dieser *in vitro* Transkripte auf dem Vergleich der Ausbeute einer „kalten“ *in vitro* Transkription, bezogen auf die gemessene Radioaktivität nach Aufreinigung des markierten RNA-Ansatzes.

2.5.5 RNA-Degradationsassays

RNA-Degradationsassays dienten während dieser Arbeit der Untersuchung rekombinant aufgereinigter Proteine hinsichtlich ihrer ribonukleolytischen Aktivität mit diversen radioaktiv markierten RNA-Substraten. Die eingesetzte Menge an Substrat pro Reaktionsansatz entsprach dabei 800 - 1500 cpm, gemessen mit einem Szintillation-Zähler (LS 6500, Beckman Coulter). Das Probenvolumen eines einzelnen Ansatzes war stets 10 µl, wobei die jeweiligen Pufferbedingungen und verwendeten Proteinmengen experimentabhängig waren. Die Inkubation der Degradationsansätze erfolgte zumeist bei 32°C in einem vorgewärmten Heizschrank. Mit Ausnahme der Proben für die Dünnschicht-Chromatographie wurden alle Reaktionen durch Zugabe von 10 µl 2 x FU-Mix gestoppt. Unmittelbar vor dem Gelauftrag wurden die Ansätze für 5 min bei 65°C denaturiert, kurz abzentrifugiert und anschließend auf denaturierenden TBE/PAA-Gele geladen (2.4.4.1).

Die Proben für eine Dünnschichtchromatographie wurden nach entsprechender Inkubation auf Eis gelagert und direkt auf die PEI-Platten gespottet (2.4.5).

2.5.6 *In vitro* Prozessierung von Polysomen

Für die im Verlauf dieser Arbeit durchgeführten *in vitro* Polysomen-Prozessierungen wurden 200 ng RNase J~His₆ (3,5 pmol) mit einer 10 pmol entsprechenden Fraktion isolierter Polysomen inkubiert (2.6.9). Das Volumen eines entsprechenden Ansatzes betrug 10 µl mit einer finalen Konzentration von 20 mM NaCl, 30 mM NH₄Cl, 1,5 mM MgCl₂, 25 mM Tris pH 7,6. Dieser Ansatz wurde für 1 h bei 32°C inkubiert und anschließend mit ddH₂O auf 100 µl aufgefüllt. Hierauf folgte die Isolierung der ribosomalen RNA durch Phenol/Chloroform-Extraktion (2.3.4) und Isopropanol-Fällung (2.3.6).

2.5.7 *Primer Extension* Analyse

Primer Extension Analysen dienten in dieser Arbeit der Bestimmung der 5'-Enden diverser ribosomaler RNA-Moleküle. Hierfür wurde eine 19 bis 25 Nukleotide lange, radioaktiv markierte DNA-Sonde, welche komplementär ist, zu einer etwa 250 Nukleotide *downstream* vom erwarteten 5'-Ende gelegenen Region mit der RNA hybridisiert. Ausgehend von diesem Primer synthetisiert die Reverse Transkriptase eine cDNA bis zu dem entsprechenden 5'-Ende. Dieser reverse Transkriptionsansatz wurde auf einem Sequenzier-Gel aufgetrennt. Eine parallel hierzu aufgetrennte Sequenzier-Reaktion ermöglichte die exakte Lokalisation der entsprechenden 5'-Enden. Als *template* für die reverse Transkription wurden jeweils 5 µg der Gesamt-RNA bzw. der polysomalen RNA eingesetzt. Diese wurden in einem Gesamtvolumen von maximal 11 µl ddH₂O mit 2 pmol spezifischem Primer (2 x 10⁶ cpm) für 3 min bei 70°C denaturiert, kurz abzentrifugiert (30 sec, RT) und daraufhin für 10 min auf Eis hybridisiert. Erneut auf 42°C erwärmt, wurden 2,5 µl Natrium-pyrophosphat (40 mM, vorgewärmt auf 42°C) zugegeben. Anschließend erfolgte die Zugabe des AMV RT-Mix:

13,5 µl	RNA/Oligo/NaPP _i Hybridisierungsansatz
5 µl	5 x AMV Puffer (Promega)
2,5 µl	dNTP (total 40 mM)
0,75 µl	RNasin (40 u/µl)
2 µl	AMV Reverse Transkriptase (10 u/µl)
1,25 µl	ad 25 µl ddH ₂ O

Dieser Ansatz wurde für 45 min bei 42°C und anschließend für 15 min bei 52°C inkubiert. Die

Reaktion wurde durch Zugabe 25 µl 2 x FU-Mix gestoppt. Von diesem Ansatz wurden zunächst 10 µl auf einem Sequenzier-Gel aufgetrennt, um die optimale Auftragsmenge für einen eventuell notwendigen zweiten Lauf zu bestimmen.

2.5.8 RNase Protection Assays

Zur exakten Bestimmung der 3'-Enden diverser ribosomaler RNA wurden *RNase Protection Assays* durchgeführt. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Einzelstrang-spezifischen Degradation einer radioaktiv markierten RNA-Sonde durch Inkubation mit einem RNase A/T₁ Mix. Die entsprechende RNA-Sonde wird dabei so konstruiert, dass diese mit etwa 100 bis 200 Nukleotiden komplementär zu dem erwarteten 3'-Ende der untersuchten RNA ist. Zusätzlich dazu sollte die RNA-Sonde einen etwa 100 nt langen 5'-Überhang besitzen. Nach Hybridisierung mit der untersuchten RNA wird der verbleibende einzelsträngige 5'-Bereich der Sonde bis zum Beginn der komplementären, doppelsträngigen Region durch Inkubation mit dem RNase A/T₁-Mix abgebaut. Die daraus resultierende Länge der verbliebenen RNA-Sonde gibt Aufschluss über das 3'-Ende der untersuchten RNA.

Die *RNase Protection Assays* wurden mit Hilfe des *HybSpeedTMRPA* Kit von Ambion (#1412) durchgeführt. Hierfür wurden zunächst je 10 µg RNA (Gesamt-RNA bzw. polysomale-RNA) zusammen mit etwa 1 pmol RNA Sonde (10⁶ cpm) für eine Aufkonzentrierung gefällt.

x µl RNA (10 µg)
x µl Sonde (1 pmol; 10⁶ cpm)
ad 15 µl ddH₂O
1,5 µl NH₃OAc (5 M)
37,5 µl EtOH (96 %) -> -20°C, 1 h -> 15.000 g, RT, 20 min

Die erhaltenen Präzipitate wurden direkt, ohne einen typischerweise durchgeführten 70 % Ethanol-Waschschritt, bei RT getrocknet. Nach Zugabe von je 10 µl *HybSpeedTM*-Hybridisierungspuffer, vorgewärmt auf 95°C, wurden die Präzipitate durch wiederholtes Vortexen für 15 sec und erneutes Erhitzen auf 95°C im Heizblock gelöst (3 - 5 x). Ein finaler Denaturierungsschritt wurde bei 95°C für 2 - 3 min durchgeführt. Zur Hybridisierung wurden die RNA-RNA-Sonden Ansätze zügig auf einen auf 68°C vorgewärmten Heizblock transferiert und für 10 min inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von jeweils 100 µl des verdünnten RNase A/T₁-Mix (1/100 in RNase-Puffer) und eine 30-minütige Inkubation bei 37°C. Die Zugabe von 150 µl des *HybSpeedTM* Inaktivierungs-Präzipitationspuffers stoppte die Reaktion. Zur Optimierung der anschließenden Fällung wurden den Ansätzen 50 µl 96%igen Ethanol hinzugefügt. Daraufhin wurden die Proben für mindestens 30 min bei -20°C gelagert. Nach 15-minütiger Zentrifugation (15.000 g, 4°C) wurde der Überstand unter Vorsicht möglichst vollständig abgenommen und verworfen. Da Rückstände des Überstandes kritisch für das spätere Laufverhalten der Proben auf einem Sequenzier-Gel sind, wurde die Probe, wenn nötig, nochmals für einige Sekunden abzentrifugiert und der verbleibende Überstand abgenommen. Die verbliebenen Pellets wurden zunächst bei RT getrocknet und dann in 10 µl Gel-Lade-Puffer 2 des *HybSpeedTMRPA* Kits aufgenommen. Intensives Vortexen und kurzes Abzentrifugieren führte zum Lösen der Präzipitate. Unmittelbar vor dem Beladen eines Sequenzier-Gels mit diesen Proben wurden diese für 4 min bei 95°C erhitzt, erneut gevortext und abzentrifugiert.

2.5.9 Sequenzier-Reaktionen

Die manuelle Sequenzierung verschiedener DNA-Sequenzen diente in dieser Arbeit der Herstellung

verschiedener Größenstandards. Derartige Sequenzier-Reaktionen wurden parallel mit Reaktions-Ansätzen der *Primer Extension Analyse* oder der *RNase Protection Assays* auf Sequenzier-Gelen aufgetrennt und ermöglichten eine exakte Beschreibung der Nukleotidabfolge an den detektierten 5'- bzw. 3'-Enden der untersuchten RNA. Die Sequenzier-Reaktionen wurden mit dem *T₇ Sequencing Kit* der Firma USB erstellt.

2.5.10 Northern Blot Analyse

Die in dieser Arbeit durchgeführten *Northern Blot* Analysen dienen dem spezifischen Nachweis kleiner RNAs mit einer Länge von 80 bis 200 Nukleotiden. Hierfür wurde zunächst Gesamt-RNA auf denaturierenden TBE/PAA-Gelen aufgetrennt und anschließend auf eine Nylonmembran geblottet, danach erfolgte die Detektion der RNA mittels radioaktiv markierter DNA-Oligonukleotid-Sonden. Für den Transfer der RNA auf die Nylonmembran wurden zunächst drei Lagen *Whatman*-Papier in 1 x TBE getränkt und auf der Anoden-Platte eines Elektro-Blotters (*PerfectBlue™Semi-Dry*, peqlab) platziert. Hierauf wurde eine Nylonmembran und das RNA-Gel aufgelegt. Abschließend folgten drei weitere Lagen 1 x TBE- getränktes *Whatman*-Papier, sowie die Kathoden-Platte des Elektro-Blotters. Nach einem 2,5-stündigem Elektrotransfer bei 250 mA wurde die transferierte RNA mittels *UV-crosslinking* (*UV-crosslinker*, Stratagene) auf der Membran fixiert. Die Prähybridisierung der Membran erfolgte für mindestens 1 h bei 55°C. Die Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten DNA-Oligonukleotid-Sonde (10⁶ cpm; (2.5.2.1)) erfolgte ebenfalls bei 55°C über Nacht. Anschließend wurde die Membran zweimal für je 30 sec gewaschen, in Folie eingeschweißt und auf einem *PhosphorImaging screen* exponiert. Die Expositionszeit richtete sich hierbei nach der Abundanz der zu detektierenden RNA und lag zwischen 30 min und 15 h. Der *screen* wurden anschließend in einem *PhosphorImager* (*Molecular Imager FX*, Bio-Rad) ausgelesen. Für die mehrmalige Verwendung einer Membran wurden zuvor gebundene Sonden durch Inkubation in 0,01 % SDS bei 95°C von einer Membran entfernt.

2.5.11 Differentielle 5'-RACE

Prähybridisierung (15 ml)	Hybridisierung	Wasch-Lösung
6 x SSC	6 x SSC	5 x SSC
0,5 % SDS	0,5 % SDS	0,01 % SDS
2,5 x Denhardt-Reagenz	0,1 mg/ml LSD	
0,1 mg/ml LSD (5 min 95°C)	10 ⁶ cpm + Sonde (5 min 95°C)	

Alle RACE-Methoden (*rapid amplification of cDNA ends*) beruhen auf der reversen Transkription einer RNA in deren, als cDNA (*complementary DNA*) bezeichnete, komplementäre, einzelsträngige DNA. Die methodischen Durchführungen sind vielfältig und deren Anwendungen sind Voraussetzung für heutzutage gängige sequentielle Transkriptom-Analysen die als *RNASeq* bezeichnet werden. Die differentielle 5'-RACE bezeichnet eine Methode, mit deren Hilfe es möglich ist, Aufschluss über den 5'-Phosphorylierungsstatus einer spezifischen RNA zu erhalten. Das wiederum ermöglicht die Unterscheidung eines Primärtranskriptes von dessen prozessierten Varianten. Die hierfür benötigte *tobacco acid pyrophosphatase* (TAP, Epicentre) entfernt das γ - und β -Phosphat an dem triphosphorylierten 5'-Ende einer RNA, wodurch ein monophosphoryliertes 5'-Ende entsteht. An dieses Ende wird ein 5'-Oligoribonukleotid-Adapter ligiert. Mit Hilfe eines komplementären Anti-Adapter Primer und eines sequenzspezifischen Primer wird anschließend durch RT-PCR das gewünschte Produkt amplifiziert. Ein 5'-triphosphoryliertes RNA-Fragment, welches keiner TAP-Behandlung unterzogen wird, erfährt bei dieser Art der 5'-RACE keine Amplifizierung. Parallele 5'-RACE Ansätze

mit bzw. ohne TAP-Behandlung bieten somit Aufschluss über den 5'-Phosphorylierungsstatus der untersuchten RNA.

10	µg	Gesamt-RNA (DNA frei)
10	µl	10 x TAP-Puffer
0,5	µl	RNasin (40 u/µl)
ad 99	µl	ddH ₂ O

Dieser Ansatz wurde halbiert und jeweils mit bzw. ohne Pyrophosphatase behandelt.

49,5	µl		49,5	µl	
0,5	µl	TAP (10 u/µl)	0,5	µl	ddH ₂ O

Es folgte eine Inkubation bei 37°C für 30 min.

In beide Ansätzen wurden 500 pmol des 5'-RNA-Adapters hinzugegeben. Nach einer Phenol/Chloroform-Extraktion und anschließender Ethanol-Fällung wurde die RNA in jeweils 14 µl ddH₂O aufgenommen. Dem schloss sich die RNA-Adapter-Ligation an. Die Proben wurden für 5 min bei 90°C denaturiert und zunächst für mindestens 5 min auf Eis gelagert.

14	µl	RNA/RNA-Adapter Mix
2	µl	10x T ₄ RNA-Ligase Puffer
2	µl	DMSO (99 %)
2	µl	T ₄ RNA-Ligase/RNasin (9:1)

Die Ligations-Ansätze wurden über Nacht bei 17°C inkubiert. Nach erneuter Phenol/Chloroform Extraktion und Ethanol Präzipitation wurde die RNA in 50 µl ddH₂O aufgenommen und eine RNA spezifische RT-PCR mit dem *One Step RT-PCR* Kit von Qiagen durchgeführt:

2	µl	ligierter RNA Ansatz	Thermo Cycler
2	µl	5 x RT-PCR Puffer	[min]
0,4	µl	dNTP-Mix	50°C 30:00
0,1	µl	RNasin (40 u/µl)	95°C 15:00
1,2	µl	Anti-Adapter Primer (10 µM)	94°C 00:30
1,2	µl	RNA spezifischer Primer (10 µM)	56°C 00:20 x 32
0,4	µl	RT-PCR-Enzym Mix (Qiagen)	72°C 00:30
2,7	µl	ddH ₂ O	72°C 10:00

Die Proben der RT-PCR wurden auf einem TBE/PAA-Gel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt.

2.5.12 RNASeq Transkriptom Analyse

Die RNASeq Analyse diente dem Vergleich der Transkriptome mikroaerob gewachsener Kulturen (OD₆₆₀ 0,4) von *R. sphaeroides* 2.4.1 und einer Deletionsmutante *Δrnj*. Die RNA wurde zunächst mit der Hot-Phenol Methode isoliert und einer DNase I Behandlung unterzogen. Nachdem eine Test-PCR (RSP_0799) bestätigte, dass keine DNA-Kontaminationen in den Proben vorlagen, folgte eine qualitative Analyse der Gesamt-RNA auf einem denaturierenden PAA-Gel. Da sich keine Anzeichen für eine unspezifische Degradation abundanter RNAs zeigten, wurden die RNA-Proben von biologischen Triplikaten gepoolt. Hiervon wurden 30 µg RNA mit Isopropanol gefällt und für die weitere Bearbeitung an *vertis* Biotechnologie AG, Freising versendet.

Die Präparation der cDNA Bibliotheken und deren Sequenzierung wurde von der *vertis* Biotechnologie AG durchgeführt und wird hier nur oberflächlich beschrieben. Nach Aufnahme der gefällten RNA in Wasser wurde diese mit Pyrophosphatase (*tobacco acid pyrophosphatase*, TAP)

behandelt. An die daraus resultierenden bzw. bereits zuvor vorhandenen 5'-Monophosphat Enden wurde ein RNA-Adapter ligiert. Unter Verwendung einer poly(A)-Polymerase wurden die 3'-Enden mit einem poly(A)-Schwanz versehen. Die *first-strand* cDNA-Synthese erfolgte mit Hilfe eines Oligo(dT)-Adapter Primer und einer reversen Transkriptase (*moloney murine leukemia virus reverse transcriptase*, RNase H minus, M-MLV H⁻). Die anschließende PCR Amplifikation und Sequenzierung wurde entsprechend den Anforderung für die Solexa Sequenzierplattform (Illumina) durchgeführt.

Die bioinformatische Aufarbeitung der erhaltenen Sequenz-Rohdaten, auch als *raw reads* bezeichnet, wurde von Konrad Förstner durchgeführt (Institut für Molekulare Infektionsbiologie, Uni Würzburg). Bedingt durch die cDNA-Synthese besitzen alle *raw reads* eine primerspezifische 5'-Sequenz, welche zunächst entfernt werden muss. Unter Verwendung des Programmes *Segemehl* wurde versucht, jedem einzelnen *raw read* eine Position auf dem Genom von *R. sphaeroides* 2.4.1 zuzuordnen, was als *mapping* bezeichnet wird. Alle *raw reads*, die nach diesem primären *mapping* nicht erfasst werden konnten, wurden hinsichtlich der Existenz eines potentiellen poly(A) Schwanzes untersucht, da dieser das primäre *mapping* verhindern kann. Nach Entfernung des potentiellen poly(A) Schwanzes wurde mit diesen *reads* ein sekundäres *mapping* durchgeführt, wobei jedoch nur *reads* zugelassen wurden, die länger als 11 Nukleotide waren. Die positiven *reads* des primären und sekundären *mapping* wurden kombiniert, um letztendlich die Anzahl an *reads* für jede einzelne Nukleotidposition der erfassten RNAs zu erhalten. Für den Fall, dass es mehrere mögliche Positionen auf dem Genom gab, wurden die *reads* gleichmäßig auf diese Positionen verteilt (*R. sphaeroides* besitzt beispielsweise drei fast identische ribosomale RNA Operons). Um einen tatsächlichen Vergleich zwischen den Daten der Wildtyp-RNA und der RNA der Deletionsmutante *Δrnj* zu ermöglichen, mussten diese Daten anschließend noch normalisiert werden. Aus diesem Grund wurde die Anzahl jeder einzelnen *read* Position durch die Gesamtzahl der *reads* eines Datensatzes geteilt (Bsp. Datensatz: Chromosom 1, Gesamtzahl der positiven *reads*: 100.000, erfasste Anzahl an *reads* für Nukleotidposition X: 50 *reads*. Der Wert nach der Normalisierung für diese Position beträgt: $5 \cdot 10^{-4}$). Da diese Art der Normalisierung zu teilweise sehr niedrigen Werten führt, welche von dem später verwendeten *Integrated Genome Browser* (IGB; www.bioviz.org/igb/) als 0 betrachtet werden, mussten alle Werte anschließend wieder mit einem konstanten Wert multipliziert werden. Hierbei entschied man sich für die niedrigste der Gesamt-Zahl an positiven *reads* in den zu vergleichenden Datensätzen (Bsp.: Datensatz 1: Chromosom 1, Gesamtzahl der positiven *reads*: 100.000, Datensatz 2: Chromosom 1, Gesamtzahl der positiven *reads*: 70.000. Der Multiplikationsfaktor für beide Datensätze nach der Normalisierung beträgt 70.000). Im Falle des Datensatzes 2 führt dieser Normalisierungs- und Multiplikationsprozess letztlich wieder zu den Ausgangswerten für die einzelnen Nukleotid Positionen. Zur Visualisierung der RNASeq Daten wurde der *Integrated Genome Browser* verwendet.

2.6 Protein - Methoden

2.6.1 Proteinmengenbestimmung

Für die Quantifizierung von Proteinen in einer Lösung wurde das Roti[®]-Nanoquant Reagenz von Roth genutzt. Die Verwendung entsprach hierbei den Herstellerangaben. Als Referenzprotein für die zu erstellende Eichgerade wurde BSA (*bovine serum albumin*, Serva) eingesetzt.

2.6.2 Nachweis von Proteinen durch Silberfärbung

Das in dieser Arbeit verwendete Protokoll für die Silberfärbung von Proteingelen basiert auf der Arbeit von Blum (Blum et al., 1987). Der exakte chemische Hergang dieser sensitiven Färbemethode ist zwar nicht geklärt, doch offensichtlich komplexieren Ag^+ -Ionen mit verschiedenen Aminosäureresten, sowie der Carbonylgruppe der Peptidbindung von Proteinen, wobei Formaldehyd diese Adsorption verstärkt. Die Reduktion dieser Ag^+ -Ionen zu elementarem Silber im alkalischen Milieu führt zu einer dunklen Färbung der Proteinbanden im Gel.

Vor der eigentlichen Färbung wurde das Gel zunächst für mindestens 1 h in Fixier-Lösung inkubiert. Nach drei 20-minütigen Waschschrritten mit 50 % Ethanol wurde das Gel für 1 min in Lösung 1 geschwenkt und anschließend gründlich mit entmineralisiertem Wasser gespült. Die anschließende Inkubation in der silbernitrat-haltigen Lösung 2 erfolgte für maximal 20 min, deren Rückstände wurden ebenfalls sorgfältig durch mehrmaliges Spülen mit entmineralisiertem Wasser entfernt. Die Entwicklung der Färbung erfolgte nach Zugabe von Lösung 3, wobei die Inkubationszeit zwischen etwa 30 und 90 sec variierte. Aufgrund der allmählichen Zunahme an unspezifischer Färbung des Hintergrunds, musste die Färbereaktion rechtzeitig durch Zugabe von Essigsäure abgebrochen werden.

Fixier-Lösung			Lösung 1		
50	% (v/v)	Methanol	0,1	g	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
12	% (v/v)	Essigsäure	ad 500	ml	ddH ₂ O
500	μl/l	Formaldehyd			
Lösung 2			Lösung 3		
0,4	g	AgNO_3	15	g	Na_2CO_3
187,5	μl	Formaldehyd	125	μl	Formaldehyd
ad 250	ml	ddH ₂ O	5	ml	Lösung 1
			ad 250	ml	ddH ₂ O

2.6.3 Herstellung eines RNase J~His₆ spezifischen Antiserums

Die Immunisierung eines Kaninchens, sowie die Aufbereitung eines polyklonalen Antiserums gegen RNase J~His₆ wurden von der Firma Davids Biotechnologie in Regensburg durchgeführt. Zuvor wurde die augenscheinlich reinste Elutionsfraktion einer RNase J~His₆ Nickel-Affinitätschromatographie in 1 x PBS dialysiert (2.6.5). Von dem erhaltenen Dialysat wurden 1,5 ml (Protein: 0,6 μg/μl) an die Firma Davids Biotechnologie versendet. Nach Erhalt des Immuserums konnte in Vorversuchen festgestellt werden, dass die Spezifität des Antiserums für die Zwecke dieser Arbeit ausreichend ist, weswegen auf eine weitere Aufreinigung der polyklonalen Antikörper des Antiserums verzichtet wurde.

2.6.4 Western Blot Analyse

Für den immunologischen Nachweis von Proteinen in einem Zelllysate wurden *Western Blot* Analysen durchgeführt. Hierfür wurde das Zellprotein auf SDS-PAA-Gelen aufgetrennt und mittels eines *semi-dry-blotting* Verfahrens auf Nitrocellulosemembranen transferiert. Nach Inkubation der Membran mit entsprechenden Antikörpern oder Antiseren erfolgte die Entwicklung der *Western Blot* Membranen auf Basis einer Peroxidase vermittelten Chemilumineszenz Reaktion und der Exposition auf Röntgenfilm.

2.6.4.1 Elektro-*blotting*

Zur Aktivierung der positiven Ladungsträger auf der Nitrocellulosemembran wurde diese zunächst für 5 min in Transfer-Puffer inkubiert, zusätzlich wurden *Whatman*-Papiere identischer Größe in Transfer-Puffer getränkt. Auf die Anoden-Platte der *blotting* Vorrichtung (*PerfectBlue™ Semi-dry*, peqlab) wurden, in der Reihenfolge, 3 Lagen *Whatman*-Papier, die Membran, das Gel und nochmals 3 Lagen *Whatman*-Papier blasenfrei gestapelt. Abschließend wurde die Kathoden-Platte aufgesetzt. Der elektrophoretische Transfer der Proteine erfolgte bei $1,2 \text{ mA/cm}^2$ für 1,5 h.

Transfer-Puffer: 25 mM Tris/HCl (pH 7,9); 192 mM Glycin; 20 % (v/v) Methanol (frisch zugegeben)

2.6.4.2 Ponceau Färbung

Unmittelbar nach dem *blotting* wurde die Membran für maximal 10 sec mit 1 x TBS gespült und anschließend mit Ponceau-S-Lösung gefärbt. Dieser Schritt diente neben der qualitativen Beurteilung der Transfereffizienz auch dem Fixieren der Proteine auf der Membran. Die weitere Behandlung der Membran, nach Entfärbung mit 0,1 M NaOH Lösung, erfolgte entsprechend den Anforderungen des jeweilig verwendeten Antikörpers.

2.6.4.3 Antikörper Bindung

Für die immunologische Protein-Detektion wurden ein Peroxidase-gekoppelter α -*hexa*-His Antikörper (Sigma-Aldrich), sowie das Antiserum eines Kaninchens, nach Immunisierung mit aufgereinigter RNase J~His₆, in Verbindung mit einem sekundären Peroxidase-gekoppelten α -*rabbit*-IgG Antikörper (Pierce-ThermoScientific) verwendet. Die generelle Behandlung einer Membran unterschied sich nicht für die beiden Antikörper, Abweichungen gab es nur bei den jeweils verwendeten Puffern (s. u.). Alle Inkubationsschritte erfolgten in Hybridisierungsröhrchen auf einem Taumelrollmischer bei Raumtemperatur, eventuelle Übernacht-Inkubationen erfolgten bei 4°C. Zur Absättigung noch freier Bindestellen auf der Membran wurde diese zunächst in einer *blocking* Lösung für mindestens 1 h inkubiert. Nach zweimaligem Waschen für 5 min mit dem entsprechenden Puffer, erfolgte die Zugabe des jeweiligen Antikörpers und dessen Inkubation mit der Membran für 2 bis 4 Stunden. Danach wurde die Membran erneut zweimal für 5 min gewaschen. Im Falle des α -RNase J~His₆-Antiserums erfolgte eine weitere 1 bis 2-stündige Inkubation der Membran mit dem Peroxidase-gekoppelten α -*rabbit*-IgG Antikörper. Nach erneutem zweimaligen Waschen der Membran erfolgte die Entwicklung der *Western Blot* Membran.

	hexa-His-Antikörper		α -RNase J~His ₆ Antiserum	
Blocking	6 ml	5 % Milchpulver in PBS	6 ml	5 % Milchpulver in TBS
Wasch-Puffer		1 x PBS		1 x TBS
1.Antikörper	6 ml	1 % BSA 1 x PBS 0,05 % (w/v) Tween20 1:5000 α - <i>hexa</i> -His AK	6 ml	1 x TBS 1:1000 α -RNJ~His ₆ Serum
2.Antikörper			6 ml	TBS 1:8000 α - <i>rabbit</i> IgG AK

2.6.4.4 Peroxidase vermittelte *Western Blot* Entwicklung

Als Substrat für die α -hexa-His Antikörper Peroxidase diente das *Lumi-Light Western Blotting Substrate* von Roche. In einer Glasschale wurde die Membran mehrfach, durch wiederholtes Aufziehen mit einer Pipette, mit einer 1:1 Mischung (1 ml) der beiden *Lumi-Light*-Lösungen 1 und 2 benetzt. Anschließend wurde die Membran zwischen zwei Klarsichtfolien platziert und in der Dunkelkammer unter Rotlicht auf einen Röntgenfilm aufgelegt. Kurzzeitiges Beleuchten der Randbereiche der Membran mit der Rotlichtlampe, *shadowing* genannt, erleichtert eine spätere Zuordnung der Signale auf dem Röntgenfilm. Die darauf folgende Expositionszeit in einer lichtdichten Filmkassette betrug 1 bis 15 Minuten. Die anschließende Röntgenfilm-Entwicklung erfolgte ebenfalls im Dunkeln unter Rotlicht. Der Röntgenfilm wurde für maximal 30 Sekunden in einem Entwicklerbad geschwenkt und nach Abtropfen in ein Wasserbad überführt. Nach dem Waschen, für etwa 30 Sekunden, wurde der Röntgenfilm in die Fixierlösung überführt.

2.6.5 Aufreinigung rekombinanter Proteine mittels Nickel-Affinitätschromatographie

Die Nickel-Affinitätschromatographie (Ni-IMAC; Nickel-immobilized-metal affinity chromatography) beruht auf der relativ spezifischen, nicht kovalenten Bindung von Histidinresten an zweiwertige Metallionen, so genannten Metallo-Chelatkomplexen (Porath et al., 1975). Die stationäre Phase dieser Säulenchromatographie besteht aus Agarose-Partikeln, an deren Oberfläche Nickel-Nitrilotriessigsäure-Reste (Ni-NTA; Nickel-nitrilotriacetic acid) gebunden sind. Das mit einem Histidintag versehene Protein bindet an die Ni²⁺-Ionen und kann anschließend durch Zugabe von Imidazol, einem Struktur analogon von Histidin, von der Säulenmatrix eluiert werden. Die Ni-IMAC wurde in dieser Arbeit zum einen verwendet, um rekombinante RNase J~His₆ und Varianten aus *E. coli* zu isolieren. Zum anderen wurde diese Methode für *Pull-Down* Experimente genutzt, um mögliche Interaktionspartner der RNase J~His₆ in *R. sphaeroides* zu identifizieren. Die generelle Handhabung der Nickel-Affinitätschromatographie entsprach den Herstellerangaben (The QIAexpressionist, Juni 2003, Qiagen).

Das Zellpellet einer 500 ml *E. coli* Kultur nach der Proteinexpression (2.2.4) wurde in 10 ml Lyse-Puffer (200 mM NaCl, 40 mM Tris/HCl pH 8, 5 % (w/v) Glycerin, 2 mM DTT, 2 mM PMSF) resuspendiert. Nach einem Ultraschall-Zellaufschluss auf Eis (Sonoplus GM70; 6 mal 30 sec, cycle: 70 %) wurden die Zelltrümmer abzentrifugiert (15.000 g, 15 min, 4°C). Der Überstand wurde mit 750 µl, zuvor mit Lyse-Puffer äquilibrierter, Nickel-NTA-Agarose zusammengeführt. Diese Suspension wurde für maximal 1 h auf einem Taumelrollmischer bei 4°C inkubiert. Nach dieser Adsorptionsphase wurde die Suspension auf eine 10 ml-Polypropylen-Säule (Qiagen) gegeben und die Säulenmatrix wurde mit 10 ml Lyse-Puffer gewaschen. Die anschließende Elution des „His₆-Proteins“ erfolgte schrittweise, wobei die Zugabe der Wasch-Puffer zunächst unspezifisch gebundenes Protein von der Säule entfernte, während die eigentliche Elution durch Zugabe der Elutions-Puffer erfolgte. Alle Wasch- und Elutionsfraktionen wurden auf Eis aufgefangen und zunächst bei 4°C gelagert. Zur qualitativen Beurteilung der Protein-Isolierung wurden Aliquots dieser Fraktionen durch SDS-PAGE aufgetrennt

	Wasch 1	Wasch 2	Elution 1	Elution 2	Elution 3
NaCl			200 mM		
Tris/HCl pH 8			40 mM		
Glycerin			5 % (w/v)		
DTT			1 mM		
Imidazol	10 mM	35 mM	100 mM	200 mM	300 mM
Volumen	10 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml

und das Gel mittels Silbernitrat gefärbt (2.6.2).

2.6.6 Herstellung eines Extrakts löslicher Proteine aus *R. sphaeroides*

Für *Western Blot* Analysen des cytoplasmatischen Zellproteins von *R. sphaeroides* wurden 40 ml Kultur einer OD₆₆₀ 0,8 geerntet (5.000 g, 15 min, 4°C) und in 5 ml Resuspensions-Puffer aufgenommen. Nach Zugabe von 50 µl PMSF (100 mM) und 30 µl Lysozym (100 mg/ml), fand eine 30-minütige Inkubation bei 4°C unter gelegentlichem Schwenken des Ansatzes statt. Anschließend wurde der Ansatz zentrifugiert (10 min, 10.000 g, 4°C) und das erhaltene Pellet mit 2 ml Resuspensions-Puffer gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (10 min, 10.000 g, 4°C) wurde auf das Pellet 500 µl 50 mM Tris/HCl pH 7,5 gegeben und direkt, ohne zuvor zu resuspendieren, wurde der Ansatz für 2mal 15 sec sonifiziert (Sonoplus GM70). Die Zelltrümmer und nicht aufgeschlossene Zellen wurden abzentrifugiert (10 min, 10.000 g, 4°C) und nochmals nach Zugabe von 500 µl 50 mM Tris/HCl pH 7,5 wie soeben beschrieben sonifiziert und abzentrifugiert. Die beiden 500 µl Zelllysate-Überstände wurden vereint und für 1 h bei 4°C mit 200.000 g zentrifugiert. Der resultierende Überstand entspricht der cytoplasmatischen Proteinfraction, im Pellet befinden sich die Membranfraction

Resuspensions-Puffer: 500 mM Sucrose, 1 mM EDTA, 50 mM Tris/HCl pH 7,5

2.6.7 Pull-Down Assays

Pull-Down Assays dienen der Ko-Aufreinigung potentieller Interaktionspartner der RNase J~His₆. Dabei sollten schwache oder transiente Interaktionen durch Verwendung des *Crosslinking*-Reagenz Formaldehyd fixiert werden. Formaldehyd führt zu einer unspezifischen Vernetzung von Proteinen über deren Aminogruppen auf Basis einer Mannich-Reaktion. Diese Vernetzung ist reversibel und kann durch eine 20-minütige Inkubation bei 95°C aufgelöst werden. Die verwendeten 4 % (w/v) Paraformaldehyd-Lösungen wurden vor jedem Experiment frisch angesetzt. Benötigte Mengen an Paraformaldehyd wurden eingewogen und in 1 x PBS unter Erwärmen bei 50°C gelöst. Der pH-Wert wurde mit 1 M NaOH Lösung auf pH 7,4 eingestellt.

2.6.7.1 *In vitro* Pull-Down Assays

Für die *in vitro* *Pull-Down* Experimente wurden zunächst 75 ml mikro-aerob gewachsener *R. sphaeroides* Kulturen einer OD₆₆₀ 0,7 geerntet und in 1 x PBS gewaschen (5.000 g, 10 min, 4°C). Anschließend wurde das Zellsediment in 4 ml kaltem Lyse-Puffer (100 mM NaCl, 40 mM Tris/HCl pH 8, 5 % (w/v) Glycerin, 2 mM DTT, 2 mM PMSF) resuspendiert. Der Zellaufschluß erfolgte durch Sonifizieren (6 x 30 sec, *cycle*: 70 %). Nach Entfernen der Zelltrümmer (15.000 g, 15 min, 4°C) wurde das Lysat mit etwa 1 mg RNase J~His₆ (nach Ni-IMAC dialysiert in: 100 mM NaCl, 40 mM Tris/HCl pH 8) für 15 min bei 4°C auf einem Taumelrollmischer inkubiert. Nach Zugabe von frisch angesetzter 4%iger (w/v) Formaldehyd-PBS-Lösung auf eine Endkonzentration von 0,1 % (w/v) wurde der Ansatz für weitere 10 min bei 4°C inkubiert. Für die anschließende Nickel-Affinitätschromatographie (2.6.5) wurden 300 µl Ni-NTA-Agarose verwendet, welche zunächst für 1 h bei 4°C mit dem formaldehydhaltigen Lysat inkubiert wurde. Aliquots der erhaltenen Elutionsfraktionen wurden mit 4 x SDS-Lade-Puffer versetzt, für 20 min bei 95°C inkubiert und anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt.

	Wasch 1	Wasch 2	Elution 1	Elution 2	Elution 3
NaCl			100 mM		
Tris/HCl pH 8			40 mM		
Glycerin			5 % (w/v)		
Imidazol	10 mM	35 mM	100 mM	200 mM	300 mM
Volumen	10 ml	4 ml	1 ml	1 ml	1 ml

2.6.7.1 *In vivo Pull-Down Assays*

Für die *in vivo Pull-Down Assays* wurde dem RÄ-Medium einer exponentiell wachsenden 75 ml-Kultur 4%ige Formaldehyd-PBS-Lösung auf eine Endkonzentration von 0,6 % (w/v) zugegeben. Anschließend wurde die Kultur für weitere 15 min bei 32°C inkubiert. Danach wurden die Zellen geerntet und zweimal mit PBS gewaschen (5.000 g, 10 min, 4°C). Die Lyse der Zellen erfolgte in 2 ml Lyse-Puffer (8 M Harnstoff, 40 mM Tris/HCl pH 8) durch Sonifizieren (6 x 30 sec, *cycle*: 70 %). Nach Entfernung der Zelltrümmer (15.000 g, 15 min, RT) wurde das Lysat mit 300 µl Ni-NTA-Agarose für eine 1 h bei Raumtemperatur auf einem Taumelrollmischer inkubiert. Nach der anschließenden Nickel-Affinitätschromatographie wurden Aliquots der Elutionsfraktionen mit 4 x SDS-Lade-Puffer versetzt, für 20 min bei 95°C erhitzt und auf SDS-PAA-Gelen aufgetrennt.

	Wasch 1	Wasch 2	Elution 1	Elution 2
Harnstoff			8 M	
Tris/HCl pH 8			40 mM	
Imidazol	10 mM	25 mM	100 mM	200 mM
Volumen	10 ml	4 ml	0,5 ml	0,5 ml

2.6.8 Größenausschlußchromatographie

Zur weiteren Aufreinigung isolierter, rekombinanter Proteine wurden Elutionsfraktionen der Nickel-Affinitätschromatographie mittels Gelfiltration aufgetrennt. Hierfür wurde eine Superdex 200 HiLoad 16/60 Säule (Pharmacia) genutzt, welche in das Flüssigkeits-Chromatographie System ÄKTApurifier (GE Healthcare) integriert wurde. Nach der Äquilibrierung der Säule mit dem Lauf-Puffer (100 - 200 mM NaCl, 40 mM Tris/HCl pH 7,5, 5 % Glycerin, 1 mM DTT) wurden maximal 1,5 ml einer Nickel-IMAC Elutionsfraktion (Proteingehalt: 0,8 µg µl⁻¹) auf die Säule geladen. Die Gelfiltration erfolgte mit einer Flussrate von 1 ml min⁻¹, das Eluat wurde in 1,5 ml Fraktionen gesammelt.

2.6.9 Polysomenisolierung aus *R. sphaeroides*

Als Polysomen bezeichnet man die einzelnen mRNA-Translationseinheiten innerhalb der Zelle. Diese Einheiten bestehen aus einer mRNA und den sich darauf befindenden translatierenden Ribosomen. Nach Zugabe von Chloramphenicol zu einer wachsenden Bakterienkultur bindet dieses Antibiotikum im Peptidyltransferase-Zentrum der 50S Ribosomen Untereinheit und führt zur Hemmung der Translation, wobei die intakten Ribosomen auf der RNA verbleiben. Da die beiden Ribosomenuntereinheiten bei geeigneten Pufferbedingungen nicht dissoziieren, ist es möglich, mit relativ geringem Aufwand diese hochmolekularen Komplexe zu isolieren.

Die Isolierung der Polysomen aus *R. sphaeroides* folgte im wesentlichen der Beschreibung aus der Arbeit von Dierstein, (Dierstein, 1984). Hierfür lässt man 400 ml einer frisch angeimpften Kultur unter semi-aeroben Bedingungen auf eine OD₆₆₀ von 0,6 wachsen. Anschließend wird dem Medium Chloramphenicol bis zu einer Konzentration von 100 µg/ml zugegeben und die Zellen werden für

weitere 5 min wachsen gelassen. Die Zellen werden geerntet und zweimal mit je 10 ml Polysomen Puffer gewaschen (8.000 g, 10 min, 4°C). Die erhaltene Zellpaste wird in eine gekühlte Reibeschale gegeben, mit Aluminiumoxid (Al_2O_3) versetzt (2,5 g Al_2O_3 /g Zellmaterial) und mit einem Mörser homogenisiert. Die Schale wurde mit 8 ml Polysomen-Puffer ausgespült und das Lysat vom Aluminiumoxid und intakten Zellen durch zweimalige Zentrifugation getrennt (17.000 g, 10 min, 4°C). Jeweils 4 ml des erhaltenen Lysates wurden auf ein Saccharose Kissen (je 3 ml 0,9 M und 1,8 M Saccharose in Polysomen-Puffer) gegeben und in einem Ausschwing-Rotor (SW41Ti) bei 200.000 g für 17 h zentrifugiert. Die Zentrifugation resultierte in einem rot-gefärbten Ring an der Grenze zwischen den beiden Saccharose-Kissen, sowie einem bräunlich-glasigem Sediment am Boden des UZ-Röhrchens. Dieses Sediment enthielt die isolierten Polysomen, es wurde in 300 μl Polysomen-Puffer resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung (maximal 4 Wochen) bei 4°C gelagert.

Für eine Mengenbestimmung der isolierten Polysomen wurden 20 μl der Polysomen-Lösung einer Phenol/Chloroform-Extraktion unterzogen (2.3.4) und die isolierte RNA mit Isopropanol gefällt (2.3.6). Die Messung der RNA-Konzentration erfolgte am *NanoDrop* (PeqLab). Die Gesamtlänge der drei ribosomalen RNA-Moleküle in einem reifen Ribosom von *R. sphaeroides* beträgt etwa 4500 nt, 1,5 μg rRNA entsprechen demnach 1 pmol Ribosom. Die durchschnittliche Ausbeute der beschriebenen Polysomen-Isolierung lag bei 500 pmol Ribosom/400 ml Kultur.

Polysomen-Puffer (P-Puffer): 10 mM Tris/HCl pH 7,5
60 mM NH_4Cl
3 mM MgOAc

3 Ergebnisse

3.1 In silico Identifizierung eines RNase J homologen Proteins in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1

Die Identifizierung eines RNase J homologen Proteins in *R. sphaeroides* erfolgte mit Hilfe des *protein-protein* BLAST (*basic local alignment search tool*). Die Suchanfrage wurde sowohl mit der RNase J1 (*ykqC*), als auch der RNase J2 (*ymfA*) von *Bacillus subtilis* als jeweilige *query* Sequenz durchgeführt (Even et al., 2005). In beiden Fällen wurde das Genprodukt von RSP_2534 als wahrscheinliches Homolog in *R. sphaeroides* 2.4.1 identifiziert. In Tabelle 2 sind die wesentlichen Parameter der beiden Suchanfragen zusammengefasst.

Tabelle 2: Homologie des Genproduktes RSP_2534 von *R. sphaeroides* zu den *B. subtilis* Paralogen RNase J1 und J2 entsprechend einer BLAST Analyse.

	RNase J1	RNase J2
e-value	$3 \cdot 10^{-62}$	$3 \cdot 10^{-52}$
identity	33 % (158/477)	30 % (148/478)
positives	53 % (254/477)	53 % (256/478)
gaps	2 % (14/477)	3 % (16/478)

Das RSP_2534 kodierte Protein weist eine in geringem Umfang höhere Aminosäure-Übereinstimmung zur RNase J1 (*identity*: 33 %) gegenüber der RNase J2 (*identity*: 30 %) auf. Die generelle Aminosäure-Ähnlichkeit (*positives*) von 53 % ist zu den beiden *B. subtilis* Paralogen RNase J1/J2 jedoch gleich. RSP_2534 ist als Mitglied der Metallo- β -Laktamase Hydrolase Superfamilie annotiert. Ein *alignment* der drei Proteinsequenzen mittels *ClustalW* ergab, dass das RSP_2534 kodierte Protein alle entscheidenden Aminosäure-Signaturen besitzt, um es zur Unterfamilie der β -CASP-Metallo-Laktamasen zuzuordnen, in der auch die RNase J1 und RNase J2 von *B. subtilis* vertreten sind. Das Genprodukt von RSP_2534 wird daher im folgenden als RNase J bezeichnet. Die entscheidenden Aminosäuren sind in Abbildung 3-1 hervorgehoben. Die Motive 1-4 (gelb) sind ein generelles Charakteristikum der Metallo- β -Laktamasen, während die Motive A, B und C (grün) eine spezifische Zuordnung zu den Nukleinsäure-prozessierenden Enzymen der β -CASP Unterfamilie erlauben. Interessanterweise zeigen sich in der RNase J2 geringe Abweichungen in den Motiven 2 und C. Der Einfluss dieser Aminosäuren auf eine veränderte Funktion und die ribonukleolytische Aktivität der RNase J2 wurde erst kürzlich in einer Veröffentlichung beschrieben und wird in der Diskussion dieser Arbeit eingehender behandelt (Newman et al., 2011). In Abbildung 3-1 sind weiterhin Aminosäuren hervorgehoben, die entsprechend einer Kristallstruktur der RNase J von *Thermus thermophilus* an der RNA-Substratbindung im katalytischen Zentrum der RNase J beteiligt sind (Li de la Sierra-Gallay et al., 2008). Diese konservierten Aminosäuren (magenta) sind vorrangig in RNase J homologen Proteinen und nicht in anderen Vertretern der β -CASP Proteinfamilie zu finden. Auch hier unterscheidet sich RNase J2 aus *B. subtilis* an einer Aminosäure-Position von dem RNase J homologen Protein aus *R. sphaeroides* (Pos. 77: Aspartat statt Glutamat). Demnach muss RNase J aus *R. sphaeroides* hinsichtlich der Homologie eher der RNase J1 als zu ihrem Paralog RNase J2 zugeordnet werden.

3.2 Expression und Aufreinigung der rekombinanten RNase J~His₆

Für *in vitro* Studien zur RNase J wurden ausreichende Mengen reinen Proteins benötigt. Unter Verwendung des Expressionplasmids pQE70 des QIAexpress Systems (Qiagen) wurde RNase J mit einem zusätzlichen C-terminalen Histidin-tag in *E. coli* M15 exprimiert und über eine Nickel-Affinitätschromatographie isoliert.

3.2.1 Überexpression und affinitätschromatographische Aufreinigung RNase J~His₆

Die Induktion der RNase J~His₆ Expression erfolgte durch Zugabe von Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG, Endkonzentration: 1mM) zu einer früh-exponentiell wachsenden *E. coli* M15pQE70::rnj Kultur. In Abbildung 3-2A ist die allmähliche Zunahme des Anteils rekombinanter RNase J~His₆ am Gesamtprotein der Zellen innerhalb von 5 h nach Zugabe von IPTG zu erkennen. Hierfür wurden äquivalente Mengen des Zelllysates (20 μl 0,5 OD₆₀₀) der Expressionskultur zu verschiedenen Zeitpunkten mittels SDS-PAGE und Silberfärbung aufgetrennt und visualisiert. Das errechnete Molekulargewicht der rekombinanten RNase J~His₆ beträgt 62 kDa (web.ExpASy.org). Auf dieser Laufhöhe ist, mit zunehmender Bandenintensität, das vermeintliche RNase J Protein erkennbar. Eine *Western Blot* Analyse des Zelllysates mit einem gegen den His-tag gerichteten Antikörper konnte die Identität der rekombinanten RNase J~His₆ verifizieren (nicht gezeigt). Offensichtlich wirkt sich die Expression der rekombinanten RNase J~His₆ in *E. coli* M15 nicht nachteilig auf dessen Wachstum aus. Neben einer Vielzahl von Banden abundanter *E. coli* M15 Proteine, deren relativer Anteil jedoch während des Wachstum konstant blieb, erkennt man unterhalb von 31 kDa die Bande eines weiteren Proteins, dessen relativer Anteil am Zelllysate während des Wachstums anstieg. Ob es sich hierbei um unvollständig translatierte oder degradierte RNase J~His₆ oder aber um ein *E. coli* spezifisches Protein handelt, wurde nicht näher analysiert, da die Identität dieses Proteins für die weitere Aufreinigung irrelevant war.

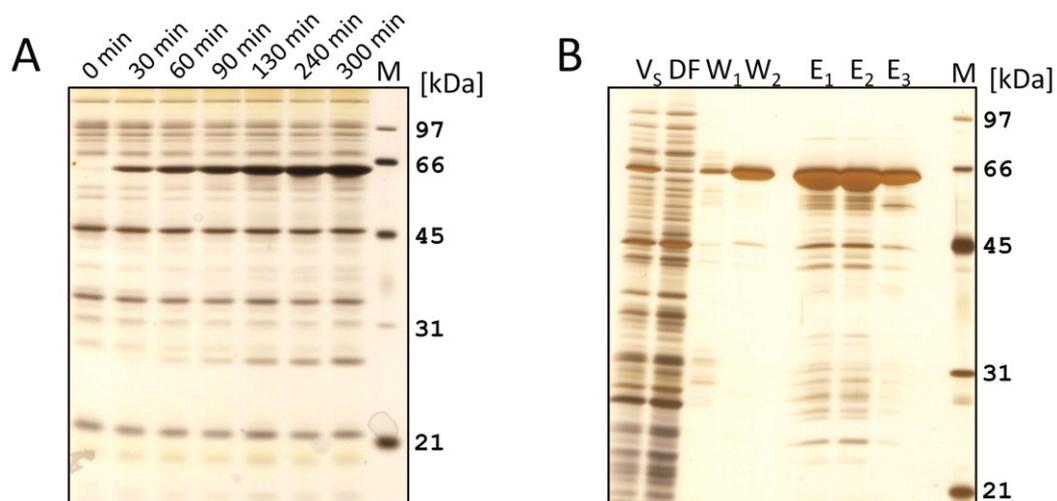


Abbildung 3-2: Überexpression und Isolierung der RNase J~His₆. (A) Zelllysate des Überexpressionsstammes *E. coli* M15 pQE70::rnj zu verschiedenen Zeiten nach IPTG-Induktion (1 mM) wurde durch SDS-PAGE (13 %) aufgetrennt und mittels Silberfärbung angefärbt. (B) Diverse Fraktionen der Nickel-Affinitätschromatographie (V_s Lysat, DF Durchfluss, W_{1/2} Waschfraktionen, E_{1/2/3} Elutionsfraktionen) wurden durch SDS-PAGE (10 %) aufgetrennt und mittels Silberfärbung angefärbt.

Für die präparative Proteinisolierung wurden 500 ml früh-exponentieller *E. coli* M15pQE70::rnj Kultur mit IPTG (Endkonzentration: 1 mM) induziert und für etwa 3 bis 4 h bei 37°C inkubiert. Nach Zellernte, nativem Zellaufschluss und Entfernung der Zelltrümmer, wurde das Lysat mit einer Nickel-

NTA Agarose-Matrix inkubiert (Nickel-Nitrilotriacetat Agarose; Qiagen). Das Aufreinigungsprinzip besteht darin, dass die mit einem Histidin-Schwanz (*His-tag*) versehenen Proteine über diesen an chelatisierte Nickel²⁺-Ionen binden und somit aus einem Lysat isoliert werden können. Nach Waschen der Ni-NTA-Matrix kann das gebundene Protein anschließend durch Zugabe eines imidazolhaltigen Puffers wieder abgelöst werden.

In Abbildung 3-2B sind diverse Fraktionen einer Aufreinigung der RNase J~His₆, die auf einem SDS-PAA-Gel aufgetrennt und mit Silbernitrat angefärbt wurden, gezeigt. Während das Lysat vor der Inkubation mit der Ni-NTA-Agarose (V_s) noch deutlich die Bande der RNase J~His₆ unterhalb der 66 kDa aufweist, ist diese im Durchfluss nach der Inkubation fast vollständig verschwunden, bedingt durch dessen Bindung an die Nickel-Matrix. In der Waschfraktion 1 (W_1) mit 20 mM Imidazol zeigen sich noch schwache Banden von unspezifisch an die Matrix gebundenen Proteinen, während in der Waschfraktion 2 (W_2) mit 50 mM Imidazol bereits RNase J~His₆ eluierte. Die eigentliche Elution erfolgte in drei Schritten durch Zugabe von 100 mM, 200 mM und 300 mM Imidazol (E_1 , E_2 , E_3). Wenn berücksichtigt wird, dass in den Spuren der Elutionsfraktionen nur 1/4 des Probenvolumens der Waschfraktionen aufgetragen wurde, bei zuvor identischem Wasch- bzw. Elutionsvolumen, wird deutlich, dass RNase J~His₆ überwiegend in diesen Fraktionen enthalten ist. Aufgrund der hohen Sensitivität einer Silberfärbung (Detektionsgrenze: < 10 ng Protein) sind auch eine Vielzahl, allerdings deutlich schwächerer, Banden zu erkennen, welche von Degradationsprodukten der RNase J~His₆ abstammen. Die durchschnittliche Ausbeute der hier beschriebenen Proteinisolierung beträgt 15-20 mg Protein/l Kultur. Da RNase J~His₆ Lösungen ab einer Konzentration von 1 µg/µl tendenziell präzipitieren, wurde darauf geachtet, die erhaltenen Elutionsfraktionen zeitnah auf 0,5-0,8 µg/µl zu verdünnen.

3.2.2 Größenausschlusschromatographie der RNase J~His₆

Im nächsten Schritt der RNase J~His₆ Aufreinigung wurden Elutionsfraktionen der Nickel-Affinitätschromatographie auf eine Gelfiltrationssäule Superdex 200 16/60 (Pharmacia) geladen und mittels Größenausschlusschromatographie aufgetrennt. Dieser Aufreinigungsschritt ermöglicht zum

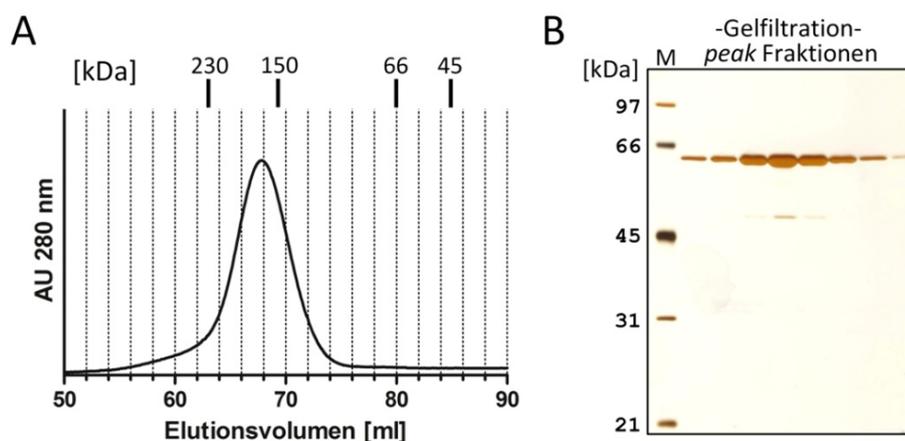


Abbildung 3-3: Aufreinigung der RNase J~His₆ durch Größenausschlusschromatographie.

(A) Elutionsprofil der RNase J~His₆ auf einer Gelfiltrationssäule Superdex 200 16/60 (Pharmacia), equilibriert in 200 mM NaCl, 40 mM Tris/HCl pH 7,5, 5 % Glycerin. Flussrate 1 ml min⁻¹, 1,5 ml Fraktionierung. Die Molekulargewichte von Standardproteinen eines Kalibrierungslaufes sind den entsprechenden Elutionsvolumen zugeordnet.

(B) Silbergefärbtes 12%iges SDS-PAA-Gel mit je 10 µl *peak* Fraktionen der Gelfiltration von RNase J~His₆.

einen die Eliminierung eines Teils der degradierten RNase J~His₆ Fragmente, zum anderen gibt das Elutionsvolumen Aufschluss über mögliche Oligomerisierungszustände der RNase J~His₆. In Abbildung 3-3A ist das Elutionsprofil eines typischen Gelfiltrationslaufes gezeigt. Zusätzlich sind die Molekulargewichte eines Kalibrierungslaufes mit verschiedenen Proteinstandards und den jeweiligen Elutionsvolumen angegeben. Entsprechend des Elutionsvolumens von ungefähr 67,5 ml liegt das apparente Molekulargewicht der RNase J~His₆ zwischen 150 und 180 kDa. Mit der im Anhang beigefügten Geradengleichung, basierend auf den jeweiligen Elutionsvolumen der Standard-Proteine, errechnet sich ein Molekulargewicht von 150 kDa. Da das Molekulargewicht eines Monomers der RNase J~His₆ bei 62 kDa liegt, könnte es sich bei dem eluierten Protein sowohl um ein Dimer oder ein Trimer handeln. Ein linearer Zusammenhang zwischen dem Elutionsvolumen und dem Logarithmus der relativen Molmasse besteht nur bei globulären Proteinen, während langgestreckte Makromoleküle identischen Molekulargewichts vergleichsweise früher eluieren und somit eine größere relative Molmasse implizieren. In diesem Fall entspricht das beobachtete Elutionsvolumen einem räumlich langgestreckten Dimer der RNase J~His₆. Im Falle der beiden homologen Proteine RNase J1 und J2 von *B. subtilis* wurde bisher, je nach Studie, von deren Di-, Tri- oder Tetramerisierung berichtet (Mathy et al., 2007, Even et al., 2005, Mathy et al., 2010). Die Silberfärbung eines SDS-PAA-Gels mit den *peak* Fraktionen der Gelfiltration ist in Abbildung 3-3B gezeigt. Daraus geht hervor, dass die RNase J~His₆ nahezu vollständig rein in diesen Fraktionen vorliegt.

3.2.3 Aufreinigung der mutierten Varianten RNase J-DH80KA~His₆ und RNase J-S369L~His₆

Auf der Basis bekannter Studien zur RNase J in *B. subtilis* wurden auch zwei Mutationsvarianten der RNase J von *R. sphaeroides* konstruiert, in den Vektor pQE70 kloniert und aufgereinigt. Die Variante RNase J-DH80KA~His₆ ist eine Doppelmutante, bei der Aspartat und Histidin an den Positionen 80 und 81 gegen Lysin bzw. Alanin ausgetauscht wurden. Beide Aminosäuren sind an der Koordination eines Zink²⁺-Ions innerhalb des katalytischen Zentrums beteiligt. Die Punktmutation der zweiten Proteinvariante, RNase J-S369L~His₆, ist in der Substratbindetasche lokalisiert, hierbei wurde Serin 369 gegen Leucin ausgetauscht (siehe auch Abbildung 4-2 in der Diskussion). Proteinvarianten der RNase J1 von *B. subtilis* mit diesen Punktmutationen zeigten eine erheblich reduzierte ribonukleolytische Aktivität (Li de la Sierra-Gallay et al., 2008). Die Aufreinigung dieser beiden Varianten erfolgte identisch zur oben beschriebenen Aufreinigung des Wildtyp-Proteins. Dabei ergaben sich keinerlei Unterschiede hinsichtlich der Expressionsrate, der Reinheit und dem Elutionsvolumen während der Größenausschlusschromatographie.

3.3 Untersuchungen zur ribonukleolytischen Aktivität der RNase J~His₆

Mithilfe von RNA-Degradationsassays wurden *in vitro* Studien zur ribonukleolytischen Aktivität der aufgereinigten RNase J~His₆ durchgeführt. Da zu Beginn dieser Arbeit nichts über ein natürliches Substrat der RNase J in *R. sphaeroides* bekannt war, dienten eine Reihe unterschiedlicher *in vitro* Transkripte als artifizielle Substrate. In den meisten der im folgenden gezeigten Experimente wurde dabei das *in vitro* Transkript ZBP verwendet (Anhang: Abbildung 8-5). Dieses RNA-Substrat entspricht einem 225 nt langem mRNA-Element, welches innerhalb des polycistronischen *puf* Operons von *R. capsulatus* liegt. Es besitzt zwei *stem loop* Strukturen, welche von einzelsträngigen Bereichen flankiert werden. *In vitro* Degradationsstudien zeigten, dass dieses RNA-Segment zwei RNase E Schnittstellen besitzt (Fritsch et al., 1995, Jäger et al., 2001). Da für die RNase J aus *B. subtilis*, hinsichtlich ihrer endonukleolytischen Aktivität, eine RNase E ähnliche Substratspezifität beschrieben wurde, schien dieses RNA-Element ein geeignetes *in vitro* Testsubstrat zu sein (Even et al., 2005).

3.3.1 Ribonukleolytische Aktivität der RNase J~His₆ Gelfiltrationsfraktionen

Die erhaltenen *peak* Fraktionen einer Größenausschlusschromatographie wurden in einem RNA-Degradationsassay eingesetzt. Hierfür wurden je 3 µl der Fraktionen mit intern radioaktiv markiertem ZBP *in vitro* Transkript (1.000 cpm) für 1,5 h bei 32°C inkubiert und diese Ansätze auf einem denaturierendem 10 % PAA-Gel aufgetrennt (Abbildung 3-4). Im unteren Bereich des Gels ist deutlich die allmähliche Zu- und Abnahme eines entstandenen, niedermolekularen Degradationsproduktes zu erkennen. Dieser Verlauf spiegelt den Proteinanteil in den eingesetzten *peak* Elutionsfraktionen der RNase J~His₆ Gelfiltration direkt wieder, was auf eine spezifische Degradation durch RNase J~His₆ schließen lässt. Die Identität des Degradationsproduktes war zum damaligen Zeitpunkt noch nicht bekannt, später folgende Experimente (3.3.3) zeigen, dass es sich hierbei um 5'-Uridinmonophosphat (UMP) handelt.

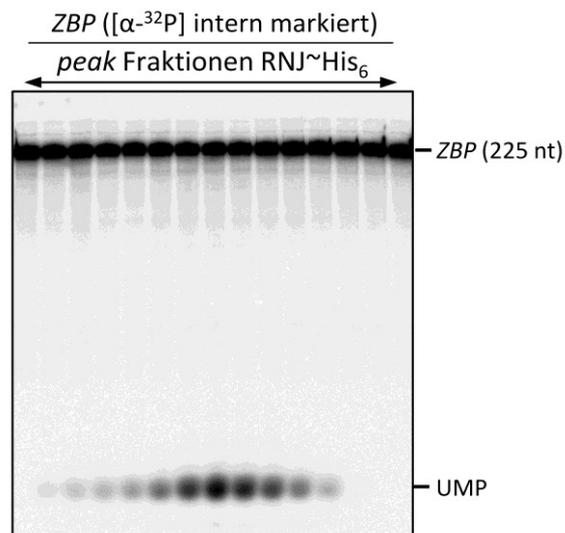


Abbildung 3-4: RNA-Degradationsassay mit RNase J~His₆ *peak* Fraktionen einer Größenausschlusschromatographie. Inkubation von jeweils 3 µl *peak* Fraktionen mit intern markiertem ZBP (1000 cpm) für 1,5 h bei 32°C. Reaktionspuffer: 70 mM NaCl, 40 mM Tris/HCl pH 7,5, 1 % Glycerin. *Phosphorimage* eines denaturierenden 10 % PAA-Gel. Das Degradationsprodukt wurde in später folgenden Experimenten als Uridinmonophosphat identifiziert (UMP).

3.3.2 Ribonukleolytische Aktivität mutierter Varianten der RNase J~His₆

Um die beobachtete ribonukleolytische Aktivität eindeutig der RNase J~His₆ zuordnen zu können, wurde die Aktivität des Wildtyp-Proteins mit den Aktivitäten der beiden mutierten Varianten RNase J-DH80KA~His₆ und RNase J-S369L~His₆ verglichen. Hierfür wurden Proben gleicher Volumina aus *peak*-Fraktionen der jeweiligen Gelfiltration mit radioaktiv markiertem ZBP inkubiert. Im unteren Teil von Abbildung 3-5 sind die *Phosphorimages* dieser Degradationsassays gezeigt. Um die Korrelation zwischen ribonukleolytischer Aktivität und eingesetzter Proteinmenge zu verdeutlichen, wurden Ausschnitte der silbergefärbten SDS-PAA-Gele mit den entsprechenden Elutionsfraktionen hinzugefügt (Abb. 4-5, oben).

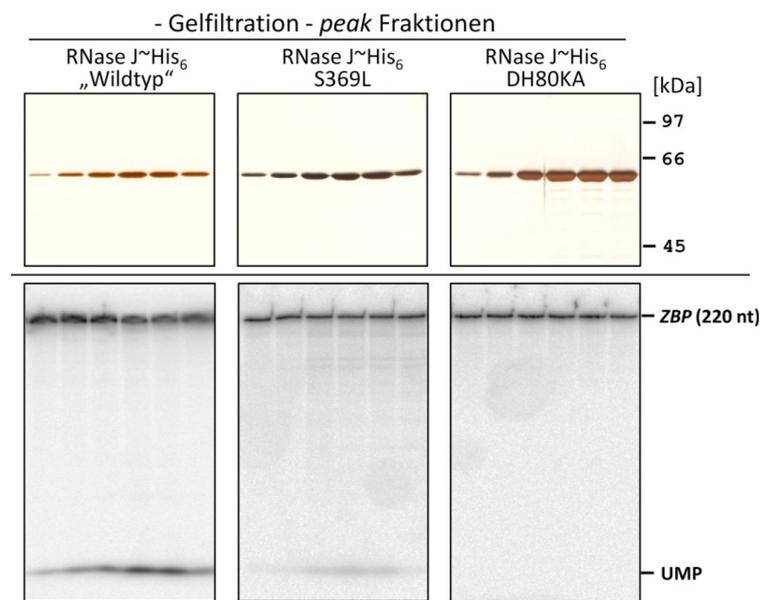


Abbildung 3-5: RNA-Degradationsassay mit Gelfiltrations-Fractionen der RNase J~His₆ und mutierten Varianten.

(Oben) Ausschnitte aus silbergefärbten 10 % SDS-PAA-Gele mit *peak* Fraktionen (67,5 ml) aus den jeweiligen Gelfiltrationen (Superdex 200 16/60) von RNase J~His₆ („Wildtyp“) und den punktmutierten Varianten (S369L, DH80KA).

(Unten) RNA-Degradationsassays. Aliquots der oben abgebildeten Gelfiltrationsfraktionen wurden mit intern radioaktiv markiertem ZBP *in vitro* Transkript inkubiert. Die Ansätze wurden auf denaturierenden 10 % PAA-Gele aufgetrennt und mittels *Phosphorimaging* visualisiert.

Wie bereits zuvor erwähnt, verlief die Aufreinigung beider mutierter Varianten identisch zu der des His-*getaggt*en Wildtyp-Proteins (3.2.3). Alle drei Proteine zeigten das gleiche Elutionsverhalten bei der Gelfiltration mit einer Superdex 200 16/60 Säule (Pharmacia) und eluierten jeweils bei etwa 67,5 ml. Werden die Mengen der gebildeten Degradationsprodukte verglichen, wird deutlich, dass RNase J-DH80KA~His₆ keine nachweisbare ribonukleolytische Aktivität besitzt. Offenbar sind die beiden Liganden Aspartat und Histidin an den Positionen 80 und 81 essentiell an der Zink²⁺-Koordination eines der beiden Zn²⁺-Ionen im katalytischen Zentrum beteiligt (siehe auch Abbildung 4-2 in der Diskussion). In Mutagenese-Studien mit RNase J1 von *B. subtilis* wurde gezeigt, dass dieses Zn²⁺-Ion eine entscheidende Rolle bei der Katalyse der hydrolytischen Spaltung von RNA-Substraten spielt (Li de la Sierra-Gallay et al., 2008). Die zweite Proteinvariante RNase J-S369L~His₆ zeigte eine reduzierte Aktivität im Vergleich zum Wildtyp-Protein. Eine reduzierte ribonukleolytische Aktivität von weniger als 10 % gegenüber dem Wildtyp-Protein wurde auch bei einer entsprechenden Mutation des *B. subtilis* Homologs RNase J1 beobachtet. Durch Substitution des polaren Serins 369 gegen das größere, unpolare Leucin, kommt es zu einer sterischen Veränderung innerhalb der Substratbindetasche von RNase J, welche offenbar zu einer verminderten Substratbindung führt (Li de la Sierra-Gallay et al., 2008). Zusammenfassend ergeben diese Daten, dass die beobachtete RNA-Degradation eindeutig der aufgereinigten RNase J~His₆ zugeschrieben werden kann und es sich dabei nicht um eine parallel aufgereinigte Kontamination handelt.

3.3.3 Identifizierung der RNA-Degradationsprodukte durch RNase J~His₆

Zur eindeutigen Bestimmung des beobachteten Degradationsproduktes wurden verschiedenartig radioaktiv markierte *ZBP* Transkripte mit RNase J~His₆ inkubiert und mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt. Zur Markierung der 5'-Enden von *ZBP* wurden zwei Methoden genutzt, die zwei verschiedene 5'-terminalen Nukleotide hervorbringen. Das im folgenden als 5'-p*ppG- bezeichnete Transkript trägt ein [γ -³²P]GTP an Nukleotidposition 1, während 5'-p*G ein terminales [α -³²P]GMP besitzt. Das am 3'-Ende markierte *ZBP* Substrat, hier als p*Cp-3' bezeichnet, besitzt ein [$5'$ -³²P]pCp als 3'-terminales Nukleotid. Ein mit [α -³²P]UTP intern markiertes *ZBP* Transkript wird als -p*U- bezeichnet. Zur Standardisierung entstehender Degradationsprodukte wurden diese Transkripte auch mit der kommerziell erhältliche Nuklease P₁ (Sigma-Aldrich) inkubiert. Nuklease P₁ ist eine Phosphodiesterase, welche DNA als auch RNA zwischen der 3'-Hydroxy und 5'-Phosphatgruppe spaltet, daraus resultierend entstehen 5'-Mononukleotide. Die Reaktionsansätze wurden mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt und durch *Phosphorimaging* visualisiert (Abbildung 3-6).

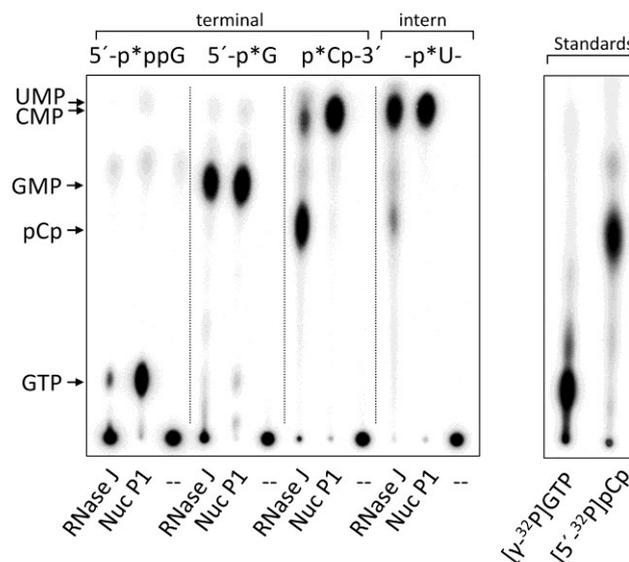


Abbildung 3-6: Identifizierung der RNase J~His₆ Degradationsprodukte mittels Dünnschichtchromatographie.

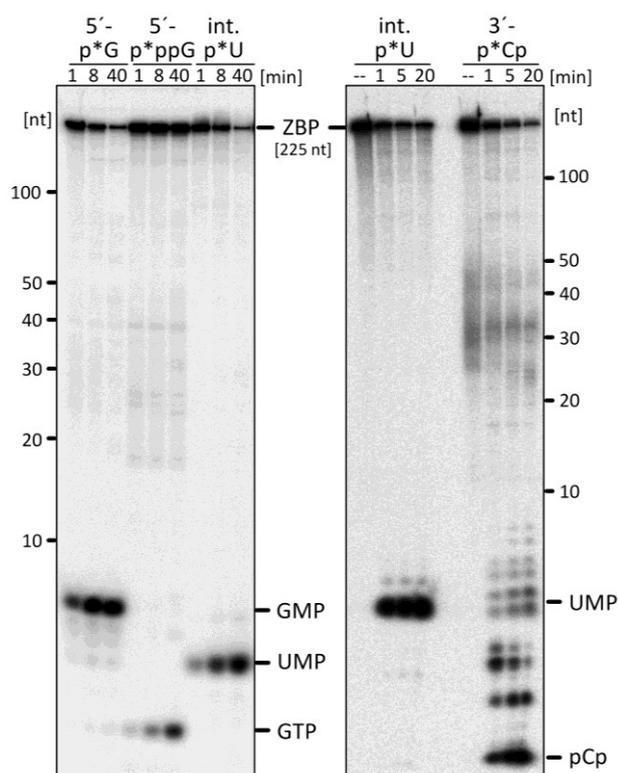
Intern (-p*U-: 0,1 pmol) und terminal (5'-p*ppG:~3 pmol; 5'-p*G: 3 pmol; p*Cp-3: 0,3 pmol) markierte *ZBP* Transkripte (je 1500 cpm) wurden mit RNase J~His₆ und Nuklease P₁ inkubiert. RNase J~His₆: ~5 pmol, 50 mM NaCl, 40 mM Tris/HCl pH 7,5, 1 % Glycerin, 1 h, 32°C. Nuklease P₁: 0,2 u, 1 x Nuklease P₁ Puffer, 40 min, 37°C. Die Auftrennung dieser Ansätze sowie zweier Radionukleotide erfolgte auf MN300 PEI-Platten (Marchery-Nagel) mit 0,9 M GdmCl als Laufmittel.

Die Degradationsprodukte des 5'-monophosphorylierten *ZBP* Transkriptes (p*G-), sowie des intern markierten Transkriptes (-p*U-) nach RNase J~His₆ bzw. Nuklease P₁ Inkubation, sind jeweils identisch. Dies zeigt eindeutig, dass auch RNase J~His₆ eine exoribonukleolytische Aktivität besitzt, welche 5'-Mononukleotide freisetzt. Die Degradation des am 5'-Ende mit [γ -³²P]GTP markierten *ZBP* Transkriptes (p*ppG-) führte bei beiden Enzymen zur Freisetzung des terminalen 5'-[γ -³²P]GTP. Jedoch wurde dieses triphosphorylierte Substrat von der RNase J~His₆ deutlich ineffizienter degradiert als alle anderen RNA-Substrate. Die exoribonukleolytische Aktivität der RNase J aus *B. subtilis* ist ebenfalls erheblich durch ein 5'-terminales Triphosphat inhibiert, was der obigen Beobachtung entspricht. Allerdings ist auch das intern gelabelte *ZBP* (-p*U-), als „klassisches“ *in vitro* Transkript, am 5'-Ende triphosphoryliert und dieses Substrat wurde von RNase J~His₆ äußerst effizient degradiert. Die scheinbare Protektion vor einer exoribonukleolytischen Aktivität durch ein

triphosphoryliertes 5'-Ende bei dem [γ - ^{32}P]-GTP markierten *ZBP* Transkript (p*ppG-) ist in diesem Fall vielmehr auf einen sehr hohen Anteil an nicht markiertem Substrat im Reaktionsansatz zurückzuführen, welches mit dem markierten Transkript hinsichtlich der ribonukleolytischen Aktivität der RNase J~His₆ konkurriert. Die 5'-terminale Markierungsmethode mit [γ - ^{32}P]-GTP ist relativ ineffizient, eine Quantifizierung der Einbaurate unterliegt einer gewissen Unwägbarkeit und ist mit konventionellen Methoden nur näherungsweise möglich. Auch der eingesetzte 5'-monophosphorylierte *ZBP* Transkript-Ansatz (p*G-) besitzt mit 3 pmol / 1500 cpm einen hohen Anteil nicht markierter RNA-Substrate. Dass hierbei dennoch deutlich das markierte Degradationsprodukt zu detektieren ist, lässt prinzipiell eine Abhängigkeit der exoribonukleolytischen Aktivität der RNase J vom 5'-terminalen Phosphorylierungsstatus eines RNA-Substrates vermuten. Dieser Aspekt wird im Abschnitt 3.3.5 näher untersucht. Bei dem mit [$5'$ - ^{32}P]pCp am 3'-Terminus markierten *ZBP* Transkript (p*Cp-3') unterschieden sich die Degradationsprodukte zwischen der RNase J~His₆ und der Nuklease P₁. Da Nuklease P₁ auch eine Phosphomonoesterase ist, spaltet sie das 3'-Phosphat am p*Cp ab und es entsteht Cytidin-5'-monophosphat. Auch die RNase J~His₆ Degradation setzt das 3'-terminale Nukleotid frei, dieses verbleibt allerdings zum überwiegende Teil als 5',3'-Cytidin-diphosphat. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass RNase J~His₆ eine Exoribonuklease ist, welche das artifizielle *ZBP* Transkript vollständig vom 5'-Ende bis zum 3'-Ende zu einzelnen Nukleotiden degradiert.

3.3.4 5'-3' Orientierung der exoribonukleolytischen Aktivität der RNase J~His₆

Die exoribonukleolytische 5'-3' Orientierung der RNase J von *B. subtilis* ist einzigartig unter den bekannten bakteriellen Exoribonukleasen. Die bisher beschriebenen Experimente bestätigen zwar eine generelle exoribonukleotische Aktivität der *R. sphaeroides* RNase J~His₆, jedoch lassen sie keine Rückschlüsse auf die Orientierung dieser Degradation zu. Aus diesem Grund wurden die zuvor beschriebenen endmarkierten *ZBP* Transkripte mit RNase J~His₆ für verschiedene Zeiträume inkubiert und diese Ansätze auf 40 cm langen Sequenzier-Gelen aufgetrennt.



Ziel dieser Experimente war es, mögliche Intermediate der Degradation zu detektieren und aufgrund der 5'- bzw. 3'-Endmarkierung Rückschlüsse auf die exoribonukleolytische Orientierung zu ziehen. Wie im linken Gel von Abbildung 3-7 zu erkennen ist, bildeten sich bei keinem der Ansätze mit 5'- oder intern markiertem *ZBP* eindeutig intermediäre Degradationsprodukte. Neben den markierungsbedingt unterschiedlichen Einzelnukleotiden

Abbildung 3-7: RNA-Degradationsassay mit RNase J~His₆ und verschieden markierten *ZBP* Transkripten. Intern und terminal radioaktiv markiertes *ZBP* wurde für die angegebene Dauer mit RNase J~His₆ (5 pmol) bei 32°C inkubiert. Degradationsprodukte wurden auf denaturierenden 10% PAA-Sequenzier-Gelen aufgetrennt und mittels *Phosphorimaging* visualisiert. Die angegebenen Größen basieren auf einem RNA-Marker Lauf unter identischen Bedingungen.

sind lediglich in den Spuren der 5'-p*ppG ZBP Inkubation schwache Signale längerer RNA-Fragmente zu finden. Diese etwa 20 bis 40 nt langen Fragmente stammen jedoch von einer unspezifischen Degradation des Substrates und waren auch in einer nicht abgebildeten Negativkontrolle ohne RNase J~His₆ Inkubation vorhanden. Die Degradation des 3'-markierten ZBP Transkriptes ist auf dem rechten Gel der Abbildung 3-7 gezeigt. Für einen besseren Vergleich wurden zusätzlich Degradationsansätze mit intern markiertem ZBP aufgetragen. In den Spuren des 3'-markierten ZBP sind unterhalb von 10 nt deutlich die Signale diverser Degradationsprodukte unterschiedlicher Länge zu sehen. Eine eindeutige Identifizierung dieser Signale wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht vorgenommen. Es ist jedoch zu vermuten, dass es sich hierbei um verschiedene 3'-Fragmente des ZBP Substrates handelt. Ausgehend von der Anzahl an Signalen unterschiedlicher Laufrhöhe scheint die Degradation des ZBP ab einer Länge von 9 bis 10 Nukleotiden weniger effizient abzulaufen und es kommt zur Akkumulation entsprechender Zwischenprodukte. Unklar ist in diesem Zusammenhang, warum das Uridinmonophosphat des intern markierten ZBP Substrats ein langsames Laufverhalten aufweist, als die theoretisch 2 bis 4 Nukleotid langen Zwischenprodukte des 3'-markierten ZBP. Möglicherweise trägt das zusätzliche terminale Phosphat des 5',3'-Cytidindiphosphat zu einer stark erhöhten elektrophoretischen Mobilität dieser sehr kurzen Oligonukleotide bei.

3.3.5 Einfluss des 5'-terminalen Phosphorylierungsstatus auf die exoribonukleolytische Aktivität der RNase J~His₆

Die exoribonukleolytische Aktivität der RNase J1 in *B. subtilis* weist eine Abhängigkeit vom 5'-terminalen Phosphorylierungsstatus eines entsprechenden Substrates auf. Je nach Studie wird dabei von einer vollständigen Inhibierung der exoribonukleolytischen Aktivität durch ein 5'-Triphosphat berichtet oder von einer deutlich reduzierten initialen Degradationsrate gegenüber einem RNA-Substrat mit einem 5'-Monophosphat (Deikus et al., 2008, Mathy et al., 2007). Es sollte daher untersucht werden, inwiefern eine derartige Abhängigkeit für RNase J~His₆ von *R. sphaeroides* existiert.

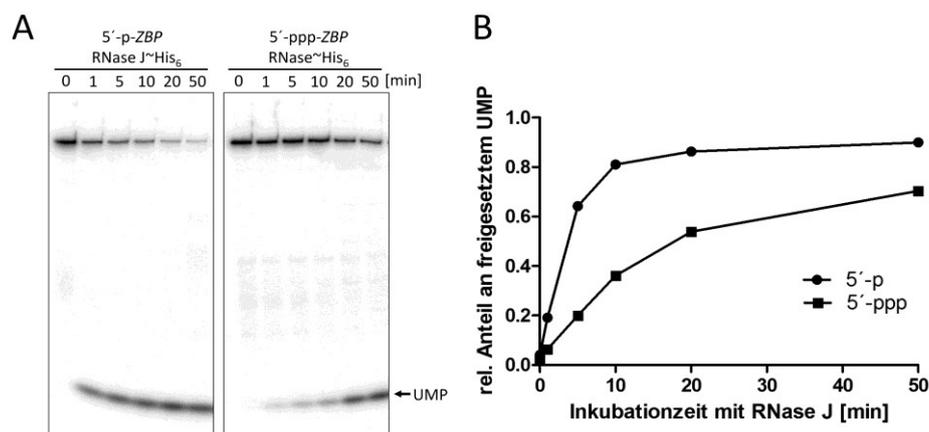


Abbildung 3-8: Einfluss des 5'-Phosphorylierungsstatus auf die RNA-Degradation durch RNase J~His₆.

(A) Equimolare Mengen an mono- bzw. triphosphoryliertem ZBP (0,2 pmol) wurden für verschiedene Zeiten mit RNase J~His₆ (5 pmol) bei 32°C inkubiert (50 mM NaCl, 40 mM Tris/HCl pH 7,5). Die Ansätze wurden auf einem denaturierendem 10 % PAA-Gel aufgetrennt und mittels *Phosphorimaging* visualisiert. (B) Quantifizierung der Degradation von mono- bzw. triphosphoryliertem ZBP unter Verwendung der *QuantityOne* Software. Der relative Anteil an freigesetztem [α -³²P]UMP vom Gesamtsubstrat wurde gegen die Zeit aufgetragen.

Hierfür wurden zwei verschieden 5'-terminierte *ZBP* Transkriptvarianten mit RNase J~His₆ inkubiert. Um eine vergleichbare Quantifizierung zu ermöglichen, entstammten beide aus dem gleichen *in vitro* Transkriptionsansatz mit [α -³²P]UTP zur internen Markierung. Ein Teil dieses Ansatzes mit triphosphoryliertem *ZBP* wurde anschließend mit CIP (*Calf Intestine Phosphatase*, Fermentas) desphosphoryliert und daraufhin mit T₄ PNK (*T₄ Polynucleotid Kinase*, NEB) und „kaltem“ ATP phosphoryliert. Dies ergab ein intern markiertes Transkript mit einem 5'-Monophosphat. Die Inkubation dieser beiden Transkriptvarianten mit RNase J~His₆ wurde zu verschiedenen Zeiten gestoppt und die Proben auf einem denaturierenden PAA-Gel aufgetrennt. Die anschließende Quantifizierung der *Phosphorimages* erfolgte mittels der *Quantity One* Software (Abbildung 3-8). Die Zeitreihe in Abbildung 3-8A zeigt deutlich, dass das 5'-monophosphorylierte Substrat (5'-p-*ZBP*) schneller degradiert wird als das 5'-triphosphorylierte (5'-ppp-*ZBP*), erkennbar in der Abnahme der Substratbande als auch an der Zunahme des Degradationsproduktes. In Abbildung 3-8B wurde der relative Anteil freigesetzten UMPs am Gesamtsubstrat gegen die Zeit aufgetragen. Offensichtlich besitzt RNase J eine Präferenz für Substrate mit einem 5'-Monophosphat-Ende, was sich in einer höheren Anfangsgeschwindigkeit bei deren Degradation widerspiegelt. Ein triphosphoryliertes 5'-Ende hingegen führt zwar zu einem verzögerten Einsetzen der exoribonukleolytischen Aktivität, ist jedoch kein Ausschlusskriterium für die Degradation.

3.3.6 Einfluss monovalenter Ionen auf die ribonukleolytische Aktivität der RNase J~His₆

Im Verlauf dieser Arbeit sollte untersucht werden, inwieweit monovalente Ionen einen Einfluss auf die ribonukleolytische Aktivität der RNase J~His₆ haben. Hierfür wurde RNase J~His₆ mit *ZBP* in Gegenwart verschiedener Ionenkonzentrationen inkubiert. Der Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen an Kaliumchlorid (KCl) und Natriumchlorid (NaCl) auf die ribonukleolytische Aktivität von RNase J~His₆ ist in Abbildung 3-9 zu sehen. Es zeigte sich, dass in beiden Fällen mit zunehmender Ionenkonzentration die exoribonukleolytische Aktivität abnimmt. Dabei boten sich weiterhin keinerlei Hinweise auf eine eventuelle endonukleolytische Aktivität der RNase J~His₆. Diese Aktivität ließe erwarten, dass auch längere Degradationsprodukte als das 5'-Uridinmonophosphat entstehen.

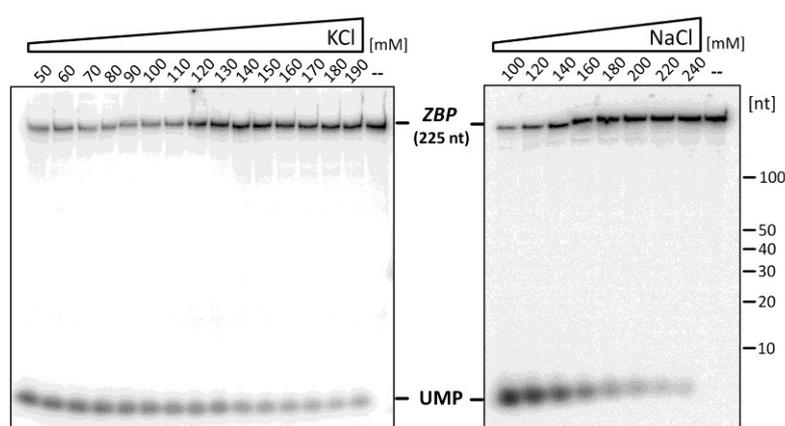


Abbildung 3-9: Degradationsassays mit RNase J~His₆ bei verschiedenen Konzentrationen monovalenter Ionen. Inkubation von RNase J~His₆ (5 pmol) mit intern markiertem *ZBP* (0,4 pmol) für 1 h bei 32°C. *Phosphorimages* der denaturierenden 10 % PAA-Gele. **(Links)** KCl Konzentration zwischen 50 und 190 mM. Reaktionspuffer ohne KCl: 50 mM NaCl, 40 mM Tris/HCl pH 7,5, 1 % Glycerin. (--) Negativ Kontrolle: 100 mM KCl ohne RNase J~His₆. **(Rechts)** NaCl Konzentration zwischen 100 und 240 mM. Reaktionspuffer ohne NaCl: 40 mM Tris/HCl pH 7,5, 1 % Glycerin. (--) Negativ Kontrolle: 150 mM NaCl ohne RNase J~His₆.

3.3.7 Einfluss divalenter Kationen auf die ribonukleolytische Aktivität der RNase J~His₆

Ribonukleasen benötigen häufig zweiwertige Metallkationen als Ko-Faktoren. Im katalytischen Zentrum der RNase J1 von *B. subtilis* sind zwei Zn²⁺-Ionen koordiniert, von denen mindestens eines direkt an der hydrolytischen Spaltung der Phosphodiesterbindung des RNA-Substrates beteiligt ist (Newman et al., 2011). Interessanterweise wurde in einigen Studien beobachtet, dass die Anwesenheit von MgCl₂ eine strikte Voraussetzung für die ribonukleolytische Aktivität der RNase J1 von *B. subtilis* ist (Even et al., 2005, Daou-Chabo et al., 2009). Aus diesem Grund wurde RNase J~His₆ mit ZBP in Gegenwart verschiedener MgCl₂-Konzentrationen inkubiert.

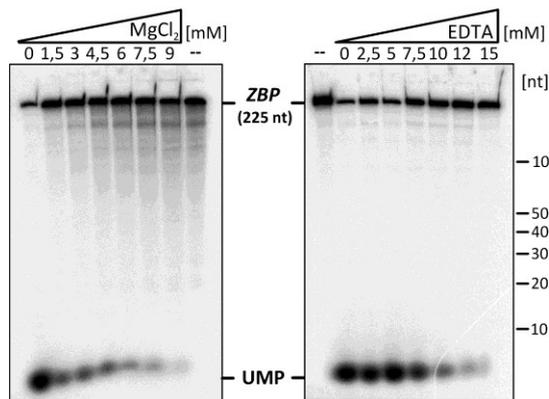


Abbildung 3-10: Degradationsassays mit RNase J~His₆ bei verschiedenen Konzentrationen an MgCl₂ oder Na₂EDTA (Na₂-Ethyldiaminacetat). Inkubation von RNase J~His₆ (5 pmol) mit intern markiertem ZBP (0,4 pmol) für 1 h bei 32°C. *Phosphorimage* der denaturierenden 10 % PAA-Gele. **(Links)** MgCl₂-Konzentration zwischen 0 und 9 mM. Reaktionspuffer ohne MgCl₂: 50 mM NaCl, 40 mM Tris/HCl pH 7,5, 1 % Glycerin). (--) Negativ-Kontrolle: 6 mM MgCl₂ ohne RNase J~His₆. **(Rechts)** EDTA-Konzentration zwischen 0 und 15 mM. Reaktionspuffer ohne Na₂-EDTA: 50 mM NaCl, 40 mM Tris/HCl pH 7,5, 1 % Glycerin). (--) Negativ-Kontrolle: 15 mM EDTA ohne RNase J~His₆.

Aus Abbildung 3-10 (links) geht hervor, dass ansteigende MgCl₂-Konzentrationen einen starken inhibitorischen Effekt auf die degradierende Aktivität der RNase J~His₆ haben. Derartige inhibitorische Effekte auf die RNase J~His₆ Aktivität wurden auch bei Zugabe von MnCl₂ oder ZnCl₂ im Reaktionspuffer beobachtet (nicht gezeigt). In diesem Zusammenhang ist zu betonen, dass während der Aufreinigung der rekombinanten RNase J~His₆ keine Zn²⁺-Ionen, trotz dessen bekannter Funktion als Ko-Faktor, den verwendeten Puffern zugesetzt wurden. Da nicht unbedingt ausgeschlossen werden konnte, dass es bereits während der Aufreinigung der RNase J~His₆ zu einer Kontamination der Proteinproben mit offenbar inhibitorischen, zweiwertigen Kationen kam, beispielsweise aufgrund verunreinigter Chemikalien, wurde ein RNA-Degradationsassay mit RNase J~His₆ und ZBP unter ansteigenden Konzentration von EDTA (Ethyldiamintetraacetat) durchgeführt. EDTA bildet sogenannte Chelatkomplexe mit zwei- und dreiwertigen Kationen und eignet sich für die Eliminierung derartiger Kontaminationen in Lösungen. Wie in Abbildung 3-10 zu sehen ist, führte die allmählich Zunahme an EDTA im Reaktionspuffer zu keiner generellen Veränderung der ribonukleolytischen Aktivität der RNase J~His₆, jedoch ist mit zunehmender EDTA-Konzentration eine geringere Menge an freigesetztem UMP zu beobachten. Die Ursache für diese abnehmende, degradierende Aktivität ist möglicherweise durch die gleichzeitige Zunahme an Na²⁺-Ionen bedingt, welche als Gegenionen in der zugegebenen Na₂-EDTA Lösung enthalten sind.

3.3.8 Endoribonukleolytische Aktivität der RNase J~His₆

Da die mit dem ZBP Substrat durchgeführten *in vitro* Degradationsstudien keine erkennbare endoribonukleolytische Aktivität der RNase J~His₆ nachweisen konnten, wurden hierfür eine Reihe weiterer RNA-Substrate getestet. Eines dieser Substrate war das *in vitro* Transkript *pre-tRNA^{Trp}*. Diese RNA entspricht einer Vorstufe der halobakteriellen Tryptophan-tRNA und wurde freundlicherweise von Frau Dr. Jasmin Weisel zur Verfügung gestellt (Weisel et al., 2010). Die Wahl dieses Substrates beruht auf einer Arbeit, in der gezeigt wurde, dass die endoribonukleolytische Aktivität der RNase J1

von *B. subtilis* erfolgreich für die enzymatische Sekundärstruktur-Analyse stark strukturierter RNAs, wie beispielsweise tRNAs, verwendet werden kann. Die dabei beobachteten endoribonukleolytischen Schnittstellen zeigten keine Nukleotid-Spezifität, waren jedoch ausschließlich in einzelsträngigen Bereichen vorhanden (Daou-Chabo & Condon, 2009). Inwieweit dies auch für die RNase J~His₆ aus *R. sphaeroides* zutrifft, sollte mit Hilfe des stark strukturierten *pre-tRNA^{Trp}* Substrates untersucht werden.

Aus einer Reihe von RNA-Degradationsassays mit diesem Substrat ist beispielhaft in Abbildung 3-11 ein Zeitreihen-Experiment gezeigt. Hierfür wurde 5'- bzw. intern markiertes *pre-tRNA^{Trp}* Substrat mit RNase J~His₆ für 0 bis 30 Minuten bei 32°C inkubiert. Anschließend wurden diese Ansätze auf einem

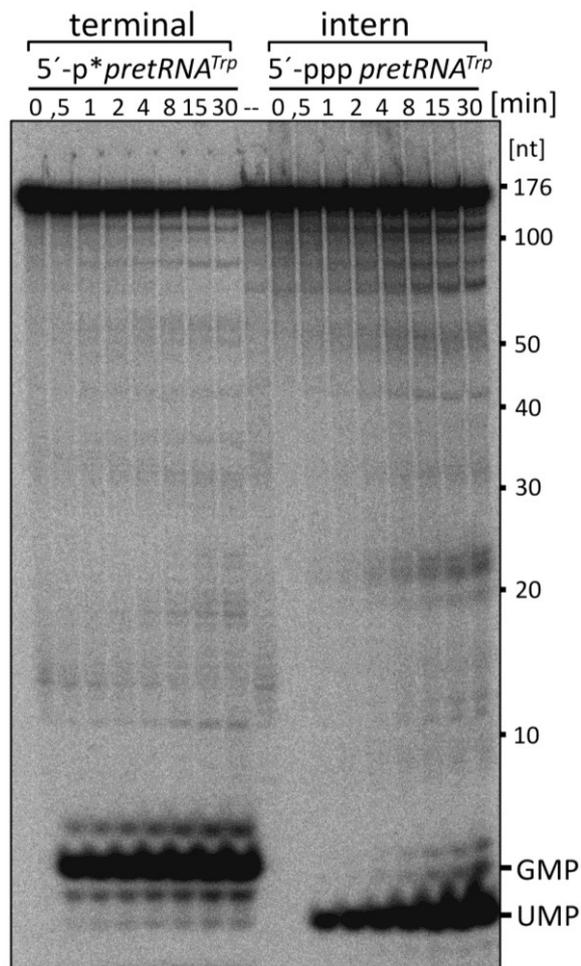


Abbildung 3-11: Zeitreihe mit *pre-tRNA^{Trp}*.

5'- und intern markierte *pre-tRNA^{Trp}* (0,4 bzw. 0,2 pmol) wurde für verschiedene Zeiten mit RNase J~His₆ (5 pmol) inkubiert. Die Ansätze wurden auf einem denaturierenden 10 % PAA-Sequenzier-Gel aufgetrennt und mittels *Phosphorimaging* visualisiert.

Sequenzier-Gel aufgetrennt. Das erhaltene *Phosphorimage* wurde mit Hilfe der *QuantityOne* Software nachträglich bearbeitet, um auch schwächere Signale sichtbar machen zu können. Im unteren Bereich sind die freigesetzten, radioaktiv markierten Einzelnukleotide 5'-GMP bzw. 5'-UMP deutlich erkennbar, die über die Zeit an Intensität zunehmen. Diese Degradationsprodukte sind auf die bereits beschriebene exoribonukleolytische Aktivität der RNase J~His₆ zurückzuführen. Zusätzlich zeigen sich in diesem „Einzelnukleotid-Bereich“ weitere Signale von Degradationsprodukten, deren Identität jedoch nicht geklärt wurde. Im oberen Trennbereich des Gels, zwischen 150 und 10 Nukleotiden, sind eine Reihe von schwachen Signalen zu erkennen, deren Intensität jedoch über die Zeit zunimmt. Hierbei kann es sich in den Spuren der 5'-markierten 5p*-*pre-tRNA^{Trp}* Ansätze (links) nur um verschiedene 5'-Fragmente des Substrates handeln. Setzt man voraus, dass die exoribonukleolytische Aktivität der RNase J~His₆ eine 5'-3' Orientierung besitzt, können diese Fragmente nicht von einer unvollständigen, exonukleolytischen Degradation stammen, sondern müssen Produkte einer endonukleolytischen Spaltung sein. Die beobachtete endoribonukleolytische Aktivität der RNase J~His₆ ist jedoch als äußerst gering einzuschätzen.

3.4 Konstruktion und Verifizierung der RNase J Deletionsmutante Δrnj

Eine RNase J Deletionsmutante sollte mögliche Funktionen der RNase J in *R. sphaeroides* aufdecken. Hierfür wurde, durch homologe Rekombination des Suizidvektors pPHU2.4.1 $\Delta rnj::Km^r$ in das Gen RSP_2534, die Insertions-Deletionsmutante Δrnj konstruiert. Die Insertion einer Kanamycin-Kassette zwischen Nukleotid 220 und 1505 führte zur Deletion von ungefähr 80 Prozent der 1674 Nukleotide langen, proteinkodierenden RSP_2534 Gensequenz. Das *Screening* nach einem erfolgreichen Deletionsstamm erfolgte zunächst über die entsprechenden Antibiotika-Resistenzen, wie in Kapitel 2.3.9 des Methodenteils beschrieben wurde. Die sich daraus ergebenden potentiellen Deletionsmutanten wurden anschließend mit Hilfe von Test-PCRs näher charakterisiert.

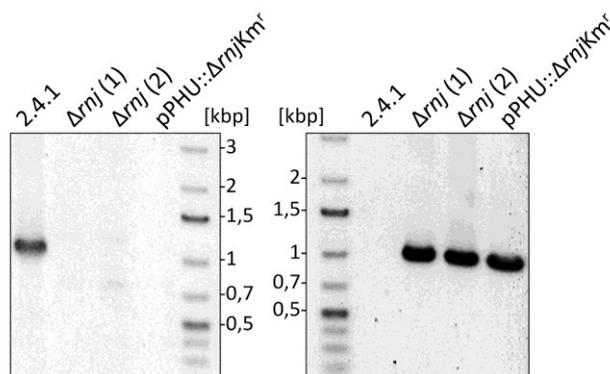


Abbildung 3-12: Validierung der RNase J Deletion auf DNA-Ebene.

(Links) PCR mit spezifischen Primern auf den deletierten DNA-Abschnitt von RSP_2534.

(Rechts) PCR auf die integrierte Kanamycin-Kassette. 2.4.1: Wildtyp, $\Delta rnj(1/2)$: potentielle *Knock Out* Kandidaten, pPHU:: $\Delta rnj Km^r$, Suizidvektor-Konstrukt.

Im linken Teil der Abbildung 3-12 ist das Ergebnis der PCR mit den Primern *RNIFrag-del_fwd* und *RNIFrag-del_rev* gezeigt. Diese Primer amplifizieren ein 988 bp langes Fragment innerhalb des RSP_2534 Gens, welches nach erfolgreicher *double-crossover* Rekombination durch die Kanamycin-Kassette ersetzt ist. Bei den beiden potentiellen Mutanten, $\Delta rnj(1)$ und $\Delta rnj(2)$, wurde im Gegensatz zum Wildtyp kein Produkt detektiert, was für eine erfolgreiche Deletion von RSP_2534 spricht. Bedingt durch einen sogenannten „*smiling effect*“ läuft die Bande des 988 bp PCR-Produkts in der Spur des Wildtyps 2.4.1 im Vergleich zum Marker allerdings etwas zu hoch. Dieses Phänomen tritt jedoch häufig in den äußeren Spuren breiter Gel-Apparaturen auf und ist auf die Kompression der Gelmatrix und auf Temperaturunterschiede während der Elektrophorese zurückzuführen. Da das generelle Ausbleiben eines PCR-Produktes beispielsweise auch auf eine verunreinigte DNA-Probe zurückgeführt werden kann, wurde eine weitere Kontroll-PCR durchgeführt. Diese sollte die prinzipielle Integrität der isolierten chromosomalen DNA aus den beiden *Knock-Out* Kandidaten $\Delta rnj(1)$ und $\Delta rnj(2)$ bestätigen. Hierfür wurde eine für die integrierte Kanamycin-Kassette spezifische PCR mit den Oligonukleotiden *KanR2_fwd* und *KanR2_rev* durchgeführt. Auch bei dieser PCR entsteht ein etwa 1000 bp großes Produkt. Bei beiden potentiellen Deletionskandidaten, als auch dem Suizidplasmid pPHU::2.4.1 $\Delta rnj::Km^r$, wurde dieses Produkt detektiert, erwartungsgemäß jedoch nicht im Wildtyp. Demnach waren die verwendeten DNA-Proben generell PCR-tauglich und das Ausbleiben eines PCR-Produktes konnte als spezifisch betrachtet werden. Eine endgültige Verifizierung der RNase J Deletion in *R. sphaeroides* erfolgte schließlich auf Proteinebene mit einem RNase J[~]His₆ spezifischen Immenserum (3.7.1).

3.5 Wachstumsverhalten der RNase J Deletionsmutante Δrnj

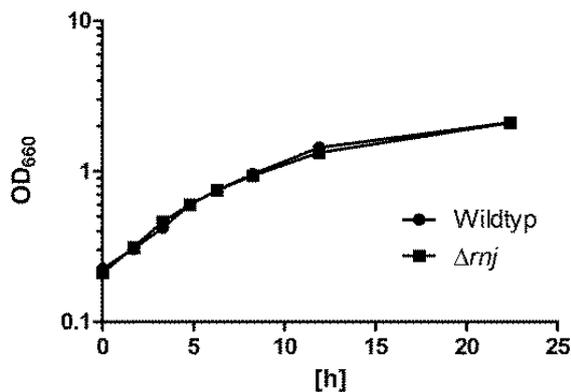


Abbildung 3-13: Wachstumskurven. *R. sphaeroides* Wildtyp und Δrnj unter mikroaeroben Wachstumsbedingungen in RÄ-Medium (32°C, 140 rpm).

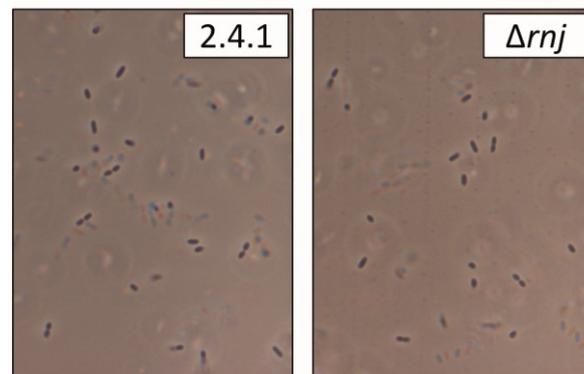
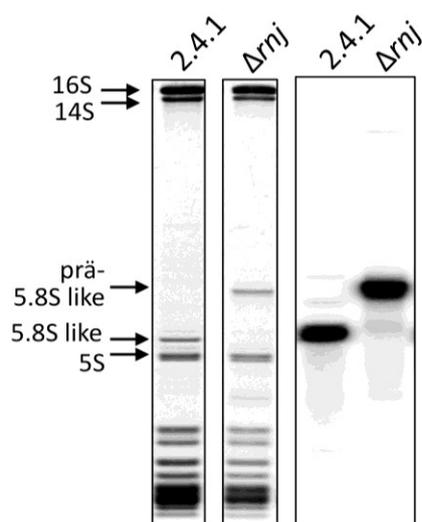


Abbildung 3-14: Lichtmikroskopische Aufnahme (1000-fache Vergrößerung) von *R. sphaeroides* Wildtyp und Δrnj . Die Zellen befinden sich im exponentiellen Wachstum (OD_{660} 0,6).

Die Untersuchung des Wachstumsverhaltens der Mutante Δrnj beschränkte sich während dieser Arbeit auf mikroaerobe Standardbedingungen. Hier ließen sich keinerlei Unterschiede zum Wildtyp feststellen. Sowohl die Geschwindigkeit des exponentiellen Wachstums, als auch Zeitpunkt und Zelldichte während des Eintretens in die stationäre Phase waren identisch zum Wildtyp (Abbildung 3-13). Auch eine lichtmikroskopische Betrachtung der Δrnj Zellen ergab hinsichtlich ihrer Morphologie oder ihrer Zellgröße keine Abweichungen zum Wildtyp (Abbildung 3-14).

3.6 Effekt der RNase J Deletion auf die 5.8Slike RNA-Prozessierung

Für den weiteren Vergleich der Mutante Δrnj mit dem Wildtyp 2.4.1 wurde die Gesamt-RNA beider Stämme auf einem denaturierenden 10 % PAA-Gel aufgetrennt. Es zeigte sich, dass in der Spur der Mutante Δrnj eine der abundantesten RNAs ein verlangsamtes Laufverhalten aufwies. Aufgrund der Größe dieser abberanten RNA war davon auszugehen, dass es sich dabei um die 5.8Slike rRNA handelt. Dies konnte mittels *Northern Blot* und einer entsprechenden DNA-Oligonukleotid-Sonde bestätigt werden (Abbildung 3-15; rechts). Die 5.8Slike rRNA ist Teil der in *R. sphaeroides* fragmentiert vorliegenden 23S rRNA. In der RNase J Deletionsmutante Δrnj akkumuliert offensichtlich eine Vorstufe dieser ribosomalen RNA. Eine Beteiligung der RNase J an der finalen Prozessierung der 5.8Slike RNA wurde auch für das α -Proteobakterium *Sinorhizobium meliloti* beschrieben (Madhugiri et al., 2009).



Die 5.8Slike rRNA ist Teil der in *R. sphaeroides* fragmentiert vorliegenden 23S rRNA. In der RNase J Deletionsmutante Δrnj akkumuliert offensichtlich eine Vorstufe dieser ribosomalen RNA. Eine Beteiligung der RNase J an der finalen Prozessierung der 5.8Slike RNA wurde auch für das α -Proteobakterium *Sinorhizobium meliloti* beschrieben (Madhugiri et al., 2009).

Abbildung 3-15: Gesamt-RNA von *R. sphaeroides* Wildtyp (2.4.1) und Δrnj . **Links:** Jeweils 5 μ g Gesamt-RNA wurden auf einem denaturierenden 10% PAA-Gel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt (invertiertes Fluoreszenzbild). Pfeile verweisen auf die Identität der abundantesten Banden. **Rechts:** Identifizierung der abberanten RNA mittels *Northern Blot* und einer 5.8Slike RNA spezifischen Sonde. *Phospholmage* der *Northern Blot* Membran.

3.7 Komplementation der Deletionsmutante Δrnj

Das Plasmid pRK415 wird für die rekombinante Proteinexpression in *R. sphaeroides* genutzt und diente in dieser Arbeit der Komplementation der RNase J in der Mutante Δrnj . Die Expressionsrate des rekombinanten Proteins unterliegt dabei einem konstitutiven *lac* Promotor. Die im folgenden erwähnten *R. sphaeroides* Stämme entstammen der konjugativen Übertragung verschiedener pRK415-Konstrukte und werden hier zunächst kurz beschrieben. Der Stamm 2.4.1RK::*rnj*~His₆ ist ein RNase J Überexpressionsstamm, welcher neben der chromosomal-kodierten Wildtyp RNase J zusätzlich die am C-Terminus mit einem His-tag versehene RNase J~His₆ exprimiert. Das hierfür verwendete Konstrukt pRK415::*rnj*~His₆ wurde auch in die RNase J Deletionsmutante Δrnj übertragen, resultierend in dem Stamm Δrnj RK::*rnj*~His₆. Ebenfalls in den Deletionsstamm Δrnj wurde das Konstrukt pRK415::*rnj*-DH80KA~His₆ übertragen, dieses Plasmid kodiert eine durch zwei Punktmutationen funktionell inaktivierte RNase J~His₆ (s. 3.3.2). Während dieser Arbeit stand auch ein pRK415-Konstrukt zur Verfügung, das die mit einem C-terminalen Streptavidin-tag versehene RNase J aus *S. meliloti* kodiert (Madhugiri et al., 2009). Die Übertragung dieses Konstruktes pRK415::*rnj*-*S.mel*~strep in den Deletionsstamm Δrnj ergab den Stamm Δrnj RK::*rnj*-*S.mel*~strep.

3.7.1 Validierung der RNase J Deletion und deren Komplementation mittels *Western Blot* Analyse

Die oben beschriebenen Stämme wurden hinsichtlich der Expression ihrer rekombinanten Proteine mittels *Western Blot* Analyse untersucht. Die lösliche Proteinfraction (10 μ g) der jeweiligen Stämme wurde auf einem 10%igem SDS-PAA-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Nach der Inkubation mit einem RNase J~His₆ spezifischen Immenserum (2.6.3) konnte die RNase J im Wildtyp 2.4.1, dem Überexpressionstamm 2.4.1RK::*rnj*~His₆ und den beiden komplementierten Stämmen Δrnj RK::*rnj*~His₆, Δrnj RK::*rnj*-DH80KA~His₆ nachgewiesen werden. Bedingt durch die sechs zusätzlichen Histidin-Reste der plasmidkodierten RNase J~His₆ ist in der Spur des Über-

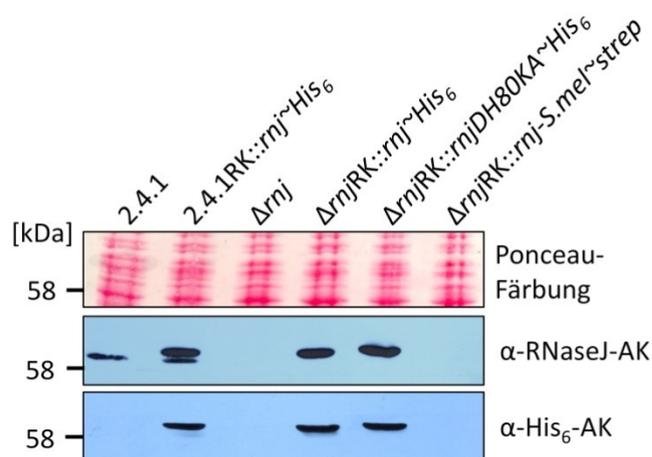
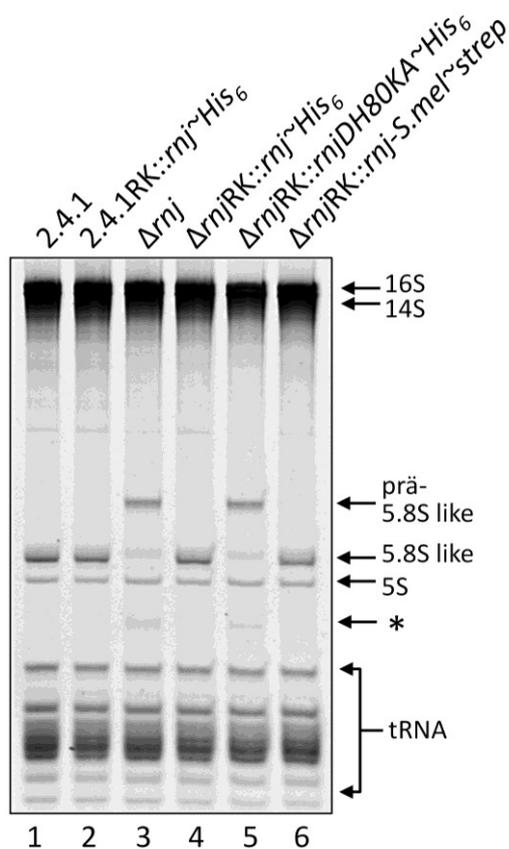


Abbildung 3-16: *Western Blot* Analyse diverser Komplementationsstäme. Jeweils 10 μ g der cytoplasmatischen Proteinfraction wurden auf 10 % SDS-PAA-Gelen aufgetrennt, auf Nitrocellulosemembranen geblottet und mit RNase J spezifischen Immenserum (α -RNase J-AK) oder His₆-tag spezifischen Antikörper (α -His₆-AK) hybridisiert. Die Entwicklung der *Western Blot* Signale erfolgte mittels der Peroxidase-Reaktion und Röntgenfilm-Exposition. Die Ponceau-Färbung diente zur Kontrolle des *blottings* und entspricht der Membran des α -His₆ *Western Blot*.

expressionstammes 2.4.1RK::*rnj*^{~His₆} ein geringer Laufunterschied zum zusätzlich vorhandenem Wildtyp-Protein zu erkennen. Ebenfalls ist in dieser Spur erkennbar, dass die Expressionsrate der RNase J^{~His₆} etwa 5 - 10fach höher als die natürliche Expression des Wildtyp-Proteins liegt. In der Mutante Δ *rnj* wurde kein Signal detektiert, was die erfolgreiche Deletion der RNase J in diesem Stamm bestätigt. Ein Nachweis für die Expression der RNase J von *S. meliloti* im Stamm Δ *rnj*RK415::*rnj-S.mel*^{~strep} konnte nicht erbracht werden, da der Antikörper offensichtlich keine Spezifität für die RNase J dieses Organismus besitzt. Aufgrund der beobachteten Komplementation auf RNA-Ebene (3.7.2) ist jedoch davon auszugehen, dass dieses Protein tatsächlich exprimiert wird. In einem weiteren *Western Blot* Experiment wurde ein Histidin-*tag* spezifischer Antikörper verwendet. Hierbei bestätigte sich die erfolgreiche Expression der RNase J^{~His₆} in den entsprechenden Stämmen.

3.7.2 Effekt der komplementierenden RNase J Varianten auf die 5.8Slike RNA-Prozessierung in Δ *rnj*



Die Gesamt-RNA der oben beschriebenen Stämme wurde auf einem denaturierenden 10 % PAA-Gel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt (Abbildung 3-17). Die Komplementation der RNase J Deletion führte zur Wiederherstellung der 5.8Slike RNA-Prozessierung in den Stämmen Δ *rnj*RK415::*rnj*^{~His₆} und Δ *rnj*RK::*rnj-S.mel*^{~Strep}. Das zeigt, dass die plasmidkodierte RNase J^{~His₆} und die RNase J^{~Strep} von *S. meliloti* zur Prozessierung der 5.8Slike RNA befähigt sind. Dass RNase J hierbei wahrscheinlich eine enzymatische und keine strukturelle Funktion übernimmt, zeigt sich, da die Expression der funktionell inaktiven Variante RNase J-DH80KA^{~His₆} (Spur 5) nicht zur Prozessierung der prä-5.8Slike RNA führte. In den Spuren 5 und 3 der nicht komplementierten Mutante Δ *rnj* ist unterhalb der 5S rRNA eine weitere aberrante RNA-Bande (*) schwach zu erkennen, dessen Identität in einem späteren Teil dieser Arbeit festgestellt werden konnte (3.9.2).

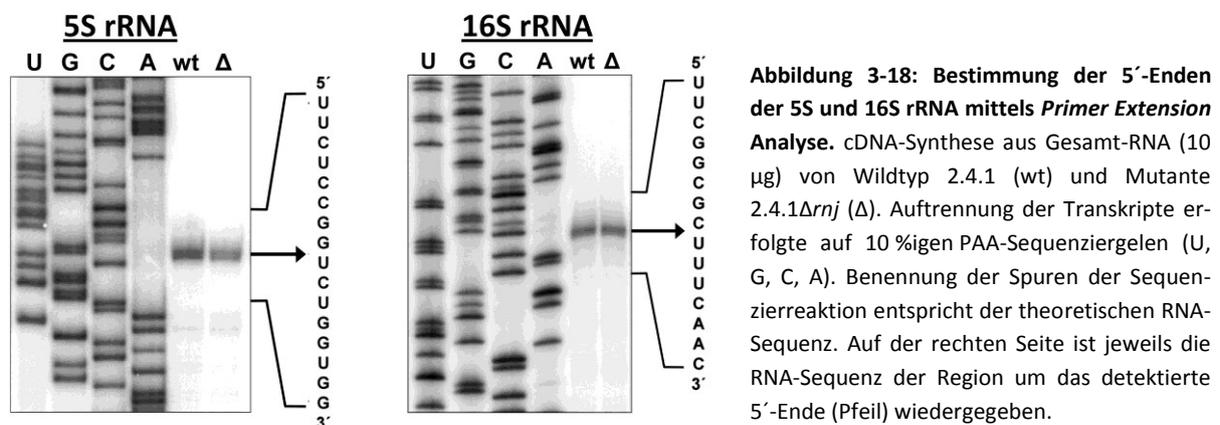
Abbildung 3-17: Einfluss der RNase J Komplementation auf die 5.8Slike RNA Prozessierung. Die Gesamt-RNA (5 µg) von *R. sphaeroides* Wildtyp, der Mutante Δ *rnj* und von verschiedenen komplementierten Stämmen wurde auf einem denaturierendem 10 % PAA-Gel aufgetrennt und mittels Ethidiumbromid angefärbt (invertiertes Fluoreszenzbild). Die Pfeile verweisen auf die Identität der abundantesten Banden. Der Stern verweist auf eine schwache, aberrante Bande in den Spuren 3 und 5.

3.8 Untersuchungen zur Prozessierung der ribosomalen RNA durch RNase J

Der Einfluss der RNase J auf die Prozessierung ribosomaler RNA wurde bereits für eine Reihe von Organismen beschrieben. Aufgrund der Beobachtung eines verlängerten 5.8Slike RNA-Transkriptes in der RNase J Deletionsmutante (s. 3.6) war zu vermuten, dass auch in *R. sphaeroides* die RNase J an der Reifung der ribosomalen RNA beteiligt ist. Daher wurden mittels *Primer Extension* Analyse die 5'-Enden aller ribosomalen RNAs im Wildtyp und in der RNase J Deletionsmutante 2.4.1 Δ *rnj* bestimmt und miteinander verglichen.

3.8.1 *Primer Extension* Analyse der ribosomalen RNA von *R. sphaeroides*

Die detektierten 5'-Enden der 5S und 16S rRNA erwiesen sich bei der Mutante und dem Wildtyp als identisch (Abbildung 3-18). Interessanterweise stellt sich jedoch das detektierte 5'-Ende der 16S rRNA um drei Nukleotide verlängert (3 x U) dar, im Vergleich zum annotierten 5'-Ende der Gendatenbank von NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).



Wie bereits in der Einleitung erwähnt, liegt die 23S rRNA von *R. sphaeroides* nicht als zusammenhängendes Molekül in der 50S Ribosomen-Untereinheit vor. Vielmehr führen RNase III Spaltungen in den *intervening sequences* 1 und 2 (IVS 1 und 2) des 23S rRNA Vorläufermoleküls zu einer Fragmentierung in die 5.8Slike, die 1.1kb und die 1.5kb rRNA (1.3.1).

Die *Primer Extension* Analyse dieser drei Fragmente im Wildtyp und der Mutante Δ *rnj* ist jeweils in den Spuren 1 und 2 von Abbildung 3-19 (nächste Seite) zu sehen. Alle drei Fragmente der Mutante zeigten vom Wildtyp abweichende, verlängerte 5'-Enden. Während die 5.8Slike RNA ein um 16 nt verlängertes 5'-Ende aufwies, lag das 5'-Ende der 1.1kb rRNA in der Mutante, 46 Nukleotide *upstream* zum detektierten Wildtyp-Ende. Interessanterweise liegt dieses Ende damit exakt in der Position einer beschriebenen RNase III Schnittstelle. Diese Schnittstelle wurde bei *in vitro* Degradationsstudien mit einem Helix 9-Transkript (entspricht IVS 1) und rekombinanter RNase III von *R. capsulatus* identifiziert (Evguenieva-Hackenberg et al., 2000). Im Falle der 1.5kb RNA ergab die *Primer Extension* Analyse eine Reihe alternativer 5'-Enden, welche sowohl im Wildtyp als auch in der Mutante Δ *rnj* detektiert wurden. Zwei dieser 5'-Enden waren allerdings in der Mutante deutlich abundanter und lagen 39 bzw. 47 Nukleotide *upstream* vom reifen Wildtyp Ende (P_2 und P_3 in Abbildung 3-19). Offensichtlich verbleiben alle drei 23S rRNA-Fragmente als Vorstufen in der RNase J Deletionsmutante Δ *rnj*.

3.8.2 *Primer Extension* Analyse der polysomalen rRNA nach *in vitro* Prozessierung

Die obigen Ergebnisse verweisen zwar auf einen generellen Einfluss der RNase J auf die Prozessierung der 23S rRNA-Fragmente, jedoch geht daraus nicht hervor, ob die finale Reifung der 5'-Enden ausschließlich der RNase J obliegt oder ob ein weiteres nicht identifiziertes Enzym daran beteiligt ist. Deshalb wurde mittels *in vitro* RNA-Degradationsassays untersucht, ob rekombinante RNase J~His₆ in der Lage ist, ein der prä-5.8Slike rRNA entsprechendes *in vitro* Transkript auf das reife 5'-Ende zu verkürzen. Diese Inkubation resultierte jedoch in der vollständigen Degradation des *in vitro* Transkriptes zu 5'-Mononukleotiden ohne Bildung eines spezifischen Produktes (nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurde die *in vitro* Prozessierung von Ribosom-assemblierten 23S rRNA-Fragmenten untersucht. Hierfür wurden die Polysomen des Wildtyps und der Mutante zunächst isoliert und anschließend mit rekombinanter RNase J~His₆ inkubiert. Die resultierenden 5'-Enden wurden erneut mittels *Primer Extension* Analyse bestimmt. Das Ergebnis dieser Polysomen *in vitro* Prozessierung ist jeweils in den Spuren 3 bis 6 von Abbildung 3-19 gezeigt.

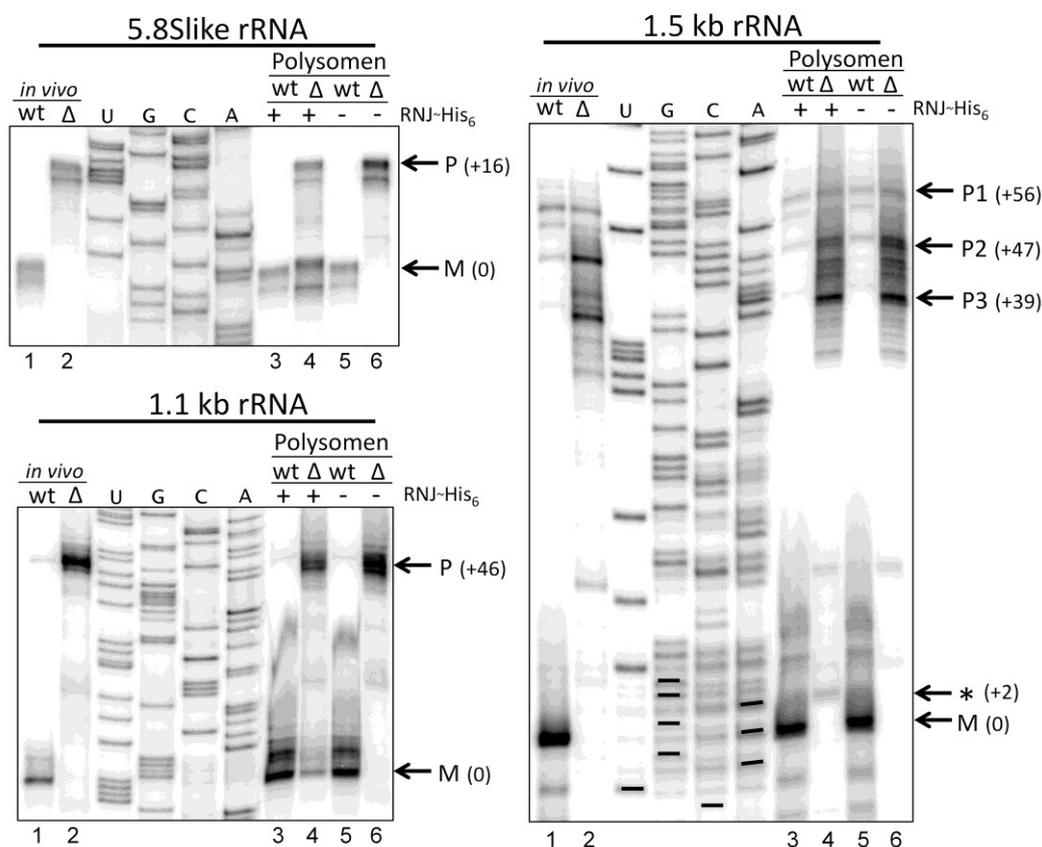


Abbildung 3-19: Bestimmung der 5'-Enden der 23S rRNA-Fragmente mittels *Primer Extension* Analyse.

(Links oben) 5.8S like RNA. (Links unten) 1.1kb rRNA. (Rechts) 1.5kb RNA.

(Spuren 1 und 2, *in vivo*) cDNA Synthese von Gesamt RNA aus Wildtyp 2.4.1 (wt) und Mutante 2.4.1 Δ rnj (Δ).

(Spuren 3-6, Polysomen) cDNA Synthese von polysomaler RNA nach Inkubation isolierter Polysomen (10 pmol) aus dem Wildtyp 2.4.1 (wt) und der Mutante 2.4.1 Δ rnj (Δ) mit (+) bzw. ohne (-) rekombinanter RNase J~His₆ (4 pmol). cDNA-Transkripte wurden auf 10 %igen PAA-Sequenzier-Gelen aufgetrennt und mittels *Phosphorimaging* visualisiert. (U, G, C, A) Benennung der Spuren der Sequenzierreaktion ist der RNA-Nukleotid Abfolge angepasst. Pfeile verweisen auf die abundantesten Präkursor-5'-Enden (P), alternative 5'-Enden der 1.5kb RNA sind dabei nummeriert von 1 - 3. Zahlen in Klammern benennen die Anzahl der Nukleotide *upstream* vom jeweiligen Wildtyp 5'-Ende (M(0)). Sternchen in der 1.5kb RNA Abbildung verweist auf ein alternatives 5'-Ende der 1.5kb RNA nach Inkubation von Polysomen der Mutante 2.4.1 Δ rnj mit RNase J~His₆.

Die Inkubation der Polysomen der Mutante Δrnj mit RNase J \sim His₆ (Spur 4) führte zur Entstehung von nativen, dem Wildtyp entsprechenden 5'-Enden (Spur 5). Die Effizienz der *in vitro* Prozessierung unterschied sich jedoch recht deutlich bei den drei Fragmenten. Der Vorläufer der 5.8Slike RNA wurde exakt und zu mehr als 50 % zum reifen 5'-Ende prozessiert. Auch der Vorläufer der 1.1kb RNA wurde in gewissem Umfang auf das reife 5'-Ende verkürzt, der relative Anteil prozessierter gegenüber nicht prozessierter 5'-Enden lag jedoch bei nur etwa 15 %. Bei dem 1.5kb RNA-Fragment resultiert die RNase J \sim His₆ Inkubation in einem alternativen 5'-Ende, das dem Wildtyp-Ende um 2 Nukleotide vorgelagert ist. Demnach könnte RNase J allein für die finale 5'-Ende Prozessierung der 23S rRNA-Fragmente verantwortlich sein, unter Vorbehalt des 1.5kb RNA-Fragments, was später diskutiert wird.

3.8.3 Northern Blot Analyse der polysomalen 5.8Slike RNA nach *in vitro* Prozessierung

Für den im unteren Teil der Abbildung 3-20 gezeigten *Northern Blot* wurden RNA-Proben der *in vitro* Polysomen-Prozessierung, sowie die Gesamt-RNA vom Wildtyp und der Mutante Δrnj auf einem denaturierenden PAA-Gel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran geblottet und anschließend mit einer 5.8Slike RNA spezifischen Sonde hybridisiert. Dabei stellte sich heraus, dass die Größe der *in vitro* prozessierten 5.8Slike RNA (P_2 in Spur 3) mit etwa 140 Nukleotiden zwar kürzer als die nicht prozessierte RNA mit 157 Nukleotiden (P_1) war, jedoch nicht der Größe des Wildtyp-Fragmentes mit 130 Nukleotiden (M) entsprach. Die nächstliegende Erklärung für diesen Laufunterschied war, dass auch die Prozessierung des 3'-Endes der 5.8Slike rRNA von der RNase J Deletion betroffen ist.

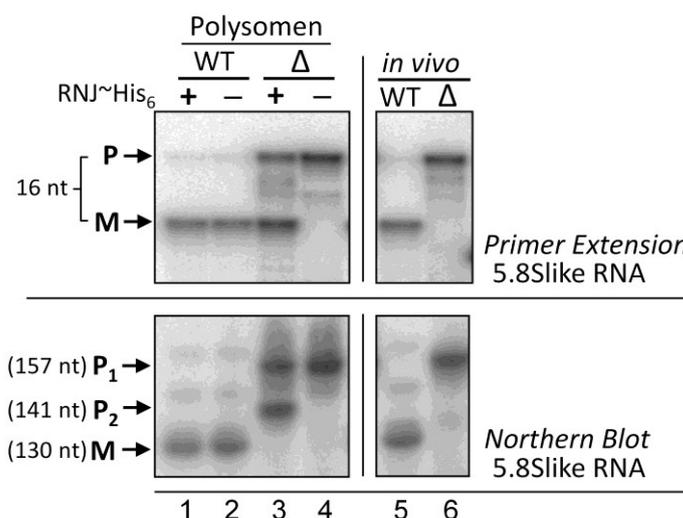


Abbildung 3-20: Vergleich der *Primer Extension* und der *Northern Blot* Analyse zur *in vitro* Prozessierung der 5.8Slike RNA.

(Oben) *Primer Extension*. 5.8Slike RNA. **(Spuren 1 - 4, Polysomen)** cDNA-Synthese von polysomaler RNA nach Inkubation isolierter Polysomen (10 pmol) aus dem Wildtyp 2.4.1 (WT) und der Mutante 2.4.1 Δrnj (Δ) mit (+) bzw. ohne (-) rekombinanter RNase J \sim His₆ (4 pmol). **(Spuren 5 - 6, *in vivo*)** cDNA-Synthese von Gesamt-RNA aus Wildtyp 2.4.1 (WT) und Mutante 2.4.1 Δrnj (Δ).

(Unten) *Northern Blot* Analyse. Polysomale RNA der *in vitro* Prozessierung (3 μ g) und Gesamt-RNA (5 μ g) wurden einem auf denaturierendem 10 % PAA-Gel aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und mit einer 5.8Slike RNA spezifischen Sonde hybridisiert.

3.8.4 Bestimmung der 3'-Ende der 23S rRNA-Fragmente mittels *RNase Protection Assays*

Um die 3'-Enden der einzelnen 23S rRNA-Fragmente im Wildtyp und in der RNase J Mutante Δrnj zu vergleichen, wurde zunächst die Gesamt-RNA beider Stämme für entsprechende *RNase Protection Assays* eingesetzt. Dabei stellte sich heraus, dass die 3'-Enden aller drei Fragmente in der RNase J Mutante Δrnj verlängert waren (Abbildung 3-21). Für die 5.8Slike rRNA wurden drei alternative Enden in der Mutante detektiert, welche 6 bis 11 Nukleotide *downstream* zum nativen Wildtyp-Ende lagen. Die 3'-Enden der 1.1kb rRNA und der 1.5kb rRNA der RNase J Mutante sind um jeweils 10 bzw. 16 Nukleotide gegenüber den entsprechenden Wildtyp-Enden verlängert.

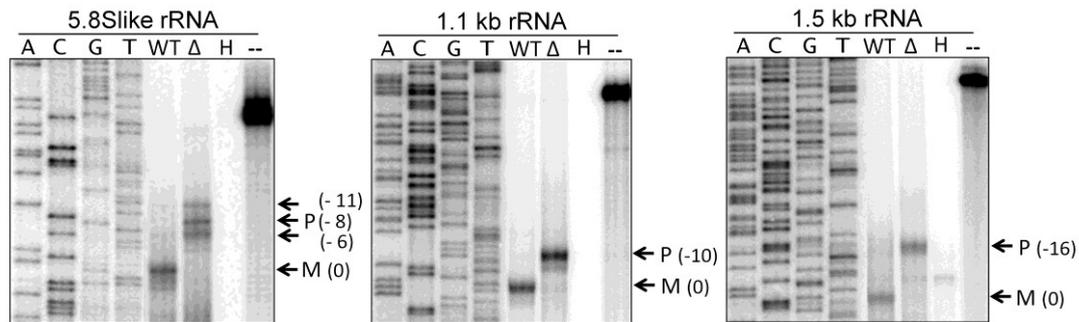


Abbildung 3-21: Bestimmung der 3'-Enden der 23S rRNA-Fragment. *RNase Protection Assay*. Gesamt-RNA (7,5 μ g) aus *R. sphaeroides* Wildtyp (WT) bzw. Δrnj (Δ) wurde mit entsprechenden RNA-Sonden hybridisiert und mit einem RNase A/T₁ Mix inkubiert. In zwei Kontrollansätzen wurde die jeweilige Sonde mit Hefe-Gesamt-RNA hybridisiert und anschließend mit (H) bzw. ohne (--) Zugabe des RNase-Cocktails inkubiert. Alle Ansätze wurden auf denaturierenden 10 % Sequenzier-Gelen aufgetrennt und mittels *Phosphorimaging* visualisiert. (A, C, G, T) Sequenzier-Reaktion der zugehörigen 3'-Region. Pfeile verweisen auf die detektierten 3'-Enden mit der Anzahl der Nukleotide *downstream* vom detektierten Wildtyp-Ende, M(0).

Offensichtlich hat die RNase J auch einen Einfluss auf die Prozessierung dieser RNAs am 3'-Ende. Inwieweit es sich dabei um eine direkte Beteiligung der RNase J an der 3'-Prozessierung handelt, sollte ein *RNase Protection Assay* unter Verwendung der *in vitro* prozessierten Polysomen-RNA klären. Dieser Assay ist in Abbildung 3-22 gezeigt. Bei keinem der Vorläufer 23S rRNA-Fragmente des RNase J Deletionsstammes Δrnj wurde ein verkürztes 3'-Ende nach Inkubation mit RNase J~His₆ detektiert. Demnach handelt es sich bei der unvollständigen 3'-Ende Prozessierung in der Mutante um einen sekundären Effekt, der nicht auf eine enzymatische Beteiligung der RNase J zurückzuführen ist.

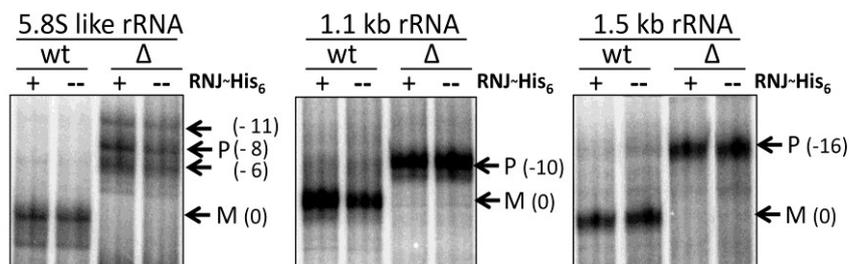


Abbildung 3-22: Bestimmung der 3'-Enden der polysomalen 23S rRNA-Fragment nach RNase J~His₆ Inkubation. *RNase Protection Assay*. RNA (7,5 μ g) der *in vitro* Prozessierung von Polysomen aus *R. sphaeroides* Wildtyp (wt) und Δrnj (Δ) mit (+) bzw. ohne (-) RNase J~His₆ Inkubation wurde mit entsprechenden RNA-Sonden hybridisiert und mit einem RNase A/T₁ Mix inkubiert. Die Ansätze wurden auf einem denaturierendem 10 % Sequenzier-Gel aufgetrennt und mittels *Phosphorimaging* visualisiert. Pfeile verweisen auf die detektierten 3'-Enden mit der Anzahl der Nukleotide *downstream* vom detektierten Wildtyp-Ende, M(0).

3.9 RNASeq Transkriptomanalyse von *R. sphaeroides* und Δrnj

Spezielle cDNASyntheseStrategien in Verbindung mit Hochdurchsatz-Sequenziermethoden ermöglichen einen detaillierten Blick auf das Transkriptom eines Organismus. Ein Vergleich derartiger RNASeq-Datensätze von *R. sphaeroides* Wildtyp mit dem der RNase J Deletionsmutante Δrnj sollte Aufschluss geben, ob es neben den bereits beschriebenen 23S rRNA-Fragmenten weitere natürliche RNase J Substrate gibt.

3.9.1 Beschreibung der RNASeq Datensätze von *R. sphaeroides* und Δrnj

Die RNASeq Daten basieren auf dem Transkriptom mikroaerob gewachsener Kulturen in der frühexponentiellen Phase mit einer OD_{660} von 0,4. Die Daten umfassen das Gesamt-Transkriptom einschließlich der ribosomalen RNA, sowie unprozessierter als auch prozessierter RNA-Transkripte. Die Sequenzierung der cDNA-Bibliotheken erfolgte auf einer *Solexa* Sequenzier-Plattform (Illumina). Die Anzahl der *reads* nach erfolgreichem *mapping* betrug beim Wildtyp 6,9 und bei der Mutante 4,9 Millionen. Dieser enorme Unterschied von 2 Millionen *reads* ist auf die unverhältnismäßig hohe Erfassung ribosomaler RNAs im Wildtyp-Transkriptom zurückzuführen. Eine Übersicht zur Verteilung der *reads* kann der Tabelle 2 im Anhang entnommen werden. Eine tiefere Analyse und Auswertung dieser Datensätze hat noch nicht stattgefunden und kann nicht Thema dieser Arbeit sein. Im folgenden werden einige, bereits näher untersuchte, Aspekte der Gesamt-Transkriptom RNASeq beschrieben.

3.9.2 Auswertung der RNASeq Datensätze

Die bisherige Analyse der RNASeq Daten beschränkte sich auf die visuelle Betrachtung der normalisierten *reads* unter Verwendung des *Integrated Genome Browser* (IGB; www.bioviz.org/igb/).

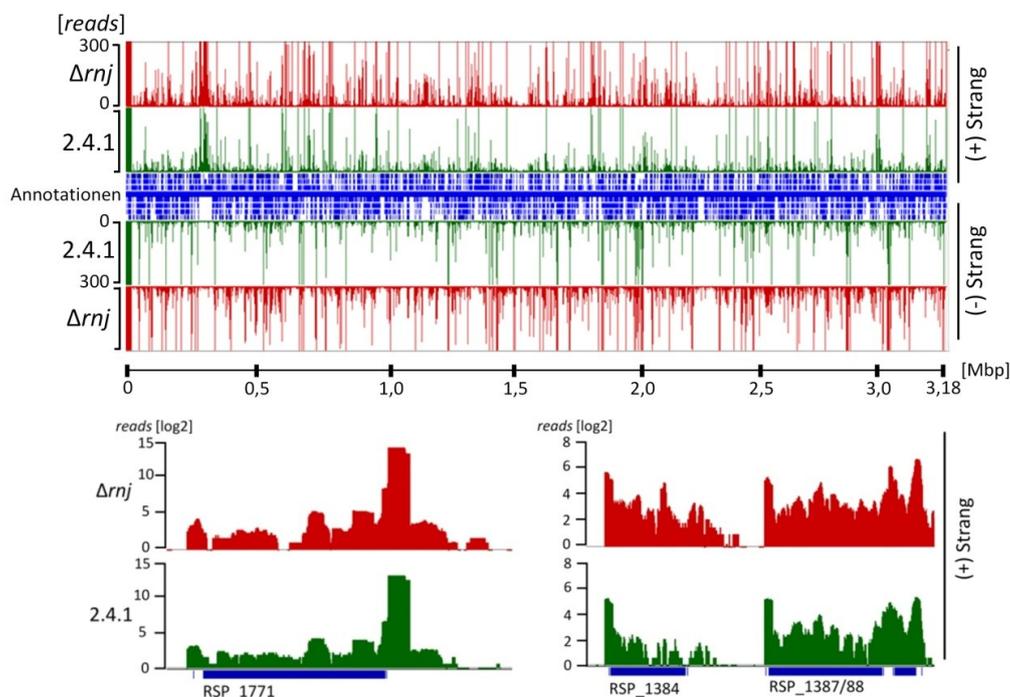
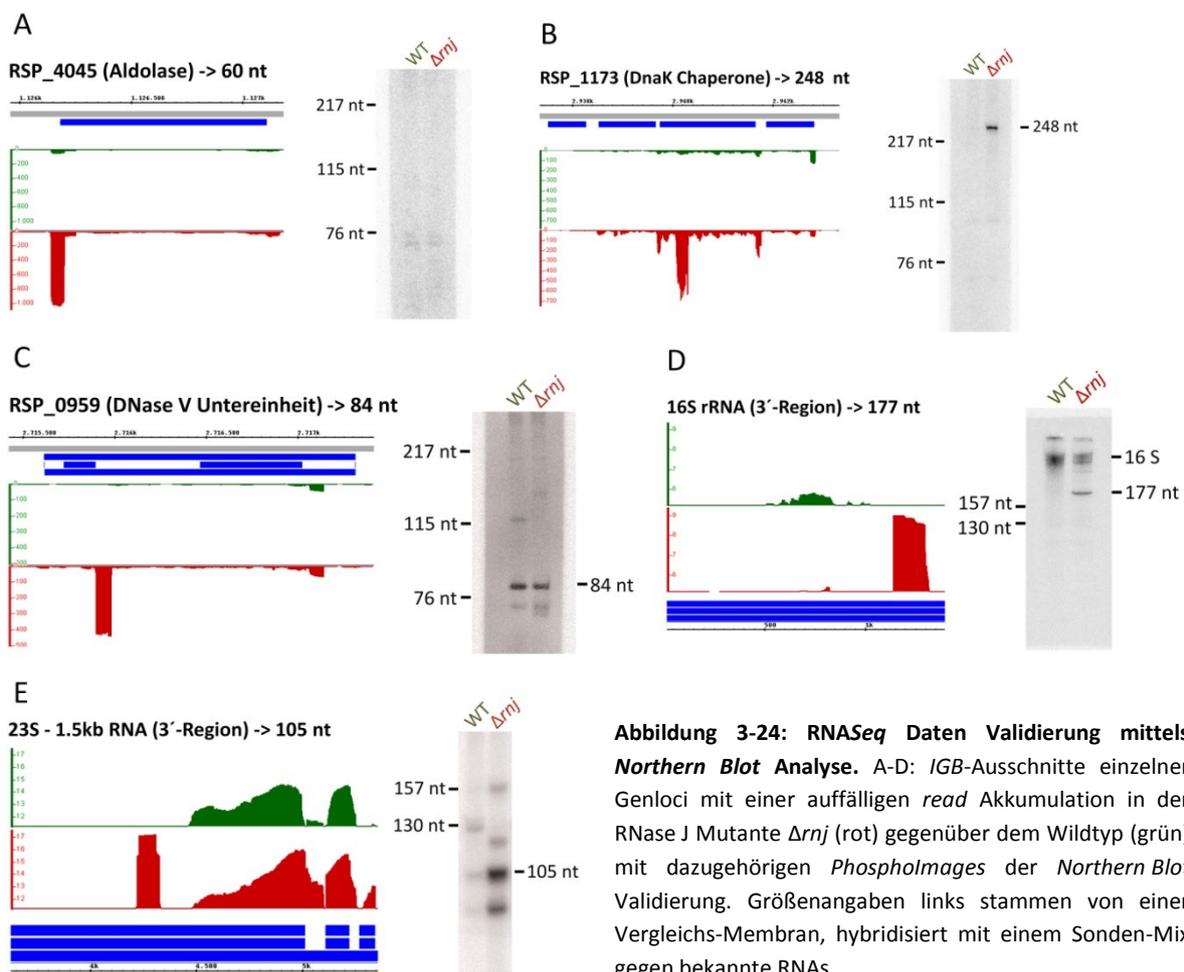


Abbildung 3-23: Nachbearbeitete Ansichten des *Integrated Genome Browser* mit den normalisierten *reads* der RNASeq für das Chromosom 1 und den drei Genloci RSP_1771 und RSP_1384/87/88. (blau) Genomannotationen. Die normalisierten Werte der einzelnen *reads* (grün) Wildtyp, (rot) Δrnj sind der jeweiligen Nukleotid-Position auf dem Chromosom 1 zugeordnet.

Hierbei werden die normalisierten Werte der *reads* für jede einzelnen Nukleotidposition auf dem annotierten Genom von *R. sphaeroides* abgebildet. Beispielhaft zeigt Abbildung 3-23 eine nachbearbeitete Ansicht des IGB-Fensters mit allen *reads* auf dem Chromosom 1 für den Wildtyp und die Mutante Δrnj . Zusätzlich sind die Detailansichten der Genloci von RSP_1771 und RSP_1384/87/88 gezeigt. Deren Auswahl war zufällig und soll nur einen generellen Eindruck der Qualität der RNASeq Abdeckung relativ abundanter RNAs vermitteln. Beide Beispiele veranschaulichen deutlich einen der qualitativen Vorteile von RNASeq Analysen gegenüber Standard-Mikroarray-Untersuchungen. Neben der möglichen Detektion von unbekannten RNAs kann diese Methode, je nach experimenteller Gestaltung, eine exakte Beschreibung der RNA hinsichtlich ihrer Position auf dem Genom liefern. Im Fall von RSP_1384 (annotiert als hypothetisches Protein) und RSP_1387/88 (ein bicistronisches Operon, welches eine AMP-Nukleosidase und das DNA-Bindeprotein HU kodiert) beispielsweise, ist eindeutig der Transkriptionsstart beider RNA Transkripte identifizierbar. Die Anhäufung der *reads* am 3'-Ende von RSP_1771 (kodiert eine Untereinheit der Citrat-Lyase) lässt hingegen auf eine stabile Transkriptionsterminator Struktur schließen.



In weiten Bereichen ergab die visuelle Betrachtung der *reads* hinsichtlich Abundanz und Position keine erkennbaren Unterschiede zwischen den Datensätzen der Wildtyp und Δrnj RNASeq. Das lässt vermuten, dass die Deletion der RNase J in *R. sphaeroides* zu keinen globalen Veränderungen auf Transkriptom-Ebene führt. Ein derartiger Effekt wurde auch in *B. subtilis* Konditionsmutanten der RNasen J1/J2 durch *Microarray*-Analysen beobachtet (Mäder et al., 2008). In einigen Bereichen der Datensätze waren jedoch auch deutliche Abweichungen bezüglich der Abundanz der abgebildeten

reads zu finden. Solche *read* Akkumulationen wurden generell nur für die RNase J Mutante beobachtet und entsprachen 50 bis 220 Nukleotiden. Zur Validierung auffälliger RNA-Anreicherungen in Δrnj wurden bereits einige *Northern Blot* Analysen durchgeführt. Diese Analysen sind notwendig, da diese RNASeq Daten auf einer PCR-basierten cDNA-Synthese beruhen. Da die exponentielle Amplifikationseffizienz der cDNA-Bibliotheken Schwankungen unterliegt, kann es bei einer quantitativen Beurteilung der Daten zu Fehleinschätzungen kommen. Die zur *Northern Blot* Validierung verwendeten Wildtyp und Δrnj RNA-Proben sind biologische Replikate zu der RNASeq RNA. Im folgenden sind nur die Beispiele, welche in *Northern Blots* Signale erbrachten, aufgeführt. Die Abbildung 3-24; A-D gibt hierfür jeweils das Erscheinungsbild der *read* Akkumulationen im IGB wieder, mit dem dazugehörigen *Northern Blot Phosphorimage*. Die abgebildeten Größenstandards sind nicht als absolut zu betrachten und dienen nur einer ungefähren Orientierung.

RSP_4045 kodiert die Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase, ein essentielles Enzym der Glykolyse. Die RNASeq Daten verweisen auf ein etwa 60 nt langes 3'-Fragment, welches in der Mutante um den Faktor 500 stärker akkumuliert als im Wildtyp. Mit *Northern Blot* wurden jedoch sehr schwache Signale auf einer Höhe von ungefähr 60 nt in Δrnj als auch im Wildtyp detektiert (Abbildung 3-24A).

RSP_1173 kodiert DnaK, das bakterielle Homolog zum Hitzeschockprotein Hsp70. Als Protein-Chaperone ist es an Faltungsvorgängen und der Proteinassemblierung beteiligt. Eine 248 nt langes RNA-Fragment der 3'-Hälfte akkumuliert ausschließlich in der RNase J Mutante und konnte sehr deutlich durch *Northern Blot* nachgewiesen werden (Abbildung 3-24B).

RSP_0959 kodiert die α -Untereinheit des Enzymkomplexes RecBCD (Exonuklease V), die in der DNA-Rekombination involviert ist. Ein 84 nt langes RNA-Fragment der 3'-Hälfte dieser mRNA akkumuliert, entsprechend der RNASeq Daten, ausschließlich in der RNase J Mutante. Die *Northern Blot* Analyse detektierte dieses Fragment jedoch sowohl in der Mutante als auch im Wildtyp mit ähnlicher Intensität (Abbildung 3-24C).

Zwei der auffälligen RNA-Akkumulationen in der Mutante entsprechen ribosomalen RNA-Fragmenten. Eine 177 nt lange RNA entspricht den Nukleotiden 1140 bis 1310 in der 3'-Region der 16S rRNA. Die Anzahl an *reads* für diese RNA war zwar vergleichsweise gering gegenüber einer Vielzahl weiterer amplifizierter rRNA-Fragmente (nicht gezeigt), ein deutlicher Unterschied zum Wildtyp in der Abundanz ließ sich dennoch erkennen. Die *Northern Blot* Analyse bestätigte, dass es sich bei der 177 nt RNA in der Mutante um kein RNASeq bedingtes technisches Artefakt handelt (Abbildung 3-24D).

Die zweite RNA in einem ribosomalen Genlocus liegt ungefähr zwischen den Nukleotiden 2095 und 2200 des 1.5kb rRNA-Fragmentes der 23S rRNA. Mit rund 150.000 *reads* war dieses Fragment das am zweithäufigsten detektierte Transkript des Δrnj RNASeq Datensatzes. Lediglich ein Fragment der 5.8S rRNA war mit mehr als 400.000 *reads* häufiger vertreten. Aufgrund einer starken Überlappung von *reads* in dieser Region konnte die exakte Position nicht ermittelt werden. Es scheinen jedoch zwei Varianten der akkumulierenden RNA, 82 bzw. 105 nt lang, zu existieren. Der *Northern Blot* bestätigte eine derartige Längenvariabilität. In der Spur der Δrnj RNA finden sich zwei Banden der entsprechenden Migrationshöhen, wobei die 105 nt Bande deutlich abundanter erscheint (Abbildung 3-24E). Bei dieser RNA handelt es sich sehr wahrscheinlich um die bereits im Abschnitt 3.7.2 erwähnte aberrante Bande auf einem mit Ethidiumbromid gefärbten Gel in den Spuren mit aufgetrennter Gesamt-RNA von Δrnj und $\Delta rnjRK::rnjDH80KA\sim His_6$ (siehe Abbildung 3-17). Der *Northern Blot* ergab ein weiteres oberhalb der 105 nt liegendes Signal, dessen Ursprung unklar ist. In der Spur der Wildtyp-RNA konnten ebenfalls schwache Signale der 82 und 105 nt langen RNA detektiert werden (Abbildung 3-24E). Diese in der Mutante stark abundanten RNA-Fragmente aus der 3'-Region der 23S rRNA werden im folgenden zusammengefasst als 23Sint RNA bezeichnet.

Die oben genannten Beispiele lassen vermuten, dass RNase J in *R. sphaeroides* für die Degradation einzelner RNA-Fragmente verantwortlich ist. Inwiefern es sich bei diesen RNAs um verbliebene besonders stabile Degradationsprodukte alternativer Abbauprozesse handelt, ist jedoch nicht geklärt.

3.9.3 Untersuchungen zur Abstammung der 23Sint RNA-Akkumulation

Die Herkunft der 82 bis 105 nt langen 23Sint RNA aus dem 1.5kb rRNA-Kontext sollte näher untersucht werden. Da ribosomale RNAs während des exponentiellen Wachstum generell sehr stabil sind, scheint es unwahrscheinlich, dass es sich bei dieser RNA um ein Degradationsprodukt der 1.5kb rRNA handelt (Piiir et al., 2011). Eine andere Möglichkeit ist, dass es sich bei diesem Fragment um ein eigenständiges Primärtranskript in der Art einer kleinen RNA handelt. In diesem Fall müsste die 23Sint RNA ein triphosphoryliertes 5'-Ende besitzen. Eine differentielle 5'-RACE der 23Sint RNA mit Δrnj Gesamt-RNA konnte ein derartiges 5'-Ende jedoch bisher nicht bestätigen (Abbildung 3-25). Ein 5'-triphosphoryliertes 23Sint RNA-Ende hätte ohne TAP (*tobacco acid pyrophosphatase*, Epicentre) Behandlung zu keiner Amplifikation eines etwa 80 bp langen RT-PCR Produktes geführt, da ein triphosphoryliertes 5'-Ende die notwendige 5'-Adapter Ligation blockiert hätte. Die Behandlung der Δrnj Gesamt-RNA mit TAP führt zu einheitlichen 5'-Monophosphat-Enden aller RNAs und ergibt in jedem Fall ein RT-PCR Produkt.

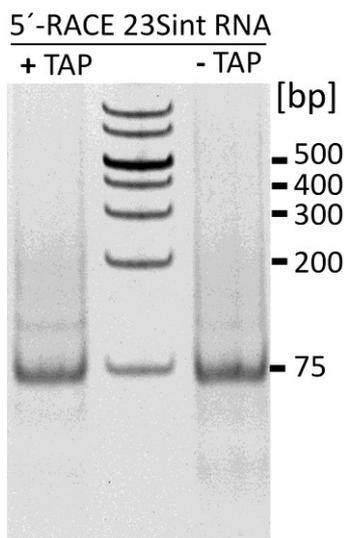


Abbildung 3-25: Differentielle 5'-RACE 23Sint RNA. Δrnj Gesamt-RNA wurde mit bzw. ohne *tobacco acid phosphatase* (+/- TAP) behandelt und in einer 23Sint RNA spezifischen 5'-RACE eingesetzt (verwendetes Oligo: 23Sint_Frag_NB). Die PCR-Produkte wurden auf einem 10 % PAA-TBE Gel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt (invertiertes Fluoreszenzbild).

In diesem Zusammenhang sollte allerdings nochmals erwähnt werden, dass die RNASeq-Daten als auch die *Northern Blot* Analyse für mindestens zwei Varianten der 23Sint RNA sprechen. Die 5'-Enden der beiden 23Sint RNA Varianten liegen laut RNASeq dabei 6 nt auseinander. Für die gezeigte differentielle 5'-RACE wären demnach Produkte von 76 bp und/oder 82 bp zu erwarten gewesen. Inwieweit sich diese Längenvarianz von 6 bp bei dem hier verwendeten 10 % PAA-Gel auf einen erkennbaren Laufunterschied zweier PCR-Produkte auswirken kann, lässt sich nicht beurteilen. Theoretisch könnte das in beiden Ansätzen (+/- TAP) entstandene etwa 75 bp lange 5'-RACE Produkt von dem verkürzten, möglicherweise prozessierten 5'-Ende der 23Sint RNA entstammen.

Ein in dem + TAP-Ansatz erwartetes 82 bp großes Produkt ist entweder aufgrund eines zu geringen Laufunterschiedes zum 76 bp Produkt nicht zu erkennen oder das primäre, triphosphorylierte 5'-Ende wurde nicht effizient dephosphoryliert, wodurch die anschließende Adapter-Ligation inhibiert ist und es somit zu keiner Amplifikation während der RT-PCR kommen konnte. Aufgrund des zeitlichen Rahmens dieser Arbeit konnte eine nähere Untersuchung dieser Aspekte nicht stattfinden.

3.10 Lokalisation und Interaktionspartner der RNase J

3.10.1 Pull-Down Experimente mit RNase J~His₆

In *B. subtilis* konnte eine Interaktion der RNase J1 mit dem RNA-Degradosom mit Hilfe eines bakteriellen *Two-Hybrid-Systems* als auch durch *Pull-Down* Experimente nach Formaldehyd *Crosslinking* nachgewiesen werden (Commichau et al., 2009, Lehnik-Habrink et al., 2010, Mathy et al., 2009). Um mögliche Interaktionspartner der RNase J in *R. sphaeroides* zu detektieren, wurden RNase J~His₆ *Pull-Down* Experimente durchgeführt, in denen Formaldehyd-*Crosslinking* zur Fixierung schwacher oder transientser Protein-Protein-Interaktionen genutzt werden sollte. Aufgereinigte RNase J~His₆ wurde mit Zelllysat von *R. sphaeroides* Wildtyp bzw. der RNase J Deletionsmutante Δrnj in Gegenwart von 0,1 % (w/v) Formaldehyd inkubiert. Nach einer Nickel-Affinitätschromatographie wurden die erhaltenen Fraktionen erhitzt (20 min, 95°C), um die Formaldehyd-bedingte Quervernetzung der RNase J~His₆ mit ko-aufgereinigten Proteinen aufzuheben. In Kontroll-experimenten wurden alle Versuchsschritte separat mit dem Zelllysat von *R. sphaeroides* Wildtyp bzw. der aufgereinigten RNase J~His₆ durchgeführt. Die Abbildung 3-26 zeigt das silbergefärbte 10 % SDS-PAA Gel eines entsprechenden *in vitro* *Pull-Down* Experiments.

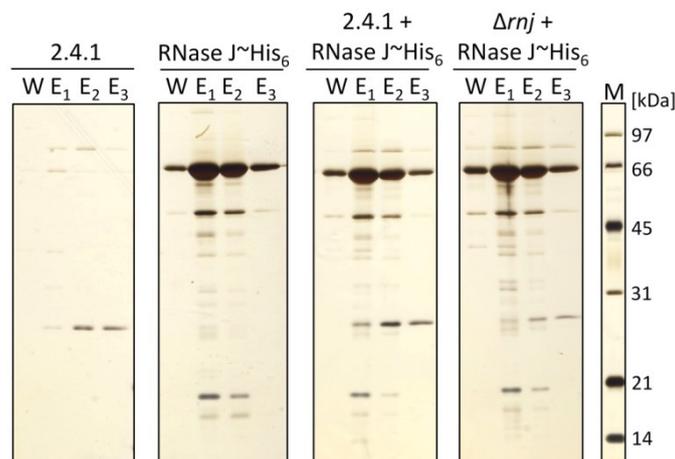


Abbildung 3-26: RNase J~His₆ *in vitro* Pull-Down Assay nach Formaldehyd-Crosslinking. RNase J~His₆ wurde mit Zelllysat von *R. sphaeroides* Wildtyp (2.4.1) und Deletionsstamm Δrnj in Gegenwart von 0,1 % (w/v) Formaldehyd inkubiert. Separate Inkubationen von Wildtyp-Lysat (2.4.1) bzw. RNase J~His₆ mit Formaldehyd dienten als Kontrollansätze. Gezeigt sind Ausschnitte eines silbergefärbten 10 % SDS-PAA-Gels mit Fraktionen der Nickel-Affinitätschromatographie nach Revision des Formaldehyd-Crosslinks (W, Waschfraktion: 20 mM Imidazol; E, Elutionsfraktionen: 100, 200 und 300 mM Imidazol).

Trotz intensiver Begutachtung der Bandenmuster und deren Vergleich mit den Kontrollexperimenten konnten keine Proteinbanden identifiziert werden, welche auf eine Interaktion mit RNase J~His₆ zurückzuführen wären. Neben der zu erwartenden RNase J~His₆ Bande bei etwa 66 kDa entsprechen alle andere Banden entweder Degradationsprodukten der RNase J~His₆ oder der unspezifischen Bindung von Proteinen des *R. sphaeroides* Lysates an die Nickel-NTA Matrix.

Ebenfalls durchgeführte *in vivo* *Pull-Down* Experimente sollten die physiologischen Bedingungen für eine mögliche RNase J-Protein-Interaktion gewährleisten. Da Formaldehyd die Membran von Zellen durchdringen kann, wurde es direkt zu exponentiell wachsenden Flüssigkulturen des Überexpressionsstammes 2.4.1RK::*rnj*~His₆ und der komplementierten Mutante Δrnj 1RK::*rnj*~His₆ zugegeben. Die endogen exprimierte RNase J~His₆ wurde anschließend über denaturierende Nickel-Affinitätschromatographie isoliert. Als Kontrollansatz diente eine identisch behandelte Wildtyp-Kultur, zusätzlich wurden Kulturen ohne Formaldehyd-Behandlung parallel bearbeitet. Die Abbildung

3-27 zeigt ein entsprechendes, silbergefärbtes SDS-PAA-Gel.

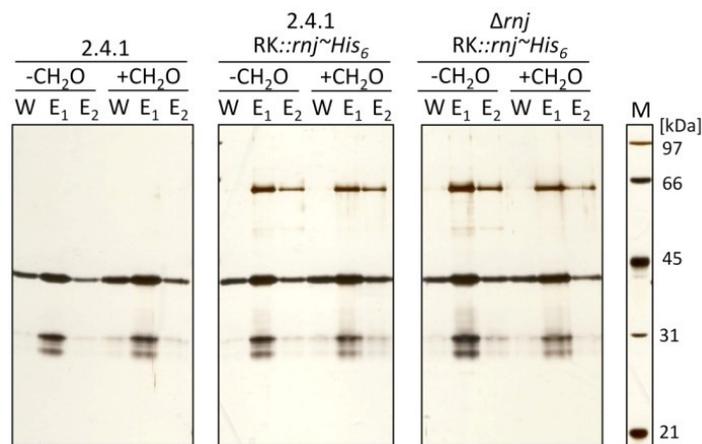


Abbildung 3-27: RNase J~His₆ *in vivo* Pull-Down Assay. Flüssigkulturen (OD₆₆₀ 0,6) von *R. sphaeroides* Wildtyp (2.4.1), 2.4.1RK::*rnj*~His₆ und Δ *rnj* RK::*rnj*~His₆ wurden für 10 min mit (+CH₂O) bzw. ohne (-CH₂O) Formaldehyd (0,1 % (w/v)) inkubiert. Gezeigt sind Ausschnitte eines silbergefärbten 10 % SDS-PAA Gel mit Fraktionen der denaturierenden Nickel-Affinitätschromatographie nach Revision des Formaldehyd-Crosslinks (W, Waschfraktion: 35 mM Imidazol; E, Elutionsfraktionen: 100 und 200 mM Imidazol).

Ein Vergleich der einzelnen Bandenmuster ergab auch in diesem Fall keinen Hinweis auf eine spezifische Ko-Aufreinigung mit RNase J~His₆. Deren Bande befand sich erwartungsgemäß in den Elutionsfraktionen der Ansätzen 2.4.1RK::*rnj*~His₆ und Δ *rnj*RK::*rnj*~His₆ unterhalb von 66 kDa, nicht jedoch in der Wildtyp-Kontrolle. In allen Spuren fand sich unterhalb von 45 kDa eine intensive Bande eines *R. sphaeroides* Proteins mit offensichtlich hoher Bindungsaffinität zur Ni-NTA-Matrix. Eine derartige Bande wurde nicht im *in vitro* Pull-Down Assay beobachtet (Abbildung 3-26). Der Zellaufschluss des *in vitro* Pull-Down Assay fand unter nativen Bedingungen statt, offensichtlich verblieb dieses Protein hierbei in der unlöslichen Fraktion und wurde nicht erfasst. Auffälligerweise zeigten sich in Abbildung 3-27 auch keine Unterschiede zwischen Ansätzen mit bzw. ohne der Behandlung des Crosslinking-Reagenz Formaldehyd. Im Verlauf der experimentellen Durchführung der Pull-Down Experimente offenbarten sich eine Reihe kritischer Faktoren, deren Optimierung zum Zeitpunkt dieser Arbeit noch nicht abgeschlossen war. Die Menge an zugesetztem Formaldehyd ist beispielsweise ein kritischer Faktor. In Vorexperimenten wurde deutlich, dass Formaldehyd ab einer Konzentration ~0,5 % (w/v) in einem Lysat-RNase J~His₆ Gemisch zu Präzipitaten führte, die mit gängigen Methoden nicht mehr gelöst werden konnten. Auch war der Zellaufschluss bei Formaldehyd-behandelten Kulturen äußerst ineffizient. Hierdurch konnte es zu Verlusten bei der Isolierung möglicherweise erfolgreich quervernetzter RNase J~His₆ Interaktionspartner kommen.

3.10.2 Lokalisation der RNase J

Um mögliche Anhaltspunkte zur Lokalisation der RNase J in *R. sphaeroides* zu erhalten, wurden die Sucrose-Überstände der Polysomen-Präparation aus dem Wildtyp und der Mutante Δrnj näher untersucht. Nach der Ultrazentrifugation wurden diese Überstände zunächst in 1 ml Fraktionen abgenommen und deren Proteingehalt mittels Bradford-Test bestimmt. Jeweils 3 μg Protein enthaltende Proben der Fraktionen sowie der resuspendierten Polysomen-Sedimente wurden auf einem SDS-PAA-Gel aufgetrennt, anschließend erfolgte eine *Western Blot* Analyse mit dem RNase J \sim His₆ spezifischen Antiserum (Abbildung 3-28). Erwartungsgemäß ergaben sich keine RNase J spezifischen Signale in den Fraktionen der Deletionsmutante Δrnj . Im Wildtyp wurde die RNase J zum überwiegenden Teil in den Fraktionen 6 und 7 nachgewiesen. Entsprechend der Bradford-Analyse war in diesen Fraktionen generell der größte Anteil des Zellproteins vorhanden. Die Fraktionen 8 und 9 lagen in der Grenzfläche der beiden Sucrose-Kissen und zeigten eine stark rötliche Färbung, was vermuten lässt, dass überwiegend Membranbestandteile darin enthalten waren. Die Färbung resultiert dabei aus den Chromophoren der Photosynthese-Komplexe von *R. sphaeroides*. In diesen Fraktionen wurde keine RNase J detektiert. Interessanterweise wurde RNase J jedoch in der Fraktion der isolierten Polysomen detektiert, wenn auch die Intensität des Signals deutlich schwächer war als in den Fraktionen 6 und 7. Der *Western Blot* lässt vermuten, dass die RNase J von *R. sphaeroides* ein cytoplasmatisches Protein ist und zum Teil mit Ribosomen assoziiert ist.

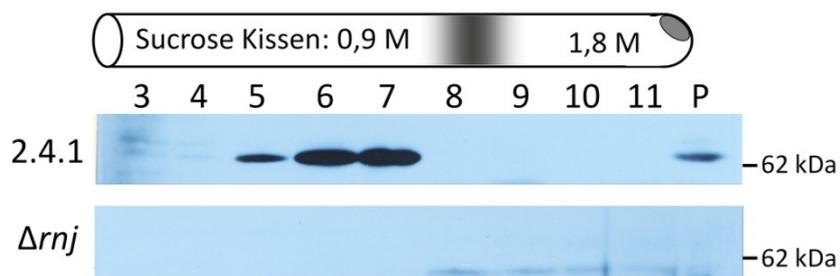


Abbildung 3-28: Western Blot Analyse der Sucrose-Überstände nach der Polysomen-Isolierung. (Oben) Schematische Darstellung des Sucrose-Überstandes nach der Ultrazentrifugation. Die Position der Fraktionsnummern entspricht auch der ungefähren Position der jeweiligen Fraktion im Überstand. An der Grenzfläche zwischen den Sucrose-Kissen (0,9 und 1,8 M) akkumulierten Membranbestandteile in einem rötlichen Ring. Am Boden des UZ-Gefäßes sedimentierten die Polysomen. **(Unten)** Fraktionen des Sucrose-Überstandes (3 μg Protein) und der Polysomen (P, 3 μg) vom Wildtyp (2.4.1) und der RNase J Mutante (Δrnj) wurden auf einem 10 % SDS-PAA-Gel aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran gebロットet und mit RNase J spezifischen Antikörper (α -RNase J \sim His₆) hybridisiert. Die Entwicklung der *Western Blot* Signale erfolgte mittels einem Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörper und Röntgenfilm Exposition.

4 Diskussion

4.1 Das RNase J homologe Protein RSP_2534 in *R. sphaeroides*

Die RNase J gehört zur β -CASP-Unterfamilie der zinkabhängigen Metallo- β -Lactamasen. Die Metallo- β -Lactamase-Proteine stellen eine sehr große Protein-Superfamilie mit vorrangig hydrolytisch-aktiven Enzymen dar. Hierzu zählen unter anderem die namensgebenden β -Lactamasen oder auch Glyoxylasen und 3'-5'-zyklisch-Nukleotid-Phosphodiesterasen. Trotz des breiten Substrat-Spektrums dieser Enzyme, weisen doch alle Substrate eine Esterbindung und meistens zumindest eine negative Ladung auf (Callebaut et al., 2002). Der β -CASP-Unterfamilie sind ausschließlich Enzyme zugehörig, welche Nukleinsäuren als Substrate aufweisen. Dazu gehören unter anderem CPSF-73, eine Untereinheit des mRNA prozessierenden *cleavage and polyadenylation specificity factors* in Mammalia und Artemis, eine wichtige Nuklease der V(D)J-Rekombination. Diese Art der Rekombination, auch als somatische Rekombination bezeichnet, ist für DNA-Rearrangierungen innerhalb der Immunglobulin- und T-Zell-Rezeptor-Gene verantwortlich. Ebenfalls zur β -CASP-Familie gehören SNM1 (Maus) und PSO2 (Hefe), beide Proteine sind an der Reparatur von UV-*crosslink* Schäden in der DNA beteiligt (Dominski, 2007).

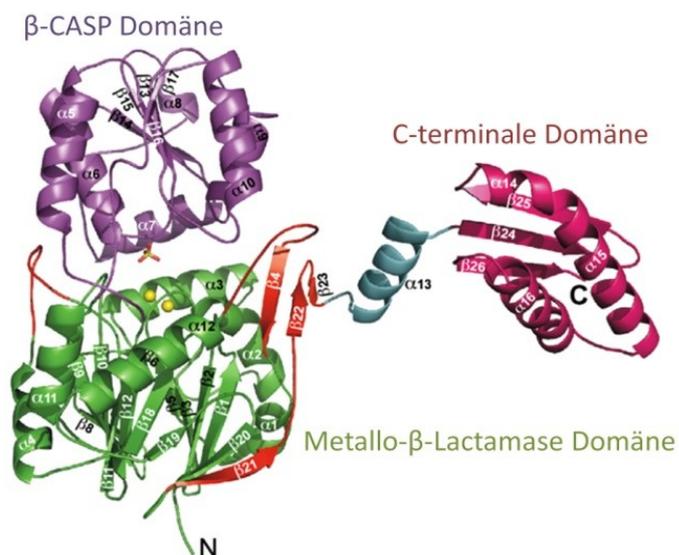


Abbildung 4-1: Struktur der RNase J von *Thermus thermophilus*. Die RNase J besteht aus drei globulären Domänen. Die β -CASP-Domäne kann als eine Art Kassette betrachtet werden, die im Kern der Metallo- β -Lactamase-Domäne eingefügt ist. Das katalytische Zentrum der β -CASP Nucleasen ist tief in einer Spalte zwischen der β -CASP und der Metallo- β -Lactamase-Domäne lokalisiert und beherbergt zwei oktaedrisch-koordinierte Zink-Ionen (gelb). Innerhalb der β -CASP-Unterfamilie zeichnet sich RNase J durch den Besitz einer C-terminalen-Domäne aus, diese ist über eine flexible *linker* Region (orange und hellblau) mit der Metallo- β -Lactamase Domäne verknüpft (modifiziert nach Li de la Sierra-Gallay et al., 2008).

Die generelle Zuordnung von Proteinen zur Superfamilie der Metallo- β -Lactamasen basiert auf dem Besitz einer gleichnamigen, spezifischen $\alpha\beta/\beta\alpha$ -gefalteten Protein-Domäne (Abbildung 4-1; grün). Im Falle der Mitglieder der β -CASP-Unterfamilie ist in der Metallo- β -Lactamase-Domäne eine zusätzliche Domäne inseriert, welche als β -CASP-Domäne bezeichnet wird (Abbildung 4-1; violett). Das katalytische Zentrum der β -CASP-Nucleasen mit zwei charakteristischen Zink-Ionen (Abbildung 4-1; gelb) liegt hier im Inneren einer Art Furche zwischen diesen beiden Domänen. Die RNase J unterscheidet sich von den anderen Mitgliedern der β -CASP-Proteinfamilie durch den Besitz einer zu-

sätzlichen C-terminalen-Domäne (Abbildung 4-1; magenta), die über eine flexible *linker* Region mit der Metallo- β -Lactamase-Domäne verknüpft ist. Die *linker* Region und die C-terminale-Domäne sind dabei offenbar für eine Dimerisierung der RNase J verantwortlich (Li de la Sierra-Gallay et al., 2008).

Die phylogenetische Verteilung der RNase J erstreckt sich nahezu vollständig über das Reich der Prokaryoten, einschließlich der Cren- und Euryarchaeota. Während sich jedoch bei den Gram-positiven *Firmicutes* häufig mehrere RNase J Paraloge in einem Organismus finden lassen, besitzen die Vertreter anderer Bakterienklassen jeweils nur ein zur RNase J homologes Protein (Even et al., 2005). Auch das α -Proteobakterium *R. sphaeroides* besitzt ein Homolog der RNase J. Unter Berücksichtigung charakteristischer Aminosäure-Motive, die sich auf die jeweiligen Domänen der Metallo- β -Lactamasen (Motiv 1-4) bzw. der β -CASP-Unterfamilie (Motive A-C) verteilen, ergab ein Sequenzvergleich mit den *B. subtilis* Paralogen RNase J1 und J2, dass die RNase J von *R. sphaeroides* eine stärkere Ähnlichkeit zur RNase J1 aufweist als zur RNase J2 (Abbildung 3-1). Die konservierten Aminosäuren sind direkt an der oktaedrischen Koordination zweier Zink-Ionen und der Hydrolyse-Reaktion im katalytischen Zentrum, oder indirekt durch überbrückende Wassermoleküle bzw. Stabilisierung von Liganden, beteiligt. Aus Gründen der Übersicht und später noch folgender Erwähnungen sind nur einige dieser Aminosäuren mit ihrer entsprechenden Motiv-Bezeichnung in der Abbildung 4-2 kenntlich gemacht.

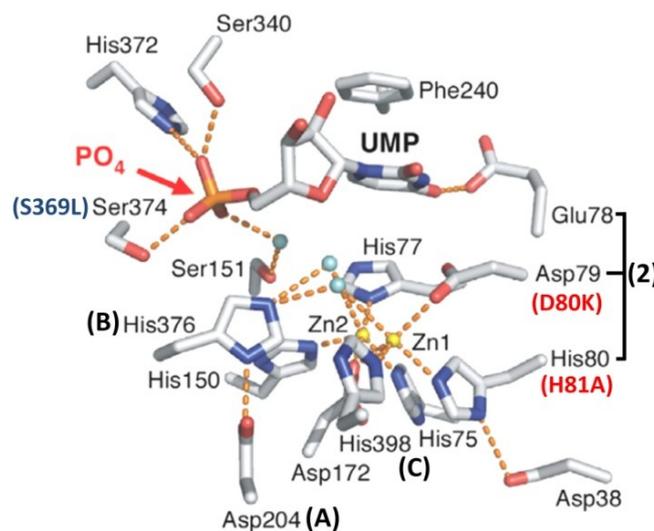


Abbildung 4-2: Katalytisches Zentrum der RNase J von *T. thermophilus* im Komplex mit einem UMP. (A), (B) und (C) bezeichnen die für die β -CASP-Unterfamilie charakteristischen Aminosäuren. (2) verweist auf das entsprechende Aminosäure-Motiv der Metallo- β -Lactamasen-Superfamilie. (S369L) und (D80K)/(H81A) beschreiben Substitutionen der entsprechenden Aminosäuren in zwei, während dieser Arbeit, konstruierten rekombinanten RNase J~His₆ Varianten von *R. sphaeroides*. Eine 5'-Monophosphat-Sensor Region ist durch einen roten Pfeil (PO₄) gekennzeichnet (modifiziert nach Li de la Sierra-Gallay et al., 2008). Nähere Erläuterungen zum katalytischen Zentrum folgen im Text.

Diese Abbildung zeigt das, auf einer Kristallstruktur basierende, katalytische Zentrum der RNase J von *T. thermophilus* (Li de la Sierra-Gallay et al., 2008). Die Positionsnummern der Aminosäuren in Abbildung 4-2 stimmen dabei nicht unmittelbar mit der Position der jeweiligen Aminosäure in *B. subtilis* und *R. sphaeroides* überein (vgl. Abbildung 3-1). Die Unterschiede in einigen Aminosäure-Motiven zwischen der RNase J2 und der RNase J von *R. sphaeroides* sind insofern wichtig, als dass RNase J2, im Gegensatz zur RNase J1, für *B. subtilis* nicht essentiell ist und dass die exoribonukleolytische *in vitro* Aktivität der RNase J2 um mehr als das 300fache niedriger ist im Vergleich zur paralogen RNase J1, während die endoribonukleolytische Aktivität sich zwischen beiden Paralogen kaum unterscheidet (Mathy et al., 2010, Mäder et al., 2008). Abweichende Aminosäuren in den

Motiven (2) und (C) werden hierbei als Grund für die deutlich verringerte exoribonukleolytische Aktivität der RNase J2 angesehen. Für den Ablauf der RNA-Spaltung im katalytischen Zentrum der RNase J wird angenommen, dass ein deprotonierter Aspartat-Rest (Asp 79), als Base wirkend, das Proton eines Wassermoleküls aufnimmt und das entstandene Hydroxyl-Ion die 3'-gelegene Phosphodiester-Bindung des RNA-Substrates spaltet. Die beiden Zink-Ionen im katalytischen Zentrum haben dabei eine Phosphat-polarisierende Funktion und positionieren den nukleophilen Angriff des Hydroxyl-Ions. Im Falle der RNase J2 ist das konservierte Aspartat (Asp 79) gegen das zwar ebenfalls saure aber größere Glutamat ausgetauscht. Zudem sind zwei an der Zink-Ionen-Koordination beteiligte, basische Histidine (His 80/398) jeweils durch ein polares Asparagin ersetzt. Aufgrund dieser variierenden Aminosäure-Reste wird angenommen, dass sich im katalytischen Zentrum der RNase J2 nur eines von zwei Zink-Ionen befindet, wobei das verbleibende Zink-Ion nur bedingt in der Lage ist, den nukleophilen Angriff des Hydroxyl-Ions auf das RNA-Phosphatrückgrat zu positionieren (Newman et al., 2011). Interessanterweise führt diese „suboptimale“ Architektur des katalytischen Zentrums in der RNase J2 lediglich zu einer stark verringerten 5'-3' exoribonukleolytische Aktivität. Die endoribonukleolytische Aktivität unterscheidet sich nicht wesentlich zwischen den Paralogen RNase J1 und J2 (Even et al., 2005, Mathy et al., 2010). In Hinblick auf das in *R. sphaeroides* als RNase J identifizierte Protein (RSP_2534) wurde auf Basis des durchgeführten Proteinsequenzvergleichs eine zur RNase J1 von *B. subtilis* ähnliche *in vitro* Aktivität erwartet.

4.2 In vitro Aktivität der RNase J~His6 von *R. sphaeroides*

Die in dieser Arbeit durchgeführten RNA-Degradationsassays mit rekombinant aufgereinigter RNase J~His₆ von *R. sphaeroides* konnten eindeutig eine exoribonukleolytische Aktivität dieses Enzyms nachweisen. Dabei führte die Inkubation von artifiziellen RNA-Substraten mit rekombinanter RNase J~His₆ zur Entstehung von 5'-Mononukleotiden (3.3.3). Die Einführung zweier Punktmutationen in eine RNase J~His₆ Variante (DH80KA) resultierte in dem vollständigen Verlust dieser exoribonukleolytischen Aktivität. Die von dem Austausch betroffenen Aminosäuren entsprechen dabei dem Aspartat (D) 79 und dem Histidin (H) 80 im bereits zuvor beschriebenen katalytischen Zentrum von *T. thermophilus* (Abbildung 4-2). Die Substitution dieser beiden Aminosäuren durch das basische Lysin (K) und das unpolare Alanin (A) verhindert offensichtlich eine für die RNA-Spaltung notwendige Hydrolyse und effiziente Zink-Koordination in der RNase J von *R. sphaeroides*. Auch eine entsprechend mutierte RNase J1 Variante von *B. subtilis* ist nahezu vollständig inaktiv, wobei sowohl deren exo- als auch endoribonukleolytische Aktivität zum Erliegen kommt (Li de la Sierra-Gallay et al., 2008). Prinzipiell kann auf Grund der rekombinanten Aufreinigung einer inaktiven RNase J~His₆ Variante weitestgehend ausgeschlossen werden, dass es sich bei den in der hier vorliegenden Arbeit beobachteten RNA-Degradationen um *E. coli* bedingte RNase-Kontaminationen handelte.

Die exoribonukleolytische *in vitro* Aktivität der RNase J~His₆ ist äußerst prozessiv, so wurde das 225 nt lange ZBP Substrat vollständig vom ersten 5'-Nukleotid bis zum letzten 3'-Nukleotid abgebaut. Eine Anreicherung von intermediären Degradationsprodukten war hierbei kaum zu beobachten. Lediglich die Degradation eines 3'-markierten Substrates führte zu einer erkennbaren Akkumulation von etwa 2 - 10 nt langen 3'-Fragmenten (3.3.4). Das lässt vermuten, dass eine 5'-3' exoribonukleolytische Aktivität dieses Enzyms bei sehr kurzen RNA-Fragmenten allmählich abnimmt, möglicherweise aufgrund einer verminderten Substratbindefähigkeit. Prinzipiell sollte eine prozessive Exoribonuklease mindestens zwei Substratbindestellen besitzen, damit es während der RNA-Translokation innerhalb des Enzyms nicht zu einem Kontaktverlust kommen kann (Laalami & Putzer,

2011). Eine Kristallstruktur der RNase J von *T. thermophilus* mit einer gebundenen 4 nt-RNA bietet diesbezüglich eine Erklärung. Aus dieser Struktur geht hervor, dass es zusätzlich zur Bindung des 5'-Endes einer RNA in der Substratbindetasche zu einer Reihe von Protein-RNA-Interaktionen innerhalb eines Kanals im Inneren des Enzyms kommen kann. Die positiven Ladungsträger innerhalb dieses Kanals fixieren dabei die RNA über ihr negativ geladenes Phosphat-Rückgrat. Der Kanal selbst ist ausreichend, um eine etwa 5 nt lange, einzelsträngige RNA aufzunehmen. Zusätzlich liegen im Bereich des Eingangs dieses Kanals weitere positive Ladungsträger an der Oberfläche der β -CASP-Domäne, welche letztlich ein 9 - 10 nt langes RNA-Fragment zuverlässig binden könnten. Eine derartige Substratbindung konnte in Degradationsstudien bestätigt werden. Dabei zeigte sich, dass bei Substraten, die kürzer als 9 nt waren, die Prozessivität der exoribonukleolytischen Aktivität der RNase J1/J2 deutlich abnahm (Dorleans et al., 2011). Dies deckt sich gut mit Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit, da es auch hier bei den *in vitro* Degradationsstudien mit RNase J~His₆ von *R. sphaeroides* zur Akkumulation kurzer 2 bis 10 nt langer 3'-RNA-Fragmente kam (3.3.4).

Der 5'-Phosphorylierungsstatus eines RNA-Substrates ist ein entscheidender Faktor für die exoribonukleolytische Degradation durch RNase J. *In vitro* Experimente mit einem Transkript der 5'-Region der Threonin-Synthetase mRNA, *thrS leader* RNA, von *B. subtilis* zeigten, dass ein triphosphoryliertes 5'-Ende dieses Substrat vor einem 5'-3' exoribonukleolytischen Abbau durch RNase J1 vollständig schützt (Li de la Sierra-Gallay et al., 2008). Auch das RNase J Homolog aus *Mycobacterium smegmatis* zeigte keinerlei exoribonukleolytische Degradation gegenüber einem derartigen *in vitro* Transkript (Taverniti et al., 2011). In anderen Untersuchungen war der Effekt eines triphosphorylierten 5'-Endes allerdings weitaus weniger drastisch und RNase J1 von *B. subtilis* zeigte lediglich eine Präferenz für ein 5'-monophosphoryliertes Substrat, war prinzipiell jedoch in der Lage, auch Substrate mit einem triphosphorylierten 5'-Ende abzubauen (Mathy et al., 2007). Mit diversen RNase J Homologen aus verschiedenen Archaeen wie *Methanocaldococcus jannaschii*, *Pyrococcus abyssi* oder *Sulfolobus solfataricus* verhält es sich ähnlich. Auch diese Proteine zeigten bei *in vitro* Studien eine Degradation von 5'-triphosphorylierten RNA-Substraten (Levy et al., 2011, Clouet-d'Orval et al., 2010, Hasenöhl et al., 2011). Die RNase J~His₆ von *R. sphaeroides* zeigte in RNA-Degradationsassays eine Präferenz für das ZBP Transkript mit einer 5'-Monophosphat-Gruppe gegenüber dem ZBP Transkript mit einem triphosphorylierten 5'-Ende (3.3.5). Diese 5'-abhängige Substrataffinität ist auf eine unmittelbar neben dem katalytischen Zentrum gelegene Phosphat-Bindetasche der RNase J zurückzuführen (Abbildung 4-2, Pfeil). Mehrere Aminosäure-Reste, vorrangig Serin, koordinieren das 5'-Monophosphat einer RNA und positionieren dadurch die zu spaltende 3'-Phosphatbindung des terminalen Nukleotides optimal in die katalytische Region. Ein 5'-terminales, längeres Triphosphat erzwingt eine Verschiebung der 3'-Phosphodiester-Bindung aus der optimalen Position für die katalytische Spaltung (Li de la Sierra-Gallay et al., 2008). Die in dieser Arbeit beobachtete verringerte exoribonukleolytische Aktivität der mutierten RNase J-S369L~His₆ Variante ist wahrscheinlich ebenfalls als Effekt einer suboptimalen, räumlichen Substratausrichtung im katalytischen Zentrum der RNase J zu verstehen. Ein Leucin ersetzt in dieser RNase J Variante das Serin an Position 369 in der Monophosphat-Bindetasche (Abbildung 4-2). Der sterisch größere Aminosäure-Rest des Leucins erschwert dabei den Zugang oder die Koordination des terminalen 5'-Endes einer RNA (Li de la Sierra-Gallay et al., 2008).

Einige Aspekte der ribonukleolytischen Aktivität der RNase J konnten während dieser Arbeit nur unvollständig aufgeklärt werden. So wurde die 5'-3' Orientierung der exoribonukleolytischen Aktivität der RNase J aus *R. sphaeroides* nur indizienhaft belegt. Für eine derartige Orientierung spricht zum einen die Akkumulation verkürzter 3'-Fragmente, welche auf eine Abnahme der 5'-3'-Prozessivität durch den allmählichen Verlust der Substratbindung zurückgeführt werden könnte. Ein

weiteres Indiz ist die beobachtete 5'-abhängige Substrataffinität der RNase J. Auch die in einem späteren Abschnitt diskutierte *in vitro* Prozessierung der ribosomalen 5'-RNA-Enden lässt sich kaum ohne eine 5'-3' exoribonukleolytische Aktivität erklären. Ein unumstößlicher Nachweis für die exoribonukleolytische 5'-3' Orientierung der RNase J unter *in vitro* Bedingungen konnte jedoch nicht erbracht werden. Experimentelle Ansätze für einen derartigen Nachweis während dieser Arbeit sind im Ergebnisteil nicht erwähnt. So war beispielsweise angedacht, die theoretisch vom 5'-Ende ausgehende RNase J~His₆ Degradation eines RNA-Substrates durch Hybridisierung eines komplementären DNA-Oligonukleotides an diesem Ende zu blockieren. Derartige Experimente ließen jedoch keine Rückschlüsse auf eine Orientierung zu, da die Degradation eines RNA-Substrates zwar tatsächlich nach Hybridisierung mit einem DNA-Oligonukleotid reduziert war, jedoch machte es hierbei keinen Unterschied, ob dieses DNA-Oligonukleotid komplementär zu dem 5'- oder dem 3'-Ende war. Letztlich stellte sich im Verlauf dieser Experimente heraus, dass RNase J~His₆ unter *in vitro* Bedingungen auch einzelsträngige DNA abbaut. Die beobachtete Abnahme der RNA-Degradation in den Hybridisierungsansätzen war dabei lediglich auf eine Enzymkompetition freier DNA-Oligonukleotide mit dem eigentlichen RNA-Substrat zurückzuführen. Eine Einzelstrang-DNA degradierende Aktivität wurde auch für RNase J Homologe einiger Euryarchaeota beschrieben (Clouet-d'Orval et al., 2010). Eine physiologische Bedeutung für eine derartige Aktivität ist allerdings zweifelhaft, vielmehr ist es wohl ein „Tribut“ an die Zugehörigkeit zur β-CASP-Proteinfamilie, die generell Phosphodiester-Bindungen spaltet (Callebaut et al., 2002).

Ebenfalls als problematisch stellten sich die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zu einer möglichen endoribonukleolytischen Aktivität der RNase J~His₆ heraus. In Studien zur RNase J1 von *B. subtilis* wurde gezeigt, dass dieses Enzym RNA auch intern spalten kann, wobei die dabei identifizierten Schnittstellen variierten. Einerseits wurde von einer RNase E ähnlichen Substratspezifität berichtet, welche einzelsträngige AU-reiche Regionen in unmittelbarer Nähe zu einer *hairpin*-Struktur spaltet (Deikus & Bechhofer, 2011, Even et al., 2005). Andererseits wurde RNase J1 in enzymatischen RNA-Strukturanalysen (*enzymatic structure probing*) eingesetzt und zeigte hierbei lediglich eine Spezifität für einzelsträngige RNA-Regionen ohne eine erkennbare Nukleotidpräferenz (Daou-Chabo et al., 2009). Einige der bisher näher untersuchten RNase J Homologe aus Archaea weisen hingegen keinerlei endoribonukleolytische Aktivität auf (Clouet-d'Orval et al., 2010, Hasenöhl et al., 2011, Levy et al., 2011). Inwieweit die RNase J aus *R. sphaeroides* eine tatsächliche endoribonukleolytische Aktivität besitzt, ließ sich während dieser Arbeit nicht abschließend feststellen, wobei die Degradationsstudien mit einem *pretrNA^{Trp}* *in vitro* Transkript prinzipiell dafür sprechen (3.3.8). Der Nachweis einer derartigen Aktivität setzt voraus, dass es zur Bildung stabiler RNA-Fragmente kommt, was aufgrund der gleichzeitig vorhandenen prozessiven exoribonukleolytischen Aktivität der RNase J nicht der Fall ist. Zukünftige Untersuchungen zur Spezifität der endoribonukleolytischen Aktivität der RNase J von *R. sphaeroides* müssten demnach zunächst wirkungsvoll ihre exoribonukleolytische Aktivität unterbinden. Dies ist eventuell durch Verwendung von RNA-Substraten möglich, welche an ihrem 5'-Ende strukturell bedingt oder aufgrund kovalenter Modifikationen vor einer Degradation geschützt werden.

Eine alternative Erklärung für die nur im geringen Umfang beobachtete endoribonukleolytische Aktivität der RNase J~His₆ bieten neuere Kristallstrukturanalysen der RNase J. Diese zeigen, dass für eine endoribonukleolytische Spaltung ein RNase J Dimer zunächst in Monomere dissoziieren müsste, um einen Zugang der RNA zu dem katalytischen Zentrum für eine interne Spaltung zu ermöglichen (Dorleans et al., 2011). Während der Aufreinigung der RNase J~His₆ von *R. sphaeroides* mittels Gelfiltration wurde das Auftreten einzelner Monomere jedoch nicht beobachtet, vielmehr scheint dieses Protein stabile Oligomere in Lösung zu bilden. Prinzipiell könnte die schwache endoribo-

nukleolytische Aktivität auf eine sehr niedrige Dissoziationskonstante (K_d) der Oligomere unter *in vitro* Bedingungen zurückzuführen sein. Für eine effektive Spaltung des RNA-Substrates könnte demnach die Anzahl an Monomeren in den *in vitro* Degradationsansätzen zu gering gewesen sein (Laalami et al., 2011).

Trotz der bereits verfügbaren Kristallstrukturen der RNase J von *T. thermophilus* und auch einer aufgeklärten Struktur der RNase J1 von *B. subtilis* (Newman et al., 2011), bleiben eine ganze Reihe von Fragen hinsichtlich der ribonukleolytischen Aktivität dieses Enzyms offen. Beispielsweise ist unklar, weshalb RNase J in bisherigen Studien stets als Oligomer auftrat, da für eine prozessive exoribonukleolytische Aktivität ein Monomer völlig ausreichend zu sein scheint. Je nach Studie ist auch die Anzahl der Untereinheiten in den jeweiligen Oligomeren verschieden. Ursprünglich wurden native RNase J1 und J2 durch klassische, chromatographische Aufreinigungen aus dem Gesamtprotein von *B. subtilis* isoliert. Das Elutionsvolumen in einer finalen Gelfiltration entsprach dabei einem trimeren Proteinkomplex (Even et al., 2005). Spätere Untersuchungen mit rekombinant aufgereinigten getaggen RNase J-Varianten verwiesen jedoch auf einen wahrscheinlich dimeren Zustand dieser Proteine in Lösung (Li de la Sierra-Gallay et al., 2008, Newman et al., 2011). In einer weiteren Arbeit wiederum wurde gezeigt, dass *in vivo* und *in vitro* RNase J1 und J2 als Hetero-Tetramere vorliegen (Mathy et al., 2009). Die Gründe für derartige Diskrepanzen in der Oligomerisierung sind nicht geklärt. Die Position des Affinitäts-*tag* bei den rekombinanten Proteinen scheint jedoch einen gewissen Einfluss auf deren Oligomerisierungs-Verhalten zu haben. Während RNase J mit einem N-terminalen His₆-*tag* als Dimer auftrat, zeigte RNase J mit einem C-terminalen His₆-*tag* eine Tetramer-Bildung. Die in dieser Arbeit rekombinant aufgereinigte RNase J~His₆ von *R. sphaeroides* trug ebenfalls ein C-terminales His₆-*tag*. Das apparente Molekulargewicht von RNase J~His₆ während der Gelfiltration entsprach rund 150 kDa, was einer Di- oder Trimerisierung des etwa 62 kDa großen RNase J~His₆ Monomers entspräche (3.2.2). Das Retentionsverhalten von Proteinen bei einer Gelfiltration ist nicht nur von deren relativem Molekulargewicht, sondern auch von der individuellen Form des jeweiligen Makromoleküls, auch bekannt als Stokes'scher Radius, abhängig. Langgestreckte Moleküle passieren die stationäre Phase einer Gelfiltrationsmatrix schneller als globuläre Moleküle identischen Molekulargewichts. Das niedrigere Elutionsvolumen eines langgestreckten Moleküls impliziert dabei ein höheres, apparentes Molekulargewicht. Demnach ist nicht auszuschließen, dass RNase J~His₆ als langgestrecktes Dimer in Lösung vorliegt.

4.3 In vivo Untersuchungen zur RNase J in *R. sphaeroides*

Eine Deletion der RNase J in *R. sphaeroides* bewirkte keinen nachteiligen Effekt auf das Wachstumsverhalten des Deletionsstammes Δrnj unter mikroaeroben Standardbedingungen im Vergleich zu einem Wildtypstamm. Inwieweit sich die Deletion auf das Wachstum unter Stressbedingungen, wie beispielsweise Nährstoffmangel, Hitze- oder Kältestress auswirkt, wurde in dieser Arbeit jedoch nicht näher untersucht. Demnach ist nicht auszuschließen, dass unter gegebenen Umständen sich der Besitz der RNase J als überlebenswichtig oder zumindest vorteilhaft für *R. sphaeroides* erweisen kann. Häufig zeigen die RNasen des RNA-Metabolismus jedoch auch überlappende Funktionen, wodurch *back-up* Systeme geschaffen werden, die es der Zelle ermöglichen, flexibel und damit schnell auf Umweltveränderungen zu reagieren. Außerdem können *back-up* Systeme in gewissem Umfang die Lebensfähigkeit einer Zelle aufrechterhalten, wenn durch eine spontane Mutation die Funktionalität eines für den Stoffwechsel wichtigen Partner-Enzyms verloren geht. In solchen Fällen führt die Deletion einer einzelnen RNase zu keinem drastischen Effekt bezüglich der Lebensfähigkeit eines Organismus. Dennoch scheint RNase J in den Gram-positiven Bakterien *B. subtilis* und

Streptococcus pyogenes zumindest teilweise essentiell zu sein. Beide Organismen besitzen jeweils zwei RNase J Paraloge. Während in *B. subtilis* nur RNase J1 essentiell zu sein scheint, konnte in *S. pyogenes* keines der beiden Paraloge deletiert werden (Bugrysheva et al., 2010, Kobayashi et al., 2003). In dem α -Proteobakterium *Sinorhizobium meliloti* wiederum scheint dessen einzige RNase J entbehrlich zu sein. Eine durch mini-Tn5 Transposon-Mutagenese erzeugte, nicht funktionelle Mutante der RNase J hat keinen offensichtlichen Einfluss auf das Wachstum dieses Organismus (Madhugiri et al., 2009). Auch in einem weiteren Gram-positiven Bakterium, *Mycobacterium smegmatis*, konnte RNase J erfolgreich deletiert werden (Taverniti et al., 2011). Diese offenkundigen Unterschiede in der Bedeutung der RNase J für die jeweiligen Organismen sind derzeit nicht erklärbar. Auffällig ist, dass *B. subtilis* und *S. pyogenes* keine RNase E besitzen und essentiell auf RNase J angewiesen sind. Hingegen besitzen die drei Bakterienarten mit einer nachweislich nicht essentiellen RNase J zumindest ein RNase E ähnliches Homolog. Die RNase E gilt generell als eines der Schlüsselenzyme im RNA-Metabolismus der Bakterien, und RNase J wurde ursprünglich als funktionelles Homolog der RNase E in *B. subtilis* beschrieben (Even et al., 2005). In allen drei bisher näher untersuchten Organismen mit einer nicht essentiellen RNase J könnte demnach RNase E als ein *back-up* Enzym für möglicherweise essentielle Prozesse der RNase J fungieren, womit die Deletierbarkeit der RNase J in diesen Organismen erklärbar wäre. Vermutlich ist eine derartige Pauschalisierung zur Bedeutung der RNase J in einzelnen Organismen auf Basis möglicher *back-up* Systeme jedoch etwas verfrüht, da die Anzahl bisher untersuchter Organismen zu gering ist. Auch die erst kürzlich entdeckte, jedoch offensichtlich weitverbreitete RNase Y wirft neue Fragen zur tatsächlichen Bedeutung einer einzelnen RNase innerhalb einer Zelle auf (Laalami et al., 2011). Letztlich lassen sich die tatsächlichen Funktionen der RNase J erst durch Identifizierung weiterer *in vivo* Substrate dieses Enzyms beurteilen.

4.4 Prozessierung der 23S rRNA-Fragmente in *R. sphaeroides* durch RNase J

Die Prozessierung der ribosomalen RNA ist ein mehrstufiger Prozess, an dem verschiedene Endo- und ExoRNasen beteiligt sind. Die ersten Prozessierungsschritte erfolgen dabei ko-transkriptionell, das heißt, noch bevor das polycistronische Primärtranskript vollständig von der RNA-Polymerase transkribiert wurde, kommt es zu ersten Spaltungen innerhalb dieses Transkriptes. Entscheidend hierfür sind sogenannte *processing stalks*. Diese helikalen RNA-Doppelstrang-Regionen bilden sich aufgrund von mehr als 1700 bzw. 2600 nt auseinanderliegenden, komplementären Sequenzen in den jeweiligen 5'- und 3'-Regionen der 16S und 23S rRNA (Young et al., 1978, Bram et al., 1980). Innerhalb dieser Strukturen liegen Schnittstellen der RNase III. Diese RNA-Doppelstrang spezifische Endoribonuklease gilt als Initiator der rRNA-Prozessierung, durch deren Spaltung die drei rRNA Vorstufen 17S, 25S und 9S freigesetzt werden. Aus diesen drei Vorläufermolekülen entstehen nach einer Reihe weiterer 5'- und 3'-Prozessierungen die reifen 16S, 23S und 5S rRNA-Moleküle. Die daran beteiligten Enzyme sind nur teilweise bekannt. In *E. coli* handelt es sich dabei um RNase E, RNase G, RNase P und RNase T (Deutscher, 2009). Hinsichtlich der oben erwähnten RNase *back-up* Systeme obliegt die initiale Segmentierung des polycistronischen rRNA-Primärtranskriptes nicht ausschließlich der RNase III. Ein RNase III defizienter *E. coli* Stamm weist zwar eine verminderte Wachstumsrate auf und die 23S rRNA liegt als verlängerte Vorstufe im 70S Ribosom vor, die 16S rRNA zeigt jedoch keinen Unterschied hinsichtlich ihrer Prozessierung zum Wildtyp (King et al., 1984). Ähnlich hierzu ist die Beobachtung, dass eine nicht funktionelle RNase III in *R. capsulatus* keinen generellen Einfluss auf die primäre Segmentierung des polycistronischen rRNA-Transkriptes in die drei rRNA-Einheiten besitzt (Kordes et al., 1994).

Die 23S rRNA erfährt in einer Reihe von α -Proteobakterien eine zusätzliche Prozessierung, welche in drei 23S rRNA-Fragmenten resultiert, der 5.8Slike, der 1.1kb und der 1.5kb rRNA (Evguenieva-Hackenberg, 2005). Ähnlich zur primären Separierung des polycistronischen rRNA-Transkriptes resultieren diese Fragmente zunächst aus RNase III Spaltungen an doppelsträngigen RNA-Helices, sogenannten *intervening sequences* (IVS). In *R. sphaeroides* liegen diese *intervening sequences* in der Helix 9 und Helix 46 der 23S rRNA und werden durch RNase III entfernt. Im Gegensatz zur primären Separierung ist diese Fragmentierung strikt RNase III abhängig, da in einer *R. capsulatus* Mutante mit einer nicht funktionellen RNase III die 23S rRNA als zusammenhängendes Molekül verbleibt (Kordes et al., 1994). Die nach der RNase III Spaltung entstandenen 5'- und 3'-Enden der einzelnen Fragmente werden weiter prozessiert, wobei die daran beteiligten RNasen nicht näher bekannt sind (Evguenieva-Hackenberg et al., 2000, Zahn et al., 2000). Für *R. capsulatus* wurde durch *in vitro* Experimente eine mögliche Beteiligung der RNase E an der 5'-Reifung des 1.1kb rRNA-Fragmentes beobachtet. Die Spaltung eines *in vitro* Transkriptes der Vorläufer 1.1kb rRNA durch RNase E ergab dabei zwar ein verkürztes 5'-Ende, dennoch entsprach dieses Ende nicht dem reifen 5'-Ende (Klein et al., 2002).

Die während dieser Arbeit durchgeführten *Primer Extension* Analysen und *RNase Protection Assays* zur Bestimmung der 5'- und 3'-Enden der 23S rRNA-Fragmente in *R. sphaeroides* ergaben, dass alle drei Fragmente als verlängerte Vorläufermoleküle in der RNase J Deletionsmutante Δ rnj vorliegen (3.8.1; 3.8.4). Das lässt vermuten, dass der RNase J eine direkte Beteiligung an der Prozessierung der 23S rRNA-Fragmente zukommt. Die Inkubation eines reinen *in vitro* Transkriptes des 5.8Slike RNA-Vorläufermoleküls mit aufgereinigter RNase J~His₆ führte jedoch nicht zur Entstehung eines reifen 5.8Slike RNA-Moleküls, vielmehr wurde dieses Substrat vollständig zu einzelnen Mononukleotiden degradiert. Demgegenüber führte eine *in vitro* Inkubation isolierter Polysomen aus der RNase J Mutante mit rekombinant aufgereinigter RNase J~His₆ zu 5'-Enden, die denen des Wildtypes entsprachen (3.8.2). Lediglich für die 1.5kb rRNA wurde nach Inkubation der Polysomen mit RNase J~His₆ nicht das Wildtyp 5'-Ende, sondern ein um 2 Nukleotide vorgelagertes Ende detektiert. Die Effizienz dieser *in vitro* Prozessierung unterschied sich zwar zwischen den einzelnen Fragmenten, prinzipiell jedoch scheint RNase J in der Lage zu sein, die finale 5'-Reifung dieser 23S rRNA-Fragmente alleine zu vollführen. Die RNase J1 von *B. subtilis* ist an der 5'-Reifung der 16S rRNA beteiligt und ähnlich zu den Beobachtungen in der hier vorliegenden Arbeit zeigten Studien, dass eine *in vitro* Prozessierung der Vorläufer 16S rRNA nur an 70S Ribosomen möglich war. Das reine *in vitro* Transkript eines 16S rRNA-Vorläufermoleküls wurde durch RNase J1 ebenfalls unspezifisch degradiert (Britton et al., 2007). Es ist daher davon auszugehen, dass die exakten Positionen der reifen 5'-Enden aus der Zugänglichkeit für die RNase J resultieren. Ausgehend von einer 5'-3' orientierten exoribonukleolytischen Aktivität verkürzt RNase J das entsprechende 5'-Ende der RNA bis, aufgrund sterischer Wechselwirkungen an der ribosomalen Protein-RNA-Oberfläche, kein Fortschreiten der Degradation mehr möglich ist.

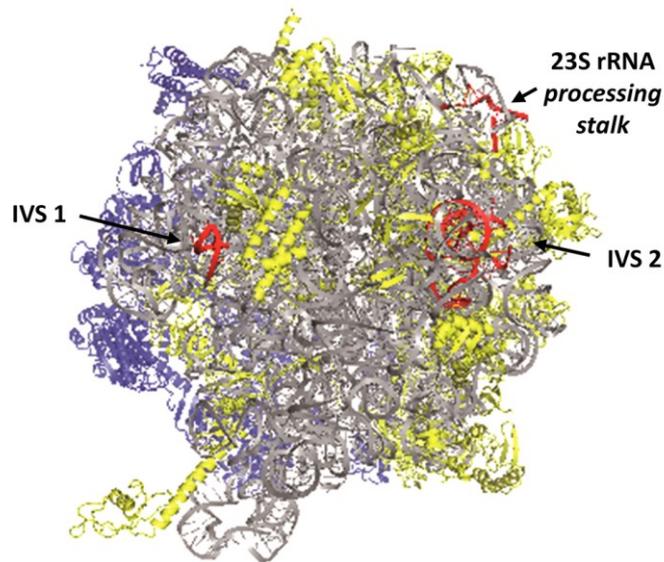


Abbildung 4-3: 70S Ribosom von *Thermus thermophilus*. Aufsicht auf die dem Cytoplasma zugewandte Seite der ribosomalen 50S Untereinheit. Die Protein-Komponenten (gelb) und die 23S rRNA (grau) bilden einen kompakten, globulären Ribonukleoprotein-Komplex aus. An dessen Oberfläche befinden sich die Helices 9 und 46 (rot), welche in *R. sphaeroides* zusätzlich die *intervening sequences* IVS 1 bzw. IVS 2 enthalten. Das 5'- und 3'-Ende des *processing stalk* (rot) der 23S rRNA liegen ebenfalls frei zugänglich an der RNA-Protein-Oberfläche. Im Hintergrund sind auch Proteinkomponenten der 30S Untereinheit (blau) erkennbar (modifiziert nach Laurberg et al., 2008, unter Verwendung der Pymol Software (<http://www.pymol.org>)).

Prinzipiell sind die untersuchten 5'-Enden in einem vollständig assemblierten 70S Ribosom für eine RNase zugänglich (Abbildung 4-3). Die Enden liegen auf der dem Cytoplasma zugewandten Seite der großen ribosomalen 50S Untereinheit und befinden sich mehr oder weniger an der Oberfläche des Ribonukleoprotein-Komplexes (Laurberg et al., 2008).

Da nicht genau bekannt ist, zu welchem Zeitpunkt der schrittweisen Ribosomen-Assemblierung die Prozessierung der ribosomalen RNA stattfindet, ist nicht auszuschließen, dass einige ribosomale Proteine erst nach einer erfolgten 5'-Reifung an die RNA binden (Shajani et al., 2011). Das würde erklären, warum sich die Effizienz der *in vitro* Prozessierung an einem vollständig assembliertem Ribosom zwischen den untersuchten Enden unterscheidet. Während die Vorstufe der 5.8S-like rRNA nach Inkubation mit RNase J~His₆ zu mehr als 50 % ein reifes 5'-Ende besaß, war der Anteil an reifen 5'-Enden für die beiden anderen Fragmente deutlich geringer, zumal für das 1.5kb rRNA-Fragment nur ein um 2 nt vorgelagertes 5'-Ende detektiert werden konnte (3.8.2). Möglicherweise findet *in vivo* die Protein-RNA-Assemblierung in den 5'-Ende-Regionen der 1.1kb und 1.5kb rRNA erst nach einer RNase J Prozessierung statt, die RNase J hätte demnach *in vivo* einen freieren Zugang zu den jeweiligen RNA 5'-Enden. Die effiziente *in vitro* Prozessierung ist hingegen aufgrund der vollständigen Protein-Assemblierung in den Polysomen für die RNase J~His₆ nur bedingt möglich. Auch direkte Modifikationen der ribosomalen 23S rRNA-Fragmente in Form von Methylierungen oder Pseudo-Uridylierungen einzelner Nukleotide könnten eine nachträgliche RNase J *in vitro* Prozessierung stören. Derartige Modifikationen wurden jedoch bisher nicht für die von der Prozessierung betroffenen 23S rRNA-Regionen beschrieben (Motorin & Helm, 2011).

Während dieser Arbeit stellte sich relativ überraschend heraus, dass auch die Reifung der 3'-Enden der 23S rRNA-Fragmente von einer RNase J Deletion betroffen ist. In der Mutante waren alle drei Fragmente um bis zu 16 nt am 3'-Ende im Vergleich zu den entsprechenden Wildtyp-Fragmenten verlängert. Die *in vitro* Polysomen-Prozessierung mit RNase J~His₆ führte hierbei zu keinen verän-

dernten 3'-Enden, was auf einen indirekten Effekt der RNase J Deletion auf die 3'-Reifung schließen lässt (3.8.4). Offenbar sind die finalen Reifungsprozesse der freigelegten 5'- und 3'-Enden in den *intervening sequences* 1 und 2 und des *processing stalks* der 23S rRNA nach Spaltung durch RNase III eng miteinander verknüpft. Die Reifung eines 5'-Endes ist eine wesentliche Voraussetzung für die 3'-Prozessierung des *upstream* gelegenen Fragmentes.

Auf Basis der komparativen Strukturvorhersage für die nicht fragmentierte 23S rRNA von *R. sphaeroides* (Cannone et al., 2002), sowie den in dieser Arbeit bestimmten 5'- und 3'-Enden ist in Abbildung 4-4 ein veranschaulichendes Modell für die 3'- und 5'-Prozessierung der 1.1kb bzw. 1.5kb rRNA (IVS 2) gezeigt. (Dem Anhang sind Modelle der IVS 1 und der 23S *processing stalk* Prozessierung beigefügt.)

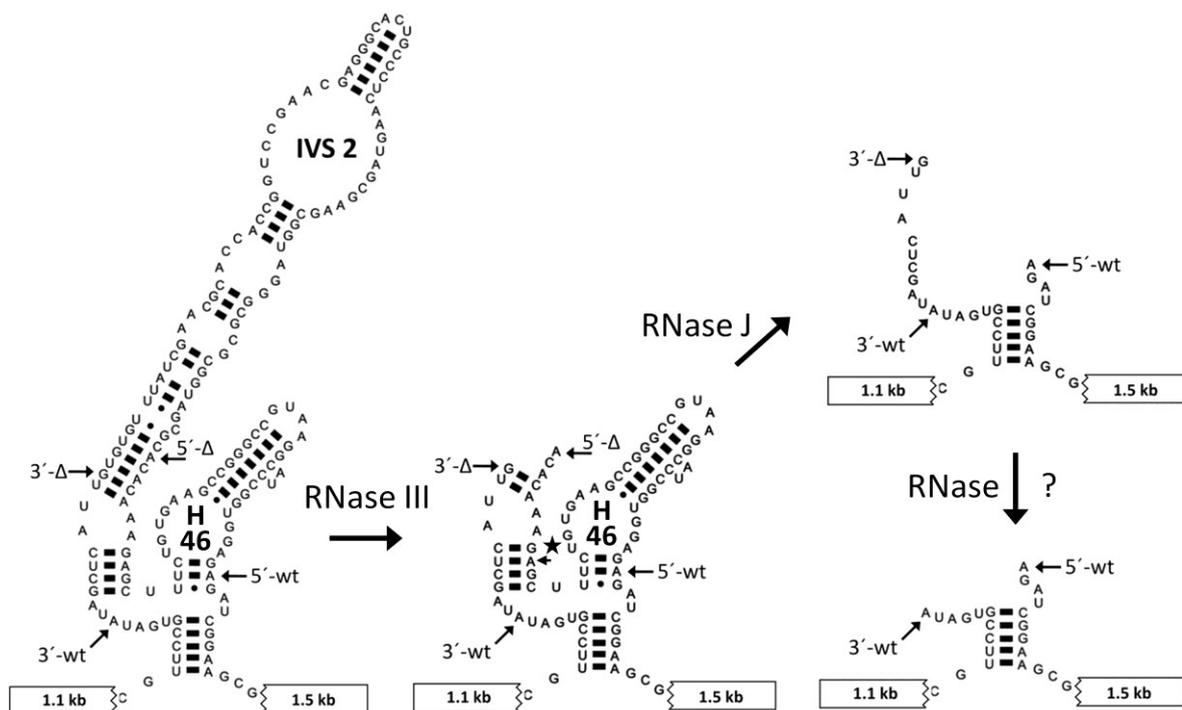


Abbildung 4-4: Modell für die 23S rRNA-Fragmentierung an der *intervening sequence* 2 (IVS 2) in *R. sphaeroides*.

Die kleinen Pfeile verweisen auf die detektierten 5'- und 3'-Enden im Wildtyp (wt) und der Mutante Δrnj (Δ ; 5'- Δ entspricht P_2 (+47 nt), Stern entspricht P_3 (+39 nt) in der Abb. 3-19). Die Entfernung des überwiegenden Teils der IVS 2 und die Separierung der 1.1kb und 1.5kb rRNA wird durch die RNA-doppelstrangspezifische RNase III vollzogen. Die dabei freigelegten 5'- und 3'- Vorläufer-Enden sind teilweise basengepaart. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen vermuten, dass zunächst RNase J das 5'-Ende der 1.5kb rRNA prozessiert und dabei auch die Helix 46 abbaut. Die Prozessierung dieser, aus dem Ribosom herausragenden, Sequenzen stoppt aufgrund sterischer Hinderung der RNase J durch die ribosomale RNA-Protein-Oberfläche. Die 5'-Prozessierung scheint Voraussetzung für die finale Reifung des 3'-Endes der 1.1kb rRNA durch eine nicht identifizierte 3'-Exoribonuklease zu sein. Weitere Erläuterungen sind dem Text zu entnehmen. Das Struktur-Modell basiert auf der 23S rRNA-Sekundärstruktur, abrufbar auf <http://www.rna.cccb.utexas.edu/>.

Der mittlere Teil dieser Abbildung entspricht dem beobachteten 3'- und 5'-Ende-Prozessierungsstatus der beiden Fragmente in der RNase J Deletionsmutante Δrnj . Diese freigelegten Enden resultieren aus der RNase III Spaltung, woraufhin die RNase J beginnt, das freigelegte 5'-Ende der 1.5kb RNA abzubauen, wobei die Degradation auch die Helix 46 betrifft. Hierbei impliziert das gezeigte Modell, dass eine exoribonukleolytische Aktivität der RNase J auch helikale RNA-Strukturen überwinden kann. Diesbezüglich wurde für die RNase J1 von *B. subtilis* gezeigt, dass dieses Enzym durchaus RNA-Regionen degradieren kann, welche doppelsträngige Bereiche aufweisen (Mathy et

al., 2007, Sinturel et al., 2009). Auch eine stabile 3'-Terminatorstruktur in der *trp leader* RNA von *B. subtilis* wird von der RNase J1 exoribonukleolytisch abgebaut (Deikus et al., 2008).

Die Identität der RNase, welche für die 3'-Prozessierung des *upstream* gelegenen Fragmentes verantwortlich ist, ist nicht bekannt. Da in *R. sphaeroides* kein Homolog zur RNase T, welche in *E. coli* für die 3'-Reifung der 23S rRNA verantwortlich ist, existiert, könnte RNase R ein möglicher Kandidat sein. Diese 3'-5' Exoribonuklease benötigt für eine effiziente Substratbindung und Degradation eine 5 bis 17 nt lange, einzelsträngige RNA-Region (Cheng et al., 2005). Das könnte erklären, warum zunächst das *downstream* gelegene 5'-Ende in der verbliebenen helikalen Struktur der IVS 2 abgebaut werden muss, bevor RNase R das zuvor basengepaarte 3'-Ende prozessieren kann. In diesem Zusammenhang muss jedoch erwähnt werden, dass in der RNase J Deletionsmutante zwei abundante 5'-Enden für die 1.5kb rRNA detektiert wurden. In Abbildung 4-4 ist das verkürzte, alternative 5'-Ende mit einem Stern markiert. In diesem Fall wäre das gegenüberliegende 3'-Ende der 1.1kb rRNA nicht mehr basengepaart, sondern einzelsträngig und somit theoretisch auch zugänglicher für eine mögliche Prozessierung durch RNase R. Möglicherweise ist jedoch der resultierende 6 nt lange einzelsträngige RNA-Bereich für eine stabile Bindung der RNase R nicht ausreichend und das freie 3'-Ende verbleibt unprozessiert.

Die in dieser Arbeit abgeleitete Reihenfolge der 5'- und 3'-Prozessierungsschritte an den helikalen Strukturen der IVS 1 und 2, sowie dem *processing stalk* der 23S rRNA-Enden (entspricht dem 5'-Ende der 5.8Slike und dem 3'-Ende der 1.5kb RNA) unterscheidet sich von bekannten Abläufen in *E. coli*. Bei der Reifung der 23S rRNA-Enden scheinen zunächst unprozessierte Nukleotide am 3'-Ende durch RNase T entfernt zu werden, bevor es zu einer finalen Reifung des 5'-Endes durch ein bislang unbekanntes Enzym kommen kann (Gutgsell & Jain, 2010). Demgegenüber scheint die Prozessierung der beiden 16S rRNA-Enden weitestgehend unabhängig voneinander ablaufen zu können. In einer temperatursensitiven RNase E/G Doppelmutante war zwar die finale 5'-Reifung der 16S rRNA unterbunden, das 3'-Ende jedoch wies keinen Unterschied zu dem reifen Ende des Wildtypes auf (Li et al., 1999).

Die Analyse der 5'-Enden der 5S und 16S rRNA in der RNase J Deletionsmutante ergab, dass der RNase J in *R. sphaeroides* keine Beteiligung an deren 5'-Prozessierung zugeschrieben werden kann (3.8.1). *S. meliloti*, ein nahe Verwandter von *R. sphaeroides*, besitzt zwei 23S rRNA-Fragmente, an deren Prozessierung ebenfalls RNase J beteiligt ist. Zusätzlich weist eine RNase J Mutante dieses Bakteriums auch eine unvollständige 5'-Reifung der 16S rRNA auf (Madhugiri et al., 2009). In *Mycobacterium smegmatis* wiederum scheint RNase J vorrangig an der Prozessierung der 23S rRNA beteiligt zu sein (Taverniti et al., 2011). In *B. subtilis* ist RNase J an einem sekundären Prozessierungsweg der 23S rRNA-Prozessierung beteiligt, wenn die eigentlich hierfür verantwortliche Mini-RNase III deletiert ist (Redko & Condon, 2010). Letzterer Fall ist damit ein klassisches Beispiel für die bereits zuvor erwähnten bakteriellen RNase *back-up* Systeme.

4.5 Weitere targets der RNase J in *R. sphaeroides*

Ein Vergleich des RNASeq Datensätze vom *R. sphaeroides* Wildtyp und der RNase J Deletionsmutante Δrnj ergab, dass in der Mutante einige kurze RNA-Fragmente akkumulieren (3.9.2). Eine ähnliche Beobachtung wurde auch bei einer RNase J1 Depletionsmutante von *B. subtilis* gemacht. In dieser Mutante kam es zu einer auffälligen Anhäufung 3'-terminaler RNA-Fragmente. Diese Fragmente besaßen dabei häufig stabile Transkriptions-Terminator-Strukturen und es wird vermutet, dass RNase J1 für die Degradation derartig strukturierter RNAs in *B. subtilis* verantwortlich ist (Daou-Chabo et al., 2009, Deikus et al., 2008). Gram-negative Bakterien, einschließlich

R. sphaeroides, besitzen typischerweise mehrere 3'-Exoribonukleasen und die Poly(A)-Polymerase, um strukturierte, helikale RNA-Fragmente vom 3'-Ende ausgehend in einem Wechselspiel von Degradation und der Poly(A)-Polymerisierung abzubauen (1.2.2). *B. subtilis*, als Gram-positives Bakterium, besitzt demgegenüber beispielsweise keine Poly(A)-Polymerase und keine RNase II. Das Fehlen dieser Enzyme könnte den Abbau strukturierter RNA-Fragmente durch RNase J1 in *B. subtilis* erklären. Sollte die RNase J in *R. sphaeroides* ebenfalls für den Abbau von Degradations-Intermediaten verantwortlich sein, stellt sich die Frage, warum die betroffenen RNA-Fragmente nicht von der 3'-exoribonukleolytischen Degradationsmaschinerie erfasst werden. Inwieweit dies auf ganz besonders stabile am 3'-Ende gelegene RNA-Strukturen zurückzuführen ist, wurde aus zeitlichen Gründen während dieser Arbeit nicht mehr näher untersucht.

Im Fall der stark akkumulierten 23Sint RNA scheint es unwahrscheinlich, dass es sich bei dieser RNA lediglich um ein rRNA-Degradationsprodukt handelt. Die Ribosomen und damit auch die ribosomale RNA gelten während des exponentiellen Wachstums als äußerst stabil (Piir et al., 2011). Daher kann die extreme Akkumulation der 23Sint RNA in der Δrnj Mutante nicht unbedingt mit der simplen Anhäufung eines intermediären rRNA-Degradationsproduktes erklärt werden. Als alternative Möglichkeit für den Ursprung dieser RNA wurde in Betracht gezogen, dass es sich bei der 23Sint RNA um ein Art kleine RNA handelt, die aus bisher nicht erklärbaren Gründen eigenständig transkribiert und spezifisch von der RNase J degradiert wird. In einem ersten experimentellen Ansatz sollte mittels differentieller 5'-RACE festgestellt werden, inwieweit die 23Sint RNA ein für bakterielle Primärtranskripte zu erwartendes triphosphoryliertes 5'-Ende besitzt. Ein derartiges 5'-Ende konnte nach einer ersten Analyse der 23Sint RNA allerdings nicht bestätigt werden (3.9.3). Dieser experimentelle Ansatz sollte in zukünftigen Versuchen jedoch weiter verfolgt werden, da offensichtlich nur eines von zwei alternativen 5'-Enden amplifiziert wurde. Ebenso könnte eine bisher nicht durchgeführte bioinformatische Analyse der *upstream* Region zur Identifizierung einer konservierten Promotor-Sequenz führen. Auch Untersuchungen zu einer eventuell variierenden Präsenz der 23Sint RNA in Δrnj während unterschiedlicher Wachstumsphasen könnten in Zukunft Hinweise zur Herkunft dieser RNA liefern.

4.6 Interaktionspartner und Lokalisation der RNase J von *R. sphaeroides*

Die Ausbildung eines RNA-degradierenden Multiprotein-Komplexes, eines sogenannten Degradosoms, wurde für eine Reihe von Bakterien beschrieben (1.2.3). Die Kernkomponenten derartiger Komplexe sind Endo- und Exo-RNasen und es wird vermutet, dass diese Kombination und die räumliche Nähe der RNasen innerhalb eines Komplexes es der Zelle ermöglichen, schnell nicht benötigte RNA-Transkripte vollständig abzubauen. Neben den RNasen finden sich in den Komplexen zusätzliche Proteine, wie RNA-Helikasen oder RNA-bindende Proteine wie der Transkriptionsfaktor *Rho*. Die spezifische Zusammensetzung der bisher bekannten Degradosomen scheint dabei organismenspezifisch zu sein. Für *B. subtilis* wurde kürzlich ebenfalls ein Degradosom ähnlicher Komplex beschrieben. Mithilfe eines bakteriellen *Two-Hybrid*-Systems konnte gezeigt werden, dass RNase J1 mit einer der Kernkomponenten dieses Multiprotein-Komplexes, der RNase Y, interagiert (Commichau et al., 2009). In späteren *in vivo Pull-Down* Experimenten wurden sowohl RNase J1 als auch RNase J2 mit einzelnen Komponenten des Degradosoms ko-aufgereinigt, allerdings nur, wenn diesen Experimenten eine Behandlung mit dem *Crosslinking*-Reagenz Formaldehyd voranging (Lehnik-Habrink et al., 2010, Mathy et al., 2009).

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten *Pull-Down* Experimente erbrachten keinerlei Hinweise auf eine mögliche Interaktion der RNase J~His₆ mit weiteren Proteinen von

R. sphaeroides (3.10.1). Wie bereits im Ergebnisteil erwähnt, führte die Verwendung des *Crosslinking*-Reagenz Formaldehyd zu einer Reihe von Problemen bei der technischen Durchführung dieser Experimente. Die unspezifische Vernetzung von Proteinen durch Zugabe von Formaldehyd sollte zunächst zur Fixierung schwacher oder transientser Protein-Protein Wechselwirkungen führen. Nach einer anschließenden spezifischen Nickel-Affinitätschromatographie sollten vernetzte, potentielle Interaktionspartner der RNase J~His₆ aus dem Zelllysate ko-isoliert und nach Reversion des *Crosslinks* durch Erhitzen diese ko-aufgereinigten Proteine durch SDS-PAGE und Silberfärbung detektiert werden (Herzberg et al., 2007, Vasilescu et al., 2004). Die Formaldehyd-Zugabe führte jedoch zum irreversiblen Ausfallen von Zellprotein, was eine gelelektrophoretische Auftrennung und qualitative Analyse dieser Fraktion verhinderte. Eine Optimierung der *Pull-Down* Experimente konnte aufgrund des zeitlichen Rahmens dieser Arbeit nicht stattfinden. Aus zeitlichen Gründen wurden bisher auch keine *Pull-Down* Studien ohne Formaldehyd durchgeführt, wodurch das Problem der irreversiblen Präzipitation vermutlich hätte umgangen werden können. Allerdings wurde bereits weiter oben erwähnt, dass eine Interaktion der RNase J1 und J2 in *B. subtilis* mit anderen Proteinen in *Pull-Downs* bisher nur unter *Crosslinking* Bedingungen beobachtet wurde, was auf eine nur schwache Wechselwirkungen hinweist. Die beobachtete Homo-Oligomerisierung der RNase J~His₆ während der Gelfiltration scheint jedoch recht stabil zu sein, demnach wäre zumindest zu erwarten gewesen, dass mit Hilfe der ko-exprimierten RNase J~His₆ auch Wildtyp RNase J aus dem Zelllysate von *R. sphaeroides* isoliert werden würde. Dies war jedoch nicht der Fall und spricht für eine methodische Unzulänglichkeit zur Identifizierung offensichtlich vorhandener Protein-Protein Wechselwirkungen.

Theoretisch könnte die RNase J von *R. sphaeroides*, ähnlich zur RNase J1 und J2 von *B. subtilis*, eine Komponente des Degradosoms sein. Ein derartiger Komplex wurde in *Rhodobacter capsulatus*, einem engen Verwandten von *R. sphaeroides*, beschrieben (Jäger et al., 2001). Zum damaligen Zeitpunkt wurde kein der RNase J entsprechendes Protein diesem Komplex zugeordnet. Die Ko-Immuno-präzipitation die zur Identifizierung des Degradosoms führte, fand jedoch ohne *Crosslinking* statt. Schwächere Interaktionspartner könnten demnach einer Detektion entgangen sein. Hinzu kommt, dass sich die jeweilige Komposition von RNA-degradierenden Multiprotein-Komplexen innerhalb eines Organismus je nach Wachstumsbedingungen unterscheiden kann, wodurch eine nur vorübergehende Assemblierung der RNase J im Degradosom übersehen werden könnte (Jäger et al., 2004, Carpousis, 2007). Eine weitere nicht unwahrscheinliche RNase-Protein-Interaktion betrifft eventuell vorhandene Regulator-Proteine, welche eine offensichtlich äußerst prozessive RNase, wie RNase J, in der Zelle kontrollieren könnten. Für RNase E sind eine Reihe von Proteinen bekannt, welche ihre endonukleolytische Aktivität beeinflussen können. RraA beispielsweise bindet an RNase E und scheint unter Stressbedingungen eine modulatorische Funktion bei der globalen RNA-Prozessierung durch RNase E zu übernehmen (Lee et al., 2003). Das ribosomale Protein L4 scheint inhibitorisch auf RNase E zu wirken und führt zu einer erhöhten Halbwertszeit von stressinduzierten RNA-Transkripten in *E. coli* (Singh et al., 2009). Einige bakterielle Toxin-Antitoxin Systeme basieren auf einer unter normalen Wachstumsbedingungen inaktivierten, ribonukleolytisch-aktiven Komponente aufgrund der Bindung eines Inhibitorproteins. So ist bekannt, dass die Endo-RNase Kid während des exponentiellen Wachstums permanent durch die Bindung des Inhibitor-Proteins Kis inaktiviert ist (Munoz-Gomez et al., 2005).

Interessanterweise ergab eine *Western Blot* Analyse des fraktionierten Sucrose-Überstandes der Polysomen-Isolierung, dass RNase J in geringem Umfang auch in dem Polysomen-enthaltenden Sediment nach Ultrazentrifugation vorhanden war. Inwieweit sich diese Ko-Sedimentation allein auf die nur kurzzeitige Assoziation der RNase J mit Ribosomen während der Prozessierung der 23S rRNA-Fragmente erklären lässt, ist nicht klar. Möglicherweise handelt es sich hierbei lediglich um

ein methodisches Artefakt und die im Ultrazentrifugations-Sediment detektierte RNase J stammt von einer partiell präzipitierten cytoplasmatischen Proteinfraction. Eine alternative Erklärung wäre jedoch, dass den Ribosomen eine Art regulatorische Funktion hinsichtlich des Pools an freier RNase J zukommt. Hierbei könnte eine kontrollierte Komplexierung der RNase J mit einem Ribosom eine unspezifische Degradation von RNA-Molekülen durch diese scheinbar äußerst prozessive Exoribonuklease verhindern. Eine ähnliche Hypothese wurde für die RNase P in *B. subtilis* aufgestellt, die mit der 30S Untereinheit einen Komplex bildet (Barrera & Pan, 2004).

Von zunehmendem Interesse bei der Erforschung der bakteriellen Genregulation auf Basis der RNA-Degradierung ist auch die räumliche Organisation von RNasen innerhalb einer Zelle. So geht man derzeit davon aus, dass ein beträchtlicher Teil der RNase E in *E. coli* mit der inneren Cytoplasmamembran verknüpft ist (Khemici et al., 2008, Taghbalout & Rothfield, 2008). Auch die RNase Y aus *B. subtilis* besitzt eine Transmembran-Domäne am N-Terminus und wurde *in vivo* membrangebunden lokalisiert (Hunt et al., 2006). Im Zuge der oben erwähnten *Western Blot* Analyse der Sucrose-Kissen-Fractionen wurde keine RNase J in den Membranprotein enthaltenden Fractionen detektiert, was dafür spricht, dass diese vorrangig im Cytoplasma von *R. sphaeroides* vorkommt.

5 Zusammenfassung

Ribonukleasen sind die Enzyme, welche für Prozessierung und Degradation der RNA-Moleküle in einer Zelle verantwortlich sind. Die zu diesen Enzymen zählende RNase J wurde erst vor einigen Jahren in *B. subtilis* identifiziert und unterscheidet sich von den bisher bekannten bakteriellen RNasen in zweierlei Hinsicht. Erstens kann dieses Enzym RNA sowohl endo- als auch exoribonukleolytisch spalten und zweitens besitzt die exoribonukleolytische Aktivität eine bislang für bakterielle Ribonukleasen nicht bekannte 5'-3' Orientierung. In *B. subtilis* ist die RNase J1 essentiell und spielt zusammen mit der paralogen RNase J2 eine Schlüsselrolle bei der Prozessierung und Degradation vieler RNAs in diesem Gram-positiven Organismus. Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit konnten erste Einblicke in die Aktivität und Funktion des RNase J homologen Proteins von *R. sphaeroides* gewonnen werden.

Bei den *in vitro* RNA-Degradationsstudien mit rekombinant aufgereinigter RNase J konnte gezeigt werden, dass dieses Enzym eine äußerst prozessive exoribonukleolytische Aktivität besitzt und hierbei eine Präferenz für RNA-Substrate mit einem monophosphorylierten 5'-Ende aufweist. Eine für die RNase J von *B. subtilis* beschriebene, nahezu vollständige Inhibition der exoribonukleolytischen Aktivität durch ein triphosphoryliertes 5'-Ende wurde während dieser Arbeit jedoch nicht beobachtet. Die außergewöhnliche 5'-3' Orientierung der RNA-Degradation durch die RNase J konnte prinzipiell auch für das homologe Enzym in *R. sphaeroides* bestätigt werden. Eine endoribonukleolytische Aktivität der RNase J ließ sich während der *in vitro* RNA-Degradationsstudien jedoch nur in geringem Umfang feststellen. Die beobachteten ribonukleolytischen Charakteristika der RNase J von *R. sphaeroides* werden vergleichend zu bekannten Eigenschaften von RNase J Homologen aus anderen Organismen diskutiert. Zusätzlich werden einige Aspekte der ribonukleolytischen Aktivität auf der Basis veröffentlichter RNase J Protein-Struktur Daten näher erläutert.

Die RNase J von *R. sphaeroides* ist unter Standardwachstumsbedingungen nicht essentiell und eine Deletionsmutante wies keinen veränderten Phänotyp zum Wildtyp auf. Auf der RNA-Ebene führte die Deletion der RNase J zum Ausbleiben der finalen Reifung der 5'- als auch 3'-Enden der ribosomalen 23S rRNA-Fragmente. Mit Hilfe von *in vitro* Experimenten konnte gezeigt werden, dass die RNase J von *R. sphaeroides* für die finale 5'-Prozessierung der 23S rRNA-Fragmente verantwortlich ist. Der sekundäre Effekt auf die Reifung der 3'-Enden führte zur Erstellung eines Modells für den Ablauf der einzelnen RNA-Reifung Vorgänge an den 23S rRNA-Fragmenten.

Die im Rahmen dieser Arbeit begonnene Auswertung einer RNASeq Transkriptom Analyse einschließlich erster *Northern Blot* Validierungen ergab, dass der RNase J möglicherweise eine weitere Funktion bei dem finalen Abbau einzelner Intermediate der RNA-Degradation in *R. sphaeroides* zukommt.

6 Referenzen

- Argaman L, Hershberg R, Vogel J, Bejerano G, Wagner EG, Margalit H, et al.** 2001. Novel small RNA-encoding genes in the intergenic regions of *Escherichia coli*. *Curr Biol*; 11:941-50.
- Baker KE, Mackie GA.** 2003. Ectopic RNase E sites promote bypass of 5'-end-dependent mRNA decay in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*; 47:75-88.
- Barrera A, Pan T.** 2004. Interaction of the *Bacillus subtilis* RNase P with the 30S ribosomal subunit. *RNA*; 10:482-92.
- Basturea GN, Zundel MA, Deutscher MP.** 2011. Degradation of ribosomal RNA during starvation: comparison to quality control during steady-state growth and a role for RNase PH. *RNA*; 17:338-45.
- Bechhofer DH.** 2011. *Bacillus subtilis* mRNA decay: new parts in the toolkit. *Wiley Interdiscip Rev RNA*; 2:387-94.
- Belasco JG.** 2010. All things must pass: contrasts and commonalities in eukaryotic and bacterial mRNA decay. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 11:467-78.
- Berghoff BA, Glaeser J, Sharma CM, Zobawa M, Lottspeich F, Vogel J, et al.** 2011. Contribution of Hfq to photooxidative stress resistance and global regulation in *Rhodobacter sphaeroides*. *Mol Microbiol*; 80:1479-95.
- Bernstein JA, Khodursky AB, Lin PH, Lin-Chao S, Cohen SN.** 2002. Global analysis of mRNA decay and abundance in *Escherichia coli* at single-gene resolution using two-color fluorescent DNA microarrays. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 99:9697-702.
- Bernstein JA, Lin PH, Cohen SN, Lin-Chao S.** 2004. Global analysis of *Escherichia coli* RNA degradosome function using DNA microarrays. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 101:2758-63.
- Birnboim HC, Doly J.** 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*; 7:1513-23.
- Blum H, Beier H, Gross HJ.** 1987. Improved Silver Staining of Plant-Proteins, RNA and DNA in Polyacrylamide Gels. *Electrophoresis*; 8:93-9.
- Bouvier M, Carpousis AJ.** 2011. A tale of two mRNA degradation pathways mediated by RNase E. *Mol Microbiol*; 82:1305-10.
- Bram RJ, Young RA, Steitz JA.** 1980. The ribonuclease III site flanking 23S sequences in the 30S ribosomal precursor RNA of *E. coli*. *Cell*; 19:393-401.
- Britton RA, Wen T, Schaefer L, Pellegrini O, Uicker WC, Mathy N, et al.** 2007. Maturation of the 5' end of *Bacillus subtilis* 16S rRNA by the essential ribonuclease YkqC/RNase J1. *Mol Microbiol*; 63:127-38.
- Bugrysheva JV, Scott JR.** 2010. The ribonucleases J1 and J2 are essential for growth and have independent roles in mRNA decay in *Streptococcus pyogenes*. *Mol Microbiol*; 75:731-43.
- Callaghan AJ, Marcaida MJ, Stead JA, McDowall KJ, Scott WG, Luisi BF.** 2005. Structure of *Escherichia coli* RNase E catalytic domain and implications for RNA turnover. *Nature*; 437:1187-91.
- Callebaut I, Moshous D, Mornon JP, de Villartay JP.** 2002. Metallo-beta-lactamase fold within

nucleic acids processing enzymes: the beta-CASP family. *Nucleic Acids Res*; 30:3592-601.

Cannone JJ, Subramanian S, Schnare MN, Collett JR, D'Souza LM, Du Y, et al. 2002. The comparative RNA web (CRW) site: an online database of comparative sequence and structure information for ribosomal, intron, and other RNAs. *BMC Bioinformatics*; 3:2.

Caron MP, Lafontaine DA, Masse E. 2010. Small RNA-mediated regulation at the level of transcript stability. *RNA Biol*; 7:140-4.

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

Celesnik H, Deana A, Belasco JG. 2007. Initiation of RNA decay in *Escherichia coli* by 5' pyrophosphate removal. *Mol Cell*; 27:79-90.

Chae H, Han K, Kim KS, Park H, Lee J, Lee Y. 2010. Rho-dependent termination of *ssrS* (6S RNA) transcription in *Escherichia coli*: implication for 3' processing of 6S RNA and expression of downstream *ygfA* (putative 5-formyl-tetrahydrofolate cyclo-ligase). *J Biol Chem*; 286:114-22.

Cheng ZF, Deutscher MP. 2005. An important role for RNase R in mRNA decay. *Mol Cell*; 17:313-8.

Clouet-d'Orval B, Rinaldi D, Quentin Y, Carpousis AJ. 2010. Euryarchaeal beta-CASP proteins with homology to bacterial RNase J Have 5'- to 3'-exoribonuclease activity. *J Biol Chem*; 285:17574-83.

Collins JA, Irnov I, Baker S, Winkler WC. 2007. Mechanism of mRNA destabilization by the *glmS* ribozyme. *Genes Dev*; 21:3356-68.

Commichau FM, Rothe FM, Herzberg C, Wagner E, Hellwig D, Lehnik-Habrink M, et al. 2009. Novel activities of glycolytic enzymes in *Bacillus subtilis*: interactions with essential proteins involved in mRNA processing. *Mol Cell Proteomics*; 8:1350-60.

Condon C. 2007. Maturation and degradation of RNA in bacteria. *Curr Opin Microbiol*; 10:271-8.

Condon C, Putzer H, Luo D, Grunberg-Manago M. 1997. Processing of the *Bacillus subtilis thrS* leader mRNA is RNase E-dependent in *Escherichia coli*. *J Mol Biol*; 268:235-42.

Conrad C, Rauhut R, Klug G. 1998. Different cleavage specificities of RNases III from *Rhodobacter capsulatus* and *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*; 26:4446-53.

Daou-Chabo R, Condon C. 2009. RNase J1 endonuclease activity as a probe of RNA secondary structure. *RNA*; 15:1417-25.

Daou-Chabo R, Mathy N, Benard L, Condon C. 2009. Ribosomes initiating translation of the *hbs* mRNA protect it from 5'-to-3' exoribonucleolytic degradation by RNase J1. *Mol Microbiol*; 71:1538-50.

Davis BM, Waldor MK. 2007. RNase E-dependent processing stabilizes MicX, a *Vibrio cholerae* sRNA. *Mol Microbiol*; 65:373-85.

Deana A, Belasco JG. 2005. Lost in translation: the influence of ribosomes on bacterial mRNA decay. *Genes Dev*; 19:2526-33.

Deana A, Celesnik H, Belasco JG. 2008. The bacterial enzyme RppH triggers messenger RNA degradation by 5' pyrophosphate removal. *Nature*; 451:355-8.

Deikus G, Bechhofer DH. 2011. 5' End-independent RNase J1 Endonuclease Cleavage of *Bacillus*

subtilis Model RNA. *J Biol Chem*; 286:34932-40.

Deikus G, Condon C, Bechhofer DH. 2008. Role of *Bacillus subtilis* RNase J1 endonuclease and 5'-exonuclease activities in *trp* leader RNA turnover. *J Biol Chem*; 283:17158-67.

Desnoyers G, Morissette A, Prevost K, Masse E. 2009. Small RNA-induced differential degradation of the polycistronic mRNA iscRSUA. *EMBO J*; 28:1551-61.

Deutscher MP. 2006. Degradation of RNA in bacteria: comparison of mRNA and stable RNA. *Nucleic Acids Res*; 34:659-66.

Deutscher MP. 2009. Maturation and degradation of ribosomal RNA in bacteria. *Prog Mol Biol Transl Sci*; 85:369-91.

Dierstein R. 1984. Synthesis of pigment-binding protein in toluene-treated *Rhodospseudomonas capsulata* and in cell-free systems. *Eur J Biochem*; 138:509-18.

Dominski Z. 2007. Nucleases of the metallo-beta-lactamase family and their role in DNA and RNA metabolism. *Crit Rev Biochem Mol Biol*; 42:67-93.

Dorleans A, Li de la Sierra-Gallay I, Piton J, Zig L, Gilet L, Putzer H, et al. 2011. Molecular basis for the recognition and cleavage of RNA by the bifunctional 5'-3' Exo/Endoribonuclease RNase J. *Structure*; 19:1252-61.

Drews G. Mikrobiologisches Praktikum. Heidelberg: Springer Verlag, 1983.

Durand S, Gilet L, Bessieres P, Nicolas P, Condon C. 2012. Three Essential Ribonucleases-RNase Y, J1, and III-Control the Abundance of a Majority of *Bacillus subtilis* mRNAs. *PLoS Genet*; 8:e1002520.

Even S, Pellegrini O, Zig L, Labas V, Vinh J, Brechemmier-Baey D, et al. 2005. Ribonucleases J1 and J2: two novel endoribonucleases in *B.subtilis* with functional homology to *E.coli* RNase E. *Nucleic Acids Res*; 33:2141-52.

Evguenieva-Hackenberg E. 2005. Bacterial ribosomal RNA in pieces. *Mol Microbiol*; 57:318-25.

Evguenieva-Hackenberg E, Klug G. 2000. RNase III processing of intervening sequences found in helix 9 of 23S rRNA in the alpha subclass of *Proteobacteria*. *J Bacteriol*; 182:4719-29.

Fritsch J, Rothfuchs R, Rauhut R, 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. *Mol Microbiol*; 15:1017-29.

Ghora BK, Apirion D. 1978. Structural analysis and in vitro processing to p5 rRNA of a 9S RNA molecule isolated from an *rne* mutant of *E. coli*. *Cell*; 15:1055-66.

Ghosh S, Deutscher MP. 1999. Oligoribonuclease is an essential component of the mRNA decay pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 96:4372-7.

Goldenberg D, Azar I, Oppenheim AB. 1996. Differential mRNA stability of the *cspA* gene in the cold-shock response of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*; 19:241-8.

Gray MW, Schnare MN. Evolution of rRNA gene organization. In: Zimmermann RA, Dahlberg AE, eds. Ribosomal RNA Structure, Evolution, Processing and Function in Protein Biosynthesis. CRC Press, Boca Raton FL, 1996:49-69.

Gutgsell NS, Jain C. 2010. Coordinated regulation of 23S rRNA maturation in *Escherichia coli*. *J*

Bacteriol; 192:1405-9.

Hasenöhr D, Konrat R, Bläsi U. 2011. Identification of an RNase J ortholog in *Sulfolobus solfataricus*: implications for 5'-to-3' directional decay and 5'-end protection of mRNA in Crenarchaeota. *RNA*; 17:99-107.

Heck C, Rothfuchs R, Jäger A, Rauhut R, Klug G. 1996. Effect of the pufQ-pufB intercistronic region on puf mRNA stability in *Rhodobacter capsulatus*. *Mol Microbiol*; 20:1165-78.

Henkin TM, Yanofsky C. 2002. Regulation by transcription attenuation in bacteria: how RNA provides instructions for transcription termination/antitermination decisions. *Bioessays*; 24:700-7.

Herzberg C, Weidinger LA, Dorrbecker B, Hubner S, Stulke J, Commichau FM. 2007. SPINE: a method for the rapid detection and analysis of protein-protein interactions *in vivo*. *Proteomics*; 7:4032-5.

Homuth G, Mogk A, Schumann W. 1999. Post-transcriptional regulation of the *Bacillus subtilis dnaK* operon. *Mol Microbiol*; 32:1183-97.

Hübner P, Willison JC, Vignais PM, Bickle TA. 1991. Expression of regulatory *nif* genes in *Rhodobacter capsulatus*. *J Bacteriol*; 173:2993-9.

Hunt A, Rawlins JP, Thomaides HB, Errington J. 2006. Functional analysis of 11 putative essential genes in *Bacillus subtilis*. *Microbiology*; 152:2895-907.

Jacques JF, Jang S, Prevost K, Desnoyers G, Desmarais M, Imlay J, et al. 2006. RyhB small RNA modulates the free intracellular iron pool and is essential for normal growth during iron limitation in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*; 62:1181-90.

Jäger S, Fuhrmann O, Heck C, Hebermehl M, Schiltz E, Rauhut R, et al. 2001. An mRNA degrading complex in *Rhodobacter capsulatus*. *Nucleic Acids Res*; 29:4581-8.

Jäger S, Hebermehl M, Schiltz E, Klug G. 2004. Composition and activity of the *Rhodobacter capsulatus* degradosome vary under different oxygen concentrations. *J Mol Microbiol Biotechnol*; 7:148-54.

Jiang X, Belasco JG. 2004. Catalytic activation of multimeric RNase E and RNase G by 5'-monophosphorylated RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 101:9211-6.

Jourdan SS, McDowall KJ. 2008. Sensing of 5' monophosphate by *Escherichia coli* RNase G can significantly enhance association with RNA and stimulate the decay of functional mRNA transcripts *in vivo*. *Mol Microbiol*; 67:102-15.

Kaberdin VR. 2003. Probing the substrate specificity of *Escherichia coli* RNase E using a novel oligonucleotide-based assay. *Nucleic Acids Res*; 31:4710-6.

Kaberdin VR, Bläsi U. 2006. Translation initiation and the fate of bacterial mRNAs. *FEMS Microbiol Rev*; 30:967-79.

Kaberdin VR, Singh D, Lin-Chao S. 2011. Composition and conservation of the mRNA-degrading machinery in bacteria. *J Biomed Sci*; 18:23.

Keen NT, Tamaki S, Kobayashi D, Trollinger D. 1988. Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in gram-negative bacteria. *Gene*; 70:191-7.

Khemici V, Carpousis AJ. 2004. The RNA degradosome and poly(A) polymerase of *Escherichia coli* are

required in vivo for the degradation of small mRNA decay intermediates containing REP-stabilizers. *Mol Microbiol*; 51:777-90.

Khemici V, Poljak L, Luisi BF, Carpousis AJ. 2008. The RNase E of *Escherichia coli* is a membrane-binding protein. *Mol Microbiol*; 70:799-813.

Kime L, Jourdan SS, Stead JA, Hidalgo-Sastre A, McDowall KJ. 2010. Rapid cleavage of RNA by RNase E in the absence of 5' monophosphate stimulation. *Mol Microbiol*; 76:590-604.

King TC, Sirdeshmukh R, Schlessinger D. 1984. RNase III cleavage is obligate for maturation but not for function of *Escherichia coli* pre-23S rRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 81:185-8.

Klein F, Evguenieva-Hackenberg E. 2002. RNase E is involved in 5'-end 23S rRNA processing in *alpha-Proteobacteria*. *Biochem Biophys Res Commun*; 299:780-6.

Klug G, Adams CW, Belasco J, Doerge B, Cohen SN. 1987. Biological consequences of segmental alterations in mRNA stability: effects of deletion of the intercistronic hairpin loop region of the *Rhodobacter capsulatus puf* operon. *EMBO J*; 6:3515-20.

Klug G, Cohen SN. 1990. Combined actions of multiple hairpin loop structures and sites of rate-limiting endonucleolytic cleavage determine differential degradation rates of individual segments within polycistronic *puf* operon mRNA. *J Bacteriol*; 172:5140-6.

Kobayashi K, Ehrlich SD, Albertini A, Amati G, Andersen KK, Arnaud M, et al. 2003. Essential *Bacillus subtilis* genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 100:4678-83.

Kordes E, Jock S, Fritsch J, Bosch F, Klug G. 1994. Cloning of a gene involved in rRNA precursor processing and 23S rRNA cleavage in *Rhodobacter capsulatus*. *J Bacteriol*; 176:1121-7.

Laalami S, Putzer H. 2011. mRNA degradation and maturation in prokaryotes: the global players. *BioMolConcepts*; 2:491-506.

Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*; 227:680-5.

Laurberg M, Asahara H, Korostelev A, Zhu J, Trakhanov S, Noller HF. 2008. Structural basis for translation termination on the 70S ribosome. *Nature*; 454:852-7.

Le Derout J, Regnier P, Hajnsdorf E. 2002. Both temperature and medium composition regulate RNase E processing efficiency of the *rpsO* mRNA coding for ribosomal protein S15 of *Escherichia coli*. *J Mol Biol*; 319:341-9.

Lee K, Zhan X, Gao J, Qiu J, Feng Y, Meganathan R, et al. 2003. RraA, a protein inhibitor of RNase E activity that globally modulates RNA abundance in *E. coli*. *Cell*; 114:623-34.

Lehnik-Habrink M, Pfortner H, Rempeters L, Pietack N, Herzberg C, Stulke J. 2010. The RNA degradosome in *Bacillus subtilis*: identification of CshA as the major RNA helicase in the multiprotein complex. *Mol Microbiol*.

Levy S, Portnoy V, Admon J, Schuster G. 2011. Distinct activities of several RNase J proteins in methanogenic archaea. *RNA Biol*; 8.

Li de la Sierra-Gallay I, Zig L, Jamalli A, Putzer H. 2008. Structural insights into the dual activity of RNase J. *Nat Struct Mol Biol*; 15:206-12.

- Li Z, Deutscher MP.** 1996. Maturation pathways for *E. coli* tRNA precursors: a random multienzyme process *in vivo*. *Cell*; 86:503-12.
- Li Z, Pandit S, Deutscher MP.** 1999. Maturation of 23S ribosomal RNA requires the exoribonuclease RNase T. *RNA*; 5:139-46.
- Li Z, Pandit S, Deutscher MP.** 1999. RNase G (CafA protein) and RNase E are both required for the 5' maturation of 16S ribosomal RNA. *EMBO J*; 18:2878-85.
- Lin PH, Lin-Chao S.** 2005. RhlB helicase rather than enolase is the beta-subunit of the *Escherichia coli* polynucleotide phosphorylase (PNPase)-exoribonucleolytic complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 102:16590-5.
- Liou GG, Chang HY, Lin CS, Lin-Chao S.** 2002. DEAD box RhlB RNA helicase physically associates with exoribonuclease PNPase to degrade double-stranded RNA independent of the degradosome-assembling region of RNase E. *J Biol Chem*; 277:41157-62.
- Mackie GA.** 1998. Ribonuclease E is a 5'-end-dependent endonuclease. *Nature*; 395:720-3.
- Mackie GA.** 2000. Stabilization of circular rpsT mRNA demonstrates the 5'-end dependence of RNase E action *in vivo*. *J Biol Chem*; 275:25069-72.
- Mäder U, Hennig S, Hecker M, Homuth G.** 2004. Transcriptional organization and posttranscriptional regulation of the *Bacillus subtilis* branched-chain amino acid biosynthesis genes. *J Bacteriol*; 186:2240-52.
- Mäder U, Zig L, Kretschmer J, Homuth G, Putzer H.** 2008. mRNA processing by RNases J1 and J2 affects *Bacillus subtilis* gene expression on a global scale. *Mol Microbiol*; 70:183-96.
- Madhugiri R, Evgenieva-Hackenberg E.** 2009. RNase J is involved in the 5'-end maturation of 16S rRNA and 23S rRNA in *Sinorhizobium meliloti*. *FEBS Lett*; 583:2339-42.
- Marcaida MJ, DePristo MA, Chandran V, Carpousis AJ, Luisi BF.** 2006. The RNA degradosome: life in the fast lane of adaptive molecular evolution. *Trends Biochem Sci*; 31:359-65.
- Mathy N, Benard L, Pellegrini O, Daou R, Wen T, Condon C.** 2007. 5'-to-3' exoribonuclease activity in *Bacteria*: role of RNase J1 in rRNA maturation and 5' stability of mRNA. *Cell*; 129:681-92.
- Mathy N, Hebert A, Mervelet P, Benard L, Dorleans A, Li de la Sierra-Gallay I, et al.** 2010. *Bacillus subtilis* ribonucleases J1 and J2 form a complex with altered enzyme behaviour. *Mol Microbiol*; 75:489-98.
- Mathy N, Hebert A, Mervelet P, Benard L, Dorleans A, Li de la Sierra-Gallay I, et al.** 2009. *Bacillus subtilis* ribonucleases J1 and J2 form a complex with altered enzyme behaviour. *Mol Microbiol*; 75:489-98.
- Meinken C, Blencke HM, Ludwig H, Stulke J.** 2003. Expression of the glycolytic *gapA* operon in *Bacillus subtilis*: differential syntheses of proteins encoded by the operon. *Microbiology*; 149:751-61.
- Misra TK, Apirion D.** 1979. RNase E, an RNA processing enzyme from *Escherichia coli*. *J Biol Chem*; 254:11154-9.
- Mohanty BK, Kushner SR.** 2003. Genomic analysis in *Escherichia coli* demonstrates differential roles for polynucleotide phosphorylase and RNase II in mRNA abundance and decay. *Mol Microbiol*; 50:645-58.

- Mohanty BK, Kushner SR.** 2006. The majority of *Escherichia coli* mRNAs undergo post-transcriptional modification in exponentially growing cells. *Nucleic Acids Res*; 34:5695-704.
- Mohanty BK, Kushner SR.** 2002. Polyadenylation of *Escherichia coli* transcripts plays an integral role in regulating intracellular levels of polynucleotide phosphorylase and RNase E. *Mol Microbiol*; 45:1315-24.
- Motorin Y, Helm M.** 2011. RNA nucleotide methylation. *Wiley Interdiscip Rev RNA*; 2:611-31.
- Munoz-Gomez AJ, Lemonnier M, Santos-Sierra S, Berzal-Herranz A, Diaz-Orejas R.** 2005. RNase/anti-RNase activities of the bacterial *parD* toxin-antitoxin system. *J Bacteriol*; 187:3151-7.
- Newman JA, Hewitt L, Rodrigues C, Solovyova A, Harwood CR, Lewis RJ.** 2011. Unusual, Dual Endo- and Exonuclease Activity in the Degradosome Explained by Crystal Structure Analysis of RNase J1. *Structure*; 19:1241-51.
- Nickel M, Homuth G, Bohnisch C, Mader U, Schweder T.** 2004. Cold induction of the *Bacillus subtilis* *bkd* operon is mediated by increased mRNA stability. *Mol Genet Genomics*; 272:98-107.
- Noller HF, Kop J, Wheaton V, Brosius J, Gutell RR, Kopylov AM, et al.** 1981. Secondary structure model for 23S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res*; 9:6167-89.
- Ow MC, Liu Q, Kushner SR.** 2000. Analysis of mRNA decay and rRNA processing in *Escherichia coli* in the absence of RNase E-based degradosome assembly. *Mol Microbiol*; 38:854-66.
- Papenfert K, Said N, Welsink T, Lucchini S, Hinton JC, Vogel J.** 2009. Specific and pleiotropic patterns of mRNA regulation by ArcZ, a conserved, Hfq-dependent small RNA. *Mol Microbiol*; 74:139-58.
- Pellegrini O, Nezzar J, Marchfelder A, Putzer H, Condon C.** 2003. Endonucleolytic processing of CCA-less tRNA precursors by RNase Z in *Bacillus subtilis*. *EMBO J*; 22:4534-43.
- Pertzev AV, Nicholson AW.** 2006. Characterization of RNA sequence determinants and antideterminants of processing reactivity for a minimal substrate of *Escherichia coli* ribonuclease III. *Nucleic Acids Res*; 34:3708-21.
- Pfeiffer V, Papenfert K, Lucchini S, Hinton JC, Vogel J.** 2009. Coding sequence targeting by MicC RNA reveals bacterial mRNA silencing downstream of translational initiation. *Nat Struct Mol Biol*; 16:840-6.
- Piir K, Paier A, Liiv A, Tenson T, Maivali U.** 2011. Ribosome degradation in growing bacteria. *EMBO Rep*; 12:458-62.
- Porath J, Carlsson J, Olsson I, Belfrage G.** 1975. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature*; 258:598-9.
- Prud'homme-Genereux A, Beran RK, Iost I, Ramey CS, Mackie GA, Simons RW.** 2004. Physical and functional interactions among RNase E, polynucleotide phosphorylase and the cold-shock protein, CsdA: evidence for a 'cold shock degradosome'. *Mol Microbiol*; 54:1409-21.
- Purusharth RI, Klein F, Sulthana S, Jager S, Jagannadham MV, Evguenieva-Hackenberg E, et al.** 2005. Exoribonuclease R interacts with endoribonuclease E and an RNA helicase in the psychrotrophic bacterium *Pseudomonas syringae* Lz4W. *J Biol Chem*; 280:14572-8.
- Rauhut R, Klug G.** 1999. mRNA Degradation in Bacteria. *FEMS Microbiol Rev*; 23:353-70.

- Redko Y, Condon C.** 2010. Maturation of 23S rRNA in *Bacillus subtilis* in the absence of Mini-III. *J Bacteriol*; 192:356-9.
- Richards J, Liu Q, Pellegrini O, Celesnik H, Yao S, Bechhofer DH, et al.** 2011. An RNA pyrophosphohydrolase triggers 5'-exonucleolytic degradation of mRNA in *Bacillus subtilis*. *Mol Cell*; 43:940-9.
- Rische T, Klug G.** 2012. The ordered processing of intervening sequences in 23S rRNA of *Rhodobacter sphaeroides* requires RNase J. *RNA Biol*; 9.
- Shahbadian K, Jamalli A, Zig L, Putzer H.** 2009. RNase Y, a novel endoribonuclease, initiates riboswitch turnover in *Bacillus subtilis*. *EMBO J*; 28:3523-33.
- Shajani Z, Sykes MT, Williamson JR.** 2011. Assembly of bacterial ribosomes. *Annu Rev Biochem*; 80:501-26.
- Sharp JS, Bechhofer DH.** 2005. Effect of 5'-proximal elements on decay of a model mRNA in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*; 57:484-95.
- Singh D, Chang SJ, Lin PH, Averina OV, Kaberdin VR, Lin-Chao S.** 2009. Regulation of ribonuclease E activity by the L4 ribosomal protein of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 106:864-9.
- Sinturel F, Pellegrini O, Xiang S, Tong L, Condon C, Benard L.** 2009. Real-time fluorescence detection of exoribonucleases. *RNA*; 15:2057-62.
- Staehelin T, Brinton CC, Wettstein FO, Noll H.** 1963. Structure and Function of *E. Coli* Ergosomes. *Nature*; 199:865-70.
- Taghbalout A, Rothfield L.** 2008. New insights into the cellular organization of the RNA processing and degradation machinery of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*; 70:780-2.
- Taghbalout A, Rothfield L.** 2008. RNaseE and RNA helicase B play central roles in the cytoskeletal organization of the RNA degradosome. *J Biol Chem*; 283:13850-5.
- Taghbalout A, Rothfield L.** 2007. RNaseE and the other constituents of the RNA degradosome are components of the bacterial cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 104:1667-72.
- Taverniti V, Forti F, Ghisotti D, Putzer H.** 2011. *Mycobacterium smegmatis* RNase J is a 5'-3' exo-/endoribonuclease and both RNase J and RNase E are involved in ribosomal RNA maturation. *Mol Microbiol*.
- van Niel CB.** 1944. The Culture, General Physiology, Morphology, and Classification of the Non-Sulfur Purple and Brown Bacteria. *Bacteriol Rev*; 8:1-118.
- Vasilescu J, Guo X, Kast J.** 2004. Identification of protein-protein interactions using in vivo cross-linking and mass spectrometry. *Proteomics*; 4:3845-54.
- Weisel J, Wagner S, Klug G.** 2010. The Nop5-L7A-fibrillarin RNP complex and a novel box C/D containing sRNA of *Halobacterium salinarum* NRC-1. *Biochem Biophys Res Commun*; 394:542-7.
- Yao S, Bechhofer DH.** 2010. Initiation of decay of *Bacillus subtilis* rpsO mRNA by endoribonuclease RNase Y. *J Bacteriol*; 192:3279-86.
- Young RA, Steitz JA.** 1978. Complementary sequences 1700 nucleotides apart form a ribonuclease III cleavage site in *Escherichia coli* ribosomal precursor RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 75:3593-7.

Zahn K, Inui M, Yukawa H. 2000. Divergent mechanisms of 5' 23S rRNA IVS processing in the *alpha*-proteobacteria. *Nucleic Acids Res*; 28:4623-33.

Zuo Y, Deutscher MP. 2001. Exoribonuclease superfamilies: structural analysis and phylogenetic distribution. *Nucleic Acids Res*; 29:1017-26.

7 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent	mol	Basiseinheit der Stoffmenge
&	und	mRNA	<i>messenger</i> RNA
°C	Grad Celsius	n	nano
μ	micro	ncRNA	<i>non-coding</i> RNA
Abb.	Abbildung	nt	Nukleotide
<i>ad</i>	auffüllen auf	OD	optische Dichte
APS	Ammoniumpersulfat	p	pico
ATP	Adenosintriphosphat	PAA	Polyacrylamid
bp	Basenpaare	PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
BSA	Bovines Serum Albumin	PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
bzw.	beziehungsweise	PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
ca.	circa	PNK	Polynukleotidkinase
cDNA	<i>complementary</i> DNA	PY	<i>peptone-yeast</i>
Ci	Curie	RÄ	Rhodobacter-Äpfelsäure
cm	Zentimeter	rel.	relativ/e
cpm	<i>counts per minute</i>	RNA	Ribonukleinsäure
CTP	Cytosintriphosphat	RNase	Ribonuklease
Da	Dalton	<i>rpm</i>	<i>revolution per minute</i>
dATP	Desoxyriboadenintriphosphat	rRNA	ribosomale RNA
dCTP	Desoxyribocytidintriphosphat	RT	Raumtemperatur
DEPC	Diethylpyrocarbonat	RT	reverse Transkriptase
DNA	Desoxyribonukleinsäure	s. u.	siehe unten
DNase	Desoxyribonuklease	SDS	Natriumdodecylsulfat
dNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat	sec	Sekunde
ds	doppelsträngig	sRNA	<i>small</i> RNA
DTT	Dithiothreitol	ss	einzelsträngig
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	St I	Standard I Medium
et al.	<i>et altera</i> (und andere)	TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
EtOH	Ethanol	TAP	Tobacco Acid Pyrophosphatase
f	femto	TBE	Tris-Borat- EDTA-Puffer
g	Gramm	TEMED	Tetramethylethylendiamin
<i>g</i>	<i>gravity</i>	Tris	Trishydroxymethylaminomethan
GMP	Guanosinmonophosphat	tRNA	<i>transfer</i> RNA
GTP	Guanosintriphosphat	u	<i>units</i>
h	Stunde	UMP	Uridinmonophosphat
His	Histidin	UTP	Uridintriphosphat
IPTG	Isopropylthiogalaktosid	UTR	<i>untranslated region</i>
kb	Kilobasen	UV	ultraviolett
kDa	Kilodalton	UZ	Ultrazentrifugation
l	Liter	V	Volt
LSD	Lachssperma DNA	v/v	Volumen/Volumenverhältnis
m	Meter/Milli	W	Watt
M	Molar	w/v	Gewichts/Volumenverhältnis
mA	Milliampere	WT	Wildtyp
MCS	<i>multiple cloning site</i>	x	mal
min	Minute	z. B.	zum Beispiel

8 Anhang

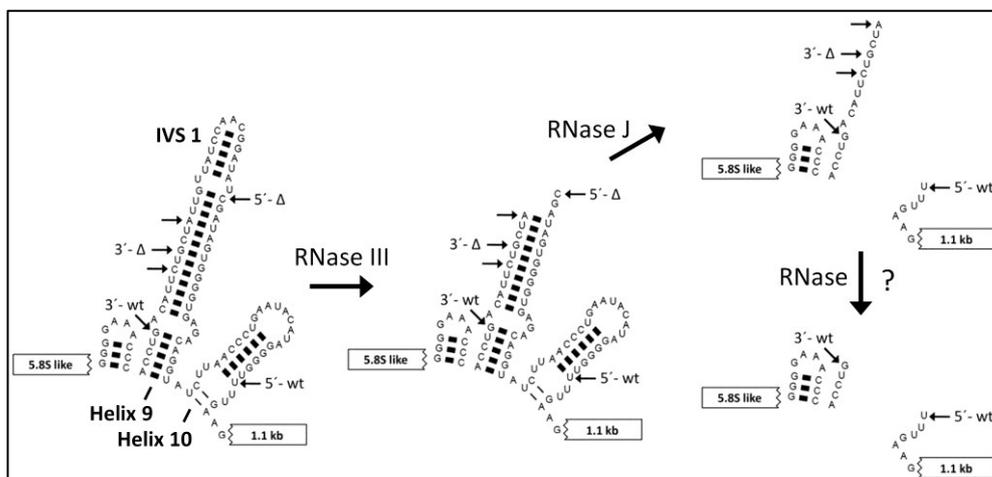


Abbildung 8-1: Modell der 5'- und 3'-Prozessierung in der *intervening sequence* 1 (IVS 1; Helices 9 und 10). Die kleinen Pfeile verweisen auf die detektierten 5'- und 3'-Enden im Wildtyp (wt) und der Mutante Δrnj (Δ). Die Separierung der 5.8Slike und 1.1kb rRNA wird durch Spaltungen der RNA-doppelstrangspezifischen RNase III in Helix 9 vollzogen. Die dabei freigelegten 5'- und 3'-Vorläufer-Enden sind teilweise basengepaart. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen vermuten, dass zunächst RNase J das 5'-Ende der 1.1kb rRNA prozessiert und dabei auch die Helix 10 abbaut. Die Prozessierung dieser außerhalb des Ribosoms liegenden Sequenzen stoppt aufgrund sterischer Hinderung der RNase J durch die ribosomale RNA-Protein-Oberfläche. Die 5'-Prozessierung scheint Voraussetzung für die finale Reifung des 3'-Endes der 5.8kb rRNA durch eine nicht identifizierte 3'-Exoribonuklease zu sein. Inwieweit es sich bei den alternativen 3'-Enden der 5.8Slike rRNA in der Mutante um alternative RNase III Schnittstellen oder ein technisches Artefakt des *RNase Protection* Assays handelt ist nicht klar. Das Struktur-Modell basiert auf der 23S rRNA Sekundärstruktur, abrufbar auf <http://www.rna.ccbb.utexas.edu/>.

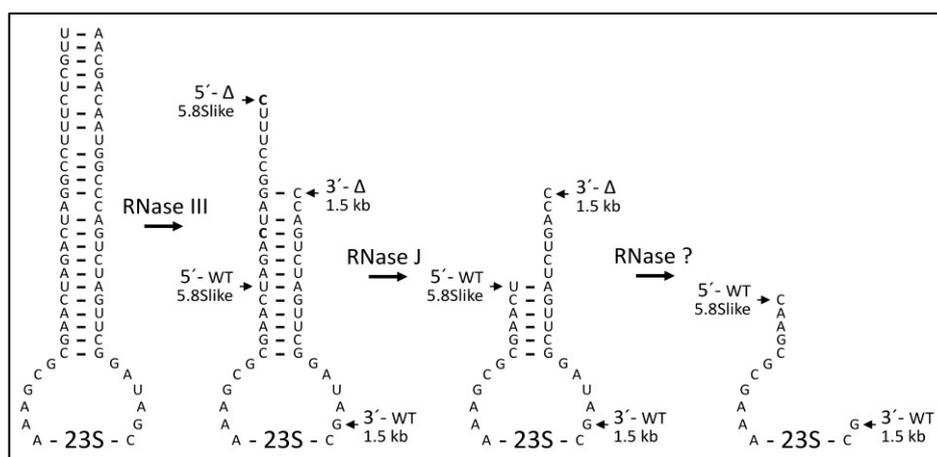


Abbildung 8-2: Modell der 5'- und 3'-Prozessierung am *processing stalk* der 23S rRNA von *R. sphaeroides*. Nach primärer Spaltung durch RNase III erfolgt zunächst die Reifung des freigelegten 5'-Endes der 5.8Slike RNA durch RNase J. Daraufhin wird das zuvor unzugängliche, weil basengepaarte Vorläufer 3'-Ende der 1.5kb rRNA durch eine bisher nicht identifizierte 3'-Exoribonuklease prozessiert. Das Struktur-Modell wurde manuell erstellt, basiert jedoch auf der 23S rRNA Sekundärstruktur, abrufbar auf <http://www.rna.ccbb.utexas.edu/>.

Protein-Standard	relatives Molekulargewicht	Elutions-Volumen (V_E)	V_E/V_0
Blue Dextran	2000 kDa	47,2 ml	V_0
Exosom	230 kDa	62,3 ml	1,32
IgG	144 kDa	69,5 ml	1,47
BSA	66,2 kDa	80 ml	1,69
Ovalbumin	45 kDa	85,1 ml	1,80
DNase I	31 kDa	94 ml	1,99
Lysozym	14,4 kDa	114 ml	2,42
RNase J	x kDa	67,5 ml	1,43

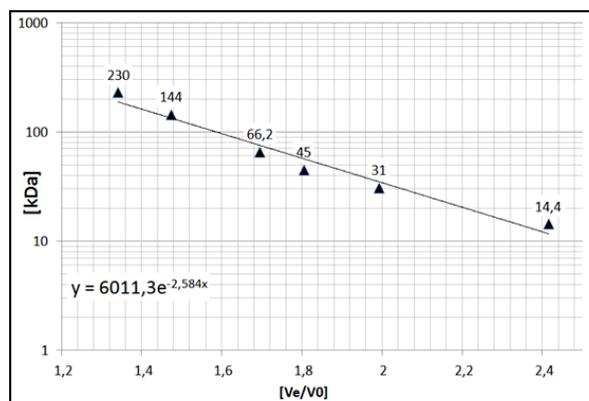


Abbildung 8-3: Kalibrierungslauf der Gefiltrationssäule Superdex 200(16/60) (Pharmacia).

Links: Tabellarische Zusammenfassung der verwendeten Standardproteine, ihres relativen Molekulargewichts und ihres Elutionsvolumens V_e (Äquilibriumspuffer: 1 x PBS; Flussrate 1 ml min⁻¹). Das Elutionsvolumen von BlueDextran entspricht dem Ausschlussvolumen V_0 der Superdex 200(16/60). Der Quotient aus V_e und V_0 (V_e/V_0) für die jeweiligen Proteine diente der Erstellung einer Eichgeraden.

Rechts: Halblogarithmische Auftragung des relativen Molekulargewichts von Standardproteinen ([kDa]) gegen den Quotienten aus jeweiligem Elutionsvolumen V_e und dem Ausschlussvolumen V_0 . Im Diagramm enthalten ist die Formel der Ausgleichsgerade. Unter Verwendung dieser Formel ergibt sich für die RNase J~His₆ mit einem Elutionsvolumen von 67,5 ml ein relatives Molekulargewicht von etwa 150 kDa.

pretRNA^{trp}

Das *pretRNA*^{trp} Transkript entspricht dem Vorläufermolekül der Tryptophan-tRNA aus *Halobacterium salinarum* NRC-1 (NCBI reference sequence: NC_002607.1). Ein PCR-Produkt, das die entsprechende Gen-Sequenz mit *upstream* gelegenen T₇ Promotor enthielt wurde freundlicherweise von Dr. Jasmin Weisel zur Verfügung gestellt (Weisel et al., 2010).

Sequenz:

```

GGGGCUGUGGCCAAGCCAGGCAUGGCGACUGACUCCAGAGGCCCGCGCCC    50
GGGACGACGCUCCAGACUGGUUAUACCGAGCGGCCGACUGAUCAUCGGUCC    100
GCUGUGACGACCCUCUGGAGUUCGAGGCGCACCGGAGAUUCAGUCGAU    150
CGGGGGUUCAAAUCCUCCGGCCCCA                                176

```

Abbildung 8-4: *pretRNA*^{trp}. Dieses Substrat wurde für die in **Abbildung 3-11: Zeitreihe mit *pre-tRNA*^{Trp}** gezeigten *in vitro* Degradationsassays mit RNase J~His₆ verwendet.

ZBP

ZBP ist ein 225 nt langes *run-off in vitro* Transkript des mit HindIII linearisierten Vektors pZBP (Fritsch et al., 1995).

Sequenz:

```
GGGCGAAUUCGAGCUCGGUACCCGUCACCACCAUCUUCUUCGCCACGCUC   50
GGCUUUUUGCUUAUCCUUUGGGGAGCCGCGAUGCAGGGCACGUGGAACCC   100
CCAAUUGAUCUCCAUCUUUCCGCCGCCGGUGGAAAAUGGUCUGAACGUGG   150
CAGCCUUGGACAAGGGCGGUCUUUGGCAGGUCAUCACCGUCUGCGCGACG   200
GGCGCCUUCUGCAGGCAUGCAAGCU                               225
```

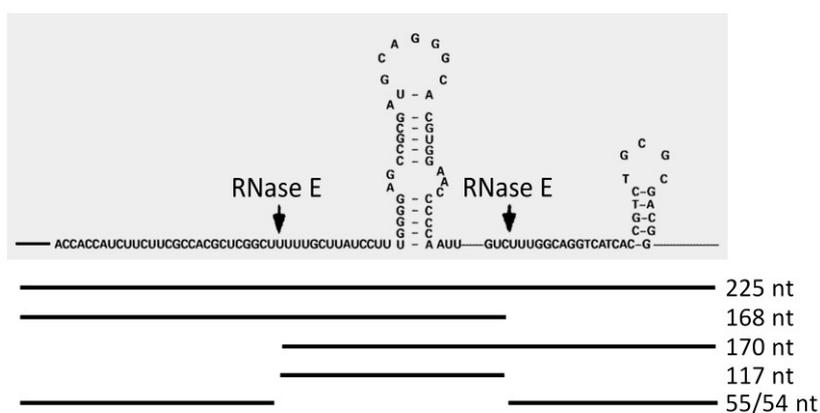


Abbildung 8-5: ZBP wurde während dieser Arbeit in den meisten Experimenten als artifizielles RNA-Substrat zur Untersuchung der ribonukleolytischen Aktivität der RNase J[~]His₆ verwendet. Unterhalb der 225 nt langen RNA-Sequenz dieses Substrates, ist eine vereinfachte strukturelle Darstellung des ZBP Substrates, mit zwei RNase E spezifischen Schnittstellen und *downstream* gelegenen *hairpin loops* gezeigt. Die resultierenden Fragmente der RNase E Spaltungen einschließlich deren Nukleotidlänge sind ebenfalls abgebildet (modifiziert nach Fritsch et al., 1995)

	GenBank	CP000143	CP000144	DQ232586	CP000145	CP000146	CP000147	DQ232587
	total	Chr. 1	Chr. 2	Plasmid A	Plasmid B	Plasmid C	Plasmid D	Plasmid E
WT	6774662	2758834	3984981	11087	259	4963	11874	2664
Δ rnj	4925991	2564672	2304896	21943	431	7240	23609	3201

Abbildung 8-6: RNASeq Transkriptom-Analyse von *R. sphaeroides* Wildtyp und Δ rnj.

Die Anzahl erfolgreich gemappter *reads* auf den beiden Chromosomen 1 & 2 sowie den 5 Plasmiden A - E von *R. sphaeroides*. Ein drastischer Unterschied zwischen Wildtyp (WT) und Mutante (Δ rnj) ist bei der Gesamtzahl der *reads* zu erkennen. Der Wildtyp RNASeq Datensatz enthält fast 2.000.000 *reads* mehr als der Δ rnj Datensatz. Dies ist auf eine äußerst starke Erfassung ribosomaler RNAs bei der Wildtyp RNASeq zurückzuführen. Das Chromosom 2 besitzt zwei ribosomale Operons, deswegen findet sich der quantitative Unterschied zwischen Wildtyp und Δ rnj *reads* in dieser Genom Einheit.

Veröffentlichung

Rische T. & Klug G. 2012. The ordered processing of intervening sequences in 23S rRNA of *Rhodobacter sphaeroides* requires RNase J. *RNA Biology*; 9.

Konferenz und Workshop Beiträge

Rische, T., Klug, G. Isolation and Characterisation of two potentially RNA-processing proteins from the model archaeon *Halobacterium sp.* NRC-1. Suzdal (2007), IRTG Workshop: "Protein-nucleic acid interactions" (Vortrag)

Rische, T., Klug, G. Characterisation of potentially RNA-processing proteins by RNA degradation assays and Primer Extension analysis. Moskau (2008), IRTG Offspring-Meeting (Vortrag)

Rische, T., Wagner, S., Klug, G. Isolation and Characterisation of potentially RNA-processing proteins from the model archaeon *Halobacterium sp.* NRC-1. Rauschholzhausen (2008), IRTG Spring-Meeting and Workshop "Protein-protein interactions" (Poster)

Rische, T., Klug, G. *In vitro* characteristics with RNase J from *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. Vilnius (2010), IRTG workshop: "Enzymes and enzyme complexes acting nucleic acids" (Vortrag)

Rische, T., Klug, G. Characterisation of potentially RNA-processing proteins by RNA degradation assays and Primer Extension analysis. Moskau (2010), IRTG: Offspring-Meeting (Vortrag)

Rische, T., Klug, G. Activity and function of RNase J from *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. Gießen (2010) IRTG - DFG *on-site evaluation* (Poster)

Rische, T., Klug, G. *In vitro* characteristics with RNase J from *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. (2010) Hannover; Annual Conference of the Association for General and Applied Microbiology (VAAM) (Poster)