

# Untersuchungen zu Funktion und Struktur des Regulatorproteins Hfq in *Synechocystis* sp. PCC 6803

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Biologe Dennis Dienst

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Christoph Marksches

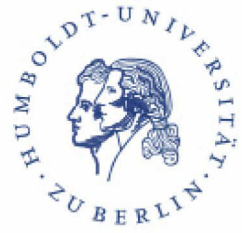
Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. Andreas Herrmann

Gutachter/innen:   1. Prof. Dr. Wolfgang Lockau  
                          2. Prof. Dr. Annegret Wilde  
                          3. Prof. Dr. Gabriele Klug

Tag der mündlichen Prüfung: 16.07.2010

HUMBOLDT-UNIVERSITÄT ZU BERLIN



There's smoke in my iris, but I painted a sunny day on the insides of my eyelids

Aesop Rock

## Zusammenfassung

Das phylogenetisch weit verbreitete RNA-bindende Protein Hfq ist an einer Vielzahl von Prozessen innerhalb des bakteriellen RNA-Metabolismus, insbesondere im Rahmen der posttranskriptionellen Genregulation durch kleine RNAs (sRNAs) beteiligt. Hfq-Proteine zählen zu der Familie der Sm- und Lsm-Proteine und zeichnen sich strukturell durch die funktionelle Ausbildung ringförmiger Homohexamere aus. Cyanobakterielle Orthologe zeigen gegenüber den gut untersuchten Hfq-Proteinen aus *E. coli* und anderen Proteobakterien eine schwache Sequenzkonservierung und bieten auch daher einen interessanten Ansatzpunkt für die Untersuchung riboregulatorischer Prozesse in diesen Organismen.

In der vorliegenden Arbeit werden einleitende Untersuchungen zu Funktion und Struktur des orthologen Hfq-Proteins aus dem einzelligen Modell-Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 vorgestellt. Die Inaktivierung des *hfq*-Gens (*ssr3341*) führte in diesem Organismus zum Verlust der phototaktischen Motilität. Mithilfe elektronenmikroskopischer Analysen konnte dieser Phänotyp auf das Fehlen von Typ IV Pili zurückgeführt werden. *Microarray*-Analysen wiesen in der  $\Delta hfq$ -Mutante für 31 Gene eine veränderte, in den meisten Fällen reduzierte Transkriptakkumulation nach. Am stärksten betroffenen waren Gene bzw. Operone, welche dem Regulon des cAMP-Rezeptorproteins Sycr1 zugeordnet werden und zum Teil nachweislich an der Motilität von *Synechocystis*-Zellen beteiligt sind. Weitere vergleichende Expressionsanalysen identifizierten mithilfe eines speziellen *Tiling-arrays* ferner zwei „intergenisch“ kodierte potenzielle sRNAs, Hpr1 und Hpr3, deren Transkriptmengen signifikant von der *hfq*-Inaktivierung beeinflusst werden.

Kristallstrukturdaten deuten zusammen mit den Ergebnissen aus *in vitro*-Bindungsstudien und genetischen Komplementierungsexperimenten - trotz starker Konservierung zentraler struktureller Charakteristika - neuartige biochemische und funktionelle Eigenschaften des Hfq-Proteins aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 an. Funktionelle Implikationen werden im strukturellen und phylogenetischen Kontext diskutiert.

## Abstract

The phylogenetically conserved RNA binding protein Hfq is a key player in bacterial RNA metabolism, particularly with regard to sRNA-mediated post-transcriptional gene regulation. Hfq proteins belong to the well-conserved family of Sm- and Lsm proteins and are characterized by the formation of homo-hexameric ring-shaped structures. In comparison with well-studied Hfq proteins from *E.coli* and other proteobacteria the cyanobacterial orthologues show rather poor sequence conservation. Therefore, they provide a quite interesting background for analyzing riboregulatory processes in these organisms.

In this work, the orthologous Hfq protein from the unicellular model cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 has been initially characterized on the functional and structural level. Insertional inactivation of the *hfq* gene (*ssr3341*) led to a non-phototactic phenotype that was due to the loss of type IV pili on the cell surface, as demonstrated by electron microscopy. Microarray analyses revealed a set of 31 genes with altered transcript levels in the knock-out mutant. Among the most strongly affected genes, there were members of two operons that had previously been shown to be involved in motility, controlled by the cAMP receptor protein Sycr1. Further comparative transcriptional analyses using custom *tiling arrays* revealed two putative sRNAs (Hpr1 and Hpr3) from intergenic regions, whose transcript levels appeared to be significantly affected by *hfq*-inactivation.

Structural analyses, genetic complementation as well as RNA-binding studies *in vitro* indicate that the Hfq orthologue from *Synechocystis* sp. PCC 6803 exhibits novel biochemical and functional properties, though retaining general structural features of its proteobacterial counterparts. Functional implications are discussed with regard to structural und phylogenetic considerations.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Überblick .....	1
1.2 Hfq – vom Wirtsfaktor zum pleiotrop wirkenden Regulatorprotein .....	2
1.3 Sm- und Lsm-Proteine.....	4
1.4 Hfq ist ein Mitglied der Sm/Lsm-Proteinfamilie.....	7
1.5 Hfq - ein zentraler Akteur in der post-transkriptionellen Genregulation ....	9
1.5.1 Kleine regulatorische RNAs in Bakterien .....	9
1.5.1.1 <i>Cis</i> -kodierte regulatorische RNAs .....	10
1.5.1.2 <i>Trans</i> -kodierte regulatorische RNAs (sRNAs).....	12
1.5.2 Hfq vermittelt die post-transkriptionelle Regulation durch sRNAs	14
1.5.3 Weitere Funktionen von Hfq im RNA-Metabolismus .....	17
1.5.3.1 Interaktionen mit weiteren Proteinen des RNA-Metabolismus..	18
1.5.3.2 Hfq beeinflusst die Polyadenylierung von mRNA .....	20
1.6 Physiologische Phänotypen von <i>hfq</i> -Inaktivierungsmutanten.....	21
1.7 Riboregulation in Cyanobakterien.....	23
1.8 Hfq in Cyanobakterien .....	26
1.9 Phototaktische Motilität in Cyanobakterien .....	29
1.10 Zielsetzung dieser Arbeit.....	31
<b>2 Ergebnisse .....</b>	<b>32</b>
2.1 Funktionelle Analyse des <i>hfq</i> -Orthologs in <i>Synechocystis</i> .....	32
2.1.1 Konstruktion einer $\Delta hfq$ -Mutante.....	32
2.1.2 Physiologische Charakterisierung der $\Delta hfq$ -Mutante von <i>Synechocystis</i>	34
2.1.2.1 Hfq hat keinen Einfluss auf das Wachstum unter diversen .....	
Lichtbedingungen .....	34
2.1.2.2 Wachstum unter Nährstoffmangel und abiotischen	
Stressbedingungen – erhöhte Thermotoleranz von $\Delta hfq$ .....	37
2.1.2.3 Hfq ist essenziell für die phototaktische Motilität von <i>Synechocystis</i>	
.....	42
2.1.2.4 Transmissionselektronenmikroskopische (TEM) Analysen .....	43
2.1.2.5 Expressionsanalysen .....	44
2.1.2.5.1 Northern Blot-Analysen ausgewählter mRNAs.....	44
2.1.2.5.2 Vergleichende <i>Microarray</i> -Analyse von WT und $\Delta hfq$ .....	46
2.1.2.5.3 Qualitätskontrolle der <i>Microarray</i> -Daten .....	47
2.1.2.5.4 Identifizierung differenziell akkumulierender Transkripte.....	49
2.1.2.5.5 Verifizierung der <i>Microarray</i> -Daten für ausgewählte Gene .....	53

2.1.2.6	Genetische Komplementierung des nicht-motilen Phänotyps ....	55
2.1.2.6.1	Extrachromosomale, homologe Komplementierung .....	55
2.1.2.6.2	Heterologe Komplementierung von $\Delta hfq$ mit <i>hfq</i> aus <i>E. coli</i> .....	59
2.1.2.6.3	cAMP und Sycr1 .....	60
2.2	Strukturanalysen eines rekombinanten Hfq-Proteins aus <i>Synechocystis</i> .....	63
2.2.1	Heterologe Expression und Reinigung von Syn-Hfq .....	63
2.2.2	Röntgenstrukturanalyse von Hfq aus <i>Synechocystis</i> .....	66
2.2.2.1	Struktur des Syn-Hfq-Monomers .....	66
2.2.2.2	Quartärstruktur .....	68
2.3	Identifikation und Untersuchungen Hfq-abhängiger sRNAs in <i>Synechocystis</i>	70
2.3.1	<i>In vitro</i> Bindungsstudien zeigen keine eindeutige Bindung bekannter sRNAs an Syn-Hfq .....	72
2.3.2	Analysen der Transkriptionsakkumulationen cyanobakterieller sRNAs in Abhängigkeit von Syn-Hfq .....	77
2.3.3	<i>Tiling-array</i> -Analyse zur Identifizierung „intergenisch“ kodierter sRNAs	79
2.3.3.1	Identifizierung differenziell akkumulierender Transkripte .....	81
2.3.3.2	Identifizierung von drei Hfq regulierten putativen sRNAs (Hpr)	84
2.3.3.3	Northern Blot-Nachweis von Hpr1-3 .....	87
2.3.3.4	Identifizierung der Transkriptenden durch RACE-Experimente	90
2.3.3.5	Hpr3 akkumuliert unter Salz- und Hitzestress .....	93
2.3.3.6	Hpr3 interagiert <i>in vitro</i> schwach mit Syn-Hfq .....	96
<b>3</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>98</b>
3.1	Hfq ist essenziell für die Motilität von <i>Synechocystis</i> .....	98
3.2	Hfq steuert in <i>Synechocystis</i> die Expression von Motilitäts-relevanten Genen	102
3.3	Hfq reguliert Komponenten eines putativen Pilus-Assemblierungs-Systems - funktionelle Betrachtung des Hfq-Regulons .....	103
3.4	Eine Verbindung zwischen Hfq und dem cAMP-Regulon in <i>Synechocystis</i>	107
3.5	Hpr1 und Hpr3 – zwei putative Hfq-abhängige sRNAs in <i>Synechocystis</i> ..	112
3.6	Reguliert Hfq die spezifische Stress-Antwort? .....	117
3.7	Struktur- und <i>in vitro</i> -Funktionsanalyse von Syn-Hfq .....	119
3.8	Welche funktionelle Rolle spielt Hfq in <i>Synechocystis</i> ? .....	124
<b>4</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>130</b>
4.1	Material .....	130
4.1.1	Chemikalien .....	130
4.1.2	Größenstandards .....	133
4.1.3	Antikörper .....	134

4.1.4	Plasmide.....	134
4.1.5	Enzyme .....	135
4.1.6	Synthetische Oligonukleotide.....	136
4.1.7	Sonstige Materialien .....	140
4.1.8	Technische Laborgeräte.....	141
4.1.9	Software/ Datenbanken.....	142
4.1.10	Medien, Stammlösungen und Puffer .....	144
4.1.11	Mikroorganismen.....	144
4.2	Methoden.....	146
4.2.1	Allgemeine und physiologische Methoden .....	146
4.2.1.1	Kultivierung von <i>E. coli</i> .....	146
4.2.1.2	Kultivierung von <i>Synechocystis</i> .....	146
4.2.1.3	Bestimmung der Zelldichte in Flüssigkulturen.....	148
4.2.1.4	Absorptionsspektren ganzer Zellen von <i>Synechocystis</i> .....	148
4.2.1.5	Bestimmung des Phycocyanin/Chlorophyll a-Verhältnisses .....	148
4.2.1.6	Wachstumsversuche in Zellkulturplatten.....	148
4.2.1.7	Phototaxis-Test .....	149
4.2.2	Molekularbiologische Methoden.....	149
4.2.2.1	DNA-Amplifizierung mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) nach Mullis <i>et al.</i> (1986).....	149
4.2.2.2	Reinigung von PCR-Produkten.....	150
4.2.2.3	DNA-Spaltung durch Restriktionsendonukleasen .....	150
4.2.2.4	Erzeugung von 3'-A-Einzelstrangüberhängen .....	150
4.2.2.5	Ligation von DNA-Molekülen.....	150
4.2.2.6	DNA-Sequenzierung.....	151
4.2.2.7	Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	151
4.2.2.8	Isolation der Gesamt-DNA aus <i>Synechocystis</i> nach Franche & Damerval (1988).....	151
4.2.2.9	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	152
4.2.2.10	Präparation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	152
4.2.2.11	Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA nach Hanahan (1983)	153
4.2.2.12	Transformation von <i>Synechocystis</i> nach Grigorieva & Shestakov (1982) .....	154
4.2.2.13	Konjugation von <i>Synechocystis</i> .....	154
4.2.2.14	Nicht-denaturierende Agarose-Gelelektrophorese und DNA-Extraktion.....	155
4.2.2.15	Southern Blot-Analyse.....	155

4.2.2.16	Konstruktion des Plasmids pGEX-Hfq zur heterologen Expression von GST-Hfq in <i>E.coli</i> .....	157
4.2.2.17	Konstruktion der Plasmide pVZ-Phfq und pVZ-PhfqS .....	157
4.2.2.18	Konstruktion des Plasmids pVZ-PpetJ-col-hfq .....	158
4.2.2.19	Konstruktion des Plasmids pVZ-PpetJ-sycrp1 .....	158
4.2.3	Methoden zur RNA-Analytik .....	159
4.2.3.1	Isolation von Gesamt-RNA aus <i>Synechocystis</i> .....	159
4.2.3.2	Denaturierende elektrophoretische Auftrennung von RNA in Formaldehyd-Agarosegelen und Kapillar- <i>Blotting</i> .....	160
4.2.3.3	Elektrophoretische Auftrennung von RNA in denaturierenden Harnstoff-Polyacrylamidgelen und Elektro- <i>Blotting</i> .....	160
4.2.3.4	Herstellung radioaktiv markierter Sonden für Northern- und Southern Blot-Hybridisierungen.....	161
4.2.3.5	Northern Blot-Hybridisierungen.....	162
4.2.3.6	<i>In vitro</i> -Transkription, radioaktive Markierung der 5'-Enden und Reinigung von RNA .....	163
4.2.3.7	5'-RACE ( <i>rapid amplification of cDNA ends</i> ) .....	164
4.2.4	Biochemische Methoden .....	165
4.2.4.1	Zellernte und -aufschluss von <i>Synechocystis</i> .....	165
4.2.4.2	Heterologe Expression und Reinigung eines GST-Hfq-Fusionsproteins	165
4.2.4.3	Konzentrationsbestimmung von Proteinen .....	166
4.2.4.4	Größenausschlusschromatographie/ Gelfiltration.....	167
4.2.4.5	DOC/TCA-Fällung von Proteinen .....	167
4.2.4.6	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	167
4.2.4.7	Immunoblot-Analyse .....	169
4.2.4.8	EMSA ( <i>electrophoretic mobility shift assay</i> ) .....	170
<b>5</b>	<b>Literatur</b> .....	<b>171</b>

---

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>195</b>
<b>Publikationsliste</b> .....	<b>201</b>
<b>Selbstständigkeitserklärung</b> .....	<b>202</b>
<b>Danksagung</b> .....	<b>203</b>
<b>Lebenslauf</b> .....	<b>204</b>

---



## 1 Einleitung

### 1.1 Überblick

Prokaryotische Organismen besiedeln heute nahezu alle Lebensräume auf der Erde und haben im Laufe der Evolution verschiedene Fähigkeiten entwickelt, sich morphologisch und physiologisch an die unterschiedlichsten Lebensbedingungen anzupassen. Besonders die physiologische Adaptation an schwankende Umweltbedingungen erfordert präzise und dynamische Mechanismen zur gerichteten Modulation der Genexpression. Die Kontrolle der transkriptionellen Aktivität galt lange Zeit als das Hauptinstrument zur Regulation der Genexpression in Bakterien. Dieses Paradigma wurde innerhalb der letzten Jahre durch die Entdeckung zahlreicher post-transkriptioneller Regulationsmechanismen geschwächt. Besondere Bedeutung kommt dabei kleinen nicht-kodierenden RNA-Molekülen zu, welche durch ihren Einfluss auf die Funktion und Stabilität bestimmter mRNAs u.a. in ein Wechselspiel mit Komponenten der Transkriptionskontrolle treten und auf diese Weise das regulatorische Netzwerk der bakteriellen Genexpression verdichten. In Prokaryoten wie in Eukaryoten werden post-transkriptionelle Prozesse zumeist durch RNA-bindende Proteine unterstützt. Diese Proteine erleichtern z.B. die Interaktion zweier RNA-Moleküle und/oder lösen inhibitorische Sekundärstrukturen auf. Zu diesen RNA-Chaperonen zählen die Mitglieder der Sm- und Sm-like Proteinfamilie, deren bakterieller Vertreter Hfq aufgrund seines weiten Funktionsspektrums zuletzt zunehmend in den Fokus der molekular- und mikrobiologischen Forschung gerückt ist.

Cyanobakterien besitzen als photoautotrophe Organismen und in ihrer ökologischen Vielfalt ein hohes Potenzial, sich physiologisch an plötzliche Änderungen der herrschenden Umweltbedingungen anzupassen. Eine besondere Herausforderung stellt die Optimierung der Licht- und CO<sub>2</sub>-Ausbeute für die photosynthetische Energie- und Nährstoffgewinnung dar. Vor diesem Hintergrund stellte sich angesichts der wachsenden Bedeutung riboregulatorischer Prozesse in der bakteriellen Genexpression die spannende Frage, inwieweit derartige Mechanismen in Cyanobakterien ausgeprägt sind. Über diesen Aspekt war bislang noch wenig bekannt. Für das Projekt, *Synechocystis* sp. PCC 6803 (von hier an *Synechocystis*) als einen Modellorganismus für die cyanobakterielle RNA-Forschung zu etablieren, galt die einleitende Analyse der Funktion und Struktur des RNA-Chaperons Hfq in diesem Organismus als interessanter Ansatzpunkt.

## 1.2 Hfq – vom Wirtsfaktor zum pleiotrop wirkenden Regulatorprotein

Die Namensgebung für das phylogenetisch konservierte RNA-bindende Protein Hfq (*host factor Q*) geht auf dessen anfängliche Identifizierung als wichtiger Faktor für die Replikation des Bakteriophagen Q<sub>β</sub> in *Escherichia coli* (von hier an *E. coli*) zurück (Eikhom *et al.*, 1968; Franze de Fernandez *et al.*, 1968; Franze de Fernandez *et al.*, 1972; Shapiro *et al.*, 1968). Im Rahmen dieser ersten Arbeiten wurde Hfq (damals HF-I, *host factor I*) als Protein mit einer apparenten Molekülmasse von 12,5 kDa charakterisiert, welches in der aktiven Form *in vitro* offenbar als Hexamer mit einer Molekülmasse von circa 75 kDa vorliegt. Es konnte damals bereits dessen spezifische Bindung an einzelsträngige RNA-, nicht jedoch doppelsträngige RNA- oder DNA-Moleküle, nachgewiesen werden (Franze de Fernandez *et al.*, 1972). Hfq galt dabei als essenzielles, positives Kontrollelement für den ersten Schritt der Phagenreplikation, d.h. die Synthese des Minus-Strangs der genomischen Phagen-RNA durch die Q<sub>β</sub>-RNA-Replikase (Shapiro *et al.*, 1968). Sehr lange Zeit war dies die einzig bekannte Funktion von Hfq und folglich auch zentraler Gegenstand der Forschungen an diesem Protein. So berichteten schließlich Barrera und Mitarbeiter (1993) viel später davon, dass es in diesem Zusammenhang die Rolle von Hfq sein könnte, Konformationsänderungen in der Q<sub>β</sub>-RNA zu induzieren, um auf diese Weise die Replikationsinitiation zu stimulieren.

Ebenfalls Mitte der 1990er Jahre erschienen die ersten Hinweise auf eine deutlich komplexere Funktion von Hfq in Bakterien. Nachdem (1991) das *hfq*-Gen bereits kloniert und dessen physikalische Lokalisation auf dem Chromosom von *E. coli* ermittelt hatten, wurde später durch dieselbe Arbeitsgruppe gezeigt, dass Hfq in Mengen von 30000 bis 60000 Molekülen pro Zelle, mehrheitlich mit Ribosomen assoziiert vorliegt (Kajitani *et al.*, 1994). Zusammen mit der Beobachtung, dass es eine Abhängigkeit der zellulären Akkumulation des Hfq-Proteins von der Wachstumsphase gibt, waren dies die ersten deutlichen experimentellen Hinweise auf eine wichtige Funktion von Hfq in nicht-infizierten Zellen von *E. coli*. Zeitgleich stießen Kaminski und Mitarbeiter (1994) im Rahmen von Mutantanalysen des stickstofffixierenden Knöllchenbakteriums *Azorhizobium caulinodans* auf ein Gen (*nrfA*), dessen Inaktivierung zu einem Expressionsdefekt des zentralen Transkriptionsaktivators NifA führte und welches hinsichtlich der abgeleiteten Aminosäuresequenz signifikante Ähnlichkeit zu Hfq zeigte. Tatsächlich ließ sich der Phänotyp der entsprechenden *nifA*-defizienten Mutante durch *hfq* aus *E. coli* genetisch komplementieren, sodass erstmals ein nicht-

# 1 EINLEITUNG

---

enterobakterielles *hfq*-Ortholog sowie eine konkrete physiologische Funktion in nicht-infizierten Bakterien beschrieben werden konnte. In demselben Jahr wurde schließlich der Phänotyp der ersten *hfq*-Insertionsmutante von *E. coli* beschrieben (Tsui *et al.*, 1994). Die genetische Inaktivierung hatte dort schwerwiegende pleiotrope Effekte auf die generelle Zellphysiologie, die Sensitivität gegenüber diversen Stressbedingungen (z.B. UV-Licht) und auch auf das *supercoiling* der Plasmide zur Folge. Später wurde zudem ein wichtiger Einfluss von Hfq auf die Glykogensynthese sowie auf die Toleranz gegenüber Nährstoffmangel und weiteren Stressbedingungen (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Hitzestress) beschrieben (Muffler *et al.*, 1997). Es zeigte sich, dass dieser Phänotyp u.a. auf einen signifikanten Defekt in der Translation des Sigmafaktors RpoS ( $\sigma^S$ ), dem Hauptregulator der allgemeinen Stressantwort in *E. coli* (z.B. Hengge-Aronis, 2002), zurückzuführen war (Muffler *et al.*, 1996; Muffler *et al.*, 1997). Ähnliche Resultate wurden zeitgleich bei entsprechenden Untersuchungen in *Salmonella typhimurium* (von hier an *Salmonella*) erzielt (Brown & Elliott, 1996). Darauf folgende Arbeiten konnten in *E. coli* einen  $\sigma^S$ -unabhängigen, destabilisierenden Einfluss von Hfq auf *ompA*-mRNA, welche das Hauptprotein der äußeren Membran (*outer membrane protein*, Omp) kodiert, nachweisen. Dieser Effekt war abhängig von der Wachstumsphase und basierte auf der Bindung des Proteins an den untranslatierten Bereich am 5'-Ende (von hier an 5'-UTR; *untranslated region*) der *ompA*-mRNA (Vytvytska *et al.*, 1998). Es wurde zunächst ein Modell diskutiert, nach welchem die 30S-Ribosomen kompetitiv durch Hfq an der Bindung an *ompA* gehindert werden und der resultierende Ausfall der Translation mit dem ribonukleolytischen Verdau durch Ribonuklease E (RNase E) einhergeht (Vytvytska *et al.*, 2000). Insbesondere *in vitro*-Studien zur Rolle von Hfq bei der Replikation des Bakteriophagen Q $\beta$  (Schuppli *et al.*, 1997) sowie weitere Untersuchungen zur Stabilität von verschiedenen mRNAs in einer  $\Delta hfq$ -Mutante (Tsui *et al.*, 1997) unterstützten die Idee, dass Hfq in *E. coli* die Rolle eines RNA-Chaperons wahrnehmen könnte, welches die Funktion spezifischer (m)RNA-Moleküle modifiziert. Die Entdeckung, dass die durch (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-) stressinduzierte regulatorische, nicht-kodierende RNA, OxyS (siehe Abschnitt 1.5.1.2) (Altuvia *et al.*, 1997), in Abhängigkeit von der Bindung an Hfq die Translation von *rpoS* reprimiert, konnte diesen Aspekt weiter bekräftigen (Zhang *et al.*, 1998). Diese Publikation war ein wichtiger Meilenstein in der Hfq- und sRNA-Forschung. Mittlerweile ist die Rolle des zentralen Faktors bei der post-transkriptionellen Regulation durch sRNAs die am besten untersuchte Funktion des RNA-Chaperons Hfq in Bakterien (Chao & Vogel, 2010).

## 1.3 Sm- und Lsm-Proteine

Die bakteriellen Hfq-Proteine gehören zu der phylogenetisch konservierten, jedoch funktionell facettenreichen Familie der Sm- und Sm-like (Lsm)-Proteine (Pfam-Eintrag: PF01423), die in allen drei Domänen des Lebens vertreten sind (Scofield & Lynch, 2008). Sie sind essenzielle Komponenten von Ribonukleoproteinkomplexen (RNP) und beteiligen sich an zahlreichen Vorgängen des RNA-Metabolismus einschließlich der RNA-Prozessierung, der mRNA-Degradation und dem prä-mRNA-Spleißen.

Charakteristisch für die eukaryotischen Varianten dieser Familie ist deren heteromorphe Assemblierung zu ringförmigen Oligomeren sowie die spezifische Bindung an einzelsträngige, Uridin-reiche (U-reiche) Sequenzmotive definierter RNA-Moleküle. Es handelt sich bei den prototypischen Sm-Proteinen um sieben individuelle Proteine (SmB/B', D1, D2, D3, E, F und G), welche zu Hetero-Heptameren assemblieren und zusammen mit unterschiedlichen snRNAs (*small nucleolar RNA*) das stabile Grundgerüst der snRNP (small nuclear Ribonucleoprotein Particle) - den Untereinheiten der Spleißosomen - bilden (Übersicht in Beggs, 2005; Will & Lührmann, 2001). Daneben wurden inzwischen 16 weitere Lsm-Varianten (Lsm1-16) in Eukaryoten identifiziert. Die individuellen Lsm-Proteine assemblieren miteinander in unterschiedlichen Kombinationen zu ebenfalls ringförmigen Hetero-Heptameren (bzw. in Einzelfällen zu apparenten Hetero-Hexameren), die in Abhängigkeit von der individuellen Zusammensetzung der Monomere sowie der subzellulären Lokalisation diverse Funktionen im RNA-Metabolismus wahrnehmen (Beggs, 2005; Tharun, 2009).

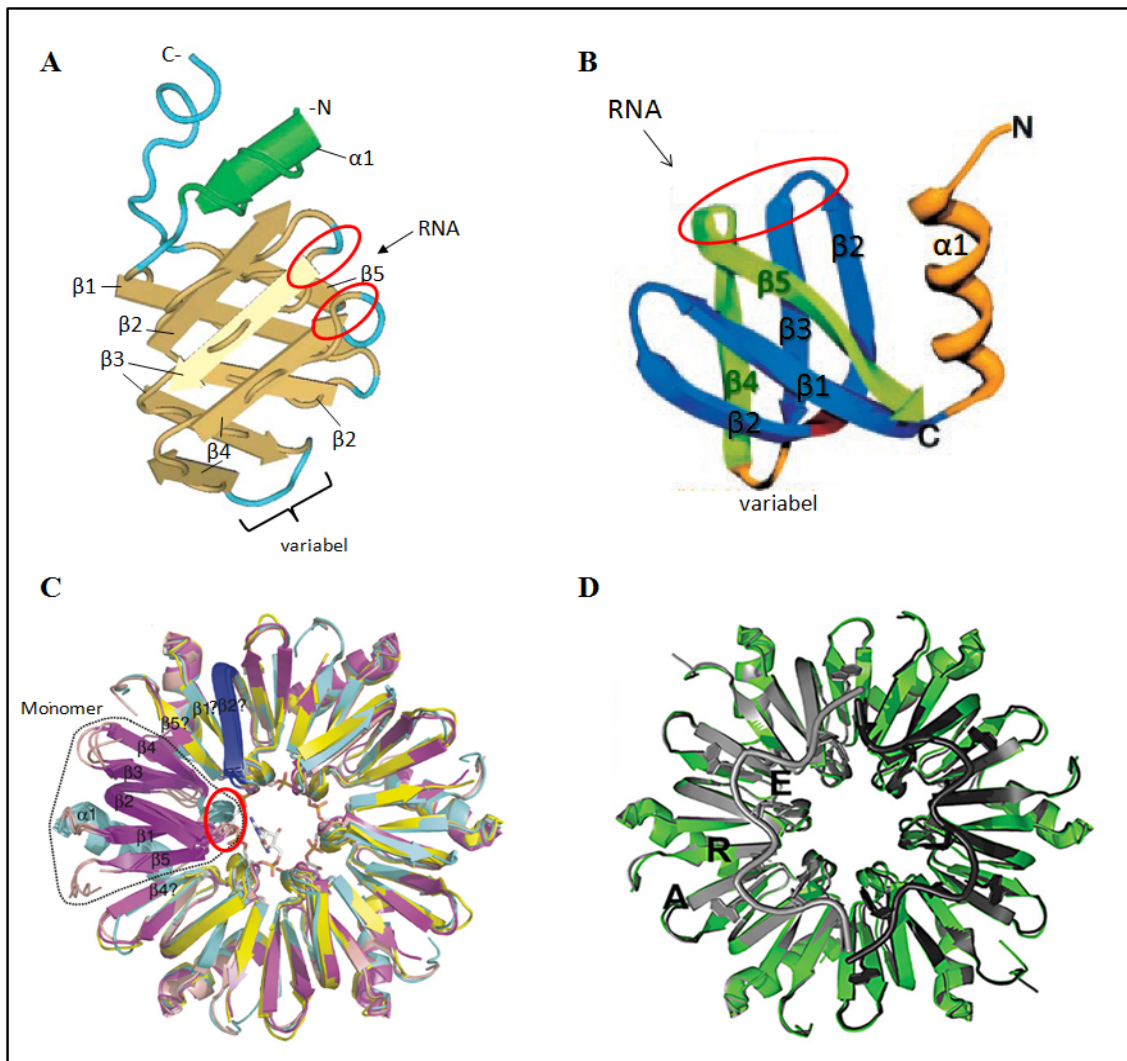
Genomische Untersuchungen einiger Vertreter der Archaea ergaben, dass in diesen Organismen jeweils ein bis drei Lsm-Proteine kodiert werden. Diese prokaryotischen Varianten assemblieren zu homo-hexameren oder homo-heptameren Ringstrukturen (Collins *et al.*, 2001; Khusial *et al.*, 2005; Kilic *et al.*, 2005; Mura *et al.*, 2003; Nielsen *et al.*, 2007; Törö *et al.*, 2001; Törö *et al.*, 2002), zeigen jedoch hinsichtlich der RNA-Bindung den eukaryotischen Lsm-Proteinen verwandte Eigenschaften. Funktionell sind die archaealen Proteine bisher noch wenig charakterisiert. Die für die Proteine AF-Sm1 und AF-Sm2 aus dem hyperthermophilen Archaeon *Archaeoglobus fulgidus* beschriebenen Bindungen an das ubiquitäre Ribozym RNase P liefern dagegen Hinweise auf eine Rolle in der Prozessierung von rRNA- und tRNA-Vorläufern (Törö *et al.*, 2001).

## 1 EINLEITUNG

---

Alle Mitglieder der Sm- und Lsm-Protein-Familie sind durch das evolutionär hoch konservierte Sm-Faltungsmotiv gekennzeichnet, welches sich mit Blick auf die Aminosäuresequenz aus zwei Abschnitten (Sm1 und Sm2) zusammensetzt, die durch eine variable Region voneinander getrennt sind (Hermann *et al.*, 1995; Séraphin, 1995). Die Struktur des Sm-Faltungsmotivs selbst besteht aus fünf anti-parallelen  $\beta$ -Faltblättern ( $\beta$ 1-5) und einer  $\alpha$ -Helix ( $\alpha$ 1) am Amino-Terminus. Der Sm1-Abschnitt des Motivs umfasst dabei die Helix  $\alpha$ 1 sowie die Faltblätter  $\beta$ 1-3, während dem Bereich Sm2 die Stränge  $\beta$ 4 und  $\beta$ 5 angehören. Eine wesentliche Eigenschaft der Sm-Faltung ist die schleifen- oder gelenkartige helikale „Querverbindung“ zwischen den entgegengesetzt peripher gelegenen Strängen  $\beta$ 4 und  $\beta$ 5, wodurch sich die charakteristische  $\beta$ -barrel-Struktur des Monomers schließt (Abbildung 1A). Die Stränge  $\beta$ 4 und  $\beta$ 5 räumlich benachbarter Monomere interagieren zudem über mehrere Wasserstoffbrücken miteinander und sind daher elementar an den Monomer-Monomer-Kontakten beteiligt, auf deren Basis die für sämtliche Vertreter der Sm- und Lsm-Proteinfamilie charakteristischen ringförmigen Oligomere assemblieren (Übersicht in Khusial *et al.*, 2005). Die Schleifen zwischen den Strängen  $\beta$ 2 und  $\beta$ 3 sowie zwischen  $\beta$ 4 und  $\beta$ 5 ragen dabei in die Pore der Ringstruktur hinein und interagieren dort mit RNA-Molekülen (Abbildung 1C). Die Monomere der Sm-Proteine haben relativ geringe Molekülmassen von ~9-29 kDa und verfügen gewöhnlich über keine weiteren funktionellen oder strukturellen Domänen. Seltener beschriebene größere Varianten der Lsm-Proteine besitzen längere Fortsätze am Carboxy-Terminus mit zusätzlichen RNA-Bindungs- oder Methyltransferase-Domänen (Albrecht & Lengauer, 2004).

# 1 EINLEITUNG



**Abbildung 1: Struktur des Sm-Faltungsmotiv und des Hfq-Hexamers.** (A) Kristallstruktur der humanen SmD1-Untereinheit (Monomer; PDB-Eintrag: 1B34). Die fünf  $\beta$ -Stränge und die amino-terminale  $\alpha$ -Helix ( $\alpha 1$ ) sind gekennzeichnet. Die Schleifen der RNA-Bindungstasche zwischen  $\beta 2$  und  $\beta 3$  bzw.  $\beta 4$  und  $\beta 5$  sind rot umrandet (modifiziert nach Khusial *et al.*, 2005). (B) Bänderdiagramm einer monomeren Sau-Hfq-Untereinheit (PDB-Eintrag: 1KQ1). Die Motive Sm1 und 'Sm2' (mit der konservierten YKHAI-Signatur) sind in blau bzw. grün hervorgehoben. Die Helix  $\alpha 1$  sowie die variable Region zwischen  $\beta 3$  und  $\beta 4$  sind in orange dargestellt. Die Rote Umrandung kennzeichnet den RNA-bindenden Bereich (modifiziert nach Schumacher *et al.*, 2002). (C) Überlagerung der Kristallstrukturen von Sau-Hfq (mit und ohne gebundener RNA [AU<sub>5</sub>G]), Pae-Hfq (PDB-Eintrag: 1U1T) und Eco-Hfq (PDB-Eintrag: 1HK9) im Bänderdiagramm; dargestellt in gelb, violett, hellblau bzw. rosa. Gezeigt ist die proximale Seite der Homohexamere. Die Atome der RNA sind im Gittermodell wie folgt gefärbt: Kohlenstoff, weiß; Stickstoff, blau; Sauerstoff, rot; Phosphor, orange. Die gestrichelte Linie umrandet eine Monomer-Untereinheit mit violett gefärbten  $\beta$ -Strängen und der hellblau gefärbten Helix  $\alpha 1$ . Die Sekundärstrukturen sind gekennzeichnet. Faltblätter der benachbarten Monomere sind durch „?“ gekennzeichnet, um die intermolekulare Interaktion zwischen den  $\beta 4$  und  $\beta 5$ -Strängen hervorzuheben. Der Strang  $\beta 2?$  ist in dunkelblau dargestellt und enthält eine modifizierte „Walker A box“ (modifiziert nach Brennan & Link, 2007; Sukhodolets & Garges, 2003). (D) Distale Aufsicht auf Bändermodell von Eco-Hfq mit Überlagerung des Apo-Hexamers (grün) durch ein modelliertes A<sub>18</sub>-Ribonukleotid. Dargestellt in grau und schwarz ist die Aufteilung des Hexamers in zwei Hfq-Trimere mit Bezug auf die zweifache Symmetrieachse; je mit gebundenem A<sub>9</sub>-Ribonukleotid. Eines der sechs dreigliedrigen Bindungs-Motive ist mit A (*adenosine site*), R (*purine nucleotide site*) und E (*entrance/exit site*) gekennzeichnet (aus Link *et al.*, 2009). Die Schleifen der proximalen RNA-Bindungstasche zwischen  $\beta 2$  und  $\beta 3$  bzw.  $\beta 4$  und  $\beta 5$  sind in (A), (B) und (C) rot umrandet.

## 1.4 Hfq ist ein Mitglied der Sm/Lsm-Proteinfamilie

Bakterielle Hfq-Proteine variieren in ihrer Sequenzlänge zwischen 70 und 110 Aminosäureresten (Franze de Fernandez *et al.*, 1972; Sun *et al.*, 2002; Valentin-Hansen *et al.*, 2004). Hfq ist ein RNA-bindendes Protein mit einer hohen Affinität zu einzelsträngigen AU-reichen Abschnitten und Poly(A)-Sequenzen. Im Falle der AU-reichen Sequenzen werden solche Bereiche bevorzugt, auf die eine Stammschleifenstruktur folgt bzw. die einer solchen vorausgehen (Übersicht in Brennan & Link, 2007).

Basierend auf den abgeleiteten Aminosäuresequenzen konnte mithilfe von BLAST-Analysen nachgewiesen werden, dass in den Genomen vieler Bakterien homologe Hfq-Proteine kodiert werden, die eine starke Konservierung des amino-terminalen Sequenzbereichs (Reste 7-64 im Protein aus *E. coli*) aufweisen (Møller *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2002). Die konservierten Abschnitte zeigten zudem eine starke Ähnlichkeit zu dem Sm1-Motiv eukaryotischer wie archaealer Sm- und Lsm-Proteine. In diesen beiden Arbeiten wurde ferner gezeigt, dass Hfq aus *E. coli* (von hier an Eco-Hfq) *in vitro* zu einem ringförmigen Homo-Hexamere assembliert (Abbildung 1C). Diese Befunde deuteten zusammen mit der bereits bekannten RNA-bindenden Aktivität und dem Einfluss auf mRNA-Stabilität und -Translation darauf hin, dass es sich bei Hfq um einen evolutionären Vorläufer der Sm-Proteine handeln könnte (Sun *et al.*, 2002) bzw. die gesamte Sm-Protein-Familie auf einen gemeinsamen Vorläufer zurückgeht (Møller *et al.*, 2002). Bakterielle Hfq-Proteine enthalten die hoch-konservierte 'Sm2'-Region [YKHAI] (Abbildung 4A). Ähnlich dem eukaryotischen/archaealen Sm2-Motiv ist diese invariable Sequenz kennzeichnend von hydrophoben Aminosäureresten umgeben und in diesem strukturellen Kontext ebenfalls entscheidend an der Oligomerisierung des Proteins, d.h. speziell an der Interaktion des  $\beta$ 4-Strangs mit dem  $\beta$ 5-Strang des jeweils benachbarten Monomers beteiligt (Sun *et al.*, 2002).

Inzwischen stehen in der Literatur Kristallstruktur-Daten von Hfq-Proteinen aus *Staphylococcus aureus* (Sau-Hfq; PDB-Eintrag: 1kq1; Schumacher *et al.*, 2002) und *Pseudomonas aeruginosa* (Pae-Hfq; PDB-Eintrag: 1U1S & 1U1T; Nikulin *et al.*, 2005) sowie von einer verkürzten Eco-Hfq-Version (Reste 1-72) (PDB-Eintrag: 1HK9; Sauter *et al.*, 2003) zur Verfügung. Zudem wurde kürzlich die Struktur eines Hfq-Orthologs aus dem Archaeon *Methanococcus jannaschii* publiziert (Mja-Hfq; PDB-Eintrag: 2qtx; Nielsen *et al.*, 2007). Dies ist der bislang einzige bekannte archaeale Vertreter des bakteriellen Sm-Typs. Diese

## 1 EINLEITUNG

---

Proteine haben das charakteristische Sm-Faltungsmotiv mit der konservierten  $\beta 5\alpha 1\beta 2\beta 3\beta 4$ -Topologie (Abbildung 1B) gemeinsam und bilden ringförmige Hexamere über die Sm-typischen, intermolekularen  $\beta 4$ - $\beta 5$ -Kontakte. Die Ringkerne haben einen Durchmesser von circa 70 Å und zeigen in der Seitenansicht eine Dicke von circa 25 Å. Der Durchmesser der durch diesen Ring definierten zentrale Pore liegt im Bereich zwischen 8 Å und 12 Å (Übersicht in Brennan & Link, 2007). Sau-Hfq wurde sowohl als Apoprotein als auch im Komplex mit der kurzen RNA-Sequenz AU<sub>5</sub>G kristallisiert (Schumacher *et al.*, 2002). Dieses Heptaribonukleotid bindet das Protein zirkulär in einer stark positiv geladenen Furche, welche die zentrale Pore auf der proximalen Seite (definiert als jene Seite mit den hervorstehenden  $\alpha$ -Helices) des Hexamers umschließt (siehe auch Abbildung 1C). Diesem Mechanismus liegt die Bildung von insgesamt sechs RNA-Bindungstaschen zu Grunde, an welcher sich im Wesentlichen fünf Aminosäurereste der Sm1- und 'Sm2'-Motive benachbarter Untereinheiten beteiligen: Die Reste Lys57-His58 im 'Sm2'-Motiv sind in allen bis dahin identifizierten Hfq-Proteinen, ebenso wie Gln8 (in der terminalen  $\alpha$ -Helix) invariabel. Innerhalb des Sm1-Motivs ist der an der Bindung beteiligte Rest Tyr42 in anderen Spezies mehrheitlich durch das funktionell äquivalente Phenylalanin substituiert, während Lys41 in den meisten (jedoch nicht sämtlichen) homologen Sequenzen durch Gln oder Asn ersetzt ist. Detaillierte Darstellungen dieser RNA-Hfq-Interaktionen finden sich in Schumacher *et al.* (2002) und Brennan & Link (2007). Link und Mitarbeiter (2009) publizierten unlängst die Kristallstruktur von Eco-Hfq im Komplex mit einem Poly(A)-RNA-Molekül (PDB-Eintrag: 3gib). Diese Interaktion, welche möglicherweise bei der Regulation der bakteriellen mRNA-Degradation eine Rolle spielt (siehe Abschnitt 1.5.3.2; Folichon *et al.*, 2003; Hajnsdorf & Régnier, 2000; Mohanty *et al.*, 2004), findet im Unterschied zu der Bindung AU-reicher Sequenzen auf der distalen Seite des Hfq-Hexamers statt (Mikulecky *et al.*, 2004). Anhand der Röntgenstrukturdaten wurden in diesem Bereich sechs dreigliedrige Bindungsmotive (A-R-E) definiert, durch dessen unterschiedliche Bindungsorte die Poly(A)-Sequenz sequenziell in Form von sechs Trinukleotid-Wiederholungen gebunden wird (Abbildung 1D). Basierend auf diesen Analysen postulieren die Autoren eine Bindekapazität von bis zu 18 Nukleotiden mit einer Spezifität für Poly(A-R-N)-Triplets<sup>1</sup> (Link *et al.*, 2009). Die meisten der an diesen Bindungsorten

---

<sup>1</sup> A, Adenosin; R, Purin-Nukleotid; N, beliebiges Nukleotid



beteiligten Aminosäurereste sind mehrheitlich in den homologen bakteriellen Proteinen konserviert oder durch verwandte Aminosäurereste substituiert. Auffällig ist jedoch die insgesamt relativ schwache Konservierung dieser Reste in der Sequenz von Sau-Hfq (und der Orthologe einzelner weiterer Bakterien). Die Strukturanalyse von Schumacher und Mitarbeitern (2002) ließ zudem erkennen, dass die Oberfläche der distalen Seite des Sau-Hfq-Hexamers (im Gegensatz zu der deutlich elektropositiven Oberfläche von Eco-Hfq) einen weithin unpolaren Charakter besitzt. Interessanterweise wurde für dieses Protein entsprechend eine deutlich geringere Poly(A)-Bindungsaffinität berichtet (Brennan & Link, 2007).

Hfq-Proteine zeigen eine erhebliche Varianz hinsichtlich der Länge des carboxy-terminalen Abschnitts. Die längsten Carboxy-Termini besitzen die Varianten der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Proteobakterien (darunter auch *E. coli*). Večerek und Mitarbeiter (2008) wiesen durch vergleichende Analysen mit einer gekürzten Version des Proteins aus *E. coli* (Hfq<sub>65</sub>) nach, dass der carboxy-terminale Fortsatz eine weitere RNA-Interaktions-Fläche bietet und dabei eine Spezifität für mRNAs zeigt. Zudem wurde in derselben Arbeit für diese Region eine ungeordnete Struktur vorhergesagt. Diese strukturelle Flexibilität könnte demnach Interaktionen mit vielen mRNA-Molekülen erleichtern. Dieser Aspekt ist insofern interessant, als die Hfq-Varianten aus *Bacillus subtilis* und *Staphylococcus aureus* (von hier an *Staphylococcus*), welchen bei einer Sequenzlänge von 73 bzw. 77 Aminosäuren jeweils der verlängerte Carboxy-Terminus fehlt, in unterschiedlichen Experimenten das Ortholog aus *E. coli* funktionell nicht ersetzen konnten (Večerek *et al.*, 2008).

## 1.5 Hfq - ein zentraler Akteur in der post-transkriptionellen Genregulation

### 1.5.1 Kleine regulatorische RNAs in Bakterien

Im Fokus der Forschungsarbeiten über das regulatorische Potenzial kleiner nicht-proteinkodierender RNAs standen anfänglich primär die *microRNA*- (miRNA) und *short interfering-RNA*-Moleküle (siRNA) eukaryotischer Zellen. Diese ~20-30 Nukleotide umfassenden RNAs sind in ihrer Funktion als zielerkennende Moleküle in eine Vielzahl komplexer Regulationsprozesse auf genomischer und genspezifischer Ebene eingebunden (Übersicht in Carthew & Sontheimer, 2009). Schon bevor Lee und Mitarbeiter (1993) die erste eukaryotische regulatorische RNA identifizierten, waren nicht-kodierende, regulatorische RNAs aus Bakterien bekannt (Übersicht in Brantl, 2002). Neben den

kodierenden mRNAs und den klassischen nicht-kodierenden RNA-Spezies (tRNA, rRNA, tmRNA, 6S RNA) besitzen Bakterien eine beachtliche Anzahl an nicht-kodierenden RNA-Molekülen mit regulatorischen Funktionen. In *E. coli* wurden bereits mehr als 80 dieser Regulatoren experimentell nachgewiesen (Gottesman, 2004). Auch in Bezug auf andere Bakterien ist in nächster Zeit dank moderner Hochdurchsatz-Verfahren mit einer zunehmenden Anzahl identifizierter Riboregulatoren zu rechnen (Übersicht in Sharma & Vogel, 2009). Regulatorische RNAs haben relativ kurze Sequenzen im Bereich zwischen 50 und 300 Nukleotiden und sind zentrale Faktoren post-transkriptioneller Regulationsmechanismen. Sie spielen dabei vermutlich in den zellulären Reaktionen auf alle umweltbedingt relevanten Stresssituationen eine maßgebliche Rolle (Gottesman, 2004).

Die in der Literatur häufig vorgenommene Einteilung regulatorischer RNAs in *cis*- und *trans*-kodierte RNAs basiert auf der genomischen Lokalisation derer kodierenden Bereiche relativ zu den Genen der jeweils regulierten Ziel-RNAs (bzw. Ziel-Proteine). In dieser Arbeit wird die Kurzform sRNA ausschließlich für *trans*-kodierte RNAs verwendet, während *cis*-kodierte RNA-Elemente aufgrund ihrer heterogenen Eigenschaften spezifisch in asRNAs (*antisense*-RNAs) und *Riboswitche* unterteilt werden.

## 1.5.1.1 *Cis*-kodierte regulatorische RNAs

Viele regulatorische RNAs werden auf extrachromosomalen Elementen wie Plasmiden, Bakteriophagen sowie innerhalb von Transposonen kodiert und regulieren deren Funktion und Stabilität bzw. die Anzahl derer zellulären Kopien (Brantl, 2007; Wagner & Simons, 1994). Es handelt sich dabei um *cis-antisense*-RNA-Moleküle (asRNAs), welche auf dem Gegenstrang des Gens ihrer Ziel-RNA (*sense*-RNA) kodiert und mithilfe eines eigenen Promoters transkribiert werden. Insofern zeigen diese Regulatoren hinsichtlich ihrer ca. 50-300 Nukleotide umfassenden Sequenz eine vollständige Komplementarität zu ihren Ziel-RNAs. In jüngeren Arbeiten zur umfassenden Identifizierung von chromosomal kodierten asRNAs deutete sich ein erhebliches Potenzial für diese Art der bakteriellen Expressionskontrolle an (Georg *et al.*, 2009; Landt *et al.*, 2008; Selinger *et al.*, 2000). Funktionelle Untersuchungen konnten zudem Beispiele asRNA-basierter post-transkriptioneller Regulation von Stoffwechsel, Stressantwort, Photosynthese und Toxinbiosynthese beschreiben (z.B. André *et*

# 1 EINLEITUNG

---

*al.*, 2008; Dühning *et al.*, 2006; Kawano *et al.*, 2007; Opdyke *et al.*, 2004; Silvaggi *et al.*, 2005).

Weitere regulatorische, *cis*-kodierte RNA-Elemente sind *Riboswitche* und RNA-Thermometer, die typischerweise in den 5'-UTRs der regulierten mRNAs lokalisiert sind und infolge unterschiedlicher Signale aus der Umgebung ihre Konformation ändern (Grundy & Henkin, 2006). *Riboswitche* bestehen aus einer Aptamer-Region zur Bindung metabolischer Liganden und einer Expressionsplattform, die - induziert durch die Liganden-Bindung - durch die Ausbildung alternativer Sekundärstrukturen die Genexpression reguliert. Die induzierte Konformationsänderung führt dabei z.B. zu der Ausbildung eines Transkriptionsterminators und dadurch zur Attenuation der Transkription. Alternativ kann die Expressionsplattform eines *Riboswitches* durch die Blockierung der Ribosomen-Bindungsstelle inhibitorisch auf die Translation wirken (Mandal & Breaker, 2004). Bekannte Liganden sind z.B. S-Adenosylmethionin (SAM), Flavinmononukleotid (FMN), L-Lysin und Thiaminpyrophosphat (TPP) (aktuelle Übersicht in Garst & Batey, 2009). Mittlerweile sind zudem magnesiumbindende *Riboswitche* in *Salmonella enterica* (Cromie *et al.*, 2006) und *Bacillus subtilis* (Dann *et al.*, 2007) bekannt. Interessanterweise ist der Mechanismus der Transkriptions-Attenuation vorwiegend aus Gram-positiven Bakterien bekannt, während *Riboswitch*-Regulation in Gram-negativen Bakterien auf der Ebene der Translations-Kontrolle funktioniert (Nudler & Mironov, 2004). Insgesamt kommt *Riboswitchen* in Gram-positiven Bakterien eine größere Bedeutung zu als in Gram-negativen Bakterien; umgekehrt verhält es sich mit der Regulation durch *trans*-kodierte sRNAs (s.u.; Waters & Storz, 2009).

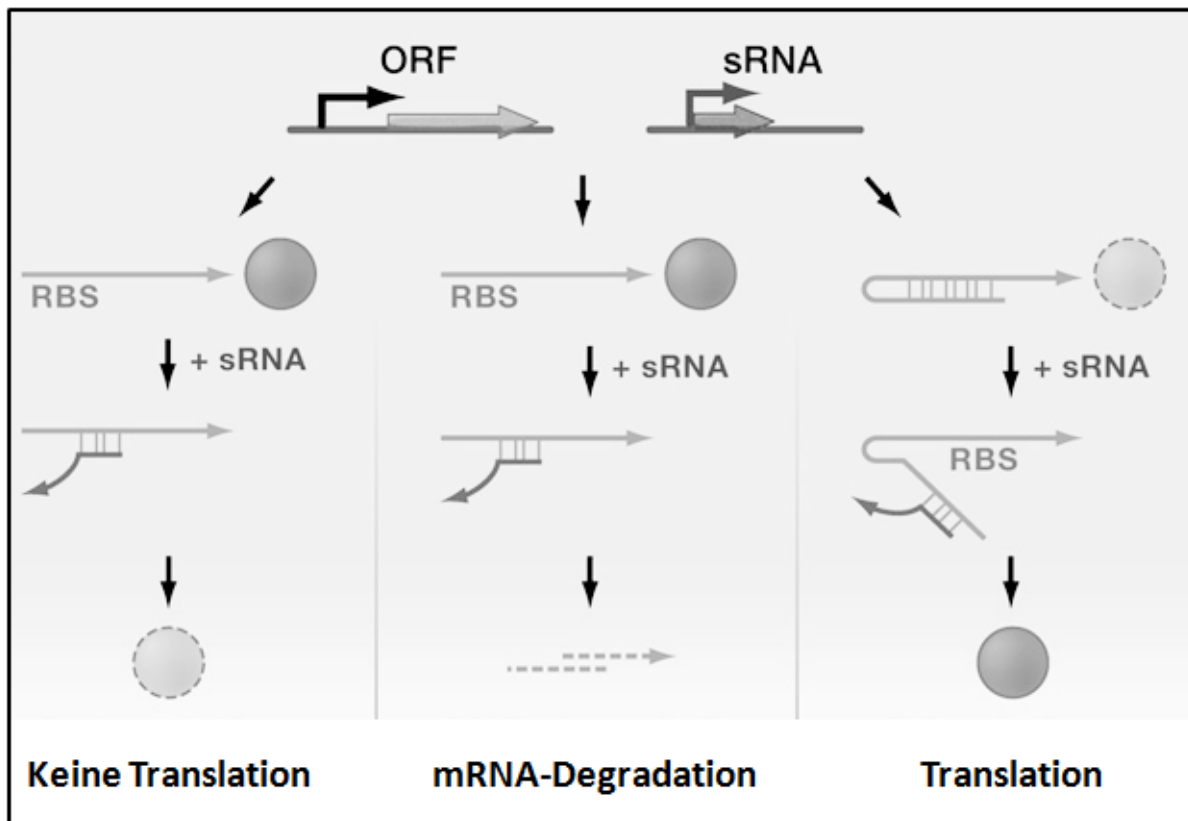
RNA-Thermometer bilden in Abhängigkeit von Temperaturänderungen ebenfalls alternative Sekundärstrukturen aus und regulieren dadurch in allen bislang bekannten Beispielen die Initiation der Translation. Bei niedrigen Temperaturen werden die Ribosomen-Bindungsstellen der regulierten mRNAs durch inhibitorische Strukturen der Thermometer-Elemente blockiert. Infolge eines Temperaturanstiegs lösen sich diese Stammschleifen auf und ermöglichen so den Zugang für die Ribosomen und damit die Translation (Übersicht in Narberhaus *et al.*, 2006).

## 1.5.1.2 *Trans*-kodierte regulatorische RNAs (sRNAs)

*Trans*-kodierte sRNAs werden im Genom z.T. weit entfernt von ihren Ziel-RNAs kodiert. Die sRNA-Gene enthalten typischerweise Rho-unabhängige Transkriptionsterminatoren und liegen innerhalb „intergenischer Regionen“ (IGRs), d.h. genomischer Loci, welche von offenen Leserastern (ORFs, *open reading frame*) flankiert sind, selbst jedoch nicht für Proteine kodieren. Die Sequenzen von sRNA-Molekülen umfassen typischerweise ~50-250 Nukleotide und zeigen im Gegensatz zu den asRNAs eine eingeschränkte Komplementarität zu ihren Ziel-RNAs. Die Synthese von sRNAs wird häufig auf transkriptioneller Ebene (z.B. durch Transkriptionsfaktoren) reguliert und unter bestimmten Wachstums- oder Stress-Bedingungen aktiviert. Ähnlich den asRNAs handelt es sich bei bakteriellen sRNAs um post-transkriptionelle Regulatoren. Sie beeinflussen durch eine direkte Basenpaarung mit kurzen Sequenzabschnitten der 5'-UTRs ihrer Ziel-mRNAs die Transkript-Stabilität und/oder die Initiation der Translation (siehe Abbildung 2; Gottesman, 2004; Gottesman, 2005; Repoila & Darfeuille, 2009; Storz *et al.*, 2005; Waters & Storz, 2009)

Die intensiv untersuchten Beispiele MicA und OxyS aus *E. coli* blockieren dabei die Ribosomen-Bindungsstellen (RBS) der jeweiligen mRNA und verhindern dadurch den Zugang für die ribosomale 30S-Untereinheit. Da die 30S-Ribosomen-Bindung zudem direkt stabilisierend auf mRNA-Moleküle wirkt, wird dieser Inhibierungs-Mechanismus oft von einem beschleunigten nukleolytischen Abbau der betroffenen mRNA (z.B. durch RNase E) begleitet (Massé *et al.*, 2003; Morita *et al.*, 2005; Vytvytska *et al.*, 2000). Vergleichbar mit dem Mechanismus der asRNA-basierten Regulation (s.o.) ist die Blockierung der RBS *per se* der entscheidende Schritt für die negative Kontrolle der Proteinsynthese, während die anschließende Degradation der mRNA diesen Hemmungsmechanismus irreversibel macht und so einen wichtigen Beitrag zur Robustheit des Systems leistet (Morita *et al.*, 2006).

Einen neuartigen Mechanismus zeigt die Regulation der Synthese des Porins OmpD durch die sRNA MicC in *Salmonella* (Pfeiffer *et al.*, 2009). MicC bindet weit innerhalb des kodierenden Bereichs der *ompD*-mRNA und beschleunigt dadurch deren Degradation durch RNase E, ohne die Translationsinitiation direkt zu inhibieren. Anders als bei den beschriebenen Beispielen für sRNA-vermittelte Translationskontrolle ist der endonukleolytische Abbau der mRNA durch RNase E in diesem Fall ausschlaggebend für die Regulation.



**Abbildung 2: Regulatorische Funktionen *trans*-kodierter sRNAs durch Basenpaarung.** Die Gene *trans*-kodierter sRNA (dunkelgrau) sind im Genom getrennt von den Genen der Ziel-mRNAs (hellgrau) lokalisiert. sRNAs interagieren mit den Ziel-mRNAs durch eingeschränkt komplementäre Basenpaarungen. Einige sRNAs blockieren durch die Bindung der 5'-UTR die Ribosomen-Bindungsstelle (RBS) und inhibieren dadurch die Translation der mRNA (links). Andere Beispiel-RNAs leiten durch die Duplexbildung mit ihrer Ziel-mRNA direkt deren nukleolytischen Verdau ein (Mitte). Dieser Mechanismus kann auch durch die Interaktion mit dem kodierenden Bereich der mRNA erfolgen (Pfeiffer *et al.*, 2009). Eine Aktivierung der Translation erfolgt, wenn eine sRNA die Bildung einer inhibitorischen Sekundärstruktur durch Sequestrierung der 5'-UTR verhindert (rechts). Modifiziert nach Waters & Storz (2009).

Neben diesen inhibitorischen Funktionen sind in Bakterien unterschiedliche Mechanismen der positiven post-transkriptionellen Genregulation durch sRNAs bekannt. Das prominenteste Beispiel ist der „*anti-antisense*“ Mechanismus der Translations-Aktivierung des generellen Stress-Sigmafaktors RpoS durch DsrA-RNA in *E. coli* (Majdalani *et al.*, 1998; Sledjeski *et al.*, 1996). Dem kodierenden Bereich der *rpoS*-mRNA geht eine lange 5'-UTR von circa 600 Nukleotiden voraus, welche durch die Ausbildung einer inhibitorischen Stammschleifen-Struktur mit der Ribosomen-Bindungsstelle die Translationsinitiation blockiert. Bei niedrigen Temperaturen wird die Expression von DsrA induziert. DsrA bindet an die 5'-UTR von *rpoS*, wodurch sich die Stammschleife öffnet und die Ribosomen-Bindungsstelle für die Bindung der ribosomalen 30S-Untereinheit freigesetzt wird (Abbildung 3A). Außerdem wirkt die

DsrA-*rpoS*-Duplexbildung direkt stabilisierend auf das *rpoS*-Transkript. Bei logarithmischem Wachstum kommt es innerhalb der inhibitorischen Stammschleife zu einem initialen endonukleolytischen Verdau durch RNase III, dem sich der rasche Abbau des kodierenden Bereichs der mRNA anschließt. Infolge der stressinduzierten Bindung an DsrA „verlagert“ sich die RNase III-Erkennungssequenz in den 5′-*rpoS*-DsrA-Duplex, was eine Prozessierung der 5′-UTR zur Folge hat und den kodierenden Bereich vor Degradation schützt (Resch *et al.*, 2008).

## 1.5.2 Hfq vermittelt die post-transkriptionelle Regulation durch sRNAs

In *E. coli* und nahe verwandten Bakterien ist Hfq ein wichtiger Ko-Faktor für die Stabilität und Funktion vieler charakterisierter *trans*-kodierter sRNAs. Mittlerweile wurde für eine Vielzahl insbesondere enterobakterieller sRNAs (und einiger mRNAs) eine Assoziationen mit Hfq nachgewiesen (Sittka *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2003). In zahlreichen Arbeiten konnte ferner dargestellt werden, dass die Präsenz von Hfq *in vitro* einen stimulierenden Effekt auf die unvollständig komplementären Basenpaar-Interaktionen zwischen sRNA und mRNA hat (Geissmann & Touati, 2004; Kawamoto *et al.*, 2006; Lease & Woodson, 2004; Møller *et al.*, 2002; Rasmussen *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2002). *In vitro*-Strukturanalysen der funktionell repräsentativen sRNA OxyS sowie der sRNA-abhängig regulierten mRNAs *sodB* und *ompA* aus *E. coli* lieferten deutliche experimentelle Hinweise auf Hfq-induzierte Veränderungen von Sekundärstrukturen (Geissmann & Touati, 2004; Moll *et al.*, 2003b; Zhang *et al.*, 2002). Moll und Mitarbeiter (2003b) zeigten zudem, dass die induzierte Strukturveränderung der *ompA*-mRNA nach einem proteolytischen Abbau des gebundenen Hfq-Proteins stabil bleibt. Hfq gilt demnach als RNA-Chaperon, welches die effiziente Basenpaarung der RNA-Regulatoren mit den Ziel-mRNAs stimuliert, indem es durch eine aktive Modifizierung der RNA-Faltung inhibitorische Sekundärstrukturen öffnet (Übersicht in Majdalani *et al.*, 2005; Storz *et al.*, 2004; Valentin-Hansen *et al.*, 2004). In einem ergänzend diskutierten Modell zur Hfq-Funktion agiert das Protein passiv als RNA-bindende Plattform, um durch die Erhöhung lokaler RNA-Konzentrationen sRNA-mRNA-Interaktionen zu unterstützen (Storz *et al.*, 2004).

Unlängst brachten Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET) -basierte Interaktionsstudien am Beispiel des DsrA-*rpoS*-Paares wichtigen Aufschluss über den Wirkungsmechanismus Hfq-

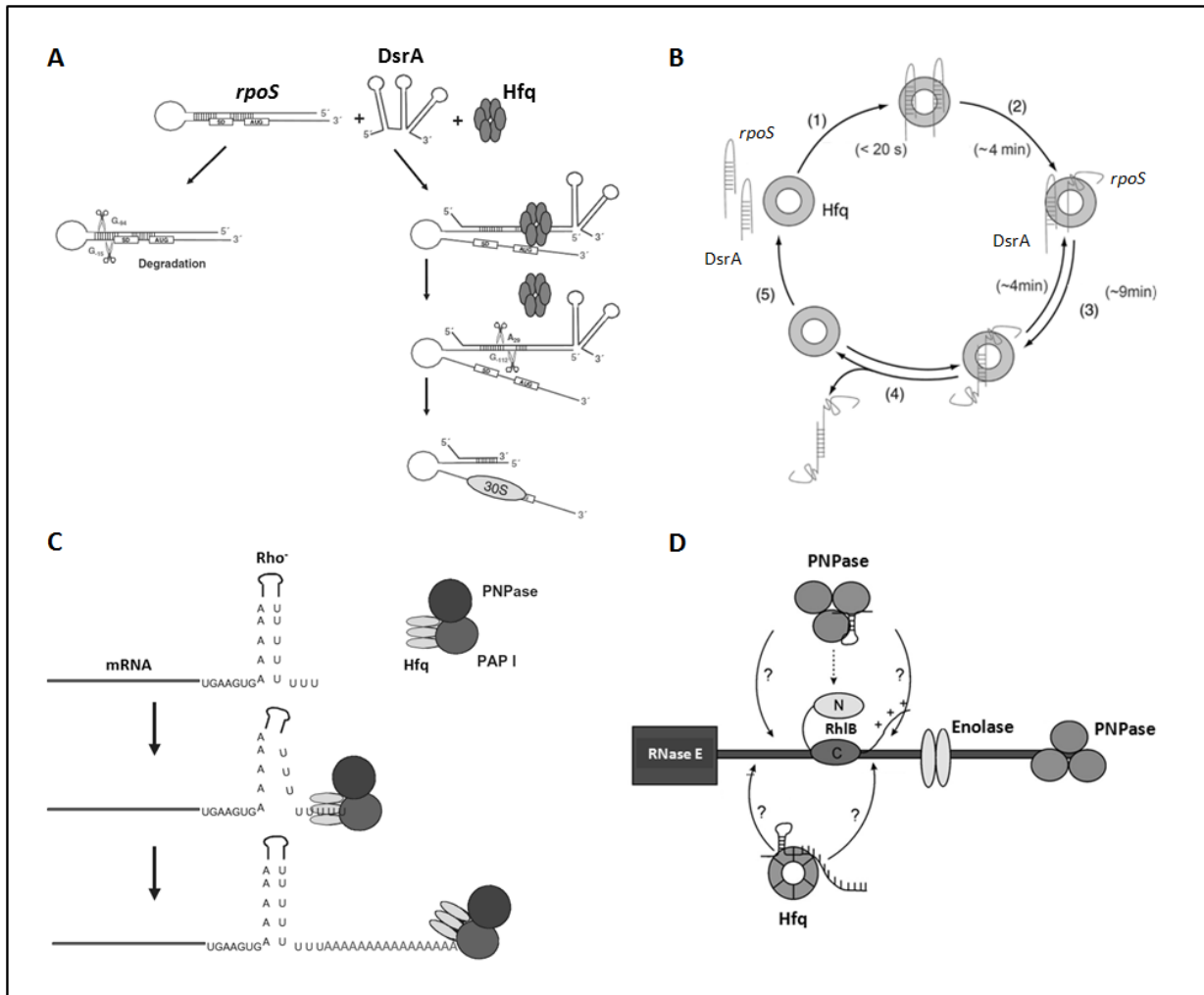
## 1 EINLEITUNG

---

stimulierter Riboregulation (Arluison *et al.*, 2007). Nach dem abgeleiteten Modell (siehe Abbildung 3B) assoziiert Hfq zunächst in einer schnellen Reaktion mit DsrA und *rpoS*, was eine Erhöhung der lokalen Konzentration beider RNAs bedingt. Daraufhin entfaltet sich die Sekundärstruktur von *rpoS* in einem langsam ablaufenden, irreversiblen Prozess. Beide Effekte begünstigen die Basenpaarung zwischen *rpoS* und DsrA, welche ebenfalls langsam verläuft. Nach weiteren Konformationsänderungen im *rpoS*-DsrA-Duplex erfolgt die Dissoziation des Hfq-RNA-Komplexes. Ferner zeigten diese Analysen, dass Hfq den bereits gebildeten Duplex ebenso wieder spalten kann. Bezüglich der physiologischen Funktion dieser Rückwärtsreaktion wird ein Feinregulierungsmechanismus diskutiert (Brennan & Link, 2007).

Weiterhin bleiben viele offene Fragen hinsichtlich des Mechanismus der Hfq-vermittelten Riboregulation. Unter anderem ist bisher nicht eindeutig geklärt, ob sRNA und mRNA zeitgleich an ein Hfq-Hexamere binden, oder ob sich beide RNAs auf zwei Hexamere verteilen und durch hydrophobe Wechselwirkung zwischen diesen in räumliche Nähe zueinander gebracht werden (Storz *et al.*, 2004). Letztere Hypothese wird durch kürzlich veröffentlichte Strukturdaten unterstützt. Die Analyse der Kristallstruktur eines Hfq-Poly(A)-Komplexes (*E. coli*) zeigte, dass Hfq auf der distalen Seite des Hexamers mit hoher Affinität repetitive A-R-N-Sequenzen (siehe Abschnitt 1.4) bindet (Link *et al.*, 2009). Tatsächlich findet sich u.a. innerhalb der 5'-UTR von *rpoS* ein (AAN)<sub>4</sub>-Element, welches für die Interaktion mit DsrA bedeutend ist (Soper & Woodson, 2008). Link und Mitarbeiter (2009) weisen zudem auf (ARN)<sub>5</sub>- und (ARN)<sub>4</sub>-Elemente im Bereich der Ribosomen-Bindungsstellen zahlreicher Gene im Genom von *E. coli* hin. Demgegenüber bindet das Hfq-Hexamere auf seiner proximalen Seite bevorzugt AU-reiche, an Stammschleifen grenzende einzelsträngige Sequenzen (Übersicht in Brennan & Link, 2007) und wäre demnach prädestiniert für die Assoziation mit sRNAs.

# 1 EINLEITUNG



**Abbildung 3: Modelle zu Funktionen von Hfq in *E. coli*.** (A) Translationsaktivierung der *rpoS*-mRNA durch DsrA und Hfq (modifiziert nach Večerek *et al.*, 2009). In Abwesenheit von Hfq und der sRNA DsrA wird die Ribosomen-Bindungsstelle von *rpoS* durch intramolekulare Basenpaarungen blockiert. Der initiale Verdau durch RNase III leitet die Degradation des kodierenden Bereichs der mRNA ein (links). Hfq unterstützt die Basenpaar-Bindung von DsrA an die 5'-UTR von *rpoS* und verlässt den Komplex anschließend. Der DsrA-*rpoS*-Duplex steht der Degradation durch RNase II zur Verfügung; die ribosomale 30S-Untereinheit hat Zugang zu der Ribosomen-Bindungsstelle von *rpoS* und kann die Translation einleiten (B) Kinetisches Modell der Hfq-vermittelten Translationsaktivierung durch DsrA (nach Arluison *et al.*, 2007). (1) Schnelle Bindung von Hfq an DsrA und *rpoS*. (2) RNA-Chaperon-Aktivität: langsame Auflösung der Stammschleifen-Region von *rpoS*. (3) Die erhöhte lokale Konzentration der RNAs und die Entfaltung von *rpoS* beschleunigen die reversible Bildung des DsrA-*rpoS*-Duplex. (4) Der RNA-Duplex löst sich von Hfq, welches (5) für eine neue Reaktion zur Verfügung steht. (C) Hfq-vermittelte Kontrolle der Polyadenylierung von mRNAs (Modell nach Mohanty *et al.*, 2004). PAP I katalysiert die Polyadenylierung der 3'-Enden von mRNAs mit Rho-unabhängigen Transkriptionsterminatoren (Rho<sup>o</sup>). Hfq erleichtert im Komplex mit PAP I und PNPase den Zugang von PAP I an die RNA, indem es die terminale Stammschleife des Terminators entfaltet. (D) Dynamisches Modell der Rekrutierung akzessorischer Protein-RNA-Komplexe durch das Kern-Protomer des Degradosoms (nach Worrall *et al.*, 2008). RhIB, PNPase und Enolase binden in stöchiometrischen Mengen konstitutiv an die carboxyterminale Domäne von RNase E. Zusätzliche PNPase-Einheiten sowie Hfq interagieren jeweils in Abhängigkeit von gebundenen RNA-Molekülen transient - z.B. über die RNA-Bindungsstellen - mit RNase E.



## **Eine reduzierte Funktion von Hfq in Gram-positiven Bakterien ?**

Im Gegensatz zu den meisten sRNAs in Gram-negativen Bakterien (speziell Enterobakterien) spielt Hfq für die regulatorische Aktivität einiger Beispiele *trans*-kodierter sRNAs in Gram-positiven Bakterien keine Rolle. Zum Beispiel wurde für die Translationsinhibitoren SR1 aus *Bacillus subtilis* (Heidrich *et al.*, 2006; Heidrich *et al.*, 2007) und RNAIII aus *Staphylococcus* (Boisset *et al.*, 2007; Huntzinger *et al.*, 2005) *in vitro* (sowie für RNAIII auch *ex vivo*) zwar eine Assoziation mit Hfq nachgewiesen; auf die Bildung der Komplexe mit den Ziel-mRNAs *ahrC* (SR1) bzw. *spa* (RNAIII) hatte Hfq jedoch keinen signifikanten Effekt.

Darüber hinaus zeigen die Kristallstrukturen der Hfq-Proteine aus *E. coli* und *Staphylococcus* deutliche Unterschiede hinsichtlich der Oberflächenladung auf der distalen (in *E. coli* A-R-N-Elemente bindenden) Seite, am potenziell RNA-bindenden seitlichen Rand sowie innerhalb der zentralen Pore des Hexamers (Link *et al.*, 2009; Sauter *et al.*, 2003; Schumacher *et al.*, 2002). Diese in Eco-Hfq stark positiv geladenen Bereiche zeigen in Sau-Hfq ein weitgehend elektronegatives Potenzial (Pore, Rand) bzw. nur schwache Polarität (distale Seite). Auch angesichts der generell niedrigen *hfq*-Transkriptmengen in *Staphylococcus* wird für dieses Homolog eine reduzierte bzw. abweichende zelluläre Funktion diskutiert (Brennan & Link, 2007). Entgegen der pleiotropen Phänotypen einiger proteobakterieller *hfq*-Mutanten, hatte die *hfq*-Inaktivierung in *Staphylococcus* zudem keine nachweisbaren physiologischen Effekte (Bohn *et al.*, 2007).

In einer jüngeren Publikation berichten Nielsen und Mitarbeiter (2009) hingegen erstmals von einem Hfq-abhängigen sRNA-mRNA-Regulationsmechanismus in dem Gram-positiven Humanpathogen *Listeria monocytogenes*. Gleichwohl ist die Mehrheit der in diesem Bakterium bis dahin untersuchten regulatorischen RNAs (u.a. einige asRNAs) *in vitro* weder für Stabilität noch Ziel-mRNA-Bindung auf Hfq angewiesen (Mandin *et al.*, 2007; Nielsen *et al.*, 2008; Toledo-Arana *et al.*, 2009).

### **1.5.3 Weitere Funktionen von Hfq im RNA-Metabolismus**

Neben der Funktion bei der sRNA-vermittelten Expressionskontrolle, kann Hfq davon unabhängig Einfluss auf die Stabilität von mRNAs nehmen. Das Protein bindet z.B. an 3'-terminale Poly(A)-Schwänze, stimuliert deren Elongation durch die Poly(A)-Polymerase I oder schützt das Transkript vor exonukleolytischem Verdau durch Polynukleotid-

Phosphorylase (PNPase), RNase II und RNase E (Folichon *et al.*, 2003; Folichon *et al.*, 2005; Hajnsdorf & Régnier, 2000; Mohanty *et al.*, 2004). Ein Hfq-vermittelter Schutz vor RNase E-katalysierter Degradation trägt zudem zur Stabilität von sRNAs bei, da Hfq und RNase E sehr ähnliche einzelsträngige, AU-reiche Sequenzabschnitte innerhalb von (s)RNA-Molekülen erkennen und daher wahrscheinlich um diese konkurrieren. Entsprechende Beobachtungen wurden in Bezug auf RNase E-abhängige Degradation/Prozessierung polycistronischer tRNA-Vorläufer gemacht (Folichon *et al.*, 2005; Moll *et al.*, 2003a; Zhang *et al.*, 2003). Hinsichtlich des tRNA-Metabolismus gibt es zudem Hinweise, dass Hfq spezifisch tRNAs bindet und die Aktivität der tRNA-Nukleotidyltransferase positiv beeinflusst (Lee & Feig, 2008; Scheibe *et al.*, 2007).

### 1.5.3.1 Interaktionen mit weiteren Proteinen des RNA-Metabolismus

Angesichts des weitreichenden Einflusses auf Stabilität und Aktivität zahlreicher RNA-Moleküle liegt die Vermutung nahe, dass Hfq auch mit Proteinen aus dem RNA-Stoffwechsel interagiert. Tatsächlich gibt es experimentelle Indizien, dass Hfq in *E. coli* mit dem ribosomalen S1-Protein und/oder der RNA-Polymerase assoziiert. Andere Arbeiten weisen zudem auf eine direkte oder indirekte Interaktion mit dem RNA-Degradosom-Komplex hin.

#### S1-Protein

S1 ist ein wichtiger Protein-Faktor bei der Translation von mRNA (Tzareva *et al.*, 1994) und Bestandteil des Replikationskomplexes des Bakteriophagen Q<sub>β</sub> (Inouye *et al.*, 1974; Wahba *et al.*, 1974). Zudem zeigte S1 *in vitro* einen stimulierenden, anti-inhibitorischen Effekt auf die Transkription (Sukhodolets *et al.*, 2006). *Ex vivo*- und *in vitro*-Analysen deuteten an, dass Hfq in *E. coli* in Abhängigkeit von S1 mit der RNA-Polymerase assoziiert (Sukhodolets & Garges, 2003). Demnach wäre es denkbar, dass Hfq (in Kooperation mit S1) eine Funktion innerhalb der Schnittstelle zwischen Transkription und Translation zukommt. Allerdings konnte bisher noch keine Evidenz für eine direkte Hfq-S1-Interaktion erbracht werden, sodass intrazellulär auch eine indirekte Assoziation, etwa über gebundene RNA vorliegen könnte (Večerek *et al.*, 2009).

## Das Degradosom

Das Degradosom ist ein Multiprotein-Komplex, der in Bakterien maßgeblich an der Prozessierung von rRNA- und tRNA-Vorläufern sowie an der Degradation von mRNA und sRNA beteiligt ist. Die gesteuerte mRNA-Degradation gilt in Bakterien als wichtiger regulatorischer Mechanismus zur Anpassung an veränderte Lebensbedingungen. Durch die schnelle Anpassung des zellulären Transkript-Profiles können Zellen mit relativ geringem energetischen Aufwand rasch auf wechselnde äußere Einflüsse reagieren (Anderson & Dunman, 2009).

In *E. coli* setzt sich der Degradosom-Komplex im Wesentlichen aus der RNase E, der PNPase, der DEAD-box RNA-Helikase B (RhlB) und dem glykolytischen Enzym Enolase zusammen. In sub-stöchiometrischen Mengen werden zudem weitere, variable Komponenten assoziiert (Übersicht in Carpousis, 2007). Die Initiation der mRNA-Degradation erfolgt zumeist durch einen endonukleolytischen Verdau durch RNase E in 5' → 3'-Richtung. Dieses Enzym schneidet bevorzugt Transkripte mit mono-phosphorylierten 5'-Enden innerhalb AU-reicher Sequenzabschnitte, die oft von Stammschleifen-Strukturen umgeben sind. (Mackie, 1998; McDowall *et al.*, 1994). Die entstehenden RNA-Fragmente werden daraufhin phosphorylytisch durch die PNPase in 5' → 3'-Richtung degradiert. RhlB bewirkt dabei die Auflösung inhibitorischer Sekundärstrukturelemente. Die Rolle der Enolase konnte in diesem Zusammenhang bisher nicht aufgeklärt werden; man vermutet jedoch eine zentrale Funktion bei der Degradation von mRNAs einiger metabolischer Enzyme (Anderson & Dunman, 2009; Chandran & Luisi, 2006).

Durch *ex vivo*-Affinitäts-Aufreinigungen der RNase E aus *E. coli* konnten Morita und Mitarbeiter (2005) zeigen, dass Hfq im Komplex mit den sRNAs SgrS und RyhB an die carboxy-terminale Region der RNase E bindet. Interessanterweise ko-präzipitierte in dem umgekehrten Ansatz lediglich RNase E, jedoch kein weiterer der typischen Degradosom-Komponenten mit Hfq. Sowohl SgrS als auch RyhB binden *in vitro* an Hfq und stimulieren in Abhängigkeit von RNase E die Degradation ihrer Ziel-mRNAs. Für diesen Prozess ist zumindest im Fall von RhyB die carboxy-terminale Region der Nuklease essenziell (Massé *et al.*, 2003; Morita *et al.*, 2004; Vanderpool & Gottesman, 2004; Zhang *et al.*, 2003). Da diese carboxy-terminale Region ebenso essenziell für die Assemblierung typischer Degradosom-

Komponenten ist (Anderson & Dunman, 2009), konkurrieren diese offenbar mit Hfq und den unterschiedlichen sRNAs um die Interaktion mit RNase E (Brennan & Link, 2007).

Dabei scheinen RNase E und Hfq jedoch nicht direkt miteinander zu interagieren, sondern wahrscheinlich in einem indirekten Mechanismus mithilfe gebundener RNA (Worrall *et al.*, 2008). In derselben Arbeit wurde zudem gezeigt, dass der PNPase-Gehalt des Degradosoms in Abhängigkeit von endo- und exogenen Bedingungen, und speziell in Korrelation mit gebundener RNA variiert. Die Autoren schlagen angesichts dessen ein dynamisches Modell vor, demnach bestimmte RNA-Spezies als Modulatoren der Degradosomen-Komposition agieren und mithilfe ihrer unterschiedlichen Sekundärstruktur-Charakteristika akzessorische Faktoren (z.B. Hfq vs. PNPase) rekrutieren (Abbildung 3D). Folglich würde Hfq im ternären Komplex mit einem sRNA-mRNA-Paar transiente Interaktionen mit RNase E eingehen und dadurch die RNA-Degradation einleiten. Die Ausbildung eines solchen Hfq-sRNA-Ribonukleotid-Komplexes mit RNase E (bzw. dem Degradosom) führte schließlich zur raschen Degradation der jeweiligen Ziel-mRNA und erinnerte insofern funktionell an den eukaryotischen *RNA-induced silencing complex* (RISC; Bartel, 2004; Morita *et al.*, 2005).

### 1.5.3.2 Hfq beeinflusst die Polyadenylierung von mRNA

Die Polyadenylierung von mRNA ist ein in fast allen Organismen ablaufender Prozess zur Kontrolle der Transkript-Stabilität. In Eukaryoten trägt diese post-transkriptionelle Modifikation nukleärer prä-mRNAs positiv zur Stabilität, Reifung, Translationseffizienz und dem Transport in das Cytoplasma bei (aktuelle Übersicht in Mandel *et al.*, 2008). In Prokaryoten und Organellen (mit einigen mitochondrialen Ausnahmen) dagegen kommt der Polyadenylierung eine wichtige, stimulierende Funktion bei der kontrollierten mRNA-Degradation zu. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die 3'-Poly(A)-Schwänze nicht dazu neigen Sekundärstrukturen auszubilden und dadurch eine geeignete Plattform für die Initiation nukleolytischen Abbaus durch 3'→5'-Exonukleasen (RNase II/PNPase) bieten (Lisitsky & Schuster, 1999).

Der bakterielle Mechanismus der Polyadenylierung ist am besten in *E. coli* untersucht und wird dort bei mindestens 90 % aller mRNAs durch die Poly(A)-Polymerase I (PAP I) katalysiert (Li *et al.*, 1998; Mohanty & Kushner, 1999; Mohanty & Kushner, 2006). In den Chloroplasten Höherer Pflanzen, Cyanobakterien (*Synechocystis*) und dem Gram-positiven

Bodenbakterium *Streptomyces coelicolor* hingegen ist die PNPase als bifunktionelles Enzym sowohl für die Polyadenylierung als auch für die anschließende exonukleolytische Degradation der mRNAs zuständig (Hayes *et al.*, 1999; Monde *et al.*, 2000; Rott *et al.*, 2003; Sohlberg *et al.*, 2003; Yehudai-Resheff *et al.*, 2003). Ein signifikanter Unterschied zwischen PAP I und PNPase liegt in den Sequenzen der durch diese Enzyme produzierten 3'-Polynukleotide. Während PAP I homopolymere Poly(A)-Schwänze synthetisiert, entstehen durch die Polymerase-Aktivität der PNPase heteropolymere poly(A)-reiche Schwänze (Übersicht in Slomovic *et al.*, 2008). Interessanterweise besitzt die PNPase in *E. coli* neben der exonukleolytischen Aktivität ebenfalls Polyadenylierungs-Aktivität und trägt zu einem circa 30-35 %igen heteropolymerischen Anteil an den Poly(A)-Schwänzen in Wildtyp-Zellen von *E. coli* bei. (Mohanty & Kushner, 2000; Mohanty *et al.*, 2004). In der jüngeren Arbeit konnte ferner gezeigt werden, dass Hfq aus *E. coli* mit PNPase und PAP I *ex vivo* ko-präzipitiert. Die genetische Inaktivierung von *hfq* führte zudem zur Reduktion der PAP I-vermittelten Polyadenylierung der 3'-Enden von mRNAs mit Rho-unabhängigen (d.h. hoch strukturierten) Transkriptionsterminatoren. Hajnsdorf und Mitarbeiter (2000) beobachteten bereits zuvor einen stimulierenden Effekt von Hfq auf die Prozessivität von PAP I in *E. coli*. Nach einem vorgeschlagenen Modell könnte Hfq in diesem Zusammenhang an die AU-reichen 3'-terminalen Stammschleifen der mRNAs binden, diese als RNA-Chaperon auflösen und dadurch den Zugriff durch PAP I ermöglichen (siehe Abbildung 3C; Mohanty *et al.*, 2004). Die PNPase synthetisierte dagegen Hetero-Polynukleotide an den 3'-Enden von mRNAs mit Rho-abhängigem Terminator sowie von RNase E-Degradationsprodukten (siehe auch Mohanty & Kushner, 2006). Mohanty und Kushner (2006) beobachteten, dass Prozessierungsprodukte polycistronischer Transkripte mit Rho-unabhängigem Terminator ebenfalls durch PAP I polyadenyliert wurden. Angesichts der oben besprochenen (RNA-abhängigen) Interaktion von Hfq mit RNase E sowie mit PAP I und PNPase diskutieren Mohanty und Kushner (2006) einen Mechanismus, demnach Hfq einen Austausch von prozessierten RNA-Molekülen zwischen RNase E (bzw. dem Degardosom) und PAP I vermittelt.

## 1.6 Physiologische Phänotypen von *hfq*-Inaktivierungsmutanten

Die phänotypischen Merkmale von  $\Delta hfq$ -Mutanten unterschiedlicher Organismen sind hauptsächlich Defekte in Wachstum, Stresstoleranz und der Virulenz. Hinsichtlich des

# 1 EINLEITUNG

---

Wachstums auf Standard-Medium sind die Effekte in den meisten Fällen relativ gering und äußern sich z.B. in verlängerten *lag*-Phasen und geringeren Zellteilungsraten (Übersicht in Chao & Vogel, 2010). Die Virulenz betreffende Phänotypen wurden insbesondere in einigen Arten der  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Proteobakterien beobachtet. Unter den Enterobakterien zeigten *hfq*-Mutanten von *Salmonella* (Ansong *et al.*, 2009; Sittka *et al.*, 2007), *Yersinia pestis* (Geng *et al.*, 2009) und eines uropathogenen *E. coli*-Stamms (Kulesus *et al.*, 2008) im Mausmodell eine stark geschwächte Infektiosität. Ähnliche Beobachtungen wurden mit entsprechenden Mutanten von *Neisseria meningitidis* (Fantappiè *et al.*, 2009) als Vertreter der  $\beta$ -Proteobakterien, sowie *Francisella tularensis* (Kadzhaev *et al.*, 2009) und *Pseudomonas aeruginosa* (Sonnleitner *et al.*, 2003) gemacht. In dem Fall von *Pseudomonas aeruginosa* (von hier an *Pseudomonas*) war der Phänotyp u.a. auf eine Beeinträchtigung der durch Typ IV Pili vermittelten Motilität zurückzuführen (siehe Abschnitt 1.9).

Motilitätsverluste wurden auch in den  $\Delta hfq$ -Mutanten von *Burkholderia cepacia* (Sousa *et al.*, 2009) und den oben genannten *E. coli*- (Kulesus *et al.*, 2008) und *Salmonella*-Stämmen (Sittka *et al.*, 2007) beobachtet; nicht jedoch in *Neisseria gonorrhoeae* (Dietrich *et al.*, 2009), welches ebenfalls Typ IV Pili-vermittelte Motilitätsmechanismen nutzt. Besonders ausgeprägt waren die Pathogenitäts-Defekte in *Brucella abortus* (Robertson & Roop, 1999) und dem Cholera-Erreger *Vibrio cholerae* (Ding *et al.*, 2004). Innerhalb der Gattung *Vibrio* konnte zudem für die ebenfalls pathogene Spezies *V. parahaemolyticus* eine Rolle von Hfq in der Pathogenität berichtet werden (Nakano *et al.*, 2008). In Vibrionen wurde weiterhin ein Zusammenhang zwischen sRNA-vermittelter Regulation des *Quorum-Sensing* und Hfq nachgewiesen (Lenz *et al.*, 2004; Tu & Bassler, 2007). Anhand anderer *in vivo*-Modellsysteme wurde noch für eine Reihe weiterer pathogener Vertreter der Proteobakterien eine wichtige Rolle von Hfq auf die Virulenz beobachtet (Übersicht in Chao & Vogel, 2010). Als bislang einziges Gram-positives Bakterium zeigte *Listeria monocytogenes* im *in vivo*-Modell eine Relevanz des Hfq-Proteins für die Virulenz (Christiansen *et al.*, 2004).

Hinsichtlich der Stresstoleranz wurden ebenfalls in zahlreichen, untersuchten Bakterien Effekte infolge der genetischen *hfq*-Inaktivierung berichtet. So spielt Hfq insbesondere im Hinblick auf die Empfindlichkeit gegenüber oxidativem Stress, Nährstofflimitation, Osmolaritäts-Schwankungen, Temperaturstress und pH-Schwankungen in verschiedenen

pathogenen Organismen (s.o.) in unterschiedlicher Ausprägung eine wichtige Rolle (Chao & Vogel, 2010).

## 1.7 Riboregulation in Cyanobakterien

Für die Wahrnehmung und Weiterleitung äußerer Signale nutzen Cyanobakterien eine Vielzahl unterschiedlicher Zwei-Komponenten-Systeme (Phosphotransfer-Kaskaden), (aktuelle Übersicht in Ashby & Houmard, 2006; Montgomery, 2007) sowie Serin/Threonin-Kinasen (Zhang *et al.*, 2007) und sekundäre Botenstoffe. Darüber hinaus sind in Cyanobakterien zahlreiche, funktionell diverse Transkriptions- und Sigmafaktoren (regulatorische Untereinheiten der RNA-Polymerase) bekannt, welche infolge äußerer wie innerer Stimuli die Transkription bestimmter Gruppen von Genen steuern (Asayama, 2006; Osanai *et al.*, 2008).

Von den ~200 experimentell in diversen Bakterien (v.a. *Enterobacteriaceae*, *Vibrio*, *Pseudomonas* und Gram-positiven Arten) nachgewiesenen sRNAs wurden bislang ausschließlich Orthologe in Organismen aus der jeweiligen phylogenetischen Nachbarschaft identifiziert, nicht jedoch in Cyanobakterien (Livny *et al.*, 2008). Angesichts der vergleichsweise kurzen Reaktionszeit zwischen Stresssignal und sRNA-vermittelter Stressantwort (Gottesman, 2004) liegt die Vermutung nahe, dass auch Cyanobakterien über ein umfangreiches Repertoire an riboregulatorischen Mechanismen verfügen.

Erstmals entdeckten Csiszár und Mitarbeiter bereits 1987 im Rahmen von Transkriptionsanalysen eine cyanobakterielle asRNA innerhalb des Gasvesikel-Operons *gvpABC* von *Calothrix* PCC 7601 (Csiszár *et al.*, 1987). Ein ähnlicher Zufallsfund war die asRNA  $\alpha$ -*furA* in *Anabaena* PCC 7120 (von hier an *Anabaena*), welche die mRNA des eisenabhängigen Transkriptionsregulators FurA (*ferric uptake regulator*) über dessen volle Länge komplementär abdeckt.  $\alpha$ -*furA* entsteht durch das „Durchlesen“ des benachbarten Gens *alr1690*. Ist dieser Mechanismus unterbrochen, kommt es zu einer Zunahme der FurA-Expression, demnach  $\alpha$ -*furA* direkt zur Regulation des zellulären Gehalts der mRNA beiträgt (Hernández *et al.*, 2006). Eine ebenfalls auf die Eisenstress-Antwort wirkende asRNA aus *Synechocystis* wird unten näher besprochen.

# 1 EINLEITUNG

---

Im Rahmen der ersten systematischen Suche nach Riboregulatoren in Cyanobakterien führten vergleichende Analysen der intergenischen Regionen unterschiedlicher mariner Stämme der Gattungen *Prochlorococcus* und *Synechococcus* zur Identifizierung von sieben sRNAs, die als Yfr1-Yfr7 bezeichnet wurden (*cyanobacterial functional RNA*; Axmann *et al.*, 2005). Von besonderem Interesse ist dabei Yfr1, dessen kodierender Bereich in den Genomen nahezu aller Cyanobakterien - mit Ausnahme einiger an Schwachlicht adaptierter Stämme der Gattung *Prochlorococcus* - hoch-konserviert ist. In den meisten Stämmen zeigt sich zudem eine Konservierung der genomischen Nachbarschaft der *yfr1*-Gene, die in diesen Fällen von den Loci *guaB* und *trxA* flankiert werden. Dies trifft dagegen in *Synechocystis* nur auf *trxA* zu, während dieses Syntenie-Merkmal z.B. in *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (*T. elongatus*) komplett fehlt. Northern Blot-Analysen konnten zudem große Transkriptmengen von Yfr1 in sieben unterschiedlichen cyanobakteriellen Stämmen nachweisen (Voß *et al.*, 2007). Analysen einer *yfr1*-Insertionsmutante in *Synechococcus elongatus* PCC 6301 (*S. elongatus*) weisen auf eine wichtige Funktion dieser sRNA für das Wachstum unter diversen Stressbedingungen hin (Nakamura *et al.*, 2007). Im Gegensatz zu diesem Ortholog ließ sich das *yfr1*-Gen in *Synechocystis* nicht deaktivieren (unveröffentlichte Daten; Dienst & Wallner), was - auch in Anbetracht der zellulären Abundanz des Transkripts - auf eine essenzielle gesamtphysiologische Relevanz von Yfr1 in diesem Organismus hindeutet.

Der erste systematische Ansatz in nicht-marinen Cyanobakterien erfolgte durch vergleichende Genomanalysen der Modellorganismen *Synechocystis*, *S. elongatus*, *T. elongatus* und des toxin-produzierenden Stamms *Microcystis aeruginosa* NIES-843. In dieser Arbeit wurde u.a. eine sRNA-Familie definiert, deren Mitglieder sich durch eine starke Konservierung der Nukleotid-Sequenzen sowie ihrer vorhergesagten Sekundärstrukturen kennzeichnen. Diese Yfr2-Familie erscheint in Cyanobakterien weithin konserviert, zumal einige Vertreter (Yfr2-5) bereits zuvor in den marinen Stämmen beschrieben wurden (s.o.; Axmann *et al.*, 2005; Steglich *et al.*, 2008). Durch exemplarische Northern Blot-Analysen wurden in *Synechocystis* hohe Transkriptmengen (ähnlich dem Yfr1-Niveau) der drei Varianten Yfr2a, Yfr2b und Yfr2c nachgewiesen. Einige konservierte Sekundärstruktur-Motive der Yfr2-Familie deuten interessanterweise auf eine Interaktion dieser sRNAs mit Proteinen hin (Voß *et al.*, 2009). Ein Beispiel für eine proteinbindende sRNA ist die in Bakterien weit verbreitete CsrB- (*carbon*



*storage regulator B*) RNA, welche durch antagonistische Bindung an das globale posttranskriptionelle Regulatorprotein CsrA dessen inhibitorische Interaktion mit verschiedenen mRNAs verhindert (Babitzke & Romeo, 2007). Eine vergleichbare (oder auch andersartige) Interaktion/Funktion wurde für die Yfr2-RNAs jedoch bislang nicht nachgewiesen. *In vivo*-Analysen des Yfr2a-Promotors dagegen zeigten, dass dessen Aktivität abhängig von den Umgebungsbedingungen, insbesondere der Lichtintensität und wahrscheinlich der Temperatur ist. So weist die Lichtstress-induzierte Transkription von Yfr2a auf eine spezifische oder allgemeine Funktion innerhalb der zellulären Stressantwort von *Synechocystis* hin.

Kürzlich wurde mithilfe einer Kombination aus bioinformatischen Vorhersagen und *Tiling-array*-Analysen des Transkriptom von *Synechocystis* eine Reihe neuer, z.T. stark akkumulierender sRNAs sowie v.a. asRNAs beschrieben und teilweise hinsichtlich ihrer Expressionsprofile charakterisiert (Georg *et al.*, 2009). Die Expression einiger der in dieser Arbeit identifizierten sRNAs werden ebenfalls bei Lichtstress induziert bzw. reprimiert. Für z.B. eine dieser asRNAs gibt es Hinweise auf eine Funktion bei der Prozessierung des (ribosomalen) L11-Operons. Die Autoren diskutieren schließlich eine zentrale Rolle von chromosomal kodierten asRNAs innerhalb regulatorischer Netzwerke in (Cyano)bakterien. Demnach wären asRNAs an der Regulation von circa 10 % aller Gene in *Synechocystis* beteiligt.

### **IsrR – ein Beispiel für *antisense*-Regulation in Cyanobakterien**

In *Synechocystis* wurde ein *sense-antisense*-Mechanismus entdeckt, der auf posttranskriptioneller Ebene die Akkumulation des Eisenstress-Proteins IsiA (*iron stress induced protein A*) reguliert (Dürring *et al.*, 2006). IsiA ist ein chlorophyllbindendes Protein, dessen Expression bei Eisenmangel sowie bei Licht-, Salz- und oxidativem Stress induziert wird. Der kodierende Bereich von IsiA liegt innerhalb des *isiAB*-Operons, dessen Expression durch das Repressorprotein FurA sowie durch bislang unbekannte aktivierende Faktoren reguliert wird (Ghassemian & Straus, 1996; Kunert *et al.*, 2003). Im Rahmen von *isiA*-Expressionsanalysen entdeckten Dürring und Mitarbeiter (2006) die asRNA IsrR (*iron stress repressed RNA*), die auf dem Gegenstrang des *isiA*-Gens kodiert und als 177 Nukleotide langes Transkript exprimiert wird. Weiterführende Analysen ergaben zudem, dass IsrR bei optimalen Wachstumsbedingungen konstitutiv in großen Mengen akkumuliert und unter Eisenlimitation

sowie anderen IsiA-induzierenden Stressbedingungen ein inverses Akkumulationsverhalten gegenüber *isiA* zeigt. Untersuchungen von *Synechocystis*-Mutanten mit modifizierten IsrR-Gehalten lieferten ferner deutliche Hinweise auf eine IsrR-vermittelte post-transkriptionelle Regulation der IsiA-Expression. So hatte die Überexpression von IsrR eine verzögerte und insgesamt reduzierte Anreicherung von IsiA unter den gegebenen Stressbedingungen zur Folge. Eine artifizielle, *antisense*-basierte Abreicherung des zellulären IsrR-Gehaltes führte dagegen zu einer frühzeitigen und insgesamt stärkeren Akkumulation von IsiA (Dühring *et al.*, 2006). Es stellte sich - auch angesichts der konstitutiv hohen zellulären Transkript-Mengen von IsrR - jedoch die Frage nach dem biologischen Zweck dieser post-transkriptionellen Kontrollinstanz (neben der Transkriptionskontrolle durch FurA).

Auf der Basis mathematischer Modellierung, gestützt durch semi-quantitative Analysen des zeitlichen Verlaufs der IsrR- und *isiA*-Transkriptakkumulationen, konnten im Vorfeld der vorliegenden Arbeit theoretische Voraussagen über den funktionellen Einfluss asRNA-basierter Regulation auf die Stressantwort in *Synechocystis* getroffen werden (Legewie *et al.*, 2008). Demnach bewirkt IsrR bei z.B. anhaltendem Eisenmangel durch kompetitive Inhibierung und regulierte Degradation eine zeitliche Verzögerung der *isiA*-Transkriptakkumulation und etabliert dadurch einen zeitlichen Schwellenwert zur Differenzierung zwischen Kurz- und Langzeit-Stimuli. Umgekehrt gewährleistet IsrR bei Rückführung der Zellen in eine optimale Umgebung (in diesem Beispiel durch ein erneutes Eisen-Angebot) eine rapide Abnahme der zellulären *isiA*-Transkriptmenge. Auf diese Weise wird die energetisch aufwändige Akkumulation und Translation der *isiA*-mRNA zeitlich präzisiert und auf den tatsächlichen zellulären, stressbedingten Bedarf abgestimmt.

## 1.8 Hfq in Cyanobakterien

Im Rahmen erster Untersuchungen zur phylogenetischen Verteilung von Hfq-Proteinen wurde mithilfe einer BLAST-Suche (auf der Basis der abgeleiteten Aminosäuresequenzen) in circa der Hälfte der 140 damals in der NCBI-Datenbank geführten bakteriellen Genome je mindestens ein homologer, Hfq-kodierender Locus identifiziert (Sun *et al.*, 2002). Während z.B. in nahezu allen  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Proteobakterien Orthologe gefunden wurden, schienen Cyanobakterien neben einigen weiteren phyletischen Gruppen jedoch kein Hfq zu besitzen. Im Hinblick auf die Sequenzkonservierung der Hfq-Orthologe war jedoch auffällig, dass das

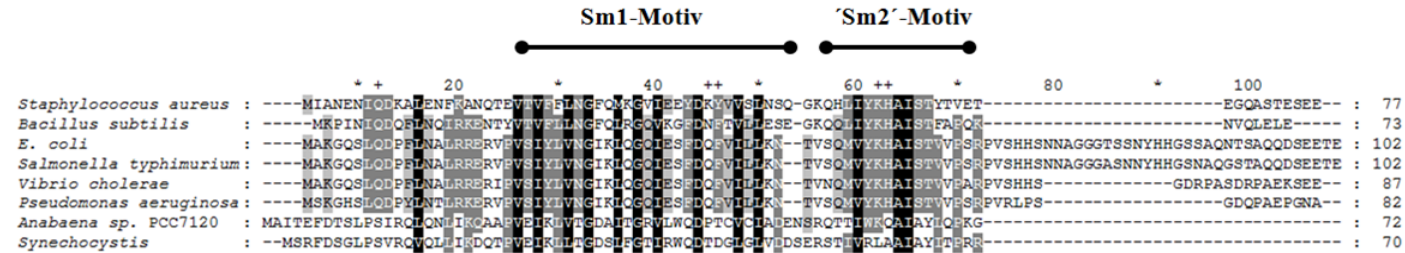
## 1 EINLEITUNG

---

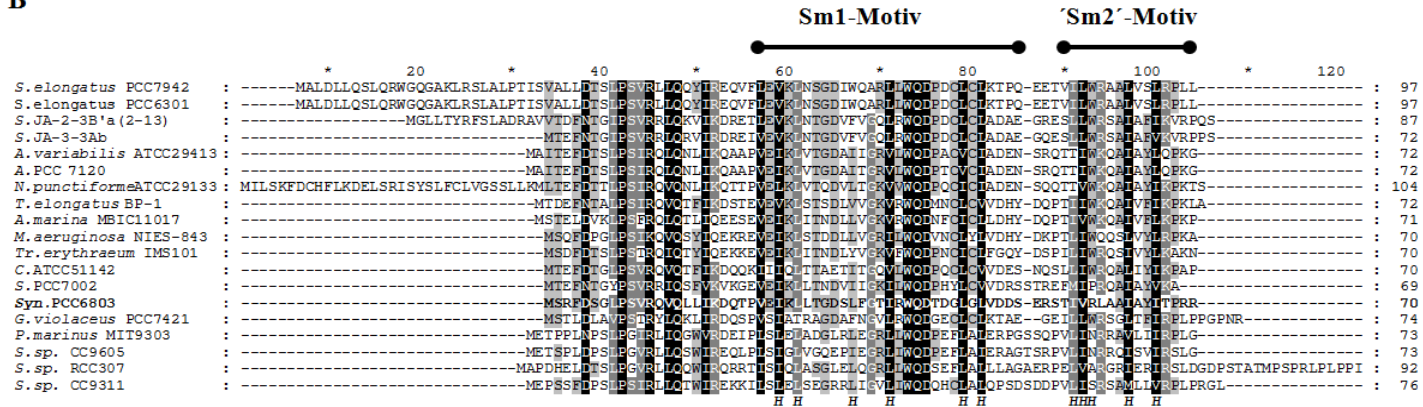
Sm-Motiv (Sm1 + 'Sm2') lediglich vier bis sieben hoch-konservierte Aminosäurereste enthält, welche von einem charakteristischen Muster hydrophober Aminosäurereste umgeben ist (siehe Abschnitt 1.4). Die Sequenzähnlichkeit innerhalb der Sm-Familie erschien insgesamt relativ gering, und selbst hinsichtlich der konservierten, an der RNA-Bindung in *Staphylococcus* beteiligten Lys-His-Folge im 'Sm2'-Motiv zeigten sich Varianzen zwischen paralogen Sequenzen innerhalb eines Organismus. Daher stellte sich die Frage, inwieweit ein einzig auf der Aminosäuresequenz-Konservierung basierende BLAST-Ansatz ausreicht, um alle bakteriellen Mitglieder der Hfq-Familie zu erfassen. Valentin-Hansen und Mitarbeiter (2004) ergänzten die zuvor durchgeführten Standard-BLAST-Analysen (Sun *et al.*, 2002) durch eine gezielte Suche nach konservierten Motiven und Sequenzmustern unter Berücksichtigung von Sequenzlänge und -ähnlichkeit. Dabei identifizierten die Autoren zunächst ein Hfq-Homolog in dem filamentösen Cyanobakterium *Anabaena*. Darauf folgende BLAST-Analysen wiesen schließlich Hfq-Homologe in vielen weiteren Cyanobakterien nach. Aus dem Sequenzvergleich zwischen Hfq-Proteinen aus *Synechocystis* und *Anabaena* sowie verschiedenen „konventionellen“ Varianten (Abbildung 4A) geht hervor, dass innerhalb beider cyanobakterieller Sm-Motive insgesamt 12 der charakteristischen hydrophoben Aminosäurereste hoch-konserviert sind. Diese sind zudem - mit den Ausnahmen weniger Reste - auch in weiteren Cyanobakterien hoch-konserviert bzw. konservativ substituiert (Abbildung 4B). Ferner zeigte sich, dass einige der ansonsten hoch-konservierten Aminosäurereste des Sm1-Motivs in den cyanobakteriellen Sequenzen fehlten; innerhalb des 'Sm2'-Motivs findet sich in *Synechocystis* zudem der untypische Sequenzabschnitt Leu-Ala [LA] (anstelle der funktionellen Lys-His-Reste [KH] konventioneller Hfq-Sequenzen; siehe Abbildung 4B). In vielen anderen cyanobakteriellen Varianten ist dieser Abschnitt jedoch durch Lys/Arg-Gln [K/RQ] substituiert. Eine auffällige Besonderheit cyanobakterieller Hfq-Sequenzen ist die hoch-konservierte Trp-Gln-Asp [WQD]-Signatur innerhalb des Sm1-Motivs. Diese Aminosäurereste sind absolut invariabel (siehe Abbildung 4B). Insgesamt beträgt die Sequenzidentität zwischen den cyanobakteriellen Hfq-Proteinen (am Beispiel der Variante aus *Synechocystis*) und jenen aus *Staphylococcus* bzw. *E. coli* 20 % und 23 %.

# 1 EINLEITUNG

A



B



**Abbildung 4: Vergleich der Aminosäuresequenzen bakterieller Hfq-Proteine. (A)** Sequenzen aus *Synechocystis* und *Anabaena* im Vergleich mit Hfq aus *Staphylococcus*, *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *Salmonella*, *Vibrio cholerae* und *Pseudomonas*. An der RNA-Bindung (in *Staphylococcus*) beteiligte Aminosäurereste sind oberhalb der Sequenzen durch „+“ gekennzeichnet (basierend auf Valentin-Hansen *et al.*, 2004). **(B)** Vergleich der Hfq-Sequenzen aus diversen Cyanobakterien. Die in Cyanobakterien weitgehend konservierten hydrophoben Reste der Sm-Motive sind unterhalb der Sequenzen durch „H“ markiert. Konservierungsgrad: Komplette konservierte Aminosäurereste (100 %), weiß mit schwarzem Hintergrund; hoch konservierte Aminosäurereste (>80 %), weiß mit dunkelgrauem Hintergrund; schwach konservierte Aminosäurereste (>60 %), schwarz mit hellgrauem Hintergrund. S., *Synechococcus*; A., *Anabaena*, N., *Nostoc*; T., *Thermosynechococcus*; Ac., *Acaryochloris*; M., *Microcystis*; Tr., *Trichodesmium*; C., *Cyanothece*; Syn., *Synechocystis*; G., *Gloeobacter*; P., *Prochlorococcus*. Die Benennung der Cyanobakterien-Arten basiert auf der aktuellen Nomenklatur der Cyanobase-Datenbank (<http://genome.kazusa.or.jp/cyanobase>; Stand: 17.02.2010)

## 1.9 Phototaktische Motilität in Cyanobakterien

Neben anderen photosynthetischen Mikroorganismen hat auch *Synechocystis* die Fähigkeit entwickelt, sich in Abhängigkeit von der herrschenden Lichtqualität bzw. -quantität gerichtet auf festen Oberflächen zu bewegen (Choi *et al.*, 1999). Diese lichtinduzierte Motilität (Phototaxis) ist für diese Bakterien bedeutend um sich innerhalb ihrer Umgebung optimal zum Licht zu positionieren. und könnte daher auch für die Fitness der Cyanobakterien innerhalb von Lebensgemeinschaften wie Biofilmen oder mikrobiellen Matten bedeutend sein (Bhaya, 2004).

Der Bewegungsmechanismus von *Synechocystis* wird als *twitching* (oder *gliding*) *motility* bezeichnet und ist im Zusammenhang mit der Chemotaxis am besten in dem Modellorganismus *Pseudomonas* untersucht (Übersicht in Kato *et al.*, 2008; Mattick, 2002). Strukturell liegen diesem Mechanismus die Typ IV Pili zu Grunde. Diese Zellfortsätze sind zudem essenziell für die natürliche Kompetenz zur Aufnahme exogener DNA-Moleküle (Nakasugi *et al.*, 2006; Yoshihara *et al.*, 2001) und spielen (in einigen pathogenen Bakterien) eine wichtige Rolle in der Zell-Zell-Adhäsion (Nudleman & Kaiser, 2004). Die Untereinheiten der Typ IV Pili setzen sich im Wesentlichen aus dem Strukturprotein Pila (Pilin) zusammen. Die Bewegung erfolgt durch einen periodischen, ATP-abhängigen Extensions-Retraktions-Mechanismus der Pili, an dem die zwei hoch-konservierten Motorproteine PilB und PilT (PilB1 bzw. PilT1/PilT2 in *Synechocystis*; Bhaya *et al.*, 2000; Okamoto & Ohmori, 2002) beteiligt sind. Über den molekularen Regulationsmechanismus der phototaktischen Bewegung - von der Lichtperzeption bis zur Expression der Strukturkomponenten - ist in *Synechocystis* im Detail bislang wenig bekannt. Basierend auf Mutagenese-Studien konnte in diesem Zusammenhang jedoch eine Reihe funktioneller Gene

## 1 EINLEITUNG

---

identifiziert und z.T. charakterisiert werden (Bhaya *et al.*, 2000; Bhaya *et al.*, 2001b; Yoshihara *et al.*, 2001; Yoshihara & Ikeuchi, 2004). Diese Gene sind ähnlich den Chemotaxis-Genen der Enterobakterien zumeist in Operonen organisiert. Darunter finden sich die drei homologen *tax* (Phototaxis)-Loci *tax1-tax3*, welche - mit Ausnahme von *tax3*, dem ein Histidin-Kinase-Gen fehlt - alle Komponenten einer Chemotaxis-Signaltransduktionskaskade kodieren. Unter diesen ist auch ein Gen für das phytochrom-ähnliche Protein TaxD1, welches wahrscheinlich als Photorezeptor in der positiven Phototaxis, d.h. der Zellbewegung in Richtung der Lichtquelle, eine wichtige Rolle spielt (Bhaya *et al.*, 2001a; Yoshihara *et al.*, 2000). Weitere konservierte, an der Signaltransduktion beteiligte Faktoren werden u.a. innerhalb der genomisch gruppierten Loci *pilG-pilJ*-, *pilL-C*, und *pilL-N* kodiert (Yoshihara *et al.*, 2002). Essenziell für die Pilus-Biogenese sind zudem die Loci *pilC* sowie *pilM-pilQ*, die putative Membranproteine kodieren und PilD, welches als putative Präpilin-Peptidase/Pilin-Methylase vermutlich elementar an der Reifung der Pili beteiligt ist (Bhaya *et al.*, 2000). Neben *pilA1* (s.o.) enthält das Genom von *Synechocystis* zudem kodierende Bereiche für elf weitere Pila-ähnliche Proteine. Für drei dieser homologen Proteine, deren kodierenden Bereiche in dem Operon *slr2015-slr2018* liegen, konnte ebenfalls eine essenzielle Funktion in der Motilität nachgewiesen werden (Bhaya *et al.*, 2001b; Yoshihara & Ikeuchi, 2004).

Als weitere regulatorische Faktoren für die phototaktische Motilität bzw. Pilus-Biogenese konnten die Serin/Threonin-Kinasen SpkA (Kamei *et al.*, 2001) und SpkB (Kamei *et al.*, 2003) sowie die putative Proteinkinase Slr1443 (Kim *et al.*, 2004) und Komponenten der cAMP-vermittelten Signaltransduktion identifiziert werden. So führte die genetische Inaktivierung sowohl der Adenylat-Zyklase Cya1 als auch des cAMP-bindenden Transkriptionsfaktors Sycrpl in *Synechocystis* zu einer starken Beeinträchtigung der Motilität (Bhaya *et al.*, 2006; Terauchi & Ohmori, 1999; Yoshimura *et al.*, 2002b). Die Mutante  $\Delta$ *sycrpl* zeigte zudem eine reduzierte Pili-Dichte auf der Zelloberfläche. Angesichts experimenteller Hinweise auf eine durch Blaulicht (450 nm) stimulierte, Cya1-abhängige Akkumulation des zellulären cAMP-Gehalts wird der direkter Einfluss einer blaulichtabhängigen Signaltransduktion für die Aktivierung der Pilus-Biogenese diskutiert (Terauchi & Ohmori, 2004).

### 1.10 Zielsetzung dieser Arbeit

Über die Rolle riboregulatorischer Mechanismen in Cyanobakterien gab es zu Beginn der vorliegenden Arbeit nur wenige Informationen. Neben einzelnen zufällig identifizierten, regulatorisch wirksamen asRNA-Molekülen war zu diesem Zeitpunkt lediglich eine kleine Gruppe potenzieller sRNAs (Yfr1-7) bekannt (siehe Abschnitt 1.7), für deren zelluläre Funktion bis dahin keine experimentellen Daten vorlagen.

Als ein wichtiger Aspekt für weiterführende, umfassende Untersuchungen des Potenzials sRNA-vermittelter Genregulation in Cyanobakterien galt die Frage nach der funktionellen Relevanz der orthologen Hfq-Proteine in diesen Organismen. In diesem Zusammenhang sollte eine *hfq*-Inaktivierungsmutante des cyanobakteriellen Modellorganismus *Synechocystis* etabliert und einleitend durch physiologische Untersuchungen sowie durch *Microarray*-Analysen charakterisiert werden, um Hinweise auf die Angriffspunkte möglicher Hfq-vermittelter Riboregulation in Cyanobakterien zu bekommen. Im Mittelpunkt des Interesses stand dabei schließlich der potenzielle Einfluss von Hfq auf die bislang wenig verstandene Regulation der phototaktischen Motilität von *Synechocystis*.

Ein weiteres Ziel war es, durch vergleichende Expressionsanalysen mit einem speziellen *Tiling-array*, Hfq-abhängig akkumulierende sRNAs in *Synechocystis* zu identifizieren und anschließend funktionell zu untersuchen.

Weiterhin sollte das Hfq-Protein aus *Synechocystis* - angesichts der im Vergleich mit (u.a.) enterobakteriellen Orthologen insgesamt schwachen Sequenzkonservierung - hinsichtlich der Konservierung struktureller und funktioneller Eigenschaften bereits charakterisierter Hfq-Varianten untersucht werden. Entsprechende *in vitro*-Analysen sollten mithilfe eines heterolog exprimierten Hfq-Proteins erfolgen und durch genetische Komplementierungsversuche ergänzt werden.

## 2 Ergebnisse

In Rahmen dieser Arbeit wurden erstmals umfassende funktionelle und strukturelle Untersuchungen zu einem cyanobakteriellen Ortholog des Regulatorproteins Hfq im Modellorganismus *Synechocystis* durchgeführt. Dieses Kapitel stellt die erarbeiteten Daten dar und ist nach den unterschiedlichen Themenkomplexen und methodischen Ansätzen in drei Hauptabschnitte gegliedert.

Der erste Abschnitt beschäftigt sich mit der physiologischen und molekularen Charakterisierung einer Mutante des genomischen Locus *ssr3341*, welcher erstmalig von Valentin-Hansen und Mitarbeitern (2004) als putatives *hfq*-Gen identifiziert wurde. Im zweiten Teil folgen Strukturanalysen eines gereinigten rekombinanten Hfq-Proteins aus *Synechocystis* (Syn-Hfq) sowie *in vitro*-Bindungsstudien desselben mit ausgewählten RNA-Molekülen. Der letzte Abschnitt behandelt die *Tiling-array*-basierte Identifikation Hfq-abhängig exprimierter putativer sRNAs (Hpr) in *Synechocystis* und liefert erste Hinweise auf eine Funktion von Hpr3.

### 2.1 Funktionelle Analyse des *hfq*-Orthologs in *Synechocystis*

#### 2.1.1 Konstruktion einer $\Delta hfq$ -Mutante

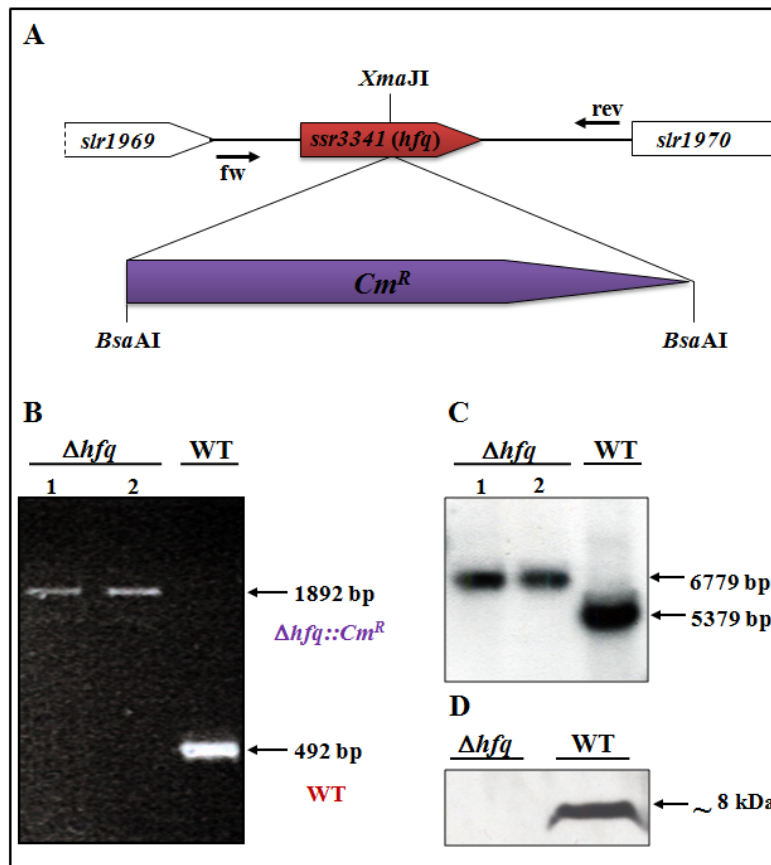
Im Vorfeld dieser Arbeit wurde der kodierende Bereich des putativen *hfq*-Gens *ssr3341* (von hier an *hfq*) im Genom von *Synechocystis* durch Insertionsmutagenese deaktiviert. Die entsprechenden Klonierungsarbeiten wurden im Wesentlichen von Dr. Ulf Dühring und Gisa Baumert (Institut für Biologie, Humboldt-Universität zu Berlin) durchgeführt.

Dabei wurde zunächst der genannte Locus inklusive der putativen Promotor- und Transkriptionsterminatorregionen der flankierenden Sequenzbereiche in den Vektor pGEM-T (Promega) ligiert. Anschließend erfolgte die Insertion einer Chloramphenicol(Cm)-Resistenzgen-Kassette (Cm<sup>R</sup>) in *sense*-Orientierung in die *Xma*II Schnittstelle des offenen Leserahmens von *hfq*. Ein Schema dieser Strategie ist in Abbildung 5A dargestellt. Mit diesem Konstrukt wurde ein motiler Wildtyp-Stamm von *Synechocystis* transformiert (Ermakova *et al.*, 1993), und die resultierenden Klone wurden auf Cm-haltigem Festmedium selektiert. Die vollständige Segregation der Wildtyp-Genomkopien in der Mutante  $\Delta hfq$



## 2 ERGEBNISSE

wurde mithilfe von PCR- und Southern Blot-Analysen nachgewiesen (Abbildung 5B,C). Ergänzend konnte durch Immunoblot-Analysen mit einem spezifischen Antiserum kein Hfq-Protein in der Mutante detektiert werden (Abbildung 5D).



**Abbildung 5: Genetische Inaktivierung von *hfq* in *Synechocystis*.** (A) Schematische Darstellung der Mutagenese von *ssr3341* (*hfq*). Die Lage der für die Amplifikation des *hfq*-Gens und dessen flankierender Bereiche (100 bp stromaufwärts; 179 bp stromabwärts) eingesetzten Primer (*fw*, *ssr3341-fw*; *rev*, *ssr3341-rev*) ist mit Pfeilen markiert. Die in der Klonierung verwendeten Restriktionsorte sind gekennzeichnet. (B, C) Der Nachweis der vollständigen Segregation von WT-Genomkopien erfolgte per PCR mit dem Primerpaar *ssr3341-fw/ssr3341-rev* sowie per Southern Blot-Analyse von *Hind*III/*Bgl*II-verdauter genomischer DNA unter Verwendung einer *hfq*-spezifischen [ $\alpha^{32}$ P]-markierten DNA Sonde. Dargestellt ist ein 0,8 %iges Agarosegel mit Ethidiumbromidfärbung der PCR-Produkte (B) bzw. ein Autoradiogramm der Southern Blot-Analyse (C) für jeweils zwei repräsentative Klone der *Δhfq*-Mutante. (D) Immunoblot-Analyse zum Nachweis der vollständigen Inaktivierung auf Proteinebene. Lösliche Zellextrakte wurden proteinnormiert (5  $\mu$ g) in einem 16 %igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Der immunologische Nachweis erfolgte mit einem spezifischen Hfq-Antiserum. Die Detektion wurde unter Verwendung eines anti-Kaninchen-HRP-Konjugates im Chemilumineszenz-Assay durchgeführt.

---

## 2 ERGEBNISSE

---

### 2.1.2 Physiologische Charakterisierung der $\Delta hfq$ Mutante von *Synechocystis*

#### 2.1.2.1 Hfq hat keinen Einfluss auf das Wachstum unter diversen Lichtbedingungen

Die Inaktivierung des *hfq*-Gens rief in den meisten untersuchten Organismen phänotypisch schwerwiegende, z.T. pleiotrope negative Effekte, insbesondere im Hinblick auf Virulenz und Stresstoleranz der Bakterien hervor (siehe Abschnitt 1.6). Funktionelle Analysen zu homologen Hfq-Proteinen aus Cyanobakterien waren bis dahin nicht veröffentlicht. Angesichts der von pathogenen Bakterien stark abweichenden Lebensweise der Cyanobakterien - im Speziellen hinsichtlich des Bedarfs an Licht und atmosphärischem CO<sub>2</sub> - stellte sich eine zentrale Frage: Inwieweit existieren funktionell einerseits Parallelen zu enterobakteriellen Hfq-Varianten (allgemeine Stresstoleranz) und andererseits spezifische Ausprägungen (Regulation photosynthetischer Parameter) bei cyanobakteriellen Hfq-Orthologen ?

Daher wurden zunächst Analysen zum Wachstumsverhalten der  $\Delta hfq$  Mutante von *Synechocystis* unter verschiedenen Lichtbedingungen durchgeführt. Für die Darstellung vergleichender Wachstumskurven wurden Flüssigkulturen von WT und  $\Delta hfq$  unter Standardkulturbedingungen (28 °C, ca. 75  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) kontinuierlich mit Luft begast. Vor Versuchsbeginn wurden die Zelldichten der Kulturen mindestens einmal durch Verdünnung mit BG11-Medium angeglichen.

Aus dem Vergleich der Wachstumskurve von Wildtyp und Mutante geht hervor, dass die *hfq*-Inaktivierung unter Standardkultivierungsbedingungen keine Effekte auf das Wachstumsverhalten von *Synechocystis* ausübt (Abbildung 6). Ähnlich dem Wildtyp zeigt  $\Delta hfq$  in den ersten Tagen logarithmisches Wachstum, welches sich im Verlauf der neun Versuchstage nur langsam einem „Plateau“ annähert. Ähnlich dem Wildtyp zeigt die Mutante in den ersten Tagen logarithmisches Wachstum, welches sich im Verlauf der neun Versuchstage nur langsam einem „Plateau“ annähert. Entsprechende Verläufe wurden auch beobachtet, wenn das Wachstumsverhalten über einen längeren Zeitraum oder ausgehend von höheren Zelldichten analysiert wurde (nicht gezeigt). So wurden auch in den spätlogarithmischen und stationären Wachstumsphasen keine Defizite bei  $\Delta hfq$  festgestellt. Folglich ist insgesamt hinsichtlich der grundlegenden Wachstumsparameter unter definierten

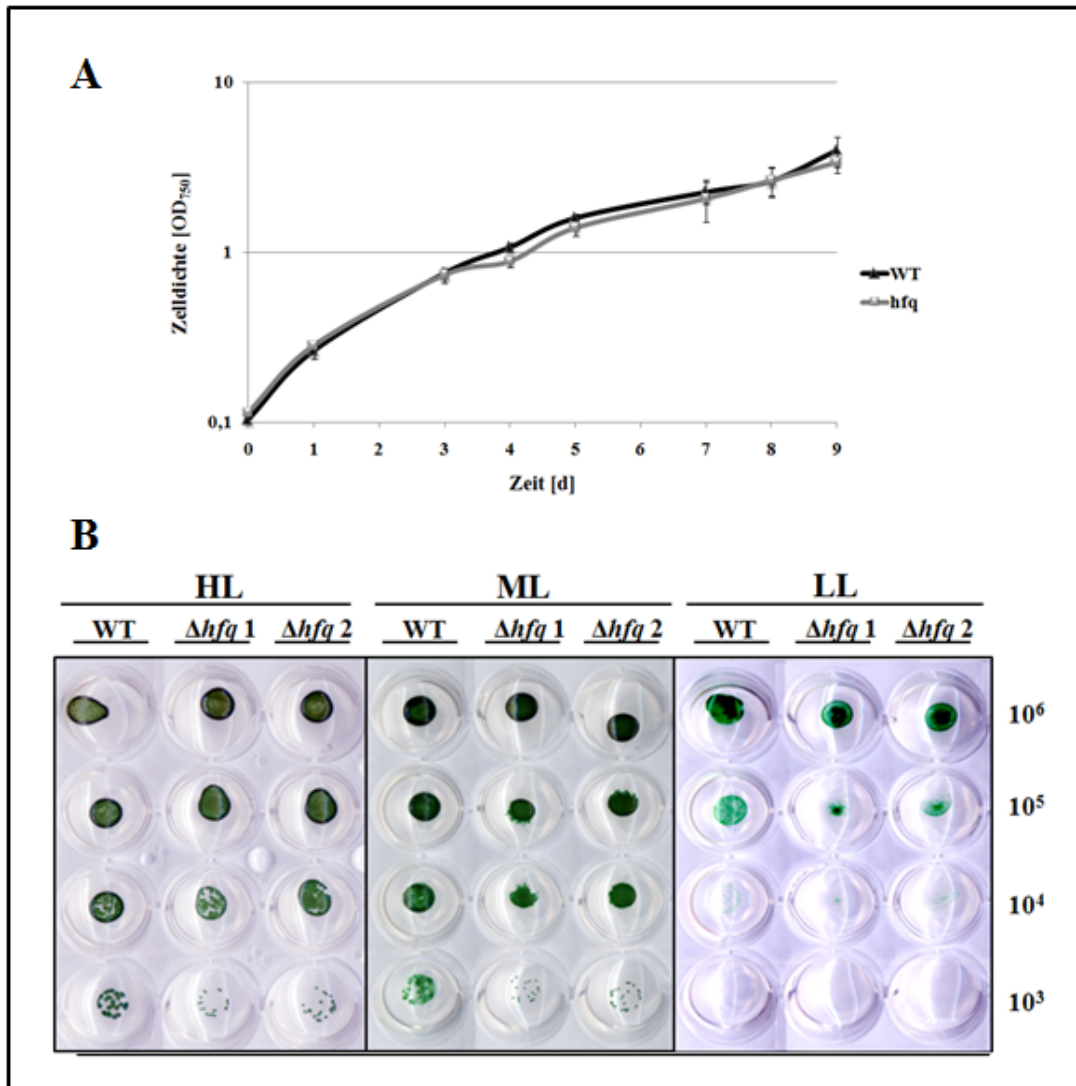
## 2 ERGEBNISSE

---

Standardbedingungen ein erster phänotypischer Unterschied zu den *hfg*-defizienten Mutanten von z.B. *E. coli* (Tsui *et al.*, 1994), *Vibrio cholerae* (Ding *et al.*, 2004) und *Pseudomonas* (Sonnleitner *et al.*, 2003) zu beschreiben.

Vergleichende Untersuchungen zum Wachstum bei diversen Lichtintensitäten wurden auf Agar-Festmedium in Zellkulturplatten durchgeführt. Dazu wurden Flüssigkulturen definierter Zelldichte auf den Agar aufgetragen und für zwei Wochen unter verschiedenen Lichtbedingungen bei 28 °C inkubiert. Um ggf. quantitative Unterschiede auf der Basis einzelner Kolonien darstellen zu können, wurde mit vierstufigen Verdünnungsreihen (je Faktor  $10^1$ ), ausgehend von einer Zelldichte von  $10^6$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$  gearbeitet. Abbildung 6B zeigt, dass weder unter Stark- (HL,  $\sim 150 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) noch unter Schwachlichtbedingungen (LL,  $< 30 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) eingeschränktes Wachstum bzw. beeinträchtigte Vitalität der  $\Delta hfg$ -Mutante zu beobachten sind. In der höchsten Verdünnungsstufe ( $10^3$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$ ) wurden für Wildtyp und  $\Delta hfg$  jeweils 18-20 Kolonien bei Starklicht und mittlerer Lichtintensität (ML,  $\sim 75 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) gezählt. Bei Schwachlicht ließen sich in der Verdünnungsstufe  $10^4$  noch Kolonien in größerer, nicht zählbarer Menge für Wildtyp und  $\Delta hfg$  nachweisen. Insgesamt fallen bei diesem Experiment unterschiedliche Koloniemorphologien zwischen Wildtyp und Mutante auf. Die distinkten, glattrandigen Kolonien von  $\Delta hfg$  sind auf den Verlust der Motilität zurückzuführen; ein Aspekt, der in Abschnitt 2.1.2.3 ausführlich besprochen wird.

## 2 ERGEBNISSE



**Abbildung 6: Wachstum von *Synechocystis* Wildtyp und  $\Delta hfq$  in Flüssigkultur sowie auf Festmedium bei unterschiedlichen Lichtintensitäten. (A) *Synechocystis* Wildtyp und  $\Delta hfq$  wurden bei 28 °C in BG11-Medium mit kontinuierlicher Luft-Begasung und bei einer Lichtintensität von  $\sim 75 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$  angezogen. Zu Versuchsbeginn wurde die Zelldichte auf  $\text{OD}_{750} = \sim 0,1$  eingestellt. Die Kultivierungsbedingungen wurden während des Versuchs konstant gehalten. (B) Wachstum von *Synechocystis* Wildtyp und von je zwei Klonen der  $\Delta hfq$ -Mutante unter diversen Lichtbedingungen. Flüssigkulturen der Konzentrationsstufen  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$  und  $10^3$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$  wurden zu je  $7 \mu\text{l}$  auf 0,75 % BG11-Agar aufgetragen und für neun Tage bei 28 °C und Lichtintensitäten von  $\sim 150$  (HL),  $\sim 75$  (ML) und  $< 30$  (LL)  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$  inkubiert. WT, Wildtyp.**

---

## 2 ERGEBNISSE

---

### 2.1.2.2 Wachstum unter Nährstoffmangel und abiotischen Stressbedingungen – erhöhte Thermotoleranz von $\Delta hfq$

In den vor dieser Arbeit untersuchten Organismen spielt Hfq eine globale Rolle in der zellulären Stressantwort, was u.a. auf dessen wichtigen Einfluss auf die Translation von  $\sigma^S$ , dem Sigma-Faktor der generellen Stressantwort (in *E. coli*) zurückgeführt wird (Muffler *et al.*, 1996). In Anbetracht dessen wurde in dieser Arbeit der Frage nachgegangen, ob die Inaktivierung von *hfq* in *Synechocystis* ähnliche Effekte auf dessen Wachstum unter ausgewählten Stressbedingungen hervorruft.

Entsprechend den in Abschnitt 2.1.2.1, beschriebenen Versuchen, wurde im Folgenden anhand des Wachstumsverhaltens der  $\Delta hfq$ -Mutante exemplarisch deren Toleranz gegenüber Salzstress, Stickstoffmangel und Glukose-Verfügbarkeit untersucht. Dazu wurden jeweils 7  $\mu$ l Flüssigkultur des Wildtyps sowie zweier Klone von  $\Delta hfq$  mit Zelldichten von  $10^3$ - $10^6$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$  auf entsprechend modifiziertes Festmedium aufgetragen und für neun Tage bei 28 °C und  $\sim 75 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$  inkubiert. Gegenüber keiner der gewählten Stressbedingungen zeigte sich eine herabgesetzte bzw. erhöhte Toleranz der Mutante im Vergleich zum Wildtyp. Die Untersuchung des mixotrophen Wachstums (mit 0,2 % Glukose) war insbesondere deshalb interessant, da in dieser Arbeit der D-Glukose sensitive (GS) Stamm von *Synechocystis* verwendet wurde. Entsprechende Versuche mit Glukosekonzentrationen von 1 % wiesen ebenfalls keine Defizite der Mutante nach. Weitere - hier nicht aufgeführte - Experimente, welche gleichfalls keine Effekte der *hfq*-Inaktivierung in *Synechocystis* darlegen konnten, untersuchten das Wachstum unter verschiedenen Lichtqualitäten (dunkelrot, grün, blau), im diurnalen Licht-Dunkel-Rhythmus sowie heterotrophes Wachstum (unter Lichtausschluss).

Da sich Cyanobakterien an schwankende Makronährstoffverfügbarkeit durch die Verschiebung der Verhältnisse von Pigmentgehalten bzw. Antennenkomplexen anpassen können (Übersicht in Grossman *et al.*, 1993; Schwarz & Forchhammer, 2005), sollte zudem der mögliche Einfluss der *hfq*-Inaktivierung auf diese Adaptationsmechanismen untersucht werden. In der Abwesenheit gebundenen Stickstoffs im Medium degradiert *Synechocystis* als nicht-diazotrophes Cyanobakterium zur Mobilisierung zelleigener Stickstoffressourcen

## 2 ERGEBNISSE

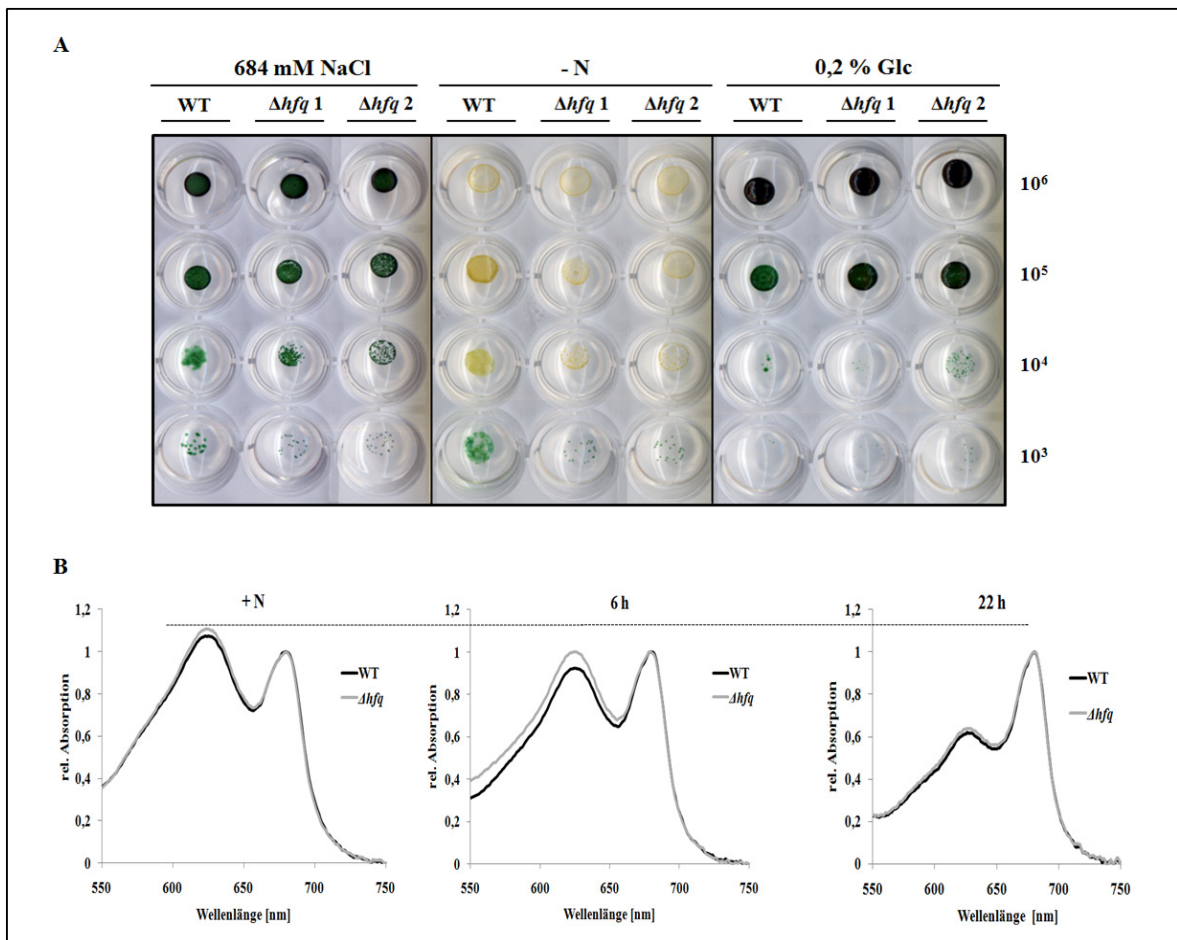
---

innerhalb eines Tages fast vollständig seine Phycobilisomen, die cyanobakteriellen Lichtsammelkomplexe (Richaud *et al.*, 2001). Dieses Phänomen lässt sich im Lichtabsorptionsspektrum anhand der abnehmenden Phycocyanin- (PC)-Absorption bei ~620-630 nm optisch verfolgen. Des Weiteren erscheinen die Kulturen nach wenigen Tagen chlorotisch, d.h. sie nehmen zunächst eine gelb-grüne, und später - wegen des zeitlich verzögerten, zusätzlichen Abbaus von Chlorophyll (Chl) *a* (Görl *et al.*, 1998) - eine gelbe Färbung an. Für die vergleichende Analyse der durch Stickstoffmangel induzierten Degradation der Phycobilisomen wurden Flüssigkulturen von Wildtyp und  $\Delta hfq$  während der logarithmischen Wachstumsphase sedimentiert und in nitratfreiem BG11-Medium resuspendiert. Die spektrale Lichtabsorption wurde zu definierten Zeitpunkten photometrisch gemessen (Abbildung 7B). Aus den gezeigten Spektren geht hervor, dass sich nach sechs Stunden eine leichte Verzögerung in der Abnahme der PC-Absorption in  $\Delta hfq$  abzeichnet. Die Berechnungen der PC/Chl-Verhältnisse (nach Myers *et al.*, 1980) ergaben für  $\Delta hfq$  zum Zeitpunkt 6 h gegenüber dem Wildtyp einen um ~11 % erhöhten Wert. Nach 22 Stunden gleichen sich diese Werte zwischen Wildtyp und Mutante wieder an (+ ~4 % in  $\Delta hfq$ ), und es ist in beiden Kulturen zu einem drastischen Abfall der PC-Absorption gekommen. Demnach löst der Stickstoffmangel keine deutlich abweichende physiologische Stressantwort  $\Delta hfq$  hervor, was sich durch den in Abbildung 7A dargestellten Wachstumsversuch auf nitratfreiem Festmedium bestätigt. Dort ist zu sehen, dass es in den getesteten Kulturen innerhalb von neun Tagen infolge des Stickstoffmangels gleichermaßen zu Chlorosen kommt und die Kolonien gelb erscheinen. Dieser Effekt ist bei einer Ausgangsdichte von  $10^3$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$  nicht erkennbar, da die geringen Ammonium-Mengen aus der Eisenquelle (~23  $\mu\text{mol l}^{-1}$  Ammoniumeisen(III)-citrat) des Mediums in dem gegebenen Zeitraum offenbar für die Stickstoffversorgung weniger Kolonien ausreicht.

Die oben beschriebene, scheinbar verlangsamte Kinetik der Phycobilisomen-Degradation sowie das temporär erhöhte PC/Chl-Verhältnis in  $\Delta hfq$  konnten in einem Wiederholungsexperiment nicht bestätigt werden. Diese Daten werden hier dennoch aufgeführt, um darauf hinzuweisen, dass ähnliche Beobachtungen mehrfach auch in anderen physiologischen Experimenten gemacht wurden. Häufig zeigte sich in Flüssigkulturen der  $\Delta hfq$ -Mutante im Vergleich zum Wildtyp eine schwache, jedoch deutlich sichtbare

## 2 ERGEBNISSE

Blaufärbung, welche sich jeweils im Absorptionsspektrum durch eine scheinbar erhöhte PC-Absorption (vgl. Abbildung 7B) widerspiegelte. In diesen Fällen betrug die Abweichungen der errechneten PC/Chl-Verhältnisse (nach Myers *et al.*, 1980) gleichwohl maximal 5 % (nicht gezeigt). Da diese Daten schwierig reproduzierbar waren, wurde dieser potenzielle Phänotyp auch angesichts seiner schwachen Ausprägung nicht weiter analysiert.



**Abbildung 7: Einfluss ausgewählter abiotischer Stressbedingungen auf Wachstum und Phycobilisomenabbau von *Synechocystis* Wildtyp und  $\Delta hfq$ -Mutante. (A)** Wachstum von *Synechocystis* Wildtyp und von je zwei Klonen der  $\Delta hfq$ -Mutante unter Salzstress (684 mM NaCl), Stickstoffmangel (-N) und mit Glukose (0,2 % Glc). Flüssigkulturen der Konzentrationsstufen  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$  und  $10^3$  Zellen  $ml^{-1}$  wurden zu je  $7\mu l$  auf 0,75 % BG11-Agar aufgetragen und für neun Tage bei  $28^\circ C$  und  $\sim 65 \mu mol$  Photonen  $m^{-2} s^{-1}$  inkubiert. **(B)** Lichtabsorptionsspektren ganzer Zellen in Flüssigkulturen von *Synechocystis* Wildtyp und  $\Delta hfq$  unmittelbar bevor (+N) und sechs (6h) bzw. 22 Stunden (22h) nach Überführung in stickstoffreies BG11-Medium. Die Spektren wurden auf die optische Dichte bei 750 nm sowie das Absorptionsmaximum von Chlorophyll *a* bei 680 nm normiert. Die graue, waagerechte Linie markiert die Höhe des Absorptionsmaximums bei  $\sim 625$  nm zu Versuchsbeginn. WT, Wildtyp.

## 2 ERGEBNISSE

---

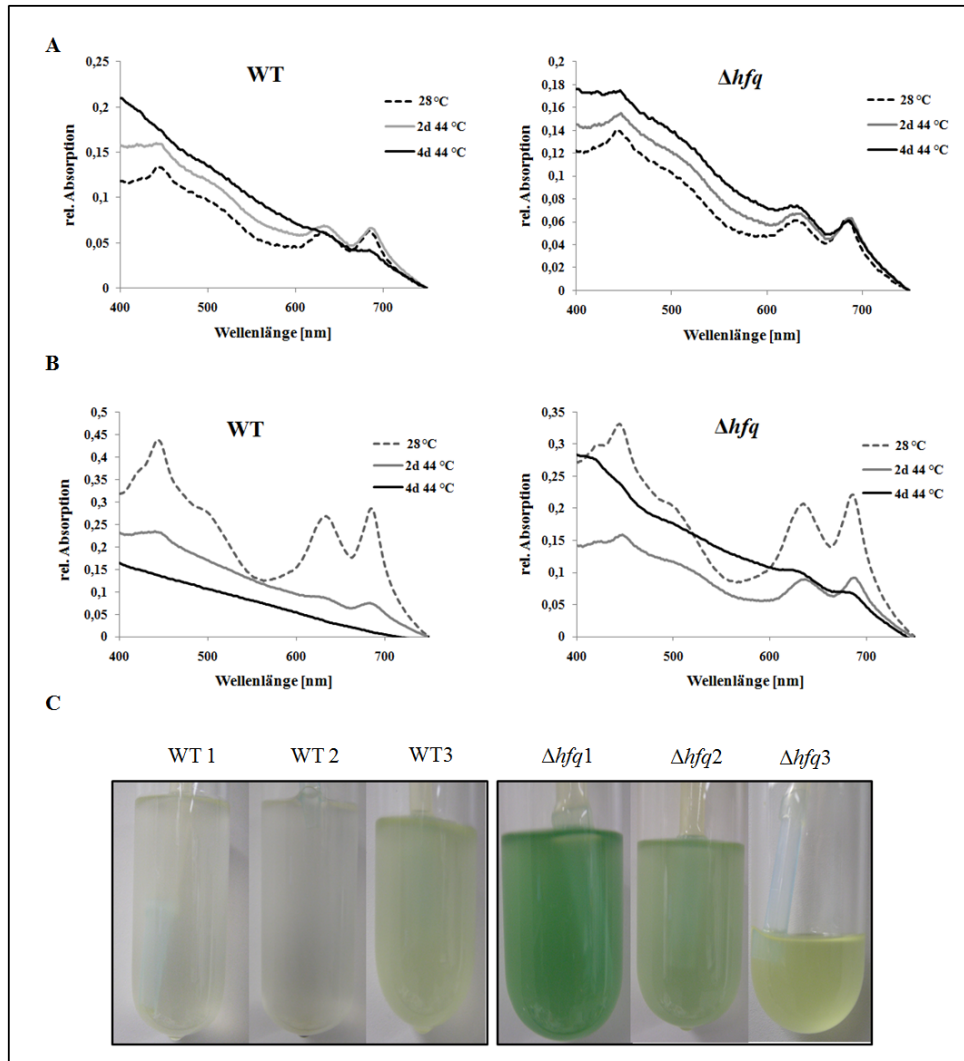
Einzig im Hinblick auf die Thermotoleranz von *Synechocystis* konnte ein schwacher stressbedingter Phänotyp von  $\Delta hfq$  beobachtet werden. Diverse Versuchsansätze zur Toleranz gegenüber kurzzeitigen, bis zu dreistündigen Temperaturerhöhungen (44 °C, 48 °C) hatten zunächst kein abweichendes Verhalten der Mutante nachweisen können. Der in dieser Arbeit verwendete Wildtyp-Stamm von *Synechocystis* erwies sich generell (auch bei höheren Lichtintensitäten) als relativ robust gegenüber der in der Literatur als lethal eingestuft Temperatur von 48 °C (z.B. Tuominen *et al.*, 2008). Entgegen den Daten von Suzuki und Mitarbeitern (2005), ließ sich unser Wildtyp-Stamm nach dreistündigem Hitzestress durch mehrtägige Inkubation bei 28 °C regenerieren. Dasselbe galt für  $\Delta hfq$  (Daten nicht gezeigt).

Daher wurden folgend Langzeitversuche in Flüssigkultur bei der „sub-lethalen“ Temperatur von 44 °C durchgeführt. Die Darstellung von Wachstumskurven erwies sich in diesem Zusammenhang als ungeeignet, da die Kulturen das Wachstum bereits nach zwei Tagen einstellen. In den Vorversuchen fiel jedoch auf, dass Wildtyp-Kulturen unter diesen Bedingungen im Licht ( $\sim 65 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) schneller ausbleichen als Kulturen der  $\Delta hfq$ -Mutante. Daher wurde hier der relative zelluläre Pigmentgehalt als Maßstab für die Thermotoleranz definiert. Dazu wurden mit Luft begaste Flüssigkulturen über jeweils vier Tage in einem Wasserbad konstant auf 44 °C temperiert. Die Analyse erfolgte ca. alle 24 Stunden durch die photometrische Messung des Lichtabsorptionsspektrums ganzer Zellen. Abbildung 8 zeigt repräsentative Ergebnisse aus zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei parallel untersuchten Kulturen, deren Zelldichte zu Versuchsbeginn auf  $\text{OD}_{750} = \sim 0,23$  (Versuch A; Abbildung 8A) bzw.  $\sim 0,7$  (Versuch B; Abbildung 8B,C) eingestellt wurde. Die Absorptionsspektren der Wildtyp-Kulturen zeigen nach vier Versuchstagen einen kompletten Verlust der zellulären Pigmente, während in den Spektren der  $\Delta hfq$ -Kulturen zum selben Zeitpunkt zwar deutlich verringerte, aber erkennbare Phycocyanin- und Chlorophyll-Absorptionsmaxima erscheinen. In Abbildung 8C sind die Flüssigkulturen aus Versuch B nach vier Tagen Hitzestress dargestellt. Die gezeigten Spektren (Abbildung 8B) repräsentieren die Kulturen WT3 bzw.  $\Delta hfq2$ . Das im Vergleich sichtbar weiter fortgeschrittene Ausbleichen der Wildtyp-Kulturen bestätigt die spektralen Daten und weist auf einen durch die *hfq*-Inaktivierung hervorgerufenen, verzögerten Pigmentverlust bei hohen Temperaturen hin. Der beobachtete, allmähliche Bleichungsprozess entspricht nicht dem von Nakamoto und



## 2 ERGEBNISSE

Mitarbeitern (2000; 2003) beschriebenen hitzeinduzierten *photobleaching* der Phycobilisomen. Jener Prozess lässt sich bei einer Temperatur von 50 °C bereits nach zehn Minuten - wie unter Stickstoffmangel - anhand der Abnahme des Absorptionsmaximums bei ~630 nm beobachten. Auch dieser Effekt war mit dem verwendeten Wildtyp nicht nachweisbar (s.o.).

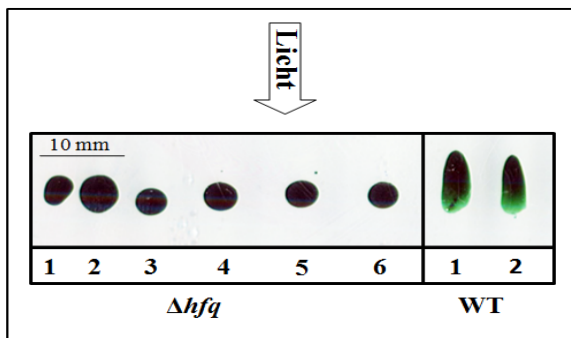


**Abbildung 8: Thermotoleranz von *Synechocystis* Wildtyp und  $\Delta hfq$ .** (A, B) Lichtabsorptionsspektren ganzer Zellen in Flüssigkulturen unmittelbar bevor (28 °C) und zwei (2d) bzw. vier Tage (4d) nach Inkubation bei 44 °C. Die Spektren wurden auf die optische Dichte bei 750 nm normiert. Zu Versuchsbeginn hatten die Zellkulturen optische Dichten von ~0,23 (A) bzw. ~0,7 (B). (C) Zellkulturen aus Versuch B nach vier Tagen Inkubation bei 44 °C. Die in (B) dargestellten Absorptionsspektren sind repräsentative Messungen der Kulturen WT3 bzw.  $\Delta hfq2$ . WT, Wildtyp.

## 2 ERGEBNISSE

### 2.1.2.3 Hfq ist essenziell für die phototaktische Motilität von *Synechocystis*

Der phototaktischen Motilität von *Synechocystis* liegt ein Mechanismus zu Grunde, der auf der Aktivität zellulärer Fortsätze, den Typ IV Pili basiert (Übersicht in Bhaya, 2004). Homologe Strukturen existieren u.a. auch im pathogenen  $\gamma$ -Proteobakterium *Pseudomonas*, für dessen Typ IV Pili vermittelte Motilität bereits eine Abhängigkeit von Hfq gezeigt werden konnte (Sonnleitner *et al.*, 2003). Vor diesem Hintergrund wurden in der vorliegenden Arbeit vergleichende Motilitätstests mit *Synechocystis* Wildtyp und  $\Delta hfq$  auf Agarmedium durchgeführt. Dazu wurden Zellen aus Flüssigkulturen von sechs unabhängigen Klonen sowie des Wildtyps auf glukosehaltige BG11-Agarplatten ohne Antibiotikum aufgetragen und bei 28 °C durch unidirektionale Belichtung mit Weißlicht zur gerichteten Bewegung stimuliert. Innerhalb von 14 Tagen nach dem Auftragen der Kulturen zeigten Wildtyp-Zellen eine deutliche Bewegung in Richtung der Lichtquelle (Abbildung 9). Die dort sichtbaren, für die Phototaxis typischen fingerartigen Koloniausläufer konnten jedoch bei keinem der sechs getesteten  $\Delta hfq$ -Klone beobachtet werden.



**Abbildung 9: Phototaxis-Test von Wildtyp und sechs Klonen der  $\Delta hfq$ -Mutante.** (A) Es wurden jeweils 5  $\mu$ l exponentiell wachsender Flüssigkulturen ( $OD_{750} \sim 0,4$ ) auf 0,5 %ige BG11-Agarplatten ohne Antibiotikum aufgetragen und für 14 Tage durch eine Weißlichtquelle unidirektional mit 1-3  $\mu$ mol Photonen  $m^{-2} s^{-1}$  belichtet (siehe Pfeil). WT, Wildtyp.

Es zeigten sich zudem glatte Ränder der aufgetragenen Kolonien, was darauf hinweist, dass die Inaktivierung von *hfq* einen generellen Motilitätsverlust zur Folge hatte. Motile Wildtyp-Stämme besitzen auch bei einer gleichmäßigen Belichtung auf Festmedium eine scheinbar ungerichtete (eventuell chemotaktische) Beweglichkeit, die im Fall von  $\Delta hfq$  nicht nachweisbar ist (siehe z.B. Abbildung 6B, Verdünnungsstufe  $10^3$ ). Demzufolge lag die Vermutung nahe, dass die Ursache für den Verlust der phototaktischen Motilität in der Beeinträchtigung zentraler Signaltransduktionsschritte und/oder im Verlust essentieller Oberflächenstrukturen liegt.

### 2.1.2.4 Transmissionselektronenmikroskopische (TEM) Analysen

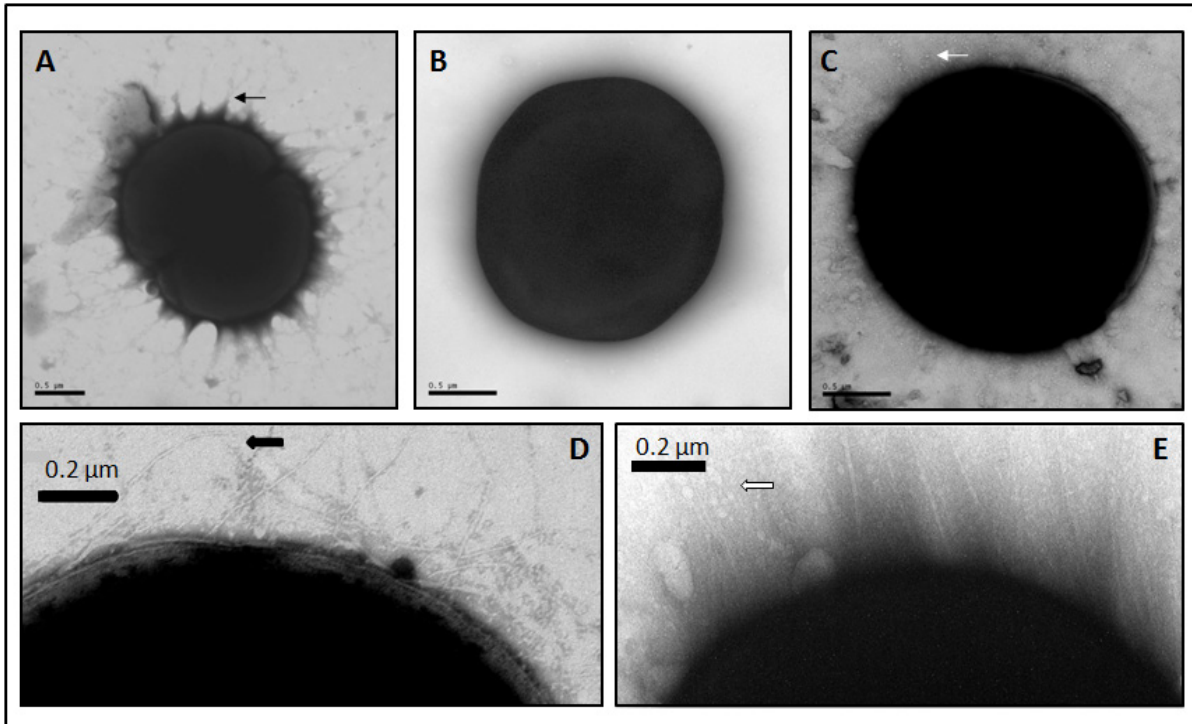
Die entscheidenden Strukturen für die Motilität von *Synechocystis* sind die einleitend erwähnten Typ IV Pili. Eine eingeschränkte/fehlende bzw. auch übermäßige Ausbildung dieser Fortsätze in  $\Delta hfq$  könnte insofern den beobachteten physiologischen Phänotyp auf zellbiologischer Ebene erklären.

Typ IV Pili von *Synechocystis* werden anhand ihrer Größe in zwei unterschiedliche Morphotypen eingeteilt (Bhaya *et al.*, 2000). Die „kleinen Pili“ haben einen Durchmesser von 3-4 nm und sind gleichmäßig auf der Zelloberfläche verteilt, während für die auffälligeren „großen Pili“ mit etwa doppeltem Durchmesser und einer Länge von bis zu 5  $\mu\text{m}$  noch kein spezifisches Lokalisationsmuster gezeigt werden konnte.

Um die Präsenz bzw. Verteilung von kleinen und großen Pili auf der Zelloberfläche von  $\Delta hfq$  zu untersuchen, wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Jochen Golecki am Institut für Biologie II der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg TEM-Aufnahmen von Zellen der Mutante und des Wildtyps angefertigt. Die Darstellungen in Abbildung 10 zeigen, dass der Wildtyp über auffallende Zellfortsätze verfügt (Abbildung 10A), die den Zellen von  $\Delta hfq$  fehlen (Abbildung 10B). In einzelnen Fällen lassen sich derartige Pilistrukturen auch auf der Zelloberfläche der Mutante nachweisen (Abbildung 10C), jedoch von deutlich feinerer Ausprägung (Abbildung 10D,E). Demnach ruft die Inaktivierung von *hfq* in *Synechocystis* einen kompletten Verlust der großen Typ IV Pili und insgesamt eine erhebliche Beeinträchtigung der Assemblierung kleiner Pili bzw. der „Gesamtpilierung“ hervor.

Ein entsprechender morphologischer Phänotyp wurde auch mit dem Motilitätsverlust einer *pilA1*-Mutante in Verbindung gebracht (Bhaya *et al.*, 2000; siehe auch nächsten Abschnitt). Insofern liefern diese Daten einen deutlichen Hinweis auf eine direkte oder indirekte (regulatorische?) Funktion von Hfq in der Pilus-Biogenese in *Synechocystis*.

## 2 ERGEBNISSE



**Abbildung 10: Exemplarische TEM-Aufnahmen einzelner *Synechocystis* Zellen von Wildtyp und  $\Delta hfq$ .** (A) Wildtyp mit großen Pili (schwarzer Pfeil), (B)  $\Delta hfq$  ohne sichtbare Pilistrukturen, (C)  $\Delta hfq$  mit kleinen Pili (weißer Pfeil). (D) und (E) zeigen Zellen von Wildtyp bzw.  $\Delta hfq$  in stärkerer Vergrößerung. Die verwendeten Zellen wurden für die Mikroskopie unmittelbar von Fest- in BG11-Flüssigmedium überführt. Die Negativkontrastierung der Strukturen erfolgte mit 0,5 % Uranylacetat (siehe auch Golecki, 1988).

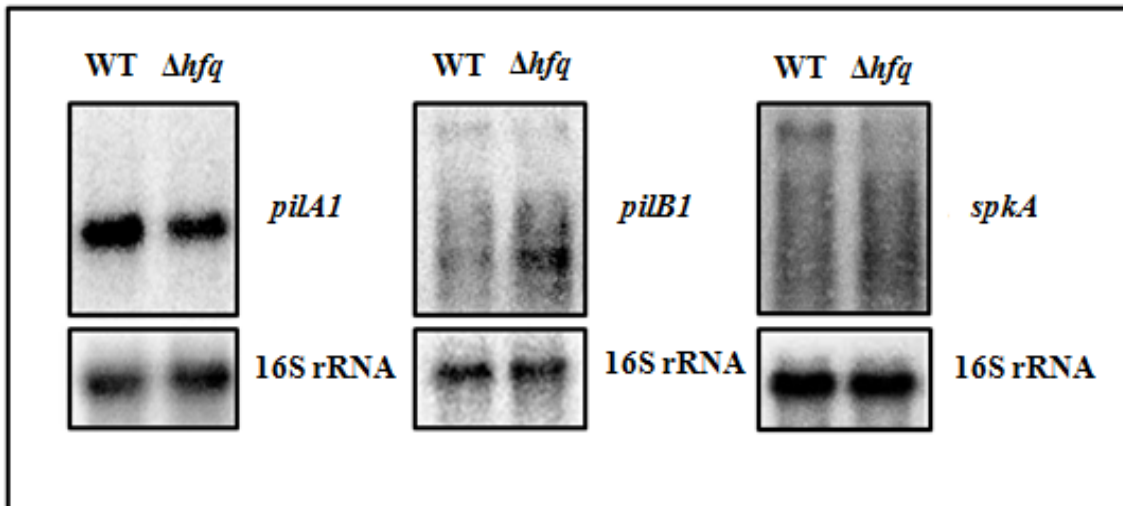
### 2.1.2.5 Expressionsanalysen

#### 2.1.2.5.1 Northern Blot-Analysen ausgewählter mRNAs

Als zentrale Strukturkomponente der Typ IV Pili ist das Polypeptid Pilin, dessen Vorläuferprotein (Präpilin) im Genom von *Synechocystis* durch *pilA1* (*sll1694*) kodiert wird, für die Biogenese der großen Pili (Bhaya *et al.*, 2000; Yoshihara *et al.*, 2001) und damit für die phototaktische Motilität essenziell. Zudem ist für den Aufbau eines funktionellen Pilusapparates neben einigen weiteren Faktoren auch die Expression des putativen Motorproteins PilB1 (Locus: *slr0063*) sowie der Serin/Threonin-Kinase SpkA (Locus: *sll1575*) erforderlich (Kamei *et al.*, 2001; Panichkin *et al.*, 2006; Yoshihara *et al.*, 2001).

Um einen ersten Einblick in die molekularen Hintergründe des nicht-motilen Phänotyps von  $\Delta hfq$  zu bekommen, wurden zunächst vergleichende Northern Blot-Analysen exemplarisch mit spezifischen Sonden für *pilA1*, *pilB1* und *spkA* durchgeführt (Abbildung 11).

## 2 ERGEBNISSE



**Abbildung 11: Northern Blot-Analyse der Transkriptmengen von *pilA1* (links), *pilB1* (Mitte) und *spkA* (rechts) in WT und  $\Delta hfq$  unter Standardkultivierungsbedingungen.** Die Gesamt-RNA wurde aus flüssigen Zellkulturen während der logarithmischen Wachstumsphase isoliert und zu je ca. 3  $\mu\text{g}$  in einem 1,3 %igen denaturierenden Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Nylonmembran wurde die RNA mit genspezifischen DNA- (*pilA1*) bzw. RNA- (*pilB1*, *spkA*) Sonden hybridisiert. Zur Ladekontrolle diente eine 16S-rRNA-spezifische DNA-Sonde. Die dargestellten Hybridisierungssignale repräsentieren Daten aus drei Versuchsreihen.

Die Hybridisierungsdaten zeigen schwach erhöhte Transkriptmengen für *pilB1* (+ 78 %) und *spkA* (+ 29 %) in  $\Delta hfq$ , während um 40 % reduzierte Mengen der *pilA1*-mRNA in der Mutante gegenüber dem Wildtyp nachweisbar sind. Panichkin und Mitarbeiter (2006) berichteten von erhöhten *pilA1*-Transkriptmengen und dem Verlust großer Pili in einer *spkA*-Insertionsmutante. Demnach wäre das inverse Verhalten der entsprechenden mRNAs in  $\Delta hfq$  ggf. auf eine stringenteren Regulation der *pilA1*-Expression durch erhöhte SpkA Mengen zu erklären. In Anbetracht des drastischen Verlustes an Typ IV Pili auf der Zelloberfläche von  $\Delta hfq$  geben diese relativ geringen Unterschiede auf mRNA-Ebene jedoch keinen ausreichenden Aufschluss über die molekularen Zusammenhänge, die für den Motilitätsverlust der Mutante verantwortlich sind. Zudem erschienen die erhöhten Mengen an *pilB1*-mRNA angesichts des Phänotyps zunächst widersprüchlich. Insofern war für ein besseres Verständnis eine umfassende vergleichende Analyse der Transkriptome von Wildtyp und  $\Delta hfq$  erforderlich.

---

## 2 ERGEBNISSE

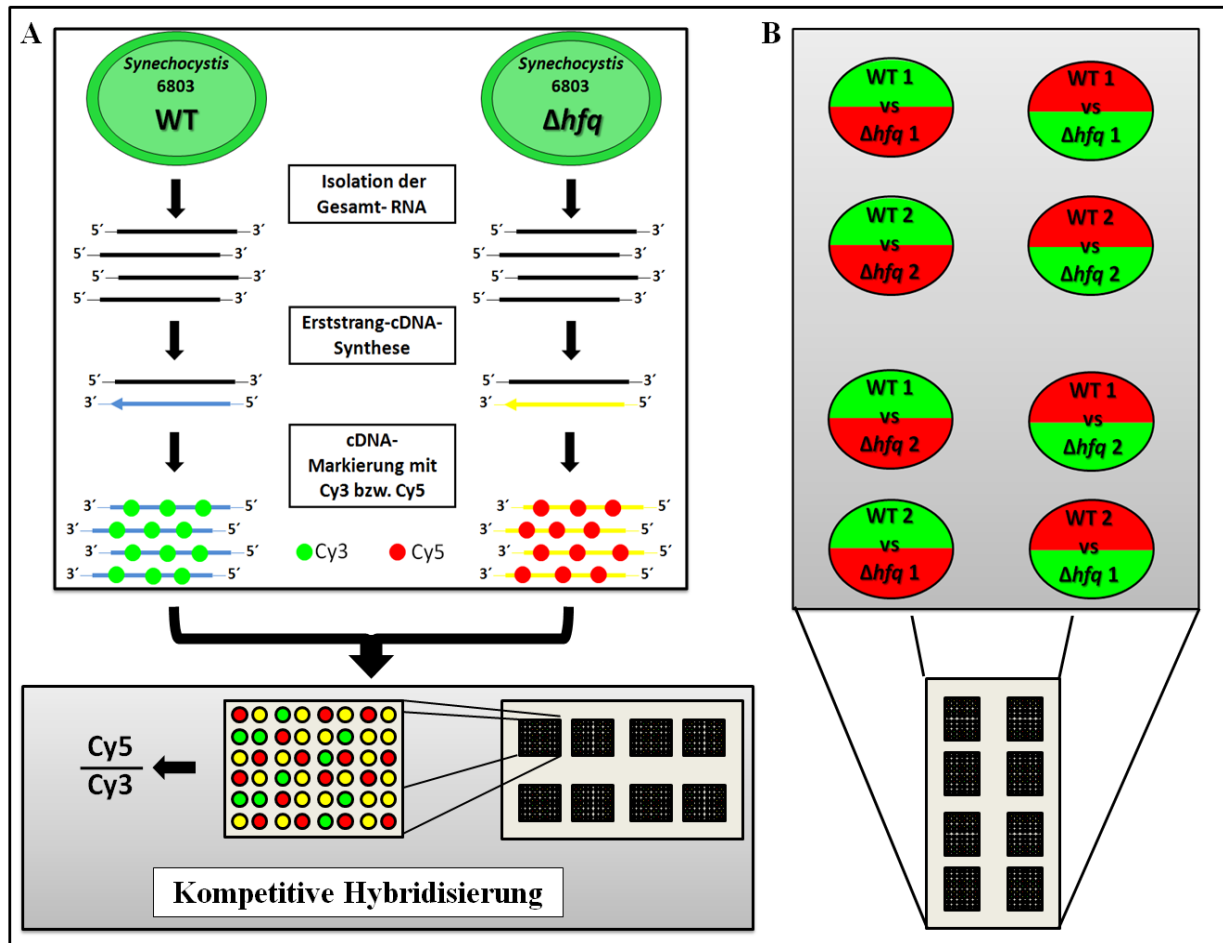
---

### 2.1.2.5.2 Vergleichende *Microarray*-Analyse von WT und $\Delta hfq$

Untersuchungen globaler transkriptioneller Veränderungen infolge der Inaktivierung von *hfq* wurden mithilfe eines speziellen „gesamtenomischen“ 15K *Microarrays* des Herstellers Agilent Technologies durchgeführt. Insgesamt 3264 annotierte ORFs des Genoms von *Synechocystis* werden jeweils durch bis zu vier verschiedene, nicht-überlappende 60-mer-Oligonukleotidsonden erfasst (Eisenhut *et al.*, 2007). Probenvorbereitung und Hybridisierung des *Microarrays* erfolgten im Wesentlichen am MPI für Infektionsbiologie, Berlin (Servicebereich *Microarray*; Ina Wagner, Dr. Hans-Joachim Mollenkopf).

Zwei unterschiedlich markierte Proben wurden dabei vereint für die Hybridisierung eines *Microarrays* eingesetzt (kompetitive Hybridisierung, Abbildung 12A). Im Rahmen dessen wurden die Proben von Wildtyp und  $\Delta hfq$  aus beiden biologischen Experimenten in allen vier möglichen Kombinationen verglichen. Um spezifische Effekte (etwa durch verschobene Intensitätsverhältnisse) der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe zu kompensieren, wurde mit zwei alternierenden Farbstoffzuordnungen (*dye swap*) gearbeitet (Churchill, 2002). Dabei wurde für je einen *Microarray* die Wildtyp-cDNA mit Cy3 und die  $\Delta hfq$ -cDNA mit Cy5 markiert; für eine zweite Hybridisierung mit Proben desselben Ursprungs erfolgte die Markierung mit umgekehrter Zuordnung. Eine schematische Darstellung des Versuchsaufbaus findet sich in Abbildung 12B.

## 2 ERGEBNISSE



**Abbildung 12: Schematische Darstellung der Genexpressionsanalyse mit DNA-Microarrays.** (A) Isolierte Gesamt-RNA aus Wildtyp und  $\Delta hfq$  wird revers transkribiert und die Erststrang-cDNA mit den Fluoreszenzfarbstoffen Cy3 (grün – im Beispiel: Wildtyp cDNA) bzw. Cy5 (rot – im Beispiel:  $\Delta hfq$  cDNA) markiert. Die Proben werden anschließend gemeinsam (kompetitiv) für die Hybridisierung eines *Mikroarrays* eingesetzt. Das Verhältnis der Fluoreszenzsignale zueinander (Cy5/Cy3) ist schließlich die Grundlage für den Nachweis differenzieller Genexpression zwischen Wildtyp und  $\Delta hfq$ . (B) Verwendet wurde ein Glasobjektträger mit acht identischen 15K *Mikroarrays*. Auf der Basis von zwei unabhängig durchgeführten biologischen Experimenten ergaben sich vier vergleichende Kombinationsmöglichkeiten (linke Reihe), die jeweils durch einen *dye swap*, d.h. durch eine umgekehrte Farbstoffzuordnung technisch repliziert wurden (rechte Reihe). WT, Wildtyp.

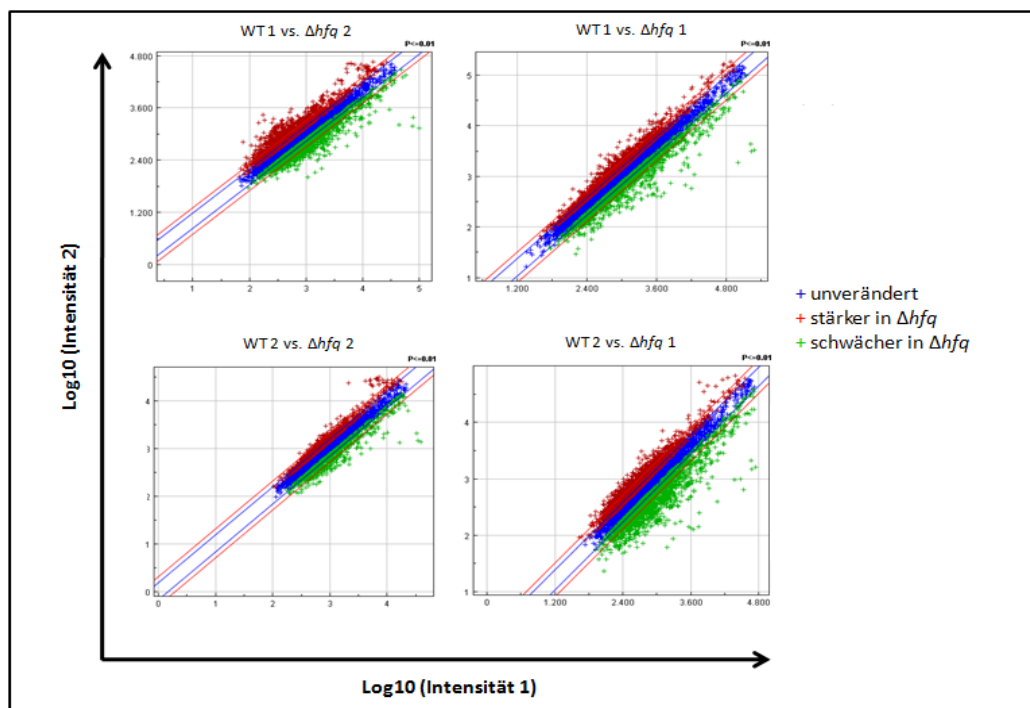
### 2.1.2.5.3 Qualitätskontrolle der *Microarray*-Daten

Zur Qualitätskontrolle der Datensätze wurde zunächst überprüft, ob die beim Lesen der *Mikroarrays* detektierten Fluoreszenzintensitäten aller Proben vergleichbar waren. Dazu wurden jeweils die Intensitätswerte der Wildtyp-Proben gegen jene der  $\Delta hfq$  Proben aufgetragen. Handelt es sich um miteinander vergleichbare Datensätze mit einer geringen Varianz, ergibt die Darstellung der Werte in Form eines doppellogarithmischen

## 2 ERGEBNISSE

Intensitätsdiagramms (Abbildung 13) im Mittel eine Gerade. Die einzelnen Punkte zeigen bei qualitativ hochwertigen Datensätzen ausschließlich im unteren Intensitätsbereich geringe Streuungen und nähern sich im Bereich hoher Fluoreszenzintensitäten einer Geraden (Steigung =  $\sim 1$ ) an. Für den Überblick werden in diesem Teilabschnitt repräsentativ lediglich die Auswertungen der Hybridisierungen mit je einer der zwei alternativen Farbstoffzuordnungen dargestellt.

Die Diagramme in Abbildung 13 zeigen, dass im Fall der durchgeführten Experimente niedrige Varianzen der kompetitiv hybridisierten Proben untereinander vorliegen. Die in beiden Proben gleichermaßen detektierten Signale scharen sich um eine theoretische, lineare Gerade (blaue Kreuze), während apparent differenziell akkumulierende Transkripte in geringem Maße streuen (grüne bzw. rote Kreuze). Die insgesamt zu beobachtende geringe Streuung spricht für die erforderliche technische Qualität der Microarray-Experimente.



**Abbildung 13: Doppellogarithmisches Intensitätsdiagramm der Hybridisierungsexperimente mit cDNA Proben aus Wildtyp und  $\Delta hfq$**  (basierend auf jeweils 3  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA). Aufgetragen sind jeweils die dekadischen Logarithmen der relativen Fluoreszenzintensitäten aller erfassten Transkripte aus Wildtyp (X-Achse) und  $\Delta hfq$  (Y-Achse). Die Diagramme zeigen die Daten aus vier kompetitiven Hybridisierungen mit Proben aus zwei unabhängigen Experimenten (WT1/ $\Delta hfq 1$  & WT2/ $\Delta hfq 2$ ). Die einzelnen Signale sind durch farbige Kreuze dargestellt (siehe Legende). WT, Wildtyp.



---

## 2 ERGEBNISSE

---

### 2.1.2.5.4 Identifizierung differenziell akkumulierender Transkripte

Zur Ermittlung statistisch signifikanter Änderungen im Transkriptionsprofil wurden zunächst definierte Filterkriterien auf die vorliegenden *Microarray*-Daten angewendet. Es wurden jeweils die *dye swap*-Paare einer Korrelationsanalyse unterzogen, um die Reproduzierbarkeit der Daten abzusichern. Dabei wurden lediglich „antikorrelierte“ Werte, d.h. Transkripte mit einem Cy3-Signal im ersten und einem Cy5-Signal im zweiten *Microarray* als differenziell reguliert erachtet. Berücksichtigt wurden schließlich Messwerte mit einem p-Wert (Signifikanzwert)  $< 0,05$  bzw. Transkripte, deren Abundanz dabei in  $\Delta hfq$  mindestens um den Faktor 2 erhöht bzw. reduziert war ( $F_c \geq 2$ ).

### Differenziell regulierte Gene bilden zu 60 % Operone/Genpaare

Diese Analyse brachte eine Auswahl von 31 Genen mit signifikant veränderten Transkriptmengen in  $\Delta hfq$  hervor (Tabelle 1). Mit Ausnahme von *ssl3445* und *sll1942*, die für ein ribosomales Protein bzw. für ein Protein unbekannter Funktion kodieren, zeigten alle gelisteten Gene in der Mutante eine schwächere Transkriptakkumulation. Betroffen von der *hfq*-Inaktivierung sind besonders einige (putative) Operone bzw. Gene, welche im Genom in enger Nachbarschaft zueinander lokalisiert sind (Abbildung 14). Darunter finden sich u.a. die Gruppen *sll1239-sll1240* (Abbildung 14A,) und *sll1429-sll1430* (Abbildung 14B), die für unbekannte Proteine bzw. - im Fall von *sll1430* - für ein putatives Enzym des Nukleosid-Stoffwechsels kodieren. Darüber hinaus zeigten die Transkripte der Genpaare *slr0150-slr0151* (Abbildung 14C), *slr0442-sll0428* (Abbildung 14D) und des Hitzeschock-Operon *slr2075-slr2076* (Abbildung 14E) ein von Hfq abhängiges Akkumulationsverhalten.

## 2 ERGEBNISSE

**Tabelle 1: Auflistung differenziell exprimierter Gene in  $\Delta hfq$ .** \*, Sequenzbasierte Einträge in der Pfam-Proteinfamiliendatenbank; \*\*, Fc, *Fold change*: Veränderung der Transkriptakkumulation in  $\Delta hfq$  im Bezug auf das Wildtyp-Niveau.

Gen	Synonym	Cyanobase Definition	Pfam-Familie*	Fc**
<i>slr1667</i>		hypothetical protein (target of <i>sycr1</i> )	PF05229: Spore coat protein U domain	-48,84
<i>slr1668</i>		periplasmic protein, function unknown (target of <i>sycr1</i> )	PF00345: pili assembly chaperone, N-term. domain	-29,1
<i>ssr2848</i>		unknown protein	-	-12,57
<i>sll1543</i>	<i>ppx</i>	hypothetical protein	PF01850: PIN domain	-6,08
<i>ssr2787</i>		unknown protein	-	-5,97
<i>slr2016</i>	<i>pilA10</i>	type 4 pilin-like protein, essential for motility	PF07963: Prokaryotic N-terminal methylation motif	-5,53
<i>ssl2996</i>		unknown protein	-	-5,36
<i>slr2018</i>		unknown protein	-	-4,49
<i>slr2015</i>	<i>pilA9</i>	type 4 pilin-like protein, essential for motility	PF07963: Prokaryotic N-terminal methylation motif	-4,03
<i>sll1514</i>	<i>hspA</i>	16.6 kDa small heat shock protein, molecular chaperone	PF00011: Hsp20/alpha crystallin family	-3,55
<i>slr1764</i>	<i>capA</i>	similar to tellurium resistance protein TerE	PF02342: Bacterial stress protein	-3,42
<i>slr0442</i>		unknown protein	-	-3,3
<i>slr0120</i>		probable tRNA/rRNA methyltransferase	PF00588: SpoU rRNA Methylase family	-3,07
<i>slr2076</i>	<i>groEL1</i>	60kD chaperonin	PF00118: TCP-1/cpn60 chaperonin family	-3,06
<i>sll1239</i>		unknown protein	-	-2,99
<i>slr2075</i>	<i>groES1</i>	10kD chaperonin	PF00166: Chaperonin 10 kD subunit	-2,95
<i>sll0910</i>		unknown protein	PF00515: Tetratricopeptide repeat (TPR1) - 3x	-2,85
<i>slr0397</i>		hypothetical protein	PF11237: Protein of unknown function	-2,82
<i>sll0711</i>	<i>ipk</i>	isopentenyl monophosphate kinase	PF00288: GHMP kinases N terminal domain PF08544: GHMP kinases C-terminal domain	-2,78
<i>sll0377</i>	<i>mfd</i>	transcription-repair coupling factor	PF00270 - DEAD/DEAH box helicase	-2,77
<i>sll0428</i>		unknown protein	-	-2,63
<i>sll1366</i>		putative SNF2 helicase	PF12419: SNF2 Helicase protein - PF00176: SNF2 family PF00271: Helicase conserved C-terminal domain	-2,57
<i>sll1429</i>		unknown protein	PF04471: Restriction endonuclease	-2,49
<i>slr0151</i>		unknown protein	PF07719: Tetratricopeptide repeat (TPR2)	-2,43
<i>sll1240</i>		unknown protein	-	-2,4
<i>slr1917</i>		hypothetical protein	PF00561: alpha/beta hydrolase fold	-2,39
<i>sll1430</i>	<i>apt</i>	adenine phosphoribosyltransferase	PF00156: Phosphoribosyl transferase domain	-2,31
<i>slr0106</i>		unknown protein	PF07498: Rho termination factor, N-terminal domain	-2,27
<i>slr0150</i>	<i>petF, fdx</i>	ferredoxin, <i>petF</i> -like protein	PF00111: 2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain	-2,14
<i>ssl3445</i>	<i>rpl31</i>	50S ribosomal protein L31	PF01197: Ribosomal protein L31	2,29
<i>sll1942</i>		unknown protein	-	2,44

---

## 2 ERGEBNISSE

---

### Zwei Operone cAMP-regulierter Gene sind am stärksten reprimiert

Die am stärksten ( $|F_c| > 4,0$ ) betroffenen Gene (mit der Ausnahme von *ssr2848*) sind in genomischer Nachbarschaft bzw. innerhalb der Operone *slr1667-slr1668* (Abbildung 14F) und *slr2015-slr2019* (Abbildung 14G) lokalisiert, für die bereits eine essenzielle Funktion in der Motilität von *Synechocystis* beschrieben wurde (Bhaya *et al.*, 2001b; Yoshihara & Ikeuchi, 2004). Des Weiteren werden diese Operone direkt (*slr1667-slr1668*) bzw. indirekt (*slr2015-slr2018*) durch den Transkriptionsfaktor Sycrp1 (*Synechocystis* *cAMP* *receptor* *protein*) reguliert, dessen Inaktivierung ebenfalls zu einem nicht-motilen Phänotyp führte (Yoshimura *et al.*, 2002a; Yoshimura *et al.*, 2002b). In der 5'-Region des stromaufwärts von *slr1667* lokalisierten Gens *sll1543* (Abbildung 14F) wurde ferner eine putative Bindestelle für Sycrp1 vorhergesagt (Omagari *et al.*, 2008).

Besonders interessant innerhalb dieser genomischen Region erscheinen die stromabwärts von *slr1668* gelegenen Loci *ssr2787* und *ssl2996*, deren Transkriptmengen in  $\Delta hfq$  ebenfalls drastisch reduziert ( $F_c = -5,97$  bzw.  $-5,36$ ) sind. Beide Gene sind in der *CyanoBase* annotiert, nicht jedoch in der *GenBank*. In der letzteren Datenbank findet man dagegen den hypothetischen ORF *ssr2786* (Abbildung 14F), der in entgegengesetzter Orientierung (*antisense*) dem obengenannten *ssl2996* entspricht.

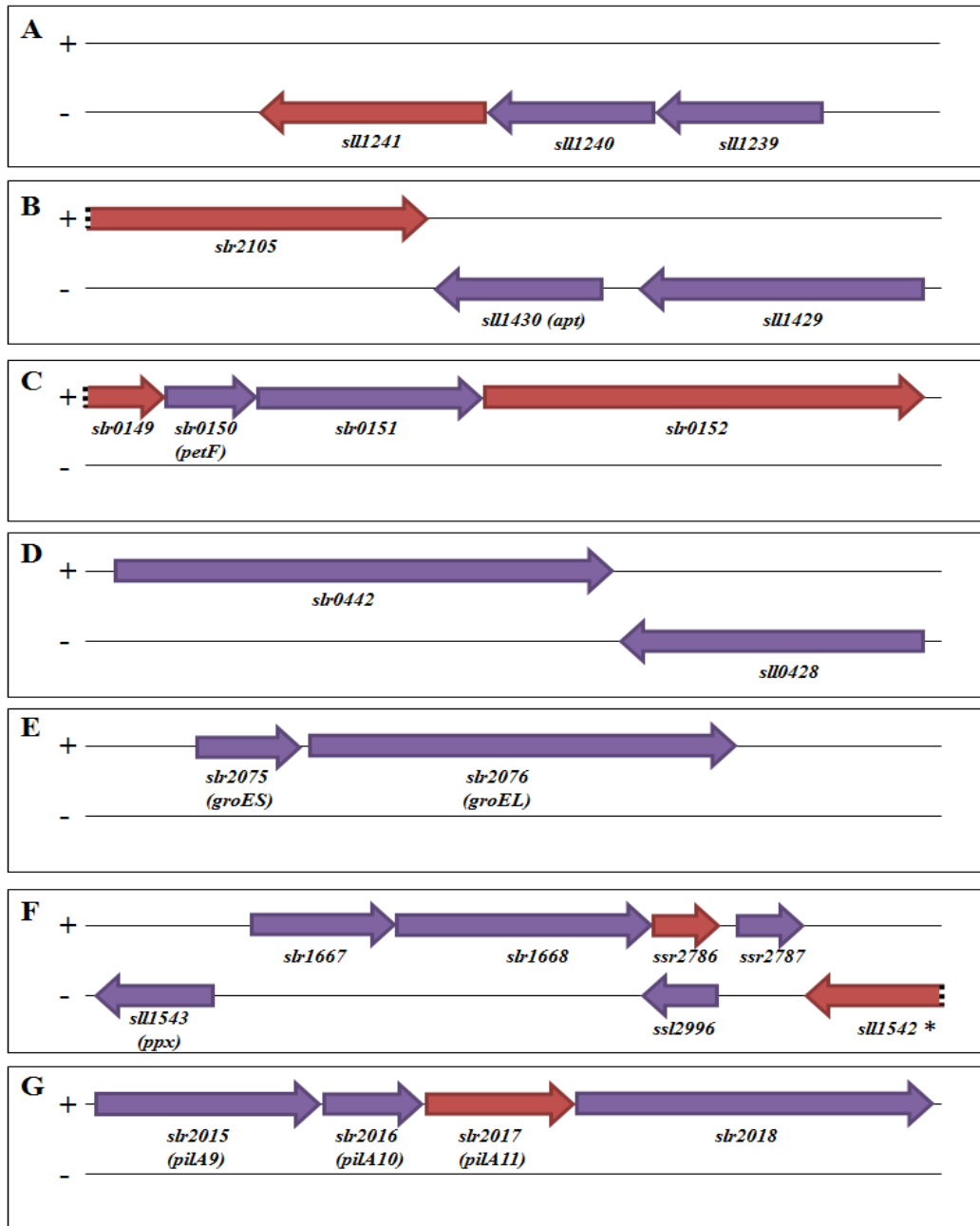
### Weitere potenzielle Elemente des cAMP-Regulons

Mit *slr0442* (Abbildung 14D) und *ssr2848* zeigten zwei weitere Gene aus dem putativen Sycrp1-Regulon (Hedger *et al.*, 2009; Yoshimura *et al.*, 2002a) eine signifikant reduzierte Transkriptakkumulation in  $\Delta hfq$ . Der Locus *ssr2848* liegt nicht in Tandemanordnung mit anderen Genen aus der vorliegenden Auswahl, zeigte jedoch die drittstärkste Abnahme der Transkriptakkumulation ( $F_c = -12,57$ ) in  $\Delta hfq$ . Daneben taucht in der Auswahl mit *slr1764* (*capA*) ein putatives cAMP-bindendes Protein mit einer mutmaßlichen Funktion in der generellen Stressantwort auf (<http://pfam.sanger.ac.uk/family/PF02342>).

### Hitzeschock-Regulon und RNA-Metabolismus

Neben dem oben bereits erwähnten *groESL*-Operon (Abbildung 14E) ist mit *sll1514* (*hspA*, *hsp17*) eine weitere wichtige Komponente des Hitzestress-Regulons in  $\Delta hfq$  schwächer exprimiert.

## 2 ERGEBNISSE



**Abbildung 14: Chromosomale Lokalisierung Hfq-abhängig regulierter, benachbarter Gene bzw. Operone.** In den Teilabbildungen (A-G) sind die unterschiedlichen chromosomalen Regionen betroffener Gene/Operone separat aufgeführt. Die schematische Darstellung basiert auf Sequenzinformationen und Annotationen der CyanoBase-Datenbank des Kazusa DNA Research Institute (Nakamura *et al.*, 2000). Davon ausgenommen ist der Locus *ssr2786* (F), der dort nicht annotiert ist. (+)- und (-)-Strang sind entsprechend am linken Rand gekennzeichnet. Durch die *hfq* Inaktivierung betroffene ORFs sind durch violette Pfeile repräsentiert. Rote Pfeile markieren benachbarte Gene, die im *Microarray* Experiment keine differenzielle Expression zeigten. \*sll1542 zeigte im *Tiling-array*-Experiment eine verringerte Transkriptakkumulation in  $\Delta hfq$  (siehe Tabelle 2, Abschnitt 2.3.3.1).

---

## 2 ERGEBNISSE

---

Weitere interessante, bisher nicht experimentell charakterisierte Gene in der Auswahl sind *slr0120* (<http://pfam.sanger.ac.uk/family/PF00588>), *sll0377* (<http://pfam.sanger.ac.uk/family/PF00270>) und *sll1366* (<http://pfam.sanger.ac.uk/family?acc=PF12419>), denen eine mögliche Rolle im RNA-Metabolismus zukommt.

### 2.1.2.5.5 Verifizierung der *Microarray*-Daten für ausgewählte Gene

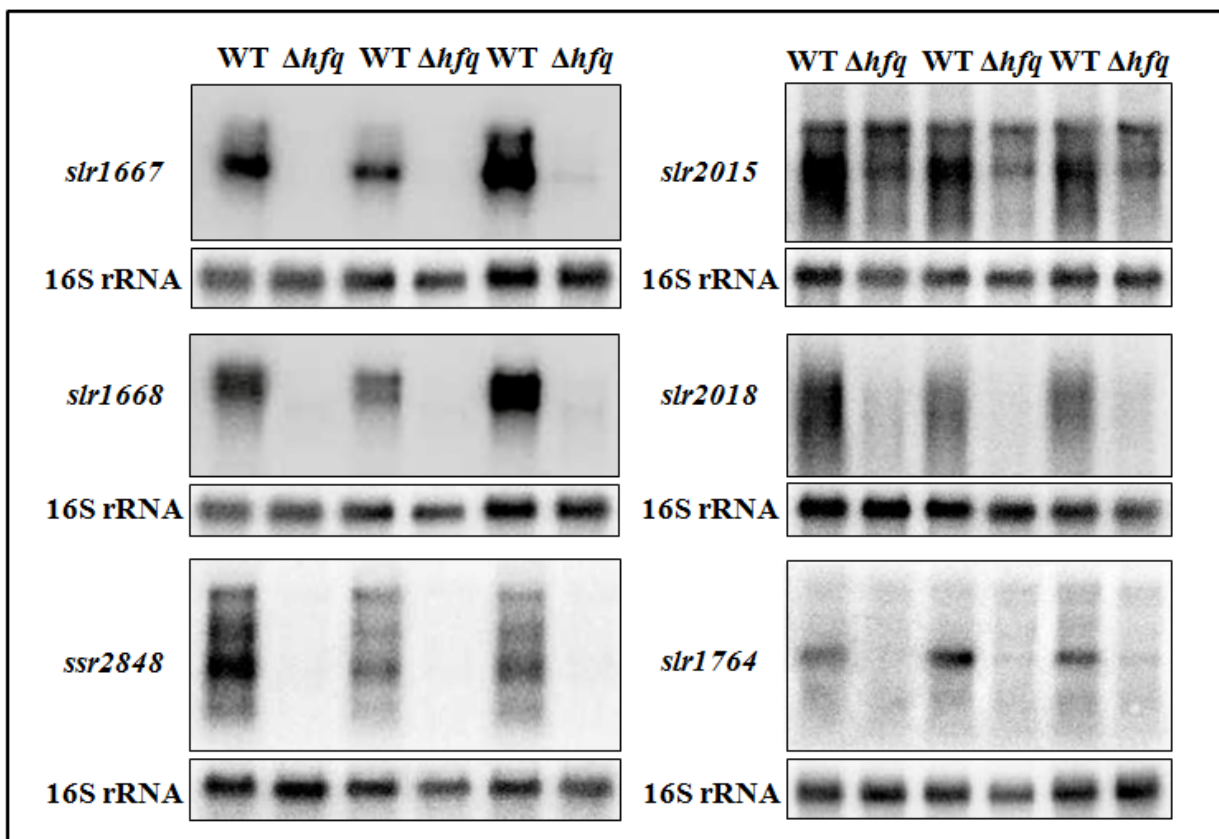
Da die Ergebnisse von Genexpressionsanalysen in Abhängigkeit von der gewählten Methode angesichts unterschiedlicher Empfindlichkeiten z.B. gegenüber Sekundär- und Tertiärstrukturbildung der untersuchten RNA variieren können (Ding *et al.*, 2007), sind solche Daten idealerweise durch eine alternative Methode zu überprüfen.

Zur Verifizierung der unter Abschnitt 2.1.2.5.4 dargestellten *Microarray*-Daten wurde erneut Gesamt-RNA aus Wildtyp- und  $\Delta hfq$ -Flüssigkulturen isoliert und für Northern Blot-Analysen von sechs ausgewählten mRNAs eingesetzt. Um die Reproduzierbarkeit der Daten zu dokumentieren, wurde mit biologischen Triplikaten gearbeitet. Die Hybridisierungen erfolgten wegen des postulierten Bezugs zur Motilität u.a. mit repräsentativen Sonden für die putativen Operone *slr1667-slr1668* und *slr2015-slr2018*. Abbildung 15 zeigt, dass für beide genannten Operone auch im Northern Blot drastisch reduzierte Transkriptmengen in  $\Delta hfq$  zu beobachten sind. Dabei sind *slr1667*- und *slr1668*-mRNAs in der Mutante nahezu nicht detektierbar, während die Signale für *slr2015* und *slr2018* in  $\Delta hfq$  um ca. 33 % bzw. 75 % reduziert sind. Auch die Akkumulation der *slr1764*- und *ssr2848*-mRNAs zeigte im Northern Blot-Experiment eine deutliche Abhängigkeit von Hfq. Im Falle von *slr1764* (ausgewählt wegen der Homologie zu cAMP-bindenden Proteinen) erscheint diese Expressionsdiskrepanz noch deutlicher als in der *Microarray*-Analyse ( $F_c = -3,42$ ).

Insgesamt konnte in diesen Experimenten die Aussagekraft der *Microarray*-Daten validiert werden. Dennoch muss darauf hingewiesen werden, dass die differenzielle Akkumulation einzelner weniger stark betroffener Transkripte aus Tabelle 1 nicht reproduziert werden konnte. Dies gilt für die mit einem  $F_c$  von -2,95 detektierten mRNA des Chaperonins GroES1, deren Menge in verschiedenen Northern Blot-Experimenten zwischen Wildtyp und  $\Delta hfq$  nicht variierte (siehe Abbildung 33, Abschnitt 2.3.3.5). Dem liegt ggf. eine starke

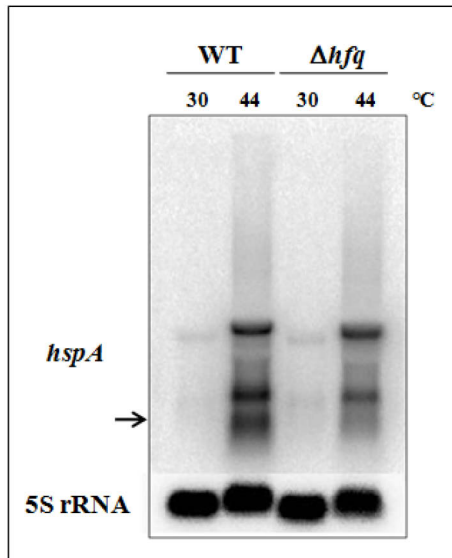
## 2 ERGEBNISSE

Empfindlichkeit der Expression gegenüber geringfügig veränderten Umweltbedingungen zu Grunde. In diesem Fall könnte dies durch unterschiedliche Schichtdicken der Kulturen in nicht identischen AnzuchtKolben hervorgerufen werden, als dadurch abweichende mittlere Lichtintensitäten in den Kulturen vorherrschen. Die mRNA des kleinen Hitzeschock-Proteins *hspA* zeigte in den Northern Blot-Experimenten - bei ansonsten gleichen Gesamt-Transkriptmengen - im Wildtyp infolge einer Hitzestress-Behandlung eine kleine Hybridisierungsbande, welche in  $\Delta hfq$  nur sehr schwach ausgeprägt war (markiert durch schwarzen Pfeil in Abbildung 16).



**Abbildung 15: Northern Blot-Analysen zur Verifizierung der *Microarray*-Daten anhand ausgewählter Transkripte.** Die Gesamt-RNA wurde aus flüssigen Zellkulturen von Wildtyp und  $\Delta hfq$  während der logarithmischen Wachstumsphase isoliert und zu je ca. 5  $\mu\text{g}$  in einem 1,3 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Nylonmembran wurde die RNA mit radioaktiv markierten, genspezifischen RNA-Sonden hybridisiert. Zur Ladekontrolle diente eine 16S-rRNA-spezifische DNA-Sonde. Dargestellt sind jeweils die Hybridisierungen von Proben aus drei unabhängigen Experimenten. WT, Wildtyp.

## 2 ERGEBNISSE



**Abbildung 16: Northern Blot-Nachweis der Transkriptakkumulation von *hspA* (*sll1514*) in Wildtyp und  $\Delta hfq$ .** Wildtyp- und  $\Delta hfq$ -Kulturen wurden parallel in einem Wasserbad bei 44 °C inkubiert. Die Probenahme erfolgte unmittelbar vor (28 °C-Kontrolle) sowie 1 h Inkubation. Die präparierte Gesamt-RNA (ca. 5  $\mu$ g) wurde in einem 1,3 %igen denaturierenden Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer strangspezifischen *hspA*-RNA-Sonde hybridisiert. Die Hybridisierung mit einer 5S rRNA-spezifischen Oligonukleotidsonde diente als Ladekontrolle. WT, Wildtyp.

### 2.1.2.6 Genetische Komplementierung des nicht-motilen Phänotyps

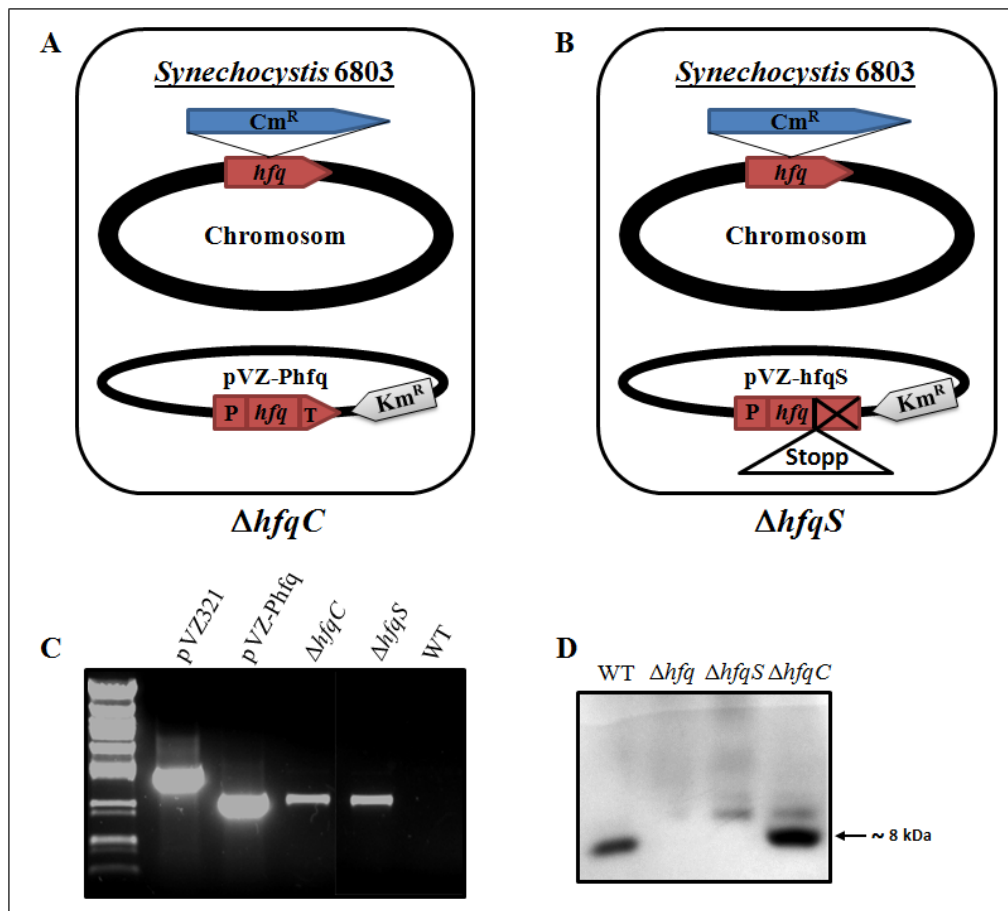
#### 2.1.2.6.1 Extrachromosomale, homologe Komplementierung

Um auszuschließen, dass der beobachtete Phänotyp von  $\Delta hfq$  etwa auf Sekundäreffekte der Insertionsmutation bzw. auf andere Mutationen zurückzuführen ist, wurde versucht die phototaktische Motilität durch genetische Komplementierung der Mutante *in trans* wiederherzustellen.

Da die (großen) Typ IV Pili neben der Motilität auch die natürliche Kompetenz zur Aufnahme exogener DNA vermitteln (Nakasugi *et al.*, 2006; Yoshihara *et al.*, 2001), wurde ein Komplementierungsversuch durch natürliche Transformation nicht in Betracht gezogen. Die Transformation von  $\Delta hfq$  durch Elektroporation wäre technisch zwar durchführbar gewesen (Zang *et al.*, 2007); diese Methode erwies sich in vorangegangenen Versuchen in unserem Labor jedoch als relativ ineffizient (Daten nicht gezeigt). Unter der Annahme, dass der Verlust der Typ IV Pili keinen Einfluss auf konjugativen Plasmidtransfer hat, wurde der Locus *ssr3341* inklusive eigener Promoter- und Terminatorregionen in den mobilisierbaren, autonom replizierenden Shuttle-Vektor pVZ321 (Zinchenko *et al.*, 1999) ligiert. Das resultierende Konstrukt pVZ-Phfq wurde schließlich mithilfe des Helferplasmids RP4 konjugativ in die  $\Delta hfq$ -Mutante transferiert, um die komplementierte Mutante  $\Delta hfqC$  zu erzeugen. Für die Negativkontrolle wurde analog der Vektor pVZ-hfqS mit einem durch Punktmutation (an Position 121) eingeführten Stoppcodon innerhalb der *hfq*-Sequenz konstruiert. Die

## 2 ERGEBNISSE

resultierende Mutante  $\Delta hfqS$  sollte demnach kein funktionelles Hfq exprimieren und weiterhin einen nicht-motilen Phänotypen aufweisen. Die Komplementierungsstrategie ist in Abbildung 17A,B schematisch dargestellt. Der erfolgreiche Plasmidtransfer und die Expression von Hfq in den Mutanten  $\Delta hfqC$  und  $\Delta hfqS$  wurden durch PCR- bzw. Immunoblot-Analyse überprüft (Abbildung 17C,D).



**Abbildung 17: Genetische Komplementierung der *hfq*-Inaktivierung in *Synechocystis* durch extrachromosomale Expression.** (A,B) Schematische Darstellung der Mutagenese- und Komplementierungsstrategie zur Komplementierung von  $\Delta hfq$  mit dem mobilisierbaren Plasmid pVZ-Phfq (A) bzw. dem Kontrollplasmid pVZ-hfqS (B). Pfeilförmige Boxen kennzeichnen die Transkriptionsrichtungen der entsprechenden ORFs. *Cm<sup>R</sup>*, Cm-Resistenzgen-Kassette; *Km<sup>R</sup>*, Km-Resistenzgen-Kassette; P, Promoter (von *ssr3341*, *hfq*); Stopp, auf Punktmutation basierendes *in frame*-Stoppcodon; T, Transkriptionsterminator (von *ssr3341*, *hfq*). (C) PCR-Nachweis der stabilen Replikation von pVZ-Phfq und pVZ-hfqS in den Transkonjuganten  $\Delta hfqC$  bzw.  $\Delta hfqS$  unter Verwendung der Primer pVZ321-fw und pVZ321-rev. Die PCR-Fragmente wurden in einem 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht. (D) Immunoblot-Nachweis der Expression von Hfq in Wildtyp,  $\Delta hfq$ ,  $\Delta hfqC$  und  $\Delta hfqS$  unter Verwendung eines Hfq-Antiserums. Normiert auf den Proteingehalt wurden Gesamtextrakte der jeweiligen Stämme durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die Detektion erfolgte unter Verwendung eines anti-Kaninchen-HRP-Konjugates durch einen Chemilumineszenz-Test. WT; Wildtyp.

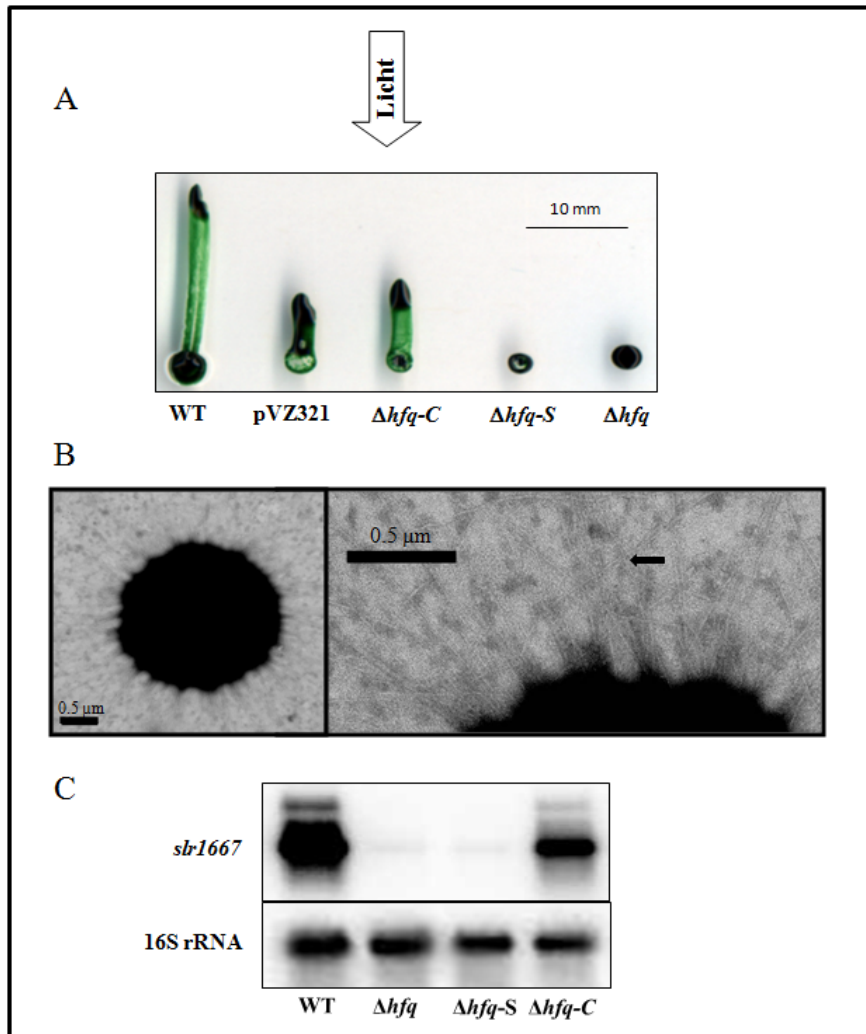


## 2 ERGEBNISSE

---

Für den folgenden Phototaxistest (Abbildung 18) wurde neben Wildtyp,  $\Delta hfq$  und  $\Delta hfqS$  ein Kontrollstamm (*pVZ321*) eingesetzt, der das nicht-modifizierte Plasmid *pVZ321* enthält. Die Abbildung zeigt die erfolgreiche Regeneration der Motilität in der Mutante  $\Delta hfqC$ , während die verkürzte Version von Hfq in  $\Delta hfqS$  den Phänotyp nicht zu komplementieren vermag. Die im Vergleich zum Wildtyp etwas verlangsamte Bewegung von  $\Delta hfqC$  sowie des *pVZ321*-Kontrollstamms ist vermutlich die Konsequenz einer Gleichgewichtsverschiebung im zellulären Energiehaushalt. Dies ließe sich auf das zusätzliche Replikon und die damit einhergehende (Über-) Expression weiterer Proteine (Antibiotika-Resistenzen, Hfq) zurückführen (Bentley *et al.*, 1990). Als weiterer Beleg der erfolgreichen Komplementierung dienten TEM-Aufnahmen, die zeigten, dass  $\Delta hfqC$  wieder große Pili auf der Zelloberfläche ausbildet (Abbildung 18B). Diese Daten konnten zudem auf molekularer Ebene mithilfe eines exemplarischen Northern Blot-Experiments unter Verwendung der *slr1667*-Sonde unterstützt werden (Abbildung 18C).

## 2 ERGEBNISSE



**Abbildung 18: Analyse komplementierter *hfq*-Mutanten mit *ssr3341*.** (A) Phototaxistest. Es wurden jeweils 5  $\mu l$  exponentiell wachsender Flüssigkulturen ( $OD_{750} \sim 0,4$ ) auf 0,5 %ige BG11-Agarplatten ohne Antibiotikum aufgetragen und für 14 Tage durch eine Weißlichtquelle unidirektional mit  $1-3 \mu mol \text{ Photonen } m^{-2} s^{-1}$  belichtet (siehe Pfeil). WT, Wildtyp; *pVZ321*, Kontrollstamm mit nicht-modifiziertem Plasmid *pVZ321*;  $\Delta hfqC$ , komplementierte Mutante mit Plasmid *pVZ-Phfq*;  $\Delta hfqS$ , Kontrollmutante mit Plasmid *pVZ-hfqS* (enthält internes Stoppcodon innerhalb des *hfq* ORF). (B) TEM-Aufnahmen der Typ IV Pili auf der Zelloberfläche von  $\Delta hfqC$ ; rechts in stärkerer Vergrößerung. Die verwendeten Zellen wurden für die Mikroskopie unmittelbar von Fest- in BG11-Flüssigmedium überführt. Die Negativkontrastierung der Strukturen erfolgte mit 0,5 % Uranylacetat (siehe auch Golecki, 1988). (C) Exemplarische Northern Blot-Analyse. Die Gesamt-RNA wurde aus flüssigen Zellkulturen der angegebenen Stämme während der logarithmischen Wachstumsphase isoliert und zu je ca. 5  $\mu g$  in einem 1,3 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Nylonmembran wurde die RNA mit einer radioaktiv markierten *sr1667*-spezifischen RNA-Sonde hybridisiert. Zur Ladekontrolle diente eine 16S-rRNA-spezifische DNA-Sonde.

---

## 2 ERGEBNISSE

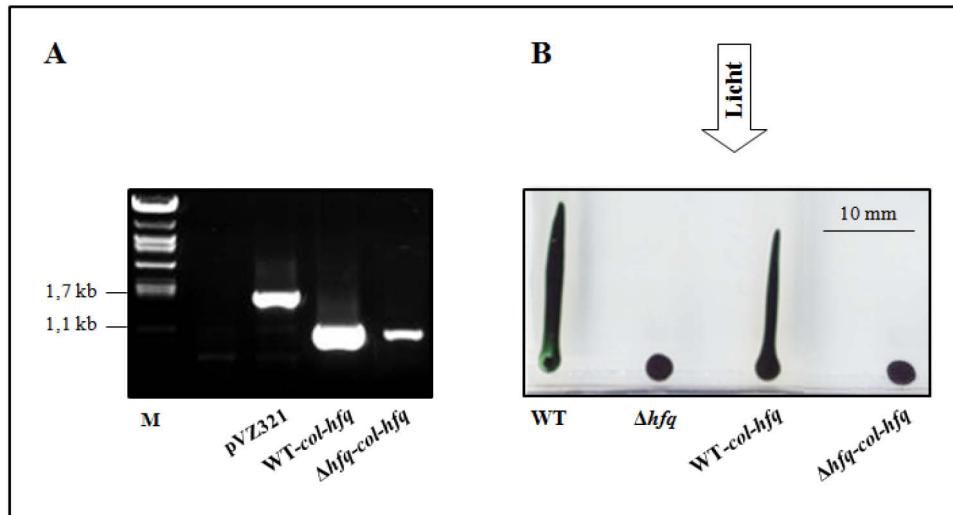
---

### 2.1.2.6.2 Heterologe Komplementierung von $\Delta hfq$ mit *hfq* aus *E. coli*

Hinsichtlich der Aminosäuresequenzen zeigt sich zwischen Hfq aus *Synechocystis* (und anderen Cyanobakterien) und den homologen Proteinen aus *E. coli* sowie anderen Bakterien eine nur schwache Konservierung. (Abbildung 4A; Valentin-Hansen *et al.*, 2004). Die Sequenzidentität mit dem Protein aus *E. coli* beträgt 23,1 %; der erweiterte carboxy-terminale Bereich (ab Aminosäurerest 73 in Hfq aus *E. coli*) der Varianten aus  $\gamma$ - und  $\beta$ -Proteobakterien (Sonnleitner *et al.*, 2004; Večerek *et al.*, 2008) fehlt sogar komplett. Ferner erscheinen die in den vorigen Abschnitten beschriebenen Effekte der *hfq*-Inaktivierung in *Synechocystis* vergleichsweise mild. Insofern stellte sich die Frage, ob zwischen den genannten Organismen in Anbetracht der konservierten Sm-Motive eine funktionelle Konservierung der jeweiligen Hfq-Homologa vorliegt.

Um dem nachzugehen, sollte untersucht werden, ob die  $\Delta hfq$  Mutante von *Synechocystis* durch heterologe Expression von *hfq* aus *E. coli* (im Folgenden *col-hfq*) komplementiert werden kann. Dazu wurde der kodierende Bereich von *col-hfq* aus dem Stamm MC4100 mit dem durch Kupfer regulierten Promoter *PpetJ* (aus *Synechocystis*) und dem Transkriptionsterminator *oop* aus dem Bakteriophagen Lambda fusioniert (siehe Abschnitt 4.2.2.18). Dieses Konstrukt wurde - analog zu der in Abschnitt 2.1.2.6.1 (Abbildung 17) beschriebenen Strategie - mithilfe des Vektors pVZ321 in die Mutante transferiert und die heterologe Expression durch die Verwendung von BG11-Medium ohne Kupfer-Zusatz induziert. Nach erfolgreichem PCR-basiertem Nachweis der stabilen Replikation der Plasmide (Abbildung 19A) konnte der folgende Phototaxis-Test zeigen, dass der nicht-motile Phänotyp von  $\Delta hfq$  durch diese Strategie in der Mutante  $\Delta hfq$ -*col-hfq* nicht komplementiert wurde (Abbildung 19B). Daher lag nun neben der eingeschränkten Sequenzkonservierung ein weiterer wichtiger Hinweis auf abweichende funktionelle Eigenschaften zwischen den homologen Hfq-Proteinen aus Cyanobakterien und Enterobakterien vor.

## 2 ERGEBNISSE



**Abbildung 19: Heterologer Komplementierungsversuch von  $\Delta hfq$  mit  $hfq$  aus *E. coli*.** (A) PCR-Nachweis von pVZ-*col-hfq* in den Transkonjuganten *WT-col-hfq* bzw.  $\Delta hfq-col-hfq$  unter Verwendung der Primer pVZ321-fw und pVZ321-rev. Die PCR-Fragmente wurden in einem 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht. (B) Es wurden jeweils 5 µl exponentiell wachsender Flüssigkulturen ( $OD_{750} \sim 0,4$ ) auf 0,5 %ige BG11-Agarplatten ohne Antibiotikum aufgetragen und für 14 Tage durch eine Weißlichtquelle unidirektional mit  $1-3 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$  belichtet (siehe Pfeil). WT, Wildtyp.

### 2.1.2.6.3 cAMP und Sycrp1

Es existieren einige Hinweise auf eine wichtige Rolle des *second messengers* cAMP in der zellulären Signaltransduktion zur Steuerung der phototaktischen Motilität (Terauchi & Ohmori, 1999; Terauchi & Ohmori, 2004). Sowohl die Inaktivierung des Adenylat-Zyklase-Gens *cyal* als auch des für das cAMP-Rezeptorprotein Sycrp1 kodierenden Gens (*sll1371*) führten in *Synechocystis* zum Verlust der Motilität. (Terauchi & Ohmori, 1999; Yoshimura *et al.*, 2002b). Zudem konnte gezeigt werden, dass die externe Zugabe von cAMP die Motilität der  $\Delta cyal$ - (nicht jedoch der  $\Delta sycrp1$ )-Mutante wiederherstellt (Bhaya *et al.*, 2006; Terauchi & Ohmori, 1999).

Da in den vergleichenden *Microarray*- und Northern Blot-Analysen in Abschnitt 2.1.2.5 insbesondere einige durch Sycrp1 regulierte mRNAs eine Hfq-abhängige Transkriptakkumulation zeigten, sollte zunächst auf physiologischer Ebene untersucht werden, ob es einen direkten Zusammenhang zwischen cAMP/Sycrp1- und Hfq-abhängiger Expressionskontrolle gibt. Dies geschah unter der Annahme, dass Hfq in *Synechocystis* z.B.

## 2 ERGEBNISSE

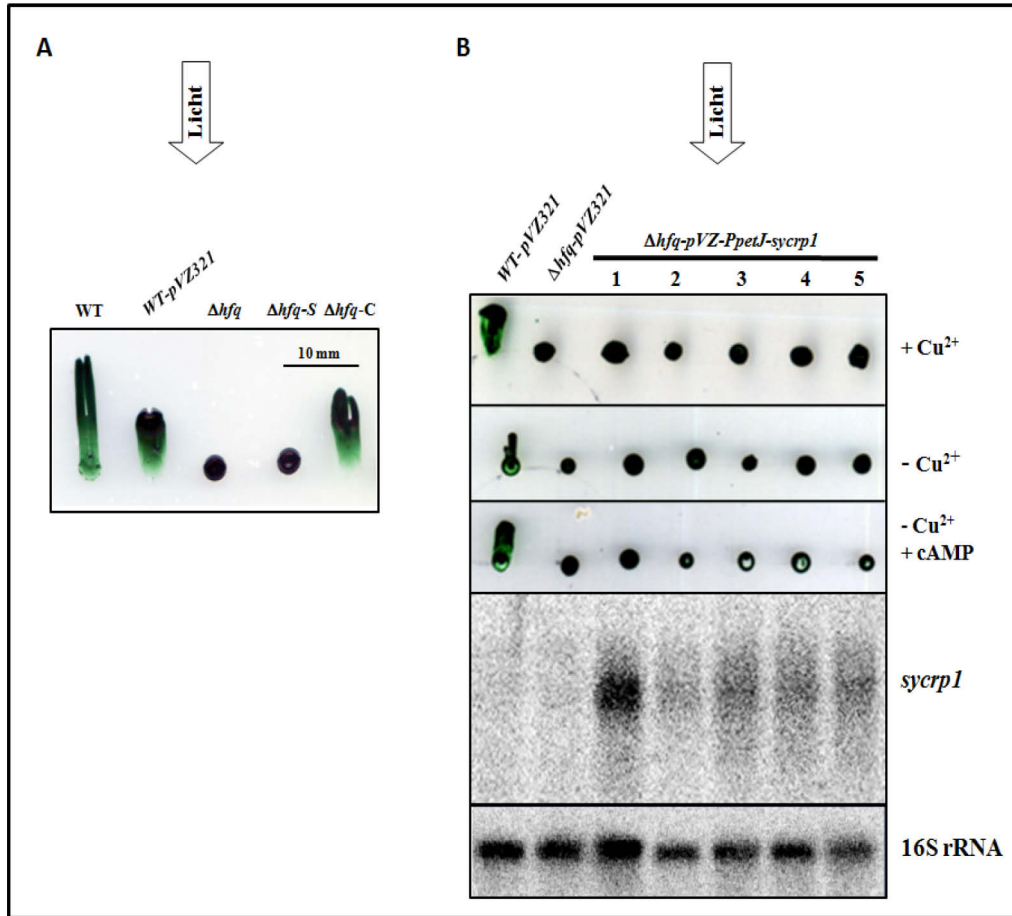
---

auf post-transkriptioneller Ebene direkt oder indirekt Einfluss auf die zellulären Mengen an Cya1- oder Sycrp1-Protein üben könnte. Dazu wurden einerseits Phototaxis-Tests mit cAMP-haltigem Medium durchgeführt, um die möglicherweise reduzierte Cya1-Aktivität in  $\Delta hfq$  zu kompensieren; andererseits wurde *sycrp1* in der  $\Delta hfq$ -Mutante mithilfe des induzierbaren Promotors *PpetJ in trans* überexprimiert (siehe Abschnitt 4.2.2.19) und die resultierende Mutante ebenfalls auf ihre Motilität untersucht.

Für den ersten Versuch wurde den Phototaxis-Testplatten 0,1 mM cAMP zugesetzt und das phototaktische Verhalten der in Abschnitt 2.1.2.6.1 besprochenen  $\Delta hfq$ -Mutanten im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollstämmen beobachtet. Aus Abbildung 20A geht hervor, dass extern appliziertes cAMP die Motilität von  $\Delta hfq$  und  $\Delta hfqS$  nicht wiederherstellen konnte. Ein generell verminderter zellulärer cAMP-Gehalt ist insofern nicht (die einzige) Ursache für den nicht-motilen Phänotyp von  $\Delta hfq$ .

Für den zweiten Versuch wurde der kodierende Bereich von *sycrp1* (*sll1371*) inklusive der putativen Terminatorregion (300 bp stromabwärts) mit dem durch Kupfer regulierten Promoter *PpetJ* fusioniert und entsprechend den Angaben in den Abschnitten 2.1.2.6.1 und 2.1.2.6.2 mithilfe des Vektors pVZ321 konjugativ in die  $\Delta hfq$ -Mutante transferiert. Der Erfolg der Mutagenese wurde durch eine PCR-Analyse mit einem *PpetJ*- bzw. *sycrp1*-spezifischem Primerpaar nachgewiesen (nicht gezeigt). Die Kontrolle der Überexpression erfolgte durch Northern Blot-Analysen. Aliquots derselben Kulturen wurden im Phototaxistest darauf untersucht, ob hohe zelluläre *sycrp1*-Transkriptmengen den phänotypischen Defekt von  $\Delta hfq$  kompensieren können. Eine der Testplatten enthielt einen Zusatz von 0,1 mM cAMP. Auf diese Weise sollte ein möglicherweise erhöhter cAMP-Bedarf infolge der *sycrp1*-Überexpression überprüft werden. Abbildung 20B zeigt, dass der nicht-motile Phänotyp von  $\Delta hfq$  auch durch diese Strategie nicht komplementiert wird. Da der Wildtyp-Kontrollstamm (*WT-pVZ321*) hinsichtlich seines Laufverhaltens durch den Kupfermangel offensichtlich kaum beeinträchtigt ist, sollte dieser Faktor keine Rolle gespielt haben.

## 2 ERGEBNISSE



**Abbildung 20: Komplementierungsversuch von  $\Delta hfq$  durch extern appliziertes cAMP und *in trans*-Überexpression von *syncr1*.** (A) Für die Phototaxistests wurden jeweils 5  $\mu$ l exponentiell wachsender Flüssigkulturen ( $OD_{750} \sim 0,4$ ) auf 0,5 %ige BG11-Agarplatten ohne Antibiotikum aufgetragen und für 14 Tage von einer Weißlichtquelle unidirektional mit 1-3  $\mu$ mol Photonen  $m^{-2} s^{-1}$  belichtet (siehe Pfeile). (A) Einfluss von extern zugeführtem cAMP auf den nicht-motilen Phänotyp von  $\Delta hfq$ . Den Phototaxisplatten wurde 0,1 mM cAMP zugesetzt. WT, Wildtyp; *WT-pVZ321*, Stamm mit nicht-modifiziertem Plasmid pVZ321;  $\Delta hfqC$ , komplementierte Mutante mit Plasmid pVZ-Phfq;  $\Delta hfqS$ , Kontrollmutante mit Plasmid pVZ-hfqS (enthält Stoppcodon innerhalb der kodierenden *hfq*-Sequenz). (B) Analyse von *syncr1*-überexprimierenden  $\Delta hfq$ -Mutanten ( $\Delta hfq$ -pVZ-PpetJ-*syncr1*). Fünf unabhängige Klone wurden im Vergleich mit den Kontrollstämmen *WT-pVZ321* und  $\Delta hfq$ -pVZ321 auf ihr phototaktisches Verhalten getestet (oben). Die Phototaxisplatten enthielten Standardmedium (+ Cu<sup>2+</sup>), kupferfreies Medium (- Cu<sup>2+</sup>) bzw. kupferfreies Medium mit Zusatz von 0,1 mM cAMP (- Cu<sup>2+</sup>, + cAMP). Zur Kontrolle der Überexpression von *syncr1* wurden Northern Blot-Analysen durchgeführt (unten). Die Gesamt-RNA wurde parallel aus denselben flüssigen Zellkulturen isoliert und zu je ca. 5  $\mu$ g in einem 1,3 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Nylonmembran wurde die RNA mit einer [ $\alpha^{32}P$ ]-markierten, *syncr1*-spezifischen RNA-Sonde hybridisiert. Zur Ladekontrolle diente eine 16S-rRNA-spezifische DNA-Sonde.

### 2.2 Strukturanalysen eines rekombinanten Hfq-Proteins aus *Synechocystis*

Die von den proteobakteriellen Varianten stark abweichenden Aminosäuresequenzen cyanobakterieller Hfq-Proteine warf (auch angesichts des in Abschnitt 2.1.2.6.2 besprochenen Komplementierungsversuchs) die Frage nach der Konservierung übergeordneter Strukturen und dem Potenzial zur RNA-Bindung von Hfq aus *Synechocystis* auf. Die bisher strukturell näher charakterisierten Hfq-Proteine aus *Staphylococcus* (Schumacher *et al.*, 2002), *Pseudomonas* (Nikulin *et al.*, 2005), *E. coli* (Sauter *et al.*, 2003) und dem Archaeon *Methanococcus jannaschii* (Nielsen *et al.*, 2007) zeigen im Monomer jeweils die konservierte  $\beta 5\alpha 1\beta 1\beta 2\beta 3\beta 4$ -Topologie und bilden durch Interaktionen zwischen den  $\beta 4$ -und  $\beta 5$ -Faltblättern zyklische Homohexamere (Übersicht in Brennan & Link, 2007).

Für die Aufklärung der Tertiär- und Quartärstruktur des Hfq-Proteins aus *Synechocystis* wurde es rekombinant in *E. coli* exprimiert, gereinigt und *in vitro* durch Größenausschlusschromatographie bzw. kristallographisch durch eine Röntgenstrukturanalyse untersucht. Die kristallographischen Untersuchungen wurden in der Arbeitsgruppe von Cheryl Kerfeld, M.A., Ph.D. (US Department of Energy -Joint Genome Institute, Walnut Creek, CA, USA) durchgeführt.

#### 2.2.1 Heterologe Expression und Reinigung von Syn-Hfq

Für die rekombinante Herstellung sollte ein Expressions- und Reinigungssystem zum Einsatz kommen, mithilfe dessen es möglich ist, das Hfq-Protein aus *Synechocystis* (von hier an Syn-Hfq) ohne ein potenziell störendes Affinitäts-tag zu erhalten. Für diesen Zweck erschien das *GST Gene Fusion System* (GE Healthcare) als besonders geeignet. Unter Verwendung des zugehörigen Expressionsvektors pGEX-6P-1 wurde das Syn-Hfq-Protein N-terminal mit einem Glutathion-S-Transferase (GST)-tag fusioniert und für die Reinigung an einer Glutathion-Affinitätsmatrix immobilisiert. Die 3C-Proteaseschnittstelle im C-terminalen Bereich des GST-tags erlaubte es, Syn-Hfq durch einen Verdau mit der PreScission-Protease vom Affinitäts-tag zu lösen, sodass am N-Terminus lediglich ein Überhang von fünf Aminosäureresten (Gly-Pro-Leu-Gly-Ser) übrig blieb. In Vorversuchen erwies sich eine induzierte, dreistündige Expression bei 37 °C im Stamm *E. coli* DH5 $\alpha$ -pGEX-Hfq als

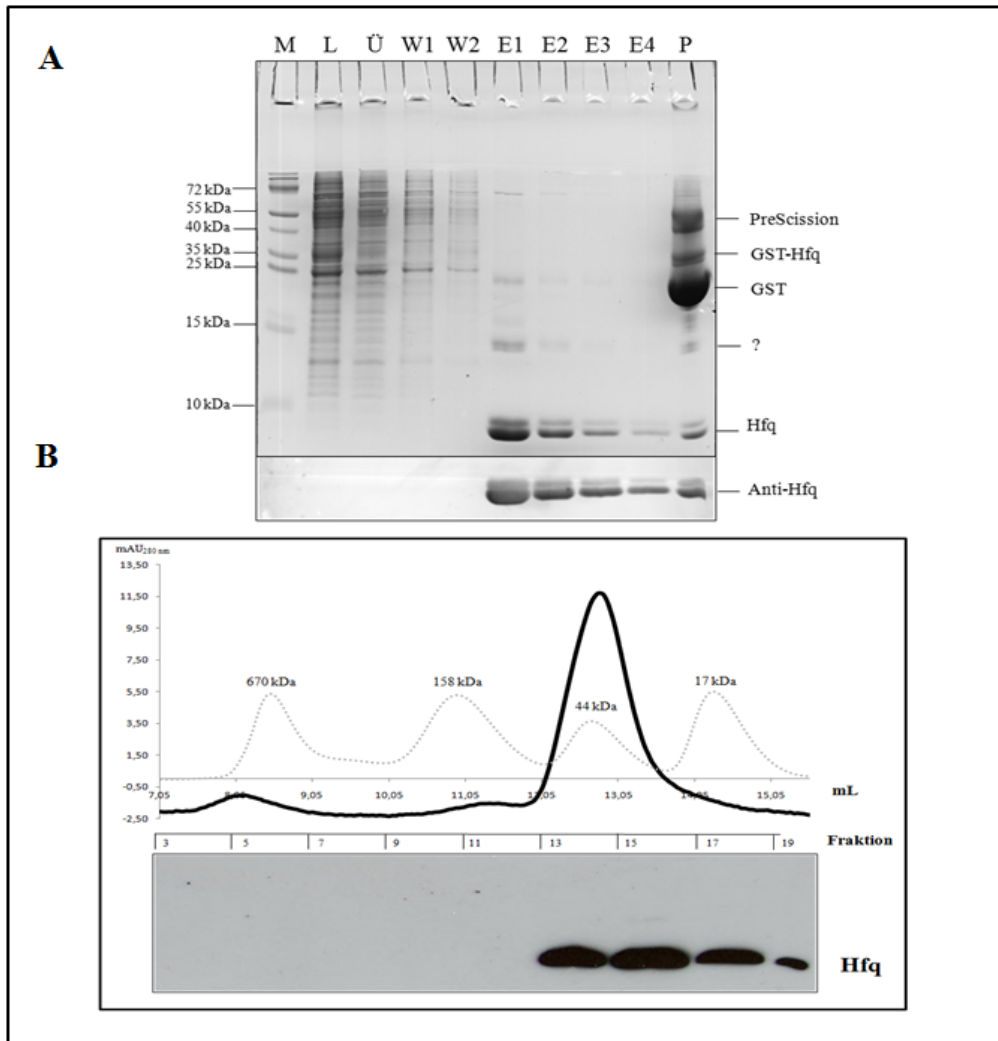
## 2 ERGEBNISSE

---

ausreichend effizient für zufriedenstellende Ausbeuten an gereinigtem Protein (Daten nicht gezeigt), sodass keine Notwendigkeit bestand die Expressionsbedingungen (z.B. durch längere Inkubation bei niedrigeren Temperaturen) zu optimieren. In Abbildung 21A ist die SDS-PAGE-Analyse einer exemplarischen Reinigung des Proteins aus dem Stamm DH5 $\alpha$  gezeigt. In den Eluaten waren jeweils dominante Doppelbanden unterhalb des 10 kDa-Markerproteins sichtbar, die dem rekombinanten Syn-Hfq-Monomer mit einem theoretischen Molekulargewicht von 7,83 kDa entspricht. Die Identität konnte durch Immunoblot-Analysen mit einem spezifischen Hfq-Antiserum verifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Die Ursache für das Auftreten des Proteins als Doppelbande im denaturierenden Gel konnte nicht abschließend geklärt werden. Da jedoch Reinigungen eines im protease-defizienten Stamm BL21 exprimierten Syn-Hfq-Proteins eine einzige distinkte Proteinbande unter gleichen Analysebedingungen hervorbrachten, könnte das Auftreten der Doppelbande auf einen proteolytischen Verdau an einem der Termini des Proteins zurückzuführen sein. Proteine aus beiden Stämmen zeigten schließlich das gleiche aus Größenausschlussanalysen (Abbildung 21B) hergeleitete Oligomerisierungsverhalten. Für die in Abschnitt 2.3.1 dargestellten Gel-Retardationsanalysen hatte diese Diskrepanz ebenfalls keine Bedeutung. Da die in Abbildung 21A gekennzeichneten Verunreinigungen in Präparationen aus DH5 $\alpha$ -Kulturen generell von geringem Ausmaß waren, wurde dieser Stamm (auch wegen der besseren Ausbeute an rekombinantem Syn-Hfq) in den meisten Fällen für die Expression eingesetzt. Die einleitende *in vitro*-Strukturanalyse von Syn-Hfq erfolgte durch Größenausschlusschromatographie im HPLC-Verfahren bei optimaler Auflösung im Molekulargewichtsbereich zwischen 3 und 70 kDa (für globuläre Proteine). Das Chromatogramm (exemplarisch in Abbildung 21B dargestellt) zeigt einen Hauptpeak im apparenten Größenbereich des 44 kDa-Markerproteins. Bei einem theoretischen Molekulargewicht des Hfq-Monomers von 7,83 kDa weisen diese Daten auf eine Hexamerisierung ( $\sim$ 47 kDa) des Proteins *in vitro* hin. Die Identität des entsprechenden Proteins konnte durch eine Immunoblot-Analyse der gesammelten Fraktionen mit dem Hfq-Antiserum validiert werden (Abbildung 21B). Das gezeigte Elutionsprofil war hoch reproduzierbar und unabhängig vom Reinheitsgrad der Proteinpräparation.



## 2 ERGEBNISSE



**Abbildung 21: Reinigung und Größenausschlussanalyse des rekombinanten Hfq-Proteins aus *Synechocystis*.** (A) Die Affinitätsreinigung des überexprimierten Proteins aus einer 600 ml-Kultur von *E. coli* DH5 $\alpha$ -pGEX-Hfq erfolgte im *batch*-Verfahren unter Verwendung von Glutathion-Agarose und der *PreScission* Protease als enzymatischen Eluenten. Das Zelllysate (L), der Überstand (Ü), die Waschfraktionen (W1, W2), die vier Eluate (E1-4) und das Sediment der Glutathion-Agarose (P) wurden mit einem Protein Marker (M) in einem 6-18 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Coomassie-Brilliant-Blue gefärbt (oben) bzw. auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Der immunologische Nachweis erfolgte mit einem Hfq-spezifischen Antiserum (Anti-Hfq; unten). Die Fraktionen E1-4 wurden vereinigt und mit einem Zentrifugalkonzentrator (Ausschlussgrenze: 5000 Da) eingengt. (B) Chromatogramm des Größenausschluss-Experiments und immunologischer Nachweis von Hfq. Aufgetragen sind die relativen Absorptionswerte bei 280 nm gegen das Retentionsvolumen (ml). Die gestrichelte Kurve markiert den Größenstandard. Der Durchlauf wurde in 0,5 ml Fraktionen gesammelt und nach einer DOC/TCA-Fällung mit Anti-Hfq im Immunoblot analysiert.

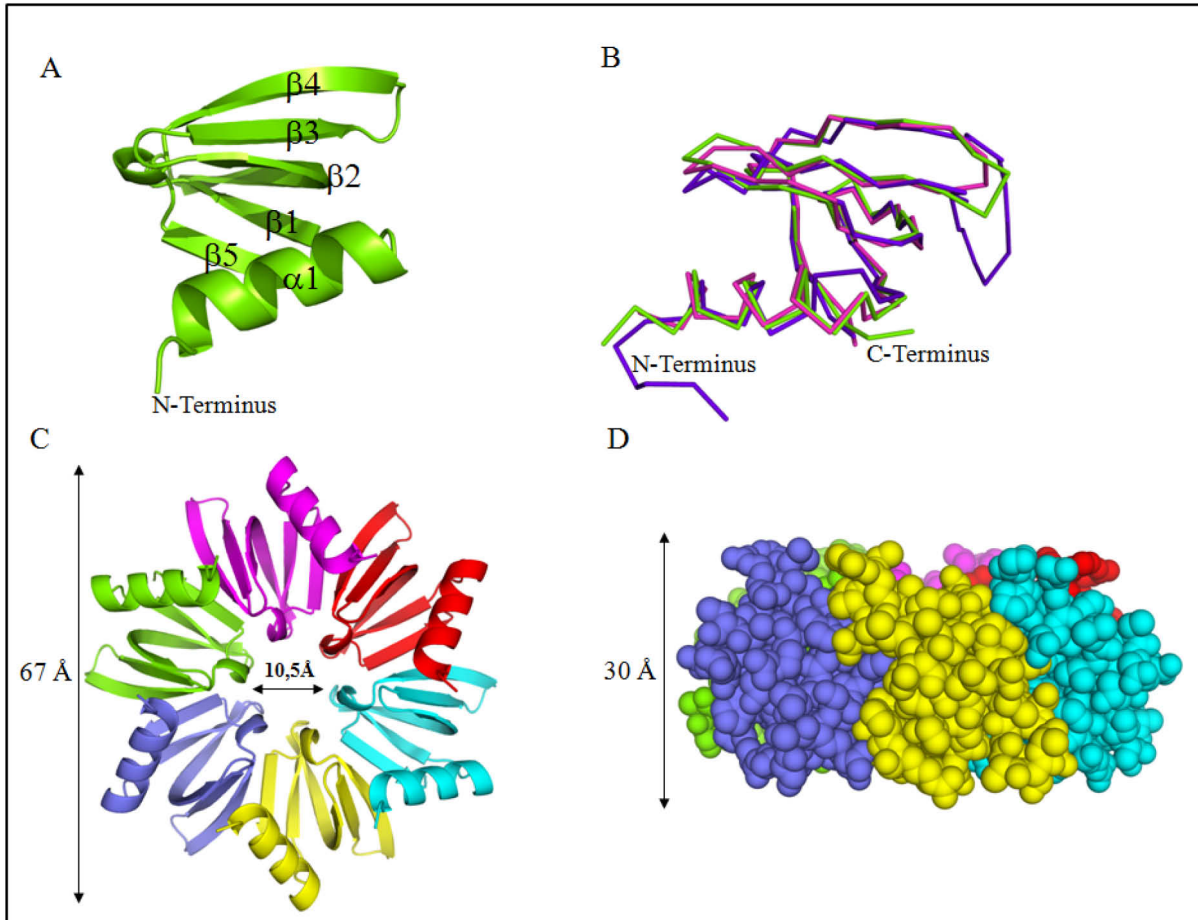
### 2.2.2 Röntgenstrukturanalyse von Hfq aus *Synechocystis*

Für die Kristallisation von Hfq aus *Synechocystis* wurde das rekombinante Protein entsprechend der in Abschnitt 2.2.1 besprochenen Strategie im Stamm *E. coli* BL21 exprimiert und anschließend gereinigt. Diese Arbeiten wurden ausschließlich in der Arbeitsgruppe von Cheryl Kerfeld (US Department of Energy -Joint Genome Institute, Walnut Creek, CA, USA) durchgeführt. Dort wurde mithilfe der Dampfdiffusionsmethode ein orthorhombisches Kristallsystem des Proteins dargestellt und zur Generierung von Diffraktionsdaten am *Lawrence Berkeley's Advanced Light Source beamline 8.2.2.* (CA, USA) analysiert. Die Struktur wurde dort durch die Methode des *Molecular Replacement* mit dem homologen Protein aus *E. coli* als Suchmodell (PDB-Eintrag 1hk9) gelöst und verfeinert. Die Auflösung der Kristallstruktur betrug 2,25 Å.

#### 2.2.2.1 Struktur des Syn-Hfq-Monomers

Syn-Hfq besitzt ein zentrales fünfsträngiges, ( $\beta$ -1 bis  $\beta$ -5, gezählt von N-bis C-Terminus) antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt, welches am Amino-Terminus an eine  $\alpha$ -Helix ( $\alpha$ 1) anschließt. Daher ergibt sich insgesamt die für die Sm- und Lsm-Proteinfamilie typische  $\beta$ 5 $\alpha$ 1 $\beta$ 1 $\beta$ 2 $\beta$ 3 $\beta$ 4-Topologie mit dem klassischen Sm-Faltungsmotiv (Abbildung 22A). Trotz der beträchtlich abweichenden Primärstrukturen überlagert das Rückgrat des Syn-Hfq-Proteins die Hfq-Version aus *Staphylococcus* (Sau-Hfq) sowie Lsma aus *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Abbildung 22B). Der in Abbildung 23 dargestellte, strukturbasierte Vergleich der Aminosäuresequenzen von Syn-Hfq, Sau-Hfq und Eco-Hfq veranschaulicht die entscheidenden Unterschiede innerhalb der Sekundärstrukturen dieser Proteine. Dabei fällt auf, dass keiner der an der RNA-Bindung von Sau-Hfq beteiligten Aminosäurereste (Schumacher *et al.*, 2002) in der Struktur des Proteins aus *Synechocystis* konserviert ist. Während die basischen Reste Lys57 und His58 in allen bisher strukturell charakterisierten (sowie vielen weiteren) Hfq-Proteinen streng konserviert sind, sind Gln8, Lys41 und Tyr42 (bei ansonsten ebenfalls hoher Konservierung innerhalb der Eubakterien) z.T. durch chemisch verwandte Reste substituiert (z.B. Tyr42  $\rightarrow$  Phe42 in *E. coli*). Derartige, funktionell (apparent) neutrale Substitutionen liegen in der Sequenz von Syn-Hfq nicht vor, sodass sich hierin eine generelle funktionelle Divergenz zwischen diesen Proteinen andeutet.

## 2 ERGEBNISSE

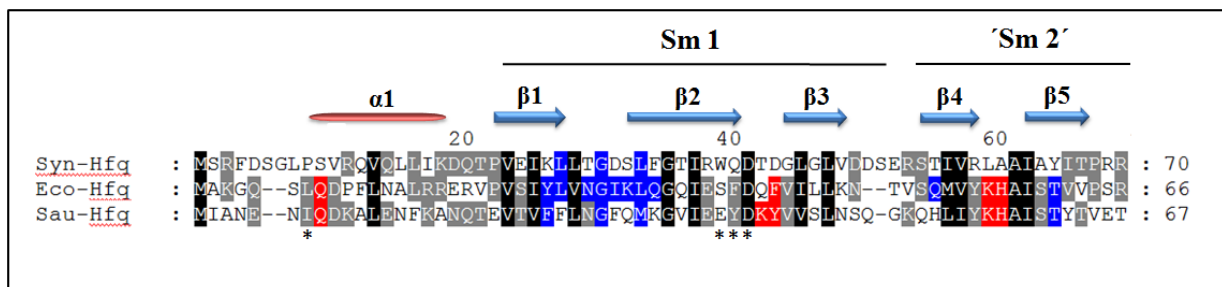


**Abbildung 22: Kristallstruktur von Monomer und Hexamer des rekombinanten Hfq-Proteins aus *Synechocystis*.** (A) Bänderdarstellung des Monomers mit markierten Sekundärstrukturelementen ( $\alpha 1$ ,  $\beta 1$ -5). (B) Überlagerung des Rückgrats von drei monomeren Hfq-bzw. Lsm-Kristallstrukturen. Syn-Hfq: grün; Sau-Hfq (PDB-Eintrag 1kq1), violett; *Methanobacterium thermoautotrophicum* Lsm $\alpha$  (PDB Eintrag 1mgq; Collins *et al.*, 2001). (C) Modell der proximalen Seite (zum N-Terminus) des Hexamers. Für diese Darstellung wurden ungeordnete Atome des Rückgrats modelliert. Porendurchmesser sowie Durchmesser des Hexamers sind in Å angegeben. (D) Raumfüllende Darstellung des Syn-Hfq-Hexamers in der Seitenansicht. Die proximale Seite liegt oben. Farben wie in (C).

Zwischen den cyanobakteriellen Vertretern zeigt sich hinsichtlich der jeweiligen Substituenten dieser Aminosäurereste insgesamt eine recht schwache Konservierung. Der in der terminalen  $\alpha$ -Helix lokalisierte Rest Ser10 ( $\rightarrow$  Gln8 in Sau-Hfq) ist in den Hfq-Sequenzen verschiedener Cyanobakterien (abgesehen von einigen Stämmen der Gattungen *Synechococcus* und *Prochlorococcus*) hochkonserviert. Der Rest Leu60 im 'Sm2'-Motiv von Syn-Hfq ( $\rightarrow$  Lys57 aus Sau-Hfq) dagegen ist mit Ausnahme des nahe verwandten Genus *Microcystis* in anderen cyanobakteriellen Proteinen - entsprechend den „konventionellen“ Hfq-Varianten - durch

## 2 ERGEBNISSE

einen basischen Rest substituiert. Alle weiteren Substituenten der RNA-bindenden Aminosäurereste (Lys41, Tyr42, His58 in Sau-Hfq) sind zwischen den cyanobakteriellen Proteinen recht divergierend. Von den insgesamt zehn an der Poly(A)-Bindung von Eco-Hfq beteiligten Aminosäureresten sind lediglich drei in Syn-Hfq konserviert: Leu28, Leu34 und Gly31 (in Eco-Hfq Leu26, Leu32 und Gly31 aus den purinnukleotid-spezifischen Bindungstaschen [*R-site*]). Diese Reste sind in cyanobakteriellen Hfq-Orthologen nicht invariabel, aber zu mindestens 60 % konserviert.



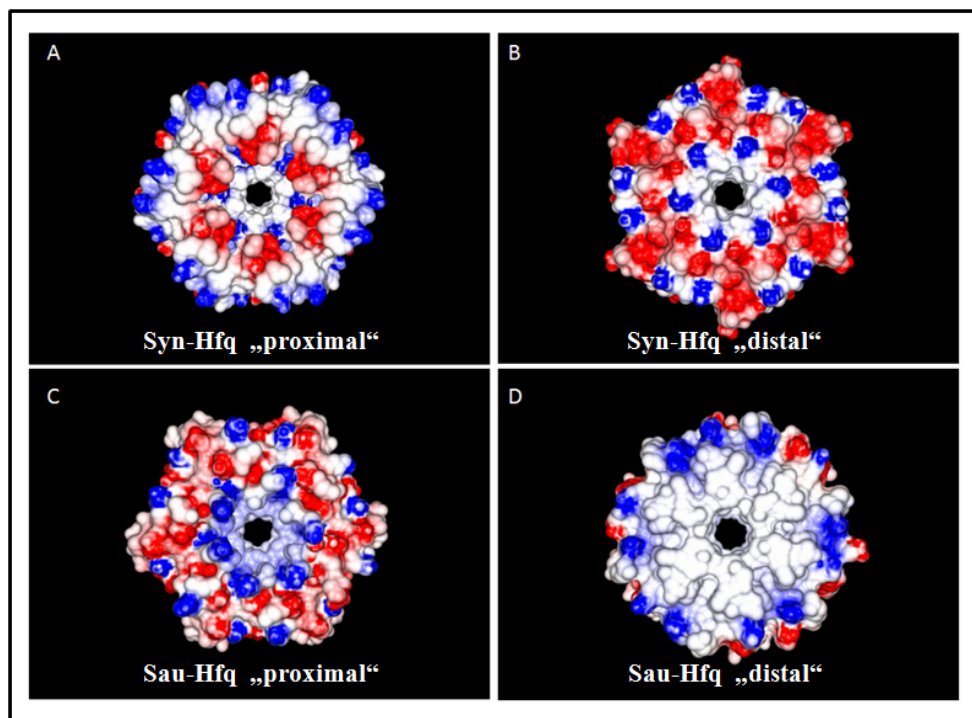
**Abbildung 23: Strukturbasierter Sequenzvergleich der Hfq-Proteine Syn-Hfq, Eco-Hfq und Sau-Hfq.** Die Aminosäuresequenzen wurden mithilfe der Überlagerung der entsprechenden 3D Strukturen (siehe Abbildung 22B) aliniert. Komplette konservierte Aminosäurereste (100 %), weiß mit schwarzem Hintergrund; hoch konservierte Aminosäurereste (>80 %), weiß mit grauem Hintergrund. Roter Hintergrund, AU-Bindungstasche von Sau-Hfq (Schumacher *et al.*, 2002); blauer Hintergrund, Poly(A)-Bindungstasche von Eco-Hfq (Nielsen *et al.*, 2009). Die Sekundärstrukturelemente von Syn-Hfq sind oberhalb der Alinierung als roter Balken (N-terminale  $\alpha$ -Helix) bzw. blaue Pfeile ( $\beta$ -Stränge) dargestellt. \*Die in Cyanobakterien streng konservierten Reste Pro9, Trp40, Gln41, Asp42.

### 2.2.2.2 Quartärstruktur

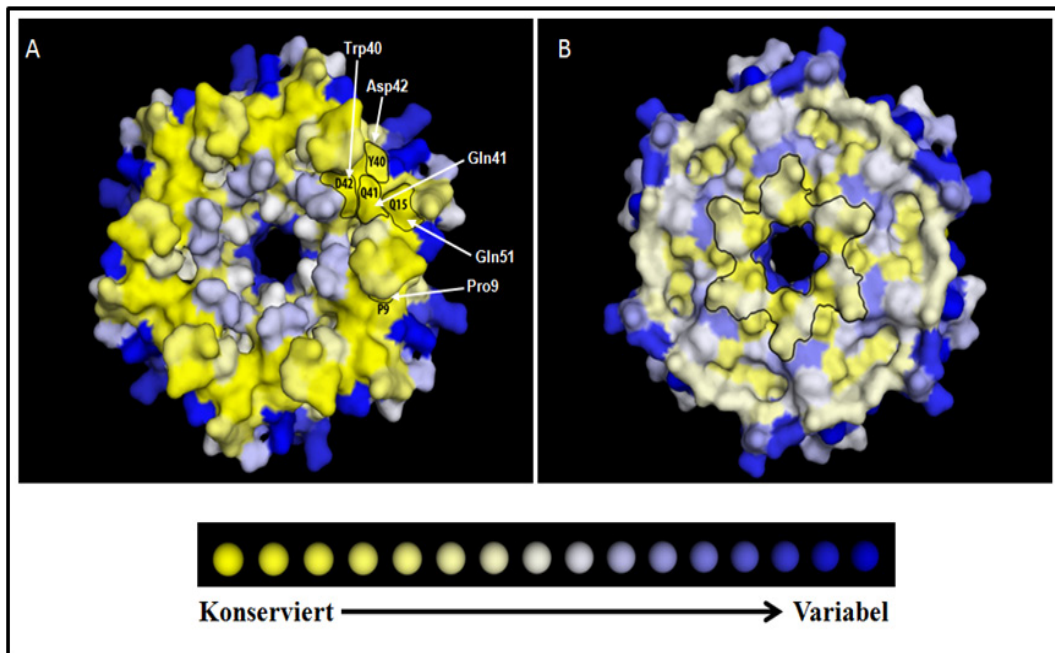
In Abbildung 22C,D ist dargestellt, dass Syn-Hfq im Kristall ringförmige Hexamere mit einem Durchmesser von ca. 67 Å und einer Dicke von ~30 Å bildet. Die zentrale Pore hat einen Durchmesser von ~10,5 Å. Auch auf dieser Ebene zeigt das Protein demnach eine starke Konservierung wesentlicher Strukturcharakteristika bisher untersuchter Hfq-Proteine. Die hexamere Struktur entsteht vorwiegend durch die Interaktion des  $\beta$ 5-Strangs eines Monomers mit dem  $\beta$ 4-Strang des benachbarten Monomers. Wie bereits in Abschnitt 2.2.1 erläutert, stellt dieses Hexamer offenbar die vorherrschende Form des rekombinanten Proteins in Lösung dar. Bei der Betrachtung der proximalen Seite des Syn-Hfq-Hexamers fällt auf, dass die ansonsten strukturell konservierte Furche um die zentrale Pore ungeladen ist (Abbildung 24A). In diesem Bereich befindet sich bei Sau-Hfq (Abbildung 24C) die AU-

## 2 ERGEBNISSE

Bindungstasche mit den konservierten basischen und aromatischen Aminosäureresten, welche in Syn-Hfq komplett substituiert sind. Die proximale Oberfläche von Syn-Hfq ist größtenteils unpolare bzw. negativ geladen und erscheint wenig geeignet für die Bindung von RNA. Auf der distalen Seite des Hexamers findet sich eine relativ gleichmäßige Verteilung potenzieller basischer Bindungsorte für RNA (Abbildung 24B). Es herrscht dort jedoch im Vergleich zu der proximalen Seite eine relativ schwache Sequenzkonservierung zwischen orthologen cyanobakteriellen Proteinen. Doch enthält dieser Bereich eine potenzielle Nukleotid-Bindestelle. Dieses als *nest* bezeichnete Strukturmotiv ist eine durch aufeinanderfolgende NH-Gruppen des Polypeptid-Rückgrats gebildete Vertiefung, die in Mononukleotid- und Dinukleotid-bindenden Enzymen zu finden ist (Watson & Milner-White, 2002). In der Kristallstruktur von Syn-Hfq umfasst dieses *nest*-Motiv die Reste 30-32 [Thr-Gly-Asp] und bildet aufgrund dessen Lage nahe der sechsfachen Symmetrieachse eine fortlaufende Mulde auf der „distalen“ Oberfläche des Hexamers (siehe Abbildung 25B).



**Abbildung 24: Elektrostatische Oberflächenpotenziale von Syn-Hfq und Sau-Hfq im Vergleich.** (A,B) Oberflächenpotenzial der „proximalen“ (A) bzw. der „distalen“ Seite (B) des Syn-Hfq-Hexamers (C, D) Oberflächenpotenzial der „proximalen“ (C) und „distalen“ (D) Seite des Sau-Hfq-Hexamers (PDB-Eintrag 1kq1; Schumacher *et al.*, 2002). Rot, elektronegat; blau, elektropositiv. Die Modelle wurden in der Arbeitsgruppe von Cheryl Kerfeld mit dem Programm GRASP2 (Petrey & Honig, 2003) erstellt.



**Abbildung 25: Primärstrukturkonservierung zwischen cyanobakteriellen Hfq- Proteinen, dargestellt auf der molekularen Oberfläche des Syn-Hfq Hexamers.** Die Aminosäuren sind nach der Stärke ihrer Konservierung innerhalb der Sequenz mithilfe eines gelb-weiß-blau- Gradienten eingefärbt (siehe Farbskala). Die relative Sequenzkonservierung wurde in der Arbeitsgruppe von Cheryl Kerfeld unter Verwendung einer Alinierung von 29 cyanobakteriellen Hfq Sequenzen mit dem Programm ConSurf (<http://consurf.tau.ac.il/>) berechnet. **(A)** „Proximale“ Seite des Syn-Hfq-Hexamers. Die fünf in cyanobakteriellen Hfq- Proteinen absolut invariablen Reste (Pro9, Gln15, Trp40, Gln41 und Asp42) sind in einem der sechs Protomere hervorgehoben. **(B)** „Distale“ Seite des Syn-Hfq-Hexamers. Das putative Anionen bindende *nest*- Motiv (Reste 30-32) ist umrissen.

### 2.3 Identifikation und Untersuchungen Hfq-abhängiger sRNAs in *Synechocystis*

Die bisher gezeigten Daten gewähren einen ersten Einblick in die globale Funktion des Hfq-Proteins in *Synechocystis*. Auf physiologischer Ebene ließ sich zunächst eine essenzielle Rolle von Hfq bei der Vermittlung phototaktischer Motilität darstellen. Diese Erkenntnisse konnten durch molekulare Analysen gestützt und insofern vertieft werden, als die Expression einiger bekanntlich an der Motilität beteiligten Gene offenbar stark von Hfq abhängt.

Keinen Hinweis gibt es bisher auf den Mechanismus, durch den Hfq diese Prozesse in *Synechocystis* steuert. Die Funktion des orthologen Proteins aus *E. coli* (sowie einiger weiterer untersuchter Hfq-Varianten) ist primär auf dessen RNA-Bindungsaktivität zurückzuführen (siehe z.B. Jouselin *et al.*, 2009; Morita *et al.*, 2008; Valentin-Hansen *et al.*,

## 2 ERGEBNISSE

---

2004). Ein besonderer und weitläufig untersuchter Aspekt ist dabei die zentrale Rolle dieses Proteins in der post-transkriptionellen Kontrolle der Genexpression durch regulatorische sRNAs. Solche sRNAs werden durch die hochaffine Bindung an Hfq entweder stabilisiert (Moll *et al.*, 2003a; Møller *et al.*, 2002; Pfeiffer *et al.*, 2007; Sledjeski *et al.*, 2001; Sonnleitner *et al.*, 2006; Viegas *et al.*, 2007); oder Hfq vermittelt/erleichtert als RNA-Chaperon *in vitro* die Interaktion der sRNA mit der entsprechenden Ziel-mRNA (Arluison *et al.*, 2007; Hopkins *et al.*, 2009; Lease & Woodson, 2004; Moll *et al.*, 2003b; Soper & Woodson, 2008).

Die Frage nach der Konservierung dieser funktionellen Eigenschaften in der cyanobakteriellen Hfq-Variante wurde erheblich durch das negative Ergebnis des in Abschnitt 2.1.2.6.2 dargestellten, heterologen Komplementierungsexperiments genährt. Wie dort gezeigt, konnte der Phänotyp der  $\Delta hfq$ -Insertionsmutante von *Synechocystis* nicht durch die *in trans* exprimierte Hfq-Variante aus *E. coli* aufgehoben werden. Entsprechend lieferte umgekehrt auch der Versuch, die  $\Delta hfq$ -Mutante von *Salmonella* (Sittka *et al.*, 2007) mit dem *hfq*-Locus aus *Synechocystis* genetisch zu komplementieren, negative Ergebnisse (persönliche Mitteilung von Alexandra Sittka, MPI für Infektionsbiologie, Berlin). Entsprechend deckte auch die Röntgenstrukturanalyse des Syn-Hfq-Proteins ggf. maßgebliche Unterschiede im Potenzial zur Bindung AU-reicher RNA-Sequenzen auf.

Vor diesem Hintergrund beschäftigen sich die folgenden Teilabschnitte mit einer zentralen Fragestellung: Gibt es in *Synechocystis* ein von Hfq abhängiges Repertoire regulatorisch aktiver sRNAs, und besitzt Hfq dabei eine mit jener der enterobakteriellen Varianten vergleichbare Aktivität?

Um sich dieser Fragestellung zu nähern, sollten in ersten Experimenten die Expressionsniveaus bekannter, stark exprimierter cyanobakterieller sRNAs in  $\Delta hfq$  untersucht werden. Darüber hinaus wurden *in vitro* Protein-RNA-Bindungsstudien u.a. mit bekannten enterobakteriellen sRNAs durchgeführt (Abschnitt 2.3.1).

---

## 2 ERGEBNISSE

---

Zudem sollten weitere RNA-Moleküle in *Synechocystis* identifiziert werden, deren Expressionsniveaus direkt oder indirekt von Syn-Hfq abhängen. Da das annotierte, proteinkodierende Spektrum des Transkriptoms (unter standardisierten Kultivierungsbedingungen) bereits durch die Expressionsanalysen in Abschnitt 2.1.2.5.2 abgedeckt wurde, standen in den folgenden Untersuchungen v.a. hypothetische regulatorische sRNAs im Fokus. Zu deren Identifikation wurden vergleichende Expressionsanalysen zwischen Wildtyp und  $\Delta hfq$  mithilfe eines speziellen *Tiling-arrays* durchgeführt, dessen Sonden ca. 40 % des Chromosoms inklusive „intergenischer Regionen“ und des *antisense*-Strangs abdecken.

### 2.3.1 *In vitro* Bindungsstudien zeigen keine eindeutige Bindung bekannter sRNAs an Syn-Hfq

Um erste Einblicke in die RNA-Bindungscharakteristika von Hfq aus *Synechocystis* zu bekommen, wurde die Affinität des rekombinanten Proteins Syn-Hfq (siehe Abschnitt 2.2.1) zu publizierten, enterobakteriellen Hfq-bindenden sRNAs und einer cyanobakteriellen sRNA *in vitro* mithilfe von *Electrophoretic Mobility Shift Assays* (EMSA) analysiert. Dieses Verfahren basiert auf der Eigenschaft von Protein-RNA/DNA-Komplexen, in nicht-denaturierenden Gelen ein verzögertes elektrophoretisches Laufverhalten gegenüber den freien Nukleinsäurefragmenten aufzuweisen (Hellman & Fried, 2007). Der EMSA ist die Standardmethode zum qualitativen Nachweis sowie zur semi-quantitativen Charakterisierung von Hfq-RNA-Komplexen *in vitro* (siehe z.B. Folichon *et al.*, 2003; Lease & Woodson, 2004; Mitobe *et al.*, 2008; Soper & Woodson, 2008; Sun & Wartell, 2006; Zhang *et al.*, 1998), sodass dieser Test angesichts der zahlreichen Referenzen auch in dieser Arbeit zur Anwendung kam.

#### RprA

Die ersten Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Nelly Said im Labor von Dr. Jörg Vogel (MPI für Infektionsbiologie, Berlin) durchgeführt. Die dort im Vorfeld durch *in vitro* Transkription präparierte, [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-markierte enterobakterielle Hfq-bindende sRNA RprA (Updegrove *et al.*, 2008) wurde bei Endkonzentrationen von je 5 nM für 30 min bei 37 °C mit dem rekombinanten Syn-Hfq-Protein in aufsteigenden Konzentrationen (mit Bezug auf



## 2 ERGEBNISSE

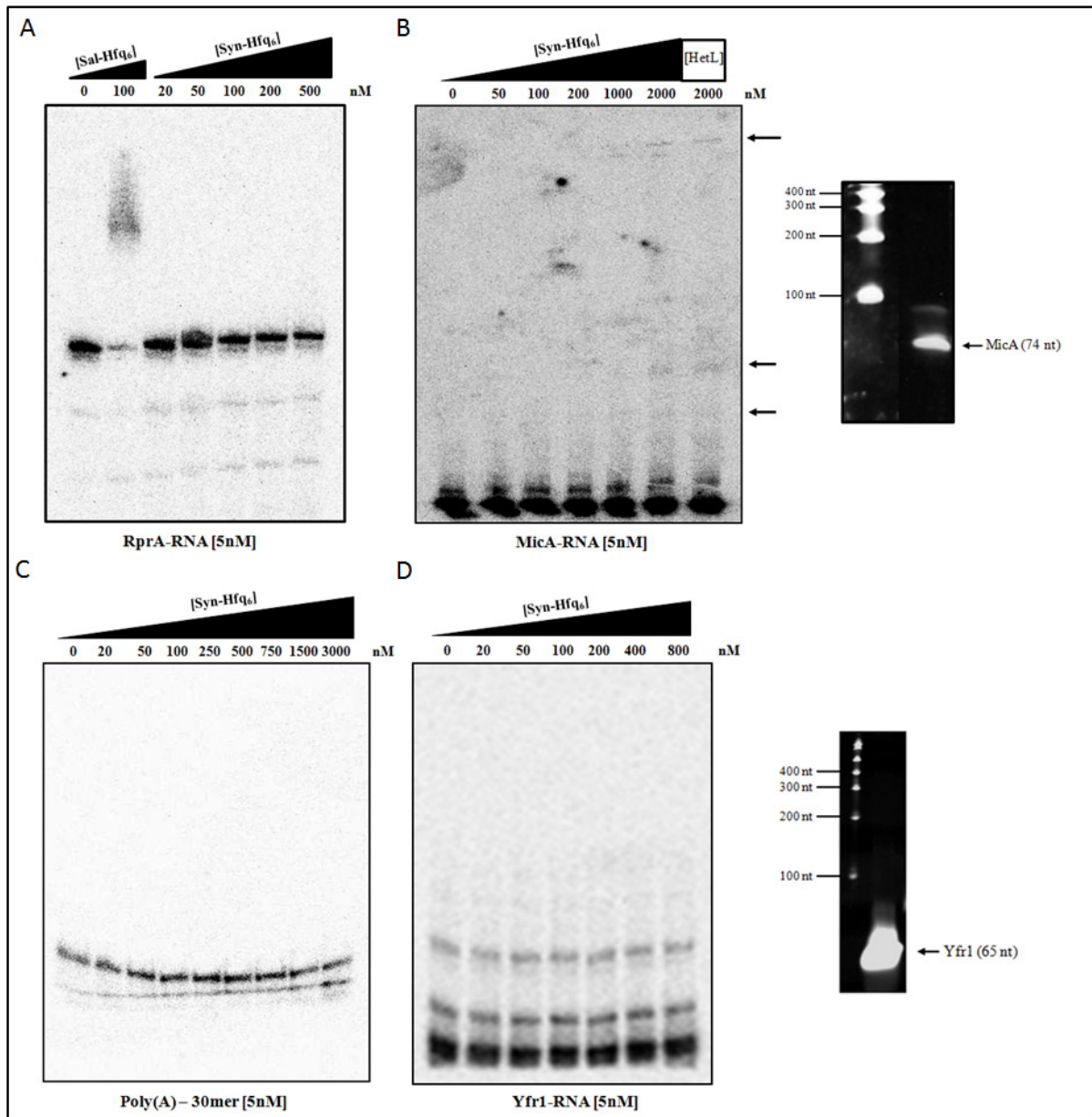
---

das theoretische Hexamer) zwischen 100 nM und 500 nM inkubiert und in einem nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel elektrophoretisch analysiert. Als Positivkontrolle diente das rekombinante, homologe Hfq-Protein aus *Salmonella* (Sal-Hfq) bei einer Konzentration von 100 nM. Zur Vermeidung unspezifischer Interaktionen des Proteins mit RprA enthielt jeder Ansatz 1 µg Hefe-tRNA als Kompetitor. Abbildung 26A zeigt, dass in dem gewählten Konzentrationsbereich kein verzögertes Laufverhalten von RprA durch Syn-Hfq zu beobachten ist, während die RNA durch Sal-Hfq nahezu komplett retardiert wird.

### **MicA**

Um diesen Aspekt zu vertiefen, wurden im Verlauf dieser Arbeit ergänzende Analysen mit weiteren RNAs durchgeführt. Nielsen und Mitarbeiter (2007) konnten mithilfe solcher heterologen *in vitro*-Bindungsstudien bereits Interaktionen zwischen dem archaealen Mja-Hfq und den enterobakteriellen sRNAs Spot42, DsrA, MicA (Synonym: SraD) und HbrC bei Proteinkonzentrationen ab 200 nM darstellen. Die Autoren verweisen jedoch auf eine zwei- bis sechsfach geringere RNA-Affinität von Mja-Hfq im Vergleich zu bakteriellen Hfq-Proteinen. Exemplarisch wurde in dieser Arbeit die Affinität von Syn-Hfq zu MicA untersucht.

## 2 ERGEBNISSE



**Abbildung 26: EMSA von Syn-Hfq mit ausgewählten sRNAs.** Die analysierten sRNAs (MicA, Yfr1) wurden durch *in vitro* Transkription synthetisiert und nach anschließendem DNase-Verdau zusammen mit einem Größenstandard in einem 8 %igen Harnstoff-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht (**B,D**, rechts). Die RNA wurde aus dem Gel eluiert und am 5'-Terminus mit [ $\alpha^{32}$ P] markiert. RprA (**A**) wurde im Labor von Dr. Jörg Vogel (MPI für Infektionsbiologie, Berlin) präpariert. Poly(A)-RNA (**C**) wurde von Dr. Elena Evgenieva-Hackenberg (Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie, Justus-Liebig-Universität Giessen) zur Verfügung gestellt und direkt mit [ $\alpha^{32}$ P] markiert. Die markierten RNAs wurden jeweils bei einer Konzentration von 5 nmol L<sup>-1</sup> für 30 min bei 30 °C mit Syn-Hfq in aufsteigenden Konzentrationen (siehe Beschriftung) inkubiert. Als Kompetitor war in jedem Ansatz 1 µg Hefe-tRNA enthalten. Die EMSA-Analysen erfolgten in 5 %igen nicht-denaturierenden Polyacrylamidgelen. Die Gele wurden im Vakuum getrocknet und die markierte RNA durch *phosphoimaging* sichtbar gemacht.

## 2 ERGEBNISSE

---

Diese sRNA wurde per *in vitro*-Transkription synthetisiert und mithilfe einer präparativen, denaturierende Gelelektrophorese (Abbildung 26B, rechts) gereinigt. 20 pmol der RNA wurden unter Verwendung von  $\gamma^{32}$ -P-ATP durch die T4-Polynukleotidkinase am 5'-Terminus radioaktiv markiert und erneut elektrophoretisch gereinigt. Die oben beschriebenen EMSA-Versuchsbedingungen wurden insofern modifiziert, als die Inkubationstemperatur in Anlehnung an die Standardkulturbedingungen für *Synechocystis* auf 30 °C herabgesetzt wurde. Zudem wurde Syn-Hfq in aufsteigenden Konzentrationen zwischen 50 nM und 2000 nM eingesetzt, um auch bei einer niedrigeren Affinität die RNA-Bindung nachweisen zu können. Für den Fall, dass bei den hohen Mengen des Proteins unspezifische RNA-Bindungen zu falsch-positiven Ergebnissen führen, wurde zur Kontrolle das entsprechend aufgereinigte, rekombinante HetL-Ortholog aus *Anabaena variabilis* ATCC 29413 bei einer Konzentration von 2000 nM eingesetzt.

Das in Abbildung 26B dargestellte Ergebnis zeigt, dass bei niedrigeren Syn-Hfq-Mengen lediglich eine schwache, undeutliche Retardation der MicA-RNA erkennbar ist (unterer Pfeil). Bei 2000 nM Syn-Hfq hingegen erscheinen auf unterschiedlicher Höhe im Gel zwei schwache, distinkte Banden (mittlerer und oberer Pfeil), die auf die Bildung eines Syn-Hfq-MicA-Komplexes hindeuten könnten. Dies würde einer gegenüber Mja-Hfq mindestens zehnfach niedrigeren Affinität von Syn-Hfq zu MicA entsprechen. Da dasselbe Bandenmuster jedoch auch durch das Kontrollprotein HetL hervorgerufen wird, ist anzunehmen, dass es sich hier tatsächlich um unspezifische Interaktionen handelt, die auf überschüssige Mengen des Proteins bzw. Verunreinigungen in der Proteinpräparation zurückzuführen sind.

### **Yfr1**

Weitere EMSA-Analysen wurden exemplarisch mit einer bekannten, stark konservierten cyanobakteriellen sRNA durchgeführt: Yfr1 ist ubiquitär in Cyanobakterien (mit Ausnahme von zwei *Prochlorococcus*-Stämmen) verbreitet und durch eine hoch-konservierte (theoretische) Sekundärstruktur mit einem invariablen einzelsträngigen Abschnitt zwischen zwei Stammschleifen gekennzeichnet (Voß *et al.*, 2007). Diese sRNA wird in *Synechocystis* konstitutiv auf hohem Niveau exprimiert und lässt sich genetisch nicht Inaktivieren, was auf eine essenzielle zelluläre Funktion von Yfr1 hinweist (Daten nicht gezeigt). Für die EMSA-

---

## 2 ERGEBNISSE

---

Analyse wurde Yfr1, wie oben für MicA beschrieben, durch *in vitro* Transkription synthetisiert (Abbildung 26D, rechts), gereinigt und radioaktiv markiert. Für den Test wurde rekombinantes Syn-Hfq im Konzentrationsbereich zwischen 20 nM und 800 nM eingesetzt. Aus Abbildung 26D geht hervor, dass auch Yfr1 bei den üblichen Proteinkonzentrationen *in vitro* nicht stabil an Syn-Hfq bindet. Angesichts der falsch-positiven EMSA-Ergebnisse zur ähnlich strukturierten MicA-RNA erschien der Einsatz größerer Mengen an Syn-Hfq für den Test mit Yfr1 nicht sinnvoll.

### **Poly(A)**

Ein weiterer Aspekt der Funktion von Hfq (in Enterobakterien) ist dessen Bindung an 3'-terminale Polyadenylat-Sequenzen von mRNAs und die damit korrelierte Regulation der zellulären mRNA-Degradation (Folichon *et al.*, 2003; Folichon *et al.*, 2005; Hajnsdorf & Régnier, 2000; Mohanty *et al.*, 2004). Folichon und Mitarbeiter (2003) konnten zeigen, dass Hfq aus *E. coli* ein (A)<sub>115</sub>-Polyribonukleotid *in vitro* im picomolaren Bereich in einer 1:3 Stöchiometrie (RNA:Hfq<sub>6</sub>) bindet. Ergebnisse gleicher Größenordnung wurden in derselben Arbeit für einen (A)<sub>18</sub>-polyadenylierten mRNA-Rest gezeigt. Vor diesem Hintergrund sollte im Folgenden untersucht werden, ob Syn-Hfq eine vergleichbare Affinität zu Poly(A)-RNA-Molekülen aufweist wie das homologe Protein aus *E. coli*. Für die entsprechende EMSA-Analyse stand ein synthetisches (A)<sub>30</sub> – Polyribonukleotid zur Verfügung, welches ebenfalls am 5'-Terminus radioaktiv markiert, mit Syn-Hfq in aufsteigenden Konzentrationen (20-3000 nM) inkubiert und schließlich gelelektrophoretisch analysiert wurde. Da es sich in diesem Fall um eine unstrukturierte, homogene RNA-Spezies handelte, die auch hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften *in vitro* von MicA und Yfr1 abweichen kann, wurde bei diesem Experiment erneut mit höheren Proteinkonzentrationen gearbeitet. In Abbildung 26C ist zu sehen, dass auch Poly(A)-RNA *in vitro* keine nachweisbare spezifische Bindung mit Syn-Hfq eingeht. Im Unterschied zu MicA (Abbildung 26B) zeigt sich hier jedoch keine unspezifische Retardation der RNA.

### 2.3.2 Analysen der Transkriptakkumulationen cyanobakterieller sRNAs in Abhängigkeit von Syn-Hfq

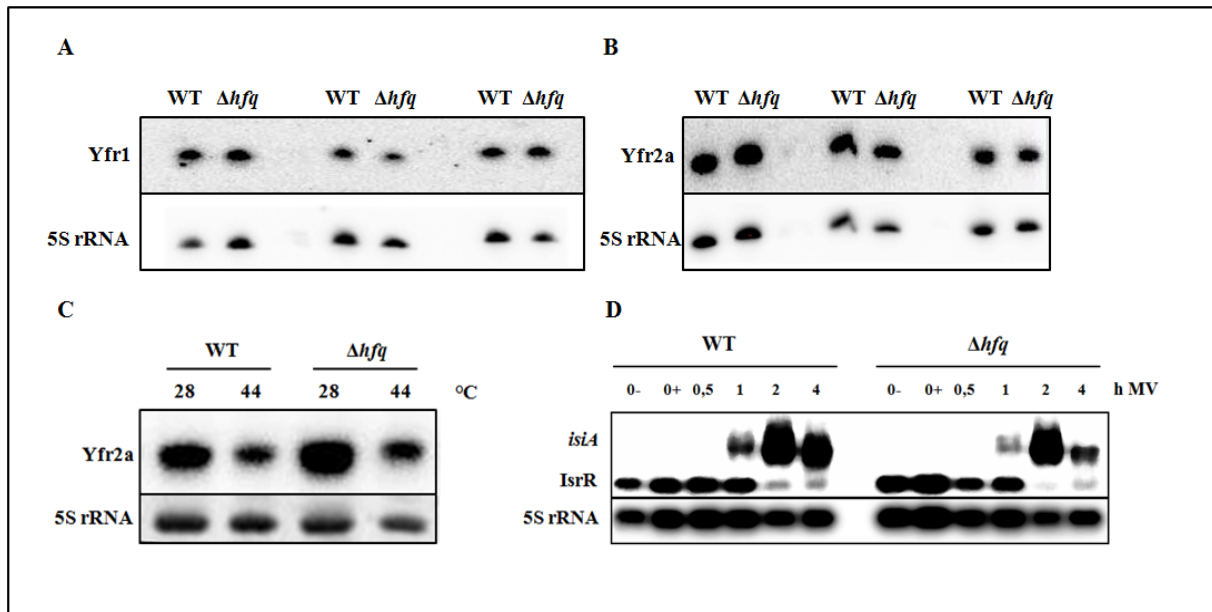
Viele der in diversen Enterobakterien konservierten sRNAs sind für ihre intrazelluläre Stabilität auf Hfq angewiesen. So konnten z.B. Zhang und Mitarbeiter (2003) eine stark reduzierte Akkumulation einiger Hfq-bindender sRNAs in einer  $\Delta hfq$ -Mutante von *E. coli* nachweisen. Als weitere zentrale Funktion von Hfq gilt die Stimulation der funktionellen Interaktion zwischen regulatorisch aktiven sRNAs und deren Ziel-mRNAs (Übersicht in Gottesman, 2005).

Um sich der Frage nach der Funktion des orthologen Hfq-Proteins in *Synechocystis* experimentell zu nähern, wurden die Transkriptniveaus ausgewählter sRNAs vergleichend in Wildtyp und  $\Delta hfq$ -Mutante durch Northern Blot-Analysen untersucht. Neben der konstitutiv exprimierten, zellulär stabilen sRNA Yfr1 (Axmann *et al.*, 2005) wurde dabei mit Yfr2a eine kürzlich beschriebene, weithin konservierte cyanobakterielle sRNA (Voß *et al.*, 2009) getestet, deren Transkriptakkumulation unter diversen Stressbedingungen abnimmt (Daten nicht gezeigt).

Aus Abbildung 27A,B geht hervor, dass Hfq für beide sRNAs unter Standardkultivierungsbedingungen keine essenzielle Rolle hinsichtlich ihrer zellulären Akkumulation spielt. Während sich für Yfr1 keine Mengenunterschiede zwischen Wildtyp und  $\Delta hfq$  zeigten, ist Yfr2a in  $\Delta hfq$  gegenüber dem Wildtyp im Mittel um ca. 17 % angereichert (basierend auf densitometrisch ermittelten, relativen Werten). In einem weiteren Versuch wurden Flüssigkulturen von Wildtyp und  $\Delta hfq$  für eine Stunde einer Temperatur von 44 °C ausgesetzt, um den Einfluss von Hfq auf das verminderte Expressionsniveau von Yfr2a unter Hitzestress zu untersuchen. Die Northern Blot-Daten (Abbildung 27C) zeigen ~50 %ige und ~67 %ige Abnahmen der Yfr2a-Akkumulation im Wildtyp bzw.  $\Delta hfq$  infolge der Hitzebehandlung. Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass im Rahmen von Promotorstudien eine drastische Abnahme der Yfr2a-Promotoraktivität nach einem zehnminütigen Hitzeschock (bei 43 °C) beschrieben wurde (Voß *et al.*, 2009). Gleichwohl verweisen die Autoren auf die Möglichkeit eines pleiotropen Effekts. Dennoch deuten die hier dargestellten Daten vor

## 2 ERGEBNISSE

diesem Hintergrund eine von Hfq unabhängige, hohe Stabilität der Yfr2a-RNA an, deren zelluläre Akkumulation unter Stressbedingungen vermutlich transkriptionell reguliert wird.



**Abbildung 27: Einfluss der *hfq*-Inaktivierung auf die Transkriptakkumulation ausgewählter sRNAs in *Synechocystis*.** (A,B) Northern Blot-Analyse der Transkriptmengen von Yfr1 (A) und Yfr2a (B) unter Standardkultivierungsbedingungen in Wildtyp und  $\Delta hfq$ . Die Gesamt-RNA wurde aus flüssigen Zellkulturen während der logarithmischen Wachstumsphase isoliert und zu je ca. 3  $\mu$ g in einem 8 %igen Harnstoff-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Nylonmembran wurde die RNA mit radioaktiv markierten, strangspezifischen Oligonukleotid-Sonden hybridisiert. Zur Ladekontrolle diente eine 5S-rRNA-spezifische Oligonukleotid-Sonde. Dargestellt sind jeweils die Hybridisierungen von Proben aus drei unabhängigen Experimenten. (C) Northern Blot-Analyse von Yfr2a unter Hitzestress in Wildtyp und  $\Delta hfq$ . Flüssige Zellkulturen wurden während der logarithmische Wachstumsphase einer Temperatur von 44 °C ausgesetzt. Die Probenahme erfolgte unmittelbar vor (28 °C-Kontrolle) und nach einer Stunde der Inkubation (44 °C Probe). (D) Northern Blot-Analyse der Expressionskinetik des *sense-antisense*-Paares *isiA/IsrR* unter oxidativen Stressbedingungen in Wildtyp und  $\Delta hfq$ . Nach Zusatz von 50  $\mu$ M Methylviologen (MV) wurden parallel von Wildtyp und  $\Delta hfq$  -Mutante zu den angegebenen Zeitpunkten Proben entnommen. Die Zeitpunkte „0-“, und „0+“ repräsentieren Probenahmen vor bzw. unmittelbar nach Zusatz des Methylviologens. Die präparierte Gesamt-RNA wurde in einem 1,3 %igen Formaldehyd-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer *isiA*-(doppelstrang)spezifischen DNA-Sonde hybridisiert. Die Hybridisierung mit einer 16S rRNA-spezifischen DNA-Sonde diente als Ladekontrolle.

Um den Aspekt der durch Hfq vermittelten bzw. geförderten RNA-Interaktionen in *Synechocystis* zu untersuchen, stand während dieser Arbeit das *isiA/IsrR-sense-antisense* Paar als einziges bisher näher charakterisiertes cyanobakterielles Modell riboregulatorischer Aktivität zur Verfügung (Dühring *et al.*, 2006; Legewie *et al.*, 2008). Die Hfq-vermittelten

---

## 2 ERGEBNISSE

---

Interaktionen zwischen *trans*-kodierten sRNAs und den jeweiligen Ziel-mRNAs basieren in *E. coli* auf mehrfachen Duplexbildungen von je weniger als 10 bp innerhalb unvollständig komplementärer Sequenzabschnitte (Gottesman, 2005). Demgegenüber handelt es sich bei IsrR (177 nt) um eine *cis*-kodierte *antisense*-RNA, welche mit der *isiA*-mRNA eine potenziell perfekt komplementäre Duplexbildung von 177 bp eingeht. Angesichts möglicher Sekundärstrukturbildungen beider RNAs *in vivo* könnte jedoch auch in diesem Beispiel die Aktivität von Hfq deren Interaktionskinetik beeinflussen. In diesem Fall wäre anzunehmen, dass in der  $\Delta hfq$ -Mutante eine abweichende Kinetik der beschriebenen inversen Akkumulation von IsrR und *isiA* unter Eisenmangel- bzw. oxidativen Stressbedingungen zu beobachten ist. In Abbildung 27D ist exemplarisch eine Northern Blot-Analyse dargestellt, die zeigt, dass es durch 50  $\mu$ M Methylviologen hervorgerufenen oxidativen Stress in Wildtyp- und  $\Delta hfq$ -Flüssigkulturen gleichermaßen nach 60 min zu einer Akkumulation der *isiA*-mRNA kommt. Die damit verbundene zeitliche Abnahme der IsrR-Menge unterscheidet sich ebenfalls nicht zwischen Wildtyp und Mutante.

Ähnlich durchgeführte Untersuchungen zur *isiA*/IsrR-Akkumulation unter Eisenmangel (BG11-Medium ohne Ammoniumeisen(III)-citrat) zeigten ferner keinen Einfluss der *hfq*-Inaktivierung auf (Daten nicht gezeigt).

### 2.3.3 *Tiling-array*-Analyse zur Identifizierung „intergenisch“ kodierter sRNAs

Für die Identifikation potenzieller Hfq-abhängig akkumulierender sRNAs in *Synechocystis* wurden vergleichende Transkriptionsanalysen mithilfe eines *Tiling-arrays* durchgeführt. *Tiling-arrays* (von engl.: *tile* = Dachziegel) präsentieren eine Vielzahl an unmittelbar benachbarten oder teilweise überlappenden Oligonukleotidsonden, welche entweder das gesamte Genom oder definierte Teile davon (*contigs*) abdecken (Selinger *et al.*, 2000). Auf diese Weise können Transkripte genomischer Regionen jenseits annotierter Gene hochauflösend detektiert und analysiert werden.

Das in dieser Arbeit verwendete 2 x 105K-Agilent *Tiling Array* umfasst insgesamt 102.739 beidseitig orientierte, überlappende Sonden sämtlicher Gene und IGR, für welche auf der Basis globaler bioinformatischer Analysen des Genoms von *Synechocystis* potenzielle

## 2 ERGEBNISSE

---

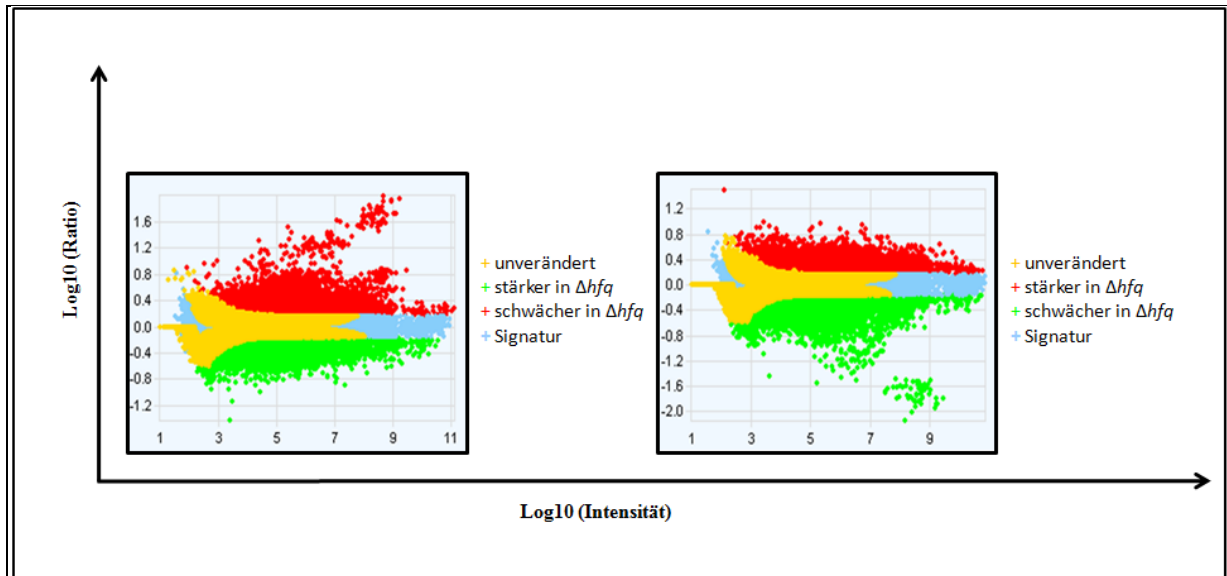
asRNAs bzw. sRNAs vorhergesagt wurden (insgesamt 646 Sequenzen). Der *Tiling Array* enthält zudem Kontrollsonden für genomische Bereiche ohne entsprechende Vorhersagen (insgesamt 632 Sequenzen). Dadurch waren für die Expressionsanalyse ca. 40 % des gesamten Genoms von *Synechocystis* abgedeckt. Der Entwurf dieses *Tiling-arrays* erfolgte in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Wolfgang Hess (Institut für Biologie III, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg) und ist publiziert (Georg *et al.*, 2009).

Für dieses Experiment wurden ebenfalls RNA-Präparationen aus Wildtyp- und  $\Delta hfq$ -Kulturen in der logarithmischen Wachstumsphase eingesetzt. Die Probenvorbereitung und kompetitive Hybridisierung (inklusive *dye swap*) des *Tiling Arrays* erfolgte im Wesentlichen entsprechend den Angaben in Abschnitt 2.1.2.5.2 am MPI für Infektionsbiologie, Berlin (Servicebereich *Microarray*; Ina Wagner, Dr. Hans-Joachim Mollenkopf). Im Unterschied zu den oben dargestellten, vergleichenden Expressionsanalysen, diente die *Tiling-array*-Analyse zunächst dem rein qualitativen Nachweis einzelner bisher unbekannter Transkripte. Insofern wurde - auch angesichts des Kostenfaktors - hier zunächst auf den Einsatz biologischer Replikate für die statistische Absicherung der Daten verzichtet. Identifizierte sRNA-Kandidaten sollten zu diesem Zweck später im Rahmen von Northern Blot-Analysen in mehreren voneinander unabhängigen Versuchen untersucht werden (Abschnitt 2.3.3.3).

Eine graphische Darstellung der differenziell akkumulierenden Transkripte ist für beide Farbstoffzuordnungen in Abbildung 28 gezeigt. Daraus geht zunächst deutlich hervor, dass sich die Transkriptionsprofile der beiden *dye swap*-Ansätze in den Diagrammen nahezu spiegelsymmetrisch zueinander darstellen, was für eine gute technische Qualität spricht. Auch hier sind z.T. erheblich reduzierte Mengen einiger Transkripte in  $\Delta hfq$  zu erkennen (rote Kreuze im linken Diagramm, grüne Kreuze im rechten Diagramm; Abbildung 28), was - auch hinsichtlich der insgesamt limitierten Varianz der Transkriptionsprofile - in der Tendenz die Daten der *Microarray*-Analyse aus Abschnitt 2.1.2.5 widerspiegelt.



## 2 ERGEBNISSE



**Abbildung 28: Graphische Gesamtdarstellung differenziell akkumulierender Transkripte in  $\Delta hfq$  gegenüber dem Wildtyp im *Tiling-array*-Experiment.** Aufgetragen sind jeweils die dekadischen Logarithmen der Verhältnisse zwischen den relativen Fluoreszenzintensitäten von Wildtyp- und  $\Delta hfq$ -Proben (Y-Achse) gegen die entsprechenden Gesamtintensitäten (X-Achse). Die Diagramme zeigen die Daten aus zwei kompetitiven Hybridisierungen derselben Proben mit inversen Farbstoffzuordnungen (*dye swap*). Die einzelnen Signale sind durch farbige Kreuze dargestellt (siehe Legende). In Anlehnung an den *dye swap* enthalten die Diagramme eine zueinander inverse Farbmarkierung.

### 2.3.3.1 Identifizierung differenziell akkumulierender Transkripte

Da für die Auswertung dieser *Tiling-array* Analyse keine Daten aus biologischen Replikaten zur Verfügung standen, wurden keine weiterführenden statistischen Analysen durchgeführt. Daher wurden zur Identifikation differenziell akkumulierender Transkripte nur solche Sonden berücksichtigt, deren Signale in  $\Delta hfq$  im Vergleich zum Wildtyp mindestens um den Faktor 4 erhöht bzw. reduziert waren ( $F_c \geq 4$ ). Dieser vergleichsweise hohe Schwellenwert sollte die Anzahl falsch-positiver Kandidaten reduzieren.

---

## 2 ERGEBNISSE

---

### Das Operon *slr1667-slr1668* als Positivkontrolle

Diese Analyse brachte eine Auswahl von 42 Genen bzw. regulatorischer Genbereiche (5'- bzw. 3'-UTRs) - repräsentiert durch eine jeweils unterschiedliche Anzahl von differenziell reagierenden *Tiling*-Sonden - hervor. (Tabelle 2). Die Fc-Werte von Sonden, welche demselben Gen bzw. einem definierten genomischen Abschnitt zugeordnet wurden, sind als Mittelwerte angegeben. Ähnlich den *Microarray*-Daten aus Abschnitt 2.1.2.5.4 (vergl. Tabelle 1) erscheint auch in diesem Experiment der Großteil der ausgewählten Transkripte in der  $\Delta hfq$ -Mutante herunterreguliert. Lediglich 15 Sonden zeigten stärkere Signale in  $\Delta hfq$ ; davon ließen sich alleine sechs Sonden *slr0804* (*dacB*) zuordnen, während insgesamt drei Sonden mit dem Locus *slr0439* (inklusive dessen 5'-UTR) übereinstimmen. Ansonsten waren nur positive Signale einzelner Sonden in  $\Delta hfq$  mit einem  $F_c \geq 4$  nachweisbar. Unter den regulierten Genen bzw. Transkripten mit den stärksten durchschnittlichen Negativänderungen in  $\Delta hfq$  finden sich erneut das Operon *slr1667-slr1668* ( $F_c > 20$ ), der diesem Operon benachbarte Locus *sll1542* ( $F_c > 10$ ; siehe auch Abbildung 14F) und *slr2015*. Alle weiteren Signale sind keinem der in Abschnitt 2.1.2.5.4 dargestellten *hfq*-abhängig akkumulierenden Transkripte zuzuordnen. Dies ist weitestgehend auf die Tatsache zurückzuführen, dass nicht das gesamte (protein-kodierende) Genom von *Synechocystis* auf dem *Tiling-array* repräsentiert ist. So befinden sich auf dem *chip* z.B. keine Sonden für die Loci *ssr2848*, *sll1543*, *ssr2787*, *slr2016*, *ssl2996* und *slr2018*, deren mRNA-Akkumulationen in  $\Delta hfq$  nach der „klassischen“ *Microarray*-Daten mindestens um den Faktor 4 reduziert sind. Zudem können abweichende Datensätze auf eine unterschiedliche Qualität (Sensitivität) der Sonden für die jeweiligen Gene zurückzuführen sein. Ferner muss bei der Bewertung der *Tiling-array*-Daten in diesem Fall das Fehlen biologischer Replikate und damit statistischer Auswertbarkeit berücksichtigt werden. So ließ sich die reduzierte Akkumulation der *nrtA*-mRNA in  $\Delta hfq$  durch Northern Blot-Analysen nicht bestätigen (Daten nicht gezeigt).

## 2 ERGEBNISSE

**Tabelle 2: Tiling-array-Signale.** <sup>a</sup>, “intergenische” Signale in chromosomaler Nachbarschaft zu ebenfalls differenziell exprimierten ORFs (potenzielle 5′- bzw. 3′-UTRs); <sup>b</sup>, *antisense*-RNA. <sup>c</sup>, Hfq-regulierte putative sRNAs; \*, bekannte Hfq-regulierte mRNA aus Tabelle 1; Nr., Anzahl reagierender Sonden; Ø Fc, aus den Signalen aller reagierenden Sonden gemittelte Änderung der Transkriptakkumulation in  $\Delta hfq$  relativ zum Wildtyp.

<b>Locus</b>	<b>Strang</b>	<b>Synonym</b>	<b>Cyanobase Definition</b>	<b>Nr.</b>	<b>Ø Fc</b>
<i>slr1667*</i>	+	<i>5′-slr1667</i>	hypothetical protein (target gene of Sycrp1)	2	<b>-35,88</b>
<i>slr1667*</i>	+	<i>slr1667</i>	hypothetical protein (target gene of Sycrp1)	11	<b>-28,73</b>
<i>slr1668*</i>	+	<i>slr1668</i>	periplasmic protein, (target gene of Sycrp1)	19	<b>-21,07</b>
<i>slr1512<sup>a</sup></i>	+	<i>5′-slr1512</i>	<i>sbtA</i> (CO2 transport)	2	<b>-19,36</b>
<i>slr0204 – x – sll0179<sup>c</sup></i>	+	<b><i>hpr2</i></b>	<b>genomic 3′ region of <i>slr0204</i> (YCF83) ; 5′ of <i>glxX</i></b>	<b>5</b>	<b>-17,22</b>
<i>slr1512</i>	+	<i>slr1512</i>	<i>sbtA</i> (CO2 transport)	23	<b>-13,4</b>
<i>slr1667<sup>b</sup></i>	+	<i>5′-slr1667as</i>	hypothetical protein (target gene of Sycrp1)	2	<b>-12,39</b>
<i>sll1542</i>	-	<i>sll1542</i>	unknown protein -	12	<b>-11,22</b>
<i>slr0363 – x – slr0364<sup>c</sup></i>	+	<b><i>hpr3</i></b>	<b>genomic between <i>slr0363</i> &amp; <i>slr0364</i></b>	<b>2</b>	<b>-7,34</b>
<i>slr2015*</i>	+	<i>pilA9</i>	type 4 pilin-like protein, ( <i>pilA9</i> )	16	<b>-6,81</b>
<i>sll1451<sup>a</sup></i>	-	<i>5′-nrtB</i>	nitrate/nitrite transport system permease protein	2	<b>-5,34</b>
<i>sll1450</i>	-	<i>nrtA</i>	nitrate/nitrite transport system substrate-binding protein	15	<b>-5,06</b>
<i>sll1452</i>	-	<i>nrtC</i>	nitrate/nitrite transport system ATP-binding protein	12	<b>-4,88</b>
<i>sll1119</i>	-	<i>sll1119</i>	unknown protein	6	<b>-4,88</b>
<i>sll1450<sup>a</sup></i>	-	<i>3′-nrtA</i>	nitrate/nitrite transport system substrate-binding protein	3	<b>-4,71</b>
<i>slr0288</i>	+	<i>glnN</i>	ammonia ligase	2	<b>-4,71</b>
<i>sll1451</i>	-	<i>nrtB</i>	nitrate/nitrite transport system permease protein	6	<b>-4,62</b>
<i>slr1651</i>	+	<i>hlyB</i>	ABC transporter ATP-binding protein	1	<b>-4,58</b>
<i>sll1453</i>	-	<i>nrtD</i>	nitrate/nitrite transport system ATP-binding protein	11	<b>-4,58</b>
<i>slr1096</i>	+	<i>phdD</i>	dihydroliipoamide dehydrogenase	1	<b>-4,54</b>
<i>slr0212</i>	+	<i>methH</i>	5-methyltetrahydrofolate–homocysteine methyltransferase	1	<b>-4,49</b>
<i>sll1755</i>	-	<i>sll1755</i>	unknown protein	1	<b>-4,37</b>
<i>slr2081</i>	+	<i>tyrA</i>	prephenate dehydrogenase	1	<b>-4,37</b>
<i>slr1959<sup>a</sup></i>	+	<i>3′-slr1959</i>	unknown protein	1	<b>-4,33</b>
<i>sll0158</i>	-	<i>glgB</i>	1,4-alpha-glucan branching enzyme ( <i>glgB</i> )	1	<b>-4,33</b>
<i>slr0220</i>	+	<i>glyS</i>	glycyl-tRNA synthetase beta chain	1	<b>-4,33</b>
<i>sll2001<sup>b</sup></i>	+	<i>lap-as</i>	leucine aminopeptidase	1	<b>-4,33</b>
<i>sll1542<sup>b</sup></i>	+	<i>5′-sll1542as</i>	unknown protein	1	<b>-4,16</b>
<i>sll1546</i>	-	<i>ppx</i>	exopolyphosphatase	1	<b>-4,12</b>
<i>slr1579</i>	+	<i>slr1579</i>	hypothetical protein	1	<b>-4,12</b>
<i>sll1864</i>	-	<i>sll1864</i>	probable chloride channel protein	1	<b>-4,08</b>
<i>sll1119<sup>a</sup></i>	-	<i>3′-sll1119</i>	unknown protein	1	<b>-4,04</b>
<i>ssl2874 – x – slr1575<sup>c</sup></i>	-	<i>hpr5</i>	genomic - between <i>ssl278</i> & <i>slr1575</i>	1	<b>+4,16</b>
<i>slr0439</i>	+	<i>slr0439</i>	unknown protein	2	<b>+4,33</b>
<i>slr0439<sup>a</sup></i>	+	<i>5′-slr0439</i>	unknown protein	1	<b>+4,41</b>
<i>slr0369</i>	+	<i>slr0369</i>	RND multidrug efflux transporter	1	<b>+4,41</b>
<i>sll1370 – x – sll1371<sup>c</sup></i>	+	<b><i>hpr1</i></b>		<b>1</b>	<b>+4,49</b>
<i>slr1655<sup>b</sup></i>	-	<i>5′-psaL-as</i>	photosystem I subunit XI	1	<b>+4,93</b>
<i>sll1898</i>	-	<i>sll1898</i>	hypothetical protein	1	<b>+6,3</b>
<i>slr0646 – x – sll0601<sup>c</sup></i>	-	<i>hpr4</i>	genomic 3′ to <i>sll0601</i> (Nitrilase homologue)	1	<b>+7,51</b>
<i>slr0804</i>	+	<i>dacB</i>	probable D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase	6	<b>+7,56</b>

---

## 2 ERGEBNISSE

---

### 2.3.3.2 Identifizierung von drei Hfq regulierten putativen sRNAs (Hpr)

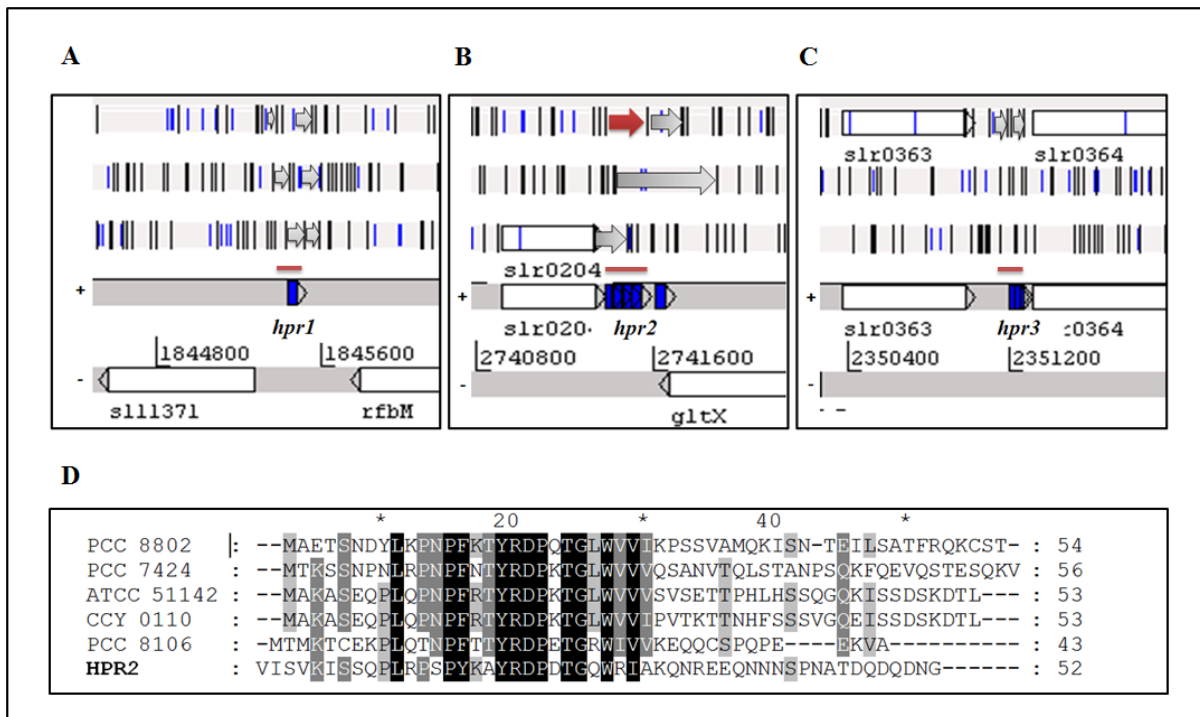
Im Folgenden sollten aus den in Tabelle 2 aufgeführten Loci bzw. „intergenischen“ Bereichen geeignete sRNA-Kandidaten für weitere Analysen ausgewählt werden. Kandidaten aus potenziellen 3'- bzw. 5'-terminalen Bereichen annotierter Gene, deren Expression (angesichts der *Tiling-array* Daten) ebenfalls durch Hfq beeinflusst wird, sowie asRNA-Kandidaten wurden in dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Letztendlich wurden drei ausgewählte Hfq regulierte putative sRNAs (Hpr 1-3) definiert. Die Hpr1 zugeordnete Sonde zeigt eine um den Faktor 4,49 erhöhte Signalstärke in  $\Delta hfq$  und ist von besonderem Interesse, da dessen genomische Sequenz in *antisense*-Orientierung 10 bp stromaufwärts einer vorhergesagten Sycrpl-Bindestelle im Promotorbereich von *sycrpl* (Xu & Su, 2009) lokalisiert ist. Zudem wurden die zwei „intergenischen“ Kandidaten mit den höchsten negativen Fc-Werten ausgewählt: Hpr2 ( $\emptyset$  Fc = -17,22) und Hpr3 ( $\emptyset$  Fc = -7,34) galten auch angesichts mehrerer reagierender Sonden (siehe Tabelle 2) als besonders vielversprechende Kandidaten.

Die genomischen Bereiche der einer Hpr zugeordneten Sonde(n) wurden vorläufig als *hpr'*-Sequenzen bezeichnet. Da auch bei diesen Kandidaten nicht ausgeschlossen werden konnte, dass es sich z.B. um regulatorische 3'-oder 5'-Bereiche von annotierten Protein-kodierenden Genen bzw. selbst um kleine, nicht-annotierte ORFs handelt, wurden sie einleitend hinsichtlich ihrer exakten Lokalisierung im Genom charakterisiert. Dazu wurden die genomischen Regionen zunächst im „Artemis“-Genombrowser (Rutherford *et al.*, 2000) visualisiert und die Lokalisierungen von *hpr1-3'* definiert (Abbildung 29). Dasselbe Programm wurde zudem genutzt, um hypothetische, nicht-annotierte ORFs zu identifizieren. Da „Artemis“ jedoch jedes mögliche Startcodon berücksichtigt, wurden die *hpr'*-Sequenzen sowie deren flankierenden Bereiche  $\leq$  (50 bp; ohne Überlappung mit annotierten ORFs) ferner mithilfe des Programms „ORF Finder“ ([http://www.geneinfinity.org/sms\\_orffinder.html](http://www.geneinfinity.org/sms_orffinder.html)) nach nicht-annotierten ORFs von mindestens 50 bp Sequenzlänge durchsucht. Es wurden alle drei Leseraster des entsprechenden Strangs analysiert und dabei ATG, CTG, GTG und TTG als mögliche Startcodons zugelassen. Zur Identifizierung homologer Sequenzen in den Genomen verwandter Organismen wurden die Aminosäuresequenzen der hypothetischen ORFs mithilfe der Algorithmen BLASTP und

## 2 ERGEBNISSE

TBLASTN (Altschul *et al.*, 1997) mit der Proteinsequenzdatenbank des NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) bzw. der Nukleotidsequenzdatenbank der Cyanobase ([http://blast.kazusa.or.jp/blast\\_search/cyanobase/genomes](http://blast.kazusa.or.jp/blast_search/cyanobase/genomes)) abgeglichen.

Die Angaben der genomischen Lokalisationen von *hpr1-3'* orientieren sich in diesem Abschnitt an den 5'- und 3'-Enden der im *Tiling-array* reagierenden Sonden. Daher sind die hier besprochenen Sequenzabschnitte zunächst als hypothetisch zu betrachten.



**Abbildung 29: Lokalisierung der reagierenden *Tiling-array*-Sonden von Hpr1-3 im Genom von *Synechocystis*.** (A-C) Ausschnitte aus Darstellungen des Artemis-Genombrowsers (Rutherford *et al.*, 2000). Beide Stränge des Chromosoms (+, -) sind mit den annotierten Loci (weiße Blockpfeile) und den *hpr*-Sequenzen (blaue Blockpfeile) schematisch in grauer Schattierung dargestellt. Die drei Leseraster oberhalb des (+)-Strangs (A-C) stellen schematisch theoretische Stoppcodons (schwarze Striche) und ATG-Startcodons (blaue Striche) dar. Graue Blockpfeile markieren durch das Programm ORF Finder ([http://www.geneinfinity.org/sms\\_orffinder.html](http://www.geneinfinity.org/sms_orffinder.html)) identifizierte hypothetische ORFs. Der Rote Blockpfeil (B) markiert einen hypothetischen ORF mit homologen Genen in anderen Cyanobakterien. Die von den Northern Blot-Sonden (siehe Abschnitt 2.3.3.3) abgedeckten Bereiche sind durch rote Balken gekennzeichnet (F) Aminosäuresequenz-Vergleich des hypothetischen Proteins Hpr2 mit homologen Sequenzen aus *Cyanothece* sp. (ATCC51142, CCY0110, PCC8802, PCC7424) und *Lyngbya* sp. PCC 8106 (PCC8106). Konservierungsgrad: Komplette konservierte Aminosäurereste (100 %), weiß mit schwarzem Hintergrund; hoch konservierte Aminosäurereste (>80 %), weiß mit dunkelgrauem Hintergrund; schwach konservierte Aminosäurereste (>60 %), schwarz mit hellgrauem Hintergrund. Die Alinierung wurde mit dem Programm ClustalW2 (EMBL-EBI) generiert und mit dem Programm GeneDoc editiert.

---

## 2 ERGEBNISSE

---

### Hpr1

Die *hpr1'*-Sequenz (Chr: 1845436..1845477)<sup>2</sup> befindet sich auf dem genomischen (+)-Strang zwischen den Loci *sll1371* (*sycrp1*) und *sll1370* (*rfbM*), die jeweils in Gegenorientierung auf dem (-)-Strang liegen. Demzufolge ist es nicht wahrscheinlich, dass Hpr1 die 3'- bzw. 5'-UTR eines anliegenden, annotierten ORFs ist. Aus der Darstellung (Abbildung 29A) geht zudem hervor, dass sich im Bereich von *hpr1'* in jedem der drei Leseraster je zwei nicht-annotierte hypothetische ORFs befinden, die mit dem Programm „ORF Finder“ ermittelt wurden. Im Rahmen von TBLASTN-Analysen wurden lediglich für einen der hypothetischen ORFs homologe Sequenzen in zwei Stämmen von *Prochlorococcus marinus* gefunden, die jedoch innerhalb eines annotierten kodierenden Bereiches (*ftsH4*) lokalisiert sind.

### Hpr2

Die genomische Sequenz von Hpr2 (Chr: 2741384..2741641), dem insgesamt fünf reagierende Sonden im *Tiling-array* zugeordnet wurden, liegt auf dem (+)-Strang direkt (56 bp in Bezug auf das 5'-Ende der ersten Sonde) stromabwärts von *slr0204* (*ycf83*). Stromabwärts von *hpr2* folgt im Abstand von 32 bp (in Bezug auf die letzte Sonde) gegenorientiert *sll0179* (*gltX*). Insofern kommt Hpr2 als 3'-UTR von *slr0204* in Frage. Jedoch ließen sich in den drei Leserastern des (+)-Strangs mithilfe von „ORF Finder“ insgesamt vier potenzielle ORFs (>50 bp) im Bereich von *hpr2'* identifizieren (Abbildung 29B). Im Rahmen der anschließenden BLAST-Analysen zeigte sich, dass für jenen ORF in der genomischen Region zwischen 2741413 und 2741568 bp (*hpr2'*; roter Pfeil in Abbildung 29B) homologe, annotierte Loci in vier *Cyanothece* Spezies (ATCC 51142, CCY0110, PCC 8802, PCC 7424) sowie in *Lyngbya* sp. PCC 8106 existieren. Der Sequenzvergleich in Abbildung 29D zeigt im amino-terminalen bis mittleren Sequenzabschnitt der Proteine eine starke Konservierung mit einem potenziellen Motiv. Diese Daten unterstützen die Annahme, dass es sich bei *hpr2'* um ein kleines protein-kodierendes Gen handelt.

---

<sup>2</sup> Exakte physikalische Lokalisation auf dem Chromosom. Die Zahlen geben die Positionen in bp an.

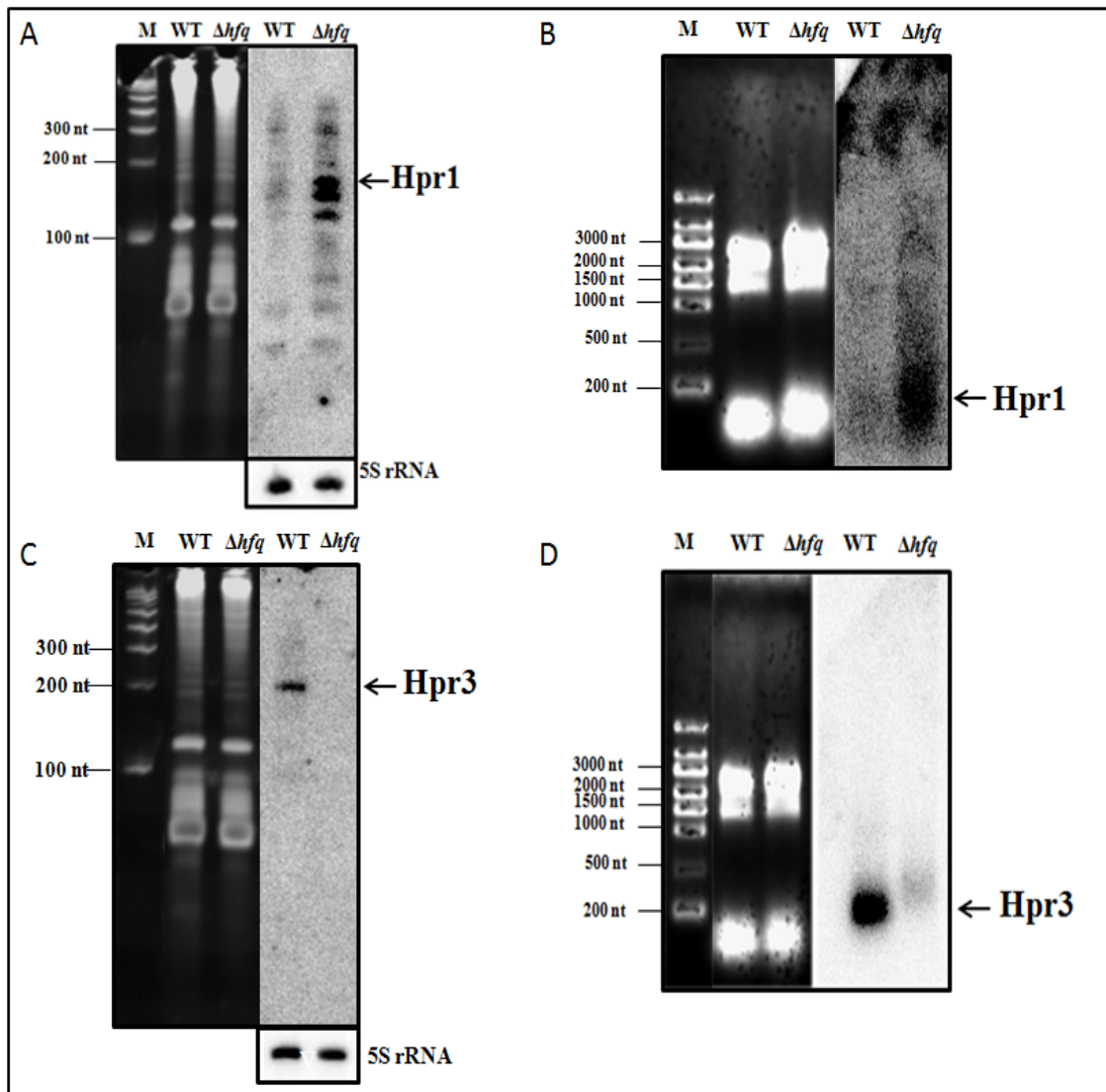
### Hpr3

Die beiden *Tiling-array* Sonden, welche Hpr3 zugeordnet wurden, umfassen die genomische Region zwischen 2351206 und 2351263 bp auf dem chromosomalen (+)-Strang (Abbildung 29C). Dieser Bereich liegt 59 bp stromaufwärts von *slr0364* und 222 bp stromabwärts von *slr0363*. Diese beiden ORFs liegen in gleicher Orientierung ebenfalls auf dem (+)-Strang. Daher könnte es sich bei Hpr3 sowohl um die 3'-UTR von *slr0363* als auch um die 5'-UTR von *slr0364* handeln. Mithilfe von „ORF-Finder“ ließen sich zwei hypothetische offene Leseraster von 84 bp bzw. 60 bp Sequenzlänge identifizieren. Sie liegen im Bereich zwischen 2351107 und 2351190 bp bzw. zwischen 2351218 und 2351277 bp des Chromosoms, so dass nur der 60 bp ORF *hpr3'* überlappt. Die Homologiesuche mit BLASTP und TBLASTN in den Datenbanken des NCBI bzw. der Cyanobase blieben jedoch ergebnislos, sodass zumindest keine funktionelle Konservierung der hypothetischen Aminosäuresequenzen vorliegt.

#### 2.3.3.3 Northern Blot-Nachweis von Hpr1-3

Zur Verifizierung der *Tiling-array*-Daten und um einen ersten Eindruck von der tatsächlichen Größe von Hpr1-3 zu bekommen, wurde erneut Gesamt-RNA aus Wildtyp- und  $\Delta hfq$ -Flüssigkulturen isoliert und für Northern Blot-Analysen unter Verwendung strangspezifischer RNA-Sonden eingesetzt. Nach Auftrennung der RNA in hochauflösenden Polyacrylamidgelen lieferten die Hpr1- und Hpr3-Sonden (Abbildung 30A,C) klare Signale knapp unterhalb (Hpr1) bzw. auf der Höhe (Hpr3) des 200 nt-Markers. Entsprechend den *Tiling-array*-Daten war die Akkumulation von Hpr3 in  $\Delta hfq$  drastisch reduziert, während Hpr1 unter diesen Versuchsbedingungen ausschließlich in der Mutante deutlich nachweisbar war. Die zwei weiteren Banden der Hpr1-Hybridisierung könnten auf eine Prozessierung bzw. Instabilität der RNA zurückzuführen sein. Um zu überprüfen, ob deutlich größere, mit diesen Sonden hybridisierende Transkripte existieren, wurde der Versuch unter Verwendung von 1,3 %igen Agarosegelen wiederholt. Auch hier weist die Hpr3-Sonde ausschließlich ein ~200 nt-Transkript nach (Abbildung 30D), während die Hpr1-Bande weniger distinkt erscheint und sich diffuse schwache Signale im oberen Bereich des Blots abzeichnen (Abbildung 30B). Insofern könnten die schwachen „Hintergrundsignale“ in Abbildung 30A auf Degradationsprodukte eines größeren Transkripts zurückzuführen sein.

## 2 ERGEBNISSE

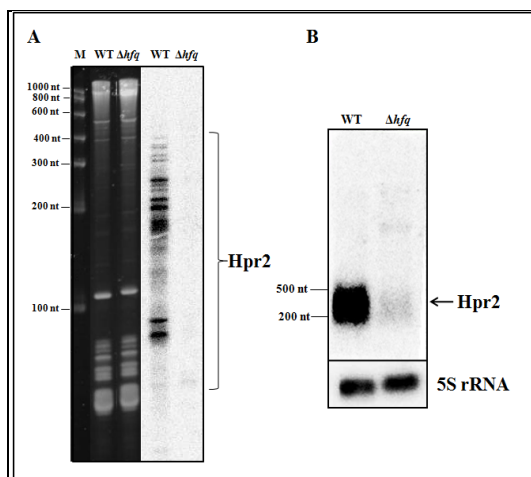


**Abbildung 30: Northern Blot-Analyse zum Expressionsnachweis der putativen sRNAs Hpr1 und Hpr3.** Die Gesamt-RNA wurde aus flüssigen Zellkulturen von Wildtyp und  $\Delta hfq$  während der logarithmischen Wachstumsphase isoliert und zu je ca. 5  $\mu$ g in einem 8 %igen Harnstoff-Polyacrylamidgel (A, C) bzw. zu je ca. 10  $\mu$ g in einem 1,3 %igen Formaldehyd-Agarosegel (B, D) elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Nylonmembran wurde die RNA mit radioaktiv markierten, genspezifischen RNA -Sonden hybridisiert. Zur Ladekontrolle diente eine 5S-rRNA-spezifische Oligonukleotid-Sonde (A, C). Dargestellt sind repräsentative Hybridisierungen aus zwei unabhängigen Experimenten. Die Abbildungen zeigen zum Mengen- und Größenabgleich links jeweils die entsprechenden Spuren des Polyacrylamidgels (A, C) bzw. der Nylonmembran nach einer Ethidiumbromidfärbung. M, *RiboRuler Low/High Range RNA Ladder*. WT, Wildtyp.



## 2 ERGEBNISSE

Für Hpr2 wurde infolge der Polyacrylamidgel-basierten Auftrennung im Northern Blot ein leiterartiges Bandenmuster in der Wildtyp-Probe detektiert, während in  $\Delta hfq$  kein Signal nachweisbar war (Abbildung 31). Derartige Bandenmuster beobachtet man gewöhnlich bei Hybridisierungen von bakteriellen mRNAs, was deren allgemein sehr geringer Halbwertszeit, d.h. einer hohen Abbaurrate geschuldet ist (Rauhut & Klug, 1999). Interessanterweise befindet sich die höchste prominente Bande im Bereich zwischen den 200 nt und 300 nt Markerbanden; die von den reagierenden *Tiling-array*-Sonden abgedeckte *hpr2*-Sequenz umfasst 258 bp, der in Abschnitt 2.3.3.2 beschriebene hypothetische ORF 156 bp. Insofern könnte es sich bei Hpr2 tatsächlich, v.a. angesichts der konservierten abgeleiteten Aminosäuresequenz um eine protein-kodierende mRNA mit nicht-translatierten Bereichen handeln. Aufgrund dieser Annahme standen in den weiteren Untersuchungen ausschließlich Hpr1 und Hpr3 im Fokus.



**Abbildung 31: Northern Blot-Analyse zum Nachweis der putativen mRNA Hpr2.** Die Gesamt-RNA wurde aus Zellkulturen von Wildtyp und  $\Delta hfq$  während der logarithmischen Wachstumsphase isoliert und zu je ca. 5  $\mu\text{g}$  in einem 8 %igen Harnstoff-Polyacrylamidgel (A) bzw. zu je ca. 10  $\mu\text{g}$  in einem 1,3 %igen Formaldehyd-Agarosegel (B) aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Nylonmembran wurde die RNA mit radioaktiv markierten, genspezifischen RNA- (Hpr2) bzw. DNA- (5S rRNA) Sonden hybridisiert. Gezeigt ist je eine repräsentative Hybridisierung von zwei unabhängigen Experimenten. M, *RiboRuler Low/High Range RNA Ladder*. WT, Wildtyp.

---

## 2 ERGEBNISSE

---

### 2.3.3.4 Identifizierung der Transkriptenden durch RACE-Experimente

Die experimentelle Ermittlung der präzisen Nukleotidsequenzen von Hpr1 und Hpr3 erfolgten im Rahmen von RACE (*rapid amplification of cDNA ends*) Analysen. Die erstmals von Bensing und Mitarbeitern (1996) für die Analyse bakterieller RNAs beschriebene 5' RACE ist eine sensitive RT-PCR-Technik zum Nachweis von 5'-Transkriptenden, die es erlaubt zwischen Primärtranskripten und prozessierten RNAs zu unterscheiden. Diese Methode kam bereits in verschiedenen Arbeiten erfolgreich zur Analyse von 5'-Enden cyanobakterieller RNAs zum Einsatz (Axmann *et al.*, 2005; Dühring *et al.*, 2006; Georg *et al.*, 2009; Steglich *et al.*, 2008; Vogel *et al.*, 2003; Voß *et al.*, 2009).

In Bakterien besitzen primäre, nicht-prozessierte Transkripte Triphosphate, prozessierte RNAs hingegen Monophosphate an ihren 5'-Enden. Durch Behandlung der RNA mit *tobacco acid pyrophosphatase* (TAP) lassen sich die primären triphosphorylierten 5'-Enden hydrolytisch zu Monophosphaten umwandeln, was die Ligation mit einem 5'-RNA-Linker bekannter Sequenz erlaubt. Bei der anschließenden RT-PCR mit einem Paar aus linker-spezifischem und gen-spezifischem Primer werden also infolge der TAP-Behandlung (+T) sowohl primäre als auch prozessierte Transkripte amplifiziert. Die jeweils durchzuführende Negativkontrolle ohne TAP-Behandlung (-T) sollte dagegen ausschließlich RT-PCR-Produkte prozessierter Transkripte hervorbringen, da die Primärtranskripte wegen der Triphosphate am 5'-Ende nicht ligierbar sind. Die Analyse erfolgt durch Klonierung und Sequenzierung gereinigter (+T)-RT-PCR-Produkte. Die Bestimmung von 3'-Transkriptenden erfolgt analog, jedoch ohne die Notwendigkeit einer TAP-Behandlung. Der 3'-RNA-Linker ist an dessen 3'-Ende chemisch modifiziert (aminiert), um intramolekulare Zyklisierungen bzw. Ligationen mit dem 5'-Ende der zu analysierenden RNA zu vermeiden. Aus entsprechenden Gründen werden die 5'-Enden der zu analysierenden RNA vor der Ligrationsreaktion vollständig dephosphoryliert (Argaman *et al.*, 2001).

Die 3'-RACE-Analysen von Hpr1 und Hpr3 erfolgten im Rahmen der Diplomarbeit von Nils Schürgers und werden in dieser Arbeit nicht im Einzelnen dargestellt.

---

## 2 ERGEBNISSE

---

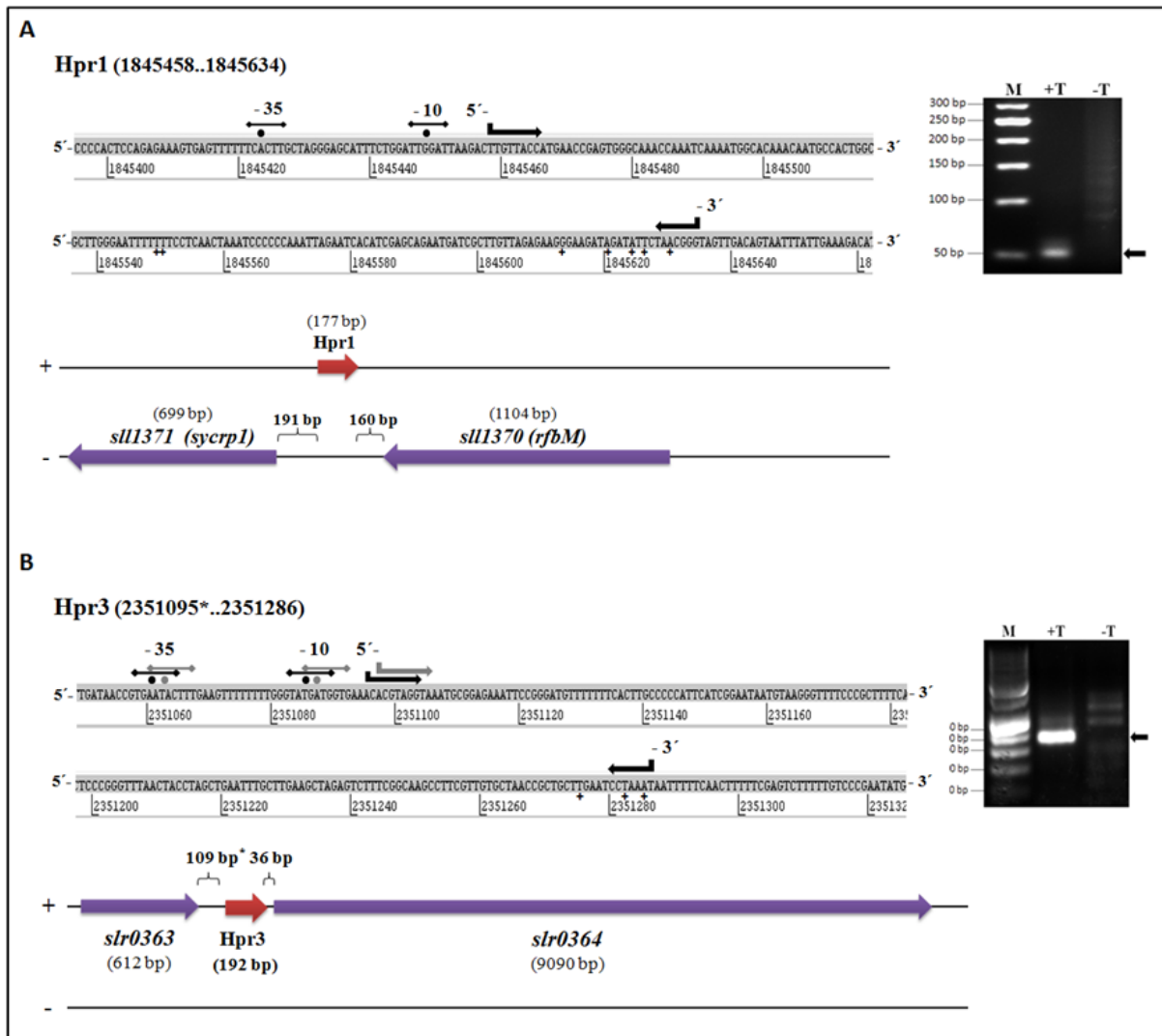
### Hpr1

Die Sequenzierungen von mindestens vier 5'-RACE-Klonen (+T; siehe markiertes RT-PCR-Produkt, Abbildung 32A, rechts oben) identifizierten für Hpr1 ein 5'-Ende an der genomischen Position 1845458. 3'-RACE-Experimente identifizierten neben dem äußersten 3'-Ende an Position 1845634 noch sieben weitere „innere“ 3'-Enden (Abbildung 32A, oben). Dabei könnte es sich um Degradationsintermediate handeln (Argaman *et al.*, 2001); da diese Methode im Gegensatz zur 5'-RACE nicht zwischen primären und prozessierten/degradierten Enden unterscheiden kann, ist dieser Befund nicht 100 %ig abgesichert. Jedoch stimmt die ermittelte Größe der RNA von 177 nt gut mit den Northern Blot-Daten aus Abbildung 30 überein. Die apparente Instabilität des 3'-Endes könnte dort auch das Auftreten der zusätzlichen Hauptbanden erklären. Die experimentell ermittelte genomische Lokalisierung von *hpr1* ist schematisch in Abbildung 32A (unten) dargestellt. Der Bereich liegt in *antisense*-Orientierung 191 bp stromaufwärts von *sll1371* (*sycrp1*) bzw. 32 bp stromaufwärts der vorhergesagten Sycrp1-Bindestelle desselben Gens.

### Hpr3

Für Hpr3 wurden in zwei unabhängigen Experimenten zwei unterschiedliche 5'-Enden in einem Abstand von 2 nt identifiziert (Abbildung 32B). In beiden Versuchen wurden mindestens vier 5'-RACE-Klone sequenziert. Die ermittelten 5'-Enden sind genomisch an Position 2351095 bzw. 2351097 auf dem Chromosom lokalisiert und liegen damit 109 bp bzw. 111 bp stromabwärts von *slr0363*. Im Rahmen der 3'-RACE wurde die genomische Position 2351286 als apparentes 3'-Ende ermittelt. In diesem Fall enthielten >50 % der sequenzierten Klone dieses Ende, während die restlichen Sequenzierungen drei alternative 3'-Enden hervorbrachten. Auch hier ist von Degradationsintermediaten auszugehen. Folglich ergibt sich aus den Daten eine RNA von 190/192 nt Länge, welche 36 bp stromaufwärts von *slr0364* kodiert wird (Abbildung 32B, unten). Diese Daten weisen deutlich darauf hin, dass es sich bei Hpr3 um eine sRNA handelt, die nicht den untranslatierten Bereichen der benachbart kodierten mRNAs entspricht. Dies wird zudem durch die Northern Blot-Ergebnisse in Abschnitt 2.3.3.3 unterstützt.

## 2 ERGEBNISSE



**Abbildung 32: Experimentell ermittelte 5'- und 3'-Enden von Hpr1 und Hpr3.** Gezeigt sind Ausschnitte der genomischen Sequenzen (jeweils oben) im Umfeld der für Hpr1 (A) und Hpr3 (B) kodierenden Regionen. Die durch 5'- bzw. 3'-RACE ermittelten Transkriptenden sind durch Pfeile markiert. Die -10- und -35-Regionen der möglichen Promotoren sind durch Querbalken gekennzeichnet; Punkte markieren jeweils die Nukleotidpositionen -10 bzw. -35 in Bezug auf die 5'-Enden. Die zwei alternativen 5'-Enden von Hpr3 sind in schwarz bzw. grau dargestellt. Alternative 3'-Enden sind unterhalb der Sequenzen markiert (+). Rechts abgebildet: RT-PCR-Produkte der 5'-RACE-Experimente, aufgetrennt in einem 4 %igen Agarosegel. Der Pfeil markiert das TAP-spezifische, klonierte und sequenzierte PCR-Produkt (+T). Als Kontrolle diente ein paralleler Ansatz ohne TAP-Behandlung (-T). Die PCR-Produkte enthalten zudem die 28 bp der RNA-Linkersequenz. Als Längenstandard wurde *GeneRule 50 bp DNA Ladder* eingesetzt (M). Unten ist jeweils eine schematische Darstellung der genomischen Lokalisierungen der für Hpr1 bzw. Hpr3 kodierenden Sequenzen gezeigt. Abgebildet sind jeweils (+)- und (-)-Strang. Die Größen sind in bp (in Klammern) angegeben. Abstände zwischen den Genen sind markiert. \*Die numerische Angabe für die exakte Position auf dem Chromosom bezieht sich für Hpr3 auf das „äußere“ der alternativen 5'-Enden (schwarzer Pfeil).

---

## 2 ERGEBNISSE

---

### 2.3.3.5 Hpr3 akkumuliert unter Salz- und Hitzestress

Die Expression vieler bakterieller regulatorischer sRNAs wird durch bestimmte Umweltbedingungen im Rahmen der zellulären Stressantwort stimuliert (siehe z.B. Gottesman, 2005). Vor diesem Hintergrund sollte der Einfluss ausgewählter - in unserem Labor technisch etablierter - Stressbedingungen auf die Transkriptakkumulationen von Hpr1 und Hpr3 in Wildtyp-Kulturen von *Synechocystis* untersucht werden. Da für Hpr1 generell keine Expression im Wildtyp nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt), sind im Folgenden ausschließlich Daten zu Expressionsanalysen von Hpr3 dargestellt. Abbildung 33 zeigt eine Northern Blot-Hybridisierung mit Gesamt-RNA-Proben aus Zellkulturen, welche über definierte Zeiträume Stickstoff- bzw. Eisenmangel, erhöhten Lichtintensitäten oder absoluter Dunkelheit ausgesetzt waren, bzw. mit Methylviologen zur Erzeugung oxidativen Stresses oder NaCl (Salzstress) behandelt wurden. Aus der Darstellung geht hervor, dass es im Vergleich zu den Standardanzuchtbedingungen (K) nach 25 h Salzstress zu einer drastisch erhöhten Transkriptakkumulation von Hpr3 kommt, während nach 1 h Starklicht (HL) immerhin eine leichte Zunahme erkennbar ist; nach 48 h HL nimmt die Transkriptmenge hingegen wieder ab. Bei Dunkelheit ist Hpr3 nicht mehr nachweisbar. Unter den restlichen untersuchten Bedingungen zeigen sich keine signifikanten Expressionsunterschiede. Die durch Salzstress vermittelte Akkumulation von Hpr3 wurde anschließend im Rahmen einer Zeitreihe etwas genauer betrachtet (Abbildung 33B). Dabei zeigte sich, dass das Expressionsniveau bereits nach 4h Inkubation mit 684 mM NaCl im Medium drastisch ansteigt, während innerhalb von zwei Stunden nach Versuchsbeginn keine Effekte zu beobachten waren. Da bereits mehrfach von Schnittmengen zwischen Salzstress- und Hitzestress-regulierten Genen in *Synechocystis* berichtet wurde (Fulda *et al.*, 2006; Kanasaki *et al.*, 2002; Marin *et al.*, 2004; Shoumskaya *et al.*, 2005), erfolgten ferner Northern Blot-Analysen mit RNA aus Flüssigkulturen, die über definierte Zeiträume bei 44 °C inkubiert wurden (Abbildung 33C). Die Darstellung zeigt (hier im Vergleich mit RNA aus  $\Delta hfq$  als Negativkontrolle), dass die Transkriptmenge von Hpr3 im Wildtyp bereits nach 0,5 h Hitzestress deutlich zunimmt; nach 2 h akkumuliert Hpr3 in etwa auf dem Niveau der Salz-Akklimatisierung (vgl. Abbildung 33A,B). Innerhalb einer Regenerationsphase von 2 h bei

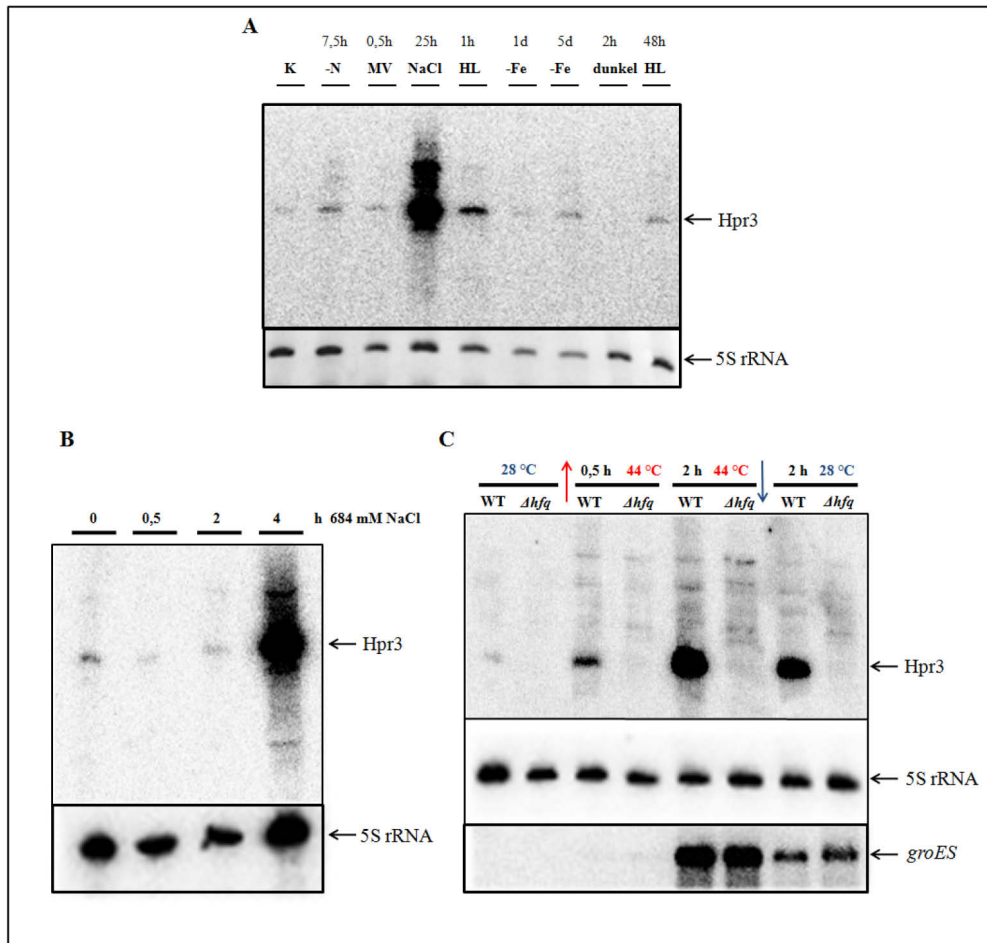
## 2 ERGEBNISSE

---

28 °C zeigt sich eine relativ geringe Abnahme der Hpr3-Mengen, was auf eine relativ hohe Stabilität der RNA hinweisen könnte.

Insgesamt konnte mithilfe dieser Northern Blot-Analysen eine stress-induzierte Expression von Hpr3 in *Synechocystis* dargestellt werden. Dies gilt insbesondere für Hitzestress und Langzeit-Salzstress; ein Einfluss weiterer, in dieser Arbeit nicht getesteter Umweltbedingungen auf die Hpr3-Expression kann nicht ausgeschlossen werden. Die Expression von Hpr1 konnte mithilfe von Northern Blot-Analysen unter den getesteten Bedingungen im Wildtyp nicht nachgewiesen werden.

## 2 ERGEBNISSE



**Abbildung 33: Einfluss ausgewählter Stressbedingungen auf die Transkriptakkumulation von Hpr3.** Logarithmisch wachsende Flüssigkulturen wurden vergleichend diversen Stressbedingungen (A) bzw. in Zeitreihen Salzstress (B) und Hitzestress (C) ausgesetzt und per Northern Blot analysiert. Die präparierte Gesamt-RNA (ca. 5 µg) wurde in einem 8 %igen Harnstoff-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer strangspezifischen Hpr3-RNA-Sonde hybridisiert. Die Hybridisierung mit einer 5S rRNA-spezifischen Oligonukleotidsonde diente als Ladekontrolle. Die Kontrollhybridisierung mit einer *groES*-RNA-Sonde (C) erfolgte zum Nachweis der zellulären Hitzestressantwort. (A) Folgende Stressbedingungen wurden im Wildtyp getestet: Standardbedingungen (K), Stickstoffmangel (7,5 h -N), oxidativer Stress durch 50 µM Methylviologen (0,5 h MV), Langzeit-Salzstress durch 684 mM NaCl (25 h NaCl), Kurzzeit-Starklicht bei 150 µE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (1h HL), Eisenmangel (1d -Fe; 5d -Fe), Dunkelheit (2 h dunkel), Langzeit-Starklicht (48 h HL). (B) Nach Zusatz von NaCl (Endkonzentration 684 mM) zu einer logarithmisch wachsenden Flüssigkultur des Wildtyps wurden zu den Zeitpunkten 0,5 h, 2 h, 4 h Proben entnommen. Der Zeitpunkt „0“ repräsentiert Probenahmen vor NaCl-Zusatz. Aus der Diplomarbeit von Nils Schürgers. (C) Wildtyp- und  $\Delta hfg$ -Kulturen wurden parallel in einem Wasserbad bei 44 °C inkubiert. Die Probenahme erfolgte unmittelbar vor (28 °C-Kontrolle) sowie 0,5 h und 2 h nach der Inkubation. Nach einer zweistündigen Regenerationsphase bei 28 °C wurden erneut Proben genommen (2 h 28 °C). Gezeigt sind repräsentative Daten aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. WT, Wildtyp.

---

## 2 ERGEBNISSE

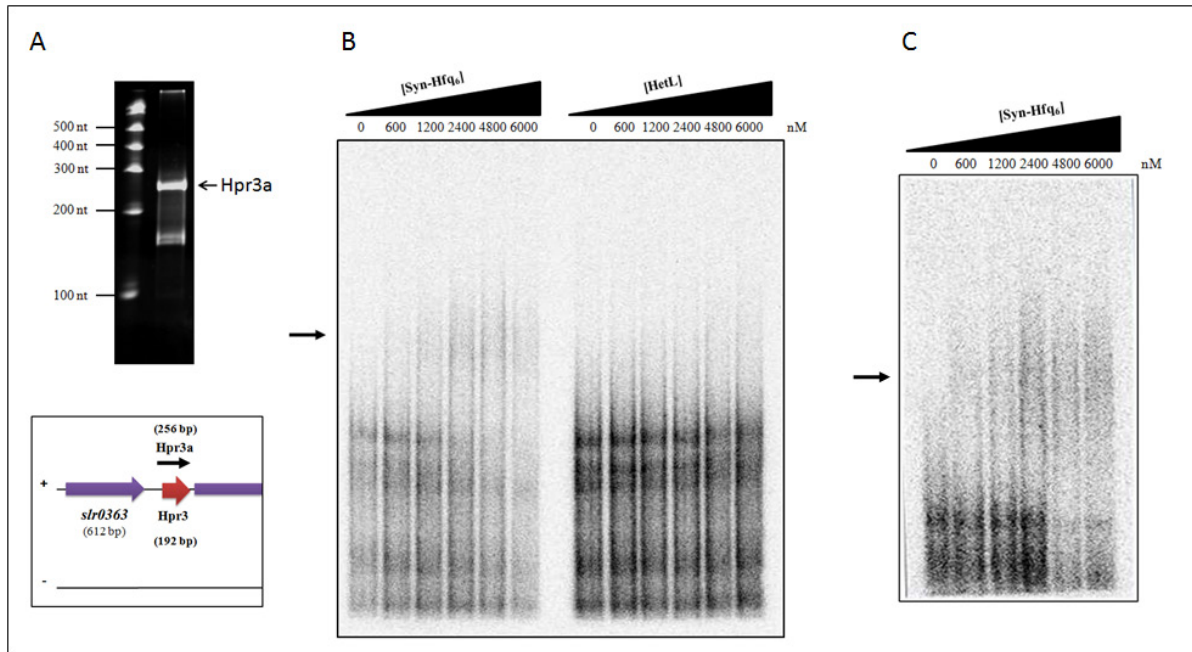
---

### 2.3.3.6 Hpr3 interagiert *in vitro* schwach mit Syn-Hfq

Unter der Annahme, dass es sich bei Hpr3 um eine Hfq-abhängig exprimierte sRNA mit potenzieller Funktion in der zellulären Stressantwort handelt, sollte geklärt werden ob sich *in vitro* eine spezifische Bindung an Syn-Hfq nachweisen lässt. Entsprechend des in Abschnitt 2.3.1 beschriebenen Verfahrens wurde dazu ein EMSA mit [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-markierter *in vitro* transkribierter Hpr3-RNA (Abbildung 34A) durchgeführt. Der Test erfolgte mit rekombinantem Syn-Hfq-Protein im Konzentrationsbereich zwischen 600 nM und 6000 nM. Als Kontrolle wurde erneut das rekombinante HetL-Ortholog aus *Anabaena variabilis* ATCC 29413 im selben Konzentrationsbereich eingesetzt. Es ist zu berücksichtigen, dass das 5'-Ende der *in vitro* transkribierten RNA (Hpr3a) gegenüber dem experimentell ermittelten 5'-Ende von Hpr3 um 64 nt erweitert ist (Abbildung 34A, unten), da die Präparation vor dem Abschluss der 5'-RACE Experimente erfolgte. Die Sequenz-Auswahl basierte auf parallel in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Wolfgang Hess (Institut für Biologie III, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg) generierten Transkriptom-Daten von *Synechocystis*. Abbildung 34B zeigt, dass ab einer Konzentration des Syn-Hfq-Proteins von 600 nM eine zunehmende diffuse Retardation von Hpr3a zu beobachten ist (schwarzer Pfeil, reproduziert in Abbildung 34C). Dieses Verhalten ist in den entsprechenden Kontrollansätzen mit HetL nicht nachweisbar, was auf die Bildung eines spezifischen Syn-Hfq-Hpr3a-Komplexes hinweist. Die Daten sprechen jedoch für eine mindestens 10-fach niedrigere Affinität des Syn-Hfq-Proteins zu Hpr3a im Vergleich zu den charakterisierten Hfq-RNA-Bindungskinetiken aus *E. coli*. Zudem weist der diffuse Charakter der retardierten Banden auf eine apparente Instabilität des Syn-Hfq-Hpr3a-Komplexes hin, was ferner auf eine sehr schwache Interaktionskinetik zurückzuführen wäre (Hopkins *et al.*, 2009).



## 2 ERGEBNISSE



**Abbildung 34: Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) mit *in vitro* synthetisierter, [ $^{32}$ P]-markierter Hpr3a RNA (5 nM) bei zunehmenden Mengen an Syn-Hfq-Protein.** (A) *In vitro* Transkription von Hpr3a. Die RNA wurde nach erfolgtem DNase-Verdau zusammen mit dem Marker „RiboRuler Low Range RNA Ladder“ (linke Spur) in einem 8 %igen Harnstoff-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Für die EMSA-Analysen wurden die Banden aus dem Gel eluiert und am 5'-Terminus mit [ $\alpha$  $^{32}$ P]-markiert. (B, C) Die markierte RNA wurde bei einer Konzentration von 5 nmol L $^{-1}$  für 30 min bei 30 °C mit Syn-Hfq bzw. dem Kontrollprotein HetL (B) in aufsteigenden Konzentrationen (siehe Beschriftung) inkubiert. Als Kompetitor war in jedem Ansatz 1  $\mu$ g Hefe-tRNA enthalten. Die EMSA-Analysen erfolgten in 5 %igen nicht-denaturierenden Polyacrylamidgelen. Die Gele wurden im Vakuum getrocknet und die markierte RNA durch *Phosphoimaging* sichtbar gemacht.

### 3 Diskussion

#### 3.1 Hfq ist essenziell für die Motilität von *Synechocystis*

Die physiologische Rolle von Hfq ist bislang vorwiegend in pathogenen Organismen aus unterschiedlichen Verwandtschaftsgruppen, insbesondere jedoch aus der Abteilung der Proteobakterien untersucht (Chao & Vogel, 2010). Pathogene Bakterien haben spezielle Mechanismen entwickelt, ihren jeweiligen Wirtsorganismus zu besiedeln und besitzen die Fähigkeit, sich an die jeweils spezifischen Stressbedingungen in der Wirtsumgebung anzupassen. Wichtige Messgrößen für die Virulenz eines Bakteriums sind z.B. Adhärenz, Invasion und die Überlebensrate des Pathogens in Bezug auf das Wirtsgewebe. Inaktivierungsmutanten von *hfq* in unterschiedlichen Organismen zeigten erhebliche Defekte hinsichtlich der genannten Eigenschaften (Chao & Vogel, 2010). Diese Phänotypen gingen häufig mit Beeinträchtigungen in der Toleranz gegenüber diversen physiologisch relevanten Stressbedingungen einher. Auch für die Knöllchenbakterien *Sinorhizobium meliloti* (Barra-Bily *et al.*, 2010b) und *Azorhizobium caulinodans* (Kaminski *et al.*, 1994; Kaminski & Elmerich, 1998) wurden der speziellen Lebensweise angepasste Funktionen der orthologen Hfq-Proteine beschrieben. Als Vertreter photosynthetischer Organismen wurden bisher für die  $\alpha$ -Proteobakterien *Rhodobacter capsulatus* (Drepper *et al.*, 2002) und *Rhodobacter sphaeroides* (Glaeser *et al.*, 2007) wichtige Funktionen von Hfq nachgewiesen. Diese Effekte bezogen sich jedoch auf die Stickstofffixierung (*R. capsulatus*) bzw. die zelluläre Antwort auf Singulett-Sauerstoff-Stress (*R. sphaeroides*).

Die einleitenden physiologischen Untersuchungen einer  $\Delta hfq$ -Mutante des Modellorganismus *Synechocystis* sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit Aufschluss darüber geben, ob Hfq auch in Cyanobakterien möglicherweise eine der speziellen (oxygen photosynthetischen) Lebensweise geschuldete Funktion zukommt. Zunächst ließ sich angesichts der schnellen, vollständigen genomischen Segregation in den selektierten Mutanten eine essenzielle Haushaltsfunktion (z.B. im Rahmen der Photosynthese) von Hfq in diesem Organismus ausschließen. Diese Beobachtung war insofern nicht überraschend, als sich die Inaktivierung des *hfq*-Locus auch in den bisher untersuchten Bakterien nicht auf das Überleben bzw. nur minimal auf das Wachstum der Stämme unter optimierten Laborbedingungen auswirkte (Attia

### 3 DISKUSSION

---

*et al.*, 2008; Bohn *et al.*, 2007; Christiansen *et al.*, 2004; Dietrich *et al.*, 2009; Ding *et al.*, 2004; Drepper *et al.*, 2002; Fantappiè *et al.*, 2009; Geng *et al.*, 2009; Kulesus *et al.*, 2008; McNealy *et al.*, 2005; Meibom *et al.*, 2009; Pannekoek *et al.*, 2009; Robertson & Roop, 1999; Shakhnovich *et al.*, 2009; Sittka *et al.*, 2007; Sonnleitner *et al.*, 2003). Die  $\Delta hfq$ -Mutante von *Synechocystis* zeigte jedoch auch bei unterschiedlichen Lichtintensitäten sowie unter diversen Stress- und Nährstoffmangel-Bedingungen im Vergleich zum Wildtyp keine Wachstumsdefekte (Abbildung 6; Abbildung 7). Bei diesen Experimenten wurden lediglich zwei minimale Effekte beobachtet: Einerseits zeigte  $\Delta hfq$  unter Stickstoffmangel eine scheinbar leichte Verzögerung des stressbedingten (Collier & Grossman, 1992) Abbaus der Phycobilisomen. Andererseits wurde eine erhöhte Langzeit-Toleranz der Mutante gegenüber Hitzestress (bei 44 °C) beobachtet (Abbildung 8; diskutiert in Abschnitt 3.6). Die durch den Stickstoffmangel bedingten Effekte wurden anhand der Lichtabsorption bei ~620-630 nm untersucht. Tatsächlich wurden in  $\Delta hfq$ , auf der Basis des Lichtabsorptionsspektrums, im Vergleich zum Wildtyp häufig erhöhte PC/Chl-Verhältnisse beobachtet. Dies galt besonders für Flüssigkulturen, welche unter diversen Stressbedingungen angezogen wurden. Abgesehen von der Nährstoffversorgung (Grossman *et al.*, 1993) wird der zelluläre Gehalt an Phycobilisomen in Cyanobakterien auch von den herrschenden Lichtintensitäten beeinflusst und verringert sich unter Starklichtbedingungen (Kalla *et al.*, 1993; Raps *et al.*, 1985). Die in  $\Delta hfq$  beobachteten Abweichungen der Pigmentverhältnisse waren jedoch generell sehr gering ( $\leq 5\%$ ) und (auch unter Stickstoffmangel) schwer reproduzierbar. Angesichts dessen und der Tatsache, dass keine Besonderheiten im Wachstumsverhalten der Mutante unter den relevanten Bedingungen zu beobachten waren, ist nicht davon auszugehen, dass Hfq in *Synechocystis* eine zentrale Rolle in der Regulation der zellulären Pigmentzusammensetzung oder der allgemeinen (Licht-) Stressantwort spielt. Es kann dennoch nicht ausgeschlossen werden, dass es sich um einen signifikanten - wenn auch schwachen - Phänotyp handelt, der auf Primär- oder Sekundäreffekte der *hfq*-Inaktivierung zurückzuführen ist. Für genauere Untersuchungen dieses Aspektes wären quantitative Pigmentanalysen von Zellextrakten z.B. infolge alternativer Behandlungen mit unterschiedlichen Lichtquantitäten bzw. -qualitäten sinnvoll. Ein weiterer wichtiger Aspekt in der Physiologie von *Synechocystis* ist die Fähigkeit, sich mithilfe der Phototaxis auf festen Oberflächen gerichtet durch einen aktiven Mechanismus einer Lichtquelle entgegen zu bewegen (Choi *et al.*, 1999). In der vorliegenden

### 3 DISKUSSION

---

Arbeit konnte gezeigt werden, dass Hfq ein essenzieller Faktor bei der Vermittlung der phototaktischen Motilität in *Synechocystis* ist. Die Phototaxis ist - wie die natürliche DNA-Aufnahme von *Synechocystis* und der meisten anderen natürlich kompetenten Organismen - ein aktiver Prozess, an welchem gleichermaßen die Typ IV Pili (bzw. eng verwandte Strukturen) beteiligt sind. Diese Mechanismen sind am besten in den Proteobakterien *Pseudomonas* und *Neisseria gonorrhoeae* untersucht (Hamilton & Dillard, 2006; Kato *et al.*, 2008; Mattick, 2002; Nudleman & Kaiser, 2004); für *Synechocystis* liegen dagegen Mutagenese-Studien vor, welche auf eine fundamentale Rolle homologer *pil*-Gene (*pilus assembly* Gene) in der natürlichen Kompetenz hinweisen (Yoshihara *et al.*, 2001; Yoshihara *et al.*, 2002). Dabei zeigte sich, dass die Expression dieser Gene sowohl für die Motilität (siehe auch Bhaya *et al.*, 2000) als auch für die natürliche Kompetenz von *Synechocystis* wichtig ist (Tabelle 3). Mit Ausnahme von einigen *pilA1*-Homologen sowie von *pilT1*, welches für ein ATP-abhängiges Motorprotein kodiert und dessen Inaktivierung zu einer Hyperpilierung der Zelloberfläche führt, sind diese Gene bzw. deren Protein-Produkte essenziell für die Assemblierung von großen Pili. Das Fehlen dieses Pilus-Morphotyps ging bislang in allen dazu untersuchten Mutanten mit dem Verlust der phototaktischen Motilität in *Synechocystis* einher. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der  $\Delta hfq$ -Mutante verdeutlichten, dass an der Zelloberfläche ebenfalls keine großen Pili ausgebildet werden, während in einzelnen Fällen noch kleine Pili sichtbar waren (Abbildung 10). Die Rolle der kleinen Pili in der Phototaxis konnte ebenso wie deren Strukturkomponenten bisher nicht aufgeklärt werden; ein kompensatorischer Einfluss bei Verlust der großen Pili wurde noch nicht beschrieben. Die Tatsache, dass der Verlust der Motilität in  $\Delta hfq$  ohne Ausnahme in verschiedenen Klonen (sowie in zwei weiteren Klonen aus einer unabhängigen Transformation; nicht gezeigt) zu beobachten war, spricht für die Konsistenz dieser Daten. Zudem konnte mithilfe genetischer Komplementation sowohl die Ausbildung der großen Pili, als auch die phototaktische Motilität in  $\Delta hfq$  wiederhergestellt werden (Abbildung 18). Daher kann ausgeschlossen werden, dass der beobachtete Phänotyp auf polaren Effekten durch die Insertion der Resistenzgen-Kassette beruht. Diese Daten weisen deutlich auf eine zentrale Rolle von Hfq in der Regulation von Pilus-Assemblierung- und/oder Funktion in *Synechocystis* hin. Interessanterweise führte die *hfq*-Inaktivierung auch in *Pseudomonas* zu einer starken Beeinträchtigung der durch Typ IV Pili vermittelten *twitching*- und *swarming* Motilität

### 3 DISKUSSION

(Sonnleitner *et al.*, 2003). In dieser Arbeit wurden jedoch keine mikroskopischen Analysen der Zelloberfläche dargestellt.

**Tabelle 3: Homologe *pil*-Loci und weitere essenzielle Gene für die Motilität/Phototaxis in *Synechocystis*.** Die Auflistung fasst im Wesentlichen die Daten aus den Übersichtsartikeln von Bhaya (2004) sowie Yoshihara & Ikeuchi (2004) zusammen. <sup>+</sup>, aus Nakasugi *et al.* (2006); <sup>++</sup>, aus dieser Arbeit (siehe auch Dienst *et al.*, 2008); <sup>a</sup>, nachweislich essenziell für die natürliche Kompetenz; <sup>\*</sup>, MCP, *methyl accepting chemotaxis protein*; <sup>\*\*</sup>, widersprüchliche Daten (Kamei *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2004).

Gen	Synonym	Mögliche Funktion	Beteiligt an:
<i>sll1694</i>	<i>pilA1</i>	Präpilin (Typ IV Pilin-ähnlich)	<sup>a</sup> Biogenese „großer“ Pili, Motilität
<i>str2015</i>	<i>pilA9</i>	Präpilin (Typ IV Pilin-ähnlich)	Motilität
<i>str2016</i>	<i>pilA10</i>	Präpilin (Typ IV Pilin-ähnlich)	Motilität
<i>str2017</i>	<i>pilA11</i>	Präpilin (Typ IV Pilin-ähnlich)	Motilität
<i>str2018</i>	-	?	Motilität
<i>str0063</i>	<i>pilB1</i>	Motor-Protein, Pilus-Extension	<sup>a</sup> Biogenese „großer“ Pili, Motilität
<i>str0161</i>	<i>pilT1</i>	Pilus-Retraktion	<sup>a</sup> Pilus-Degradation, Motilität
<i>str0162-63</i>	<i>pilC</i>	Protein der inneren Membran	<sup>a</sup> Biogenese „großer“ und „kleiner“ Pili,
<i>str1274</i>	<i>pilM</i>	Protein der inneren Membran	<sup>a</sup> Biogenese „großer“ Pili, Motilität
<i>str1275</i>	<i>pilN</i>	Protein der inneren Membran	<sup>a</sup> Biogenese „großer“ Pili, Motilität
<i>str1276</i>	<i>pilO</i>	Protein der inneren Membran	<sup>a</sup> Biogenese „großer“ Pili, Motilität
<i>str1277</i>	<i>pilQ</i>	Pore der äußeren Membran	<sup>a</sup> Biogenese „großer“ Pili, Motilität
<i>str1120</i>	<i>pilD</i>	Präpilin-Peptidase	<sup>a</sup> Biogenese „großer“ und „kleiner“ Pili,
<i>sll0038</i>	<i>pixG, taxP1</i>	<i>Response regulator</i>	Positive Phototaxis
<i>sll0039</i>	<i>pixH, taxY1</i>	<i>Response regulator</i>	Positive Phototaxis
<i>sll0040</i>	<i>pixI, taxW1</i>	Kopplungs-Faktor	Positive Phototaxis
<i>sll0041</i>	<i>pixJ1, taxD1</i>	Phytochrom-ähnliches MCP <sup>*</sup>	Positive Phototaxis
<i>sll0042</i>	<i>pixJ2, taxD'</i>	MCP <sup>*</sup>	Positive Phototaxis
<i>sll0043</i>	<i>pixL, taxAY1</i>	Histidin-Kinase	Positive Phototaxis
<i>sll1533</i>	<i>pilT2</i>	Motor-Protein	Positive Phototaxis
<i>sll0821</i>	<i>cph2</i>	Phytochrom-ähnlicher Rezeptor	Negative Phototaxis gegenüber Blaulicht
<i>str1041</i>	<i>pilG, taxP3</i>	<i>Response regulator</i>	Biogenese „großer“ Pili, Motilität
<i>str1042</i>	<i>pilH, taxY3</i>	<i>Response regulator</i>	Biogenese „großer“ Pili, Motilität
<i>str1043</i>	<i>pilI, taxW3</i>	Kopplungs-Faktor	Biogenese „großer“ Pili, Motilität
<i>str1044</i>	<i>pilJ, taxD3</i>	Intrazellulärer Rezeptor	<sup>a</sup> Biogenese „großer“ Pili, Motilität
<i>str0073</i>	<i>pilL-N</i>	Histidin-Kinase, N-Terminus	Pilus-Degradation
<i>str0322</i>	<i>pilL-C,</i>	Histidin-Kinase, C-Terminus	<sup>a</sup> Biogenese „großer“ Pili, Motilität
<i>str2031</i>	-	Protein-Phosphatase, PP2C-Typ	Motilität
<i>sll1575</i>	<i>spkA</i>	Ser/Thr-Protein-Kinase	Biogenese „großer“ Pili, Motilität
<i>str1697</i>	<i>spkB</i>	Ser/Thr-Protein-Kinase	Motilität
<i>str1443</i>	<i>spkE</i>	Ser/Thr-Protein-Kinase	<sup>**</sup> Motilität
<i>str1991</i>	<i>cya1</i>	Adenylat-Cyclase	Motilität
<i>sll1371</i>	<i>sycrpl</i>	cAMP-Rezeptor-Protein	Motilität
<i>str1667</i>	-	-	Biogenese „großer“ Pili, Motilität
<i>str1668</i>	-	Pilus-Chaperon, Periplasma	Biogenese „großer“ Pili, Motilität
<i>str1564</i>	<i>sigF, rpoF</i>	Sigma Faktor, Gruppe 3	Biogenese „kleiner Pili“, Motilität
<i>str0388</i> <sup>+</sup>	<i>comF</i>	Kompetenz-Protein	<sup>a</sup> Pilus-Biogenese/Degradation, Motilität
<i>ssr3341</i> <sup>++</sup>	<i>hfq</i>	RNA-Chaperon	Biogenese „großer“ Pili, Motilität

### 3 DISKUSSION

---

Bei einer  $\Delta hfq$ -Mutante von *Neisseria gonorrhoeae* ging die verminderte Dichte der Typ IV Pili auf der Zelloberfläche mit Einschränkungen in der Bildung von Zellaggregaten und der natürlichen Kompetenz einher. Die *twitching* Motilität war davon jedoch nicht betroffen (Dietrich *et al.*, 2009). Die Autoren diskutieren daher alternativ die herabgesetzte Expression weiterer Adhäsine als Ursache für diesen Phänotyp.

Untersuchungen der  $\Delta hfq$ -Mutanten zweier unterschiedlicher Stämme von *Neisseria meningitidis* lieferten ferner gegensätzliche Daten hinsichtlich der Akkumulation von Pile (homolog zu PilA aus *Synechocystis*) (Fantappiè *et al.*, 2009; Pannekoek *et al.*, 2009). Weitere nicht-motile Phänotypen von  $\Delta hfq$ -Mutanten wurden für zwei pathogene Stämme von *E. coli* (Hansen & Kaper, 2009; Kulesus *et al.*, 2008), sowie von *Salmonella* (Sittka *et al.*, 2007) und *Burkholderia cepacia* (Sousa *et al.*, 2009) beschrieben. In *Salmonella* war dieser Phänotyp auf eine verringerte Expression des Flagellins FliC zurückzuführen. Die strukturellen und mechanistischen Eigenschaften dieser Zellfortsätze unterscheiden sich jedoch grundlegend von jenen der cyanobakteriellen Typ IV Pili (Bardy *et al.*, 2003). Die Motilität dient allen genannten Organismen zudem als ein wesentlicher Mechanismus für deren Pathogenität und unterscheidet sich daher im ökologischen Kontext funktionell grundsätzlich von der cyanobakteriellen Phototaxis. Insbesondere vor diesem Hintergrund lässt sich anhand des vorgestellten Phänotyps von  $\Delta hfq$  - im Vergleich mit den physiologischen und morphologischen Daten aus anderen Bakterien - nur mit Vorbehalt eine physiologisch-funktionelle Ähnlichkeit für Hfq aus *Synechocystis* festhalten.

#### 3.2 Hfq steuert in *Synechocystis* die Expression von Motilitäts-relevanten Genen

Mithilfe umfassender *Microarray*-Analysen ließ sich ein grundlegender Einblick in den molekularen Hintergrund des nicht-motilen Phänotyps der  $\Delta hfq$ -Mutante gewinnen. Dabei zeigte sich zunächst die Besonderheit, dass mit 31 Genen weniger als 1 % des protein-kodierenden Genoms von *Synechocystis* Hfq-abhängig reguliert wird. Dieser Umfang erscheint gegenüber den meisten bislang publizierten Daten zu  $\Delta hfq$ -Mutanten anderer Organismen äußerst gering. In den entsprechenden Arbeiten machten die Anteile zwischen ~6 % (z.B. 269 Gene in einem nicht-pathogenen *E. coli*-Stamm; Guisbert *et al.*, 2007) und ~18 % (785 Gene in *Salmonella*; Sittka *et al.*, 2008) des protein-kodierenden Genoms aus.

---

### 3 DISKUSSION

---

Auf der Basis von Proteom-Analysen dagegen wurden in *Neisseria meningitidis* (Fantappiè *et al.*, 2009; Pannekoek *et al.*, 2009) und *Sinorhizobium meliloti* (Barra-Bily *et al.* 2010a) lediglich ~30 bzw. 55 differenziell akkumulierende Proteine in  $\Delta hfq$ -Mutanten identifiziert. In diesen Arbeiten wurden jedoch keine Transkriptom-Analysen durchgeführt. Zwar liegen die Befunde in derselben Größenordnung wie jene der vorliegenden Transkriptom-Analyse von *Synechocystis*; jedoch lassen sich solche Daten schwer miteinander vergleichen. Bei globalen Transkriptom- und Proteom-Analysen einer  $\Delta hfq$ -Mutante von *Salmonella* wurden insgesamt 781 differenziell akkumulierende Proteine bzw. 492 Transkripte identifiziert. Die beiden Datensätze bildeten jedoch lediglich eine Schnittmenge von 113 regulierten Genen (Ansong *et al.*, 2009), was darauf zurückgeführt wurde, dass Hfq auf post-transkriptioneller Ebene Transkription und Translation regulatorisch voneinander entkoppelt. Demnach steuert Hfq in *Salmonella* durch die direkte post-transkriptionelle Regulation der Synthese von Transkriptionsfaktoren auch indirekt die Transkription bestimmter weiterer Gene (Ansong *et al.*, 2009; Sittka *et al.*, 2008). Des Weiteren ist zu berücksichtigen, dass die Expressionsprofile in den genannten Arbeiten unter verschiedenen Wachstumsbedingungen analysiert wurden. Für die vorliegenden Untersuchungen zu *Synechocystis* wurden Zellkulturen in der logarithmischen Wachstumsphase unter Standard-Kultivierungsbedingungen geerntet. Daher bieten die hier diskutierten Daten zwar - insbesondere im Hinblick auf den nicht-motilen Phänotyp von  $\Delta hfq$  - einen guten grundlegenden Einblick in die Hfq-abhängige Genregulation von *Synechocystis*; für ein vollständiges Bild sind jedoch weitere umfassende Analysen auf Transkriptom- und Proteomebene und mit Blick auf unterschiedliche Kultivierungsbedingungen notwendig.

#### **3.3 Hfq reguliert Komponenten eines putativen Pilus-Assemblierungs-Systems - funktionelle Betrachtung des Hfq-Regulons**

Unter den am stärksten regulierten Genen waren Komponenten der zwei potenziellen Operone *slr1667-slr1668* und *slr2015-slr2019* (mit Ausnahme von *slr2017* und *slr2019*), deren Transkriptmengen auch in einer *sycrp1*-Inaktivierungsmutante von *Synechocystis* (Yoshimura *et al.*, 2002a) ähnlich drastisch reduziert waren. Das Gen *sycrp1* (*sll1371*) kodiert das cAMP-Rezeptorprotein Sycrp1, welches im cAMP-Sycrp1-Komplex die Promotorregion von *slr1667* bindet und dessen Transkription aktiviert (Yoshimura *et al.*, 2002a; Yoshimura *et al.*, 2002b).

### 3 DISKUSSION

---

Auch stromaufwärts von *slr2015* wurde im Rahmen von bioinformatischen Analysen ein potenzielles cAMP-Sycrp1-bindendes Promotor-Element vorhergesagt (Xu & Su, 2009). Experimentell konnten Yoshimura und Mitarbeiter (2002a) in diesem Bereich jedoch keine Bindung nachweisen. Eine  $\Delta$ *sycrp1*-Mutante zeigte indes einen nicht-motilen Phänotyp mit einer reduzierten Anzahl großer Typ IV Pili, die zudem im Durchschnitt um ca. 2  $\mu$ m kürzer waren als jene des Wildtyps (Yoshimura *et al.*, 2002b). *slr2015-slr2017* zählen zu den *pilA*-ähnlichen Genen, deren Proteinprodukte primär innerhalb einer kurzen hydrophoben Region nahe des Amino-Terminus Ähnlichkeit zu PilA1 zeigen (Bhaya *et al.*, 2000; Sergeyenko & Los, 2000). Diese Konservierung sowie u.a. die typische, basische Signalsequenz (*leader peptide*) am Amino-Terminus klassifiziert die PilA-Proteine als extrazelluläre Proteine (Sergeyenko & Los, 2003). Einschließlich *pilA1* sind in dem Genom von *Synechocystis* insgesamt elf *pilA*-ähnliche Gene (*pilA1-pilA11*) bekannt, welche - abgesehen von *pilA3* (*slr1046*<sup>3</sup>) und *pilA4* (*slr1456*) - genomisch gruppiert vorliegen (Bhaya *et al.*, 2000; Yoshihara *et al.*, 2001): *pilA1-pilA2* (*sll1694-sll1695*), *pilA5-pilA8* (*slr1928-slr1931*), *pilA9-pilA11* (*slr2015-slr2017*). *slr2018* wird in der Literatur mangels Sequenzkonservierung nicht als *pilA*-ähnliches Gen aufgeführt (Bhaya *et al.*, 2000; Panichkin *et al.*, 2006). Im Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen zeigt sich gleichwohl durchaus, dass in dem aminoterminalen Bereich des hypothetischen *slr2018*-Produkts die typischen Charakteristika sekretierter Proteine vom *pilA*-Typ (s.o.) wenigstens teilweise konserviert sind. Während PilA1 als Hauptstrukturkomponente der großen Pili essenziell für deren Biogenese und die Motilität ist (Bhaya *et al.*, 2000), hatten einzelne Mutationen der Gene *pilA2-8* keinen Einfluss auf Motilität und/oder Pilus-Morphologie (Bhaya *et al.*, 2000; Yoshihara *et al.*, 2001). Die Inaktivierungen einzelner Gene des Lokus *slr2015-slr2018* führte dagegen zu nicht-motilen Mutanten (Bhaya *et al.*, 2001b), die jedoch weiterhin große und kleine Pili ausbildeten (Yoshihara & Ikeuchi, 2004).

Die Gene *slr1667* und *slr1668* dagegen sind jeweils essenziell für die Biogenese großer Pili (Yoshihara & Ikeuchi, 2004) und zeigen keine Ähnlichkeit zu den bekannten *pil*-Genen in

---

<sup>3</sup> *slr1046* ist genomisch direkt stromabwärts des *pilG*-Genclusters lokalisiert und wurde kürzlich als putative Komponente des Tat-Proteintransport-Systems der Thylakoid- und Plasmamembran beschrieben (Aldridge *et al.*, 2008).



### 3 DISKUSSION

---

*Synechocystis*. Die abgeleitete Aminosäuresequenz von *slr1667* enthält im Carboxy-Terminus eine *Spore coat protein U*-Domäne (Pfam-Eintrag: PF05229), welche auch in einer Familie sekretierter Pili-Proteine zu finden ist. Deren Mitglieder wurden u.a. in *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 (*A. baumannii*) als Komponenten von Pilus-Assemblierungssystemen identifiziert und spielen als solche eine Rolle bei der Bildung von Biofilmen und Oberflächen-Adhärenz (Tomaras *et al.*, 2003). Sequenzvergleiche zeigen für diese Proteine zudem eine schwache Ähnlichkeit zu der FimG-Untereinheit der gut untersuchten Typ-I-Pili aus uropathogenen *E. coli* (UPEC)-Stämmen (Übersicht in Waksman & Hultgren, 2009). In den Genomen von *A. baumannii* und einigen weiteren Organismen sind die entsprechenden Gene innerhalb polycistronischer Operone lokalisiert. Darin werden auch Proteine mit einer amino-terminalen Pili-Assemblierungs-Chaperon-Domäne (Pfam-Eintrag: PF00345) kodiert. Interessanterweise enthält auch *slr1668* eine solche Domäne, die man typischerweise in den periplasmatischen Pilus-Assemblierungs-Chaperonen PapD und FimC der P-Pili bzw. Typ-I-Pili der UPEC-Stämme findet (Tomaras *et al.*, 2003; Waksman & Hultgren, 2009). Diese Chaperone unterstützen dort die Faltung und Stabilisierung der Pilus-Untereinheiten für deren Assemblierung und verhindern frühzeitige Aggregationen (Sauer *et al.*, 2000; Waksman & Hultgren, 2009). Die Sequenzidentität zwischen *slr1668* und PapD beträgt insgesamt jedoch lediglich 12,05 %, die Ähnlichkeit 22,14 % (jeweils berechnet mit dem Programm SIAS; <http://imed.med.ucm.es/Tools/sias.html>). Es ist daher auch darauf hinzuweisen, dass sich die genannten Pili-Klassen hinsichtlich ihrer Biosynthese und des Aufbaus deutlich von Typ IV Pili unterscheiden (Fronzes *et al.*, 2008). Dennoch weisen die Daten - auch in Anbetracht der Bedeutung des *slr1667-slr1668*-Locus für Pilierung und Motilität von *Synechocystis* - auf eine fundamentale Funktion von Hfq in der Regulation der Biosynthese großer Pili hin. Neben weiteren, kleinen hypothetischen ORFs mit unbekannter Funktion war auch die Transkriptakkumulation des Gens *sll1543* von der Hfq-Inaktivierung mit einer sechsfachen Abnahme besonders stark betroffen. *sll1543* kodiert ein hypothetisches Protein mit einer PIN (PilT N-Terminus)-Domäne (Pfam-Eintrag: PF01850). Diese Domäne ist in Prokaryoten besonders innerhalb der toxischen Komponenten von Toxin-Antitoxin-Operonen bzw. -Genkassetten zu finden und hat u.a. vermutlich eine nukleolytische Funktion bei der mRNA-Qualitätskontrolle (<http://pfam.sanger.ac.uk/family/PF01850.14>; 08.03.2010; Anantharaman & Aravind, 2003). In Eukaryoten wurden PIN-Domänen als ribonukleolytische

### 3 DISKUSSION

---

Komponenten innerhalb des *Nonsense-mediated mRNA decay*-Mechanismus (Clissold & Ponting, 2000) und des Exosoms<sup>4</sup> identifiziert (Schaeffer *et al.*, 2009). BLAST-Recherchen mit der abgeleiteten Aminosäuresequenz von *sll1543* identifizierten jedoch lediglich homologe Proteine ohne definierte Funktion. Dennoch könnte hier eine interessante Verbindung zwischen primärer und sekundärer, Hfq-vermittelter (post-transkriptioneller) Regulation existieren. Bemerkenswert ist auch die Tatsache, dass dieser ORF in Gegenorientierung stromaufwärts von *slr1667* lokalisiert ist (Abbildung 14) und beide Loci offenbar durch Hfq ko-reguliert sind.

Eines der zwei einzigen Gene, welche in der *Microarray*-Analyse eine signifikante Zunahme ihrer Transkriptmengen in  $\Delta hfq$  zeigten, war *sll1942*, dessen hypothetisches Protein-Produkt eine putative Pilus\_PilP-Domäne (Pfam-Eintrag: PF11356) enthält. In der Gattung *Neisseria* ist PilP ein Lipoprotein der inneren Membran, welches wahrscheinlich als stabilisierender Faktor des Sekretins PilQ essenziell für Pilus-Biogenese und natürliche Kompetenz ist (Averhoff, 2004; Balasingham *et al.*, 2007; Nudleman & Kaiser, 2004). In *Neisseria* sowie *Pseudomonas* ist *pilP* innerhalb des *pilM*-Operons lokalisiert. In dem homologen Operon von *Synechocystis* (*slr1274-slr1277*; Tabelle 3) fehlt dagegen ein *pilP*-Ortholog (Yoshihara *et al.*, 2001). Insofern wären gezielte genetische Untersuchungen interessant, um zu überprüfen, ob es sich bei *slr1942* tatsächlich um ein genetisch und ggf. regulatorisch von dem *pilM*-Operon entkoppeltes *pilP*-Ortholog in *Synechocystis* handelt.

Die im Vorfeld der *Microarray*-Analysen durchgeführten Northern Blot-Experimente zeigten den Einfluss von Hfq auf die Akkumulation weiterer für die Motilität wichtiger mRNAs. *spkA* und *pilBI* kodieren eine Serin/Threonin-Kinase bzw. eine putative ATPase, welche eine essenzielle Funktion bei der Pilus-Extension wahrnimmt (Panichkin *et al.*, 2006; Yoshihara *et al.*, 2001). Für beide wurde eine leichte Zunahme der Transkriptmenge in  $\Delta hfq$  nachgewiesen, während die relative Menge der *pilAI*-mRNA leicht abnahm (Abbildung 11). Diese Kandidaten zeigten im Rahmen der *Microarray*-Analysen - möglicherweise aufgrund der

---

<sup>4</sup> Das Exosom ist ein ribonukleolytischer Proteinkomplex, welcher - ähnlich dem bakteriellen Degradosom - in Eukaryoten und Archaeen für viele RNA-Prozessierungs- und Degradationsprozessen verantwortlich ist (Mitchell *et al.*, 1997).

---

### 3 DISKUSSION

---

ausgewählten statistischen Stringenz bei der Datenauswertung - keine differenzielle Akkumulation. Da PilA1 die Hauptstrukturkomponente der Pili bildet, sollte dessen Synthese streng reguliert werden, um die zellulären Ressourcen zu rationalisieren. Daher könnte die beobachtete Abnahme der *pilA1*-Transkriptakkumulation eher auf einen sekundären Mechanismus zurückzuführen sein als auf einen direkten Effekt durch die *hfq*-Inaktivierung.

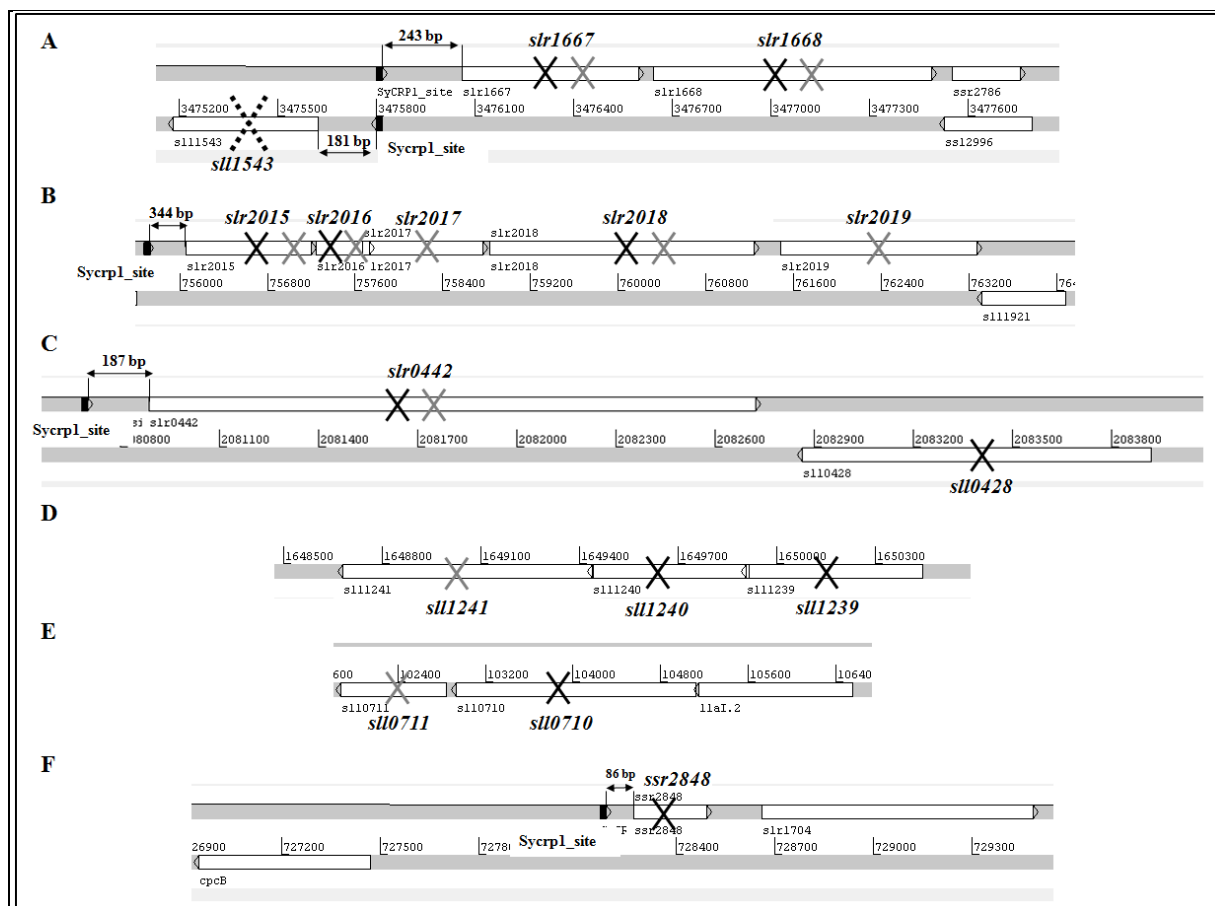
Die inversen Veränderungen der *pilA1*- und *spkA*-Transkriptniveaus stimmen interessanterweise mit der Beobachtung überein, dass die *pilA1*-Transkriptakkumulation in einer  $\Delta$ *spkA*-Mutante erhöht ist (Panichkin *et al.*, 2006). Demgegenüber waren die Transkriptmengen von *slr2015-slr2018* sowohl in  $\Delta$ *hfq* als auch in  $\Delta$ *spkA* vermindert. Demnach unterscheidet sich die SpkA-abhängige Kontrolle der Pilusbiogenese offenbar von der Hfq-abhängigen Regulation, wenngleich Schnittmengen in Bezug auf die regulierten Komponenten existieren. Die erhöhten *pilB1*-Transkriptmengen in  $\Delta$ *hfq* erscheinen angesichts des Phänotyps zunächst widersprüchlich, zumal PilB1 ein entscheidender Faktor für die Biogenese großer Pili ist (Yoshihara & Ikeuchi, 2004). Möglicherweise handelt es sich dabei ebenfalls um einen (kompensatorischen) Sekundäreffekt. Zudem würde die Expression der genannten Komponenten die (wenn auch eingeschränkte) Präsenz kleiner Pili auf der Zelloberfläche von  $\Delta$ *hfq* erklären.

#### 3.4 Eine Verbindung zwischen Hfq und dem cAMP-Regulon in *Synechocystis*

Neben den Loci *slr1667-slr1668* und *slr2015-slr2018* wurden im Rahmen der *Microarray*-Analysen auch weitere Gene aus dem Sycrp1-Regulon identifiziert, welche in  $\Delta$ *hfq* drastisch reduzierte Transkriptmengen zeigten (Übersicht in Abbildung 35). Yoshimura und Mitarbeiter (2002a) wiesen im Rahmen von vergleichenden *Microarray*-Analysen in einer *sycrp1*-Inaktivierungsmutante auch für *slr0442* reduzierte Transkriptmengen nach. Die abgeleitete Aminosäuresequenz dieses Gens enthält jedoch kein bekanntes Motiv (<http://pfam.sanger.ac.uk/>; [http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif\\_scan](http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan); am 08.03.2010) und lässt sich daher funktionell nicht einordnen. Sowohl in  $\Delta$ *hfq* als auch in  $\Delta$ *sycrp1* ist die Transkriptakkumulation von *slr0442* im Vergleich zum Wildtyp circa dreifach reduziert (Tabelle 1). Zudem wurde im Abstand von 187 bp stromaufwärts des Locus *slr0442* (relativ zum Translationsstartpunkt +1) eine putative Sycrp1-Bindungsstellen vorhergesagt (Omagari

### 3 DISKUSSION

*et al.*, 2008; Xu & Su, 2009) und experimentell verifiziert (Hedger *et al.*, 2009). Als interessanter Aspekt kommt hinzu, dass 144 bp stromabwärts von *slr0442* in dessen Gegenorientierung *sll0428* lokalisiert ist, dessen mRNA ebenfalls Hfq-abhängig akkumuliert.



**Abbildung 35: Gemeinsame Loci des Sycrp1- und des Hfq-Regulons.** Schematische Darstellung der chromosomalen Lokalisierungen von Genen mit Sycrp1- bzw. Hfq-abhängiger Transkriptakkumulation. In den Teilabbildungen (A-F) sind die unterschiedlichen chromosomalen Regionen betroffener Gene/Operone separat aufgeführt. Die numerische Skalierung kennzeichnet die Positionen innerhalb des Genoms von *Synechocystis*. Schwarze Kreuze: reduzierte Transkriptakkumulation in  $\Delta hfq$ ; graue Kreuze: reduzierte Transkriptakkumulation in  $\Delta sycrp1$  (Yoshimura *et al.*, 2002a). Das gestrichelte Kreuz bei *sll1543* verweist auf eine reduzierte Transkriptakkumulation in  $\Delta hfq$  ohne statistische Validierung (Tiling-array-Analyse). Hypothetische Sycrp1-Bindungsstellen nach (Omagari *et al.*, 2008; Xu & Su, 2009) sind schwarz markiert. Die Sycrp1-Bindungsstelle stromaufwärts des *slr2015-slr2018*-Locus wurde nur durch (Xu & Su, 2009) vorhergesagt. Die eingezeichneten Abstände (bp) entsprechen der Anzahl der Basenpaare, welche zwischen dem ersten und letzten Basenpaar des ORFs bzw. der Bindungsstelle liegen.

### 3 DISKUSSION

---

In Zusammenhang mit dem Sycrp1-Regulon wurde dieses Gen in der Literatur jedoch noch nicht erwähnt. Die mutmaßliche Ko-Regulation mit *slr0442* in  $\Delta hfq$  könnte demnach auch zufällig sein.

Überdies waren in  $\Delta hfq$  die Transkriptmengen des Genpaares *sll1239-sll1240*, welches zusammen mit *slr1241* ein putatives Operon bildet, um das zwei- bis dreifache reduziert. Die Transkriptakkumulation von *slr1241* zeigte sich auch in  $\Delta sycrp1$  in entsprechender Größenordnung beeinträchtigt (Yoshimura *et al.*, 2002a). Für diesen Locus wurde in den genannten Arbeiten jedoch keine Sycrp1-Bindungsstelle vorhergesagt bzw. experimentell sondiert. Daher könnte dieses Operon (ähnlich wie *slr2015-slr2019*) regulatorisch sekundär von den *sycrp1*-Inaktivierung betroffen sein. Für Hfq kommen in diesen Beispielen dagegen auch direkte post-transkriptionelle Kontrollmechanismen in Frage. Dafür spricht die scheinbar differenzielle Akkumulation der einzelnen Transkripte innerhalb des putativen Operons (s.o.). Anhand der abgeleiteten Aminosäuresequenzen lässt sich für keines der Gene des *sll1239-sll1241*-Operons eine funktionelle Vorhersage machen (<http://pfam.sanger.ac.uk/>; [http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif\\_scan](http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan); am 08.03.2010).

Ein ähnliches Beispiel findet sich in dem Genpaar *sll0710-sll0711*: In  $\Delta hfq$  zeigte sich eine etwa dreifache Reduktion des *sll0711*-Transkriptmenge, während die Expression von *sll0710* in ähnlicher Größenordnung in  $\Delta sycrp1$  betroffen war (Yoshimura *et al.*, 2002a). Während sich in dem putativen Sll0710-Genprodukt wiederum kein bekanntes funktionelles Motiv befindet, kodiert *sll0711* für eine mögliche Isopentenyl-Monophosphat-Kinase (<http://genome.kazusa.or.jp/cyanobase>; 08.03.2010). Auch diese Gene werden vermutlich nicht direkt durch Sycrp1 reguliert (Omagari *et al.*, 2008; Xu & Su, 2009).

In diesem Zusammenhang erwähnenswert sind auch die Loci *sll1543* und *ssr2848*, deren Transkriptakkumulation in  $\Delta hfq$  um den Faktor 6 bzw. 13 reduziert ist. Damit stellen sie nach *slr1667-slr1668* die am stärksten regulierten Gene dar. Für beide Gene wurde eine Sycrp1-Bindungsstelle vorhergesagt: für *sll1543* 181 bp und für *ssr2848* 86 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts (Omagari *et al.*, 2008; Xu & Su, 2009). *sll1543* teilt sich das erste Element mit *slr1667* und ist mit dem *slr1667-slr1668*-Operon (auch angesichts ähnlicher Fc-Werte; siehe Tabelle 1) offenbar ko-reguliert, wenngleich die Transkriptakkumulation von

### 3 DISKUSSION

---

*sll1543* in  $\Delta$ *sycrp1* nicht beeinträchtigt war (Yoshimura *et al.*, 2002a). Insofern könnten diese Daten darauf hinweisen, dass Hfq als zweite Kontrollinstanz an der Regulation von Genen des Sycrp1-Regulons beteiligt ist. *ssr2848* dagegen teilt sich die vorhergesagte Sycrp1-Bindungsstelle mit *cpcB* (*sll1577*), dem ersten Gen des *cpc*-Operons, welches Phycocyanine und *Linker*-Polypeptide der Phycobilisomen kodiert (Ughy & Ajlani, 2004). Komponenten dieses Operons tauchten jedoch weder in den *Microarray*-Analysen der  $\Delta$ *hfq*- noch der  $\Delta$ *sycrp1*-Mutante auf (Yoshimura *et al.*, 2002a). Auch *ssr2848* zeigte in  $\Delta$ *sycrp1* keine differenzielle Transkriptakkumulation.

Insgesamt decken diese Analysen einen interessanten Zusammenhang zwischen cAMP-vermittelter Signaltransduktion, der Biogenese großer Pili und Genregulation durch Hfq in *Synechocystis* auf. Der wichtige Einfluss von cAMP auf die Motilität wurde bereits mehrfach beschrieben (Bhaya *et al.*, 2006; Terauchi & Ohmori, 1999; Terauchi & Ohmori, 2004). So führte die genetische Inaktivierung der Adenylat-Cyclase Cya1 in *Synechocystis* zu einem apparenten Verlust der phototaktischen Motilität, welche durch die exogene Zugabe von cAMP wiederhergestellt werden konnte. Entsprechende Versuche zur Komplementierung der nicht-motilen  $\Delta$ *sycrp1*- (Bhaya *et al.*, 2006) und  $\Delta$ *hfq*-Mutanten (Abbildung 20) waren dagegen nicht erfolgreich.

Daher scheint es, dass Hfq innerhalb der cAMP-vermittelten Signaltransduktion entweder stromabwärts bzw. unabhängig von Sycrp1 regulatorisch wirkt. Versuche zur Komplementierung von  $\Delta$ *hfq* durch induzierte Überexpression von *sycrp1* zeigten entsprechend keinen Effekt (Abbildung 20). Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass Hfq z.B. aktivierend auf die Translation von *sycrp1* wirkt. Ein solcher Mechanismus müsste sich nicht zwangsläufig auf die Transkriptakkumulation auswirken. In diesem Fall wäre eine Überexpression von *sycrp1* in Abwesenheit von Hfq wahrscheinlich (wie beobachtet) physiologisch wirkungslos. Dagegen sprechen jedoch insbesondere die morphologischen Daten: Bei  $\Delta$ *sycrp1* wurde eine reduzierte Anzahl großer Pili sowie eine unveränderte Menge kleiner Pili auf der Zelloberfläche beobachtet, während die  $\Delta$ *hfq*-Mutante einen kompletten Verlust großer Pili sowie eine verminderte Anzahl kleiner Pili zeigte (Abbildung 10). In diesem Kontext ist es erwähnenswert, dass die lediglich

### 3 DISKUSSION

---

eingeschränkte Pilierung (in Bezug auf die großen Pili) von *Δsycrpl* (Yoshimura *et al.*, 2002b) gegenüber der berichteten essenziellen Rolle von *slr1667* und *slr1668* in der Biogenese großer Pili (Yoshihara & Ikeuchi, 2004) widersprüchlich erscheint.

Jedenfalls decken sich auch die Ergebnisse der *Microarray*-basierten Expressionsanalysen von *Δsycrpl* (Yoshimura *et al.*, 2002a) und *Δhfq* nur teilweise. Der Grund dafür könnte allerdings in unterschiedlichen Qualitäten der verwendeten *Microarrays* liegen (Järvinen *et al.*, 2004). Dafür würde sprechen, dass die Regulation desselben putativen Operons (*sll0710-sll0711*, *slr2015-slr2019*, *sll1239-sll1241*; siehe Abbildung 35) in den beiden Experimenten anhand unterschiedlicher Transkripte nachgewiesen wurde.

Die *slr2015*- und *slr2018*-mRNAs zeigten in *Δhfq* lediglich eine um 33 % bzw. 75 % reduzierte Akkumulation (im Northern Blot; Abbildung 15), während Yoshimura und Mitarbeiter (2002a) von einer komplett reprimierten *slr2015*-mRNA-Akkumulation berichteten. Angesichts dessen erfolgt die Hfq-abhängige Regulation dieser *pilA*-ähnlichen Gene möglicherweise auf einer anderen Ebene bzw. unter Mitwirkung weiterer (Sycrpl-abhängiger) Faktoren. Dafür spricht die Beobachtung, dass die *slr2017*- und *slr2019*-Transkript in den *Microarray*-Analysen als Komponente des putativen Polycistrons nicht auftauchte. Dies kann erneut auf die Qualität des *Microarrays* bzw. der *Microarray*-Sonden zurückzuführen sein; andererseits könnten Hfq-abhängige post-transkriptionelle Regulationsprozesse zu der differentiellen Transkriptabundanz - z.B. durch nukleolytische Prozessierung des Polycistrons (Homuth *et al.*, 1999; Sawers, 2006) - beitragen.

Zudem lassen sich mehr als die Hälfte der durch Hfq beeinflussten Gene nach aktuellem Kenntnisstand nicht in direkten oder indirekten Zusammenhang mit dem Sycrpl-Regulon bringen. Auch waren einige stark betroffene Gene, welche - wie etwa *ssr2848* - hypothetische Proteine mit unbekannter Funktion kodieren, trotz der vorhergesagten Sycrpl-Bindungsstelle nicht von der *sycrpl*-Inaktivierung betroffen (Yoshimura *et al.*, 2002a).

Es bleibt also die Frage, ob Hfq entweder epistatisch gegenüber cAMP-Sycrpl wirkt oder im Rahmen eines (z.B. durch weitere äußere Signale gesteuerten) post-transkriptionellen Feinregulierungs-Mechanismus einen Teil des Sycrpl-Regulons unabhängig bzw. ergänzend

---

### 3 DISKUSSION

---

kontrolliert. Ein interessanter Aspekt wurde in diesem Zusammenhang von Hedger und Mitarbeitern (2009) diskutiert. Die Autoren wiesen in ihrer Arbeit eine durch einen Licht-Dunkel-Wechsel induzierte cAMP-Sycrp1-abhängige Aktivierung der Transkription einiger Sycrp1-Zielgene nach. Dabei zeigte sich, dass sich die *slr0442*-Transkriptmenge infolge der Belichtung im Wildtyp nicht veränderte, während in einer  $\Delta$ *sycrp1*-Mutante (entsprechend den Beobachtungen von Yoshimura und Kollegen (2002a) eine Abnahme zu beobachten war. Mit dem Hinweis auf die relative Instabilität des 5'-Bereichs dieser mRNA wurde vorgeschlagen, dass das *steady-state*-Niveau der *slr0442*-mRNA auf eine simultane Transkriptionsaktivierung durch cAMP-Sycrp1 und post-transkriptioneller mRNA-Degradation zurückzuführen sein könnte. Bei solchen Prozessen könnte auch Hfq eine Rolle spielen. Eine potenziell stabilisierende Wirkung von Hfq auf das *slr0442*-Transkript würde deren reduzierte Akkumulation in  $\Delta$ *hfq* erklären. Ein entsprechender Mechanismus ist ebenso für das *slr1667-1668*-Operon denkbar, dessen Expression ebenfalls gleichermaßen von Hfq und Sycrp1 abhängt.

#### 3.5 Hpr1 und Hpr3 – zwei putative Hfq-abhängige sRNAs in *Synechocystis*

Angesichts der weithin konservierten Funktion homologer Hfq-Proteine in der sRNA-vermittelten Expressionskontrolle (Chao & Vogel, 2010; Valentin-Hansen *et al.*, 2004) sollten vergleichende *Tiling-array*-Analysen von Wildtyp und  $\Delta$ *hfq*-Mutante Aufschluss über die Existenz Hfq-abhängig akkumulierender sRNAs geben. Im Rahmen parallel durchgeführter Arbeiten mit demselben *Tiling-array* wurde die Expression zahlreicher neuer sRNAs und asRNAs in *Synechocystis* nachgewiesen (Georg *et al.*, 2009). Für diese Analysen wurde jedoch eine Mischung von Gesamt-RNA aus Wildtyp-Kulturen, welche zuvor unterschiedlichen Stressbedingungen ausgesetzt waren, verwendet. Diese Daten lassen entsprechend keine Rückschlüsse auf einen Zusammenhang zwischen cyanobakterieller Riboregulation und Hfq bzw. dessen oben diskutierten Regulon zu. Ein definiertes Ziel war es demnach, sRNA-Kandidaten zu identifizieren, welche ggf. in Abhängigkeit von Hfq an der post-transkriptionellen Kontrolle motilitäts-relevanter Gene beteiligt sind. Die Analyse ergab eine Reihe differenziell ausgeprägter Signale aus intergenischen Regionen, die in den meisten Fällen 3'- bzw. 5'-UTRs zugeordnet wurden. Letztlich blieben nach Anwendung der beschriebenen Ausschlusskriterien fünf Kandidaten für Hfq regulierte putative sRNAs (Hpr;



### 3 DISKUSSION

---

Tabelle 2) übrig. Drei dieser Kandidaten (Hpr1-3) wurden weiter analysiert. Dabei zeigte sich, dass es sich bei Hpr2 um einen hypothetischen, bisher in den Cyanobase- und NCBI-Datenbanken nicht annotierten ORF handelt, welcher bei logarithmischem Wachstum im Wildtyp auf hohem Niveau transkribiert wird und in  $\Delta hfq$  scheinbar komplett reprimiert ist (Abbildung 31). Homologe *hpr2*-Loci existieren in einigen Cyanobakterien-Stämmen (vor allem der Gattung *Cyanothece*). Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen zeigen ein hochkonserviertes, putatives Motiv im amino-terminalen Bereich, welches jedoch keine Übereinstimmungen in der Pfam-Datenbank findet (Stand: 08.03.2010). Zudem fanden BLAST-Analysen keine homologen Gene außerhalb der Cyanobakterien. Insofern handelt es sich bei Hpr2 um ein Cyanobakterien-spezifisches, hypothetisches Protein des Hfq-Regulons, dem möglicherweise eine bisher nicht berücksichtigte Funktion innerhalb der Pilus-Biogenese zukommen könnte. Da sich angesichts der Datenlage jedoch keine definitiven Vorhersagen machen lassen, kommen auch andere Funktionen in Frage.

Bei Hpr1 und Hpr3 handelt es sich dagegen nicht um putative protein-kodierende Sequenzen bzw. mRNAs. In beiden Fällen konnte zudem mithilfe von RACE- und Northern Blot-Analysen kleine Transkripte von 177 Nukleotiden (Hpr1) und 192 Nukleotiden (Hpr3) Länge nachgewiesen werden. Während die Akkumulation von Hpr1 in Abwesenheit von Hfq deutlich zunimmt (Abbildung 30), akkumuliert Hpr3 - ähnlich wie Hpr2 und die meisten der oben besprochenen mRNAs - in Abhängigkeit von Hfq.

Die Identifizierung von Hpr1 liefert einen neuen Aspekt hinsichtlich einer mutmaßlichen, Hfq-vermittelten Kontrolle von *sycrpl*, da der kodierende Bereich im Genom 191 bp stromaufwärts (in Gegenorientierung) von *sycrpl* (*sll1371*) lokalisiert ist (Abbildung 32). Insofern käme Hpr1 - insbesondere im Hinblick auf dessen hohe Abundanz in  $\Delta hfq$  - *per se* als post-transkriptioneller RNA-Regulator der *sycrpl*-Expression in Frage. Andererseits wurde ab 32 bp stromaufwärts von *hpr1* (und 143 bp stromaufwärts von *sll1371*) eine Sycrpl-Bindungsstelle vorhergesagt (Xu & Su, 2009). Dies weist einerseits auf eine Autoregulation der *sycrpl*-Expression durch das eigene Protein-Produkt hin. Zum anderen ist es dadurch unwahrscheinlich, dass Hpr1 eine asRNA der 5'-UTR von *sycrpl* ist, da *hpr1* jenseits dessen Promoters lokalisiert wäre. Eindeutige experimentelle Daten zu den Promoter-Elementen und

### 3 DISKUSSION

---

dem Transkriptionsstartpunkt von *sycrpl* liegen jedoch nicht vor. Da die Expression von Hpr1 im Wildtyp unter keiner der getesteten Bedingungen nachweisbar war, deutet sich in diesem Fall eine stringente Hfq-vermittelte Expressionskontrolle an.

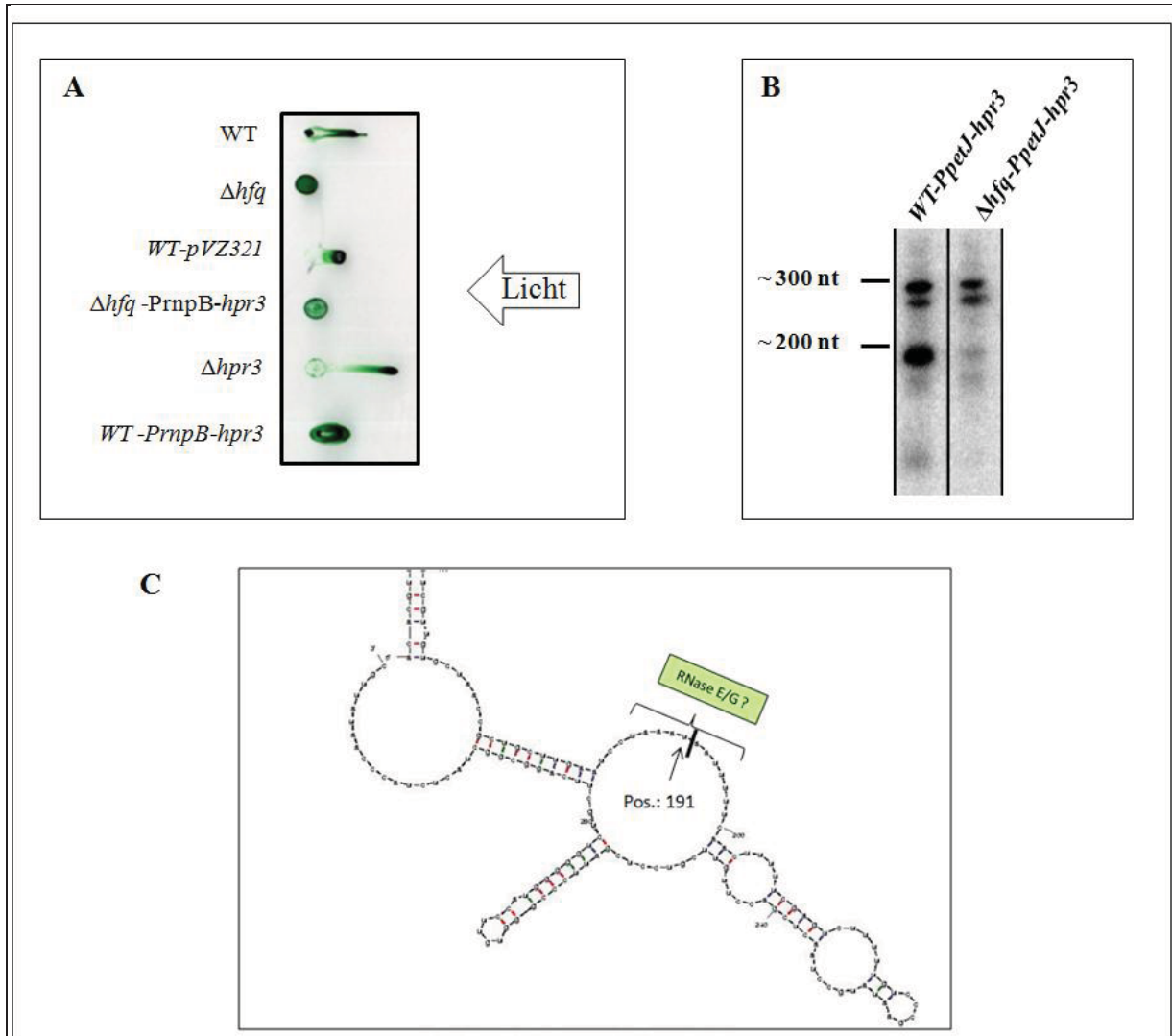
Die Akkumulation des Hpr3-Transkripts dagegen nahm unter definierten Stress-Bedingungen zu. Dies galt insbesondere für Salz- und Hitzestress (Abbildung 33). Eine Funktion lässt sich auf der Basis dieser Daten für Hpr3 jedoch nicht vorhersagen. Während der Fertigstellung der vorliegenden Arbeiten wurden im Rahmen einer Diplomarbeit Mutanten von *Synechocystis* hergestellt, welche Hpr3 unter der Kontrolle des Promoters *PpetJ* (vergleiche Abschnitt 2.1.2.6.2) bzw. *PrnpB* *in trans* überexprimieren. Daneben wurde eine  $\Delta$ *hpr3*-Deletionsmutante konstruiert, deren genomische Segregation bereits nachgewiesen werden konnte (nicht gezeigt). Für funktionelle Untersuchungen stehen diese Mutanten mittlerweile der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Annegret Wilde (Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie, Justus-Liebig-Universität Giessen) zur Verfügung. Die Phototaxis ist von der Modifikation des zellulären Hpr3-Gehalts offenbar nicht betroffen (Abbildung 36A). Aus dem Test geht entsprechend auch hervor, dass die  $\Delta$ *hfq*-Mutante hinsichtlich der Motilität nicht durch die Überexpression von Hpr3 komplementiert wird.

Erste Northern Blot-Untersuchungen der Hpr3-Überexpressoren zeigten ferner ein interessantes Hpr3-Bandenmuster, welches auf eine Hfq-vermittelte Prozessierung dieser RNA hinweisen könnte. Dazu ist anzumerken, dass in den Mutanten eine am 3'-Ende um die folgenden (genomischen) 120 nt verlängerte Hpr3-Variante exprimiert wird. Im Northern Blot zeigen sich neben der Bande unterhalb des 200-nt-Markers zwei weitere, schwächere Banden knapp unterhalb des 300 nt-Markers (Abbildung 36B). Diese Banden waren auch in den Spuren der 44 °C-Proben von Wildtyp und  $\Delta$ *hfq* schwach zu erkennen (Abbildung 33C). Die Überexpression von Hpr3 in  $\Delta$ *hfq* bringt lediglich diese zwei Banden hervor, nicht jedoch die ~200 nt-Bande, welche unter Hitzestress akkumuliert (Abbildung 36B). Die Vorhersage der Sekundärstruktur von Hpr3 zeigt, dass sich das per 3'-RACE ermittelte 3'-Ende inmitten einer potenziellen, AU-reichen RNaseE/G<sup>5</sup>-Erkennungssequenz befindet (Abbildung 36C).

---

<sup>5</sup> Slr1129 aus *Synechocystis* ist ein funktionelles Homolog zu sowohl RNase E als auch RNase G aus *E. coli* und wird daher als RNase E/G bezeichnet (Horie *et al.*, 2007).

### 3 DISKUSSION



**Abbildung 36: Vorläufige Analysen zu der putativen sRNA Hpr3.** (A) Phototaxis-Test verschiedener *hpr3*-Mutanten im Vergleich zu den Kontrollstämmen Wildtyp,  $\Delta hfq$  und *WT-pVZ321*. *WT-PrnpB-hpr3* und  $\Delta hfq$ -*PrnpB-hpr3* sind Hpr3-Überexpressoren unter Verwendung des konstitutiven Promoters *PrnpB* in einem modifizierten pVZ-Plasmid. (B) Northern Blot-Analyse von Hpr3 in Hpr3-Überexpressoren (mit *PpetJ*-Promoter in einem modifizierten pVZ-Plasmid) aus der Diplomarbeit von Nils Schürgers. Die Hpr3-Überexpression wurde in An- (*WT-PpetJ-hpr3*) und Abwesenheit ( $\Delta hfq$ -*PpetJ-hpr3*) getestet. (C) Ausschnitt aus der Hpr3-Sekundärstrukturvorhersage mit dem Programm *mfold* (Zuker, 2003). Die RNA wurde am ermittelten 3'-Ende um die folgenden 116 nt (der genomischen Sequenz) erweitert. Der schwarze Pfeil zeigt die letzte Base der längsten 3'-RACE-Sequenz an (Abbildung 32). Die Klammer zeigt eine potenzielle Erkennungssequenz für RNase E/G an.

### 3 DISKUSSION

---

Demnach ist es denkbar, dass Hpr3 als längeres Primärtranskript von ~300 nt synthetisiert und in Abhängigkeit von Hfq und RNase E/G zu der funktionellen/stabilen Version von 192 bp prozessiert wird. Ein ähnlicher Mechanismus ist aus *Vibrio cholerae* bekannt: Das Primärtranskript der sRNA MicX wird in Abhängigkeit von RNase E und Hfq zu der in Wildtyp-Zellen deutlich abundanteren, kurzen Form prozessiert, welche eine circa 10-fach höhere Stabilität aufweist (Davis & Waldor, 2007). Die exakte Funktion von Hfq bei diesem Mechanismus ist nicht aufgeklärt; möglicherweise fördert das Protein jedoch die Faltung des Primärtranskripts in eine Form, welche die RNase E-Erkennungssequenz für die Prozessierung freisetzt (vgl. auch: Modell zur Funktion von Hfq in der Polyadenylierung von mRNAs, Abschnitt 1.5.3.2 und Abbildung 3C; Mohanty *et al.*, 2004).

In Bezug auf Hpr3 könnten für einen solchen Mechanismus die Ergebnisse der Bindungsstudien mit Syn-Hfq sprechen, demnach Hpr3 und Syn-Hfq *in vitro* spezifisch miteinander interagieren (Abbildung 34). Die relativ geringe Affinität von Syn-Hfq zu Hpr3 könnte auf die am 5'-Ende um 64 nt verlängerte Hpr3-Variante zurückzuführen sein. Entsprechende EMSA-Analysen von kurzen und langen Hpr3-Varianten mit korrekten 5'-Enden (mit Bezug auf die 5'-RACE-Daten) sind in Vorbereitung. Zudem sollten weiterführende *in vitro*- und *in vivo*-Analysen - u.a. mithilfe der vorliegenden Mutanten - Aufschluss über den Einfluss von Hfq und RNase E/G auf die Prozessierung und Stabilisierung von Hpr3 geben. Interessanterweise lässt sich ein mit Hpr3 vergleichbares Hfq-abhängiges Bandenmuster auch in den Northern Blot-Daten von *slr2015* erkennen (siehe Abbildung 15). Demnach könnte Hfq in *Synechocystis* tatsächlich eine wesentliche Funktion in der Prozessierung einiger Primärtranskripte bzw. polycistronischer mRNAs zukommen.

Für die funktionelle Charakterisierung von Hpr3 stehen Expressionsanalysen der  $\Delta hpr3$ -Mutante sowie der Hpr3-Überexpressoren auf Transkriptom- und ggf. Proteomebene aus. Auf diese Weise sollen potenzielle Ziel-mRNAs von Hpr3 identifiziert und später hinsichtlich der Interaktionseigenschaften charakterisiert werden. Entsprechende Untersuchungen sind ebenso für Hpr1 in Planung.

---

## 3 DISKUSSION

---

### 3.6 Reguliert Hfq die spezifische Stress-Antwort?

Die Daten der Expressionsanalysen von Hpr3 wiesen ferner darauf hin, dass Hfq offenbar auch innerhalb der spezifischen, zellulären Stressantwort eine regulatorische Rolle spielt. Die *Microarray*-Analysen deuteten einen Einfluss von Hfq auf die Expression einiger Komponenten des Hitzestress-Regulons an. Die differenzielle Akkumulation der *groES1* (*slr2075*)- und *hspA* (*sll1514*)-Transkripte ließ sich experimentell jedoch nicht eindeutig verifizieren. Die mRNA des Chaperonins GroES1 war dabei unter Standard-Kultivierungsbedingungen allerdings auch im Wildtyp nicht durch Northern Blot-Analysen nachweisbar. Die im *Microarray*-Experiment detektierten Differenzen der *groES1*-Expression zwischen Wildtyp und Mutante hätten demnach - angesichts des insgesamt sehr niedrigen Expressionsniveaus - wahrscheinlich keine weiteren physiologischen Konsequenzen, zumal sich diese Unterschiede unter induzierenden Hitzestress-Bedingungen nicht zeigten (Abbildung 33). Die mRNA des kleinen Hitzeschock-Proteins *hspA* dagegen zeigte bei den Northern Blot-Experimenten im Wildtyp infolge einer Hitzestress-Behandlung eine zusätzliche Hybridisierungsbande, welche in  $\Delta hfq$  nur sehr schwach ausgeprägt war (Abbildung 16). Diese Bande könnte z.B. auf eine Hfq-abhängige Prozessierung zurückzuführen sein, deren Produkt ggf. die Unterschiede der *hspA*-Signale in der *Microarray*-Analyse begründen würde. So könnte die cDNA-Synthese mit der prozessierten mRNA als *Template* effektiver ablaufen als in Anwesenheit einer hoch-strukturierten 5'-UTR. Dabei ist anzumerken, dass *hspA* in *Synechocystis* u.a. post-transkriptionell durch ein RNA-Thermometer reguliert wird (siehe 1.5.1.1), dessen durch erhöhte Temperaturen induzierte Strukturänderung zur Freisetzung der Ribosomen-Bindungsstelle führt (Tagungsvortrag von Prof. Dr. Franz Narberhaus, Ruhr-Universität Bochum; „Regulatory RNA in prokaryotes“, 3.-6. Juni 2009, Berlin). Eine unterstützende Beteiligung von Hfq an diesem Prozess - ggf. in Verbindung mit einer anschließenden Degradation - ist vorstellbar.

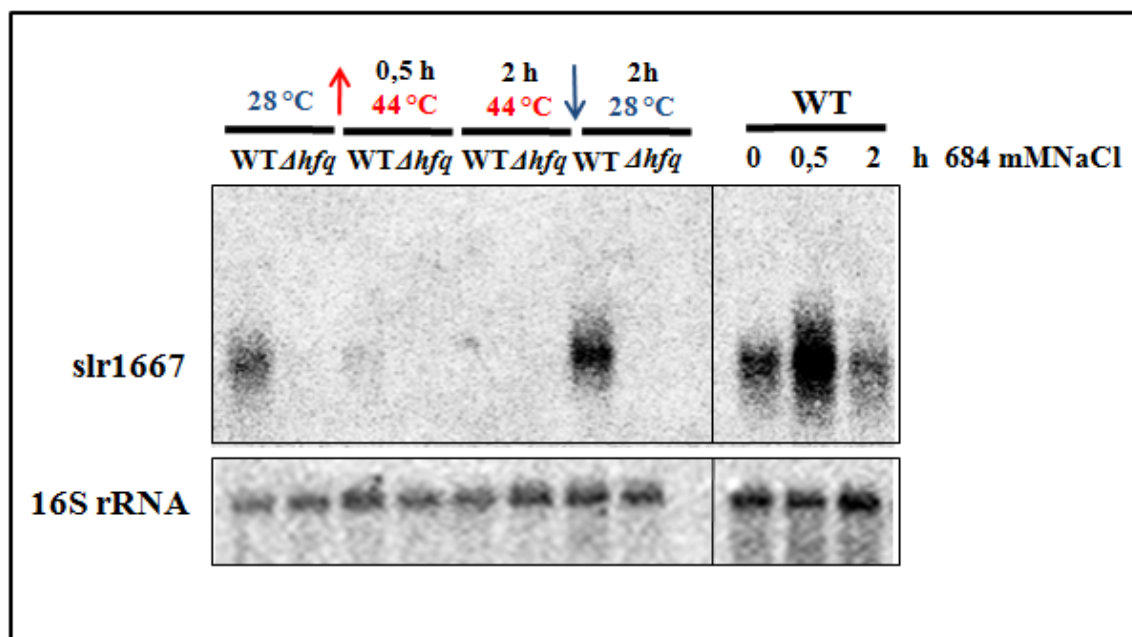
Umfassende, vergleichende Analysen von Wildtyp und  $\Delta hfq$ -Mutante unter den genannten Bedingungen würden neuen Aufschluss darüber geben, inwiefern Hfq z.B. an der Regulation der Expression bekannter stress-induzierter Gene beteiligt ist. Entsprechende *Microarray*-Experimente zur Untersuchung des Transkriptoms von  $\Delta hfq$  unter Hitzestress sind in Vorbereitung. Für einige Hfq-abhängig akkumulierende mRNAs zeigte sich bereits, dass

### 3 DISKUSSION

---

deren relative Menge im Wildtyp unter Hitzestress abnimmt und demnach ein inverses Verhalten gegenüber Hpr3 zeigt (in Abbildung 37 am Beispiel von *slr1667* dargestellt). Im Gegensatz zu den entsprechenden Mutanten von unterschiedlichen Proteobakterien (Chao & Vogel, 2010) zeigte die  $\Delta hfq$ -Mutante von *Synechocystis* jedoch keine signifikanten Beeinträchtigungen in der Stresstoleranz. Tatsächlich erschien  $\Delta hfq$  sogar etwas toleranter gegenüber gemäßigttem Hitzestress (bei 44 °C) als der Wildtyp (Abbildung 8). Erhöhte Thermotoleranz wurde auch in Inaktivierungsmutanten des Transkriptionsregulators HrcA (*heat-inducible transcription repressor, slr1670*) und der Histidin-Kinase Hik34 beobachtet (Nakamoto *et al.*, 2003; Suzuki *et al.*, 2005). In beiden Fällen war der Phänotyp jedoch deutlicher ausgeprägt und mit einer deregulierten Expression einiger Hitzeschockgene korreliert. Zudem wurde in diesen zwei Arbeiten die Sensitivität der Zellen gegenüber kurzzeitigen (maximal ein- bzw. dreistündige) Hitzebehandlungen bei 48 °C untersucht. Entsprechende Experimente zeigten in Vorversuchen der vorliegenden Arbeit keine Unterschiede zwischen Wildtyp und  $\Delta hfq$ . Daher ist es schwierig, eine direkte Verbindung zwischen Hfq und der Hitzeschock-Antwort in *Synechocystis* zu postulieren. Interessanterweise stellten Singh und Mitarbeiter (2006) auf der Basis von Expressionsanalysen einen Zusammenhang zwischen der Hitzeschock-Antwort und der Regulation einiger für die Motilität relevanter Gene (u.a. *pilA1*, *pilM* und *taxD1*) in *Synechocystis* her. Allerdings scheint eine Verbindung zu Hfq bzw. Sycr1 auch hier mangels Übereinstimmungen der regulierten Gene unwahrscheinlich. Insgesamt spielt Hfq in *Synechocystis* demnach eine scheinbar untergeordnete Rolle in der zellulären Antwort auf Hitzestress (und ebenso Salzstress).

### 3 DISKUSSION



**Abbildung 37: Einfluss von Hitze- und Salzstress auf die Transkriptakkumulation von *slr1667*.** Logarithmisch wachsende Flüssigkulturen wurden bei 42 °C (links) bzw. mit 684 mM NaCl (rechts) unter gleichen Lichtbedingungen inkubiert und in Proben zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet. Je ~5 µg der isolierten Gesamt-RNA wurden in einem 1,3 %igen, denaturierenden Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylon-Membran transferiert und mit einer strangspezifischen *slr1667*-RNA-Sonde hybridisiert. Die Hybridisierung mit einer 16S rRNA-spezifischen DNA-Sonde diente als Ladekontrolle. WT, Wildtyp.

#### 3.7 Struktur- und *in vitro*-Funktionsanalyse von Syn-Hfq

Ergänzend zu den beschriebenen phänotypischen Analysen der  $\Delta hfq$ -Mutante von *Synechocystis* wurden im Rahmen dieser Arbeit *in vitro*-Untersuchungen zu Struktur und Funktion des Syn-Hfq-Proteins durchgeführt. Hierbei stand die Frage im Vordergrund, inwieweit sich die schwache Sequenzkonservierung des Proteins (im Vergleich zu den Hfq-Varianten aus Proteobakterien) auf dessen übergeordnete Struktur sowie auf funktionelle Aspekte im RNA-Metabolismus auswirkt.

An dieser Stelle wird darauf hingewiesen, dass die in diesem Kapitel diskutierten Kristallstruktur-Analysen von Syn-Hfq etwa zeitgleich in den Arbeitsgruppen von Dr. Ditlev E. Brodersen und Dr. Poul Valentin-Hansen durchgeführt wurden und publiziert sind (Bøggild *et al.*, 2009). Strukturdaten und zentrale Schlussfolgerungen stimmen mit jenen der vorliegenden Arbeit überein. Zusätzliche Aspekte bzw. Experimente aus der Arbeit von Bøggild und Mitarbeitern (2009) werden entsprechend zitiert.

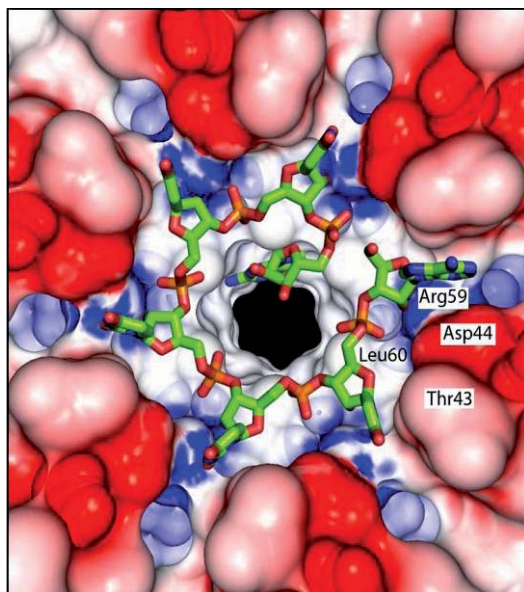
### 3 DISKUSSION

---

Die Kristallstruktur des Hfq-Proteins aus *Synechocystis* zeigte, dass diese Hfq-Version - entsprechend den orthologen Proteinen anderer Organismen - das typische Sm-Faltungsmotiv besitzt und zu einem ringförmigen Hexamer assembliert (Abbildung 22). Durch die insgesamt relativ negative Oberflächenladung der proximalen Seite des Hexamers (Abbildung 24) erscheint der Bereich um die Pore - trotz ansonsten struktureller Konservierung - zunächst wenig geeignet für die Bindung von RNA. Zudem spricht in Syn-Hfq die fehlende Konservierung der basischen und aromatischen Aminosäurereste (insbesondere der ansonsten hoch-konservierten [KHAI]-Sequenz im 'Sm2'-Motiv) der RNA-Bindungstasche von Sau-Hfq gegen einen vergleichbaren Mechanismus zur Bindung AU-reicher RNA-Sequenzen (Abbildung 23). Angesichts der Bindungseigenschaften wurde ferner die Möglichkeit diskutiert, dass einzelsträngige RNA die ebenfalls positiv geladene, zentrale Pore des Sau-Hfq- bzw. Eco-Hfq-Hexamers zur distalen Seite hin durchqueren könnte (Brennan & Link, 2007). Ein ähnlicher Mechanismus wurde auch für eukaryotische Sm-Proteine vorgeschlagen (Stark *et al.*, 2001; Urlaub *et al.*, 2001). Doch der Poreninnenraum von Syn-Hfq zeigt ein stark elektronegatives Potenzial und erscheint daher ebenfalls nicht prädestiniert für die Bindung von Nukleinsäuren. Brescia und Mitarbeiter (2003) berichteten, dass für die stabile Bindung physiologisch relevanter sRNAs (am Beispiel von DsrA aus *E. coli*) an Hfq nicht deren kurze (ca. 10-15 Nukleotide langen) AU-reichen Einzelstrangbereiche *per se* ausschlaggebend sind. Auf der Basis von *in vitro*-Bindungsstudien schlugen die Autoren ein Modell vor, demnach die Bindung der flankierenden Sekundärstrukturen an die periphere Oberfläche des Hfq-Hexamers die Interaktion der einzelsträngigen Region mit der RNA-Bindungstasche sterisch begünstigt. An diesem Mechanismus wären demnach wahrscheinlich die hoch-konservierten Aminosäurereste Arg16 und Phe39 (Eco-Hfq) bzw. Arg15 und Phe41 beteiligt (Brescia *et al.*, 2003). Auch diese Reste sind in Syn-Hfq nicht konserviert bzw. konservativ substituiert. Abbildung 38 zeigt das Modell eines Syn-Hfq-AU<sub>5</sub>-Komplexes, demnach innerhalb der strukturell konservierten AU-Bindungstasche dennoch die Bindung einzelsträngiger RNA möglich wäre.



### 3 DISKUSSION



**Abbildung 38: Modell der Interaktion des Syn-HfqHexamers mit einem AU<sub>5</sub>-Ribonukleotid.** Darstellung der elektrostatischen Oberflächenpotenziale von Syn-Hfq mit RNA im Stäbchenmodell. Interaktion basierend auf hypothetischen Wasserstoffbrücken-Bindungen unter Beteiligung der Reste Thr43, Arg59 und Asp44 (markiert). Das Modell wurde in der Arbeitsgruppe von Cheryl Kerfeld erstellt.

An dieser hypothetischen Interaktion sind die Reste Arg59 und Leu60 (in der Schleife zwischen  $\beta 4$  und  $\beta 5$ ; siehe Abbildung 23) sowie Thr43 und Asp44 (in der Schleife zwischen  $\beta 2$  und  $\beta 3$ ) mit insgesamt bis zu fünf Wasserstoffbrückenbindungen pro Monomer-Untereinheit beteiligt. Möglicherweise hat diese neuartige Zusammensetzung - auch aufgrund der fehlenden stabilisierenden Aminosäurereste aus dem 'Sm2'-Motiv von Sau-Hfq - Konsequenzen hinsichtlich der Affinität und/oder Spezifität für die RNA-Bindung.

Mithilfe der Bindungsstudien konnten *in vitro* keine spezifischen Interaktionen von Syn-Hfq (bei Proteinkonzentrationen von bis zu 2  $\mu\text{M}$ ) mit bekannten Hfq-bindenden sRNAs ( $\sim 5$  nM Endkonzentration) aus Enterobakterien nachgewiesen werden. Im Fall von MicA muss davon ausgegangen werden, dass es sich um unspezifische Bindungen handelte, da auch das Kontrollprotein bei entsprechender Konzentration eine Retardation von MicA hervorrief. Bøggild und Mitarbeiter (2009) führten entsprechende Experimente mit den sRNAs Spot42 und MicM (jeweils  $\sim 1$  nM Endkonzentration) aus *E. coli* durch und setzten dabei das Syn-Hfq-Hexamere in hohen Konzentrationen von bis zu 20  $\mu\text{M}$  ein. Dabei retardierten die RNAs im Gel bei Konzentrationen von mindestens 5  $\mu\text{M}$  (MicM) bzw. 10  $\mu\text{M}$  (Spot42). Die Autoren postulierten auf dieser Basis eine im Vergleich zu Eco-Hfq ca. 100-fach niedrige Affinität von Syn-Hfq zu diesen sRNAs. In dieser Arbeit wurden jedoch keine Experimente mit Negativ-Kontrollproteinen beschrieben.

### 3 DISKUSSION

---

Ferner wurde die Bindung von Syn-Hfq an die abundante und hoch-konservierte cyanobakterielle sRNA Yfr1 aus *Synechocystis* getestet. Yfr1 ist durch eine einzelsträngige, AU-reiche Region (5'-ACUCCUCACAC-3') gekennzeichnet, welche von zwei Stammschleifen flankiert wird (Voß *et al.*, 2007). Die EMSA-Bindungsanalysen konnten jedoch auch für diese RNA keine Bindung an Syn-Hfq nachweisen (Abbildung 26D). In Enterobakterien ist die Akkumulation einiger sRNAs abhängig von Hfq (Papenfert *et al.*, 2009; Urban & Vogel, 2007; Zhang *et al.*, 2003). Northern Blot-Analysen der Akkumulationen von Yfr1 und Yfr2a in *Synechocystis* zeigten dagegen, dass die *hfq*-Inaktivierung in diesen Fällen keinen Einfluss auf die Transkriptmengen hatte (Abbildung 27A-C). Zudem zeigte sich bei erfolglosen Versuchen Yfr1 genetisch zu inaktivieren, dass diese sRNA für das Überleben von *Synechocystis* essenziell ist (nicht gezeigt), während die  $\Delta hfq$ -Mutante einen milden, sehr speziellen Phänotyp zeigt. Des Weiteren kodieren einige Stämme wie z.B. *Prochlorococcus marinus* MED4, in welchen Yfr1 bioinformatisch und/oder experimentell nachgewiesen wurde (Axmann *et al.*, 2005; Voss *et al.*, 2007) kein Hfq-Protein. Zusammen sprechen diese Daten deutlich gegen eine Beteiligung von Hfq an potenziellen Yfr1-vermittelten post-transkriptionellen Regulationsmechanismen in *Synechocystis* und anderen Cyanobakterien.

Auch die durch die asRNA IsrR vermittelte Feinregulation der *isiA*-Transkriptakkumulation unter oxidativen Stressbedingungen war in  $\Delta hfq$  nicht betroffen (Abbildung 27D). Allerdings handelt es sich bei IsrR um eine vollständig zu dem interagierenden Bereich von *isiA* komplementäre asRNA. Für diese Art der RNA-RNA-Interaktion ist bisher kein Beispiel bekannt, welches Hfq erfordert. Insgesamt muss bemerkt werden, dass zwar ein großes Potenzial sRNA-vermittelter, post-transkriptioneller Regulation in *Synechocystis* und anderen Cyanobakterien existiert (Axmann *et al.*, 2005; Csiszàr *et al.*, 1987; Dühring *et al.*, 2006; Georg *et al.*, 2009; Hernández *et al.*, 2006; Steglich *et al.*, 2008; Voss *et al.*, 2007); abgesehen jedoch von einigen *cis*-kodierten asRNAs gibt es noch keine konkreten Hinweise auf die Funktionsmechanismen der bisher identifizierten, putativ regulatorischen RNAs in *Synechocystis*. Tatsächlich wurde auch im Rahmen der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten *Tiling-array*-Analysen für keine der bislang publizierten sRNA-Kandidaten eine differenzielle Akkumulation in  $\Delta hfq$  nachgewiesen. Dieser Aspekt ist insofern

### 3 DISKUSSION

---

interessant, als die von Georg und Mitarbeitern (2009) publizierten sRNAs und asRNAs mithilfe desselben *Tiling-arrays* experimentell identifiziert wurden. Dabei wurde jedoch Gesamt-RNA aus Kulturen eingesetzt, die unterschiedlichen Stressbedingungen ausgesetzt waren. Insofern ist dieser Datensatz mit den Daten aus der  $\Delta hfq$ -Analyse nicht vorbehaltlos vergleichbar.

Insgesamt weisen die Daten darauf hin, dass Hfq in *Synechocystis* offenbar eine von den proteobakteriellen Gegenstücken abweichende Funktion wahrnimmt. Die strukturellen Unterschiede liefern zusammen mit den vorgestellten *in vitro*- und *in vivo*-Befunden bisher keine Hinweise darauf, dass potenzielle sRNA-vermittelte Regulationsprozesse - jedenfalls nach den untersuchten enterobakteriellen Modellen - in *Synechocystis* im Zusammenspiel mit Hfq erfolgen. Der in dieser Arbeit unternommene Versuch, den physiologischen Phänotyp der  $\Delta hfq$ -Mutante durch die orthologe Variante aus *E. coli* genetisch zu komplementieren war ebenso erfolglos wie der umgekehrte Ansatz zur genetischen Komplementierung einer *Salmonella*-Mutante mit Hfq aus *Synechocystis*. Diese Beobachtungen werden durch funktionelle Analysen in der Arbeit von Bøggild und Mitarbeitern (2009) unterstützt. Demgegenüber stehen die Berichte, dass sich *hfq* in *E. coli* funktionell zumindest teilweise durch die näher verwandten homologen Gene aus *Pseudomonas* (Sonnleitner *et al.*, 2002), dem Archaeon *Methanococcus jannaschii* (Nielsen *et al.*, 2007) und *Listeria monocytogenes* (Nielsen *et al.*, 2009) substituieren lässt. Die Hfq-Proteine dieser Bakterien enthalten jedoch im Gegensatz zu Syn-Hfq die kritischen Aminosäuren für die (experimentell nachgewiesene) Bindung AU-reicher RNA-Sequenzen auf der proximalen Seite des Hexamers (Nielsen *et al.*, 2007; Nielsen *et al.*, 2009). Für das archaeale Hfq-Ortholog Mja-Hfq wurde die Konservierung der AU-Bindungstasche zudem anhand der Kristallstruktur des Proteins demonstriert. EMSA-Analysen von Mja-Hfq zeigten eine lediglich zwei- bis sechs-fach reduzierte Affinität zu sRNAs (u.a. MicA) aus *E. coli* (Nielsen *et al.*, 2007).

Für Syn-Hfq steht nun Hpr3 als Modell zur Verfügung, um die Sequenzspezifität des Proteins für RNA-Bindungen experimentell zu analysieren. Mithilfe von z.B. Nuklease-*Footprinting*-Analysen sowie durch zielgerichtete Basensubstitutionen innerhalb der RNA in Verbindung mit kompetitiven *in vitro*-Bindungsanalysen ließen sich die für die Interaktion kritischen

---

### 3 DISKUSSION

---

Bereiche sondieren (Brescia *et al.*, 2003). Umgekehrt wären (in Anlehnung an das AU<sub>5</sub>-Syn-Hfq-Modells; Abbildung 38) gezielte Austausch von Aminosäureresten im Sm- bzw. *nest*-Motiv von Syn-Hfq hilfreich, um *in vitro* deren jeweiligen Einfluss auf die Affinität zu der bindenden RNA zu überprüfen. Ergänzend ließe sich die funktionelle Relevanz zielgerichteter Mutagenesen von *hfq* *in vivo* anhand von Motilitätstests und Northern Blot-Analysen überprüfen. Die Ko-Kristallisation von Syn-Hfq mit einem RNA-Molekül wäre schließlich ein vielversprechender Ansatz, um den Bindungsmechanismus aufzuklären.

#### 3.8 Welche funktionelle Rolle spielt Hfq in *Synechocystis*?

Innerhalb unterschiedlicher phylogenetischer Gruppen von Bakterien lassen sich bereits abweichende Erfordernisse für Hfq in der Riboregulation beobachten. In den Gram-positiven Bakterien *Staphylococcus* und *Bacillus subtilis* wurden mehrere sRNAs mit vermuteten Funktionen für die Virulenz (Novick *et al.*, 1993; Pichon & Felden, 2005) bzw. der Sporulationskontrolle (Silvaggi *et al.*, 2006) identifiziert. Für die bisher dazu untersuchten sRNA konnte jedoch kein Einfluss des jeweiligen Hfq-Orthologs auf Funktion und *in vivo*-Stabilität nachgewiesen werden (Boisset *et al.*, 2007; Heidrich *et al.*, 2006; Jousselin *et al.*, 2009). Zudem zeigte eine *hfq*-Mutante von *Staphylococcus* im Rahmen umfangreicher Analysen keinen nachweisbaren Phänotyp (Bohn *et al.*, 2007). Dies ist angesichts der nachweislichen Bindung AU-reicher RNA-Sequenzen durch Sau-Hfq sowie der Konservierung der dafür relevanten Strukturmerkmale in Eco-Hfq bemerkenswert (Schumacher *et al.*, 2002).

Jousselin und Mitarbeiter (2009) diskutierten einen Zusammenhang zwischen der Beteiligung von Hfq an riboregulatorischen Prozessen und thermodynamischen Parametern der sRNA-mRNA-Interaktionen bzw. dem genomischen GC-Gehalt des betreffenden Organismus<sup>6</sup>. Interessanterweise ließ sich die thermodynamische Korrelation anhand einiger Beispiele belegen. Auch bei dem GC-Gehalt scheint angesichts einiger Beispiele tatsächlich eine Korrelation vorzuliegen: Je höher der GC-Gehalt (in der Regel > 50 %), desto ausgeprägter

---

<sup>6</sup> Bei hohen GC-Gehalten interagierender sRNAs und mRNAs wären demnach stabilere Sekundärstrukturen zu erwarten, deren Entfaltung die Aktivität eines RNA-Chaperons erfordert (Jousselin *et al.*, 2009).

### 3 DISKUSSION

---

der Einfluss von Hfq auf die Funktion von sRNAs. Allerdings hat das Genom von *Synechocystis* mit 47 % den gleichen GC-Gehalt wie die Genome von *Vibrio cholerae* sowie *Vibrio harveyi* (beide 47 %). In diesen Organismen spielt Hfq eine wichtige Rolle in der Funktion einiger sRNAs (Lenz *et al.*, 2004). Die Aminosäuresequenzen dieser Proteine (Reste 1-72; ohne den variablen Carboxy-Terminus) sind zu ~96 % (*Vibrio*) mit Hfq aus *E.coli* identisch, sodass auch insgesamt von einer strukturellen Konservierung des Proteins auszugehen ist. Auch für das Gram-positive Bakterium *Listeria monocytogenes* (GC-Gehalt: 37 %; siehe NCBI-Datenbank) existiert ein Beispiel für Hfq-abhängige sRNA-Regulation, wenngleich die Mehrzahl der in diesem Organismus bislang identifizierten sRNAs nicht auf Hfq angewiesen ist (Mandin *et al.*, 2007; Nielsen *et al.*, 2008; Toledo-Arana *et al.*, 2009). Doch auch hier liegt eine funktionelle (und wahrscheinlich strukturelle) Konservierung der kritischen Eigenschaften von Eco-Hfq vor (Nielsen *et al.*, 2009). Die an den jeweiligen Lebensstil angepassten Erfordernisse bestimmter (Hfq-abhängiger) sRNAs könnten schließlich zu einer unterschiedlichen Komplexität des Funktionsspektrums von Hfq geführt haben, zumal die Gene bekannter sRNAs nur in phylogenetisch eng verwandten Organismen konserviert sind (Livny *et al.*, 2008). So würde z.B. eine reduzierte bzw. erhöhte Anzahl interagierender RNAs nicht zwingend zu grundlegenden strukturellen und funktionellen Modifikationen von Hfq in einem Bakterium führen. Auf diese Weise ließe sich (in Anbetracht proteobakterieller  $\Delta hfq$ -Phänotypen) z.B. die Konservierung der AU-Bindungstasche in Hfq aus *Staphylococcus* im Kontext mit den ausbleibenden physiologischen Konsequenzen der *hfq*-Inaktivierung erklären (Bohn *et al.*, 2007; Schumacher *et al.*, 2002).

Für Sau-Hfq wurde zudem eine niedrige Affinität zu Poly(A)-Ribonukleotiden berichtet (Brennan & Link, 2007). Dies lässt sich wahrscheinlich auf die relativ unpolare Oberfläche und die schwache Konservierung des A-R-E-Motivs auf der distalen Seite des Hexamers zurückführen (siehe Abbildung 23 und Abbildung 24; Schumacher *et al.*, 2002). Für Syn-Hfq ließ sich in der vorliegenden Arbeit keine stabile Interaktion mit einem Poly(A)-Ribonukleotid nachweisen. Auch hier zeigt sich eine von Eco-Hfq stark abweichende Ladungsverteilung sowie schwache Konservierung des Bindungs-Motivs auf der distalen Seite des Hexamers (siehe auch Abbildung 1D und Abbildung 23). Das A-R-E-Motiv besitzt

### 3 DISKUSSION

---

eine Bindekapazität von bis zu 18 Nukleotiden mit der Spezifität für sechsfach repetitive Adenosin-Purin-Purin/Pyrimidin-Nukleotid- (A-R-N-) Triplets. Unter den insgesamt zehn daran beteiligten Aminosäureresten sind lediglich drei in *Synechocystis* konserviert: Leu28, Leu34 und Gly31 (in Eco-Hfq Leu26, Leu32 und Gly31 aus den purinnukleotid-spezifischen Bindungstaschen [*R-site*]). Diese Reste sind in cyanobakteriellen Hfq-Orthologen nicht invariabel, aber zu mindestens 60 % konserviert (siehe Abbildung 4B). Interessanterweise konnte anhand der Kristallstruktur von Syn-Hfq im distalen Bereich ein *nest*-Motiv vorhergesagt werden, an welchem neben Gly31 auch die Reste Thr30 und Asp32 beteiligt sind. Dieses Motiv bildet auf der distalen Seite des Hexamers eine fortlaufende Furche um die Pore (Abbildung 25B) und wäre angesichts der *nest*-typischen Affinität zu Anionen (Watson & Milner-White, 2002) für die Bindung von RNA geeignet (persönliche Kommunikation mit Cheryl Kerfeld). Die Affinität von Syn-Hfq zu Poly(A)-Sequenzen wurde unter Verwendung eines synthetischen A<sub>30</sub>-Ribonukleotids getestet. Selbst bei hohen Hfq-Konzentrationen von 3 µM konnten keine stabilen RNA-Hfq-Komplexe nachgewiesen werden (Abbildung 26C). Dagegen demonstrierten Mikulecky und Mitarbeiter (2004) für Eco-Hfq bereits im nanomolaren Konzentrationsbereich die Bindung eines A<sub>27</sub>-Ribonukleotids.

Die Spezifität für Poly(A)-Sequenzen steht in *E. coli* vermutlich im Zusammenhang mit der Rolle von Hfq in der PAP I-vermittelten Polyadenylierung, d.h. der Stabilitätskontrolle von mRNAs (siehe Abschnitt 1.5.3.2; Folichon *et al.*, 2003; Hajnsdorf & Régnier, 2000; Mohanty *et al.*, 2004). Zudem könnten an dasselbe Hfq-Hexamer simultan sRNA (proximal via AU-Einzeltrangeblich) und mRNA (distal via Poly(A)-Strang) binden und deren Interaktion dadurch unterstützt werden. Es ist in diesem Kontext zu beachten, dass in *Synechocystis* - im Unterschied zu *E. coli* - vorwiegend heterogene, 15-172 Nukleotide umfassende Polynukleotidsequenzen an den 3'-Termini von mRNAs nachgewiesen wurden (Rott *et al.*, 2003), deren Adenosin-Anteil jedoch mindestens 60 % betrug. Insofern ist es denkbar, dass - sofern in *Synechocystis* ähnliche Hfq-abhängige Mechanismen zur Kontrolle der mRNA-Stabilität vorherrschen wie in *E. coli* - Syn-Hfq eine andere Spezifität hinsichtlich 3'-terminaler Sequenzen besitzt. Andererseits ist es auch möglich, dass solche Prozesse in *Synechocystis* keine Hfq-Aktivität erfordern. Dafür könnten insbesondere zwei Erkenntnisse sprechen: Erstens fehlt dem cyanobakteriellen Ortholog der RNase E die carboxy-terminale

### 3 DISKUSSION

---

Domäne (Kaberdin *et al.*, 1998), welche in *E. coli* von essenzieller Bedeutung für die Assemblierung der Kernkomponenten des Degradosoms ist (siehe Abschnitt 1.5.3.1.). Zweitens existiert in *Synechocystis* kein PAP I-Homolog und die Synthese der poly(A)-reichen Schwänze wird wahrscheinlich exklusiv durch die PNPase katalysiert (Rott *et al.*, 2003). Die durch PAP I katalysierte Polyadenylierung von mRNAs wird in *E. coli* entscheidend durch Hfq stimuliert (Folichon *et al.*, 2003; Folichon *et al.*, 2005; Hajnsdorf & Régnier, 2000; Mohanty *et al.*, 2004). In einer *hfq*-Inaktivierungsmutante wurden deutlich kürzere Poly(A)-Schwänze beobachtet und die entsprechenden mRNAs zeigten eine erhöhte Stabilität. Zugleich zeigte sich in dieser Mutante ein Anstieg der Synthese heteropolymerer Schwänze an prozessierte 3'-Enden von mRNAs durch PNPase (Mohanty *et al.*, 2004). Angesichts der im Vergleich zu PAP I hohen Konservierung von PNPase in Prokaryoten und der strukturellen und funktionellen Ähnlichkeit zwischen PNPase und archaealer Exosomen, gilt dieses bifunktionelle Protein als die phylogenetisch ursprünglichere, weniger spezialisierte „polyadenylierende“ Enzym (Mohanty *et al.*, 2004; Rott *et al.*, 2003; Slomovic *et al.*, 2008). Insofern könnte sich die Relevanz von Hfq in der Stabilitätskontrolle von mRNAs erst zusammen mit der funktionellen Differenzierung von Nukleotidyltransferasen zu PAP-Enzymen entwickelt haben. Tatsächlich wurden mithilfe phylogenetischer Stammbaumanalysen in allen untersuchten  $\beta$ - und  $\gamma$ -Proteobakterien, denen die meisten Organismen mit drastischen  $\Delta hfq$ -Phänotypen angehören (Chao & Vogel, 2010), homologe Proteine mit putativer PAP-Aktivität gefunden (Bralley *et al.*, 2005). Die homologen Proteine aus den untersuchten Gram-positiven Bakterien (inklusive *Staphylococcus* und *Bacillus subtilis*) besitzen dagegen wahrscheinlich tRNA-Nukleotidyltransferase-Aktivität, für welche in  $\beta$ - und  $\gamma$ -Proteobakterien ein zweites Homolog zur Verfügung steht. Für die Gram-positiven Vertreter *Streptomyces coelicolor* und *Bacillus subtilis* existiert zudem experimentelle Evidenz, dass PNPase in diesen Organismen für die Synthese heteropolymerer poly(A)-reicher 3'-Schwänze verantwortlich ist (Campos-Guillén *et al.*, 2005; Sohlberg *et al.*, 2003). Dasselbe gilt für *Synechocystis*. Unklar ist, ob die homologen Proteine aus den untersuchten  $\alpha$ - und  $\epsilon$ -Proteobakterien (darunter *Helicobacter pylori* und *Campylobacter jejuni*, die jeweils kein Hfq-Homolog besitzen) PAP- oder tRNA-Nukleotidyltransferase-Aktivität zugeordnet werden kann (Bralley *et al.*, 2005).

### 3 DISKUSSION

---

Um zu klären, mit welchen RNA-Molekülen Hfq *in vivo* interagiert, bedarf es weiterführender Untersuchungen, für die mittlerweile hoch-effiziente Verfahren zur Verfügung stehen. Durch RNA-Ko-Immunoprecipitation (Ko-IP, mit einem „getaggen“ Hfq-Protein) in Verbindung mit der Hochdurchsatz-Pyrosequenzierertechnik (Tiefensequenzierung, *deep sequencing*) konnten in *Salmonella* zahlreiche mit Hfq interagierende mRNAs und neue sRNAs identifiziert werden (Sittka *et al.*, 2009). Ein Vorteil dieser hochauflösenden Sequenziermethode gegenüber *Microarrays* ist die Tatsache, dass kleine RNA-Moleküle in voller Länge mit den exakten 5'- und 3'-Enden identifiziert werden können. Auf diese Weise lassen sich darüber hinaus präzise Prozessierungsorte von Hfq-bindenden RNA-Molekülen bestimmen (Sharma & Vogel, 2009). Ein entsprechendes, einleitendes Sequenzierungs-Experiment wurde in Kooperation mit Cynthia Sharma (MPI für Infektionsbiologie, Berlin) auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt. Die RNA wurde durch Ko-IP mit einem funktionellen<sup>7</sup>, rekombinant in  $\Delta hfq$  exprimierten Flag-Syn-Hfq-Fusionsprotein (vergleiche 3X FLAG Peptide, Sigma-Aldrich) aus *Synechocystis* gewonnen und im Vergleich zu entsprechend isolierter RNA aus einer Wildtyp-Kultur per 454-Sequenzierung (*Genome Sequencer FLX System*, Roche, Mannheim) analysiert. Da die generierten Daten bisher weder eindeutig experimentell verifiziert wurden, noch (mangels biologischer und technischer Replikate) statistisch auswertbar sind, wurden sie in dieser Arbeit nicht näher dargestellt. Aus dem Vergleich von ~48.000 (Wildtyp-Kontrolle) bzw. ~58.000 (Flag-Syn-Hfq-KoIP) generierten *reads* (d.h. kurzen Sequenzabschnitten von 18-300 nt Länge) ließ sich lediglich für einige zellulär hoch-abundante RNA-Moleküle (tRNAs, rRNAs, RnpB) sowie für wenige einzelne mRNAs (z.B. *slr0376*, 20-fach; *slr1042*, 12-fach) eine deutliche Anreicherung in der Ko-IP-Probe ableiten. Allerdings ließen sich diese Daten mithilfe von Northern Blot- bzw. Slot Blot-Analysen nicht validieren. Zudem wurden bereits von anderen Autoren unspezifische Anreicherungen ribosomaler RNAs in Immunoprecipitations-Experimenten mit eukaryotischen RNA-bindenden Proteinen (u.a. auch mit dem hier verwendeten Flag-System) beobachtet (de Planell-Saguer *et al.*, 2009). Zur Überprüfung der 454-Sequenzierungsdaten sind bereits Wiederholungsexperimente - u.a. mit einer alternativen Flag-Syn-Hfq-Variante -

---

<sup>7</sup> Mehrfach wiederholte Phototaxis-Tests zeigten, dass die Expression des Flag-Syn-Hfq-Fusionsproteins *in trans* die phototaktische Motilität von  $\Delta hfq$  wiederherstellen konnte.



### 3 DISKUSSION

---

in Planung. Der Nachweis von Flag-Syn-Hfq-spezifischen Anreicherungen soll dabei mithilfe von weiterentwickelten *Microarray*-Analysen erfolgen. Ein *Microarray*, welcher neben den Transkripten von in der Cyanobase-Datenbank annotierten Genen auch sämtliche bisher identifizierte sRNAs-Kandidaten aus *Synechocystis* sondiert, steht bereits zur Verfügung (persönliche Mitteilung von Jens Georg, Institut für Biologie III, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg). Die vorläufigen Daten aus dem 454-Sequenzierungsexperiment, welche ferner auf eine allenfalls sehr niedrige Affinität von Syn-Hfq zu RNA hinweisen, liefern indes weitere Anhaltspunkte für die Idee, dass Hfq in *Synechocystis* (und ggf. anderen Cyanobakterien) ein von den proteobakteriellen Orthologen abweichendes bzw. ein generell neuartiges Wirkspektrum zeigt. Interessanterweise zeigten Le Derout und Mitarbeiter (2010) kürzlich am Beispiel einiger mRNAs, dass deren Hfq-abhängige Akkumulation in *E. coli* nicht auf posttranskriptioneller Regulation, sondern auf Hfq-vermittelter Aktivierung der Transkription basiert. Die Autoren diskutieren, dass Hfq etwa die Entfaltung attenuierender 5'-Bereiche von einigen naszierenden mRNAs unterstützen könnte. Es ist daher denkbar, dass Hfq in *Synechocystis* – z.B. als sekundäre Kontrollinstanz des Sycrpl-Regulons - auf eine solche Funktion spezialisiert ist und seine Ziel-RNAs (d.h. in diesem Beispiel nicht-kodierende Bereiche von mRNAs) nur transient, d.h. zeitlich vor dem Beginn der Transkription des kodierenden Bereichs, bindet. Demnach würden RNA-Hfq-KoIP-Experimente vermutlich zu keiner deutlichen Anreicherung kodierender Bereiche von mRNAs (und ggf. entsprechend regulierten sRNAs) führen. Angesichts dieser Hypothese bieten sich für zukünftige Untersuchungen - in Anlehnung an die von Le Derout und Mitarbeitern (2010) publizierten Experimente - neben gerichteten *in vitro*-Bindungsstudien zudem *in vivo*-Analysen der Transkriptionsaktivität Hfq-abhängig regulierter Gene durch Reporter-gen-Fusionen mit deren 5'-Bereichen an.

### 4 Material und Methoden

#### 4.1 Material

In diesem Kapitel werden die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Geräte und Reagenzien beschrieben. Nicht aufgeführt sind allgemeine Labor- und Verbrauchsmaterialien, wie z.B. Glas- und Reaktionsgefäße, Petrischalen, Parafilm.

##### 4.1.1 Chemikalien

Die zur Durchführung der praktischen Arbeiten im Labor verwendeten Lösungsmittel und Feinchemikalien sowie deren Bezugsquellen sind in Tabelle 4 aufgeführt

**Tabelle 4: Chemikalien und fertige Gebrauchslösungen**

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
2-Propanol (100 %ig)	Roth, Karlsruhe
3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure (MOPS)	Roth, Karlsruhe
5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (X-Gal)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Acrylamid (AA)	Roth, Karlsruhe
Adenosin-3',5'-monophosphat (cAMP)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Ammoniumacetat	Roth, Karlsruhe
Ammoniumeisen(III)-citrat	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Ampicillin (Na-Salz)	Roth, Karlsruhe
Bacto-Agar	Difco, Detroit, USA
Bisacrylamid (BisAA)	Serva, Heidelberg
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
Chloramphenicol	Boehringer, Mannheim
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Coomassie brilliant blue R-250	Serva, Heidelberg
Deoxycholat (DOC)	Roth, Karlsruhe
D-Glukose	Roth, Karlsruhe
di-Kaliumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe

## 4 MATERIAL UND METHODEN

---

Dimethylfuran (DMF)	Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
Dinatriumcarbonat	Roth, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe
D-Saccharose	Roth, Karlsruhe
Essigsäure (100 %ig, p.a.)	Roth, Karlsruhe
Ethanol (96 %ig, p.a.)	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Formaldehyd (37 %ig)	Roth, Karlsruhe
Formamid (deionisiert $\geq 99,5$ %ig)	Roth, Karlsruhe
Glycerol	Roth, Karlsruhe
Glykogen ( <i>molecular biology grade</i> )	MBI Fermentas, St. Leon Roth
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
Hefe-tRNA (10 mg ml <sup>-1</sup> )	Ambion, Austin, TX, USA
Hydroxyethylpiperazinesulfonsäure (HEPES)	Roth, Karlsruhe
Isopropyl-thio- $\beta$ -D-Galaktopyranosid (IPTG)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Kaliumacetat	Roth, Karlsruhe
Kalziumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kanamycin (Sulfat-Salz)	Roth, Karlsruhe
Kobalt(II)-nitrat (Hexahydrat)	Roth, Karlsruhe
Kupfersulfat (Pentahydrat)	Roth, Karlsruhe
LB-Agar (Lennox)	Roth, Karlsruhe
LB-Medium (Lennox)	Roth, Karlsruhe
LE Agarose	Biozym, Hess. Oldendorf
Magnesiumchlorid (Hexahydrat)	Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat (Heptahydrat)	Roth, Karlsruhe
Manganchlorid	Roth, Karlsruhe
Methanol (99 %ig, p.a.)	Roth, Karlsruhe
Methylviologen (MV)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
N,N,N,N-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Na-Ethyldiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe

## 4 MATERIAL UND METHODEN

---

Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
Natriummolybdat	Roth, Karlsruhe
Natriumnitrat	Roth, Karlsruhe
Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
N-Tris-(hydroxymethyl)-methyl-glycin (Tricine)	Roth, Karlsruhe
Phenol (Roti-Phenol)	Roth, Karlsruhe
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)	Roth, Karlsruhe
Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure) (PIPES)	Roth, Karlsruhe
Ponceau S	Roth, Karlsruhe
Roti-Blot A Anodenpuffer	Roth, Karlsruhe
Roti-Blot K Kathodenpuffer	Roth, Karlsruhe
Rotiphorese 10x TBE (Tris-Borat-EDTA)-Puffer	Roth, Karlsruhe
Rotiphorese Gel 40 (19:1) Acrylamid/Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Rotiphorese Gel 40 (29:1) Acrylamid/Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Salzsäure	Roth, Karlsruhe
Sulfosalicylsäure	Merck, Darmstadt
Trichloressigsäure (TCA)	Roth, Karlsruhe
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)-aminomethansulfonsäure	Roth, Karlsruhe
Trizol-Reagenz	Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, USA
Tween20	Roth, Karlsruhe
Xylencyanol	Roth, Karlsruhe
Zinksulfat (Heptahydrat)	Roth, Karlsruhe
Zitronensäure	Roth, Karlsruhe

## 4 MATERIAL UND METHODEN

---

### Radiochemikalien

Radiochemikalien wurden von Amersham Bioscience (Freiburg) oder Hartmann Analytic GmbH (Braunschweig) bezogen. Folgende Radionukleotide kamen in dieser Arbeit zum Einsatz:

[ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-dCTP, spezifische Aktivität: 6000 Ci/mmol

[ $\gamma^{32}\text{P}$ ]-ATP, spezifische Aktivität: 6000 Ci/mmol

[ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-UTP, spezifische Aktivität: 6000 Ci/mmol

### 4.1.2 Größenstandards

Die für die Elektrophorese bzw. Größenausschlusschromatographie eingesetzten Größenstandards sind in Tabelle 5 aufgeführt.

**Tabelle 5: Größenstandards für Elektrophorese und Größenausschlusschromatographie**

<b>Standard</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Proteinstandards</b>	
<i>Gel Filtration Standard</i>	Biorad, München
<i>PageRuler Prestained Protein Ladder</i>	MBI Fermentas, St. Leon Roth
<b>DNA-Standards</b>	
<i>GeneRuler 50bp DNA Ladder</i>	MBI Fermentas, St. Leon Roth
<i>GeneRuler 100bp DNA Ladder</i>	MBI Fermentas, St. Leon Roth
$\lambda$ -DNA/PstI	MBI Fermentas, St. Leon Roth
<b>RNA-Standards</b>	
<i>RiboRuler Low Range RNA Ladder</i>	MBI Fermentas, St. Leon Roth
<i>RiboRuler High Range RNA Ladder</i>	MBI Fermentas, St. Leon Roth

## 4 MATERIAL UND METHODEN

### 4.1.3 Antikörper

Für Immunoblots wurden die in Tabelle 6 aufgeführten Antikörper verwendet.

Tabelle 6: Verwendete Antikörper

Antikörper	Eigenschaften	Verd.	Hersteller
Anti-Hfq	Kaninchen IgG, Primärantikörper, gerichtet gegen das Hfq-Protein aus <i>Synechocystis</i>	1:5000	Elena Puerta-Fernández, Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, Universidad de Sevilla
anti-Kaninchen; Alkalische Phosphatase-Konjugat	Ziege IgG, Sekundärantikörper gerichtet gegen invariable Ketten von Kaninchen IgG, konjugiert mit Alkalischer Phosphatase (AP)	1:25000	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

### 4.1.4 Plasmide

In Tabelle 7 sind alle Plasmide aufgeführt, auf welchen die in dieser Arbeit hergestellten Konstrukte basieren. Die im Rahmen dieser Arbeit konstruierten Plasmide sind in den Abschnitten 4.2.2.16 bis 4.2.2.19 beschrieben.

Tabelle 7: Verwendete Plasmide

Vektor	Beschreibung	Referenz
pDrive	TA-Klonierungsvektor; Amp <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> ; Größe: 3851 bp	Qiagen, Hilden
pGEM-T	TA-Klonierungsvektor; Amp <sup>r</sup> ; Größe: 3003 bp	Promega, Mannheim
pGEX-6P-1	Expressionsvektor für Proteine mit amino-terminalen GST-tag; Amp <sup>r</sup> ; Größe: 4984 bp	GE Healthcare, Waukesha, USA
pSK9	Zur 5'-terminalen <i>PpetJ</i> -Promotorfusion ; Größe: 6267 bp	
pVZ321	Mobilisierbarer <i>shuttle</i> -Vektor zur homologen Proteinexpression in <i>Synechocystis</i> ; IncQ, <i>mob</i> <sup>+</sup> , Km <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup> ; Größe: 9601 bp	Zinchenko <i>et al.</i> (1999)
RP4	Helferplasmid für konjugativen Transfer von pVZ321-Derivaten in <i>Synechocystis</i> ; Amp <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup> ; Größe: 56400 bp	Haase <i>et al.</i> (1995)

## 4 MATERIAL UND METHODEN

---

### 4.1.5 Enzyme

In Tabelle 8 sind die in dieser Arbeit genutzten Enzyme und Reaktions-Kits aufgelistet. Die verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden ausschließlich von MBI Fermentas (St. Leon Roth) bezogen und sind nicht im Einzelnen aufgeführt. Alle Enzyme wurden nach Angaben des Herstellers unter Einsatz des jeweils mitgelieferten Reaktionspuffers verwendet.

**Tabelle 8: Verwendete Enzyme und Reaktions-Kits**

<b>Enzym</b>	<b>Hersteller</b>
<i>AmpliScribeT7-Flash Transcription Kit</i>	Epicentre Biotechnologies, Madison, WI, USA
CIAP ( <i>calf intestine alkaline phosphatase</i> )	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>DNA-free DNase Treatment &amp; Removal Reagents</i>	Ambion, Austin, TX, USA
<i>DreamTaq</i> DNA-Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>HexaLabel/DecaLabel DNA Labeling Kit</i>	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Lysozym	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>PCR Cloning Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>pGEM-T Vector System</i>	Promega, Mannheim
<i>Phusion High Fidelity</i> DNA-Polymerase	New England Biolabs, Schwalbach
<i>PreScission</i> Protease	GE Healthcare, Waukesha, USA
<i>RiboLock RNase inhibitor</i>	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Proteinase K	MBI Fermentas (St. Leon Roth)
RNase A	AppliChem GmbH, Darmstadt
T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
T4-Polynukleotid-Kinase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
T4-RNA-Ligase	Epicentre Biotechnologies, Madison, WI, USA
<i>Thermoscript Reverse Transcriptase Kit</i>	Invitrogen, Life Technologies,
<i>Tobacco acid pyrophosphatase</i>	Epicentre Biotechnologies, Madison, WI, USA

### 4.1.6 Synthetische Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden in lyophilisiertem Zustand von den Herstellern Sigma-Aldrich (Steinheim), Eurogentec Deutschland GmbH (Köln) und Eurofins MWG Operon (Ebersberg) bezogen. Für die Herstellung der Stammlösungen (Konzentration: 100  $\mu\text{M}$ ) wurde die DNA nach Angaben des Herstellers in MQ- $\text{H}_2\text{O}$  gelöst. Besondere Merkmale der Oligonukleotide sind in Tabelle 9 und Tabelle 10 hervorgehoben.



**Tabelle 9: Synthetische Oligonukleotide (DNA/ Primer)**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz (5'...-3')</b>	<b>Verwendungszweck</b>	<b>Markierter Bereich</b>
isiA-fw	CTGGGGCTTTGTTTCATACC	PCR/ dsDNA-Sonde	
isiA-rev	TAAAATTCTGGCGGATAGGC	PCR/ dsDNA-Sonde	
pilA1-fw	CGGTGTATTGGCTGCTATTG	PCR/ dsDNA-Sonde	
pilA1-rev	TTCAGCACCACCACAATCAT	PCR/ dsDNA-Sonde	
16S-fw	AAGTCATCATGCCCCCTTAC	PCR/ dsDNA-Sonde	
16S-rev	ATGGGATTCGCTTACTCTC	PCR/ dsDNA-Sonde	
Yfr1-as	TGTGAGGAGTGAACGGAAACTTACG	Oligonukleotid-Sonde	
Yfr2a-as	TGCTTCCTTATTAATCTTACTCCTC	Oligonukleotid-Sonde	
PCC6803-r5S-rev	GCATCGGACTATTGTGCCGTG	Oligonukleotid-Sonde (5S rRNA)	
slr1667-T7	<u>TAATACGACTCACTATAGGGGGTATGTCAGCCGATGGAGT</u>	<i>in vitro</i> -Transkription/ RNA-Sonde	<u>Unterstrichen:</u> T7-Promoter
slr1667-fw	CCCTAGTCGGTTTTGGCTCT	<i>in vitro</i> -Transkription/ RNA-Sonde	
slr1668-T7	<u>TAATACGACTCACTATAGGGGGCACTTGTTTCGGCAATAAT</u>	<i>in vitro</i> -Transkription/ RNA-Sonde	<u>Unterstrichen:</u> T7-Promoter
slr1668-fw	GTCTGCCCTACCTGCTCTTG	<i>in vitro</i> -Transkription/ RNA-Sonde	
slr2015-T7	<u>TAATACGACTCACTATAGGGACGCCGTTATTGCATTTTTTC</u>	<i>in vitro</i> -Transkription/ RNA-Sonde	<u>Unterstrichen:</u> T7-Promoter
slr2015-fw	CTAGCGACCGATACCACCAT	<i>in vitro</i> -Transkription/ RNA-Sonde	
slr2018-T7	<u>TAATACGACTCACTATAGGGTCAGAGGAGCGGCATTATCT</u>	<i>in vitro</i> -Transkription/ RNA-Sonde	<u>Unterstrichen:</u> T7-Promoter
slr2018-fw	CTTGCGCTGGAACCTTCTAC	<i>in vitro</i> -Transkription/ RNA-Sonde	
slr1764-T7	<u>TAATACGACTCACTATAGGGGGCAATTCGTTAATGTCG</u>	<i>in vitro</i> -Transkription/ RNA-Sonde	<u>Unterstrichen:</u> T7-Promoter
slr1764-fw	TCAGTCTCTTCCCTTACTAAACCA	<i>in vitro</i> -Transkription/ RNA-Sonde	
ssr2848-T7	<u>TAATACGACTCACTATAGGGATCGATAGGCGACGGACATA</u>	<i>in vitro</i> -Transkription/ RNA-Sonde	<u>Unterstrichen:</u> T7-Promoter
ssr2848-fw	GCCCTCAAGCGGAAAATTAC	<i>in vitro</i> -Transkription/ RNA-Sonde	
spka-T7	<u>TAATACGACTCACTATAGGGAGCTTTGATTTCCGCTTCAATGG</u>	<i>in vitro</i> -Transkription/ RNA-Sonde	<u>Unterstrichen:</u> T7-Promoter

spka-fw	CAGCAGAGGAGTCGAAAACC	<i>in vitro</i> -Transkription/ RNA-Sonde	
pilB1-T7	<u>TAATACGACTCACTATAGGGCAAATCCGCAAACAAACC</u>	<i>in vitro</i> -Transkription/ RNA-Sonde	<u>Unterstrichen:</u> T7-Promoter
pilB1-fw	GGCTCCATCGACATGAATCTGG	<i>in vitro</i> -Transkription/ RNA-Sonde	
hspA-T7	<u>TAATACGACTCACTATAGGGTGTGTTTTGGATTGCTCCAG</u>	<i>in vitro</i> -Transkription/ RNA-Sonde	<u>Unterstrichen:</u> T7-Promoter
hspA-fw	TTCCAGCAGCAGATGAACC	<i>in vitro</i> -Transkription/ RNA-Sonde	
T7-sycrp1-rev	<u>TAATACGACTCACTATAGGGGTTAGGCAACGGGTGACAGT</u>	<i>in vitro</i> -Transkription/ RNA-Sonde	<u>Unterstrichen:</u> T7-Promoter
sycrp1-fw	ATGTGGATGGTCGGGAAGTA	<i>in vitro</i> -Transkription/ RNA-Sonde	
T7-groEs-rev	<u>TAATACGACTCACTATAGGGGCCGGCATACTTGGAATAGA</u>	<i>in vitro</i> -Transkription/ RNA-Sonde	<u>Unterstrichen:</u> T7-Promoter
groES-fw	GCCAAAGAAAAACCCCAAAT	<i>in vitro</i> -Transkription/ RNA-Sonde	
T7-Hpr1-2	<u>TAATACGACTCACTATAGGGAGCTTGGAACCCACAGGCTATTG</u>	<i>in vitro</i> -Transkription/ RNA-Sonde	<u>Unterstrichen:</u> T7-Promoter
Hpr1-fw	GGTTGTGCCCCACTCCAGAG	<i>in vitro</i> -Transkription/ RNA-Sonde	
T7-Hpr3	<u>TAATACGACTCACTATAGGGGCACAACGAAGGCTTGCCGA</u>	<i>in vitro</i> -Transkription/ RNA-Sonde	<u>Unterstrichen:</u> T7-Promoter
Hpr3 – fw	TTCAGTGCCCTGTGAGTTCTCCC	<i>in vitro</i> -Transkription/ RNA-Sonde	
T7-Hpr2	<u>TAATACGACTCACTATAGGGCCGTCTCTCCGGTCTTTCAGCC</u>	<i>in vitro</i> -Transkription/ RNA-Sonde	<u>Unterstrichen:</u> T7-Promoter
Hpr2 – fw	TAGACTGGTGAGATTTAGCCTGGCG	<i>in vitro</i> -Transkription/ RNA-Sonde	
ssr3341-fw	TTTACGATTAATGCTTGGAC	Klonierung $\Delta hfq$ / Kolonie-PCR	
ssr3341-rev	GCTTAGTGCGGGGTAGAAAG	Klonierung $\Delta hfq$ / Kolonie-PCR	
pVZ321-fw	GCCGCTTTCCTGGCTTTC	Kolonie-PCR von pVZ-Konstrukten	
pVZ321-rev	CGCTGCCCCGATTACAGATC	Kolonie-PCR von pVZ-Konstrukten	
psk9-fw-petJ-neu	TACGCCCCGGTAGTGATCTTATTTTC	PCR von <i>PpetJ-sycrp1/-col-hfq</i> -Fusionen aus pSK9-Konstrukten	
psk9-rev	TCCTGTACCTGGAGCAATCC	PCR von <i>PpetJ-sycrp1/-col-hfq</i> -Fusionen aus pSK9-Konstrukten	
Col-hfq-fw-NdeI	<u>ACATAATGGCTAAGGGGCAATCTTTAC</u>	Klonierung pVZ-PpetJ-col-hfq	<u>Unterstrichen:</u> <i>NdeI</i> -Zielsequenz
Col-hfq-rev-ooop-BglII	<u>AGATCTAATAAAAAACGCCCGCGGCAACCGAGCGTTCTTATTC</u> GGTTTCTTCGCTG	Klonierung pVZ-PpetJ-col-hfq	<u>Unterstrichen:</u> <i>BglII</i> -Zielsequenz

Phfq-hfq-fw	GATAAGTTGGATGCCGCCATGC	Klonierung pVZ-Phfq und pVZ-PhfqS	
hfq-Terhfq-rev	GAGGACCATTTCTCCATGACG	Klonierung pVZ-Phfq und pVZ-PhfqS	
NdeI-slr1371-fw	<u>ACATATGGG</u> CACTAGTCCCAAAATTC	Klonierung pVZ-PpetJ-sycr1-hfq	<u>Unterstrichen:</u> NdeI-Zielsequenz
BamHI-rev	<u>GGATCCT</u> GTAGTGCTTTGCTTTCCTC	Klonierung pVZ-PpetJ-sycr1-hfq	<u>Unterstrichen:</u> BamHI-Zielsequenz
BamHI-hfq-fw:	<u>AGGATCC</u> AGCAGATTTGATAGCGG	Klonierung pGex-Hfq	<u>Unterstrichen:</u> BamHI-Zielsequenz
NotI-hfq-rev:	<u>AGCGGCCG</u> CCTAACGGCGGGGAGT	Klonierung pGex-Hfq	<u>Unterstrichen:</u> NotI-Zielsequenz
T7-MicA	GGGGATCCT <u>TAATACGACTCACTATAGGG</u> AGGAAA	<i>in vitro</i> -Transkription/ EMSA	<u>Unterstrichen:</u> T7-Promoter
MicA-rev	AGAAAAAGGCCACTCGTGAGTGG	<i>in vitro</i> -Transkription/ EMSA	
GS-T7-Hpr3a-fw	<u>TAATACGACTCACTATAGGG</u> AGTCTGCCAAGGTTTATTGATAA CC	<i>in vitro</i> -Transkription/ EMSA	<u>Unterstrichen:</u> T7-Promoter
GS-Hpr3-rev	TATTTAGGATTCAAGCAGCGGTTCC	<i>in vitro</i> -Transkription/ EMSA	
T7-Yfr1-fw	<u>TAATACGACTCACTATAGGG</u> GCGGAGACGTAAGTTTCCG	<i>in vitro</i> -Transkription/ EMSA	<u>Unterstrichen:</u> T7-Promoter
Yfr1-rev	AACCGCCCGAACATCATCCAG	<i>in vitro</i> -Transkription/ EMSA	
Primer 1	TGATCCAACCGACGCGAC	5'-RACE	
Primer 2	ACCGACGCGACAAGCTAATGC	5'-RACE	
Hpr3-P2	GCACAACGAAGGCTTGCCGAA	5'-RACE von Hpr3	
Hpr3-P3	CTCTAGCTTCAAGCAAATTCAGC	5'-RACE von Hpr3	
Hpr1-P2	GCATTGTTTGCCATTTG	5'-RACE von Hpr1	
Hpr1-P3	CCCACTCGGTTTCATGGTAAC	5'-RACE von Hpr1	
M13-rev	TTCACACAGGAAACAGCTATGAC	Sequenzierung von pDrive-Konstrukten	

**Tabelle 10: Synthetische Oligoribonukleotide (RNA)**

Bezeichnung	Sequenz (5'...-3')	Verwendung	Markierung
5'-RNA	GUGAUCCAACCGACGCGACAAGCUAAUGCAAG <u>ANN</u>	5'-RACE	<u>Unterstrichen:</u> N-tag
A30	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	EMSA	

### 4.1.7 Sonstige Materialien

In Tabelle 11 sind Filter, Membranen sowie Säulenmaterialien aufgelistet, welche in dieser Arbeit zur Anwendung kamen.

**Tabelle 11: Porenfilter und Membranen**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Porenfilter und Membranen</b>	
3MM-Filterpapier	Whatman Paper Ltd., Maidstone, GB
HATF-Nitrozellulose Membranen	Schleicher & Schuell GmbH, Dassel
Hybond N <sup>+</sup> -Membranen	GE Healthcare, Waukesha, USA
Millex-GS Sterilfilter (0,22 µM Porengröße)	Millipore, Carrigtwohill, Ireland
Protran-Nitrocellulose Membran	Schleicher & Schuell, Dassel
Steril-Filter (0,25 µm Porengröße)	Renner, Dannstadt
Vivaspin 500, 5000 MWCO	Vivascience AG, Hannover
<b>Säulenmaterial und sonstige Materialien</b>	
Glutathion-Agarose 4B	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
<i>illustra MicroSpin G-50 columns</i>	GE Healthcare, , Waukesha, USA
<i>NucleoSpin Extract II Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>QIAquick PCR Purification Kit</i>	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Superdex 75 10/300GL	GE Healthcare, , Waukesha, USA
Glasperlen 0,1/0,25-0,5 mm	Roth, Karlsruhe

### 4.1.8 Technische Laborgeräte

Nachfolgende Tabelle listet die verwendeten Geräte auf.

**Tabelle 12: Geräteliste**

Gerät	Gerätetyp/Hersteller
Äkta™Purifier	GE Healthcare, Waukesha, USA
Aquarien-Durchlüfterpumpe	Schego Optimal
Brutschrank	B 6200, Heraeus, Hanau
Flachbettschüttler	Celloshaker Variospeed, Renner GmbH, Dannstadt
Geldokumentationssystem	<i>Gel iX system</i> , Intas, Göttingen
Geltrockner	Bio-Rad Gel Dryer 583, Bio-Rad, München
Horizontale Gelelektrophorese-Kammern (für Agarosegele)	Bio-Rad Mini Sub DNA-Cell, Bio-Rad DNA-Cell, München
Hybridisierungsöfen	Bachhofer, München
Kühlbare Tischzentrifugen	Heraeus Biofuge fresco, Heraeus, Hanau
<b><u>Kühlzentrifugen:</u></b>	
Rotoren: SS 34, SLA-1000, SLA-1500	RC 5B Plus; Sorvall, DuPont, Bad Homburg
Rotor: S4180	SS 15R; Beckmann, München
Laborwaagen	Basic, BP 310S, BP 1200, Sartorius AG, Göttingen
Lichtstärkemessgerät	190SA-Sensor, Li-Cor, Bad Homburg
Magnetrührer	Heidolph MR 3000
PCR-Thermocycler	T-Personal, Biometra, Göttingen
Phospho-Imager	Personal Molecular Imager FX, Bio-Rad, München
Rotationsschüttler	Intelli Mixer RM-2M. ELMI Ltd., Riga, LV
<i>Semidry-Blotting</i> -Apparatur	Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell, Biorad, München
<b><u>Spannungsquellen für:</u></b>	
Elektrophorese allgemein	PowerPac 300, Biorad, München
EMSA	PowerPac 3000, Biorad, München
<i>Semi-Dry Blotting</i>	PowerPac Universal, Biorad, München

## 4 MATERIAL UND METHODEN

---

<b><u>Spektrophotometer:</u></b>	Shimadzu, UV-2401PC, Kyoto, Japan  <i>Novaspec III Visible Spectrophotometer</i> , GE Healthcare, Waukesha, USA  <i>NanoDrop ND-1000 UV/Vis-Spektralphotometer</i> , Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Sterilwerkbank	Heraeus <i>Lamin Air</i> , Hanau
Thermoblock/ -mixer	Thermomixer 5436, Eppendorf AG, Hamburg
Tischzentrifuge	Eppendorf 5415C, Eppendorf AG, Hamburg
Titan-Sonotrode/Kegelspitze KE76	Sonopuls, Bandelin
Ultraschall-Homogenisator	Sonopuls, Bandelin
UV-Quervernetzer	UV-Stratalinker 1800, Stratagene, La Jolla, USA
UV-Transluminator	Biometra, Göttingen
<b><u>Vertikale Gelelektrophorese-Kammern:</u></b>  (für Polyacrylamidgele)	Hoefer SE260 <i>Mighty Small</i> , Amersham Bioscience (Freiburg)  Protean II, Biorad, München
Vortexer	Reax2000, Heidolph, Schwabach
<b><u>Wasserbäder:</u></b>	MA6, Lauda Dr. R. Wobser, Lauda-Königshofen  Julabo, SW20, Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach  GFL-1086, GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel
Zellmühle	Typ MM2, MM301, Retsch, Haan

### 4.1.9 Software/ Datenbanken

Zur Analyse/ Bearbeitung von Sequenzdaten sowie zur Auswertung von Hybridisierungssignalen kamen in dieser Arbeit unterschiedliche Computerprogramme und Datenbanken zum Einsatz. Diese sind in Tabelle 13 aufgelistet.

## 4 MATERIAL UND METHODEN

**Tabelle 13: Software und Datenbanken**

<b>Software</b>	<b>Adresse/Referenz</b>	<b>Applikation</b>
<b>Artemis</b>	Rutherford <i>et al.</i> (2000)	Programm zur Visualisierung von Genomen und Annotationen
<b>BioEdit</b>	<a href="http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html">http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html</a>	Programm zur Bearbeitung und Analyse von Sequenzierungsdaten
<b>ClustalW2</b>	<a href="http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html">http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html</a>	Aminosäure-Sequenzvergleiche
<b>CyanoBase</b>	<a href="http://bacteria.kazusa.or.jp/cyanobase">http://bacteria.kazusa.or.jp/cyanobase</a>	Sequenzdatenbank für Cyanobakterien
<b>GenBank</b>	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">http://www.ncbi.nlm.nih.gov</a>	Molekularbiologische Sequenzdatenbank
<b>GeneDoc</b>	<a href="http://www.psc.edu/biomed/genedoc">http://www.psc.edu/biomed/genedoc</a>	Programm zur manuellen Bearbeitung von Sequenzvergleichen
<b>Mfold</b>	Zuker (2003); Mathews <i>et al.</i> (1999)  <a href="http://mfold.bioinfo.rpi.edu/cgi-bin/rna-form1.cgi">http://mfold.bioinfo.rpi.edu/cgi-bin/rna-form1.cgi</a>	Programm zur Vorhersage der Sekundärstrukturen von RNA-Molekülen anhand thermodynamischer Parameter
<b>Multalin</b>	<a href="http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html">http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html</a>	Multiple Sequenzvergleiche
<b>MyHits</b>	<a href="http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/index">http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/index</a>	Datenbank von Proteindomänen
<b>NCBI-BLAST</b>	<a href="http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>	Homologiesuche
<b>ORF Finder</b>	<a href="http://www.geneinfinity.org/sms_orffinder.html">http://www.geneinfinity.org/sms_orffinder.html</a>	Suche nach offenen Leserastern in einer Nukleotidsequenz
<b>Peptide Property Calculator</b>	<a href="http://www.basic.northwestern.edu/biotools/proteincalc.html">http://www.basic.northwestern.edu/biotools/proteincalc.html</a>	Berechnung des molaren Extinktionskoeffizienten von Syn-Hfq
<b>Pfam</b>	<a href="http://pfam.sanger.ac.uk/">http://pfam.sanger.ac.uk/</a>	Datenbank von Proteinen und Proteinfamilien
<b>Primer3</b>	<a href="http://frodo.wi.mit.edu/primer3/">http://frodo.wi.mit.edu/primer3/</a>	Ermittlung geeigneter Primer für PCR
<b>Quantity One</b>	BioRad, München	Densitometrische Analyse von Hybridisierungssignalen
<b>SIAS</b>	<a href="http://imed.med.ucm.es/Tools/sias.html">http://imed.med.ucm.es/Tools/sias.html</a>	Berechnung der Ähnlichkeit von Aminosäuresequenzen

### 4.1.10 Medien, Stammlösungen und Puffer

Die Zusammensetzungen von Medien, Lösungen und Puffern sind den Methodenbeschreibungen in den nachfolgenden Abschnitten zu entnehmen. Wässrige Lösungen wurden - entsprechend den Angaben im Text - generell unter Verwendung von ddH<sub>2</sub>O bzw. MQ-H<sub>2</sub>O angesetzt. Für alle Arbeiten mit RNA wurden fertige Lösungen zur präventiven Dekontamination von Ribonukleasen zusätzlich durch Millex-GS Sterilfilter (MilliQ) filtriert. Nur wenn ein anderes Lösungsmittel als ddH<sub>2</sub>O bzw. MQ-H<sub>2</sub>O verwendet wurde, ist dies entsprechend vermerkt. Zudem wird vermerkt, wenn Lösungen filtriert oder autoklaviert wurden.

### 4.1.11 Mikroorganismen

Folgende *E. coli*-Stämme wurden verwendet:

**DH5 $\alpha$ :** Genotyp: *recA1, endA1, hsdR17*(r<sub>k</sub><sup>-</sup>, m<sub>k</sub><sup>+</sup>), *supE44, thi-1, gyrA96, relA, phoA* (phi) 80d *lacZ*( $\Delta$ M15) $\Delta$ (*lacZYA-argF*) U1690

Referenz: Hanahan (1983)

Verwendung: Klonierungen, Expression von Syn-Hfq

**BL21 (DE3):** Genotyp: F<sup>-</sup>, *ompT, hsdSB* (r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>), *gal*

Referenz: Studier & Moffatt (1986)

Verwendung: Expression von Syn-Hfq

**J53 (RP4):** Genotyp: R<sup>+</sup>, *met, pro* (RP4: *Amp, Tc, Km, Tra*<sup>+</sup>, *IncP*)

Referenz: Wolk *et al.* (1984)

Verwendung: Konjugation von *Synechocystis* sp. PCC 6803:

**MC4100** Genotyp: F<sup>-</sup> *araD139*  $\Delta$ (*argF-lac*)U169 *rpsL150 relA1 deoC1 rbsR fthD5301 fruA25*  $\lambda$ -

Referenz: Casadaban (1976)

Verwendung: Matrize für Amplifikation des *col-hfq*-Fragments



Folgende *Synechocystis*-Stämme/Mutanten wurden verwendet:

### ***Synechocystis* sp. PCC 6803:**

*Synechocystis* sp. PCC 6803 ist ein einzelliges, nicht-diazotrophes, fakultativ photoheterotrophes Cyanobakterium (Ordnung: Chroococcales) mit einer Genomgröße von 3,57 Mbp und 3317 annotierten ORFs (<http://genome.kazusa.or.jp/cyanobase/Synechocystis>; 15.03.2010). Diese Arbeit beschäftigt sich ausschließlich mit einem Wildtyp-Stamm, welcher von der Arbeitsgruppe von Prof. Sergey V. Shestakov (Lehrstuhl für Genetik, Staatliche Universität Moskau, Russland) zur Verfügung gestellt wurde. Dieser Stamm besitzt eine natürliche Kompetenz zur Aufnahme exogener DNA und zeigt phototaktische Motilität. Alle in dieser Arbeit untersuchten und generierten Mutanten basieren auf diesem Stamm.

Bereits zu Beginn dieser Arbeit vorliegende Mutante:

### **$\Delta hfq$**

Generiert von Gisa Baumert und Dr. Ulf Dühring (in derselben Arbeitsgruppe) durch Insertion einer Chloramphenicol-Resistenzgen-Kassette in den Locus *ssr3341* (*hfq*) via *Xma*II.

Die folgenden Mutanten wurden im Rahmen dieser Arbeit hergestellt und sind in Abschnitt 2.1.2.6 sowie in den Abschnitten 4.2.2.17 bis 4.2.2.19 beschrieben:

***$\Delta hfqS$ ,  $\Delta hfqc$ , pVZ321,  $\Delta hfq$ -pVZ321, WT-*col-hfq*,  $\Delta hfq$ -*col-hfq* (unter Mitarbeit von Lydia Kretzschmar),  $\Delta hfq$ -pVZ-*PpetJ-sycrp1****

### 4.2 Methoden

#### 4.2.1 Allgemeine und physiologische Methoden

##### 4.2.1.1 Kultivierung von *E. coli*

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte aerob unter Standardbedingungen (Sambrook & Russel, 2001) und Verwendung eines modifizierten LB-*(lysogeny broth)* Mediums (Lennox, 1955). *E. coli*-Kulturen wurden entweder als Flüssigkultur im Schüttelinkubator bei 37 °C und 200 rpm oder auf einem LB-Agar-Festmedium im Brutschrank (bei ebenfalls 37 °C) angezogen.

Zur Selektion resistenter bzw. entsprechend transformierter Bakterien wurden den Medien die jeweiligen Antibiotika folgender Endkonzentrationen hinzugefügt: Ampicillin (Amp; 75 µg ml<sup>-1</sup>), Chloramphenicol (Cm; 25 µg ml<sup>-1</sup>) und Kanamycin (Km; 20 µg ml<sup>-1</sup>).

- **LB-Medium** (Lennox), Roth, autoklaviert
- **LB-Agar** (Lennox), Roth, autoklaviert
- **Amp-Stammlösung:** 75 mg ml<sup>-1</sup> in 50 % (v/v) Ethanol
- **Km-Stammlösung:** 20 mg ml<sup>-1</sup>, sterilfiltriert
- **Cm-Stammlösung:** 25 mg ml<sup>-1</sup>

##### 4.2.1.2 Kultivierung von *Synechocystis*

Die Anzucht von *Synechocystis* erfolgte (wenn nicht anders vermerkt) photoautotroph in BG11-Medium (Rippka *et al.*, 1979) bei 28 °C. Für die Stammhaltung wurden die in Abschnitt 4.1.11 aufgeführten *Synechocystis*-Kulturen unter sterilen Bedingungen auf BG11 - Festmedium mit 0,75 % (w/v) Bacto-Agar (Difco) ausgestrichen und bei 28 °C und kontinuierlicher Belichtung (Weißlicht, ~50-60 µmol Photonen m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, Philips TLD F36W/33) kultiviert. Zur Langzeit-Konservierung wurde je ein Aliquot aller generierten Mutanten steril in 1 ml Kryo-Medium resuspendiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Die Anzucht von *Synechocystis*-Flüssigkulturen erfolgte entweder in 100-200 ml-Erlenmeyerkolben auf einem Flachbettschüttler (~150 rpm) oder in kontinuierlich mit steriler Raumluft begasten Glasfermentern. Die Kulturen wurden bei kontinuierlicher Bestrahlung mit Weißlicht (Philips TLD F36W/33) von ~75 µmol Photonen m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (mittlere Lichtintensität, ML), <30 µmol Photonen m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (Schwachlicht, LL) oder >150 µmol Photonen m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (Starklicht, HL) angezogen. Zur Selektion von Mutanten wurden den Medien

## 4 MATERIAL UND METHODEN

---

die jeweiligen Antibiotika folgender Endkonzentrationen hinzugefügt: Cm ( $7 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) und Km ( $80 \mu\text{g ml}^{-1}$ ).

Für Untersuchungen des Wachstums bzw. der Reaktion von *Synechocystis* auf spezifischen Nährstoffmangel wurden Flüssigkulturen zunächst während der logarithmischen Wachstumsphase durch fünfminütige Zentrifugation bei RT und 3800 g geerntet und in modifiziertem BG11-Medium ohne Ammoniumeisen(III)-citrat (für Eisenmangel) bzw. ohne Natriumnitrat ( $\text{NaNO}_3$ ; für Stickstoffmangel) resuspendiert. Der Zusatz stress-induzierender Faktoren zu den Kulturen bzw. die Kultivierung bei abweichenden Temperaturen ist entsprechend im Ergebnisteil (Abschnitt 2.1.2.2.) beschrieben.

<b>1 x BG11-Kulturmedium</b>		<b>100 x BG11, autoklaviert</b>	
100 x BG11	10 ml l <sup>-1</sup>	CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	3,6 g l <sup>-1</sup>
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1 ml l <sup>-1</sup>	Zitronensäure	0,6 g l <sup>-1</sup>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 3 H <sub>2</sub> O	1 ml l <sup>-1</sup>	NaNO <sub>3</sub>	149,58 g l <sup>-1</sup>
Ammoniumeisen(III)-citrat	1 ml l <sup>-1</sup>	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	7,49 g l <sup>-1</sup>
Spurenelemente-Mix	1 ml l <sup>-1</sup>	0,25 M Na <sub>2</sub> -EDTA (pH 8)	0,56 ml l <sup>-1</sup>
TES-Puffer (pH 8,0)	10 ml l <sup>-1</sup>		
<b>Spurenelemente-Mix, sterilfiltriert</b>		<b>Weitere Stammlösungen für BG11, sterilfiltriert</b>	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,86 g l <sup>-1</sup>	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	20 mg ml <sup>-1</sup>
MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	1,81 g l <sup>-1</sup>	Ammoniumeisen(III)-citrat	6 mg ml <sup>-1</sup>
ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,222 g l <sup>-1</sup>	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 3 H <sub>2</sub> O	30 mg ml <sup>-1</sup>
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,390 g l <sup>-1</sup>	TES-Puffer (pH 8,0)	1 M
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,049 g l <sup>-1</sup>		
CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	0,079 g l <sup>-1</sup>		
○ <b>Kryo-Medium:</b>		0,5 x BG11; 8 % (v/v) DMSO	
○ <b>Km-Stammlösung:</b>		40 mg ml <sup>-1</sup> , sterilfiltriert	
○ <b>Cm-Stammlösung:</b>		7 mg ml <sup>-1</sup>	

### 4.2.1.3 Bestimmung der Zelldichte in Flüssigkulturen

Die Bestimmung der optischen Dichte (OD) von Flüssigkulturen erfolgte mithilfe eines Spektralphotometers (*Novaspec III Visible Spectrophotometer*, GE Healthcare) bei einer Wellenlänge von 600 nm (*E. coli*) bzw. 750 nm (*Synechocystis*) in Plastikkuvetten. Als Referenz diente das jeweilige Anzuchtmedium.

### 4.2.1.4 Absorptionsspektren ganzer Zellen von *Synechocystis*

Absorptionsspektren von *Synechocystis*-Kulturen wurden an ganzen Zellen in BG11-Flüssigkulturen und bei RT im Wellenlängenbereich zwischen 400 und 750 nm mit einem Spektralphotometer (UV-2401PC, Shimadzu) in Plastikkuvetten gemessen. Vor den Messungen wurde eine Basislinie mit Wasser aufgenommen.

### 4.2.1.5 Bestimmung des Phycocyanin/Chlorophyll a-Verhältnisses

Das Verhältnis von Phycocyanin (PC) zu Chlorophyll a (Chl) in *Synechocystis*-Flüssigkulturen wurde mithilfe der Absorptionsspektren ganzer Zellen ermittelt (Abschnitt 4.2.1.4). Die Berechnung erfolgte nach einer modifizierten Formel nach Myers und Mitarbeitern (1980):

$$\frac{PC}{Chl} = \frac{1,0162 * OD_{630nm} - 0,2612 * OD_{680nm}}{1,0162 * OD_{680nm} - 0,063 * OD_{630nm}}$$

### 4.2.1.6 Wachstumsversuche in Zellkulturplatten

Untersuchungen des Wachstums von *Synechocystis* unter verschiedenen (Stress-) Bedingungen auf Festmedium wurden mithilfe von 24-well-Zellkulturplatten durchgeführt. Zunächst wurden *Synechocystis*-Flüssigkulturen in BG11-Medium bei Normallicht (Abschnitt 4.2.1.2) angezogen und nach circa drei Tagen auf eine  $OD_{750\text{ nm}}$  von 0,4 (*Novaspec III Visible Spectrophotometer*, GE Healthcare) angeglichen. Unter der Annahme, dass die Zelldichte bei dieser  $OD_{750\text{ nm}}$   $\sim 10^7$  Zellen  $ml^{-1}$  beträgt, wurden in Schritten um den Faktor  $10^1$  Verdünnungsreihen mit BG11-Medium hergestellt. Die Verdünnungsstufen  $10^6$ - $10^3$  Zellen  $ml^{-1}$  wurden zu je 7  $\mu l$  seriell auf jeweils 1 ml BG11-Festmedium (0,75 % Argar) in den Kulturplatten aufgetragen. Die Zellkulturen wurden daraufhin für neun Tage bei 28 °C

unter den in den Abschnitten 2.1.2.1 und 2.1.2.2 angegebenen Wachstumsbedingungen inkubiert.

### 4.2.1.7 Phototaxis-Test

Für Untersuchungen des phototaktischen Verhaltens von *Synechocystis* wurden je 5 µl Flüssigkulturen während der logarithmischen Wachstumsphase in definierten Abständen auf Phototaxis-Testplatten pipettiert und zunächst für 48 h bei 28 °C gleichmäßig und konstant belichtet (Weißlicht, ~50-60 µmol Photonen m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>; Philips TLD F36W/33). Anschließend wurden die Testplatten in lichtundurchlässige Schachteln mit einer (ca. 3 cm breiten) Öffnung auf der Vorderseite positioniert und auf diese Weise unidirektional mit Weißlicht von 1-3 µmol Photonen m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> bestrahlt (Philips TLD F36W/33). Die Kulturen wurden in je drei Entfernungen von der Lichtquelle aufgetragen, wodurch sich die Lichtintensität von 100 % an der ersten Position auf etwa 60 % an der zweiten, und 35 % an der dritten Position reduzierte.

- **Phototaxis-Testplatte:** 0,5 % (w/v) Bacto-Agar; 5 mM Glukose; 10 mM TES/NaOH (pH 8,0)

### 4.2.2 Molekularbiologische Methoden

#### 4.2.2.1 DNA-Amplifizierung mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) nach Mullis *et al.* (1986)

Die PCR wurde zur *in vitro*-Amplifizierung von DNA-Fragmenten aus dem *Synechocystis*- bzw. *E. coli*-Genom sowie aus Plasmid-DNA durchgeführt. Zur Synthese möglichst fehlerfreier PCR-Produkte für anschließende Klonierungen und *in vitro*-Transkriptionen wurde - aufgrund ihrer Korrekturlesefunktion (*proof-reading*) - die *Phusion High Fidelity DNA Polymerase* (NEB) verwendet. Für Anwendungen, bei welchen Sequenzfehler nicht von Bedeutung sind (z.B. analytische Kolonie-PCR, RACE), kam die *DreamTaq*-Polymerase (MBI Fermentas) zum Einsatz. Als Matrize dienten genomische DNA, Plasmid-DNA oder etwas unaufgeschlossenes Zellmaterial (Kolonie-PCR). Die PCR-Bedingungen wurden nach den Angaben der Hersteller und den berechneten Schmelztemperaturen (Programm Primer3, Tabelle 13) der jeweiligen Primerpaare gewählt.

### 4.2.2.2 Reinigung von PCR-Produkten

PCR-Produkte wurden entweder direkt mithilfe des *QIAquick PCR Purification Kits* (Qiagen, Hilden) bzw. des *NucleoSpin Extract II Kits* (Macherey-Nagel) nach Angaben des jeweiligen Herstellers gereinigt oder bei artifizieller Amplifikation zusätzlicher PCR-Produkte zunächst elektrophoretisch in einem Agarosegel separiert und anschließend eluiert (siehe Abschnitt 4.2.2.14).

### 4.2.2.3 DNA-Spaltung durch Restriktionsendonukleasen

Analytische und präparative DNA-Spaltungen im Rahmen von Klonierungsexperimenten erfolgten mithilfe verschiedener Restriktionsendonukleasen (MBI Fermentas). In der Regel wurden 5 U Enzym pro  $\mu\text{g}$  DNA in einem Reaktionsvolumen von 50  $\mu\text{l}$  eingesetzt. Die Reaktionen erfolgten in den vom Hersteller mitgelieferten Puffern und wurden auch gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt.

### 4.2.2.4 Erzeugung von 3'-A-Einzelstrangüberhängen

Im Vorfeld von TA- bzw. UA-Klonierungen (*pGEM-T-Vector System I*, Promega bzw. *PCR Cloning Kit*, Qiagen) wurden an PCR-Produkten mit glatten Enden (*blunt ends*) enzymatisch 3'-A-Einzelüberhänge erzeugt (*A-tailing*). Dazu wurde ein definiertes Volumen des gereinigten DNA-Fragments mit 1 x *DreamTaq*-Puffer (MBI Fermentas), 0,2 mM dATP und 5 U *DreamTaq*-Polymerase (MBI Fermentas) in einem Reaktionsvolumen von 20  $\mu\text{l}$  für 30 min bei 72 °C im Thermoblock inkubiert.

### 4.2.2.5 Ligation von DNA-Molekülen

Die intermolekulare Ligation von DNA-Molekülen erfolgte mit 25 ng der linearisierten Plasmid-DNA in einem molaren Verhältnis von 1:5 mit der *Insert*-DNA. Der Ligationsansatz enthielt daneben 1 x T4 DNA Ligase-Puffer und 1 Weiss unit T4-DNA-Ligase (beides MBI Fermentas) in einem Gesamtvolumen von 20  $\mu\text{l}$ . Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C oder für 1 h bei RT. Der gesamte Ligationsansatz wurde für die Transformation chemisch kompetenter Zellen des Stamms *E. coli* DH5 $\alpha$  verwendet (siehe Abschnitt 4.2.2.11). Bei Verwendung der UA-bzw. TA-Klonierungsvektoren pDrive (Qiagen) und pGEM-T (Promega) wurde strikt nach den Protokollen der Hersteller verfahren.

### 4.2.2.6 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierungen von DNA-Proben wurden der Firma DLMBC am Institut für Biologie der HU Berlin in Auftrag gegeben. Sie erfolgte nach der Kettenabbruchmethode von Sanger *et al.* (1977) mit Standard-Sequenzierprimern (M13-rev) oder den jeweiligen gen-bzw. plasmid-spezifischen Primern (siehe Tabelle 9.).

### 4.2.2.7 Isolation von Plasmid-DNA aus *E.coli*

Die Präparation von Plasmid-DNA erfolgte nach dem Prinzip der „Alkalischen Lyse“ (Birnboim & Doly, 1979). Dazu wurden Zellen aus 3 ml Übernachtskultur durch Zentrifugation (10 min, 3000 g, 4 °C) sedimentiert, in 350 µl Puffer P1 resuspendiert und für 10 min bei RT inkubiert. Der Suspension wurden daraufhin 350 µl Puffer P2 zugefügt und der Ansatz nach einer fünfminütigen Inkubation bei RT mit 350 µl Puffer P3 gemischt. Nach einer zehnminütigen Inkubation auf Eis wurden chromosomale DNA und Proteine durch 15-minütige Zentrifugation bei 16000 g und 4 °C sedimentiert. Die Plasmid-DNA im Überstand wurde daraufhin mit 0,7 Volumen 2-Propanol gefällt. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 16000 g (15 min, 4 °C) wurde das Sediment mit 300 µl 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, für 1 h bei RT getrocknet und in 50 µl TE-Puffer resuspendiert.

- **P1:** 50 mM TRIS/HCl (pH 8,0); 10 mM EDTA; 100 µg ml<sup>-1</sup> RNase A
- **P2:** 200 mM NaOH; 1 % (w/v) SDS
- **P3:** 3 M Kaliumacetat (pH 5,5)

### 4.2.2.8 Isolation der Gesamt-DNA aus *Synechocystis* nach Franche & Damerval (1988)

Zur Isolation von Gesamt-DNA aus *Synechocystis* wurden zunächst 50 ml-Flüssigkulturen der spätlogarithmischen Wachstumsphase ( $OD_{750} = \sim 1,0$ ; UV-2401PC, Shimadzu) durch siebenminütige Zentrifugation bei 3800 g und 4 °C geerntet. Nach zweimaligem Waschen mit 10 ml TE-Puffer wurden die Zellen in 1 ml TE-S-Puffer resuspendiert und für den Zellaufschluss zunächst in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Darauf folgte eine einstündige Inkubation mit 5 mg ml<sup>-1</sup> Lysozym bei 37 °C. Nach Zusatz von Proteinase K (Endkonzentration: 100 µg ml<sup>-1</sup>) und SDS (Endkonzentration: 2 %) wurde das Zelllysate über Nacht bei 60 °C inkubiert. Im Anschluss wurde dem Ansatz für die Extraktion der genomischen DNA ein Volumen Phenol/Chloroform zugefügt und damit sorgfältig gemischt.

Nach zehnminütiger Zentrifugation bei 4 °C und 16000 g wurde die obere, wässrige Phase vorsichtig abgenommen und es folgte ein weiterer Extraktionsschritt mit einem Volumen Phenol/Chloroform. Phenolreste in der wässrigen Phase wurden durch Zugabe von einem Volumen Chloroform und erneuter Zentrifugation beseitigt. Die DNA im wässrigen Überstand wurde durch Zugabe von 0,7 Volumen 2-Propanol präzipitiert und schließlich bei 16000 g und 4 °C für 30 min sedimentiert. Es folgte ein Waschschriff mit 0,5 ml 70 % (v/v) Ethanol, woraufhin die DNA für 1 h bei RT getrocknet und in 50 µl TE-Puffer resuspendiert wurde. Abschließend wurden mögliche RNA-Rückstände durch eine 30-minütige Inkubation mit 0,8 µg µl<sup>-1</sup> RNase A bei 37 °C entfernt und die RNase A daraufhin für 10 min bei 72 °C inaktiviert.

- **TE-Puffer:** 10 mM Tris/HCl (pH 8,0); 1 mM EDTA
- **TE-S-Puffer:** 50 mM Tris/HCl (pH 8,0); 1 mM EDTA, 25 % (w/v) Saccharose
- **Phenol/Chloroform:** 1 Vol. Phenol (in TE-Puffer äquilibriert; pH 7,5-8,0); 1 Vol. Chloroform

### 4.2.2.9 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die DNA- und RNA-Konzentrationen in wässrigen Lösungen wurde durch die Messung der Absorption bei 260 nm mithilfe des *NanoDrop* ND-1000 UV/Vis-Spektralphotometers (PeqLab) bestimmt. Für die Messungen wurde je ein absolutes Volumen von 1,5 µl eingesetzt. Daneben wurde mit demselben Gerät die Qualität der Nukleinsäure anhand des Absorptionsverhältnisses OD<sub>260nm</sub>/OD<sub>280nm</sub> (mit optimalen Werten zwischen 1,8 und 2,0) ermittelt. Der Leerwert wurde mit dem entsprechenden Volumen MQ-H<sub>2</sub>O gemessen.

### 4.2.2.10 Präparation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen kam die Manganchlorid-Methode nach Inoue *et. al.* (1990) zur Anwendung. Zunächst wurden 3 ml LB-Medium (ergänzt durch 20 mM Glukose) mit dem zu transformierenden *E.coli*-Stamm beimpft und über Tag bei 37 °C und 200 rpm auf einem Flachbettschüttler inkubiert. Aus dieser Übertagkultur wurde eine frische 2 %ige Kultur in 50 bis 100 ml LB-Medium (ergänzt durch 20 mM Glukose) angeimpft, die über Nacht bei 200 rpm und RT angezogen wurde. Eine definierte Menge LB-Medium (mit 20 mM Glukose) wurde schließlich mit fünf Prozent der Übernachtskultur inokuliert und unter ständigem Schütteln (200 rpm) bei RT bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5



(Novaspec III Visible Spectrophotometer, GE Healthcare) angezogen. Nach 20-minütiger Inkubation auf Eis erfolgte eine Sedimentation der Zellen für 10 min bei 2665 g und 4 °C. Die Zellen wurden in eiskaltem Transformationspuffer (TB; 1/4 Volumen des Ausgangskulturvolumens) aufgenommen und erneut zentrifugiert. Das Zellpellet wurde nach Resuspension in 1/10 Volumen (bezogen auf die Ausgangskultur) TB und Zugabe von 7 % DMSO für 30 min auf Eis inkubiert. Gebrauchsfertige Aliquots zu je 200 µl wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

Die Kompetenz wurde durch Transformation (siehe Abschnitt 4.2.2.11) mit 100 pg pUC19 überprüft.

- **TB:** 10 mM PIPES; 55 mM MnCl<sub>2</sub>; 15 mM CaCl<sub>2</sub>; 250 mM KCl; (pH 7,6)

### 4.2.2.11 Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA nach Hanahan (1983)

Um geeignete Wirtszellen mit Plasmid-DNA zu transformieren, wurde mit chemisch kompetenten Zellen (siehe Abschnitt 4.2.2.10) des Stammes *E. coli* DH5α bzw. BL21 (DE3) gearbeitet. Dies erfolgte in allen Fällen mit der Hitzeschock-Transformationsmethode. Dazu wurden tiefgefrorene kompetente Zellen zunächst auf Eis aufgetaut, zu dem jeweiligen Ligationsansatz gegeben und vorsichtig gemischt. Der Ansatz wurde daraufhin zuerst für 30 min auf Eis und direkt im Anschluss für 90 sec im Wasserbad bei 42° C inkubiert. Der Hitzeschock wurde im Eisbad gestoppt. Nach fünf Minuten wurden die Zellen durch Zugabe von 800 µL LB-Medium (RT, ohne Antibiotikum) für 60 min (für spätere Selektion auf Ampicillin) bzw. 120 min (für spätere Selektion auf Km oder Cm) bei 37°C und 200 rpm auf einem Flachbettschüttler regeneriert. 100 µL der Kultur wurden auf LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die LB-Platten enthielten bei Bedarf Antibiotika (siehe Abschnitt 4.2.1.1) als Selektionsmarker. Resultierende Transformanten wurden entweder durch Kolonie-PCR (siehe Abschnitt 4.2.2.1) oder durch Restriktionsanalyse isolierter Plasmid-DNA (siehe Abschnitt 4.2.2.3) analysiert. Im Fall von UA- bzw. TA-Klonierungen enthielten die LB-Agarplatten zusätzlich zu den erforderlichen Antibiotika jeweils 40 µl IPTG und X-Gal (pro 25 ml LB-Agar), um den Ligationserfolg durch Blau-Weiss-Selektion zu überprüfen.

- **IPTG:** 20 mg ml<sup>-1</sup> in H<sub>2</sub>O
- **X-GAL:** 20 mg ml<sup>-1</sup> in DMF

### 4.2.2.12 Transformation von *Synechocystis* nach Grigorieva & Shestakov (1982)

Zur Transformation von *Synechocystis* wurden Zellen aus 10 ml Flüssigkultur während der exponentiellen Wachstumsphase durch Zentrifugation (10 min, 1500 g, RT) geerntet und in ca. 200 µl Restmedium aufgenommen. Darauf folgte eine 30-minütige Inkubation der Bakteriensuspension mit 1 µg der zu transferierenden Plasmid-DNA bei kontinuierlicher Belichtung (Weißlicht,  $\sim 50\text{-}60 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) und RT. Anschließend wurden die Zellen auf BG11-Festmedium (1 % Bacto-Agar) ausgestrichen und bei 28 °C und einer Lichtintensität von  $\sim 40 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$  inkubiert. Nach 48 h wurden 400 µl Cm-Lösung einseitig unter die Agarplatte gegeben, um einen Konzentrationsgradienten zu generieren. Resistente Klone (Transformanten) wurden mehrfach vereinzelt auf frisches BG11-Festmedium (0,75 % Agar) mit schrittweise ansteigender Cm-Konzentration von maximal  $7 \mu\text{g ml}^{-1}$  überimpft.

- **Cm-Lösung:**  $1,4 \text{ mg ml}^{-1}$  Chloramphenicol

### 4.2.2.13 Konjugation von *Synechocystis*

Der konjugative Transfer von Plasmid-DNA in *Synechocystis*-Zellen erfolgte durch die „Drei-Eltern-Kreuzung“ („*triparental mating*“). Als *Cargo*-Plasmid wurde der in *Synechocystis* autonom replizierende *shuttle*-Vektor pVZ321 (mit dem Stamm *E. coli* DH5α als Donor-Wirt) verwendet. Als Helferplasmid stand RP4 in dem Stamm *E. coli* J53 zur Verfügung. Zunächst wurden je 0,25 ml einer Übernachtskultur der Stämme *E. coli* J53-RP4 und *E. coli* DH5α-pVZ321 (bzw. der konstruierten pVZ321-Derivate; siehe Abschnitte 4.2.2.17 bis 4.2.2.19) in 10 ml frisches LB-Medium überführt und für 2,5 h bei 200 rpm und 37 °C inkubiert. Die Kulturen wurden daraufhin für 5 min bei 1000 g und RT zentrifugiert und in 1 ml LB-Medium resuspendiert. Beide Stämme wurden anschließend vereint und erneut zentrifugiert. Das Sediment wurde dann in 100 µl LB-Medium aufgenommen und für 1 h bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden 1,9 ml einer *Synechocystis*-Kultur ( $\text{OD}_{750} = 0,6\text{-}0,8$ ; *Novaspec III Visible Spectrophotometer*, GE Healthcare) zu der *E. coli*-Suspension gegeben und daraufhin für 5 min bei 1000 g und RT zentrifugiert. Das Sediment wurde in 30 µl BG11-Medium aufgenommen. Dieser Konjugationsansatz wurde anschließend auf einen sterilen HATF-Filter pipettiert, welcher einer BG11-Agarplatte (0,75 % Agar) mit 5 % LB-Medium (ohne Antibiotikum) auflag. Nach zwei Tagen wurden die Zellen mit BG11-Medium von dem Filter abgespült und dabei auf BG11-Festmedium (0,75 % Agar) mit  $20 \mu\text{g ml}^{-1}$  Km überführt.

Nach etwa 14 Tagen wurden resistente Klone vereinzelt auf BG11-Festmedium (0,75 % Agar) mit  $40 \mu\text{g ml}^{-1}$  Km ausgestrichen.

### 4.2.2.14 Nicht-denaturierende Agarose-Gelelektrophorese und DNA-Extraktion

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA in Agarosegelen erfolgte nach Sambrook & Russel (2001). In Abhängigkeit von der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurden 0,7–1,0 %ige Agarosegele mit  $0,2 \mu\text{g ml}^{-1}$  Ethidiumbromid verwendet. War eine Auftrennung zu Analysezwecken vorgesehen, wurde 0,5 x Tris-Borat(TBE)-Puffer verwendet. Die präparative Auftrennung für die anschließende Elution von DNA-Fragmenten erfolgte in 1 x Tris-Acetat(TAE)-Puffer. Vor dem Lauf wurden die Proben mit 1 x Ladepuffer versetzt. Zur Auftrennung wurde eine Spannung von 3-5 V pro cm Elektrodenabstand (Verwendung von TBE) bzw. 2 V pro cm Elektrodenabstand (Verwendung von TAE) angelegt. Die DNA-Fragmente wurden durch Bestrahlung mit UV-Licht in einem Geldokumentationssystem (*Gel iX system*, Intas) visualisiert und gegebenenfalls mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Größen der separierten Fragmente wurden mithilfe eines parallel aufgetragenen Größenstandards (siehe Tabelle 5) abgeschätzt.

Die Elution ausgeschnittener DNA erfolgte mithilfe des *QIAquick Gel Extraction Kits* (Qiagen) bzw. des *NucleoSpin Extract II Kits* (Macherey-Nagel) nach Angabe des jeweiligen Herstellers.

- **10 x TAE-Puffer:** 0,4 M Tris-HCl (pH 8,3); 0,2 M Essigsäure; 10 mM EDTA
- **10 x TBE-Puffer:** Rotiphorese 10x TBE Buffer, Roth
- **6 x Ladepuffer:** 0,25 % (w/v) Bromphenolblau; 0,25 % (w/v) Xylencyanol;  
30 % (v/v) Glycerol

### 4.2.2.15 Southern Blot-Analyse

Die Southern Blot-Analyse (Southern, 1975) diente dem spezifischen Nachweis genomischer DNA-Abschnitte, d.h. in dieser Arbeit der Insertion einer Cm-Resistenzgen-Kassette in den Locus *ssr3341 (hfq)* von *Synechocystis*. Dazu wurden ca.  $6 \mu\text{g}$  genomische DNA mit *HindIII* und *BglII* geschnitten und die resultierenden Fragmente durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt (siehe Abschnitt 4.2.2.14). Daraufhin wurde das Gel für 8 min in Depurinierungslösung unter leichtem Schwenken inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine 20-

## 4 MATERIAL UND METHODEN

---

minütige Inkubation in Denaturierungslösung, gefolgt von einer ebenfalls 20-minütigen Inkubation in Neutralisierungspuffer. Der anschließende Transfer der DNA-Fragmente auf eine *Roti-Nylon-plus*-Nylonmembran (Roth) erfolgte über Nacht per Kapillartransfer (Sambrook & Russel, 2001). Dazu wurden in die zwei Vertiefungen einer horizontalen Elektrophoresekammer je etwa 150 ml 10 x SSC-Puffer gefüllt und durch eine Filterpapierbrücke miteinander verbunden. Darauf wurden sukzessive drei Lagen mit 10 x SSC getränktes Filterpapier, das Agarose-Gel (Oberseite nach unten), die getränkte Nylonmembran sowie drei weitere Lagen getränktes Filterpapier luftblasenfrei aufgelegt. Abschließend wurde dieser Aufbau von einem circa 5 cm dicken Stapel Papierhandtücher bedeckt und mit einer Glasplatte beschwert. Nach dem Transfer wurde die Membran für einige Sekunden in 2 x SSC geschwenkt und die DNA anschließend durch UV-Licht (60 mJ, UV-Stratalinker 1800, Stratagene) mit der Membran quervernetzt. Die Prähybridisierung und Hybridisierung der Membran erfolgte innerhalb von Glasrohren in einem Rotationsofen (Bachhofer). Zuerst wurde die Membran in 10 ml Church-Puffer<sup>-</sup> für 30 min bei 65 °C prähybridisiert. Daraufhin wurde die radioaktiv markierte DNA-Sonde (siehe Abschnitt 4.2.3.4) dazugegeben und die DNA über Nacht bei ebenfalls 65 °C hybridisiert. Zur Entfernung ungebundener und unspezifisch gebundener Sonde wurde die Membran zweimal für je 15 min bei RT in Waschpuffer I (WP I) und anschließend zweimal für je 15 min bei 65 °C mit Waschpuffer II (WP II) gespült. Zum Nachweis der radioaktiven Signale wurde ein Röntgenfilm aufgelegt und in einer lichtundurchlässigen Filmkassette über Nacht bei -80 °C gelagert. Die radioaktive Strahlung führt zu einer lokalen Schwärzung des Röntgenfilms.

- **Depurinierungspuffer:** 0,25 M HCl
- **Denaturierungspuffer:** 1,5 M NaCl; 0,5 M NaOH
- **Neutralisierungspuffer:** 1 M Tris/HCl (pH 7,5); 1,5 M NaCl
- **10x SSC:** 87,65 g l<sup>-1</sup> NaCl; 88,2 g l<sup>-1</sup> Na<sub>3</sub>-Citrat
- **Church-Puffer<sup>-</sup>:** 0,25 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7,2); 1 mM EDTA; 7 % (w/v) SDS; 250 mM NaCl
- **Waschpuffer I (WP I):** 2x SSC; 0,5 % (w/v) SDS
- **Waschpuffer II (WP II):** 0,1x SSC 0,1 % (w/v) SDS

### 4.2.2.16 Konstruktion des Plasmids pGEX-Hfq zur heterologen Expression von GST-Hfq in *E.coli*

Zur Expression eines rekombinanten GST-Hfq-Fusionsproteins in *E.coli* wurde zunächst der ORF *ssr3341* (*hfq*) unter Verwendung genomischer DNA aus *Synechocystis* und der Primer BamHI-*hfq*-fw und NotI-*hfq*-rev (siehe Tabelle 9) als 226 bp langes DNA-Fragment amplifiziert (Abschnitt 4.2.2.1). Das PCR-Produkt wurde gereinigt (Abschnitt 4.2.2.2), mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Not*I an dessen Enden geschnitten (Abschnitt 4.2.2.3) und in die entsprechend geschnittene *multiple cloning site* (MCS) des pGEX-6P-1 Expressionsvektors (GE Healthcare) ligiert (Abschnitt 4.2.2.5). Die *hfq*-Insertion liegt *in frame* stromabwärts des 3'-Endes des *gst*-Gens hinter die *PreScission*-Protease-Zielsequenz. Die Korrektheit des Konstrukts wurde durch DNA-Sequenzierung überprüft (Abschnitt 4.2.2.6).

### 4.2.2.17 Konstruktion der Plasmide pVZ-Phfq und pVZ-PhfqS

Für die genetische Komplementierung der  $\Delta$  *hfq*-Mutante von *Synechocystis* wurde zunächst mithilfe der Primer Phfq-*hfq*-fw und *hfq*-Ter-*hfq*-rev (siehe Tabelle 9) und unter Verwendung genomischer DNA aus *Synechocystis* ein 1111 bp langes DNA-Fragment amplifiziert (Abschnitt 4.2.2.1), welches den ORF *ssr3341* (213 bp) sowie 500 bp und 398 bp der angrenzenden Stromaufwärts- bzw. Stromabwärtsbereiche (mit den eigenen putativen Promotor- bzw. Transkriptionsterminator-Regionen) enthielt. Das PCR-Produkt wurde gereinigt und nach Angaben des Herstellers in den UA-Klonierungsvektor pDrive (*PCR Cloning Kit*, Qiagen) ligiert (Abschnitt 4.2.2.5). Aus dessen MCS wurde das Fragment anschließend mit den Restriktionsendonukleasen *Pst*I und *Sal*I herausgeschnitten (Abschnitt 4.2.2.3) und (im Austausch gegen die Cm-Resistenzgenkassette des Plasmids) in den entsprechend geschnittenen *shuttle*-Vektor pVZ321 ligiert (siehe Tabelle 7). Das Plasmid pVZ-PhfqS wurde im Rahmen derselben Klonierungsarbeiten aus einem anderen Klon isoliert und enthält an Position 121 des kodierenden Bereichs von *ssr3341* eine zufällige Punktmutation, welche dort *in frame* ein Stoppcodon einfügte. Da diese Mutation *in vivo* zu der Synthese eines verkürzten Hfq-Proteins führen würde, wurde dieses Plasmid als Negativkontrolle für die Komplementierungsexperimente eingesetzt. Die Konstrukte pVZ-Phfq und pVZ-PhfqS sowie der unmodifizierte Vektor pVZ321 wurden durch Konjugation in die  $\Delta$ *hfq*-Mutante von *Synechocystis* transferiert (Abschnitt 4.2.2.13). Exkonjuganten wurden

auf BG11-Festmedium mit 40  $\mu\text{g ml}^{-1}$  Km selektiert. Das Medium enthielt aufgrund der entsprechenden Resistenz der  $\Delta hfq$ -Mutante zudem 7  $\mu\text{g ml}^{-1}$  Cm.

### 4.2.2.18 Konstruktion des Plasmids pVZ-PpetJ-col-hfq

Für die heterologe Komplementierung der  $\Delta hfq$ -Mutante von *Synechocystis* mit *hfq* aus *E. coli* wurde zunächst mithilfe der Primer Col-hfq-fw-NdeI und Col-hfq-rev-oop-BglII (siehe Tabelle 9) per Kolonie-PCR (mit *E. coli*-Zellen) ein 339 bp langes DNA-Fragment amplifiziert (Abschnitt 4.2.2.1), welches den ORF *hfq* (aus *E. coli*) mit einer *NdeI*-Schnittstelle am 5'-Ende sowie den Transkriptionsterminator *oop* aus dem Bakteriophagen Lambda mit einer *BglII*-Schnittstelle am 3'-Ende enthielt. Infolge der Reinigung des PCR-Produkts wurde dieses zunächst in den TA-Klonierungsvektor pDrive (*PCR Cloning Kit*, Qiagen) ligiert und dort mit den Restriktionsendonukleasen *NdeI* und *BglII* wieder herausgeschnitten (Abschnitt 4.2.2.3). Daraufhin konnte das Fragment erfolgreich in den mit denselben Enzymen linearisierten Vektor pSK9 ligiert werden (Abschnitt 4.2.2.5). Auf diese Weise wurde das *hfq-oop*-Konstrukt am 5'-Ende *in frame* mit dem Promotor *PpetJ* (aus *Synechocystis*) innerhalb des Plasmids fusioniert. Mithilfe der Primer psk9-fw-petJ-neu und psk9-rev (Tabelle 9) wurde anschließend per Kolonie-PCR eines positiven Klons ein 1015 bp langes Fragment inklusive der *PpetJ-hfq-oop*-Fusion amplifiziert, welches gereinigt und in den Vektor pDrive ligiert wurde. Aus dessen MCS wurde das Fragment anschließend mit den Restriktionsendonukleasen *PstI* und *SalI* herausgeschnitten und (im Austausch gegen die Cm-Resistenzgenkassette des Plasmids) in den entsprechend geschnittenen *shuttle*-Vektor pVZ321 ligiert (siehe Tabelle 7). Das resultierende Konstrukt pVZ-PpetJ-col-hfq sowie der unmodifizierte Vektor pVZ321 wurden durch Konjugation in den Wildtyp sowie in die  $\Delta hfq$ -Mutante von *Synechocystis* transferiert (Abschnitt 4.2.2.13). Exkonjuganten wurden auf BG11-Festmedium mit 40  $\mu\text{g ml}^{-1}$  Km selektiert. Das Medium enthielt aufgrund entsprechender Resistenz der  $\Delta hfq$ -Mutante zudem 7  $\mu\text{g ml}^{-1}$  Cm.

### 4.2.2.19 Konstruktion des Plasmids pVZ-PpetJ-sycrp1

Für den Versuch zur Komplementierung  $\Delta$  der *hfq*-Mutante von *Synechocystis* durch Überexpression von *sycrp1* wurde zunächst mithilfe der Primer NdeI-slr1371-fw und BamHI-rev (siehe Tabelle 9) und unter Verwendung genomischer DNA aus *Synechocystis* ein 1009 bp langes DNA-Fragment amplifiziert (Abschnitt 4.2.2.1), welches den ORF *sycrp1* (*slr1371* aus

*Synechocystis*, 699 bp) mit einer *NdeI*-Schnittstelle am 5'-Ende sowie 300 bp des angrenzenden Stromabwärtsbereiches mit einer *BamHI*-Schnittstelle am 3'-Ende enthielt. Infolge der Reinigung des PCR-Produkts wurde dieses zunächst in den Vektor pDrive ligiert (Abschnitt 4.2.2.5) und dort mit den Restriktionsendonukleasen *NdeI* und *BamHI* (welches die gleichen Überhänge hervorbringt wie *BglII*) wieder herausgeschnitten. Alle weiteren Klonierungsschritte erfolgten entsprechend den Angaben in Abschnitt 4.2.2.18.

### 4.2.3 Methoden zur RNA-Analytik

#### 4.2.3.1 Isolation von Gesamt-RNA aus *Synechocystis*

Für die RNA-Isolation wurden Zellen aus ~25 ml *Synechocystis*-Flüssigkulturkultur in einem 50 ml-Reaktionsgefäß mit ~1 Volumen Eis gemischt und bei 3800 g und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Das Sediment wurde nach dem vorsichtigen Dekantieren des Überstandes in den Flüssigkeitsresten (ca. 1 ml) resuspendiert, in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt und erneut zentrifugiert (16000 g, 15 sec, 4 °C). Nach der Aufnahme des Sediments in 1 ml Trizol-Reagenz wurden die Zellen zunächst bei -20 °C (in der Regel über Nacht) eingefroren und anschließend für 15 min bei 65 °C unter ständigem Schütteln inkubiert. Nach der Zugabe von 200 µl eiskaltem Chloroform und sorgfältigem Durchmischen (30 Sekunden Vortexer) wurden die Proben für 5 min auf Eis inkubiert und zur Phasentrennung für 10 min bei 4 °C und 16000 g zentrifugiert. Nach dem Überführen der oberen, wässrigen Phase in ein neues Reaktionsgefäß erfolgte eine Nachextraktion mit einem Volumen PCI unter entsprechenden Bedingungen. Die RNA in der wässrigen Phase wurde daraufhin mit einem Volumen 2-Propanol über Nacht bei -20 °C präzipitiert. Nach 30 minütiger Zentrifugation bei 16000 g und 4 °C wurde die sedimentierte RNA mit 70 % (v/v) eiskaltem Ethanol gewaschen und erneut für 10 min bei 16000 g und 4 °C zentrifugiert. Das RNA-Pellet wurde für 5 min bei RT getrocknet, in 30 µl MQ-Wasser resuspendiert und bei -20 °C gelagert.

- **PCI:** Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisch (25:24:1)
- **Trizol-Reagenz,** Invitrogen

### 4.2.3.2 Denaturierende elektrophoretische Auftrennung von RNA in Formaldehyd-Agarosegelen und Kapillar-*Blotting*

RNA-Moleküle mit einer Sequenzlänge von mehr als 500 Nukleotiden wurden in 1,3 %igen Agarosegelen mit 1,85 % Formaldehyd und in 1 x MEN-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt. Die RNA-Proben wurden vorbereitend mit einem Volumen 2 x RNA-Ladepuffer<sup>+</sup> versetzt, für 5 min bei 95 °C denaturiert, kurz auf Eis abgekühlt und (ggf. zusammen mit einem Längenstandard; siehe Tabelle 5) auf das Agarosegel geladen. Die Elektrophorese fand bei konstanter Spannung von 4 V pro cm Elektrodenabstand in einer horizontalen Elektrophoresekammer statt. Die aufgetrennten RNA-Moleküle wurden anschließend per Kapillartransfer auf eine *Hybond-N<sup>+</sup>*-Nylonmembran (GE Healthcare) transferiert (siehe Abschnitt 4.2.2.15) und durch UV-Licht-Bestrahlung (60 mJ, UV-Stratalinker 1800, Stratagene) mit dieser quervernetzt.

- **10 x MEN-Puffer:** 200 mM MOPS; 50 mM Na-Acetat; 10 mM EDTA (pH 7,0)
- **2 x RNA-Ladepuffer<sup>+</sup>:** 95 % (v/v) Formamid (deionisiert); 0,025 % (v/v) SDS, 0,5 mM EDTA; 0,1 % (w/v) Xylencyanol; 0,1 % (w/v) Bromphenolblau; 0,4 % (v/v) Ethidiumbromid

### 4.2.3.3 Elektrophoretische Auftrennung von RNA in denaturierenden Harnstoff-Polyacrylamidgelen und Elektro-*Blotting*

RNA-Moleküle mit einer Sequenzlänge von weniger als 500 Nukleotiden wurden in 8 %igen Harnstoff-Polyacrylamidgelen (-PAG) in vertikalen Elektrophorese-Kammern (10 x 8 cm; Hoefer SE260 *Mighty Small*, Amersham) aufgetrennt. Für die Herstellung des Gels wurde das Harnstoff-PAG-Gemisch vor Zugabe von APS und TEMED im Wasserbad bei 60 °C erhitzt, bis sich der Harnstoff vollständig gelöst hatte. Die RNA-Proben wurden vorbereitend mit je einem Volumen 2 x RNA-Ladepuffer<sup>-</sup> versetzt, für 5 min bei 95 °C denaturiert, kurz auf Eis abgekühlt und zusammen mit einem Längenstandard auf das Gel geladen. Die Elektrophorese erfolgte für etwa 1,5 h bei einer konstanten Stromstärke von 10 mA in 1 x TBE-Puffer. Das Gel wurde daraufhin für circa 30 min in EtBr-Färbelösung geschwenkt und anschließend für 10 min in 0,5 x TBE-Puffer gewaschen und mit einem Geldokumentationssystem (*Gel iX system*, Intas) dokumentiert. Die RNA wurde durch Elektrotransfer unter Verwendung einer *Semi-Dry-Blot*-Einheit (*Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell*, Biorad) auf eine *Hybond-N<sup>+</sup>*-Nylonmembran (GE Healthcare) transferiert. Der Transfer erfolgte für 1 h in



0,5 x TBE-Puffer bei RT und einer konstanten Stromstärke von 0,8 mA/cm<sup>2</sup>. Die RNA wurde durch UV-Licht-Bestrahlung (60 mJ, UV-Stratalinker 1800, Stratagene) mit der Nylonmembran quervernetzt. Zur Kontrolle des gleichmäßigen Transfers wurde die Membran mithilfe des Geldokumentationssystems (s.o.) analysiert.

- **8 % Harnstoff-PAG:** 8 % (v/v) Rotiphorese Gel 40 (19:1)  
Acrylamid/Bisacrylamid (Roth); 8,3 M Harnstoff; 1 x TBE-Puffer; 0,8 % APS (v/v); 0,1 % (v/v)TEMED
- **2 x RNA-Ladepuffer:** 95 % (v/v)Formamid (deionisiert); 0,025 % (v/v) SDS, 0,5 mM EDTA
- **EtBr-Färbelösung:** 0,5 x TBE-Puffer; 0,3 µg ml<sup>-1</sup> Ethidiumbromid

#### 4.2.3.4 Herstellung radioaktiv markierter Sonden für Northern- und Southern Blot-Hybridisierungen

Die Synthese strangspezifischer RNA-Sonden per *in vitro*-Transkription erfolgte in Anwesenheit von [<sup>32</sup>P]-UTP mithilfe des *AmpliScribe T7-Flash Transcription Kits* (Epicentre Biotechnologies) oder des *MAXIscript T7 In Vitro Transcription Kits* (Ambion) nach den Angaben des jeweiligen Herstellers.

Als Matrizen dienten genpezifische PCR-Fragmente, welchen mithilfe der in Tabelle 9 entsprechend gekennzeichneten Primer 3'-terminale T7-Promotor-Sequenzen angefügt wurden. Der *in vitro*-Transkription schloss sich unmittelbar ein 15-minütiger DNase-Verdau (mithilfe derselben *Kits*) bei 37°C an.

Die Synthese von genspezifischen dsDNA-Sonden erfolgte in Anwesenheit von [<sup>32</sup>P]-dCTP mithilfe des *DecaLabel™ DNA Labeling Kits* (MBI Fermentas) nach Angaben des Herstellers. Als Matrize dienten DNA-Fragmente, die per PCR mithilfe der in Tabelle 9 entsprechend gekennzeichneten, genspezifischen Primer hergestellt wurden.

Die radioaktive Markierung von Oligonukleotiden erfolgte durch [<sup>32</sup>P]-Phosphorylierung der 5'-Enden mithilfe der T4 Polynukleotid-Kinase (MBI Fermentas) und [<sup>32</sup>P]-ATP. Ein 20 µl-Reaktionsansatz enthielt 10 U T4 Polynukleotid-Kinase (MBI Fermentas), 2 µl 10 x Puffer A (MBI Fermentas), 3 µl [<sup>32</sup>P]-ATP und 2,5 µl einer 10 µM-Stammlösung des zu markierenden Oligonukleotids (Tabelle 9). Der Ansatz wurde für 30 min bei 37°C inkubiert und die Reaktion anschließend durch 1 µl 0,5 M EDTA gestoppt.

Infolge der Synthese bzw. radioaktiven Markierung aller Sonden wurden nicht inkorporierte/ überschüssige Nukleotide per Gelfiltration mithilfe von *MicroSpin* G-50-Säulen (GE Healthcare) entfernt.

### 4.2.3.5 Northern Blot-Hybridisierungen

Die Northern Blot-Hybridisierung erfolgte mit Church-Puffer<sup>+</sup> entsprechend den Angaben in Abschnitt 4.2.2.15, jedoch - in Abhängigkeit von der jeweils verwendeten, radioaktiv markierten Sonde (siehe Abschnitt 4.2.3.4) - bei unterschiedlichen Temperaturen:

Oligonukleotid-Sonde (DNA): 45 °C

Doppelsträngige DNA-Sonde: 55 °C

Einzelsträngige RNA-Sonde: 68 °C

Das sequenzielle Waschen der Membran erfolgte ebenfalls in Abhängigkeit von der verwendeten Sonde bei unterschiedlichen Bedingungen:

Einzelsträngige RNA-Sonde und doppelsträngige DNA-Sonde:

15 min RT, WP I → 15 min 68 °C, WP I → 5 min 68 °C, WP II

Oligonukleotid-Sonde (DNA):

30 min RT, Waschpuffer III → 15 min 42 °C, Waschpuffer IV → 1 min, RT, WP II

Die Detektion und Analyse der radioaktiven Hybridisierungssignale erfolgte mithilfe des *Personal Molecular Imager FX Systems* und dem Programm *Quantity One* v. 4.6.3 (beides Biorad).

- **Church-Puffer<sup>+</sup>:** 0,25 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7,2); 1 mM EDTA; 7 % (w/v) SDS; 250 mM NaCl, 50 % (v/v) Formamid (deionisiert)
- **Waschpuffer III:** 2 x SSC; 1 % (w/v) SDS
- **Waschpuffer IV:** 1 x SSC; 0,5 % (w/v) SDS

### 4.2.3.6 *In vitro*-Transkription, radioaktive Markierung der 5'-Enden und Reinigung von RNA

*In vitro*-Transkriptionen zur Synthese von RNA für EMSA-Analysen (Abschnitt 4.2.4.8) erfolgten inklusive anschließendem DNase I-Verdau mithilfe des *AmpliScribe T7-Flash Transcription Kits* (Epicentre Biotechnologies) nach den Angaben des Herstellers. Als Matrizen dienten PCR-Fragmente, welche mithilfe der in Tabelle 9 aufgelisteten Primer generiert wurden und einen 5'-terminalen T7-Promotor enthielten. Die Größe und Integrität der synthetisierten RNA wurde mithilfe einer Harnstoff-Polyacrylamidgelelektrophorese in Verbindung mit einer Ethidiumbromid-Färbung überprüft (siehe Abschnitt 4.2.3.3). Der Bereich des Gels mit der RNA wurde mit einem Skalpell ausgeschnitten, grob zerkleinert und über Nacht bei 4 °C in CSS eluiert. Die RNA wurde mit 1 Vol. eiskaltem PCI extrahiert und durch die Zugabe von 3 Vol. Ethanol/3M Natrium-Acetat (30:1) sowie von 20 µg Glykogen (MBI Fermentas) bei -20 °C über Nacht präzipitiert. Infolge einer 30-minütigen Zentrifugation bei 16000 g wurde die RNA mit 300 µl 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, für 5 min luftgetrocknet und in 10 µl MQ-H<sub>2</sub>O aufgenommen. 20 pmol der RNA wurden mit 10 U CIAP (*calf intestine alkaline phosphatase*, MBI Fermentas) nach Herstellerprotokoll in einem Reaktionsvolumen von 20 µl dephosphoryliert, mit PCI extrahiert und über Nacht - wie oben beschrieben - präzipitiert. Die radioaktive 5'-Markierung der dephosphorylierten RNA erfolgte mithilfe von [ $\gamma^{32}\text{P}$ ]-ATP (20 µCi) unter Verwendung der T4 Polynukleotid-Kinase (PNK, MBI Fermentas) nach Herstellerangaben in einem Reaktionsvolumen von 20 µl. Restliche Nukleotide wurden per Gelfiltration in *MicroSpin G-50*-Säulen (GE Healthcare) entfernt. Die markierte RNA wurde in einem Harnstoff-Polyacrylamidgel aufgetrennt, mithilfe eines Röntgenfilms (GE Healthcare) visualisiert und wie oben beschrieben gereinigt. Infolge der Ethanol-Präzipitation wurde die RNA in 10 µl MQ-H<sub>2</sub>O gelöst.

- **CSS (*crush and soak solution*):** 500 mM Ammoniumacetat; 0,1 % (w/v) SDS;  
0,1 mM EDTA

### 4.2.3.7 5'-RACE (*rapid amplification of cDNA ends*)

Die Ermittlung von 5'-Enden der Primärtranskripte von Hpr1 und Hpr3 aus *Synechocystis* erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Bensing *et al.* (1996). Dabei wurden zunächst die 5'-Triphosphate primärer RNA-Transkripte in Proben von 2 µg Gesamt-RNA durch Behandlung mit 10 U TAP (*tobacco acid pyrophosphatase*, Epicentre Biotechnologies) für 1 h bei 37 °C unter Zusatz von 40 U RNase-Inhibitor (MBI Fermentas) in 5'-Monophosphate umgewandelt (+TAP). Zur Kontrolle wurden parallel ansonsten identische Ansätze ohne TAP-Behandlung (-TAP) analysiert. Die RNA wurde anschließend mit PCI extrahiert, in Ethanol/3 M Natriumacetat (pH 5,2) (30:1) über Nacht bei -20 °C präzipitiert und in MQ-H<sub>2</sub>O gelöst. Daraufhin wurde die RNA für 1 h bei 37 °C mit 10 pmol der 5'-Adapter-RNA (siehe Tabelle 10), 50 U T4 RNA-Ligase (Epicentre Biotechnologies), 1 mM ATP und 80 U RNase-Inhibitor (MBI Fermentas) in dem mitgelieferten Puffer inkubiert. Kontrollreaktionen wurden ohne den RNA-Linker durchgeführt. Nachfolgend wurde die RNA - wie oben beschrieben - erneut einer PCI-Extraktion mit anschließender Präzipitation in Ethanol unterzogen. Die RNA wurde in MQ-H<sub>2</sub>O gelöst und unter Verwendung des *Thermoscript Reverse Transcriptase Kits* (Invitrogen) sowie der genspezifischen revers-Primer Hpr1-P2 bzw. Hpr3-P2 (siehe Tabelle 9) nach Angaben des Herstellers für 1 h bei 55 °C revers transkribiert. Die synthetisierten cDNAs wurden in der ersten PCR in 35 Zyklen mit dem 5'-Adapter-spezifischen Primer1 (siehe Tabelle 9) und dem genspezifischen Primer Hpr1-P2 bzw. Hpr3-P2 in 50 µl-Reaktionsansätzen amplifiziert. In der zweiten – ansonsten entsprechend durchgeführten - PCR (*nested* PCR) wurden 2 µl des ersten PCR-Produkts als Matrize in ebenfalls 50 µl Reaktionsvolumen eingesetzt. Als *nested*-Primer wurden Primer2 (adapterspezifisch, Tabelle 9) und Hpr1-P3 bzw. Hpr3-P3 verwendet. Die Reaktionsbedingungen waren jeweils: 3 min 95° C; 35 Zyklen mit **1.** 30 sec 95 °C, **2.** 30 sec 58 °C, **3.** 1 min 72 °C; abschließend 10 min 72 °C. Die PCR-Produkte wurden per Agarose-Gelelektrophorese (Abschnitt 4.2.2.14) analysiert, aus dem Gel ausgeschnitten, gereinigt und in den Vektor pDrive (Qiagen) ligiert (Abschnitt 4.2.2.5). Die Ligationsprodukte wurden in den Stamm *E. coli* DH5α transferiert (Abschnitt 4.2.2.11), positive Klone mit *Insert* durch Blau-Weiss-Selektion identifiziert und die pDrive-Konstrukte mithilfe des Primers M13-rev sequenziert (Tabelle 9).

### 4.2.4 Biochemische Methoden

#### 4.2.4.1 Zellernte und -aufschluss von *Synechocystis*

Die Ernte von *Synechocystis*-Flüssigkulturen erfolgte für 10 min bei 1500 g und 4 °C. Die Sedimente wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Für den Zellaufschluss wurden die geernteten Zellen im Verhältnis 1:3 (Pelletvolumen: Puffervolumen) in Extraktionspuffer resuspendiert und ggf. zu je 1 ml auf mehrere 2 ml-Reaktionsgefäße aufgeteilt. Nach der Zugabe von 0,8 Vol. Glasperlen (0,1-0,5 mm) wurde die Zellsuspension bei 30 Hz und 4 °C für 10 min in der Zelmühle (Typ MM2, MM301, Retsch, Haan) geschüttelt. Daraufhin wurden Glasperlen, Zelltrümmer und nicht aufgeschlossene Zellen durch eine fünfminütige Zentrifugation bei 4 °C und 1500 g sedimentiert. Der Überstand (Gesamtzellextrakt) wurde abgenommen und das Sediment erneut in demselben Volumen Extraktionspuffer resuspendiert. Nach einem weiteren Extraktionsschritt unter entsprechenden Bedingungen wurde der zweite Überstand mit dem ersten vereinigt. Anschließend wurden die löslichen Zellbestandteile durch eine 30-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 23500 g von der unlöslichen Membranfraktion getrennt und gesammelt.

- **Extraktionspuffer:** 50 mM Hepes/NaOH (pH 7,0); 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 25 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 % (v/v) Glycerol

#### 4.2.4.2 Heterologe Expression und Reinigung eines GST-Hfq-Fusionsproteins

Zur heterologen Expression von GST-Hfq wurden 600 ml LB-Medium (mit 75 µg ml<sup>-1</sup> Amp) zweiprozentig mit Übernachtskulturen von BL21-pGEX-Hfq bzw. DH5α-pGEX-Hfq (siehe Abschnitt 4.2.2.16) beimpft und in einem Schüttelinkubator bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Bei einer OD<sub>600</sub> von 0,4-0,6 (*Novaspec III Visible Spectrophotometer*, GE Healthcare) wurde die Expression des rekombinanten Proteins durch Zugabe von 1,5 mM IPTG induziert und die Kultur für weitere 3 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 10 min bei 3800 g und 4 °C sedimentiert und anschließend ggf. bei -20 °C gelagert. Die geernteten Zellen wurden in 60 ml Natrium-Kalium-Phosphatpuffer resuspendiert und durch Kavitation lysiert. Dazu wurde die Suspension unter ständiger Eiskühlung fünfmal für jeweils 30 sec bei 10 %iger Leistung mit Ultraschall (Titan-Sonotrode/Kegelspitze KE76 Sonopuls) behandelt. Es folgte eine 20-minütige Zentrifugation bei 23500 g zur Trennung des löslichen Extrakts von den Membranbestandteilen und nicht aufgeschlossenen Zellen. Die Reinigung des rekombinanten Hfq-Proteins (Syn-Hfq) erfolgte durch Glutathion-Affinitätschromatographie

im *batch*-Verfahren. Dabei wurden alle im Folgenden aufgeführten Zentrifugationsschritte für 3 min bei 1500 g und 4 °C durchgeführt. Zunächst wurde die Affinitätsmatrix (Glutathion-Agarose 4B; Macherey-Nagel) dreimal mit dem fünffachen Volumen an Natrium-Kalium-Phosphatpuffer gewaschen und zur Bindung des GST-Hfq-Proteins in einem Volumen-Verhältnis von 1: 100 (Matrix: Extrakt) zu dem löslichen Zellextrakt gegeben. Der Ansatz wurde für eine Stunde bei RT und 5 rpm in einem Rotator (Intelli Mixer RM-2M) inkubiert. Im Anschluss wurde die Matrix sedimentiert, der Überstand abgenommen und nichtgebundene Proteine durch viermaliges Waschen mit dem zehnfachen Matrixvolumen an Natrium-Kalium-Phosphatpuffer entfernt. Durch Inkubation mit *PreScission*-Protease (0,1 µg µl<sup>-1</sup> Matrix in 500 µl *PreScission-Cleavage*-Puffer) für 16 h bei 4 °C wurde Syn-Hfq von dem an die Matrix gebundenen GST-Fusionstag gespalten und dadurch eluiert. Anschließend wurde das Protein nach einer weiteren Zentrifugation abgenommen und die verbleibende Matrix viermal mit je 0,5 ml *PreScission-Cleavage*-Puffer gespült. Das Protein wurde mithilfe eines Zentrifugalkonzentrators in Natrium-Kalium-Phosphatpuffer überführt, dadurch auf eine Konzentration von ~1 mg ml<sup>-1</sup> eingestellt und bei 4 °C gelagert.

- **Natrium-Kalium-Phosphatpuffer:** 20 mM Na-K-Phosphat-Stammlösung (pH 7,6);  
20 mM NaCl; 200 mM KCl; 2 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 %  
(v/v) Glycerol
- **Na-K-Phosphat-Stammlösung (pH 7,6):** 13 ml 0,5 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 87 ml 0,5 M  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- ***PreScission-Cleavage*-Puffer:** 50 mM Tris/HCl (pH 7,0); 150 mM NaCl; 1 mM  
EDTA; 1 mM DTT

### 4.2.4.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Protein-Konzentration in wässrigen Lösungen wurde durch die Messung der Absorption bei 280 nm mithilfe des *NanoDrop* ND-1000 UV/Vis-Spektralphotometers (PeqLab) ermittelt. Für die Messungen wurde je ein absolutes Volumen von 1,5 µl eingesetzt. Der Leerwert wurde mit dem entsprechenden Volumen des verwendeten Puffers gemessen. Die Berechnung der Konzentration erfolgte durch die zugehörige *Software* (PeqLab) nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz unter Verwendung des theoretischen, molaren Extinktionskoeffizienten (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/proteincalc.html>) sowie der Molekülmasse des Proteins.

### 4.2.4.4 Größenausschlusschromatographie/ Gelfiltration

Der Oligomerisierungszustand des rekombinanten Hfq-Proteins wurde mithilfe einer Größenausschlusschromatographie analysiert. Dabei kam der *ÄktaPurifier* (GE Healthcare) als Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)-Anlage zum Einsatz.

Jeweils 100 µg des gereinigten Syn-Hfq-Proteins (siehe Abschnitt 4.2.4.2) wurden in Natrium-Kalium-Phosphatpuffer mit einer Flussrate von 0,5 ml/min auf eine in Kalium-Phosphatpuffer äquilibrierte Superdex 75 10/300 GL-Säule (GE Healthcare) aufgetragen und die Elution der Proteine bei konstanter Flussrate anhand einer Absorptionsmessung bei 280 nm verfolgt. Zur weiterführenden Analyse wurden Proteinproben in Fraktionen von je 0,5 ml gesammelt, durch DOC/TCA-Fällung (Abschnitt 4.2.4.5) konzentriert und entsprechend für die SDS-PAGE (Abschnitt 4.2.4.6) vorbereitet. Nach jedem Lauf wurde der *Gel Filtration Standard* (Biorad) unter den gleichen Bedingungen aufgetrennt.

### 4.2.4.5 DOC/TCA-Fällung von Proteinen

Für die SDS-PAGE- und Immunoblot-Analysen gesammelter Fraktionen aus der Größenausschlusschromatographie wurden die Proteine durch eine DOC/TCA-Fällung (Bensadoun & Weinstein, 1976) zunächst konzentriert. Dazu wurden die Proben jeweils mit ddH<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 1 ml aufgefüllt. Nach der Zugabe von 25 µl 2 % (w/v) DOC und sofortigem Mischen wurden 30 µl 40 % (v/v) TCA zugegeben, gemischt und die Proteine 15 min auf Eis präzipitiert. Die Ansätze wurden anschließend bei 4 °C und 16000 g für 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde daraufhin in 30 µl ChuaA-Puffer aufgenommen und mit 20 µl ChuaB-Puffer versetzt. Die Proben wurden abschließend entsprechend den Angaben in Abschnitt 4.2.4.6 für die Gelelektrophorese vorbereitet.

- **ChuaA-Puffer:** 0,1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 0,1 M DTT
- **ChuaB-Puffer:** 5 % (w/v) SDS; 30 % (w/v) Saccharose; 0,1 % (w/v) Bromphenolblau

### 4.2.4.6 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen kam in dieser Arbeit das kontinuierliche Tris-Tricin-Puffersystem nach Schagger (2006) zur Anwendung. Vorbereitend wurden die Proteinproben in Probenpuffer für 5 min bei 95 °C

## 4 MATERIAL UND METHODEN

---

inkubiert. Proteine, welche zuvor durch DOC/TCA gefällt und mit denaturierendem ChuaB-Puffer behandelt wurden (siehe Abschnitt 4.2.4.5), konnten direkt bei 95 °C denaturiert werden. Nach einer einminütigen Zentrifugation bei 16000 g wurde der lösliche Überstand auf das Polyacrylamidgel aufgetragen. Für die Abschätzung der apparenten Molekülmasse wurden parallel Referenzproteine (*PageRuler Prestained Protein Ladder*, MBI Fermentas) aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte in denaturierenden Harnstoff-SDS-Polyacrylamidgelen bei konstanter Stromstärke (20 mA pro Gel) in vertikalen Elektrophorese-Kammern (10 x 8 cm; Hoefer SE260 *Mighty Small*, Amersham). Dabei kam generell ein Stufengradient mit Polyacrylamidkonzentration von 5 % (im oberen Drittel) und 15 % (in den unteren zwei Dritteln des Gels) zum Einsatz. Im Anschluss wurden die Gele für 30 min in Coomassie-Färbelösung auf einem Flachbettschüttler geschwenkt und anschließend im Wechsel mit Fixierlösung und 7 %iger Essigsäure entfärbt. Die Dokumentation der gefärbten Proteine erfolgte mithilfe eines Durchlichtscanners (*OpticPro ST48*, Plustek). Alternativ wurden die Proteine im Rahmen von Immunoblot-Analysen auf Nitrozellulose-Membranen transferiert (siehe Abschnitt 4.2.4.7).

- **Harnstoff-SDS-Polyacrylamidgele:**
  - 5 %iges Gel: 0,5 ml Acrylamid/Bisacrylamid- (AA/BisAA-) Stammlösung; 1 ml Gelpuffer; 50 µl APS-Stammlösung; 5 µl TEMED; 2 ml ddH<sub>2</sub>O
  - 15 %iges Gel: 1,8 g Harnstoff; 1,5 ml AA/BisA-Stammlösung; 1,75 ml Gelpuffer; 25 µl APS-Stammlösung; 2,5 µl TEMED; 1 ml ddH<sub>2</sub>O
  - Gelpuffer: 3M Tris (pH 8,45); 0,3 % (w/v) SDS
  - AA/BisAA-Stammlösung: 50 % (w/v) AA/BisAA (49,5 % T/ 3 % C)
  - APS-Stammlösung: 10 % (w/v) APS in ddH<sub>2</sub>O
  
- **4x Probenpuffer:** 250 mM Tris/HCl, 40 % (w/v) Glycin, 8 % (w/v) SDS, 0,4 M DTT, 0,4 % (w/v) Bromphenolblau, pH 6,8
  
- **Laufpuffer Kathode:** 100 mM Tricin; 100 mM Tris (pH 8,25); 0,1 % (w/v) SDS
- **Laufpuffer Anode:** 100 mM Tris/HCl (pH 8,9)



- **Coomassie-Färbelösung:** 0,2 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250 (Serva);  
40 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Essigsäure
- **Fixier-Lösung:** 50 % (v/v) Ethanol (vergällt); 10 % (v/v) Essigsäure

### 4.2.4.7 Immunoblot-Analyse

Für den immunologischen Nachweis wurden per SDS-PAGE (Abschnitt 4.2.4.6) aufgetrennte Proteingemische zunächst auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Dies erfolgte durch Elektrotransfer nach Kyhse-Andersen (1984) unter Verwendung einer *Semi-Dry-Blot*-Einheit (*Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell*, Biorad). Das Polyacrylamidgel sowie eine Lage Filterpapier (Protean *xi size*, Biorad) wurden für 5 min in Kathodenpuffer, die Nitrozellulosemembran sowie eine weitere Lage Filterpapier in Anodenpuffer äquilibriert. Der Aufbau erfolgte nach Angaben des Herstellers (Biorad). Der Transfer wurde für 45 min bei einer konstanten Stromstärke von  $1 \text{ mA cm}^{-2}$  Gelfläche durchgeführt. Der Erfolg des Transfers wurde durch eine reversible Protein-Färbung (nach einer fünfminütigen Inkubation der Membran) mit Ponceau-Rot überprüft. Daraufhin wurde die Membran für 30 min bei RT in Blockierungspuffer geschwenkt, um unspezifische Bindungsstellen in der Nitrozellulosematrix für die Antikörper zu blockieren. Die Membran wurde kurz in TBST gespült und für 1 h mit dem primären Antikörper (Anti-Hfq) bei RT auf einem Flachbettschüttler inkubiert. Daraufhin wurde die Membran viermal (2 x 5 min und 2 x 15 min) mit TBST gewaschen und für 1 h bei RT mit dem an die Alkalische Phosphatase gekoppelten sekundären Antikörper (anti-Kaninchen, Sigma-Aldrich), inkubiert. Überschüssige Antikörper wurden erneut durch viermaliges Waschen mit TBST entfernt.

Die Detektion der an den Antikörper gebundenen Proteine erfolgte durch eine chromogene Nachweisreaktion der alkalischen Phosphatase. Dazu wurde die Membran mit einem frisch hergestellten Gemisch aus 10 ml AP-Puffer, 66  $\mu\text{l}$  BCIP-Lösung und 115  $\mu\text{l}$  NBT -Lösung benetzt. Die Entwicklung der Färbung erfolgte ruhend bei RT in Dunkelheit für 15 bis 60 min. Die Farbreaktion wurde schließlich durch Spülen mit ddH<sub>2</sub>O gestoppt. Die Dokumentation erfolgte mithilfe eines Durchlichtscanners (OpticPro ST48, Plustek).

- **Anodenpuffer:** 10 % (v/v) Roti®-BlotA, Roth; 20 % (v/v) Ethanol
- **Kathodenpuffer:** 10 % (v/v) Roti®-BlotK, Roth; 20 % (v/v) Ethanol

## 4 MATERIAL UND METHODEN

---

- **Ponceaulösung:** 2 % (w/v) Ponceau S in 30 % (w/v) TCA; 30 % (w/v) Sulfosalicylsäure; 1:100 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt
- **TBST:** 100 mM Tris/HCl (pH 7,5); 150 mM NaCl; 0,1 % (v/v) Tween 20
- **Blockierungspuffer:** 5 % (w/v) Milchpulver in TBST
- **BCIP-Lösung:** 10 mg ml<sup>-1</sup> BCIP in ddH<sub>2</sub>O
- **NBT-Lösung:** 10 mg ml<sup>-1</sup> NBT in 70 % (v/v) DMF
- **AP-Puffer:** 100 mM Tris/HCl (pH 9,5); 100 mM NaCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>

### 4.2.4.8 EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*)

Für die *in vitro*-Analysen von Hfq-RNA-Interaktionen wurde die markierte RNA zunächst für 1 min bei 95 °C denaturiert und anschließend kurz auf Eis abgekühlt. Die denaturierte RNA wurde in einer Endkonzentration von ~5nM zusammen mit 1 µg Hefe-tRNA (Ambion), 40 U *RiboLock RNase-Inhibitor* (MBI Fermentas) und Hfq-Protein definierter Konzentration (siehe entsprechende Abbildungen) für 30 min bei 30 °C in 1 x Strukturpuffer-DD und einem Reaktionsvolumen von 10 µl inkubiert. Direkt vor der Beladung des Gels wurden 3 µl 5 x Nativ-Ladepuffer zu den Proben gegeben. Die Elektrophorese erfolgte in nicht-denaturierenden 5 %igen Polyacrylamidgelen in 0,5 x TBE-Puffer bei 4 °C und einer konstanten Spannung von 300 V. Die Gele wurden für eine Stunde in einem Gelrockner (Biorad) auf Filterpapier getrocknet und mithilfe des *Personal Molecular Imager FX Systems* und des Programms *Quantity One* v. 4.6.3 (beides Biorad) analysiert.

- **10 x Strukturpuffer-DD:** 100 mM Tris/HCl (pH 7,5); 200 mM NaCl; 2 M KCl; 20 mM MgCl
- **5% PAG:** 5 % Rotiphorese Gel 40 (29:1) Acrylamid/Bisacrylamid (Roth); 0,5 x TBE-Puffer; 0,8 % APS; 0,1 % TEMED
- **5 x Nativ-Ladepuffer:** 50 % (v/v) Glycerol; 0,2 % (w/v) Bromphenolblau; 0,5 x TBE-Puffer

### 5 Literatur

- Aiba, H. (2007).** Mechanism of RNA silencing by Hfq-binding small RNAs. *Curr Opin Microbiol* **10**, 134-139.
- Albrecht, M. & Lengauer, T. (2004).** Novel Sm-like proteins with long C-terminal tails and associated methyltransferases. *FEBS Lett* **569**, 18-26.
- Aldridge, C., Spence, E., Kirkilionis, M. A., Frigerio, L. & Robinson, C. (2008).** Tat-dependent targeting of Rieske iron-sulphur proteins to both the plasma and thylakoid membranes in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803. *Mol Microbiol* **70**, 140-150.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997).** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389-3402.
- Altuvia, S., Weinstein-Fischer, D., Zhang, A., Postow, L. & Storz, G. (1997).** A Small, Stable RNA Induced by Oxidative Stress: Role as a Pleiotropic Regulator and Antimutator. *Cell* **90**, 43-53.
- Anantharaman, V. & Aravind, L. (2003).** New connections in the prokaryotic toxin-antitoxin network: relationship with the eukaryotic nonsense-mediated RNA decay system. *Genome Biol* **4**, R81.
- Anderson, K. L. & Dunman, P. M. (2009).** Messenger RNA Turnover Processes in *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, and Emerging Studies in *Staphylococcus aureus*. *Int J Microbiol* **2009**, 525491.
- André, G., Even, S., Putzer, H., Burguière, P., Croux, C., Danchin, A., Martin-Verstraete, I. & Soutourina, O. (2008).** S-box and T-box riboswitches and antisense RNA control a sulfur metabolic operon of *Clostridium acetobutylicum*. *Nucleic Acids Res* **36**, 5955-5969.
- Ansong, C., Yoon, H., Porwollik, S. & weitere Autoren (2009).** Global systems-level analysis of Hfq and SmpB deletion mutants in *Salmonella*: implications for virulence and global protein translation. *PLoS One* **4**, e4809.
- Argaman, L., Hershberg, R., Vogel, J., Bejerano, G., Wagner, E. G., Margalit, H. & Altuvia, S. (2001).** Novel small RNA-encoding genes in the intergenic regions of *Escherichia coli*. *Curr Biol* **11**, 941-950.
- Arluisson, V., Hohng, S., Roy, R., Pellegrini, O., Régnier, P. & Ha, T. (2007).** Spectroscopic observation of RNA chaperone activities of Hfq in post-transcriptional regulation by a small non-coding RNA. *Nucleic Acids Res* **35**, 999-1006.
- Asayama, M. (2006).** Regulatory system for light-responsive gene expression in photosynthesizing bacteria: *cis*-elements and *trans*-acting factors in transcription and post-transcription. *Biosci Biotechnol Biochem* **70**, 565-573.

- Ashby, M. K. & Houmard, J. (2006).** Cyanobacterial two-component proteins: structure, diversity, distribution, and evolution. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**, 472-509.
- Attia, A. S., Sedillo, J. L., Wang, W., Liu, W., Brautigam, C. A., Winkler, W. & Hansen, E. J. (2008).** *Moraxella catarrhalis* expresses an unusual Hfq protein. *Infect Immun* **76**, 2520-2530.
- Averhoff, B. (2004).** DNA transport and natural transformation in mesophilic and thermophilic bacteria. *J Bioenerg Biomembr* **36**, 25-33.
- Axmann, I. M., Kensche, P., Vogel, J., Kohl, S., Herzel, H. & Hess, W. R. (2005).** Identification of cyanobacterial non-coding RNAs by comparative genome analysis. *Genome Biol* **6**, R73.
- Babitzke, P. & Romeo, T. (2007).** CsrB sRNA family: sequestration of RNA-binding regulatory proteins. *Curr Opin Microbiol* **10**, 156-163.
- Balasingham, S. V., Collins, R. F., Assalkhou, R., Homberset, H., Frye, S. A., Derrick, J. P. & Tønjum, T. (2007).** Interactions between the lipoprotein PilP and the secretin PilQ in *Neisseria meningitidis*. *J Bacteriol* **189**, 5716-5727.
- Bardy, S. L., Ng, S. Y. & Jarrell, K. F. (2003).** Prokaryotic motility structures. *Microbiology* **149**, 295-304.
- Barra-Bily, L., Fontenelle, C., Jan, G., Flechard, M., Trautwetter, A., Pandey, S. P., Walker, G. C. & Blanco, C. (2010a).** Proteomic alterations explain phenotypic changes in *Sinorhizobium meliloti* lacking the RNA chaperone Hfq. *J Bacteriol* **192**, 1719-1729.
- Barra-Bily, L., Pandey, S. P., Trautwetter, A., Blanco, C. & Walker, G. C. (2010b).** The *Sinorhizobium meliloti* RNA chaperone Hfq mediates symbiosis of *S. meliloti* and alfalfa. *J Bacteriol* **192**, 1710-1718.
- Barrera, I., Schuppli, D., Sogo, J. M. & Weber, H. (1993).** Different mechanisms of recognition of bacteriophage Q beta plus and minus strand RNAs by Q beta replicase. *J Mol Biol* **232**, 512-521.
- Bartel, D. P. (2004).** MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**, 281-297.
- Beggs, J. D. (2005).** Lsm proteins and RNA processing. *Biochem Soc Trans* **33**, 433-438.
- Bensadoun, A. & Weinstein, D. (1976).** Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Anal Biochem* **70**, 241-250.
- Bensing, B. A., Meyer, B. J. & Dunny, G. M. (1996).** Sensitive detection of bacterial transcription initiation sites and differentiation from RNA processing sites in the pheromone-induced plasmid transfer system of *Enterococcus faecalis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 7794-7799.

- Bentley, W. E., Mirjalili, N., Andersen, D. C., Davis, R. H. & Kompala, D. S. (1990).** Plasmid-encoded protein: The principal factor in the "metabolic burden" associated with recombinant bacteria. *Biotechnol Bioeng* **35**, 668-681.
- Bhaya, D., Bianco, N. R., Bryant, D. & Grossman, A. (2000).** Type IV pilus biogenesis and motility in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *Mol Microbiol* **37**, 941-951.
- Bhaya, D., Takahashi, A. & Grossman, A. R. (2001a).** Light regulation of type IV pilus-dependent motility by chemosensor-like elements in *Synechocystis* PCC6803. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 7540-7545.
- Bhaya, D., Takahashi, A., Shahi, P. & Grossman, A. R. (2001b).** Novel motility mutants of *Synechocystis* strain PCC 6803 generated by *in vitro* transposon mutagenesis. *J Bacteriol* **183**, 6140-6143.
- Bhaya, D. (2004).** Light matters: phototaxis and signal transduction in unicellular cyanobacteria. *Mol Microbiol* **53**, 745-754.
- Bhaya, D., Nakasugi, K., Fazeli, F. & Burriesci, M. S. (2006).** Phototaxis and impaired motility in adenyl cyclase and cyclase receptor protein mutants of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J Bacteriol* **188**, 7306-7310.
- Birnboim, H. C. & Doly, J. (1979).** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513-1523.
- Bøggild, A., Overgaard, M., Valentin-Hansen, P. & Brodersen, D. E. (2009).** Cyanobacteria contain a structural homologue of the Hfq protein with altered RNA-binding properties. *FEBS J* **276**, 3904-3915.
- Bohn, C., Rigoulay, C. & Bouloc, P. (2007).** No detectable effect of RNA-binding protein Hfq absence in *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiol* **7**, 10.
- Boisset, S., Geissmann, T., Huntzinger, E. & weitere Autoren (2007).** *Staphylococcus aureus* RNAIII coordinately represses the synthesis of virulence factors and the transcription regulator Rot by an antisense mechanism. *Genes Dev* **21**, 1353-1366.
- Bralley, P., Chang, S. A. & Jones, G. H. (2005).** A phylogeny of bacterial RNA nucleotidyltransferases: *Bacillus halodurans* contains two tRNA nucleotidyltransferases. *J Bacteriol* **187**, 5927-5936.
- Brantl, S. (2002).** Antisense-RNA regulation and RNA interference. *Biochim Biophys Acta* **1575**, 15-25.
- Brantl, S. (2007).** Regulatory mechanisms employed by *cis*-encoded antisense RNAs. *Curr Opin Microbiol* **10**, 102-109.
- Brennan, R. G. & Link, T. M. (2007).** Hfq structure, function and ligand binding. *Curr Opin Microbiol* **10**, 125-133.

- Brescia, C. C., Mikulecky, P. J., Feig, A. L. & Sledjeski, D. D. (2003).** Identification of the Hfq-binding site on DsrA RNA: Hfq binds without altering DsrA secondary structure. *RNA* **9**, 33-43.
- Brown, L. & Elliott, T. (1996).** Efficient translation of the RpoS sigma factor in *Salmonella typhimurium* requires host factor I, an RNA-binding protein encoded by the *hfq* gene. *J Bacteriol* **178**, 3763-3770.
- Campos-Guillén, J., Bralley, P., Jones, G. H., Bechhofer, D. H. & Olmedo-Alvarez, G. (2005).** Addition of poly(A) and heteropolymeric 3' ends in *Bacillus subtilis* wild-type and polynucleotide phosphorylase-deficient strains. *J Bacteriol* **187**, 4698-4706.
- Carpousis, A. J. (2007).** The RNA degradosome of *Escherichia coli*: an mRNA-degrading machine assembled on RNase E. *Annu Rev Microbiol* **61**, 71-87.
- Carthew, R. W. & Sontheimer, E. J. (2009).** Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* **136**, 642-655.
- Casadaban, M.J. (1976).** Transposition and fusion of the *lac* genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage lambda and Mu. *J Mol Biol* **104**:541-555
- Chandran, V. & Luisi, B. F. (2006).** Recognition of enolase in the *Escherichia coli* RNA degradosome. *J Mol Biol* **358**, 8-15.
- Chao, Y. & Vogel, J. (2010).** The role of Hfq in bacterial pathogens. *Curr Opin Microbiol*.
- Choi, J. S., Chung, Y. H., Moon, Y. J., Kim, C., Watanabe, M., Song, P. S., Joe, C. O., Bogorad, L. & Park, Y. M. (1999).** Photomovement of the gliding cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Photochem Photobiol* **70**, 95-102.
- Christiansen, J. K., Larsen, M. H., Ingmer, H., Søgaard-Andersen, L. & Kallipolitis, B. H. (2004).** The RNA-binding protein Hfq of *Listeria monocytogenes*: role in stress tolerance and virulence. *J Bacteriol* **186**, 3355-3362.
- Churchill, G. A. (2002).** Fundamentals of experimental design for cDNA microarrays. *Nat Genet* **32 Suppl**, 490-495.
- Clissold, P. M. & Ponting, C. P. (2000).** PIN domains in nonsense-mediated mRNA decay and RNAi. *Curr Biol* **10**, R888-890.
- Collier, J. L. & Grossman, A. R. (1992).** Chlorosis induced by nutrient deprivation in *Synechococcus* sp. strain PCC 7942: not all bleaching is the same. *J Bacteriol* **174**, 4718-4726.
- Collins, B. M., Harrop, S. J., Kornfeld, G. D., Dawes, I. W., Curmi, P. M. & Mabbutt, B. C. (2001).** Crystal structure of a heptameric Sm-like protein complex from archaea: implications for the structure and evolution of snRNPs. *J Mol Biol* **309**, 915-923.

- Cromie, M. J., Shi, Y., Latifi, T. & Groisman, E. A. (2006).** An RNA sensor for intracellular Mg(2+). *Cell* **125**, 71-84.
- Csiszàr, K., Houmard, J., Damerval, T. & Tandeau de Marsac, N. (1987).** Transcriptional analysis of the cyanobacterial *gypABC* operon in differentiated cells: occurrence of an antisense RNA complementary to three overlapping transcripts. *Gene* **60**, 29-37.
- Dann, C. E., 3rd, Wakeman, C. A., Sieling, C. L., Baker, S. C., Irnov, I. & Winkler, W. C. (2007).** Structure and mechanism of a metal-sensing regulatory RNA. *Cell* **130**, 878-892.
- Davis, B. M. & Waldor, M. K. (2007).** RNase E-dependent processing stabilizes MicX, a *Vibrio cholerae* sRNA. *Mol Microbiol* **65**, 373-385.
- de Planell-Saguer, M., Schroeder, D. G., Rodicio, M. C., Cox, G. A. & Mourelatos, Z. (2009).** Biochemical and genetic evidence for a role of IGHMBP2 in the translational machinery. *Hum Mol Genet* **18**, 2115-2126.
- Dienst, D., Dühring, U., Mollenkopf, H. J., Vogel, J., Golecki, J., Hess, W. R. & Wilde, A. (2008).** The cyanobacterial homologue of the RNA chaperone Hfq is essential for motility of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Microbiology* **154**, 3134-3143.
- Diestra, E., Cayrol, B., Arluison, V. & Risco, C. (2009).** Cellular electron microscopy imaging reveals the localization of the Hfq protein close to the bacterial membrane. *PLoS One* **4**, e8301.
- Dietrich, M., Munke, R., Gottschald, M., Ziska, E., Boettcher, J. P., Mollenkopf, H. & Friedrich, A. (2009).** The effect of *hfq* on global gene expression and virulence in *Neisseria gonorrhoeae*. *FEBS J* **276**, 5507-5520.
- Ding, Y., Davis, B. M. & Waldor, M. K. (2004).** Hfq is essential for *Vibrio cholerae* virulence and downregulates sigma expression. *Mol Microbiol* **53**, 345-354.
- Ding, Y., Xu, L., Jovanovic, B. D., Helenowski, I. B., Kelly, D. L., Catalona, W. J., Yang, X. J., Pins, M. & Bergan, R. C. (2007).** The methodology used to measure differential gene expression affects the outcome. *J Biomol Tech* **18**, 321-330.
- Drepper, T., Raabe, K., Giaourakis, D., Gendrullis, M., Masepohl, B. & Klipp, W. (2002).** The Hfq-like protein NrfA of the phototrophic purple bacterium *Rhodobacter capsulatus* controls nitrogen fixation via regulation of *nifA* and *anfA* expression. *FEMS Microbiol Lett* **215**, 221-227.
- Douglas, S. E. (1998).** Plastid evolution: origins, diversity, trends. *Curr Opin Genet Dev* **8**, 655-661.
- Dühring, U., Axmann, I. M., Hess, W. R. & Wilde, A. (2006).** An internal antisense RNA regulates expression of the photosynthesis gene *isiA*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 7054-7058.

- Eikhom, T. S., Stockley, D. J. & Spiegelman, S. (1968).** Direct participation of a host protein in the replication of viral RNA *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **59**, 506-512.
- Eisenhut, M., von Wobeser, E. A., Jonas, L., Schubert, H., Ibelings, B. W., Bauwe, H., Matthijs, H. C. & Hagemann, M. (2007).** Long-term response toward inorganic carbon limitation in wild type and glycolate turnover mutants of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Plant Physiol* **144**, 1946-1959.
- Ermakova, S. Y., Elanskaya, I. V., Kallies, K. U., Weihe, A., Börner, T., & S.V., S. (1993).** Cloning and sequencing of mutant *psbB* genes of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Photosynth Res* **37**, 139-146.
- Fantappiè, L., Metruccio, M. M., Seib, K. L., Oriente, F., Cartocci, E., Ferlicca, F., Giuliani, M. M., Scarlato, V. & Delany, I. (2009).** The RNA chaperone Hfq is involved in stress response and virulence in *Neisseria meningitidis* and is a pleiotropic regulator of protein expression. *Infect Immun* **77**, 1842-1853.
- Folichon, M., Arluisson, V., Pellegrini, O., Huntzinger, E., Régnier, P. & Hajnsdorf, E. (2003).** The poly(A) binding protein Hfq protects RNA from RNase E and exoribonucleolytic degradation. *Nucleic Acids Res* **31**, 7302-7310.
- Folichon, M., Allemand, F., Régnier, P. & Hajnsdorf, E. (2005).** Stimulation of poly(A) synthesis by *Escherichia coli* poly(A)polymerase I is correlated with Hfq binding to poly(A) tails. *FEBS J* **272**, 454-463.
- Franche, C. & Damerval, T. (1988).** Tests on *nif* probes and DNA hybridizations. *Meth Enzym* **167**, 803-808.
- Franze de Fernandez, M. T., Eoyang, L. & August, J. T. (1968).** Factor fraction required for the synthesis of bacteriophage Qbeta-RNA. *Nature* **219**, 588-590.
- Franze de Fernandez, M. T., Hayward, W. S. & August, J. T. (1972).** Bacterial proteins required for replication of phage Q ribonucleic acid. Purification and properties of host factor I, a ribonucleic acid-binding protein. *J Biol Chem* **247**, 824-831.
- Fronzes, R., Remaut, H. & Waksman, G. (2008).** Architectures and biogenesis of non-flagellar protein appendages in Gram-negative bacteria. *EMBO J* **27**, 2271-2280.
- Fulda, S., Mikkat, S., Huang, F., Huckauf, J., Marin, K., Norling, B. & Hagemann, M. (2006).** Proteome analysis of salt stress response in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Proteomics* **6**, 2733-2745.
- Garst, A. D. & Batey, R. T. (2009).** A switch in time: detailing the life of a riboswitch. *Biochim Biophys Acta* **1789**, 584-591.
- Gao, J., Lee, K., Zhao, M., Qiu, J., Zhan, X., Saxena, A., Moore, C. J., Cohen, S. N. & Georgiou, G. (2006).** Differential modulation of *E. coli* mRNA abundance by inhibitory proteins that alter the composition of the degradosome. *Mol Microbiol* **61**, 394-406.



- Gee, J. M., Valderas, M. W., Kovach, M. E., Grippe, V. K., Robertson, G. T., Ng, W. L., Richardson, J. M., Winkler, M. E. & Roop, R. M., 2nd (2005).** The *Brucella abortus* Cu,Zn superoxide dismutase is required for optimal resistance to oxidative killing by murine macrophages and wild-type virulence in experimentally infected mice. *Infect Immun* **73**, 2873-2880.
- Geissmann, T. A. & Touati, D. (2004).** Hfq, a new chaperoning role: binding to messenger RNA determines access for small RNA regulator. *EMBO J* **23**, 396-405.
- Geng, J., Song, Y., Yang, L. & other authors (2009).** Involvement of the post-transcriptional regulator Hfq in *Yersinia pestis* virulence. *PLoS One* **4**, e6213.
- Georg, J., Voß, B., Scholz, I., Mitschke, J., Wilde, A. & Hess, W. R. (2009).** Evidence for a major role of antisense RNAs in cyanobacterial gene regulation. *Mol Syst Biol* **5**, 305.
- Ghassemian, M. & Straus, N. A. (1996).** Fur regulates the expression of iron-stress genes in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *Microbiology* **142** ( Pt 6), 1469-1476.
- Glaeser, J., Zobawa, M., Lottspeich, F. & Klug, G. (2007).** Protein synthesis patterns reveal a complex regulatory response to singlet oxygen in *Rhodobacter*. *J Proteome Res* **6**, 2460-2471.
- Golecki, J. R. (1988).** Electron microscopy of isolated microbial membranes. *Methods Microbiol* **20**, 261-282.
- Görl, M., Sauer, J., Baier, T. & Forchhammer, K. (1998).** Nitrogen-starvation-induced chlorosis in *Synechococcus* PCC 7942: adaptation to long-term survival. *Microbiology* **144** ( Pt 9), 2449-2458.
- Gottesman, S. (2004).** The small RNA regulators of *Escherichia coli*: roles and mechanisms\*. *Annu Rev Microbiol* **58**, 303-328.
- Gottesman, S. (2005).** Micros for microbes: non-coding regulatory RNAs in bacteria. *Trends Genet* **21**, 399-404.
- Grigorieva, G. & Shestakov, S. (1982).** Transformation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. 6803. *FEMS Microbiol Lett* **13**, 367-370.
- Grossman, A. R., Schaefer, M. R., Chiang, G. G. & Collier, J. L. (1993).** The phycobilisome, a light-harvesting complex responsive to environmental conditions. *Microbiol Rev* **57**, 725-749.
- Grundy, F. J. & Henkin, T. M. (2006).** From ribosome to riboswitch: control of gene expression in bacteria by RNA structural rearrangements. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **41**, 329-338.
- Guisbert, E., Rhodius, V. A., Ahuja, N., Witkin, E. & Gross, C. A. (2007).** Hfq modulates the sigmaE-mediated envelope stress response and the sigma32-mediated cytoplasmic stress response in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **189**, 1963-1973.

- Haase, J., Lurz, R., Grahn, A. M., Bamford, D. H. & Lanka, E. (1995).** Bacterial conjugation mediated by plasmid RP4: RSF1010 mobilization, donor-specific phage propagation, and pilus production require the same Tra2 core components of a proposed DNA transport complex. *J Bacteriol* **177**, 4779-4791.
- Hajnsdorf, E. & Régnier, P. (2000).** Host factor Hfq of *Escherichia coli* stimulates elongation of poly(A) tails by poly(A) polymerase I. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 1501-1505.
- Hamilton, H. L. & Dillard, J. P. (2006).** Natural transformation of *Neisseria gonorrhoeae*: from DNA donation to homologous recombination. *Mol Microbiol* **59**, 376-385.
- Hanahan, D. (1983).** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-580.
- Hansen, A. M. & Kaper, J. B. (2009).** Hfq affects the expression of the LEE pathogenicity island in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **73**, 446-465.
- Hamilton, A. J. & Baulcombe, D. C. (1999).** A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* **286**, 950-952.
- Hayes, R., Kudla, J. & Grussem, W. (1999).** Degrading chloroplast mRNA: the role of polyadenylation. *Trends Biochem Sci* **24**, 199-202.
- Hedger, J., Holmquist, P. C., Leigh, K. A., Saraff, K., Pomykal, C. & Summers, M. L. (2009).** Illumination stimulates cAMP receptor protein-dependent transcriptional activation from regulatory regions containing class I and class II promoter elements in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Microbiology* **155**, 2994-3004.
- Heidrich, N., Chinali, A., Gerth, U. & Brantl, S. (2006).** The small untranslated RNA SR1 from the *Bacillus subtilis* genome is involved in the regulation of arginine catabolism. *Mol Microbiol* **62**, 520-536.
- Heidrich, N., Moll, I. & Brantl, S. (2007).** *In vitro* analysis of the interaction between the small RNA SR1 and its primary target *ahrC* mRNA. *Nucleic Acids Res* **35**, 4331-4346.
- Hellman, L. M. & Fried, M. G. (2007).** Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein-nucleic acid interactions. *Nat Protoc* **2**, 1849-1861.
- Hengge-Aronis, R. (2002).** Recent insights into the general stress response regulatory network in *Escherichia coli*. *J Mol Microbiol Biotechnol* **4**, 341-346.
- Hermann, H., Fabrizio, P., Raker, V. A., Foulaki, K., Hornig, H., Brahms, H. & Lührmann, R. (1995).** snRNP Sm proteins share two evolutionarily conserved sequence motifs which are involved in Sm protein-protein interactions. *EMBO J* **14**, 2076-2088.
- Hernández, J. A., Muro-Pastor, A. M., Flores, E., Bes, M. T., Peleato, M. L. & Fillat, M. F. (2006).** Identification of a *furA* cis antisense RNA in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *J Mol Biol* **355**, 325-334.

- Homuth, G., Mogk, A. & Schumann, W. (1999).** Post-transcriptional regulation of the *Bacillus subtilis dnaK* operon. *Mol Microbiol* **32**, 1183-1197.
- Hopkins, J. F., Panja, S., McNeil, S. A. & Woodson, S. A. (2009).** Effect of salt and RNA structure on annealing and strand displacement by Hfq. *Nucleic Acids Res* **37**, 6205-6213.
- Horie, Y., Ito, Y., Ono, M. & other authors (2007).** Dark-induced mRNA instability involves RNase E/G-type endoribonuclease cleavage at the AU-box and SD sequences in cyanobacteria. *Mol Genet Genomics* **278**, 331-346.
- Huntzinger, E., Boisset, S., Saveanu, C. & weitere Autoren (2005).** *Staphylococcus aureus* RNAIII and the endoribonuclease III coordinately regulate *spa* gene expression. *EMBO J* **24**, 824-835.
- Inoue, H., Nojima, H. & Okayama, H. (1990).** High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**, 23-28.
- Inouye, H., Pollack, Y. & Petre, J. (1974).** Physical and functional homology between ribosomal protein S1 and interference factor i. *Eur J Biochem* **45**, 109-117.
- Järvinen, A. K., Hautaniemi, S., Edgren, H., Auvinen, P., Saarela, J., Kallioniemi, O. P. & Monni, O. (2004).** Are data from different gene expression microarray platforms comparable? *Genomics* **83**, 1164-1168.
- Jousselin, A., Metzinger, L. & Felden, B. (2009).** On the facultative requirement of the bacterial RNA chaperone, Hfq. *Trends Microbiol* **17**, 399-405.
- Kaberdin, V. R., Miczak, A., Jakobsen, J. S., Lin-Chao, S., McDowall, K. J. & von Gabain, A. (1998).** The endoribonucleolytic N-terminal half of *Escherichia coli* RNase E is evolutionarily conserved in *Synechocystis* sp. and other bacteria but not the C-terminal half, which is sufficient for degradosome assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 11637-11642.
- Kadzhaev, K., Zingmark, C., Golovliov, I., Bolanowski, M., Shen, H., Conlan, W. & Sjöstedt, A. (2009).** Identification of genes contributing to the virulence of *Francisella tularensis* SCHU S4 in a mouse intradermal infection model. *PLoS One* **4**, e5463.
- Kajitani, M. & Ishihama, A. (1991).** Identification and sequence determination of the host factor gene for bacteriophage Q beta. *Nucleic Acids Res* **19**, 1063-1066.
- Kajitani, M., Kato, A., Wada, A., Inokuchi, Y. & Ishihama, A. (1994).** Regulation of the *Escherichia coli hfq* gene encoding the host factor for phage Q beta. *J Bacteriol* **176**, 531-534.
- Kalla, R., Bhalerao, R. P. & Gustafsson, P. (1993).** Regulation of phycobilisome rod proteins and mRNA at different light intensities in the cyanobacterium *Synechococcus* 6301. *Gene* **126**, 77-83.
- Kamei, A., Yuasa, T., Orikiwa, K., Geng, X. X. & Ikeuchi, M. (2001).** A eukaryotic-type protein kinase, SpkA, is required for normal motility of the unicellular Cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J Bacteriol* **183**, 1505-1510.

- Kamei, A., Yuasa, T., Geng, X. & Ikeuchi, M. (2002).** Biochemical examination of the potential eukaryotic-type protein kinase genes in the complete genome of the unicellular Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *DNA Res* **9**, 71-78.
- Kamei, A., Yoshihara, S., Yuasa, T., Geng, X. & Ikeuchi, M. (2003).** Biochemical and functional characterization of a eukaryotic-type protein kinase, SpkB, in the cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Curr Microbiol* **46**, 296-301.
- Kaminski, P. A., Desnoues, N. & Elmerich, C. (1994).** The expression of *nifA* in *Azorhizobium caulinodans* requires a gene product homologous to *Escherichia coli* HF-I, an RNA-binding protein involved in the replication of phage Q beta RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 4663-4667.
- Kaminski, P. A. & Elmerich, C. (1998).** The control of *Azorhizobium caulinodans nifA* expression by oxygen, ammonia and by the HF-I-like protein, NrfA. *Mol Microbiol* **28**, 603-613.
- Kanesaki, Y., Suzuki, I., Allakhverdiev, S. I., Mikami, K. & Murata, N. (2002).** Salt stress and hyperosmotic stress regulate the expression of different sets of genes in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochem Biophys Res Commun* **290**, 339-348.
- Kato, J., Kim, H. E., Takiguchi, N., Kuroda, A. & Ohtake, H. (2008).** *Pseudomonas aeruginosa* as a model microorganism for investigation of chemotactic behaviors in ecosystem. *J Biosci Bioeng* **106**, 1-7.
- Kawamoto, H., Koide, Y., Morita, T. & Aiba, H. (2006).** Base-pairing requirement for RNA silencing by a bacterial small RNA and acceleration of duplex formation by Hfq. *Mol Microbiol* **61**, 1013-1022.
- Kawano, M., Aravind, L. & Storz, G. (2007).** An antisense RNA controls synthesis of an SOS-induced toxin evolved from an antitoxin. *Mol Microbiol* **64**, 738-754.
- Khusial, P., Plaag, R. & Zieve, G. W. (2005).** LSm proteins form heptameric rings that bind to RNA via repeating motifs. *Trends Biochem Sci* **30**, 522-528.
- Kilic, T., Thore, S. & Suck, D. (2005).** Crystal structure of an archaeal Sm protein from *Sulfolobus solfataricus*. *Proteins* **61**, 689-693.
- Kim, Y. H., Park, Y. M., Kim, S. J., Park, Y. I., Choi, J. S. & Chung, Y. H. (2004).** The role of Slr1443 in pilus biogenesis in *Synechocystis* sp. PCC 6803: involvement in post-translational modification of pilins. *Biochem Biophys Res Commun* **315**, 179-186.
- Kulesus, R. R., Diaz-Perez, K., Slechta, E. S., Eto, D. S. & Mulvey, M. A. (2008).** Impact of the RNA chaperone Hfq on the fitness and virulence potential of uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **76**, 3019-3026.
- Kunert, A., Vinnemeier, J., Erdmann, N. & Hagemann, M. (2003).** Repression by Fur is not the main mechanism controlling the iron-inducible *isiAB* operon in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEMS Microbiol Lett* **227**, 255-262.

- Kufel, J., Allmang, C., Petfalski, E., Beggs, J. & Tollervey, D. (2003).** Lsm Proteins are required for normal processing and stability of ribosomal RNAs. *J Biol Chem* **278**, 2147-2156.
- Kyhse-Andersen, J. (1984).** Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* **10**, 203-209.
- Landt, S. G., Abeliuk, E., McGrath, P. T., Lesley, J. A., McAdams, H. H. & Shapiro, L. (2008).** Small non-coding RNAs in *Caulobacter crescentus*. *Mol Microbiol* **68**, 600-614.
- Le Derout, J., Folichon, M., Briani, F., Deho, G., Régnier, P. & Hajnsdorf, E. (2003).** Hfq affects the length and the frequency of short oligo(A) tails at the 3' end of *Escherichia coli* *rpsO* mRNAs. *Nucleic Acids Res* **31**, 4017-4023.
- Le Derout, J., Boni, I. V., Régnier, P. & Hajnsdorf, E. (2010).** Hfq affects mRNA levels independently of degradation. *BMC Mol Biol* **11**, 17.
- Lease, R. A. & Woodson, S. A. (2004).** Cycling of the Sm-like protein Hfq on the DsrA small regulatory RNA. *J Mol Biol* **344**, 1211-1223.
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L. & Ambros, V. (1993).** The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* **75**, 843-854.
- Lee, T. & Feig, A. L. (2008).** The RNA binding protein Hfq interacts specifically with tRNAs. *RNA* **14**, 514-523.
- Legewie, S., Dienst, D., Wilde, A., Herzel, H. & Axmann, I. M. (2008).** Small RNAs establish delays and temporal thresholds in gene expression. *Biophys J* **95**, 3232-3238.
- Lennox, E. S. (1955).** Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P1. *Virology* **1**, 190-206.
- Lenz, D. H., Mok, K. C., Lilley, B. N., Kulkarni, R. V., Wingreen, N. S. & Bassler, B. L. (2004).** The small RNA chaperone Hfq and multiple small RNAs control quorum sensing in *Vibrio harveyi* and *Vibrio cholerae*. *Cell* **118**, 69-82.
- Li, Z., Pandit, S. & Deutscher, M. P. (1998).** Polyadenylation of stable RNA precursors *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 12158-12162.
- Link, T. M., Valentin-Hansen, P. & Brennan, R. G. (2009).** Structure of *Escherichia coli* Hfq bound to polyriboadenylate RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 19292-19297.
- Lisitsky, I. & Schuster, G. (1999).** Preferential degradation of polyadenylated and polyuridinylated RNAs by the bacterial exoribonuclease polynucleotide phosphorylase. *Eur J Biochem* **261**, 468-474.
- Livny, J., Teonadi, H., Livny, M. & Waldor, M. K. (2008).** High-throughput, kingdom-wide prediction and annotation of bacterial non-coding RNAs. *PLoS One* **3**, e3197.

- Mackie, G. A. (1998).** Ribonuclease E is a 5'-end-dependent endonuclease. *Nature* **395**, 720-723.
- Majdalani, N., Cuning, C., Sledjeski, D., Elliott, T. & Gottesman, S. (1998).** DsrA RNA regulates translation of RpoS message by an anti-antisense mechanism, independent of its action as an antisilencer of transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 12462-12467.
- Majdalani, N., Chen, S., Murrow, J., St John, K. & Gottesman, S. (2001).** Regulation of RpoS by a novel small RNA: the characterization of RprA. *Mol Microbiol* **39**, 1382-1394.
- Majdalani, N., Hernandez, D. & Gottesman, S. (2002).** Regulation and mode of action of the second small RNA activator of RpoS translation, RprA. *Mol Microbiol* **46**, 813-826.
- Majdalani, N., Vanderpool, C. K. & Gottesman, S. (2005).** Bacterial small RNA regulators. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **40**, 93-113.
- Mandal, M. & Breaker, R. R. (2004).** Gene regulation by riboswitches. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 451-463.
- Mandel, C. R., Bai, Y. & Tong, L. (2008).** Protein factors in pre-mRNA 3'-end processing. *Cell Mol Life Sci* **65**, 1099-1122.
- Mandin, P., Repoila, F., Vergassola, M., Geissmann, T. & Cossart, P. (2007).** Identification of new noncoding RNAs in *Listeria monocytogenes* and prediction of mRNA targets. *Nucleic Acids Res* **35**, 962-974.
- Marin, K., Kanesaki, Y., Los, D. A., Murata, N., Suzuki, I. & Hagemann, M. (2004).** Gene expression profiling reflects physiological processes in salt acclimation of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Plant Physiol* **136**, 3290-3300.
- Massé, E., Escorcia, F. E. & Gottesman, S. (2003).** Coupled degradation of a small regulatory RNA and its mRNA targets in *Escherichia coli*. *Genes Dev* **17**, 2374-2383.
- Mathews, D. H., Sabina, J., Zuker, M. & Turner, D. H. (1999).** Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure. *J Mol Biol* **288**, 911-940.
- Mattick, J. S. (2002).** Type IV pili and twitching motility. *Annu Rev Microbiol* **56**, 289-314.
- Mayes, A. E., Verdone, L., Legrain, P. & Beggs, J. D. (1999).** Characterization of Sm-like proteins in yeast and their association with U6 snRNA. *EMBO J* **18**, 4321-4331.
- McDowall, K. J., Lin-Chao, S. & Cohen, S. N. (1994).** A+U content rather than a particular nucleotide order determines the specificity of RNase E cleavage. *J Biol Chem* **269**, 10790-10796.
- McNealy, T. L., Forsbach-Birk, V., Shi, C. & Marre, R. (2005).** The Hfq homolog in *Legionella pneumophila* demonstrates regulation by LetA and RpoS and interacts with the global regulator CsrA. *J Bacteriol* **187**, 1527-1532.

- Meibom, K. L., Forslund, A. L., Kuoppa, K., Alkhuder, K., Dubail, I., Dupuis, M., Forsberg, A. & Charbit, A. (2009).** Hfq, a novel pleiotropic regulator of virulence-associated genes in *Francisella tularensis*. *Infect Immun* **77**, 1866-1880.
- Mikulecky, P. J., Kaw, M. K., Brescia, C. C., Takach, J. C., Sledjeski, D. D. & Feig, A. L. (2004).** *Escherichia coli* Hfq has distinct interaction surfaces for DsrA, rpoS and poly(A) RNAs. *Nat Struct Mol Biol* **11**, 1206-1214.
- Mitchell, P., Petfalski, E., Shevchenko, A., Mann, M. & Tollervey, D. (1997).** The exosome: a conserved eukaryotic RNA processing complex containing multiple 3'→5' exoribonucleases. *Cell* **91**, 457-466.
- Mitobe, J., Morita-Ishihara, T., Ishihama, A. & Watanabe, H. (2008).** Involvement of RNA-binding protein Hfq in the post-transcriptional regulation of *invE* gene expression in *Shigella sonnei*. *J Biol Chem* **283**, 5738-5747.
- Mohanty, B. K. & Kushner, S. R. (1999).** Analysis of the function of *Escherichia coli* poly(A) polymerase I in RNA metabolism. *Mol Microbiol* **34**, 1094-1108.
- Mohanty, B. K. & Kushner, S. R. (2000).** Polynucleotide phosphorylase functions both as a 3' right-arrow 5' exonuclease and a poly(A) polymerase in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 11966-11971.
- Mohanty, B. K., Maples, V. F. & Kushner, S. R. (2004).** The Sm-like protein Hfq regulates polyadenylation dependent mRNA decay in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **54**, 905-920.
- Mohanty, B. K. & Kushner, S. R. (2006).** The majority of *Escherichia coli* mRNAs undergo post-transcriptional modification in exponentially growing cells. *Nucleic Acids Res* **34**, 5695-5704.
- Moll, I., Afonyushkin, T., Vytvytska, O., Kaberdin, V. R. & Bläsi, U. (2003a).** Coincident Hfq binding and RNase E cleavage sites on mRNA and small regulatory RNAs. *RNA* **9**, 1308-1314.
- Moll, I., Leitsch, D., Steinhauser, T. & Bläsi, U. (2003b).** RNA chaperone activity of the Sm-like Hfq protein. *EMBO Rep* **4**, 284-289.
- Møller, T., Franch, T., Højrup, P., Keene, D. R., Bächinger, H. P., Brennan, R. G. & Valentin-Hansen, P. (2002).** Hfq: a bacterial Sm-like protein that mediates RNA-RNA interaction. *Mol Cell* **9**, 23-30.
- Monde, R. A., Schuster, G. & Stern, D. B. (2000).** Processing and degradation of chloroplast mRNA. *Biochimie* **82**, 573-582.
- Montgomery, B. L. (2007).** Sensing the light: photoreceptive systems and signal transduction in cyanobacteria. *Mol Microbiol* **64**, 16-27.
- Morita, T., Kawamoto, H., Mizota, T., Inada, T. & Aiba, H. (2004).** Enolase in the RNA degradosome plays a crucial role in the rapid decay of glucose transporter mRNA in the response to phosphosugar stress in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **54**, 1063-1075.

- Morita, T., Maki, K. & Aiba, H. (2005).** RNase E-based ribonucleoprotein complexes: mechanical basis of mRNA destabilization mediated by bacterial noncoding RNAs. *Genes Dev* **19**, 2176-2186.
- Morita, T., Mochizuki, Y. & Aiba, H. (2006).** Translational repression is sufficient for gene silencing by bacterial small noncoding RNAs in the absence of mRNA destruction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 4858-4863.
- Morita, T., Maki, K., Yagi, M. & Aiba, H. (2008).** Analyses of mRNA destabilization and translational inhibition mediated by Hfq-binding small RNAs. *Methods Enzymol* **447**, 359-378.
- Muffler, A., Fischer, D. & Hengge-Aronis, R. (1996).** The RNA-binding protein HF-I, known as a host factor for phage Qbeta RNA replication, is essential for *rpoS* translation in *Escherichia coli*. *Genes Dev* **10**, 1143-1151.
- Muffler, A., Traulsen, D. D., Fischer, D., Lange, R. & Hengge-Aronis, R. (1997).** The RNA-binding protein HF-I plays a global regulatory role which is largely, but not exclusively, due to its role in expression of the  $\sigma^S$  subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **179**, 297-300.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. & Erlich, H. (1986).** Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**, 263-273.
- Mura, C., Phillips, M., Kozhukhovskiy, A. & Eisenberg, D. (2003).** Structure and assembly of an augmented Sm-like archaeal protein 14-mer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 4539-4544.
- Myers, J., Graham, J. R. & Wang, R. T. (1980).** Light Harvesting in *Anacystis nidulans* Studied in Pigment Mutants. *Plant Physiol* **66**, 1144-1149.
- Nakamoto, H., Suzuki, N. & Roy, S. K. (2000).** Constitutive expression of a small heat-shock protein confers cellular thermotolerance and thermal protection to the photosynthetic apparatus in cyanobacteria. *FEBS Lett* **483**, 169-174.
- Nakamoto, H., Suzuki, M. & Kojima, K. (2003).** Targeted inactivation of the *hrcA* repressor gene in cyanobacteria. *FEBS Lett* **549**, 57-62.
- Nakamura, T., Naito, K., Yokota, N., Sugita, C. & Sugita, M. (2007).** A cyanobacterial non-coding RNA, Yfr1, is required for growth under multiple stress conditions. *Plant Cell Physiol* **48**, 1309-1318.
- Nakamura, Y., Kaneko, T. & Tabata, S. (2000).** CyanoBase, the genome database for *Synechocystis* sp. strain PCC6803: status for the year 2000. *Nucleic Acids Res* **28**, 72.
- Naidoo, N., Harrop, S. J., Sobti, M., Haynes, P. A., Szymczynska, B. R., Williamson, J. R., Curmi, P. M. & Mabbutt, B. C. (2008).** Crystal structure of Lsm3 octamer from *Saccharomyces cerevisiae*: implications for Lsm ring organisation and recruitment. *J Mol Biol* **377**, 1357-1371.



- Nakano, M., Takahashi, A., Su, Z., Harada, N., Mawatari, K. & Nakaya, Y. (2008).** Hfq regulates the expression of the thermostable direct hemolysin gene in *Vibrio parahaemolyticus*. *BMC Microbiol* **8**, 155.
- Nakasugi, K., Svenson, C. J. & Neilan, B. A. (2006).** The competence gene, *comF*, from *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 is involved in natural transformation, phototactic motility and piliation. *Microbiology* **152**, 3623-3631.
- Narberhaus, F., Waldminghaus, T. & Chowdhury, S. (2006).** RNA thermometers. *FEMS Microbiol Rev* **30**, 3-16.
- Nakao, H., Watanabe, H., Nakayama, S. & Takeda, T. (1995).** *yst* gene expression in *Yersinia enterocolitica* is positively regulated by a chromosomal region that is highly homologous to *Escherichia coli* host factor 1 gene (*hfq*). *Mol Microbiol* **18**, 859-865.
- Nielsen, J. S., Bøggild, A., Andersen, C. B., Nielsen, G., Boysen, A., Brodersen, D. E. & Valentin-Hansen, P. (2007).** An Hfq-like protein in archaea: crystal structure and functional characterization of the Sm protein from *Methanococcus jannaschii*. *RNA* **13**, 2213-2223.
- Nielsen, J. S., Olsen, A. S., Bonde, M., Valentin-Hansen, P. & Kallipolitis, B. H. (2008).** Identification of a  $\sigma^B$ -dependent small noncoding RNA in *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol* **190**, 6264-6270.
- Nielsen, J. S., Lei, L. K., Ebersbach, T., Olsen, A. S., Klitgaard, J. K., Valentin-Hansen, P. & Kallipolitis, B. H. (2009).** Defining a role for Hfq in Gram-positive bacteria: evidence for Hfq-dependent antisense regulation in *Listeria monocytogenes*. *Nucleic Acids Res* **38**, 907-919.
- Nikulin, A., Stolboushkina, E., Perederina, A. & weitere Autoren (2005).** Structure of *Pseudomonas aeruginosa* Hfq protein. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **61**, 141-146.
- Novick, R. P., Ross, H. F., Projan, S. J., Kornblum, J., Kreiswirth, B. & Moghazeh, S. (1993).** Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. *EMBO J* **12**, 3967-3975.
- Nudleman, E. & Kaiser, D. (2004).** Pulling together with type IV pili. *J Mol Microbiol Biotechnol* **7**, 52-62.
- Nudler, E. & Mironov, A. S. (2004).** The riboswitch control of bacterial metabolism. *Trends Biochem Sci* **29**, 11-17.
- Okamoto, S. & Ohmori, M. (2002).** The cyanobacterial PilT protein responsible for cell motility and transformation hydrolyzes ATP. *Plant Cell Physiol* **43**, 1127-1136.
- Omagari, K., Yoshimura, H., Suzuki, T., Takano, M., Ohmori, M. & Sarai, A. (2008).** DeltaG-based prediction and experimental confirmation of SYCRP1-binding sites on the *Synechocystis* genome. *FEBS J* **275**, 4786-4795.
- Olson, J. M. & Blankenship, R. E. (2004).** Thinking about the evolution of photosynthesis. *Photosynth Res* **80**, 373-386.

## 5 LITERATUR

---

- Opdyke, J. A., Kang, J. G. & Storz, G. (2004).** GadY, a small-RNA regulator of acid response genes in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **186**, 6698-6705.
- Osanai, T., Ikeuchi, M. & Tanaka, K. (2008).** Group 2 sigma factors in cyanobacteria. *Physiol Plant* **133**, 490-506.
- Panichkin, V. B., Arakawa-Kobayashi, S., Kanaseki, T., Suzuki, I., Los, D. A., Shestakov, S. V. & Murata, N. (2006).** Serine/threonine protein kinase SpkA in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 is a regulator of expression of three putative *pilA* operons, formation of thick pili, and cell motility. *J Bacteriol* **188**, 7696-7699.
- Pannekoek, Y., Huis in 't Veld, R., Hopman, C. T., Langerak, A. A., Speijer, D. & van der Ende, A. (2009).** Molecular characterization and identification of proteins regulated by Hfq in *Neisseria meningitidis*. *FEMS Microbiol Lett* **294**, 216-224.
- Papenfort, K., Said, N., Welsink, T., Lucchini, S., Hinton, J. C. & Vogel, J. (2009).** Specific and pleiotropic patterns of mRNA regulation by ArcZ, a conserved, Hfq-dependent small RNA. *Mol Microbiol* **74**, 139-158.
- Petrey, D. & Honig, B. (2003).** GRASP2: visualization, surface properties, and electrostatics of macromolecular structures and sequences. *Methods Enzymol* **374**, 492-509.
- Pfeiffer, V., Sittka, A., Tomer, R., Tedin, K., Brinkmann, V. & Vogel, J. (2007).** A small non-coding RNA of the invasion gene island (SPI-1) represses outer membrane protein synthesis from the *Salmonella* core genome. *Mol Microbiol* **66**, 1174-1191.
- Pfeiffer, V., Papenfort, K., Lucchini, S., Hinton, J. C. & Vogel, J. (2009).** Coding sequence targeting by MicC RNA reveals bacterial mRNA silencing downstream of translational initiation. *Nat Struct Mol Biol* **16**, 840-846.
- Pichon, C. & Felden, B. (2005).** Small RNA genes expressed from *Staphylococcus aureus* genomic and pathogenicity islands with specific expression among pathogenic strains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 14249-14254.
- Raps, S., Kycia, J. H., Ledbetter, M. C. & Siegelman, H. W. (1985).** Light Intensity Adaptation and Phycobilisome Composition of *Microcystis aeruginosa*. *Plant Physiol* **79**, 983-987.
- Rasmussen, A. A., Eriksen, M., Gilany, K., Udesen, C., Franch, T., Petersen, C. & Valentin-Hansen, P. (2005).** Regulation of *ompA* mRNA stability: the role of a small regulatory RNA in growth phase-dependent control. *Mol Microbiol* **58**, 1421-1429.
- Rauhut, R. & Klug, G. (1999).** mRNA degradation in bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **23**, 353-370.
- Repoila, F. & Darfeuille, F. (2009).** Small regulatory non-coding RNAs in bacteria: physiology and mechanistic aspects. *Biol Cell* **101**, 117-131.

- Resch, A., Afonyushkin, T., Lombo, T. B., McDowall, K. J., Bläsi, U. & Kaberdin, V. R. (2008).** Translational activation by the noncoding RNA DsrA involves alternative RNase III processing in the *rpoS* 5'-leader. *RNA* **14**, 454-459.
- Richaud, C., Zabulon, G., Joder, A. & Thomas, J. C. (2001).** Nitrogen or sulfur starvation differentially affects phycobilisome degradation and expression of the *nblA* gene in *Synechocystis* strain PCC 6803. *J Bacteriol* **183**, 2989-2994.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J. B., Herdman, M., & Stanier, R. Y. (1979).** Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J Gen Microbiol* **111**, 1-61.
- Robertson, G. T. & Roop, R. M., Jr. (1999).** The *Brucella abortus* host factor I (HF-I) protein contributes to stress resistance during stationary phase and is a major determinant of virulence in mice. *Mol Microbiol* **34**, 690-700.
- Rodriguez-Ezpeleta, N., Brinkmann, H., Burey, S. C., Roure, B., Burger, G., Löffelhardt, W., Bohnert, H. J., Philippe, H. & Lang, B. F. (2005).** Monophyly of primary photosynthetic eukaryotes: green plants, red algae, and glaucophytes. *Curr Biol* **15**, 1325-1330.
- Rott, R., Zipor, G., Portnoy, V., Liveanu, V. & Schuster, G. (2003).** RNA polyadenylation and degradation in cyanobacteria are similar to the chloroplast but different from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **278**, 15771-15777.
- Rutherford, K., Parkhill, J., Crook, J., Horsnell, T., Rice, P., Rajandream, M. A. & Barrell, B. (2000).** Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics* **16**, 944-945.
- Sambrook, J. & Russel, D. W. (2001).** Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd edn. *Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory*
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-5467.
- Sauer, F. G., Mulvey, M. A., Schilling, J. D., Martinez, J. J. & Hultgren, S. J. (2000).** Bacterial pili: molecular mechanisms of pathogenesis. *Curr Opin Microbiol* **3**, 65-72.
- Sauter, C., Basquin, J. & Suck, D. (2003).** Sm-like proteins in Eubacteria: the crystal structure of the Hfq protein from *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* **31**, 4091-4098.
- Sawers, R. G. (2006).** Differential turnover of the multiple processed transcripts of the *Escherichia coli* *focA-pflB* operon. *Microbiology* **152**, 2197-2205.
- Schaeffer, D., Tsanova, B., Barbas, A., Reis, F. P., Dastidar, E. G., Sanchez-Rotunno, M., Arraiano, C. M. & van Hoof, A. (2009).** The exosome contains domains with specific endoribonuclease, exoribonuclease and cytoplasmic mRNA decay activities. *Nat Struct Mol Biol* **16**, 56-62.

- Schägger, H. (2006).** Tricine-SDS-PAGE. *Nat Protoc* **1**, 16-22.
- Scheibe, M., Bonin, S., Hajnsdorf, E., Betat, H. & Mörl, M. (2007).** Hfq stimulates the activity of the CCA-adding enzyme. *BMC Mol Biol* **8**, 92.
- Schopf, J. W. & Packer, B. M. (1987).** Early Archean (3.3-billion to 3.5-billion-year-old) microfossils from Warrawoona Group, Australia. *Science* **237**, 70-73.
- Schopf, J. W. (1993).** Microfossils of the Early Archean Apex chert: new evidence of the antiquity of life. *Science* **260**, 640-646.
- Schumacher, M. A., Pearson, R. F., Møller, T., Valentin-Hansen, P. & Brennan, R. G. (2002).** Structures of the pleiotropic translational regulator Hfq and an Hfq-RNA complex: a bacterial Sm-like protein. *EMBO J* **21**, 3546-3556.
- Schuppli, D., Miranda, G., Tsui, H. C., Winkler, M. E., Sogo, J. M. & Weber, H. (1997).** Altered 3'-terminal RNA structure in phage Qbeta adapted to host factor-less *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 10239-10242.
- Schwarz, R. & Forchhammer, K. (2005).** Acclimation of unicellular cyanobacteria to macronutrient deficiency: emergence of a complex network of cellular responses. *Microbiology* **151**, 2503-2514.
- Scofield, D. G. & Lynch, M. (2008).** Evolutionary diversification of the Sm family of RNA-associated proteins. *Mol Biol Evol* **25**, 2255-2267.
- Selinger, D. W., Cheung, K. J., Mei, R., Johansson, E. M., Richmond, C. S., Blattner, F. R., Lockhart, D. J. & Church, G. M. (2000).** RNA expression analysis using a 30 base pair resolution *Escherichia coli* genome array. *Nat Biotechnol* **18**, 1262-1268.
- Séraphin, B. (1995).** Sm and Sm-like proteins belong to a large family: identification of proteins of the U6 as well as the U1, U2, U4 and U5 snRNPs. *EMBO J* **14**, 2089-2098.
- Sergeyenko, T. V. & Los, D. A. (2000).** Identification of secreted proteins of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *FEMS Microbiol Lett* **193**, 213-216.
- Sergeyenko, T. V. & Los, D. A. (2003).** Cyanobacterial leader peptides for protein secretion. *FEMS Microbiol Lett* **218**, 351-357.
- Shakhnovich, E. A., Davis, B. M. & Waldor, M. K. (2009).** Hfq negatively regulates type III secretion in EHEC and several other pathogens. *Mol Microbiol* **74**, 347-363.
- Shapiro, L., Franze de Fernandez, M. T. & August, J. T. (1968).** Resolution of two factors required in the Q-beta-RNA polymerase reaction. *Nature* **220**, 478-480.
- Sharma, C. M. & Vogel, J. (2009).** Experimental approaches for the discovery and characterization of regulatory small RNA. *Curr Opin Microbiol* **12**, 536-546.
- Sharma, C. M., Darfeuille, F., Plantinga, T. H. & Vogel, J. (2007).** A small RNA regulates multiple ABC transporter mRNAs by targeting C/A-rich elements inside and upstream of ribosome-binding sites. *Genes Dev* **21**, 2804-2817

- Shoumskaya, M. A., Paithoonrangarid, K., Kanasaki, Y., Los, D. A., Zinchenko, V. V., Tanticharoen, M., Suzuki, I. & Murata, N. (2005).** Identical Hik-Rre systems are involved in perception and transduction of salt signals and hyperosmotic signals but regulate the expression of individual genes to different extents in *Synechocystis*. *J Biol Chem* **280**, 21531-21538.
- Silvaggi, J. M., Perkins, J. B. & Losick, R. (2005).** Small untranslated RNA antitoxin in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **187**, 6641-6650.
- Silvaggi, J. M., Perkins, J. B. & Losick, R. (2006).** Genes for small, noncoding RNAs under sporulation control in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **188**, 532-541.
- Singh, A. K., Summerfield, T. C., Li, H. & Sherman, L. A. (2006).** The heat shock response in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803 and regulation of gene expression by HrcA and SigB. *Arch Microbiol* **186**, 273-286.
- Sittka, A., Pfeiffer, V., Tedin, K. & Vogel, J. (2007).** The RNA chaperone Hfq is essential for the virulence of *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* **63**, 193-217.
- Sittka, A., Lucchini, S., Papenfort, K., Sharma, C. M., Rolle, K., Binnewies, T. T., Hinton, J. C. & Vogel, J. (2008).** Deep sequencing analysis of small noncoding RNA and mRNA targets of the global post-transcriptional regulator, Hfq. *PLoS Genet* **4**, e1000163.
- Sittka, A., Sharma, C. M., Rolle, K. & Vogel, J. (2009).** Deep sequencing of *Salmonella* RNA associated with heterologous Hfq proteins *in vivo* reveals small RNAs as a major target class and identifies RNA processing phenotypes. *RNA Biol* **6**, 266-275.
- Sledjeski, D. D., Gupta, A. & Gottesman, S. (1996).** The small RNA, DsrA, is essential for the low temperature expression of RpoS during exponential growth in *Escherichia coli*. *EMBO J* **15**, 3993-4000.
- Sledjeski, D. D., Whitman, C. & Zhang, A. (2001).** Hfq is necessary for regulation by the untranslated RNA DsrA. *J Bacteriol* **183**, 1997-2005.
- Slomovic, S., Portnoy, V., Yehudai-Resheff, S., Bronshtein, E. & Schuster, G. (2008).** Polynucleotide phosphorylase and the archaeal exosome as poly(A)-polymerases. *Biochim Biophys Acta* **1779**, 247-255.
- Sohlberg, B., Huang, J. & Cohen, S. N. (2003).** The *Streptomyces coelicolor* polynucleotide phosphorylase homologue, and not the putative poly(A) polymerase, can polyadenylate RNA. *J Bacteriol* **185**, 7273-7278.
- Sonnleitner, E., Moll, I. & Bläsi, U. (2002).** Functional replacement of the *Escherichia coli* *hfq* gene by the homologue of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **148**, 883-891.
- Sonnleitner, E., Hagens, S., Rosenau, F., Wilhelm, S., Habel, A., Jäger, K. E. & Bläsi, U. (2003).** Reduced virulence of a *hfq* mutant of *Pseudomonas aeruginosa* O1. *Microb Pathog* **35**, 217-228.

- Sonnleitner, E., Napetschnig, J., Afonyushkin, T., Ecker, K., Večerek, B., Moll, I., Kaberdin, V. R. & Bläsi, U. (2004).** Functional effects of variants of the RNA chaperone Hfq. *Biochem Biophys Res Commun* **323**, 1017-1023.
- Sonnleitner, E., Schuster, M., Sorger-Domenigg, T., Greenberg, E. P. & Bläsi, U. (2006).** Hfq-dependent alterations of the transcriptome profile and effects on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **59**, 1542-1558.
- Soper, T. J. & Woodson, S. A. (2008).** The *rpos* mRNA leader recruits Hfq to facilitate annealing with DsrA sRNA. *RNA* **14**, 1907-1917.
- Sousa, S. A., Ramos, C. G., Moreira, L. M. & Leitão, J. H. (2009).** The *hfq* gene is required for stress resistance and full virulence of *Burkholderia cepacia* to the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Microbiology* **156**, 896-908.
- Southern, E. M. (1975).** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**, 503-517.
- Stark, H., Dube, P., Lührmann, R. & Kastner, B. (2001).** Arrangement of RNA and proteins in the spliceosomal U1 small nuclear ribonucleoprotein particle. *Nature* **409**, 539-542.
- Steglich, C., Futschik, M. E., Lindell, D., Voß, B., Chisholm, S. W. & Hess, W. R. (2008).** The challenge of regulation in a minimal photoautotroph: non-coding RNAs in *Prochlorococcus*. *PLoS Genet* **4**, e1000173.
- Stanier, R. Y. & Cohen-Bazire, G. (1977).** Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. *Annu Rev Microbiol* **31**, 225-274.
- Storz, G., Opdyke, J. A. & Zhang, A. (2004).** Controlling mRNA stability and translation with small, noncoding RNAs. *Curr Opin Microbiol* **7**, 140-144.
- Storz, G., Altuvia, S. & Wassarman, K. M. (2005).** An abundance of RNA regulators. *Annu Rev Biochem* **74**, 199-217.
- Studier, F. W. & Moffatt, B. A. (1986).** Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189**, 113-130.
- Sukhodolets, M. V. & Garges, S. (2003).** Interaction of *Escherichia coli* RNA polymerase with the ribosomal protein S1 and the Sm-like ATPase Hfq. *Biochemistry* **42**, 8022-8034.
- Sukhodolets, M. V., Garges, S. & Adhya, S. (2006).** Ribosomal protein S1 promotes transcriptional cycling. *RNA* **12**, 1505-1513.
- Sun, X., Zhulin, I. & Wartell, R. M. (2002).** Predicted structure and phyletic distribution of the RNA-binding protein Hfq. *Nucleic Acids Res* **30**, 3662-3671.
- Sun, X. & Wartell, R. M. (2006).** *Escherichia coli* Hfq binds A<sub>18</sub> and DsrA domain II with similar 2:1 Hfq<sub>6</sub>/RNA stoichiometry using different surface sites. *Biochemistry* **45**, 4875-4887.

- Suzuki, I., Kanasaki, Y., Hayashi, H., Hall, J. J., Simon, W. J., Slabas, A. R. & Murata, N. (2005).** The histidine kinase Hik34 is involved in thermotolerance by regulating the expression of heat shock genes in *Synechocystis*. *Plant Physiol* **138**, 1409-1421.
- 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**, 13850-13855.
- Tan, E. M. & Kunkel, H. G. (1966).** Characteristics of a soluble nuclear antigen precipitating with sera of patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* **96**, 464-471.
- Terauchi, K. & Ohmori, M. (1999).** An adenylate cyclase, Cya1, regulates cell motility in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Cell Physiol* **40**, 248-251.
- Terauchi, K. & Ohmori, M. (2004).** Blue light stimulates cyanobacterial motility via a cAMP signal transduction system. *Mol Microbiol* **52**, 303-309.
- Tharun, S. (2009).** Roles of eukaryotic Lsm proteins in the regulation of mRNA function. *Int Rev Cell Mol Biol* **272**, 149-189.
- Toledo-Arana, A., Dussurget, O., Nikitas, G. & weitere Autoren (2009).** The *Listeria* transcriptional landscape from saprophytism to virulence. *Nature* **459**, 950-956.
- Tomaras, A. P., Dorsey, C. W., Edelmann, R. E. & Actis, L. A. (2003).** Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. *Microbiology* **149**, 3473-3484.
- Tomasevic, N. & Peculis, B. A. (2002).** *Xenopus* LSm proteins bind U8 snoRNA via an internal evolutionarily conserved octamer sequence. *Mol Cell Biol* **22**, 4101-4112.
- Törö, I., Thore, S., Mayer, C., Basquin, J., Séraphin, B. & Suck, D. (2001).** RNA binding in an Sm core domain: X-ray structure and functional analysis of an archaeal Sm protein complex. *EMBO J* **20**, 2293-2303.
- Törö, I., Basquin, J., Teo-Dreher, H. & Suck, D. (2002).** Archaeal Sm proteins form heptameric and hexameric complexes: crystal structures of the Sm1 and Sm2 proteins from the hyperthermophile *Archaeoglobus fulgidus*. *J Mol Biol* **320**, 129-142.
- Tsui, H., Feng, G. & Winkler, M. (1997).** Negative regulation of *mutS* and *mutH* repair gene expression by the Hfq and RpoS global regulators of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **179**, 7476-7487.
- Tsui, H. C., Leung, H. C. & Winkler, M. E. (1994).** Characterization of broadly pleiotropic phenotypes caused by an *hfq* insertion mutation in *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol* **13**, 35-49.
- Tu, K. C. & Bassler, B. L. (2007).** Multiple small RNAs act additively to integrate sensory information and control quorum sensing in *Vibrio harveyi*. *Genes Dev* **21**, 221-233.

- Tuominen, I., Pollari, M., von Wobeser, E. A., Tyystjärvi, E., Ibelings, B. W., Matthijs, H. C. & Tyystjärvi, T. (2008).** Sigma factor SigC is required for heat acclimation of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *FEBS Lett* **582**, 346-350.
- Tzareva, N. V., Makhno, V. I. & Boni, I. V. (1994).** Ribosome-messenger recognition in the absence of the Shine-Dalgarno interactions. *FEBS Lett* **337**, 189-194.
- Ughy, B. & Ajlani, G. (2004).** Phycobilisome rod mutants in *Synechocystis* sp. strain PCC6803. *Microbiology* **150**, 4147-4156.
- Updegrove, T., Wilf, N., Sun, X. & Wartell, R. M. (2008).** Effect of Hfq on RprA-*rpos* mRNA pairing: Hfq-RNA binding and the influence of the 5' *rpos* mRNA leader region. *Biochemistry* **47**, 11184-11195.
- Urban, J. H. & Vogel, J. (2007).** Translational control and target recognition by *Escherichia coli* small RNAs *in vivo*. *Nucleic Acids Res* **35**, 1018-1037.
- Urlaub, H., Raker, V. A., Kostka, S. & Lührmann, R. (2001).** Sm protein-Sm site RNA interactions within the inner ring of the spliceosomal snRNP core structure. *EMBO J* **20**, 187-196.
- Valentin-Hansen, P., Eriksen, M. & Udesen, C. (2004).** The bacterial Sm-like protein Hfq: a key player in RNA transactions. *Mol Microbiol* **51**, 1525-1533.
- Vanderpool, C. K. & Gottesman, S. (2004).** Involvement of a novel transcriptional activator and small RNA in post-transcriptional regulation of the glucose phosphoenolpyruvate phosphotransferase system. *Mol Microbiol* **54**, 1076-1089.
- Večerek, B., Rajkowitsch, L., Sonnleitner, E., Schroeder, R. & Bläsi, U. (2008).** The C-terminal domain of *Escherichia coli* Hfq is required for regulation. *Nucleic Acids Res* **36**, 133-143.
- Večerek, B., Moll, I. & Bläsi, U. (2007).** Control of Fur synthesis by the non-coding RNA RyhB and iron-responsive decoding. *EMBO J* **26**, 965-975.
- Večerek, B., Beich-Frandsen, M., Resch, A. & Bläsi, U. (2009).** Translational activation of *rpos* mRNA by the non-coding RNA DsrA and Hfq does not require ribosome binding. *Nucleic Acids Res*.
- Viegas, S. C., Pfeiffer, V., Sittka, A., Silva, I. J., Vogel, J. & Arraiano, C. M. (2007).** Characterization of the role of ribonucleases in *Salmonella* small RNA decay. *Nucleic Acids Res* **35**, 7651-7664.
- Vogel, J., Axmann, I. M., Herzel, H. & Hess, W. R. (2003).** Experimental and computational analysis of transcriptional start sites in the cyanobacterium *Prochlorococcus* MED4. *Nucleic Acids Res* **31**, 2890-2899.
- Voß, B., Gierga, G., Axmann, I. M. & Hess, W. R. (2007).** A motif-based search in bacterial genomes identifies the ortholog of the small RNA Yfr1 in all lineages of cyanobacteria. *BMC Genomics* **8**, 375.



- Voß, B., Georg, J., Schön, V., Ude, S. & Hess, W. R. (2009).** Biocomputational prediction of non-coding RNAs in model cyanobacteria. *BMC Genomics* **10**, 123.
- Vogel, J., Argaman, L., Wagner, E. G. & Altuvia, S. (2004).** The small RNA IstR inhibits synthesis of an SOS-induced toxic peptide. *Curr Biol* **14**, 2271-2276.
- Vytvytska, O., Jakobsen, J. S., Balcunaite, G., Andersen, J. S., Baccarini, M. & von Gabain, A. (1998).** Host factor I, Hfq, binds to *Escherichia coli ompA* mRNA in a growth rate-dependent fashion and regulates its stability. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 14118-14123.
- Vytvytska, O., Moll, I., Kaberdin, V. R., von Gabain, A. & Bläsi, U. (2000).** Hfq (HF1) stimulates *ompA* mRNA decay by interfering with ribosome binding. *Genes Dev* **14**, 1109-1118.
- Wagner, E. G. & Simons, R. W. (1994).** Antisense RNA control in bacteria, phages, and plasmids. *Annu Rev Microbiol* **48**, 713-742.
- Wahba, A. J., Miller, M. J., Niveleau, A., Landers, T. A., Carmichael, G. G., Weber, K., Hawley, D. A. & Slobin, L. I. (1974).** Subunit I of Q beta replicase and 30 S ribosomal protein S1 of *Escherichia coli*. Evidence for the identity of the two proteins. *J Biol Chem* **249**, 3314-3316.
- Waksman, G. & Hultgren, S. J. (2009).** Structural biology of the chaperone-usher pathway of pilus biogenesis. *Nat Rev Microbiol* **7**, 765-774.
- Waters, L. S. & Storz, G. (2009).** Regulatory RNAs in bacteria. *Cell* **136**, 615-628.
- Watson, J. D. & Milner-White, E. J. (2002).** A novel main-chain anion-binding site in proteins: the nest. A particular combination of phi,psi values in successive residues gives rise to anion-binding sites that occur commonly and are found often at functionally important regions. *J Mol Biol* **315**, 171-182.
- Will, C. L. & Lührmann, R. (2001).** Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function. *Curr Opin Cell Biol* **13**, 290-301.
- Wolk, C. P., Vonshak, A., Kehoe, P. & Elhai, J. (1984).** Construction of shuttle vectors capable of conjugative transfer from *Escherichia coli* to nitrogen-fixing filamentous cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 1561-1565.
- Wilusz, C. J. & Wilusz, J. (2005).** Eukaryotic Lsm proteins: lessons from bacteria. *Nat Struct Mol Biol* **12**, 1031-1036.
- Worrall, J. A., Górna, M., Crump, N. T., Phillips, L. G., Tuck, A. C., Price, A. J., Bavro, V. N. & Luisi, B. F. (2008).** Reconstitution and analysis of the multienzyme *Escherichia coli* RNA degradosome. *J Mol Biol* **382**, 870-883.
- Xu, M. & Su, Z. (2009).** Computational prediction of cAMP receptor protein (CRP) binding sites in cyanobacterial genomes. *BMC Genomics* **10**, 23.

- Yehudai-Resheff, S., Portnoy, V., Yogev, S., Adir, N. & Schuster, G. (2003).** Domain analysis of the chloroplast polynucleotide phosphorylase reveals discrete functions in RNA degradation, polyadenylation, and sequence homology with exosome proteins. *Plant Cell* **15**, 2003-2019.
- Yoshihara, S., Suzuki, F., Fujita, H., Geng, X. X. & Ikeuchi, M. (2000).** Novel putative photoreceptor and regulatory genes required for the positive phototactic movement of the unicellular motile cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Cell Physiol* **41**, 1299-1304.
- Yoshihara, S., Geng, X., Okamoto, S., Yura, K., Murata, T., Go, M., Ohmori, M. & Ikeuchi, M. (2001).** Mutational analysis of genes involved in pilus structure, motility and transformation competency in the unicellular motile cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Cell Physiol* **42**, 63-73.
- Yoshihara, S., Geng, X. & Ikeuchi, M. (2002).** *pilG* Gene cluster and split *pilL* genes involved in pilus biogenesis, motility and genetic transformation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Cell Physiol* **43**, 513-521.
- Yoshihara, S. & Ikeuchi, M. (2004).** Phototactic motility in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Photochem Photobiol Sci* **3**, 512-518.
- Yoshimura, H., Yanagisawa, S., Kanehisa, M. & Ohmori, M. (2002a).** Screening for the target gene of cyanobacterial cAMP receptor protein SYCRP1. *Mol Microbiol* **43**, 843-853.
- Yoshimura, H., Yoshihara, S., Okamoto, S., Ikeuchi, M. & Ohmori, M. (2002b).** A cAMP receptor protein, SYCRP1, is responsible for the cell motility of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Cell Physiol* **43**, 460-463.
- Zang, X., Liu, B., Liu, S., Arunakumara, K. K. & Zhang, X. (2007).** Optimum conditions for transformation of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J Microbiol* **45**, 241-245.
- Zhang, A., Altuvia, S., Tiwari, A., Argaman, L., Hengge-Aronis, R. & Storz, G. (1998).** The OxyS regulatory RNA represses *rpos* translation and binds the Hfq (HF-I) protein. *EMBO J* **17**, 6061-6068.
- Zhang, A., Wassarman, K. M., Ortega, J., Steven, A. C. & Storz, G. (2002).** The Sm-like Hfq protein increases OxyS RNA interaction with target mRNAs. *Mol Cell* **9**, 11-22.
- Zhang, A., Wassarman, K. M., Rosenow, C., Tjaden, B. C., Storz, G. & Gottesman, S. (2003).** Global analysis of small RNA and mRNA targets of Hfq. *Mol Microbiol* **50**, 1111-1124.
- Zhang, X., Zhao, F., Guan, X., Yang, Y., Liang, C. & Qin, S. (2007).** Genome-wide survey of putative serine/threonine protein kinases in cyanobacteria. *BMC Genomics* **8**, 395.
- Zinchenko, V. V., Piven, I. V., Melnik, V. A., & Shestakov, S. V. (1999).** Vectors for the complementation analysis of cyanobacterial mutants. *Russ J Genet* **35**, 228-232.
- Zuker, M. (2003).** Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* **31**, 3406-3415.

---

## Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Begriff
°C	Grad Celsius
μ	Mikro [ $10^{-6}$ ]
A	Ampere
Å	Ångström
A, C, G, T, U	Nukleinbasen der DNA und/oder RNA
AA	Acrylamid
Amp	Ampicillin
<i>Anabaena</i>	<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 (auch: <i>Nostoc</i> sp. PCC 7120)
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
asRNA	<i>antisense</i> RNA
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
BisAA	Bisacrylamid
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	<i>complementary</i> DNA
Chl	Chlorophyll
Ci	Curie
Cm	Chloramphenicol
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Cy	<i>Cyanine</i>

---

d.h.	das heißt
dCTP	Desoxy-Cytosintriphosphat
ddH <sub>2</sub> O	zweifach destilliertes Wasser
DMF	Dimethylfuran
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DOC	Deoxycholat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EBI	European Bioinformatics Institute
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMBL	<i>European Molecular Biology Laboratory</i>
EMSA	<i>electrophoretic mobility shift assay</i>
<i>et al.</i>	<i>et alia</i> (und andere)
EtBr	Ethidiumbromid
Fc	<i>Fold change</i> (x - fache Änderung)
FRET	Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer
g	Gravitationsbeschleunigung
ggf.	gegebenenfalls
Glc	Glukose
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HEPES	Hydroxyethylpiperazinethanesulfonsäure
HF-I	<i>Host factor I</i>
Hfq	<i>Host factor Q</i>

---

---

HL	Starklicht
Hpr	Hfq regulierte putative sRNA
IGR	intergenische Region
IPTG	Isopropyl-thio- $\beta$ -D-Galaktopyranosid
IsiA	<i>iron stressed induced protein A</i>
IsrR	<i>iron stress repressed RNA</i>
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
Km	Kanamycin
Ko-IP	Ko-Immunopräzipitation
l	Liter
LB	<i>lysogeny broth</i>
LL	Schwachlicht
log	Logarithmus
m	Meter bzw. milli ( $10^{-3}$ )
M	Molar ( $\text{mol l}^{-1}$ )
Mb	Megabasen ( $10^6$ )
MCP	<i>methyl accepting chemotaxis protein</i>
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MEN	MOPS-EDTA-Natrium-Acetat-Puffer
min	Minuten
miRNA	<i>micro-RNA</i>
ML	mittlere Lichtintensität
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
MPI	Max-Planck-Institut
MQ-H2O	MilliQ- / Reinstwasser (zweifach deionisiert + filtriert)
mRNA	<i>messenger RNA</i> (Boten-RNA)
MV	Methylviologen
n	Nano ( $10^{-9}$ )

---

---

NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nt	Nukleotide
OD	optische Dichte
ORF	open reading frame (offener Leserahmen)
p.a	<i>pro analysi</i>
PAG	Polyacrylamidgel
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PC	Phycocyanin
PCC	<i>Pasteur Culture Collection</i>
PCI	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDB	<i>protein data bank</i>
Pfam	<i>protein families</i> ; Protein-Datenbank
pH	<i>potentia Hydrogenii</i>
p	pico ( $10^{-12}$ )
<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
RACE	<i>rapid amplification of cDNA ends</i>
RBS	Ribosomenbindungsstelle
rev. kompl.	revers komplementär
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNP	Ribonukleoproteinkomplex
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
RT	Reverse Transkription/reverse Transkriptase bzw. Raumtemperatur
S	Svedberg-Sedimentationskoeffizient
<i>S. elongatus</i>	<i>Synechococcus elongatus</i> PCC 6301

---

---

<i>S. typhimurium</i>	<i>Salomonella typhimurium</i>
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
<i>Salmonella</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
SDS	<i>Sodium</i> (Natrium)-dodecylsulfat
sec	Sekunden
siRNA	<i>short interfering RNA</i>
snRNA	<i>small nucleolar RNA</i>
snRNP	<i>small nuclear ribonucleoprotein particle</i>
sp.	Spezies
sRNA	<i>small RNA</i> ; kleine (transkodierte) RNA
<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Sycrp1	<i>Synechocystis cAMP receptor protein</i>
Sycrp1	<i>Synechocystis cAMP receptor protein</i>
<i>Synechocystis</i>	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803
<i>T. elongatus</i>	<i>Thermosynechococcus elongatus</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TAP	<i>tobacco acid pyrophosphatase</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TBST	<i>Tris-buffered saline</i> mit Tween 20
TCA	Trichloressigsäure
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEMED	N, N, N, N-Tetramethylethylendiamin
Term.	(Transkriptions-)Terminator
TES	Tris(hydroxymethyl)methylaminoethansulfonsäure
tmRNA	<i>transfer-messenger-RNA</i>
Tricin	N-Tris-(hydroxymethyl)-methyl-glycin
Tris	Tris-(hydroxylmethyl)-aminomethan

---

---

tRNA	<i>transfer-RNA</i>
U	unit
u.a.	unter anderem
UPEC	<i>Uropathogenic Escherichia coli</i>
UTP	Uridintriphosphat
UTR	<i>untranslated region</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
v.a.	vor allem
v/v	Volumenteil pro Gesamtvolumen
Verd.	Verdünnung
vgl.	vergleiche
Vol.	Volumen
vs.	<i>versus</i>
w/v	Massenanteil pro Gesamtvolumen
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -Dgalactopyranosid
Yfr	<i>cyanobacterial functional RNA</i>
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil



---

## Publikationsliste

**Dienst, D., Dühring, U., Mollenkopf, H. J., Vogel, J., Golecki, J., Hess, W. R. & Wilde, A. (2008).** The cyanobacterial homologue of the RNA chaperone Hfq is essential for motility of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Microbiology* **154**, 3134-3143.

**Legewie, S., Dienst, D., Wilde, A., Herzel, H. & Axmann, I. M. (2008).** Small RNAs establish delays and temporal thresholds in gene expression. *Biophys J* **95**, 3232-3238.

**Peter, E., Salinas, A., Wallner, T., Jeske, D., Dienst, D., Wilde, A., Grimm, B. (2009).** Differential requirement of two homologous proteins encoded by *sll1214* and *sll1874* for the reaction of Mg protoporphyrin monomethylester oxidative cyclase under aerobic and micro-oxic growth conditions. *Biochim Biophys Acta* **1787**, 1458-1467.

## Konferenz-Vorträge

**Dienst, D., Dühring, U., Mollenkopf, H.J., Golecki, J., Georg, J., Voß, B., Hess, W.R., Wilde, A. (2008).** Phototactic motility of *Synechocystis* PCC 6803: Requirement of the RNA chaperone Hfq. 7<sup>th</sup> *European Workshop on the Molecular Biology of Cyanobacteria* (31. 08 – 03.09 2008) in Česke Budějovice (Tschechien).

**Dienst, D., Dühring, U., Mollenkopf, H.J., Golecki, J., Georg, J., Voß, B., Hess, W.R., Wilde, A. (2008).** Function of the RNA chaperone Hfq in *Synechocystis* PCC 6803. „SPP 1258: *Sensory and Regulatory RNAs in Prokaryotes*” progress report meeting (16.-18. 09. 2008) in Kassel.

**Dienst, D., Georg, J., Schürgers, N., Wallner, T., Hess, W.R., Wilde, A. (2010).** Identification and functional analysis of putative Hfq dependent ncRNAs in *Synechocystis* PCC 6803. VAAM-Jahrestagung 2010 (28.-31.03 2010) in Hannover.

## Konferenz-Poster

**Dienst, D., Wallner, T., Voß, B., Georg, J., Gierga, G., Axmann, I.M., Hess, W.R., Wilde, A. (2007).** Yfr1 and IsrR - two small regulatory RNAs in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. „SPP 1258: *Sensory and Regulatory RNAs in Prokaryotes*” kick-off-meeting, 05.-06. 09. 2007 in Bochum.

**Dienst, D., Georg, J., Schürgers, N., Wallner, T., Hess, W.R., Wilde, A. (2009).** Identification and functional analysis of putative Hfq dependent ncRNAs in *Synechocystis* sp. PCC 6803. „SPP 1258: *Sensory and Regulatory RNAs in Prokaryotes*” international meeting (03.-06.06, 2009) in Berlin.

---

## **Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Alle Stellen der Arbeit, die wörtlich oder sinngemäß aus anderen Quellen übernommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht. Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegt. Die dem Verfahren zugrundeliegende Promotionsordnung ist mir bekannt.

Berlin, den 14. April 2009

---

## Danksagung

Zunächst und im Besonderen danke ich Herrn Prof. Lockau für die Möglichkeit, mein Promotionsthema in seiner Arbeitsgruppe ausgiebig zu bearbeiten. Daneben gilt mein Dank allen weiteren (auch ehemaligen) MitarbeiterInnen für die ständige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft, sowie für die insgesamt außerordentlich angenehme Arbeitsatmosphäre in Labor, Büro und Pausenraum. Dabei möchte ich Gisa Baumert und Sabine Nicklisch aufgrund der tatkräftigen Unterstützung vieler meiner Vorhaben namentlich hervorheben. Außerdem richtet sich mein spezieller Dank an Ilka Axmann, Dr. Volkmer und Frau Dr. Gründel für zahlreiche Anregungen und Inspirationen, welche das Gelingen meiner Experimente voranzutreiben vermochten.

Den allergrößten Dank verdient an dieser Stelle Annegret Wilde für ihre herausragende Betreuung sowie für ihre wertvolle Gabe, mir auch während glückloser Phasen mithilfe der richtigen Ratschläge immer wieder frische Motivation einhauchen zu können.

Weiterhin richtet sich mein Dank an die an dieser Arbeit beteiligten Diplomanden Thomas Wallner und Nils Schürgers sowie an Lydia Kretschmar, die im Rahmen ihrer Bachelor-Arbeit wertvolle Beiträge liefern konnte.

Zudem danke ich Wolfgang Hess und dessen Arbeitsgruppe für die insgesamt angenehme und fruchtbare Zusammenarbeit im Rahmen des sRNA-Projekts. Ich danke ferner Hans Mollenkopf und seinem Team für die Durchführung der *Microarray*-Experimente sowie Dr. Jochen Golecki für die TEM-Bilder. Aus der Arbeitsgruppe von Dr. Jörg Vogel danke ich Alexandra Sittka für die Zusammenarbeit bei den Komplementierungsversuchen, Nelly Said für die Einführung in die EMSA-Technik sowie Cynthia Sharma für die 454-Sequenzierung.

Special thanks go to Cheryl Kerfeld for the crystal structure of the Hfq protein and in particular for providing me deeper insights into the world of structural biology.

Schließlich bedanke ich mich bei Anika Wiegard, die mich immer unterstützt hat und vergeblich versuchte, Rechtschreibfehler in dieser Arbeit aufzuspüren. ;-)

Familie und Freunden sei ohnehin gedankt.

---

## **Lebenslauf**

Der Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version dieser Arbeit nicht veröffentlicht.