

Charakterisierung der sRNAs RybA und HB_428 unter Peroxid-Stress in *Escherichia coli*

DISSERTATION

Zur Erlangung des akademischen Grades Doktor der Naturwissenschaften
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Kirstin Gerstle
aus Henstedt-Ulzburg

Hamburg
2011

Die vorgelegte Arbeit wurde von März 2008 bis Oktober 2011 am Institut für Biochemie und Molekularbiologie des Fachbereichs Chemie der Fakultät Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften an der Universität Hamburg unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Ulrich Hahn durchgeführt.

Gutachter:

Herr Prof. Dr. Ulrich Hahn

Herr Prof. Dr. Reinhard Bredehorst

Tag der Disputation: 09.12.2011

Für meine Lieben

Inhaltverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
Abstract	VIII
Kurzfassung.....	X
1 Einleitung	1
1.1 Kleine nicht-codierende RNAs.....	1
1.2 Die Rolle von sRNAs in Bakterien.....	2
1.2.1 Die Rolle von sRNAs in der Genregulation.....	3
1.2.2 Die Rolle von sRNAs unter Stressbedingungen	9
1.3 Identifizierung von sRNAs	12
1.4 Target-Identifizierung von sRNAs in Bakterien.	16
1.5 Oxidativer Stress in Bakterien	20
1.6 Zielsetzung.....	22
2 Material	23
2.1 Chemikalien.....	23
2.2 Puffer, Lösungen und Medien	23
2.3 Enzyme	25
2.4 Protein– RNA- und DNA-Längenstandards.....	26
2.5 Kommerziell erhältliche Kits.....	26
2.6 Nucleotide und Radionucleotide	27
2.7 Bakterienstämme	27
2.8 Plasmide.....	28
2.9 Synthetische Oligonucleotide	30
3 Methoden.....	34
3.1 Methoden zur Analyse von Nucleinsäuren.....	34
3.1.1 Native Polyacrylamidgelelektrophorese	34
3.1.2 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese	35

3.1.3	Native Agarose-Gelelektrophorese	35
3.1.4	Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese	36
3.1.5	Nachweis von Nucleinsäuren mittels Ethidiumbromidfärbung	36
3.1.6	Detektion von Nucleinsäuren durch UV- <i>shadowing</i>	37
3.1.7	Detektion von Nucleinsäuren mittels Autoradiographie	37
3.1.8	Northern-Blot-Analysen	37
3.2	Methoden zur Isolierung und Reinigung von Nucleinsäuren	39
3.2.1	Diffusionselution von Nucleinsäuren aus Polyacrylamidgelen	39
3.2.2	Reinigung von Nucleinsäuren über Micro Bio-Spin® P30/P 6 Säulen	39
3.2.3	Reinigung von DNA-Fragmenten mittels PCR <i>purification kit</i>	39
3.2.4	Reinigung von Nucleinsäuren mittels Phenol-Chloroform Extraktion	39
3.2.5	Alkoholpräzipitation von Nucleinsäuren	40
3.2.6	Konzentrations- und Reinheitsbestimmungen von Nucleinsäuren	40
3.2.7	Heiße Phenol Extraktion zur Isolierung von Total-RNA aus <i>E. coli</i>	40
3.2.8	Isolierung von genomischer DNA aus <i>E. coli</i>	41
3.2.9	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	42
3.3	Methoden zur Präparation von Nucleinsäuren	42
3.3.1	Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	42
3.3.2	<i>In vitro</i> T7 Transkription	45
3.3.3	Ortsspezifische Mutagenese	45
3.3.4	Sequenzierung von Plasmid-DNA	46
3.3.5	Dephosphorylierung von Nucleinsäuren	47
3.3.6	Radioaktive 5'-Markierung von Nucleinsäuren	47
3.3.7	Radioaktive Markierung von DNA mittels <i>random priming</i>	49
3.4	Bestimmung des 5'-Endes mittels <i>primer extension</i>	49
3.5	Bestimmung des 3'- Endes mittels <i>rapid amplification of cDNA ends</i> (RACE)	51
3.6	Klonierungstechniken	52
3.6.1	Enzymatische Spaltung von Nucleinsäuren	52
3.6.2	Ligation	53

Inhaltsverzeichnis

3.6.3	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen für die Elektroporation	53
3.6.4	Transformation von <i>E. coli</i> Zellen mittels Elektroporation	53
3.7	Kultivierung von Bakterien	54
3.7.1	Zellanzucht	54
3.7.2	Messung des Bakterienwachstums	54
3.7.3	Kultivierung von <i>E. coli</i> unter verschiedenen Bedingungen	54
3.7.4	Lagerung von Bakterienkulturen	56
3.8	Konstruktion von <i>E. coli</i> Knock-out Stämmen	56
3.9	Proteinproduktion und Reinigung in <i>E. coli</i>	57
3.9.1	Produktion des TyrR Proteins in <i>E. coli</i> BL21 Star Zellen	57
3.9.2	Reinigung des TyrR Proteins mittels Nickel-Affinitätschromatographie	57
3.9.3	Reinigung des TyrR Proteins mittels Anionenaustauschchromatographie	58
3.10	Methoden zur Proteinanalyse	58
3.10.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)	58
3.10.2	Coomassie Brilliant Blue Färbung	59
3.10.3	Proteinbestimmung nach Bradford	59
3.11	Microarray-Analyse zur Target-Identifizierung von sRNAs	60
3.12	<i>Gel shift</i> -Assay	60
4	Ergebnisse	62
4.1	Charakterisierung der sRNA RybA und HB_428	62
4.1.1	Expression von <i>rybA</i> unter verschiedenen Wachstumsbedingungen	62
4.1.2	Konstruktion von <i>E. coli</i> Knock-out Mutanten	64
4.1.3	Überexpression von <i>rybA</i> und HB_428	67
4.1.4	Bestimmung des 5'-Ende von RybA und HB_428	69
4.1.5	Bestimmung des 3'- Endes von RybA und HB_428	75
4.1.6	Regulation der Expression von <i>rybA</i> unter Peroxid-Stress	82
4.2	Microarray-Analysen zur Targetidentifizierung	84
4.3	Verifizierung der Microarray-Ergebnisse mittels Northern-Blot	90

Inhaltsverzeichnis

4.3.1	Analyse möglicher HB_428 Targets	90
4.3.2	Analyse möglicher RybA Targets	92
4.4	Charakterisierung der RybA- <i>yliL</i> mRNA Interaktionen	94
4.5	RybA und das TyrR Regulon	99
4.5.1	Einfluss von RybA auf die Expression des <i>aroF</i> - und <i>aroL</i> -Operon.....	100
4.5.2	Vergleichende Analyse eines TyrR ⁻ Stammes und der KO-Mutante Δ rybA...	106
4.5.3	Produktion und Reinigung des TyrR Proteins.....	111
4.5.4	<i>Gel shift</i> -Assays zur Analyse der TyrR-RybA Interaktion	115
5	Diskussion	120
5.1	Charakterisierung der sRNA HB_428	120
5.2	Analyse möglicher Targets von HB_428	125
5.3	Charakterisierung der sRNA RybA	126
5.4	Analyse der RybA- <i>yliL</i> Interaktion	132
5.5	Die Rolle von RybA im TyrR-Regulon.....	136
6	Ausblick	147
	Literaturverzeichnis.....	150
	Anhang	158
	Danksagung.....	167
	Selbständigkeitserklärung	169
	Lebenslauf	170

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ad	auffüllen auf
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxydisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
<i>aqua dest.</i>	<i>aqua destillata</i>
b	Basen
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
°C	Grad Celsius
cDNA	<i>copy</i> DNA
Ci	Curie
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonucleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
DNase	Desoxyribonuclease
dNTP	2'-Desoxynucleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde
HCl	Salzsäure
IGR	Intergenische Region
kDa	Kilodalton
LB	Luria Broth
M	Molar
min ´	Minute
mM	Millimolar
µM	Mikromolar

Abkürzungsverzeichnis

ncRNA	<i>non-coding</i> RNA
nM	Nanomolar
miRNA	<i>micro</i> RNA
mRNA	<i>messenger</i> RNA
NaOH	Natriumhydroxid
NTPs	Nucleosid-5'-triphosphate
nt	Nucleotide
OD ₆₀₀	Optische Dichte, gemessen bei 600 nm
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	Wasserstoffionen-Konzentration (<i>potentia hydrogenii</i>)
PNK	Polynucleotidkinase
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	Ribonucleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNase	Ribonuclease
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
s	Sekunde
ssDNA	Einzelsträngige DNA (single stranded DNA)
SDS	Natriumdodecylsulfat
sRNA	<i>small</i> RNA
siRNA	<i>small interfering</i> RNA
snoRNA	<i>small nucleolar</i> RNA
<i>S. Typhimurium</i>	<i>Salmonella enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i>
Tab.	Tabelle
<i>Taq</i>	<i>Thermus Aquaticus</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	<i>transfer</i> RNA
U	Unit
UV	Ultraviolett

Abkürzungsverzeichnis

V	Volt
v/v	Volumenanteil (<i>volume-volume percentage</i>)
w/v	Massenanteil (<i>weight-volume percentage</i>)
W	Watt
WT	Wildtyp

Abstract

Small non-coding RNAs (sRNAs) were found in all bacterial species investigated so far. They are mainly involved in the adaption to changes of environmental conditions and in stress response. Predominantly they do so by regulating gene expression at the post-transcriptional level via base-pairing with mRNAs. Outcomes of these base-pairings include activation or repression of translation and/or de- or stabilization of the mRNA. In addition there are few examples of sRNAs, which interact with a protein by mimicking other nucleic acids. This leads to inhibition of protein function.

To date approximately 80-100 sRNAs are known to be expressed in *E. coli*, but the function of only half of them has been determined. Moreover several hundreds were predicted with computational approaches in *E. coli* and other bacteria. The verification of the majority is still missing.

This thesis reports the characterization of the sRNA RybA and the predicted sRNA HB_428. Using northern analysis it was demonstrated that *rybA* is primarily expressed under peroxide stress. Previous experiments for HB_428 have shown that this RNA was also expressed under this condition among others. Using primer extension the 5' end of both sRNA was determined. 3'- RACE experiments were successfully used to map the 3' end of RybA under peroxide stress. Under peroxide stress RybA is 206 nt in size whereas larger species were observed under non-stress conditions. HB_428 appeared in three different species of approximately 120, 210 and 320 nt.

For target identification microarray analysis was used to compare gene expression of *rybA* and HB_428 deletion strains with *E. coli* wild type strain. For HB_428 no results of the microarray analysis could be confirmed by northern analysis. In the case of RybA two types of targets could be confirmed by northern analysis. First, RybA seems to act as a *cis*-encoded antisense RNA, which down regulates the expression of *yliL*, the gene which is encoded antisense to *rybA*. The function of YliL has to be elucidated since no information about this protein is available until now. However, *yliL* has no influence in the second regulation pathway of RybA.

Under peroxide stress RybA takes also part in the regulation of key genes involved in aromatic amino acid biosynthesis. In *E. coli* wild type cells the expression of these genes is repressed under peroxide stress. Deletion of RybA led to an up-regulation of gene expression

Abstract

under peroxide stress. It could be demonstrated that this regulation is dependent on the transcriptional regulator protein TyrR.

The mechanism of repression by RybA of the genes involved in the aromatic amino acid metabolism as well as its physiological role will be subject to further investigations.

Kurzfassung

Kleine nicht-codierende RNAs (sRNAs) spielen in Bakterien eine wichtige Rolle in der Anpassung an veränderte Umweltbedingungen oder in der Stressantwort. Sie regulieren in Antwort auf externe oder interne Stimuli die Genexpression auf post-transkriptioneller Ebene. Der Großteil der heute bekannten sRNAs agiert über Basenpaarung mit einer mRNA. Dies kann zu einer Aktivierung oder Inhibierung der Translation oder zu einer Änderung der Stabilität der mRNA führen. Dazu gibt es Beispiele für sRNAs, die durch Bindung an Proteine deren Aktivitäten beeinflussen.

In *E. coli* sind zurzeit ca. 80-100 sRNAs bekannt, wobei der Hälfte bis jetzt noch keine Funktion zugewiesen werden konnte. Des Weiteren wurden durch bioinformatische Methoden mehrere hundert sRNAs in *E. coli* und anderen Bakterienarten vorhergesagt. Die experimentelle Validierung wurde jedoch nur für einen kleinen Teil der vorhergesagten sRNAs durchgeführt.

Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der sRNA RybA und der vorhergesagten sRNA HB_428. Die Analyse der Expression von *rybA* mittels Northern-Blot unter verschiedenen Wachstumsbedingungen ergab, dass diese sRNA besonders stark unter Peroxid-Stress produziert wird. Für HB_428 konnte eine verstärkte Expression unter dieser Bedingung zuvor schon gezeigt werden.

Für beide RNAs wurden erfolgreich die Transkriptionsstartpunkte mittels *primer extension* bestimmt. Das 3'-Ende der sRNA RybA wurde mittels 3'-RACE bestimmt. Es resultierte eine Länge von 206 nt für RybA. Diese Form war unter Peroxid-Stress vorherrschend, unter stressfreien Bedingungen konnten größere RybA-Spezies detektiert werden. HB_428 trat in drei unterschiedlichen Spezies von ca. 120 nt, 210 nt und 320 nt auf.

Zur Target-Identifizierung wurde die Genexpression von sRNA-Knock-out-Mutanten mit *E. coli* K12 WT-Zellen durch den Einsatz von Microarrays verglichen. Im Fall der sRNA HB_428 konnten die Ergebnisse der Microarrays durch Northern-Blot Analysen nicht bestätigt werden. Die Ergebnisse für RybA suggerierten eine duale Funktion der sRNA. Zum einen agierte sie als *cis*-codierte antisense RNA und reguliert die Expression von *yliL*, welches ein putatives Protein ohne bekannte Funktion codiert. Zum anderen konnte unter Peroxid-Stress eine Beteiligung an der Regulation der Genexpression von Schlüsselgenen der aromatischen Aminosäurebiosynthese mittels Northern-Blot gezeigt werden. In *E. coli* K12 Wildtyp-Zellen wird die Expression dieser Gene unter Peroxid-Stress inhibiert. Der Knock-

Kurzfassung

out von RybA führte zu einer verstärkten Expression unter dieser Bedingung. Es konnte gezeigt werden, dass die Regulation von dem Transkriptionsregulator TyrR abhängig ist. Das *yltL*-Gen spielt dabei keine Rolle.

Die Aufklärung des Mechanismus und die Bedeutung der Regulation der Aminosäurebiosynthese unter Peroxid-Stress durch die sRNA RybA bietet Stoff für zukünftige Experimente und verspricht weitere Einsichten in die Abwehr von Bakterien gegen oxidativen Stress.

1 Einleitung

1.1 Kleine nicht-codierende RNAs

Als kleine nicht-codierende RNAs (ncRNAs) waren lange Zeit nur *transfer* RNAs (tRNAs), ribosomale RNAs (rRNAs) und *small nuclear* RNAs (snRNAs) bekannt. Im Unterschied zu *messenger* RNAs (mRNAs) werden sie nicht translatiert, sondern üben ihre Funktion auf RNA-Ebene aus. Alle bisher genannten RNA-Spezies spielen eine direkte Rolle bei der Proteinbiosynthese. Der Fortschritt der Technik und die Verfügung neuer experimenteller sowie bioinformatischer Methoden führten in den letzten vier Jahrzehnten zu der Identifizierung zahlreicher neuer ncRNA-Klassen in Eu- und Prokaryoten. Ein Großteil der gefundenen ncRNAs spielt eine wichtige Rolle in der Genregulation (Abb. 1.1). Die Nomenklatur für regulatorische RNAs ist nicht einheitlich. Meist werden eukaryotische regulatorische RNAs als ncRNAs und prokaryotische als small RNAs (sRNAs) bezeichnet [1]. Diese Nomenklatur wird fortlaufend auch in dieser Arbeit verwendet. Als Beispiele für eukaryotische ncRNAs sind die *small nucleolar* RNAs (snoRNAs), microRNAs (miRNAs) und *small interfering* RNAs (siRNAs) zu nennen. snoRNAs spielen eine Rolle bei der Modifikation von rRNA durch Methylierung und Pseudouridylierung. Über Basenpaarung führen sie Methylasen und Pseudouridin-Synthetasen an die zu modifizierenden Stelle der rRNA [2].

Für die Entdeckung der RNA Interferenz (RNAi) 1998 erhielten A. Fire und C. Mello 2006 den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin. Sie zeigten, dass das Einbringen von doppelsträngiger RNA (dsRNA) in *C. elegans* zu einem Gen-Knockdown führte [3]. Hamilton und Baulcombe konnten wenig später zeigen, dass kleine 25 Nucleotid-lange RNA Moleküle, die siRNAs oder miRNAs, für den Knockdown-Effekt verantwortlich sind [4]. Nach ihrem Einbau in den *RNA-induced silencing complex* (RISC) führt die Basenpaarung mit ihrer Target-mRNA zu einem Abbau der mRNA (siRNA) oder zu einer Blockade der Translation (miRNA) [5].

Die 6S RNA wurde als erste prokaryotische sRNA bereits 1967 von Hindley entdeckt [6]. Ihre Funktion blieb jedoch lange ungeklärt. Heute ist bekannt, dass die 6S RNA an die σ^{70} -RNA-Polymerase von *E. coli* in der stationären Phase bindet. Die RNA-Polymerase ist dadurch nicht mehr in der Lage an die σ^{70} -abhängigen Promotoren zu binden, was zu einer Inhibierung der Expression dieser Gene führt (Abb. 1.4 B) [7]. Dass kleine nicht-codierende RNAs durch Bindung an Proteine ihre Funktion ausüben, ist eine Ausnahme. Die meisten

Einleitung

ncRNAs oder sRNAs interagieren über Basenpaarungen mit einer Target-RNA, wie die oben beschriebenen miRNAs oder siRNAs.

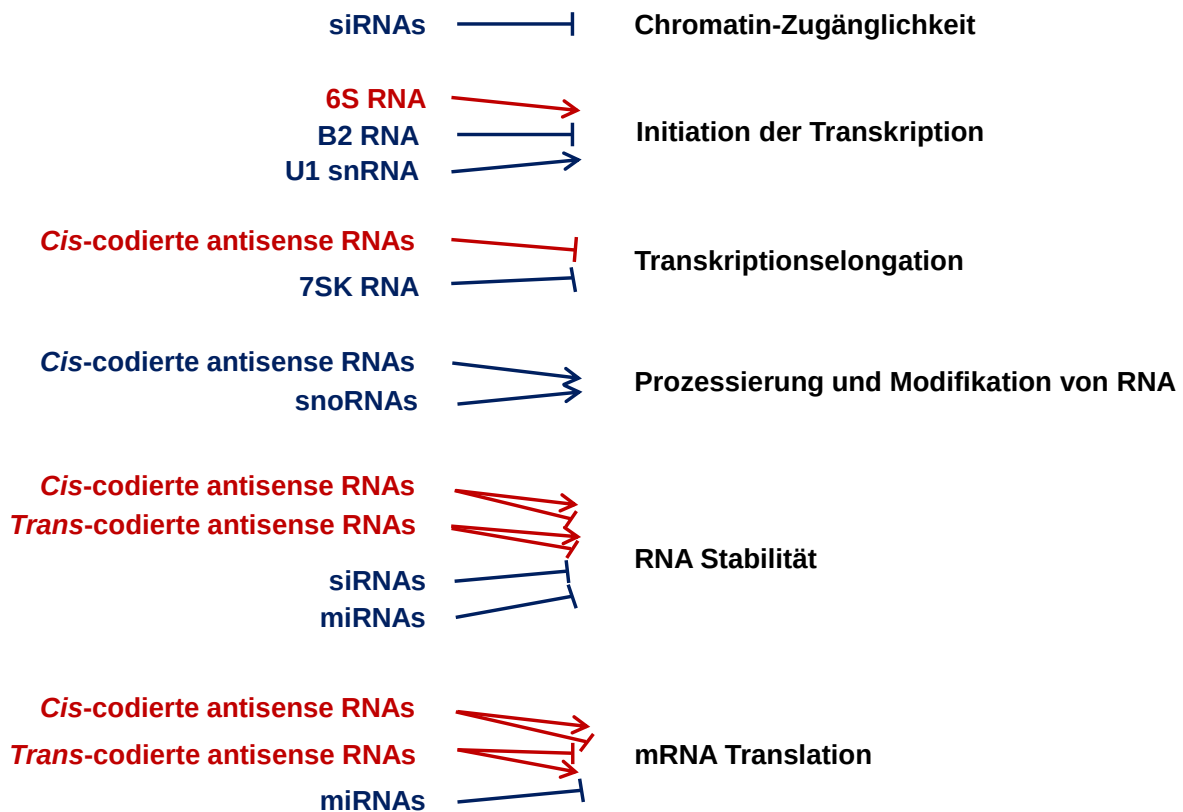


Abb. 1.1: Die Rolle von ncRNAs in der Regulation der Genexpression (nach [1]). Beispiele für prokaryotische (rot) und eukaryotische (blau) ncRNAs, die in unterschiedlichen Stadien positiven (→) oder negativen (⊥) Einfluss auf die Genexpression haben.

1.2 Die Rolle von sRNAs in Bakterien

Neben RNA-Molekülen, die in der Proteinbiosynthese beteiligt sind, gibt es in Bakterien verschiedene regulatorische RNAs. Dazu gehören die *riboswitches*, die als Teil der mRNA am 5'-Ende dessen Transkription oder Translation regulieren. *Riboswitches* bilden Sekundärstrukturen aus, die Liganden wie z. B. Metabolite binden können. Die Bindung löst eine Konformationsänderung aus, die sich positiv oder negativ auf die Translation oder Transkription der mRNA auswirkt. *Riboswitches* dienen daher als Sensor für Metabolit-Konzentrationen und führen zu einer Anpassung an deren Veränderung [8].

Die kürzlich entdeckten CRISPR (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) -RNAs sind an der Abwehr von mobilen genetischen Elementen beteiligt [9]. Sie enthalten

kurze Sequenzabschnitte mit Homologien zu Bakteriophagen und Plasmid-Sequenzen. Die Interaktion der CRISPR-RNAs mit Phagen- oder Plasmid-DNA vermittelt Immunität gegen Infektion oder Konjugation durch einen noch nicht bekannten Mechanismus. Es handelt sich hierbei um eine Art adaptive Immunität, da durch Einbau von neuer Fremd-DNA in das Genom das Repertoire von CRISPR-RNAs erweitert werden kann [9].

Die größte Gruppe von kleinen regulatorischen RNAs besteht aus 50-400 Nucleotid (nt) großen Molekülen, die über Basenpaarung mit ihrer Target-mRNA die Genexpression post-transkriptionell regulieren [10]. Sie werden traditionell in *cis*- und *trans*-codierte antisense RNAs eingeteilt. Zudem gibt es sRNAs, wie die 6S RNA, die an Proteine binden und deren Funktion regulieren.

Seit der Entdeckung der 6S RNA wurden noch weitere sRNAs gefunden, jedoch blieb die Funktion oft unerforscht. Zu Beginn dieses Jahrhunderts erhöhte sich die Zahl der gefundenen sRNA durch neue Techniken wie Microarrays und *shotgun cloning* sprunghaft [11]. Der am besten untersuchte Organismus ist *Escherichia coli* (*E. coli*). Ca. 80-100 sRNAs sind in *E. coli* bekannt, wobei erst weniger als der Hälfte eine Funktion zugeordnet werden konnte [12].

Im Folgenden soll zunächst die Funktion der sRNAs in der Genregulation mittels Basenpaarung anhand einiger Beispiele vorgestellt werden.

1.2.1 Die Rolle von sRNAs in der Genregulation

Cis-codierte antisense RNAs

Cis-codierte antisense RNAs sind kleine (50 – 300 nt) hochstrukturierte Moleküle [13]. Ihren Namen verdanken sie der Tatsache, dass sie auf dem gegenüberliegenden Strang ihres Target-Gens codiert sind und ihre Funktion über Basenpaarung ausüben. *Cis*-codierte antisense RNAs haben zumeist nur eine Target-RNA und weisen eine hohe Komplementarität mit bis zu 75 Nucleotiden zu ihr auf [13]. Der größte Teil *cis*-codierter antisense RNAs wurde auf mobilen genetischen Elementen wie Plasmiden, Phagen-DNA oder Transposons gefunden, jedoch steigt die Zahl der gefundenen chromosomal-codierten *cis*-sRNAs stetig an. *Cis*-codierte antisense sRNAs mobiler genetischer Elemente regulieren häufig deren Kopienzahl, indem sie z. B. die Stabilität und Replikation von Plasmiden oder Transpositionereignisse steuern. Dazu gehört z. B. die RNAI des ColE1 Plasmides. Für die Replikation von ColE1

wird der RNA-Primer RNAII benötigt. Die RNAII geht Basenpaarungen mit der Plasmid-DNA am Replikationsursprung ein und dient als Startpunkt für die DNA-Polymerase. Für die Anlagerung von RNAII an die DNA ist die Ausbildung einer bestimmten Sekundärstruktur der RNA notwendig. Nach Ausbildung des RNA-DNA-Hybrids wird die RNA durch RNase H teilweise abgebaut und der reife Primer entsteht. Die sRNA RNAI ist auf dem gegenüberliegenden Strang der RNAII codiert. Sie hemmt die Replikation des Plasmides durch Basenpaarung mit dem RNA-Primer RNAII und führt dadurch zu einer Veränderung der Sekundärstruktur von RNAII. Der Primer kann sich nicht mehr an die DNA anlagern und die Replikation wird inhibiert [14].

Der RNA Toxin-Antitoxin Mechanismus ist ein weiteres Beispiel für *cis*-codierte antisense RNAs. Toxin-Antitoxin Loci wurden zuerst auf Plasmiden identifiziert, sind aber auch auf bakteriellen Chromosomen gefunden worden [15]. Das System besteht aus einer stabilen mRNA für das Toxin und einer instabilen sRNA, dem Antitoxin. Ein Beispiel hierfür ist der *hok/sok* Locus des Plasmides R1 [16]. Der Locus besteht aus drei Genen: Das *hok* Gen, dass ein toxisches Membranprotein codiert. Das *mok* Gen überlappt mit dem *hok* Gen und ist wichtig für dessen Translation. Das *sok* Gen, welches die antisense RNA codiert, liegt auf dem antisense Strang und überlappt teilweise mit dem *mok* Gen. Die sRNA inhibiert durch Basenpaarung die Translation der *mok* mRNA und führt zu deren Abbau. Somit wird auch indirekt die Translation des Hok-Toxins gehemmt. Die *hok* mRNA ist stabiler, als die *Sok* sRNA und so würde ein Verlust des Plasmides zum Tod der betreffenden Zelle führen.

Chromosomale *cis*-codierte antisense RNAs sind bei der Regulation des Stoffwechsel und der Stressantwort beteiligt [13]. Auch Toxin-Antitoxin Loci, wie der *hok/sok* Locus wurden auf bakteriellen Chromosomen in einer inaktiven Form gefunden. Aktive chromosomal-codierte Toxin-Antitoxin Paare wie das *symE/symR* Paar in *E. coli* könnten eine Funktion in der Wachstumsregulation haben [17]. SymE ist ein SOS-induziertes Toxin, dessen Transkription unter normalen Wachstumsbedingungen von dem Transkriptionsrepressor-Protein LexA reprimiert wird [18]. Die Translation von noch vorhandenen *symE* Transkripten wird durch die sRNA SymR inhibiert (Abb. 1.2 A).

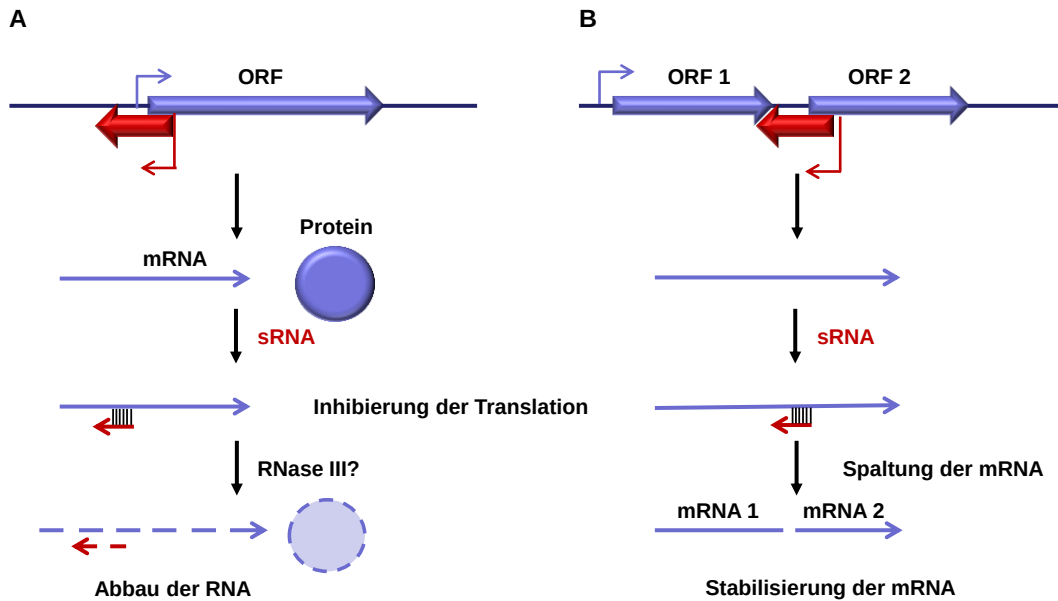


Abb. 1.2: Beispiele für die Regulation der Genexpression durch cis-codierte antisense RNAs (verändert nach [8]). Basenpaarung der sRNA (rot) mit ihrer Target-mRNA (blau) kann zur Inhibition der Translation und zum Abbau der Duplex führen oder zur Spaltung der mRNA (A). Im Falle der GadY – *gadX* mRNA Interaktion führt dies zu Stabilisierung der Spaltprodukte (B, vgl. Text).

Die chromosomal-codierte sRNA GadY überlappt mit der 3'UTR (untranslatierter Bereich, *untranslated region*) der *gadX* mRNA, die zusammen mit *gadW* transkribiert wird [19]. GadX und GadW sind Transkriptionsregulatoren, die in der Säurestressantwort eine Rolle spielen. Überproduktion von GadY führt zu der Spaltung der *gadXW* mRNA und zu einer Stabilisierung der beiden Produkte im Gegensatz zu dem Ausgangstranskript (Abb. 1.2 B) [20].

Trans-codierte antisense RNAs

Bei dem Großteil der heute bekannten sRNAs handelt es sich um *trans*-codierte antisense RNAs. Im Gegensatz zu den *cis*-codierten antisense RNAs sind sie nicht in räumlicher Nähe zu ihren Targets codiert. *Trans*-codierte antisense sRNAs üben ihre Funktion ebenfalls über Basenpaarung mit ihrer Target-mRNA aus. Im Gegensatz zu den *cis*-codierten antisense RNAs ist die Basenpaarung zwischen sRNA und mRNA jedoch auf einen kleineren Bereich beschränkt und durch Unterbrechungen in der Doppelhelix gekennzeichnet. Der Bereich der Basenpaarung umfasst typischerweise 10-25 Nucleotide [8]. Die Kernsequenz, die für eine Regulation ausreichend ist, besteht jedoch meistens aus 6-9 zusammenhängenden Basenpaaren [12]. Die Art der Regulation durch *trans*-codierte antisense RNAs ist zumeist

Einleitung

negativ und weist Ähnlichkeiten zu der Regulation durch miRNAs und siRNAs in Eukaryoten auf [21]. Die Bindung der sRNA an die mRNA führt zu einer Inhibierung der Translation und/oder zu einer meist RNase E-abhängigen Degradierung der mRNA (Abb. 1.3 A und B). Die Basenpaarung der sRNA RyhB mit ihrer Target-mRNA (z. B. *sodB*) führt so zu einer Degradierung der mRNA [22]. Die RNase E-abhängige Degradierung ist allerdings nicht zwingend notwendig für eine vollständige Inhibierung der Translation. RyhB kann die Translation der *sodB* mRNA auch unabhängig von der mRNA Degradierung inhibieren [23]. Die meisten sRNAs binden im Bereich der 5'-UTR der mRNA in der Nähe der Shine-Dalgarno-Sequenz und dem Startcodon. Im Unterschied dazu binden eukaryotische miRNAs und siRNAs an die 3'-UTR der mRNAs [21]. Im Gegensatz zu miRNAs und siRNAs können *trans*-codierte antisense RNAs die Translation der mRNA auch aktivieren (Abb. 1.3 C). Die sRNA DsrA z. B. aktiviert die Translation der *rpoS* mRNA bei niedrigen Temperaturen. *rpoS* codiert den stationären Sigmafaktor σ^S , ein wichtiger Stressregulator in gram-negativen Bakterien [24]. Die 5'-UTR der *rpoS* mRNA kann eine Haarnadelstruktur ausbilden, in der auch die Ribosomenbindestelle liegt (vergl. Abb. 1.3 C) und die Translation inhibiert. Durch Basenpaarung der sRNA DsrA mit der Haarnadelstruktur würde die Ribosomenbindestelle frei und die *rpoS* mRNA könnte translatiert werden [25].

Ein Großteil der sRNAs benötigt für eine effektive Bindung an die mRNA das RNA-Chaperon Hfq [26]. *E. coli* Hfq ist ein 11,2 Kilodalton (kDa) großes Protein, das Homohexamere bildet. *In vitro* Studien zeigten, dass Hfq in einigen Fällen die Basenpaarung zwischen mRNA und sRNA stimulieren kann. Hfq unterstützt die Interaktion zwischen sRNA und mRNA, indem es Strukturveränderungen der RNA bewirkt und somit zuvor unzugängliche Bereiche für Basenpaarungen frei setzt [27]. Außerdem kann Hfq durch gleichzeitige Bindung an mRNA und sRNA die lokale Konzentration beider Bindungspartner erhöhen [28]. Hfq kann zudem die Stabilität von sRNAs erhöhen.

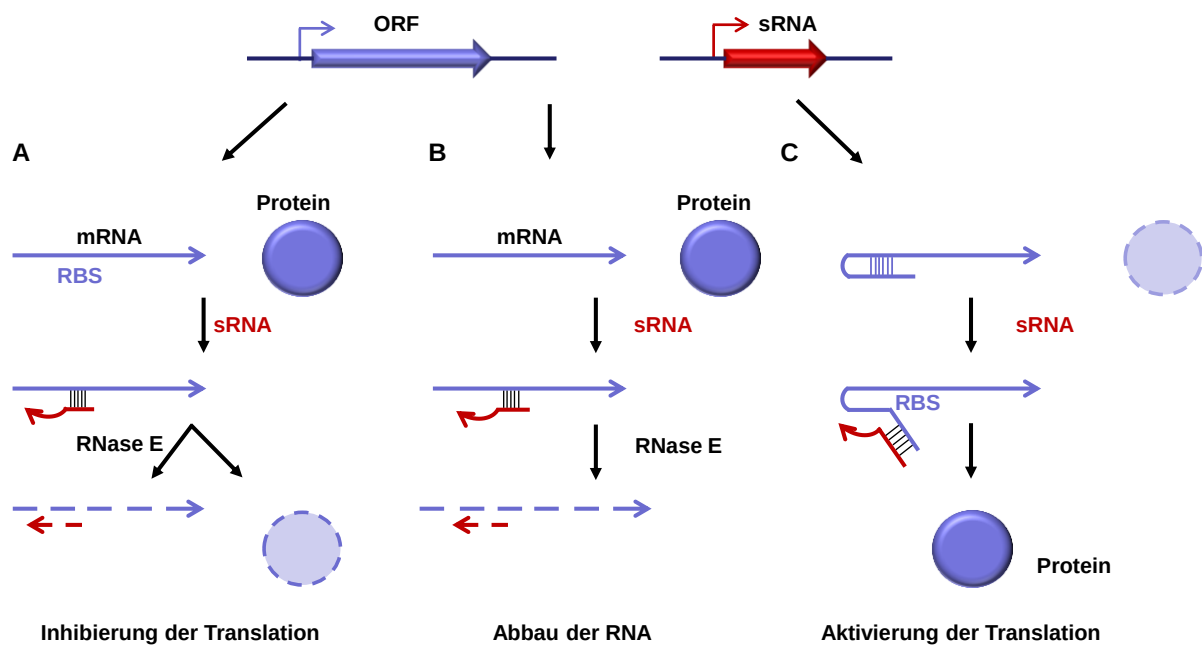


Abb. 1.3: Beispiele für die Regulation der Genexpression durch *trans*-codierte antisense RNAs (verändert nach [8]). Basenpaarung der sRNA (rot) mit der Target-mRNA (blau) kann zur Inhibierung der Translation und Degradierung der mRNA (A), nur zur Degradierung der mRNA (B) oder zur Aktivierung der Translation (C) führen.

Trans-codierte antisense RNAs können im Gegensatz zu den *cis*-codierten antisense RNAs auf Grund der nicht notwendigen absoluten Komplementarität und der Unterstützung durch Hfq an mehrere Target-mRNAs binden [21]. Als Beispiel sei hier die sRNA GcvB genannt, die die Expression der *E. coli* und *Salmonella typhimurium* Gene *oppA*, *dppA*, *gltI*, *livK*, *livJ*, *argT*, *cycA* und *sstT* reprimiert. Diese Gene codieren alle Proteine, die bei der Aminosäureaufnahme in die Zelle involviert sind [12]. Die Expression von *gcvB* wird von den Transkriptionsregulatoren GcvA/GcvB reguliert und durch hohe Glycinkonzentrationen stimuliert [29].

Protein-bindende sRNAs

Protein-bindende sRNAs können in zwei Arten unterteilt werden: sRNAs mit intrinsischer Aktivität, wie die RNase P RNA oder sRNAs, die als funktioneller Teil eines Ribonucleoproteins fungieren, wie die 4,5S RNA oder die tmRNA. Auf diese RNAs soll hier nicht weiter eingegangen werden. Zum anderen sind zurzeit drei sRNAs bekannt, die an Proteine binden und dadurch deren Funktion inhibieren: die 6S RNA, die CsrB RNA und GlmY RNA [8].

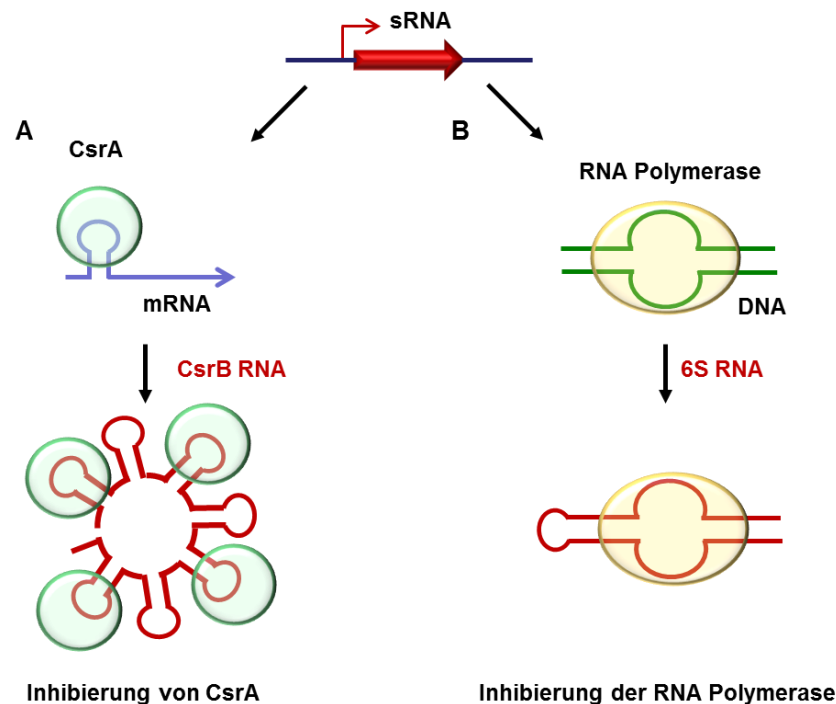


Abb. 1.4: Beispiele für die Inhibition der Proteinaktivität durch sRNAs (verändert nach [8]). (A) Das Protein CsrA (grüner Kreis) bindet an Haarnadelstrukturen von mRNAs (blau) und beeinflusst deren Translation. Wird die sRNA CsrB (rot) produziert, bindet diese an CsrA und verhindert so die Regulation der mRNA. (B) In Abwesenheit der 6S RNA bindet die σ^{70} -RNA-Polymerase (gelber Kreis) ihre Promotor-DNA (grün) und transkribiert die dazugehörigen Gene. Bei hohen Konzentrationen an 6S RNA bindet die σ^{70} -RNA-Polymerase an diese. Dadurch kommt es zu einer Verringerung der σ^{70} -abhängigen Genexpression.

Die Funktion der 6S RNA wurde schon erläutert (siehe 1.1 und Abb. 1.4 B), daher wird im Folgenden die Funktion der Protein-bindenden sRNAs am Beispiel der CsrB RNA beschrieben.

Das Csr-(carbon storage regulator) System in *E. coli* spielt unter anderem eine wichtige Rolle im Kohlenstoff-Metabolismus und besteht aus dem CsrA Protein und den sRNAs CsrB und CsrC. Das RNA-Bindeprotein CsrA reguliert die Genexpression seiner Targets durch Bindung an die mRNAs. Dies kann zu einer Aktivierung oder Inhibition der Genexpression

Einleitung

durch Stabilisierung der mRNA oder Blockierung der Ribosomen-Bindestelle mit anschließender Degradierung führen [30]. Die beiden sRNAs CsrB und CsrC besitzen 22, bzw. 13 Bindestellen für CsrA und wirken als Antagonisten. CsrB kann bis zu neun CsrA Proteine gleichzeitig binden und macht das Protein dadurch unzugänglich für seine Target-mRNAs [31]. Die Expression von *csrB* und *csrC* wird durch Nahrungsmangel stimuliert. Alle drei Protein-bindenden sRNAs imitieren Nucleinsäuren, um das Protein von seinem Target zu verdrängen. Die 6S RNA nimmt die Struktur eines offenen Promotors an. CsrB simuliert eine mRNA und die GlmY RNA imitiert eine andere sRNA.

sRNAs mit dualer Funktion

Die Bezeichnung „nicht-codierende“ RNA impliziert, dass das dazugehörige Gen nicht ein Protein codiert. In Bakterien sind zurzeit fünf Beispiele für Gene bekannt, die sowohl eine sRNA als auch ein Protein codieren und bilden somit die Ausnahme von der Regel. Als Beispiel sei hier die SgrS RNA genannt. In *E. coli* wird die Produktion der SgrS RNA durch den Transkriptionsfaktor SgrR unter Glucose-Phosphat-Stress bei Akkumulation von Glucose-6-Phosphat induziert. SgrS inhibiert die Translation der *ptsG* mRNA und führt zur Degradierung der mRNA, die den Haupt-Glucosetransporter in *E. coli* codiert. *SgrS* codiert auch ein 43 Aminosäuren großes Peptid, SgrT [32]. SgrT wird ebenfalls durch Glucose-Phosphat-Stress induziert und führt zu einer verminderten Glucoseaufnahme, beeinflusst aber nicht die Stabilität von PtsG auf mRNA- oder Proteinebene. Es wird vermutet, dass SgrT stattdessen hemmend auf den Glucosetransporter wirkt [32].

1.2.2 Die Rolle von sRNAs unter Stressbedingungen

Ein Großteil der sRNAs in Bakterien wird als Antwort auf veränderte Umweltbedingungen transkribiert. Dazu gehören z. B. Eisenmangel, Membranstress, Veränderung der Glucose-Phosphat-Konzentrationen, Glucosemangel und oxidativer Stress. Über die Regulation der Target-Gene der sRNAs kommt es zu einer Anpassung an die veränderten Bedingungen oder zu einer Stressantwort. In Tab. 1.1 sind Beispiele für sRNAs und deren Funktion bei veränderten Umweltbedingungen gezeigt.

Tab. 1.1: Funktionen ausgewählter sRNAs unter veränderten Umweltbedingungen

sRNA	Induktion der Expression	Auswirkung	Quelle
MicF	Hyperosmotischer Stress	Inhibierung der Porinsynthese (<i>ompF</i>)	[33]
MicC	Niedrige Temperaturen	Inhibierung der Porinsynthese (<i>ompC</i> , <i>ompD</i>)	[34]
RyhB	Niedrige Fe-Konzentration	Einsparung von Eisen (<i>sodB</i> , <i>sdhC</i> , <i>frdA</i> , <i>shiA</i>)	[35]
OxyS	Peroxid-Stress	Antimutator-Effekte (u. a. <i>fhlA</i> , <i>rpoS</i>)	[36]
CyaR	Glucosemangel	Quorum sensing (<i>luxS</i>), NAD-Synthese (<i>nadE</i>), Porinsynthese (<i>ompX</i>)	[37]
SgrS	Hohe Glucose-Phosphat-Konzentration	Inhibierung des Glucose-Imports (<i>ptsG</i>)	[32]
OmrA/B	Hyperosmotischer Stress	Inhibierung der äußeren Membranproteinsynthese (<i>cirA</i> , <i>fecA</i> , <i>fepA</i> , <i>ompT</i> , <i>gntP</i> , <i>ompR</i>)	[38]

Im Folgenden wird die Rolle der sRNAs unter Bedingungen wie Membranstress und oxidativem Stress beispielhaft erläutert.

Oxidativer Stress ist eine der großen Herausforderungen von Bakterien bei der Etablierung der Infektion in ihrem Wirt. Säugetiere und Pflanzen benutzen häufig Wasserstoffperoxid (H_2O_2) zur Bekämpfung von Pathogenen wie Bakterien und Pilzen [36]. Dies kann zu Mutationen in der DNA und Schäden an Proteinen führen. Bakterien haben dagegen eine Reihe von Abwehrmechanismen entwickelt, bei denen unter anderem auch die sRNA OxyS beteiligt ist. Die Transkription von OxyS wird durch den Transkriptionsregulator OxyR reguliert [39]. OxyR ist eines der wichtigsten regulatorischen Proteine in der oxidativen Stressantwort und steuert u. a. die Expression von Genen, die für den Peroxid-Schutz und Metabolismus verantwortlich sind [40]. Über die Aktivierung der Expression von *oxyS* kann OxyR so bis zu 40 weitere Gene, die bei der oxidativen Stressantwort eine Rolle spielen, regulieren [39]. Die beiden am besten untersuchten OxyS-Targets sind *fhlA* und *rpoS*. Über Basenpaarung von OxyS mit der mRNA wird in beiden Fällen die Translation inhibiert. *rpoS*, dessen Expression wie oben beschrieben auch durch DsrA bei niedrigen Temperaturen reguliert wird, codiert den stationären Sigma-Faktor σ^S der RNA-Polymerase. Durch die Inhibierung der Translation von *rpoS* werden σ^S -abhängige Gene nicht mehr transkribiert, was unter anderem zu einer Verringerung der Zellatmung und so zu einer geringeren Produktion

von Superoxiden führt [36]. *fhlA* codiert einen Transkriptionsfaktor, der aktivierend auf den Formiat-Metabolismus wirkt [41]. Die Rolle von *fhlA* in der oxidativen Stressantwort ist nicht abschließend geklärt. FhlA induziert die Formation des Formiat-Hydrogenlyase-Komplexes, der auch Metall-Cofaktoren enthält. Es wird vermutet, dass Schäden an diesem Komplex, ausgelöst durch oxidativen Stress, durch die Inhibierung der Translation von FhlA verhindert werden soll [42].

Die äußere Membran bildet zusammen mit der Peptidoglycan-Schicht und der inneren Membran die Zellhülle von Bakterien. Als selektive Barriere verhindert die äußere Membran den Eintritt von vielen toxischen Substanzen in die Zelle. Äußere Membranproteine (OMP, *outer membrane protein*) sorgen für den Eintritt von Nährstoffen und spielen bei der Adhäsion der Bakterienzelle sowie bei der Interaktion zwischen Bakterium und Wirt eine Rolle [43]. Die Expression der OMPs ist abhängig von den äußeren Bedingungen stark reguliert. In *E. coli* ist jedes der wichtigen OMPs durch eine oder mehrere sRNAs reguliert [12]. Abb. 1.5 zeigt eine Übersicht über die sRNAs und einige Targets.

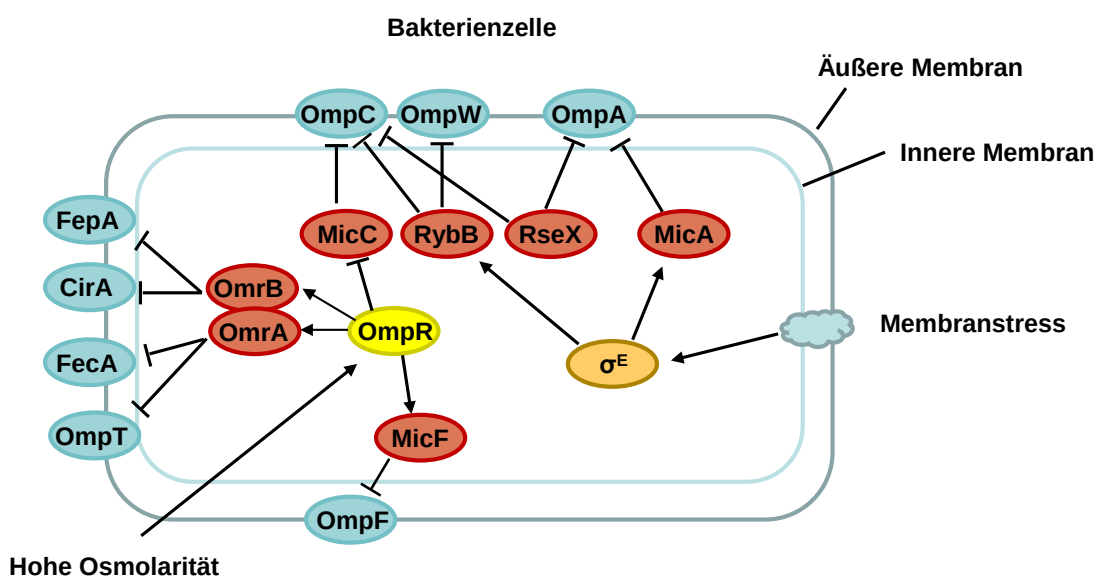


Abb. 1.5: Übersicht über die Regulation der äußeren Membranproteine durch sRNAs in *E. coli* (verändert nach [43]). Ausgelöst durch hohe Osmolarität in der Umgebung oder Membranstress, der zu falsch gefalteten Membranproteinen führt (blaue Wolke), wird die Transkription verschiedener sRNAs (rote Kreise) über Transkriptionsfaktoren (gelbe Kreise) induziert (Pfeile). Die sRNAs inhibieren als Antwort auf die Stressbedingung die Produktion verschiedener Membranproteine (blaue Kreise).

Veränderte Umweltbedingungen, wie z. B. hohe Osmolarität führen zur Induktion der Transkription der sRNAs. Alle bis heute bekannten sRNAs wirken inhibierend auf die Synthese der OMPs über Basenpaarung mit der jeweiligen mRNA. Die beiden sRNAs MicA

und RybB werden unter Einfluss des σ^E -Faktors transkribiert (Abb. 1.5). Dieser Sigma-Faktor reguliert unter anderem Gene, deren Produkte am OMP-Transport zur äußeren Membran beteiligt sind oder falschgefaltete Proteine im Periplasma detektieren. MicA und RybB inhibieren die Translation der OMPs OmpA bzw. OmpW und OmpC (Abb. 1.5). Dieser Zusammenhang hat zu der Annahme geführt, dass die verminderte OMP-Produktion unter Membranstressbedingungen zu einer Entlastung des Transportes und der Membran führt [12]. Ein weiteres Beispiel sind die sRNAs OmrA und OmrB, deren Produktion von dem Zwei-Komponenten System EnvZ-OmpR reguliert wird. Hohe Osmolarität in der Umgebung der Bakterienzelle führt zu einer Phosphorylierung von OmpR durch die Kinase EnvZ [44]. Phosphoryliertes OmpR bindet an die DNA seiner Target-Gene, wie z. B. die der OMPs OmpC und OmpF und aktiviert die Transkription. Die Aktivierung von OmrA und OmrB führt zu einer Inhibierung der Synthese der OMPs FepA, CirA, FecA und OmpT und des eigenen Regulators OmpR über Basenpaarung mit der mRNA [38].

1.3 Identifizierung von sRNAs

Die ersten sRNAs 6S und 4,5S RNA in *E. coli* wurden gegen Ende der 60er Jahre durch radioaktive Markierung von Total-RNA und anschließender Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) identifiziert. *E. coli*-Zellen wurden mit radioaktivem Orthophosphat kultiviert und die Total-RNA anschließend mittels PAGE getrennt. Die Identifizierung erfolgte durch Isolierung der RNA aus dem Gel und anschließender Sequenzierung über die Spaltung mit Nucleasen [6,45]. Durch Anwendung von neuen Techniken, wie die 2-D-Gelelektrophorese wurden wenig später die Spot 42 RNA, tmRNA und RNase P entdeckt [46,47]. Diese Methoden eignen sich jedoch nur zur Identifizierung von sRNAs, die in großer Menge in der Zelle vorhanden sind.

Bis 2001 waren in *E. coli* nur 11 sRNAs bekannt [48]. Der Großteil davon wurde durch Zufall entdeckt, wie die CsrB RNA, die über Affinitätsreinigung ihres Target-Proteins CsrA gefunden wurde [49]. MicF, DsrA und DicF wurden zufällig durch Klonierung genomischer Fragmente entdeckt. Die zufällige Überexpression dieser Gene in den klonierten Fragmenten führte zu verschiedenen regulatorischen Aktivitäten, die später den sRNAs zugeschrieben werden konnte [50].

Seitdem führten systematische experimentelle und bioinformatische Studien zur Identifizierung von über 150 neuen sRNAs in diversen Bakterienarten [11]. Die

verschiedenen Ansätze wurden hauptsächlich zur Identifizierung von *trans*-codierten antisense RNAs entwickelt, da diese den Großteil der bekannten sRNAs ausmachen.

Bioinformatische Ansätze zur Identifizierung von sRNAs

Zu Beginn dieses Jahrhunderts führten mehrere bioinformatische Ansätze, teilweise kombiniert mit experimentellen Methoden, zu der Vorhersage von mehreren 100 sRNAs in Bakterien. Die Suche beschränkte sich zunächst auf den Modellorganismus *E. coli*, da die Sequenz des Genoms vollständig bekannt war und alle bisher gefundenen sRNAs aus diesem Organismus stammten. Die Kriterien für die Vorhersagen basierten auf Charakteristika bekannter sRNAs. So beschränkte sich die Suche nach potentiellen neuen sRNAs auf die intergenischen Regionen (IGR) zwischen Protein-codierenden Genen von *E. coli*, da die zu dem Zeitpunkt bekannten sRNAs alle dort zu finden waren.

Argaman *et al.* suchten 2001 in den IGR des *E. coli* Genoms nach möglichen Transkriptions-Startpunkten und Terminationssignalen um neue sRNAs zu finden [51]. Die daraus resultierenden Sequenzen wurden durch Einschränkung der Größe auf einen Bereich von 50-400 Basenpaaren (bp) und Analyse der Konservierung zwischen verschiedenen Bakterienspezies auf 24 potentielle sRNA-Gene eingeschränkt. Die Überprüfung mittels Northern-Blot-Analysen ergab, dass 14 von 23 Kandidaten in *E. coli* exprimiert wurden. Unter anderem befanden sich die später charakterisierten sRNAs MicA, OmrA, CsrC und GcvB unter den Kandidaten.

Carter *et. al* nutzten maschinelles Lernen um 370 neue sRNAs in den IGRs von *E. coli* vorherzusagen [52]. Als Parameter verwendeten sie die Nucleotid-Kompositionen, Sequenzmotive und die freie Faltungsenergie auf Basis bekannter sRNAs. Sie konnten damit erfolgreich mehrere zuvor als sRNAs vorgeschlagene Gene identifizieren. Auch die Ergebnisse anderer Suchen nach kleinen RNAs mit anschließender experimenteller Validierung konnten mit dieser Methode reproduziert werden. Eine eigene experimentelle Bestätigung der vorhergesagten sRNAs blieb jedoch aus.

Die Suche nach neuen sRNAs auf Basis von Konservierung der intergenischen Regionen zwischen *E. coli*, *Salmonella*- und *Klebsiella pneumonia*-Arten von Wassarman *et al.* 2001 [53] ergab 60 mögliche, neue sRNAs Kandidaten. In Kombination mit *high-density* Oligonucleotid-Microarrays und Northern-Blot-Analysen konnten so 17 potentiell neue sRNAs ermittelt werden.

Rivas *et al.* ermittelten auf Basis von konservierten Sekundärstrukturen in den IGR von *E. coli* 275 neue sRNA Kandidaten [54]. Die Expression in *E. coli* von 49 Kandidaten wurde mittels Northern-Blot getestet und 11 Kandidaten gefunden, die als mögliche sRNAs exprimiert wurden.

Auf der Suche nach σ^{70} -abhängigen Promotoren und Rho-unabhängigen Terminationssequenzen in einem geeigneten Abstand, fanden Chen *et. al.* 2002 144 putative sRNA Gene, von denen 7 der 8 getesteten in *E. coli* validiert wurden [55].

Alle Vorhersagen beschränkten sich auf die IGR von *E. coli*. Cis-codierte sRNAs wurden dadurch nicht berücksichtigt. Zudem wurde die Expression der getesteten Kandidaten zumeist nur unter wenig verschiedenen Wachstumsbedingungen getestet. Da sRNAs oft nur unter bestimmten Bedingungen exprimiert werden, besteht die Möglichkeit, dass einige Kandidaten übersehen wurden. In vielen der Studien wurden auch nicht alle erhaltenen Kandidaten getestet, so dass die tatsächliche Zahl neuer sRNAs viel höher sein könnte.

Experimentelle Ansätze zur Identifizierung von sRNAs

Computergestützte Vorhersagen von sRNAs erfordern Informationen über Charakteristika von sRNAs, um zu Ergebnissen zu führen. Zudem resultieren sie oft in mehreren 100 Kandidaten, die experimentell überprüft werden müssen. Daher wurden verschiedene experimentelle Methoden zur Identifizierung von sRNAs entwickelt.

Tjaden *et al.* nutzten 2002 die Microarray-Technik für die Suche nach Transkripten in den intergenischen Regionen von *E. coli* [56]. Dafür benutzten sie Microarray-Chips, auf denen Oligonucleotide immobilisiert waren, die alle *E. coli* Gene und intergenischen Regionen repräsentierten. Aus 13 Kulturen unter verschiedenen Wachstumsbedingungen wurde die Total-RNA isoliert und nach cDNA-Synthese mit den Microarray-Chips hybridisiert. Nach Analyse der erhaltenen Daten schlugen Tjaden *et al.* 9 neue sRNAs vor. Zudem konnten sie mit der Methode 19 der damals 34 bekannten sRNAs in *E. coli* nachweisen und fanden Transkripte von 31 sRNAs, die in anderen Studien vorhergesagt worden waren.

Shotgun cloning, auch experimentelle RNomics genannt, wurde zuerst erfolgreich für die Identifizierung von ncRNAs in Eukaryoten und Archeen angewandt [57-59]. 2003 wendeten Vogel *et al.* die Methode als erstes in Eubakterien an [60]. In Abb. 1.6 ist die Methode schematisch dargestellt. Total-RNA von *E. coli* Kulturen aus verschiedenen Wachstumsphasen (lag-Phase, exponentielle Phase, stationäre Phase) wurde mittels PAGE der Größe nach getrennt. Die RNA im Bereich von 50-500 Nucleotiden wurde isoliert und nach

Einleitung

Addition eines PolyC-Schwanzes in cDNA umgeschrieben und direkt kloniert. 10.000 Klone wurden auf *high density* Filter immobilisiert und mit Sonden für tRNAs und rRNAs hybridisiert, um diese von der Analyse auszuschließen. 1000 cDNA Klone mit den niedrigsten Hybridisierungssignalen wurden ausgewählt und sequenziert. Bei der Analyse der Sequenzen wurden 20 der zu der Zeit 55 bekannten sRNAs gefunden. Von den ausgewählten 34 potentiellen sRNA Kandidaten konnten 7 mittels Northern-Blot bestätigt werden.

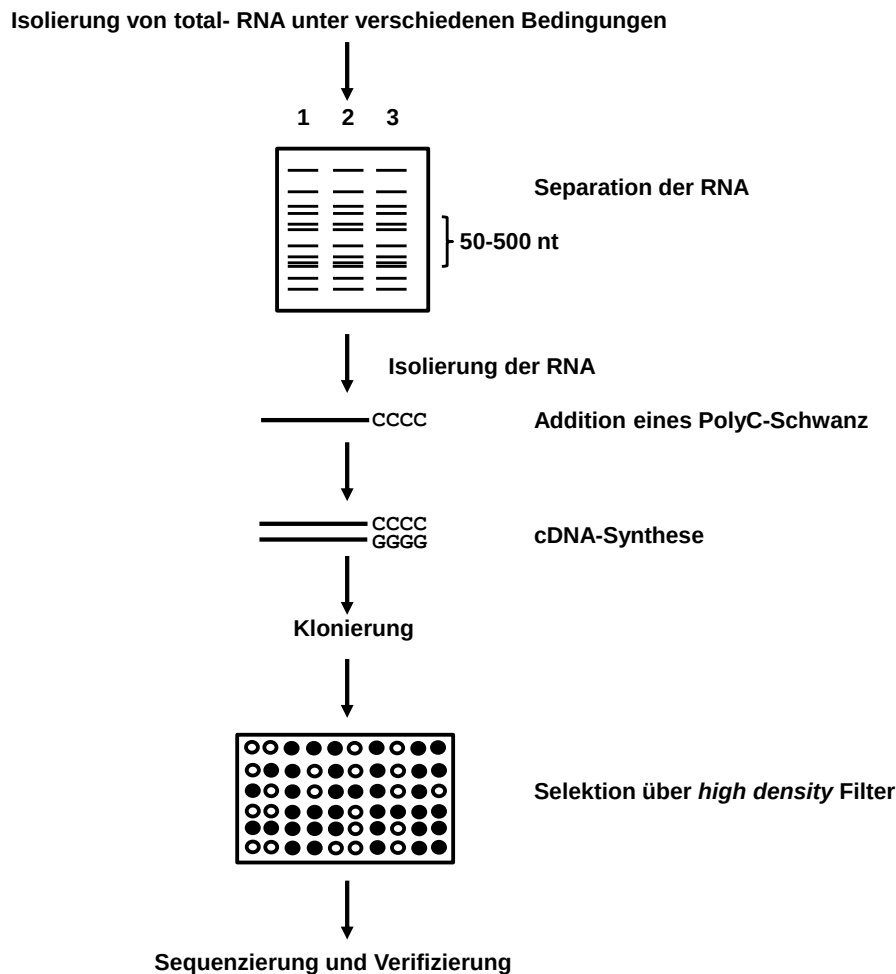


Abb. 1.6: Shotgun cloning (RNomics) zur Identifizierung von neuen sRNAs in *E. coli* (verändert nach [61]). Schematische Darstellung der Methode von Vogel *et. al* [60] zur Identifizierung von sRNAs in *E. coli*. Erläuterung im Text.

Microarrays und *shotgun cloning* erlauben im Gegensatz zu bioinformatischen Ansätzen die Identifizierung von sRNAs unter verschiedenen Wachstumsbedingungen. Beide Methoden sind allerdings sehr kostenintensiv. Hinzu kommt, dass Sekundärstrukturen der RNA bei der PolyC-Addition beim *shotgun cloning* oder Markierung der cDNA für die Detektion in

Microarrays störend sein können und einige potentielle Kandidaten übersehen werden können.

Die Entwicklung von *high throughput sequencing* Techniken, wie z. B. 454 Pyrosequenzierung umgeht die zeitaufwändige Klonierung von cDNAs und kostenintensive Sanger-Sequenzierungen [62]. Durch die Anwendung dieser Methoden können ganze Transkriptome eu- oder prokaryotischer Zellen parallel untersucht werden. Dabei wird zunächst Total- oder zuvor fraktionierte RNA nach Polyadenylierung und Ligation von Adapter-Oligonucleotiden an das 5'-Ende in cDNA umgeschrieben. Die Sequenzierung der cDNAs erfolgt automatisiert im Hochdurchsatz-Verfahren durch Pyrosequenzierung [63]. Sittka *et al.* haben diese auch als RNA-Seq (*RNA sequencing*) bezeichnete Methode zur Identifizierung von Hfq-assoziierten mRNAs und sRNAs in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* (*S. Typhimurium*) angewendet [64]. Durch Co-Immunpräzipitation mit Hfq und anschließender RNA-Seq konnten so 727 mRNAs identifiziert werden, die *in vivo* an Hfq binden. Weiterhin konnte mit dieser Methode die Zahl der bekannten sRNAs in *Salmonella* auf 64 verdoppelt werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass wohl noch lange nicht alle sRNAs in *E. coli* und anderen Bakterien identifiziert worden sind, bzw. dass viele der vorgeschlagenen sRNAs nicht überprüft worden sind. Die Tatsache, dass sich die Zahl der entdeckten sRNAs allein in *E. coli* in dem letzten Jahrzehnt verzehnfacht hat, und dass viele vorhergesagte sRNAs noch nicht untersucht wurden, lässt vermuten, dass es noch viele weitere zu entdecken gibt.

1.4 Target-Identifizierung von sRNAs in Bakterien.

Die beschriebenen Methoden zur Identifizierung von sRNAs in Bakterien lassen keine Rückschlüsse auf deren Funktion zu. Daher wurden verschiedene bioinformatische und experimentelle Methoden entwickelt, um die Funktion der identifizierten sRNAs zu untersuchen. Die meisten zielen dabei auf die direkte Identifizierung des Interaktionspartners der sRNA. In nahezu allen Fällen handelt es sich hierbei um eine mRNA, deren Level durch die jeweilige sRNAs verändert wird. *Trans*-codierte antisense RNAs sind teilweise komplementär zu ihren Target-mRNAs (1.2.1). Im einfachsten Fall führt eine simple BLASTN-Suche zur Identifizierung des Targets, in dem nach komplementären Bereichen zwischen der zu untersuchenden sRNA und dem Genom des jeweiligen Organismus gesucht wird. So wurde z. B. die *ompC* mRNA als Target der sRNA MicC gefunden [34].

Einleitung

Die Basis vieler experimenteller Methoden zur Target-Identifizierung ist die Konstruktion von sRNA Überexpressions- und Deletionsmutanten. *ompA* wurde z. B. als Target von MicA durch den Vergleich des Proteoms zwischen *E. coli* Wildtyp-Zellen und einer MicA-Überexpressionsmutante mittels 2D-Gelelektrophorese gefunden [65]. Dabei werden die Proteine der zu vergleichenden Stämme zunächst nach ihrem isoelektrischen Punkt getrennt (Isoelektrische Fokussierung). Anschließend folgt eine PAGE, in der die Proteine der Größe nach getrennt werden. So wird eine hochauflösende Trennung des Proteoms erreicht, in der einzelne Proteine als Spots visualisiert werden können. Der Vergleich der Intensitäten einzelner Spots zwischen dem Wildtyp und der Überexpressionsmutante gibt Aufschluss über eine mögliche Regulierung der Genexpression durch die sRNA. Die 2D-Gelelektrophorese eignet sich jedoch nur bedingt zur Target-Identifizierung, da viele Proteine nur in sehr geringen Mengen vorhanden oder unlöslich sind und mit dieser Methode nicht detektiert werden können.

Durch den Vergleich des Transkriptoms eines Wildtyp-Stamms mit einer Überexpressions- oder Deletionsmutante kann die Regulation möglicher Targets auf mRNA-Ebene beobachtet werden. Hierfür eignen sich besonders Microarray-Analysen. Total-RNA aus den zu vergleichenden Stämmen wird unter bestimmten Wachstumsbedingungen isoliert, in cDNA umgeschrieben und für eine anschließende Detektion markiert (z. B. durch Fluoreszenzfarbstoffe). Die cDNAs werden mit einem Chip, der Oligonucleotide trägt, die das Genom des jeweiligen Organismus repräsentieren, hybridisiert und detektiert. Der Vergleich der Signalintensitäten zwischen dem Wildtyp und der Mutante zeigt, ob ein Gen stärker oder schwächer exprimiert wird. Die Permease *CycA*, die für den Transport der Aminosäuren Glycin, D-Alanin, D-Serin und D-Cycloserin in die *E. coli* Zelle verantwortlich ist, wurde so als Target der sRNA *GcvB* identifiziert [66]. Voraussetzung für die Target-Identifizierung durch Microarray-Analysen ist, dass die mRNAs durch die sRNA entweder stabilisiert oder destabilisiert werden. Eine Inhibierung der Translation ohne nachfolgenden Abbau der mRNA kann durch diese Methode nicht detektiert werden. Zudem kann auch die Regulation von sekundären Targets detektiert werden, die aus der Regulation des direkten Targets durch die sRNA resultiert. Die Unterscheidung von primären (direkten) und sekundären Targets muss im Anschluss experimentell untersucht werden. Um hauptsächlich Kandidaten für primäre Targets durch Microarray-Analysen zu erhalten, wird häufig die *pulse-expression* Methode angewendet. Die sRNA wird von einem Plasmid mit einem induzierbaren Promotor (z. B. dem Arabinose-abhängigen P_{BAD} Promotor) exprimiert. Die Induktion erfolgt zu dem

gewünschten Zeitpunkt für 10-15 min. gefolgt von der RNA-Isolierung und Microarray-Analysen. Die kurze Zeit der Expression soll ausreichend für den Abbau oder die Stabilisierung der mRNA sein, aber nicht für Veränderung auf dem Proteinlevel, was zu möglichen sekundären Effekten führen kann [62]. Durch die Verwendung der *pulse-expression* Methode in Kombination mit Microarrays konnten für die sRNA RyhB in *E. coli* 18 mögliche primäre Targets gefunden werden [67].

Die bisher genannten Methoden zielen alle auf die Identifizierung von mRNAs als Targets. Um Proteine und auch mRNAs als Targets zu identifizieren, kann die zu untersuchende sRNA an einer Festphase immobilisiert und anschließend mit Zellextrakt inkubiert werden. So können mögliche Interaktionspartner isoliert werden. Die Tryptophanase TnaA wurde durch Immobilisierung der Rcd RNA des ColE1 Plasmides an Sepharose aus dem Zellextrakt von *E. coli* isoliert und durch Massenspektrometrie identifiziert [68].

Neben experimentellen Methoden zur Target-Identifizierung sind auch diverse bioinformatische Methoden entwickelt worden. Basierend auf bekannten sRNA-mRNA Interaktionen sind Algorithmen entwickelt worden, um mögliche Interaktionspartner von sRNAs zu finden. Beispiele hierfür sind die Programme IntaRNA [69] sRNAtarget [70,71], oder TargetRNA [72], welches im Folgenden beschrieben wird. Das webbasierte Programm TargetRNA ermittelt Hybridisierungsmöglichkeiten zwischen der zu untersuchenden sRNA und verschiedenen mRNAs und gibt daraus die möglichen Interaktionspartner an. Die Sequenz der sRNA wird dabei mit dem Genom des gewünschten Organismus verglichen. Dabei kann zusätzlich der Ort der Hybridisierung (z. B. im Bereich des Start- oder Stopp-Codons) auf der mRNA eingeschränkt werden oder die Länge der minimalen, ununterbrochenen Basenpaarung. Zusätzlich kann die Konservierung der gefundenen sRNA-mRNA Interaktionen in verwandten Organismen untersucht werden. Das Programm konnte 8 von 12 zuvor bekannten sRNA-mRNA Interaktionen vorhersagen. Zusätzlich wurden neue Targets für 4 sRNAs ermittelt, die mittels Northern-Blot-Analysen bestätigt werden konnten [73]. Bei dieser Methode werden intramolekulare Basenpaarungen nicht mit einbezogen. Dies kann zu der Vorhersage von unmöglichen Basenpaarungen führen [74].

Die beschriebenen Methoden geben nur Hinweise auf mögliche Targets. Ob es sich um eine direkte Interaktion zwischen der sRNA und mRNA oder einem Protein handelt, muss im Anschluss validiert werden. Verschiedene *in vivo* und *in vitro* Methoden wurden erfolgreich zum Nachweis und zur Charakterisierung der Interaktion angewandt.

Einleitung

Die direkte Interaktion zwischen einer sRNA und der mRNA kann *in vitro* durch *gel shift*-Assays nachgewiesen werden. Dabei wird entweder die sRNA oder die mRNA radioaktiv markiert und beide zusammen inkubiert. Bindet die sRNA an die mRNA, kann im Gel ein *shift* der markierten RNA detektiert werden [65].

Die Bestimmung der Bindestelle der sRNA auf der mRNA kann über sogenanntes RNA *footprinting* mit Blei(II) oder RNasen erfolgen [75]. Hier macht man sich die Eigenschaft von Blei(II)-Acetat zu Nutze, ungepaarte Regionen einer RNA zu spalten. Auch verschiedene RNasen, wie z. B. die RNase T1, die nur nach ungepaarten Guanosin-Resten spaltet, können verwendet werden. Meistens werden verschiedene RNasen oder Blei(II) in Kombination verwendet, um die Bindestelle zu charakterisieren.

Der *in vivo* Nachweis der Interaktion erfolgt häufig über ein Zwei-Plasmid-System. Dabei kann das Target-Gen z. B. mit dem *lacZ*-Gen auf einem Plasmid fusioniert werden. Das Gen für die sRNA wird von einem zweiten Plasmid zusammen mit dem Fusionskonstrukt in der Zelle exprimiert. Die Transkription der Target-mRNA wird über die β -Galaktosidase-Aktivität gemessen. Führt die Bindung der sRNA zu einer Inhibierung der Translation oder zu der Degradierung der mRNA, ist die Aktivität niedrig. Werden Mutationen in der Bindestelle in der sRNA eingefügt, die die direkte Interaktion negativ beeinflussen, kann dies anhand einer steigenden β -Galaktosidase-Aktivität verfolgt werden. Komplementäre Mutationen in der Target-Sequenz sollten dann die Regulation wieder herstellen. Unter anderen wurde die Interaktion der sRNA MicA mit mRNA *ompA* durch diese Methode nachgewiesen [65].

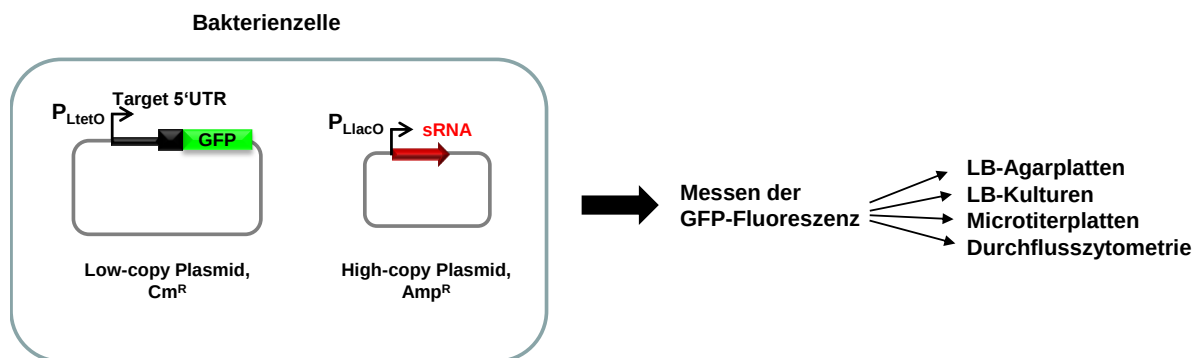


Abb. 1.7: Zwei-Plasmid-System zur Analyse der sRNA vermittelten Translationskontrolle (verändert nach [76]). Mögliche Target-Sequenzen von sRNAs werden als Translationsfusionskonstrukt mit GFP in einem *low-copy* Plasmid, das ein Chloramphenicol-Resistenzgen (Cm^R) trägt kloniert. Das Fusionsprodukt steht unter der Kontrolle eines konstitutiven P_{LtetO-1} Promotors. Die zu untersuchende sRNA wird von einem *high-copy* Plasmid, das ein Ampicillin-Resistenzgen (Amp^R) enthält, unter der Kontrolle des konstitutiven P_{LlacO-1} Promotors exprimiert. Eine Aktivierung oder Inhibierung der Translation kann über Messung der GFP-Fluoreszenz mit verschiedenen Methoden nachgewiesen werden.

Vogel *et al.* [76] entwickelten ein Zwei-Plasmid-System zur Analyse von sRNA vermittelter Translationskontrolle auf Basis von GFP-Fusionskonstrukten (Abb. 1.7). Mögliche Target-Sequenzen von sRNAs werden als Fusionskonstrukt mit GFP in ein *low-copy* Plasmid kloniert. Die sRNA wird in ein kompatibles *high-copy* Plasmid kloniert und beide Plasmide werden in der Bakterienzelle co-exprimiert. Durch *in vivo* Messung der GFP-Fluoreszenz auf LB-Agarplatten, in Standard LB-Kulturen, Microtiterplatten oder mittels Durchflusszytometrie, kann der Einfluss der sRNA auf die Translation des Fusionskonstruktes untersucht werden.

1.5 Oxidativer Stress in Bakterien

Reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) wie das Superoxid-Anion O_2^- , Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oder Hydroxyl-Radikale ($\cdot OH$) entstehen laufend in der Atmungskette von aerob lebenden Bakterien. Äußere Einflüsse wie ionisierende, UV-nahe Strahlung oder verschiedene Verbindungen (z. B. Menadion), die zusätzlich intrazelluläres O_2^- bilden, können zu oxidativem Stress führen [77]. Pathogene Bakterien müssen zudem die oxidative Umgebung, die der Wirt zur Bekämpfung erzeugt, bewältigen, um eine Infektion zu etablieren. Oxidativer Stress entsteht, wenn das Gleichgewicht zwischen entstehenden ROS und dem Antioxidationsmechanismus der Zelle verschoben wird. ROS führen zu Schädigungen an DNA, RNA, Proteinen und Lipiden in der Zelle. Vor allem Membranlipide sind Ziele von freien Radikalen, was zu einem Abfall der Membran-Fluidität und nachfolgend zur Zerstörung Membran-gebundener Proteine führt. In der DNA können ROS zu Doppel- und Einzelstrangbrüchen, DNA-Modifikationen oder Verknüpfung mit anderen Molekülen führen [77]. Schäden an Proteinen beinhalten u. a. die Oxidation von Sulfhydrylgruppen, Reduktion von Disulfiden oder Protein-Protein *cross-linking*. Um die Konzentration der ROS in einem akzeptablen Bereich zu halten und entstandene Schäden zu reparieren, haben Bakterien eine Reihe von Abwehrmechanismen entwickelt. Verschiedene Verbindungen wie NADH, NADPH, β -Carotin und Glutathion sorgen für eine reduzierende Umgebung in der Zelle oder helfen bei der Beseitigung der ROS. Enzyme, wie die Superoxid-Dismutase (SOD) katalysieren die Umsetzung von O_2^- zu H_2O_2 und O_2 . Das H_2O_2 wird wiederum von Katalasen zu H_2O und O_2 umgesetzt. Für die Reparatur von Schäden an der DNA und Proteinen sind diverse Enzyme, wie die Exonuclease III und IV oder die Thioredoxin-Reduktase und die Protein-Disulfid-Isomerase verantwortlich.

Einleitung

Die Induktion der oxidativen Stressantwort durch ROS in Bakterien verläuft hauptsächlich über das SoxR/S- und das OxyR-Regulon [78]. Superoxid-Stress löst die Oxidation des Eisen-Schwefel-Clusters $[2\text{Fe}+2\text{S}]^+$ in dem Transkriptionsfaktor SoxR zu $[2\text{Fe}+2\text{S}]^{2+}$ aus, was zur Aktivierung der Transkription des sekundären Transkriptionsfaktors SoxS führt. SoxS aktiviert die Transkription einer Reihe von Genen der oxidativen Stressantwort wie *sodA* (Mangan-abhängige SOD), *nfo* (Endonuclease IV) und *micF* (sRNA) [78].

OxyR wird durch erhöhte H_2O_2 Konzentration, die zu einer Oxidation eines Cystein-Restes und anschließende Formierung einer intramolekularen Disulfid-Brücke führen, aktiviert [36]. Es aktiviert die Transkription von Genen für die H_2O_2 -Beseitigung wie z. B. das der Katalase G und der sRNA *oxyS* (1.2.2) [78].

1.6 Zielsetzung

Die Entdeckung kleiner nicht-codierender RNAs in Prokaryoten revidierte die Annahme, dass RNA in Prokaryoten nur „Helfer“ bei der Proteinbiosynthese ist. Vielmehr spielen sRNAs wichtige Rollen in verschiedenen regulatorischen Kreisläufen der Zelle. Sie scheinen vor allem bei der Adaption an veränderte Umweltbedingungen wie z. B. bei der Stressantwort wichtige Effektorfunktionen zu haben.

In *E. coli* sind zurzeit 80-100 sRNAs bekannt. Die Entdeckung und Vorhersage zahlreicher weiterer sRNAs suggeriert, dass die tatsächliche Anzahl noch viel höher ist. Die Funktionen sind nur für ca. die Hälfte der sRNAs erforscht.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung der putativen sRNAs HB_428 und RybA in *E. coli*. Dies beinhaltete zunächst die Bestimmung der Transkriptionsstart- und Endpunkte der sRNAs. Durch Analyse des Expressionsmusters unter verschiedenen Wachstums- und Stressbedingungen sollte ein Hinweis auf die Rolle der sRNAs in der Zelle erhalten werden. Für die Analyse der Funktion der sRNAs sollten Knock-out- und Überexpressions-Mutanten hergestellt werden. Die Target-Identifizierung sollte durch den Vergleich der Genexpression zwischen der Knock-out-Mutante und dem Wildtyp mittels Microarray-Analysen durchgeführt werden. Die daraus erhaltenen putativen Targets sollten durch Northern-Blot-Analysen verifiziert werden. Für die Untersuchung des Mechanismus der sRNA-Target-Interaktion sollte zum einen ein Zwei-Plasmid-System verwendet werden. Zum anderen sollten *gel shift*-Assays zur Analyse möglicher sRNA-Protein-Interaktionen durchgeführt werden.

2 Material

2.1 Chemikalien

Alle Standardchemikalien wurden von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (München) in p.a. Qualität erworben.

2.2 Puffer, Lösungen und Medien

Tab. 2.1: Allgemeine Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
AIEX Puffer	25 mM 1-methyl Piperazine; 25 mM Bis-Tris; 12,5 mM Tris-HCl; pH 8,5
Ammoniumpersulfat	10% APS in <i>aqua dest.</i>
Coomassie-Färbelösung	0,02% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250; 5% (w/v) Aluminiumsulfat; 10% (v/v) Ethanol; 2% (v/v) Phosphorsäure
Dialysepuffer	1 mM Tris, pH 8,5; 10 mM NaCl
DNA-Elutionspuffer	150 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl, pH 8; 10 mM NaOAc
DNA-Probenpuffer (6x)	10 mM Tris-HCl; 0,03% (w/v) Bromphenolblau; 0,03 % (w/v) Xylen Cyanol FF; 60 % (v/v) Glycerol; 60 mM EDTA, pH 7,6
EMSA-Puffer (5x)	250 mM Tris-HCl, pH7,8; 250 mM NaCl; 15 mM MgCl ₂ ; 0,5 M EDTA; 0,5 mM DTT; 125 µg BSA/ml
Ethidiumbromid-Färbelösung	4 µg Ethidiumbromid pro ml 1x TAE
Lysispuffer	20 mM Tris-HCl, pH 8; 300 mM NaCl; 20 mM Imidazol
MOPS-Puffer (10x)	0,4 M MOPS; 0,1 M NaOAc 3x H ₂ O; 10 mM EDTA; pH 7,2
Natriumacetat	3 M NaOAc, pH 5,2
RNA- Elutionspuffer	0,3 M NaOAc, pH 5,2
RNA-Probenpuffer (2x)	95% (v/v) Formamid; 0,025 % (w/v) SDS; 0,025 % (w/v) Bromphenolblau; 0,025 % (w/v) Xylen Cyanol FF; 0,025 % (w/v) Ethidiumbromid; 0,5 mM EDTA
Sammelgelpuffer (4x)	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8; 0,4% SDS

Material

SDS-Laufpuffer (5x)	0,125 M Tris, pH 8,3; 0,96 M Glycin; 0,5% SDS
SDS-Probenpuffer (2x)	125 mM Tris-HCl, pH 6,8; 4% SDS; 40% (v/v) Glycerin; 0,002% (w/v) Bromphenolblau
SSC Puffer (20x)	3 M NaCl; 0,3 M Natriumcitrat
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; pH 8
Transkriptionspuffer (5x)	200 mM Tris-HCl, pH 7,9
Trenngelpuffer (4x)	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8; 0,4% SDS

Tab. 2.2: Kommerziell erworbene Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung	Firma
cDNA-Synthesepuffer (5x)	250 mM Trisacetat, pH 8,4; 375 mM Kaliumacetat; 40 mM Magnesiumacetat	Invitrogen
FastAP™ Buffer (10x)	100 mM Tris-HCl; 50 mM MgCl ₂ ; 1 M KCl; 0.2% Triton X-100; 1 mg BSA /ml	Fermentas
PCR-Puffer B (10x)	800 mM Tris-HCl, pH 8,8; 200 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 0,2% (w/v) Tween-20	Solis BioDyne (Estland)
Coomassie Protein Assay Reagent	Zusammensetzung geschützt	Thermo Scientific
Phusion® HF Puffer (5x)	Zusammensetzung geschützt	Finnzymes
PNK-Puffer A (10x)	500 mM Tris-HCl, pH 7,6; 100 mM MgCl ₂ ; 50 mM DTT; 1 mM Spermidin; 1 mM EDTA	Fermentas
Roti®-Hybri-Quick	Zusammensetzung geschützt	Roth
T4-DNA-Ligase-Puffer (10x)	400 mM Tris-HCl; 100 mM MgCl ₂ ; 100 mM DTT; 5 mM ATP; pH 7,8 bei 25 °C	Fermentas
T4-RNA-Ligase-Puffer (10x)	50 mM Tris-HCl, pH 7,8; 10 mM MgCl ₂ ; 10 mM DTT; 1 mM ATP	NEB
Tango-Puffer (10x)	330 mM Tris-Acetat, pH 7,5; 100 mM Magnesiumacetat; 660 mM Kaliumacetat; 1 mg BSA/ml	Fermentas

Tab. 2.3: Medien und Lösungen für die Bakterienkultivierung

Bezeichnung	Zusammensetzung
Ampicillin-Stocklösung	100 mg pro ml 70% EtOH
Chloramphenicol-Stocklösung	34 mg pro ml 70% EtOH
Kanamycin-Stocklösung	25 mg pro ml <i>aqua dest.</i>
LB-Medium	10 mM NaCl; 5% (w/v) Hefeextrakt; 1% (w/v) Trypton
MOPS Minimalmedium	Nach Neidhardt <i>et al.</i> [79]
SOB-Medium	2% (w/v) Trypton; 0,5% (w/v) Hefeextrakt; 42 mM MgSO ₄ ; 8,6 mM NaCl; 2,5 mM KCl
SOC-Medium	2% (w/v) Trypton; 0,5% (w/v) Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl ₂ ; 10 mM MgSO ₄ ; 20 mM Glucose
Tetracyclin-Stocklösung	12,5 mg pro ml EtOH
YT- Medium (2x)	1,6% (w/v) Trypton; 1% (w/v) Hefeextrakt; 86 mM NaCl

2.3 Enzyme

DNase I (RNase-frei)	Fermentas
DpnI	Fermentas
EcoRI	Fermentas
FastAP TM	Fermentas
FIREPol [®] DNA Polymerase	Solis BioDyne
HindIII	Fermentas
Phusion [®] High-Fidelity DNA Polymerase	Finnzymes
Proteinase K	Fermentas
Klenow-Fragment, exo-	Fermentas
RiboLock TM RNase-Inhibitor	Fermentas
SuperScript [®] III Reverse Transcriptase (RNase H-)	Invitrogen
T4 DNA Ligase	Fermentas

Material

T4 Polynucleotidkinase	Fermentas
T4 RNA Ligase	New England Biolabs
T7 RNA-Polymerase	D. Plön [80], AG Hahn
XbaI	Fermentas
XhoI	Fermentas

2.4 Protein– RNA- und DNA-Längenstandards

PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas
PageRuler™ Unstained Protein Ladder	Fermentas
O'GeneRuler™ Ultra Low Range DNA Ladder	Fermentas
O'GeneRuler™ Low Range DNA Ladder	Fermentas
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	Fermentas
RiboRuler™ Low Range RNA Ladder	Fermentas

2.5 Kommerziell erhältliche Kits

HiYield® Plasmid Mini Kit	Süd-Laborbedarf
NucleoBond® Xtra Midi Kit	Machery & Nagel
NucleoSpin® Extract II	Machery & Nagel
Sequenase™ Version 2.0 DNA Sequencing Kit	USB
Random Primed DNA Labeling Kit	Roche
RNeasy® Mini Kit	Qiagen

2.6 Nucleotide und Radionucleotide

Desoxyribonucleotidtriphosphate (dNTPs)	Roth
Ribonucleotidtriphosphate (NTPs)	Roth
[α - 32 P]-dCTP (3000 Ci/mmol)	Hartmann Analytic
[γ - 32 P]-ATP (3000 Ci/mmol)	Hartmann Analytic

2.7 Bakterienstämme

Tab. 2.4: Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Beschreibung	Quelle
GI 724	λ F ⁻ <i>mcrA mcrB</i> IN(<i>rrnD-rrnE</i>)1	DSMZ
SKG0801	GI 724 Δ rybA::kan	Diese Arbeit
SKG0901	GI 724 Δ rybA::HB_428	Diese Arbeit
SKG1001	GI 724 Δ rybA/yliL::kan	Diese Arbeit
SKG1101	JP 8042 Δ rybA::kan	Diese Arbeit
JP 7740	Δ lacU169 <i>recA</i> 56	Yang <i>et al.</i> [81]
JP 8042	JP7740 <i>tyrR</i> 366	Yang <i>et al.</i> [81]
TOP10	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 <i>nupG recA</i> 1 <i>araD</i> 139 Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galE</i> 15 <i>galK</i> 16 <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>endA</i> 1 λ ⁻	Invitrogen
BL21star (DE3)	RNaseE (<i>rne</i> 131) Mutante	Invitrogen

Die Stämme JP 8042 und JP7740 wurden freundlicherweise von Dr. J. Jang und Dr. J. Pittard von der Universität Brisbane, Australien zur Verfügung gestellt.

2.8 Plasmide

Tab. 2.5: Verwendete Plasmide

Plasmid	Trivialname und Beschreibung	Quelle
pSK17	<i>micC</i> unter Kontrolle unter Kontrolle des konstitutiven $p_{LlacO-1}$ Promotors. Origin: ColE1, Resistenz: Amp ^R	Urban <i>et al.</i> [76]
pKE01	Kontroll-Plasmid, pSK17-Derivat mit <i>micC</i> Deletion.	Diese Arbeit
pKG09	pRybA, pSK17-Derivat mit <i>rybA</i> unter Kontrolle des nativen Promotors	Diese Arbeit
pKG10	pRybA _{mut} , pKG09-Derivat, mutiertes AUG in dem putativen ORF im <i>rybA</i> Gen	Diese Arbeit
pKG11	pHB_428; pSK17-Derivat mit <i>HB_428</i> unter Kontrolle des nativen Promotors	Diese Arbeit
pRSET-B	<i>E. coli</i> Expressionsvektor	Invitrogen
pKG02	pTyrR, pRSET-B mit dem <i>tyrR</i> Gen unter Kontrolle des T7 Promotors	Diese Arbeit
pKD13	Enthält die Kanamycin-Resistenz-Kassette	Datsenko <i>et al.</i> [82]
pKD46	Codiert die λ Red Rekombinase	Datsenko <i>et al.</i> [82]
pUC18	Klonierungsvektor	Invitrogen
pXG10	Klonierungsvektor	Urban <i>et al.</i> [76]
pKG12	pYliL ₁ , pXG10-Derivat mit dem <i>yliL</i> Gen unter dem $P_{LtetO-1}$ Promotor und <i>rybA</i> unter Kontrolle des nativen Promotor	Diese Arbeit
pKG13	pYliL _{mut} , pKG12-Derivat, mit mutiertem -10 Element im <i>rybA</i> Promotor	Diese Arbeit

pKG14	pYliL ₂ , pKG12-Derivat, 3'UTR von <i>yliL</i> um 126 bp verkürzt, Keine Expression von <i>rybA</i>	Diese Arbeit
pKG15	pYliL ₃ , pKG12-Derivat, 3'UTR von <i>yliL</i> um 173 bp verkürzt, Keine Expression von <i>rybA</i>	Diese Arbeit
pKG16	pRybA _{sh1} , verkürztes pKG09-Derivat, (-123 bp am 3'-Ende der klonierten Sequenz)	Diese Arbeit
pKG17	pRybA _{sh2} , verkürztes pKG09-Derivat, (-180 bp am 3'-Ende der klonierten Sequenz)	Diese Arbeit
pKG18	pRybA _{sh3} , verkürztes pKG09-Derivat, (-210 bp am 3'-Ende der klonierten Sequenz)	Diese Arbeit
pKG19	pRybA _{sh4} , verkürztes pKG09-Derivat, (-240 bp am 3'-Ende der klonierten Sequenz)	Diese Arbeit
pKG21	pRybA _{pLlacO-1N} , pSK17-Derivat mit <i>rybA</i> unter Kontrolle des konstitutiven p _{LlacO-1} Promotors; Start-Nucleotid von <i>RybA</i> : +1 _{alt}	Diese Arbeit
pKG22	pRybA _{p1} , pKG09-Derivat mit verkürzter Promotor-Region (-25 bp am 5'-Ende der klonierten Sequenz)	Diese Arbeit
pKG23	pRybA _{p2} , pKG09-Derivat mit verkürzter Promotor-Region (-45 bp am 5'-Ende der klonierten Sequenz)	Diese Arbeit
pKG24	pRybA _{p3} , pKG09-Derivat mit verkürzter Promotor-Region (-65 bp am 5'-Ende der klonierten Sequenz)	Diese Arbeit
pKG25	pRybA _{p4} , pKG09-Derivat mit verkürzter Promotor-Region (-85 bp am 5'-Ende der klonierten Sequenz)	Diese Arbeit
pKG26	pRybA _{p5} , pKG09-Derivat mit verkürzter Promotor-Region (-105 bp am 5'-Ende der klonierten Sequenz)	Diese Arbeit
pKG29	pRybA _{pLlacO-1} +1 _{alt} , pKG21-Derivat ohne NheI Schnittstelle	Diese Arbeit

pKG30	pRybA _{pLlacO-1} +1, pKG21-Derivat ohne NheI Schnittstelle; Start-Nucleotid von RybA: +1	Diese Arbeit
pKG31	pRybA ₂₀₆ , verkürztes pKG09-Derivat, enthält nur die Promotorregion und 206 nt Form von <i>rybA</i> .	Diese Arbeit

2.9 Synthetische Oligonucleotide

Alle verwendeten Oligonucleotide wurden von der Firma Invitrogen bezogen.

Tab. 2.6: Verwendete Oligonucleotide

Name	Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'
KG1	KO RybA fwd	GTTGTTGACCATATCGCACAAACATAGAGAGCAGCATTAA CCGTACTTTAAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
KG2	KO RybA rev	TCGTGCGCACATTGTAAACCAGAGTTGCGAAGGTACAAA AAATTAACGTTCTGTCAAACATGAGAATTAA
KG3	IGR_2 fw-XhoI	AGCTCTCGAGTTGTGCTTCCTCATTATGGTGAC
KG4	IGR_2 rev-XbaI	AGCTTCTAGAGTGGAAAGGGGTCCGCATCC
KG5	RybA-Sonde	CTCTTGAACCTCATTTCATAAGACCTCCTGACTTGCTAATC CCGTCGATCCT
KG6	RybA fw	TCATCCCTCAAGGATCGACG
KG7	RybA rev	AGGGAGAATGACTAAACACGC
KG8	3'map HindIII rev	ATGCAAGCTTAAGCAACGTC
KG9	3'map HindIII-bio	GACGTTGCTTAAGCTTGCAT-BIOTIN
KG10	RybA_RACE_EcoRI fw	AGCTGAATTCGCGTGTTTAGTCATTCTCCCT
KG11	Sonde 5 S RNA	GAGACCCACACTACCATCGGCGCTACGGCGTTTCACTT CTGAGTTCGGC
KG12	KO YliL fwd	ATGTGCTTACCCTGGCGTCAAGGGTCAATACCTGCAAGA GTGCGTGAAGAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
KG13	Seq pSK-17 vorm Promotor	CGTCTAAGAAACCATTATTATCATG

Material

	fw	
KG14	pSK17 IGR RybA mut fwd	TGAAATGAGTTCAAGAGGTGTATGC
KG15	pSK17 IGR RybA mut rev	AAGACCTCCTGACTTGCTAATC
KG16	YbiP Sonde fwd	CCCTCAAAGAATCGCTTGT
KG17	YbiP Sonde rev	GAAATACCGGATAGCCAGTATC
KG18	T7 RybA fwd	AATGCTAATACGACTCACTATAGGATGCAATCATCCCTC AAGGAT
KG19	RybA T7 rev	AGGAGTGAAGCGGCGTACCG
KG20	TyrR_XhoI_fwd	CGAGCTCGAGACGTCTGGAAGTCTTTTGTGAA
KG21	TyrR_HindIII_rev	ACTGAAGCTTTTACTCTTCGTTCTTCTTCTGA
KG22	aroL fwd	ACACAACCTCTTTTTCTGAT
KG23	aroL rev	GCGCTGCGAATTTTCAGAAAT
KG24	TyrA fwd	AATTGACCGCATTACGCGAT
KG25	TyrA rev	TGCTCAGTAACGTGGATTGG
KG26	KO R/Y control rev	TTGTGCTTCCTCATTATGGTG
KG27	control YliL fwd	CCACTATCGTAACAAACGCC
KG28	AroF_fwd	AGCTGACGTCTCTTTCTCCTTTTTCAAAGCATAG
KG29	Arof_rev	AGCTGCTAGCCATGATGGCGATCCTGTTTAT
KG30	RybA_fwd 2	AGCTGACGTCTGTGCTTCCTCATTATGGTG
KG31	RybA_rev2	AGCTGCTAGCCCGTACTTTAAAGGGAGAATG
KG32	HB_428 IGR+ygaM XhoI fwd	AGCTCTCGAGATGGGGGATCATATGTTTAACCG
KG33	HB_428 IGR XbaI rev	AGCTTCTAGACGGCAACTGACGAAAGCCC
KG35	HB_428 RT rev2	TTCTTTTTGCCTGGTGAATCA
KG36	3' Sonde RybA	AGGAGTGAAGCGGCGTACCGCGACGCCGCTATTTATCGG AAGGTTTATCT
KG37	HB_428 Sonde	TTGCCTGGTGAATCACAAAAATCCCCCTACCCCGTCACG CTCATATCCAG
KG38	CusC Sonde fwd:	CGCTAACCGGTTGTTCCT

Material

KG39	CusC Sonde rev	ATACGCCAGTTGCTGATT
KG40	CusC (Sonde) fwd 2	ACGCAGCAGATAACTATCAG
KG41	CusC Sonde rev 2	GCGCCAGAACATTACTGCTA
KG42	YliL fwd	GTGGAAAGGGGTCCGCATCC
KG43	YliL rev	ATGCTGCTCTCTATGTTGTGC
KG44	YliL-RybA pXG fwd	AGCT <u>GGTACCG</u> TGGAAAGGGGTCCGCATCC
KG45	YliL-RybA pXG rev1	AGCT <u>TCTAG</u> ATTGTGCTTCCTCATTATGGTGAC
KG46	YliL-RybA pXG rev2	AGCT <u>TCTAGA</u> ATCTGTATGTAATGCAATCATCCC
KG47	YliL-RybA pXG rev3	AGCT <u>TCTAGAG</u> TCAGGAGGTCTTATGAATGAGTT
KG48	RybA -10 mut fwd	GGGGGGTAGCTATTGCTAAAACGTTAATT
KG49	RybA -10 mut rev	ATAGCCTGTGCTATATCTGT
KG50	RybA short rev 1	AGCT <u>TCTAGA</u> ACAAAAAGTGGGGTTTTTCAGAC
KG51	RybA short rev 2	AGCT <u>TCTAGAC</u> GGCGTACCGCGACGCC
KG52	RybA short rev3	AGCT <u>TCTAGA</u> AGGTTTATCTTGCTGCGGTT
KG53	RybA short rev4	AGCT <u>TCTAGAC</u> ATATCGCACAAACATAGAGAGC
KG54	5' Sonde YliL	TCTTGCGAGCCCTGCGTATATTGCGGCTCGCGGATGCGGA CCCTTTCCAC
KG55	TauA fwd	CATCGCGTAACACACTTCTT
KG56	TauA rev	GCCCAGACATAAGCACCATC
KG57	TauB fwd	AACCGGCACTGGAAGATATC
KG58	TauB rev	TGGGTAATCAACAGCACCTG
KG59	Cbl fwd	TACCTCACAGTCAGGCGTCA
KG60	Cbl rev	ACGGCCACTTCGCTATTGAT
KG61	CysP fwd	AGGCAACGGAACTGCTGAAC
KG62	CysP rev	GCCACGACCGCCAGTATCGA
KG63	oxyR fwd	GTGATCTTGAGTACCTGGTGGC
KG64	oxyR rev:	ATAGATAGCCAGCAACATTGGC

Material

KG65	AroF fwd (Sonde)	CTGCAACAAGAAGCCCAGAT
KG66	AroF rev (Sonde)	AGCGTTAATTGCTGTTGCCA
KG74	RybA Sonde 2	AGGAGTGAAGCGGCGTACCGCGACGCCGCTATTTATCGG AAGGTTTATC
KG75	RybA Sonde 3	ACAAAAAGTGGGGTTTTTCAGACCAAAACGCGTTATGCC TGCATGAAAGC
KG67	RybA Prom1 fwd	AGCT <u>CTCGAGCT</u> TCCTCATTATGGTGACGC
KG68	RybA Prom2 fwd	AGCT <u>CTCGAGATA</u> CATAGCGTTCTCATTTCGT
KG69	RybA Prom3 fwd	AGCT <u>CTCGAGGT</u> GCACATTGTAAACCAG
KG70	RybA Prom4 fwd	AGCT <u>CTCGAGAGT</u> TGCGAAGGTACAAAAAATTA
KG71	RybA Prom5 fwd	AGCT <u>CTCGAGT</u> TAAACGTTTTAGCAATAGCTATATAA
KG76	RybA 206 rev XbaI	AGCTTCTAGAAAGGAGTGAAGCGGCGTACCG
KG77	pRybA –P mut fwd1	GTGCTATATCTGTATGTAATGC
KG78	pRybA –P mut fwd2	ATGCAATCATCCCTCAAGGATCG
KG81	RybA NheI fwd	AGCT <u>GCTAGCGT</u> GCTATATCTGTATGTAATGCAAT
KG82	pRybA-Pmut rev-T	GTGCTCAGTATCTTGTTATCCGC
	M13 rev	CAGGAAACAGCTATGACC
	T7 Promotor Primer	TAATACGACTCACTATAGGG
	T7 reverse Primer	TAGTTATTGCTCAGCGGTGG
AR1	T7_CsrB_fwd	AATGCTAATACGACTCACTATAGGGACAGGGAGTCAGAC AAC
AR2	CsrB_rev_XbaI	AGCTTCTAGAAAAAAGGGAGCACTGTATTC

Restriktionschnittstellen sind unterstrichen.

3 Methoden

3.1 Methoden zur Analyse von Nucleinsäuren

3.1.1 Native Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Analyse von DNA-Fragmenten erfolgte über die Auftrennung mittels nativer Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE). In Tab. 3.1 ist die Zusammensetzung der verwendeten Polyacrylamidgele (PAA-Gele) gezeigt.

Tab. 3.1: Zusammensetzung nativer PAA-Gele

Komponente	10%ige Gele
Acrylamid/Bisacrylamid, 19:1 (v/v)	10%
TEMED (v/v)	0,1%
APS (w/v)	0,1%
TAE	1x

Die zu untersuchenden Proben wurden mit 6x DNA-Probenpuffer versetzt und in die Taschen der Gele überführt. Die Trennung erfolgte bei 200 Volt (V) für ca. 30 min. Die DNA wurde im Anschluss mit einer Ethidiumbromidlösung gefärbt und detektiert (3.1.5).

3.1.2 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Analyse und Reinigung von RNA erfolgte mittels denaturierender PAGE. Tab. 3.2 zeigt die Zusammensetzung der verwendeten PAA-Gele:

Tab. 3.2: Zusammensetzung denaturierender PAA-Gele

Komponente	10%ige Gele	8%ige Gele	6%ige Gele
Acrylamid/Bisacrylamid, 19:1 (v/v)	10%	8%	6%
TEMED (v/v)	0,1%	0,1%	0,1%
APS (w/v)	0,1%	0,1%	0,1%
Urea	8 M	8 M	8 M
TAE	1x	1x	1x

Für die Trennung von RNA-Fragmenten wurden 10%- (analytisch), 8%- (präparativ) oder 6%ige (Northern-Blot) denaturierende PAA-Gele verwendet. Die Proben wurden mit 2x RNA Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 90°C denaturiert. Die Geltaschen wurden vor dem Auftrag der Proben mit 1x TAE gespült. Der Vorlauf der Gele und die elektrophoretische Trennung erfolgte bei 8 Watt (W) (analytisch/Northern-Blot) oder 20 W (präparativ) für 20 min bzw. 1 Stunde. Die Detektion der RNA erfolgte mittels Ethidiumbromidfärbung (3.1.5), UV *shadowing* (3.1.6) oder Autoradiographie (3.1.7).

Zur Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes der sRNAs wurden *primer extension* Experimente durchgeführt (3.4). Die Sequenzierreaktion wurde über 8%ige, denaturierende Sequenziergele (Maße: 370 mm x 180 mm x 0,4 mm) analysiert. Der Vorlauf und die elektrophoretische Trennung erfolgten bei 20 W für 30 min bzw. 2,5 Stunden. Im Anschluss wurde das Gel unter Vakuum getrocknet. Die Detektion erfolgte mittels Autoradiographie (3.1.7).

3.1.3 Native Agarose-Gelelektrophorese

Um DNA-Fragmente zu analysieren, die eine Größe von über 400 bp aufwiesen, wurden native Agarosegele verwendet. Für DNA-Fragmente mit einer Größe von 400-3000 bp

Methoden

wurden 1,5%ige Agarosegele verwendet. DNA-Fragmente mit einer Größe von über 3000 bp wurden auf 1%igen Agarosegelen getrennt. Dafür wurde die entsprechende Menge Agarose (w/v) in 1x TAE durch Aufkochen gelöst und erstarrte anschließend in einem Gießstand. Die Proben wurden mit 6x DNA-Probenpuffer versetzt und in die Taschen überführt. Die elektrophoretische Trennung erfolgte bei 150 V für 30-45 min. Die Detektion der Nucleinsäuren erfolgte mittels Ethidiumbromidfärbung (3.1.5)

3.1.4 Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von RNA-Fragmenten von über 400 nt für Northern-Blot-Analysen erfolgte mittels denaturierender Agarose-Gelelektrophorese. Die Zusammensetzung der denaturierenden Agarosegele ist in Tab. 3.3 dargestellt. Zunächst wurde die Agarose in *aqua dest.* durch Aufkochen gelöst. Nach kurzem Abkühlen wurden MOPS-Puffer und Formaldehyd hinzugegeben und vorsichtig vermischt. Die Aushärtung erfolgte in einem Gießstand.

Tab. 3.3: Zusammensetzung denaturierender Agarosegele und Laufpuffer

Komponente	1%ige Gele	Laufpuffer
Agarose (w/v)	1%	
Formaldehyd 37% (v/v)	1,85%	0,6%
MOPS-Puffer (10x)	1x	1x

Vor dem Auftragen wurden die Proben mit 2x RNA Ladepuffer versetzt und für 5 min bei 90°C denaturiert. Die elektrophoretische Trennung erfolgte bei 100 V für 2 Stunden. Zum Entfernen des Formaldehyds wurde das Gel anschließend 3 x für je 10 min mit *aqua dest.* gewaschen. Mittels Northern-Blot (3.1.8) wurde die RNA auf eine Nylonmembran übertragen. Die Detektion erfolgte durch Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden (3.1.8) und Autoradiographie (3.1.7).

3.1.5 Nachweis von Nucleinsäuren mittels Ethidiumbromidfärbung

Für die Detektion von Nucleinsäuren in Polyacrylamidgelen und Agarosegelen wurden die Gele für 5-10 min in einem Ethidiumbromidbad (4 µg Ethidiumbromid/ml 1x TAE) inkubiert

und anschließend unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 254 nm dokumentiert. Das Ethidiumbromid interkaliert zwischen die Basen der Nucleinsäuren und wird durch die Bestrahlung mit UV-Licht zur Fluoreszenz angeregt. Dadurch erscheinen Nucleinsäuren als leuchtende Banden im Gel.

3.1.6 Detektion von Nucleinsäuren durch UV-shadowing

Beim UV-shadowing macht man sich die Eigenschaften der Nucleinsäuren zu Nutze, Licht einer Wellenlänge von 260 nm zu absorbieren. Bei der präparativen Reinigung von Nucleinsäuren aus PAA-Gelen wurden die Gele nach erfolgter Elektrophorese in Klarsichtfolie eingeschlagen. Das Gel wurde auf eine Dünnschichtschromatographieplatte überführt, welche mit einem bei 254 nm absorbierenden Fluoreszenzfarbstoff beschichtet war. Durch Anregung dieses Farbstoffes mit Licht der entsprechenden Wellenlänge konnten Nucleinsäuren als Schattenbanden detektiert, markiert und ausgeschnitten werden. Die Extraktion der Nucleinsäuren aus dem Gel erfolgte mittels Diffusionselution (3.2.1).

3.1.7 Detektion von Nucleinsäuren mittels Autoradiographie

Die Autoradiographie ist geeignet, um kleinste Mengen radioaktiv markierter Nucleinsäuren in PAA-Gelen oder auf Northern-Blot Membranen zu detektieren. Die PAA-Gele oder Northern-Blot Membranen wurden dazu in einer lichtgeschützten Kassette einem Phosphorimager-Screen exponiert. Die Expositionsdauer richtete sich nach der Strahlungsintensität der Proben und reichte von einigen Minuten bis zu mehreren Tagen. Die Dokumentation und Auswertung erfolgte mit dem Personal FX Imager der Firma BioRad und der Software Quantity One®.

3.1.8 Northern-Blot-Analysen

Zum spezifischen Nachweis von sRNAs und mRNAs wurden Northern-Blot-Analysen durchgeführt. Zur Analyse kleiner RNAs (< 400 nt) wurden 10 µg isolierter Total-RNA (3.2.7) auf einem 6% denaturierendem PAA-Gel getrennt (3.1.2). Die RNA wurde im Anschluss mit dem *semi-dry* Blot-Verfahren unter Verwendung des Trans-Blot® SD der

Methoden

Firma BioRad auf eine positiv geladene Nylonmembran (Roche) übertragen. Der Transfer erfolgte bei 80 mA pro Gel für 2 Stunden.

Für die Analyse von RNAs mit einer Länge von über 400 nt wurde die Total-RNA in einem denaturierenden Agarosegel getrennt (3.1.4). Der Transfer auf die positiv geladene Nylonmembran erfolgte mittels Kapillarblot. Dafür wurde das Agarosegel in einem mit 20x SSC gefülltem Pufferreservoir auf einem Träger positioniert, der über puffergetränkte Filterpapiere (Rotilabo®-Blottingpapier, Roth) mit dem Reservoir verbunden war. Die zuvor in 20x SSC äquilibrierte Membran wurde auf das Gel gelegt und mit weiteren puffergetränkten sowie zwei trocknen Filterpapieren überschichtet. Zur Erhaltung der Kapillarkräfte wurde ein Stapel trockenes Handtuchpapier platziert und mit einem Gewicht beschwert. Der Transfer erfolgte für 6 – 16 Stunden.

Im Anschluss wurden die Nucleinsäuren durch *cross-linking* mit UV-Licht ($0,12 \text{ kV/cm}^2$) auf der Membran fixiert. Die Detektion der RNA auf der Membran erfolgte über die Hybridisierung mit gen-spezifischen, radioaktiv markierten (3.3.6 und 3.3.7.) DNA Sonden. Dafür wurden die Membranen zunächst für 1-2 Stunden in 5-10 ml Roti®-Hybriquick Hybridisierungspuffer mit 50 µg Lachssperma DNA pro ml Puffer bei 65°C unter konstanter Rotation in einem Hybridisierungssofen prähybridisiert. Die DNA-Sonden wurden vor der Zugabe für 3 min bei 95°C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Die Hybridisierung wurde über Nacht bei 65°C unter konstanter Rotation durchgeführt. Um überschüssige und unspezifisch gebundene Sonden zu entfernen wurde die Membranen im Anschluss nacheinander für jeweils 15 min bei 55°C mit 2x SSC, 0,5% SDS, 1x SSC, 0,5% SDS und 0,5x SSC, 0,5% SDS gewaschen. Die Detektion erfolgte mit Hilfe des Phosphorimagers (3.1.7).

Um zu gewährleisten, dass jeweils gleiche Mengen an RNA eingesetzt wurden und keine Degradierung der RNA vorlag, wurde die RNA in den Gelen vor dem Blotten mit Ethidiumbromid gefärbt (3.1.5). Der Vergleich der 5S, 16S und 23S rRNA in den verschiedenen Proben zeigte, ob gleiche Mengen der jeweiligen RNA vorhanden waren.

Alternativ wurde die Membran nach Hybridisierung mit der genspezifischen Sonde mit einer Sonde für die 5S rRNA hybridisiert.

3.2 Methoden zur Isolierung und Reinigung von Nucleinsäuren

3.2.1 Diffusionselution von Nucleinsäuren aus Polyacrylamidgelen

Zur Diffusionselution von Nucleinsäuren aus präparativen PAA-Gelen wurden die mittels UV-*shadowing* (3.1.6) detektierten Nucleinsäurebanden aus dem Gel ausgeschnitten und mit 200-350 µl DNA- bzw. RNA-Elutionspuffer überschichtet. Die Elution erfolgte unter Schütteln im Thermomixer bei 42°C (DNA) oder 37°C (RNA) für 45 min bzw. 1 Stunde. Der Überstand wurde abgenommen, frischer Elutionspuffer hinzugegeben und erneut wie oben beschrieben inkubiert. Die Eluate wurden im Anschluss vereinigt und die Nucleinsäuren mit Isopropanol präzipitiert (3.2.5).

3.2.2 Reinigung von Nucleinsäuren über Micro Bio-Spin® P30/P 6 Säulen

Nach radioaktiver Markierung von Nucleinsäuren (3.3.6, 3.3.7) wurden nicht eingebaute radioaktive Nucleotide über Micro Bio-Spin® P30 oder P6 Säulen der Firma BioRad entfernt. Die Durchführung erfolgte gemäß Herstellerangaben.

3.2.3 Reinigung von DNA-Fragmenten mittels PCR *purification kit*

Die Entsalzung von DNA-Fragmenten sowie die Reinigung von PCR-Produkten von Oligonucleotiden und Nucleotiden erfolgte mit dem NucleoSpin® Extract II Kit der Firma Machery & Nagel nach Herstellerangaben.

3.2.4 Reinigung von Nucleinsäuren mittels Phenol-Chloroform Extraktion

Zum Entfernen von Proteinen aus Nucleinsäure-enthaltenen Lösungen nach enzymatischen Reaktionen wurde eine Phenol-Chloroform Extraktion durchgeführt. Das Reaktionsvolumen wurde auf 100 µl mit *aqua dest.* aufgefüllt und mit einem Volumen Phenol-Chloroform (Verhältnis 1:1) versetzt. Dabei wurde für die Reinigung von RNA saures Phenol (pH < 7) verwendet. Nach sorgfältigem Mischen wurde der Ansatz für 5 min bei 10.000 x g zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde im Anschluss 2x mit 1 Volumen Chloroform

gegenextrahiert, um verbliebene Phenolreste zu entfernen. Zur Konzentration der Nucleinsäuren schloss sich eine Alkoholpräzipitation an (3.2.5).

3.2.5 Alkoholpräzipitation von Nucleinsäuren

Nucleinsäuren lassen sich in Gegenwart monovalenter Kationen und Alkohol präzipitieren und somit konzentrieren. Die Präzipitation erfolgte unter Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat, pH 5,3 und 2,5 Volumen absolutem, eiskaltem Ethanol oder 1 Volumen absolutem, eiskaltem Isopropanol und Inkubation bei -20°C für 1 Stunde oder bei -80°C für 15 min. Im Anschluss wurden die Proben für 20 min zentrifugiert (18.000 x g und 4°C). Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen. Nach 5 minütiger Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und das Pellet bei 37°C für ca. 10 min getrocknet und anschließend in *aqua dest.* aufgenommen.

3.2.6 Konzentrations- und Reinheitsbestimmungen von Nucleinsäuren

Die Quantifizierung der wässrigen DNA- und RNA-Lösungen erfolgte photometrisch am NanoDrop ND-1000 bei einer Wellenlänge von 260 nm. Es wurde 1 µl der Probe eingesetzt. Für die Berechnung der Konzentration gelten folgende Zusammenhänge:

$$\begin{aligned} \text{OD}_{260} = 1 & \quad \sim 50 \mu\text{g dsDNA/ml} \\ \text{OD}_{260} = 1 & \quad \sim 33 \mu\text{g RNA/ml} \\ x \text{ pmol} \sim & \quad (x \mu\text{g} \times 10^6) / (325 \times \text{Anzahl der Basen}) \end{aligned}$$

Gleichzeitig wurde die Absorption bei 280 nm gemessen, wo Proteine durch ihre Tyrosin- und Tryptophanreste absorbieren. Der Quotient $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ ist ein Maß für die Reinheit der Probe. RNA-Proben galten als rein, wenn sie durchschnittlich einen Quotienten $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ von 2,0 aufwiesen und DNA-Proben bei einem Quotienten $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ von durchschnittlich 1,8.

3.2.7 Heiße Phenol Extraktion zur Isolierung von Total-RNA aus *E. coli*

Die Isolierung von Total-RNA aus *E. coli* erfolgte mittels heißer Phenol-Extraktion. Dabei wurde saures Phenol verwendet, so dass sich Lipide, DNA und Proteine in der organischen (Phenol-) Phase befanden oder ausfielen, während die RNA in der wässrigen Phase verblieb.

Für die Zelllyse wurde das gefrorene Zellpellet (3.7.3) in 700 µl 0,5 mg Lysozym pro ml TE-Puffer gelöst und nach Zugabe von 1/10 Volumen 10% SDS für 1-2 min im Wasserbad bei 65°C inkubiert. Es wurden 1/10 Volumen 1 M Natriumacetat, pH 5,2 und ein Volumen 65°C heißes Phenol hinzugeben. Nach 10-maligen invertieren wurden die Proben für 6 min bei 65°C im Wasserbad inkubiert und dabei alle 40 s invertiert. Es folgte eine kurze Inkubation auf Eis mit anschließender Zentrifugation für 5 min bei 10.000 x g zur Phasentrennung. Die wässrige Phase wurde in ein neues Gefäß überführt und die Phenolextraktion wie oben beschrieben wiederholt. Um anschließend Phenolreste zu entfernen, wurde die wässrige Phase mit einem Volumen Chloroform versetzt, 10x invertiert und zur Phasentrennung 5 min bei 10.000 x g zentrifugiert. Nach Wiederholung der Chlorformextraktion wurde die RNA aus der wässrigen Phase mittels Isopropanolpräzipitation (3.2.5) gefällt und das Pellet in *aqua dest.* aufgenommen.

3.2.8 Isolierung von genomischer DNA aus *E. coli*

Genomische DNA (gDNA) diente als Templat für die Amplifikation (3.3.1) und anschließende Klonierung (3.6) von DNA-Fragmenten. Für die Isolierung wurden 2 ml LB-Medium mit einer Kolonie *E. coli* GI 724 angeimpft und über Nacht bei 37°C in einem Inkubationsschüttler bei 220 rpm inkubiert. Die Zellen wurden anschließend bei 10.000 x g für 2 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 460 µl TE-Puffer, pH 8 resuspendiert. Nach Zugabe von 30 µl 10% SDS und 3 µl Proteinase K (20 mg/ml) wurde der Ansatz für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Extraktion der gDNA erfolgte durch Zugabe von einem Volumen Phenol (pH 8)/Chloroform im Verhältnis 1:1. Der Ansatz wurde vorsichtig durch invertieren gemischt und für 10 min bei 10.000 x g zentrifugiert. Die Extraktion wurde einmal wiederholt und die DNA durch Zugabe von 1/10 Volumen 3M Natriumacetat und 0,6 Volumen Isopropanol aus der wässrigen Phase gefällt. Mit Hilfe einer am Ende gebogenen Pasteur-Pipette wurde die DNA aus der Lösung geangelt und mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen. Nach 5 min Zentrifugation bei 18.000 x g und Entfernen des Überstandes wurde das Pellet in 200 µl TE-Puffer aufgenommen und die Konzentration bestimmt (3.2.6).

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

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* Zellen erfolgte mit dem HiYield® Plasmid Mini Kits der Firma Süd-Laborbedarf nach Herstellerangaben.

3.3 Methoden zur Präparation von Nucleinsäuren

3.3.1 Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Doppelstrang-DNA-Fragmente wurden mit Hilfe der Polymerase-Kettreaktion (PCR) hergestellt und amplifiziert. Die Amplifikation erfolgte unter Verwendung einer thermostabilen DNA-Polymerase (Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus*) und zwei Oligonucleotiden (Primer), die das zu vermehrende Fragment flankieren. Als Templat dienten entweder isolierte Plasmid-DNA (3.2.9), gDNA oder ein Teil einer *E. coli* Kolonie. Tab. 3.4 zeigt einen typischen PCR-Ansatz.

Tab. 3.4: Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes

Komponente	Volumen	Endkonzentration
Templat	1-5 µl	
10x PCR Puffer B	3 µl	1x
MgCl ₂ [25 mM]	3 µl	2,5 mM
dNTPs [25 mM]	0,4 µl	0,3 mM
Primer <i>forward</i> [100 µM]	0,5 µl	1,7 µM
Primer <i>reverse</i> [100 µM]	0,5 µl	1,7 µM
FIREPol® (5 U/µl)	0,5 µl	0,08 U
<i>aqua dest.</i>	Ad 30 µl	

Bei Verwendung von Plasmid-DNA als Templat wurden 10-15 ng DNA eingesetzt. Diente eine *E. coli* Kolonie als Templat, so wurde diese von einer LB-Agar Platte mit einer sterilen

Methoden

Spitze gepickt und etwas Zellmaterial direkt in den PCR-Ansatz überführt. Die PCR wurde bei folgendem Temperaturprofil durchgeführt:

Tab. 3.5: Temperaturprofil der PCR

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	95°C	5 min
Denaturierung	95°C	30 s
Hybridisierung der Primer	45-55°C	30s
Elongation	72°C	0,5 – 1,5 min
Finale Elongation	72°C	5 min

Für die Amplifikation größerer DNA-Fragmente (>1 kb) wurde die Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes) verwendet, da dieses Enzym im Gegensatz zur Taq-Polymerase eine Korrekturlesefunktion besitzt. Als Templat diente entweder gDNA (3.2.8) oder Plasmid-DNA. Tab. 3.6 gibt die Zusammensetzung des PCR Ansatzes an. Bei Verwendung von Plasmid-DNA als Templat wurden 10 ng DNA eingesetzt. Für die Amplifikation von DNA-Fragmente mit gDNA als Templat wurden 250 ng DNA eingesetzt. Folgendes Temperaturprofil wurde verwendet:

Tab. 3.6: Zusammensetzung eines PCR Ansatzes unter Verwendung der Phusion® DNA Polymerase

Komponente	Volumen	Endkonzentration
Templat-DNA	1-5 µl	
5x Phusion® HF Puffer	10 µl	1x
dNTPs [25 mM]	0,4 µl	200 µM
Primer <i>forward</i> [100 µM]	0,25 µl	0,5 µM
Primer <i>reverse</i> [100 µM]	0,25 µl	0,5 µM
Phusion®DNA Polymerase (2 U/µl)	0,5 µl	0,02 U/µl
<i>aqua dest.</i>	Ad 50 µl	

Methoden

Die Hybridisierung-Temperatur wurde für jede Oligonucleotid-Kombination experimentell bestimmt. Die Elongationszeit richtete sich nach der Größe des erwarteten PCR-Produktes. Generell galt 1 min Elongation pro kb PCR-Produkt bei Verwendung der Taq-Polymerase und 15-30 s pro kb bei Verwendung der der Phusion®DNA Polymerase. Es wurden jeweils 25 Zyklen durchgeführt. Der Erfolg der PCR wurde in allen Fällen mittels Agarosegelelektrophorese (3.1.3) oder nativer PAGE (3.1.1) mit anschließender Ethidiumbromidfärbung überprüft (3.1.5).

Tab. 3.7: Temperaturprofil der PCR unter Verwendung der Phusion® DNA Polymerase

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	98°C	30 s
Denaturierung	98°C	10 s
Hybridisierung der Primer	45-55°C	20 s
Elongation	72°C	15 s – 60 s
Finale Elongation	72°C	5 min

3.3.2 *In vitro* T7 Transkription

RNA lässt sich mit Hilfe der RNA Polymerase aus dem T7 Phagen *in vitro* herstellen. Dazu wird ein DNA Templat, das den T7 Promotor enthält, benötigt. Das DNA Templat für die *in vitro* Transkription der sRNA RybA und der Kontroll-RNA CsrB wurde mittels Kolonie-PCR (3.3.1) unter Verwendung der Oligonucleotide KG18/KG19 bzw. AR1/AR2 (Tab. 2.6) hergestellt. Tab. 3.8 zeigt die Zusammensetzung eines T7-Transkriptionsansatzes.

Tab. 3.8: Zusammensetzung eines T7 Transkriptionsansatzes

Komponente	Volumen	Endkonzentration
DNA Templat	5 µl	
5x T7 Puffer	10 µl	1x
MgCl ₂ [100 mM]	7,5 µl	15 mM
NTPs [25 mM]	4 µl	2 mM
T7 Polymerase (150 U/µl)	1 µl	3 U/µl
aqua dest.	Ad. 50 µl	

Die Transkription erfolgte für 3 Stunden bei 37°C. Die RNA wurde anschließend über ein präparatives 8% denaturierendes PAA-Gel gereinigt (3.1.2).

3.3.3 Ortsspezifische Mutagenese

Für den gezielten Austausch von Nucleotiden in einem Gen wurde die *site-directed mutagenesis* oder ortsspezifische Mutagenese angewendet. Der Austausch erfolgte mittels PCR mit der Phusion® DNA Polymerase (3.3.1) und dem Ausgangsvektor, der das Gen enthält, in das die Mutation eingeführt werden sollte. Dabei wurden Oligonucleotide verwendet, die das gesamte Plasmid amplifizieren und von denen ein Oligonucleotid die gewünschte Mutation enthält. Um das Ausgangsplasmid nach der PCR zu entfernen wurde zu dem Ansatz 1 µl DpnI gegeben und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. DpnI schneidet nur, wenn das Adenin in der Erkennungsstelle methyliert ist und gewährleistet so nur den Abbau

des Ausgangsplasmids. Nach Reinigung des PCR Produktes mit dem NucleoSpin® Extract II Kit der Firma Machery & Nagel (3.2.3) wurden 100 ng des neu synthetisierten, linearen Plasmides zunächst mittels T4 Polynucleotidkinase (T4 PNK) phosphoryliert und anschließend mit Hilfe der T4 DNA Ligase zirkularisiert.

Tab. 3.9: Ansatz für die Phosphorylierung und Zirkularisierung des PCR-Produktes

Komponente	Volumen	Endkonzentration
PCR Produkt	1-5 µl	
10x T4 DNA Ligase Puffer	2 µl	1x
50% PEG 4000	2 µl	5%
T4 PNK (10 U/µl)	0,5 µl	0,25 U/µl
aqua dest.	Ad. 19 µl	

Der Ansatz wurde für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 1 µl T4 DNA Ligase wurde die Zirkularisierung über Nacht bei 22°C durchgeführt. Nach erneuter Reinigung mittels NucleoSpin® Extract II Kit (3.2.3) wurden *E. coli* Top10 Zellen mit dem zirkularisierten Plasmid transformiert. Der erfolgreiche Austausch wurde durch Sequenzierung (3.3.4) des Plasmides überprüft.

3.3.4 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die Verifizierung von klonierten DNA-Fragmenten erfolgte mittels Sequenzierung der Plasmide bei der Firma SeqLab (Göttingen). Die für die Sequenzierung der verschiedenen Plasmide verwendeten Primer sind in Tab. 3.10 aufgeführt.

Tab. 3.10: Für die Sequenzierung der konstruierten Plasmide verwendeten Primer.

Primer für die Sequenzierung	Plasmid
KG13	pKG9, pKG10, pKG11, pK12, pKG13, pKG14, pKG15, pKG16, pKG17, pKG18, pKG18, pKG19,
T7 reverse Primer; T7 Promotor Primer	pKG02
M13 rev	pUC18

3.3.5 Dephosphorylierung von Nucleinsäuren

Die Dephosphorylierung von DNA und RNA diente zum einen der Vorbereitung auf die radioaktive 5'-Markierung mittels T4 Polynucleotidkinase (3.3.6). Zum anderen wurden Plasmide nach erfolgter Spaltung mit Restriktionsenzymen (3.6.1) dephosphoryliert, um bei der anschließenden Ligation eine Rezirkularisierung zu vermeiden. Zur Dephosphorylierung wurde das Enzym alkalische Phosphatase FastAPTM verwendet.

Tab. 3.11: Ansatz zur Dephosphorylierung von DNA/RNA

Komponente	Volumen	Endkonzentration
DNA/RNA	1-10 µl	>0,5 µM
10x FastAPTM Puffer	2 µl	1x
FastAPTM (1 U/µl)	1 µl	0,05 U/µl
<i>aqua dest.</i>	Ad. 20µl	

Die Dephosphorylierung von Plasmid-DNA erfolgte durch Zugabe von 1 µl FastAPTM zu dem Restriktionsansatz (3.6.1). Alle Ansätze wurden 10-30 min bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte bei 75°C für 5 min. Für die radioaktive 5'-Markierung wurde die FastAPTM mittels Phenol-Chlorform Extraktion (3.2.4) aus dem Ansatz entfernt.

3.3.6 Radioaktive 5'-Markierung von Nucleinsäuren

Um Nucleinsäuren radioaktiv zu markieren wurde die T4 Polynucleotidkinase (PNK) verwendet. Die T4 PNK phosphoryliert DNA oder RNA am 5'-Terminus und wurde unter Verwendung von γ -[³²P]-ATP als Substrat zur Herstellung radioaktiv markierter Nucleinsäuren genutzt (Tab. 3.12).

Tab. 3.12: Ansatz zur radioaktiven 5'-Markierung von Nucleinsäuren

Komponente	Volumen	Endkonzentration
DNA/RNA	1-10 µl	>2 µM
10x PNK Puffer A	2 µl	1x
γ -[³² P]-ATP (10 µCi/µl)	1-6 µl	0,5 – 3 µCi/µl
T4 PNK (10 U/µl)	1 µl	0,5 U/µl
<i>aqua dest.</i>	Ad. 20 µl	

Der Ansatz wurde für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung der PNK erfolgte durch Zugabe von 1 µl 0,5 M EDTA, pH 8. Nicht inkorporiertes γ -[³²P]-ATP wurde mittels P6 oder P 30 Säulen (3.2.2) aus dem Ansatz entfernt. Der Erfolg der Markierung wurde auf 10% nativen (DNA, 3.1.1) oder 10% denaturierenden (RNA, 3.1.2) PAA-Gelen überprüft. Gegebenenfalls schloss sich ein zweiter Reinigungsschritt mittels präparativer PAGE an.

3.3.7 Radioaktive Markierung von DNA mittels *random priming*

Die Herstellung von radioaktiv markierten DNA-Sonden für Northern-Blot-Analysen wurde mit dem *Random Primed Labeling Kit* der Firma Roche und [α - 32 P]-dCTP (3000 Ci/mmol) nach Herstellerangaben durchgeführt. Das DNA-Templat für die Markierung wurde mittels PCR (3.3.1) hergestellt und mit dem NucleoSpin® Extract II Kit gereinigt. Nicht inkorporiertes [α - 32 P]-dCTP wurde über P6 oder P30 Säulen (3.2.2) aus dem Ansatz entfernt. Die für die Herstellung des DNA-Templats verwendeten Primer (Tab. 2.6) sind in Tab. 3.13 aufgeführt.

Tab. 3.13: Primer zu Herstellung der DNA-Templat für die radioaktive Markierung der DNA-Sonden.

Oligonucleotid-Paar	Sonde
KG65/66	AroF
KG22/23	AroL
KG59/60	Cbl
KG40/41	CusC
KG61/62	CysP
KG55/56	TauA
KG57/58	TauB
KG24/25	TyrA
KG63/64	OxyR
K16/17	YbiP
KG42/43	YliL-RybA

3.4 Bestimmung des 5'-Endes mittels *primer extension*

Für die Bestimmung des 5'-Ende der sRNA wurden zunächst 10 µg Total-RNA aus *E. coli* einer DNaseI Spaltung unterzogen, um Reste genomischer DNA zu entfernen. Die Spaltung erfolgte unter Zugabe von 1 Unit DNaseI und 20 U RNase Inhibitor (RiboLock™) in

Methoden

1x DNaseI Reaktionspuffer für 30 min bei 37°C. Die DNaseI wurde anschließend unter Zugabe von 1 µl 25 mM EDTA bei 65°C für 10 min inaktiviert. Für die *primer extension* Analyse wurde die RNA über Reverse Transkription (RT) mit einem genspezifischen, 5'-radioaktiv markiertem (3.3.6) *reverse* Primer und der SuperScript™ III Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Nach Hybridisierung von 1 pmol *reverse* Primer mit der RNA für 5' bei 65°C wurden folgenden Komponenten hinzugegeben:

Tab. 3.14: Zusammensetzung eines RT-Ansatzes

Komponente	Volumen	Endkonzentration
RNA + Primer	13 µl	
5x cDNA Synthesepuffer	4 µl	1x
dNTPs [25 mM]	0,4 µl	300 µM
DTT [100 mM]	1 µl	2 mM
RiboLock™ (40 U/µl)	0,5 µl	1 U/µl
SuperScript™ III (200 U/µl)	1 µl	50 U/µl
aqua dest.	Ad. 20 µl	

Zusätzlich wurde ein Ansatz ohne Zugabe des Enzyms Reverse Transkriptase als Negativkontrolle mitgeführt. Die RT wurde für ein Stunde bei 50°C durchgeführt und die Reverse Transkriptase anschließend bei 70°C für 10 min inaktiviert. Die Sequenzierreaktion wurde mit dem Sequenase™ Version 2.0 DNA Sequencing Kit der Firma USB unter Verwendung des genspezifischen, 5'-radioaktiv markiertem *reverse* Primer nach Herstellerangaben durchgeführt. Grundlage der Sequenzierreaktion war die Didesoxymethode nach Sanger [83]. Als Templat diente ein Plasmid, das das Gen für die entsprechende RNA enthält. Zur Analyse wurden 1-5 µl des RT-Ansatzes und jeweils 3 µl der Sequenzierreaktion in einem 8%igen denaturierenden PAA Gel getrennt (3.1.2). Das Gel wurde im Anschluss unter Vakuum getrocknet und die radioaktiven Banden mittels Autoradiographie (3.1.7) detektiert.

3.5 Bestimmung des 3'-Endes mittels *rapid amplification of cDNA ends* (RACE)

Um das 3'-Ende der sRNAs zu bestimmen wurde die RACE-Methode angewandt. Es handelt sich dabei um eine Methode zur Amplifikation von cDNA Enden der zu untersuchenden RNA zur Bestimmung des 3'- oder 5'-Ende. Durch Ligation eines Adapter-Oligonucleotids durch die T4 RNA Ligase mit anschließender reverser Transkription wird isolierte Total-RNA zunächst in cDNA umgeschrieben. Mittels PCR mit einem Adapter-spezifischen und einem Gen-spezifischen Oligonucleotid wird anschließend die zu untersuchende cDNA amplifiziert. Die Analyse erfolgt über Klonierung und Sequenzierung der erhaltenen PCR-Produkte. Die Total-RNA aus *E. coli* wurde vor der Ligation des Adapters einer DNaseI Spaltung unterzogen. Zu 10 µg RNA wurden 1 Unit DNase I und 20 U RNase Inhibitor (RiboLock™) gegeben und in 1x DNaseI Reaktionspuffer für 30 min bei 37°C inkubiert. Die DNaseI wurde anschließend nach Zugabe von 1 µl 25 mM EDTA bei 65°C für 10 min inaktiviert. Für die Ligation wurde die RNA in Anwesenheit von 500 pmol des biotinylierten Adapter-Oligonucleotids KG9 (Tab. 2.6) für 5 min bei 95°C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Der Ligationsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Tab. 3.15: Ansatz zu Ligation des Adapter-Oligonucleotids

Komponente	Volumen	Endkonzentration
RNA + Adapter-Oligonucleotid	10 µl	
10x T4 RNA Ligase Puffer	20 µl	1x
RiboLock™ (40 U/µl)	0,5 µl	1 U/µl
T4 RNA Ligase (20 U/µl)	5 µl	5 U/µl
aqua dest.	Ad. 20 µl	

Als Negativkontrolle wurde ein Ansatz ohne Zugabe von T4 RNA Ligase angefertigt. Die Ligation erfolgte für 12 h bei 17°C. Zur Reinigung des Ligationsansatzes wurde eine Phenol-Chloroform Extraktion (3.2.4) mit anschließender Alkoholpräzipitation (3.2.5) durchgeführt. Die cDNA wurde mit Hilfe der Reversen Transkriptase SuperScript™ III und einem Adapter-spezifischen *reverse* Primer für eine Stunde bei 50°C synthetisiert (Tab. 3.16). Der

Methoden

gereinigte Ligationsansatz wurde zuvor mit 100 pmol des *reverse* Primers für 5' bei 65°C hybridisiert.

Tab. 3.16: Zusammensetzung des RT-Ansatzes für das 3'-RACE

Komponente	Volumen	Endkonzentration
RNA + Primer	13 µl	
5x cDNA Synthesepuffer	4 µl	1x
dNTPs [25 mM]	0,4 µl	300 µM
DTT [100 mM]	1 µl	2 mM
RiboLock™ (40 U/µl)	0,5 µl	1 U/µl
SuperScript™III (200 U/µl)	1 µl	50 U/µl
aqua dest.	Ad. 20 µl	

Die Amplifikation der zu untersuchenden cDNA erfolgte mittels PCR (3.3.1). Als Templat wurden 2 µl des RT-Ansatzes eingesetzt. Der Erfolg der RACE-PCR wurde auf einem 10% nativen PAA-Gel überprüft. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden in das Plasmid pUC18 kloniert (3.6) und das Produkt zur Analyse des 3'-Endes sequenziert (3.3.4).

3.6 Klonierungstechniken

3.6.1 Enzymatische Spaltung von Nucleinsäuren

Für Klonierungen wurden die mittels PCR amplifizierten DNA-Fragmente (3.3.1) und das Empfänger-Plasmid jeweils mit geeigneten Restriktionsenzymen geschnitten. Die Restriktionsschnittstellen wurden über die bei der PCR verwendeten Oligonucleotide in das zu klonierende Fragment eingebracht. Für die Spaltung wurden im Allgemeinen 1,5 bis 3 µg Empfänger-Plasmid sowie ca. 1 µg des DNA-Fragmentes (Insert) eingesetzt. Die Reaktion wurde in dem für das Enzym empfohlenen Puffer bei 37°C über Nacht durchgeführt. Das Plasmid wurde im Anschluss dephosphoryliert (3.3.5). Insert und Plasmid wurden nach der Reaktion mittels NucleoSpin® Extract II Kit gereinigt (3.2.3).

3.6.2 Ligation

Die Ligation des geschnittenen Plasmids mit dem Insert (3.6.1) wurde mit Hilfe der T4 DNA-Ligase durchgeführt. In einem Reaktionsvolumen von 10 µl wurde ein molares Verhältnis von Plasmid zu Insert von 5:1 oder 3:1 in 1x T4 DNA Ligase Puffer eingesetzt. Die Reaktion erfolgte unter Zugabe von 5 U T4 DNA Ligase über Nacht bei 22°C. Als Negativkontrolle wurde ein Ansatz ohne die Zugabe von Insert angefertigt. Die Ligase wurde anschließend für 10 min bei 65°C inaktiviert.

3.6.3 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen für die Elektroporation

Für die Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen für die Transformation mittels Elektroporation wurde eine Vorkultur von *E. coli* Zellen in LB-Medium angesetzt und über Nacht bei 37°C und 220 rpm inkubiert. Eine 40 ml Hauptkultur wurde mit 1/100 Volumen der Vorkultur angeimpft und die Zellen bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 – 0,6 kultiviert. Nach Abkühlen der Kultur auf Eis für 15 min wurden die Zellen mittels Zentrifugation für 10 min bei 3000 x g und 4°C pelletiert. Alle folgenden Arbeitsschritte wurden auf Eis oder im Kühlraum durchgeführt. Die Zellen wurden dreimal mit 3 ml kaltem 10%igen Glycerol gewaschen, in dem die Zellen resuspendiert und dann erneut 10 min bei 3000 x g und 4°C zentrifugiert wurden. Das Pellet wurde im Anschluss in 350 µl 10% Glycerol aufgenommen und zu je 50 µl aliquotiert. Die kompetenten Zellen wurden entweder direkt für die Elektroporation eingesetzt oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.6.4 Transformation von *E. coli* Zellen mittels Elektroporation

Die Transformation von kompetenten *E. coli* Zellen erfolgte mittels Elektroporation. Dafür wurden 50 µl Zellen mit 1 -2 µl eines Ligationsansatzes oder bei einer Retransformation 1 – 10 ng Plasmid versetzt und in vorgekühlte Elektroporationsküvetten überführt. Die Transformation erfolgte bei 1,8 kV in dem *E. coli* Pulser der Firma BioRad. Nach zügiger Zugabe von 450 µl SOC-Medium wurden die Zellen in ein Reaktionsgefäß überführt und zur Regeneration und Resistenzausbildung für eine Stunde bei 37°C und 500 rpm im Thermomixer inkubiert. Zur Selektion wurden die Zellen auf LB-Agar Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Die Verifizierung selektierter Klone erfolgte mittels Kolonie-PCR(3.3.1) und Sequenzierung (3.3.4).

3.7 Kultivierung von Bakterien

3.7.1 Zellanzucht

Alle *E. coli* Stämme wurden aerob in Erlenmeyerkolben oder Kulturröhrchen in LB-, 2xYT- oder MOPS Minimalmedium und soweit nicht anders beschrieben bei 37°C und 220 rpm in dem Innova 43 Inkubator der Firma New Brunswick Scientific kultiviert. Die Anzucht auf LB-Agarplatten erfolgte in dem Brutschrank der Firma Binder bei 37°C. Wenn benötigt, wurden folgende Antibiotika zugesetzt:

Tab. 3.17: Konzentrationen verwendeter Antibiotika

Antibiotikum	Konzentration im Medium
Ampicillin	100 µg/ml
Kanamycin	25 µg/ml
Chloramphenicol	34 µg/ml
Tetracyclin	12,5 µg/ml

3.7.2 Messung des Bakterienwachstums

Das Bakterienwachstum wurde photometrisch durch Messen der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD₆₀₀) mit dem Gene Quant 1300 Photometer der Firma GE Healthcare bestimmt. Als Leerwert diente das Kulturmedium.

3.7.3 Kultivierung von *E. coli* unter verschiedenen Bedingungen

Um die Expression von sRNAs und möglichen Target-RNAs zu untersuchen wurden *E. coli* Zellen unter verschiedenen Bedingungen kultiviert. Aus den Kulturen wurde anschließend Total-RNA isoliert (3.2.7) und die zu untersuchende RNA mittels Northern-Blot-Analyse untersucht (3.1.8).

Wachstumsbedingungen in LB-Medium

Zur Untersuchung der Expression der RNAs unter verschiedenen Bedingungen in LB-Medium wurde eine 3 ml LB-Medium Vorkultur angefertigt und über Nacht inkubiert. Die OD₆₀₀ der Vorkultur wurde bestimmt und eine 60 ml Hauptkultur mit einem Teil der Vorkultur angeimpft, so dass die Start-OD₆₀₀ 0,05 betrug. Die Zellen wurden bis zu der unten beschriebenen OD₆₀₀ kultiviert.

Für die Analyse unter Standardwachstumsbedingungen wurden die Zellen bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 (exponentielle Phase) bzw. 2 (stationäre Phase) kultiviert.

Für die Kultivierung unter Temperaturstress wurden die Zellen bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 kultiviert und anschließend für eine Stunde bei 18°C bzw. 42°C und 220 rpm inkubiert.

Um Expressionsmuster unter Säurestress zu untersuchen wurde eine 60 ml LB-Medium Hauptkultur bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 inkubiert. Die Stressinduktion erfolgte durch Zugabe von 170 mM 2-Morpholinoethansulfonsäure (MES) mit anschließender Inkubation für 40 min.

Um *E. coli* Zellen unter Peroxid-Stress zu kultivieren, wurde die Hauptkultur bei einer OD₆₀₀ von 0,5 mit 5 mM 30%igem H₂O₂ versetzt und für 20 min inkubiert.

Für die Isolierung von Total-RNA aus den Zellen (3.2.7) wurden je 10 ml Kultur abgenommen und für 10 min bei 4500 x g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Wachstumsbedingungen in MOPS Minimalmedium

Für die Untersuchung der RNA-Expression unter verschiedenen Wachstumsbedingungen in MOPS Minimalmedium wurde eine *E. coli* Vorkultur in 5 ml MOPS Minimalmedium angesetzt und über Nacht inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die OD₆₀₀ der Vorkultur bestimmt und damit eine 60 ml MOPS Minimalmedium Hauptkultur auf eine Start-OD₆₀₀ von 0,05 eingestellt. Die Zellen wurden bis zu der gewünschten OD₆₀₀ kultiviert und anschließend wie folgt weiterbehandelt.

Für die Analyse der Expression in MOPS Minimalmedium in der exponentiellen Wachstumsphase wurde die Kultur bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 kultiviert.

Die Induktion von hyperosmotischen Stress erfolgte durch Zugabe von 0,3 M NaCl bei einer OD₆₀₀ von 0,3 und anschließender Inkubation für 20 min.

Bei der Kultivierung von *E. coli* unter Glucosemangel wurde eine Hauptkultur bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 kultiviert und die Zellen für 10 min bei 4000 x g und 4°C zentrifugiert. Das

Methoden

Medium wurde entfernt und das Zellpellet in 60 ml MOPS Minimalmedium ohne Glucose vorsichtig resuspendiert. Es folgte eine einstündige Inkubation bei 37°C und 220 rpm.

ATP-Mangel wurde durch die Zugabe von 1,25 mM 2,5-Dinitrophenol (DNP) zu der Hauptkultur bei einer OD₆₀₀ von 0,4 mit anschließender Kultivierung für eine Stunde induziert.

Die Induktion von Superoxidstress erfolgte bei einer OD₆₀₀ von 0,5 durch Zugabe von 200 mM Menadion zu der Hauptkultur und anschließender Kultivierung für eine Stunde bei 37°C.

Das Ernten der Zellen erfolgte analog zu den Wachstumsbedingungen in LB-Medium.

3.7.4 Lagerung von Bakterienkulturen

Für eine langfristige Lagerung von Bakterienkulturen wurden diese in LB-Medium mit 20% Glycerol versetzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Kulturen auf LB-Agar-Platten konnten luftdicht verschlossen bis zu vier Wochen bei 4°C gelagert werden.

3.8 Konstruktion von *E. coli* Knock-out Stämmen

Die Herstellung von *E. coli* Knock-out Stämmen erfolgte nach der *one-step inactivation* Methode von Datsenko und Wanner [82]. Das Prinzip beruht auf homologer Rekombination, bei der das Zielgen durch eine Kanamycin-Resistenz-Kassette mit Hilfe der λ Red Rekombinase ausgetauscht wird. Die Kanamycin-Kassette wurde mittels PCR (3.3.1) von dem Plasmid pKD13 amplifiziert. Dabei wurden Oligonucleotide verwendet, die als Überhänge 50 bp homologe Sequenzen zu den flankierenden Bereichen des Zielgens trugen. Der PCR Ansatz wurde gereinigt (3.2.3) und anschließend einer Spaltung mit DpnI unterzogen, um das Ausgangsplasmid pKD13 abzubauen. Parallel wurden *E. coli* Zellen mit dem thermolabilen Plasmid pKD46 transformiert, welches das Gen für die λ Red Rekombinase unter einem Arabinose-abhängigen Promotor enthielt. Diese Zellen wurden bei 30°C unter Zugabe von 10 mM Arabinose kultiviert und erneut für die Elektroporation kompetent gemacht (3.6.3). Es folgte die Transformation der Zellen mit 50 oder 100 ng des PCR Produktes. Die Selektion erfolgte über Nacht bei 37°C auf Kanamycin-haltigen LB-Agarplatten. Die erhaltenen Klone wurden zur Vereinzelung auf Kanamycin-haltigen Platten und zur Kontrolle auf Ampicillin-haltigen LB-Agarplatten ausgestrichen. Positive Klone, die

weder pKD13 noch pKD46 trugen, sollten nur auf Kanamycin-Platten wachsen können. Zur Verifizierung des Knock-outs wurde eine Kolonie-PCR (3.3.1) durchgeführt, bei der Oligonucleotide verwendet wurden, die den ausgetauschten Bereich flankierten. Anhand der Größe des PCR-Produktes konnte auf einen erfolgreichen Knock-out geschlossen werden.

3.9 Proteinproduktion und Reinigung in *E. coli*

3.9.1 Produktion des TyrR Proteins in *E. coli* BL21 Star Zellen

Für die Produktion und Reinigung des TyrR Proteins in *E. coli* wurde das *tyrR* Gen in das Plasmid pRSET-B kloniert (3.6). Die Amplifikation des Gens erfolgte mittels PCR mit der Phusion® DNA Polymerase (3.3.1) und isolierter genomischer DNA aus *E. coli* (3.2.8). In dem resultierendem Plasmid pKG02 lag das *tyrR* Gen unter der Kontrolle eines T7-Promotors. Des Weiteren wurde durch die Klonierung am 5'-Ende des Gens die Sequenz für ein 6x Histidin-Tag (His-Tag) angefügt. BL21 Star Zellen wurden mit dem Plasmid durch Elektroporation (3.6.4) transformiert. Die Selektion und weitere Kultivierung erfolgte über Ampicillin-haltige LB-Agarplatten bzw. Ampicillin-haltiges Medium. Zur Proteinproduktion wurde zunächst eine 4 ml 2xYT-Medium Vorkultur angeimpft und ca. 8 Stunden kultiviert. Die Vorkultur wurde in eine zweite 40 ml 2xYT Vorkultur überführt und über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurden 500 ml 2xYT-Medium mit der Vorkultur versetzt und die Zellen bis zu einer OD₆₀₀ von 1,6 kultiviert. Zur Induktion der Proteinproduktion wurde die Kultur mit 0,5 mM IPTG versetzt und für 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden im Anschluss für 10 min bei 4500 x g und 4°C zentrifugiert und das Pellet bei -20°C gelagert. Das Zellpellet wurde zur Lyse in 20 ml Lysispuffer aufgenommen, dem die Proteaseinhibitoren Leupeptin (48 µg/ml) und PMSF (1,7 µg/ml) zugesetzt wurden. Die Zelllyse erfolgte anschließend durch Behandlung mit Ultraschall für 3x 3 min auf Eis durch den Branson Sonifier 250A. Die Trennung der Zelltrümmer von dem Lysat wurde über eine 45-minütige Zentrifugation der lysierten Zellen bei 20.000 x g und 4°C erreicht.

3.9.2 Reinigung des TyrR Proteins mittels Nickel-Affinitätschromatographie

Durch die Klonierung wurde am N-Terminus des TyrR Proteins ein 6x His-Tag angefügt, das der Reinigung aus den BL21 Star Zellen mittels Nickel-Affinitätschromatographie diene. Die

Reinigung wurde mit dem ÄKTA *purifier* und einer 1 ml His-TRAP Säule der Firma GE Healthcare im Kühlraum durchgeführt. Vor dem Auftragen des Zelllysates wurde die Säule zunächst bei einer Flussrate von 1 ml/min mit sieben Säulenvolumen Lysispuffer äquilibriert. Nach dem Probenaufrag wurde mit zwei Säulenvolumen Lysispuffer und 50 mM Imidazol gewaschen, um nicht- oder schwach gebundene Proteine zu entfernen. Spezifisch gebundene Proteine wurden mit zehn Säulenvolumen Lysispuffer und 500 mM Imidazol eluiert. Die erhaltenen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE (3.10.1) und anschließender Coomassie-Färbung (3.10.2) auf das Vorhandensein des TyrR Proteins untersucht.

3.9.3 Reinigung des TyrR Proteins mittels Anionenaustauschchromatographie

Das TyrR Protein wurde nach der Reinigung mittels Nickel-Affinitätschromatographie für eine zweite Reinigung einer Anionenaustauschchromatographie (AIEX) unterzogen. Die Fraktionen aus der Affinitätschromatographie, die das Protein enthielten, wurden vereinigt und 3x für 30 min gegen 200 Volumen Dialysepuffer dialysiert. Um eventuell ausgefallene Proteine abzutrennen wurde die Probe anschließend für 10 min bei 18.000 x g und 4°C zentrifugiert. Die AIEX wurde mit dem ÄKTA *purifier* und einer 1 ml Poros HQ/M Säule (Applied Biosystems) durchgeführt. Nach Äquilibrierung der Säule mit 5 Säulenvolumen AIEX-Puffer wurde die Probe auf die Säule gegeben und im Anschluss mit 5 Säulenvolumen AIEX-Puffer gewaschen. Die Elution erfolgte mit 20 Säulenvolumen AIEX-Puffer und einem kontinuierlich steigenden Natriumchlorid-Gradienten bis zu einer Endkonzentration von 0,5 M und in einem zweiten Schritt bis zu einer Endkonzentration von 1M Natriumchlorid. Die Elutionsfraktionen wurden gesammelt und mittels SDS-PAGE (3.10.1) und anschließender Coomassie-Färbung (3.10.2) auf das Vorhandensein des TyrR Proteins überprüft.

3.10 Methoden zur Proteinanalyse

3.10.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Zur Analyse der Proteinproduktion und -Reinigung wurde eine denaturierende, diskontinuierliche SDS-PAGE nach Laemmli [84] durchgeführt. Die Zusammensetzung der SDS-PAA-Gele ist in Tab. 3.18 gezeigt.

Tab. 3.18: Zusammensetzung 10%iger denaturierender SDS-PAA-Gele

Komponente	Sammelgel	Trenngel
Sammelgel-/Trenngelpuffer (4x)	1x	1x
Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1 (w/v)	4%	10%
TEMED (v/v)	0,07%	0,07%
APS (w/v)	0,07%	0,07%

Die Zugabe von SDS bewirkte eine einheitliche, negative Ladung aller Proteine und ermöglichte eine Trennung nach dem Molekulargewicht. Proteinproben wurden vor dem Auftragen mit 2x SDS-Probenpuffer versetzt und für 3 min bei 95°C denaturiert. Die Elektrophorese wurde bei 150 V für eine Stunde in 1x SDS-Laufpuffer durchgeführt. Die SDS-PAA-Gele wurden im Anschluss mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt (3.10.2).

3.10.2 Coomassie Brilliant Blue Färbung

Die Detektion von Proteinen in SDS-PAA-Gelen erfolgte durch eine sensitive, kolloidale Coomassie-Färbung. Bei dieser Färbemethode kann bis zu 1 ng Protein detektiert werden. Die SDS-PAA-Gele wurden nach der Elektrophorese 2x mit *aqua dest.* gewaschen und anschließend für 30 min bis zu 1 Stunde in der Coomassie-Färbelösung inkubiert. Zum Entfärben wurden die Gele 2x für 10 min mit *aqua dest.* gewaschen.

3.10.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinkonzentrationen wurde mittels Bradford-Assay bestimmt. Als Standard wurde eine BSA-Verdünnungsreihe (20, 50, 100, 250, 500, 750 und 1000 µg) in einem Volumen von 25 µl erstellt. Das zu untersuchende Protein wurde ebenfalls in dem gleichen Volumen 1:5, 1:10 und 1:50 verdünnt. Nach Zugabe von je 200 µl Coomassie Protein Assay Reagent wurden die Proben für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde die Absorption der Proben bei 595 nm im ELISA *reader* gemessen. Die Absorptionen der BSA-Verdünnungsreihe wurden in Abhängigkeit der Konzentration aufgetragen und die Konzentration der untersuchten Proteinlösung mittels linearer Regression bestimmt.

3.11 Microarray-Analyse zur Target-Identifizierung von sRNAs

Um Anhaltspunkte für mögliche Targets der sRNAs zu erhalten wurden Microarray-Experimente durchgeführt. Dabei wurden die Transkriptome von *E. coli* GI724 Zellen und einem sRNA Knock-out Stamm, die beide unter Peroxid-Stress kultiviert wurden, verglichen. Das Prinzip beruht auf einem Chip, auf dem Oligonucleotid-Sonden in separaten Feldern (*spots*) immobilisiert sind, die das *E. coli* Genom repräsentieren. Total-RNA aus den zu vergleichenden Stämmen wurde zunächst in cDNA umgeschrieben und anschließend biotinyliert. Nach Hybridisierung der cDNA mit den Microarray-Chips erfolgte die Detektion der cDNA durch die Zugabe von Streptavidin- Phycoerythrin-Konjugaten. Die Intensität der Emission des Phycoerythrins bei 570 nm ist proportional zu der Anzahl der gebunden c-DNA-Moleküle. Durch den Vergleich der Intensitäten einzelner *spots* der beiden Stämme, können Unterschiede in der Genexpression ermittelt werden. Für die Microarrays wurden die Stämme unter Peroxid-Stress kultiviert (3.7.3) und Total-RNA isoliert (3.2.7). Die RNA wurde im Anschluss mit dem RNeasy[®] Mini Kit der Firma Qiagen nach Herstellerangaben gereinigt. Alle folgenden Arbeitsschritte und die Auswertung wurden von Frau Kristin Klätschke am Universitätsklinikum Eppendorf im Institut für Klinische Chemie in Hamburg durchgeführt. Die Probenbearbeitung, Hybridisierung und Detektion erfolgte nach dem GeneChip[®] Expression Analysis Technical Manual (Affymetrix). Für die Hybridisierung wurden GeneChip *E. coli* Genome 2.0 Array Chips der Firma Affymetrix verwendet. Die Microarrays wurden mit dem Affymetrix GeneChip Scanner 7G gescannt. Die Signale wurden mit der *robust multi-array* (RMA) Methode unter Verwendung der Software Expression Console 1.1 der Firma Affymetrix normalisiert. Die Analyse der Microarray-Daten und der Vergleich zwischen den Wildtyp-Signalen und den der KO-Mutanten wurde mit der Software TIGR MeV 4.5.1 durchführt.

3.12 Gel shift-Assay

Mögliche Interaktionen zwischen dem TyrR Protein und Nucleinsäuren wurden mittels *gel shift* Analysen in 5%igen, nativen PAA-Gelen untersucht. Eine Komplexbildung zwischen Protein und Nucleinsäure führt auf Grund der Größe zu einem veränderten Migrationsverhalten im Gel. Im Vergleich zu ungebundenen Nucleinsäuren weist der Protein-Nucleinsäure-Komplex ein verzögertes Laufverhalten auf. Dies wird als *shift* bezeichnet.

Tab. 3.19: Zusammensetzung 5%iger, nativer PAA-Gele und Laufpuffer

Komponente	5%ige PAA Gel	Laufpuffer
Acrylamid:Bisacrylamid 37,5:1 (w/v)	5%	
TEMED (v/v)	0,1%	
APS (w/v)	0,1%	
TAE	1x	1x

Tab. 3.20: Zusammensetzung 5%iger, nativer PAA-Gele mit Tyrosin und ATP

Komponente	Endkonzentration	Laufpuffer
Acrylamid:Bisacrylamid 37,5:1 (w/v)	5%	
TEMED (v/v)	0,1%	
APS (w/v)	0,1%	
Tyrosin [100 mM]	1 mM	1 mM
ATP [10 mM]	0,1 mM	0,1 mM
MgCl ₂ [100 mM]	1 mM	1 mM
Glycerin (v/v)	1%	1%
TAE	1x	1x

Für die Untersuchung der Interaktionen wurden 10 – 500 nM Protein mit 2-50 nM 5'-radioaktiv markierter Nucleinsäure (3.3.6) in 20 µl 1x EMSA Puffer bei 37°C für 25 min in Gegenwart oder Abwesenheit von 1 mM Tyrosin und 0,1 mM ATP inkubiert. Um die Spezifität der Bindung zu untersuchen wurden Ansätze mit 100x molaren Überschuss an tRNA bzw. Lachsperma-DNA angefertigt. Die Proben wurden mit 6x DNA-Probenpuffer versetzt und mittels 5%iger nativer PAGE (Tab. 3.19) getrennt. Die Zusammensetzung der Gele für die Ansätze, die Tyrosin und ATP enthielten, ist in Tab. 3.20 gezeigt. Die Elektrophorese erfolgte bei 50 V für 3-4 Stunden bei 4°C in den entsprechenden Laufpuffern (Tab. 3.19 und Tab. 3.20). Die Gele wurden im Anschluss unter Vakuum getrocknet. Die Detektion erfolgte mittels Autoradiographie (3.1.7).

4 Ergebnisse

In *E. coli* sind aktuell 87 experimentell bestätigte sRNAs bekannt. Der Hälfte dieser sRNAs konnte bis jetzt eine Funktion zugeordnet werden [85]. Zudem wurden über bioinformatische Suchen mehrere hunderte sRNAs in *E. coli* und anderen Bakterienarten vorhergesagt [51,52,55,86]. Die experimentelle Validierung ist jedoch nur für einen Teil dieser RNAs durchgeführt worden. Die Ergebnisse der computergestützten Vorhersagen und der anschließende experimentelle Nachweis einiger sRNAs lassen vermuten, dass es noch wesentlich mehr sRNAs in *E. coli* und in anderen Bakterien zu entdecken gibt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung und Analyse der Funktion der sRNAs RybA und HB_428 unter Peroxid-Stress. RybA wurde 2001 von Wassarman *et al.* mittels *comparative genomics* und Microarrays identifiziert, jedoch nicht weiter charakterisiert [53]. HB_428 wurde 2001 als eine von 370 sRNAs von Carter *et al.* [52] auf Basis von Nucleotid-Zusammensetzung und strukturellen Parametern vorhergesagt, aber nicht experimentell bestätigt. Der Nachweis der Expression von HB_428 unter Peroxid-Stress mittels Northern-Blot-Analysen wurde 2008 in dieser Arbeitsgruppe von P. Feinäugle erbracht [87].

Zur Charakterisierung der sRNA sollte zunächst das Expressionsmuster von *rybA* unter verschiedenen Bedingungen mittels Northern-Blot untersucht werden. Für beide sRNAs sollte anschließend der Transkriptionsstart und -Endpunkt bestimmt werden. Des Weiteren sollten potentielle Targets der sRNAs mittels Microarray-Analysen durchgeführt werden.

4.1 Charakterisierung der sRNA RybA und HB_428

4.1.1 Expression von *rybA* unter verschiedenen Wachstumsbedingungen

Zu Beginn dieser Studie wurde das Expressionsmuster von *rybA* unter verschiedenen Wachstums- und Stressbedingungen mittels Northern-Blot-Analysen untersucht. Wassarman *et al.* wiesen die Expression von *rybA* in *E. coli* lediglich unter Standardbedingungen in LB-Medium (exponentielle und stationäre Phase) und in M9 Minimalmedium nach [53]. Ein erhöhtes Expressionslevel unter bestimmten Stressbedingungen könnte bereits einen Hinweis auf die Funktion der sRNA liefern. Für die Untersuchungen wurde der *E. coli* Stamm GI724

(Tab. 2.4), ein Derivat des K12 Stamms W3110, unter verschiedenen Bedingungen kultiviert (3.7.3.). Dieser Stamm wird nachfolgend als *E. coli* K12 Wildtyp (WT) bezeichnet. Aus den Kulturen wurde Total-RNA isoliert und jeweils 10 µg RNA in einem 1%igen, denaturierenden Agarosegel (3.1.4) getrennt und mittels Northern-Blot auf eine Nylonmembran transferiert (3.1.8). Die Detektion der sRNA RybA erfolgte durch Hybridisierung einer 5'-radioaktiv markierten komplementären Sonde (3.3.6, KG5 Tab. 2.6) mit anschließender Autoradiographie (3.1.7) Um die erhaltenen Signale vergleichen zu können wurde die Membran im Anschluss mit einer radioaktiv markierten 5S rRNA Sonde (KG11, Tab. 2.6) hybridisiert. Die 5S rRNA wurde unter allen Bedingungen gleich stark transkribiert und diente daher als Kontrolle. Es konnte gezeigt werden, dass *rybA* vor allem unter Peroxid-Stress in LB-Medium und unter Kälteschock stark exprimiert wurde (Abb. 4.1). In der exponentiellen Phase in LB-Medium ist RybA dagegen nicht zu detektieren. Vergleicht man die Expression in LB-Medium in der stationären Phase und dem exponentiellen Wachstum in MOPS Minimalmedium so ist kein Unterschied zu erkennen. Unter hyperosmotischem Stress, ATP-Mangel und Superoxid-Stress in MOPS Minimalmedium war ein leichter Anstieg der Expression zu verzeichnen. Unter den anderen getesteten Bedingungen konnte keine verstärkte Expression beobachtet werden. Im Folgenden wurde sich auf die Charakterisierung von RybA unter Peroxid-Stress konzentriert.

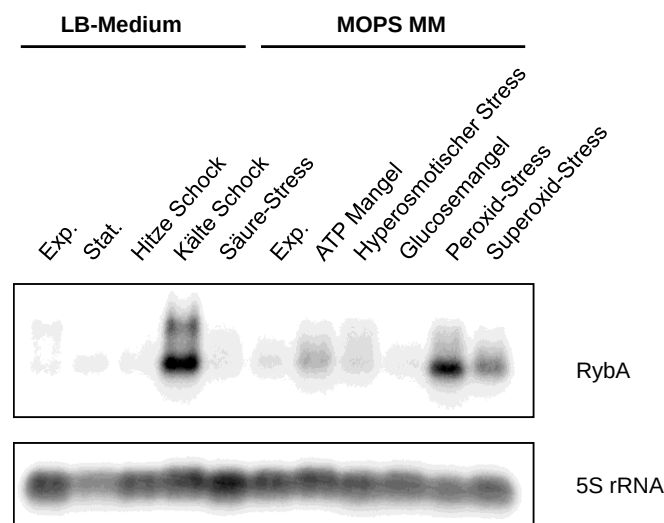


Abb. 4.1: Northern-Blot-Analyse des Expression von *rybA* unter verschiedenen Wachstumsbedingungen. *E. coli* K12 WT-Zellen wurden in LB- Medium oder MOPS-Minimalmedium (MOPS MM) unter verschiedenen Bedingungen kultiviert und die Total-RNA isoliert. Jeweils 10 µg Total-RNA wurden in einem 1%igen Agarosegel getrennt und auf eine Nylonmembran mittels Northern-Blot transferiert. Die Detektion erfolgte durch Hybridisierung mit einer radioaktiven, RybA-spezifischen Sonde (KG5, Tab. 2.6). Zur Kontrolle wurde die Membran im Anschluss mit einer radioaktiven 5S rRNA-spezifischen Sonde (KG11, Tab. 2.6) hybridisiert. Exp.: exponentielles Wachstum, Stat.: Wachstum in der stationären Phase.

Da viele der nachfolgenden Untersuchungen auf Grund besserer Reproduzierbarkeit in MOPS Minimalmedium durchgeführt werden sollten, wurde die Expression der sRNA RybA unter Peroxid-Stress in diesem Medium getestet (3.7.3). Zum Vergleich wurden *E. coli* K12 WT-Zellen ohne Zugabe von Wasserstoffperoxid in MOPS Minimalmedium kultiviert. Nach Isolierung der Total-RNA (3.2.7) wurde die *rybA* Expression mittels Northern-Blot und Hybridisierung mit einer RybA-spezifischen Oligonucleotid-Sonde (KG36, Tab. 2.6) untersucht (Abb. 4.2). Auch in MOPS Minimalmedium wurde die Expression von *rybA* durch Peroxid-Stress induziert (Abb. 4.2, Spur 2). Ohne Stress wurde eine schwächere Expression beobachtet (Abb. 4.2, Spur 1). Auffällig war, dass ohne Stress eine größere Spezies von RybA dominierte.

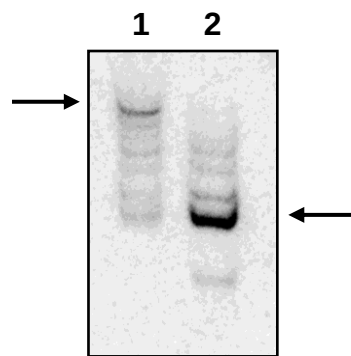


Abb. 4.2: Analyse der Expression von *rybA* in MOPS Minimalmedium mit und ohne Peroxid-Stress. 10 µg Total-RNA aus *E. coli* K12 WT-Zellen, die in MOPS Minimalmedium mit und ohne Zugabe von 2,5 mM H₂O₂ kultiviert wurden, wurden mittels Northern-Blot auf die Expression von *rybA* untersucht. Die Hybridisierung erfolgte mit einer 5'-radioaktiv markierten, RybA-spezifischen Oligonucleotid-Sonde (KG36, Tab. 2.6). Spur 1: Total-RNA aus *E. coli* K12 WT ohne H₂O₂; Spur 2: Total-RNA aus *E. coli* K12 WT + 2,5 mM H₂O₂. Die Pfeile markieren die jeweils dominante Spezies von RybA.

4.1.2 Konstruktion von *E. coli* Knock-out Mutanten

Zur weiteren Charakterisierung der beiden sRNAs RybA und HB_428 wurden *E. coli* Knock-out (KO) Mutanten hergestellt. Die Untersuchung von KO-Mutanten ist hilfreich bei der Aufklärung der Funktion der sRNAs. Durch ihre Rolle in der Genregulation kann z. B. ein verändertes Genexpressionsmuster in der Knock-out Mutante durch Techniken wie Microarrays oder 2-D Gelelektrophorese analysiert werden.

Für den Knock-out der Gene der beiden sRNAs RybA und HB_428 in *E. coli* K12 WT-Zellen wurde die *one-step inactivation* Methode angewendet (3.8) [82]. In Abb. 4.3 sind die einzelnen Schritte exemplarisch für den Knock-out von *rybA* gezeigt. Das Prinzip beruht auf

Ergebnisse

dem Austausch des Gens, das die sRNA codiert, durch eine Kanamycin-Resistenz-Kassette mittels homologer Rekombination durch die λ Red Rekombinase.

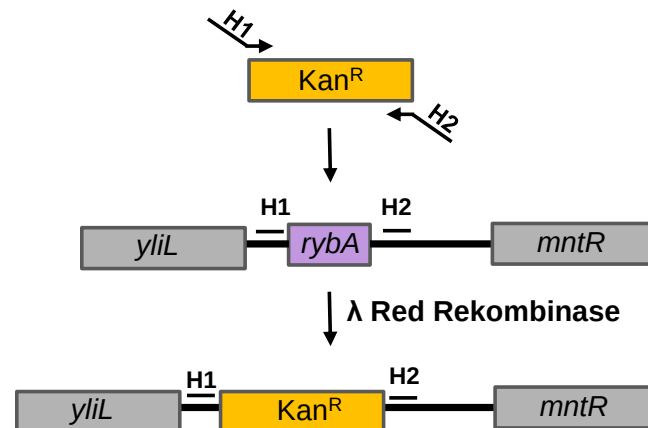


Abb. 4.3: Schema zur Herstellung einer *E. coli* Knock-out Mutante mit der *one-step inactivation* Methode [82] am Beispiel des *rybA* Gens. Im ersten Schritt wurde eine Kanamycin-Resistenz-(Kan^R) Kassette mittels PCR amplifiziert. Die verwendeten Oligonucleotide trugen homologe Sequenzen (H1 und H2), die die auszutauschende Sequenz flankierten. Nach Transformation von *E. coli* K12 WT-Zellen mit dem erhaltenen PCR-Produkt wurde über homologe Rekombination durch die λ Red Rekombinase ein Teil des *rybA* Gens auf dem Chromosom von *E. coli* gegen Kan^R ausgetauscht.

Da der Transkriptionsstart- und Endpunkt der beiden sRNAs zum Zeitpunkt der Konstruktion der Knock-out Mutanten nicht bekannt war, wurden die bekannten 89 bp für RybA und 80 bp für HB_428 gegen das Kanamycin-Resistenz-Gen im Genom von *E. coli* ausgetauscht.

Die homologen Sequenzen, die den auszutauschenden Bereich flankierten, wurden so gewählt, dass auf dem Chromosom bei HB_428 die 80 bp und bei RybA die 89 bp + 50 bp *upstream* ausgetauscht wurden. Es wurde somit nicht die vollständige Sequenz der beiden sRNAs aus dem Genom von *E. coli* entfernt, da die Northern-Blot Ergebnisse zeigten, dass beide RNAs in größeren Formen vorkamen. Durch das Einbringen der 1,4 Kilobasen (kb) großen Kanamycin-Resistenz-Kassette konnte aber davon ausgegangen werden, dass die sRNAs nicht mehr funktionell waren. Der Erfolg der Knock-outs wurde auf chromosomaler Ebene mittels Kolonie-PCR (3.3.1) überprüft (Abbildung nicht gezeigt).

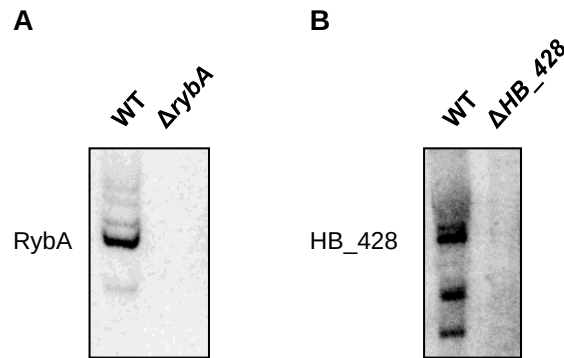


Abb. 4.4: Northern-Blot zur Überprüfung der Knock-out Mutanten $\Delta rybA$ und ΔHB_428 . *E. coli* K12 WT- $\Delta rybA$ - und ΔHB_428 -Zellen wurden unter Peroxid-Stress in MOPS Minimalmedium kultiviert und die Total-RNA isoliert. Der Nachweis der RybA und HB_428 RNA erfolgte mittels Northern-Blot und Hybridisierung mit einer 5'-radioaktiv markierten, RybA- (A), bzw. HB_428-spezifischen (B) Oligonucleotid-Sonde (KG5 bzw. KG37, Tab. 2.6).

Der Nachweis auf RNA-Ebene erfolgte über Northern-Blot-Analysen (3.1.8) und Hybridisierung mit RNA-spezifischen, 5'-radioaktiv markierten DNA-Sonden (3.3.6). Es konnte gezeigt werden, dass *rybA* (Abb. 4.4 A) und *HB_428* (Abb. 4.4 B) in $\Delta rybA$ (SK0801, Tab. 2.4) und ΔHB_428 (SKG0901, Tab. 2.4) nicht mehr exprimiert wurden. Die KO-Mutanten lieferten die Grundlage für die weitere Charakterisierung der sRNAs.

Um mögliche Auswirkungen der Deletion von *HB_428* zu untersuchen, wurde das Wachstumsverhalten von ΔHB_428 -Zellen analysiert. Dazu wurden ΔHB_428 - und *E. coli* K12 WT-Zellen unter stressfreien Bedingungen und Peroxid-Stress kultiviert (3.7.3), da die sRNA unter Peroxid-Stress verstärkt produziert wurde. Das Bakterienwachstum wurde photometrisch verfolgt (3.7.2). Unter stressfreien Bedingungen konnte kein Unterschied im Wachstumsverhalten zwischen ΔHB_428 und dem Wildtyp beobachtet werden (Abb. 4.5). Die Zugabe von H_2O_2 zur Induktion von Peroxid-Stress erzeugte in beiden Stämme zunächst eine Retardierung im Wachstum. Während sich der Wildtyp ca. 50 min nach H_2O_2 -Zugabe wieder erholte und sich exponentiell vermehrte, konnte bei ΔHB_428 eine deutliche Verzögerung dieser Erholungsphase verzeichnet werden. Das Experiment wurde mehrmals mit unabhängigen Kulturen wiederholt und zeigte immer ein deutlich verzögertes Wachstum von ΔHB_428 unter Peroxid-Stress.

Ergebnisse

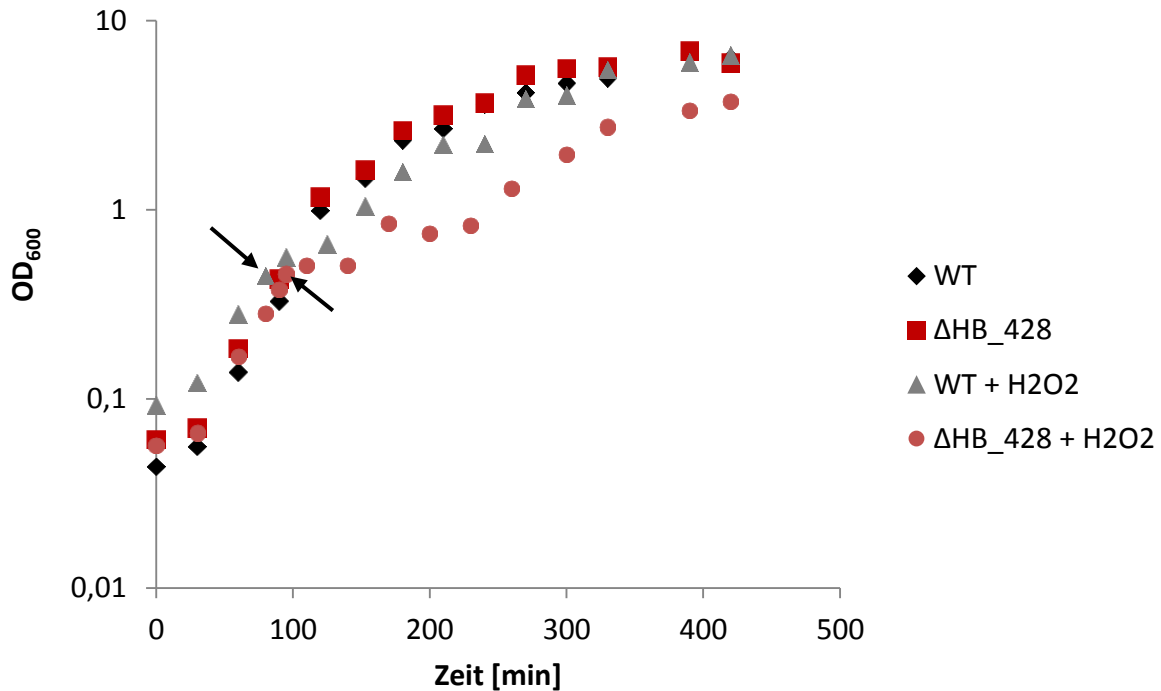


Abb. 4.5: Wachstumskurve von *E. coli* K12 WT und ΔHB_{428} unter Peroxid-Stress und stressfreien Bedingungen. *E. coli* K12- und ΔHB_{428} -Zellen wurden in LB-Medium unter stressfreien Bedingungen und Peroxid-Stress kultiviert. Die Pfeile markieren den Zeitpunkt der Zugabe von 2,5 mM H_2O_2 . Das Bakterienwachstum wurde photometrisch durch Messen der OD_{600} verfolgt.

Mit $\Delta rybA$ -Zellen wurden ebenfalls Wachstumskurven unter diesen Bedingungen aufgenommen, jedoch konnten keine reproduzierbaren Ergebnisse erhalten werden.

4.1.3 Überexpression von *rybA* und *HB_428*

Für spätere Analysen der Funktion der beiden sRNAs RybA und HB_428 wurden Überexpressionsmutanten hergestellt. Dafür wurden die Sequenzen der intergenischen Regionen, in denen *rybA* und *HB_428* liegen, in das Plasmid pSK17 (Tab. 2.5) kloniert.

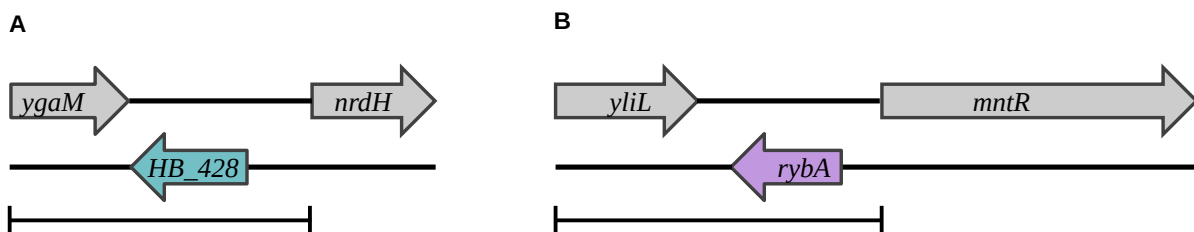


Abb. 4.6: Herstellung von *rybA* und *HB_428* Überexpressionsmutanten. Schematische Darstellungen der intergenischen Regionen in denen *HB_428* (A) und *rybA* (B) auf dem Chromosom von *E. coli* liegen [88]. Der Bereich, der für die Erzeugung von Überexpressionsmutanten verwendet wurde, ist markiert (—).

Bei pSK17 handelt es sich um ein *high-copy* Plasmid, das schon für die Überexpression von sRNAs verwendet wurde [76]. Das 3'-Ende der beiden sRNAs war zum Zeitpunkt der Klonierung noch nicht bekannt. Daher wurden die angrenzenden Gene am 3'-Ende (*ygaM* bei *HB_428* und *yliL* bei *rybA*) bei der Klonierung der Sequenzen mit eingeschlossen (Abb. 4.6 A und B). Die DNA-Sequenzen wurden mittels Kolonie-PCR (3.3.1) und den Oligonucleotiden KG3/KG4 für *rybA* und KG32/KG33 für *HB_428* (Tab. 2.6) aus dem *E. coli* Genom amplifiziert. Um eine konstitutive Transkription der sRNAs von dem Plasmid zu vermeiden, wurden die Schnittstellen für die Klonierung so gewählt, dass der konstitutive P_{LacO-1} Promotor und das *micC*-Gen während der Klonierung aus dem Plasmid pSK17 entfernt wurde. Diese Klonierungsstrategie sollte gleichzeitig die Frage beantworten, ob die jeweiligen nativen Promotoren in den klonierten Sequenzen lagen. Das Plasmid und die Amplifikate für *rybA* und *HB_428* wurden mit den Enzymen *XbaI* und *XhoI* geschnitten (3.6.1) und anschließend ligiert (3.6.2). Die neu entstandenen Plasmide pRybA und pHB_428 (Tab. 2.5) wurden durch Sequenzierung (3.3.4) verifiziert. Die Transkription der sRNAs von pRybA und pHB_428 wurden in $\Delta rybA$ bzw. ΔHB_428 -Zellen unter Peroxid-Stress und stressfreien Bedingungen in LB-Medium (3.6.4) nach Isolierung der Total-RNA mittels Northern-Blot untersucht (3.1.8).

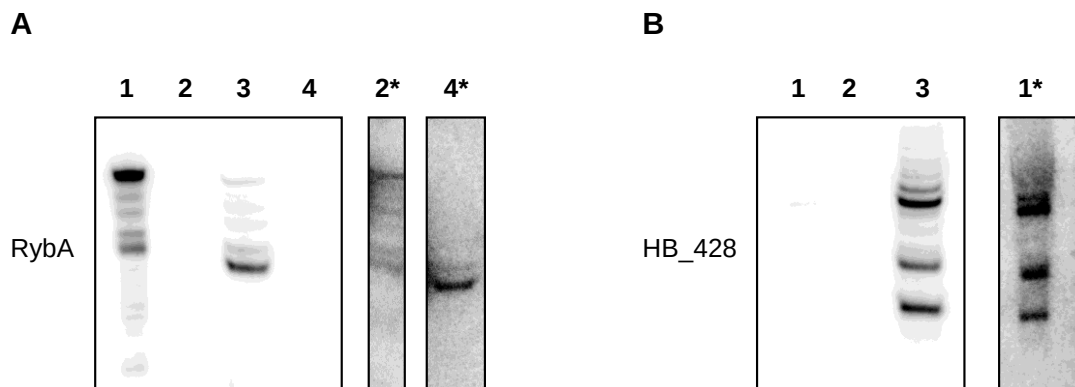


Abb. 4.7: Analyse der Überexpression von *rybA* und *HB_428*. *E. coli* K12 WT-, $\Delta rybA$ + pRybA- und ΔHB_428 + pHB_428-Zellen wurden unter Peroxid-Stress (+H₂O₂) und ohne Stress (-H₂O₂) in LB-Medium kultiviert und die Total-RNA isoliert. Der Nachweis der sRNAs RybA und HB_428 erfolgte mittels Northern-Blot und Hybridisierung mit einer radioaktiven RybA- (A) bzw. HB_428-spezifischen (B) Oligonucleotid-Sonde (KG5 bzw. KG37, Tab. 2.6). (A) Analyse der Expression von *rybA* in der Überexpressionsmutante. Spur 1: Total-RNA aus $\Delta rybA$ + pRybA -H₂O₂; Spur 2: Total-RNA aus *E. coli* K12 WT -H₂O₂; Spur 3: Total-RNA aus $\Delta rybA$ + pRybA +H₂O₂; Spur 4: Total-RNA aus *E. coli* K12 WT +H₂O₂. (B) Analyse der *HB_428* Expression in der Überexpressionsmutante. Spur 1: Total-RNA aus *E. coli* K12 WT +H₂O₂; Spur 2: Total RNA aus ΔHB_428 + pHB_428 -H₂O₂; Spur 3: Total RNA aus ΔHB_428 + pHB_428 +H₂O₂. * Über-Exposition der jeweiligen Spuren.

Es konnte gezeigt werden, dass *rybA* und *HB_428* jeweils von den Plasmiden unter Peroxid-Stress exprimiert wurden (Abb. 4.7 und B, jeweils Spur 3). Die nativen Promotoren befanden sich daher in den klonierten DNA-Sequenzen. Der Vergleich mit der Expression in *E. coli* K12 WT-Zellen unter Peroxid-Stress (Abb. 4.7 A Spur 4 und B Spur 1) zeigte, dass beide sRNAs stark überproduziert wurden. Um die die Größen der Banden zwischen Wildtyp und den Überexpressionsmutanten besser vergleichen zu können wurden die Spuren 4 in Abb. 4.7 A und 1 in Abb. 4.7 B überexponiert (Spur 4* und 1*). Beide sRNAs wiesen in den Überexpressionsmutanten das gleiche Bandenmuster wie im Wildtyp auf, was auf eine korrekte Expression schließen ließ.

Ohne Stress konnte in der Überexpressionsmutante $\Delta rybA$ + pRybA eine ähnlich starke Expression von *rybA* wie unter Peroxid-Stress beobachtet werden (Abb. 4.7 A Spur 1). Jedoch dominierte hier eine größere Spezies von RybA, wie schon zuvor für den Wildtyp unter stressfreien Bedingungen gezeigt werden konnte (Abb. 4.7 A Spur 2/2*, Vgl. Abb. 4.2). Im Unterschied zum Wildtyp war hier aber auch eine starke Bande für die kleinere Form von RybA zu beobachten. Unter Peroxid-Stress ist die größere Form von RybA in der Überexpressionsmutante wie im Wildtyp kaum noch vorhanden (Abb. 4.7 A Spur 3 und 4/4*).

Die Überexpressionsmutante ΔHB_428 + pHB_428 zeigte unter stressfreien Bedingungen keine detektierbare Expression von *HB_428*. In *E. coli* K12 WT-Zellen ohne Stress wird *HB_428* ebenfalls nicht exprimiert [87].

4.1.4 Bestimmung des 5'-Ende von RybA und HB_428

Um Hinweise auf den Transkriptionsstartpunkt der sRNAs RybA und HB_428 zu erhalten, wurde das 5'-Ende von RybA und HB_428 mittels *primer extension* bestimmt (3.4). Für RybA wurde Total-RNA aus *E. coli* K12 WT Zellen, die unter Peroxid-Stress in LB-Medium kultiviert wurden, isoliert und einer reversen Transkription mit dem 5'-radioaktiv markierten Oligonucleotid KG7 (Tab. 2.6) unterzogen. Der Erfolg wurde auf einem 10%igen, denaturierenden PAA-Gel überprüft (3.1.2). Das RT-Produkt ist in Abbildung 4.8, Spur 1 gezeigt. Als Negativkontrolle wurde ein Ansatz ohne Zugabe des Enzyms Reverse Transkriptase angefertigt (Abb. 4.8, Spur 2). Hier konnte kein RT-Produkt detektiert werden.

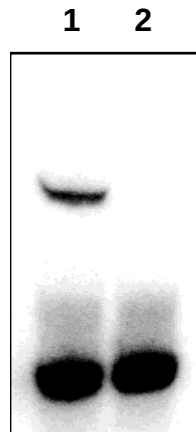


Abb. 4.8: 10%iges, denaturierendes PAA-Gel zur Analyse der reversen Transkription der sRNA RybA für die Bestimmung des 5'-Endes. Die reverse Transkription wurde mit Total-RNA aus *E. coli* K12-Zellen, die unter Peroxid-Stress kultiviert wurden und einem RybA-spezifischen, radioaktiv-markierten Oligonucleotid (KG7, Tab. 2.6) durchgeführt. Ein Ansatz ohne Zugabe des Enzyms Reverse Transkriptase wurde als Negativkontrolle mitgeführt. Die Detektion erfolgte mittels Autoradiographie (3.1.7). Spur 1: RT-Produkt RybA; Spur 2: Negativkontrolle ohne Reverse Transkriptase.

Um das 5'-Ende genau bestimmen zu können, wurde eine Sequenzierreaktion mit der Didesoxymethode nach Sanger [83] unter Verwendung des Plasmids pRybA (4.1.3) als Templat und dem radioaktiv markierten Oligonucleotid KG7 durchgeführt. Die Sequenzierreaktion und das RT-Produkt von RybA wurden in einem 8%igen, denaturierenden Sequenziergel getrennt und die radioaktiven Banden mittels Autoradiographie (3.1.7) detektiert (Abb. 4.9).

Anhand der Sequenz, die aus der Sequenzierreaktion hervorging (Abb. 4.9, C, T, A, G), konnte durch den Vergleich mit dem RT-Produkt RybA (Abb. 4.9, RybA) das 5'-Ende der sRNA abgelesen werden. Es handelt sich hierbei um das in Abb. 4.9 markierte Adenosin. Zusätzlich konnte bei dem RT Produkt bei erhöhter Sensitivität eine weitere schwächere, Bande (nicht gezeigt) detektiert werden. Dies führte zu der Vermutung, dass RybA kein uniformes 5'-Ende besitzt und dass das dominierende 5'-Ende durch Prozessierung entstanden sein könnte. Das schwache Signal ließ allerdings keine eindeutige Bestimmung der zusätzlichen 5'-Enden zu.

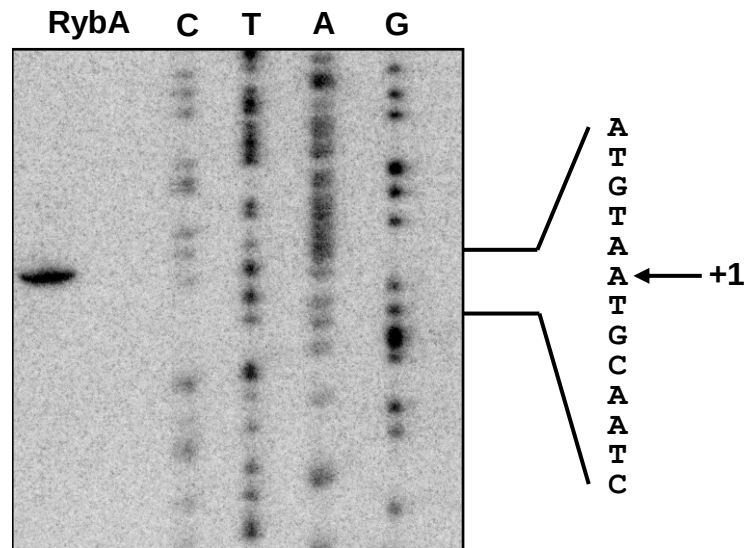


Abb. 4.9: Bestimmung des 5'-Endes der sRNA RybA. Die Bestimmung des 5'-Endes erfolgte mittels *primer extension*. Die Sequenzierungsreaktion wurde mit dem Plasmid pRybA und dem radioaktiv markierten RybA *reverse* Primer mit der Didesoxymethode nach Sanger [83] durchgeführt (3.4). Die Analyse der Reaktion erfolgte durch Trennung der einzelnen Sequenzierungsansätze und des RT-Produktes RybA (Abb.4.3) auf einem 8%igen, denaturierenden PAA-Sequenziergel. RybA: RT-Produkt; C, T, A, G: Sequenzierungsabbruchprodukte nach Einbau von ddCTP, ddTTP, ddATP, ddGTP. Das 5'-Ende von RybA konnte durch den Vergleich der Bande des RT-Produktes mit den Banden der Sequenzierungsabbruchprodukten bestimmt werden. Rechts ist die ermittelte Sequenz gezeigt. Der Pfeil markiert das Start-Nucleotid +1 der RNA RybA.

Um ein stärkeres Signal für die zweite Bande zu erhalten wurde die reverse Transkription mit Total-RNA aus der Überexpressionsmutante $\Delta rybA$ + pRybA (unter Peroxid-Stress kultiviert) durchgeführt. Wie in Abb. 4.10 A, Spur 1 zu sehen ist, wurde nach der reversen Transkription zusätzlich zu dem dominierenden RT-Produkt zwei weitere Produkte unterschiedlicher Größe erhalten. Die RT-Produkte wurden, analog zu der Bestimmung des 5'-Endes mit RNA aus Wildtyp-Zellen, zusammen mit der Sequenzierungsreaktion in einem 8%igen, denaturierenden PAA-Sequenziergel getrennt (Abb. 4.10 B). Die größere Bande entsprach einem Guanodin (+1_{alt}), das 18 nt *upstream* des zuvor gefundenen 5'-Ende liegt (Abb. 4.11). Die dritte, kleinere Bande die durch die reverse Transkription erhalten wurde (Abb. 4.10 A) entsprach in der Sequenzierung einem Guanodin (Abb. 4.10 B), das 57 nt *downstream* zu dem Adenosin liegt (Abb. 4.11).

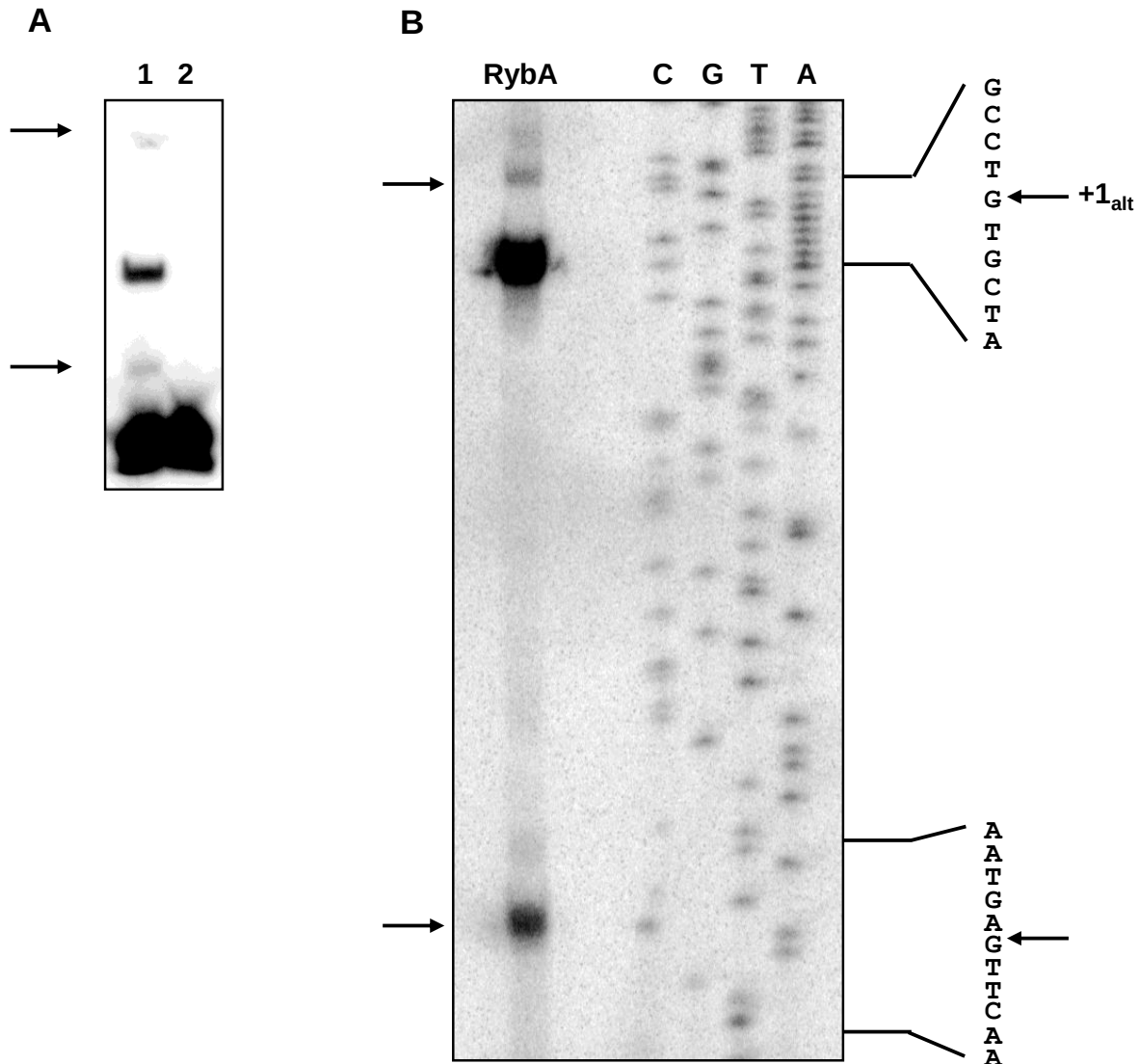


Abb. 4.10: Bestimmung des 5'-Endes mit Total-RNA aus der *rybA* Überexpressionsmutante unter Peroxid-Stress. Die Bestimmung des 5'-Endes mit RNA aus Δ *rybA* + p*RybA* erfolgte analog zu der mit Total-RNA aus *E. coli* K12 WT (Abb. 4.4). **(A)** 10%igen, denaturierenden PAA-Gel zur Überprüfung der reversen Transkription mit Total-RNA aus Δ *rybA* + p*RybA*. Spur 1: RT-Produkt *RybA*; Spur 2: Negativkontrolle ohne Reverse Transkriptase. Die Pfeile markieren die zusätzlich erhaltenen RT-Produkte. **(B)** Die Analyse der Sequenzierreaktion erfolgte durch Trennung in einem 8%igen, denaturierenden PAA-Sequenziergel. *RybA*: RT-Produkte; C, T, A, G: Sequenzierabbruchprodukte nach Einbau von ddCTP, ddTTP, ddATP, ddGTP. Rechts ist die ermittelte Sequenz gezeigt. Die Pfeile markieren die erhaltenen RT-Produkte sowie die dazugehörigen Start-Nucleotide.

Abb. 4.11 zeigt die drei für *RybA* erhaltenen 5'-Enden relativ zu der zuvor bekannten Sequenz. Die Suche nach möglichen Promotorelementen ergab ein putatives -10 Element 10 bp *upstream* des alternativen Start-Nucleotids +1_{alt}, das dem Start-Nucleotid des größten Transkriptes entspricht. Die Sequenz 5'-TATAAT-3' entspricht dabei der Konsensussequenz typischer -10 Elemente für die σ^{70} -abhängige RNA Polymerase in Prokaryoten [89]. Ein

Ergebnisse

putatives -35 Element der σ^{70} -RNA Polymerase wurde 16 bp *upstream* des -10 Elements gefunden (Abb. 4.11). Die Sequenz 5'-TTAACG-3' ähnelt sehr stark der Konsensus-Sequenz 5'-TTGACA-3' [89] bis auf das Adenosin an Position 2 und das Guanotin an Position 6.

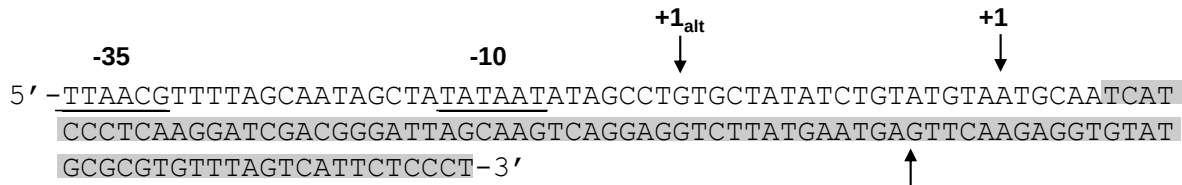


Abb. 4.11: Transkriptionsstartpunkt von RybA nach Bestimmung des 5'-Endes. Ausschnitt aus dem *E. coli* K12 Genom von Position 852.321 bis 852.175 [88]. Gezeigt ist die Sequenz für *rybA* mit putativen Promotorelementen (-10 und -35 Elemente sind unterstrichen) nach Bestimmung des 5'-Endes. Die Pfeile markieren die gefundenen 5'-Nucleotide aus den *primer extension* Experimenten. Das erste Guanotin entspricht der Position 852287, das Adenosin Position 852269 und das zweite Guanotin Position 852212 im Genom von *E. coli*. Die ursprünglich bekannte Sequenz für *rybA* ist grau unterlegt.

Die Bestimmung des 5'-Endes von HB_428 wurde zunächst auch mit Total-RNA aus *E. coli* K12 WT Zellen, die unter Peroxid-Stress kultiviert wurden, durchgeführt. Jedoch wurde nach der reversen Transkription kein RT-Produkt erhalten. Daher wurde die reverse Transkription mit Total-RNA aus Δ HB_428 + pHB_428 unter Peroxid-Stress und dem 5'-radioaktiv markiertem Primer KG35 (Tab. 2.6) durchgeführt. Das erhaltene RT-Produkt (Abb. 4.12 A) wurde zusammen mit der Sequenzierungsreaktion, die analog zu der Bestimmung des 5'-Endes von RybA mit dem Plasmid pHB_428 durchgeführt wurde (3.4), auf einem 8%igen, denaturierenden Sequenziergel aufgetragen (Abb. 4.12 B).

Die Auswertung des Sequenziergels ergab zwei mögliche 5'-Enden für HB_428 (Abb. 4.12 B). Das dominierende RT-Produkt (Abb. 4.12 A) entsprach einem Adenosin an Position 2798716 im Genom von *E. coli* und die schwächere Bande konnte einem Thymidin 9 bp downstream zugeordnet werden (Abb. 4.12 B).

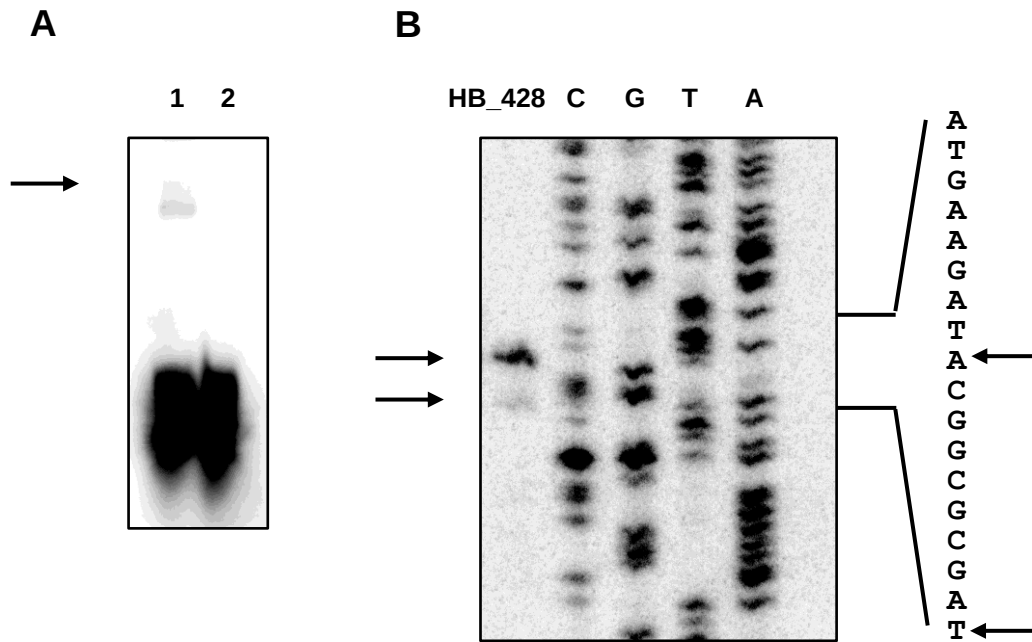


Abb. 4.12: Bestimmung des 5'-Endes der sRNA HB_428. Die Bestimmung des 5'-Endes von HB_428 mit RNA aus Δ HB_428 + pHB_428 erfolgte analog zu der Bestimmung des 5'-Endes von RybA. Als Templat für die Sequenzierreaktion wurde das Plasmid pHB_428 verwendet. **(A)** 10%iges, denaturierendes PAA-Gel zur Überprüfung der reversen Transkription mit Total-RNA aus Δ HB_428 + pHB_428 als Templat. Spur 1: RT-Produkt HB_428; Spur 2: Negativkontrolle ohne Reverse Transkriptase. Der Pfeil markiert das erhaltene RT-Produkt. **(B)** Die Analyse der Sequenzierreaktion erfolgte durch Trennung auf einem 8%igen, denaturierenden PAA-Sequenziergel. HB_428: RT-Produkt; C, T, A, G: Sequenzierabbruchprodukte nach Einbau von ddCTP, ddTTP, ddATP, ddGTP. Rechts ist die ermittelte Sequenz gezeigt. Die Pfeile markieren die erhaltenen RT-Produkte sowie die dazugehörigen Start-Nucleotide.

Abb. 4.13 zeigt die Lage der 5'-Enden im Kontext mit möglichen Promotorelementen und der zuvor bekannten Sequenz.



Abb. 4.13: Transkriptionsstartpunkt von HB_428 nach Bestimmung des 5'-Endes. Ausschnitt aus dem *E. coli* K12 Genom von Position 2.798.759 bis 2.798.534 [88]. Gezeigt ist die Sequenz für *HB_428* mit putativen Promotorelementen (-10 und -35 Elemente sind unterstrichen). Die Pfeile markieren die gefundenen 5'-Nucleotide. Das Adenosin entspricht der Position 2798716 und das Thymidin Position 2798725 im Genom von *E. coli*. Die ursprünglich bekannte Sequenz ist grau unterlegt. Die Sequenz des Nachbargens *nrdH* ist grün hervorgehoben.

Beide möglichen 5'-Enden liegen *upstream* der schon bekannten Sequenz. 6 bp vor dem ermittelten 5'-Ende des dominanten RT-Produktes konnte ein putatives -10 Element der σ^{70} -RNA Polymerase gefunden werden. Die Sequenz 5'-TAAAT-3' weicht nur an der dritten

Position von der Konsensussequenz 5'-TATAAT-3' ab. Ein mögliches -35 Element war 17 bp *upstream* des -10 Elements zu finden. Die Sequenz 5'-TGCGCA-3' weicht an den Positionen 2-4 von der Konsensussequenz 5'-TTGACA-3' ab. Das mögliche -35 Element überlappt mit dem Startcodon des Nachbargens *nrdH*, das auf dem gegenüberliegenden Strang liegt und dessen Sequenz somit in Abb. 4.13 in *antisense* gezeigt ist.

4.1.5 Bestimmung des 3'-Endes von RybA und HB_428

Das 3'-Ende der sRNA RybA wurde mittels *rapid amplification of cDNA ends* (RACE) bestimmt (3.5). Zunächst wurde ein biotinyliertes Adapter-Oligonucleotid (KG9, Tab. 2.6) an die 3'-Enden der Total-RNA aus $\Delta rybA$ + pRybA durch die T4 RNA Ligase ligiert. Durch reverse Transkription konnte die Total-RNA anschließend mit dem zu dem Adapter-Oligonucleotid komplementären Oligonucleotid KG8 (Tab. 2.6) in cDNA umgeschrieben werden. Die Amplifikation der Sequenzen, die der sRNA RybA entsprachen, erfolgte über eine PCR mit dem Oligonucleotid KG8 und einem *rybA* spezifischen Oligonucleotid (KG10, Tab. 2.6). Über die Oligonucleotide wurden gleichzeitig Schnittstellen für die Restriktionsenzyme EcoRI (Primer KG10) und HindIII (KG8) eingefügt. So konnten die erhaltenen PCR-Produkte in das Plasmid pUC18 kloniert (3.6.1, 3.6.2) und sequenziert werden (3.3.4). Die Total-RNA für die 3'-RACE Experimente wurde aus der Überexpressionsmutante $\Delta rybA$ + pRybA unter Peroxid-Stress oder unter stressfreien Bedingungen isoliert, da für Total-RNA aus *E. coli* K12 WT Zellen kein RACE-PCR Produkt erhalten werden konnte. Die Bestimmung des 3'-Endes unter stressfreien Bedingungen erfolgte, da zuvor gezeigt werden konnte, dass hier eine größere Spezies von RybA vorherrschend war (vergl. Abb. 4.2 und Abb. 4.7 A). Es wurde zusätzlich ein Ansatz ohne Zugabe der T4 RNA Ligase bei der Ligation des Adapter-Oligonucleotids als Negativkontrolle angefertigt.

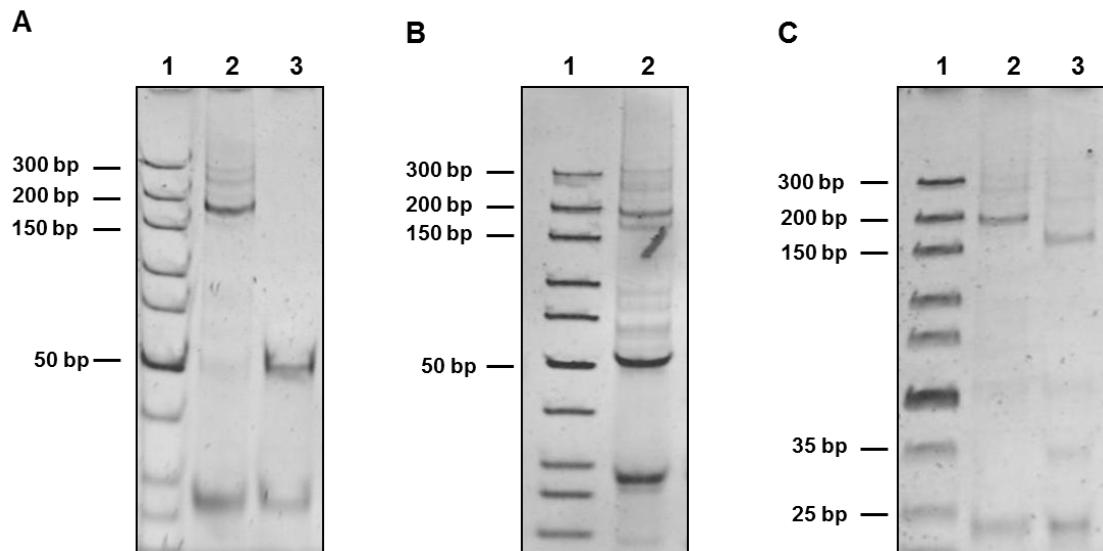


Abb. 4.14: 10%ige, native PAA-Gele zur Analyse der 3'-RACE-PCR RybA. 10 µg Total-RNA aus Δ rybA + pRybA mit **(A)** und ohne Peroxid-Stress **(B)** wurden zur Bestimmung des 3'-Endes mit einem Oligonucleotid-Adapter ligiert und in cDNA umgeschrieben. Die Amplifikation der RybA cDNA erfolgte mittels PCR mit einem rybA-spezifischen Oligonucleotid (KG10, Tab. 2.6). Ein Ansatz ohne Zugabe der T4 RNA Ligase diente als Negativkontrolle. **(A)** Spur 1: *O'GeneRuler™ Ultra Low Range DNA Ladder*; Spur 2: 3'-RACE PCR RybA, Peroxid-Stress; Spur 3: 3'-RACE PCR Negativkontrolle ohne Zugabe von T4 RNA Ligase. **(B)** Spur 1: *O'GeneRuler™ Ultra Low Range DNA Ladder*; Spur 2: 3'-RACE PCR RybA ohne Stress. **(C)** Analyse des 3'-RACE-PCR Produktes durch Spaltung mit DraI. Spur 1: *O'GeneRuler™ Ultra Low Range DNA Ladder*; Spur 2: 3'-RACE PCR RybA; Spur 3: 3'-RACE PCR RybA nach DraI Spaltung.

Die RACE-PCR wurde zur Kontrolle auf einem 10%igen, nativen PAA-Gel aufgetragen (Abb. 4.14 A und B). Für beide RACE-PCR Ansätze wurden mehrere PCR-Produkte erhalten. Für das 3'-RACE mit Total-RNA aus Zellen unter stressfreien Bedingungen wurden nach der PCR Banden erhalten, die durchgehend ein langsames Laufverhalten aufwiesen als die Banden der RACE-PCR unter Peroxid-Stress. (Abb. 4.14 A und B, Spur 2). Bei der Negativkontrolle ohne Zugabe der T4 RNA Ligase wurden bei beiden Ansätzen keine PCR-Produkte erhalten (Abb. 4.14 A Spur 3; für 3'-RACE ohne Stress nicht gezeigt). Um zu überprüfen, ob es sich bei den erhaltenen PCR-Produkten um rybA-spezifische Sequenzen handelte wurden die PCR-Produkte, die aus dem 3'RACE unter Peroxid-Stress erhalten wurden, einer Spaltung mit dem Restriktionsenzym DraI unterzogen (Abb. 4.14 C). rybA enthält eine Schnittstelle für DraI, so dass sich nach der Spaltung theoretisch zwei Fragmente mit einer Länge von 150-160 bp und 20-30 bp ergeben sollte. Die genaue Fragmentlänge ließ sich nicht vorhersagen, da das 3'-Ende der erhaltenen PCR-Produkte nicht bekannt war. In Abb. 4.14 C, Spur 2 ließen sich zwei Banden, die dieser Größe entsprachen, nach Spaltung

Ergebnisse

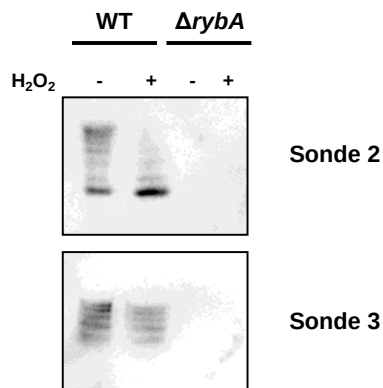
mit DraI erkennen. Zum Vergleich wurde das nicht gespaltene PCR-Produkt aufgetragen (Abb. 4.14, Spur 1).

Nach Klonierung der PCR-Produkte in das Plasmid pUC18 und anschließender Sequenzierung konnte das 3'-Ende für RybA unter Peroxid-Stress und unter stressfreien Bedingungen ermittelt werden. Unter Peroxid-Stress ergab sich für die sRNA RybA eine Länge von 206 nt, wenn man als Start-Nucleotid das +1 Adenosin betrachtet. Ohne Stress konnte so eine Länge von 322 nt ermittelt werden. Festzuhalten bleibt, dass die 322 nt Form nicht der größten Spezies von RybA entspricht, da Vergleiche mit Northern-Blot Analysen zeigten, dass noch größere Formen von RybA beobachtet werden konnten. Vermutlich entspricht das gefundene 3'-Ende der von Wassarman *et al.* detektierten größeren Spezies [53]. Diese wurde mittels Northern-Blot-Analysen auf eine Größe von ca. 300 nt geschätzt. Dabei wurde die Expression von *rybA* ebenfalls unter stressfreien Bedingungen untersucht. Zur Verifizierung der ermittelten 3'-Enden wurde Total-RNA aus WT- und Δ *rybA*-Zellen mittels Northern-Blot und zwei radioaktiv markierten Sonden, die am 3'-Ende der 206 nt Form (Sonde 2) und direkt hinter diesem 3'-Ende hybridisieren (Sonde3, Abb. 4.15 B), analysiert. Abb. 4.15 A zeigt, dass die 206 nt Form von RybA nur mit Sonde 2 detektiert werden konnte. Bei der Hybridisierung mit der Sonde 3 wurden nur größere Spezies von RybA detektiert. Diese Beobachtungen bestätigen die 3'-RACE Ergebnisse.

In Abb. 4.15 B ist die DNA-Sequenz für RybA nach Bestimmung des 5'- und 3'-Endes gezeigt. Das 3'-Ende von RybA überlappt in beiden Fällen mit dem ORF von *yliL*, das auf dem gegenüberliegenden Strang liegt. Dies ließ die Vermutung zu, dass es sich bei RybA um eine *cis*-codierte antisense RNA handeln könnte. *Cis*-codierte antisense RNAs können bis zu 75 nt vollständige Komplementarität zu ihrer Target-mRNA aufweisen [13]. Die 206 nt Form von RybA überlappt 100 nt und die 322 nt Form 216 nt mit dem ORF von *yliL*.

Ergebnisse

A



B

Sequenz der sRNA RybA mit putativen Promotorelementen. Die Pfeile markieren die gefundenen Start-Nucleotide +1 und +1_{alt}. Die Sequenz des Nachbargens *yljL* ist blau hervorgehoben. Die Hybridisierungsstellen der RybA Sonden 2 und 3 aus (A) sind rot bzw. orange unterstrichen. Die Sequenz von *rybA* beinhaltet ein ORF. Start- und Stoppcodon des ORFs sind eingerahmt.

```

5' -TTAACGTTTTAGCAATAGCTATATAATATAGCCTGTGCTATATCTGTATGTAATGCAATCAT
CCCTCAAGGATCGACGGGATTAGCAAGTCAGGAGGTCTTATGAATGAGTTCAAGAGGTGTATGCC
CGTGTTTAGTCATTCTCCCTTTAAAGTACGGTTAATGCTGCTCTCTATGTTGTGCGATATGGTCA
ACAACAAACCGCAGCAAGATAAACCTTCCGATAAAATAGCGGCGTCGCGGTACGCCGCTTCACTCC
TGCTTTTCATGCAGGCATAACGCGTTTTGGTCTGAAAAACCCCACTTTTTGTTCGGATTTGCAATCC
CCTTCGCAAAAGATTTGTTCTGTCAGTAGTTGACCTGAACGGCGGCTCGCTCT-3'
  
```

Abb. 4.15: RybA nach Bestimmung des 5'- und 3'-Endes. (A) Northern-Blot-Analyse von Total-RNA aus WT- und ΔrybA-Zellen +/- Peroxid-Stress zur Verifizierung der 3'-RACE Ergebnisse. Die Detektion von RybA erfolgte durch Hybridisierung mit den radioaktiv markierten RybA Sonden 2 und 3 (KG74 und KG75 Tab. 2.6). **(B)** Gezeigt ist die Sequenz der sRNA RybA mit putativen Promotorelementen. (-10 und -35 Elemente sind unterstrichen). Die Pfeile markieren die gefundenen Start-Nucleotide +1 und +1_{alt}. Das letzte Nucleotid der 206 nt Form von RybA ist fett hervorgehoben. Das letzte Nucleotid in der Sequenz entspricht dem 3'-Ende, dass unter stressfreien Bedingungen in LB-Medium bestimmt wurde. Die Sequenz des Nachbargens *yljL* ist blau hervorgehoben. Die Hybridisierungsstellen der RybA Sonden 2 und 3 aus (A) sind rot bzw. orange unterstrichen. Die Sequenz von *rybA* beinhaltet ein ORF. Start- und Stoppcodon des ORFs sind eingerahmt.

Nach Bestimmung des 5'- und 3'-Ende von RybA wurde die Konservierung der Sequenz in anderen Bakterienarten untersucht. Dafür wurde die Sequenz inklusive der Promotorregion (Abb. 4.15 B) mit dem Programm BLASTN 2.2.25+ [90] mit den Genomen anderer Bakterienarten abgeglichen. Die Sequenzen wurden mit der Software Vector NTI Advance™ ausgewertet (siehe Anhang).

Tab. 4.1: Konservierung von *rybA* in verschiedenen Spezies

	% Sequenzabdeckung ^a	Konservierter Bereich in bp (Identität in %) ^b
<i>Shigella dysenteriae</i>	100%	1-374 (99%)
<i>Shigella flexneri 2a</i>	100%	1-374 (99%)
<i>Shigella boydii</i>	100%	1-374 (99%)
<i>Shigella sonnei</i>	100%	1-374 (99%)
<i>Citrobacter sp.</i>	95%	1-357 (82%)
<i>Citrobacter youngae</i>	95%	1-357 (81%)
<i>Salmonella typhimurium</i>	67%	1-251 (87%)
<i>Citrobacter rodentium</i>	68%	1-257 (87%)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	67%	1-253 (80%)

^a Angegeben ist der prozentuale Anteil der Sequenz von *rybA*, der in den verschiedenen Arten gefunden wurde.

^b Konservierter Bereich von *rybA* in bp und dessen Identität in Prozent.

RybA ist stark konserviert zwischen *E. coli*-, *Shigella*-, *Salmonella*-, *Citrobacter*- und *Klebsiella*-Arten (Tab. 4.1). Auffällig war, dass die 206 nt Form von RybA und die Promotorregion stärker konserviert sind als die 322 nt lange Form. In dem Zusammenhang wurde auch die Konservierung der codierenden Sequenz von *yliL* zwischen den verschiedenen Bakterienspezies untersucht (Tab. 4.2 und Anhang). *yliL* ist stark konserviert (99% Identität) zwischen *E. coli*, den *Shigella*-Arten, *Citrobacter sp.* und *Citrobacter youngae*. In *Salmonella typhimurium* sind nur die letzten 92 bp zu 86% identisch. In *Citrobacter rodentium*, *Citrobacter koseri* und *Klebsiella pneumoniae* konnte die Sequenz nicht gefunden werden. Würde es sich bei RybA um eine *cis*-codierte antisense sRNA handeln, wäre zu erwarten, dass das Target ebenso stark konserviert ist wie *rybA*.

Tab. 4.2: Konservierung des ORFs von *yliL* in verschiedenen Spezies.

	% Sequenzabdeckung ^a	Konservierter Bereich in bp (Identität in %) ^b
<i>Shigella dysenteriae</i>	99%	3-270 (99%)
<i>Shigella flexneri</i>	99%	3-270 (98%)
<i>Shigella boydii</i>	99%	3-270 (98%)
<i>Shigella sonnei</i>	99%	3-270 (99%)
<i>Citrobacter sp.</i>	95%	9-267 (79%)
<i>Citrobacter youngae</i>	97%	9-270 (77%)
<i>Salmonella typhimurium</i>	34%	178-207 (86%)

^a Angegeben ist der prozentuale Anteil der Sequenz von *yliL*, die in den verschiedenen Arten gefunden wurde.

^b Konservierter Bereich von *yliL* in bp und dessen Identität in Prozent.

Bei der Analyse der *rybA* Sequenz wurde außerdem ein 129 bp langer ORF gefunden (Abb. 4.16), der für ein kleines Protein von 42 Aminosäuren (AS) codieren könnte. 4 bp *upstream* vor dem ATG des ORFs wurde eine putative Shine-Dalgarno Sequenz gefunden, die perfekt der Konsensussequenz 5'-AGGAGG-3' [91] entspricht. Der ORF wäre in der 206 nt Form (oxidativer Stress) und in der 322 nt (ohne Stress) Form vollständig enthalten. Das *rybA* Gen könnte demnach auch ein Protein codieren. Tatsächlich gibt es Beispiele für Gene, die für eine sRNA und ein Protein codieren [32]. Die bioinformatische Suche nach möglichen Terminatorsequenzen, um das *rybA* Gen exakt zu definieren, brachte keine Ergebnisse. Abb. 4.16 zeigt schematisch die Organisation von *rybA* nach Bestimmung des 5'- und 3'-Endes im Genom von *E. coli* K12.

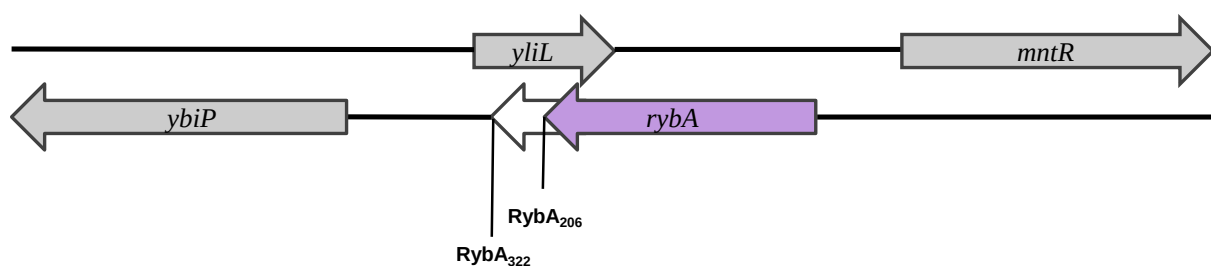


Abb. 4.16: Position des *rybA* Gens im Genom von *E. coli* K12 nach Bestimmung des 5'- und 3'-Endes. Gezeigt ist ein Ausschnitt aus dem Genom von *E. coli* von Position 850.237 – 852.873 [88]. ORFs sind als graue Pfeile dargestellt. Die 206 nt Form von RybA ist als violetter Pfeil dargestellt. Der weiße Pfeil weist auf das 3'-Ende unter stressfreien Bedingungen hin.

Ergebnisse

Das 3'-Ende von HB_428 sollte unter Verwendung von Total-RNA aus der Überexpressionsmutante $\Delta HB_428 + pHB_428$ analog zu dem 3'-Ende von RybA bestimmt werden. Es konnten allerdings keine Ergebnisse für HB_428 erzielt werden. Um dennoch näherungsweise einen Eindruck von der Größe der für HB_428 gefundenen Spezies zu erhalten, wurde die sRNA mit einem 5'-radioaktiv markiertem RNA Marker (3.3.6) verglichen (Abb. 4.17).

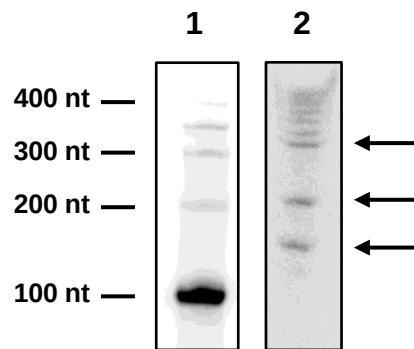


Abb. 4.17: Größenanalyse der sRNA HB_428. Northern-Blot-Analyse zur Bestimmung der Größe der HB_428-Transkripte. 10 µg Total-RNA *E. coli* K12 WT-Zellen unter Peroxid-Stress wurden mit dem 5'-radioaktiv markierten RiboRuler™ Low Range RNA Ladder in einem 6%igen, denaturierenden PAA-Gel getrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Die Detektion von HB_428 erfolgte durch Hybridisierung mit einer HB_428-spezifischen Oligonucleotid-Sonde (KG37, Tab. 2.6) und anschließender Autoradiographie (3.1.7). Spur 1: Radioaktiv markierter RiboRuler™ Low Range RNA Ladder; Spur 2: Total-RNA aus *E. coli* K12 WT unter Peroxid-Stress. Die Pfeile markieren die verschiedenen HB_428-Transkripte.

Den drei Spezies von HB_428 konnte eine Größe von etwa 160 nt, 210 nt und 320 nt zugeordnet werden. Zusammen mit dem bestimmten 5'-Ende konnte sich der Position von HB_428 im Genom von *E. coli* angenähert werden (Abb. 4.18). Die Abschätzung der Transkriptgrößen ergab, dass das HB_428 Gen teilweise mit *ygaM* auf dem antisense Strang überlappt.

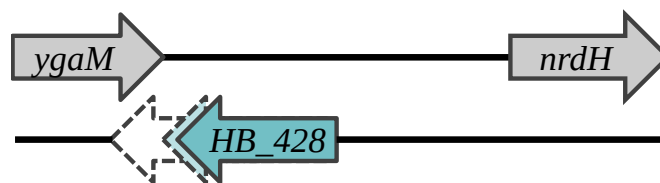


Abb. 4.18: Angenäherte Position der Sequenz von HB_428 im Genom von *E. coli* K12 nach Bestimmung des 5'-Endes und Abschätzung der Größe. Gezeigt ist ein Ausschnitt aus dem Genom von *E. coli* von Position 2.789.156 – 2.798.990 [88]. Open reading frames (ORFs) sind als graue Pfeile dargestellt. HB_428 nach Bestimmung des 5'-Endes ist als blauer Pfeil dargestellt und entspricht in etwa der Größe des kleinsten Transkriptes. Der hellblaue und der weiße Pfeil entsprechen jeweils den beiden größeren Transkripten.

4.1.6 Regulation der Expression von *rybA* unter Peroxid-Stress

Um der Frage nachzugehen, wie die verstärkte Expression von *rybA* unter Peroxid-Stress reguliert ist, wurde die putative Promotorregion von *rybA* auf potentielle regulatorische Elemente untersucht. Dabei könnte es sich z. B. um Bindestellen für Transkriptionsfaktoren handeln, die die Transkription von RybA unter Peroxid-Stress stimulieren. Dazu wurden verschiedene Konstrukte hergestellt, in denen die Promotorregion sukzessive verkürzt wurde (Abb. 4.19 A). Die Klonierung der Promotor-Varianten pRybA_{P1-P5} (pKG22-pKG26, Tab. 2.5) erfolgte analog zu der Konstruktion von pRybA (4.1.3) unter Verwendung der Oligonucleotide KG67-KG71 und KG4 (Tab. 2.6) zur Amplifikation der jeweiligen Sequenz.

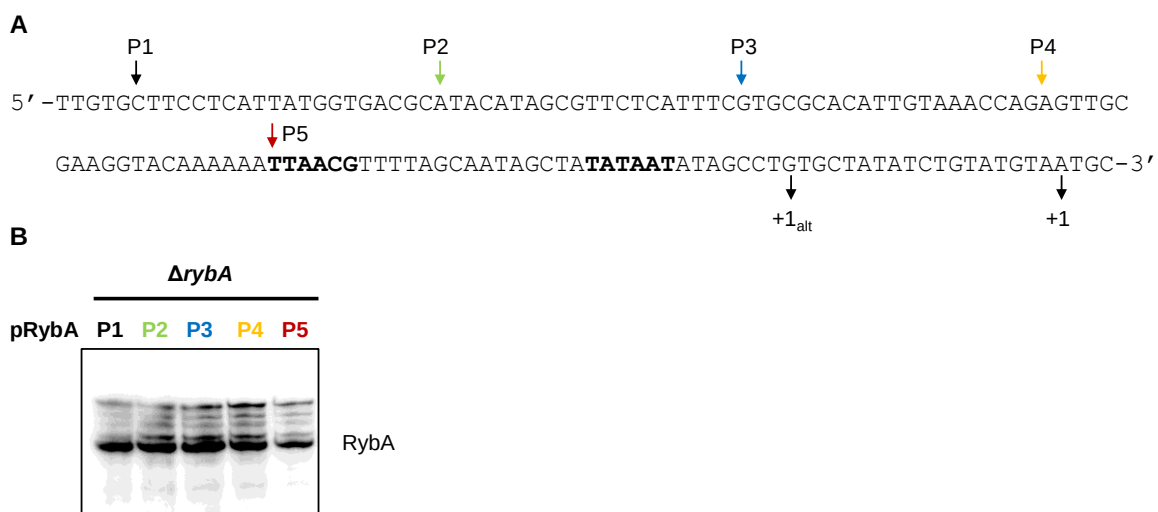


Abb. 4.19: Analyse der putativen Promotorregion von *rybA*. Zur Identifizierung von potentiellen regulatorischen Elementen in der Promotorregion von *rybA* wurden fünf verschiedene Plasmid-basierte Konstrukte (pRybA_{P1-P5}) hergestellt, in denen die Region sukzessive verkürzt wurde. **(A)** Sequenz der Promotorregion von *rybA*. Die 5'-Enden der jeweiligen Konstrukte, sowie die Start-Nucleotide +1 und +1_{alt} sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die putative -10 und -35 Elemente sind fett hervorgehoben. **(B)** Northern-Blot-Analysen der verkürzten Promotorkonstrukte pRybA_{P1-5}. Δ *rybA* wurden mit dem jeweiligen Plasmid transformiert und unter Peroxid-Stress kultiviert. Nach Isolierung der Total-RNA wurde RybA mittels Northern Blot und anschließender Hybridisierung mit einer spezifischen Sonde (KG5, Tab. 2.6) detektiert.

Die am weitesten verkürzte Version (pRybA_{P5}) enthielt nur noch das putative -35 und -10 Element (Abb. 4.19 A). Nach Transformation von Δ *rybA* Zellen und Kultivierung unter Peroxid-Stress wurde die Expression von *rybA* mittels Northern-Blot untersucht (Abb. 4.19 B). Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von *rybA* unter Peroxid-Stress durch die Verkürzung der Promotorregion in keinem Fall negativ beeinflusst wurde. Daher kann ausgeschlossen werden, dass sich regulatorische Elemente in dieser Region befinden, die für die Induktion der Expression unter Peroxid-Stress verantwortlich sind. Alternativ könnte der erhöhte RNA-Level von RybA auch durch eine Stabilisierung der RNA unter Peroxid-Stress

hervorgerufen werden. Daher wurde das *rybA*-Gen ohne Promotorelemente unter der Kontrolle eines konstitutiven P_{LacO-1} Promotor kloniert. Als Start-Nucleotid wurde dabei zunächst das alternative Start-Nucleotid (+1_{alt}) gewählt (vergl. Abb. 4.15 B). pSK17 diente hier, wie zuvor bei der Konstruktion von pRybA, als Ausgangsplasmid. Die Sequenz für *rybA* wurde mittels Kolonie-PCR (3.3.1) und den Oligonucleotiden KG81 und KG4 (Tab. 2.6) amplifiziert und anschließend mit den Enzymen NheI und XbaI geschnitten. Nach Ligation mit dem Plasmid pSK17, welches ebenfalls mit NheI und XbaI geschnitten wurde, erfolgte die Verifizierung des neu entstandenen Plasmides pRybA_{pLacO-1N} (pKG21, Tab. 2.5) durch Sequenzierung. Durch die gewählte Klonierungsstrategie befand sich zwischen dem Promotor und dem Start-Nucleotid die NheI Schnittstelle. Um eine mögliche Beeinflussung durch die Basen der Schnittstelle auf die Transkription und/oder Prozessierung zu vermeiden und um zu gewährleisten, dass das Transkript mit dem +1_{alt} Nucleotid von RybA anfängt, wurde mittels ortsspezifischer Mutagenese (3.3.3) die NheI Schnittstelle entfernt. Dabei wurde parallel ein zweites Konstrukt mit dem +1 Adenosin als Start-Nucleotid hergestellt (Abb. 4.15 B). Für die ortsspezifische Mutagenese wurden die Oligonucleotide KG77 (pRybA_{pLacO-1+1alt}) bzw. KG78 (pRybA_{pLacO-1+1}) und KG82 verwendet. Die Verifizierung der neu entstandenen Plasmide pRybA_{pLacO-1+1alt} (pKG29, Tab. 2.5) und pRybA_{pLacO-1+1} (pKG30, Tab. 2.5) erfolgte mittels Sequenzierung (3.3.4). Nach Transformation von Δ *rybA*-Zellen mit dem jeweiligen Plasmid wurde die Expression von *rybA* unter Peroxid-Stress und stressfreien Bedingungen mittels Northern-Blot untersucht (Abb. 4.20). Auch wenn *rybA* unter der Kontrolle eines konstitutiven Promotors exprimiert wurde, war die 206 nt Form von RybA nur unter Peroxid-Stress stabil bzw. in größeren Mengen vorhanden. Unter stressfreien Bedingungen konnte die 206 nt Form im Vergleich nur in geringeren Mengen detektiert werden. Dies spricht für eine Stabilisierung der RNA oder verstärkte Prozessierung zu der 206 nt Form unter Peroxid-Stress. Anderenfalls wäre zu erwarten gewesen, dass der RNA-Level bei Expression von einem konstitutiven Promotor unter Peroxid-Stress und stressfreien Bedingungen gleich bleibt.

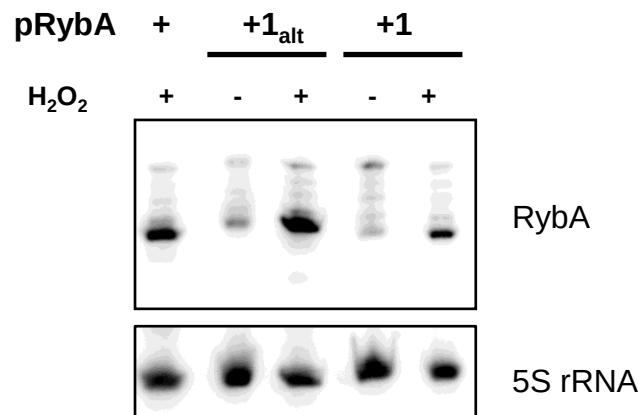


Abb. 4.20: Expression von *rybA* unter Kontrolle des konstitutiven P_{LacO-1} Promotors. $\Delta rybA$ -Zellen wurden mit $pRybA_{P_{LacO-1}+1alt}$, $pRybA_{P_{LacO-1}+1}$ und $pRybA$ transformiert und unter Peroxid-Stress und stressfreien Bedingungen kultiviert. Die Analyse der *rybA*-Expression erfolgte mittels Northern Blot und Hybridisierung mit einer radioaktiven RybA-spezifischen Oligonucleotid-Sonde (KG 5, Tab. 2.6).

4.2 Microarray-Analysen zur Targetidentifizierung

Der Großteil der bekannten sRNAs reguliert die Genexpression über den direkten Einfluss auf die Stabilität ihrer Target-mRNA [12]. Ein Vergleich des Transkriptoms zwischen dem Wildtyp-Stamm und der sRNA KO-Mutanten kann daher zur Identifizierung von Targets führen. Zur Targetidentifizierung der sRNAs RybA und HB_428 wurden Microarray-Analysen durchgeführt (3.11). Durch die Verwendung von DNA-Microarrays kann das veränderte Expressionslevel einzelner Gene detektiert werden. In dieser Studie wurden GeneChip *E. coli* Genome 2.0 Array Chips der Firma Affymetrix verwendet. Auf den Chips sind mehrere Oligonucleotid-Sonden für alle 20.366 Gene und 700 Intergenische Regionen der *E. coli* Stämme K12, O157:H7-EDL933, O157:H7-Saka und CFT073 immobilisiert. Zudem sind Sonden für verschiedene Antibiotika-Resistenzgene auf dem Chip vorhanden. Durch Hybridisierung der Chips mit isolierter, in cDNA umgeschriebener Total-RNA aus *E. coli* K12 WT-Zellen und den KO-Mutanten $\Delta rybA$ und ΔHB_{428} mit anschließender photometrischer Detektion der cDNAs konnte das Expressionslevel einzelner Gene miteinander verglichen werden.

Dafür wurden zunächst jeweils drei unabhängige Kulturen von *E. coli* K12 WT-, $\Delta rybA$ - und ΔHB_{428} -Zellen in MOPS Minimalmedium unter Peroxid-Stress kultiviert (3.7.3) und die Total-RNA isoliert (3.2.7). Die RNA wurde anschließend über das RNeasy[®] Mini Kit der Firma Qiagen gereinigt. Alle folgenden Arbeitsschritte, wie die cDNA-Synthese,

Ergebnisse

Hybridisierung der Chips, Detektion sowie die Auswertung wurden von Frau Kristin Klätschke am Universitätsklinikum Eppendorf im Institut für Klinische Chemie in Hamburg durchgeführt. Es wurden für jeden Stamm drei unabhängige Microarray-Experimente durchgeführt und das Expressionsmuster anschließend ausgewertet.

Für die Analyse potentieller Target-Gene wurden nur die Gene berücksichtigt, deren Expression im Vergleich zum Wildtyp mindestens 1,7-fach reguliert waren und einen p-Wert unter 0,05 aufwiesen. Der Regulierungsfaktor wurde aus der *signal log ratio* (SLR) berechnet, der die Größe und Änderungsrichtung der zu vergleichenden Proben angibt. Die Umrechnung erfolgte für $SLR \geq 0$ durch die Formeln 2^{SLR} und für $SLR < 0$ durch 2^{-SLR} . Der p-Wert wurde nach Anwendung des T-Tests zwischen den jeweils gemittelten Werten der drei Einzelexperimente (WT 1-3, $\Delta rybA$ 1-3 und ΔHB_428 1-3) bestimmt und gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der der beobachtete Unterschied in der Genexpression zufällig ist. Ein p-Wert von unter 0,05 bedeutet daher, dass die beobachtete Regulation eines Gens mit einer Wahrscheinlichkeit von unter 5% zufällig ist.

Für $\Delta rybA$ konnten so 75 Gene ermittelt werden, die im Vergleich zum Wildtyp differentiell exprimiert wurden. In ΔHB_428 wurden 49 differentiell exprimierte Gene gefunden. Auffällig war, dass eine Reihe von Genen in beiden KO-Mutanten eine ähnliche Regulation zeigten (Anhang, Tabelle 1). Um Nebeneffekte, die durch die Kultivierung entstanden sein könnten auszuschließen, wurde ein zusätzliches Kriterium für signifikant regulierte Gene eingeführt. Gene, die die beiden oben genannten Kriterien erfüllten, mussten zusätzlich einen Unterschied in der SLR zwischen RybA und HB_428 von 0,8 aufwiesen, um als signifikant reguliert betrachtet zu werden.

Für RybA ergab die Analyse demnach 12 und für HB_428 11 differentiell regulierte Gene (Tab. 4.3 und Tab. 4.4). Davon waren 10 Gene in $\Delta rybA$ im Vergleich zum Wildtyp stärker exprimiert und 2 Gene wiesen eine schwächere Expression auf. Für HB_428 wurden 4 stärker und 7 schwächer exprimierte Gene gefunden.

Zudem wurden die Gene auf Gemeinsamkeiten in der Funktion oder in regulatorischen Netzwerken untersucht. Dies führte zur Auswahl von je 3 weiteren potentiellen Target-Genen für RybA und HB_428, die von einem der drei genannten Kriterien abwichen (In Tab. 4.3 und Tab. 4.4 mit * gekennzeichnet).

In Tab. 4.3 ist die Auswahl für RybA gezeigt. Als Positivkontrolle konnten die Ergebnisse für die Expression des Kanamycin-Resistenz-Gens und *rybA* betrachtet werden. Die Kanamycin-Resistenz war, bedingt durch den Knock-out des *rybA* Gens (4.1.2), in $\Delta rybA$ vorhanden. Es

konnte im Vergleich zum Wildtyp eine 719-fach stärkere Expression verzeichnet werden. *rybA* zeigte im Vergleich zum Wildtyp in der KO-Mutante eine 114-fach schwächere Expression.

yliL war nach der Kanamycin-Resistenz in Δ *rybA* mit dem Faktor 5,03 am stärksten hochreguliert. *yliL* ist auf dem gegenüberliegenden Strang von *rybA* codiert. Teile des ORFs überlappen mit dem 3'Ende von RybA (4.1.5). Dies führte zuvor schon zu der Vermutung, dass es sich bei RybA um eine *cis*-codierte antisense RNA mit *yliL* als Target handeln könnte. Die Microarray-Daten unterstützten diese Annahme, da die Expression von *yliL* in Abwesenheit von RybA hochreguliert ist. *Cis*-codierte antisense RNAs haben häufig einen destabilisierenden Einfluss auf ihre Target-mRNA und führen zum ihrem Abbau [13].

Auffällig war die verstärkte Expression des *aroL-yaiA-aroM*- und *aroF-tyrA*-Operons (folgend als *aroL*-bzw. *aroF*-Operon bezeichnet) in Δ *rybA*. Das *aroL*-Operon umfasst die Gene *aroL*, *yaiA* und *aroM*. Für alle drei Gene konnte unabhängig eine bis zu 2,8-fach verstärkte Expression beobachtet werden (Tab. 4.3). Das *aroF*-Operon umfasst die Gene *tyrA* und *aroF*. Beide Gene waren in Δ *rybA* ca. 2-fach stärker exprimiert (Tab. 4.3.). Für *aroF* lag der p-Wert mit 0,05332743 allerdings über dem Signifikanzniveau von 0,05. Die Funktionen von *yaiA* und *aroM* sind unbekannt. Die Genprodukte von *tyrA* (Chorismatmutase/Prephenat Dehydrogenase), *aroF* (3-Desoxy-D-Arabino-Heptulosonat-7-Phosphat-Synthase, DHAP-Synthase) und *aroL* (Shikimat Kinase II) sind an der Biosynthese der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan beteiligt [92]. Beide Operons werden von dem Transkriptionsregulator TyrR reguliert. *tyrR* zeigte in den Microarrays keine Veränderung der Expression zwischen Δ *rybA* und dem Wildtyp.

Nach *rybA* zeigte *ybiP* als einziges eine signifikante negative Regulation in Δ *rybA*. *ybiP* liegt auf dem Genom von *E. coli* K12 *antisense* neben *yliL* (Abb. 4.16) auf dem gleichen Strang wie RybA und codiert ein vorhergesagtes Protein von 527 AS. Die beobachtete Regulation von *ybiP* könnte somit im Zusammenhang mit der Regulation von *yliL* stehen.

Zudem wurden die Gene *cusC* und *cusF* für weitere Untersuchungen herangezogen. Der p-Wert, der eine Aussage über die Wahrscheinlichkeit der Regulation eines Gens trifft, lag bei beiden Genen über knapp über 0,05 (Tab. 4.3) und somit über dem Signifikanzniveau. Beide Gene gehören zu einem Operon, das außerdem noch die Gene *cusB* und *cusA* enthält. Während *cusC* und *cusF* ca. 2,5-fach stärker exprimiert waren, zeigten *cusB* und *cusA* nach den gewählten Kriterien keinen Unterschied zwischen Δ *rybA* und dem Wildtyp in der

Ergebnisse

Expression. *cusC* und *cusF* codieren für Proteine, die eine Rolle im Kupfer-/Silbertransport aus der Zelle in *E. coli* spielen [93].

Tab. 4.3: Signifikant^a regulierte Gene in *ΔrybA*.

Gen	Funktion	Bemerkung	Regulation ^b	p-Wert ^c
<i>Kan^R</i>	Kanamycin-Resistenz		719,11	0,00029013
<i>yliL</i>	unbekannt	Antisense <i>rybA</i>	5,03	0,00167406
<i>aroM</i>	unbekannt	<i>aroL</i> -Operon	2,81	0,00055648
<i>yaiA</i>	unbekannt	<i>aroL</i> -Operon	2,58	0,01146644
<i>ygaW</i>	unbekannt	Putatives Protein	2,51	0,00681525
IGR <i>yaiA</i> - <i>aroM</i>		<i>aroL</i> -Operon	2,43	0,00188642
<i>tyrA</i>	Chorismatmutase/Prephenat Dehydrogenase	<i>aroF</i> -Operon	2,19	0,0301386
<i>yaiA</i>	unbekannt	<i>aroL</i> -Operon	2,19	0,00867127
<i>aroF*</i>	DHAP-Synthase	<i>aroF</i> -Operon	2,11	0,05332743
<i>aroL</i>	Shikimat Kinase II	<i>aroL</i> -Operon	1,91	0,01354092
IGR <i>raiA</i> - <i>pheL</i>			1,83	0,00247977
<i>ybiP</i>	unbekannt	Nachbarn <i>yliL</i>	-2,03	0,0132384
<i>cusF*</i>	Kupfer- Silber-Bindeprotein	<i>cusC</i> -Operon	-2,45	0,053458385
<i>cusC*</i>	CusCFBA Kupfer/Silber Efflux System	<i>cusC</i> -Operon	-2,91	0,05570883
<i>rybA</i>			-114,56	0,00001755

^a Als signifikant reguliert wurden Gene betrachtet, die im Vergleich zum WT und zu *ΔHB_428* mindestens einen Unterschied in der SLR von 0,8 und einen p-Wert unter 0,05 aufwiesen.

^b Der Regulierungsfaktor wurde aus den SLR-Werten gemäß $SLR \geq 0$ durch die Formeln 2^{SLR} (hochregulierte Gene und für $SLR < 0$ durch 2^{-SLR} berechnet (herunterregulierte Gene). Eine SLR von 0,8 entspricht einer 1,74 fachen Regulation.

^c Wahrscheinlichkeit, mit der die beobachtete Regulation der Expression zufällig ist.

* Gene, die nach einem der 3 Kriterien als nicht signifikant eingestuft wurden, aber trotzdem für weitere Analysen verwendet wurden.

In Tab. 4.4 sind die möglichen Targets für HB_428 aufgelistet. In ΔHB_428 konnte ebenso wie in $\Delta rybA$ die Expression des Kanamycin-Resistenzgens beobachtet werden (Tab. 4.4). Bei HB_428 handelte es sich um eine vorhergesagte sRNA, welche nicht im Genom von *E. coli* annotiert ist. Daher gab es auch keine direkten Oligonucleotid-Sonden für HB_428 auf den Microarray-Chips. Es konnte aber eine 2,77-fach schwächere Expression der intergenischen Region zwischen *ygaM* und *nrdH*, in der HB_428 liegt, beobachtet werden (Tab. 4.4). Für weitere Analysen wurden sechs Gene ausgewählt, die in ΔHB_428 im Vergleich zum Wildtyp eine schwächere Expression aufwiesen und ein Gen, das eine stärkere Expression zeigten. Die schwächer exprimierten Gene spielen dabei eine Rolle bei der Schwefelaufnahme in *E. coli*. Zum einen handelte es sich um zwei Gene des *tauABCD*-Operons, *tauA* und *tauB*, wobei der p-Wert von *tauA* über dem Signifikanz-Niveau von 0,05 lag. Beide Gene codieren für Untereinheiten des Taurin-ABC-Transporters, der wahrscheinlich für die Aufnahme von Taurin in *E. coli* verantwortlich ist. Taurin wird bei Mangel an anorganischem Schwefel von *E. coli* als Schwefelquelle genutzt [94]. Die weiteren Mitglieder des Operons *tauC* und *tauD* waren in ΔHB_428 nicht signifikant reguliert. Die Transkription des *TauABC*-Operons wird von dem Transkriptionsfaktor Cbl unter Sulfat-Mangel aktiviert [95]. *cbl* ist im Vergleich zum Wildtyp in ΔHB_428 ca. 3,5-fach schwächer exprimiert. Dies legte die Vermutung nahe, dass es sich bei *cbl* um ein direktes Target von HB_428 handeln könnte und *tauA* und *tauB* sekundäre Targets sein könnten.

Die Gene *cysW*, *cysP* (p-Wert über dem Signifikanzniveau von 0,05) und *sbp* codieren für Untereinheiten des Thiosulfat-ABC-Transporters, der für die Aufnahme von Sulfat bzw. Thiosulfat aus dem Periplasma ins Cytosol verantwortlich ist [96]. In ΔHB_428 sind die Gene bis zu 2,8-fach schwächer exprimiert. *cysW* und *cysP* gehören zu dem *CysPTWAM*-Operon in *E. coli*. Die anderen Mitglieder des Operons *cysT*, *cysA* und *cysM* waren nicht signifikant reguliert in ΔHB_428 .

Bei dem stärker exprimierten Gen, das ausgewählt wurde, handelte es sich um *oxyR*, das einen Transkriptionsregulator codiert. OxyR reguliert die Expression von Genen, die bei der Antwort auf Peroxid-Stress eine wichtige Rolle spielen [97]. *oxyR* war in ΔHB_428 (2,5-fach) und in $\Delta rybA$ (2-fach) stärker exprimiert als im Wildtyp. *oxyR* wurde ausgewählt, um zu überprüfen, ob es sich bei den ähnlich regulierten Genen in ΔHB_428 und $\Delta rybA$ um einen Nebeneffekt handelte, der durch die Kultivierung hervorgerufen wurde.

Tab. 4.4: Signifikant^a regulierte Gene in *ΔHB_428*

Gen	Funktion	Bemerkung	Regulation ^b	p-Wert ^c
<i>Kan^R</i>	Kanamycin-Resistenz		803,41	0,00028934
<i>mdtJ</i>	Untereinheit des SMR Spermidin-Transporters		2,53	0,02964774
<i>puuP</i>	Glutamat-Putrescin Ligase		1,99	0,045348
<i>puuD</i>	γ-Glutamyl-γ-Aminobutyrat Hydrolase		1,95	0,03468808
<i>oxyR*</i>	Transkriptions-Regulator	Reguliert oxidative Stress Antwort	2,25	0,00714909
<i>tauB</i>	Untereinheit des Taurin-ABC-Transporter	tauABC-Operon	-1,8	0,045871984
<i>cysW</i>	Untereinheit des Thiosulfat-ABC-Transporters	cysPUWAM-Operon	-1,92	0,04209413
<i>iraD</i>	σ ^S Proteolyse Inhibitor		-2,11	0,04822493
<i>tauA*</i>	Untereinheit des Taurin-ABC-Transporter	tauABC-Operon	-2,31	0,06578603
<i>cysP*</i>	Untereinheit des Thiosulfat-ABC-Transporters	cysPUWAM-Operon	-2,19	0,07057962
<i>Z5924</i>	unbekannt	Putatives Protein	-2,64	0,01363283
<i>HB_428 (IGR ygaM-nrdH)</i>			-2,77	0,015095552
<i>sbp</i>	Untereinheit des Thiosulfat-ABC-Transporters		-2,77	0,01204323
<i>cbl</i>	Transkriptions-Aktivator	Reguliert tauABC-Operon	-3,46	0,035306547

^a Als signifikant reguliert wurden Gene betrachtet, die im Vergleich zum WT und zu *ΔrybA* mindestens einen Unterschied in der SLR von 0,8 und einen p-Wert unter 0,05 aufwiesen.

^b Der Regulierungsfaktor wurde aus den SLR-Werten gemäß $SLR \geq 0$ durch die Formeln 2^{SLR} (hochregulierte Gene und für $SLR < 0$ durch 2^{-SLR} berechnet (herunterregulierte Gene). Eine SLR von 0,8 entspricht einer 1,74 fachen Regulation.

^c Wahrscheinlichkeit, mit der die beobachtete Regulation der Expression zufällig ist.

* Gene, die nach einem der 3 Kriterien als nicht signifikant eingestuft wurden, aber trotzdem für weitere Analysen verwendet wurden.

4.3 Verifizierung der Microarray-Ergebnisse mittels Northern-Blot

Um die Microarray-Ergebnisse zu validieren, wurde eine zweite Methode zur Untersuchung potentieller Targets von RybA und HB_428 angewendet. Mittels Northern-Blot-Analysen (3.1.8) sollte die Regulation der möglichen Target-Gene zwischen dem Wildtyp und der KO-Mutanten bestätigt werden. Dafür wurden zunächst je 10 µg der Total-RNA aus *E. coli* K12 WT, Δ rybA und Δ HB_428, die auch für die Microarrays eingesetzt wurde, verwendet. Nach dem Blotten wurden die Membranen mit radioaktiv markierten, genspezifischen Sonden hybridisiert. Die Sonden wurden, wenn nicht anders erwähnt, für alle Targets mittels *random priming* unter Verwendung eines ca. 500 bp langen, genspezifischen DNA-Templat und [α -³²P]-dCTP radioaktiv markiert (3.3.7).

4.3.1 Analyse möglicher HB_428 Targets

Vier Gene, die in Δ HB_428 herunterreguliert waren (*cbl*, *tauA*, *tauB* und *cysP*) und ein Gen, das verstärkt exprimiert wurde (*oxyR*), wurden mittels Northern-Blot untersucht. *CysP* wurde dabei stellvertretend für die Regulation von *cysP* und *cysW* gewählt, da beide Gene in einem Operon liegen. Für drei Gene konnten die Microarray Ergebnisse bestätigt werden. In Abb. 4.21 ist für *cbl* und *cysP* eine deutliche Abnahme der Bandintensität in Δ HB_428 zu beobachten. Parallel dazu ist für *oxyR* eine deutliche Zunahme sichtbar. Hingegen konnte für *tauA* und *tauB* kein Unterschied zwischen dem WT und der KO-Mutante beobachtet werden, was die Microarray Ergebnisse widerlegte.

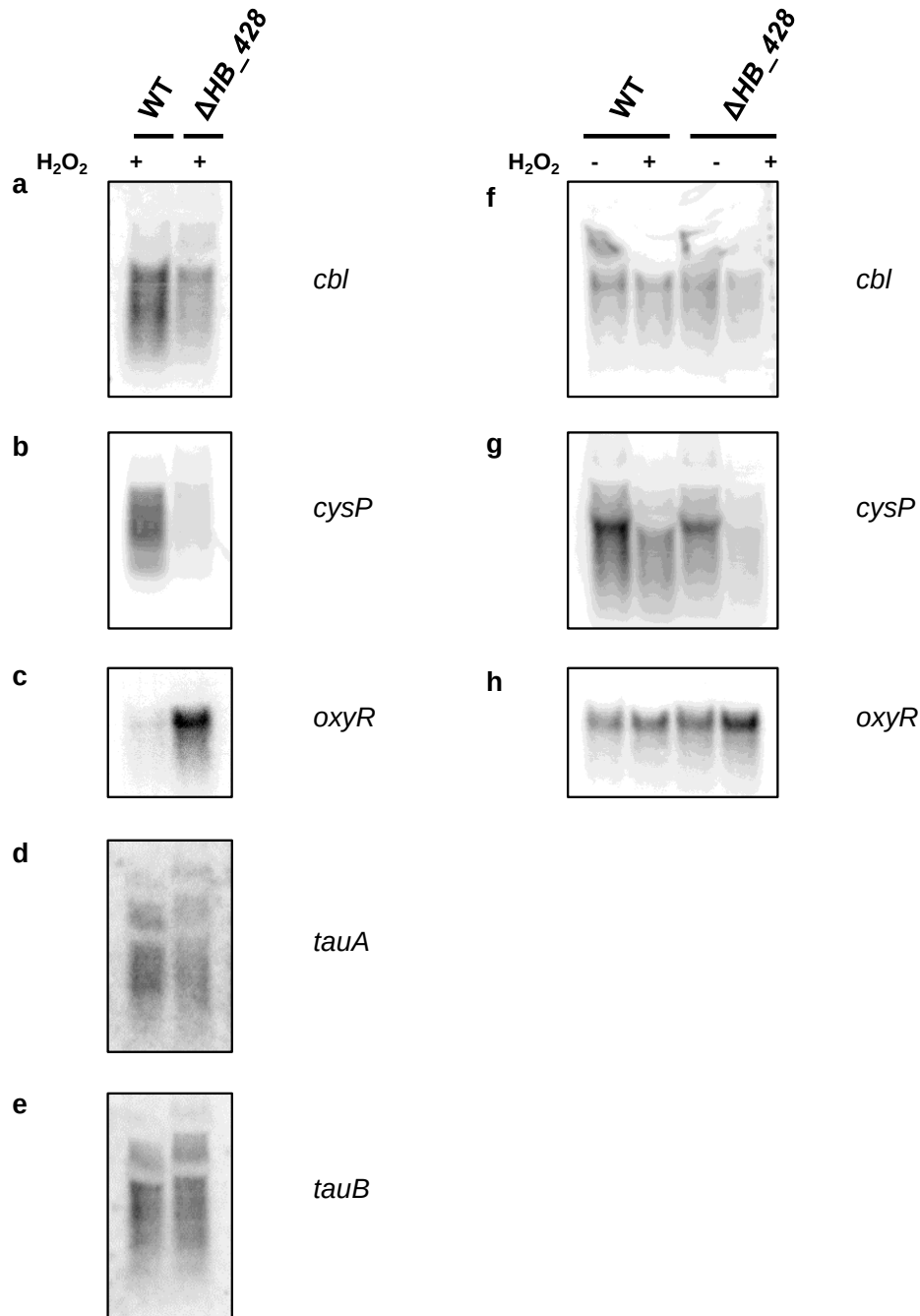


Abb. 4.21: Analyse putativer HB₄₂₈ Targets mittels Northern-Blot. *E. coli* K12 WT- und ΔHB_{428} -Zellen wurden mit und ohne Peroxid-Stress (+/- H₂O₂) in MOPS Minimalmedium kultiviert und die Total-RNA isoliert. Die Expression der mittels Microarray identifizierten Target-Gene (**a-h**) wurde mittels Northern-Blot untersucht. Die Hybridisierung erfolgte mit genspezifischen, radioaktiv markierten Sonden (3.3.7). Links: Total-RNA aus Microarray-Analysen. Rechts: Verifizierung der Ergebnisse mit neu präparierter Total-RNA.

Eine Wiederholung des Experiments mit neu präparierter Total-RNA aus *E. coli* K12 WT- und ΔHB_{428} -Zellen unter Peroxid-Stress und stressfreien Bedingungen konnte die Regulation von *cbl*, *cysP* und *oxyR* jedoch nicht bestätigen (Abb. 4.21 f bis h). Der Vergleich der Expression zwischen Peroxid-Stress und stressfreien Bedingungen im Wildtyp zeigte,

dass *cysP* unter Peroxid-Stress weniger stark exprimiert ist als unter stressfreien Bedingungen (Abb. 4.21 f) und spricht daher für eine Regulation von *cysP* unter dieser Bedingung. Für *cbl* und *oxyR* konnte kein Unterschied in der Expression zwischen Peroxid-Stress und stressfreien Bedingungen in der Wiederholung des Experimentes beobachtet werden.

Die Expression von *tauA* in der neu präparierten RNA wurde stellvertretend für *tauB* auch untersucht. Wie schon in dem Northern-Blot mit der RNA aus den Microarray-Analysen konnte auch hier keine Veränderung der Expression zwischen dem Wildtyp und der KO-Mutante ΔHB_428 beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

4.3.2 Analyse möglicher RybA Targets

Für die experimentelle Validierung möglicher RybA Targets wurden zunächst die Targets *aroL*, *aroM*, *yaiA*, *tyrA*, *aroF*, *yliL*, *cusC* und *ybiP* ausgewählt und deren Expression analysiert. In allen Fällen konnte die positive oder negative Regulation der Microarray-Daten (Tab. 4.3) mittels Northern-Blot bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Um diese Ergebnisse zu verifizieren, wurde die Zellkultivierung und RNA-Isolierung unabhängig von den Microarray-Proben wiederholt und die Genexpression der Target-Gene mittels Northern-Blot untersucht (Abb. 4.22). Dabei wurde das *aroL*-Operon (*aroL-yaiA-aroM*) stellvertretend durch Hybridisierung mit der AroL-Sonde detektiert.

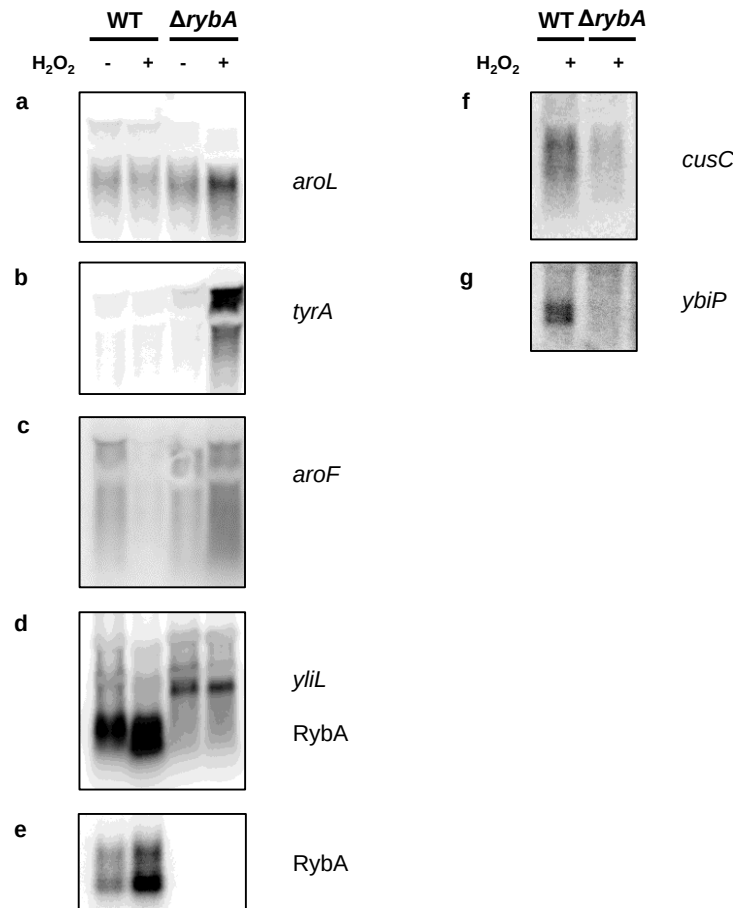


Abb. 4.22: Verifizierung der Microarray-Ergebnisse mittels Northern-Blot. *E. coli* K12 WT- und $\Delta rybA$ -Zellen wurden mit und ohne Peroxid-Stress kultiviert (+/- H_2O_2), Total-RNA isoliert und die Genexpression der mittels Microarray identifizierten Target-Gene (**a-g**) mittels Northern-Blot untersucht. Die Herstellung der radioaktiven Sonden erfolgte bis auf e mittels *random priming* (3.3.7). Die Hybridisierung erfolgte mit den unter a-g angebenen Sonden. Bei d wurde die Sonde mittels *random priming* hergestellt und detektiert RybA und die *yliL*-mRNA (siehe Text). In e wurde RybA mit einer 5'-markierten Oligonucleotid-Sonde (KG5, Tab. 2.6, 3.3.6) detektiert.

Es konnte in dem Microarray-unabhängigen Experiment bestätigt werden, dass die Expression des *aroL*-Operon und des *aroF*-Operon (*aroF-tyrA*) in der KO-Mutante $\Delta rybA$ unter Peroxid-Stress im Vergleich zum Wildtyp hochreguliert war (Abb. 4.22 a-c). Die schwächere Expression von *cusC* und *ybiP* in $\Delta rybA$ konnte ebenfalls bestätigt werden (Abb. 4.22 f und g). Bei *yliL* handelt es sich um das Gen, das auf dem gegenüberliegenden Strang von *rybA* liegt und mit dessen Sequenz überlappt. Mit einer Oligonucleotid-Sonde konnte die *yliL* mRNA nicht nachgewiesen werden. Daher wurde eine Sonde mittels *random priming* hergestellt. Zur Herstellung dieser Sonde wurde ein PCR-Produkt als Templat verwendet, dessen Sequenz dem ORF von *yliL* entsprach. Mit dieser Sonde wurde durch den großen Überlappungsbereich auch gleichzeitig die sRNA RybA nachgewiesen. Abb. 4.22 d und e

lassen erkennen, dass *rybA* im Wildtyp exprimiert wurde, jedoch nicht in der KO-Mutante $\Delta rybA$. In Abb. 4.21 d konnte die verstärkte Expression von *yliL* in $\Delta rybA$ unter Peroxid-Stress und stressfreien Bedingungen nachgewiesen werden und die Microarray-Ergebnisse bestätigt werden. In *E. coli* K12 Wildtyp Zellen konnte die *yliL* mRNA nicht detektiert werden. Die Ergebnisse der Microarrays und die Validierung mittels Northern-Blot der Regulation der Genexpression von *yliL* unterstützten die Vermutung, dass es sich bei RybA um eine *cis*-codierte antisense RNA handelt, deren Target *yliL* ist. Dabei schien das Fehlen von RybA unabhängig von der Wachstumsbedingung ausschlaggebend für die verstärkte Expression von *yliL* zu sein.

Der Vergleich der Expression des *aroL*- und *aroF*-Operons im Wildtyp unter Peroxid-Stress und stressfreien Bedingungen zeigte eine leichte Abnahme des mRNA-Levels unter Peroxid-Stress (Abb. 4.22 a-c). In der KO-Mutante $\Delta rybA$ unter stressfreien Bedingungen veränderte sich das Expressionslevel von *aroL* und *aroF* im Vergleich zum Wildtyp kaum. Die erhöhte Expression in $\Delta rybA$ unter Peroxid-Stress deutete daher stark auf eine essentielle Rolle von RybA in der Regulation von des *aroL*- und *aroF*-Operons unter dieser Bedingung. Daraus ergab sich die Frage, ob *aroL*, *aroF*, *cusC* und *ybiP* direkte Targets von RybA sein könnten oder ob die Regulation der Expression über *yliL* als primäres Target von RybA verläuft.

4.4 Charakterisierung der RybA-*yliL* mRNA Interaktionen

Um der Frage nachzugehen, ob es sich bei RybA um eine *cis*-codierte antisense RNA mit *yliL* als Target handelt, wurde die direkte Interaktion der sRNA und der *yliL* mRNA untersucht. Es wurde ein Zwei-Plasmid-System angewendet, bei dem *yliL* von einem *low-copy* Plasmid exprimiert wurde und *rybA* von dem *high-copy* Plasmid pRybA (4.1.3). Dadurch sollte überprüft werden, ob RybA einen direkten Einfluss auf die *yliL* mRNA-Konzentration hat, wenn es in *trans* dazugegeben wird. Als Ausgangsplasmid für die Klonierung von *yliL* diente pXG10 (Tab. 2.5). Für die Expression wurden verschiedene Konstrukte hergestellt (Abb. 4.23 A). pYliL₁ (pKG12, Tab. 2.5) enthielt die den ORF von YliL und die Sequenz für RybA. *yliL* stand unter der Kontrolle des konstitutiven P_{LtetO-1} Promotors. RybA war auf dem gegenüberliegenden Strang codiert und die Sequenz umfasste auch die gefundenen putativen Promotorelemente (4.1.4). Daher sollten *yliL* und *rybA* gleichzeitig von pYliL₁ exprimiert werden. Die Sequenzen für *yliL/rybA* wurden mittels Kolonie-PCR unter Verwendung der Oligonucleotide KG44/KG45 aus dem Genom von *E. coli* K12 WT amplifiziert (3.3.1). Die

Klonierung der Sequenz in pXG10 erfolgte durch die Spaltung von PCR-Produkt und Plasmid mit den Restriktionsenzymen KpnI und XbaI (3.6.1) und anschließender Ligation (3.6.2). Das erhaltene Konstrukt pYliL₁ wurde durch Sequenzierung überprüft (3.3.4). Die Konstrukte pYliL₂ und pYliL₃ (pKG14 und pKG15, Tab. 2.5) stellten am 3'-Ende von *yliL* verkürzte Versionen von pYliL₁ dar (Abb. 4.23 A). Der ORF blieb dabei intakt, verkürzt wurde nur die putative 3'UTR von *yliL*. Im Vergleich zu pYliL₁ fehlen in pYliL₂ 126 bp in der 3'UTR von *yliL* und bei pYliL₃ 173 bp. Das hatte zur Folge, dass in beiden Fällen das *rybA* Gen nicht mehr intakt war. In pYliL₂ fehlten durch die Verkürzung die -10 und -35 Promotorelemente und die ersten 6 Nucleotide von RybA. In pYliL₃ fehlten die ersten 54 Nucleotide von RybA. *rybA* sollte daher von beiden Plasmiden nicht exprimiert werden. Die Klonierung von pYliL₂ und pYliL₃ erfolgte analog zu der Klonierung von pYliL₁ (siehe oben). Für die Amplifikation der Sequenzen aus dem Genom von *E. coli* K12 WT wurden die Oligonucleotide KG44/KG46 (pYliL₂) und KG44/KG47 (pYliL₃) verwendet.

Gleichzeitig sollte der Einfluss des putativen -10 Element 5'-TATAAT-3' in der Promotorregion von RybA auf die Transkription von *rybA* untersucht werden. Dafür wurde die Sequenz in pYliL₁ über ortsspezifische Mutagenese (3.3.3) durch 6 Guanosinreste ersetzt. Der Austausch erfolgte über Amplifikation von pYliL₁ mit den Primern KG48/49 (Tab. 2.6), wobei KG48 die veränderten Nucleotide enthielt. Der Austausch des -10 Element gegen die Guanosinreste in pYliL_{mut} (pKG13, Tab. 2.5) wurde durch Sequenzierung überprüft.

Der KO-Stamm Δ *rybA* wurde mit den verschiedenen pYliL-Konstrukten allein oder mit pRybA co-transformiert (3.6.4). Die erhaltenen Transformanten wurden unter Peroxid-Stress kultiviert (3.7.3) und die Total-RNA isoliert (3.2.7). Die Analyse der Expression von *yliL* und *rybA* erfolgte mittels Northern-Blot (3.1.8).

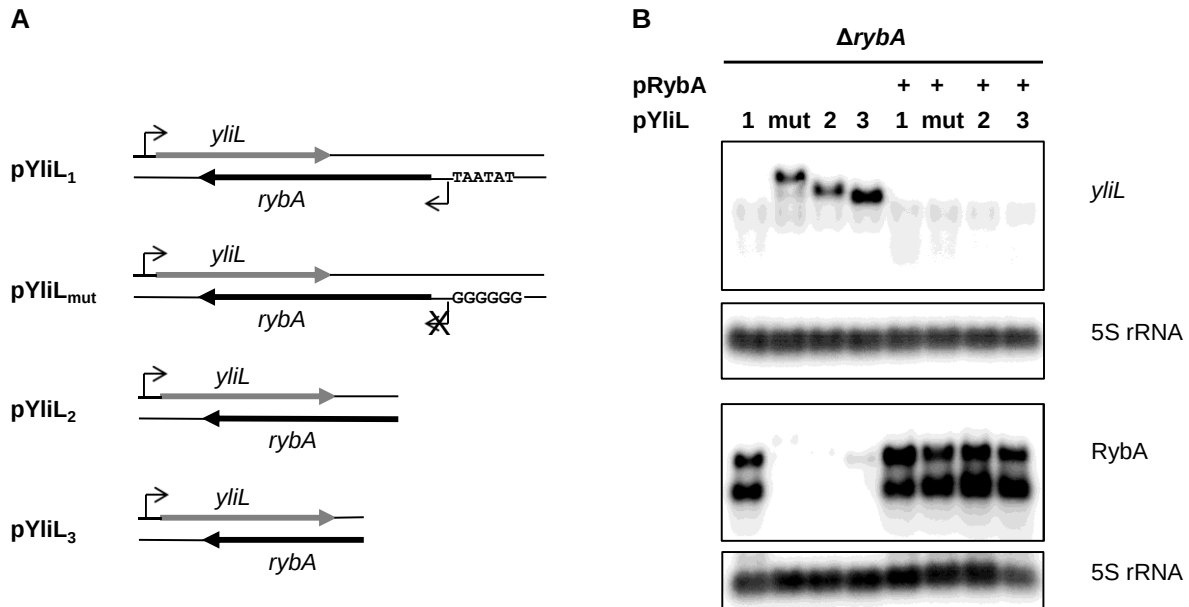


Abb. 4.23: Regulation der *yliL* mRNA-Stabilität durch die sRNA RybA. (A) Übersicht über die verwendeten pYliL-Konstrukte. (B) Die KO-Mutante $\Delta rybA$ wurde mit den verschiedenen pYliL-Konstrukten aus B transformiert und anschließend unter Peroxid-Stress kultiviert und die Total-RNA isoliert. Zusätzlich wurden jeweils Zellen mit pRybA co-transformiert. Die Detektion der *yliL* mRNA und RybA erfolgte über Northern-Blot mit anschließender Hybridisierung mit einer *yliL*- oder RybA-spezifischen (KG54 und KG5, Tab. 2.6), 5'-radioaktiv markierten Oligonucleotid-Sonde. Zur Kontrolle wurden die Membranen im Anschluss mit einer 5S rRNA Oligonucleotid-Sonde (KG11, Tab. 2.6) hybridisiert.

$\Delta rybA$ -Zellen, die pYliL₁ trugen, exprimierten *rybA*. Die Expression von *yliL* konnte jedoch nicht detektiert werden (Abb. 4.23 B). pYliL_{mut}, der das mutierte putative -10 Element im Promotor von *rybA* enthielt, (Abb. 4.23 A) zeigte hingegen keine Expression von *rybA*, dafür aber die Expression von *yliL*. Dies bestätigte zum einen die Relevanz des -10 Elements für die Transkription von RybA. Zum anderen zeigte es, dass *yliL* nur exprimiert wird wenn RybA abwesend ist. Die verkürzten Konstrukte pYliL₂ und pYliL₃ zeigten beide die Expression von *yliL*, nicht aber von *rybA*. Zudem schien die Verkürzung der putativen 3'UTR von *yliL* keinen Einfluss auf die Stabilität der mRNA zu haben. Dass es sich hierbei um die 3'UTR der *yliL* mRNA handelt, wird durch die Beobachtung gestützt, dass die verkürzten Konstrukte auch in einer Verkürzung der *yliL* mRNA resultierten. Würde es vor dem Bereich Terminationssequenzen geben, so wäre ein einheitliches Transkript zu erwarten gewesen.

Wurden $\Delta rybA$ -Zellen zusätzlich zu den pYliL-Konstrukten mit pRybA co-transformiert, konnte in keinem Fall eine Expression von *yliL* detektiert werden (Abb. 4.23 B). RybA reguliert die Expression also auch, wenn es in *trans* von einem anderen Plasmid transkribiert wurde. Basenpaarung zwischen der sRNA und der *yliL* mRNA könnte zum Abbau der mRNA

Ergebnisse

führen. Die Verkürzung der 3'UTR von *yliL* betraf weiterhin keine essentiellen Bindestellen von RybA, da die Regulation auch mit den verkürzten *yliL*-Transkripten zu beobachten war. Um die Sequenzabschnitte in der sRNA RybA zu identifizieren, die essentiell für die Bindung und Regulation der *yliL* mRNA sein könnten, wurde das 3'-Ende von RybA sukzessive verkürzt. Die Klonierung der vier trunkierten RybA-Versionen pRybA_{sh1-4} (Abb. 4.24 A) erfolgte analog zu der Klonierung von pRybA (4.1.3). Für die Amplifikation der Sequenz aus dem *E. coli* Genom über Kolonie-PCR wurden die Oligonucleotide KG3/KG50 (pRybA_{sh1}), KG3/KG1 (pRybA_{sh2}), KG3/KG52 (pRybA_{sh3}) und KG3/KG53 (pRybA_{sh4}) (Tab. 2.6) verwendet. Wie bei pRybA lag *rybA* unter der Kontrolle des nativen Promotors vor. Nach Überprüfung der Konstrukte durch Sequenzierung (3.3.4) wurden Δ *rybA*-Zellen mit pRybA_{sh1-4} und pRybA transformiert (3.6.4). Die Transformanten wurden unter Peroxid-Stress in MOPS Minimalmedium kultiviert, die Total-RNA isoliert und die Expression von *rybA* mittels Northern-Blot-Analysen untersucht (Abb. 4.24 B).

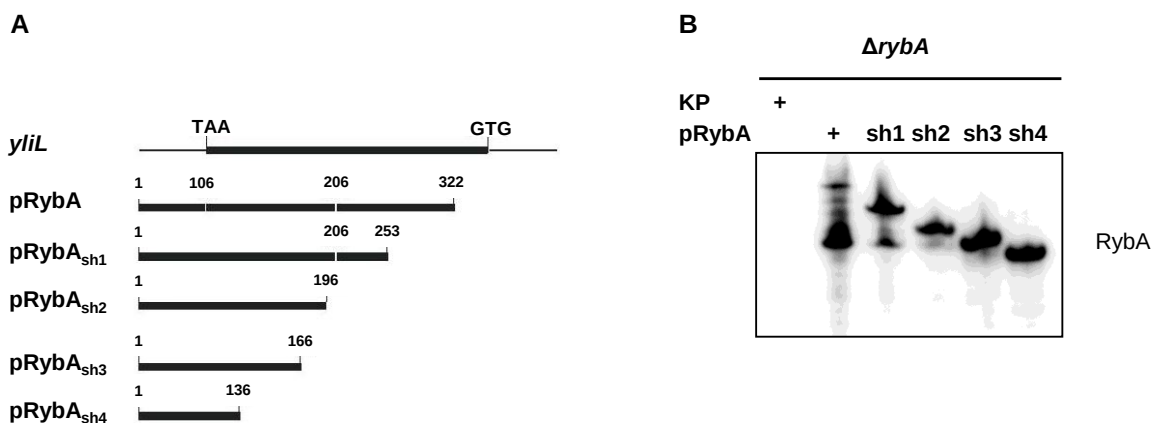


Abb. 4.24: Verkürzung des 3'-Endes von RybA. (A) Übersicht über die hergestellten, verkürzten RybA-Konstrukte. Zum Vergleich wurde der Überlappungsbereich der Konstrukte mit dem ORF und der 3'-UTR der *yliL* mRNA gezeigt. (B) Analyse der Expression der verkürzten RybA-Konstrukte in Δ *rybA* unter Peroxid-Stress mittels Northern-Blot. Die Detektion von RybA erfolgte durch Hybridisierung einer RybA-spezifischen, 5'-radioaktiv markierten Oligonucleotid-Sonde (KG5, Tab. 2.6). Zur Kontrolle wurden Δ *rybA*-Zellen mit dem Kontroll-Plasmid (KP) pKE01 transformiert.

Die Expression von *rybA* von pRybA zeigte das bekannte Bandenmuster mit der dominierenden 206 nt Form (Abb. 4.24 B). Die am 3'-Ende verkürzten RybA-Konstrukte (pRybA_{sh1-4}) zeigten ein abweichendes Bandenmuster. Die 206 nt Form von RybA war bei pRybA_{sh1} noch vorhanden, jedoch dominierte eine größere Spezies, die in Δ *rybA* +pRybA nicht vorhanden war. In Δ *rybA* +pRybA_{sh2} war die 206 nt Form kaum noch zu detektieren. Auch hier konnte eine größere dominante Spezies beobachtet werden, die allerdings kleiner

war als bei pRybA_{sh1}. Bei pRybA_{sh3} konnte eine im Vergleich zu der 206 nt Form etwas größere Bande beobachtet werden, pRybA_{sh4} zeigte eine etwas kleinere Spezies. In beiden Fällen wären kleinere Formen von RybA zu erwarten gewesen (166 nt und 136 nt, Abb. 4.24 A). Die Verkürzungen führten vermutlich zur Entfernung des nativen Terminators von RybA. Auf dem Ausgangsplasmid pSK17 ist 67 bp hinter der XbaI-Erkennungssequenz eine Terminatorsequenz lokalisiert, die die Transkription von davor klonierten Genen beendet. Daher könnte es sich bei den beiden Formen um die klonierte Sequenz von RybA und ein Stück Sequenz des Vektors bis zum Terminationssignal handeln. So würden sich für die verkürzten Konstrukte für RybA Längen von 263 nt (sh2), 233 nt (sh3) und 203 nt ergeben. Dies passt zu den im Northern-Blot beobachteten Formen von RybA.

Die Ergebnisse für pRybA_{sh1} und pRybA_{sh2} lassen vermuten, dass RybA nicht mehr korrekt in die natürlich vorkommende 206 nt Form prozessiert wird, da diese Form bei pRybA_{sh1} nur noch schwach auftritt, obwohl sich die Sequenz dafür noch in dem Konstrukt befindet (Abb. 4.24 A). In pRybA_{sh2} sollte die 206 nt Form nicht mehr auftreten, da die klonierte Sequenz für RybA nur 196 nt groß ist. Hier könnte auch die fehlende natürliche Terminatorsequenz für das Auftreten von größeren Spezies verantwortlich sein.

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss der Verkürzungen von RybA auf die Regulation von *yliL* untersucht. Dafür wurden Δ rybA-Zellen mit den verkürzten Konstrukten pRybA_{sh1-4} und pYliL_{mut} co-transformiert. Als Positivkontrolle wurde pRybA verwendet. Das Kontroll-Plasmid pKE01 (Tab. 2.5) wurde als Negativkontrolle verwendet. Die Zellen wurden unter Peroxid-Stress in MOPS Minimalmedium kultiviert, die Total-RNA isoliert und die Expression von *yliL* und *rybA* mittels Northern-Blot untersucht (Abb. 4.25). Alle vier verkürzten RybA Konstrukte führten zu einer Degradierung der *yliL* mRNA in Δ rybA-Zellen unter Peroxid-Stress. Die Co-Transformation mit dem Kontroll-Plasmid hingegen hatte keinen Einfluss auf die Expression von *yliL*. Die Größe der Degradierungsprodukte der *yliL* mRNA zeigte eine Abhängigkeit von der Länge der RybA-Spezies. Eine zunehmende Verkürzung von RybA führte zu längeren *yliL* mRNA-Abbauprodukten. Da auch eine Verkürzung des 3'-Endes der *yliL* mRNA keine Auswirkung auf die Regulation durch RybA hatte, scheint der Abbau der mRNA nicht abhängig von der Basenpaarung in diesem Bereich zu sein. Die Formation einer mRNA-sRNA-Duplex an sich könnte demnach ausreichend für ein anschließende Prozessierung/Degradierung sein.

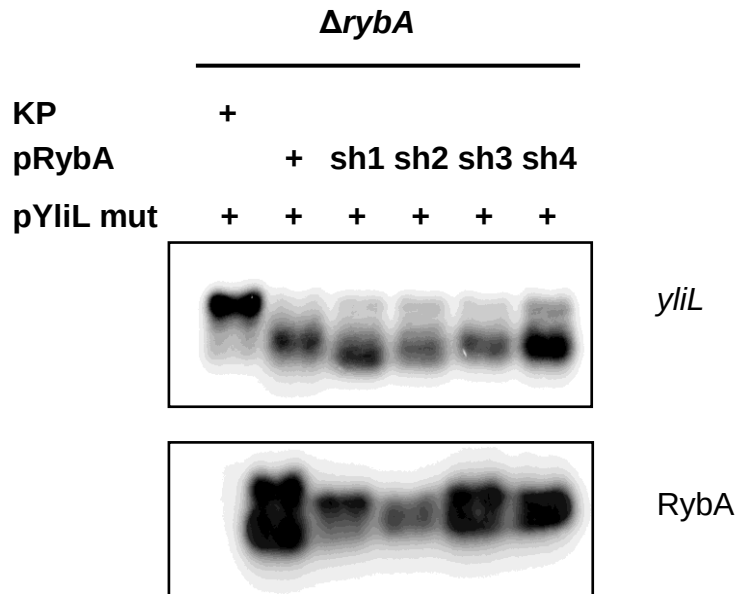


Abb. 4.25: Einfluss der verkürzten RybA-Konstrukte auf die Expression von *yliL*. $\Delta rybA$ -Zellen wurden jeweils mit den verkürzten RybA-Konstrukten pRybA_{sh1-4} und pYliL_{mut} co-transformiert und anschließend unter Peroxid-Stress kultiviert. Nach Isolierung der Total-RNA wurde die Expression von *rybA* und *yliL* mittels Northern-Blot-Analysen untersucht. Die Detektion erfolgte durch Hybridisierung mit einer *yliL*- (KG54, Tab. 2.6) oder RybA-spezifischen (KG5, Tab. 2.6), 5'-radioaktiv markierten Oligonucleotid-Sonde. KP: Kontroll-Plasmid.

Die veränderte Prozessierung von RybA bei Verkürzung des 3'-Endes führte zu der Vermutung, dass es sich bei *yliL* nicht um ein Target im klassischen Sinne handeln könnte, sondern eine „Prozessierungshilfe“ für RybA. Demnach würde die Duplexformation zu einer Prozessierung von RybA zu der 206 nt Form und zum Abbau der *yliL* mRNA führen. Wenn RybA wie in $\Delta rybA$ nicht exprimiert wird, wird auch die *yliL* mRNA nicht prozessiert und kann somit detektiert werden.

4.5 RybA und das TyrR Regulon

Nachdem gezeigt werden konnte, dass *yliL* als direktes Target von RybA reguliert wird, sollte die Rolle von RybA in der Regulation des *aroL*- und *aroF*-Operons untersucht werden. Es konnte durch die Microarray- und Northern-Blot-Analysen gezeigt werden, dass die Mitglieder des *aroL*-Operons (*aroL-yaiA-aroM*) und des *aroF*-Operons (*aroF-tyrA*) in der KO-Mutante $\Delta rybA$ unter Peroxid-Stress stärker exprimiert wurden als im Wildtyp (4.2 und 4.3.2). Beide Operons werden von dem Transkriptionsregulator TyrR reguliert, der keine Veränderung der Expression in $\Delta rybA$ im Vergleich zum Wildtyp aufwies. Die Genprodukte

von *aroF*, *aroL* und *tyrA* spielen eine wichtige Rolle in der Synthese der aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Phenylalanin und Tryptophan. Die Funktionen von *yaiA* und *aroM* sind unbekannt.

4.5.1 Einfluss von RybA auf die Expression des *aroF*- und *aroL*-Operon

Zunächst sollte untersucht werden, ob die in Δ *rybA* verstärkte Expression des *aroL*- und *aroF*-Operons tatsächlich durch die Deletion des *rybA* Gens verursacht wurde. Wäre RybA für die Regulation verantwortlich, sollte die Expression von *rybA* von einem Plasmid in Δ *rybA*-Zellen zu einer Reduktion der Expression der beiden Operons unter Peroxid-Stress führen. Δ *rybA*-Zellen wurden dafür mit dem Plasmid pRybA transformiert und unter Peroxid-Stress kultiviert, die Total-RNA isoliert und mittels Northern-Blot die Expression des *aroL*- und *aroF*-Operons untersucht. Als Kontrolle wurden Δ *rybA*-Zellen mit dem Kontroll-Plasmid transformiert, um Einflüsse des Plasmids auf die Expression der Operons auszuschließen. Die Detektion erfolgte durch Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden (3.3.7). Dabei wurde das *aroF*-Operon stellvertretend durch eine Sonde für *tyrA* und das *aroL*-Operon durch eine Sonde für *aroL* detektiert.

Δ *rybA*-Zellen, die das Plasmid pRybA trugen, zeigten eine deutliche Überexpression von RybA im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 4.26). *aroL* und *aroF* (*tyrA*) wiesen in der Überexpressionsmutante im Vergleich zu der KO-Mutante Δ *rybA* eine schwächere Expression auf. Für *aroF* konnte eine Reduktion der Expression beobachtet werden, die aber nicht den Level des Wildtyps erreichte. Die Expression des *aroL*-Operons ging auf den Level des Wildtyps zurück. Die Transformation von Δ *rybA* mit dem Kontroll-Plasmid zeigte, dass das Plasmid keine Auswirkungen auf die Expression von *aroL* bzw. *tyrA* hatte, da im Vergleich zu Δ *rybA*-Zellen kein Unterschied zu beobachten war.

Um zu überprüfen, ob die 206 nt Form von RybA ausreichend für die Regulation der beiden Operons ist, wurde *rybA* in pRybA verkürzt. Das Plasmid pRybA₂₀₆ (pKG31, Tab. 2.5) enthält die Promotorregion und 206 bp von *rybA*, die der unter Peroxid vorherrschenden Form entsprechen. Die Klonierung erfolgte analog zur Konstruktion von pRybA (s. 4.1.3) Für die Amplifikation der DNA-Sequenz von dem *E. coli* Genom wurden die Oligonucleotide KG3 und KG76 (Tab. 2.6) verwendet. Die Analyse der Expression des *aroL*- und *aroF*-Operons in Δ *rybA*-Zellen + pRybA₂₀₆ mittels Northern-Blot zeigte, dass die 206 nt Form von RybA,

Ergebnisse

ähnlich wie das vollständige Konstrukt (pRybA), den Effekt des Knock-outs kompensieren kann (Abb. 4.26).

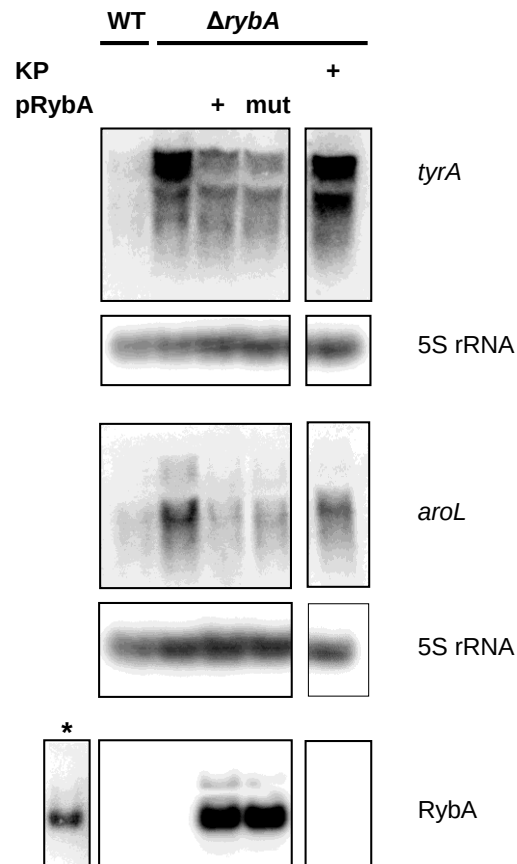


Abb. 4.26: Regulation der Expression des *aroL*- und *aroF*-Operons durch RybA. Δ *rybA*- Zellen wurden mit den angegebenen Plasmiden transformiert und in MOPS Minimalmedium unter Peroxid-Stress kultiviert. Nach Isolierung der Total-RNA erfolgte die Analyse der Genexpression mittels Northern-Blot. Die Detektion von *tyrA* und *aroL* erfolgte durch Hybridisierung mit über *random priming* hergestellten, radioaktiv markierten Sonden (3.3.7). RybA wurde über eine 5'-markierte Oligonucleotid-Sonde (KG5, Tab. 2.6) detektiert. *: Erhöhte Sensitivität der ersten Spur (WT). Zur Kontrolle wurden die Membranen im Anschluss mit einer 5'-markierten 5S rRNA Oligonucleotid-Sonde (KG11, Tab. 2.6) hybridisiert. KP: Kontroll-Plasmid.

Nach Bestimmung des 5'- und 3'-Ende der sRNA RybA wurde in der Sequenz ein ORF mit Shine-Dalgarno-Sequenz gefunden (4.1.5), aus dem ein 42 AS langes, putatives Protein resultieren könnte. Um auszuschließen, dass die Regulation der Operons durch das Protein hervorgerufen wurde, wurde das mögliche Startcodon (AUG) des ORFs in pRybA durch ein Stoppcodon (UGA) ersetzt. Die Mutation wurde über ortsspezifische Mutagenese (3.3.3) unter Verwendung der Oligonucleotide KG14/KG15, wobei KG14 die Mutation trug, eingefügt. Der Austausch wurde mittels Sequenzierung überprüft (3.3.4). Δ *rybA*-Zellen wurden mit dem entstandenen Plasmid pRybA_{mut} (pKG10, Tab. 2.5) transformiert und in MOPS Minimalmedium unter Peroxid-Stress kultiviert. Die Analyse der Expression von des *aroL*-

und *aroF*-Operons erfolgte wie oben für $\Delta rybA$ + pRybA beschrieben. Der Austausch des Startcodons hatte keine Auswirkung auf die Regulation von *aroL* bzw. *tyrA* (Abb. 4.26) durch RybA. In beiden Fällen konnte eine Reduktion des mRNA Levels durch Transformation von pRybA_{mut} vergleichbar zu der durch pRybA hervorgerufenen Reduktion beobachtet werden. Es konnte demnach ausgeschlossen werden, dass das putative Protein als Effektor agiert und bestätigt werden, dass die Regulation durch RybA als RNA erfolgte.

yliL wird als direktes Target von RybA auf mRNA-Ebene herunterreguliert (4.4). Um zu untersuchen, ob *yliL* eine Rolle bei der Regulation der Expression des *aroL*- und *aroF*-Operons spielt, wurde eine Doppelmutante hergestellt. Dabei wurden die Gene *rybA* und *yliL* auf dem Chromosom von *E. coli* durch eine Kanamycin-Resistenz-Kassette ersetzt. Der Knock-out wurde nach demselben Prinzip wie für $\Delta rybA$ durchgeführt (3.8, 4.1.2). Die Kanamycin-Resistenz-Kassette wurde von pKD13 (Tab. 2.5) mit den Oligonucleotiden KG12/KG2 (Tab. 2.6) amplifiziert. Die homologen Sequenzen für die Rekombination wurden dabei so gewählt, dass der ORF in *yliL* und *rybA* inklusive des -10 Elements durch die Kanamycin-Resistenz ausgetauscht wurden. Der Erfolg des Knock-outs wurde mittels Kolonie-PCR (3.3.1) mit den Oligonucleotiden KG26/KG27 (Tab. 2.6), das die ausgetauschte Sequenz flankierte, überprüft. Die KO-Mutante $\Delta(rybA-yliL)$ (SKG1001, Tab. 2.4) wurde zur Kontrolle in MOPS-Minimalmedium unter Peroxid-Stress kultiviert und die Expression von *yliL* und *rybA* nach Isolierung der Total-RNA mittels Northern-Blot untersucht. Weder RybA noch die *yliL* mRNA konnten in $\Delta(rybA-yliL)$ detektiert werden (Abb. 4.27).

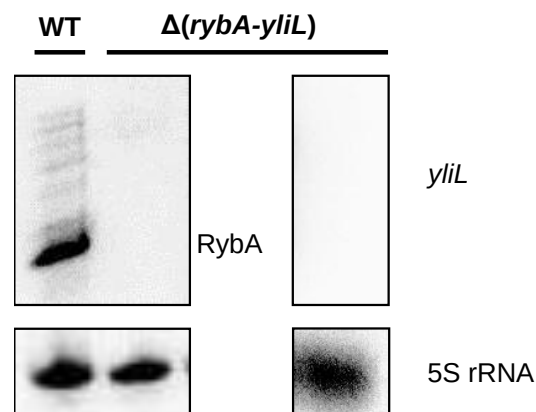


Abb. 4.27: Analyse der Doppelmutante $\Delta(rybA-yliL)$. Die Expression von *rybA* und *yliL* wurde in $\Delta(rybA-yliL)$ -Zellen, die unter Peroxid-Stress in MOPS-Minimalmedium kultiviert wurden, mittels Northern-Blot untersucht. Zum Vergleich wurde RNA aus *E. coli* K12 Wildtyp-Zellen ebenfalls analysiert. Die Detektion von RybA erfolgte durch Hybridisierung der Membran mit einer 5'-radioaktiv markierten Oligonucleotid-Sonde (KG5, Tab. 2.6). Für die Detektion der *yliL* mRNA wurde die Sonde mittels *random priming* hergestellt (3.3.7) und detektierte gleichzeitig RybA. Zur Kontrolle wurden die Membranen im Anschluss mit einer 5'-markierten 5S rRNA Oligonucleotid-Sonde (KG11, Tab. 2.6) hybridisiert.

Ergebnisse

Die Ergebnisse der Untersuchung der RybA-*yliL* mRNA Interaktion (4.4) ließen die Vermutung aufkommen, dass die *yliL* mRNA vielleicht eine „Prozessierungshilfe“ für RybA zu der 206 nt Form sein könnte. In $\Delta(\text{rybA-yliL})$ -Zellen sollte demnach RybA nicht mehr korrekt prozessiert werden, da *yliL* fehlt. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurden $\Delta(\text{rybA-yliL})$ - und ΔrybA -Zellen jeweils mit pRybA und der AUG-Mutante pRybA_{mut} transformiert (3.6.4) und unter Peroxid-Stress in MOPS Minimalmedium kultiviert.

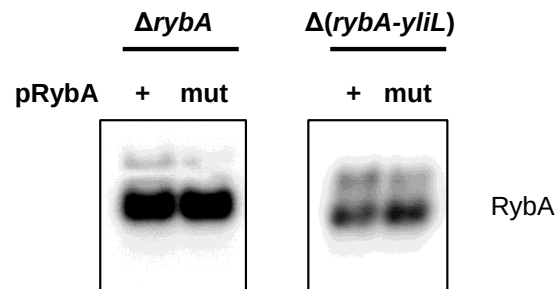


Abb. 4.28: Prozessierung von RybA in $\Delta(\text{rybA-yliL})$ und ΔrybA . Total-RNA aus $\Delta(\text{rybA-yliL})$ - und ΔrybA -Zellen + pRybA bzw. pRybA_{mut} unter Peroxid-Stress in MOPS-Minimalmedium wurde mittels Northern-Blot auf die Prozessierung von RybA untersucht. Die Detektion von RybA erfolgte durch Hybridisierung der Membran mit einer 5'-radioaktiv markierten Oligonucleotid-Sonde (KG5, Tab. 2.6).

Die Prozessierung von RybA wurde mittels Northern-Blot-Analysen der Total-RNA untersucht. Es zeigte sich, dass RybA und die AUG-Mutante RybA_{mut} in $\Delta(\text{rybA-yliL})$ im Verhältnis zu ΔrybA weniger stark zu der 206 nt Form prozessiert wurden (Abb. 4.28), was durch das Fehlen der *yliL* mRNA begründet sein könnte. Es konnte dennoch ein Anteil von RybA in der 206 nt Form beobachtet werden.

Um den Einfluss von *yliL* auf die Regulation des *aroL*- und *aroF*-Operons zu untersuchen wurde die Doppel-KO Mutante mit pRybA, pRybA_{mut} und zur Kontrolle mit dem Kontroll-Plasmid transformiert und unter Peroxid-Stress in MOPS Minimalmedium kultiviert. Die Expression der beiden Operons wurde mittels Northern Blot untersucht (Abb. 4.29).

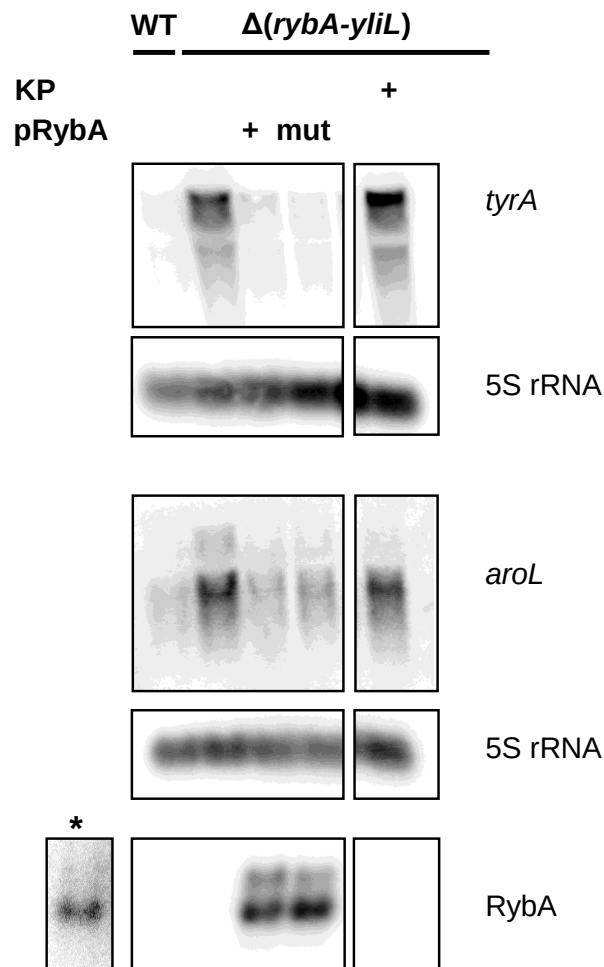


Abb. 4.29: Regulation der Expression des *aroL*- und *aroF*-Operons durch RybA in $\Delta(rybA-yliL)$ -Zellen. $\Delta(rybA-yliL)$ -Zellen wurden mit den angegebenen Plasmiden transformiert und in MOPS Minimalmedium unter Peroxid-Stress kultiviert. Nach Isolierung der Total-RNA erfolgte die Analyse der Genexpression mittels Northern-Blot. Die Detektion von *tyrA* und *aroL* erfolgte durch Hybridisierung von mittels *random priming* hergestellten, radioaktiv markierten Sonden (3.3.7). RybA wurde über eine 5'-markierte Oligonucleotid-Sonde (KG5, Tab. 2.6) detektiert. *: Erhöhte Sensitivität der ersten Spur (WT). Zur Kontrolle wurden die Membranen im Anschluss mit einer 5'-radioaktiv markierten 5S rRNA Oligonucleotid-Sonde (KG11, Tab. 2.6) hybridisiert. KP: Kontroll-Plasmid.

In $\Delta(rybA-yliL)$ ist analog zu $\Delta rybA$ (vergl. Abb. 4.26) eine Zunahme der Expression von *tyrA* und *aroL* zu beobachten. Der zusätzliche Knock-out von *yliL* schien keinen Einfluss auf die Expression der beiden Operons zu haben. Die Transformation der Doppelmutante mit pRybA und pRybA_{mut} verursachte wie schon in $\Delta rybA$ eine Reduktion des mRNA Levels von *tyrA* und *aroL* auf das Niveau des Wildtyps (Abb. 4.29 vergl. Abb. 4.26). Das Kontroll-Plasmid pKE01 hatte keinen Einfluss auf die Expression von *tyrA* und *aroL*. *yliL* schien in keiner Form eine Rolle in der Regulation des *aroL* und *aroF*-Operons zu spielen, diese war allein RybA-abhängig. Durch Hybridisierung mit der 5'-markierten RybA Sonde (KG5, Tab. 2.6)

Ergebnisse

konnte die Überexpression von *rybA* von pRybA und pRybA_{mut} nachgewiesen werden (Abb. 4.29).

Die Regulation von zwei weiteren möglichen Targets von RybA (*cusC* und *ybiP*) wurden ebenfalls auf die Abhängigkeit von RybA überprüft. Beide Gene zeigten in den Microarray- und Northern-Blot-Analysen (4.2 und 4.3.2) in Δ *rybA* eine schwächere Expression im Vergleich zum Wildtyp. Um Hinweise auf eine durch RybA vermittelte Regulation zu erhalten wurde die Expression von *cusC* und *ybiP* in Δ *rybA* + pRybA unter Peroxid-Stress untersucht (Abb. 4.30).

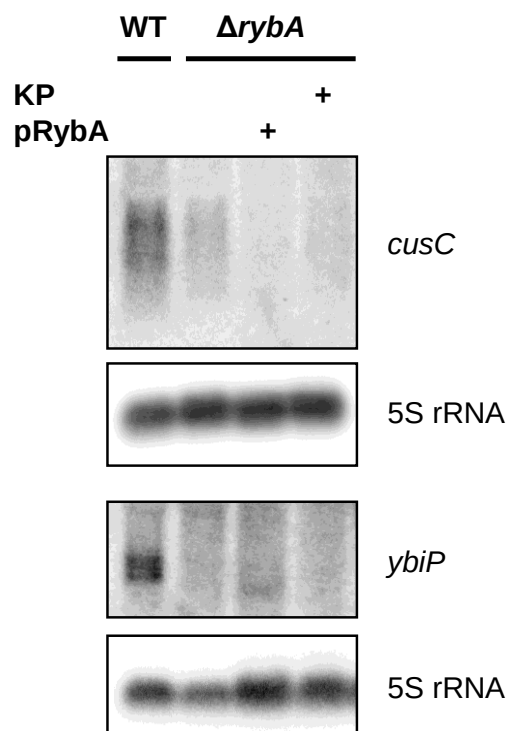


Abb. 4.30: Regulation der Expression von *cusC* und *ybiP* durch RybA. Δ *rybA*-Zellen wurden mit pRybA bzw. dem Kontroll-Plasmid (KP) transformiert und in MOPS Minimalmedium unter Peroxid-Stress kultiviert. Nach Isolierung der Total-RNA erfolgte die Analyse der Genexpression mittels Northern-Blot. Die Detektion erfolgte durch Hybridisierung mit genspezifischen, radioaktiv markierten Sonden (3.3.7) Zur Kontrolle wurden die Membranen im Anschluss mit einer 5'-markierten 5S RNA Oligonucleotid-Sonde (KG11, Tab. 2.6) hybridisiert.

In beiden Fällen bewirkte die Zugabe von RybA durch Expression in *trans* von pRybA keine Verstärkung der Expression auf das Niveau des Wildtyps. Wenn RybA einen direkten Einfluss auf die Expression von *cusC* und *ybiP* hätte, wäre zu erwarten gewesen, dass der Effekt der Deletion in Δ *rybA* durch pRybA wie bei dem *aroL*- und *aroF*-Operon wieder aufgehoben wird.

4.5.2 Vergleichende Analyse eines TyrR⁻ Stammes und der KO-Mutante Δ rybA

Es konnte gezeigt werden, dass RybA für die Regulation der Expression der *aroL*- und *aroF*-Operons unter Peroxid-Stress verantwortlich ist (4.3.2 und 4.5.1). Um die Frage nach dem Mechanismus der Regulation zu klären, wurde zunächst nach potentiellen Hybridisierungsstellen auf der mRNA der Operons für RybA gesucht. *Trans*-codierte antisense RNAs wirken, in dem sie meist unvollständige Basenpaarungen mit ihrer Target-mRNA eingehen und zur Inhibierung der Translation und/oder Abbau der mRNA führen. Eine Möglichkeit wäre demnach die direkte Interaktion von RybA mit der mRNA des *aroL*- und *aroF*-Operons und anschließende Degradierung. Mit dem Programm TargetRNA von *B. Tjaden et al.* [72] wurde versucht, mögliche Interaktionspartner von RybA zu finden. Nach Eingabe der Sequenz von RybA wurde das Genom von *E. coli* nach potentiellen Hybridisierungsmöglichkeiten der sRNA durchsucht. Mit dem Programm wurden keine Interaktionen zwischen RybA und einem der Gene der beiden Operons gefunden.

Die Expression des *aroL*- und *aroF*-Operons wird durch den Transkriptionsfaktor TyrR reguliert [98]. TyrR reguliert insgesamt 9 Transkriptionseinheiten, wobei es in 6 Fällen die Transkription inhibiert und in 3 Fällen Transkriptions-aktivierend wirkt. In einem Beispiel kann TyrR aktivierend oder inhibierend wirken. Bis auf eine Ausnahme sind alle Gene, die durch TyrR reguliert werden, an der Biosynthese oder dem Transport der aromatischen Aminosäuren Tyrosin, Tryptophan und Phenylalanin beteiligt [98]. Die Microarray-Daten zeigten nur eine veränderte Regulation des *aroL*- und *aroF*-Operons in Δ rybA. Die anderen Targets von TyrR wie auch *tyrR* selber waren nicht reguliert.

Um zu untersuchen, ob die Regulation des *aroL*- und *aroF*-Operons durch RybA über den Transkriptionsregulator TyrR verläuft, wurde zunächst die Expression der Gene in dem TyrR⁻-Stamm JP8042 (Tab. 2.4), einem *E. coli* K12 Derivat und der KO-Mutante Δ rybA verglichen. JP8042 trägt eine *frameshift* Mutation (*tyrR366*) in dem *tyrR* Gen. Die Deletion eines Guanosins in Codon 371 des ORFs führt zu einem vorzeitigen Translations-Abbruch neun Codons nach dem *frameshift*. *E. coli*-Stämme mit dieser Mutation bilden kein funktionelles TyrR-Protein [81].

JP8042 (im Folgenden als TyrR⁻-Stamm bezeichnet) und der dazugehörige Wildtyp-Stamm ohne Mutation im *tyrR* Gen JP7740 (Tab. 2.4, im Folgenden als TyrR⁺-Stamm bezeichnet) wurden unter Peroxid-Stress und ohne Stress in MOPS Minimalmedium kultiviert. Nach Isolierung der Total-RNA wurde die Expression der Operons am Beispiel von *tyrA* für das

Ergebnisse

aroF-Operon mittels Northern-Blot untersucht und mit der Expression in $\Delta rybA$ und dem dazugehörigen Wildtyp *E. coli* K12 WT verglichen.

In dem TyrR⁻-Stamm ist die Expression des *aroF*-Operons unter Peroxid-Stress und unter stressfreien Bedingungen im Vergleich zum TyrR⁺-Stamm stark erhöht (Abb. 4.31). Eine vergleichbare Erhöhung der Expression in $\Delta rybA$ im Vergleich zum *E. coli* K12 WT wurde unter Peroxid-Stress beobachtet. Der Knock-out von *rybA* hatte demnach den gleichen Einfluss auf die Expression des *aroF*-Operons unter Peroxid-Stress wie die *frameshift* Mutation in dem TyrR⁻-Stamm.

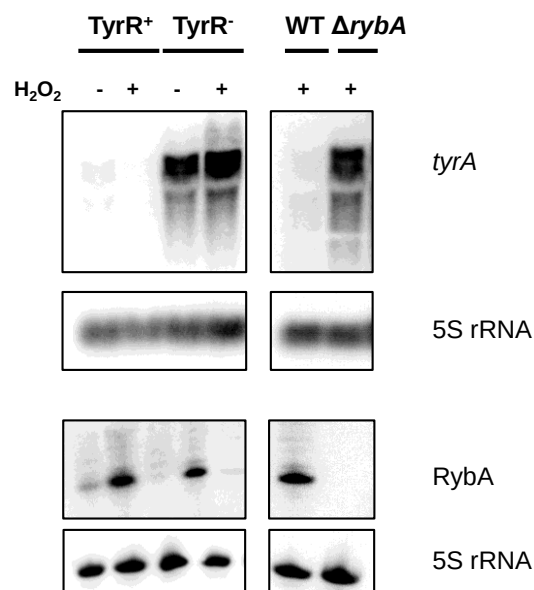


Abb. 4.31: Vergleich der Expression des *aroF*-Operons in TyrR⁻ und $\Delta rybA$. TyrR⁻, TyrR⁺, $\Delta rybA$ - und *E. coli* K12 WT-Zellen wurden in MOPS Minimalmedium unter Peroxid-Stress oder stressfreien Bedingungen (+/- H₂O₂) kultiviert und die Expression des *aroF*-Operons und *rybA* mittels Northern-Blot untersucht. Die Detektion der RNA erfolgte durch Hybridisierung mit einer radioaktiven, *tyrA*- (3.3.7), bzw. RybA-spezifischen Sonde (3.3.6, KG5, Tab. 2.6). Zur Kontrolle wurden die Membranen im Anschluss mit einer 5'-markierten 5S rRNA Oligonucleotid-Sonde (KG11, Tab. 2.6) hybridisiert.

Zudem konnte auch in dem TyrR⁺-Stamm, wie schon zuvor in *E. coli* K12 WT-Zellen (vergl. Abb. 4.22), eine Verringerung der Expression des *aroF*-Operons unter Peroxid-Stress im Vergleich zu stressfreien Bedingungen beobachtet werden. Dies spricht für eine Regulation der Biosynthese von aromatischen Aminosäuren unter Peroxid-Stress und dafür, dass RybA eine Rolle in dieser Regulation spielt.

Unter physiologischen Bedingungen liegt TyrR als Dimer vor und kann als solches an die Promotorregion einiger Zielgene binden und die Transkription aktivieren oder inhibieren. Dies ist für das *aroF*- und *aroL*-Operon der Fall. Die Anwesenheit von Tyrosin und ATP führt

Ergebnisse

zu einer Hexamerisierung des Proteins [99] und zu veränderten DNA-Bindeeigenschaften und verstärkt die Inhibierung der Transkription von *aroL* bzw. *aroF* [100]. TyrR kann prinzipiell mit allen drei aromatischen Aminosäuren interagieren. Die Anwesenheit von Phenylalanin löst zwar keine Hexamerisierung aus, es konnte aber gezeigt werden, dass die Expression von *aroF* und teilweise von *aroL* stärker inhibiert wurde. Um zu untersuchen, ob Tyrosin und Phenylalanin den gleichen Effekt auf die Expression von *aroL* bzw. *aroF* in Δ *rybA* Zellen hat, wurden die KO-Mutante und *E. coli* K12 WT-Zellen in MOPS Minimalmedium in Anwesenheit von 1 mM Phenylalanin oder 1 mM Tyrosin kultiviert. Zum Vergleich wurden Zellen in MOPS Minimalmedium ohne Stress und unter Peroxid-Stress kultiviert. Die Analyse der Expression des *aroL*-bzw. *aroF*-Operons erfolgte mittels Northern-Blot der isolierten Total-RNA.

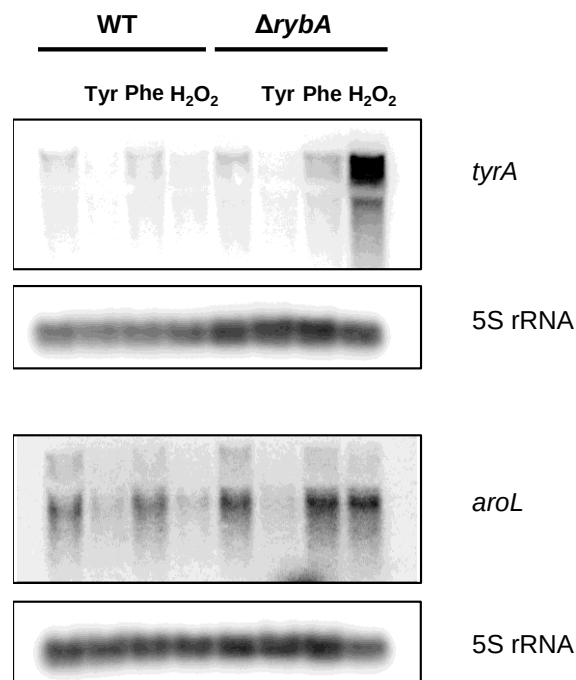


Abb. 4.32: Expression des *aroL*- und *aroF*-Operons in Anwesenheit von Tyrosin oder Phenylalanin. Δ *rybA*- und *E. coli* K12 WT-Zellen wurden in MOPS Minimalmedium ohne Stress, unter Peroxid-Stress (H_2O_2) oder in Gegenwart von 1 mM Tyrosin (Tyr) bzw. 1 mM Phenylalanin (Phe) kultiviert und die Expression des *aroL*- und *aroF*-Operons mittels Northern-Blot untersucht. Die Detektion der RNA erfolgte durch Hybridisierung mit einer radioaktiven, *aroL*- bzw. *tyrA*-spezifischen Sonde (3.3.7). Zur Kontrolle wurden die Membranen im Anschluss mit einer 5'-radioaktiv markierten 5S rRNA Oligonucleotid-Sonde (KG11, Tab. 2.6) hybridisiert.

In *E. coli* K12 WT-Zellen verursachte die Gegenwart von Tyrosin oder H_2O_2 eine Reduktion des mRNA-Levels des *aroF*- und *aroL*-Operons (Abb. 4.32). Phenylalanin hingegen hatte keinen Einfluss auf die Expression. In der KO-Mutante Δ *rybA* konnte der gleiche Effekt von

Ergebnisse

Tyrosin und Phenylalanin beobachtet werden. Nur unter Peroxid-Stress konnte eine Verstärkung der Expression verzeichnet werden. Die Tyrosin-vermittelte Inhibierung der Expression von *aroF* und *aroL* durch TyrR wurde durch den Knock-out von *rybA* nicht beeinträchtigt.

Um der Frage nachzugehen, ob die Regulation durch RybA unter Peroxid-Stress TyrR-abhängig ist, wurde im nächsten Schritt eine TyrR⁻/Δ*rybA* Doppelmutante (SKG1101, Tab. 2.4) konstruiert. Dafür wurde das *rybA*-Gen analog zu dem Einzel-Knock-out (3.8 und 4.1.2) in dem TyrR⁻-Stamm über homologe Rekombination durch eine Kanamycin-Resistenz ersetzt. Die anschließende Transformation von TyrR⁻/Δ*rybA* mit dem Plasmid pRybA (4.1.3) sollte zeigen, ob unter Peroxid-Stress die Expression von *aroL* bzw. *aroF* durch RybA TyrR-unabhängig herunterreguliert werden kann. Zur Kontrolle wurden TyrR⁻/Δ*rybA*-Zellen mit dem Kontroll-Plasmid pKE01 transformiert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in MOPS Minimalmedium unter Peroxid-Stress. Die Expression der Gene *tyrA* stellvertretend für das *aroF*-Operon und *aroL* für das *aroL*-Operon wurde nach RNA-Isolierung mittels Northern-Blot untersucht.

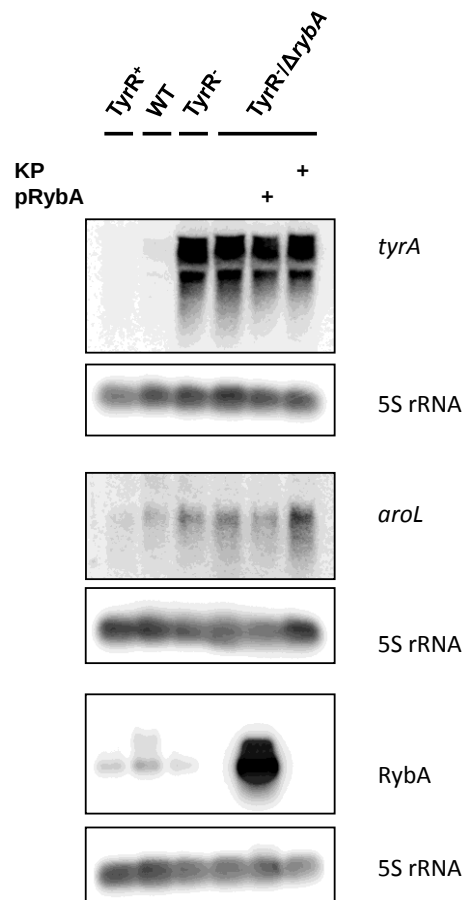


Abb. 4.33: Analyse der Expression des *aroL* und *aroF*-Operons in der Doppelmutante *TyrR*⁻/*ΔrybA*. *E. coli* K12 WT⁻, *TyrR*⁺-, *TyrR*⁻ und *TyrR*⁻/*ΔrybA*-Zellen wurden wenn angegeben mit den gezeigten Plasmiden transformiert. Die Kultivierung erfolgte in MOPS Minimalmedium unter Peroxid-Stress. Die Expression des *aroL*- und *aroF*-Operons wurde mittels Northern-Blot untersucht. Die Detektion der RNA erfolgte durch Hybridisierung mit einer radioaktiven *RybA*- Sonde (KG5, Tab. 2.6, 3.3.6,) und *aroL*- bzw. *tyrA*-spezifischen. Sonden (3.3.7). Zur Kontrolle wurden die Membranen im Anschluss mit einer 5'-radioaktiv markierten 5S rRNA Oligonucleotid-Sonde (KG11, Tab. 2.6) hybridisiert.

Der Erfolg der Deletion von *rybA* in dem *TyrR*⁻-Stamm wurde durch Hybridisierung mit einer 5'-radioaktiv markierten, *RybA*-spezifischen Sonde (KG5, Tab. 2.6) überprüft (Abb. 4.33). Die *TyrR*⁺-, *TyrR*⁻ und *E. coli* K12 WT-Stämme zeigten unter Peroxid-Stress eine Expression von *rybA*. In der Doppelmutante *TyrR*⁻/*ΔrybA* konnte *RybA* nicht nachgewiesen werden. *TyrR*⁻/*ΔrybA* wies ebenso wie die Einzelmутanten *ΔrybA* und *TyrR*⁻ unter Peroxid-Stress eine verstärkte Expression des *aroL*- und *aroF*-Operons auf (Abb. 4.33). Die Expression von *RybA* von dem Plasmid *pRybA* in der Doppelmutante hatte keinen Einfluss auf das Expressionslevel von *aroL* und *aroF*. Es ließ sich eine leichte Reduktion erkennen, die aber nicht das Niveau des *E. coli* K12 WT- oder *TyrR*⁺-Stammes erreicht. *RybA* alleine konnte die Expression von *aroL* und *aroF* unter Peroxid-Stress nicht regulieren. Zusätzlich

wurde auch TyrR benötigt. In $\Delta rybA$, in dem funktionelles TyrR gebildet wird, wurde durch Expression von RybA in *trans* von pRybA die Expression von *aroL* und *aroF* wieder auf das Niveau des Wildtyps gesenkt (Abb. 4.26). Zudem zeigte der TyrR⁻-Stamm keinen Unterschied in der Expression von *aroL* und *aroF* unter Peroxid-Stress und stressfreien Bedingungen (Abb. 4.31), was zu erwarten gewesen wäre, wenn RybA unabhängig von TyrR für die Regulation dieser Gene unter Peroxid-Stress verantwortlich wäre. Welche Rolle hat TyrR in der RybA vermittelten Inhibierung der Expression von *aroL* und *aroF* unter Peroxid-Stress? Auf mRNA Ebene konnte keine Regulation der Genexpression von TyrR beobachtet werden (4.2), so dass ausgeschlossen werden konnte, dass RybA auf dieser Ebene mit TyrR interagiert. Eine Möglichkeit wäre, dass RybA die Aktivität von TyrR auf Proteinebene durch direkte Interaktion beeinflusst, ähnlich wie es für Tyrosin gezeigt werden konnte [100].

4.5.3 Produktion und Reinigung des TyrR Proteins

Um einen möglichen Einfluss der sRNA RybA auf die Aktivität des TyrR Proteins zu überprüfen, wurde TyrR rekombinant in *E. coli* BL21 Star-Zellen produziert. Dafür wurde das *tyrR* Gen in das Plasmid pRSET-B (Tab. 2.5) kloniert. Die Amplifikation der Sequenz für *tyrR* erfolgte mit der Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (3.3.1), den Oligonucleotiden KG20/KG21 (Tab. 2.6) und genomischer DNA aus *E. coli* (3.2.8) als Templat. Das Plasmid pRSET-B und das erhaltene PCR-Produkt wurden mit dem Enzymen XhoI und HindIII gespalten (3.6.1) und anschließend ligiert (3.6.2). Das entstandene Konstrukt pTyrR (pKG02, Tab. 2.5) wurde durch Sequenzierung überprüft (3.3.4).

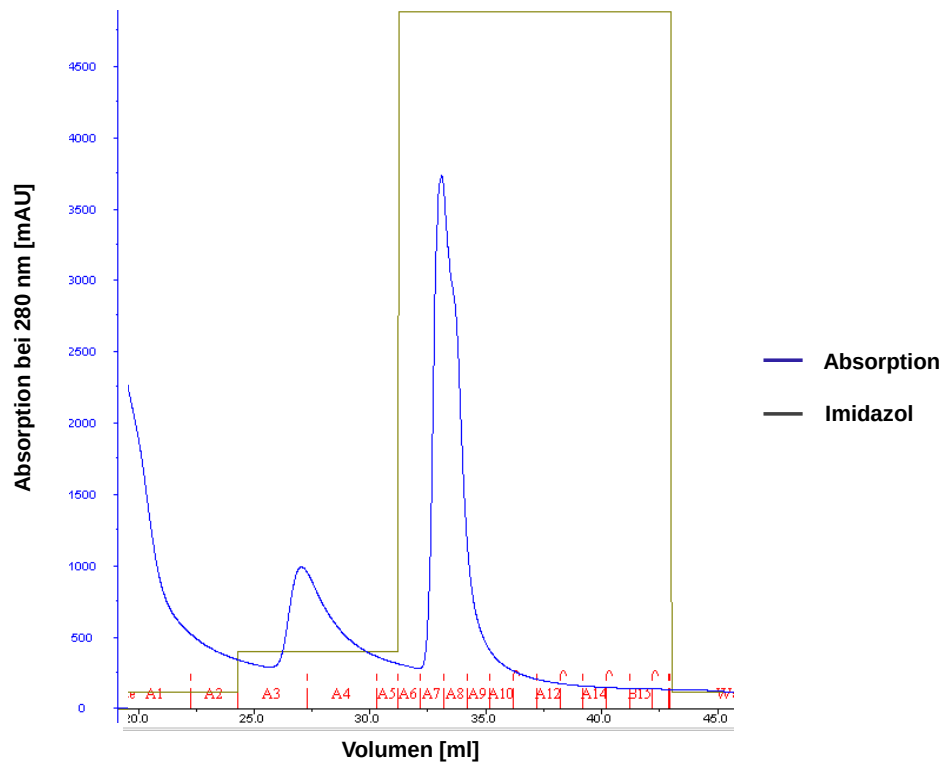


Abb. 4.34: Reinigung des TyrR Proteins mittels Nickel-Affinitätschromatographie. Das Zelllysate aus TyrR-produzierenden *E. coli* BL21-Zellen wurde auf eine His-TRAP Säule gegeben und mit Hilfe des ÄKTA *purifier* gereinigt. Nach dem Probenaufrag erfolgte ein Waschriss mit 50 mM Imidazol (Fraktionen A3-A6). Die Elution wurde mit einer Imidazol-Konzentration von 500 mM durchgeführt (Fraktionen A7-B15). Gezeigt ist das Elutionsprofil der His-TRAP Säule durch Imidazol. Blau: Absorption bei 280 nm, Grün: Imidazol-Konzentration, Rot: Fraktionen.

Nach Transformation von *E. coli* BL21 Star-Zellen mit pTyrR wurden die Zellen zur Proteinproduktion kultiviert (3.9.1). Durch die Klonierungsstrategie wurde das TyrR Protein mit einem N-terminalen 6x His-Tag produziert, das nach der Produktion und Lyse der Zellen zur Reinigung mittels Nickel-Affinitätschromatographie diente (3.9.2). Abb. 4.34 zeigt das Elutionsprofil der His-TRAP Säule durch Zugabe von Imidazol (3.9.2). Zunächst wurde ein Waschriss mit 50 mM Imidazol durchgeführt (Abb. 4.34, Fraktionen A3-A6), wobei ein kleiner Teil Protein von der Säule eluiert wurde. Die Elution erfolgte anschließend mit einer Imidazolkonzentration von 500 mM. Anhand der Absorption bei 280 nm konnte beobachtet werden, dass die gebundenen Proteine von der Säule wieder eluiert werden konnten (Abb. 4.34, Fraktionen A7-A9). Alle Fraktionen wurden aufgefangen und mittels SDS-PAGE (3.10.1) und anschließender Coomassie-Färbung (3.10.2) überprüft (Abb. 4.35).

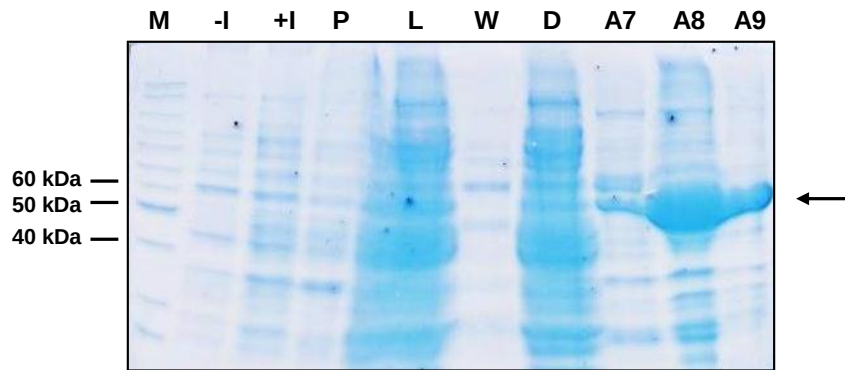
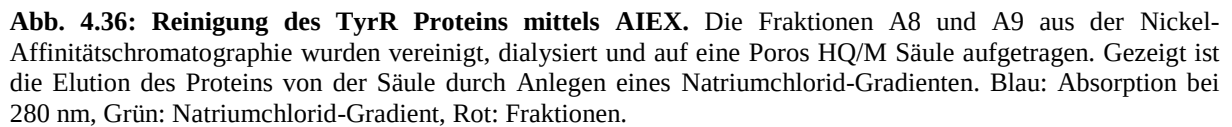
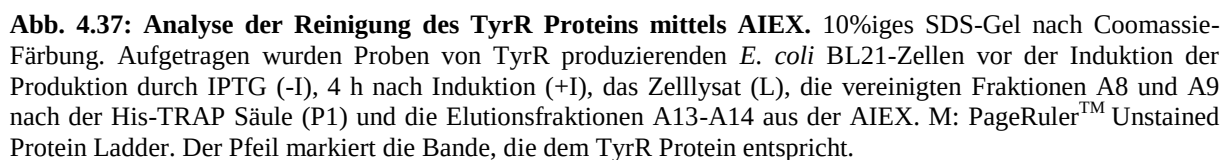


Abb. 4.35: Analyse der Produktion und Reinigung mittels Nickel-Affinitätschromatographie des TyrR Proteins. 10%iges SDS-PAA-Gel nach Coomassie-Färbung. Aufgetragen wurden Proben von TyrR produzierenden *E. coli* BL21-Zellen vor der Induktion der Produktion von TyrR durch IPTG (-I), 4 h nach Induktion (+I), das nach der Zellyse erhaltene Zellpellet (P), das Lysat (L), der Durchlauf der His-TRAP Säule nach dem Probenauftrag (D) und die Elutionsfraktionen A7-A9. M: PageRuler™ Unstained Protein Ladder. Der Pfeil markiert die Bande, die dem TyrR Protein entspricht.

Das aus der Nucleotidsequenz berechnete Molekulargewicht von TyrR beträgt 57,640 kDa [101]. In den Proben, die vor und nach der Induktion der TyrR Produktion in *E. coli* BL21 Star-Zellen genommen, wurden konnte keine Bande, die dieser Größe entspricht detektiert werden (Abb. 4.35, -I und +I). Auch im Lysat und in den nach der Lyse abgetrennten Zelltrümmern war keine dominierende Proteinbande dieser Größe nachzuweisen (Abb. 4.35, L und P). In den Elutionsfraktionen A7-A9 konnte eine starke Bande zwischen 50 und 60 kDa beobachtet werden, die darauf schließen ließ, dass es sich um das gereinigte TyrR Protein handelte. Der Vergleich des Lysats mit den Elutionsfraktionen (Abb. 4.35, L, A7-9) zeigte deutlich einen Reinigungseffekt. Es befanden sich jedoch noch Verunreinigungen in allen drei Elutionsfraktionen, so dass ein zweiter Reinigungsschritt in Form einer Anionenaustauschchromatographie (AIEX, 3.9.3) nötig war, um sauberes TyrR Protein zu erhalten. Dazu wurden die Fraktionen A8 und A9 vereinigt und dialysiert. Vor dem Auftragen auf eine Poros HQ/M Säule wurde die Probe zentrifugiert, um nach der Dialyse ausgefallenes Protein abzutrennen. Nach dem Probenauftrag wurde die Säule gewaschen. Die Elution des Proteins erfolgte in zwei Schritten durch eine kontinuierlich steigende Natriumchlorid-Konzentration bis zu einer Endkonzentration von 1 M (Abb. 4.36).



M -I +I L P1 A13 A14 A15 B15



Fraktionen nach der His-TRAP Säule (Abb. 4.37, P1) mit den Elutionsfraktionen aus der AIEX zeigte, dass der Reinigungsschritt erfolgreich war und nicht zu einem großen Protein-Verlust geführt hat. Die Elutionsfraktionen A14, A15 und B15 wurden vereinigt und die Proteinkonzentration mittels Bradford-Test bestimmt (3.10.3). Die Proteinkonzentration betrug 1,085 mg Protein/ml bei einem Gesamtvolumen von 6 ml. Die Bestätigung, dass es sich bei dem gereinigten Protein tatsächlich um TyrR handelt, wurde über Bindungsstudien mit der Promotor-DNA von *aroF* nachgewiesen (4.5.4).

4.5.4 Gel shift-Assays zur Analyse der TyrR-RybA Interaktion

Der Transkriptionsregulator TyrR bindet in der Promotorregion seiner Zielgene an Erkennungsstellen mit der Konsensussequenz TGTAAN₆TTTACA [98]. Die meisten Zielgene haben zwei oder mehr dieser sogenannten TyrR-Boxen. Dabei werden die TyrR-Boxen in „schwache“ oder „starke“ Boxen eingeteilt. „Schwache“ Boxen werden von TyrR *in vitro* nur in Gegenwart von Tyrosin gebunden, wohingegen die Bindung von TyrR an „starke“ Boxen keine Cofaktoren benötigt [100]. Bei der Analyse der Promotorregion von *rybA* wurde eine der TyrR-Boxen ähnliche Sequenz gefunden (Abb. 4.38), was auf eine mögliche Regulation der Expression von *rybA* durch TyrR hinweisen könnte.

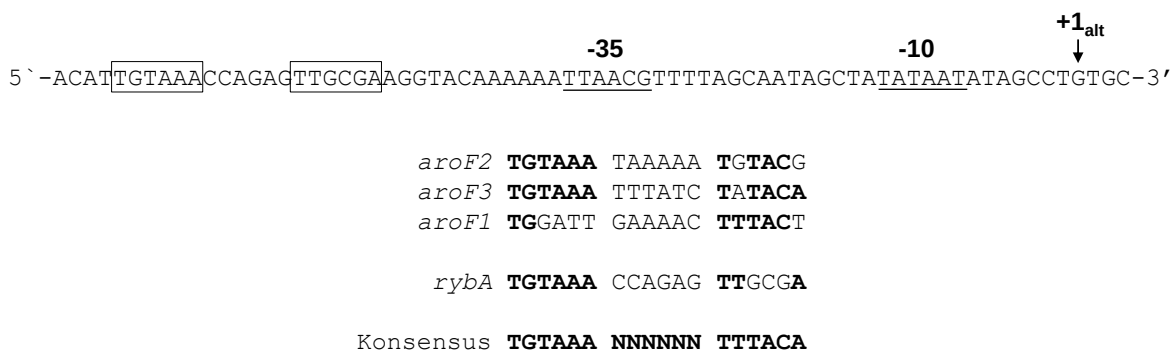


Abb. 4.38: Sequenzen von TyrR-Boxen. Oben: Lage der putativen TyrR-Box in der Promotor-Region von *rybA*. Die Elemente der TyrR-Bindestelle sind hervorgehoben. Unten: Sequenzen der TyrR-Boxen in der Promotorregion von *aroF* (*aroF1-F3*) [100], der putativen TyrR-Box in der *rybA*-Promotorregion und die Konsensussequenz der TyrR-Box. Bei *aroF2* und 3 handelt es sich um „starke“, bei *aroF1* um eine „schwache“ TyrR-Box [100].

Zum Vergleich sind in Abb. 4.38 die Sequenzen der TyrR-Boxen in der Promotorregion von *aroF* gezeigt. *aroF* besitzt drei TyrR-Boxen, wobei *aroF2* und *aroF3* „starke“ Boxen sind und es sich bei *aroF1* um eine „schwache“ Box handelt [100]. Die in *rybA* gefundene

potentielle TyrR-Bindestelle ist im ersten Teil identisch mit der Konsensussequenz. Der zweite Teil der Sequenz weicht an drei Positionen von der Konsensussequenz ab.

Um eine mögliche Regulation der *rybA* Expression durch TyrR zu untersuchen, wurden *gel shift*-Assays mit dem gereinigten TyrR Protein und der DNA der *rybA* Promotorregion durchgeführt (3.12). Als Positivkontrolle wurde die DNA der Promotorregion von *aroF* verwendet. Dies diente gleichzeitig als Nachweis für die Aktivität des Proteins nach der Reinigung. Für die *gel shift*-Assays wurde die Promotorregion von *aroF* und *rybA* mittels Kolonie-PCR (3.3.1) mit den Oligonucleotiden KG28/KG29 bzw. KG30/KG31 (Tab. 2.6) amplifiziert. Die DNA wurde nach Dephosphorylierung (3.3.5) am 5'-Ende radioaktiv markiert (3.3.6). Die Inkubation von ca. 2 nM DNA mit 50 bzw. 500 nM Protein erfolgte in Gegenwart oder Abwesenheit von 0,1 mM ATP und 1 mM Tyrosin für 25 min. Die Komplexe wurden anschließend in einem 5%igen, nativen PAA-Gel getrennt und die DNA mittels Autoradiographie (3.1.7) detektiert (Abb. 4.39).

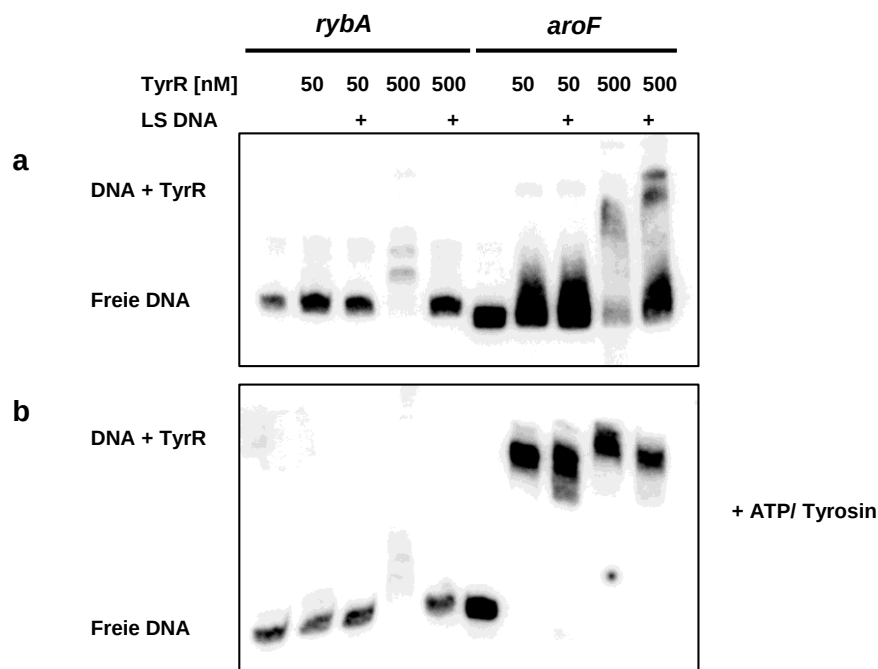


Abb. 4.39: Gel shift-Assay zur Analyse der TyrR-DNA Interaktion mit dem *rybA* und *aroF* Promotor. 2 nM radioaktiv markierter DNA der *rybA*- bzw. *aroF* Promotorregion wurden mit 50 bzw. 500 nM TyrR Protein in Abwesenheit (a) oder Gegenwart von 0,1 mM ATP und 1 mM Tyrosin (b) inkubiert und über ein 5%iges, natives PAA-Gel getrennt. Als Kompetitor wurde Lachssperma DNA (LS-DNA) in einem 100-fach molaren Überschuss zu den Ansätzen gegeben.

In Abwesenheit von ATP und Tyrosin konnte eine Bindung von TyrR an die Promotor-DNA von *rybA* in Form eines *shifts* im Gel nur bei einer Proteinkonzentration von 500 nM gezeigt

werden (Abb. 4.39 a). Die Zugabe eines 100-fach molaren Überschuss an Lachsperma-DNA zu dem Ansatz führte jedoch zu einer Verdrängung der Promotor-DNA von TyrR. Die Bindung von TyrR an die Promotor-DNA von *aroF* führte schon bei 50 nM Protein zu einem leicht veränderten Laufverhalten der DNA im Gel (Abb. 4.39 a). Die DNA konnte auch nicht durch Zugabe von Lachsperma-DNA verdrängt werden, was auf die Spezifität der Bindung hinwies. Bei einer Proteinkonzentration von 500 nM führte die Bindung von TyrR an die *aroF*-DNA zu einem deutlichen *shift*. Die Promotorregion von *aroF* enthält zwei starke TyrR-Boxen (Abb. 4.38). Daher kann das Protein auch ohne Cofaktoren an die DNA binden. Die Bindung von TyrR an die *aroF*-DNA zeigte, dass das gereinigte Protein aktiv war und an seine Zielsequenzen bindet. Die Anwesenheit von 0,1 mM ATP und 1 mM Tyrosin beeinflusst die Bindung von TyrR an die *rybA*-DNA nicht (Abb. 4.39 b). Es war nur eine Bindung von TyrR an die DNA bei einer Proteinkonzentration von 500 nM zu beobachten, die bei Zugabe von Lachsperma DNA verdrängt wurde. Im Fall der *aroF*-DNA wurde durch Zugabe von ATP und Tyrosin schon bei 50 nM Protein fast die gesamte DNA von TyrR gebunden (Abb. 4.39 b). Bei 500 nM TyrR konnte keine freie DNA mehr detektiert werden. Die gesamte DNA lag im Komplex mit TyrR vor. Die Zugabe von Lachssperma-DNA hatte bei beiden Proteinkonzentrationen keine Auswirkung auf die Bindung. Der Komplex, der durch die Bindung von TyrR an die *aroF*-DNA zustande kam, zeigte in Anwesenheit von Tyrosin und ATP ein langsames Laufverhalten als der Komplex ohne Zugabe von Cofaktoren (vergl. Abb. 4.39 a und b). Die Ergebnisse der *gel shift*-Assays ließen darauf schließen, dass die Expression *rybA* nicht von TyrR reguliert wird, da keine spezifische Bindung des Proteins an die Promotor-DNA nachgewiesen werden konnte.

Beispiele, wie die 6S RNA oder die CsrB RNA zeigen, dass sRNAs durch Bindung an ein Protein dessen Aktivität beeinflussen können [7,30]. Die Vermutung, dass RybA die Aktivität des TyrR-Proteins in Bezug auf die Regulation des *aroF*- und *aroL*-Operons unter Peroxid-Stress beeinflusst, wurde ebenfalls mit *gel shift*-Assays untersucht. Dazu wurde die 206 nt Form von RybA, die unter Peroxid-Stress als Hauptform erschien, mittels *in vitro* T7-Transkription hergestellt (0). Als Kontroll-RNA wurde die CsrB-RNA hergestellt (Abb. 4.40 A und B). Die RNA wurde im Anschluss dephosphoryliert (3.3.5) und am 5'-Ende radioaktiv markiert (3.3.6, Abb. 4.40 C).

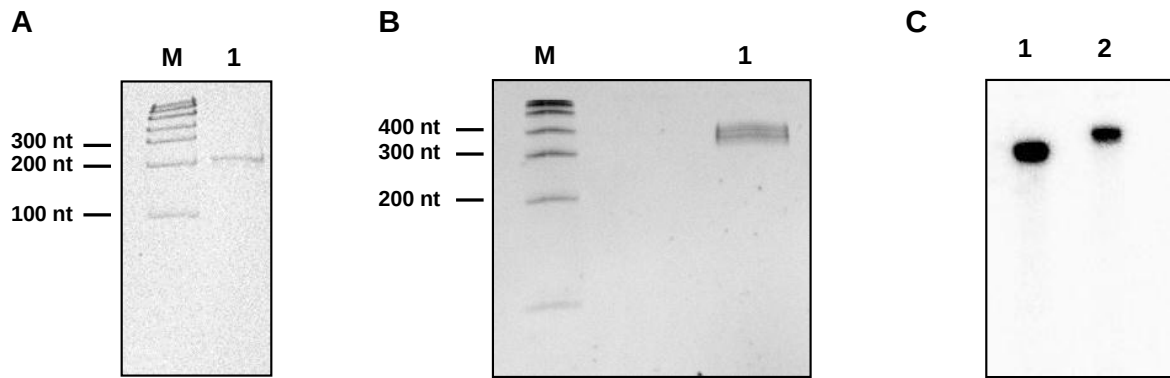


Abb. 4.40: *In vitro* T7-Transkription und 5'-radioaktiv Markierung der RybA RNA und der Kontroll-RNA CsrB. Überprüfung der *in vitro* T7-Transkription der RNA RybA (A, Spur 1) und CsrB (B, Spur 2) mittels denaturierender PAGE (10%iges PAA-Gel). M: RiboRuler™ Low Range RNA Ladder. (C) 5'-Radioaktiv Markierung der RNA. Spur 1: RybA, Spur 2: CsrB.

Die CsrB RNA ist mit 369 nt größer als RybA (Abb. 4.40 B). Sie wurde als Kontroll-RNA gewählt, da es sich um eine sRNA handelt, die an ein Protein bindet. Für die Bindungsstudien der RNA und TyrR wurde die RNA vor Inkubation mit dem Protein renaturiert, in dem sie für 5 min bei 75°C erhitzt und nach Zugabe von 15 mM MgCl₂ langsam auf Raumtemperatur abgekühlt wurde. Die Inkubation mit dem Protein erfolgte analog zu den Bindungsstudien mit der DNA mit und ohne 0,1 mM ATP und 1 mM Tyrosin (3.12). Die Trennung und Analyse erfolgte über ein 5%iges natives PAA-Gel (Abb. 4.41 a und b). Ohne ATP und Tyrosin war eine Bindung in Form eines *shifts* im Gel der RybA RNA an TyrR erst bei einer Proteinkonzentration von 500 nM zu beobachten (Abb. 4.41 a). Die Zugabe eines 100-fach molaren Überschuss an tRNA als Kompetitor verdrängte die RybA RNA jedoch teilweise wieder von dem Protein. Dies konnte durch die Zunahme an ungebundener RNA verfolgt werden. Das gleiche Bindungsverhalten zeigte auch die Kontroll-RNA CsrB. In Anwesenheit von ATP und Tyrosin zeigte sich bei beiden RNAs schon bei 50 nM TyrR ein *shift* (Abb. 4.41 b) Die Zugabe von tRNA verdrängte auch hier beide RNAs teilweise von dem Protein. Bei einer Proteinkonzentration von 500 nM zeigte sich bei RybA und CsrB ein deutlicher *shift*. Diese Bindung wurde durch Zugabe von tRNA nicht inhibiert. Auffällig war, dass bei erhöhten Proteinkonzentrationen in An- und Abwesenheit von ATP und Tyrosin der Komplex nicht ins Gel zu wandern schien. Dies kann nicht durch Formierung des Hexamers erklärt werden, da dazu ATP und Tyrosin nötig sind. Vermutlich handelt es sich daher um Protein-Aggregate, die sich bei hohen Proteinkonzentrationen bilden. Da die Kontroll-RNA CsrB in

Ergebnisse

allen Fällen das gleiche Bindeverhalten zeigte, kann nicht von einer spezifischen Bindung von RybA an TyrR gesprochen werden.

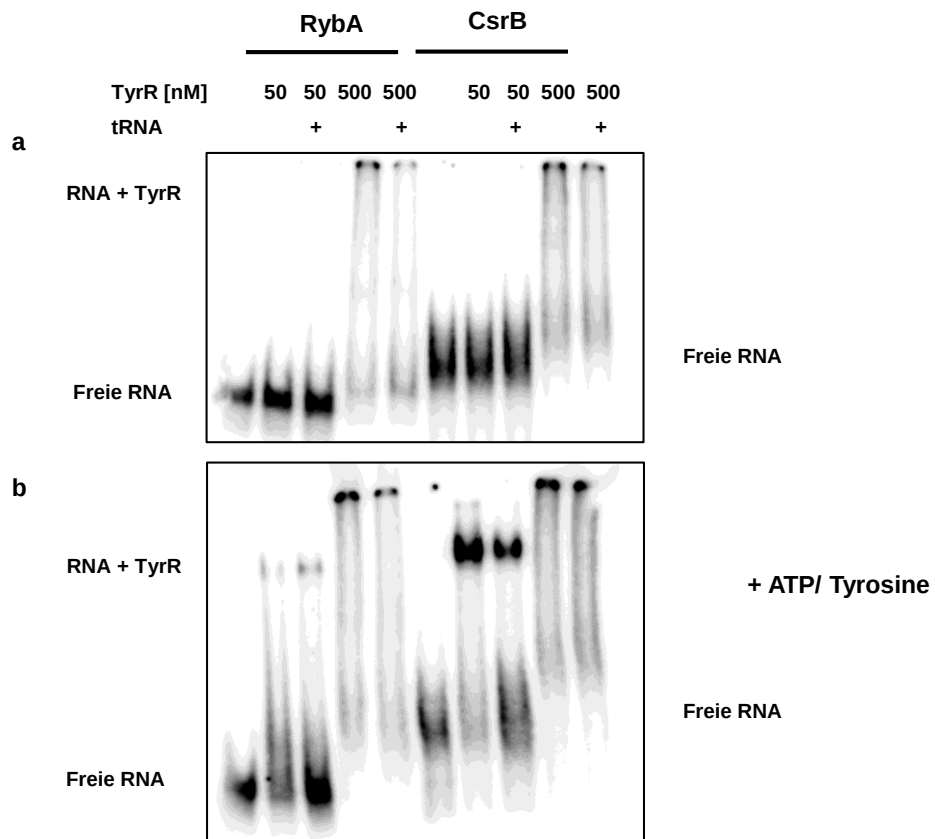


Abb. 4.41: Gel shift-Assay zur Analyse der Interaktion zwischen TyrR und der RybA RNA. 2 nM radioaktiv markierter RybA oder CsrB RNA wurden mit 50 bzw. 500 nM TyrR Protein in Abwesenheit (a) oder Gegenwart von 0,1 mM ATP und 1 mM Tyrosin (b) inkubiert und über ein 5%iges, natives PAA-Gel getrennt. Als Kompetitor wurde tRNA in einem 100fach molaren Überschuss zu den Ansätzen gegeben.

5 Diskussion

Im letzten Jahrzehnt stieg die Zahl neu entdeckter sRNAs durch die Entwicklung neuer bioinformatischer und experimenteller Methoden in *E. coli* von 10 auf ca. 80-100 an. Die Charakterisierung der sRNAs zeigte, dass sie eine wichtige Rolle in der Genregulation zur Anpassung an veränderte Umwelt- oder Stressbedingungen spielen. Die meisten sRNAs agieren dabei über Basenpaarung mit einer mRNA. Dies kann eine Aktivierung oder Inhibierung der Translation oder eine Veränderung der Stabilität der mRNA zur Folge haben und so die Genexpression beeinflussen. Die Expression der sRNAs ist dabei präzise reguliert. Typischerweise handelt es sich bei den Regulatoren um Transkriptionsfaktoren, die direkt durch äußere oder innere Signale stimuliert werden oder über ein Zwei-Komponenten-System die veränderten Umweltbedingungen wahrnehmen [102]. Beispiel hierfür ist die Aktivierung der SgrS sRNA durch den Transkriptionsfaktor SgrR unter Glucose-Phosphat-Stress. Induziert durch hohe, intrazelluläre Glucose-6-Phosphat-Konzentrationen aktiviert SgrR die Expression von SgrS. SgrS destabilisiert die mRNA *ptsG* des für die Glucoseaufnahme verantwortlichen Transporters EIICB^{Glc} [103].

Der Hälfte der bekannten sRNAs konnte bis heute allerdings keine Funktion zugeordnet werden. Hinzu kommt, dass ein Großteil der mit bioinformatischen Methoden vorhergesagten sRNAs nicht experimentell bestätigt wurde. Die Untersuchung dieser sRNAs und ihrer Funktion liefert wichtige Hinweise über das Ausmaß und die Art der Beteiligung von sRNAs in den verschiedenen regulatorischen Prozessen der Bakterien. Daher war das Ziel dieser Arbeit die Charakterisierung der vorhergesagten sRNA HB_428 und der sRNA RybA in *E. coli*, um weitere Einsichten in das Netzwerk der sRNAs in Bakterien zu erlangen.

5.1 Charakterisierung der sRNA HB_428

Bei HB_428 handelt es sich um eine durch Carter *et al.* [52] vorhergesagte sRNA (1.3). In einer vorangegangenen Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass HB_428 unter Stressbedingungen wie Peroxid- oder hyperosmotischen Stress, sowie in Minimalmedium und unter ATP- und Glucosemangel exprimiert wurde. Unter Kultivierung in LB-Medium in der exponentiellen oder stationären Phase konnte keine Expression beobachtet werden [87]. Die differentielle Expression von HB_428 lässt auf eine Rolle der sRNA bei der Anpassung an bzw. Bewältigung dieser Stressbedingungen vermuten. In der Literatur sind mehrere Beispiele

von sRNAs beschrieben, die unter diesen Bedingungen eine regulatorische Rolle spielen. In Tab. 5.1 sind einige ausgewählte Beispiele gezeigt. Die Expression der sRNA MicF wird zum Beispiel unter anderem auch durch Superoxid-Stress und hyperosmotischen Stress induziert [50] und inhibiert über Basenpaarungen die Translation der *ompF* mRNA. *ompF* codiert ein Porin in der äußeren Membran, durch dessen Pore kleine, hydrophile Moleküle diffundieren können. Durch die Inhibierung der OmpF-Produktion unter Stressbedingungen wird z. B. die Diffusion von Molekülen über die Membran gesteuert [104]. In dieser Arbeit wurde die Funktion der sRNA HB_428 unter Peroxid-Stress untersucht.

Tab. 5.1: Beispiele von sRNAs, die unter bestimmten Stress-Bedingungen transkribiert werden.

sRNA	Induktion	Funktion/Target	Quelle
MicF	u.a. Superoxid-Stress; Hyperosmotischer Stress	Inhibierung der Porinsynthese/ <i>ompF</i>	[50]
CyaR	Glucosemangel	<i>Quorum sensing</i> (luxS), NAD-Synthese (nadE), Porinsynthese (<i>ompX</i>)	[37]
OmrA/B	Hyperosmotischer Stress	Inhibierung der äußeren Membranproteinsynthese (<i>cirA</i> , <i>fecA</i> , <i>fepA</i> , <i>ompT</i> , <i>gntP</i> , <i>ompR</i>)	[38]
OxyS	Peroxid-Stress	Antimutator-Effekte (u. a. <i>fhlA</i> , <i>rpoS</i>)	[36,39]

Als Basis für eine Charakterisierung wurden Knock-out- und Überexpressionsmutanten von HB_428 hergestellt. Der Transkriptionsstart- und Endpunkt von HB_428 war nicht bekannt. Dies resultierte aus den Kriterien, die Carter *et al.* für die Vorhersage der sRNAs gewählt haben [52]. Die Suchkriterien basierten auf der Nucleotid-Zusammensetzung und Sequenzmotiven und beinhalteten keine Transkriptionsstart- oder Stopp-Signale. Northern-Blot-Analysen zeigten, dass HB_428 in drei verschiedenen Formen vorliegt, die alle eine Länge von über 80 nt aufwiesen (Abb. 4.17). Für die Herstellung der KO-Mutante wurden nur diese 80 Basenpaare aus dem Genom von *E. coli* K12 durch eine Kanamycin-Resistenz-Kassette ersetzt. Somit wurde nicht das vollständige Gen für HB_428 entfernt. Durch das Ersetzen der 80 bp durch die ca. 1,4 kb große Kanamycin-Resistenz-Kassette konnte aber davon ausgegangen werden, dass keine funktionale sRNA mehr gebildet wurde. Der Knock-out wurde unter Verwendung der *one-step inactivation* Methode [82] durch homologe Rekombination durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine schnelle und effiziente Methode, bei der der Erfolg des Knock-outs über die Selektion in Kanamycin-haltigem Medium oder

Diskussion

auf entsprechenden Agarplatten leicht verfolgt werden kann. Zudem ermöglicht diese Methode Knock-outs von weiteren Genen, da das Kanamycin-Resistenzgen (Kan^R) durch homologe Rekombination wieder entfernt werden kann. In diesem Fall wurde auf ein Entfernen von Kan^R verzichtet, um einen Selektionsmarker zur Vermeidung von Kontaminationen zu erhalten. Das Rekombinationsereignis wurde mittels PCR überprüft. Auf RNA-Ebene wurde der Erfolg des Knock-outs durch Northern-Blot-Analysen mit einer HB_428 spezifischen Sonde überprüft (Abb. 4.4 B).

Mögliche Auswirkungen des Knock-outs von HB_428 auf die Vitalität von *E. coli* unter normalen Bedingungen und Peroxid-Stress wurden durch Beobachtungen des Wachstumsverhaltens untersucht (Abb. 4.5). Unter normalen Bedingungen zeigte ΔHB_428 kein vom Wildtyp abweichendes Wachstumsverhalten. Die Zugabe von H_2O_2 führte in Wildtyp-Zellen zu einer Phase verzögerten Wachstums, aus der die Zellen anschließend wieder in die exponentielle Phase übergingen. ΔHB_428 -Zellen zeigten eine wesentlich längere Erholungsphase oder gar kein Wachstum nach Stressinduktion. Die Deletion von HB_428 beeinträchtigte die Anpassung von *E. coli* an Peroxid-Stress. Dies ist ein Hinweis für eine essentielle Rolle von HB_428 unter dieser Stressbedingung.

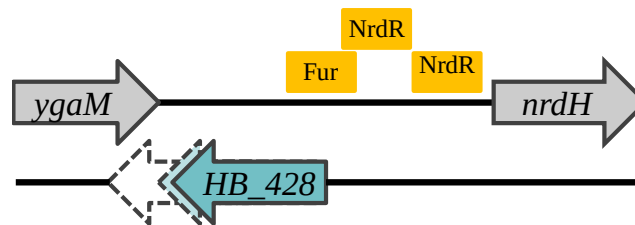


Abb. 5.1: Angenäherte Position der putativen sRNA HB_428 im Genom von *E. coli* K12. Gezeigt ist ein Ausschnitt aus dem Genom von *E. coli* von Position 2.789.156 – 2.798.990 [88]. Open reading frames (ORFs) sind als graue Pfeile dargestellt. Die Sequenz von HB_428 nach Bestimmung des 5'-Endes ist als blauer Pfeil dargestellt und entspricht in etwa der Größe des kleinsten Transkriptes. Der hellblaue und der weiße Pfeil entsprechen jeweils den beiden größeren Transkripten. Bindestellen für Transkriptionsregulatoren des *nrdH*-Operons sind gelb dargestellt [88].

Bei der Analyse der Auswirkungen, die die Deletion von HB_428 verursacht, musste berücksichtigt werden, dass durch den Knock-out regulatorische Elemente der Nachbargene möglicherweise beeinflusst wurden. HB_428 liegt in der intergenischen Region zwischen *ygaM* und dem *nrdHIEF*-Operon auf dem antisense Strang (Abb. 5.1). Die Transkription des *nrdHIEF*-Operons wird von dem Transkriptionsfaktor NrdR reprimiert und codiert die Untereinheiten der Ribonucleotid Reduktase (RNR) der Klasse Ib (*nrdE* und *nrdF*), dem

Elektronendonator der RNR (*nrdH*) und ein Flavodoxin (*nrdI*) [105,106]. Unter normalen Bedingungen wird das Operon nur schwach exprimiert. Es konnte gezeigt werden, dass oxidativer Stress zu einem erhöhten Expressionslevel führt, wobei der Mechanismus der Induktion noch ungeklärt ist [107]. Zusätzlich impliziert das Vorhandensein einer FUR-Box in der Promotorregion die Regulation des Operons durch den Eisen-Metabolismus [108]. Der Transkriptionsregulator Fur spielt ebenfalls eine Rolle in der oxidativen Stressantwort und die Expression wird von SoxS und OxyR induziert [78]. Die Regulation des *nrdHIEF*-Operons durch Fur unter oxidativem Stress ist jedoch nicht untersucht. Die FUR-Box überlappt in einem Bereich von 5 bp mit der Sequenz, die durch den Knock-out von HB_428 entfernt wurde (Abb. 5.1). Dies könnte die Expression des *nrdHIEF*-Operons vor allem unter Peroxid-Stress beeinflusst haben, da regulatorische Bindestellen eventuell zerstört wurden. Die durchgeführten Microarray-Analysen zum Vergleich des Transkriptoms von Δ HB_428 und *E. coli* K12 WT zeigten allerdings keine signifikante Veränderung des Transkriptionslevels der einzelnen Gene des Operons in Δ HB_428. Die Expression des Operons wurde daher nicht durch den Knock-out beeinflusst. Der durch den Knock-out entfernte Bereich überlappte nicht den Transkriptionsstart des *nrdHIEF*-Operons. Die Beeinflussung eventueller post-transkriptioneller Regulationen wie die Inhibierung oder Aktivierung der Translation durch sRNAs konnte daher ausgeschlossen werden. Somit ist anzunehmen, dass der Phänotyp von Δ HB_428 unter Peroxid-Stress auf die Deletion der sRNA zurückzuführen ist.

Für die Herstellung einer HB_428 Überexpressionsmutante wurde der Bereich der intergenischen Region ab dem Startcodon von *nrdH* einschließlich des ORFs von *ygaM* (Abb. 4.6 A) in ein *high-copy* Plasmid kloniert. Durch die gewählte Klonierungsstrategie wurde der auf dem Plasmid vorhandene Promotor entfernt. Die Expression von pHB_428 in Δ HB_428-Zellen zeigte, dass sich der native Promotor in der klonierten Sequenz befand (Abb. 4.7). Zudem waren potentielle regulatorische Elemente vorhanden, die die Expression unter Peroxid-Stress stimulierten, da unter stressfreien Bedingungen kaum Expression nachgewiesen werden konnte. In der Überexpressionsmutante konnte das gleiche Bandenmuster für HB_428 wie in Wildtyp-Zellen beobachtet werden, was auf eine korrekte Prozessierung der sRNA schließen ließ. Das Auftreten von mehreren verschieden großen RNA-Spezies bei sRNAs ist keine Seltenheit. Dies ist zumeist auf eine Prozessierung durch RNase P, RNase III oder RNase E zurückzuführen, die der Reifung des primären Transkriptes dient [109]. Einige sRNAs, wie GadY kommt in mehreren aktiven Spezies vor, die von einem

Promotor aus transkribiert werden [19]. Andere sRNAs werden erst unter bestimmten Bedingungen zu einer aktiven Form prozessiert.

Einen Hinweis auf mögliche Prozessierungsstellen lieferte die Bestimmung des 5'-Endes von HB_428 mittels *primer extension* unter Peroxid-Stress. Hier wurden zwei verschiedene 5'-Enden für die sRNA gefunden (Abb. 4.13). Das dominantere 5'-Ende (Abb. 4.12) konnte dem Adenosin an Position 2798716 und das zweite 5'-Ende dem Thymidin an Position 2798725 im *E. coli* Genom zugeordnet werden. Hierbei könnte es sich um ein 5'-Prozessierungsprodukt handeln. Denkbar ist auch, dass das zweite 5'-Ende aus der Verwendung von Total-RNA aus der Überexpressionsmutante für die *primer extension* Experimente resultierte. Die Verwendung von Total-RNA aus Wildtyp-Zellen für die reverse Transkription ergab kein RT-Produkt für HB_428, weshalb auf die Überexpressionsmutante zurückgegriffen wurde. Wenn HB_428 in ΔHB_428 überproduziert wurde, konnte neben den drei dominierenden Banden mehrere schwächere Banden detektiert werden (Abb. 4.7 B), welche eventuell auf Transkriptionsabbrüche oder falsche Prozessierung zurückzuführen waren. Das könnte auch zu dem zweiten 5'-Ende geführt haben. Wo und durch welche RNasen HB_428 prozessiert werden könnte, bleibt zu untersuchen. Hierfür wären Analysen der sRNA in verschiedenen RNase-defizienten Mutanten geeignet, in denen schon für andere sRNAs ein verändertes Prozessierungsmuster erfolgreich nachgewiesen werden konnte [51,110,111].

Die Bestimmung des 3'-Endes von HB_428 durch 3'-RACE Experimente verlief erfolglos. Es wurden mehrere Klone erhalten, die in der Sequenz mit HB_428 übereinstimmten und verschiedene 3'-Enden aufwiesen. Zusammen mit dem ermittelten 5'-Ende passte allerdings keins der gefundenen 3'-Enden auf Grund ihrer Größe zu den beobachteten Banden in den Northern-Blot-Analysen. Die erfolgreiche Anwendung der Methode für die Bestimmung des 3'-Ende von RybA und anderer sRNAs [51] belegt ihre Funktionalität. Für die Bestimmung des 3'-Endes von HB_428 sollte jedoch eine andere Methoden, wie z. B. das *Mung Bean nuclease mapping* [112] angewendet werden.

Über Northern-Blot-Analysen mit einem radioaktiv markierten Standard wurde versucht, die Größe der verschiedenen HB_428-Spezies abzuschätzen (Abb. 4.17). Die drei Formen von HB_428 entsprachen Größen von ca. 120 nt, 210 nt und 320 nt. Zusammen mit dem ermittelten 5'-Ende ergab sich daraus, dass das Gen für HB_428 mit dem *ygaM* Gen überlappt (Abb. 4.18). Die meisten sRNAs weisen im Durchschnitt eine Größe von 50-250 nt auf [102]. Beispiele für größere sRNAs sind die Protein-bindende CsrB-RNA (369 nt) in *E. coli* und ihr

Erwinia carotovora Homolog RsmB (479 nt) [30]. Bei der Plasmid-codierten RNA α handelt es sich um eine *cis*-codierte antisense RNA, die in *Vibrio anguillarum* den Eisen-Transport reguliert und eine Größe von 650 nt aufweist [113].

Die Überlappung des *HB_428*-Gens mit *ygaM* könnte vermuten lassen, dass es sich bei *HB_428* ebenfalls um eine *cis*-codierte antisense sRNA handelt. Die Microarray-Analysen zeigten jedoch keine veränderte Genexpression von *ygaM* in Δ *HB_428*.

5.2 Analyse möglicher Targets von *HB_428*

Um einen Hinweis auf die Funktion der sRNA *HB_428* zu erhalten wurde die Genexpression in Δ *HB_428* unter Peroxid-Stress im Vergleich zum Wildtyp in drei unabhängigen Experimenten mittels Microarrays untersucht. Pulvermacher *et al.* konnten durch den Vergleich der Genexpression eines Δ *gcvB*-Stammes mit Wildtyp-Zellen durch diese Methode in *E. coli* erfolgreich *cycA* als Target für die sRNA GcvB identifizieren [66]. In ähnlichen Ansätzen führte der Vergleich von sRNA Knock-out Stämmen mit einer Überexpressionsmutante ebenfalls zur erfolgreichen Target-Identifizierung [37,67].

Die Analyse ergab für *HB_428* 12 signifikant regulierte Gene (Tab. 4.4). Der Nachweis der Regulation eines Gens sollte mindestens mit einer weiteren Methode bestätigt werden. Für weitere Untersuchungen wurden dafür vier Gene (*cbl*, *cysP*, *tauA* und *tauB*) ausgewählt, die in Δ *HB_428* herunterreguliert waren und ein Gen (*oxyR*), dass stärker exprimiert wurde. Als Nachweismethode wurden Northern-Blot-Analysen gewählt. Für keines der ausgewählten Gene konnte damit die unterschiedliche Regulation zwischen Δ *HB_428* und dem Wildtyp nachgewiesen werden (Abb. 4.21). Eine Überprüfung durch eine dritte Methode, wie z. B. die quantitative RT-PCR (qRT-PCR) wurde nicht durchgeführt. Um abschließend eine Regulation dieser Gene durch *HB_428* nachzuweisen oder auszuschließen zu können, sollte die Anwendung einer dritten Methode in zukünftigen Experimenten miteinbezogen werden. Zusätzlich sollten die anderen signifikant regulierten Gene, die hier nicht bei der Auswahl berücksichtigt wurden, durch eine zweite Methode wie Northern-Blot-Analysen oder qRT-PCR untersucht werden.

Zusätzlich könnten die Microarray-Analysen mit der Überexpressionsmutante von *HB_428* wiederholt werden. Der Vergleich könnte zeigen, ob die in dieser Studie gefundenen Gene auch in der Überexpressionsmutante differentiell exprimiert werden.

Es besteht außerdem die Möglichkeit, dass es sich bei HB_428 um eine Protein-bindende sRNA handelt. Potentielle Targets wären durch die Microarray-Analyse nicht detektiert worden, da nur Effekte auf mRNA Ebene beobachtet werden können. Für die Untersuchung von möglichen RNA-Protein-Interaktionen könnte die sRNA z. B. mit einem RNA-Tag, wie dem Streptavidin-bindenden RNA-Aptamer Streptotag fusioniert und *in vivo* exprimiert werden [114]. Über eine Affinitätsreinigung mit anschließender Massenspektrometrie könnten so Interaktionspartner identifiziert werden.

5.3 Charakterisierung der sRNA RybA

Seit ihrer Entdeckung 2001 in *E. coli* durch Wassarman *et al.* [53] wurde die sRNA RybA nicht weiter untersucht. Es wurde nur gezeigt, dass RybA in zwei Formen von ~205 und ~300 nt auftritt. Der Transkriptionsstart- und Endpunkt wurde nicht bestimmt. Es wurde lediglich eine Sequenz von 89 bp von Position 852.263 bis 852.175 im Genom von *E. coli* für RybA angegeben. *rybA* ist in der intergenischen Region (IGR) zwischen *yljL* und *mntR* auf dem *antisense* Strang lokalisiert. Wassarman *et al.* wiesen die Expression von *rybA* in *E. coli* unter Standardbedingungen in LB-Medium (exponentielle und stationäre Phase) und in M9 Minimalmedium nach, wobei die stärkste Expression in der stationären Phase verzeichnet wurde, gefolgt von der Expression in M9 Minimalmedium [53].

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, RybA in Hinblick auf ihre Funktion unter Peroxid-Stress in *E. coli* zu charakterisieren. Oxidativer Stress, ausgelöst durch reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) kann in Pro- wie auch in Eukaryoten zu Schäden an DNA, Proteinen und Lipiden führen. Er kann in Peroxid-Stress, ausgelöst durch H₂O₂ und Superoxid-Stress, ausgelöst durch O₂⁻, eingeteilt werden. Bakterien haben für beide Stressformen unterschiedliche Abwehrmechanismen entwickelt, bei denen auch sRNAs eine wichtige Rolle spielen (Tab. 5.1). Die Analyse von RybA in *E. coli* unter verschiedenen (Stress-) Bedingungen zeigte eine hohe Expression unter Peroxid-Stress und unter Kälteschock (Abb. 4.1), sowie in geringerem Maße unter Superoxid-Stress. Unter den anderen getesteten Bedingungen konnte RybA nur sehr schwach oder gar nicht detektiert werden, was für eine spezifische Rolle von RybA unter Peroxid-Stress und Kälteschock sprach. In dieser Arbeit wurde ausschließlich die Rolle von RybA unter Peroxid-Stress untersucht.

Auffällig war, dass unter stressfreien Bedingungen eine größere Spezies von RybA beobachtet werden konnte als unter Peroxid-Stress (Abb. 4.2). Dies ließ eine Prozessierung

von RybA unter dieser Bedingung vermuten. Beispiele wie die tmRNA zeigen, dass sRNAs erst durch eine Veränderung der Umweltbedingungen von einem Vorläufertranskript durch RNase-Spaltung zu einer aktiven Form prozessiert werden können [115]. Eine Alternative wäre die Transkription von einem anderen Promotor unter Stressbedingungen, wie z. B. für die IstR-1 und IstR-2 sRNAs gezeigt werden konnte [116].

Um die Funktion von RybA unter Peroxid-Stress zu untersuchen, wurde eine *rybA*-Knock-out- und Überexpressionsmutante hergestellt. Die Konstruktion der KO-Mutante Δ *rybA* erfolgte analog zu der von *HB_428*. Der Erfolg konnte auf chromosomaler und RNA-Ebene über PCR bzw. Northern-Blot-Analysen (Abb. 4.4 A) nachgewiesen werden. Durch die Klonierung der intergenischen Region zwischen *mntR* und *yliL*, einschließlich der Sequenz des ORFs von *yliL* (Abb. 4.6 B), in das *high-copy* Plasmid pSK17, konnte erfolgreich eine Überexpressionsmutante hergestellt werden. Hierbei wurde ebenfalls, wie schon bei der Konstruktion der *HB_428* Überexpressionsmutante, der in pSK17 vorhandene Promotor und *micC* durch die Klonierung entfernt. Die Expression von *rybA* in der Überexpressionsmutante Δ *rybA* + pRybA konnte über Northern-Blot-Analysen unter stressfreien Bedingungen und Peroxid-Stress gezeigt werden (Abb. 4.7 A). Daraus konnte geschlossen werden, dass sich der native Promotor von *rybA* in der klonierten Sequenz befand, da andernfalls keine Expression zu erwarten gewesen wäre. In der Überexpressionsmutante konnte unter Peroxid-Stress und stressfreien Bedingungen das gleiche Bandenmuster für RybA wie im Wildtyp beobachtet werden. Die kleinere Form von RybA dominierte auch in der Überexpressionsmutante unter Peroxid-Stress. Dies bestätigte die korrekte Expression von *rybA* in Δ *rybA* + pRybA.

Die Bestimmung des 5'- und 3'-Endes von RybA unter Peroxid-Stress erfolgte mittels *primer extension* und 3'-RACE Experimenten. Für die *primer extension* Experimente wurde RybA aus Total-RNA, die aus *E. coli* K12 Wildtyp-Zellen unter Peroxid-Stress isoliert wurde, unter Zuhilfenahme eines radioaktiv markierten Primers in cDNA umgeschrieben. Nach der reversen Transkription wurden drei verschieden große Transkripte für RybA erhalten, die eine unterschiedliche Intensität aufwiesen. Das 5'-Ende des dominierenden Transkriptes konnte durch den Vergleich mit der parallel durchgeführten Sequenzierungsreaktion (Abb. 4.9) dem Adenosin an Position 852269 im Genom von *E. coli* als 5'-Nucleotid (+1) zugeordnet werden (Abb. 4.11). Die Signalintensität der beiden anderen Transkripte war für eine eindeutige Zuordnung zu schwach. Die Verwendung von Total-RNA aus der Überexpressionsmutante Δ *rybA* + pRybA unter Peroxid-Stress für die *primer extension* Analyse löste dieses Problem. Das größere RT-Produkt wurde dem Guanotin an Position 852287 (+1_{alt}) im Genom von *E.*

coli zugeordnet (Abb. 4.10). Das dritte Transkript, das im Gel eine geringere Größe als die beiden anderen RT-Produkte aufwies, wurde dem Guanosin an Position 852212 zugeordnet. Die beiden kleineren Transkripte könnten durch Prozessierung des größeren Transkriptes oder durch Transkription von unabhängigen Promotoren entstanden sein. Putative Promotorelemente (-10 und -35 Elemente) wurden allerdings nur vor dem ersten Guanosin an Position 852287 gefunden. Bei dem gefundenen Promotorelement handelt es sich um Sequenzen, die von dem Sigma-Faktor σ^{70} erkannt werden (Abb. 5.2).

	-35		-10		+1 _{alt}
<i>rybA</i>	TTAACG	- 15 bp -	TATAAT	- 7 bp -	G
Konsensus σ^{70}	TTGACA	- 17 bp -	TATAAT	- 5-8 bp -	R

Abb. 5.2: Promotorelemente von *rybA*. Die für *rybA* gefundenen Promotorelemente sind im Vergleich zu der Konsensussequenz des σ^{70} -Faktors [89] gezeigt. Nucleotide, die der Konsensussequenz entsprechen sind hervorgehoben. R steht für ein Purin (G oder A).

Mutationsstudien konnten zeigen, dass nach dem Austausch des putativen -10 Elements von *rybA* gegen 6 Guanosinreste keine Expression mehr stattfand (Abb. 4.23) und unterstreichen damit die Bedeutung dieses Elements für die Transkription von *rybA*. Dadurch konnte ausgeschlossen werden, dass die beiden anderen 5'-Enden aus der Transkription von einem unabhängigen Promoter resultierten. Andernfalls wäre eine Expression von *rybA* zu erwarten gewesen.

Die σ^{70} -RNA-Polymerase ist für die Transkription der sogenannten Haushaltsgene (engl.: *housekeeping*) während des aktiven Wachstums von *E. coli* zuständig. Für viele sRNA-Gene konnte bereits gezeigt werden, dass sie σ^{70} -Promotorelemente beinhalten. Bioinformatische Studien nutzten dies als Basis zur erfolgreichen Identifizierung neuer sRNAs [51]. Die vornehmliche Detektion von RybA unter Peroxid-Stress lässt einen zusätzlichen, regulatorischen Mechanismus vermuten. Würde die Transkription nur von der σ^{70} -abhängigen Polymerase gesteuert werden, wäre eine Expression vor allem in der exponentiellen Wachstumsphase zu erwarten gewesen. Zusätzliche regulatorische Faktoren wie Transkriptionsregulatoren könnten die Transkription von *rybA* aktivieren oder reprimieren. Die Expression der sRNA OxyS wird z. B. durch den Transkriptionsregulator OxyR unter Peroxid-Stress aktiviert [39]. Regulatorische Elemente in der Promotorregion von *rybA*, wie z. B. Bindestellen für Transkriptionsfaktoren könnten Hinweise auf den Mechanismus der

Induktion unter Peroxid-Stress geben. Durch sukzessive Verkürzung der Promotorregion bis auf das -35 und -10 Element (Abb. 4.19 A) von *rybA* in pRybA konnte gezeigt werden, dass sich in dieser Region keine wichtigen regulatorischen Elemente für die Transkription befinden (Abb. 4.19 B). Die Expression von *rybA* unter Kontrolle des konstitutiven P_{LacO-1} Promotors von den Plasmiden pRybA_{PLacO-1}+1alt bzw. pRybA_{PLacO-1}+1 ergab, dass die 206 nt Form von RybA auch hier nur verstärkt unter Peroxid-Stress detektiert werden konnte (Abb. 4.20). Unter stressfreien Bedingungen waren im Vergleich nur geringe Mengen RybA zu beobachten. Daraus kann geschlossen werden, dass der erhöhte RNA-Level von RybA unter Peroxid-Stress vermutlich aus einer Stabilisierung der RNA resultiert und nicht aus einer verstärkten Transkriptionsrate.

Die Bestimmung des 3'-Endes von RybA erfolgte über 3'-RACE Experimente. Durch Ligation eines Adapter-Oligonucleotids an die 3'-Enden von total RNA und anschließender RT-PCR mit einem *rybA*-spezifischen Oligonucleotid konnten Regionen, die RybA entsprachen, amplifiziert, kloniert und sequenziert werden. Das 3'-Ende entsprach dabei dem letzten Nucleotid vor dem Adapter-Oligonucleotid. Unter Verwendung von Total-RNA aus Wildtyp-Zellen konnten keine PCR-Produkte erhalten werden. Daher wurde für die Bestimmung des 3'-Endes Total-RNA aus der Überexpressionsmutante unter Peroxid-Stress und stressfreien Bedingungen verwendet. Für die unter Peroxid-Stress dominierende Form von RybA konnte das 3'-Ende dem Thymidin an Position 8522064 zugeordnet werden. Zusammen mit dem dominierenden 5'-Ende aus der Primer Extension Analyse ergab sich eine Länge von 206 nt für die sRNA RybA. Die Position im Genom von *E. coli* ist in Abb. 5.3 gezeigt. Die Größe stimmt mit der durch Wassarman *et al.* über Northern-Blot abgeschätzten Größe von ca. 205 nt überein [53]. Unter stressfreien Bedingungen wurde als 3'-Nucleotid das Thymidin an Position 851948 bestimmt (Abb. 5.3). Zusammen mit dem 5'-Ende würde sich eine Größe von 322 nt für die größere Form für RybA ergeben. Die zweite, größere Form die durch Wassarman *et al.* gefunden wurde, weist eine Länge von ca. 300 nt auf. Die Größe wurde jedoch nur durch Northern-Blot-Analysen abgeschätzt und erlaubt keine exakte Bestimmung. Durch die Verwendung von radioaktiv markierten Oligonucleotid-Sonden, die am 3'-Ende der 206 nt Form von RybA und direkt dahinter hybridisieren, konnten die Ergebnisse der 3'-RACE gestützt werden. Die 206 nt Form konnte mit der zweiten Sonde nicht mehr detektiert werden (Abb. 4.15). Die größeren Spezies hingegen wurden detektiert.

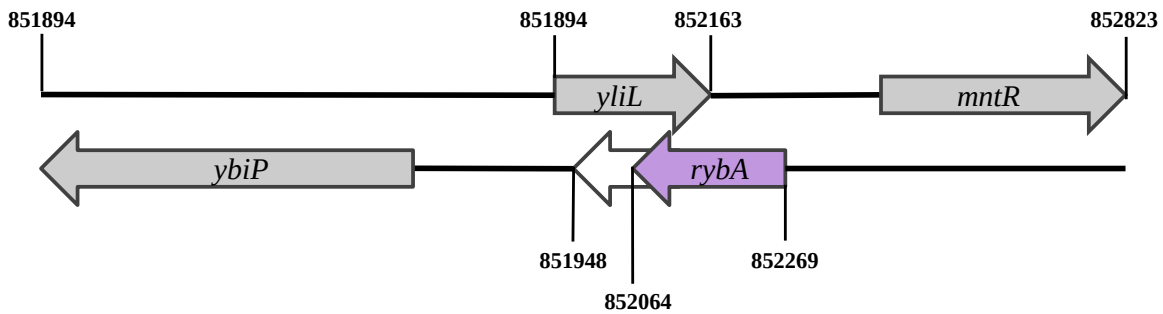


Abb. 5.3: Schematisch dargestellte Position von *rybA* im Genom von *E. coli* K12. Gezeigt ist ein Ausschnitt des *E. coli* Genoms von 851894 bis 852823 [88]. ORFs sind als graue Pfeile dargestellt. Die 206 nt Form von RybA ist als violetter Pfeil, die unter stressfreien Bedingungen vorherrschende Form als weißer Pfeil, dargestellt. Die Zahlen markieren die Positionen im Genom von *E. coli*.

In *rybA* wurde nach Analyse ein putativer ORF mit einer Länge von 129 bp gefunden (Abb. 4.15). Daraus würde sich ein Protein mit einer Länge von 42 AS ergeben. Hinweise darauf, dass es sich tatsächlich um ein proteincodierendes Gen handeln könnte, gab eine Shine-Dalgarno-Sequenz, die sich in Übereinstimmung mit Literaturwerten 4 bp vor dem Startcodon befand und perfekt der Konsensussequenz 5'-AGGAGG-3' entsprach [91]. Der ORF ist in beiden Formen von RybA vollständig vorhanden. In Bakterien sind fünf Beispiele von sRNA-Genen bekannt, die gleichzeitig ein Protein codieren [32,117-120], wobei eins davon in *E. coli* zu finden ist. Das Gen der sRNA SgrS beinhaltet den ORF *sgrT*, welcher ein 43 AS langes, funktionales Peptid codiert. Die SgrS RNA und SgrT hemmen beide die Glucoseaufnahme unter Glucose-6-Phosphat-Stress, jedoch durch unterschiedliche Mechanismen [32]. Um die Rolle des ORFs in RybA in der Regulation der *aroL*- und *aroF*-Operons zu untersuchen, wurde das putative AUG durch ein Stoppcodon ersetzt. Diese Mutation hatte keinen Einfluss auf die Aktivität von RybA in Bezug auf die Regulation der beiden Operons unter Peroxid-Stress (Abb. 4.26). Andere Funktion des putativen Proteins in der Peroxid-Stressantwort können jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Durch die Bestimmung des 5'- und 3'-Endes von RybA konnte die Position im Genom von *E. coli* genauer bestimmt werden. Daraus wurde ersichtlich, dass RybA mit dem benachbarten *yliL* Gen, das auf dem antisense Strang liegt, überlappt (Abb. 5.3). Hierbei handelt es sich um ein vorhergesagtes Protein, über das keine weiteren Informationen in der Literatur zu finden sind.

Die sukzessive Verkürzung des 3'-Endes von RybA in den Plasmiden pRybA_{sh1-4} (Abb. 4.24 A) im Zuge der Charakterisierung der RybA-*yliL* mRNA Interaktion (4.4 und 5.4) führte

zu dem Auftreten verschieden großer RybA Spezies (Abb. 4.24 B). Die 206 nt Form von RybA konnte nur bei Expression von pRybA und etwas schwächer von pRybA_{sh1} beobachtet werden. In pRybA_{sh1} fehlten 69 nt am 3'-Ende von *rybA*. Somit enthielt es noch die Sequenz für die 206 nt Form. Durch die Verkürzung könnten eventuell vorhandene Prozessierungsstellen beeinflusst worden sein, wodurch die sRNA nur noch zum Teil zu der 206 nt Form prozessiert wird. In den anderen verkürzten Konstrukten (pRybA_{sh2-4}) dominierten RybA-Spezies, die von der Größe der 206 nt Form abwichen. Der Mechanismus der Prozessierung von RybA zu der 206 nt Form konnte nicht aufgeklärt werden. Da für viele sRNAs bekannt ist, dass Prozessierung von Vorläufertranskripten zu einer reifen sRNA über nucleolytische Spaltung durch RNasen verläuft, wären Studien mit verschiedenen RNase-Mutanten geeignet, für die schon gezeigt werden konnte, dass sie an der Prozessierung von sRNAs beteiligt sind. Die sRNA MicX aus *Vibrio cholerae* kommt in verschiedenen großen, biologisch aktiven Formen vor. Es konnte gezeigt werden, dass die Prozessierung zu den kleineren Formen RNase E vermittelt ist und zu einer Stabilisierung der sRNA führt [121]. Ein ähnlicher Mechanismus wäre auch für RybA denkbar, da gezeigt werden konnte, dass die RNA bei Transkription von einem konstitutiven Promotor nur unter Peroxid-Stress stabil ist. Für die sRNAs SraC, SraF und GlmZ gibt es Hinweise, dass die RNase III an der Prozessierung von größeren Spezies beteiligt ist [51]. Auch die Beteiligung der RNasen P, R und G an der Prozessierung von sRNAs konnte gezeigt werden [109].

Alternativ zu einer Prozessierung am 3'-Ende wäre auch die Transkription von *rybA* von einem anderen Promotor unter stressfreien Bedingungen denkbar, der *upstream* von dem für *rybA* bestimmten Promotor liegt. Als Beispiel sei hier die 6S RNA aus *E. coli* angeführt, die von zwei verschiedenen Promotoren transkribiert wird. Bei der 6S RNA (*ssrS*) handelt es sich um eine Protein-bindende sRNA, die die Transkription von vielen σ^{70} -abhängigen Genen in der stationären Phase reguliert, in dem sie an den Sigma-Faktor σ^{70} des RNA-Polymerase Holoenzym bindet [122]. Dadurch kann die RNA-Polymerase nicht mehr an σ^{70} -abhängige Promotoren binden und die Transkription dieser Gene wird inhibiert. Die 6S RNA wird von einem proximalen, σ^{70} -abhängigen und einem distalen Promotor, der σ^{70} und σ^S -abhängig ist, transkribiert [123]. Der alternative Sigma-Faktor σ^S ist verantwortlich für die Transkription von Genen in der stationären Phase und unter Stressbedingungen [124]. In der exponentiellen Wachstumsphase wird die 6S RNA von beiden Promotoren von der σ^{70} -RNA-Polymerase transkribiert. Bei Eintritt in die stationäre Phase wird die Expression von *ssrS* durch die σ^S -RNA-Polymerase von dem distalen Promotor gewährleistet.

Gegen eine Expression von *rybA* von verschiedenen Promotoren unter stressfreien Bedingungen und Peroxid-Stress sprechen die *primer extension* Experimente unter Verwendung der Total-RNA aus der Überexpressionsmutante $\Delta rybA$ + pRybA unter Peroxid-Stress. Northern-Blot Analysen der Überexpressionsmutante zeigten eine schwache Bande für die 322 nt Form von RybA (Abb. 4.7 A). In den *primer extension* Experimenten konnte jedoch keine größere Bande detektiert werden, die für eine Transkription von einem distalen Promotor sprechen würde.

5.4 Analyse der RybA-*yliL* Interaktion

Die Position von RybA auf dem gegenüberliegenden Strang ließ die erste Vermutung zu, dass es sich bei RybA um eine *cis*-codierte antisense RNA handelt. *Cis*-codierte antisense RNAs wurden hauptsächlich auf mobilen Elementen wie Transposons, Plasmiden oder in Bakteriophagen gefunden. Dort regulieren sie Transpositionseignisse, die Initiation der Replikation oder die Konjugationseffizienz [13]. Wie die meisten heute bekannten sRNAs gehen *cis*-codierte antisense RNAs Basenpaarungen mit ihrer Target-mRNA ein und führen dadurch zu Strukturveränderungen, Stabilisierung oder Degradierung der Target-mRNA oder Inhibierung der Translation. Die wenigen Beispiele für chromosomal-codierte antisense RNAs weisen eine Expression unter bestimmten Bedingungen auf, wie z. B. GadY in der stationären Phase oder unter Säure-Stress [19,125]. Einige der chromosomal-codierten antisense RNAs fungieren als Antitoxine, die die Translation oder Stabilität von mRNAs, die ein Toxin codieren, negativ beeinflussen [15]. Solche Antitoxin-Toxin-Paare wurden zuerst auf Plasmiden entdeckt, wo sie für die Plasmidstabilität in der Zelle verantwortlich sind. Die Rolle von chromosomal-codierten Antitoxin-Toxin-Paaren ist jedoch nicht abschließend geklärt. Beispiele wie das SOS-induzierte Toxin TisB in *E. coli* lassen jedoch auf eine Funktion bei der Stressantwort schließen [126].

Um die Auswirkung der Deletion von RybA unter Peroxid-Stress auf die Genexpression in *E. coli* zu untersuchen, wurden Microarray-Analysen durchgeführt. Der Vergleich der Genexpression zwischen $\Delta rybA$ - und *E. coli* K12 WT-Zellen ergab 12 signifikant unterschiedlich exprimierte Gene (Tab. 4.3). Dabei wurde ein Gen als signifikant reguliert angesehen wenn es i) mindestens eine *signal log ratio* (SLR) von 0,8 bei dem Vergleich mit dem Wildtyp, ii) einen p-Wert von unter 0,05 und iii) eine Differenz in der SLR von 0,8 im Vergleich zu ΔHB_428 aufwies. Das letzte Kriterium wurde eingeführt, da der Vergleich von

$\Delta rybA$ mit ΔHB_{428} eine ähnliche Regulation zahlreicher Gene aufzeigte (Tabelle 1, Anhang). Die Microarray-Analysen für $\Delta rybA$ und ΔHB_{428} wurde parallel durchgeführt, so dass die Genexpression jeweils mit denselben *E. coli* K12 WT-Proben verglichen wurde. Eine mögliche Erklärung für die vielen, ähnlich stark regulierten Gene in den beiden KO-Mutanten könnte die Kultivierung des Wildtyps geben. Für die Microarray-Analysen wurden jeweils drei unabhängigen $\Delta rybA$, ΔHB_{428} und *E. coli* K12-Kulturen parallel unter Peroxid-Stress angezogen. Trotzdem sind Abweichungen in der Kultivierung nicht auszuschließen. Um derartige Fehlerquellen zu vermeiden, wurden die in $\Delta rybA$ und ΔHB_{428} ähnlich regulierten Gene für weitere Analysen ausgeschlossen.

Als Positivkontrolle konnte die 114-fach schwächere Expression von *rybA* in $\Delta rybA$ gewertet werden. Pulvermacher *et al.* konnten in einem ähnlichen Experiment zur Identifizierung von möglichen Targets der sRNA GcvB 250-fach schwächere Expression des *gcvB* Gens in der *gcvB* KO-Mutante im Vergleich zum Wildtyp verzeichnen [66]. Neben Oligonucleotiden für die Gene und IGRs von *E. coli* enthielten die verwendeten Microarray-Chips auch Sonden für verschiedene Resistenzgene. Bedingt durch die Knock-out-Strategie konnte daher als zusätzliche Kontrolle die ca. 700-fache Verstärkung der Kan^R Expression in $\Delta rybA$ angesehen werden.

yliL war neben Kan^R in $\Delta rybA$ mit dem Faktor 5 am stärksten positiv reguliert (Tab. 4.3). Dies unterstützte die Vermutung, dass es sich bei RybA um eine *cis*-codierte antisense RNA mit *yliL* als Target handeln könnte. Die Microarray-Ergebnisse in Bezug auf die verstärkte Expression von *yliL* in $\Delta rybA$ konnten mittels Northern-Blot-Analysen unabhängig durch eine zweite Methode bestätigt werden (Abb. 4.22). In *E. coli* K12 WT-Zellen konnte die *yliL* mRNA unter Peroxid-Stress und stressfreien Bedingungen nicht nachgewiesen werden.

Die Bestimmung des 3'-Endes von RybA ergab, dass die 206 nt Form von RybA unter Peroxid-Stress eine Komplementarität von 100 nt zu dem codierenden Bereich von *yliL* aufwies. Bezieht man die 3'-UTR der *yliL* mRNA mit ein, so vergrößert sich der komplementäre Bereich sogar noch. Mit 75 nt weist die *cis*-codierte antisense RNA RatA aus *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) zu ihrer Target-mRNA *txpA* einen ähnlich großen Überlappungsbereich auf [127]. Hierbei handelt es sich um das erste gefundene Toxin-Antitoxin-Paar in *B. subtilis*. Die RatA RNA führt zu einer Degradierung der mRNA des TxpA-Toxins. Der Mechanismus ist nicht exakt untersucht, allerdings wird vermutet, dass eine RNase-vermittelte Degradierung durch die Basenpaarung der 3'-Enden der sRNA und mRNA erfolgt [127]. Es gibt keine Hinweise, dass es sich bei YliL um ein funktionelles

Toxin handelt. Weder die Deletion von *rybA* noch die Überexpression von *yliL* in Δ *rybA* führten zu einer signifikanten Beeinträchtigung der Vitalität der Zellen.

Untersuchungen zur Konservierung von *rybA* und *yliL* in verschiedenen Bakterienarten ergaben eine stärkere Konservierung von *rybA* in den untersuchten Spezies (Tab. 4.1 und Tab. 4.2). In den *Shigella*-Spezies ist RybA zu 99% identisch vorhanden. In den *Citrobacter*-Arten und in *Klebsiella pneumonia* weist nur die 206 nt Form eine hohe Identität auf, was die Bedeutung dieser Form unterstreicht. *yliL* ist ebenfalls in den *Shigella*-Spezies hoch konserviert. In den übrigen Arten (*Citrobacter sp.*, *Citrobacter youngae*, *Salmonella typhimurium*) ist die Sequenzidentität geringer oder *yliL* ist nicht konserviert (*Klebsiella pneumoniae*). Wenn es sich bei *yliL* tatsächlich um ein Target von RybA handeln würde, das eine Rolle unter Peroxid-Stress spielt, wäre eine ähnlich starke Konservierung zu erwarten gewesen. Die Beurteilung von *yliL* als Target von RybA wird durch die unbekannte Funktion des Genprodukts erschwert, da keine Hinweise auf eine mögliche Rolle in der Peroxid-Antwort vorhanden sind.

Um den Mechanismus der Regulation von *yliL* durch RybA aufzuklären, wurde die direkte Interaktion zwischen der mRNA und der sRNA untersucht. Beispiele für *cis*-codierte antisense RNAs aus der Literatur zeigen, dass Basenpaarungen der sRNA mit der Target-mRNA häufig zur Degradierung der mRNA führen [13]. Da die *yliL* mRNA nur in Abwesenheit von RybA nachzuweisen war, sollte überprüft werden, ob es sich hier auch um eine basenpaarvermittelte Degradierung handelte. Dazu wurde ein Zwei-Plasmid-System verwendet, in dem *yliL* von dem *low-copy* Plasmid pYliL₁ und verschiedenen Derivaten in Δ *rybA* exprimiert wurde (Abb. 4.23 A). Erneut konnte mittels Northern-Blot nur in Abwesenheit von *rybA* eine Expression von *yliL* nachgewiesen werden (Abb. 4.23 B). Wenn *rybA* von demselben Plasmid (pYliL₁) oder in *trans* von pRybA exprimiert wurde, konnte die *yliL* mRNA nicht mehr detektiert werden. Die Verkürzung der putativen 3'-UTR von *yliL* hatte keinen Einfluss auf die Expression von *yliL* in Abwesenheit von RybA. Auf der anderen Seite wurde die Regulation durch RybA dadurch ebenfalls nicht beeinträchtigt. Die 3'-UTR ist daher nicht essentiell für die Regulation der Genexpression von *yliL*. Die sukzessive Verkürzung des 3'-Endes von RybA lieferte einen wichtigen Hinweis auf eine über Basenpaarung vermittelte Degradierung der *yliL* mRNA. Alle verkürzten RybA-Konstrukte waren funktionell und führten zu einem Abbau der *yliL* mRNA (Abb. 4.25). Die Größe der Abbauprodukte von *yliL* korrelierte dabei mit der Verkürzung des 3'-Endes von RybA. Kürzere Versionen von RybA führten zu längeren Abbauprodukten der *yliL* mRNA. Durch

die Verkürzung wurde die Hybridisierung zwischen der mRNA und der sRNA in Richtung 3'-Ende von *yliL* verschoben. Dieser Zusammenhang ist ein Beleg für die basenpaarvermittelte Degradierung von *yliL* durch die sRNA RybA. Da weder die Verkürzung der 3'-UTR von *yliL* noch des 3'-Endes von RybA zu einer Beeinträchtigung der Regulation von *yliL* führte, scheint das Ausbilden einer sRNA-mRNA-Duplex an sich ausreichend für eine Degradierung zu sein. Um diese Annahme zu bestätigen sollten noch weitere Experimente mit verschiedenen RybA-Konstrukten durchgeführt werden, die z. B. nur das 3'-Ende oder ein Teil der inneren Sequenz von RybA beinhalten.

Die Microarray-Analysen ergaben neben *yliL* noch weitere mögliche Targets für RybA (Tab. 4.3). Im Zuge der Analyse der Regulation des *aroF*- und *aroL*-Operons durch RybA (4.5.1) wurde auch die Beteiligung von *yliL* untersucht. Die Konstruktion einer *ΔrybA-yliL* Doppel-Knock-out-Mutante konnte zeigen, dass die Regulation dieser Operons durch RybA unabhängig von *yliL* war. Durch Expression von *rybA* in *trans* von pRybA in *ΔrybA-yliL* konnte der Effekt des Knock-outs von RybA auch in Abwesenheit von *yliL* kompensiert werden (Abb. 4.27).

In der Doppelmutante *ΔrybA-yliL* konnte im Vergleich zu *ΔrybA* ein etwas abweichendes Verhältnis der 206 nt Form zu der 322 nt Form von RybA beobachtet werden (Abb. 4.28). In Abwesenheit von *yliL* wurde ein größerer Anteil der 322 nt Form von RybA beobachtet.

Dies lässt Spekulationen über eine mögliche Rolle der *yliL* mRNA bei der Prozessierung von RybA zu. Die Bildung des sRNA-mRNA-Duplex könnte zu der Rekrutierung von RNasen führen, die die dsRNA spalten, aus der die 206 nt Form der RNA hervorgeht. Diese Form der Prozessierung einer sRNA ist in der Literatur nicht beschrieben. Bekannt hingegen ist die Spaltung der bicistronischen mRNA *gadX-gadY*, die durch die sRNA GadY vermittelt wird [128]. Die sRNA ist antisense in der intergenischen Region von *gadX-gadY* codiert. Die Basenpaarung mit der mRNA führt zu einer zum Teil RNase III abhängigen Spaltung der *gadX-gadY* mRNA in der intergenischen Region. Es konnte gezeigt werden, dass diese Spaltung zur Stabilisierung der Produkte (*gadX* und *gadW* mRNA) im Vergleich zu der bicistronischen mRNA führt [128]. Der Grund für die Stabilisierung ist jedoch unklar. Außerdem scheinen neben der RNase III noch andere Faktoren bei der Spaltung der mRNA eine Rolle zu spielen, da diese auch in RNase III-defizienten Zellen zu beobachten war.

Die Frage, ob ein ähnlicher Mechanismus in der Generierung der 206 nt Form von RybA unter Beteiligung der *yliL* mRNA vorliegt, kann hier nicht beantwortet werden. Es könnte

allerdings eine Erklärung für die weniger starke Konservierung der Sequenz von *yliL* sein, die nicht mit der 206 nt Form von RybA überlappt.

5.5 Die Rolle von RybA im TyrR-Regulon

Die Bildung der aromatischen Aminosäuren L-Tryptophan, L-Tyrosin und L-Phenylalanin in *E. coli* verläuft über den Aromatenbiosyntheseweg (Abb. 5.4). Ausgehend von Erythrose-4-Phosphat aus dem Pentosephosphatweg und Phosphoenolpyruvat aus der Glycolyse wird durch die drei Isoenzyme (*aroF*, *aroG* und *aroH*) der 3-Desoxy-D-Arabino-Heptulosonat-7-Phosphat-Synthase (DHAP-Synthase) im ersten Schritt DHAP gebildet. Über Shikimat entsteht durch mehrere Zwischenschritte und unter Einbau von Phosphoenolpyruvat Chorismat. Chorismat ist das Ausgangsprodukt für die Synthese von L-Tryptophan in mehreren Schritten. Die Synthese von L-Tyrosin und L-Phenylalanin verläuft über die Bildung von Phenylpyruvat bzw. 4-Hydroxyphenylpyruvat aus Chorismat. Dieses dient außerdem als Ausgangsprodukt für die Synthese von Tetrahydrofolat, Menachinon (Vitamin K) und Ubichinon [92].



Abb. 5.4: Schematische Übersicht der Biosynthese der aromatischen Aminosäuren L-Tryptophan, L-Phenylalanin und L-Tyrosin in *E. coli* (nach [88]). Gezeigt sind die Intermediate ausgehend von Erythrose-4-Phosphat und die Enzyme, die die jeweilige Reaktion katalysieren. Mitglieder des TyrR-Regulons sind unterstrichen. Targets der sRNA RybA sind zusätzlich rot hervorgehoben.

Die Produktion der aromatischen Aminosäuren wird genauestens über verschiedene Mechanismen gesteuert. Die Regulation verläuft in der Regel über Attenuation (L-Tryptophan, L-Phenylalanin) und/oder über Transkriptionsregulatoren, die die Transkription der Gene inhibieren oder aktivieren (L-Tryptophan, L-Phenylalanin, L-Tyrosin). Zudem

werden einige Enzyme des Aromatenbiosynthesewegs über Endprodukthemmung durch eine oder mehrere der drei Aminosäuren direkt inhibiert. Die drei Isoenzyme der DHAP-Synthase werden durch Tyrosin (AroF), Phenylalanin (AroG) bzw. Tryptophan (AroH) gehemmt [129]. Ebenso werden die Chorismat-Mutase/Prephenat-Dehydratase (PheA) und die Chorismat-Mutase/Prephenat-Dehydrogenase (TyrA) durch L-Phenylalanin [130], bzw. L-Tyrosin [131] direkt gehemmt.

Tab. 5.2: Transkriptionseinheiten des TyrR-Regulons [98].

Transkriptionseinheit	Funktion	Aktivierung (A)/ Inhibierung (I)	Haupt- Cofaktor
<i>aroF, tyrA</i>	DHAP-Synthase (tyr), Chorismat-Mutase/ Prephenat-Dehydrogenase	I	Tyr
<i>aroL, aroM</i>	Shikimat-Kinase II, unbekannte Funktion	I	Tyr
<i>tyrP</i>	Tyrosin-Transporter	I A	Tyr Phe
<i>aroP</i>	Aromatische AS-Transporter	I	Phe, Tyr, Trp
<i>tyrR</i>	TyrR-Protein	I	
<i>tyrB</i>	Aminotransferase	I	Tyr
<i>mtr</i>	Tryptophan-Transporter	A	Phe oder Tyr
<i>aroG</i>	DHAP-Synthase (phe)	I	Phe
<i>folA</i>	Dihydrofolat-Reduktase	A	Tyr

Die Expression des *aroF*-Operons (*aroF, tyrA*), *aroL* (Shikimat-Kinase II) und *aroG* wird zusätzlich durch den Transkriptionsregulator TyrR mit L-Tyrosin als Cofaktor inhibiert. Die Expression des *tyrB*-Gens, das die Aminotransferase codiert, wird ebenfalls durch TyrR mit Tyrosin als Cofaktor inhibiert. Das TyrR-Regulon umfasst insgesamt 9 Transkriptionseinheiten, dessen Expression von TyrR positiv oder negativ reguliert wird (Tab. 5.2) [98] [132]. Bis auf *folA* sind alle Mitglieder des TyrR-Regulons an der Biosynthese oder dem Transport der aromatischen Aminosäuren beteiligt. TyrR reguliert die Genexpression durch Bindung an die Promotor-DNA seiner Zielgene an sogenannte TyrR-Boxen. Ob TyrR

aktivierend oder inhibierend wirkt, ist abhängig von dem Cofaktor, der Lage der RNA-Polymerasebindestelle zu den TyrR-Boxen und der Form, in der TyrR vorliegt [100]. TyrR interagiert mit allen drei Aminosäuren, ATP und der RNA-Polymerase. In Lösung liegt TyrR als Dimer vor. In Anwesenheit von ATP und Tyrosin bildet TyrR Homohexamere [99]. In Abwesenheit von Cofaktoren bindet TyrR *in vitro* nur an „starke“ TyrR-Boxen. Die Bindung an „schwache“ TyrR-Boxen benötigt die Anwesenheit von ATP, Tyrosin oder Phenylalanin [100].

Der Vergleich der Genexpression von *ΔrybA*- und *E. coli* K12 WT-Zellen unter Peroxid-Stress durch die Microarray-Experimente ergab eine ca. 2-fach verstärkte Expression des *aroL*- und *aroF*-Operons in *ΔrybA* (Tab. 4.3). Mittels Northern-Blot-Analysen konnte die verstärkte Expression unabhängig bestätigt werden (Abb. 4.29). Dabei konnte jeweils für alle Mitglieder des *aroL*- (*aroL*, *yaiA*, *aroM*,) und des *aroF*-Operons (*aroF*, *tyrA*) die verstärkte Expression in *ΔrybA* durch die Microarray-Experimente und Northern-Blot-Analysen gezeigt werden. Zusätzlich wurde auch eine verstärkte Expression der intergenischen Region zwischen *yaiA* und *aroM* beobachtet (Tab. 4.3). Für die weiteren Mitglieder des TyrR-Regulons (Tab. 5.2) konnte keine Veränderung in der Genexpression verzeichnet werden.

Die Analyse der Expression von *rybA* in *trans* in *ΔrybA* mittels Northern-Blot zeigte, dass die Regulation der beiden Operons RybA-abhängig ist (Abb. 4.26). Durch die Überexpression von *rybA* konnte der Effekt der Knock-outs kompensiert werden. *yliL* schien keinen Einfluss auf die Regulation zu haben, da die Regulation durch RybA bei Expression in *trans* auch in der Doppelmutante *Δ(rybA-yliL)* beobachtet werden konnte (Abb. 4.29). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der putative ORF in *rybA* (Abb. 4.16) nicht an der Regulation des *aroL*- und *aroF*-Operons beteiligt ist. Durch ortsspezifische Mutagenese wurde das Startcodon in dem ORF gegen ein Stoppcodon ausgetauscht. Die Mutation hatte keinen Einfluss auf die Regulation von *aroF* und *aroL* durch die sRNA RybA (Abb. 4.26). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die 206 nt Form von RybA ausreichend war, um den Effekt des Knock-outs in Bezug auf die Expression des *aroL*- und *aroF*-Operons zu kompensieren.

Die Frage, ob es sich bei der Regulation der beiden Operons durch RybA um eine direkte Interaktion der sRNA mit der mRNA handelt, konnte durch die Microarray- und Northern-Blot-Analysen nicht beantwortet werden. In diesem Falle würde RybA neben den Eigenschaften einer *cis*-codierten antisense RNA in Bezug auf die Regulation von *yliL* auch als *trans*-codierte sRNA fungieren. *Trans*-codierte sRNAs agieren ebenso wie *cis*-codierte sRNAs über Basenpaarung mit einer Target-mRNA. Im Gegensatz zu den *cis*-codierten

RNAs sind sie zumeist an einer anderen Stelle als ihr Target im Genom codiert. Auch der Bereich der Basenpaarung mit der mRNA ist nicht so extensiv. Zumeist reicht eine komplementäre Kernsequenz von 6-8 nt für die Funktion aus [12]. Für viele *trans*-codierte sRNAs ist bekannt, dass sie die Expression mehrerer Targets durch Basenpaarung mit der mRNA regulieren. So inhibieren die sRNAs OmrA/B beide die Expression verschiedener Proteine der äußeren Membran (*outer membrane proteins*, OMP) in *E. coli*, induziert durch hyperosmotischen Stress. Es konnte gezeigt werden, dass OmrA/B durch Basenpaarung mit den mRNAs der OMPs CirA, OmpT und dem *ompR-envZ*-Operon die Translation inhibiert [38]. Wie bei den meisten *trans*-codierten antisense RNAs [12] findet die Basenpaarung am 5'-Ende der mRNA statt. Dadurch wird die Ribosomenbindestelle blockiert und die Translation inhibiert. In vielen Fällen geht dies mit Destabilisierung der mRNA einher. Die Suche nach potentiellen Bindestellen von RybA auf der mRNA von *aroL* und *aroF* wurde mit dem im Internet verfügbaren Programm TargetRNA [72] durchgeführt. Hiermit wurde das Genom von *E. coli* nach möglichen Interaktionspartnern der sRNA RybA durchsucht. Dabei wurden weder im Bereich des Startcodons, der codierenden Sequenz oder des Stoppcodons Interaktionen mit der RNA von *aroL* oder *aroF* vorhergesagt. Viele *trans*-codierte antisense RNAs benötigen das RNA Chaperon Hfq, um an ihre Target-RNA zu binden bzw. ihre Funktion auszuüben [26]. Hfq verändert dabei Sekundärstrukturen in der RNA, die die Basenpaarung zwischen der mRNA und der sRNA beeinflusst und erhöht durch die Bindung an beide RNAs vermutlich deren lokale Konzentration. Wassarman *et al.* konnten in ihrer Studie keine Interaktion zwischen RybA und Hfq detektieren. All diese Befunde sprechen gegen eine Rolle von RybA als *trans*-codierte RNA in Bezug auf die Regulation des *aroL*- und *aroF*-Operons.

Bei dem *aroL*- und *aroF*-Operon könnte es sich auch um sekundäre Targets handeln. Beide Operons werden durch den Transkriptionsregulator TyrR reprimiert, der dadurch als mögliches Target von RybA in den Fokus rückte. Demnach würde die Expression von *rybA* unter Peroxid-Stress aktivierend auf TyrR in Hinblick auf die Inhibierung der Transkription des *aroL*- und *aroF*-Operons wirken. In Abwesenheit von RybA würde TyrR unter Peroxid-Stress nicht mehr aktiviert werden, was sich in einer verstärkten Expression der beiden Operons zeigt. Ein Beispiel für die Regulation eines Transkriptionsfaktors durch eine sRNA ist OxyS. Die sRNA OxyS inhibiert über Basenpaarung mit der mRNA die Translation des Transkriptionsaktivators FhlA unter Peroxid-Stress [133].

Für *tyrR* konnte in Δ *rybA* im Vergleich zum Wildtyp keine Veränderung der Expression in den Microarray-Analysen beobachtet werden. Zudem wurden auch keine potentiellen Bindestellen für RybA auf der *tyrR* mRNA gefunden. Daher kann ausgeschlossen werden, dass RybA die Stabilität der *tyrR* mRNA negativ oder positiv beeinflusst. Außerdem konnte über die Microarray-Analysen gezeigt werden, dass alle anderen Transkriptionseinheiten des TyrR-Regulons nicht durch die Deletion von RybA beeinflusst worden sind. Bei einer Veränderung der TyrR-Proteinkonzentration wäre wahrscheinlich die Expression aller Mitglieder der Regulons beeinflusst worden. *E. coli* K12-Zellen, in denen die *frameshift* Mutation *tyrR366* einen vorzeitigen Translationsabbruch von *tyrR* verursacht (TyrR⁻-Zellen), weisen einen vollständigen Verlust der TyrR-Funktion auf [81], von der alle Mitglieder des Regulons betroffen sind [100]. Wenn TyrR unter Peroxid-Stress über RybA aktiviert wird, stellt sich die Frage, warum nur das *aroL*- und *aroF*-Operon davon betroffen sind. Beide Operons codieren Enzyme des Biosynthesewegs der aromatischen Aminosäuren L-Tyrosin, L-Phenylalanin und L-Tryptophan (Abb. 5.4). Bis auf *tyrB* (Aminotransferase) spielen alle anderen Mitglieder des TyrR-Regulons keine Rolle für den Syntheseweg, sondern sind fast alle am Transport dieser Aminosäuren beteiligt (Tab. 5.2). TyrB katalysiert den letzten Schritt in der Biosynthese von Tyrosin und Phenylalanin (Abb. 5.4) und zeigte kein verändertes Expressionslevel in Δ *rybA*. Ein weiterer auffälliger Unterschied besteht in der Anordnung der TyrR-Boxen in der Promotor-Region von *aroL* und *aroF* (Abb. 5.5). Soweit bekannt ist, sind hier als einziges 3 TyrR-Boxen vorhanden, wobei es sich jeweils um zwei „starke“ und eine schwache TyrR-Box handelt [98].

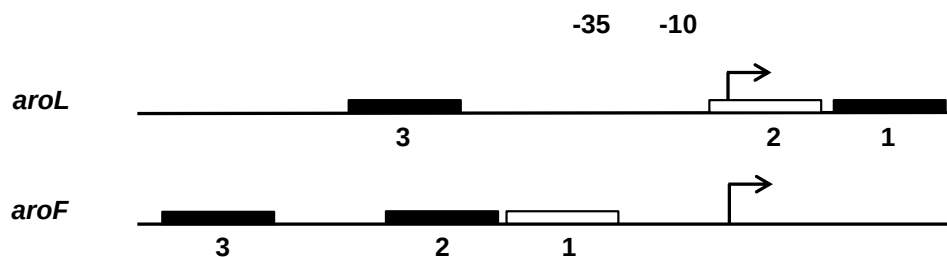


Abb. 5.5: Anordnung der TyrR-Boxen in der Promotorregion von *aroL* und *aroF* (nach [100]). „Starke“ Boxen sind schwarz, „schwache“ Boxen in weiß dargestellt.

Die anderen Mitglieder des Regulons besitzen eine oder zwei TyrR-Boxen in ihrer Promotorregion. Neben *tyrP*, *aroG* und *tyrR* können *aroL* und *aroF* beide Cofaktor-unabhängig durch TyrR inhibiert werden [134,135]. Verantwortlich ist hierfür vermutlich die

Bindung von TyrR an die „starke“ Box, die *upstream* der -35-Region liegt. Dadurch interferiert das Protein mit der RNA-Polymerase. Der Grund für die Cofaktor-unabhängige Regulation ist unbekannt. Spekulationen verweisen auf die Möglichkeit einer Regulation unter noch nicht identifizierten physiologischen Bedingungen [100].

Der Vergleich der Expression des *aroF*-Operons mittels Northern-Blot in dem TyrR⁻-Stamm unter stressfreien Bedingungen und in Δ *rybA* unter Peroxid-Stress zeigte, dass die Deletion von RybA den gleichen Effekt wie die Null-Mutation *tyrR366* aufwies (Abb. 4.31). Die Kultivierung der TyrR⁻-Mutante unter Peroxid-Stress zeigte trotz Anwesenheit von RybA keine Reduktion der Expression des *aroF*-Operons. Dies liefert einen starken Hinweis auf die Beteiligung von TyrR an der RybA-vermittelten Regulation des Operons unter Peroxid-Stress. Die Deletion von RybA hatte generell keinen Einfluss auf die Funktion des TyrR-Proteins als Transkriptionsregulator. Unter stressfreien Bedingungen wurde in Δ *rybA*-Zellen keine Veränderung der Expression des *aroL* und *aroF*-Operons im Vergleich zu *E. coli* K12-WT-Zellen verzeichnet (Abb. 4.32). Die verstärkte Expression trat nur unter Peroxid-Stress auf. Zudem konnte durch die Zugabe von Tyrosin in das Kulturmedium gezeigt werden, dass die Tyrosin-abhängige Inhibierung der Transkription durch TyrR durch die Deletion von *rybA* nicht beeinflusst wurde (Abb. 4.32). Die Zugabe von Phenylalanin hatte in Übereinstimmung mit der Literatur [98] keinen Einfluss auf die Expression der beiden Operons.

Um die TyrR-Abhängigkeit der Regulation des *aroL*- und *aroF*-Operons zu belegen wurde eine TyrR⁻/ Δ *rybA*-Doppelmutante hergestellt. Die Expression von RybA in *trans* von pRybA in TyrR⁻/ Δ *rybA* konnte den Effekt der verstärkten Expression der Operons nicht kompensieren (Abb. 4.33). Weiterführende Experimente durch gleichzeitige Expression von *rybA* und *tyrR* in *trans* in der Doppelmutante könnten die Rolle von TyrR bei der RybA-abhängigen Regulation unter Peroxid-Stress bestätigen.

In der Literatur sind einige Beispiele von sRNAs bekannt, die durch Bindung an ein Protein dessen Funktion inhibieren. Die sRNA CsrB bindet an das RNA-bindende Protein CsrA und verhindert dadurch die Bindung von CsrA an seine Target-mRNA [30]. Die 6S RNA imitiert einen offenen Promotorkomplex und bindet an die σ^{70} -RNA-Polymerase von *E. coli* in der stationären Phase. Dadurch kann die RNA-Polymerase nicht mehr an alle σ^{70} -abhängige Promotoren binden [7]. Beispiele für die Aktivierung eines Proteins durch die Bindung einer sRNA sind bis heute nicht bekannt. Um eine mögliche Aktivierung des TyrR-Proteins durch Bindung von RybA zu untersuchen, wurde TyrR erfolgreich in *E. coli* BL21 Star-Zellen überproduziert und mittels Nickel-Affinitätschromatographie und

Anionenaustauschchromatographie gereinigt (Abb. 4.37). Zur Überprüfung der Aktivität wurden *gel shift*-Assays mit der *aroF* Promotor-DNA durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass TyrR an den Promotor von *aroF* in An- und Abwesenheit der beiden Cofaktoren ATP und Tyrosin bindet (Abb. 4.39). In Anwesenheit von ATP und Tyrosin konnte ein größerer *shift* der radioaktiv markierten *aroF*-DNA beobachtet werden im Gegensatz zu dem *shift* ohne Cofaktoren. Dies ist zum einen vermutlich auf die durch ATP und Tyrosin stimulierte Hexamerisierung des Proteins und die damit verbundene Zunahme des Molekulargewichtes zurückzuführen. Die Tyrosin-induzierte Multimerisierung führt außerdem dazu, dass zwei Hexamere an die insgesamt drei TyrR-Boxen binden und das Molekulargewicht des Protein-DNA-Komplexes weiter erhöhen [136].

Die Analyse der Promotorregion von *rybA* lieferte Hinweise auf das Vorhandensein einer möglichen TyrR-Box (Abb. 4.38). Die Sequenz dieser putativen TyrR-Bindestelle ähnelte stark der Konsensussequenz der TyrR-Boxen. Um eine mögliche Regulation der Expression von RybA durch TyrR zu untersuchen wurden *gel shift*-Experimente mit der Promotor-Region von *rybA* und dem gereinigten TyrR-Protein analog zu den *gel shifts* mit der *aroF*-DNA durchgeführt. Weder in An- noch in Abwesenheit von ATP und Tyrosin konnte eine spezifische Bindung von TyrR an die *rybA*-Promotor-DNA nachgewiesen werden (Abb. 4.39). Northern-Blot-Analysen zeigten außerdem keine Veränderung der Expression von *rybA* unter stressfreien Bedingungen und Peroxid-Stress in dem TyrR⁻-Stamm im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 4.31). Somit gibt es keine Hinweise auf eine TyrR-vermittelte Regulation der *rybA* Expression und die potentielle Bindestelle konnte nicht bestätigt werden.

Gel shift-Assays mit der *in vitro* transkribierten 206 nt Form von RybA und dem TyrR-Protein konnten *in vitro* keine spezifische Bindung von RybA an TyrR zeigen (Abb. 4.41). Ohne Zugabe von Tyrosin und ATP wurde die RybA RNA durch Zugabe von Kompetitor-RNA von TyrR verdrängt. In Anwesenheit der beiden Cofaktoren konnte die RNA bei höheren Proteinkonzentrationen durch Kompetitor-Zugabe nicht von dem Protein verdrängt werden. Jedoch zeigte eine Kontroll-RNA das gleiche Bindeverhalten, was auf eine unspezifische RNA-Bindung von TyrR unter den gewählten Bedingungen hinwies. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass für eine spezifische Bindung von RybA an TyrR andere Faktoren benötigt werden, die *in vivo* unter Peroxid-Stress vorhanden sind. Um solche Faktoren zu berücksichtigen, sollte die mögliche Interaktion zwischen RybA und TyrR *in vivo* untersucht werden. Hierfür würden sich Methoden eignen, bei denen entweder das Protein oder die RNA mit einem *Tag* in *E. coli* produziert wird und Interaktionspartner anschließend

über eine Affinitätsreinigung isoliert werden können. Die sRNA CsrB wurde als Interaktionspartner des CsrA-Proteins durch Isolierung des Ribonucleoprotein-Komplexes identifiziert [31]. Schroeder *et al.* konnten über die Fusion eines Streptavidin-bindenden Aptamers mit verschiedenen sRNAs aus *E. coli* unterschiedliche Protein-Interaktionspartner isolieren [114]. Neben der direkten Interaktion zwischen RybA und TyrR ist auch eine Regulation durch RybA über andere noch nicht identifizierte Faktoren denkbar. Zum Beispiel könnten Faktoren, die die Funktion von TyrR unter Peroxid-Stress inhibieren, durch die sRNA RybA unschädlich gemacht werden. Kandidaten für solche Faktoren wären z. B. Oxidationsprodukte der Aminosäure Tyrosin. Solche Oxidationsprodukte könnten anstelle von Tyrosin mit TyrR interagieren und dessen Aktivität in Bezug auf die Regulation des *aroL*- und *aroF*-Operons inhibieren. Tyrosin kann durch verschiedene ROS (*reactive oxygen species*) oxidiert werden. Bekannte Oxidationsprodukte sind 3,4-Dihydroxy- (DOPA) Derivate oder Bityrosin. Die Oxidation von Phenylalanin führt zu *ortho*- und *meta*-Tyrosin-Derivaten [137].

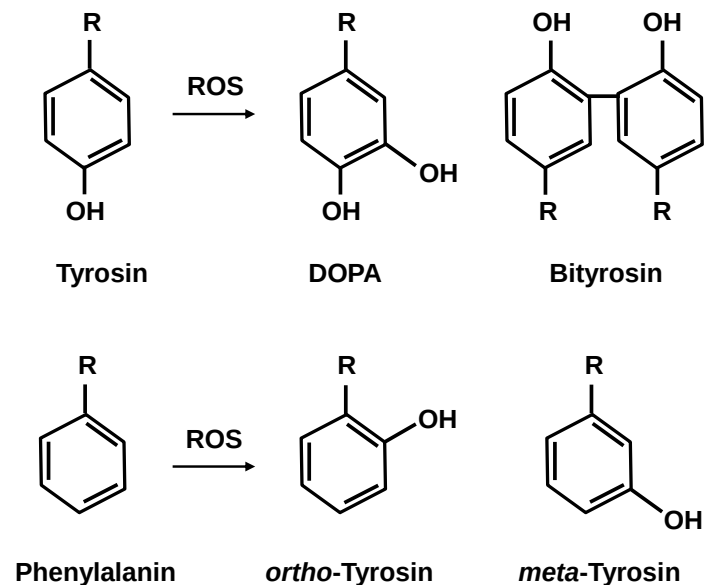


Abb. 5.6: Oxidation von Tyrosin und Phenylalanin durch *reactive oxygen species* (ROS) (nach [137]).

Dass RNA kleine organische Moleküle binden, kann am Beispiel der *riboswitches* verdeutlicht werden. Hierbei handelt es sich um *cis*-regulatorische RNA-Strukturen, die in der 5'-UTR von mRNAs zu finden sind und über die Bindung von Metaboliten die Expression regulieren. In Bakterien dienen sie als Sensor von Metaboliten, was gegebenenfalls zu einer Anpassung an die vorhandenen Bedingungen durch Veränderung der Expression relevanter

Gene führt [138]. *Riboswitches* bestehen aus einer Aptamer-Region und einer Expressions-Plattform. Die Aptamer-Region ist für die Bindung der Metabolite zuständig, was zu einer Strukturveränderung der Expressions-Plattform führt. Diese Strukturveränderung kann positiven oder negativen Einfluss auf die Transkription oder Translation der zugehörigen mRNA haben. Zurzeit sind zwei *riboswitches* bekannt, die an Aminosäuren binden. Der Lysin-*riboswitch* ist in verschiedenen mRNAs von Proteinen zu finden, die für die Biosynthese und den Transport von Lysin verantwortlich sind [139]. Der Glycin-*riboswitch* aktiviert bei hohen Glycinkonzentrationen die Expression von Genen, die am Glycin-Katabolismus und Transport aus der Zelle beteiligt sind [138]. Möglicherweise ist die sRNA RybA in der Lage, Oxidationsprodukte von Tyrosin und/oder Phenylalanin zu binden und dadurch eine Bindung an TyrR zu verhindern. Soweit bekannt, gibt es allerdings keine Beispiele in der Literatur, die *trans*-codierte RNAs beschreiben, die kleine organische Moleküle binden und dadurch einen regulatorischen Effekt ausüben. Um diese Hypothese zu überprüfen, müsste zunächst die Wirkung von den oben beschriebenen Oxidationsprodukten von Phenylalanin und Tyrosin auf die Funktion von TyrR untersucht werden. Bindungsstudien von TyrR an die Promotor-DNA von *aroF* unter Anwesenheit dieser Oxidationsprodukte anstelle von Tyrosin mittels *gel shift*-Assays könnten Hinweise auf eine inhibierende Wirkung geben. Weiterhin sollten mögliche Interaktionen der sRNA RybA mit den Oxidationsprodukten der Aminosäuren untersucht werden. Hierfür würde sich die Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC, *isothermal titration calorimetry*) eignen. Diese Methode erlaubt u. a. die Charakterisierung von Interaktionen zwischen kleinen Molekülen, Proteinen, Nucleinsäuren oder Lipiden. Das Prinzip beruht auf der Messung von Wärmeenergie, die durch Bindung zweier Moleküle frei oder verbraucht wird. Die ITC wurde schon erfolgreich zur Charakterisierung der Lysin-*riboswitches* - Lysin Interaktion [140] und anderer *riboswitches* eingesetzt [141-143].

Es konnte gezeigt werden, dass die Expression wichtiger Gene für die Biosynthese der aromatischen Aminosäuren unter Peroxid-Stress in *E. coli* K12 Wildtyp-Zellen inhibiert wird (Abb. 4.32). Studien mit dem TyrR⁻-Stamm zeigten, dass die Regulation von dem Transkriptionsregulator TyrR abhängig ist (Abb. 4.31). Die Deletion der sRNA RybA führte ebenfalls zu einer verstärkten Expression dieser Gene unter Peroxid-Stress, nicht aber unter stressfreien Bedingungen (Abb. 4.32).

Über die physiologische Rolle der Inhibierung der Expression der Schlüsseltene unter Peroxid-Stress in der Aromatenbiosynthese lässt sich nur spekulieren. Die Kultivierung von

E. coli in MOPS Minimalmedium erforderte die autotrophe Synthese aller Aminosäuren. Die Inhibierung der Shikimat-Kinase II (*aroL*) und DHAP-Synthase (*aroF*) in MOPS Minimalmedium unter Peroxid-Stress lässt eine geringere Synthese der Intermediate Shikimat und Chorismat vermuten. Die Chorismat-Mutase/Prephenat-Dehydrogenase (*tyrA*) katalysiert die beiden vorletzten Schritte der Biosynthese von Tyrosin (Abb. 5.4). Dies lässt vermuten, dass vor allem die Synthese von Tyrosin unter Peroxid-Stress beeinflusst wird. Um dies zu überprüfen, sollten zukünftige Experimente die Quantifizierung der aromatischen Aminosäuren unter Peroxid-Stress und stressfreien Bedingungen in *E. coli* K12 WT und Δ *rybA*-Zellen beinhalten. Zusätzlich sollte untersucht werden, ob Enzyme in der Synthese von Phenylalanin und Tryptophan nach dem Verzweigungspunkt Chorismat durch Peroxid-Stress beeinflusst werden. Die Oxidation von Tyrosin oder Phenylalanin durch ROS könnte zu Schädigungen durch die entstehenden Produkte führen. Niedrigere Konzentrationen dieser Aminosäuren unter Peroxid-Stress würden das Entstehen solcher Produkte vermeiden.

Chorismat ist ein wichtiges Zwischenprodukt in der Biosynthese der aromatischen Aminosäuren. Daneben dient Chorismat als Ausgangsprodukt für die Synthesewege von Ubichinon, Tetrahydrofolat und Menachinon [92]. Wie die Verteilung von Chorismat auf die verschiedenen Synthesewege reguliert wird, ist kaum erforscht [132]. Ubichinon hat eine antioxidative Wirkung in *E. coli*. Zellen, mit einem Defekt in der Ubichinon-Biosynthese, weisen höhere intrazelluläre Konzentrationen an H_2O_2 und eine erhöhte Sensitivität gegenüber oxidativem Stress auf [144]. Möglicherweise wird durch die Inhibierung der Genexpression von *aroL*, *aroF* und *tyrA* unter Peroxid-Stress mehr Chorismat für die Synthese von Ubichinon bereitgestellt. Das Vorhandensein der drei Isoenzyme der DHAP-Synthase (AroF, AroG und AroH) und der zwei Isoenzyme der Shikimat-Kinase (AroK und AroL) könnte dabei den Flux zur Synthese von Chorismat aufrechterhalten, wenn die Produktion von jeweils einem Isoenzym gehemmt wird.

6 Ausblick

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung der sRNAs HB_428 und RybA unter Peroxid-Stress in *E. coli*. Die Aufklärung der Funktion von sRNAs trägt zum Verständnis der komplexen regulatorischen Schaltkreise und der Bewältigung von Stressbedingungen in Bakterien bei.

Für beide sRNAs konnte gezeigt werden, dass sie eine Rolle in der Peroxid-Stressantwort spielen. Die Deletion der sRNA HB_428 in *E. coli* K12-Zellen führte zu einer Beeinträchtigung des Wachstums unter Peroxid-Stress, was die Rolle dieser sRNA unter dieser Bedingung unterstreicht. Mit Hilfe von Microarray-Analysen sollten potentielle Targets von HB_428 ermittelt werden. Die Northern-Blot-Analyse einiger Gene, deren Expression einen Unterschied in Δ HB_428-Zellen im Vergleich zum Wildtyp aufwies, konnten die Microarray-Ergebnisse nicht bestätigen. Weiterführende Experimente sollten sich zunächst auf Untersuchung der übrigen Gene konzentrieren, die in Δ HB_428 eine veränderte Expression aufwiesen. Alternativ könnte die Genexpression der HB_428-Überexpressionsmutante mit dem Wildtyp über Microarrays zur Target-Identifizierung verwendet werden. Sollte es sich bei HB_428 um eine Protein-bindende sRNA handeln, wären Affinitätsreinigungen geeignet, bei denen mögliche Interaktionspartner *in vivo* isoliert werden könnten [68,114]. Zusätzlich sollte in Betracht gezogen werden die Untersuchungen von HB_428 auf die anderen Bedingungen auszuweiten, bei denen die sRNA verstärkt transkribiert wird. Um die Charakterisierung von HB_428 abzuschließen sollte das genaue 3'-Ende durch Verwendung anderer Methoden wie die des *Mung Bean nuclease mapping* [114] bestimmt werden.

Die Detektion verschieden großer Spezies für HB_428 und RybA ließ auf eine Prozessierung durch RNasen schließen. Untersuchungen der sRNAs in verschiedenen RNase-defizienten Stämmen könnten hilfreich bei der Aufklärung des Mechanismus sein.

Aus der Charakterisierung der sRNA RybA folgte, dass es sich wahrscheinlich um eine *cis*-codierte antisense RNA mit *yliL* als Zielgen handelt. Die Rolle der Regulation von *yliL* konnte jedoch nicht geklärt werden, da die Funktion des Proteins unbekannt ist. Es konnte allerdings ausgeschlossen werden, dass *yliL* an der Regulation weiterer RybA Targets beteiligt ist.

Bei diesen Targets handelt es sich um die Mitglieder des *aroL*- und *aroF*-Operons, die Schlüsselenzyme der aromatischen Aminosäurebiosynthese codieren. Unter Peroxid-Stress wird die Expression dieser Gene RybA-abhängig inhibiert. RybA ist die erste sRNA, bei der

eine Rolle bei der Regulation der Biosynthese von Aminosäuren nachgewiesen werden konnte. Der Schlüssel zum Verständnis dieser Regulation liegt in der Aufklärung des Mechanismus. Es konnte gezeigt werden, dass die Regulation von dem Transkriptionsregulator TyrR abhängig ist. Der Zusammenhang zwischen der sRNA und TyrR blieb jedoch unklar. Es gab keine Hinweise, dass RybA als *trans*-codierte antisense RNA auf die Expression von TyrR Einfluss hat. Untersuchungen des TyrR-Levels auf Proteinebene mit einem spezifischen Antikörper könnte diese Möglichkeit abschließend klären. *In vitro* Bindungsstudien der RNA RybA und TyrR zeigten unter den gewählten Bedingungen keine spezifische Bindung der RNA an das Protein. Um den Einfluss anderer Faktoren, die für eine spezifische Bindung notwendig sein könnten, zu berücksichtigen, könnte die Interaktion *in vivo* untersucht werden. Methoden zu *in vivo* Untersuchungen von sRNA-Protein-Interaktionen beinhalten die Fusion des Proteins oder der sRNA mit einem geeigneten *Tag*. Schroeder *et al.* konnten durch Fusion von sRNAs mit dem Streptavidin-bindenden Aptamer erfolgreich Protein-Interaktionspartner in *E. coli* identifizieren [114]. Nach Immobilisierung der sRNA auf einer Streptavidin-Säule wurde diese mit Zellextrakt inkubiert. Die Identifikation der Interaktionspartner erfolgte mittels Massenspektrometrie. Alternativ wären Methoden denkbar, bei denen sRNA-Fusionskonstrukte in der Zelle produziert werden und anschließend über Affinitätsreinigung zusammen mit möglichen Interaktionspartnern isoliert werden. Collins *et al.* haben nach diesem Prinzip die Methode RNA *affinity in tandem* (RAT) entwickelt und erfolgreich zur Isolierung des 7SK Ribonucleoprotein-Komplexes aus humanen Zellen angewandt [145].

Eine Strukturanalyse der sRNA RybA könnte ebenfalls zu der Aufklärung des Mechanismus beitragen. Die Identifikation von Strukturmotiven könnte bei einem Vergleich mit Motiven bekannter sRNAs Hinweise auf die Funktionalität oder mögliche Interaktionsstellen mit z. B. Proteinen liefern. Hierfür würde sich z. B. die RNA-SHAPE Chemie (*selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension chemistry*) eignen, bei der gleichzeitig Informationen über Sekundär- und Tertiärstrukturen in RNA-Molekülen erhalten werden [146].

Um die physiologische Rolle der Regulation von Schlüsselenzymen in der Aromatenbiosynthese näher zu untersuchen, sollten zunächst die Auswirkungen auf die intrazellulären Konzentrationen der Intermediate und Endprodukte des Synthesewegs analysiert werden. Von besonderem Interesse wäre dabei der Vergleich der Ubichinon-Konzentration in *E. coli* K12 WT und Δ rybA-Zellen unter Peroxid-Stress. Eine verminderte

Ubichinon-Konzentration in $\Delta rybA$ -Zellen könnte die Inhibierung der Biosynthese der aromatischen Aminosäuren zugunsten der antioxidativen Wirkung von Ubichinon erklären. Interessant wäre es auch, den Einfluss von Peroxid-Stress auf die Oxidation von freien aromatischen Aminosäuren zu untersuchen. So könnte z. B. die Wirkung von Oxidationsprodukten freier aromatischer Aminosäuren in der Bakterienzelle untersucht werden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass L-DOPA *in vitro* von der *E. coli* Translationsmaschinerie in Proteine eingebaut wird. Dies führte zu falsch gefalteten Proteinen oder Aggregationen [147]. Beim Menschen wird die Oxidation von Tyrosin zu L-DOPA und der Einbau von L-DOPA in neu-synthetisierte Protein in Verbindung mit Krankheiten wie Arteriosklerose und der Kataraktbildung (grauer Star) gebracht [148]. Inwieweit L-DOPA durch Oxidation in *E. coli* entsteht und *in vivo* in Proteine eingebaut wird, ist nicht bekannt und bietet daher die Grundlage für weitere Experimente zur Analyse von Schädigungen, die durch oxidativen Stress hervorgerufen werden.

Literaturverzeichnis

1. Storz G, Altuvia S, Wassarman KM: **An abundance of RNA regulators.** *Annu Rev Biochem* 2005, **74**:199-217.
2. Bachellerie JP, Cavaille J, Huttenhofer A: **The expanding snoRNA world.** *Biochimie* 2002, **84**:775-790.
3. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC: **Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*.** *Nature* 1998, **391**:806-811.
4. Hamilton AJ, Baulcombe DC: **A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants.** *Science* 1999, **286**:950-952.
5. Paroo Z, Liu Q, Wang X: **Biochemical mechanisms of the RNA-induced silencing complex.** *Cell Res* 2007, **17**:187-194.
6. Hindley J: **Fractionation of 32P-labelled ribonucleic acids on polyacrylamide gels and their characterization by fingerprinting.** *J Mol Biol* 1967, **30**:125-136.
7. Wassarman KM: **6S RNA: a small RNA regulator of transcription.** *Curr Opin Microbiol* 2007, **10**:164-168.
8. Waters LS, Storz G: **Regulatory RNAs in bacteria.** *Cell* 2009, **136**:615-628.
9. van der Oost J, Jore MM, Westra ER, Lundgren M, Brouns SJ: **CRISPR-based adaptive and heritable immunity in prokaryotes.** *Trends Biochem Sci* 2009, **34**:401-407.
10. Frohlich KS, Vogel J: **Activation of gene expression by small RNA.** *Curr Opin Microbiol* 2009, **12**:674-682.
11. Livny J, Waldor MK: **Identification of small RNAs in diverse bacterial species.** *Curr Opin Microbiol* 2007, **10**:96-101.
12. Gottesman S, Storz G: **Bacterial Small RNA Regulators: Versatile Roles and Rapidly Evolving Variations.** *Cold Spring Harb Perspect Biol.*
13. Brantl S: **Regulatory mechanisms employed by cis-encoded antisense RNAs.** *Curr Opin Microbiol* 2007, **10**:102-109.
14. Eguchi Y, Itoh T, Tomizawa J: **Antisense RNA.** *Annu Rev Biochem* 1991, **60**:631-652.
15. Gerdes K, Wagner EG: **RNA antitoxins.** *Curr Opin Microbiol* 2007, **10**:117-124.
16. Thisted T, Gerdes K: **Mechanism of post-segregational killing by the hok/sok system of plasmid R1. Sok antisense RNA regulates hok gene expression indirectly through the overlapping mok gene.** *J Mol Biol* 1992, **223**:41-54.
17. Fozo EM, Hemm MR, Storz G: **Small toxic proteins and the antisense RNAs that repress them.** *Microbiol Mol Biol Rev* 2008, **72**:579-589, Table of Contents.
18. Kawano M, Aravind L, Storz G: **An antisense RNA controls synthesis of an SOS-induced toxin evolved from an antitoxin.** *Mol Microbiol* 2007, **64**:738-754.
19. Opdyke JA, Kang JG, Storz G: **GadY, a small-RNA regulator of acid response genes in *Escherichia coli*.** *J Bacteriol* 2004, **186**:6698-6705.
20. Tramonti A, De Canio M, De Biase D: **GadX/GadW-dependent regulation of the *Escherichia coli* acid fitness island: transcriptional control at the gadY-gadW divergent promoters and identification of four novel 42 bp GadX/GadW-specific binding sites.** *Mol Microbiol* 2008, **70**:965-982.
21. Gottesman S: **Micros for microbes: non-coding regulatory RNAs in bacteria.** *Trends Genet* 2005, **21**:399-404.

22. Masse E, Escorcia FE, Gottesman S: **Coupled degradation of a small regulatory RNA and its mRNA targets in Escherichia coli.** *Genes Dev* 2003, **17**:2374-2383.
23. Morita T, Mochizuki Y, Aiba H: **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* 2006, **103**:4858-4863.
24. Sledjeski DD, Gupta A, Gottesman S: **The small RNA, DsrA, is essential for the low temperature expression of RpoS during exponential growth in Escherichia coli.** *EMBO J* 1996, **15**:3993-4000.
25. Majdalani N, Cuning C, Sledjeski D, Elliott T, Gottesman S: **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* 1998, **95**:12462-12467.
26. Brennan RG, Link TM: **Hfq structure, function and ligand binding.** *Curr Opin Microbiol* 2007, **10**:125-133.
27. Kawamoto H, Koide Y, Morita T, Aiba H: **Base-pairing requirement for RNA silencing by a bacterial small RNA and acceleration of duplex formation by Hfq.** *Mol Microbiol* 2006, **61**:1013-1022.
28. Storz G, Opdyke JA, Zhang A: **Controlling mRNA stability and translation with small, noncoding RNAs.** *Curr Opin Microbiol* 2004, **7**:140-144.
29. Urbanowski ML, Stauffer LT, Stauffer GV: **The gcvB gene encodes a small untranslated RNA involved in expression of the dipeptide and oligopeptide transport systems in Escherichia coli.** *Mol Microbiol* 2000, **37**:856-868.
30. Babitzke P, Romeo T: **CsrB sRNA family: sequestration of RNA-binding regulatory proteins.** *Curr Opin Microbiol* 2007, **10**:156-163.
31. Liu MY, Gui G, Wei B, Preston JF, 3rd, Oakford L, Yuksel U, Giedroc DP, Romeo T: **The RNA molecule CsrB binds to the global regulatory protein CsrA and antagonizes its activity in Escherichia coli.** *J Biol Chem* 1997, **272**:17502-17510.
32. Wadler CS, Vanderpool CK: **A dual function for a bacterial small RNA: SgrS performs base pairing-dependent regulation and encodes a functional polypeptide.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**:20454-20459.
33. Coyer J, Andersen J, Forst SA, Inouye M, Delihhas N: **micF RNA in ompB mutants of Escherichia coli: different pathways regulate micF RNA levels in response to osmolarity and temperature change.** *J Bacteriol* 1990, **172**:4143-4150.
34. Chen S, Zhang A, Blyn LB, Storz G: **MicC, a second small-RNA regulator of Omp protein expression in Escherichia coli.** *J Bacteriol* 2004, **186**:6689-6697.
35. Masse E, Salvail H, Desnoyers G, Arguin M: **Small RNAs controlling iron metabolism.** *Curr Opin Microbiol* 2007, **10**:140-145.
36. Benjamin JA, Desnoyers G, Morissette A, Salvail H, Masse E: **Dealing with oxidative stress and iron starvation in microorganisms: an overview.** *Can J Physiol Pharmacol* **88**:264-272.
37. De Lay N, Gottesman S: **The Crp-activated small noncoding regulatory RNA CyaR (RyeE) links nutritional status to group behavior.** *J Bacteriol* 2009, **191**:461-476.
38. Guillier M, Gottesman S: **The 5' end of two redundant sRNAs is involved in the regulation of multiple targets, including their own regulator.** *Nucleic Acids Res* 2008, **36**:6781-6794.
39. Altuvia S, Weinstein-Fischer D, Zhang A, Postow L, Storz G: **A small, stable RNA induced by oxidative stress: role as a pleiotropic regulator and antimutator.** *Cell* 1997, **90**:43-53.

40. Zheng M, Wang X, Templeton LJ, Smulski DR, LaRossa RA, Storz G: **DNA microarray-mediated transcriptional profiling of the Escherichia coli response to hydrogen peroxide.** *J Bacteriol* 2001, **183**:4562-4570.
41. Schlensog V, Lutz S, Bock A: **Purification and DNA-binding properties of FHLA, the transcriptional activator of the formate hydrogenlyase system from Escherichia coli.** *J Biol Chem* 1994, **269**:19590-19596.
42. Altuvia S, Zhang A, Argaman L, Tiwari A, Storz G: **The Escherichia coli OxyS regulatory RNA represses fhlA translation by blocking ribosome binding.** *EMBO J* 1998, **17**:6069-6075.
43. Vogel J, Papenfort K: **Small non-coding RNAs and the bacterial outer membrane.** *Curr Opin Microbiol* 2006, **9**:605-611.
44. De la Cruz MA, Calva E: **The Complexities of Porin Genetic Regulation.** *J Mol Microbiol Biotechnol* **18**:24-36.
45. Griffin BE: **Separation of 32P-labelled ribonucleic acid components. The use of polyethylenimine-cellulose (TLC) as a second dimension in separating oligoribonucleotides of '4.5 S' and 5 S from E. coli.** *FEBS Lett* 1971, **15**:165-168.
46. Ikemura T, Dahlberg JE: **Small ribonucleic acids of Escherichia coli. I. Characterization by polyacrylamide gel electrophoresis and fingerprint analysis.** *J Biol Chem* 1973, **248**:5024-5032.
47. Jain SK, Gurevitz M, Apirion D: **A small RNA that complements mutants in the RNA processing enzyme ribonuclease P.** *J Mol Biol* 1982, **162**:515-533.
48. Gottesman S: **The small RNA regulators of Escherichia coli: roles and mechanisms*.** *Annu Rev Microbiol* 2004, **58**:303-328.
49. Romeo T: **Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non-coding RNA molecule CsrB.** *Mol Microbiol* 1998, **29**:1321-1330.
50. Wassarman KM, Zhang A, Storz G: **Small RNAs in Escherichia coli.** *Trends Microbiol* 1999, **7**:37-45.
51. Argaman L, Hershberg R, Vogel J, Bejerano G, Wagner EG, Margalit H, Altuvia S: **Novel small RNA-encoding genes in the intergenic regions of Escherichia coli.** *Curr Biol* 2001, **11**:941-950.
52. Carter RJ, Dubchak I, Holbrook SR: **A computational approach to identify genes for functional RNAs in genomic sequences.** *Nucleic Acids Res* 2001, **29**:3928-3938.
53. Wassarman KM, Repoila F, Rosenow C, Storz G, Gottesman S: **Identification of novel small RNAs using comparative genomics and microarrays.** *Genes Dev* 2001, **15**:1637-1651.
54. Rivas E, Klein RJ, Jones TA, Eddy SR: **Computational identification of noncoding RNAs in E. coli by comparative genomics.** *Curr Biol* 2001, **11**:1369-1373.
55. Chen S, Lesnik EA, Hall TA, Sampath R, Griffey RH, Ecker DJ, Blyn LB: **A bioinformatics based approach to discover small RNA genes in the Escherichia coli genome.** *Biosystems* 2002, **65**:157-177.
56. Tjaden B, Saxena RM, Stolyar S, Haynor DR, Kolker E, Rosenow C: **Transcriptome analysis of Escherichia coli using high-density oligonucleotide probe arrays.** *Nucleic Acids Res* 2002, **30**:3732-3738.
57. Huttenhofer A, Kiefmann M, Meier-Ewert S, O'Brien J, Lehrach H, Bachellerie JP, Brosius J: **RNomics: an experimental approach that identifies 201 candidates for novel, small, non-messenger RNAs in mouse.** *EMBO J* 2001, **20**:2943-2953.
58. Marker C, Zemann A, Terhorst T, Kiefmann M, Kastenmayer JP, Green P, Bachellerie JP, Brosius J, Huttenhofer A: **Experimental RNomics: identification of 140**

- candidates for small non-messenger RNAs in the plant *Arabidopsis thaliana*.** *Curr Biol* 2002, **12**:2002-2013.
59. Tang TH, Bachellerie JP, Rozhdestvensky T, Bortolin ML, Huber H, Drungowski M, Elge T, Brosius J, Huttenhofer A: **Identification of 86 candidates for small non-messenger RNAs from the archaeon *Archaeoglobus fulgidus*.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**:7536-7541.
60. Vogel J, Bartels V, Tang TH, Churakov G, Slagter-Jager JG, Huttenhofer A, Wagner EG: **RNomics in *Escherichia coli* detects new sRNA species and indicates parallel transcriptional output in bacteria.** *Nucleic Acids Res* 2003, **31**:6435-6443.
61. Vogel J, Sharma CM: **How to find small non-coding RNAs in bacteria.** *Biol Chem* 2005, **386**:1219-1238.
62. Sharma CM, Vogel J: **Experimental approaches for the discovery and characterization of regulatory small RNA.** *Curr Opin Microbiol* 2009, **12**:536-546.
63. Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA, Berka J, Braverman MS, Chen YJ, Chen Z, *et al.*: **Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors.** *Nature* 2005, **437**:376-380.
64. Sittka A, Lucchini S, Papenfort K, Sharma CM, Rolle K, Binnewies TT, Hinton JC, Vogel J: **Deep sequencing analysis of small noncoding RNA and mRNA targets of the global post-transcriptional regulator, Hfq.** *PLoS Genet* 2008, **4**:e1000163.
65. Udekwi KI, Darfeuille F, Vogel J, Reimegard J, Holmqvist E, Wagner EG: **Hfq-dependent regulation of OmpA synthesis is mediated by an antisense RNA.** *Genes Dev* 2005, **19**:2355-2366.
66. Pulvermacher SC, Stauffer LT, Stauffer GV: **Role of the sRNA GcvB in regulation of *cycA* in *Escherichia coli*.** *Microbiology* 2009, **155**:106-114.
67. Masse E, Vanderpool CK, Gottesman S: **Effect of RyhB small RNA on global iron use in *Escherichia coli*.** *J Bacteriol* 2005, **187**:6962-6971.
68. Chant EL, Summers DK: **Indole signalling contributes to the stable maintenance of *Escherichia coli* multicopy plasmids.** *Mol Microbiol* 2007, **63**:35-43.
69. Busch A, Richter AS, Backofen R: **IntaRNA: efficient prediction of bacterial sRNA targets incorporating target site accessibility and seed regions.** *Bioinformatics* 2008, **24**:2849-2856.
70. Zhao Y, Li H, Hou Y, Cha L, Cao Y, Wang L, Ying X, Li W: **Construction of two mathematical models for prediction of bacterial sRNA targets.** *Biochem Biophys Res Commun* 2008, **372**:346-350.
71. Cao Y, Zhao Y, Cha L, Ying X, Wang L, Shao N, Li W: **sRNATarget: a web server for prediction of bacterial sRNA targets.** *Bioinformation* 2009, **3**:364-366.
72. Tjaden B: **TargetRNA: a tool for predicting targets of small RNA action in bacteria.** *Nucleic Acids Res* 2008, **36**:W109-113.
73. Tjaden B, Goodwin SS, Opdyke JA, Guillier M, Fu DX, Gottesman S, Storz G: **Target prediction for small, noncoding RNAs in bacteria.** *Nucleic Acids Res* 2006, **34**:2791-2802.
74. Backofen R, Hess WR: **Computational prediction of sRNAs and their targets in bacteria.** *RNA Biol* 7.
75. Chevalier C, Geissmann T, Helfer AC, Romby P: **Probing mRNA structure and sRNA-mRNA interactions in bacteria using enzymes and lead(II).** *Methods Mol Biol* 2009, **540**:215-232.
76. Urban JH, Vogel J: **Translational control and target recognition by *Escherichia coli* small RNAs in vivo.** *Nucleic Acids Res* 2007, **35**:1018-1037.

77. Cabiscol E, Tamarit J, Ros J: **Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species.** *Int Microbiol* 2000, **3**:3-8.
78. Imlay JA: **Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide.** *Annu Rev Biochem* 2008, **77**:755-776.
79. Neidhardt FC, Bloch PL, Smith DF: **Culture medium for enterobacteria.** *J Bacteriol* 1974, **119**:736-747.
80. Ploen D: **Strukturelle Untersuchungen viraler RNA-Pseudoknoten [Diplomarbeit].** Hamburg: Universität Hamburg: 2008.
81. Yang J, Ganesan S, Sarsero J, Pittard AJ: **A genetic analysis of various functions of the TyrR protein of Escherichia coli.** *J Bacteriol* 1993, **175**:1767-1776.
82. Datsenko KA, Wanner BL: **One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, **97**:6640-6645.
83. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: **DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977, **74**:5463-5467.
84. Laemmli UK: **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature* 1970, **227**:680-685.
85. Huang HY, Chang HY, Chou CH, Tseng CP, Ho SY, Yang CD, Ju YW, Huang HD: **sRNAMap: genomic maps for small non-coding RNAs, their regulators and their targets in microbial genomes.** *Nucleic Acids Res* 2009, **37**:D150-154.
86. Rivas E, Eddy SR: **Noncoding RNA gene detection using comparative sequence analysis.** *BMC Bioinformatics* 2001, **2**:8.
87. Feinäugle P: **Charakterisierung von putativen sRNAs in Bakterien [Diplomarbeit].** Hamburg: Universität Hamburg: 2008.
88. Keseler IM, Collado-Vides J, Santos-Zavaleta A, Peralta-Gil M, Gama-Castro S, Muniz-Rascado L, Bonavides-Martinez C, Paley S, Krummenacker M, Altman T, *et al.*: **EcoCyc: a comprehensive database of Escherichia coli biology.** *Nucleic Acids Res* 2009, **37**:D583-590.
89. Busby S, Ebright RH: **Promoter structure, promoter recognition, and transcription activation in prokaryotes.** *Cell* 1994, **79**:743-746.
90. Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W: **A greedy algorithm for aligning DNA sequences.** *J Comput Biol* 2000, **7**:203-214.
91. Shine J, Dalgarno L: **The 3'-terminal sequence of Escherichia coli 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1974, **71**:1342-1346.
92. Gibson F, Pittard J: **Pathways of biosynthesis of aromatic amino acids and vitamins and their control in microorganisms.** *Bacteriol Rev* 1968, **32**:465-492.
93. Grass G, Rensing C: **Genes involved in copper homeostasis in Escherichia coli.** *J Bacteriol* 2001, **183**:2145-2147.
94. van der Ploeg JR, Weiss MA, Saller E, Nashimoto H, Saito N, Kertesz MA, Leisinger T: **Identification of sulfate starvation-regulated genes in Escherichia coli: a gene cluster involved in the utilization of taurine as a sulfur source.** *J Bacteriol* 1996, **178**:5438-5446.
95. van der Ploeg JR, Iwanicka-Nowicka R, Kertesz MA, Leisinger T, Hryniewicz MM: **Involvement of CysB and Cbl regulatory proteins in expression of the tauABCD operon and other sulfate starvation-inducible genes in Escherichia coli.** *J Bacteriol* 1997, **179**:7671-7678.

96. Hryniewicz M, Sirko A, Palucha A, Bock A, Hulanicka D: **Sulfate and thiosulfate transport in Escherichia coli K-12: identification of a gene encoding a novel protein involved in thiosulfate binding.** *J Bacteriol* 1990, **172**:3358-3366.
97. Storz G, Tartaglia LA: **OxyR: a regulator of antioxidant genes.** *J Nutr* 1992, **122**:627-630.
98. Pittard AJ, Davidson BE: **TyrR protein of Escherichia coli and its role as repressor and activator.** *Mol Microbiol* 1991, **5**:1585-1592.
99. Wilson TJ, Maroudas P, Howlett GJ, Davidson BE: **Ligand-induced self-association of the Escherichia coli regulatory protein TyrR.** *J Mol Biol* 1994, **238**:309-318.
100. Pittard J, Camakaris H, Yang J: **The TyrR regulon.** *Mol Microbiol* 2005, **55**:16-26.
101. Argaet VP, Wilson TJ, Davidson BE: **Purification of the Escherichia coli regulatory protein TyrR and analysis of its interactions with ATP, tyrosine, phenylalanine, and tryptophan.** *J Biol Chem* 1994, **269**:5171-5178.
102. Beisel CL, Storz G: **Base pairing small RNAs and their roles in global regulatory networks.** *FEMS Microbiol Rev* **34**:866-882.
103. Vanderpool CK: **Physiological consequences of small RNA-mediated regulation of glucose-phosphate stress.** *Curr Opin Microbiol* 2007, **10**:146-151.
104. Delihias N, Forst S: **MicF: an antisense RNA gene involved in response of Escherichia coli to global stress factors.** *J Mol Biol* 2001, **313**:1-12.
105. Torrents E, Grinberg I, Gorovitz-Harris B, Lundstrom H, Borovok I, Aharonowitz Y, Sjoberg BM, Cohen G: **NrdR controls differential expression of the Escherichia coli ribonucleotide reductase genes.** *J Bacteriol* 2007, **189**:5012-5021.
106. Cotruvo JA, Jr., Stubbe J: **An active dimanganese(III)-tyrosyl radical cofactor in Escherichia coli class Ib ribonucleotide reductase.** *Biochemistry* **49**:1297-1309.
107. Monje-Casas F, Jurado J, Prieto-Alamo MJ, Holmgren A, Pueyo C: **Expression analysis of the nrdHIEF operon from Escherichia coli. Conditions that trigger the transcript level in vivo.** *J Biol Chem* 2001, **276**:18031-18037.
108. Vassinova N, Kozyrev D: **A method for direct cloning of fur-regulated genes: identification of seven new fur-regulated loci in Escherichia coli.** *Microbiology* 2000, **146 Pt 12**:3171-3182.
109. Viegas SC, Arraiano CM: **Regulating the regulators: How ribonucleases dictate the rules in the control of small non-coding RNAs.** *RNA Biol* 2008, **5**:230-243.
110. Li Z, Pandit S, Deutscher MP: **3' exoribonucleolytic trimming is a common feature of the maturation of small, stable RNAs in Escherichia coli.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**:2856-2861.
111. Lin-Chao S, Wei CL, Lin YT: **RNase E is required for the maturation of ssrA RNA and normal ssrA RNA peptide-tagging activity.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, **96**:12406-12411.
112. Bellavia D, Sisino G, Papadopoulos GL, Forte GI, Barbieri R: **Mung bean nuclease mapping of RNAs 3' end.** *Immun Ageing* 2009, **6**:6.
113. Chen Q, Crosa JH: **Antisense RNA, fur, iron, and the regulation of iron transport genes in Vibrio anguillarum.** *J Biol Chem* 1996, **271**:18885-18891.
114. Windbichler N, von Pelchrzim F, Mayer O, Csaszar E, Schroeder R: **Isolation of small RNA-binding proteins from E. coli: evidence for frequent interaction of RNAs with RNA polymerase.** *RNA Biol* 2008, **5**:30-40.
115. Cairrao F, Cruz A, Mori H, Arraiano CM: **Cold shock induction of RNase R and its role in the maturation of the quality control mediator SsrA/tmRNA.** *Mol Microbiol* 2003, **50**:1349-1360.

116. Darfeuille F, Unoson C, Vogel J, Wagner EG: **An antisense RNA inhibits translation by competing with standby ribosomes.** *Mol Cell* 2007, **26**:381-392.
117. Morfeldt E, Taylor D, von Gabain A, Arvidson S: **Activation of alpha-toxin translation in Staphylococcus aureus by the trans-encoded antisense RNA, RNAIII.** *EMBO J* 1995, **14**:4569-4577.
118. Mangold M, Siller M, Roppenser B, Vlamincx BJ, Penfound TA, Klein R, Novak R, Novick RP, Charpentier E: **Synthesis of group A streptococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule.** *Mol Microbiol* 2004, **53**:1515-1527.
119. Sonnleitner E, Sorger-Domenigg T, Madej MJ, Findeiss S, Hackermüller J, Huttenhofer A, Stadler PF, Blasi U, Moll I: **Detection of small RNAs in Pseudomonas aeruginosa by RNomics and structure-based bioinformatic tools.** *Microbiology* 2008, **154**:3175-3187.
120. Gimpel M, Heidrich N, Mader U, Krügel H, Brantl S: **A dual-function sRNA from B. subtilis: SR1 acts as a peptide encoding mRNA on the gapA operon.** *Mol Microbiol* **76**:990-1009.
121. Davis BM, Waldor MK: **RNase E-dependent processing stabilizes MicX, a Vibrio cholerae sRNA.** *Mol Microbiol* 2007, **65**:373-385.
122. Wassarman KM, Storz G: **6S RNA regulates E. coli RNA polymerase activity.** *Cell* 2000, **101**:613-623.
123. Kim KS, Lee Y: **Regulation of 6S RNA biogenesis by switching utilization of both sigma factors and endoribonucleases.** *Nucleic Acids Res* 2004, **32**:6057-6068.
124. Hengge-Aronis R: **Recent insights into the general stress response regulatory network in Escherichia coli.** *J Mol Microbiol Biotechnol* 2002, **4**:341-346.
125. Hayes ET, Wilks JC, Sanfilippo P, Yohannes E, Tate DP, Jones BD, Radmacher MD, BonDurant SS, Slonczewski JL: **Oxygen limitation modulates pH regulation of catabolism and hydrogenases, multidrug transporters, and envelope composition in Escherichia coli K-12.** *BMC Microbiol* 2006, **6**:89.
126. Unoson C, Wagner EG: **A small SOS-induced toxin is targeted against the inner membrane in Escherichia coli.** *Mol Microbiol* 2008, **70**:258-270.
127. Silvaggi JM, Perkins JB, Losick R: **Small untranslated RNA antitoxin in Bacillus subtilis.** *J Bacteriol* 2005, **187**:6641-6650.
128. Opdyke JA, Fozo EM, Hemm MR, Storz G: **RNase III participates in GadY-dependent cleavage of the gadX-gadW mRNA.** *J Mol Biol* **406**:29-43.
129. Ray JM, Yanofsky C, Bauerle R: **Mutational analysis of the catalytic and feedback sites of the tryptophan-sensitive 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase of Escherichia coli.** *J Bacteriol* 1988, **170**:5500-5506.
130. Dopheide TA, Crewther P, Davidson BE: **Chorismate mutase-prephenate dehydratase from Escherichia coli K-12. II. Kinetic properties.** *J Biol Chem* 1972, **247**:4447-4452.
131. Hudson GS, Howlett GJ, Davidson BE: **The binding of tyrosine and NAD⁺ to chorismate mutase/prephenate dehydrogenase from Escherichia coli K12 and the effects of these ligands on the activity and self-association of the enzyme. Analysis in terms of a model.** *J Biol Chem* 1983, **258**:3114-3120.
132. Yang J, Ogawa Y, Camakaris H, Shimada T, Ishihama A, Pittard AJ: **folA, a new member of the TyrR regulon in Escherichia coli K-12.** *J Bacteriol* 2007, **189**:6080-6084.
133. Zhang A, Altuvia S, Storz G: **The novel oxyS RNA regulates expression of the sigma s subunit of Escherichia coli RNA polymerase.** *Nucleic Acids Symp Ser* 1997:27-28.

134. Camakaris H, Pittard J: **Autoregulation of the tyrR gene.** *J Bacteriol* 1982, **150**:70-75.
135. Kwok T, Yang J, Pittard AJ, Wilson TJ, Davidson BE: **Analysis of an Escherichia coli mutant TyrR protein with impaired capacity for tyrosine-mediated repression, but still able to activate at sigma 70 promoters.** *Mol Microbiol* 1995, **17**:471-481.
136. Maroudas P: **Characterization of the TyrR protein from Escherichia coli: ATPase activity and interactions with DNA.** [PhD-Thesis]. VictoriaUniversity of Melbourne: 1999.
137. Stadtman ER, Levine RL: **Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins.** *Amino Acids* 2003, **25**:207-218.
138. Winkler WC, Breaker RR: **Regulation of bacterial gene expression by riboswitches.** *Annu Rev Microbiol* 2005, **59**:487-517.
139. Serganov A, Patel DJ: **Amino acid recognition and gene regulation by riboswitches.** *Biochim Biophys Acta* 2009, **1789**:592-611.
140. Huang L, Serganov A, Patel DJ: **Structural insights into ligand recognition by a sensing domain of the cooperative glycine riboswitch.** *Mol Cell* **40**:774-786.
141. Gilbert SD, Mediatore SJ, Batey RT: **Modified pyrimidines specifically bind the purine riboswitch.** *J Am Chem Soc* 2006, **128**:14214-14215.
142. Gilbert SD, Stoddard CD, Wise SJ, Batey RT: **Thermodynamic and kinetic characterization of ligand binding to the purine riboswitch aptamer domain.** *J Mol Biol* 2006, **359**:754-768.
143. Muller M, Weigand JE, Weichenrieder O, Suess B: **Thermodynamic characterization of an engineered tetracycline-binding riboswitch.** *Nucleic Acids Res* 2006, **34**:2607-2617.
144. Soballe B, Poole RK: **Ubiquinone limits oxidative stress in Escherichia coli.** *Microbiology* 2000, **146 (Pt 4)**:787-796.
145. Hogg JR, Collins K: **RNA-based affinity purification reveals 7SK RNPs with distinct composition and regulation.** *RNA* 2007, **13**:868-880.
146. Wilkinson KA, Merino EJ, Weeks KM: **RNA SHAPE chemistry reveals nonhierarchical interactions dominate equilibrium structural transitions in tRNA(Asp) transcripts.** *J Am Chem Soc* 2005, **127**:4659-4667.
147. Ozawa K, Headlam MJ, Mouradov D, Watt SJ, Beck JL, Rodgers KJ, Dean RT, Huber T, Otting G, Dixon NE: **Translational incorporation of L-3,4-dihydroxyphenylalanine into proteins.** *FEBS J* 2005, **272**:3162-3171.
148. Rodgers KJ, Dean RT: **Metabolism of protein-bound DOPA in mammals.** *Int J Biochem Cell Biol* 2000, **32**:945-955.

Anhang

Konservierung von *rybA* und *yliL* in verschiedenen Bakterienarten

Die Konservierung von *rybA* und *yliL* wurde in verschiedenen Bakterienarten mit dem Programm BLASTN 2.2.25+ untersucht. Die Sequenzen wurden im Anschluss mit der Software Vector NTI AdvanceTM ausgewertet. Basen, die zu 100% identisch sind, sind gelb unterlegt.

Konservierung *rybA*

Die putativen -10 und -35 Elemente, sowie die bestimmten 5'-Nucleotide sind unterstrichen.

		1		50
<i>E. coli</i>	(1)	<u>TTAACGTTTTAGCA</u> <u>AATAGCTATATAATATAGCCTGTGCTATATCTGTATG</u>		
<i>S. dysenteriae</i>	(1)	<u>TTAACGTTTTAGCA</u> <u>AATAGCTATATAATATAGCCTGTGCTATATCTGTATG</u>		
<i>S. boydii</i>	(1)	<u>TTAACGTTTTAGCA</u> <u>AATAGCTATATAATATAGCCTGTGCTATATCTGTATG</u>		
<i>S. sonnei</i>	(1)	<u>TTAACGTTTTAGCA</u> <u>AATAGCTATATAATATAGCCTGTGCTATATCTGTATG</u>		
<i>S. flexneri</i>	(1)	<u>TTAACGTTTTAGCA</u> <u>AATAGCTATATAATATAGCCTGTGCTATATCTGTATG</u>		
<i>C. sp.</i>	(1)	<u>TTAACGTTTTAGCA</u> <u>AATAGCTATATAATATAGCCTGTGCTATATCTGTATA</u>		
<i>C. youngae</i>	(1)	<u>TTAACGTTTTAGCA</u> <u>AATAGCTATATAATATAGCCTGTGCTATATCTGTATA</u>		
<i>K. pneumoniae</i>	(1)	<u>TTAACGTTTTAGC</u> <u>CATAGCTATAAAATATAGCCTGTGCTATATCTGTATG</u>		
<i>S. Typhimurium</i>	(1)	<u>TTAACGTTTTAGCA</u> <u>AATAGCTATAAAACATAGCCTGTGCTATATCTGTATG</u>		
		51		100
<i>E. coli</i>	(51)	<u>TAATGCAATCATCCCTCAAGGATCGACGGGATTAGC</u> <u>AAAGTCAGGAGGTCT</u>		
<i>S. dysenteriae</i>	(51)	<u>TAATGCAATCATCCCTCAAGGATCGACGGGATTAGC</u> <u>AAAGTCAGGAGGTCT</u>		
<i>S. boydii</i>	(51)	<u>TAATGCAATCATCCCTCAAGGATCGACGGGATTAGC</u> <u>AAAGTCAGGAGGTCT</u>		
<i>S. sonnei</i>	(51)	<u>TAATGCAATCATCCCTCAAGGATCGACGGGATTAGC</u> <u>AAAGTCAGGAGGTCT</u>		
<i>S. flexneri</i>	(51)	<u>TAATGCAATCATCCCTCAAGGATCGACGGGATTAGC</u> <u>AAAGTCAGGAGGTCT</u>		
<i>C. sp.</i>	(51)	<u>TAATAAAGACATCCCTCAAGGACTGATGGGATTGTGAAGTCAGGAGGTTT</u>		
<i>C. youngae</i>	(51)	<u>TAATAAAGACATCCCTCAAGGACTGATGGGATTGTGAAGTCAGGAGGTTT</u>		
<i>K. pneumoniae</i>	(51)	<u>TAATGCAAAACAGCCATCATGGATTGACGGCGT</u> <u>GAACAGGCAGGAGGAGA</u>		
<i>S. Typhimurium</i>	(51)	<u>TAATGCAAGACATCCCTCAAGGATCGATGGGATTAGAAA</u> <u>CATCAGGAGGTTT</u>		
		101		150
<i>E. coli</i>	(101)	--- <u>TATGAATGAGTTCAAGAGGTGTATGCGCGTGTTTAGTCATTCTCCCT</u>		
<i>S. dysenteriae</i>	(101)	--- <u>TATGAATGAGTTCAAGAGGTGTATGCGCGTGTTTAGTCATTCTCCCT</u>		
<i>S. boydii</i>	(101)	--- <u>TATGAATGAGTTCAAGAGGTGTATGCGCGTGTTTAGTCATTCTCCCT</u>		
<i>S. sonnei</i>	(101)	--- <u>TATGAATGAGTTCAAGAGGTGTATGCGCGTGTTTAGTCATTCTCCCT</u>		
<i>S. flexneri</i>	(101)	--- <u>TATGAATGAGTTCAAGAGGTGTATGCGCGTGTTTAGTCATTCTCCCT</u>		
<i>C. sp.</i>	(101)	A-- <u>CATGAATGAATTTAAGAGGTGCATACCGTGTTTAGTCATCTCTCCCT</u>		
<i>C. youngae</i>	(101)	A-- <u>TATGAATGAATTTAAGAGGTGTATACCGTGTTTAGCCATCTCTCCCT</u>		
<i>K. pneumoniae</i>	(100)	GCAG <u>ATGAACGAATTC</u> <u>AAGAGGTGCTTAAACGTGTTTAGCCATTC</u> <u>CCCT</u>		
<i>S. Typhimurium</i>	(101)	A-- <u>TATGAACGAATTTAAGAGGTGTATACCGTGTT</u> <u>CAGTCATCTCTCCCT</u>		

Anhang

<i>E. coli</i>	(148)	TTAAAGTACGGTTAATGCTGCTCTCTATGTTGTGCGATATGGTCAACAAC
<i>S. dysenteriae</i>	(148)	TTAAAGTACGGTTAATGCTGCTCTCTATGTTGTGCGATATGGTCAACAAC
<i>S. boydii</i>	(148)	TTAAAGTACGGTTAATGCTGCTCTCTATGTTGTGCGATATGGTCAACAAC
<i>S. sonnei</i>	(148)	TTAAAGTACGGTTAATGCTGCTCTCTATGTTGTGCGATATGGTCAACAAC
<i>S. flexneri</i>	(148)	TTAAAGTACGGTTAATGCTGCTCTCTATGTTGTGCGATATGGTCAACAAC
<i>C. sp</i>	(149)	TTAAAGTACGGTTGATGCTGATCTCTATGCTGTGTGACATGATTAAACAGC
<i>C. youngae</i>	(149)	TTAAAGTACGGTTAATGCTGATCTCTATGCTGTGTGACATGATTAAACAGC
<i>K. pneumoniae</i>	(150)	TTAAAGTACGATTAATGCTGATCGGTATGCTGTGCGAGATGATCAACGGT
<i>S. Typhimurium</i>	(149)	TTAAAGTCCGGTTAATGCTGCTCTCTATGTTGTGCGATATGATCAACGGC
		201
<i>E. coli</i>	(198)	AAACCGCAGCAAGATAAACCTTCCGATAAATA--GCGGCGTCGCGGTACG
<i>S. dysenteriae</i>	(198)	AAACCGCAGCAAGATAAACCTTCCGATAAATA--GCGGCGTCGCGGTACG
<i>S. boydii</i>	(198)	AAACCGCAGCAAGATAAACCTTCCGATAAATA--GCGGCGTCGCGGTACG
<i>S. sonnei</i>	(198)	AAACCGCAGCAAGATAAACCTTCCGATAAATA--GCGGCGTCGCGGTACG
<i>S. flexneri</i>	(198)	AAACCGCAGCAAGATAAACCTTCCGATAAATA--GCGGCGTCGCGGTACG
<i>C. sp</i>	(199)	AAACCGAGAGCAGGATAAACCTTCCGATAAATA--GCGGCGTCGCGGTACG
<i>C. youngae</i>	(199)	AAACCGAGAGCAGGATAAACCTTCCGATAAATA--GCGGCGTCGCGGTACG
<i>K. pneumoniae</i>	(200)	AAACCGAGAGCAGGATAAACCTTCCGATAAATA--GCGGCGTCGCGGTACG
<i>S. Typhimurium</i>	(199)	AAACCGAGAGCAGGATAAACCTTCCGATAAATA--GCGGCGTCGCGGTACG
		251
<i>E. coli</i>	(246)	CCGCTTCACCT--CCTGCTTTTCATGCAGGCATAACGC--GTTTTGTCTGA
<i>S. dysenteriae</i>	(246)	CCGCTTCACCT--CCTGCTTTTCATGCAGGCATAACGC--GTTTTGTCTGA
<i>S. boydii</i>	(246)	CCGCTTCACCT--CCTGCTTTTCATGCAGGCATAACGC--GTTTTGTCTGA
<i>S. sonnei</i>	(246)	CCGCTTCACCT--CCTGCTTTTCATGCAGGCATAACGC--GTTTTGTCTGA
<i>S. flexneri</i>	(246)	CCGCTTCACCT--CCTGCTTTTCATGCAGGCATAACGC--GTTTTGTCTGA
<i>C. sp</i>	(249)	CCGCTTCACCTTTTCTGCTTTTCATGCAGGCATAACGC--GTTTTGTCTGA
<i>C. youngae</i>	(249)	CCGCTTCACCTTTTCTGCTTTTCATGCAGGCATAACGC--GTTTTGTCTGA
<i>K. pneumoniae</i>	(247)	CCGCTTCACCTTTTCTGCTTTTCATGCAGGCATAACGC--GTTTTGTCTGA
<i>S. Typhimurium</i>	(249)	CCGCTTCACCTTTTCTGCTTTTCATGCAGGCATAACGC--GTTTTGTCTGA
		301
<i>E. coli</i>	(292)	AAAACCCCACTTTTTGTGCGGATTGCAATCCCTTCGCAAAAAGATTGT
<i>S. dysenteriae</i>	(292)	AAAACCCCACTTTTTGTGCGGATTGCAATCCCTTCGCAAAAAGATTGT
<i>S. boydii</i>	(292)	AAAACCCCACTTTTTGTGCGGATTGCAATCCCTTCGCAAAAAGATTGT
<i>S. sonnei</i>	(292)	AAAACCCCACTTTTTGTGCGGATTGCAATCCCTTCGCAAAAAGATTGT
<i>S. flexneri</i>	(292)	AAAACCCCACTTTTTGTGCGGATTGCAATCCCTTCGCAAAAAGATTGT
<i>C. sp</i>	(299)	ATAACCCCTTCTTTTTGTGCGGATTGCAATCCCTTCGCAAAAAGATTGT
<i>C. youngae</i>	(299)	ATAACCCCTTCTTTTTGTGCGGATTGCAATCCCTTCGCAAAAAGATTGT
<i>K. pneumoniae</i>	(255)	-----
<i>S. Typhimurium</i>	(255)	-----
		351
<i>E. coli</i>	(342)	CGTCAGTAGTTGACCTGAACGGCGGCTCGCTCT
<i>S. dysenteriae</i>	(342)	CGTCAGTAGTTGACCTGAACGGCGGCTCGCTCT
<i>S. boydii</i>	(342)	CGTCAGTAGTTGACCTGAACGGCGGCTCGCTCT
<i>S. sonnei</i>	(342)	CGTCAGTAGTTGACCTGAACGGCGGCTCGCTCT
<i>S. flexneri</i>	(342)	CGTCAGTAGTTGACCTGAACGGCGGCTCGCTCT
<i>C. sp</i>	(349)	TTGTAGTAGTTGACCT-----
<i>C. youngae</i>	(349)	TTGTAGTAGTTGACCT-----
<i>K. pneumoniae</i>	(255)	-----
<i>S. Typhimurium</i>	(255)	-----
		383

Konservierung *yliL*

		1	50
<i>E. coli</i>	(1)	GTGGAAAGGGGTCCGCATCCGCGAGCCGCAATATACGCAGGGCTGCAAGA	
<i>S. Typhimurium</i>	(1)	-----	
<i>S. boydii</i>	(1)	GTGGAAAGGGGTCCGCATCCGCGAGCCGCAATATACGCAGGGCTGCAAGA	
<i>S. dysenteriae</i>	(1)	--GGAAAGGGGTCCGCATCCGCGAGCCGCAATATACGCAGGGCTGCAAGA	
<i>S. flexneri</i>	(1)	GTGGAAAGGGGTCCGCATCCGCGAGCCGCAATATACGCAGGGCTGCAAGA	
<i>S. sonnei</i>	(1)	--GGAAAGGGGTCCGCATCCGCGAGCCGCAATATACGCAGGGCTGCAAGA	
		51	100
<i>E. coli</i>	(51)	AGATAGAGCGAGCCGCCGTTCAAGTCAACTACTGACGAACAAATCTTTTG	
<i>S. Typhimurium</i>	(1)	-----	
<i>S. boydii</i>	(51)	AGATAGAGCGAGCCGCCGTTCAAGTCAACTACTGACGAACAAATCTTTTG	
<i>S. dysenteriae</i>	(49)	AGATAGAGCGAGCCGCCGTTCAAGTCAACTACTGACGAACAAATCTTTTG	
<i>S. flexneri</i>	(51)	AGATAGAGCGAGCCGCCGTTCAAGTCAACTACTGACGAACAAATCTTTTG	
<i>S. sonnei</i>	(49)	AGATAGAGCGAGCCGCCGTTCAAGTCAACTACTGACGAACAAATCTTTTG	
		101	150
<i>E. coli</i>	(101)	CGAAGGGGATTGCAAATCCGACAAAAAGTGGGGTTTTTCAGACCAAAACG	
<i>S. Typhimurium</i>	(1)	-----	
<i>S. boydii</i>	(101)	CGAAGGGGATTGCAAATCCGACAAAAAGTGGGGTTTTTCAGACCAAAACG	
<i>S. dysenteriae</i>	(99)	CGAAGGGGATTGCAAATCCGACAAAAAGTGGGGTTTTTCAGACCAAAACG	
<i>S. flexneri</i>	(101)	CGAAGGGGATTGCAAATCCGACAAAAAGTGGGGTTTTTCAGACCAAAACG	
<i>S. sonnei</i>	(99)	CGAAGGGGATTGCAAATCCGACAAAAAGTGGGGTTTTTCAGACCAAAACG	
		151	200
<i>E. coli</i>	(151)	CGTTATGCCTGCATGAAAGCAGGAGTGAAGCGGCGTACCGCGACGCGCGC-	
<i>S. Typhimurium</i>	(1)	-----AAGCGGCGTACCGCACGCGCGC	
<i>S. boydii</i>	(151)	CGTTATGCCTGCATGAAAGCAGGAGTGAAGCGGCGTACCGCGACGCGCGC-	
<i>S. dysenteriae</i>	(149)	CGTTATGCCTGCATGAAAGCAGGAGTGAAGCGGCGTACCGCGACGCGCGC-	
<i>S. flexneri</i>	(151)	CGTTATGCCTGCATGAAAGCAGGAGTGAAGCGGCGTACCGCGACGCGCGC-	
<i>S. sonnei</i>	(149)	CGTTATGCCTGCATGAAAGCAGGAGTGAAGCGGCGTACCGCGACGCGCGC-	
		201	250
<i>E. coli</i>	(200)	-TATTTATCGGAAGGTTTATCTTGCTGCGGTTTGTGTTGACCATATCGC	
<i>S. Typhimurium</i>	(24)	TTATTTTCGTGGAAGGTTTATCTTGCTGCGGTTTGCCGTTGATCATATCGC	
<i>S. boydii</i>	(200)	-TATTTATCGGAAGGTTTATCTTGCTGCGGTTTGTGTTGACCATATCGC	
<i>S. dysenteriae</i>	(198)	-TATTTATCGGAAGGTTTATCTTGCTGCGGTTTGTGTTGACCATATCGC	
<i>S. flexneri</i>	(200)	-TATTTATCGGAAGGTTTATCTTGCTGCGGTTTGTGTTGACCATATCGC	
<i>S. sonnei</i>	(198)	-TATTTATCGGAAGGTTTATCTTGCTGCGGTTTGTGTTGACCATATCGC	
		251	272
<i>E. coli</i>	(249)	ACAACATAGAGAGCAGCATTAATTA	
<i>S. Typhimurium</i>	(74)	ACAACATAGAGAGCAGCATTAATTA	
<i>S. boydii</i>	(249)	ACAACATAGAGAGCAGCATTAATTA	
<i>S. dysenteriae</i>	(247)	ACAACATAGAGAGCAGCATTAATTA	
<i>S. flexneri</i>	(249)	ACAACATAGAGAGCAGCATTAATTA	
<i>S. sonnei</i>	(247)	ACAACATAGAGAGCAGCATTAATTA	

Microarray-Daten

Tabelle 1 zeigt die Gene, die in ΔHB_428 und $\Delta rybA$ im Vergleich zu *E. coli* K12 WT-Zellen unter Peroxid-Stress ähnlich reguliert waren.

Tabelle 1: Gene, die in ΔHB_428 und $\Delta rybA$ vs. WT eine ähnliche Regulation aufwiesen

Gen	SLR ΔHB_428	SLR $\Delta rybA$	p-Wert ΔHB_428	p-Wert $\Delta rybA$
<i>flu</i>	-4,53	-4,58	0,00140032	0,00019687
<i>isrC</i>	-3,18	-3,07	4,0051E-05	7,7034E-05
<i>hemH</i>	-2,27	-2,08	0,05721461	0,02088142
<i>yaaA</i>	-2,12	-1,83	0,05494701	0,00521411
<i>yeeR</i>	-1,69	-1,82	0,00068162	0,00047601
<i>metL</i>	-1,51	-1,58	0,02946625	0,02362406
<i>hemF</i>	-1,69	-1,46	0,03492229	0,0223156
<i>xthA</i>	-1,49	-1,38	0,0446601	0,04577268
<i>glpE</i>	-1,29	-1,36	0,04185912	0,00914352
<i>mltF</i>	-1,09	-1,28	0,01580034	0,01601141
<i>EtrxC</i>	-1,30	-1,16	0,05835832	0,01162021
<i>trxB</i>	-1,16	-1,08	0,04992368	0,0485226
<i>gntT</i>	-1,14	-1,02	0,05304584	0,03069444
IGR <i>dps</i> - <i>rhtA</i>	-0,85	-1,00	0,01736232	0,00175144
IGR <i>thrC</i> und <i>yaaX</i>	-1,18	-0,98	0,02274917	0,02822297
<i>holD</i>	-0,59	-0,97	0,04691041	0,01120775
<i>yfiP</i>	-1,15	-0,91	0,01299406	0,01888575
<i>anmK</i>	-0,71	-0,88	0,04299299	0,00896158
<i>gor</i>	-0,74	-0,87	0,06620888	0,03108472
<i>bhsA</i>	-0,89	-0,85	0,02451379	0,00447853
<i>glpG</i>	-0,91	-0,83	0,05215606	0,00953555
<i>gor</i>	-0,86	-0,81	0,06605855	0,03343196
<i>fepA</i>	0,98	0,82	0,05253584	0,01366274
IGR <i>yaiA</i> - <i>aroM</i>	0,12	0,82	0,5845124	0,03689488
<i>wecB</i>	0,64	0,82	0,04982995	0,02758444
<i>ygdH</i>	0,73	0,83	0,04133599	0,04404089
<i>nrfG</i>	0,22	0,83	0,56684864	0,01061466
<i>csgF</i>	1,12	0,84	0,08800326	0,04897064
<i>cvrA</i>	0,73	0,84	0,05956694	0,01190569
<i>fecR</i>	0,90	0,84	0,01356692	0,0046413
<i>entF</i>	0,72	0,84	0,11932266	0,00748681
<i>ybjC</i>	0,94	0,85	0,00612683	0,00236983
<i>dadX</i>	0,29	0,85	0,14621317	0,01073266
<i>rarD</i>	0,36	0,87	0,11342555	0,01637744
<i>rnpA</i>	1,16	0,89	0,08907559	0,03169003
<i>rfaC</i>	0,84	0,89	0,04859525	0,02826649
<i>yigL</i>	0,38	0,89	0,13196191	0,01054661

Anhang

<i>gadX</i>	0,78	0,89	0,09183342	0,02474624
<i>dos</i>	0,85	0,90	0,04364968	0,03110345
IGR <i>mdtF</i> - <i>gadW</i>	0,75	0,91	0,04418976	0,01761144
<i>pdhR</i>	0,47	0,92	0,36582732	0,04509164
<i>yigA</i>	0,57	0,93	0,04314098	0,02474904
<i>cspI</i>	0,53	0,96	0,2650548	0,04609325
<i>arnA</i>	0,98	0,97	0,08102325	0,0070465
<i>c0670</i>	0,85	0,98	0,01251331	0,01243418
<i>yeiE</i>	1,42	0,99	0,01476037	0,0279541
<i>ybdZ</i>	0,82	0,99	0,01284837	0,00900371
<i>oxyR</i>	1,17	1,01	0,00714909	0,02344428
<i>gsiD</i>	0,79	1,03	0,05350241	0,0360662
IGR <i>ndh</i> - <i>ycfJ</i>	0,46	1,03	0,38446686	0,03494901
<i>yafP</i>	0,95	1,09	0,07276193	0,02126455
<i>bglJ</i>	0,89	1,10	0,01303107	0,01383521
<i>proV</i>	1,18	1,11	0,0603023	0,00466816
<i>pinQ</i>	1,10	1,12	0,0567669	0,03726408
IGR <i>dadX</i> - <i>cvrA</i>	0,46	1,15	0,09072749	0,00313103
<i>xerC</i>	0,77	1,15	0,05162821	0,02474695
<i>c4703</i>	0,97	1,17	0,09079328	0,04808689
IGR <i>gadW</i> - <i>gadY</i>	1,12	1,19	0,15640566	0,02145703
<i>oppB</i>	0,85	1,19	0,20473692	0,01862983
<i>fes</i>	1,35	1,24	0,00578151	0,00566846
<i>yigB</i>	0,82	1,26	0,06640741	0,00767406
<i>evgS</i>	1,44	1,28	0,05979922	0,03631903
<i>ynfN</i> und angrenzende IGR	1,13	1,36	0,10528636	0,04076697
<i>c0672</i>	1,44	1,50	0,04289459	0,01379535
<i>cysP</i>	-1,13	-0,53	0,03791148	0,15582459
<i>metC</i>	-1,08	-0,83	0,03205451	0,08835446
<i>cysP</i>	-0,84	-0,72	0,02766504	0,04891865
<i>rutR</i>	-0,83	-0,77	0,03828887	0,03848763
<i>yeeS</i>	-0,80	-0,72	0,01684479	0,00160523
IGR <i>yafP</i> - <i>ykfJ</i>	0,80	0,79	0,04377367	0,02781544
<i>Z3866</i>	0,81	0,62	0,01598482	0,03820447
<i>xseA</i>	0,83	0,54	0,0255819	0,03418744
IGR <i>yciG</i> - <i>trpA</i>	0,86	0,55	0,03417718	0,09752237
<i>csgE</i>	0,91	0,63	0,04515902	0,03854805
<i>puuR</i>	0,91	0,46	0,0446499	0,08105202
<i>spr</i>	0,99	0,77	0,03396719	0,0345715
<i>yeiE</i>	1,42	0,99	0,01476037	0,0279541

GHS-Verordnung

Piktogramm	Bezeichnung	Signalwort	Gefahrenklasse
	Explodierende Bombe	Gefahr	Instabile explosive Stoffe, Gemische und Erzeugnisse mit Explosivstoff(en), selbstzersetzliche Stoffe und Gemische, Organische Peroxide
	Flamme	Gefahr	Entzündbar, selbsterhitzungsfähig, selbstzersetzlich, pyrophor, Organische Peroxide
	Flamme über einem Kreis	Gefahr	Entzündend (oxidierend) wirkend
	Gasflasche	Achtung	Gase unter Druck, verdichtete, verflüssigte, tiefgekühlt verfl., gelöste Gase
	Ätzwirkung	Gefahr/ Achtung	Auf Metalle korrosiv wirkend, hautätzend, schwere Augenschädigung
	Totenkopf mit gekreuzten Knochen	Gefahr	Akute Toxizität
	Gesundheitsgefahr	Gefahr	Diverse Gesundheitsgefahren
	Umwelt	Achtung/ Gefahr	Gewässergefährdend
	dickes Ausrufezeichensymbol		

Gefahrstoffinformationen

Verbindung	Piktogramm	H-Sätze	P-Sätze
Acrylamid		H301-H312-H315- H317-H319-H332- H340-H350-H361f- H372	P280-P302+P352- 305+P351+P338
Ampicillin- Natriumsalz		H315-H317-H319- H334-H335	P261-P280-P305+P351+P338- P342+P311
APS		H272-H302-H315- H317-H319-H334- H335	P280-P305+P351+P338- P302+P352-P304+P341-P342 + P311
Bisacrylamid		H302	
Chloramphenicol		H350	P201-P308+P313
Chloroform		H302-H315-H351- H373	P302+352-P314
DTT		H302-H315-H319- H335	P261-P280-P301+P312- P304+P340
Essigsäure		H226-H314	P280-P301+P330+P331- P305+P351+P338
Ethanol		H225	P210-P233
EtBr		H330-H341-H302	P281-P201-P260-P284- P305+P351+P338-P312

Formaldehyd		H301-H311-H314- H317-H331-H351	P301+P310-P303+P361+P353- P305+P351+P338-P361-P405- P505
Formamid		H360D	P308+P313
Isopropanol		H225-H319-H336	P210-P233-P305+P351+P338
NaOH		H314-H290	P280-P301+P330+P331- P309+P310-P305+P351+P338
Phenol		H331-H301-H311- H314-H341-H373	P280-P302+P352- P301+P330+P331-P309-P310- P305+P351+P338
SDS		H228-H311-H302- H335-H315-H319	P210-P280-P304+P340- P305+P351+P338-P309+P310
TEMED		H225-H302-H314- H332	P210-P233-P280- P301+P330+P331- P305+P351+P338
Tris		H315-H319-H335	P261-P280-P302+P352- P305+P351+P338-P304+P340
Xylen Cyanol FF		H315-H319-H335	P261-P280-P302+P352- P305+P351+P338-P304+P340

Auflistung verwendeter KMR-Substanzen, Kat. I und II

CAS-Nummer	Stoffname	Verfahren und eingesetzte Menge	Kategorie
79-06-1	Acrylamid	30-40%ige, wässrige Lösungen zur Polymerisation. Menge: 300 ml	K1B, M1B, RF2
1239-45-8	Ethidiumbromid	10 mg/ml wässrige Lösungen zur Färbung von Agarosegelen (0,5 mg/ml Endkonzentration). Menge: 50 ml	M2
108-95-2	Phenol	H ₂ O gesättigte Lösung zur Extraktion von DNA/RNA. Menge: 100 ml	M2
67-66-3	Trichlormethan	100%ige Lösung zur Extraktion von DNA/RNA. Menge: 100 ml	K1B*/s, M2*, RE2*
50-00-0	Formaldehyd	37%ige Lösung, Bestandteil von denat. Agarosegelen und Laufpuffer. Menge: 30 ml	K2
75-12-7	Formamid	95%ige Lösung, Bestandteil von RNA-Probenpuffer. Menge: 2 ml	RE1B
56-65-5	$\gamma^{32}\text{P}$ -ATP	Radioaktive Markierung von DNA/RNA. Menge: 100 μl	
1927-31-7	$\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP	Radioaktive Markierung von DNA/RNA. Menge: 50 μl	

Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei Herrn Professor Dr. Ulrich Hahn für Möglichkeit diese Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen, seine Unterstützung, sowie das Vertrauen in mich und meine Arbeit bedanken.

Herrn Professor Dr. Reinhardt Bredehorst danke ich sehr für die Erstellung des Zweitgutachtens.

Ein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Nicolas Piganeau für die Inspirationen zu diesem Thema, die sehr gute Betreuung und die Unterstützung bei der Entstehung dieser Arbeit. Danke auch für die vielen guten Ratschläge, kleinen Hinweise und die ständige Diskussionsbereitschaft und das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Bei Frau Kristin Klätschke vom Universitätsklinikum Eppendorf möchte ich mich für die Durchführung und Unterstützung bei der Auswertung der Microarray-Experimente bedanken.

Frau Dr. Christina Stacke möchte ich für die großartige Unterstützung bei der Proteinproduktion und Reinigung danken.

Bei Frau Dr. Cindy Meyer möchte ich mich herzlichst für die vielen tollen Ratschläge und fachlichen Gespräche bedanken. Außerdem bedanke ich mich besonders für die sehr schöne Zeit mit ihr in und außerhalb des Labors und dafür, dass sie immer ein offenes Ohr für mich und meine „kleinen“ Problem hatte.

Ein großer Dank geht an Frau Margot Binnewies für die hervorragende Hilfe im Labor vor allem bei den vielen großen und kleinen Gelen. Danke auch für deine Unterstützung in allen anderen Lebenslagen außerhalb des Labors und für die richtigen Worte, die du immer für mich gefunden hast.

Danksagung

Ganz herzlich möchte ich mich bei allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern dieser Arbeitsgruppe für die sehr schöne Arbeitsatmosphäre und tollen Diskussionen bedanken. Besonders möchte ich mich bei Frau Anna Rath für all die lustigen Momente, die Entdeckung von g und die tolle, gemeinsame Zeit bedanken. Daniela Otto danke ich ganz herzlich für die schnelle Lösung von großen und kleinen administrativen Problemen

Mein herzlichster Dank gilt Timm für sein Verständnis für mich und meine Arbeit, seine unermüdliche Unterstützung und Liebe, die er mir auch in „schwierigen“ Zeiten entgegengebracht hat.

Zu guter Letzt möchte ich meiner Mutter meine tiefste Dankbarkeit für ihre Liebe, ihre Unterstützung und ihren Glauben an mich ausdrücken. Oder einfach: Danke für alles!

Selbständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst habe. Teile der Arbeit die nicht von mir durchgeführt worden sind, sind im Text gekennzeichnet.

Diese Arbeit wurde zuvor an keiner anderen Hochschule oder Universität in gleicher oder ähnlicher Form zur Erlangung des akademischen Grades Dr. rer. nat. vorgelegt.

Hamburg, den 10.10.2011

Kirstin Gerstle

Lebenslauf

Kirstin Gerstle
Diplom-Biologin

Persönliches

Geburtsdatum: 12.10.1982 in Henstedt-Ulzburg
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Ausbildung und Berufserfahrung

03/2008 – 12/2011

Promotion

- Institut für Biochemie und Molekularbiologie, Universität Hamburg
- Dissertation zum Thema: Charakterisierung der sRNAs HB_428 und RybA unter Peroxid-Stress in *E. coli*
- Disputation: 09.12.2011
- Betreuung und Anleitung des Praktikums Biochemie/Proteinchemie
- Anleitung und Betreuung von Diplom- und Bachelorarbeiten, sowie praktische Ausbildung von Biologisch-Technischen Assistenten

03/2007 – 12/2007

Diplomarbeit

- Institut für Biochemie und Molekularbiologie, Universität Hamburg
- Thema: Fluoreszenzmarkierung von RNA zur Untersuchung von p53-RNA-Interaktionen mittels FCS

02/2007 – 12/2007

Studium der Biologie

- Universität Hamburg
- Studienschwerpunkte: Biochemie und Genetik/Molekularbiologie

09/1993 – 06/2002

Lise-Meitner-Gymnasium in Norderstedt

- abgeschlossen mit Abitur
-

09/1989 – 06/1993

Grundschule Glashütte-Süd in Norderstedt

Besondere Kenntnisse

Proteinchemie: Rekombinante Expression und Reinigung von Proteinen aus *E. coli*; Affinitätschromatographie (ÄKTA), SDS-PAGE, Western Blot; Bindungsstudien von Proteinen und Nukleinsäuren (Gel-shift-Assays), 2-D Gelelektrophorese

Molekularbiologie: PCR, Reverse Transkription, T7-Transkription, DNA-Klonierung, Northern Blot, Gelelektrophoretische Trennmethode von DNA und RNA, Arbeiten mit radioaktiver (P^{32}) DNA/RNA, Microarray-Analysen, DNA-Sequenzierung

Mikrobiologie: Kultivierung von *E. coli*, Isolation von DNA/RNA aus *E. coli*

EDV MS Excel, MS PowerPoint, MS Word, EndNote, VectorNTI, QuantityOne

Sprachen	Deutsch:	Muttersprache
	Englisch:	fließend in Wort und Schrift
	Französisch:	Grundkenntnisse

Tagungsteilnahmen und Beiträge:

62. Mosbacher Kolloquium, Mechanism of RNA-mediated regulation, 07.-09. April 2011, Mosbach/Baden, Deutschland. **Gerstle, K.**, Klätschke, K., Hahn, U. & Piganeau, N. The small RNA RybA regulates the aromatic amino acid biosynthesis under oxidative stress in *E. coli*. (Posterbeitrag)

8. Hamburger Studententagung zur Medizin- und Biotechnologie, 04. Mai 2011, Hamburg, Deutschland. **Gerstle, K.** Die Rolle der sRNA RybA unter Peroxid-Stress in *E. coli*. (Vortrag)

6th Meeting of the GBM study section RNA-Biochemistry, 30. September-03. Oktober 2010 in Hohenwart, Deutschland. **Gerstle, K.** & Piganeau, N. The small non-coding RNA RybA regulates *yljL* in *cis*. (Posterbeitrag)

EBMO workshop on New Functions of Regulatory RNAs in Pro- & Eukaryotes, 13-15 Januar 2009 in Wien, Österreich. **Gerstle, K.**, Feinäugle, P. & Piganeau, N. Characterisation of putative sRNAs in *E. coli*. (Posterbeitrag)

Mitgliedschaften

Mitglied der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie e.V. (GBM)