

Identifizierung und Charakterisierung
von sRNAs in
Streptomyces coelicolor

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt im Fachbereich Biowissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe – Universität
in Frankfurt am Main

von
Michael-Paul Vockenhuber
aus Wien

Frankfurt 2009-10-22
(D30)

Vom Fachbereich Biowissenschaften der
Johann Wolfgang – Goethe Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Anna Starzinski-Powitz

Gutachter: Prof. Dr. Beatrix Süß
Prof. Dr. Jörg Soppa

Datum der Disputation:

– **Meiner Familie** –

Inhalt

1. ZUSAMMENFASSUNG	1
2. EINLEITUNG	3
2.1. STREPTOMYCETEN – EINE ÜBERSICHT	3
2.2. GENREGULATION DURCH NICHT KODIERENDE RNAS	7
2.2.1. REPRESSION DER TRANSLATION	8
2.2.2. VERÄNDERUNG DER MRNA STABILITÄT	9
2.2.3. AKTIVIERUNG DER TRANSLATION	10
2.2.4. RIBOSOME STANDBY	10
2.2.5. INHIBIERUNG VON PROTEINEN	12
2.3. DAS RNA CHAPERON Hfq	13
2.4. SRNAS SUCHE UND FINDEN	14
2.5. IDENTIFIKATION MÖGLICHER ZIELGENE VON SRNAS	16
2.6. ZIEL DIESER ARBEIT	18
3. ERGEBNISSE	19
3.1. BIOINFORMATISCHE VORHERSAGE VON SRNAS	19
3.1.1. RNAMOTIF	19
3.1.2. TARGET EXPLORER	21
3.1.3. PREDETECTOR	22
3.1.4. VORHERSAGE KONSERVIERTER STRUKTUREN	24
3.2. 454 SEQUENZIERUNG DES TRANSKRIPTOMS	24
3.3. DIE SRNA sc32	26
3.3.1. EXPRESSIONSANALYSE UND 5'RACE	26
3.3.2. ÜBEREXPRESSION VON SC32	28
3.3.3. DELETION VON SC32 MIT HILFE DES REDIRECT SYSTEMS	28
3.3.4. DISRUPTION VON SC32 MIT DEM REDIRECT SYSTEM	29
3.4. DIE SRNA sc1	30
3.4.1. EXPRESSIONSPROFIL VON SC1	31
3.4.2. 5' UND 3' ENDE	32
3.4.3. DELETION UND DISRUPTION VON SC1	33
3.4.4. KNOCKDOWN VON SC1 DURCH ASC1	35
3.4.5. ÜBEREXPRESSION VON SC1	35
3.4.6. PHÄNOTYPEN VON SC1+ UND ASC1	35
Produktion von Actinorhodin	35
Der Effekt von sc1+ auf die Agarase DagA	36
Transkription von dagA und Stabilität der mRNA	37
Die Translation von dagA	38
Wachstum auf Chitosan	40
Interaktion von sc1 mit der dagA mRNA	41
3.4.7. DIE HISTIDIN KINASE SCO5239	46
5'RACE von SCO5239	47
Reportergen Analyse von SCO5239	47
3.4.8. WEITERE MÖGLICHE ZIELE VON SC1	48

4. DISKUSSION	51
4.1. IDENTIFIZIERUNG VON SRNAS	51
4.1.1. VORHERSAGE VON TERMINATORSTRUKTUREN	51
4.1.2. VORHERSAGE VON <i>DRE</i> -SITES	51
4.1.3. 454 SEQUENZIERUNG	52
4.1.4. VERGLEICH VON BIOINFORMATIK <i>UND</i> SEQUENZIERUNG	53
4.2. SC32 – SRNA ODER 3’UTR ?	55
4.2.1. DAS GEN <i>BLDC</i> – SCO4091	55
4.2.2. IST SC32 EIN EIGENSTÄNDIGES TRANSKRIPT?	55
4.3. SC1 – EIN REGULATOR DES SEKUNDÄRMETABOLISMUS	56
4.3.1. DIE KONSERVIERUNG VON SC1	56
4.3.2. DIE FUNKTION VON SC1	57
4.3.3. DIE REGULATION VON SC1 DURCH DASR	60
5. MATERIAL UND METHODEN	63
5.1. MATERIALIEN	63
5.2. OLIGONUKLEOTIDE	66
5.3. BAKTERIENSTÄMME	78
5.4. PUFFER UND LÖSUNGEN	79
5.4.1. ANTIBIOTIKA	79
5.4.2. MEDIEN	80
E. coli Medien	80
Streptomyceten Medien	80
5.4.3. DNA SPEZIFISCHE PUFFER	85
5.4.4. RNA SPEZIFISCHE PUFFER	86
5.5. METHODEN	88
5.5.1. STREPTOMYCETEN SPEZIFISCHE METHODEN	88
5.5.2. DNA	90
5.5.3. RNA	91
5.5.4. PROTEIN	97
6. LITERATUR	101
7. ANHANG	107
8. CURRICULUM VITAE	137

1. Zusammenfassung

Streptomyces coelicolor ist der Modellorganismus der GC reichen, Gram+ Actinomyceten, die mehr als zwei Drittel aller bekannten Antibiotika produzieren. Phänotypisch zeichnet er sich durch die Bildung eines Substrat- und eines Luftmyzels aus, welches im Laufe der weiteren Differenzierung Sporen bildet. Streptomyceten produzieren neben Antibiotika noch eine Vielzahl biotechnologisch interessanter Metaboliten. Der komplexe Lebenszyklus und Stoffwechsel erfordern eine genaue Regulation der Genexpression.

Die letzten Jahre haben gezeigt, dass neben Proteinen auch die RNA eine regulatorische Funktion hat. Verschiedene regulatorisch aktive RNA Elemente wie Riboswitche, RNA-Thermometer und kleine nicht kodierende RNAs (*small noncoding RNAs* – sRNAs) wurden identifiziert. sRNAs wirken meist als *antisense* Riboregulatoren, indem sie ihre Ziel-mRNA binden und dadurch die Translation hemmen oder fördern.

In dieser Arbeit wurden verschiedene bioinformatische Methoden verwendet, um sRNAs im Genom von *S. coelicolor* vorherzusagen. Es wurden Terminatorstrukturen und konservierte Sekundärstrukturen in den intergenen Regionen vorhergesagt, die keinem Gen zuzuordnen waren. In einem weiteren Ansatz wurden Bindestellen des Regulatorproteins DasR vorhergesagt, um DasR kontrollierte sRNAs zu identifizieren. Zusätzlich wurde mittels 454 Sequenzierung erstmalig das Transkriptom von *S. coelicolor* analysiert. Auf diese Weise konnten etwa 500 sRNAs vorhergesagt werden.

Eine der beiden charakterisierten sRNAs, sc32, ist 139 nt lang. Ihr Promoter liegt im kodierenden Bereich des Gens *bldC* und sie wird spezifisch durch Kälteschock induziert. Die zweite charakterisierte sRNA, sc1, ist 159 nt lang und in allen sequenzierten Streptomyceten konserviert. Ihre Expression wird nur bei Stickstoffmangel in der Stationärphase reprimiert. Durch molekularbiologische Analysen konnte ein Zielgen von sc1 identifiziert werden, die extrazelluläre Agarase DagA. Es konnte gezeigt werden, dass sc1 an die *dagA*-mRNA bindet und dadurch die Translation inhibiert. Als zweites mögliches Ziel von sc1 konnte die Histidinkinase SCO5239 identifiziert werden. Hier wurde gezeigt, dass Koexpression von sc1 die Expression einer SCO5239 Reporterfusion um den Faktor acht steigert. Durch Analyse des Proteoms von sc1 Mutanten konnte die differenzierte Expression von elf weiteren Proteinen gezeigt werden. Die sRNA sc1 scheint ein Regulator zu sein, der auf die Stickstoffversorgung der Zelle reagiert und daraufhin den Sekundärmetabolismus deaktiviert.

2. Einleitung

2.1. Streptomyceten – eine Übersicht

Taxonomische Einordnung

Gram+ Bakterien teilen sich in zwei große Zweige. Organismen mit niedrigem GC Gehalt, zu denen *Bacillus*, *Clostridium*, *Staphylococcus* oder *Streptococcus* gehören und GC-reiche Organismen – die Actinomyceten. Zu ihnen gehören unter anderen *Bifidobacterium*, *Nocardia*, *Mycobacterium*, *Corynebacterium* und *Streptomyces*. Die meisten Actinobakterien entwickeln in ihrem Lebenszyklus zumindest zeitweise ein Myzel.

Die Gattung der Streptomyceten ist durch chemotaxonomische und phänotypische Charakteristika definiert. Der Schwerpunkt liegt in der Homologie der 16S rRNA, zusätzlich wird aber auch die Analyse von Zellwandbestandteilen, Fettsäuren und Lipiden für die taxonomische Einordnung herangezogen [1, 2]. Ein weiteres Kriterium für die Identifizierung einer neuen Spezies als Streptomycet ist die Bildung von Substrat- und Luftmyzel (Abb. 2-1).

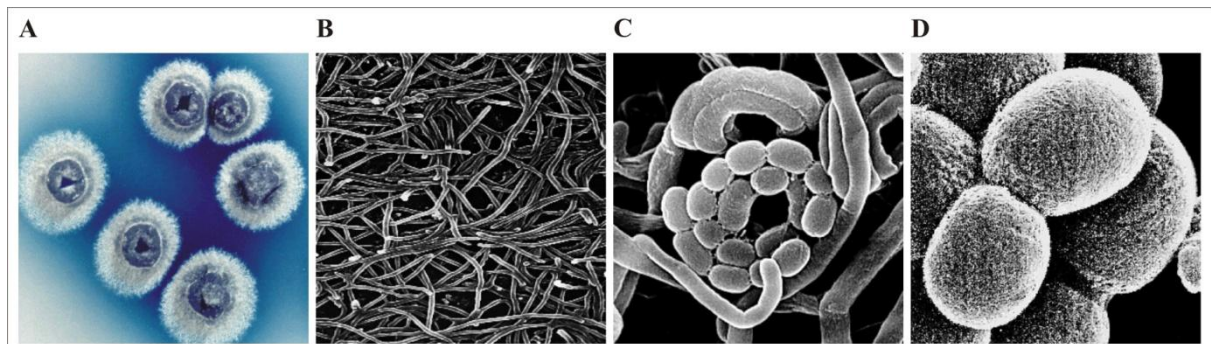


Abbildung 2-1: A *S. coelicolor* Kolonien mit Luftmyzel und Sporen. Der blaue Farbstoff ist sekretiertes Actinorhodin. B vegetatives Myzel in Flüssigkultur C Luftmyzel und Sporenkette D Großaufnahme der Sporen. Photos © John Innes Centre, Norwich.

Grund für die Vielseitigkeit dieser Organismen ist nicht zuletzt ihr im Vergleich zu anderen Bakterien sehr großes Chromosom, das bei *S. coelicolor* 8.6 Mbp umfasst und für etwa 7800 Proteine codiert ([3] und Abb. 2-2). Diese Fülle an genetischer Information unterliegt einer sehr feinen Regulation, die es dem Organismus ermöglicht, mit dem passenden Expressionsmuster auf gegebene Umwelteinflüsse zu antworten. Durch Sequenzierung des Genoms von *S. coelicolor* und bioinformatische Analysen konnten nunmehr 65 verschiedene Sigmafaktoren identifiziert werden, die das Expressionsmuster in verschiedene *cluster* wie Stressregulation oder Sporulation gruppieren. Ein großer Teil der Genregulation funktioniert bei diesen Bakterien somit über die Heterogenität der RNA-Polymerase.

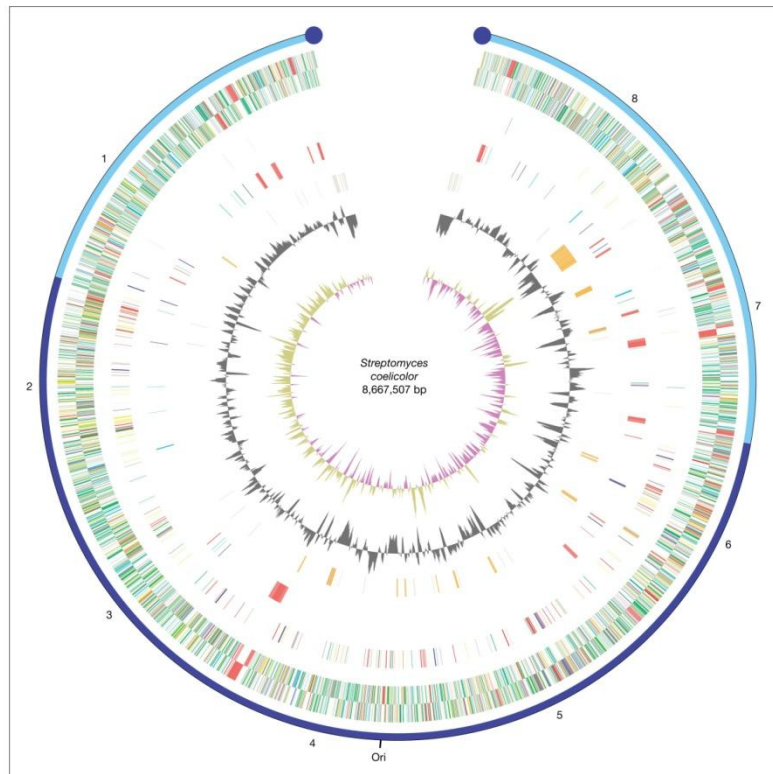


Abb. 2-2: Zirkuläre Darstellung des Genoms von *S. coelicolor*.

Ökologie der Streptomyceten

Streptomyceten kommen in der Natur ubiquitär vor. Ihre Fähigkeit, den Boden zu besiedeln, wird durch ihr vegetatives Hyphenwachstum unterstützt. Die Differenzierung zu Sporen hilft bei der Verbreitung und der Persistenz der Art. Die Sporen sind ein semi-dormantes Stadium im Lebenszyklus, die lange Zeit im Boden überdauern können [4, 5]. Lebensfähige Streptomyceten konnten bereits aus 70 Jahre alten Bodenproben kultiviert werden [6].

Streptomyceten sekretieren viele extrazelluläre Enzyme in den Boden und können komplexe polymere Bestandteile toter Pflanzen, Tiere und Pilze abbauen [7-9]. Dadurch spielen sie eine wichtige Rolle beim Recycling von Nährstoffen im Boden.

Streptomyces coelicolor

S. coelicolor ist ein filamentös wachsendes, aerobes Bodenbakterium aus der Gruppe der Actinomyceten, die zur großen Klasse der Actinobakterien gehört. Er dient als Modell-Organismus für Gram+ Bakterien mit hohem GC-Gehalt [1, 10]. Durch die Produktion einer Reihe von Exoenzymen ist es diesem Organismus möglich, eine Vielzahl von unlöslichen organischen Substraten wie Chitin, Xylanen, Cellulose, Fettsäuren bis hin zu Herbiziden abzubauen [7, 11, 12]. Außerdem sind bodenbewohnende Actinomyceten auch die hauptsächlichen Produzenten von Antibiotika. Für das Verständnis ist es hilfreich, diese

Aussage in einen Kontext zu stellen. Vergleicht man die Gesamtmenge der produzierten Sekundärmetaboliten, so wird diese Liste von höheren Eukaryoten und Pilzen mit großem Vorsprung angeführt. Analysiert man jedoch, welcher Anteil der Sekundärmetaboliten antibiotische Wirkung zeigt, übernehmen die Streptomyceten mit 66% die Führung.[13] So produziert zum Beispiel *S. aureofaciens* Tetrazyklin, *S. venezuelae* Chloramphenicol, *S. noursei* Nystatin und *S. fradiae* Neomycin. Für *S. coelicolor* sind Actinorhodin und Undecylprodigiosin charakteristisch. Actinorhodin, das unter sauren Bedingungen rot und unter alkalischen Bedingungen blau ist, ist ein Polyketid, das durch mehrere Kondensationen durch eine Typ II Polyketidsynthetase aus Acetat hergestellt wird [14, 15].

Im Jahr 2002 waren etwa 8700 antibiotisch wirksame Substanzen in bodenbewohnenden Actinobakterien entdeckt [16]. In allen anderen Bakterien waren es etwa 2900, beziehungsweise 4900 in Pilzen. Aber auch andere biotechnologisch interessante Substanzen wie Immunsuppressiva, antivirale Agentien oder Herbizide werden von Actinomyceten in großer Zahl produziert [17]. Da sie auch in der Lage sind, korrekt gefaltete Proteine zu sekretieren, bieten sie sich als alternative Quelle für die rekombinante Expression humaner Proteine an [18].

Der Lebenszyklus

Während des Wachstums einer Kolonie nimmt deren Komplexität kontinuierlich zu [19-22]. Aus einer monogenomischen Spore wachsen einer oder zwei Keimschläuche (Abb. 2-3). Das Wachstum findet hauptsächlich an der Spitze des Keimschlauches statt. Die Geschwindigkeit verdoppelt sich mit jeder Replikation des Chromosoms in dem noch nicht durch Septen unterteilten Schlauch [22]. Nach einigen Replikationszyklen entstehen laterale Verzweigungen des Schlauches und es werden Septen eingezogen. Wird das Myzel älter und immer dichter gepackt, treten die ersten Änderungen auf. Diese sind vermutlich Folgen von Nährstoffmangel [23-25], Zelldichte [26] und einer Signalkaskade, die zur Entwicklung von Luftmyzel führen [27]. Die Produktion einiger extrazellulärer Proteine wird gesteigert. Die Einlagerung von Nährstoffreserven im Substratmyzel und an der Oberfläche der Kolonie beginnt. Teile des Substratmyzels werden lysiert und das Luftmyzel beginnt zu wachsen. Die Regulation dieser Prozesse ist komplex. Die Klasse der *bld* Gene spielt dabei aber eine wichtige Rolle. *bld* (*bald* - kahl) Mutanten in Streptomyceten fassen eine Klasse von Genen zusammen, deren Deletion dazu führt, dass kein Luftmyzel mehr gebildet werden kann [28-32]. Mutanten von *bldA* zum Beispiel bilden unter bestimmten Bedingungen kein Luftmyzel,

synthetisieren keine Antibiotika und lagern kein Glykogen ein. Das Gen *bldA* kodiert jedoch nicht für ein Protein, sondern für die tRNA für Leucin mit dem Anticodon UUA. Dieses ist in den GC reichen Streptomyceten sehr selten, kommt aber gehäuft in den regulatorischen Genen der Antibiotika-Synthese-Cluster vor [33]. Mehrere der *bld* Gene können extrazellulär komplementiert werden, kodieren also für eine Kaskade sekretierter Proteine. Die Lufthyphen wachsen ebenfalls hauptsächlich an der Spitze, was bedeutet, dass sie durch Diffusion oder Transport vom Substratmyzel aus mit Nährstoffen versorgt werden müssen [34]. Sechs spezifische Regulatoren (*whiA*, *B*, *G*, *H*, *I* und *J*) sind notwendig um in den multi-genomischen Hyphenspitzen durch synchrone Zellteilung monogenomische zylindrische Sporenkompartimente abzuschneiden. Die Deletion der *whi* Gene führt zu einem *white* Phänotyp. Es wird zwar noch ein Luftmyzel gebildet, aber keine Sporen mehr. Die Oberfläche der Kolonie erscheint deshalb weiß. Die Kompartimente runden sich ab und bekommen eine dicke Wand aus einem aromatischen Polyketid, das auch für die graue Farbe verantwortlich ist [20, 35, 36].

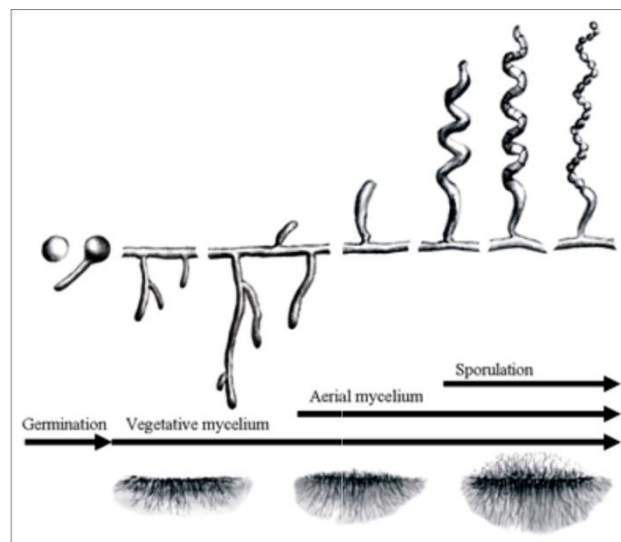


Abbildung 2-3: Der Lebenszyklus von *S. coelicolor*. Unter den richtigen Bedingungen wachsen ein bis zwei Keimschläuche aus einer Spore. Durch Spitzenwachstum und Verzweigungen formt sich ein Substratmyzel. Nach zwei bis drei Tagen beginnt die Entwicklung des Luftmyzels. Im apikalen Teil jeder Hyphe formt sich ein spiralförmiges Syncytium mit bis zu zehn Genomen. Sobald das Wachstum des Luftmyzels stoppt, werden Septen eingezogen und monogenomische Sporen gebildet (Abb. © Markus Hempel, Universität Lund).

Streptomyceten sind also multizelluläre differenzierte Organismen. Genexpression, Metabolismus, Morphogenese und der Nährstofffluss werden präzise reguliert. Diese Eigenschaften werden häufiger mit mehrzelligen Eukaryoten assoziiert, sind hier aber deutlich leichter zu manipulieren. Das Wissen über die Entwicklungsbiologie der Streptomyceten ist nicht nur von wissenschaftlichem Interesse, sondern auch essenziell für ihre optimale industrielle Nutzung.

2.2. **Genregulation durch nicht kodierende RNAs**

Die exakte Regulation der Expression der Gene eines Organismus ist die Voraussetzung für die Fähigkeit sich an Änderungen in der Umgebung anzupassen. Die Regulation muss sowohl zeitlich als auch in ihrer Stärke genau zur Änderung der äußeren Einflüsse wie Nahrungsangebot, pH, Temperatur usw. passen. Bakterien besitzen eine ganze Reihe verschiedenster Regulationsmechanismen, die auf jeder Ebene der Expression eines Genes eingreifen können.

Eine Kontrollebene ist die Regulation der Transkription des jeweiligen Gens. Diese kann durch die Verwendung transkriptioneller Aktivatoren oder Repressoren, die die Aktivität eines Promoters regulieren, erreicht werden. Mit Hilfe verschiedener Sigmafaktoren kann die Promotererkennung durch die RNA-Polymerase variiert werden. Auf diese Weise können funktional zusammenhängende Gene gemeinsam ein- und ausgeschaltet werden. Diese Methode ist besonders effizient, da durch Regulation eines einzigen Gens (für den Sigmafaktor) alle von ihm abhängigen Gene gesteuert werden.

Eine weitere Kontrollebene besteht in der posttranslationalen Modifikation von Proteinen oder in der Veränderung ihrer Halbwertszeit. Eine häufige regulatorische Modifikation ist die Phosphorylierung von Seitenketten der Aminosäuren.

Auf RNA Ebene kann die Halbwertszeit einer *messenger* RNA (mRNA) durch die Expression spezifischer RNAsen oder die Bindung von Proteinen gezielt verändert werden.

Es gibt jedoch auch Regulationsmechanismen, die nur auf RNA basieren und keine zusätzlichen Proteine benötigen. Hier werden zwei Klassen unterschieden, *cis* und *trans*. Bei der Regulation in *cis* ist der Regulator auf der mRNA des Zielgenes kodiert. Diese Regulatoren basieren auf der Fähigkeit von RNA verschiedene Strukturen anzunehmen. Auf ein externes Signal hin, wird so meist die Transkription oder die Translationsinitiation beeinflusst. Mögliche Signale sind regulatorische Proteine (TRAP), blockierte Ribosomen (Transkriptionsattenuation), unbeladene tRNAs (T-Box), physikalische Parameter (Temperatur) oder die intrazelluläre Konzentration von Metaboliten (Riboswitche).

Ebenfalls *cis* kodiert sind antisense RNAs (asRNAs) von Plasmiden und Phagen, die meist auf dem Gegenstrang ihres Zielgens liegen. Dies gewährleistet die perfekte Komplementarität des Zielgenes, selbst wenn die Bindestelle im Gen mutiert ist. asRNAs kommen häufig bei der Kontrolle der Kopienzahl eines Plasmids oder der Replikation von Phagen vor [37, 38].

Die letzten Jahre haben gezeigt, dass die *trans* kodierten kleinen RNAs (sRNAs) eine außergewöhnliche Rolle als Regulatoren der Genexpression spielen. sRNAs sind typischer Weise 40 – 200 nt lange eigenständige Transkripte aus den intergenen Regionen des Genoms (IGR) und kodieren nicht für Proteine. In *Escherichia coli* sind derzeit etwa 70 sRNAs experimentell validiert. Nur bei einem kleinen Teil der bekannten sRNAs ist bekannt welche mRNA(s) sie regulieren (etwa 25 bei *E. coli* von ~ 300 vorhergesagten). Bei der Regulation der Transkription über Proteine findet man häufig eine Konzentration der funktional zusammenhängenden Gene und ihrer Regulatoren im selben Bereich des Genoms. Bei sRNAs und ihren Ziel-mRNAs ist eine solche Konzentration an einem Ort selten. Dies macht die Identifikation der Zielgene einer sRNA schwierig.

Bei der Analyse der Expression von sRNAs zeigt sich häufig eine Induktion beim Übergang in die Stationärphase oder durch Stress. Tatsächlich findet die Expression einiger sRNAs spezifisch nur bei einer bestimmten Stresssituation statt. Diese Erkenntnis zusammen mit dem Wissen über bereits analysierte sRNAs legt nahe, dass sRNAs ein wichtiger Bestandteil der bakteriellen Stressantwort sind.

2.2.1. Repression der Translation

Die bisher am häufigsten beschriebene Wirkungsweise von sRNAs ist die Verhinderung der Initiation der Translation (Abb. 2-4). Meist findet diese über eine direkte Interaktion der sRNA mit der Region um die Shine-Dalgarno Sequenz (SD-Sequenz) der mRNA statt. Die sRNA bindet dann über Basenpaarung direkt an ihre Ziel-mRNA(s). Diese Interaktion erstreckt sich meist nur über einen kurzen Bereich beider RNAs mit nur unvollständiger Komplementarität. Sie ist jedoch ausreichend, um eine effektive Translation der mRNA zu verhindern. Die erste in *E. coli* entdeckte sRNA – MicF – verhindert auf diese Weise die Translation der *ompF* mRNA [39, 40]. Auf dieselbe Weise funktioniert die Regulation bei den sRNA – mRNA Paaren MicA/*ompA* und MicC/*ompC* [41, 42].

Auch die differenzielle Expression polycistronischer mRNAs ist mit Hilfe von sRNAs möglich. Wie das Beispiel des *galETKM* Operons in *E. coli* zeigt, dass Teile des Galactose Metabolismus kodiert. Die sRNA Spot42 bindet, durch eine hohe Glukosekonzentration in der Zelle induziert, an die SD-Sequenz des *galK* Gens der polycistronischen mRNA. Dadurch wird die Expression von *galK* verhindert ohne die von *galET* zu beeinflussen [43]. Diese

2.2.3. Aktivierung der Translation

Die Bindung einer sRNA im 5'UTR einer mRNA kann die Translation nicht nur reprimieren, sondern auch stimulieren, wie die Regulation von *rpoS* durch DsrA und RprA zeigt [46, 47]. Das Gen *rpoS* kodiert für den Sigmafaktor der Stationärphase σ^S , der auch für die Adaptation an verschiedene Stressbedingungen benötigt wird [48]. Ohne sRNA faltet sich der 5'UTR von *rpoS* in eine Stammschleife, die die SD maskiert. In diesem Zustand ist keine Translation der mRNA möglich. Durch Bindung der sRNAs DsrA und RprA wird eine Umfaltung des 5'UTR ausgelöst, durch die die SD freigegeben wird (Abb. 2-6). Die beiden sRNAs binden in derselben Region des 5'UTR, werden aber nicht gleichzeitig exprimiert. DsrA wird durch niedrige Temperaturen induziert, RprA durch osmotischen Stress an der Zelloberfläche [47, 49]. Zwei verschiedene externe Auslöser haben also in diesem Fall dieselbe globale Antwort der Zelle zur Folge.

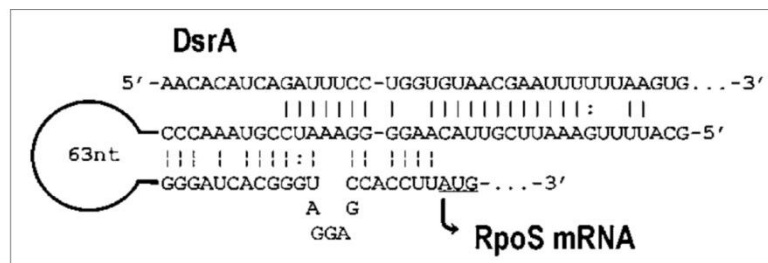


Abbildung 2-6: Bindung von DsrA an die *rpoS* mRNA führt zu einer Umfaltung, durch die die SD-Sequenz zugänglich wird. (aus Lease 1998)

2.2.4. Ribosome standby

Strukturierte mRNAs in denen die SD sequestriert ist, stellen ein Problem für die effiziente Initiation der Translation dar. Der ΔG° einer solchen Stammschleife kann auch als K_D der Entfaltung und Faltung derselben interpretiert werden [50]. Ein niedriger K_D einer solchen Stammschleife würde zum Beispiel bei der SD der mRNA des Hüllprotein des MS2 Phagen bedeuten, dass die SD bei einer Faltungsrate von 10^5 s^{-1} nur für je $10 \mu\text{s}$ zugänglich ist [50]. Bei der limitierten Diffusion der Ribosomen und einer Konzentration freier Ribosomen in der Zelle von $\sim 8.5 \mu\text{M}$ sollte die Translation dieser mRNA sehr ineffizient sein. Sie ist jedoch sehr effizient. Gelöst wurde dieses Paradoxon durch de Smit *et. al.* durch ihr Modell des Ribosome standby. Freie Ribosomen binden unspezifisch an unstrukturierte Regionen einer mRNA (*standby sites*). Dadurch ist die Diffusion nicht mehr der limitierende Faktor. Die Bindung an die SD wird nun durch den K_D der Stammschleife bestimmt. Ist die Stammschleife geöffnet kann durch Hineingleiten des Ribosoms eine Bindung an die SD

stattfinden [50, 51]. Das Ribosome standby Modell wurde von Studer *et al.* 2006 mittels FRET experimentell bewiesen [52]. An einer stabilen Stammschleife mit SD Sequenz bildete sich erst dann ein Initiationskomplex, wenn ihr ein einzelsträngiger Bereich vorausging. Zwei Stadien konnten dann von den Autoren unterschieden werden. Eines mit unspezifischer Bindung unabhängig von der Sequenz aber inhibiert durch Sekundärstrukturen. Und ein stabiler Initiationskomplex der sich bildete, sobald die Struktur aufgefaltete war. Der zweite Punkt war dann abhängig von der Stabilität der SD / anti-SD Interaktion.

Ein Beispiel wie eine sRNA in das Ribosome standby regulierend eingreifen kann ist die Regulation des *tisAB locus* in *E. coli* (Abb. 2-7). Dieser kodiert für ein SOS induziertes Toxin (TisB). Dessen Translation wird durch die Bindung der sRNA IstR-1 ~ 100 nt 5' der TIR von *tisB* verhindert solange keine SOS Bedingungen vorliegen [53]. Die SD von *tisB* ist normalerweise in einer Sekundärstruktur sequestriert, während die Bindestelle von IstR-1 zugänglich ist [54]. Die Bindestelle von IstR-1 ist gleichzeitig auch die Warteposition des Ribosoms so dass es eine Konkurrenz um dieselbe Bindestelle gibt. Unter normalen Bedingungen wird IstR-1 exprimiert und bildet an die *tisB* mRNA. Dadurch wird die Bindung der 30S Untereinheit verhindert und gleichzeitig der Abbau der mRNA durch RNase III initiiert.

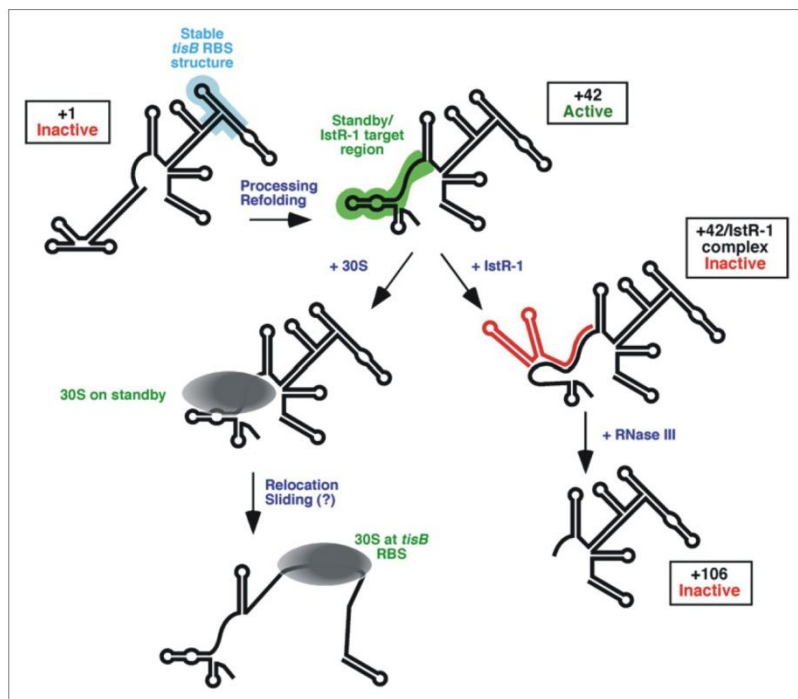


Abbildung 2-7: Modell der Regulation der *tisB* Expression durch IstR-1. Die sRNA konkurriert mit dem 30S Ribosom um die Bindung an die Warteposition auf der mRNA (aus Darfeuille 2007).

2.2.5. Inhibierung von Proteinen

Eine weitere Möglichkeit der sRNA vermittelten Genregulation ist die Sequestrierung von Proteinen (Abb. 2-8). In diesem Fall bindet die sRNA an ein Protein und inhibiert so seine Funktion. Ein Beispiel ist die Regulation von CsrA durch die sRNAs CsrB und CsrC in *E. coli* [55]. Der globale Regulator CsrA steuert eine Vielzahl von Prozessen in der Zelle. Dazu gehören neben der Glykogen Biosynthese und dem Kohlenstoffmetabolismus auch die Beweglichkeit und Größe der Zelle. CsrA ist ein RNA Bindeprotein und kann als Aktivator oder Repressor wirken. Bindung an den 5'UTR einer mRNA stört entweder die Initiation der Translation (ähnlich wie bei sRNAs durch Blockade der SD) und verkürzt die Halbwertszeit der mRNA, oder fördert die Translation und stabilisiert die mRNA. Der Mechanismus der Aktivierung durch CsrA ist noch unbekannt.

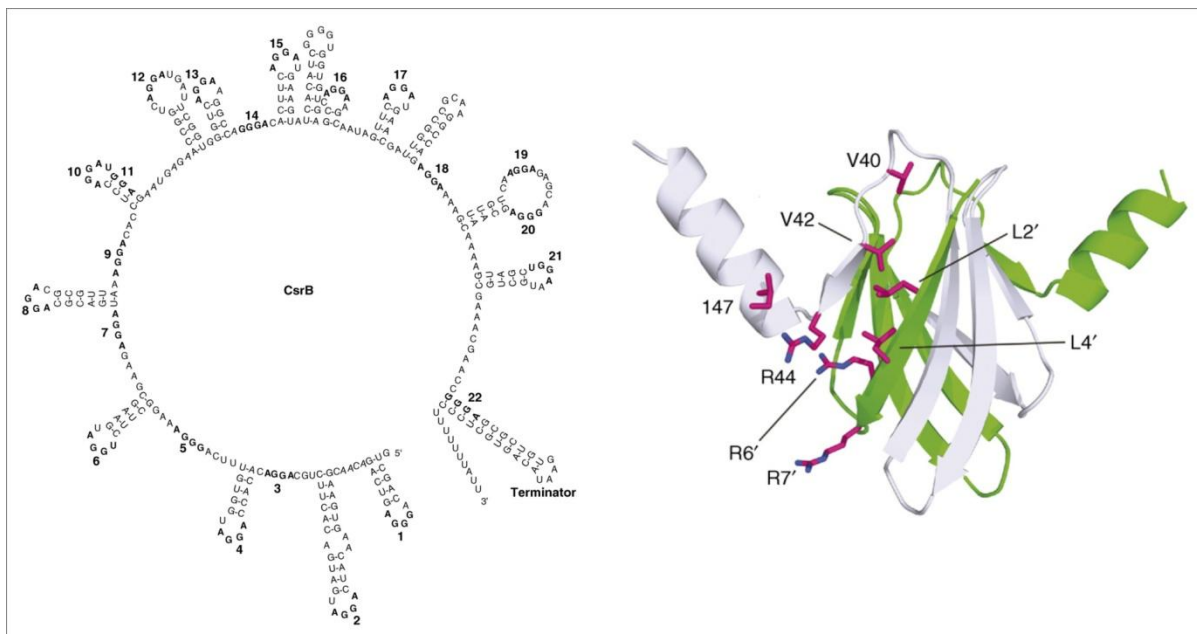


Abbildung 2-8: Die CsrB RNA (links) bindet ~ 18 Moleküle des Proteins CsrA (rechts). Die Abbildung ist nicht maßstabsgetreu. (aus Babitze 2007)

Die sRNA CsrB ist etwa 360 nt lang und faltet sich in eine Struktur mit 15 Stammschleifen die etwa 18 Moleküle CsrA binden können [56, 57]. Es wird vermutet, dass CsrB mit der Sequenz seiner Stammschleifen die natürlichen Ziel-mRNAs von CsrA nachahmt und das Protein so sequestriert. CsrC ist ein etwa 240 nt langes Homolog von CsrB und scheint nach demselben Mechanismus zu funktionieren [58].

Eine zweite, hoch konservierte und weit verbreitete sRNA die die Aktivität eines Proteins reguliert ist die während der Stationärphase exprimierte 6S RNA. Diese bindet spezifisch und stabil an RNA-Polymerase Holoenzyme, die den Sigmafaktor 70 (σ^{70}) tragen. σ^{70} ist der

Sigmafaktor der Haushaltsgene. Durch die Entfernung der Holoenzyme mit σ^{70} werden diese global reprimiert.

Die 6S RNA ist größtenteils doppelsträngig, hat aber eine konservierte einzelsträngige Schleife (Abb. 2-9). Die gesamte Struktur ähnelt der eines offenen DNA Promoters während der Initiation der Transkription. Man kann sich also einen Mechanismus vorstellen, bei dem die 6S RNA einen offenen Promoter nachahmt und so RNA-Polymerase Holoenzyme an sich bindet. Diese Theorie konnte durch Gelshift Experimente bestätigt werden. Es konnte gezeigt werden, dass die 6S RNA mit einem σ^{70} spezifischen Promoterfragment um die Bindung an σ^{70} konkurriert [59, 60]. σ^{70} /6S RNA Komplexe reicher sich in der Stationärphase an und führe zu einer transkriptionellen Repression σ^{70} abhängiger Promotoren. Nach Zugabe von Nährstoffen kann die 6S RNA selbst als Vorlage für eine σ^{70} abhängige Transkription dienen (pRNA), wodurch σ^{70} wieder freigegeben wird und die Zellen wieder zu exponentiellem Wachstum zurückkehren. Die 6S RNA konnte in den meisten bakteriellen Genomen identifiziert werden.

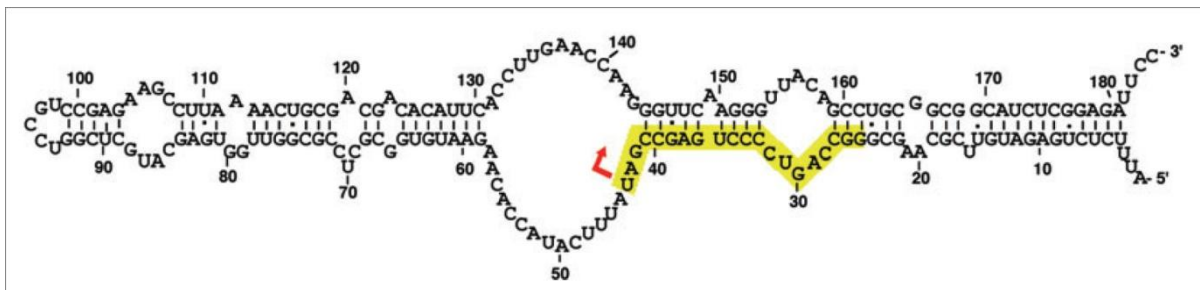


Abbildung 2-9: Sekundärstruktur der 6S RNA aus *E. coli*. Der rote Pfeil markiert den Transkriptionsstart der pRNA (gelb) (aus Wassarman 2007).

2.3. Das RNA Chaperon Hfq

Der Großteil der in *E. coli* oder *Salmonella typhimurium* identifizierten sRNAs benötigt das RNA Chaperon Hfq um ihre Funktion auszuführen. Hfq gehört zur Familie der Sm Proteine. Diese umfasst viele Proteine die RNA binden oder modifizieren. Sie werden zum Beispiel beim Spleißen oder beim Abbau von mRNAs in Eukaryoten und Archaeen verwendet [61]. Hfq selbst wurde 1968 erstmalig als *host factor I* bei der Replikation des Phagen Q β beschrieben [62]. Es formt Homohexamere und bindet bevorzugt an AU reiche, einzelsträngige RNA Sequenzen vor Stammschleifen. Es moduliert die Stabilität, Translation und Polyadenylierung vieler mRNAs, wie auch die Prozessierung vieler RNAs. In *E. coli* führt die Deletion von Hfq zu Wachstumsstörungen, verringerter Stressresistenz und Virulenz. Hfq ist eines der häufigsten Proteine in *E. coli* mit 30.000 – 60.000 Kopien pro

Zelle. In anderen Bakterien, wie *Staphylococcus aureus*, liegt es nur in sehr geringer Kopienzahl vor.

Etwa die Hälfte der sequenzierten bakteriellen Genome kodieren ein Hfq Homolog. Wie schon erwähnt unterscheidet sich aber die Stärke der Expression teilweise deutlich. Unklar ist auch die Art der Vermittlung von sRNA-mRNA Interaktionen in Bakterien ohne Hfq (wie *S. coelicolor*). In einigen dieser Bakterien gibt es nachgewiesene sRNA/mRNA Interaktionen wie sie in *E. coli* von Hfq vermittelt werden. Das wirft die Frage auf, ob und wie diese Bakterien Hfq ersetzen. Entweder gibt es ein analoges Protein mit anderer Sequenz, dass deshalb nicht über Sequenz- oder Strukturvergleiche gefunden werden kann. Oder die sRNA/mRNA Interaktionen sind darauf abgestimmt keine Kofaktoren zu benötigen.

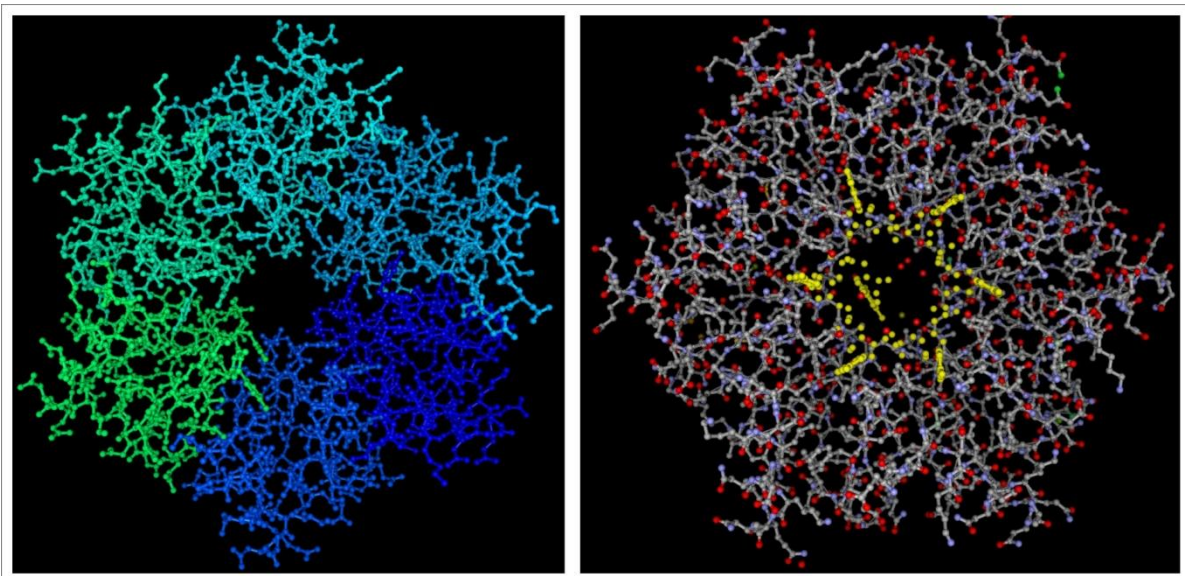


Abbildung 2-10: Kristallstruktur von Hfq aus *Staphylococcus aureus*. Links die freie Form. Die sechs Monomere sind unterschiedlich gefärbt. Rechts Hfq im Komplex mit einer RNA (gelb) (Abb. © www.rcsb.org PDB Nummern 1KQ1 und 1KQ2).

2.4. sRNAs suchen und finden

In früheren Jahren wurden sRNAs in Bakterien meist nur durch Zufall entdeckt, wie das Beispiel von DsrA zeigt. DsrA wurde bei der Untersuchung des Gens *rcsA* auf einem *multicopy* Plasmid entdeckt, das für einen Regulator der Capsid Synthese kodiert. In diesem System bewirkte DsrA eine Capsid Überproduktion. DsrA reprimiert die Expression des Histon ähnlichen Proteins Hns, welches *rcsA* reprimiert. Dieser Zusammenhang erklärt den entstandenen Phänotyp. Überexpression von DsrA entfernt Hns aus dem System und führt so zu einer Überexpression von RcsA [63]. In den folgenden Jahren wurde eine Vielzahl verschiedener Methoden angewandt um – meist in *E. coli* – gezielt sRNAs zu identifizieren.

***in vivo* Markierung der Gesamt-RNA**

Durch den Zusatz von radioaktiv markiertem Orthophosphat ($^{32}\text{PO}_4^{3-}$) zum Kulturmedium konnten häufig vorkommende RNA Spezies identifiziert werden. Orthophosphat wird vom Organismus aufgenommen und zufällig in Nukleinsäuren und andere Biomoleküle eingebaut. Nach Isolierung von Gesamt-RNA und Auftrennung in einem denaturierenden Gel konnten spezifische Banden ausgeschnitten und sequenziert werden.

Der Nachteil dieser Methode ist, dass sie sich nur für hoch exprimierte RNA Spezies eignet. Sie war jedoch empfindlich genug zum Nachweis von tmRNA, 6S RNA oder Spot42 [64].

Bioinformatische Vorhersage

Im Jahr 2001 wurden drei Studien veröffentlicht, in denen zum ersten Mal sRNAs bioinformatisch vorhergesagt wurden [65-67]. Alle drei zusammen identifizierten und verifizierten mehr als 40 neue sRNAs in *E. coli*.

Argaman *et al.* extrahierten die intergenen Regionen (IGR) aus dem Genom und suchten darin nach den -35 und -10 Boxen σ^{70} abhängiger Promotoren. 50 bis maximal 400 nt stromabwärts davon wurde nach *rho* unabhängigen Terminatoren gesucht. Die Sequenz zwischen den beiden Strukturen sollte zu einem bestimmten Mindestmaß auch in anderen Enterobakterien konserviert sein. Von den so vorhergesagten 24 neuen sRNA Kandidaten konnte bei 14 im Northern Blot ein Transkript nachgewiesen werden, was einer Erfolgsquote von immerhin 58% entspricht.

Wassarman *et al.* nutzten zusätzlich zur Promoter- und Terminatorvorhersage die hohe Konservierung bis dahin bekannter sRNAs für ihre Studie. Sie führten die Identität und Orientierung der benachbart liegenden Gene als weiteres Kriterium für die Auswahl potentieller sRNAs ein. Sie nahmen an, dass sRNAs in verwandten Arten mit hoher Wahrscheinlichkeit von jeweils denselben Genen flankiert werden. Außerdem werteten sie die Orientierung der Gene. Eine potentielle sRNA 3' eines Leserahmens (ORF) ist mit höherer Wahrscheinlichkeit ein Treffer, als 5' eines ORF wo es sich auch um einen regulatorisch aktiven 5' UTR, wie einen Riboswitch, handeln kann. Mit diesem Ansatz konnten 17 neue sRNAs in *E. coli* nachgewiesen werden.

Die dritte Studie von Rivas *et al.* führte als erste neben der Konservierung der Sequenz in verwandten Organismen auch die Konservierung der Sekundärstruktur als Kriterium mit ein. Konservierte Sekundärstrukturen, vor allem solche mit kompensatorischen Sequenzen,

wurden für eine Auswahl der sRNA Kandidaten verwendet. Bei 10 der vorhergesagten 49 sRNA Kandidaten konnte eine Transkription nachgewiesen werden.

Shotgun Klonierung

Mit diesem globaler angelegten Ansatz konnten sRNAs in *E. coli* in größerer Menge als vorher nachgewiesen werden [68]. RNAs einer Länge von 50 bis 500 nt wurden aufgereinigt, in eine cDNA Bibliothek umgeschrieben und auf einem *high-density filter* fixiert. In einer Vorstudie wurden diese mit rRNA und tRNA Sonden hybridisiert um diese Signale ausschließen zu können. Die Sequenzierung der verbleibenden ~ 3.000 Klone identifizierte mehrere neue sRNAs und bestätigte einige bioinformatisch vorhergesagte sowie bereits bekannte.

Prinzipiell ist es mit dieser Methode möglich alle sRNAs eines Organismus zu identifizieren, die zum Zeitpunkt der Zellernte exprimiert werden.

Microarrays

Eine Studie von Tjaden *et al.* in *E. coli* untersuchte die Genexpression unter verschiedenen Wachstumsbedingungen mit Hilfe von Microarrays [69]. Auf diesen wurden die kodierenden Regionen wie auch beide Stränge der intergenen Regionen detektiert. Die Autoren fanden ~4050 kodierende Transkripte sowie ~1100 Transkripte aus den IGR. Von diesen konnten 334 die länger als 70 nt waren nicht einem 5' oder 3' UTR oder einem Operon zugeordnet werden. Die Liste enthielt auch 19 der 34 damals bekannten sRNAs.

Co-Immunopräzipitation mit Proteinen

Die meisten sRNAs in *E. coli* benötigen Hfq für ihre Funktion und binden es mit hoher Affinität. Diese Eigenschaft wurde von Zhang *et al.* ausgenutzt um mittels Hfq spezifischer Antikörper Hfq-RNA Komplexe aus Zelllysat zu fällen [70]. Mit dieser Methode wurden 15 bekannte und 5 neue sRNAs in *E. coli* nachgewiesen. Diese Methode kann theoretisch in allen Spezies mit Hfq angewandt werden.

2.5. Identifikation möglicher Zielgene von sRNAs

Nach der Identifizierung einer neuen sRNA folgt die oftmals viel aufwendigere Suche nach ihrem Ziel. Dafür stehen mehrere verschiedene Methoden zur Auswahl, die im Folgenden kurz erläutert werden sollen.

Proteomanalyse von Mutanten

Eine häufig eingesetzte Methode ist die vergleichende Analyse des Proteoms von Überexpressions- und Deletionsmutanten der sRNA mit dem Wildtyp in 1D- oder 2D-Gelen. Urbanowski *et al.* identifizierten vier mögliche Ziele der sRNA GcvB in 1D Proteingelen. Alle diese Ziele konnten später von Sharma *et al.* bestätigt werden. Auf eine ähnliche Weise wurden die Ziele von MicA (*ompA*) und Spot42 (*galk*) durch Überexpression der sRNAs in 2D-Gelen identifiziert [41, 71, 72].

Analyse des Transkriptoms

Die Aktivierung oder Repression von mRNAs durch sRNAs führt oft zu einer Änderung von deren Stabilität. Eine vergleichende Analyse des Transkriptoms in Überexpressions- oder Deletionsmutanten der sRNA in Microarrays kann solche Änderungen der mRNA Menge aufzeigen. Die zeitlich befristete Expression der sRNA in einem kurzen Puls kann primäre und sekundäre Ziele unterscheidbar machen. Primäre Ziele interagieren direkt mit der sRNA, sekundäre reagieren auf die Veränderung der primären Ziele. Dieser Ansatz wurde in mehreren Studien verwendet um die Ziele von sRNAs zu finden.

Die Expression der sRNAs OmrA oder OmrB für 20 Minuten führte zu starken Änderungen der Menge von mehreren mRNAs von Proteinen der äußeren Membran in *E. coli* [73]. In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass die 10 minütige Induktion der sRNA RhyB den Abbau von mindestens sieben mRNAs von Proteinen der äußeren Membran zur Folge hatte [74].

Bioinformatische Vorhersage von Ziel-mRNAs

Da sRNA-mRNA Interaktionen auf Basenpaarung beruhen, lassen sich diese in der Theorie leicht vorhersagen. Das größte Problem beim Versuch solch eine Interaktion vorherzusagen ist der relativ kleine Bereich über den sie sich in beiden Molekülen erstreckt. Zusätzlich erschwert wird die Vorhersage dadurch dass die Bindung immer wieder durch ungepaarte oder nicht kanonische Basenpaare unterbrochen wird. Eine Interaktion kann sich also über 20 Basen erstrecken, beinhaltet aber nur 10 Basenpaare. Je größer die Interaktionsfläche ist, desto besser sind aber die Chancen ein richtiges Ziel vorherzusagen. Bei einer Suche mit BlastN wurde *ompC* als Ziel von MicC identifiziert [42]. Diese Interaktion besteht allerdings aus einer 16 nt langen Helix ohne Unterbrechungen.

Ein erster Versuch ein Programm zu entwickeln das spezifisch für die Suche nach sRNA-mRNA Interaktionen geschrieben ist, ist TargetRNA. Hier wird die Suche auf die TIR fokussiert um zumindest auf Seiten der mRNA das häufigste Ziel zu verwenden. Dann wird versucht die sRNA Sequenz mit der TIR zu hybridisieren und die Resultate nach Stabilität der Bindung sortiert. Das Problem bei dieser Methode ist, dass die Sekundärstrukturen der beiden RNAs nicht in die Bewertung mit einfließen. Das einzige Kriterium ist also die Stabilität der möglichen Hybridisierung so das, je nachdem wie stringent nach der Suche gefiltert wird, entweder keine Treffer übrigbleiben, oder viel zu viele. (Die in Kapitel 3.4 beschriebene Interaktion der sRNA *sc1* mit ihre Ziel-mRNA *dagA* wurde von TargetRNA nicht vorhergesagt.)

Momentan ist es vor allem auf Grund mangels experimenteller Daten nicht möglich *in silico* zu entscheiden wann eine Hybridisierung für eine Regulation der mRNA ausreicht und wann nicht.

2.6. Ziel dieser Arbeit

Die meisten bisher charakterisierten sRNAs stammen aus Gram negativen Enterobakterien wie *E. coli*. Zu Beginn dieser Arbeit gab es nur sehr wenige Beispiele überhaupt für sRNAs in Gram positiven Bakterien wie *B. subtilis*. Für GC-reiche Gram positive wie die Gruppe der Actinobakterien war keine sRNA bekannt – abgesehen von ubiquitären RNAs wie tmRNA und 6S RNA.

Ziel dieser Arbeit war es mit verschiedenen bioinformatischen Methoden sRNAs in *S. coelicolor* vorherzusagen. Parallel dazu sollte das Transkriptom mittels 454 Sequenzierung nach sRNAs durchsucht werden. Interessante Kandidaten aus allen Ansätzen sollten in ihrer Expression analysiert und strukturell sowie funktional charakterisiert werden. Die dazu notwendigen Methoden sollten deshalb zunächst etabliert und, soweit notwendig, an die GC-reichen Streptomyceten angepasst werden.

3. Ergebnisse

3.1. Bioinformatische Vorhersage von sRNAs

Die Suche nach sRNAs im Genom von *S. coelicolor* wurde auf die IGR beschränkt, da sRNAs meist dort kodiert sind. Dazu wurden aus dem kompletten Genom alle kodierenden Regionen sowie alle bekannten RNA Spezies (tRNAs und rRNAs) entfernt. Die übrig bleibenden IGRs wurden fortlaufend nummeriert. Für die weiteren Vorhersagen wurden nur IGRs mit einer Länge ≥ 80 nt verwendet (3797 Stück). Die Abbildung 3-1 zeigt beispielhaft eine so extrahierte Region. Es handelt sich um die intergene Region 5 (>IG|5). Sie reicht von 11953 bis 12365 nt im Genom. 11617..11952- $\&\&$ +12366..13457 beschreibt die Start- und Endpunkte der flankierenden Gene. Minus und Plus Zeichen neben dem $\&\&$ geben an, auf welchem Strang die flankierenden Gene liegen. Die Sequenz der IGR entspricht immer dem Plusstrang von 5' nach 3'.

```
>IG|5:11953-12365:11617..11952- $\&\&$ +12366..13457  
GCTGCGGGATAGCCGGGGCGCCGTAGCGGCCGATTCCCCCTCGACGTACGCCACCAGGGCTTGCCCGTGGTGCCCGTCATCAGTTTCGGCTTCCAC  
CGGTCCGAATCGGTCCAGTGCAGGGGCTGGTCCGACCGGGTGCAGTACCGGGACTCCGCGGGTGGACCGCTGGTGCCGGAGACATCGGGCAGACCG  
CTCAACGGCGTCGTCGAAGACGCCGGAAGTGGACTGCCGGCGTCCGCGTTGCGCCGAATCGGGCAGCGCTGCTCCCGTGCAGGGCCAGCATAGGCAGGA  
GTAGTGCTGCGATCGTCCGCGACGGCGTCCGAGGCAACATGAGTGCTGAGCGAGAACAGCAGCCGAGGACGGCCCCGGTCTTCCCCGCCAACGGCGT  
GCCTCCGGGAACACGTTGACC
```

Abbildung 3-1: Intergene Region Nummer 5.

3.1.1. RNAmotif

Eine häufig verwendete Methode zur Vorhersage von sRNAs besteht darin, die Vorhersage bekannter Promotoren (meist Stress- oder Haushaltspromotoren) und *rho* unabhängiger Terminatoren zu kombinieren. Die Vorhersagen werden dann zunächst unabhängig voneinander durchgeführt und anschließend die Ergebnisse kombiniert. Ein typischer Filter sieht zum Beispiel so aus, dass nur solche Promotoren als Treffer anerkannt werden, bei denen maximal 300 nt dahinter auch ein Terminator gefunden wurde. So eine Transkriptionseinheit wird dann auf einen Leserahmen hin überprüft. Genome werden meist automatisch annotiert, Fehler sind deshalb durchaus möglich. Findet sich in der Sequenz dazwischen kein Leserahmen, handelt es sich vermutlich um eine nicht kodierende RNA. Diese könnte dann eine nicht annotierte tRNA, rRNA oder eine sRNA sein. Die ersten beiden Möglichkeiten lassen sich aber durch die hohe Konservierung, die diese beiden Spezies auszeichnet, zuverlässig überprüfen. Die übrig bleibenden Sequenzen sind potentielle sRNAs und können weiter untersucht werden.

Streptomyceten verwenden – anders als *E. coli* – eine Vielzahl von *Sigma* Faktoren zur Regulation der Genexpression. Zurzeit sind etwa 65 solcher *Sigma* Faktoren in *S. coelicolor* bekannt bzw. als solche annotiert. Dies hat zur Folge, dass sich Promotersequenzen hier sehr inhomogen darstellen. Des Weiteren sind nur von wenigen *Sigma* Faktoren die Bindeepitope auf der DNA bekannt. Aus diesem Grund wurde die bioinformatische Vorhersage auf die Suche nach Terminatoren beschränkt. Hierfür wurde das Programm RNAmotif verwendet [75]. RNAmotif durchsucht eine Datenbank nach RNA Sequenzen, die einem vorher definierten Motiv entsprechen. Solch ein Motiv kann sowohl eine bestimmte Sequenz als auch eine Sekundärstruktur sein. Verschiedene Motive können kombiniert und unterschiedlich gewichtet werden. Ein Treffer bedeutet, dass eine Sequenz in der Lage ist, eine bestimmte Sekundärstruktur einzunehmen.

Die extrahierten IGRs wurden nun dazu verwendet, mittels RNAmotif nach terminatorähnlichen Strukturen zu suchen. Hierbei wurde ein Terminator als Sequenz definiert, die in der Lage ist eine Stammschleife gefolgt von einer einzelsträngigen Region auszubilden.

```
#RM descr ss h5(tag='1') ss h3(tag='1') ss ss ss ss
```

Mit diesem Deskriptor wurden 172 potentielle Terminatoren in den IGRs vorhergesagt. Diese wurden unter `NC_003888_min80nt_no_rRNA_tRNA_genes.rnamotif_sorted` gespeichert. Abbildung 3-2 zeigt beispielhaft das Ergebnis der Vorhersage mit RNAmotif für die IGR Nr. 31. Zu Beginn steht wieder die Beschreibung der IGR, dann folgen die Ergebnisse von RNAmotif. Die Sequenz der Stammschleife folgt als letztes: `gtttttgataa ccctct ccatgc gggggg a ttctt ttc cctt`, wobei der zweite und vierte Block die Helix bilden (`ccctct` und `gggggg`). Danach folgt eine T reiche Region. Die Zahl vor der Sequenz (42) gibt die Länge des Terminators an, die beiden Zahlen davor (0 und 109) geben den Strang an auf dem der Terminator liegt (0 bezeichnet den plus, 1 den minus Strang) und die Anfangsposition des Terminators relativ zum Beginn der IGR (109). Der Terminator in Abbildung 3-2 liegt also in IGR 31, ist 42 nt lang und beginnt bei Nukleotid 109 der IGR. Die anderen Zahlen der Ausgabe sind verschiedene Scores, die von RNAmotif während der Suche erzeugt wurden. Der wichtigste ist der 6 (-2.29 in Abbildung 3-2). Er gibt den vorausberechneten ΔG Wert des Terminators in kcal/mol an. In die nähere Auswahl kamen nur Terminatoren mit einem $\Delta G \leq -4$ kcal/mol. Diese Bedingung traf auf 129 potentielle Terminatoren zu. Sie wurden in der Datei `sco_min80nt_no_rRNA_tRNA_genes.terminators_sorted_score-4.txt` gespeichert.

```

#RM scored
#RM descr ss h5(tag='1') ss h3(tag='1') ss ss ss ss
>IG|31:51540-51830:49821..51539-&&+51831..53144
IG|31:51540-51830:49821..51539-&&+51831..53144 | -7.00 | -0.90 | -2.80 |
-1.70 | -3.20 | -2.29 | 6.0 | 6.0 | 3.0 | 0.6 | 0 | 109 | 42
gtttttgataa ccctct ccatgc gggggg a ttctt ttc cctt
>IG|31:51540-51830:49821..51539-&&+51831..53144
IG|31:51540-51830:49821..51539-&&+51831..53144 | -5.80 | -0.90 | -2.80 |
-1.70 | -3.20 | -1.09 | 6.0 | 5.0 | 3.0 | 0.6 | 0 | 110 | 41
tttttgataac cctctc catgc gggggg a ttctt ttc cctt
>IG|31:51540-51830:49821..51539-&&+51831..53144
IG|31:51540-51830:49821..51539-&&+51831..53144 | -6.40 | -0.90 | -2.80 |
-1.70 | -3.20 | -1.69 | 6.0 | 4.0 | 3.0 | 0.6 | 0 | 111 | 40
ttttgataacc ctctcc atgc gggggg a ttctt ttc cctt

```

Abbildung 3-2: Ergebnis der RNAmotif Suche für IGR 31.

3.1.2. Target Explorer

Ein weiterer Ansatz bestand darin, sRNAs zu finden, die unter der Kontrolle eines globalen Regulatorproteins stehen. Ein solches Protein in Streptomyces ist DasR (*deficient in aerial mycelium and spore formation*). DasR ist ein Repressor der Transkription und reguliert, laut Vorhersagen, mehr als 100 Gene in *S. coelicolor* [76-79]. Induziert wird das Protein durch Glucosamin-6-Phosphat (GlcN-6P), einem Zwischenprodukt des Chitinabbaus. Chitin wird extrazellulär durch Chitinasen in sein Monomer N-Acetyl-Glucosamin (GlcNAc) gespalten, über das Phosphotransferasesystem (PTS) in die Zelle aufgenommen und dabei zu N-Acetyl-Glucosamin-6-Phosphat (GlcNAc-6P) phosphoryliert. Durch Deacetylierung durch NagA entsteht Glc-6P, das von NagB in Fructose-6-Phosphat (Fru-6P) umgewandelt wird. Ein hoher GlcN-6P Spiegel in der Zelle bewirkt die Ablösung von DasR von seiner Operatorbindestelle und die Freigabe der Transkription der dahinter liegenden Gene – unter anderem des PTS. Die Erkennungssequenz von DasR auf der DNA ist die so genannte *dre*-site (DasR *responsive element*), deren Konsensussequenz in Abbildung 3-3 gezeigt wird.



Abbildung 3-3: Konsensussequenz bekannter Bindestellen von DasR (aus Rigali *et al.* 2007).

Um *dre*-sites Vorhersagen zu können, musste zunächst eine Matrix erstellt werden, in der die einzelnen Nukleotide der Bindestelle eine Bewertung entsprechend ihrer Wichtigkeit bekommen. Dazu wurde das Programm ‘Target Explorer’ verwendet [80]. Zum Erstellen der

Positionsmatrix wurden die Sequenzen von fünf verschiedenen *dre*-sites verwendet, deren Erkennung durch DasR *in vivo* nachgewiesen worden ist (Friedrich Titgemeyer, persönliche Daten). Die verwendeten Sequenzen und zugehörigen Gene sind in Tabelle 3-1 aufgelistet. Die erstellte Positionsmatrix ist in Abbildung 3-4 gezeigt.

Tabelle 3-1: *dre*-sites, die zur Erstellung der Positionsmatrix verwendet wurden.

Gen	<i>dre</i> -site
nagE1	actgggttagaccagt
nagE2	agtgggttagacctgt
ptsH	agttgtctagaccagt
dasA	aatgggttagaccagt
crr	tgtgggttagacctct

Score matrix:

A	1.00	-0.22	-1.79	-1.79	-1.79	-1.79	-1.79	-1.79	1.21	-1.79	1.21	-1.79	-1.79	0.73	-1.79	-1.79
C	-1.79	-0.14	-1.79	-1.79	-1.79	-1.79	0.45	-1.79	-1.79	-1.79	-1.79	1.30	1.30	-1.79	-0.14	-1.79
G	-1.79	0.82	-1.79	1.09	1.30	-1.79	0.82	-1.79	-1.79	1.30	-1.79	-1.79	-1.79	-1.79	1.09	-1.79
T	-0.22	-1.79	1.21	-0.22	-1.79	1.21	-1.79	1.21	-1.79	-1.79	-1.79	-1.79	-1.79	0.36	-1.79	1.21

Abbildung 3-4: Positionsmatrix der *dre*-sites erstellt mit Target Explorer.

3.1.3. PreDetector

Mit Hilfe der Matrix in Abbildung 3-4 wurden mit dem Programm PreDetector mögliche DasR Bindestellen im Genom von *S. coelicolor* vorhergesagt [81]. Dieses durchsucht ein gegebenes Genom nach allen Sequenzen die einer bestimmten Positionsmatrix entsprechen. Die Ergebnisse werden nach Grad der Übereinstimmung mit der Matrix gewertet und sortiert (Score). Als weiterer Filter wurden nur *dre*-sites als Treffer akzeptiert, die in einer IGR und mindestens 100 nt vom nächsten Gen entfernt liegen. Auf diese Weise wurden 15 neue *dre*-sites vorhergesagt (Tab. 3-2). Im nächsten Schritt wurde stromabwärts dieser *dre*-sites nach konservierten Bereichen gesucht.

Tabelle 3-2: vorhergesagte *dre*-sites.

Score	<i>dre</i> -site	Position	stromabwärts gelegenes Gen	Funktion des Gens
16,97	actggtctacaccatt	-105	SCO5232	<i>Zuckertransporter</i>
13,99	acaggtctaaaccatt	-101	SCO3563	Synthetase
13,97	actggtctacaccctt	-171	SCO7263	<i>chiF, Chitinase</i>
12,19	agtggctagtccaca	-334	SCO5239	Histidin Kinase
11,55	agtggcgtagacactgt	-214	SCO7250c	unbekannt
11,18	agtggactatacctgt	-245	SCO6004c	<i>ATP/GTP bindendes Protein</i>
10,90	agaggtctagacaaaa	-117	SCO6300c	<i>sekretierte Hydrolase</i>
10,60	aatggtctggaccaga	-112	SCO6012c	<i>unbekannt</i>
10,35	aatcgtaagacactgt	-117	SCO3490	Transposase
9,95	agaggtcaagatcact	-102	SCO4506	unbekannt
9,70	ccttgtagaccaat	-160	SCO7224c	<i>integrales Membranprotein</i>
9,45	actggcggagacctct	-129	SCO1906c	<i>sekretiertes Protein</i>
9,23	tgtgtctagtccaat	-313	SCO3679	unbekannt
9,09	tctggtctagtctctgg	-119	SCO5230c	<i>integrales Membranprotein</i>
9,01	taaggtctagacctgc	-113	SCO6345	<i>sekretierte Chitinase</i>

Dazu wurde die Genomsequenz von *S. coelicolor* an dieser Stelle mittels BLAST mit der von *S. avermitilis* und *Thermobifida fusca* verglichen. Nur bei einer – SCO5239 – zeigte sich eine ~ 200 nt lange konservierte Region in der IGR direkt hinter der *dre*-site (siehe Kapitel 3.4). Bei neun weiteren (in der Tabelle kursiv) lässt die Funktion des stromabwärts liegenden Gens eher eine auf Regulation durch DasR und einen langen 5'UTR vermuten. SCO7263 zum Beispiel kodiert ChiF, eine extrazelluläre Chitinase, die vermutlich durch DasR in ihrer Expression reguliert wird.

3.1.4. Vorhersage konservierter Strukturen

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Heiko Liesegang aus Göttingen wurden zwei weitere Vorhersagen durchgeführt. In diesen wurde mittels RNAz bzw. Infernal nach konservierten Strukturen – unabhängig von der Sequenz – in den IGRs gesucht [82, 83]. RNAz lieferte 991, Infernal 1377 Treffer. In beiden Fällen wurde die Suche auf die IGRs > 80 nt beschränkt. Ein Treffer bezeichnet jeweils eine konservierte Sekundärstruktur in einer bestimmten Region. Die Ergebnisse sind unter `RNAz_0.5_SCO.xls` und `Inf_80_SCO_ScoreSort.xls` abgelegt. Von beiden Listen wurden `gff` (*general file format*) Dateien erstellt, die die Visualisierung der Daten in Artemis erlauben [84].

3.2. 454 Sequenzierung des Transkriptoms

Alternativ zur bioinformatischen Vorhersage von sRNAs wurde eine Datenbank des Transkriptoms von *S. coelicolor* erstellt. Hierzu wurde *S. coelicolor* M145 in TSB Medium bis zum Ende der exponentiellen Phase angezogen (48 h). Die Kultur wurde geerntet und Gesamt-RNA extrahiert. Durch RT-PCR mit fünf verschiedenen Oligonukleotidpaaren wurde die RNA auf DNA Kontamination überprüft. 30 µg DNA-freie RNA wurden zur weiteren Bearbeitung an C. Sharma (MPI IB, Berlin) gesandt. Dort wurden 5' Linker und ein Poly-A Schwanz mit und ohne vorherige Behandlung mit *Tobacco Acid Pyrophosphatase* (TAP) an die RNA ligiert und die cDNA Synthese durchgeführt. Die TAP Behandlung ist notwendig, da bakterielle Primärtranskripte am 5' Ende ein Triphosphat tragen, dass eine Ligation erschwert. Nach einer Prozessierung haben die RNAs ein Monophosphat am 5' Ende und können ligiert werden. Die TAP Behandlung erhöht also den Anteil an Primärtranskripten in der Sequenzierung. An die RNAs ± TAP Behandlung wurden verschiedene Linker (ACTA bzw. AGGT) ligiert um die Sequenzen nach der Sequenzierung unterscheiden zu können. Die Sequenzierung erfolgte dann auf einem Roche FLX Sequencer. Die erhaltenen Sequenzen wurden von C. Sharma gefiltert. Nach der Sortierung ± TAP Behandlung wurden die Linkersequenzen und die Poly-A Schwänze sowie alle Sequenzen ≤ 18 nt entfernt. Die verbleibenden Sequenzen wurden mittels BLASTN im Genom annotiert (Tab. 3-3 und 3-4).

Tabelle 3-3: Primäre Sequenzen in der 454 Datenbank.

Datenbank	Linker	Sequenzen	≤ 18 nt	> 18nt
SCO-	ACTA	40428	11140	29288
SCO+	AGGT	38946	10532	28414

Diese jeweils ~ 40.000 Sequenzen wurden weiter gefiltert. So wurden alle kodierenden Bereiche, rRNAs, tRNAs und bekannte Riboswitche entfernt. Das Ergebnis der Filterung ist in Tabelle 3-4 zusammengefasst.

Tabelle 3-4: 454 Ergebnis.

	SCO-	SCO+
< 18 nt	11140	10532
≥ 18 nt ohne BLAST Treffer	6844	4123
5S rRNA	1224	1227
23S rRNA	7417	4582
16S rRNA	2344	1137
tRNAs	3433	7805
antisense zu rRNA	11	10
SRP RNA	37	112
RNAseP RNA	16	52
tmRNA	31	72
sense to mRNA	2691	3069
antisense to mRNA	643	660
sense zu Riboswitch	16	19
IGR	4581	5546
Total	40428	38946

Die fett markierten Sequenzen in Tabelle 3-4 waren für die weitere Bearbeitung interessant. Diese enthalten transkribierte sRNAs, aber auch 5' und 3' UTRs annotierter Gene, sowie nicht annotierte Gene. Diese wurden im nächsten Schritt manuell mit dem Affymetrix Genome Browser untersucht und eine Tabelle potentieller sRNAs erstellt. Der Genome Browser erlaubt die Visualisierung von 454 Daten im annotierten Genom. Trotz der Filterung waren noch einige Sequenzen übrig, die mit kodierenden Bereichen überlappten. Diese wurde aus der Liste entfernt. Ebenfalls entfernt wurden alle Sequenzen die näher als 10 nt an einen

kodierenden Bereich heran reichten oder die sich im intergenen Bereich vor oder hinter einer tRNA oder rRNA befanden. Dies resultierte in 815 Transkripten, die derzeit in der Arbeitsgruppe weiter analysiert werden (siehe Anhang Seite 116ff).

3.3. Die sRNA sc32

3.3.1. Expressionsanalyse und 5'RACE

Aus den Ergebnissen der bioinformatischen Vorhersagen mittels RNAz und RNAmotif wurde eine Liste mit Treffern erstellt, die in beiden Suchen vorkamen. 35 dieser Treffer wurden ausgewählt und die Expression eines Transkriptes im Northern Blot überprüft. Als Kriterium für die Auswahl wurde die Stabilität des vorhergesagten Terminators, die Konservierung der Struktur und der Abstand zu den benachbarten Genen verwendet. Nur eine Sequenz dieses Pools – Nummer 32 – zeigte im Northern Blot ein Signal, das nicht mit einer mRNA in Verbindung zu bringen war (Abb. 3-5).

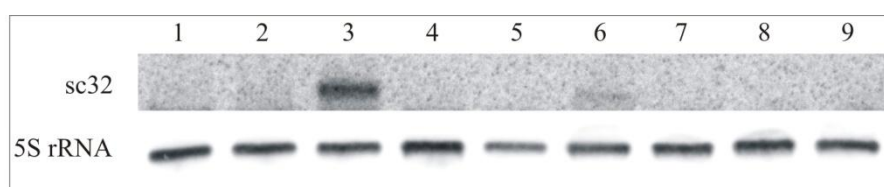


Abbildung 3-5: Northern Blot zum Nachweis von sc32 mit RNA präpariert aus verschiedenen Stressbedingungen. Sonde: Oligonukleotid as_sc32#1. **1** Stickstoffmangel **2** Stickstoffpuls **3** Kälteschock **4** Hitzeschock **5** Balanced + GlcNAc **6** Balanced **7** sc1 Überexpression **8** DasR Überexpression + GlcNAc **9** DasR Überexpression.

Diese sRNA – sc32 – wird spezifisch bei Kälteschockbedingungen exprimiert. Sie liegt zwischen den Genen SCO4091 und SCO4092. Um den Transkriptionsstart zu bestimmen, wurde 5'RACE durchgeführt. Dazu wurde eine *S. coelicolor* Kultur einem Kälteschock unterzogen und anschließend die RNA präpariert. Nach der cDNA Synthese wurden die Oligonukleotide as_sc32#1 und as_sc32#2 zur PCR Amplifikation verwendet. Das entstandene PCR-Produkt wurde jeweils TOPO-kloniert und sequenziert (Abb. 3-6). Auf

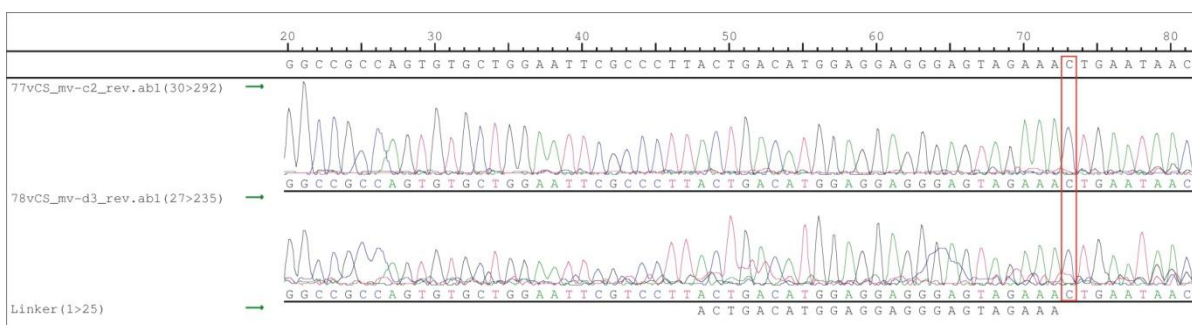


Abbildung 3-6: 5'RACE von sc32. Die Sequenz des A4-Linkers ist eingezeichnet. Für die PCR wurden die Oligonukleotide as_sc32#2 und as_sc32#1 verwendet. Das 5' Ende von sc32 ist rot markiert.

diese Weise konnte das 5' Ende der sRNA sc32 bei Position 4485574 im Genom bestimmt werden. Auf Grund des ausgeprägten Terminators war eine experimentelle Bestimmung des 3' Endes nicht notwendig. Es liegt bei 4485713, was einer Länge von sc32 von 139 nt entspricht. Diese Länge entspricht auch der Laufstrecke im Gel.

Die Strukturvorhersage von sc32 mit RNAfold sagt eine Faltung in drei Haarnadelschleifen unterschiedlicher Stabilität voraus (Abb. 3-7). Der Farbcode der Abbildung ist ein Maß für die Glaubwürdigkeit („reliability“) der Vorhersage. Rot markierte Basenpaarungen kommen in allen vorhergesagten Sekundärstrukturen häufiger vor als blaue.

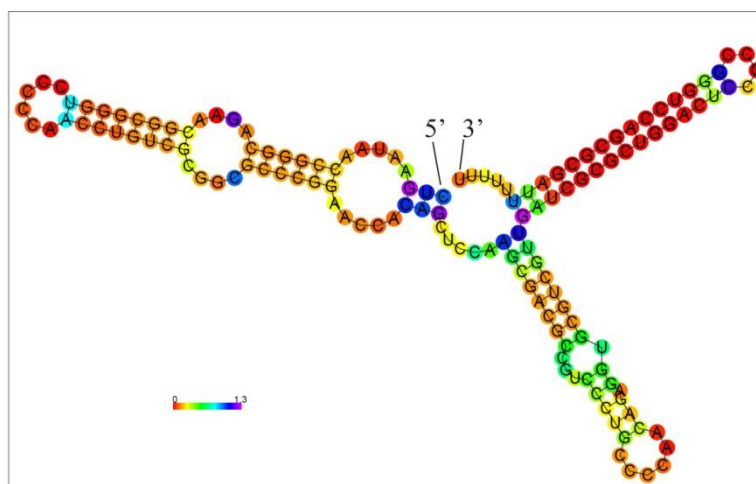


Abbildung 3-7: Strukturvorhersage von sc32 mit RNAfold.

Sc32 liegt zwischen den Genen *bldC* (SCO4091) und SCO4092 nur vier nt vom 3' Ende von *bldC* entfernt (Abb. 3-8). Somit muss der Promoter von sc32 entweder im kodierenden Bereich von *bldC* liegen oder sc32 ist ein Produkt der Prozessierung des 3'UTRs von *bldC*. Ein Northern Blot mit einer Sonde gegen den kodierenden Bereich von *bldC* konnte aber keine synchrone Expression bei Kälteschock der mRNA und sc32 zeigen. Auch konnte in der durchgeführten 454 Sequenzierung keine durchgehende mRNA nachgewiesen werden. Das Gen *bldC* kodiert für einen konservierten Sigmafaktor, dessen genaue Funktion nicht bekannt ist. Eine Deletion von *bldC* führt zu einem *bold* Phänotyp, bei dem kein Luftmyzel mehr gebildet wird [85, 86]

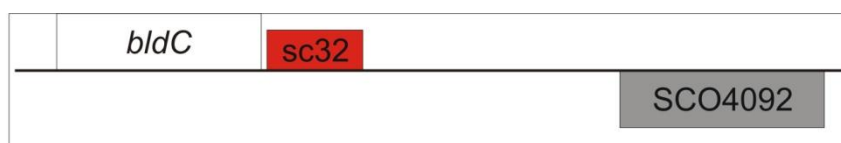


Abbildung 3-8: Lage von sc32 im Genom von *S. coelicolor* zwischen den Genen *bldC* (SCO4091) und SCO4092.

3.3.2. Überexpression von sc32

Die Suche nach den Zielgenen von sRNAs gestaltet sich oft schwierig, da diese meist nicht benachbart den sRNAs im Genom liegen, wie dies für viele Repressorproteine der Fall ist. Um dennoch deren Zielgene zu identifizieren, wird die sRNA überexprimiert bzw. deletiert. Ein Phänotyp kann dann einen Rückschluss auf die Funktion der sRNA und damit mögliche Zielgene erlauben. Die Wirkung von sRNAs ist meist eher die Modulation der Aktivität ihres Zielgens. Deshalb ist es nicht selten, dass die Deletion einer sRNA keinen Phänotyp nach sich zieht. Die Überexpression zeigt meist deutlichere Resultate.

Das Überexpressionsplasmid von sc32 – pUWL-sc32 – wurde von Johannes Förtsch in seiner Diplomarbeit kloniert und in *S. coelicolor* transformiert. Auf ihm ist sc32 unter der Kontrolle des konstitutiven Phagenpromoters SF14 [87]. Dies führt zu einer deregulierten, starken Überexpression der sRNA. In den von ihm durchgeführten Untersuchungen mit dieser Mutante konnten jedoch keine Phänotypen erzeugt werden.

3.3.3. Deletion von sc32 mit Hilfe des ReDirect Systems

Es wurde weiterhin versucht, sc32 mittels der ReDirect Methode [88, 89] im Genom zu deletieren. Dabei wird in einem mehrstufigen Prozess eine bestimmte Genomsequenz gegen eine Resistenzkassette ausgetauscht (siehe Anhang Seite 107). Zunächst wurde die Resistenzkassette – in diesem Fall Apramycin – vom Plasmid pIJ773 mit dem Oligonukleotiden sc32_del_fwd und sc32_del_rev mittels PCR amplifiziert. Durch die Oligonukleotide wurde an die Kassette am 5' und 3' Ende je 39 nt genomischer Sequenz angehängt. Diese entsprachen der Region +2 bis +40 von sc32 sowie 2 – bis 41 nt hinter dem 3' Ende der sRNA. Diese Strategie wurde verwendet, um die Expression von *bldC* möglichst nicht zu stören. Das erzeugte PCR-Produkt wurde in *E. coli* BW25113/pIJ790/StD17 elektroporiert. Dieser Stamm trägt auf pIJ790 das Lambda-*red* Rekombinationssystem unter Kontrolle des durch L-Arabinose induzierbaren Promoters ParaBAD [90]. Mutationen werden in *S. coelicolor* meist nicht direkt eingeführt, sondern zunächst in *E. coli* auf einem Cosmid etabliert. Die Cosmidbank für *S. coelicolor* ist ein Nebenprodukt der Sequenzierung des Genoms und sind über das Sanger Institut erhältlich [91]. Jedes der Cosmide trägt etwa 50 kB genomischer Sequenz und kann in *E. coli* vermehrt werden. Mutanten werden also zuerst in *E. coli* mit Hilfe des Lambda-*red* Systems kloniert. Die mutierten Cosmide werden dann in *S. coelicolor* konjugiert. Durch doppelt homologe Rekombination wird dann die

Resistenzkassette an der richtigen Stelle ins Genom integriert. Das Cosmid StD17 trägt den Abschnitt von 4469119 bis 4508921 nt des *S. coelicolor* Genomes (SCO4076 – SCO4108) also auch die sRNA sc32. Mit Hilfe des Lambda-*red* Systems erfolgt eine doppelt homologe Rekombination in das Cosmid und somit ein Austausch der gewünschten Genomsequenz durch die Resistenzkassette. Das mutierte Cosmid wurde in *E. coli* ET12567/pUZ8002 transformiert und von dort in *S. coelicolor* konjugiert. Nach erfolgreicher Konjugation tragen die Streptomycceten eine lineare Kopie des Cosmids mit einer Kanamycin Resistenz aus dem Rückgrat des Cosmids und eine Apramycin Kassette die in das Cosmid eingebaut wurde (Km^R und Ap^R). Findet eine doppelt homologe Rekombination des Fragments in das Genom statt, wird die Apramycin Kassette ins Genom integriert, während die Kanamycin Kassette dabei verloren geht. Durch Überstempeln von Kolonien von SM-Apramycin auf SM-Apramycin-Kanamycin Platten können Kanamycin sensitive Mutanten gefunden werden.

In mehreren Versuchen konnten keine Km^S Mutanten von sc32 isoliert werden. Um ausschließen zu können, dass es an der Nähe zu *bldC* liegt wurde ein alternativer Ansatz durchgeführt. Bei diesem sollte sc32 nicht deletiert, sondern an Position +50 disruptiert werden. Dadurch sollte die Sequenzumgebung von *bldC* möglichst wenig verändert werden.

3.3.4. Disruption von sc32 mit dem ReDirect System

Analog zum Vorgehen bei der Deletion wurde mit den Oligonukleotiden sc32_dis_fwd und sc32_dis_rev die Apramycin Resistenzkassette von dem Plasmid pIJ773 amplifiziert. Mit dem erzeugten Produkt wurde in *E. coli* BW25113/pIJ790/StD17 mit Hilfe des Lambda-*red* Systems eine doppelt homologe Rekombination am Cosmid StD17 durchgeführt. Bei diesem Ansatz konnten jedoch keine Cosmide mit Apramycin Kassette erzeugt werden.

3.4. Die sRNA *sc1*

Eine zweite sRNA, die genauer untersucht wurde, tauchte in zwei verschiedenen bioinformatischen Vorhersagen auf. Bei der Suche nach potentiellen *dre*-sites wurde sie zwischen den Genen SCO5238 und SCO5239 vorhergesagt (Tabelle 3-2, vierte von oben). Das diese von DasR *in vitro* erkannt wird, konnte bereits von Joachim Stephan durch einen Gelshift mit aufgereinigtem DasR gezeigt werden (Abb. 3-9).

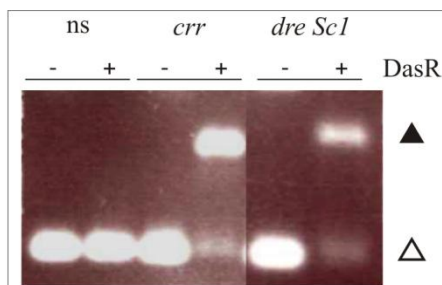


Abbildung 3-9: Gelshift der *dre*-site vor *sc1*. Freie *dre*-site DNA weißes Dreieck, *dre*-DasR Komplex schwarzes Dreieck. Eine unspezifische Sequenz wurde als Negativkontrolle (ns), die *dre*-site vor *crr* (SCO1390) als Positivkontrolle verwendet. © Joachim Stephan, Erlangen

49 nt Stromabwärts dieser *dre*-site wurde mittels BLAST ein ~ 200 nt langer Bereich mit 75% Sequenzidentität zwischen *S. coelicolor*, *S. avermitilis*, *S. griseus* und *S. scabies* gefunden (Abb. 3-10). Dieser Bereich unterscheidet sich stark von den 9% Sequenzidentität im Rest dieser IGR. Mittels Northern Blot konnte die Expression eines etwa 160 nt langen Transkriptes nachgewiesen werden (Abb. 3-11). Eine genauere Analyse der Region zeigte einen 102 nt langen Leserahmen, der für 34 Aminosäuren kodiert.

VLSALTAPAPHPsADRDRTPHGRCCSGLRCREG*



Abbildung 3-10: Lage von *sc1* (rot) im Genom von *S. coelicolor* (SCO), *S. avermitilis* (SAV), *S. griseus* (SGR) und *S. scabies* (SSC). Gelb *dre*-site, Grau konservierte Histidin Kinase.

Eine BLAST Suche in allen sequenzierten bakteriellen Genomen ergab jedoch keinerlei Ähnlichkeit dieses potentiellen Peptids zu bekannten Proteinen. Ein Vergleich der DNA Sequenz mit *S. avermitilis*, *S. griseus* und *S. scabies* zeigte außerdem, dass dieser Leserahmen in keinem der anderen Streptomyceten vorhanden ist. Es kann also davon ausgegangen werden, dass dieses Transkript – *sc1* – keine mRNA, sondern eine sRNA ist.

3.4.1. Expressionsprofil von *sc1*

Zur Charakterisierung von *sc1* wurde Gesamt-RNA aus einer Reihe von Streßbedingungen sowie Medien präpariert und im Northern Blot auf die Expression von *sc1* hin untersucht (Abbildung 3-11A und B). Es wurde die Expression in Vollmedium, Minimalmedium, unter Hitze- und Kälteschock, UV-Stress, osmotischen und Alkohol induziertem Stress sowie unter Nährstoffmangel untersucht.

Es zeigte sich, dass *Sc1* beinahe konstitutiv exprimiert wird. In fast allen getesteten Bedingungen ließ sie sich im Northern Blot nachweisen. Die einzige Ausnahme trat bei Stickstoffmangel auf. Wurden die Zellen in Stickstoff limitierten Evans Medium angezogen,

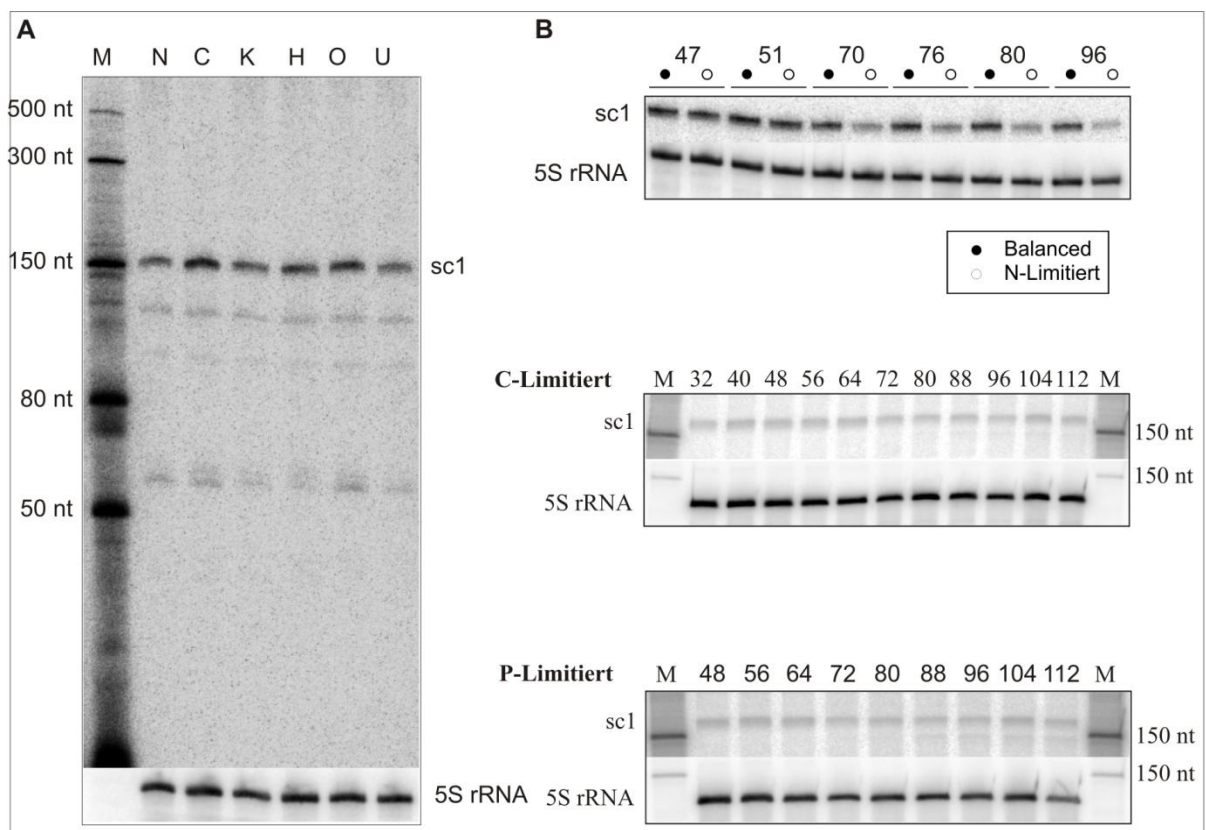


Abbildung 3-11: Expressionsanalyse von *sc1*. **A** Northern Blot in Vollmedium (N), Kälteschock (C), Osmotischer Stress (K), Hitzeschock (H), Sauerstoffmangel (O) und UV-Stress (U). **B** Northern Blots in Evans Medium ohne Mangelbedingungen (Balanced) sowie unter Stickstoff- (N), Kohlenstoff- (C) und Phosphatmangel (P). Zahlen über den Spuren bezeichnen Stunden nach Animpfen der Kultur.

ging die Expression von *sc1* drastisch zurück, sobald die Zellen in die Stationärphase kamen. Dieser Effekt ist spezifisch für Stickstoffmangel. Bei Kohlenstoff- oder Phosphatmangel trat er nicht auf (Abb. 3-11B).

Da die 5' von *sc1* liegende *dre*-site von DasR *in vitro* erkannt wurde, wurde RNA aus DasR Deletions- und Überexpressionsmutanten (BAP29 und M145/pFT241, Dissertation Harald Nothaft, 2003) präpariert. Hier zeigt sich eine Abhängigkeit von *sc1* von der Menge an DasR. Überproduktion von DasR führte zu Halbierung der Menge an *sc1*, während Deletion von DasR eine Verdopplung der Transkriptmenge bewirkte (Abb. 3-12). Durch Zugabe von 9 mM GlcNAc zum Medium sollte der GlcN-6P Spiegel in der Zelle angehoben und dadurch DasR induziert werden. Dadurch sollte die Menge an *sc1* im Vergleich zu einer nicht induzierten Kultur steigen. Es zeigten sich jedoch keine Unterschiede in der Menge an *sc1* zwischen induzierten und nicht induzierten Kulturen.

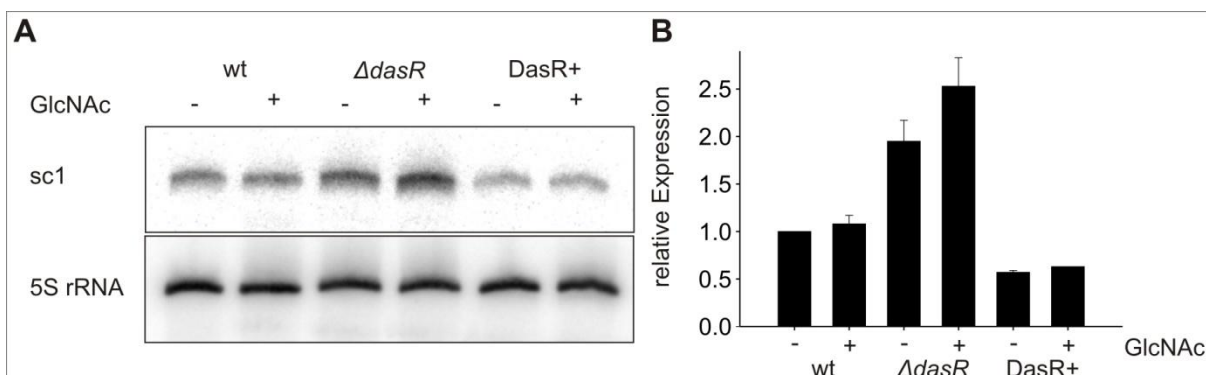


Abbildung 3-12: Expressionsanalyse von *sc1* in Abhängigkeit von DasR. **A** Northern Blot gegen *sc1* im Wildtyp (wt), DasR Deletions- ($\Delta dasR$) und DasR Überexpressionsstamm \pm 9 mM GlcNAc. **B** Quantifizierung des Northern Blots.

3.4.2. 5' und 3' Ende

Der Transkriptionsstart von *sc1* wurde mittels 5'RACE bestimmt. Dazu wurde eine *S. coelicolor* Kultur in TSB Medium bis zu Beginn der Stationärphase angezogen und die Gesamt-RNA präpariert. Die cDNA Bank wurde mit randomisierten Hexamer Oligonukleotiden erstellt. Für die nachfolgende PCR wurden die genspezifischen Oligonukleotide as-*sc1*, 1-C und 1-A verwendet. Das PCR Produkt wurde aus einem 2% Agarosegel ausgeschnitten, aufgereinigt und TOPO kloniert. In Abbildung 3-13A ist das Ergebnis der nachfolgenden Sequenzierung zu sehen. Das 5' Ende von *sc1* konnte bei 5.699.861 nt im Genom von *S. coelicolor* bestimmt werden.

Da *sc1*, anders als *sc32*, keinen klassischen Terminator am 3' Ende trägt, sollte im nächsten Schritt der Terminationspunkt bestimmt werden. Hierzu wurde der A4-Linker an seinem 5'

Ende phosphoryliert und mit Hilfe der T4 RNA Ligase an das 3' Ende aller zellulären RNAs ligiert. Im nächsten Schritt wurde – analog zum 5'RACE – mit randomisierten Hexamer Oligonukleotiden eine cDNA Bank erstellt. Mit den genspezifischen Oligonukleotiden 1_fwd, 1_fwd-2 und 5239-F1 wurde dann eine PCR durchgeführt. Es konnte jedoch in mehreren Versuchen kein spezifisches Produkt amplifiziert werden. Alternativ wurde auch versucht, die reverse Transkription statt mit randomisierten Hexameren mit genspezifischen Oligonukleotiden durchzuführen. Zusätzlich wurden verschiedene reverse Transkriptasen (Superscript II oder III von Invitrogen oder Thermoscript von Fermentas) getestet. Keine dieser Maßnahmen ermöglichte jedoch die Bestimmung des 3' Endes.

Es wurde deshalb ein anderer Ansatz gewählt. Zehn µg Gesamt-RNA wurden auf einem 10% denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. Zusätzlich wurden je 50.000 cpm radioaktiv markierter ssRNA Leitemix und ein partieller alkalischer Verdau *in vitro* transkribierter 200 nt langer RNA geladen. Nach dem Gellauf wurde ein Northern Blot durchgeführt und sc1 mit der Sonde 1-A detektiert (Abb. 3-13B). Der alkalische Verdau erzeugte eine 1 nt Leiter mit der man, ausgehend von der 150 nt Bande des Leitemixes, die Größe von sc1 – 159 nt – abzählen konnte. Da der Transkriptionsstart bekannt ist, errechnet sich für den Terminationspunkt die Position 5.700.020 im Genom von *S. coelicolor*. Eine weitere Analyse der Sequenzalignments von sc1 zeigte außerdem, dass die terminalen Schleifen von Stamm 1 und 3 dieselbe Sequenz haben und ebenfalls in vier Streptomycceten konserviert sind (Abb. 3-13C und D blau).

3.4.3. Deletion und Disruption von sc1

Wie auch bei sc32 sollte die sRNA durch Deletion bzw. Disruption durch eine Apramycinkassette entfernt werden. Dazu wurde die Kasette mit den Oligonukleotiden sc1_del_fwd und sc1_dwl_rev bzw. sc1_dis_fwd und sc1_dis_rev vom Plasmid pIJ773 amplifiziert. Durch die Deletion sollte der Bereich von -65 bis 23 nt hinter sc1 entfernt werden. Bei der Disruption sollte die Kasette bei Position +52 in sc1 integriert werden. Für beide Strategien wurden, wie bei sc32 beschrieben, mutierte Cosmide erzeugt (Cosmid 2St7G11). Jedoch konnten auch bei mehreren Versuchen keine Kanamycin sensitiven *S. coelicolor* Mutanten isoliert werden. Aus diesem Grund wurde hier eine andere Vorgehensweise gewählt.

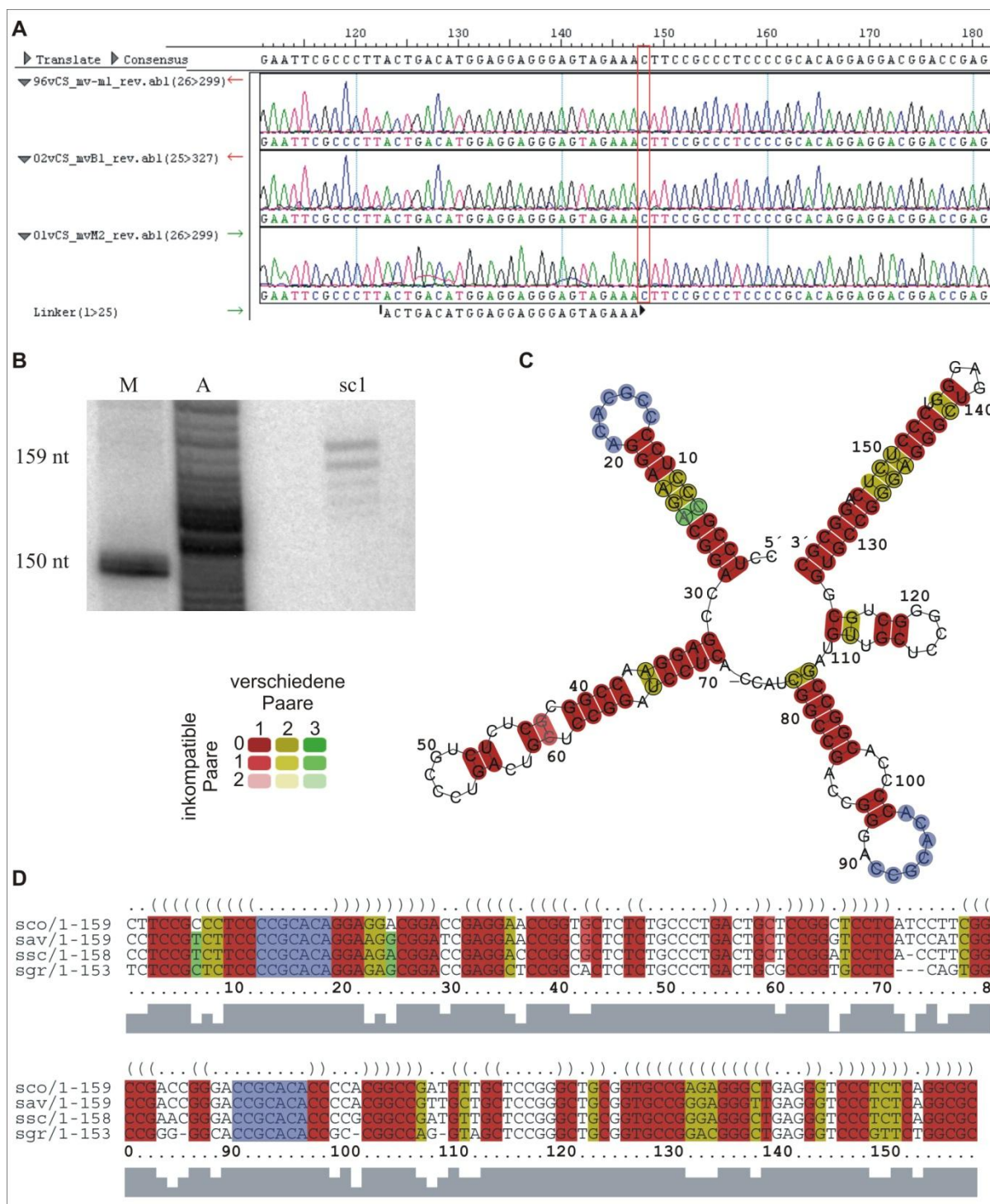


Abbildung 3-13: **A** 5'RACE von sc1. Die Sequenz des A4-Linkers ist eingezeichnet. Für die PCR wurden die Oligonukleotide as_sc1, 1-C und 1-A verwendet (von oben nach unten). Das 5' Ende von sc1 ist rot markiert. **B** Bestimmung des 3' Endes mittels Northern Blot. ssRNA Leiternmix (M), partieller alkalischer Verdau (A), Gesamt-RNA (sc1). Die niedrigeren Banden deuten auf einen beginnenden Abbau von sc1 hin. 159 nt entsprechen der obersten Bande. **C** Mit RNAalifold vorhergesagte Konsensusstruktur. Rot markierte Basenpaare kommen in *S. coelicolor*, *S. avermitis*, *S. scabiei* und *S. griseus* vor, gelbe und grüne haben eine oder zwei alternative Sequenzen an dieser Stelle, die Paarung bleibt aber erhalten. Bei schattierten Basenpaaren gibt es eine oder zwei Sequenzen, bei denen die Paarung verloren ging. Die blaue Schattierung zeigt die konservierten terminalen Schleifen. **D** Strukturelles Alignment mit LocARNA. Farbcode wie bei C. Der graue Balken zeigt die Konservierung der Sequenz.

3.4.4. **knockdown von sc1 durch asc1**

Da eine Deletion oder Disruption nicht gelang, wurde *sc1* durch die gezielte Expression eines komplementären Transkriptes (*asc1*, *antisense sc1*) reprimiert. Mit den Oligonukleotiden *antisc1*–a und –d sowie *antisc1*–b und –c wurde die komplementäre Sequenz von *sc1* vom Plasmid pUWL-*sc1*+ (Diplomarbeit Johannes Förtsch) amplifiziert. Die beiden Fragmente wurden in einer *overlap* PCR fusioniert, mit den Restriktionsenzymen BamHI und XbaI verdaut und in das Plasmid pUWL-SK kloniert [92]. Nach der Sequenzierung wurde das entstandene Plasmid pUWL-*asc1* in *S. coelicolor* M145 transformiert (siehe Anhang Seite 108f). Der erfolgreiche *knockdown* von *sc1* wurde anschließend im Northern Blot überprüft (Abb. 3-14). Expression des komplementären Transkriptes vermindert die Menge an *sc1* in der Zelle auf ca. 8% verglichen mit dem Wildtyp.

3.4.5. **Überexpression von sc1**

Das Plasmid pUWL-*sc1*+ von dem *sc1* konstitutiv stark exprimiert wird wurde von Johannes Förtsch in seiner Diplomarbeit kloniert (siehe Anhang Seite 108f). *Sc1* steht unter der Kontrolle des SF14 Promoters [87]. Dies führt zu einer mindestens 2.5fachen Überexpression (Abb. 3-14).

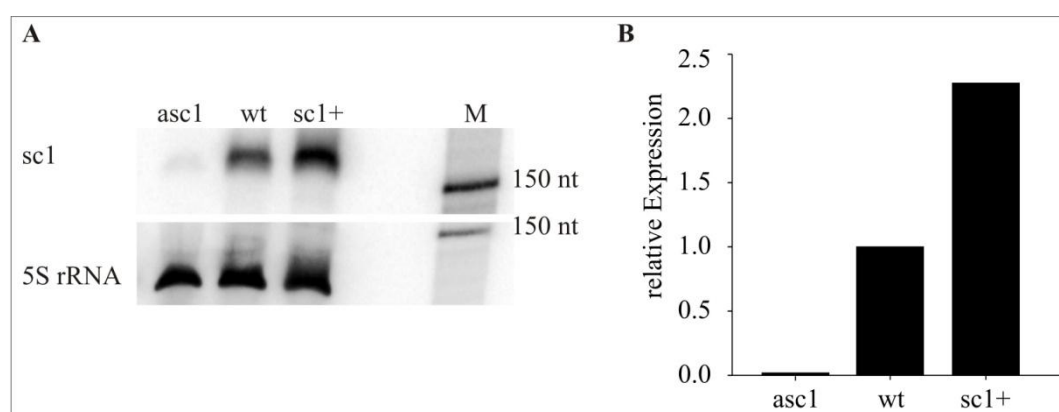


Abbildung 3-14: A Northern Blot mit *sc1* *knockdown* (*asc1*), Wildtyp (*wt*) und Überexpressionsstamm (*sc1*+). B Quantifizierung von A.

3.4.6. **Phänotypen von sc1+ und asc1**

Produktion von Actinorhodin

Sowohl der Überexpressionsstamm (*sc1*+) als auch der *knockdown* Stamm (*asc1*) zeigen spezifische Phänotypen. Bei beiden wurde ein deutlicher und gegensätzlicher Einfluss auf die Produktion des Antibiotikums Actinorhodin (Act) beobachtet. Dieses färbt sich außerhalb der

Zelle und kann deshalb als Blaufärbung um die Kolonie wahrgenommen werden. In *sc1+* kann kaum noch Act Produktion festgestellt werden, während *asc1* früher und mehr Act produziert als der Wildtyp. Um diese Beobachtung zu quantifizieren, wurde eine Wuchskurve der drei Stämme aufgenommen. Je zwei Mal 500 ml TSB Medium wurden mit einer ~ 24 h alten Vorkultur auf eine oD_{450} von 0.1 angeimpft. Ab diesem Zeitpunkt wurde über acht Tage hinweg an jedem Punkt das Trockengewicht und die Menge an produziertem Act gemessen (Abb. 3-15). Die mittlere normierte Endkonzentration an Act nach acht Tagen ist in Tabelle 3-5 aufgelistet.

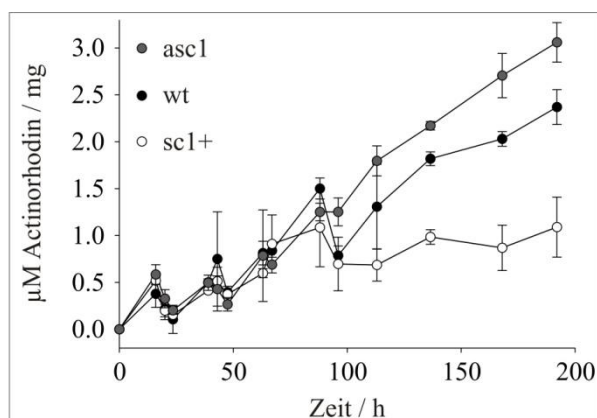


Abbildung 3-15: Messung der Actinorhodinproduktion in Wildtyp (*wt*), *sc1* Überexpression (*sc1+*) und *sc1* Knockdown(*asc1*).

Tabelle 3-5: maximale Act Konzentration

	µM Actinorhodin / mg Trockengewicht
Wildtyp	2.4 ± 0.2
<i>sc1+</i>	1.1 ± 0.3
<i>asc1</i>	3.1 ± 0.2

Der Effekt von sc1+ auf die Agarase DagA

S. coelicolor ist in der Lage, Agar als Kohlenstoffquelle zu nutzen [93]. Dies hat zur Folge, dass Kolonien auf Festmedium im Laufe der Zeit in die Oberfläche des Mediums einsinken. Es wurde beobachtet, dass dies beim *sc1+* Stamm nicht der Fall ist. Es wurde ein Agarasetest durchgeführt. Dazu wurden je 5×10^6 Sporen auf MBSM Platten mit 2% Agar als alleiniger Kohlenstoffquelle aufgetropft. Es wurden die Stämme *sc1+*, *asc1* und M145/pUWL verwendet. Letzterer ist der Wildtyp transformiert mit dem leeren Vektor pUWL-SK (siehe Anhang Seite 108). Er ist deshalb, wie *sc1+* und *asc1*, resistent gegen Thiostrepton und kann unter denselben Bedingungen analysiert werden. Nach fünftägiger Inkubation bei 28°C

wurden die Platten mit Lugol'scher Lösung gefärbt. Durch das Iod wird der Agar im Medium dunkelbraun gefärbt. Agaraseaktivität zeigt sich in einem hellen Hof um eine Kolonie, wo Agar verbraucht wurde. Abbildung 3-16 zeigt das Ergebnis des Agarasetests. Wildtyp und *asc1* können beide Agar verwerten und zeigen etwa gleich große Höfe um die Kolonien. *Sc1+* hingegen zeigt keinerlei Agaraseaktivität. Er kann mit Agar als Kohlenstoffquelle nicht angezogen werden. Durch Zusatz von 1% Glucose zum Medium konnte *sc1+* wieder wachsen. Dies zeigt dass die Zellen nicht tot sind, sondern mangels geeigneter Kohlenstoffquelle nicht wachsen können.

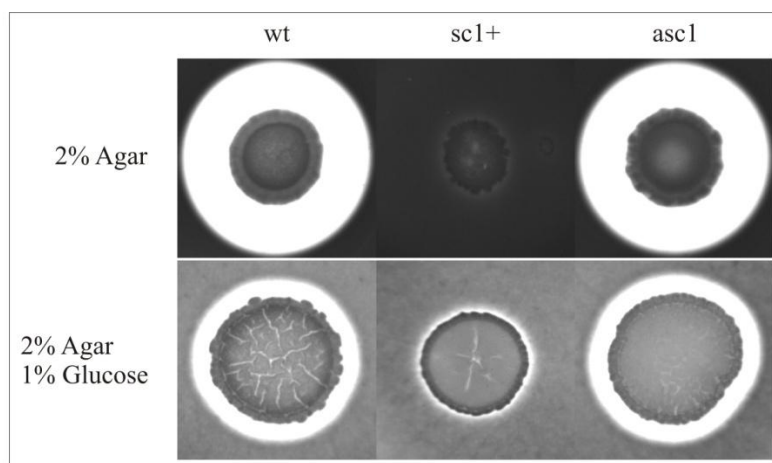


Abbildung 3-16: Test der Agaraseproduktion in M145/pUWL (wt), *sc1+* und *asc1*. *Sc1+* ist nicht in der Lage mit Agar als Kohlenstoffquelle zu wachsen. Zusatz von 1% Glucose ermöglicht Wachstum aber wieder.

Wie reguliert *sc1* die Menge an extrazellulärem DagA? Möglicherweise ist die Produktion, der Export oder die Aktivität der Agarase (DagA, SCO3471) im *sc1+* Stamm behindert. Fünf mögliche Angriffspunkte waren denkbar und wurden im Folgenden untersucht.

Transkription von dagA und Stabilität der mRNA

Die ersten beiden Möglichkeiten an denen *sc1* in die Expression von DagA eingreifen könnte, sind die Transkription und die Stabilität der *dagA* mRNA. Der durch sRNA induzierte Abbau einer Ziel-mRNA ist ein bekannter Mechanismus der Regulation der Genexpression [45]. Um diese Möglichkeit zu testen, wurde in Northern Blots die Transkriptmenge von *dagA* in den Stämmen M145/pUWL, *sc1+* und *asc1* überprüft. Von den drei Stämmen wurde je eine Vorkultur in TSB Medium über 48 h angezogen. Die Zellen wurden Zehn Minuten bei 6000 Upm geerntet und das jeweilige Pellet in LMPC Medium mit 1% hydrolysiertem Agar resuspendiert, um die Expression der Agarase zu induzieren. Die Kulturen wurden weitere 24 h bei Standardbedingungen inkubiert. Danach wurde die Gesamt-RNA präpariert und Northern Blots mit den Sonden *dagA1-3* durchgeführt. In Abbildung 3-17 ist das Ergebnis zu

sehen. Die Transkriptmenge von *dagA* ist in den drei Stämmen gleich. Daraus wurde geschlossen, dass *sc1* weder die Transkription noch die mRNA Stabilität von *dagA* beeinflusst.

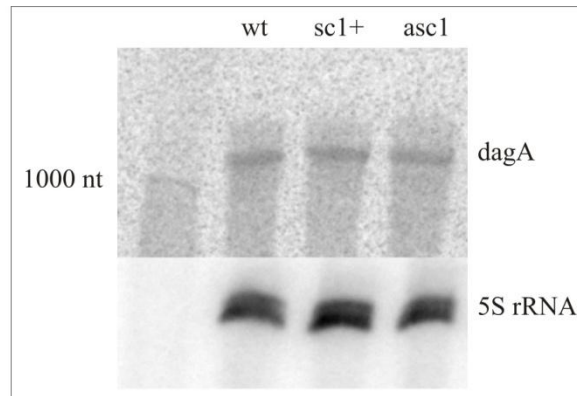


Abbildung 3-17: Northern Blot zum Nachweis der Menge an *dagA* mRNA. Als Sonde wurde *dagA2* verwendet.

Die Translation von *dagA*

Eine weitere Möglichkeit, die Expression von DagA zu beeinflussen, ist die Störung der Translation der mRNA. Auch diese Wirkungsweise von sRNAs ist schon mehrfach beschrieben worden [39-43]. Dies sollte mit Western Blot untersucht werden. Da keine Antikörper gegen DagA vorhanden waren, wurde zunächst eine DagA Mutante hergestellt, die C-Terminal einen 6×HisTag trägt. Dieses Fusionsprotein kann dann mit einem Anti-His Antikörper detektiert werden.

Konstruktion von *pdagAHis6* und Komplementation von J801

Um die Gendosis von *dagA* nicht zu verändern, wurde die *dagA*-6×HisTag Fusion (*dagA6His*) in das Genom eines *dagA*⁻ (J801, [93]) Stammes integriert. Das Megaplasmid SCP1 von *S. coelicolor* wird manchmal durch spontane Rekombination in das Genom integriert. Beim Stamm J801 wurde dadurch der *dagA* Locus zerstört. Der exakte genetische Phänotyp des Stammes ist aber nicht bekannt.

Das Gen *dagA* hat vier bekannte Startpunkte der Transkription (*dagP*1-4, [94]). Diese liegen bei -33, -78, -124 und -219 nt relativ zu Startcodon. Die Termination findet bei +124 relativ zum Stopcodon statt. Um das *dagA* Regulon intakt zu lassen, wurde in der folgenden Klonierung die Region von -319 relativ zum Startcodon bis +174 relativ zum Stopcodon in zwei Fragmenten amplifiziert. Dabei wurden vor dem Stopcodon sechs Histidin Codons in den Leserahmen eingefügt (*dagA*-CAT CAC CAC CAT CAC CAC TGA). Die verwendeten Oligonukleotide waren *dagA_fwd* und *dagA_over1* bzw. *dagA_rev* und *dagA_over2*. Die

entstandenen Fragmente wurden dann in einer *overlap* PCR fusioniert. Das Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen XbaI und SpeI verdaut und in das Integrationsplasmid pLuci (Diplomarbeit Johannes Förtsch) kloniert. Das entstandene Plasmid heißt pdagAHis6 (siehe Anhang Seite 112).

Zur genomischen Integration in J801 wurde pdagAHis6 zunächst in *E. coli* ET12567/pUZ8002 transformiert. Dieser Stamm ist in der Lage mit Streptomycceten zu konjugieren und überträgt dabei Plasmide, die einen *oriT* tragen – wie pdagAHis6. Nach dem Transfer wird das komplette Plasmid mit Hilfe der darauf kodierte Integrase an der Integrationsstelle des Phagen $\phi\beta$ in das Genom eingebaut. Die auf dem Plasmid ebenfalls kodierte Apramycin Resistenzkassette erlaubt eine Selektion auf die Integration. Die erfolgreiche Komplementation von J801 wurde mit einem Agarasetest überprüft (Abb. 3-18).

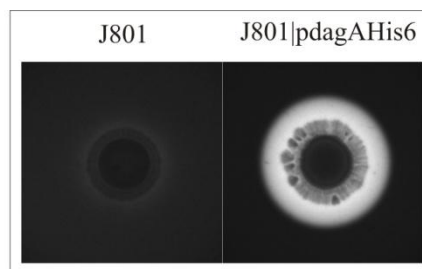


Abbildung 3-18: Agarasetest zur Überprüfung der Komplementation von J801.

Western Blot zur Überprüfung der Translation

Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob sich die His markierte Agarase im Western Blot nachweisen lässt. Dazu wurden je zwei Kulturen J801|pdagAHis6 und *S. coelicolor* Wildtyp M145 als Negativkontrolle in LMPC mit 1% Glucose angezogen. Nach 48 h wurde je eine Kultur in LMPC mit 1% hydrolysiertem Agar umgesetzt, um die Expression der Agarase zu induzieren. Der Überstand nach dem Ernten der Kulturen wurde mit TCA gefällt. Er gibt einen Überblick über die sekretierten Proteine vor Induktion der Agarase. Die beiden anderen Kulturen wurden 24 h weiter inkubiert und dann geerntet. Auch hier wurde der Überstand gefällt und aufgehoben. Aus den Zellpellets wurde der Rohextrakt gewonnen, der dann auf einem denaturierenden SDS PAA Gel überprüft wurde (Abb. 3-19). Im anschließenden Western Blot sollte DagA in J801|pdagAHis6 nachgewiesen werden. Es konnte jedoch überhaupt kein Signal detektiert werden (Abb. 3-19C und D). Lediglich der ebenfalls His markierte Leitemix ist zu sehen. Die Erhöhung der aufgetragenen Proteinmenge von 20 auf 40 oder 60 μg brachte kein besseres Ergebnis. Auch eine längere Inkubation der Blots mit den Antikörpern oder eine Erhöhung der Menge der Antikörper führte zu keinem Signal.

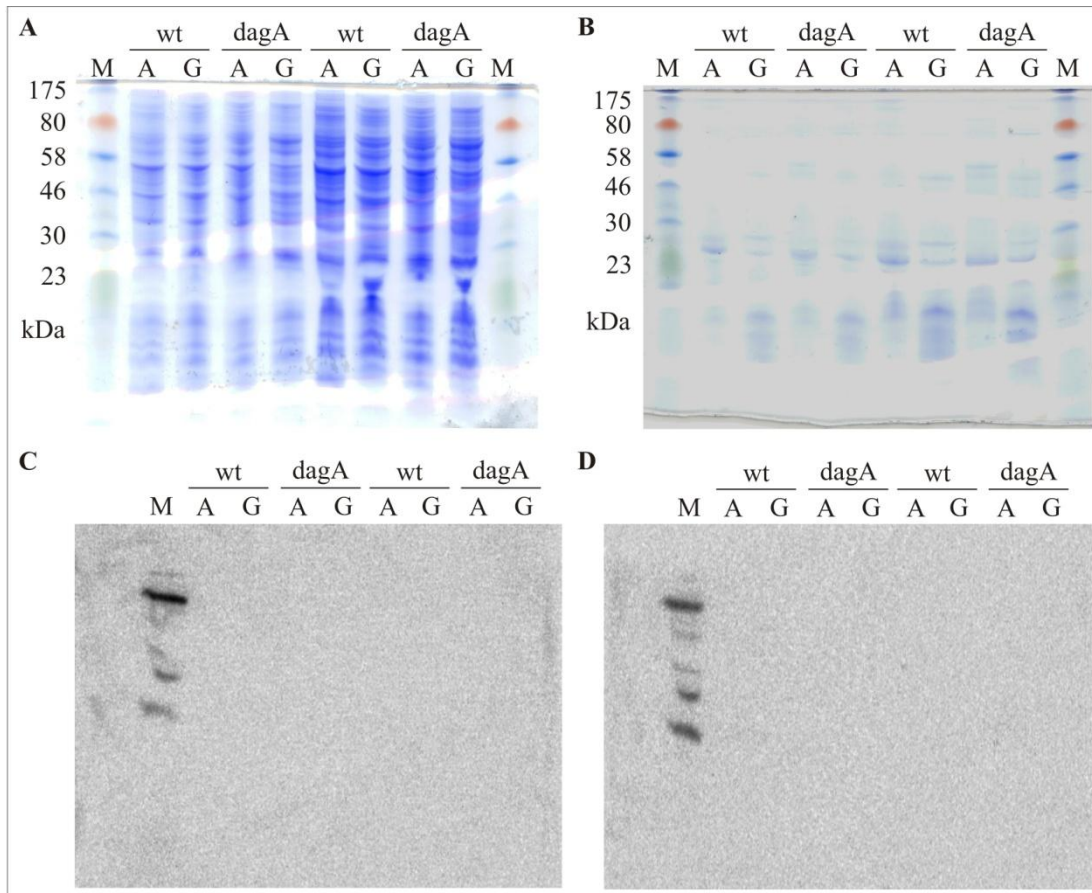


Abbildung 3-19: 10% denaturierendes SDS PAA Gel, Coomassie gefärbt. **A** Rohextrakt von M145 (wt) und J801[*pdagAHis6*] (*dagA*) angezogen mit Agar (A) oder Glucose (G) als Kohlenstoffquelle. Es wurden je 10 (links) und 20 μg (rechts) aufgetragen. Marker (M). **B** wie A, Es wurden je 2 (links) und 4 μg (rechts) TCA gefälltes Medium aufgetragen. **C** und **D** Western Blot mit dem Proteinextrakt von A und B. Es wurden je 20 μg Protein aufgetragen. M His-getagter Proteinletermix. Die Banden konnten jedoch nicht zugeordnet werden.

Wachstum auf Chitosan

Die vierte Möglichkeit, von *sc1* die Expression von *DagA* zu stören, ist der Export des Proteins. *DagA* wird über den *twin-arginine-translocation* (*tat*) Pfad aus der Zelle exportiert [95]. Dies ist der Hauptweg, auf dem in Streptomycceten Proteine exportiert werden. Es stellte sich die Frage, ob *sc1* spezifisch den Export von *DagA* behindert oder ob es allgemein die Funktion des *tat*-Exportweges stört. Um diese beiden Möglichkeiten unterscheiden zu können, wurde nach einem sekretierten Protein gesucht, das über den *tat*-Pfad exportiert wird. Außerdem sollte es kein alternatives Protein mit derselben Funktion geben, das über einen anderen Weg exportiert wird.

Ein Protein, auf das diese Anforderungen zuträfen, war die sekretierte Chitosanase *Csn* (SCO0677) [96]. Sie ist für die Nutzung von Chitosan als Kohlenstoffquelle notwendig (Tabelle 3-6). Chitosan entsteht bei der Spaltung von Chitin durch eine Chitinacetylase. Diese hydrolysiert die N-Acetoaminogruppe der N-Acetyl-D-Glucosamineinheiten des

Chitins. Der folgende Schritt des Abbaus, die Endohydrolyse der β -(1 \rightarrow 4) Verbindungen der Glucosamine im Chitosan wird von Csn katalysiert. Die dabei entstehenden D-Glucosaminide werden in die Zelle transportiert und in D-Glucosamine umgewandelt. Diese werden in N-Acetyl-D-Glucosamin (GlcNAc) umgesetzt und im PTS Stoffwechsel weiter abgebaut.

Tabelle 3-6: Abbau von Chitin über den Chitosan Weg.

$\text{Chitin} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Chitosan} + \text{Acetat}$	Chitin Deacetylase
<u>$\text{Chitosan} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{D-Glucosaminid} + \text{Chitosan}$</u>	<u>Chitosanase</u>
$\text{D-Glucosaminid} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{GlcN} + \text{D-Glucosaminid}$	GlcN Hydrolase
$\text{GlcN} + \text{Acetyl-CoA} \rightarrow \text{CoA} + \text{GlcNAc}$	GlcN Acetyltransferase

Wenn durch Überexpression von *sc1* der *tat*-Pfad gestört wird, sollten die Zellen nicht mehr in der Lage sein, Chitosan als Kohlenstoffquelle zu nutzen. Um das zu überprüfen, wurden M145/pUWL, *sc1+* und *asc1* auf MBSM mit 1% Chitosan ausgestrichen (Abb. 3-20). *Sc1+* kann, wie die anderen Stämme auch, Chitosan als Kohlenstoffquelle nutzen. Der *tat*-Pfad ist von der Überexpression von *sc1* offensichtlich nicht betroffen.

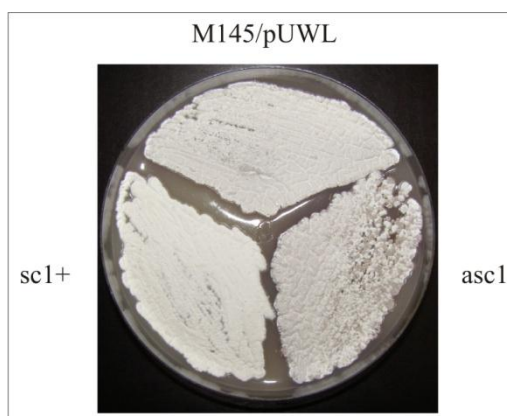


Abbildung 3-20: Wachstumstest mit Chitosan als Kohlenstoffquelle.

Interaktion von *sc1* mit der *dagA* mRNA

Die fünfte Möglichkeit, die *DagA* Expression zu reprimieren, ist die direkte Interaktion von *sc1* mit der *dagA* mRNA. Eine direkte Interaktion der beiden RNAs sollte in Gelshift Experimenten überprüft werden.

Dafür wurde *sc1* in den Transkriptionsvektor pHDV kloniert. Mit den Oligonukleotiden pSP64-*sc1*-fwd und *sc1*-hdv wurde die Sequenz vom Chromosom amplifiziert, mit den

Restriktionsenzymen EcoRI und NcoI verdaut und in pHDV kloniert (pHDV-sc1, siehe Anhang Seite 110). Am 5' Ende von sc1 der T7 Promoter, der durch das Oligonukleotid pSP64-sc1-fwd angehängt wurde, am 3' Ende das HDV Ribozym. Letzteres spaltet sich nach der Transkription selbst und erzeugt so homogene 3' Enden der transkribierten RNAs. Für die *dagA* mRNA wurden vier verschiedene Konstrukte kloniert. Sie reichen jeweils von einem der vier bekannten Transkriptionsstarts (-33, -78, -124, -219) bis +50 nt in den kodierenden Bereich (Abb. 3-21).

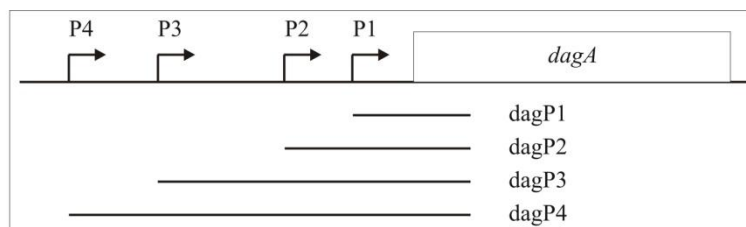


Abbildung 3-21: Für die *in vitro* Transkription klonierte *dagA* 5'UTR Fragmente.

Die vier Fragmente wurden mit den Oligonukleotiden dagP1_fwd, dagP2_fwd, dagP3_fwd und dagP4_fwd sowie dagProm_rev vom Plasmid pdagHis6 amplifiziert. Nach Verdau mit EcoRI und HindIII wurden sie in den Transkriptionsvektor pSP64 kloniert (siehe Anhang Seite 110f). Von jedem der fünf Konstrukte wurde eine 1 ml *in vitro* Transkription angesetzt und die RNA durch Gelelektion aufgereinigt. Abbildung 3-22A zeigt ein denaturierendes PAA Kontrollgel aller Konstrukte nach der Aufreinigung. Außerdem wurde bei jedem Konstrukt in einem nativen PAA Gel überprüft, ob die RNA homogen vorliegt oder verschiedene Konformationen annimmt (Abb. 3-22B). Die Konstrukte dagP2-4 zeigen in Anwesenheit von 100 mM KCl und 10 mM MgCl₂ eine höhere Bande, die ein Dimer darstellen kann.

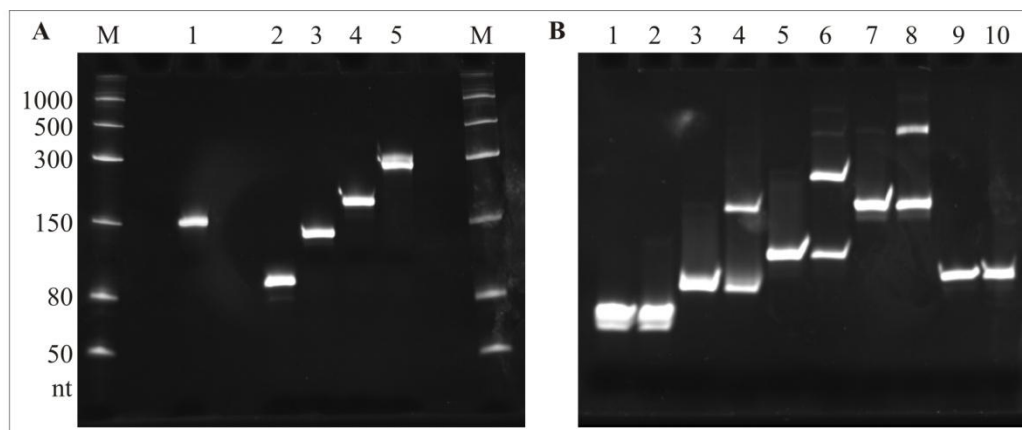


Abbildung 3-22: **A** denaturierendes PAA Gel *in vitro* transkribierter RNAs (je 100 ng). M Marker, 1 sc1, 2 dagP1, 3 dagP2, 4 dagP3, 5 dagP4. **B** natives Gel von A. ± 1 × Structure Buffer (SB). 1 dagP1, 2 dagP1 SB, 3 dagP1, 4 dagP1 SB, 5 dagP2, 6 dagP2 SB, 7 dagP3, 8 dagP3 SB, 9 sc1, 10 sc1 SB (je 100 ng).

Gelshift von dagP1 und dagP4 mit sc1

Als nächstes wurde überprüft, ob der *dagA* 5'UTR und *sc1* *in vitro* miteinander interagieren. Dazu wurde zunächst ein Gelshift mit der kürzesten und der längsten Variante (*dagP1* und *dagP4*) gemacht. Je 20 fmol radioaktiv markiertes *sc1* wurde mit 160 – 10.000 fmol *dagP1* bzw. *dagP4* in 1 × *structure buffer* in einem 10 µl Ansatz gemischt und 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Um unspezifische Wechselwirkungen auszuschließen, wurde in jeden Ansatz 100 ng/µl Hefe tRNA gegeben. Der Ansatz wurde dann auf einem 6%igen nativen PAA Gel aufgetrennt (Abb. 3-23). *Sc1* bildet einen stabilen und spezifischen Komplex mit beiden getesteten 5' UTRs. Für die weiteren Untersuchungen wurde deshalb nur noch *dagP1* verwendet. Es wurden weitere Gelshifts bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt (Abb. 3-24). Wie Abbildung 24A zeigt, führt eine höhere Temperatur zu stärkerer Komplexbildung.

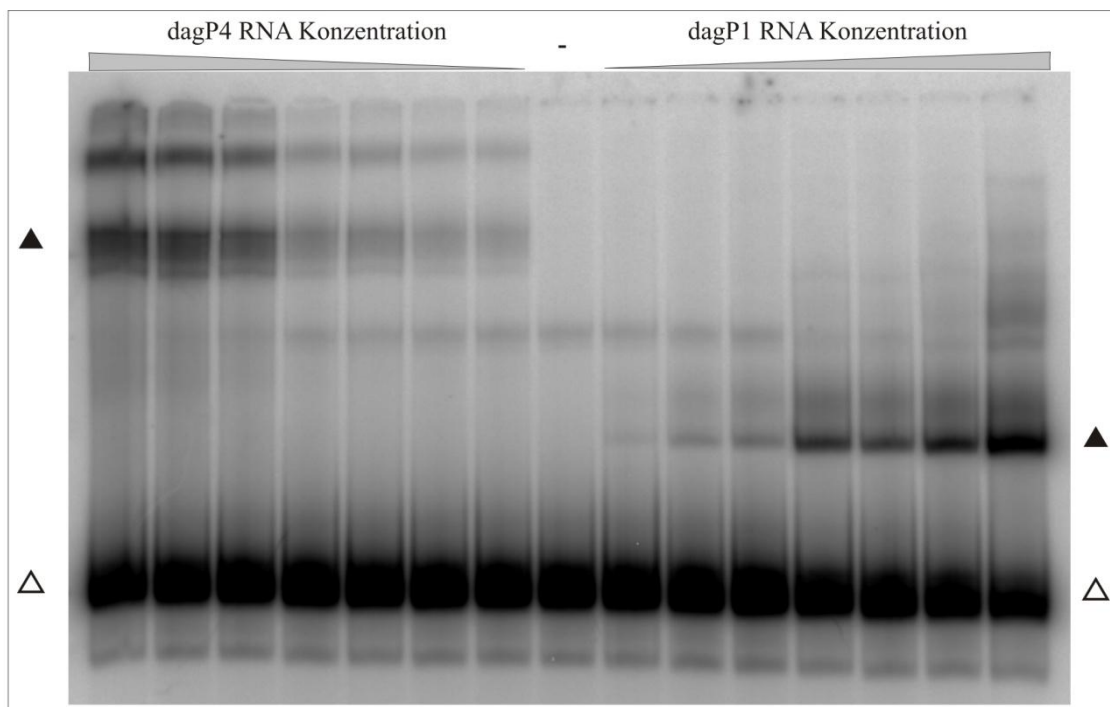


Abbildung 3-23: Gelshift mit *sc1* und *dagP1/4*. Freies *sc1* weißes, *sc1*-*dagP1/4* Komplex schwarzes Dreieck.

Gelshifts mit Mutanten von *sc1*

Nachdem gezeigt werden konnte, dass der *dagA* 5'UTR mit *sc1* interagiert, wurde diese Wechselwirkung genauer charakterisiert. Durch Sequenzvergleich wurde eine Interaktion von Stamm 2 von *sc1* mit *dagP1* vorhergesagt (Abb. 3-25). Zur Überprüfung dieser Interaktion wurden vier Mutanten von *sc1* hergestellt (Abb. 3-25 M1 – M4). M1 sollte die direkte

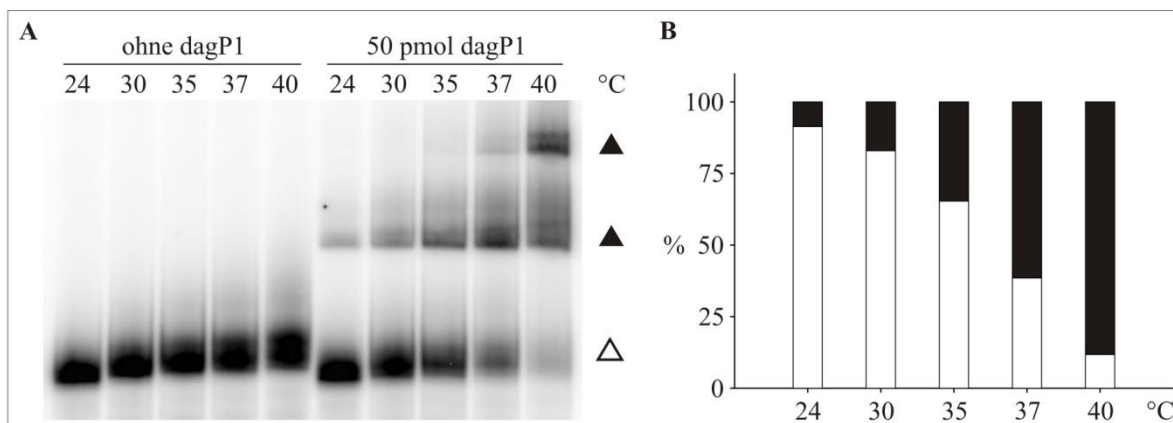


Abbildung 3-24: **A** Gelshift von sc1 und dagP1 bei 24 - 40°C. **B** Quantifizierung von A. Weiß Anteil an freiem sc1, Schwarz sc1-dagP1 Komplex.

Interaktion zwischen sc1 und der Shine-Dalgarno (SD) Sequenz von dagP1 verhindern. Bei M2 wurde durch die Mutation von CU nach GA der interne *loop* geschlossen. Dies sollte das Aufschmelzen des Stammes erschweren, das für eine Interaktion notwendig ist. Bei den Mutanten M3 und M4 wurde die konservierte terminale Schleife von Stamm 1 bzw. 3 durch einen UUCG Tetraloop ersetzt. An diesen Stellen war zwar keine direkte Interaktion vorhergesagt, die konservierten Sequenzen könnten aber Bindestellen für ein Protein darstellen, das für die Funktion von sc1 notwendig ist (Abb. 3-13C und D).

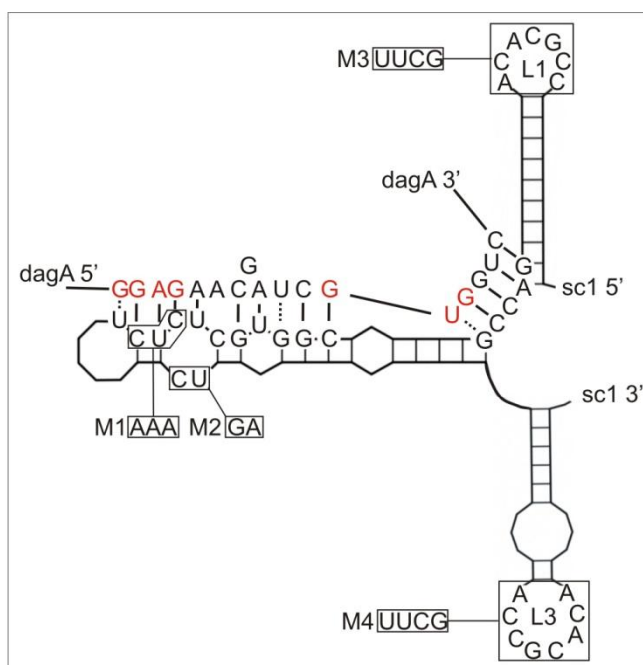


Abbildung 3-25: Vorhersage der Interaktion von sc1 mit dem dagA 5' UTR. SD-Sequenz und Startcodon rot. Die Mutationen M1 - M4 sind eingezeichnet.

In Gelshift Experimenten mit den Mutanten M1 und M2 zeigte sich, dass diese beiden dagP1 etwa gleich stark binden wie der Wildtyp. Die berechneten Bindekonstanten liegen alle in derselben Größenordnung (Abb. 3-26 und Tabelle 3-7).

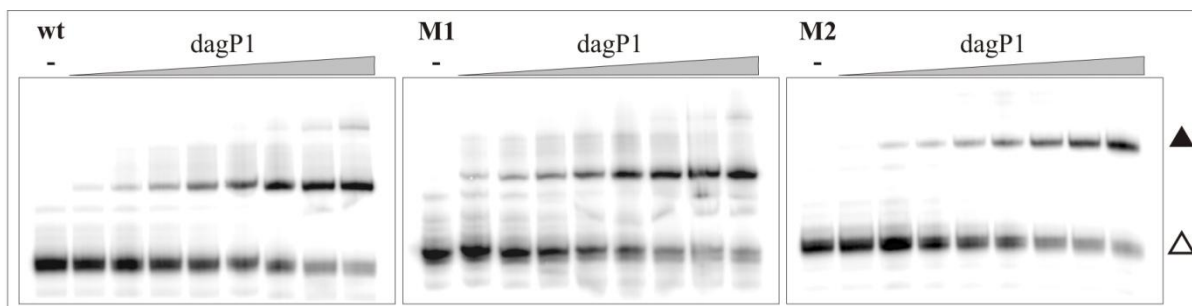


Abbildung 3-26: Gelshift von sc1 Wildtyp (wt), M1 und M2 mit dagP1.

Tabelle 3-7: Bindekonstanten von dagP1 an sc1. Mittelwert aus je drei Gelshifts.

	K_D [μ M]
sc1	1.12 ± 0.04
sc1 M1	0.76 ± 0.05
sc1 M2	1.52 ± 0.07

In vivo Aktivität der Mutanten M1 – M4

Zusätzlich zur *in vitro* Charakterisierung wurde *in vivo* überprüft, ob eine Überexpression von M1 – M4 einen Einfluss auf die Repression von DagA hat. Dazu wurden die Konstrukte analog zum sc1 Wildtyp in den Vektor pUWL-SK kloniert (Tabelle 3-8).

Tabelle 3-8: Klonierung der *in vivo* Konstrukte.

	Oligonukleotidpaare
M1	pUWL_seq / mSD_over_rev mSD_over_fwd / pUWL_seq_rev
M2	pUWL_seq / GA_over_rev GA_over_fwd / pUWL_seq_rev
M3	pUWL_seq / dL1_over_rev dL1_over_fwd / pUWL_seq_rev
M4	pUWL_seq / dL3_over_rev dL3_over_fwd / pUWL_seq_rev

Nach Transformation der Plasmide in *S. coelicolor* M145 wurde ein Agarasetest durchgeführt, um zu sehen, ob in den Mutanten DagA nicht mehr reprimiert wird (Abb. 3-27). M1 und M2 zeigen eine leichte Aufhellung um die Kolonie, was auf eine weniger starke

Repression der Agarase schließen lässt. Die eingeführten Mutationen schwächen offenbar die Bindung von *sc1* an den *dagA* 5'UTR und erlauben so eine gewisse Expression des Gens. Bei M3 und M4 zeigt sich keine Veränderung im Vergleich zu *sc1+*. Die terminalen Schleifen 1 und 3 sind an der Regulation von *dagA* nicht beteiligt.

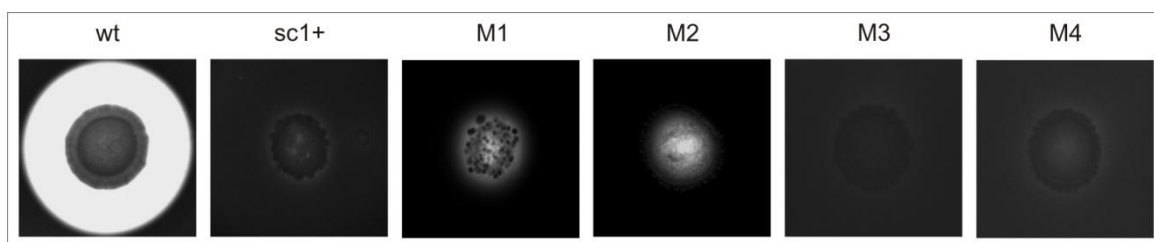


Abbildung 3-27: Agarasetest von M145/pUWL (wt), *sc1+* und den Mutanten M1-4.

3.4.7. Die Histidin Kinase SCO5239

Neben *dagA* gibt es noch ein weiteres potentielles Zielgen von *sc1*. In den vier zugänglichen annotierten Streptomyceten Genomen liegt *sc1* immer neben einer ebenfalls konservierten Histidin Kinase (Abbildung 3-10, grau). Es handelt sich um die Sensorkinase eines Zweikomponentensystems. Ihre genaue Funktion ist unbekannt, es gibt jedoch Hinweise auf eine Funktion des Proteins im Stickstoffstoffwechsel (Jens Reuther, Universität Tübingen, persönliche Mitteilung). Stickstoffmangel ist der einzige bekannte Zustand, bei dem sich die Expression von *sc1* ändert (Abb. 3-11B). Aus diesem Grund wurde eine mögliche Verbindung zwischen *sc1* und der Kinase untersucht. Im Northern Blot ist SCO5239 nur gering nachweisbar, zeigt jedoch ein ähnliches Expressionsmuster wie *sc1* (Abb. 3-28). Auch die Expression der Kinase wird in der Stationärphase bei Stickstoffmangel reduziert.

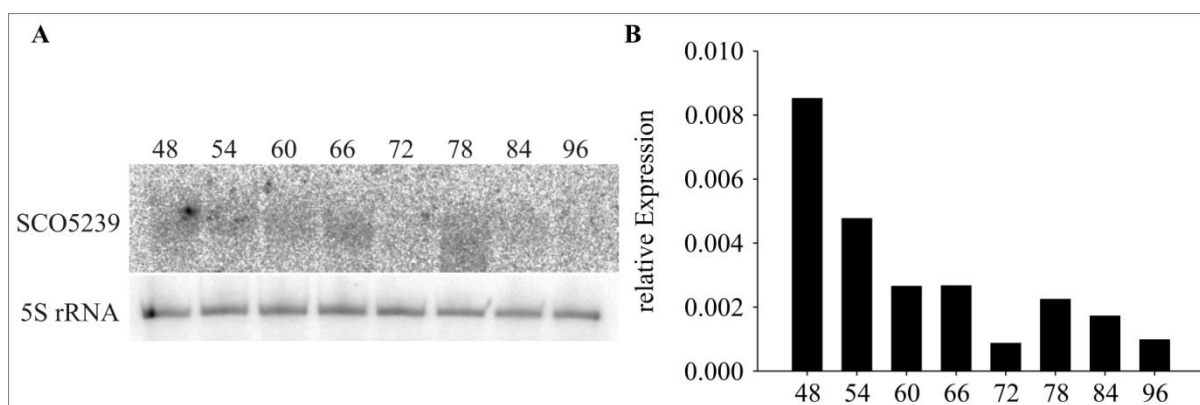


Abbildung 3-28: **A** Northern Blot gegen SCO5239 unter Stickstoffmangel. Die Nummern geben die Stunden nach dem Animpfen an. **B** Quantifizierung des Northern Blots.

5'RACE von SCO5239

Um eine mögliche Interaktion zwischen *sc1* und der Histidin Kinase zu untersuchen, musste zunächst das 5' Ende der mRNA der Kinase bestimmt werden. Hierzu wurde 5'RACE mit den Oligonukleotiden *kin1_rev*, *kin2_rev* und *kin3_rev* durchgeführt. Es konnte jedoch in mehreren Versuchen kein spezifisches Produkt isoliert werden. Die Verwendung genspezifischer Oligonukleotide statt Zufallshexameren brachte keine Verbesserung, ebenso wie die Verwendung verschiedener reverser Transkriptasen. Der Grund für diese Schwierigkeiten könnte das sehr niedrige Expressionsniveau der Kinase sein.

Reportergen Analyse von SCO5239

Um eine Aussage über eine Verbindung zu *sc1* zu treffen, wurde die TIR von SCO5239 an ein Reportergen fusioniert. Dazu wurde die Region von -88 nt vor dem Startcodon von SCO5239 bis +3 an das *luxA* Gen im Plasmid pLuci (Diplomarbeit Johannes Förtsch, siehe Anhang Seite 115) kloniert. Das entstandene Plasmid pL_kinUTR (siehe Anhang Seite 113f) wurde in das Genom von *S. coelicolor* integriert. Der entstandene Stamm kann nun dazu verwendet werden, die Expression von SCO5239 über die Luziferaseaktivität zu messen. Als nächstes wurde *sc1* bzw. *asc1* über die singuläre NheI Schnittstelle in pL_kinUTR kloniert. *Sc1* stand unter der Kontrolle seines eigenen Promoters. *Asc1* wurde, identisch zum *knockdown* Konstrukt, unter Kontrolle des SF14 Promoters kloniert. Die verwendete NheI Schnittstelle ist ~ 4000 nt vom klonierten 5'UTR der Kinase entfernt. Die entstandenen Plasmide pL-kinUTR_sc1 und pL_kinUTR_asc1 wurden ebenfalls genomisch integriert (siehe Anhang Seite 113f). In einem Luziferaseassay wurde anschließend getestet, ob die Anwesenheit von *sc1* die Transkription von SCO5239 verändert. Je drei Kulturen der Stämme pL_kinUTR, pL-kinUTR_sc1 und pL_kinUTR_asc1 wurden in Jasenka Medium angezogen. Als Negativkontrolle wurde ein Stamm ohne Luziferase mitgeführt (M145|pGFP). Als Positivkontrolle diente der Stamm M145|pLuci, der die Luziferase konstitutiv exprimiert. Abbildung 3-29 zeigt das Ergebnis der Messung. Die Anwesenheit von *sc1* steigert die Expression von SCO5239 etwa um den Faktor acht. Der *knockdown* von *sc1* (*asc1*) hat keinen Effekt. Die sRNA *sc1* wirkt somit positiv auf die Expression der Kinase. Der Mechanismus dieses Effekts ist bislang noch unklar.

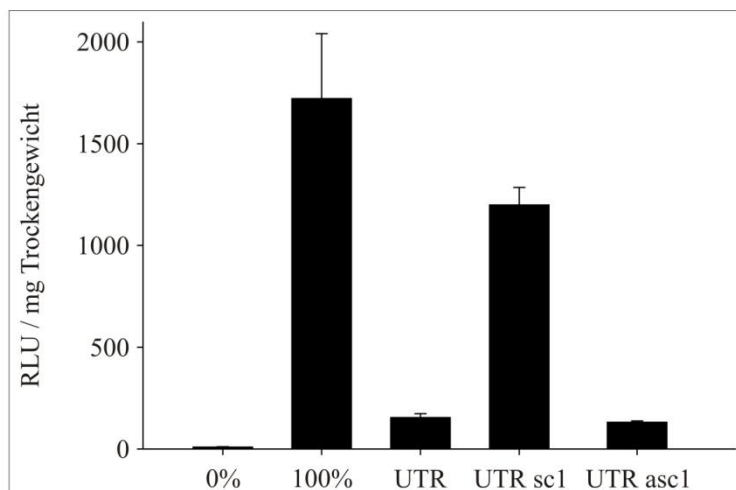


Abbildung 3-29: Luziferasemessung. **0%** M145|pGFP, **100%** M145|pLuci, **UTR** M145|pL_kinUTR, **UTR sc1** M145|pL_kinUTR_sc1, **UTR asc1** M145|pL_kinUTR_asc1.

3.4.8. Weitere mögliche Ziele von sc1

Da aus dem Vergleich der Phänotypen der sc1 Mutanten keine weiteren direkten Ziele der sRNA geschlossen werden konnten, wurde das Proteom dieser Stämme unter verschiedenen Bedingungen verglichen. Mit DagA war bereits ein Ziel bekannt, dass in den Kohlenstoffmetabolismus involviert ist. Deshalb wurden der Wildtyp, der Überexpressions- und der *knockdown* Stamm mit verschiedenen Kohlenstoffquellen angezogen. Die Stämme wurden in 50 ml LMPC Medium mit je 1% Glucose, hydrolysiertem Agar (hAgar) und GlcNAc 48 h bei 30°C inkubiert. Da sc1⁺ in hAgar nicht wachsen kann, wurde hierfür eine Vorkultur in LMPC mit Glucose 48 h angezogen. Diese Zellen wurden geerntet, in LMPC mit hAgar gewaschen und weitere 24 h in LMPC mit hAgar inkubiert. Nach Zellernte und Proteinextraktion wurden je 100 µg Rohextrakt in einem 20x20 cm großen 10%igen denaturierenden SDS PAA Gel aufgetrennt. Zur Visualisierung der Proteine wurde das Gel mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt (Abb. 3-30). Mindestens 11 Proteine zeigen eine differenzierte Expression abhängig von der Menge an sc1. Neun davon zeigen zusätzlich eine Abhängigkeit von der verwendeten Kohlenstoffquelle. Diese Proteine werden nun einer Analyse mittels Massenspektrometrie unterzogen, um mögliche neue Ziele von sc1 zu identifizieren.

– ERGEBNISSE –

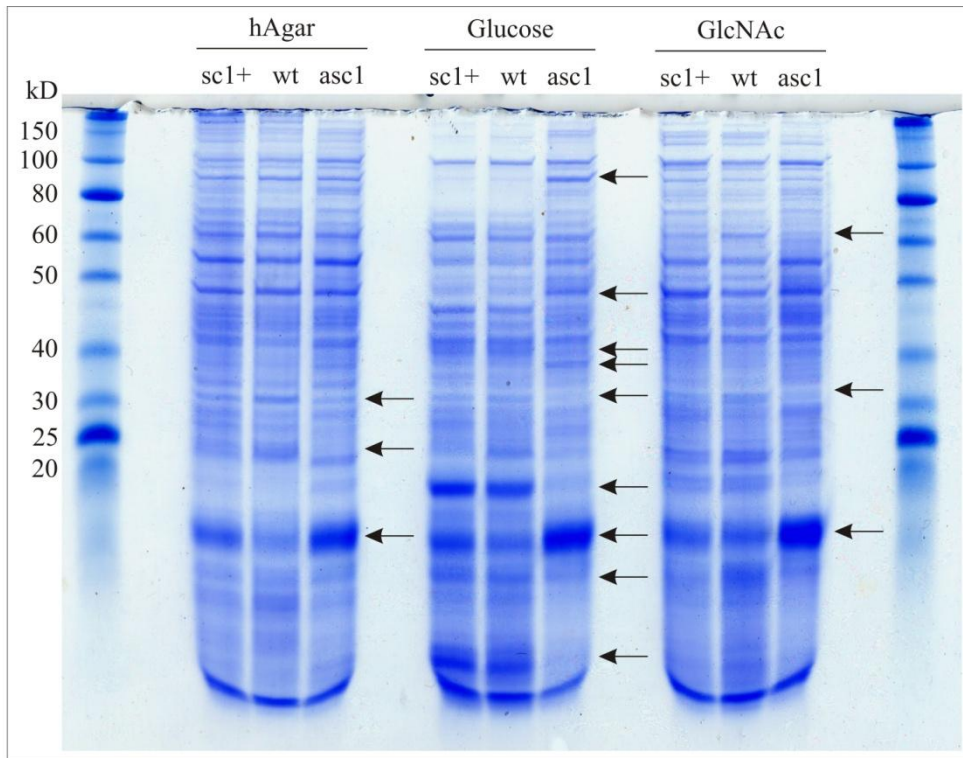


Abbildung 3-30: 1D PAA-Gel von sc1 Mutanten gewachsen auf verschiedenen C-Quellen. Mindestens elf Proteine zeigen eine sichtbar differenzierte Expression abhängig von der Menge an sc1.

4. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mittels verschiedener bioinformatischer Methoden kleine nicht kodierende RNAs in *S. coelicolor* vorherzusagen. Im Folgenden sollte die biologische Funktion ausgewählter Kandidaten näher charakterisiert werden.

4.1. Identifizierung von sRNAs

4.1.1. Vorhersage von Terminatorstrukturen

Mit Hilfe von RNAmotif wurden 129 Terminatorstrukturen in den intergenen Regionen von *S. coelicolor* vorhergesagt. 35 davon wurden ausgewählt, um im Northern Blot auf die Expression einer sRNA hin überprüft zu werden. Nur bei einer davon – sc32 – konnte ein Transkript nachgewiesen werden, dass nicht mit einer mRNA korreliert. Diese schlechte Ausbeute kann mehrere Gründe haben. Aufgrund der hohen Diversität von Promotoren in Streptomycceten konnte die Terminatorsuche nicht mit einer Promotervorhersage verknüpft werden, wie dies bei dieser Methode üblicherweise getan wird. Gerade die Kombination der Suche nach einem Promoter und maximal 200 nt stromabwärts davon entfernt einem Terminator, ohne offensichtlichen Leserahmen dazwischen stellt einen guten Filter dar, der viele falsch-positive Ergebnisse entfernt (siehe auch Kapitel 2.4).

4.1.2. Vorhersage von *dre*-sites

Der Ansatz, sRNAs über die Bindestellen eines Regulators zu finden, hat einen entscheidenden Vorteil gegenüber den anderen durchgeführten Methoden. Diese basieren auf einer Konservierung von Sequenz oder Struktur in verwandten Spezies. Schwach konservierte RNAs oder solche, die für eine Spezies spezifisch sind, lassen sich mit diesen Methoden nicht finden. Die Terminatorsuche ist limitiert auf sRNAs, deren Transkription *rho* unabhängig erfolgt. Die Suche nach Proteinbindestellen im Genom ist unabhängig von solchen Faktoren, hat aber ihre eigenen Limitationen. Vor allem muss das Bindeepitop des Proteins bekannt und gut definiert sein.

Das Bindeepitop von DasR war bekannt und aus Vorhersagen ging hervor, dass etwa 100 Gene von DasR reguliert werden könnten [97]. Diese große Anzahl möglicher Ziele erlaubt die Vermutung, dass auch sRNAs von DasR reguliert werden könnten.

Die 15 vorhergesagten *dre*-sites, die bei dieser Suche gefunden wurden und die mindestens

100 nt 5' des nächsten Leserahmens lagen, hatten alle einen sehr guten Score zwischen 9.01 und 16.97. Der Score ist ein Maß für die Ähnlichkeit der vorhergesagten *dre*-sites zur Konsensussequenz. Im Vergleich dazu lagen die Scores der fünf bekannten *dre*-sites, die zur Erstellung der Konsensussequenz verwendet wurden, zwischen 13.78 und 17.5. Eine genaue Analyse der Liste zeigte, dass sich diese 15 Treffer in drei Gruppen einteilen ließen. Die erste Gruppe besteht aus den Genen SCO7263 und SCO6345. Diese kodieren beide für Bestandteile des PTS, von dem bekannt ist, dass es von DasR reguliert wird. In dieser Gruppe ist anzunehmen, dass das jeweilige Gen selbst das Ziel der Regulation durch DasR ist. Die zweite Gruppe umfasst sieben Gene (SCOs 6004, 7224, 1906, 5230, 6012, 5332 und 6300), bei denen es sich jeweils um Membrantransporter oder sekretierte Proteine handelt. Auch in dieser Gruppe ist zu vermuten, dass DasR an der Regulation des stromabwärts liegenden Genes beteiligt ist. Die letzte Gruppe umfasst sechs verschiedene Gene (SCOs 5239, 3679, 7250, 3490, 4506 und 3563). Bei diesen ist nichts über ihre Funktion bekannt (3679, 4250 und 4506) oder die mögliche oder bekannte Funktion kann nicht mit DasR in Verbindung gebracht werden (Histidin Kinase 5239, Transposase 3490 und Acetyl CoA Synthetase 3563). Stromabwärts einer *dre*-site, SCO5239, wurde eine konservierte Region gefunden, die sich nicht bis zum kodierenden Bereich des Gens erstreckt. In dieser konnte die sRNA *sc1* nachgewiesen werden.

4.1.3. 454 Sequenzierung

Als Alternative zu den bioinformatischen Vorhersagen von sRNAs wurde im Laufe dieser Arbeit auch eine 454 Sequenzierung des Transkriptoms von *S. coelicolor* durchgeführt. Von den ~ 40.000 primären Sequenzen blieben nach bioinformatischer Filterung etwa 5.500 übrig (siehe Ergebnisse Seite 25), die sich in 1265 individuelle Sequenzen gruppieren. Sie befanden sich alle in intergenen Regionen und ließen sich keiner annotierten RNA Spezies zuordnen. Diese Gruppe beinhaltete noch eine Reihe von 5' und 3'UTRs bei denen die Sequenzierung nicht mit der jeweiligen kodierenden Region überlappte und die deshalb nicht automatisch entfernt worden waren. Durch manuelle Überprüfung konnten 450 potentielle 5' und 3'UTRs von der Liste gestrichen werden. Es blieben 815 Transkripte übrig, denen allein durch Analyse ihrer Lage keine Funktion zugeordnet werden konnte. Die weitere Auswertung der 454 Sequenzierung wurde von Michaela Statt durchgeführt. Von den bisher von ihr getesteten 16 Sequenzen konnte bei 11 die Expression einer sRNA im Northern Blot nachgewiesen werden. Dies entspricht einer Trefferquote von bisher 68%. Hoch gerechnet

auf die gefundenen 815 Transkripte ergibt sich eine Zahl von 554 potentiellen sRNAs in *S. coelicolor*. Diese Menge ist gemessen an der Größe des Genoms durchaus mit der vorhergesagten Menge an sRNAs in *E. coli* vergleichbar (~ 300).

4.1.4. Vergleich von Bioinformatik *und* Sequenzierung

Die fünf durchgeführten Studien zur Identifizierung von sRNAs unterschieden sich sehr deutlich sowohl in der Menge der vorgeschlagenen sRNAs als auch in der Menge der falsch positiven Treffer.

Die Vorhersage von sRNAs mittels Infernal (Kapitel 3.1.4) brachte die bei weitem größte Anzahl an Treffern (5343). Die große Menge an Treffern zeigt bereits, dass diese Art der Suche nicht sehr spezifisch war und lässt einen großen Anteil an falsch positiven erwarten. Um die Anzahl der Treffer einzuschränken, wurden diese mit der Liste aller bekannten RNA Familien (Rfam Database) abgeglichen. Dies reduzierte sie auf 1378 Treffer. Der Großteil dieser Treffer wurde jedoch als potentielle microRNA vorhergesagt, die in Bakterien nicht vorkommen. Die vorliegende Liste wurde auf Grund der vermutlich niedrigen Spezifität nicht weiter verwendet.

Das Programm RNAz sagte 991 konservierte strukturierte Bereiche im Genom von *S. coelicolor* voraus. Die im Vergleich zu Infernal deutlich niedrigere Zahl zeigt, dass es vermutlich besser für die Vorhersage von sRNAs geeignet ist.

RNAz sagt mit Hilfe von RNAalifold eine Konsensus-Sekundärstruktur für einen Sequenzabgleich voraus. Die Vorhersage mit RNAalifold funktioniert analog zur Vorhersage für eine einzelne Sequenz mit RNAfold. Der hauptsächliche Unterschied ist, dass das verwendete Energiemodell um Informationen zur Kovarianz erweitert wird. Kompensatorische Mutationen (z.B. ein CG Paar mutiert zu einem UA Paar) sowie konsistente Mutationen (z.B. AU mutiert zu GU) werden durch einen energetischen ‚Bonus‘ belohnt. Mutationen, die nicht mit der Struktur vereinbar sind (z.B. CG mutiert zu CA), bekommen eine energetische ‚Strafe‘. Dies führt zu einer Konsensus-MFE Struktur (*minimum free energy*). RNAz vergleicht nun diese Konsensus-MFE mit der durchschnittlichen MFE der einzelnen Sequenzen und berechnet daraus den *structure conservation index* SCI. Ein hoher SCI bedeutet, dass sich die Sequenzen gemeinsam in eine ähnliche Struktur falten wie jede für sich genommen. Andererseits sinkt der SCI, wenn keine Konsensus-Struktur gefunden werden kann.

Die 991 vorhergesagten sRNAs hatten einen SCI zwischen 0.5 und 1. Verglichen wurden hierfür *S. coelicolor* und *S. avermitilis*. Ein SCI von 0.5 bedeutet also, dass eine Struktur / Sequenz zu 50% konserviert war. Bei einem SCI von 1 ist die Sequenz und damit die Struktur identisch. Es stellt sich die Frage, wie aussagekräftig der SCI in diesem Fall ist, wenn zwei sehr nahe verwandte Spezies verglichen werden. Eine hohe Sequenzähnlichkeit auch in der intergenen Region ist zu erwarten.

Die Vorhersage von Terminatoren brachte 172 Treffer. Zur Auswahl von Kandidaten, die im Northern Blot überprüft werden, wurden Daten aus beiden Vorhersagen (von RNAz und RNAmotif) verwendet. Zunächst wurden Terminatoren mit einem potentiellen ΔG von höchstens -4 kcal/mol ausgesucht, die mehr als 100 nt vom nächsten Gen entfernt lagen. Dann wurden 35 Terminatoren ausgewählt, die zusätzlich noch einen Treffer in der Suche mit RNAz hatten. Kriterien für die Auswahl waren die Orientierung und Entfernung der benachbarten Gene, die Stabilität des Terminators und der SCI des RNAz Treffers. Trotz der Kombination von zwei Methoden konnten bei den 35 getesteten Kandidaten nur fünf sRNAs identifiziert werden.

Die Vorhersage von *dre*-sites im Genom brachte die bei geringste Trefferzahl (15). Eine von sechs (mit dem höchsten Score) stellte sich als sRNA heraus – sc1. Diese wurde auch von RNAz vorhergesagt (SCI 0.9999), war jedoch nicht bei den 35 ausgewählten Kandidaten dabei, da von RNAmotif keine Terminatorstruktur vorhergesagt wurde.

Der vorliegende Vergleich zeigt, dass die Art der Vorhersagen sich deutlich in Quantität und Qualität der Ergebnisse unterscheiden. Von 35 bioinformatisch ausgewählten konnte nur bei fünf ein Transkript nachgewiesen werden. Der SCI ist bei der Auswahl in diesem Fall auch nur bedingt hilfreich, da 854 der 991 Treffer einen SCI von > 0.9 haben. Dies liegt mit ziemlicher Sicherheit an der Ähnlichkeit der verwendeten Organismen.

Die spezifischste Art ist die Suche nach Proteinbindestellen. Sie ist allerdings auch die mit der geringsten Gesamtausbeute und limitiert auf bekannte Regulatorproteine. Auch lassen sich so nur solche sRNAs finden, die von einem Protein kontrolliert werden. Dafür ist sie unabhängig von jeglicher Konservierung und ermöglicht auch die Identifizierung von sRNAs, die nur in einer Spezies vorkommen. Die 454 Sequenzierung ist dazu auch in der Lage. Sie liefert jedoch nur das Expressionsbild zum Zeitpunkt der Ernte der Zellen. Für einen globalen Überblick müssten mehrere Sequenzierungen mit RNA, die aus verschiedenen Bedingungen präpariert wurde, durchgeführt werden.

4.2. sc32 – sRNA oder 3'UTR ?

4.2.1. Das Gen *bldC* – SCO4091

Die putative sRNA sc32 wird ausschließlich durch Kälteschock induziert. Im 5'RACE zeigte sich, dass ihr Transkriptionsstart nur vier nt hinter dem Leserahmen des Gens *bldC* (SCO4091) liegt. *bldC* kodiert für ein DNA-Bindeprotein der MerR Familie der transkriptionalen Aktivatoren [85]. *bld* (*bald* - kahl) Mutanten in Streptomyceten fassen eine Klasse von Genen zusammen, deren Deletion dazu führt, dass kein Luftmycel mehr gebildet werden kann [28-32]. Die meisten der charakterisierten *bld* Gene kodieren Proteine mit regulatorischer Funktion. *bldB*, *D* und *M* kodieren für bekannte oder putative DNA Bindeproteine [98-103], *bldN* und *bldG* für einen Sigmafaktor beziehungsweise für einen anti-anti-Sigmafaktor [104-106]. *bldC* Mutanten sind wie viele andere *bld* Mutanten auf den meisten Medien kahl. Die Differenzierung in Luftmycel und die Sporulation lassen sich, im Fall von *bldC*, aber bei Wachstum in Minimalmedium mit Glycerin, Cellobiose, Mannose oder Glucose wiederherstellen [107]. Das Gen *bldC* ist konstitutiv exprimiert, seine genaue Funktion aber unbekannt [85].

4.2.2. Ist sc32 ein eigenständiges Transkript?

Die Frage, ob sc32 ein eigenständiges Transkript ist oder aus dem 3'UTR von *bldC* prozessiert wird, konnte nicht endgültig geklärt werden. Aus dem vorliegenden Datensatz ergeben sich jedoch mehrere Hinweise, die auf eine unabhängige Transkription hindeuten. Zunächst wurde das 5' Ende von sc32 mittels RACE bestimmt. Dazu wurde RNA aus einer mit Kälteschock behandelten Kultur verwendet. Die verwendeten Oligonukleotide as_sc32#1 und #2 wiesen immer auf dieselbe Base hin. Die verwendete Elongationszeit bei der RT-PCR würde jedoch theoretisch ausreichen, um das 5' Ende von *bldC* zu erreichen. In keiner der Sequenzierungen nach dem RACE wurde ein weiter 5' liegender Punkt erreicht.

Die Expressionsanalyse von sc32 gibt einen weiteren Hinweis. Hier wurde gezeigt, dass sc32 spezifisch und stark während Kälteschock induziert wird. Das 139 nt lange Transkript konnte im Northern Blot nachgewiesen werden. Von *bldC* ist jedoch bekannt, dass es unter Standardbedingungen während des gesamten Lebenszyklus von *S. coelicolor* konstitutiv exprimiert wird [85]. Es ist möglich, dass sc32 nur während Kälteschock aus der existierenden mRNA von *bldC* prozessiert wird. Diese dann 475 nt lange mRNA hätte aber mit den Sonden gegen sc32 unter den verwendeten Bedingungen detektiert werden müssen.

Es wurde aber nie ein Produkt vergleichbarer Größe im Northern Blot identifiziert. Auch in der 454 Sequenzierung wurden Transkripte von *sc32* und *bldC* gefunden, die nicht überlappen (Abb. 4-1).



Abbildung 4-1: Ergebnis der 454 Sequenzierung im Bereich von *sc32*. 1 - 5: erhaltene reads. 1 und 2 überlappen. Der Pfeil zeigt den experimentell bestimmten Transkriptionsstart von *bldC* 125 nt oberhalb des Startcodons (Hunt, JBac 2005). 1 endet drei Nukleotide vorher. Zwischen *bldC* und *sc32* liegen 4 nt zwischen 4 und 5 24 nt.

Zusammenfassend lässt sich zu *sc32* sagen, dass es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um eine unabhängig transkribierte sRNA handelt, deren Promoter im Leserahmen von *bldC* liegt und die durch Kälteschock induziert wird. Ihre Funktion konnte in dieser Arbeit nicht aufgeklärt werden, da keine sichtbaren Phänotypen auftreten.

4.3. *sc1* – Ein Regulator des Sekundärmetabolismus

4.3.1. Die Konservierung von *sc1*

Die sRNA *sc1* konnte in allen 14 Streptomycceten identifiziert werden, von denen Sequenzinformationen vorlagen (Abbildung 4-2, Seite 57). Außerhalb des Genus der Streptomycceten konnte die sRNA mittels BLASTN in keinem bakteriellen Genom gefunden werden.

Tabelle 4-1: Streptomyces Spezies von denen die Genomsequenz vorliegt

<i>S. albus</i>	<i>S. griseus subsp. griseus</i> NBRC 13350
<i>S. avermitilis</i>	<i>S. lividans</i> TK24
<i>S. clavuligerus</i> ATCC 27064	<i>S. scabies</i>
<i>S. coelicolor</i> A3(2)	<i>S. species C</i>
<i>S. roseosporus</i>	<i>S. species Mg1</i>
<i>S. ghanaensis</i> ATCC 14672	<i>S. sviceps</i> ATCC 29083
<i>S. griseoflavus</i> Tu4000	<i>S. viridochromogenes</i> DSM 40736

Die sRNA *sc1* scheint also spezifisch für die Gattung der Streptomycceten zu sein.

4.3.2. Die Funktion von sc1

Sc1 benötigt kein RNA Chaperon für die Regulation von *dagA*

Die Mehrheit der bis heute charakterisierten sRNAs funktioniert als Riboregulator über einen antisense Mechanismus durch Bindung an ihre Ziel-mRNAs. Meist wird durch Basenpaarung die TIR sequestriert und für das Ribosom unzugänglich [108]. Diese Interaktion wird bei den bekannten sRNAs oft durch das Sm Protein Hfq vermittelt. Es wurde postuliert, dass sRNAs in Bakterien ohne Hfq auf eine andere Weise funktionieren [109].

In der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, wie der Gram+ GC reiche Organismus *S. coelicolor* die Expression eines Gens mit Hilfe einer sRNA reguliert. Es wurde eine direkte Interaktion der *dagA* mRNA mit der sRNA sc1 gezeigt. Findet die Interaktion beidseitig in einem einzelsträngigen Bereich statt, sollte bei steigender Temperatur mehr Komplex gebildet werden. Ist jedoch für die Bindung das Aufschmelzen einer Sekundärstruktur erforderlich, sollte eine höhere Temperatur zu mehr Komplexbildung führen. Durch Steigerung der Temperatur wurde die Menge an entstehenden Komplex auf 80% gesteigert. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass für die Bindung *in vitro* keine weiteren Faktoren notwendig sind. Möglicherweise gilt dies auch *in vivo*, da durch den hohen GC Gehalt sRNA und mRNA Interaktionen deutlich stabiler sind als in *E. coli*. Andererseits haben auch sRNA und mRNA für sich genommen bereits stabilere Sekundärstrukturen, so dass durchaus die Hilfe eines RNA Chaperons notwendig sein kann, um eine Interaktion überhaupt erst zu ermöglichen. Ist der Komplex erst gebildet, könnte sich das Protein wieder ablösen, da er dann stabil genug ist, um das Ribosom an der Translation zu hindern. In vielen Bakterien wird die sRNA – mRNA Interaktion von dem RNA Chaperon Hfq vermittelt. In Streptomycceten existiert kein Hfq homologes Protein.

Die Expression von *dagA* wird auf mindestens drei Ebenen reguliert

Die in dieser Arbeit charakterisierte sRNA sc1 zeigt einen deutlichen Effekt auf die Expression der extrazellulären Agarase DagA. Die Überexpression von sc1 um das zweifache führt bereits zu einer kompletten Repression der Agarase. Von DagA ist bekannt, dass es auf der Ebene der Transkription reguliert wird [110]. Es unterliegt auch der Kohlenstoff Katabolitenrepression durch Glucose und andere Zucker [111, 112]. Untersuchungen in *multicopy* Systemen zeigten, dass auch der Export des Pro-Proteins durch das *twin*-Arginin Translokationssystem (*tat*) reguliert wird. Dort wurde das Pro-Protein nicht mehr aus der

– DISKUSSION –

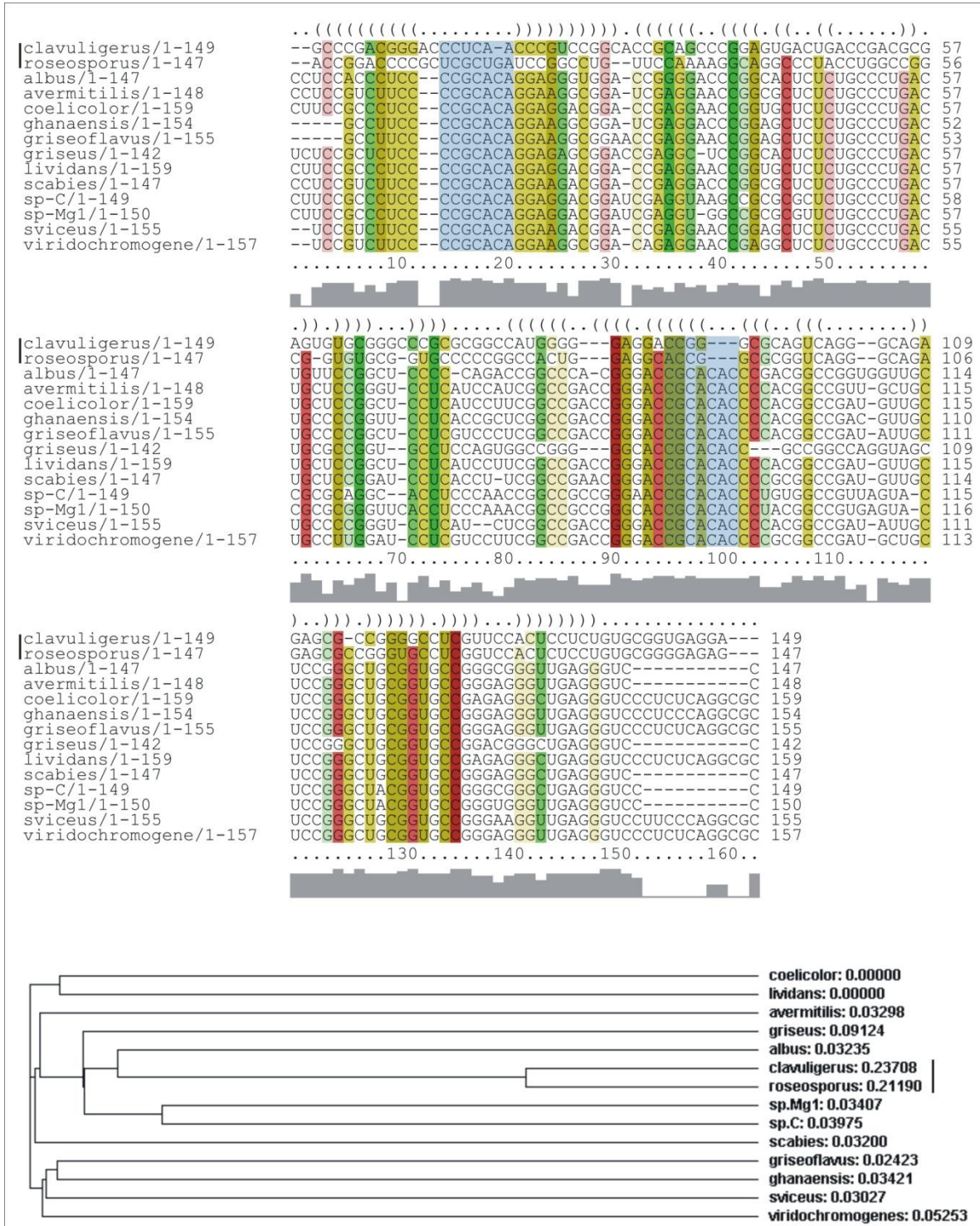


Abbildung 4-2: Oben Struktur und Sequenz Konservierung von sc1 in 14 Streptomyceten. In 12 der 14 Genome ist das selbe Motiv CCGCACA in der ersten und dritten Stammsschleife konserviert (blau). Der Farbcode zeigt strukturelle Konservierungen, der graue Balken die der Sequenz. Unten Phylogramm der Verwandtschaft der Sequenzen zueinander. Das Sequenzmotiv CCGCACA ist in *S. clavuligerus* und *S. roseosporus* nicht konserviert.

Zelle exportiert, sobald Glucose im Medium vorhanden war. Dieses komplexe Szenario wirft die Frage auf, warum DagA neben der Transkription und dem Export auch noch auf der Ebene der Translation mit Hilfe einer sRNA reguliert wird. Eine mögliche Erklärung dafür kann die Geschwindigkeit sein, die ein solches System ermöglicht. Dabei sind zwei Faktoren maßgeblich. Die sRNA muss zwar wie die mRNA eines Proteins transkribiert werden, ist aber in der Regel deutlich kürzer als ein durchschnittliches Protein (40 – 200 nt versus etwa 1000 nt). Sie kann also deutlich schneller und mit geringerem Energie- und Materialaufwand hergestellt werden. Desweiteren entfällt die Translation [113]. Daraus folgt, dass durch eine sRNA eine schnelle Regulation möglich ist.

sRNAs sind aber nur selten für die dauerhafte Regulation eines Genes ausgelegt. Meist ist es nicht sinnvoll, die mRNA eines Proteins, das nicht benötigt wird vorrätig zu halten und währenddessen durch eine sRNA zu inaktivieren. Eine Ausnahme bilden Hitzeschockproteine, da diese möglichst schnell nach einem Hitzeschock produziert werden müssen. Generell sind sRNAs jedoch eher dazu geeignet schnell die Translationseffizienz eines Zielgenes zu ändern. Die dauerhafte Repression eines Gens über DNA-bindende Proteine ist ihnen aber an Effizienz überlegen da keine mRNA synthetisiert werden muss.

Während der *sc1+* Stamm kein extrazelluläres DagA mehr produziert, konnte in den Plattentests im *asc1* Stamm keine gesteigerte Produktion von DagA nachgewiesen werden. DagA könnte unter den verwendeten Bedingungen bereits im Wildtyp maximal induziert sein, so dass die Entfernung von *sc1* keine Steigerung der Expression mehr bringen kann. Andererseits ist es auch möglich, dass die DagA Translation im *asc1* Stamm gesteigert ist, mit der verwendeten Methode aber nicht messbar ist. DagA ist kein membranständiges Protein, sondern wird sekretiert und diffundiert in das Medium. Es bildet sich ein Gradient von DagA um die Kolonie herum aus. Für die Spaltprodukte von DagA gibt es keinen aktiven Transporter, sie erreichen die Zelle ebenfalls per Diffusion. Mit steigender Entfernung zur Zelle nimmt die Effizienz dieser Diffusion exponentiell ab. Daraus folgt, dass es eine maximale Entfernung gibt, für die diese Art des Nährstofftransports für eine Zelle nutzbar ist. Unter den verwendeten Bedingungen erreicht wahrscheinlich bereits der Wildtyp diese Grenze, so dass eine Steigerung der Expression von DagA keine Erweiterung mehr bringen kann. Um diese Theorie zu überprüfen, könnte die Zunahme des Hofes um eine Kolonie über mehrere Tage hinweg beobachtet werden. Sollte der *asc1* Stamm tatsächlich mehr DagA sekretieren, sollte der Hof schneller wachsen als beim Wildtyp.

Nur wenige bodenbewohnende Streptomycceten kodieren in ihrem Genom eine Agarase. Tatsächlich konnte mittels BLAST Suche in keinem der in Tabelle 4-1 erwähnten Genome ein *dagA* homologes Gen gefunden werden. Sc1 ist jedoch in allen diesen Streptomycceten konserviert (Abb. 4-2). Die Interaktion von sc1 mit *dagA* erklärt auch nicht die beobachteten Phänotypen, wie die Repression von sc1 bei Stickstoffmangel in der Stationärphase und die Repression der Actinorhodin Produktion im sc1+ Stamm. Diese Daten zeigen, dass *dagA* nicht das einzige Ziel von sc1 sein kann.

SCO5239 – ein direktes Ziel von sc1?

Ein mögliches zweites Ziel von sc1 ist die Histidin Kinase SCO5239. Hier konnte gezeigt werden, dass die Koexpression von sc1 einen positiven Effekt auf die Expression einer SCO5239 – Luziferase Reporterfusion hatte. Nicht geklärt werden konnte, ob dieser Effekt durch eine direkte Interaktion vergleichbar mit der Agarase zustande kommt oder über einen oder mehrere Zwischenstationen vermittelt wird. Die Aufklärung dieses Zusammenhangs scheiterte hauptsächlich daran, dass der Transkriptionsstart der Kinase nicht bestimmt werden konnte. Dies wiederum kann in der extrem niedrigen Expression des Gens begründet liegen. Da gezeigt werden konnte, dass die Koexpression von sc1 die Expression der Kinase um den Faktor acht steigert, kann ein 5'RACE im sc1+ Stamm möglicherweise erfolgreicher sein. Alternativ kann das 5'RACE auch mit der SCO5239 – Luziferase Fusion in Gegenwart von sc1 durchgeführt werden. Auf diese Weise könnten eventuelle Abbauprozesse der Kinase mRNA umgangen werden, die die Detektion erschweren. Ist das 5' Ende der Kinase bestimmt, kann mit Gelshift Experimenten eine direkte Interaktion von sc1 mit der mRNA der Kinase untersucht werden. Lässt sich keine direkte Interaktion nachweisen, könnte analysiert werden, ob sc1 das aufgereinigte Protein bindet. Zusätzlich kann die Expression der Kinase in Abhängigkeit von sc1 in Gegenwart unterschiedlicher Stickstoffquellen getestet werden.

4.3.3. Die Regulation von sc1 durch DasR

Die Regulation von sc1 blieb trotz der erhaltenen Ergebnisse unklar. Es konnte gezeigt werden, dass die *dre*-site vor sc1 von DasR sowohl *in vitro* als auch *in vivo* erkannt wird. Im Northern Blot zeigte sich auch, dass die Expression von sc1 abhängig ist von der Menge an DasR. Jedoch gelang es nicht, die Expression von sc1 durch Erhöhen des GlcN-6P Spiegels in der Zelle durch Zugabe von GlcNAc zu induzieren. Es ist denkbar, dass neben GlcN-6P

noch ein weiterer Induktor von DasR existiert, der für die Induktion dieser *dre*-site notwendig ist. Dafür spricht, dass bei den von Rigali *et al.* durchgeführten *in vitro* Studien ein mindestens 300.000-facher molarer Überschuss GlcN-6P notwendig war, um DasR von der *dre*-site vor *crr* zu lösen[78].

Möglicherweise spielen die konservierten Schleifen der Stämme eins und drei eine Rolle bei der Funktion von *sc1* (Abbildung 4-2 blau). Beide zeigen dasselbe Sequenzmotiv CCGCACA, das in 12 der 14 verglichenen Streptomyceten konserviert ist. Es konnte gezeigt werden, dass dieses Motiv zumindest bei der Interaktion von *sc1* mit *dagA* nicht essentiell ist. Es könnte sich aber um eine Bindestelle für eine andere RNA oder ein Protein handeln.

Unklar ist auch die Frage, wie die Repression von *sc1* unter Stickstoffmangel in der Stationärphase mit DasR in Verbindung zu bringen ist. Von DasR ist bisher noch nicht bekannt, dass es Gene des Stickstoffmetabolismus kontrolliert. Um diesen Sachverhalt weiter zu untersuchen, wurde die Promoterregion von *sc1* vor das Luziferase Reporter gen kloniert. Mit Hilfe dieses Plasmides kann nun die Induktion von *sc1* durch Zugabe verschiedener Stickstoffquellen wie Nitrat, Nitrit, Ammonium oder Harnstoff untersucht werden. Es müsste analysiert werden, ob sich das Induktionsverhalten von *sc1* unter diesen Bedingungen im Δ DasR Stamm BAP29 von Wildtyp unterscheidet. Zeigt sich trotz Deletion von DasR noch eine Stickstoff abhängige Regulation von *sc1*, gibt es möglicherweise einen zweiten Regulator von *sc1*. Zur weiteren Untersuchung sollte dann die *dre*-site vor *sc1* mutiert werden. Dies ist notwendig, da die Deletion von DasR zur Deregulation von etwa 100 Genen führen kann. Ein in BAP29 auftretender Effekt kann also auch auf die unkontrollierte Expression verschiedenster Gene zurückzuführen sein. Zeigt sich dann immer noch kein Unterschied in der Induktion, legt das den Schluss nahe, dass es einen zweiten Regulator von *sc1* gibt. Ein möglicher Kandidat dafür ist GlnR, der Regulator des Stickstoffstoffwechsels in *S. coelicolor* [114]. In einer vorläufigen Untersuchung konnte jedoch keine Bindestelle von GlnR vor *sc1* vorhergesagt werden (Jens Reuther persönliche Mitteilung).

Die mögliche biologische Funktion von *sc1*

Es konnte gezeigt werden, dass *sc1* neben seinem Effekt auf *dagA* und SCO5239 auch direkt auf die Versorgung der Zellen mit Nährstoffen und die Wachstumsphase reagiert. Nur in der Stationärphase unter Stickstoffmangel war die Expression von *sc1* reduziert, der Mangel an

Phosphat oder Kohlenstoff Quellen führte nicht zu einer Änderung. Wächst *S. coelicolor* nicht unter Laborbedingungen, sondern in seinem natürlichen Lebensraum – im Boden – ist Stickstoffmangel der vorherrschende Zustand [114, 115]. Die Expression von *sc1* ist also normalerweise niedrig und wird durch plötzliche Verfügbarkeit von Stickstoffquellen gesteigert. Bringt man dies in den Zusammenhang mit den Phänotypen von *sc1+* und *asc1*, so zeigt sich, dass die Überexpression von *sc1* einen verringerten Sekundärmetabolismus zur Folge hat. Die Nutzung alternativer C-Quellen wie Agar und die Produktion von Sekundärmetaboliten wie Actinorhodin wird dann reprimiert. Im Gegensatz dazu folgt aus der Verringerung der Menge an *sc1* eine Aktivierung des Sekundärmetabolismus. Diese war bei der Produktion von Actinorhodin messbar. Der *asc1* Stamm produzierte etwa 30% mehr Actinorhodin als der Wildtyp.

Sc1 ist also möglicherweise ein Regulator, der den Sekundärmetabolismus abschaltet, sobald die Zellen ausreichende Stickstoffquellen zur Verfügung haben.

Weitere Ziele von *sc1*

Welche zentrale Rolle *sc1* zumindest in *S. coelicolor* spielt, zeigte die Analyse des Proteoms. Bereits in 1D Gelen zeigten sich mindestens elf differentiell exprimierte Proteine. Die meisten dieser Proteine waren zusätzlich von *sc1* auch von der verwendeten C-Quelle abhängig. Die Identifizierung dieser Proteine mittels Massenspektrometrie könnte zusätzliche direkte oder indirekte neue Ziele von *sc1* aufzeigen.

Bakterielle sRNAs werden in vielen Fällen zur schnellen Antwort auf Stressbedingungen exprimiert. *Sc1* könnte solch eine schnelle Antwort auf einen positiven Stress – ausreichende Stickstoffversorgung – sein und als Signal dafür dienen, den Sekundärmetabolismus zu deaktivieren bevor weitere Kontrollinstanzen aktiviert werden.

5. Material und Methoden

5.1. *Materialien*

Chemikalien

Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Agar	OXOID, Heidelberg
Agarose peqGold Universal	peqLab, Erlangen
Ammoniumheptamolybdat Tetrahydrat	Roth, Karlsruhe
Ammoniumsulfat	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Apramycin	Sigma, München
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
β -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Bactopecton	Becton Dickenson, USA
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid	Roth, Karlsruhe
Casaminosäuren	Roth, Karlsruhe
Chloramphenicol	Roth, Karlsruhe
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Citronensäure	Roth, Karlsruhe
Coomassie Phast Gel™ Blue R Tabletten	GE Healthcare, Schweden
Dikaliumhydrogenphosphat Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Dinatriumhydrogensulfat	Roth, Karlsruhe
Dikaliumsulfat	Roth, Karlsruhe
Dinatiumtetraborat Decahydrat	Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
Dimethylformamid (DMF)	
Desoxinukleotide (dNTPs)	peqLab, Erlangen
Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamin-tetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Eisen-III-Chlorid Hexahydrat	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol 99,98%	Merck, Darmstadt
Ethanol, technisch	Merck, Darmstadt
Fleischextrakt	Roth, Karlsruhe
Formamid, deionisiert	Roth, Karlsruhe
α -D-Glukose	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Glycerin 100%	Roth, Karlsruhe
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	OXOID, Heidelberg
iBlock	Tropix, USA

– MATERIAL UND METHODEN –

Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Kaliumsulfat	Roth, Karlsruhe
Kanamycin	Roth, Karlsruhe
Kupfer-II-Chlorid Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Lysozym	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Roth, Karlsruhe
Maleinsäure	Roth, Karlsruhe
Malzextrakt	OXOID, Heidelberg
Mangan-II-Chlorid Dihydrat	Merck, Darmstadt
Mannitol	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Nalidixinsäure	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumcarbonat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
Natriummolybdat Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Natriumnitrat	Roth, Karlsruhe
Natriumsulfat	Roth, Karlsruhe
Natronlauge 50%	Roth, Karlsruhe
n-Decanal	Roth, Karlsruhe
PEG 1000	Roth, Karlsruhe
PEG 6000	Roth, Karlsruhe
Pepton	Roth, Karlsruhe
Phenol	Roth, Karlsruhe
Saccharose	Roth, Karlsruhe
Salzsäure	Roth, Karlsruhe
Sojapulver	Hensel / Reformhaus
Spermidin	SERVA, Heidelberg
Streptomycin	Sigma, München
Natrium-Dodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
N-[Tris(hydroxymethyl)-methyl]-2-aminoethansulfonsäure (TES)	Roth, Karlsruhe
Thiostrepton	Roth, Karlsruhe
Trichloressigsäure	Roth, Karlsruhe
Tricin	Roth, Karlsruhe
Tris	Roth, Karlsruhe
Trypton/Pepton aus Casein	Roth, Karlsruhe
<i>Tryptic Soy Broth</i> (TSB)	Becton Dickenson, USA
Xylencyanol	Roth, Karlsruhe
Zinkchlorid	Roth, Karlsruhe

Alle verwendeten Chemikalien hatten p.a. Qualität

kommerzielle Systeme

Becher, Glas	Schott Duran, Jena
Becher, Kunststoff	Vitlab, Grossostheim
Filterspitzen (10, 20, 200, 1000 µl)	Greiner, Nürtingen
Einmalhandschuhe	Roth, Karlsruhe
Einmal-Spritze (10, 20 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Reaktionsgefäße (1,5 ml; 2,0 ml)	Greiner, Nürtingen
Filterpapier	Whatman, England
Glaspipetten	Ochs, Bovenden
Glasperlen (0.5 und 5 mm)	Roth, Karlsruhe
Halbmikroküvetten	Sartsedt, Nümbrecht
Kanülen, steril	Becton Dickinson, Heidelberg
Messzylinder	Vitlab, Grossostheim
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim
PCR-Reaktionsgefäß 0,2 ml	peqLab, Erlangen
Petrischalen, Kunststoff	Greiner, Nürtingen
Pipetman acu	IBS Integra Biosciences, Fernwald
Pipetten (2, 20, 200, 1000 µl)	Gilson, Frankreich
Pipettenspitzen, Kunststoff	Greiner, Nürtingen
Polyethylenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner, Nürtingen
Reagenzgläser	Schott Duran, Jena
Schikanekolben	Schott Duran, Jena
Schraubflaschen	KAVALIERS, Sázava
Serologische Pipetten (5, 10, 25 ml)	Greiner, Nürtingen
Skalpellklinge	Roth, Karlsruhe
Stericup	Millipore, Schwalbach
96-well Platte, durchsichtig	Greiner, Nürtingen
96-well Platte, Flachboden	Greiner, Nürtingen

Geräte

Autoklav	Getinge, Schweden
Autoklaviertopf	Sitram, Frankreich
Biofuge (Fresco17, Pico17, PrimoR)	Heraeus Christ, Osterode
Brutschrank (30°C, 37°C)	Heraeus Christ, Osterode
Bunsenbrenner	VWR, Darmstadt
Eismaschine	Scotsman Ice Systems, USA
Elektrophoresekammern	M. Müller, FAU Erlangen-Nürnberg, Roth, Karlsruhe C.B.S. Scientific, Del Mar peqLab, Erlangen
Electrophoresis Power Supply Consort	peqLab, Erlangen
FastPrep®-24	MP Biomedicals, USA
Feinwaage	Acculab, USA

Gelschüttler GFL	Karow, Berlin
Heizblock	VWR, Darmstadt
IKA VORTEX Genius3	IKA, Staufen
Inkubationsschüttler Aquatron	Infors AG, Bottmingen
Inkubationsschüttler Multitron	Infors AG, Bottmingen
Kochplatte	Rommelsbacher GmbH, Dinkelsbühl
Kulturschüttler Mixer 5432	Eppendorf AG, Hamburg
Kühlschrank (mit Gefrierschrank -20°C)	Liebherr, Schweiz
Magnetrührer IKA RET basic	IKA, Staufen
Mikrowelle	AEG, Frankfurt am Main
Multifuge 1L-R	Heraeus Christ, Osterode
NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer	peqLab, Erlangen
peqSTAR	peqLab, Erlangen
pH Meter 766 Calimatic	Knick, Berlin
Safire 2	Tecan Trading AG, Schweiz
Spannungsnetzgerät	Bio-Rad, USA
Thermocycler Primus 25	peqLab, Erlangen
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg
ThermoStat plus	Eppendorf AG, Hamburg
Tiefkühltruhe (-80°C)	Heraeus Christ, Osterode
Trockenschrank	Heraeus Christ, Osterode
UV Schirm 254 nm	INTAS, Göttingen
UV Schirm 312 nm	INTAS, Göttingen
Videodokumentationsanlage	INTAS, Göttingen
Waage	Acculab, USA
Wallac 1409 liquid scintillation counter	Wallac, Monza
Wasserbad E	Julabo, Seefeld
Wasserbad ED	Julabo, Seefeld
Wasservollentsalzungsanlage	Millipore, Frankreich
Wärmeschrank	EHRET, Emmendingen

5.2. *Oligonukleotide*

Nummer	Name	Sequenz (5' → 3')	Beschreibung
26	5239_F1	TGCTCTCTGCCCTGACTGCT	RT-PCR SCO5239 fwd1
27	5239_F2	CATCCTTCGGCCGACCGGGA	RT-PCR SCO5239 fwd2
28	5239_R1	TGAGAGGGACCCTCAGCCCT	RT-PCR SCO5239 rev1
29	5239_R2	AAGCACCCGCGGGCCGCGGC	RT-PCR SCO5239 rev2
30	5239_R3	CTCGAGGTCGGAGTCGTCGA	RT-PCR SCO5239 rev3

– MATERIAL UND METHODEN –

Nummer	Name	Sequenz (5' → 3')	Beschreibung
31	5239_R4	GCGGGTGGGGACCCACAGGA	RT-PCR SCO5239 rev4
32	5239_R5	GCCGACCATGTCGTCCTGGT	RT-PCR SCO5239 rev5
33	IGR5239_fwd	TGCTCTCTGCCCTGACTGCT	Northern Blot IGR SCO5239
34	IGR5239-T7_rev	GGGCCCTAATACGACTCACTATAGGGAGAG GGACCCCTCAGCCCTCT	Northern Blot IGR SCO5239 + T7 Promoter
35	16S_fwd	GTAAAGAGCTCGTAGGCGGCT	Northern Blot SCO 16S rRNA
36	16S-T7_rev	CCCGGGATTATGCTGAGTGATATCCCGCGTC GAATTAAGCCACATGCT	Northern Blot SCO 16S rRNA + T7-Promoter
37	IGR0527-fwd	GGCTCGGACATGCCGTGTAG	Dot-Blot SCO fwd; die Nummer ist die SCO Nummer des Gens stromaufwärts; Name im Dot-Blot: 1fwd
38	IGR0527-rev	CCCGGGATTATGCTGAGTGATATCCCCACGA CATCTGCTGCTGACG	Dot-Blot SCO rev; 1rev
39	IGR1118-fwd	GGCTGCCTGTTGAGCCACTG	Dot-Blot SCO fwd; 2fwd
40	IGR1118-rev	GGGCCCTAATACGACTCACTATAGGGTATAG GAGCATCCCGGCCG	Dot-Blot SCO rev: 2rev
41	IGR2571-fwd	CTGATCAGTCCCGACCCCGG	Dot-Blot SCO fwd; 3fwd
42	IGR2571-rev	GGGCCCTAATACGACTCACTATAGGGTTCCG GCCACCGGACTACGA	Dot-Blot SCO rev; 3rev
43	IGR4151-fwd	GCTCGTCGGCGCAGCAGCCT	Dot-Blot SCO fwd; 4fwd
44	IGR4151-rev	GGGCCCTAATACGACTCACTATAGGGCGCTA CGCGCGTTGACTCT	Dot-Blot SCO rev; 4rev
45	IGR4253-fwd	TACGAGACAGGACGCCCTC	Dot-Blot SCO fwd; 5fwd
46	IGR4253-rev	GGGCCCTAATACGACTCACTATAGGGCAAC GCGCGCGTGAGGCT	Dot-Blot SCO rev; 5rev
47	IGR5038-fwd	TTCCCGCCCGCGGCCGCGCC	Dot-Blot SCO fwd; 6fwd
48	IGR5038-rev	GGGCCCTAATACGACTCACTATAGGGCCGC CGTTCGTCGGGCGCG	Dot-Blot SCO rev; 6rev
49	IGR5350-fwd	CCGCCCTCCGCGGGTGACAG	Dot-Blot SCO fwd; 7fwd
50	IGR5350-rev	GGGCCCTAATACGACTCACTATAGGGACGG GGCCCGTGCGGGGCC	Dot-Blot SCO rev; 7rev
51	IGR5876-fwd	TGCGGCCCCACCGAGGGCC	Dot-Blot SCO fwd; 8fwd
52	IGR5876-rev	GGGCCCTAATACGACTCACTATAGGGACCG GCATGATGGTGGCTGC	Dot-Blot SCO rev; 8rev
53	IGR7281-fwd	CTTGTCGAGTCGTGGCCGGT	Dot-Blot SCO fwd; 9fwd
54	IGR7281-rev	GGGCCCTAATACGACTCACTATAGGGACCTC CGCACGACCGGCCAC	Dot-Blot SCO rev; 9rev

– MATERIAL UND METHODEN –

Nummer	Name	Sequenz (5' → 3')	Beschreibung
55	IGR7638-fwd	CTGGCGCGAGGCCCGGCAGG	Dot-Blot SCO fwd; 10fwd
56	IGR7638-rev	GGGCCCTAATACGACTCACTATAGGGAGCAT TGCTGTAGAGTCTGG	Dot-Blot SCO fwd; 10rev
57	11_fwd	TCCCAAATGCGGTTCGCAGGA	IG346
58	11_rev	GGGCCCTAATACGACTCACTATAGGGTCATG TCTGCCACAAGCATG	
59	16_fwd	CGGACGTTGTGAAGGTGTCC	IG634
60	16_rev	GGGCCCTAATACGACTCACTATAGGGCTGA ACGCACTGGCCGACCC	
61	17_fwd	TGAATGTGCGGCAGTTCGAA	IG667
62	17_rev	GGGCCCTAATACGACTCACTATAGGGCTTCG CGTCTGTCGGCGGC	
63	18_fwd	TGCGCCGCCGCGCTGCCCGG	IG725
64	18_rev	GGGCCCTAATACGACTCACTATAGGGCCTCC CCGGGCAGCGCCGGG	
65	19_fwd	CATCCATCCATGAAACCCCG	IG725
66	19_rev	GGGCCCTAATACGACTCACTATAGGGCCGC CGCACCCCGTCCCA	
67	23_fwd	GTCTCGCCCGCGCGGTTGGC	IG1010
68	23_rev	GGGCCCTAATACGACTCACTATAGGGAGCG AGAAGGCAGGCCGCA	
69	24_fwd	CTTGCTGCTGCTCAGCGGAC	IG1164
70	24_rev	GGGCCCTAATACGACTCACTATAGGGTGCA ACGGTGTGAATTCCT	
71	25_fwd	TGTCACCCGACCACCCTCAC	IG1164
72	25_rev	GGGCCCTAATACGACTCACTATAGGGTCCG GAGCCGCCGCCGATCG	
73	27_fwd	GGGCGGTCCC GTTCAACGGG	IG1431
74	27_rev	GGGCCCTAATACGACTCACTATAGGGCCGG ACGGGACCGCCCCAC	
75	29_fwd	GCTGAAACGGGGCACTCGCA	IG1667
76	29_rev	GGGCCCTAATACGACTCACTATAGGGCAAA GCAGGTAAGCGGCTTA	
77	30_fwd	CTTGGTCTCGCGGGCCGTTG	IG1716
78	30_rev	GGGCCCTAATACGACTCACTATAGGGACCG GTAGTACAAAGGACT	

– MATERIAL UND METHODEN –

Nummer	Name	Sequenz (5' → 3')	Beschreibung
79	31_fwd	CACATGTGCGCGTCGGCATG	IG1877
80	31_rev	GGGCCCTAATACGACTCACTATAGGGAGGG ACCGGGGCCAAAC	
81	32_fwd	CACAGCTCCAAGCGACGCCG	IG1992
82	32_rev	GGGCCCTAATACGACTCACTATAGGGCACCT CTGTTGGGGCAGGGA	
83	33_fwd	GAACATCGGTTCGAAACGTCC	IG2071
84	33_rev	GGGCCCTAATACGACTCACTATAGGGACAA ATACCCCGGCACAAC	
85	35_fwd	CCGCTTCGCGGCGCGTCCAT	IG2235
86	35_rev	GGGCCCTAATACGACTCACTATAGGGCGGC GGCGCCGCCCTGCG	
87	36_fwd	GTGACCCGAGCGCCACGGTC	IG2282
88	36_rev	GGGCCCTAATACGACTCACTATAGGGCATA CCGATCCGTGACG	
89	37_fwd	CCCCACAGGAGAGGCCCCGG	IG2369
90	37_rev	GGGCCCTAATACGACTCACTATAGGGCCCGT GCCGCGCGACGG	
91	tmRNA_fwd	CCCGACCCGGAUCCUGGCAU	tmRNA, +Kontrolle Dot/Northern
92	tmRNA_rev	GGGCCCTAATACGACTCACTATAGGGAAGG TTTAGTCCCCTAGCTG	
93	RNaseP_fwd	AGUGCCCAGGGCGACCUGGG	RNase P, +Kontrolle Dot/Northern
94	RNaseP_rev	GGGCCCTAATACGACTCACTATAGGGGGGT GGGGTTTACCTAGCTG	
95	SRP_fwd	UGAACUCCCCCAGGGCCGGA	4.5S RNA of SRP, +Kontrolle Dor/Northern
96	SRP_rev	GGGCCCTAATACGACTCACTATAGGGCCGA CCTACCCTTGCTGCCT	
125	sd2_rev	GGGCCCTAATACGACTCACTATAGGGGAAG GAGGCTAGTTAGTTAT	
126	sc1_5RACE_fwd	GGGCCTAAAACATACCAGAT	Primer für 5'RACE mit sc1; bindet am Anfang vom tc-Aptamer Tmin2 siehe pSP64-Tmin2. rev. Primer: Nr. 127 & 28
127	sc1_5RACE_rev	CCGTGGGGTGTGCGGTCCCG	s. o., bindet im Bereich in dem auch die Sonde für den Northern bindet
128	sc1_3RACE_rev	GAGCCTAGGTGGTCGTATTC	für 3'RACE, bindet am Ende des tc-Aptamers. Siehe 126. fwd Primer 26 & 27
129	Linker_5RACE_f wd	GATATGCGCGAATTCCTGTA	s.o. für 5'RACE mit dem von Purimex bestellten Oligo

– MATERIAL UND METHODEN –

Nummer	Name	Sequenz (5' → 3')	Beschreibung
130	Linker_3RACE_rev	TTTCTTCTAGTGTTCGTTCT	s.o. für 3'RACE mit dem von Purimex bestellten Oligo
131	sc1_aac_fwd	GAAGTACCGTGTTCATCACGCAAGGTGATCGTCAGGCTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	Redirect Deletion sc1; PCR der Apramycin Kasette auf pIJ733 mit je 39 nt homolog zu sc1 konservierter Region
132	sc1_aac_rev	TCCACAGCGCCCTCCGCCTGCGAAGCGGCCGGCGAGACCATCCGGGGATCCGTCGAC	s.o.
133	sc1_5_rev4	CGAAGGATGAGGAGCCGGAGCA	alternativer rev primer 5'RACE sc1
134	sc1_5_rev3	TGCGGTCCCGTCCGGCCGAA	alternativer rev primer 5'RACE sc1
135	sc1_5_rev2	CCCGGAGCAACATCGGCCGT	alternativer rev primer 5'RACE sc1
136	5_Linker_long	GATATGCGCGAATTCCTGTAGAACGAACAC TAG	längerer fwd Primer 5'RACE Linker
137	32_5RACE_rev1	GGGCAGGGACGGCGTCGCTT	rev Primer 5'RACE sc32
138	32_5RACE_rev2	GATCAACGACGCACCTCTGTT	rev Primer 5'RACE sc32
139	sc32_del_fwd	TGAATAACCGGGCAGAACGGCGGGTCCCC AACCTGTCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	Deletion sc32 Redirect – falsch bestellt zu nah dran statt dessen sc32_del_fwd1
140	sc1_del_rev	TCCACAGCGCCCTCCGCCTGCGAAGCGGCCGGCGAGACCATCCGGGGATCCGTCGACC	del sc1 redirect
141	sc1_del_fwd	GTACCAACAACAAACAACGTCCACCGCATG GACACGGTTTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	del sc1 redirect
142	sc32_del_rev	ACACTGCCCCGGACACCGACCCGGGCCCCG GGCCCCGGCAATTCCGGGGATCCGTCGACC	del sc32 redirect
143	sc32_del_fwd1	TGAATAACCGGGCAGAACGGCGGGTCCCC AACCTGTCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	del sc32 redirect – richtig
144	sc1-seq-fwd	TGGCCCCGAGGTTGAGCCAACGGGGTT	
145	sc1-seq-rev	TTCATGGAGGGCACGGGGCCGAGCGTA	
146	sc32-seq-fwd	CTCGGCGGGCATCGCCGCTACCGCGAA	
147	sc32-seq-rev	CACCTTCGCAGTGCCCGCACAGCCGAT	
148	sc32d-long-fwd	CGGGCATTCCGCAGCAGCGCAGCGAGGCCT GAACAACCTGAATAACCGGGCAGAACGGCG GGTCCCCAACCTGTCGTGTAGGCTGGAGC TGCTTC	del sc32 redirect längerer homologer bereich (77nt)
149	sc32d-long-rev	ACACAGGACAGGACACGGACCCCGCACACT GCCCCCCACACTGCCCGGACACCGACCCG GGCCCCGGCCCCGGCAATTCCGGGGATCCG TCGACC	del sc32 redirect längerer homologer bereich (75nt)
150	sc32-ux-fwd	AGGAGGCAATTGACATTGTGAGCGGATAAC AAGATACTGAGCACGCCCCAACCTGTCCG GCGC	fwd Primer für Klonierung des Überexpressionsvektors pSK-17 + sc32; MfeI Schnittstelle plus ca. Hälfte des PLacO Promoters. Die Transkription startet beim G

– MATERIAL UND METHODEN –

Nummer	Name	Sequenz (5' → 3')	Beschreibung
			vor den 5 Cs.
160	T32-fwd	CTTCTTGAATTCTAATACGACTCACTATAGG GCCCCAACCTGTCGCGGCGCCC	fwd Primer klonierung pSP64-sc32 zur Transkription sc32
161	T32-rev	CTTCTTAAGCTTAAAAAATCGCGCTGGAC CCGGCGGA	rev Primer s.o.
162	5S_fwd	TTTCGGTGGTCATAGCGTA	Riboprobe Primer SCO 5S RNA, als Kontrolle statt SRP
163	5S_rev	GGGCCCTAATACGACTCACTATAGGGCTTAG CTTCCGGGTTCGAAA	s.o.
164	5S_all	CTTCCGGGTTCGAAATGTAACCGGGCGTTT	Oligoprobe, wird Phosphoryliert und direkt verwendet
165	32-A	GTCGCTTGAGCTGTGGTT	Oligo für 5'RACE mit 54° Tm sc32
166	32-B	GGACGGCGTCGCTTGGA	s.o.
167	1-A	GCAGTCAGGGCAGAGAGCA	s.o. sc1
168	1-B	GGTCGGCCGAAGGATGA	s.o. sc1
169	apra-seq-rev	TCGATTGGCTGAGCTCATGAAGTT	Deletion kleiner RNA mit Apra-Kassette. Zum Sequenzieren aus der Kassette nach vorne raus
170	apra-seq-fwd	GCGGGAACCTCGAAGTTCCTATA	Deletion kleiner RNA mit Apra-Kassette. Zum Sequenzieren aus der Kassette nach hinten raus
171	as_sc32_#2	CGTCGCTTGAGCTGT	rev; für 5'RACE und Northern mit Oligoprobes sc32
172	as_sc32_#1	AACGACGCACCTCTGTT	s.o.
173	5S_short	CGAAATGTAACCGGGCGTTT	Oligoprobe 5S RNA
174	as_sc1	GGCCGAAGGATGAGGA	rev; für 5'RACE und Northern mit Oligoprobes sc1
175	1-C	CATCGGCCGTGGGGTGT	rev; T7-Promoter; Riboprobe Template für 5S RNA
176	5S_rev	GGGCCCTAATACGACTCACTATAGGGCTTAG CTTCCGGGTTCGAAA	s.o.
177	5S_all	CTTCCGGGTTCGAAATGTAACCGGGCGTTT	Oligoprobe 5S RNA
178	random hexamer	NNNNNN	zur Herstellung eines cDNA Pools
179	2789-1	CTCCAGGCGCTGGAGA	rev; 5'RACE Oligo SCO2789
180	2789-2	TCACGCTTGCCGATGT	rev; 5'RACE Oligo SCO2789
181	5237-1	CGCTCCCGTGACGAGT	rev; 5'RACE Oligo SCO5237
182	5237-2	GTCCTGCCCGCAAGCA	rev; 5'RACE Oligo SCO5237
183	5238-1	CCGGACCGTTCACTCTT	rev; 5'RACE Oligo SCO5238

– MATERIAL UND METHODEN –

Nummer	Name	Sequenz (5' → 3')	Beschreibung
184	5238-2	ACCCGTGCTCCCAGAA	rev; 5'RACE Oligo SCO5238
185	5239-1	GTGCTGGCGTACGAGTT	rev; 5'RACE Oligo SCO5239
186	5239-2	ACCAGCAGATGGAGCCA	rev; 5'RACE Oligo SCO5239
187	5240-1	GTCTTCCTCGCGGCAA	rev; 5'RACE Oligo SCO5240
188	5240-2	GTTGCCGATGGGGAAGAA	rev; 5'RACE Oligo SCO5240
189	A4-Linker	GACGAGCACGAGGACACUGACAUGGAGGA GGGAGUAGAAA	RNA Oligo! Adapter für 5'RACE
190	Linker-fwd	GACGAGCACGAGGACACTGA	Bindet auf A4-Linker fwd für 5'RACE
191	A4-rev	TTTCTACTCCCTCCTCCATGTCA	Bindet auf A4-Linker rev für 3'RACE
192	T7-sc1	GGGCCCTAATACGACTCACTATAGGGCTTCC GCCCTCCCCGCACA	T7-Promoter + Anfang von sc1 für Transkription
193	4091-1	CGGCAAGCTCACGCTGAT	fwd, für 3'RACE <i>bldC</i>
194	1fwd	CTTCCGCCCTCCCCGCACAGGAGGA	fwd Primer sc1; für qPCR
195	1fwd-2	CGAGGAACCGGTGCTCTCTGCCCTGA	s.o.
196	1rev	AGGGACCCTCAGCCCTCTCGGCACC	s.o. rev
197	1rev-2	CCCGGAAGCACCCGCGGG	s.o. rev
198	kin1-fwd	AGCTCCTCTCCGACCTCTCCTTCGCCG	fwd Primer SCO5239 qPCR
199	kin1-rev	CGTCTTGGTACGAGGTGGGTCCGGTGT	rev Primer SCO5239 qPCR
200	kin2-fwd	ATGCTGGACGCCGCCCTGGACG	s.o.
201	kin2-rev	CGTGAGCAGGTTGGTGTTCGGGC	s.o.
202	pSP64sc1-fwd	GAACAAGAATTCCAAGTAATACGACTCACT ATAGGGCTTCCGCCCTCCCCGCACA	Klonierung sc1 in pSP64 zur Transkription, EcoRI Schnittstelle und enhanced T7 Promoter
203	pSP64sc1-rev	TTCTTGAAGCTTCTCGAGGTCGGAGTCGTC GA	s.o. rev Primer; HindIII
204	eco-gln2-fwd	GAGCACATGCATAGTAGACGCGGCACCCCT GCCGCC	Klonierung gln2 in pXG10 für GFP Messung mit sc1
205	eco-gln2-rev	TCCTTTGCTAGCGATCCAGATGTACTCGGCC TTG	s.o.
206	eco-sc1-150-rev	ACGTGCTCTAGAAGGGACCCTCAGCCCTCT CGGCA	Klonierung sc1 150 nt lang in pSK17 für Messung mit gln2 im GFP System
207	eco-sc1-182-rev	GATGCCTCTAGACCCGGAAGCACCCGCGGG CCGC	s.o. - 182 nt langes sc1
208	eco-sc1-fwd	ACGTGCCAATTGACATTGTGAGCGGATAAC AAGATACTGAGCACCTTCCGCCCTCCCCGC ACAG	fwd Primer für s.o.

– MATERIAL UND METHODEN –

Nummer	Name	Sequenz (5' → 3')	Beschreibung
209	pL-seq	CGACGGCCAGTGCCAAGCTT	Sequenzierungsprimer für pLuci - pAR933 Derivat von Hannes LuciSystem
210	sco-gln2-fwd	TTGGTAGGATCCAGCGAGTAGACGCGGCAC CCCTGCCGCC	Klonierungsprimer für gln2-UTR in pLuci
211	sco-gln2-rev	GCCGAACCTTAAGCCAGATGTACTCGGCCTT GAA	s.o.
212	pSP64-gln2-fwd	GATTACGAATTCCCAAGTAATACGACTCACT ATAGGGAGTAGACGCGGCACCCCTGCC	Klonierung des gln2 UTR in pSP64 zur Transkription und Gelshift
213	pSP64-gln2-rev	GAATACAAGCTTGATCCAGATGTACTCGGC CTT	s.o.
214	pSP64-sc1-180- rev	GAATACAAGCTTCCCGGAAGCACCCGCGGG CCGCG	rev Primer für Klonierung in pSP64 kürzeres Stück sc1 (180nt) vgl. 218/9
215	sc32_dis_fwd	CTGAATAACCGGGCAGAACGGCGGGTCCCC CAACCTGTGCGGCGCCCGGTGTAGGCTGG AGCTGCTTC	Disruption sc32 mit redirect System an pos. 50
216	sc32_dis_rev	ACGACGCACCTCTGTTGGGGCAGGGACGG CGTCGCTTGGAGCTGTGGTTATTCCGGGGAT CCGTCGACC	rev
217	sc1_dis_fwd	TTCCGCCCTCCCCGCACAGGAGGACGGACC GAGGAACCGGTGCTCTCTGCTGTAGGCTGG AGCTGCTTC	Disruption sc1 mit redirect System an pos. -52
218	sc1_dis_rev	GGGTGTGCGGTCCCGGTCCGCCGAAGGATG AGGAGCCGGAGCAGTCAGGATTCCGGGGA TCCGTCGACC	rev
219	mv1_fwd	GAATTGGGTACCAGCTCGCTGCAGTCGAAG GGCGAGGAGCTGTTC	Umbau pFT73 (GFP++ ohne Promoter auf pUWL-KS) -> GFP ohne AUG mit ACC65I und PstI Schnittstelle zur Fusion mit Strepto Promotoren
220	mv1_rev	CAGGATGTTACCGTCTCCTTGAAG	rev
221	kinIGR_fwd	GAATTGGGTACCGCCAACGGGGTTAGGCTT CTGGCGG	fwd, Klonierung SCO5239 kompletter IGR (-428 bis +3 incl. sc1) als GFP-Fusion in pMV1 für Promotersuche Kinase
222	kinMED_fwd	GAATTGGGTACCACCGCACACCCACGGCC GATGTTG	s.o. -181 bis +3
223	kinUTR_fwd	GAATTGGGTACCGGTCTCGCCGGCCGCTTC GCA	s.o. -88 bis +3
224	kinUTR_rev	CTTCGACTGCAGCACGGGGCCGAGCGTACC TGG	s.o. rev
225	150_rev	GAATACAAGCTTCTGAGAGGGACCCTCAGC CCTCT	Klonierung pSP64-sc1-150
226	6C-1	GACCGGGTTAGCACGGT	northern sonde 6C-motiv SCO3557
227	6C-2	GGGTCGTCTCCACGGC	s.o.

– MATERIAL UND METHODEN –

Nummer	Name	Sequenz (5' → 3')	Beschreibung
228	puwl1_fwd	GGCGAGTAATCCCAGGAT	Komplette Sequenzierung pMV1
229	puwl2_rev	GTAATACGGTTATCCACAGAA	s.o.
230	puwl3_fwd	CCGATCCGTCCGAGGAGTT	s.o.
231	puwl4_rev	GGTCTGACGCTCAGTGGAA	s.o.
232	puwl5_rev	CTCGCTGCGCTCGGTCGTT	s.o.
233	puwl6_fwd	CGCTTGATCCACTCGACCA	s.o.
234	puwl7_rev	GCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAA	s.o.
235	puwl8_fwd	AAGTCGGCCCAGTCGCAA	s.o.
236	puwl9_rev	TCGCTATTACGCCAGAGCTT	s.o.
237	sc1_T7_G	GAACAAGAATTCTAATACGACTCACTATAGC TTCCGCCCTCCCCGCACA	Neu-Klonierung pSP64-sc1 mit nur einem G an 5' und EcoRV statt HindIII an 3'. Damit Linearisierung als Blunt-End möglich.
238	150_Eco	CTTCTTAAGCTTGATATCTGAGAGGGACCCCT CAGCCCT	s.o.
239	180_Eco	GAATACAAGCTTGATATCCCGGAAGCACCC GCGGGC	s.o.
240	32_T7_G	GATTACGAATTCTAATACGACTCACTATAGC TGAATAACCGGCAGAAC	s.o. sc32
241	32_Eco	GAATACAAGCTTGATATCAAAAAAATCGCG CTGGAC	s.o. sc32
242	puwl10_rev	GACTCGGTCTGGCTCATCAT	Komplette Sequenzierung pMV1
243	puwl11_fwd	CGGACCAGCCACCGCCGTT	s.o.
244	puwl12_fwd	AAATTATTATTCGCAATTCCTTTAG	s.o.
245	pApra_fwd	AACTTCCATATGGGAATAGGAACCTCATGAG C	Austausch tsr gegen apra in pUWL-SK
246	pApra_rev	GCCCGGTTATAACTGACGCCGTTGGATACA C	Austausch tsr gegen apra in pUWL-SK
247	antisc1-a	GTGAGCTACAATCAATACTCCCCGGAAGCA CCCCGCGGCC	overlapPCR Klonierung Antisense sc1-182 für <i>knockdown</i>
248	antisc1-b	GGCCCGCGGGTGCTTCCGGGGAGTATTGAT TGTAGCTCAC	s.o.
249	antisc1-c	CCCGGGGATCCGACCTACGCCTTGACCT	s.o.
250	antisc1-d	GGCCGCTCTAGACTTCCGCCCTCCCCGCAC A	s.o.
251	bldC_1	ACGCGGAACATGGTGGCG	Northern Sonde bldC coding region
252	bldC_2	CCGCGAGCAGAGCGCGGA	s.o.

– MATERIAL UND METHODEN –

Nummer	Name	Sequenz (5' → 3')	Beschreibung
253	169	TGTTGAAGGTGTTTCCTGCGCACG	Northern Sonde SCO0169; Hit aus 454 Antisense SCO0169
254	3287	ACGGACTGTGCGTCGTCTTC	s.o.
255	3471	AACCTTCAGGGGCAGATGGC	s.o.
256	4440	TGGCCGGAGCACAGCTGG	s.o.
257	4566	CGGCATCCGACCCTTCCAAC	s.o.
258	4672	GCGCACCTGCCCGACAC	s.o.
259	4675	ATCCGGACGAGGCCCGCG	s.o.
260	4685	ACGCGCTCAGGCCGTACG	s.o.
261	4697	TCGTCGGCATCATCGCGA	s.o.
262	4699	ATGGTCGTTTGAATACGACA	s.o.
263	4969	GTGGCGCAGGAGGAGCTG	s.o.
264	7117	GCTGAAGGTCCTGGGCCG	s.o.
265	pMV_sc1_fwd	TTTATCGGATCCCCCGGAAGCACCCGCGGG	Klonierung sc1 extra in pMV1_kinUTR
266	pMV_sc1_rev	GGCCGCTCTAGAGCCAACGGGGTTAGGCTTC	s.o.
267	sc1_UTR100	GAATTGGGTACCCAACAACAACAACGTCCA	Klonierung sc1 Promoter als gfp fusion -100 bis +20
268	sc1_UTR50	GAATTGGGTACCAATGGTTGCTGAGGAACTGA	Klonierung sc1 Promoter als gfp fusion -50 bis +20
269	sc1_UTR_rev	CTTCGACTGCAGCATTATTAACCTCCTTCTGTGCGGGGAGGGCGGAA	rev s.o.
270	sc32_UTR100	GAATTGGGTACCACGTCGATCCGCACGCTCG	Klonierung sc32 Promoter als gfp fusion -100 bis +20
271	sc32_UTR50	GAATTGGGTACCCCGCGCTCTGCTCGCGGGC	Klonierung sc32 Promoter als gfp fusion -50 bis +20
272	sc32_UTR_rev	CTTCGACTGCAGCATTATTAACCTCCTTCGTCTGCCCCGTTATTC	rev s.o.
273	1-100-fwd	GTCGACTCTAGACAACAACAACAACGTCCAAC	siehe Nr. 283 ff nur mit Luziferase als Reporter
274	1-50-fwd	GTCGACTCTAGAAATGGTTGCTGAGGAACTGA	siehe Nr. 283 ff nur mit Luziferase als Reporter
275	1-Luzi-rev	CTCGCTGGATCCCTGTGCGGGGAGGGCGGAAG	siehe Nr. 283 ff nur mit Luziferase als Reporter
276	32-100-fwd	GTCGACTCTAGAACGTCGATCCGCACGCTCGG	siehe Nr. 283 ff nur mit Luziferase als Reporter

– MATERIAL UND METHODEN –

Nummer	Name	Sequenz (5' → 3')	Beschreibung
277	32-50-fwd	GTCGACTCTAGACCGCGCTCTGCTCGCGGG CA	siehe Nr. 283 ff nur mit Luziferase als Reporter
278	32-Luzi-rev	CTCGCTGGATCCCCTTCTGCCCGTTATTCA G	siehe Nr. 283 ff nur mit Luziferase als Reporter
279	pL-IGR-fwd	GTCGACTCTAGAGCCAACGGGGTTAGGCTT CT	Klonierung Kinase intergene Region als Lux Fusion
280	pL-UTR-fwd	GTCGACTCTAGAGGTCTCGCCGGCCGCTTC GC	Klonierung Kinase bis -88 als Lux Fusion
281	pL-kin-rev	GCCGAACCTTAAGCACGGGGCCGAGCGTACC TGGCG	rev zu 295 und 296
282	pL-sc1-fwd	TGGCCAGCTAGCGCCAACGGGGTTAGGCTT CT	Klonierung sc1-182 mit 5'UTR in Lux Plasmide
283	pL-sc1-rev	ACTCTAGCTAGCCCCGGAAGCACCCGCGGG CC	rev zu 298
284	pL-Nhe-seq	CAACACGTGGAGCGGATCGGGGATT	Sequenzierprimer für 297 298
285	pL-as-fwd	TGGCCAGCTAGCGACCTACGCCTTGACCTT GA	Klonierung asc1 mit SF14 Promoter in Lux Plasmide
286	pL-as-rev	ACTCTAGCTAGCCTTCCGCCCTCCCCGCAC AG	rev s.o.
287	DagA_1	CCCAGCGGTAGTAGATGTTG	Northern Sonde Agarase DagA
288	DagA_2	CTGCCGTTGAAGTAGAAATC	Northern Sonde Agarase DagA
289	DagA_3	GAGATTCCGTCAGCCACCC	Northern Sonde Agarase DagA
290	DagA_4	CGTTCTCCTTCTTCGATTCC	Northern Sonde Agarase DagA
291	DagA_5	GAGCTAGGCTCCAGGAGGTA	Northern Sonde Agarase DagA
292	5' shape oligo	GGGCGGAAGCCCTACTGGCC	Splint Oligo Ligation 5' Cy5 an sc1 bei SHAPE
293	sc1-Linker-hdv	CTGGGACCATGGCCGGCGAAGAGAAAGAG GATATTGATATGGAGGATTTAGTAGAAAGCG CCTGAGAGGGACCCTCA	rev, hängt linker fuer 3'SHAPE an, Stamm für hdv Ribozym
294	sc1-hdv	CTGGGACCATGGCCGGCGCGCCTGAGAGG GACCCTCA	rev, sc1 159 nt mit hdv ribozyme
295	hdv-seq	CACTTTATGCTTCCGGCTCG	fwd, Sequenzierprimer für pHDV ca. 50 nt vor EcoRI Schnittstelle
296	shape-rt	GAAGAGAAAGAGGATATTGATATG	rev Primer mit 5' Cy5 Markierung für SHAPE
297	dagA_fwd	GTCGACTCTAGAAGGTCGCCGCTGGATCAC AGTCGGG	Klonierung <i>dagA</i> mit 6xHisTag in pARderivat pLuzi
298	dagA_over_1	CCGTTCCGTGAGGTGCTGACCTAGTGGTGA TGGTGGTGATGCACGGCCTGATACGTCCTG A	s.o.

– MATERIAL UND METHODEN –

Nummer	Name	Sequenz (5' → 3')	Beschreibung
299	dagA_over_2	TCAGGACGTATCAGGCCGTGCATCACCACC ATCACCAGTGGTCAGCACCTCACGGAACG G	s.o.
300	dagA_rev	AATTGTACTAGTGCCCCTCGGTCCGGATCTTT CTGTC	s.o.
301	dagP1_fwd	GATTACGAATTCTAATACGACTCACTATAGG GCAGCCAGGCCGGAATCGAAG	Klonierung <i>dagA</i> ab Promoter 1 bis +50 für Gelshift in pHDV-Linker
302	dagP2_fwd	GATTACGAATTCTAATACGACTCACTATAGG GTGGCGCCAGGGTCTGCGGA	Klonierung <i>dagA</i> ab Promoter 2 bis +50 für Gelshift in pHDV
303	dagP3_fwd	GATTACGAATTCTAATACGACTCACTATAGG GCGTGGGCGTTCCGGAACTTT	Klonierung <i>dagA</i> ab Promoter 3 bis +50 für Gelshift in pHDV
304	dagP4_fwd	GATTACGAATTCTAATACGACTCACTATAGG GAACCGGTTACCTCATTGAA	Klonierung <i>dagA</i> ab Promoter 4 bis +50 für Gelshift in pHDV
305	dagP1-4_rev	TCGGGACCATGGCCGGCGCTCCGAGTGCGA CGGCACT	rev Primer für dagP1 bis dagP4 bindet +50 in <i>dagA</i> hängt NcoI SS an Klonierung in pHDV
306	dagProm_rev	GAATACAAGCTTGCTCCGAGTGCACGGCA CT	rev Primer für dagP1 bis dagP4 in pSP64 ohne Ribozym
307	dL1_over_fwd	CTATAGGGCTTCCGCCCTCCTTCGGGAGGA CGGACCGAGGAACC	Mutation sc1 Loop1 in UUCG pHDV
308	dL1_over_rev	GGTTCCTCGGTCCGTCCTCCCGAAGGAGGG CGGAAGCCCTATAG	Mutation sc1 Loop1 in UUCG pHDV
309	dL3_over_fwd	TCATCCTTCGGCCGACCGGGTTCGCCCCAC GGCCGATGTTGCTC	Mutation sc1 Loop3 in UUCG pHDV/pUWL
310	dL3_over_rev	GAGCAACATCGGCCGTGGGGCGAACCCGG TCGGCCGAAGGATGA	Mutation sc1 Loop3 in UUCG pHDV/pUWL
311	mSD_over_fwd	CGGACCGAGGAACCGGTGCTAAATGCCCTG ACTGCTCCGGCTC	Mutation sc1 antiSD in AAA pHDV/pUWL
312	mSD_over_rev	GAGCCGGAGCAGTCAGGGCATTAGCACCG GTTTCCTCGGTCCG	Mutation sc1 antiSD in AAA pHDV/pUWL
313	pdL1_over_fwd	CAATACTCCTTCCGCCCTCCTTCGGGAGGA CGGACCGAGGAACC	Mutation sc1 Loop1 in UUCG Klonierung in pUWL
314	pdL1_over_rev	GGTTCCTCGGTCCGTCCTCCCGAAGGAGGG CGGAAGGAGTATTG	Mutation sc1 Loop1 in UUCG Klonierung in pUWL
315	GA_over_fwd	ACCGGTGCTCTCTGCCCTGAGAGCTCCGGC TCCTCATCCTC	Mutation sc1 antianti SD CU -> GA Klonierung in pUWL und pHDV
316	GA_over_rev	GAAGGATGAGGAGCCGGAGCTCTCAGGGC AGAGAGCACCGGT	Mutation sc1 antianti SD CU -> GA Klonierung in pUWL und pHDV

5.3. Bakterienstämme

Stamm	Beschreibung	Referenz
<i>E. coli</i>		
DH5 α / pIJ773	4334bp, pBluescript KS (+), aac(3)IV, oriT (RK2), Carbenicillin (100 μ g/ml) und Apramycin (50 μ g/ml) 37°C.	Chater 2002
DH5 α / pIJ778	4377bp, pBluescript KS (+), aadA, oriT (RK2), Carbenicillin (100 μ g/ml), Streptomycin (50 μ g/ml) und Spectinomycin (50 μ g/ml) 37°C.	Chater 2002
DH5 α / pIJ10701	Entspr. 10700 ohne FRT-sites & Attachment site, Hygromycin ^R	Chater 2002
DH5 α / pIJ10700	Vorlage Plasmid für Redirect System Hygromycin ^R	Chater 2002
DH5 α / pJ780	Vorlage Plasmid für Redirect System Viomycin ^R , Amp ^R , pBluescript KS (+), vph, oriT (RK2), FRT sites, sollte auf DNA, 2xYT oder DNB gezogen werden mit Carbenicillin (100 μ g/ml) und Viomycin (30 μ g/ml) 37°C.	Chater 2002
BW25113 / pIJ790	Plasmid: pIJ790 [oriR101], [repA101(ts)], araBp-gam-be-exo Chromosom: (Δ (araD-araB)567, Δ lacZ4787(::rrnB-4), lacIp-4000(lacIQ), λ -, Chloramphenicol (25 μ g/ml) 30°C.	Chater 2002
ET12567	F-, dam13::Tn9, dcm6, hsdM, hsdR, recF143, zjj201::Tn10, galK2, galT22, ara-14, lacY1, xyl-5, leuB6, thi-1, tonA31, rpsL136, sG4, tsx-78, mtl-1, glnV44; Cm ^R , Tc ^R	Chater 2002
ET12567 / pUZ8002	Helferplasmid für Konjugation Streptomyces mit <i>E. coli</i> , Km ^R	Chater 2002
DH5 α / StD25	Cosmid; 4455342 bis 4496963; 41621b; SCO4065 bis SCO4097, Km ^R	Chater 2002
DH5 α / StC123	Cosmid; 2760885 bis 2802160 41275b; SCO2560 bis SCO2590, Km ^R	Chater 2002
DH5 α / StD17	Cosmid; 4469119 bis 4508921 39802b; SCO4075 bis SCO4109, Km ^R	Chater 2002
BW25113 / pIJ790 / StD17	siehe dort	Vockenhuber 2007
BW25113 / StD17	sc32::aac3(IV)	Vockenhuber 2008
DH5 α / StD17Asc32	StD17 sc32::aac3(IV)	Vockenhuber 2007
DH5 α / StF6	Cosmid StF6 532868 to 565500; 32632 bp; Supercos Derivat; SCO499 – SCO533, Km ^R	Chater 2002
DH5 α / StF11	Cosmid StF11 554373 to 594476; 40103 bp; Supercos Derivat; SCO521 – SCO544, Km ^R	Chater 2002
<i>S. coelicolor</i>		
M145	SCP1-, SCP2-, prototroph	Bentley 2000
BAP1 / pFT73	Plasmid : Amp ^R , Ts ^R , pUWL-KS Derivat, gfp++	Nothhaft 2003
M145 / pFT74	pFT73 mit glkA Promoter vor dem gfp++	Schmidt 2006
M145 / pUWL-KS	Amp ^R , Ts ^R , Shuttlevektor <i>E. coli</i>	Nothhaft 2003
M145 / pFT241	Amp ^R , Ts ^R , dasR+	Nothhaft 2003
BAP29	dasR::acc3(IV)	Nothhaft 2003

Stamm	Beschreibung	Referenz
M145 / pUWLsc1	pUWL-KS, sc1 Überexpression, SF14 Promoter	DA Johannes Förtsch
M145 / pUWL-asc1	pUWL-KS, sc1 knockdown	diese Arbeit
M145 / pUWL-nsRNA	pUWL-KS, Überexpression nonsense RNA	diese Arbeit
M145 / pUWL-sc1dL1	Überexpression sc1, Loop 1 gegen UUCG ausgetauscht (M3)	diese Arbeit
M145 / pUWL-sc1dL3	Überexpression sc1, Loop 3 gegen UUCG ausgetauscht (M4)	diese Arbeit
M145 / pUWL-sc1mSD	Überexpression sc1, putative anti-SD gegen AAA ausgetauscht (M1)	diese Arbeit
M145 / pUWL-sc1GA	Überexpression sc1, putative anti-anti-SD gegen GA ausgetauscht (M2)	diese Arbeit

5.4. Puffer und Lösungen

5.4.1. Antibiotika

Antibiotikum	Abkürzung	Stammlösung
für <i>E. coli</i>		
Ampicillin	Amp	100 mg/ml in 70% Ethanol
Chloramphenicol	Cm	25 mg/ml in 70% Ethanol
Kanamycin	Km	50 mg/ml in H ₂ O
Carbenicillin	Cr	100 mg/ml in 70% Ethanol
Nalidixinsäure	Nal	25 mg/ml in 0.4 M NaOH
für <i>S. coelicolor</i>		
Thiostrepton	Ts	25 mg/ml in DMF
Apramycin	Apr	50 mg/ml in H ₂ O
Cycloheximid	Chx	80 mg/ml in Ethanol

5.4.2. Medien

E. coli Medien

Luria Broth (LB)

Trypton	1%
Hefextrakt	0.5%
NaCl	1%
[Agar]	[2%]

Teriffic Broth (TB)

Trypton	1.2%
Hefextrakt	2.4%
Glycerin	0.4%
@ 90%	autoklavieren
0.1 M KH ₂ PO ₄ pH7.5	10%

Streptomyceten Medien

Actinorhodin Produktionsmedium

Glycerin	1.5%
Sojamehl	1%
NaCl	0.3%
pH 7.0 mit HCl	

CRM-Medium

Glucose, wasserfrei	1%
Sucrose	10.3%
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	1%
TSB	1.5%
Hefeextrakt	0.5%

Difco Nutrient Agar (DNA)

Fleischextrakt	0.3%
Pepton	0.5%
Agar	1.5%

Evans Medium

Basismedium (pro 100 ml)

0.1 M CaCl ₂	250 µl
1 M MOPS	10 ml
1 M KCl	1 ml
1 M Na ₂ SO ₄	200 µl
1 M C ₆ H ₆ O ₇	250 µl
1 M MgCl ₂	125 µl
10 mM NaMoO ₄	10 µl
Spurenelemente	500 µl
pH 7.2 (NaOH)	@ 90 ml

Nach Autoklavieren können ein definiertes Vollmedium (Balanced) oder drei Mangelmedien daraus hergestellt werden.

Balanced (pro 100 ml)

50% Glucose	5 ml
2 M NaNO ₃	5 ml
2 M NaH ₂ PO ₄	100 µl

C-limitiert (pro 100 ml)

50% Glucose	500 µl
2 M NaNO ₃	5 ml
2 M NaH ₂ PO ₄	100 µl
H ₂ O	4.5 ml

N-limitiert (pro 100 ml)

50% Glucose	5 ml
2 M NaNO ₃	500 µl
2 M NaH ₂ PO ₄	100 µl
H ₂ O	4.5 ml

P-limitiert (pro 100 ml)

50% Glucose	5 ml
2 M NaNO ₃	5 ml
2 M NaH ₂ PO ₄	20 µl

Spurenelemente Lösung für Evans Medium

ZnCl ₂	40 mg
FeCl ₃ x 6 H ₂ O	200 mg
CuCl ₂ x 2 H ₂ O	10 mg
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	10 mg
Na ₂ B ₄ O ₇ x 10 H ₂ O	10 mg
(NH ₄) ₆ MoO ₂₄ x 4 H ₂ O	10 mg
sterilfiltrieren @ -20°C lagern	@ 100 ml

hydrolysierter Agar als C-Quelle

Agar	5%
pH 2 (HCl)	
12.5 min Autoklavieren	
pH 7 (NaOH)	

Die Agarsuspension wird mit stark verdünntem HCl auf pH 2.0 eingestellt und auf 80% des Endvolumens aufgefüllt. Der Autoklav wird vorgeheizt. Erst wenn das Wasser im Autoklaven kocht wird der saure Agar hineingestellt. Sobald die roten Druckventile des Autoklaven nach oben gehen wird die Zeitmessung gestartet. Es ist wichtig nicht zu lange zu

autoklavieren, sonst verbrennt der Agar. Das erkennt man daran, dass die Lösung schwarz wird. Normalerweise hat der Agar nachher eine goldbraune Farbe. Sobald die Lösung auf Raumtemperatur abgekühlt ist wird der pH mit NaOH auf 7.0 eingestellt (sehr wenig) und das Volumen mit sterilem Wasser aufgefüllt. Binnen zwei Wochen verwenden und im Kühlschrank lagern [116].

Jasenka Medium

Sucrose	10%
TSB	3%
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0.1%
Hefeextrakt (Oxoid)	0.5%

LMPC Medium

(NH ₄)SO ₄	0.2%
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0.06%
Casaminosäuren	0.2%
PEG 6000	5%
C-Quelle	1%
Spurenelemente	1 ml
0.1 M KH ₂ PO ₄	15%
pH 6.8 (NaOH)	

Bei Verwendung von hydrolysiertem Agar als C-Quelle wurde PEG 6000 weggelassen.

Spurenelementelösung für LMPC

FeSO ₄	10 mg
MnCl ₂	10 mg
ZnSO ₄	10 mg
CaCl ₂	10 mg
	@ 100 ml

MBSM Medium

(NH ₄)SO ₄	0.6%
K ₂ HPO ₄	0.6%
KH ₂ PO ₄	0.1%
MgCl ₂	0.05%
CaCl ₂	0.02%
NaCl	0.2%
FeCl ₂ x 6 H ₂ O	0.02%
Agar	2%

S-Medium

Pepton	0.4%
Hefeextrakt	0.4%
K ₂ HPO ₄	0.4%
KH ₂ PO ₄	0.2%
Glycin	1%
@ 99%	autoklavieren
Glucose	1%
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	2 mM

Soja Manitol Medium (SM)

Sojamehl	2%
Manitol	2%
Agar	2%

Tryptic Soy Broth (TSB)

TSB	3%
-----	----

YEME Medium

Hefeextrakt	0.3%
Bactopepton	0.5%
Malzextrakt	0.3%
Glucose	1%
Sucrose	34%
	autoklavieren
MgCl ₂	5 mM

2 x YT Medium

Bactotrypton	1.6%
Hefeextrakt	1%
NaCl	0.5%

5.4.3. DNA spezifische Puffer

50 x TAE

Tris	2 M
Essigsäure	1 M
EDTA	50 mM
pH 8.3	

DNA Ladepuffer

Bromphenolblau	0.1%
Xylencyanol	0.1%
Glycerin	50%
50 x TAE	2%

SET Puffer

NaCl	75 mM
EDTA pH 8.0	25 mM
Tris pH 7.5	20 mM

5.4.4. RNA spezifische Puffer

10 x TB[E]

Tris	0.89 M
Borsäure	0.89 M
[EDTA]	[10 mM]
pH ist 8.3	

Methylenblau Färbelösung

Natriumacetat	0.5 M
Essigsäure	5%
Methylenblau	0.04%

RNA Extraktionspuffer

Natriumacetat	10 mM
Sucrose	150 mM
pH 4.8 (Essigsäure)	

Crush-Soak Puffer

Natriumacetat	200 mM
Tris-Cl pH 7.5	100 mM
EDTA pH 8.0	1 mM

Polyacrylamid Mix (500 ml)

	6%	8%	10%	15%
40 % Acrylamid	75 ml	100 ml	125 ml	187.5 ml
10 x TBE	50 ml			
Harnstoff [8 M]	240 g			

nativer RNA Ladepuffer (5 x)

Glycerin	50%
Bromphenolblau	0.2%
TB[E]	0.5 x

RNA Ladepuffer (2 x)

EDTA pH 8	25 mM
in deionisiertem Formamid	

10 x Structure buffer

Tris-Cl pH 7	100 mM
KCl	1 M
MgCl ₂	100 mM

6% natives PAA Gel für Gelshift

40% Acrylamid (19:1)	10.5 ml
10x TB	3.5 ml
MQ	56 ml
	70 ml

Polymerisation mit 600 µl 10% APS und 60 µl TEMED

20 x SSC

Natriumcitrat	0.3 M
NaCl	3 M
pH 7 (HCl)	

5.5. Methoden

5.5.1. Streptomyceten spezifische Methoden

Isolation chromosomaler DNA (aussalzen)

30 ml TSB-Kultur 15 Minuten bei 6000 Upm und 4°C ernten. Das Pellet in 5 ml SET-Puffer resuspendieren. 100 µl LysozymbLösung (50 mg/ml in MQ) zugeben. 60 Minuten bei 37°C inkubieren. 140 µl Proteinase K Lösung (20 mg/ml in MQ) und 300 µl 20% SDS zugeben, durch vorsichtiges Invertieren mischen. Zwei Stunden bei 55°C inkubieren, gelegentlich invertieren. 2 ml 5 M NaCl zugeben, invertieren. Mischung auf ca. 37°C abkühlen lassen. 5 ml CHCl₃ zugeben. Für 30 Minuten bei RT auf der Wippe schwenken. 15 Minuten bei 4500 g zentrifugieren. Überstand in ein neues Gefäß geben und 0.6 Vol. Isopropanol zugeben, invertieren. Nach ca. 3 Minuten die ausfallende DNA mit einer gebogenen Pasteurpipette aufwickeln. Auf der Pipette in 3 ml 70% Ethanol waschen und trocken lassen. Die DNA dann in TE pH 7.0 lösen.

Herstellung elektrokompetenter Streptomyceten

100 ml CRM mit 10¹⁰ Sporen animpfen und 24 h bei 28°C schütteln. Die Kultur 15 Minuten bei 10.000 Upm und 4°C ernten. Die Zellen in 100 ml 10% Sucrose (4°C) waschen und pelletieren. In 50 ml 15% Glycerin (4°C) waschen und pelletieren. In 10 ml 15% Glycerin mit 100 µl/ml Lysozym resuspendieren. 1.5 Stunden bei 37°C inkubieren, alle 30 Minuten mit einer 25 ml Glaspipette vorsichtig durchmischen. Zweimal mit 10 ml 15% Glycerin (4°C) waschen und pelletieren. Das Pellet in 1–5 ml Lagerpuffer resuspendieren, 200 µl aliquotieren, in N₂ (l) schockfrieren und bei -80°C lagern.

Lagerpuffer für elektrokompetente Streptomyceten

PEG 1000	30%
Glycerin	10%
Sucrose	6.5%

Elektroporation von Streptomycceten

200 µl elektrokompente Zellen auf RT auftauen, dann auf Eis stellen. In einer kalten Elektroporationsküvette mit 500 ng unmethylierter Plasmid DNA mischen. Puls mit 2 kV, 400 Ω, 25 µF. Die Zeitkonstante ist 8 – 9 ms. Sofort 750 µl kaltes CRM zugeben. 3 Stunden bei 30°C und 1000 Upm inkubieren. Auf SM-Platten mit passendem Antibiotikum ausplattieren.

Konjugation in Streptomycceten¹

E. coli ET12567/pUZ8002 mit dem zu konjugierenden Plasmid transformieren und vereinzeln. Sechs mal 4 ml ÜNK LB mit Cm, Km und dem Antibiotikum für das Konjugationsplasmid animpfen. Davon drei mal 20 ml TB mit den drei Antibiotika 1:100 animpfen. Bei 37°C bis zu einer OD_{600} von 0.4 – 0.6 wachsen lassen (5 – 10 Stunden). 10 ml der Kultur 5 Minuten bei 6000 Upm 4°C ernten und zweimal in 10 ml TB ohne Antibiotika waschen. Pellet in 1 ml TB resuspendieren. Währenddessen 10^8 Sporen mit 500 µl 2x YT mischen und 10 Minuten bei 50°C inkubieren (Hitzeschock). Auf RT abkühlen lassen und mit 500 µl gewaschenen *E. coli* Zellen mischen. Auf SM ohne Antibiotika ausplattieren und über Nacht (ÜN) bei 28°C mit dem Medium nach unten inkubieren. Die Platte am nächsten Tag mit 1 ml MQ mit 500 µl Nalidixinsäure und 1 mg Antibiotikum überschwemmen und einen weiteren Tag bei 28°C mit dem Medium nach unten trocken lassen, dann umdrehen. Konjuganten auf SM mit Nalidixinsäure und dem Antibiotikum vereinzeln.

Messung der Agarase Produktion auf Platte

10^6 Sporen in 5 µl MQ auf MBSM Platte tropfen. Nach dem Eintrocknen 5 Tage bei 28°C inkubieren, dann die Platte mit 10 ml Lugol'scher Lösung überschichten und 1 Stunde bei 4°C einziehen lassen. Überschüssige Lösung abkippen. Agaraseaktivität zeigt sich durch einen hellen Hof um die Kolonie. Die Aktivität kann semiquantitativ verglichen werden. Dazu wird der Durchmesser der Kolonie und des Hofes je einmal horizontal und einmal vertikal gemessen. Der mittlere Durchmesser des Hofes geteilt durch den mittleren Durchmesser der Kolonie ist dann ein Maß für die Menge an produzierter Agarase.

¹ Hinweis: ET12567/pUZ8002 wächst ziemlich schlecht, vor allem, wenn nach der Transformation des Konjugationsplasmids drei Antibiotika verwendet werden. Dann kommt es häufig vor, dass eine Kultur gar nicht mehr wächst. Deshalb werden sechs ÜNK gestartet, von denen meist nur 3 anwachsen.

Messung der Actinorhodin Produktion

100 µl Kultur mit 900 µl 2 M NaOH mischen und mindestens 5 Minuten auf Eis inkubieren, dann 5 Minuten bei 6000 g 4°C zentrifugieren. oD_{640} des Überstandes messen. Der Extinktionskoeffizient von Actinorhodin ist $25320 M \cdot cm^{-1}$ (Brockmann 1950).

$$c (M) = \frac{Absorption}{25320 M^{-1}cm^{-1} \times 1 cm} \times 10$$

5.5.2. DNA

Cosmid DNA Isolation

Cosmid in *E. coli* transformieren. Zur Selektion Km und Cr verwenden. 1 ml Übernachtskultur (ÜNK) 1 Minute bei 13.000 Upm ernten. Pellet in 100 µl Lösung I resuspendieren. Sofort 200 µl Lösung II zugeben, invertieren. Sofort 150 µl Lösung III zugeben, invertieren. 5 Minuten bei 13.000 Upm bei RT zentrifugieren. Überstand in neues Gefäß geben und 400 µl PC zugeben. 2 Minuten vortexen und 5 Minuten bei 13.000 Upm zentrifugieren. Überstand in neues Gefäß geben und 600 µl Isopropanol zugeben. 10 Minuten auf Eis inkubieren und 5 Minuten bei 13.000 Upm zentrifugieren. Überstand verwerfen. Pellet mit 200 µl 70% Ethanol waschen, trocken und in 50 ml 10 mM Tris pH 8.0 aufnehmen. Kontrolle auf 0.5% Agarosegel.

Lösung I

Tris-HCl pH 8.0	50 mM
EDTA pH 8.0	10 mM

Lösung II

NaOH	200 mM
SDS	1%

Lösung III

Kaliumacetat	3 M
pH 5.5 (Essigsäure)	

Phenol Chlorophorm (PC)

Phenol	96%
Chlorophorm	4%

5.5.3. RNA

³²P markierter RNA Leitermix

Low Range ssRNA Leiter (NEB)	5 µl
MQ	12 µl
10 x CIP Puffer	2 µl
<i>calf intestine</i> <i>phosphatase CIP</i>	1 µl
	20 µl

30 Minuten bei 50°C inkubieren – 10 Minuten 96°C – sofort auf Eis

CIP-Leiter	11 µl
10 x PNK Puffer	2 µl
γ - ³² P-ATP (6000 Ci/mmol)	6 µl
PNK	1 µl
	20 µl

1 h bei 37°C inkubieren – 30 µl MQ zugeben – mit Sephadex G-25 Säulchen (GE Healthcare) entsprechend der Gebrauchsanweisung aufreinigen.

RNA – RNA Gelshift

Wichtig beim Gelshift ist die Temperatur des Gels (4°C) und die Geschwindigkeit mit der die Proben auf das laufende Gel geladen werden. Vor Beginn der anderen Arbeiten wird deshalb das native Gel gegossen, in die Kammer eingespannt und die Wasserkühlung angeschlossen.

Dann wird eine Verdünnungsreihe der kalten RNA hergestellt und auf die Eppendorfgefäße

verteilt. Wichtig ist auch ein Gefäß mit Puffer und Wasser, aber ohne kalte RNA vorzubereiten. Zu der aufgeteilten Verdünnungsreihe werden dann je 5 µl heißer RNA Mastermix (4 fmol/µl) gegeben.

kalter RNA – Mastermix

40 pmol RNA	X µl
MQ	Y µl
18 µl	

1 Minute 96°C – sofort 5 Minuten auf Eis stellen – 2 µl 10 x *structure buffer* zugeben – ergibt 20 µl mit 2 pmol/µl

³²P-markierte RNA – Mastermix

200 fmol RNA	X µl
MQ	Y µl
35 µl	

1 Minute 96°C – sofort 5 Minuten auf Eis stellen – 10 µl Hefe t-RNA (1µg/µl) und 5 µl 10 x Structure Puffer zugeben – ergibt 50 µl mit 4 fmol/µl

Verdünnungsreihe der kalten RNA:

	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Puffer vorlegen	5 µl 1 x SB	–	je 5 µl 1 x SB						
kalter RNA Mix	–	10 µl Mix	5 µl aus 1	5 µl aus 2	5 µl aus 3	5 µl aus 4	5 µl aus 5	5 µl aus 6	5 µl aus 7
pmol kalte RNA	–	10	5	2.5	1.25	0.625	0.313	0.156	0.08
Überschuss	–	500	250	125	62.5	31	16	8	4

Zur Verdünnungsreihe je 5 µl heißen RNA Mastermix geben – mischen – 15 Minuten bei 37°C inkubieren. Während der Inkubation je 3 µl 5x nativen RNA Ladepuffer innen an den Rand jedes Gefäßes geben. Der Ladepuffer darf sich noch nicht mit der Probe mischen! Nach der Inkubation den Ladepuffer durch kurzes runterschütteln mit der Probe vermischen und sofort auf das laufende – auf 4°C vorgekühlte – Gel laden. Der Gellauf erfolgt bei 300 V. Danach wird das Gel eine halbe Stunde im Geltrockner bei 80°C getrocknet. Das Signal wird über Nacht mit einer Phosphoimager Platte detektiert.

5' markierte DNA-Oligonukleotide

10 pmol Oligonukleotid	X µl
MQ	Y µl
10 x PNK Puffer	2 µl
γ - ³² P-ATP (6000 Ci/mmol)	4 µl
PNK	1 µl
	20 µl

1 Stunde bei 37°C inkubieren – 30 µl MQ zugeben – mit Sephadex G25 Säulchen aufreinigen

RNA Isolierung aus Streptomyceten

10–50 ml Kultur ernten (15 Minuten 8500 Upm RT) und in 10 ml Extraktionspuffer resuspendieren. Je 5 ml Glasperlen (0.4 mm und 4 mm Durchmesser) zugeben. Die RNA wird nach der *hot phenol* Methode isoliert [117]. Kultur 10 Minuten bei RT und 8.500 Upm ernten, Überstand absaugen und je 5 ml RNase freie Glasperlen mit 0.4 und 4 mm Durchmesser zugeben. Dann 10 ml Lysepuffer und 10 ml heißes saures Phenol (65°C) zugeben. Der Aufschluss erfolgt in der FastPrep24 (MP Biomedicals) 3 x 30 s bei 6 m/s. Zwischen den Läufen wird die Probe für mindestens 1 Minute in ein 65°C heißes Wasserbad gestellt, damit sie nicht auskühlt. 15 Minuten bei 8500 Upm 4°C zentrifugieren, Überstand in neues Gefäß geben. 10 ml Chlorophorm – Isoamylalkohol (24:1) zugeben, vortexen und wieder 15 Minuten zentrifugieren. Überstand in neues Gefäß geben, mit Ethanol und Natriumacetat fällen und in ~ 500 µl MQ lösen. Im NanoDrop (PeqLab) die Konzentration bestimmen (meist 2 – 4 µg/µl). 100 µg mit 30 U TurboDNase (Ambion) für eine Stunde bei 37°C verdauen und nochmal mit Ethanol fällen. Pellet in ~ 50 µl MQ lösen, Konzentration im NanoDrop messen (meist 1 – 1.5 µg/µl) und 1 µg auf einem 1%igen Agarosegel kontrollieren.

Lysepuffer

Natriumacetat	10 mM
Sucrose	150 mM
pH 4.8 (Essigsäure)	
autoklavieren	

Northern Blot

10–50 µg gesamt RNA pro Spur in einem 20x20 cm 6% PAA Gel bei 25 W auftrennen. Anschließend in einem Tankblotter in 5 L vorgekühlten 1xTBE bei 50 V und 3 A eine Stunde auf eine N⁺-Membran transferieren. Die Membran trocknen lassen und 4 Minuten mit der RNA Seite nach unten auf dem UV-Schirm fixieren. Die Membran in ein Hybridisierungsröhrchen geben und 1 Stunde mit 12 ml Rothi HybriQuick bei 42°C prähybridisieren (T_m – 15°C). Dann 30 µl 5' markiertes DNA-Oligo zugeben und weitere 1–12 Stunden hybridisieren (je nach Stärke des erwarteten Signals). Hybridisierungslösung abgießen und die Membran bei 42°C waschen:

5x SSC, 0.1% SDS	20 Minuten
1x SSC, 0.1% SDS	15 Minuten
0.5x SSC, 0,1% SDS	15 Minuten

Membran trocknen lassen und in Frischhaltefolie einschlagen. Detektion mit Phosphoimager.

5'RACE

TAP-Behandlung

12 µg Gesamt RNA	X µl
MQ	Y µl
10x TAP Puffer	10 µl
RNase Inhibitor	0.5 µl
	100 µl

Gemisch auf zwei Eppis aufteilen (je 49 µl). Zu einem davon 1 µl TAP geben (Tobacco Acid Pyrophosphatase, Epicentre, 10 U/µl). 30 Minuten bei 37°C inkubieren

PCI Extraktion

50 µl MQ zugeben – in 1.5 ml MaxTract Gefäß überführen – 100 µl Phenol–Chlorophorm–Isoamylalkohol (PCI, Roth) zugeben – 30 Sekunden schütteln – 15 Minuten 13.000 Upm 15°C – Überstand in neues Gefäß geben

RNA Mengen

1 µg RNA enthält etwa

23S rRNA	3 kB	0.6 µg	0.6 pmol
16S rRNA	1.6 kB	0.3 µg	1 pmol
tRNA		0.16 µg	6.4 pmol

1 µg RNA enthält also etwa 8 pmol 5' Enden. Für die Ligation des Linkers wird ein 10x molarer Überschuss an Linker eingesetzt.

Ligation des Linkers

Es sind 5–6 µg RNA übrig, das sind ca. 40 pmol 5' Enden, man braucht also 400 pmol Linker (Purimex).

A4-Linker 5' -GACGAGCACGAGGACACUGACAUGGAGGAGGGAGUAGAAA-3'

4 µl Linker RNA (100 pmol/µl) zum Überstand von oben zugeben und mit 260 µl Ethanol - NaAcetat (30:1) für 1 Stunde bei -20°C fällen. 30 Minuten bei 13.000 Upm 4°C zentrifugieren und mit 200 µl 70% Ethanol waschen. Pellet kurz trocknen und in 13.5 µl MQ lösen.

Ligation

Gelöste RNA 5 Minuten bei 95°C denaturieren und 5 Minuten auf Eis abschrecken. 6.5 µl Ligationmix zugeben und 12 Stunden bei 17°C ligieren.

Ligationmix (pro Ligation)

DMSO	2 µl
10x RNA Ligase Puffer	2 µl
T4 RNA Ligase	2 µl
RNase Inhibitor	0.5 µl
	6.5 µl

PCI Extraktion siehe oben – Ethanol Fällung siehe oben – Pellet in 10 µl MQ lösen

cDNA Synthese mit Superscript III

In einem PCR Gefäß mischen: 4.5 µl RNA +/- TAP – 1 µl random Hexamer Oligos (250 ng/µl, Purimex) 4.5 µl DEPC-Wasser (Roth)

– MATERIAL UND METHODEN –

Reverse Transkription in der PCR-Maschine :

Denaturieren	65°C	5 Minuten
Zugabe von 10 µl RT-Mix		
reverse Transkription	25°C	10 Minuten
reverse Transkription	50°C	60 Minuten
Inaktivierung RT	70°C	15 Minuten
Zugabe 1 µl RNase H		
Verdau der RNA	37°C	20 Minuten

RT-Mix (pro Transkription)

5x First Strand Buffer	4 µl
10 mM dNTPs	2 µl
DEPC-Wasser	1.5 µl
0.1 M DTT	1 µl
RNase Inhibitor	0.5 µl
Superscript III reverse Transkriptase (Invitrogen, 200 U/µl)	1 µl
	10 µl

RACE PCR

MQ	29 µl
cDNA	1 µl
10x Taq Puffer	4 µl
10 mM dNTPs	0.8 µl
Linker_fwd Primer (10 pmol/µl)	2.5 µl
genspez. Primer (10 pmol/µl)	2.5 µl
Taq Polymerase	0.2 µl
	40 µl

Programm : 5 Minuten 95°C – (95°C 45 Sekunden | 55°C 45 Sekunden | 72°C 45 Sekunden)

35x –72°C 7 Minuten.

5.5.4. Protein

Rohextrakt

1–50 ml Kultur wurde 15 Minuten bei 8.500 Upm 4°C geerntet und ein Mal mit demselben Volumen 1×ZAP gewaschen. Der Zellaufschluss erfolgte 3×1 Minute bei 6 m/s in der FastPrep. Zwischen den Runden wurden die Proben jeweils 5 Minuten auf Eis gekühlt. Nach dem Aufschluss wurden Zelltrümmer 1 h bei 10.350 Upm abzentrifugiert. Die Konzentration des Rohextraktes wurde mittels Bradford Test bestimmt.

Überstand fällen

Zur Gewinnung sekretierter Proteine wurden 40 ml Kultur 30 Minuten bei 10.350 Upm abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt, auf 20% TCA eingestellt und 30 Minuten auf Eis gefällt. Nach 30 Minuten Zentrifugation bei 10.350 Upm, 4°C wurde der Überstand verworfen und das Pellet 2x mit 40 ml eiskaltem Aceton gewaschen. Abschließend wurde das Pellet in Wasser gelöst.

PAA Gel nach Schägger

Proteine wurden in Tris-Tricin gepufferten Acrylamidgelen nach der Anleitung von Schägger [118] elektrophoretisch aufgetrennt.

3×Gelpuffer

Tris	3 M
SDS	0.3%
pH 8.45 (HCl)	

10% Trenngel (2 kleine Gele)

40% Acrylamidlösung	3.25 ml
3× Gelpuffer	4.3 ml
MQ	5.45 ml
Glycerin	1.1 ml
APS	135 µl
TEMED	15 µl

4% Sammelgel (2 kleine Gele)

40% Acrylamidlösung	700 µl
3× Gelpuffer	2.6 ml
MQ	3.7 ml
APS	160 µl
TEMED	10 µl

10×Anodenpuffer (unten)

Tris	1 M
pH 8.9 (HCl)	

10×Kathodenpuffer (oben)

Tris	1 M
Tricin	1 M
SDS	1%
pH 8.25 (HCl)	

Coomassie Färbung

Proteingele wurden mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt und mit Entfärber I bzw. II entfärbt.

Coomassie Färbelösung

Essigsäure	10%
Methanol	45%
PhastBlu Tabletten	3/L

Entfärber I (schnell)

Essigsäure	7%
Methanol	40%

Entfärber II (langsam)

Essigsäure	7%
Methanol	4%

Western Blot

Das Proteingel wurde 5 Minuten in Transferpuffer äquilibriert. Die passend zugeschnittene PVDF Membran wurde 5 Minuten in Methanol und 5 Minuten in Transferpuffer äquilibriert. Der Transfer erfolgte für 1 h bei 100 V und 4°C. Die Membran wurde 1 h in TBST mit 0.2% iBlock blockiert. Zur Detektion wurde ein Anti-His Tag Antikörper HRP Konjugat 1:2000 verdünnt verwendet (Novagen).

Luziferase Messung

200 µl Jasenka-Kultur in eine auf Eis stehende weiße 96 Well Platte pipettieren. Sind alle Kulturen vorgelegt, wird die Platte ca. 10 Minuten bei 30°C inkubiert um die Zellen wieder aufzuwärmen. Währenddessen wird im Luminometer folgendes Programm vorbereitet.

Injektion von 20 µl 1% n-Decanal (verdünnt in 50% Ethanol)	
10 s schütteln mit 1 mm orbitaler Auslenkung	
0.5 s warten	10×
messen der Lumineszenz mit 0.5 s Integration	

Direkt auf die Injektion des Decanals hin erfolgt eine Spitze der Lumineszenz, die in ein Plateau mündet. Für die Auswertung werden die stabilen Werte hinter der Spitze verwendet (meist die 3.–5. Messung). Zur Normierung wird entweder die oD_{450} oder das Trockengewicht der Kultur bestimmt.

6. Literatur

1. Locci, R., *Streptomyces and related genera.*, in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, S.T. Williams, Sharpe M E, Holt J G, Editor. 1989, Williams & Wilkins: Baltimore. p. 2451-2508.
2. Wellington, E.M., N. Cresswell, and P.R. Herron, *Gene transfer between streptomyces in soil.* Gene, 1992. **115**(1-2): p. 193-8.
3. Bentley, S.D., et al., *Complete genome sequence of the model actinomycete Streptomyces coelicolor A3(2).* Nature, 2002. **417**(6885): p. 141-7.
4. Mayfield C I, W.S.T., Ruddick S M, Hatfield H L, *Studies on the ecology of actinomycetes in soil.* Soil Biol. Biochem., 1972. **4**: p. 79-91.
5. Ensign, J.C., *Formation, properties, and germination of actinomycete spores.* Annu Rev Microbiol, 1978. **32**: p. 185-219.
6. Y, M.R., *Starvation and miniaturisation of heterotrophs, with special emphasis on maintainance of the starved viable state,* in *Bacteria in their Natural Environments*, F.G.D. Fletcher M, Editor. 1985, Academic Press: London. p. 111-130.
7. McCarthy, A.J. and S.T. Williams, *Actinomycetes as agents of biodegradation in the environment--a review.* Gene, 1992. **115**(1-2): p. 189-92.
8. Crawford, D.L., *Biodegradation of agricultural and urban wastes,* in *Actinomycetes in Biotechnology*, W.S.T. Goodfellow M, Mordarski M, Editor. 1988, Academic Press: London. p. 433-439.
9. Wang Z, C.D., Pometto III AL, Rafii F, *Survival and effects of wild-type, mutant, and recombinant Streptomyces in soil.* Can. J. Microbiol., 1989. **35**: p. 535-543.
10. Embley, T.M. and E. Stackebrandt, *The molecular phylogeny and systematics of the actinomycetes.* Annu Rev Microbiol, 1994. **48**: p. 257-89.
11. Banchio, C. and H.C. Gramajo, *Medium- and long-chain fatty acid uptake and utilization by Streptomyces coelicolor A3(2): first characterization of a gram-positive bacterial system.* Microbiology, 1997. **143 (Pt 7)**: p. 2439-47.
12. Shelton, D.R., et al., *Metabolism of twelve herbicides by Streptomyces.* Biodegradation, 1996. **7**(2): p. 129-36.
13. Tobias Kieser, M.J.B., Mark J. Buttner, Keith F. Chater, David A. Hopwood, *Practical Streptomyces Genetics*, Colney, Norwich NR4 7UH, England: John Innes Foundation.
14. M, B., *The regulation of antibiotic production in Streptomyces coelicolor A3(2).* Microbiology, 1996. **142**: p. 1335-1344.
15. Hopwood, D.A., K.F. Chater, and M.J. Bibb, *Genetics of antibiotic production in Streptomyces coelicolor A3(2), a model streptomycete.* Biotechnology, 1995. **28**: p. 65-102.
16. Berdy, J., *Bioactive microbial metabolites.* J Antibiot (Tokyo), 2005. **58**(1): p. 1-26.
17. Watve, M., et al., *How many antibiotics are produced by the genus Streptomyces ?* Archives of Microbiology, 2001. **176**(5): p. 386-390.
18. Binnie, C., et al., *Expression and characterization of soluble human erythropoietin receptor made in Streptomyces lividans 66.* Protein Expr Purif, 1997. **11**(3): p. 271-8.
19. Hodgson, D.A., *Differentiation in Actinomycetes.*, in *Prokaryotic Structure and Function*, D.C. Mohan S, Cole J A, Editor. 1992, Cambridge University Press: Cambridge. p. 407-440.
20. Chater, K.F., *Genetics of differentiation in Streptomyces.* Annu Rev Microbiol, 1993. **47**: p. 685-713.
21. Champness W C, C.K.F., *Regulation and Integration of antibiotic production and morphological differentiation in Streptomyces spp.*, in *Regulation of Bacterial*

- Differentiation*, M.C. Piggot P, Youngman P, Editor. 1994, American Society of Microbiology: Washington D.C. p. 61-93.
22. Chater K, L.R., *The mycelial life-style of Streptomyces coelicolor A3(2) and its relatives*, in *Bacteria as Multicellular Organisms*, D.M. Shapiro J H, Editor. 1996, Oxford University Press: New York. p. 149-182.
 23. Ochi, K., *Occurrence of the stringent response in Streptomyces sp. and its significance for the initiation of morphological and physiological differentiation*. J Gen Microbiol, 1986. **132**(9): p. 2621-31.
 24. Takano, E. and M.J. Bibb, *The stringent response ppGpp and antibiotic production in Streptomyces coelicolor A3(2)*. Actinomycetology, 1994. **8**: p. 1-16.
 25. Chakraborty, R. and M. Bibb, *The ppGpp synthetase gene (relA) of Streptomyces coelicolor A3(2) plays a conditional role in antibiotic production and morphological differentiation*. J Bacteriol, 1997. **179**(18): p. 5854-61.
 26. Horinouchi, S. and T. Beppu, *A-factor as a microbial hormone that controls cellular differentiation and secondary metabolism in Streptomyces griseus*. Mol Microbiol, 1994. **12**(6): p. 859-64.
 27. Willey, J., J. Schwedock, and R. Losick, *Multiple extracellular signals govern the production of a morphogenetic protein involved in aerial mycelium formation by Streptomyces coelicolor*. Genes Dev, 1993. **7**(5): p. 895-903.
 28. Takano, E., et al., *A rare leucine codon in adpA is implicated in the morphological defect of bldA mutants of Streptomyces coelicolor*. Mol Microbiol, 2003. **50**(2): p. 475-86.
 29. Chater, K.F. and S. Horinouchi, *Signalling early developmental events in two highly diverged Streptomyces species*. Mol Microbiol, 2003. **48**(1): p. 9-15.
 30. Elliot, M.A. and N.J. Talbot, *Building filaments in the air: aerial morphogenesis in bacteria and fungi*. Curr Opin Microbiol, 2004. **7**(6): p. 594-601.
 31. Kelemen, G.H. and M.J. Buttner, *Initiation of aerial mycelium formation in Streptomyces*. Curr Opin Microbiol, 1998. **1**(6): p. 656-62.
 32. Wosten, H.A. and J.M. Willey, *Surface-active proteins enable microbial aerial hyphae to grow into the air*. Microbiology, 2000. **146** (Pt 4): p. 767-73.
 33. Leskiw, B.K., M.J. Bibb, and K.F. Chater, *The use of a rare codon specifically during development?* Mol Microbiol, 1991. **5**(12): p. 2861-7.
 34. Miguez, E.M., et al., *Autoradiographic study of hyphal growth during aerial mycelium development in Streptomyces antibioticus*. J Bacteriol, 1994. **176**(7): p. 2105-7.
 35. Bruton, C.J., K.A. Plaskitt, and K.F. Chater, *Tissue-specific glycogen branching isoenzymes in a multicellular prokaryote, Streptomyces coelicolor A3(2)*. Mol Microbiol, 1995. **18**(1): p. 89-99.
 36. Brana, A.F., et al., *Glycogen and trehalose accumulation during colony development in Streptomyces antibioticus*. J Gen Microbiol, 1986. **132**(5): p. 1319-26.
 37. Wagner, E.G.H., S. Altuvia, and P. Romby, *Antisense RNAs in bacteria and their genetic elements*. Adv Genet, 2002. **46**: p. 361-98.
 38. Wagner, E.G.H. and K. Flürdh, *Antisense RNAs everywhere?* Trends Genet, 2002. **18**(5): p. 223-6.
 39. Andersen, J. and N. Delihias, *micF RNA binds to the 5' end of ompF mRNA and to a protein from Escherichia coli*. Biochemistry, 1990. **29**(39): p. 9249-56.
 40. Coyer, J., et al., *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**(8): p. 4143-50.

41. Udekwu, K.I., et al., *Hfq-dependent regulation of OmpA synthesis is mediated by an antisense RNA*. Genes Dev, 2005. **19**(19): p. 2355-66.
42. Chen, S., et al., *MicC, a second small-RNA regulator of Omp protein expression in Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, 2004. **186**(20): p. 6689-97.
43. Møller, T., et al., *Spot 42 RNA mediates discoordinate expression of the E. coli galactose operon*. Genes & Development, 2002. **16**(13): p. 1696-706.
44. Takyar, S., R.P. Hickerson, and H.F. Noller, *mRNA helicase activity of the ribosome*. Cell, 2005. **120**(1): p. 49-58.
45. Pfeiffer, V., et al., *Coding sequence targeting by MicC RNA reveals bacterial mRNA silencing downstream of translational initiation*. Nat Struct Mol Biol, 2009.
46. Lease, R.A., M.E. Cusick, and M. Belfort, *Riboregulation in Escherichia coli: DsrA RNA acts by RNA:RNA interactions at multiple loci*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(21): p. 12456-61.
47. Majdalani, N., et al., *Regulation of RpoS by a novel small RNA: the characterization of RprA*. Mol Microbiol, 2001. **39**(5): p. 1382-94.
48. Hengge-Aronis, R., *Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the sigma(S) (RpoS) subunit of RNA polymerase*. Microbiol Mol Biol Rev, 2002. **66**(3): p. 373-95, table of contents.
49. Repoila, F. and S. Gottesman, *Signal transduction cascade for regulation of RpoS: temperature regulation of DsrA*. Journal of Bacteriology, 2001. **183**(13): p. 4012-23.
50. de Smit, M.H. and J. van Duin, *Translational standby sites: how ribosomes may deal with the rapid folding kinetics of mRNA*. J Mol Biol, 2003. **331**(4): p. 737-43.
51. Pavlov, M.Y., et al., *Fast recycling of Escherichia coli ribosomes requires both ribosome recycling factor (RRF) and release factor RF3*. EMBO J, 1997. **16**(13): p. 4134-41.
52. Studer, S.M. and S. Joseph, *Unfolding of mRNA secondary structure by the bacterial translation initiation complex*. Mol Cell, 2006. **22**(1): p. 105-15.
53. Vogel, J., et al., *The small RNA IstR inhibits synthesis of an SOS-induced toxic peptide*. Curr Biol, 2004. **14**(24): p. 2271-6.
54. Darfeuille, F., et al., *An antisense RNA inhibits translation by competing with standby ribosomes*. Mol Cell, 2007. **26**(3): p. 381-92.
55. Babitzke, P. and T. Romeo, *CsrB sRNA family: sequestration of RNA-binding regulatory proteins*. Current Opinion in Microbiology, 2007. **10**(2): p. 156-163.
56. Liu, M.Y., et al., *The RNA molecule CsrB binds to the global regulatory protein CsrA and antagonizes its activity in Escherichia coli*. J Biol Chem, 1997. **272**(28): p. 17502-10.
57. Liu, M.Y. and T. Romeo, *The global regulator CsrA of Escherichia coli is a specific mRNA-binding protein*. J Bacteriol, 1997. **179**(14): p. 4639-42.
58. Weilbacher, T., et al., *A novel sRNA component of the carbon storage regulatory system of Escherichia coli*. Mol Microbiol, 2003. **48**(3): p. 657-70.
59. Wassarman, K., *6S RNA: a small RNA regulator of transcription*. Current Opinion in Microbiology, 2007. **10**(2): p. 164-168.
60. Wassarman, K.M. and R.M. Saecker, *Synthesis-mediated release of a small RNA inhibitor of RNA polymerase*. Science, 2006. **314**(5805): p. 1601-3.
61. He, W. and R. Parker, *Functions of Lsm proteins in mRNA degradation and splicing*. Curr Opin Cell Biol, 2000. **12**(3): p. 346-50.
62. Franze de Fernandez, M.T., L. Eoyang, and J.T. August, *Factor fraction required for the synthesis of bacteriophage Qbeta-RNA*. Nature, 1968. **219**(5154): p. 588-90.
63. Sledjeski, D. and S. Gottesman, *A small RNA acts as an antisilencer of the H-NS-*

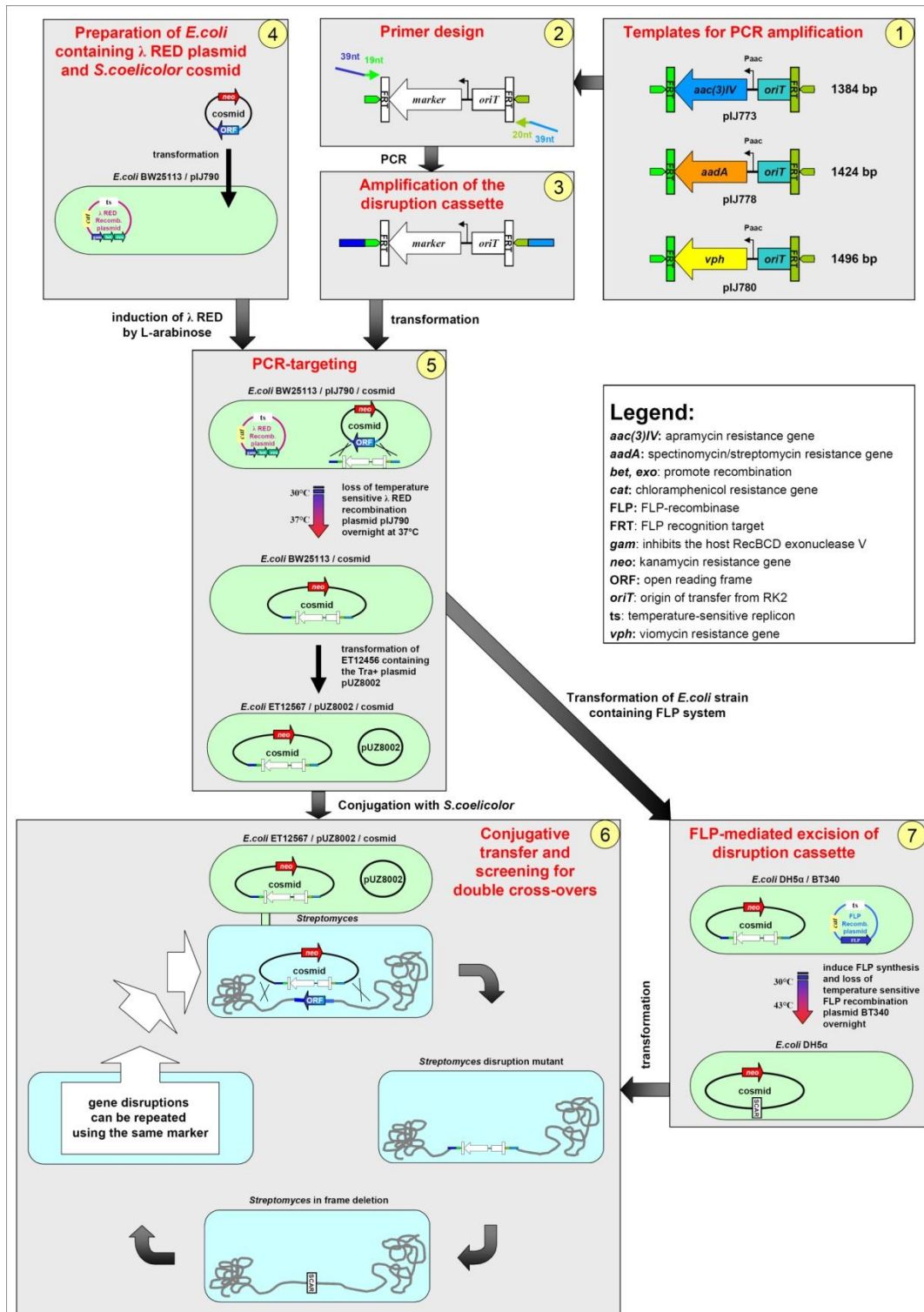
- silenced rcsA gene of Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(6): p. 2003-7.
64. Ikemura, T. and J.E. Dahlberg, *Small ribonucleic acids of Escherichia coli. I. Characterization by polyacrylamide gel electrophoresis and fingerprint analysis*. J Biol Chem, 1973. **248**(14): p. 5024-32.
65. Argaman, L., et al., *Novel small RNA-encoding genes in the intergenic regions of Escherichia coli*. Curr Biol, 2001. **11**(12): p. 941-50.
66. Wassarman, K.M., et al., *Identification of novel small RNAs using comparative genomics and microarrays*. Genes & Development, 2001. **15**(13): p. 1637-51.
67. Rivas, E., et al., *Computational identification of noncoding RNAs in E. coli by comparative genomics*. Curr Biol, 2001. **11**(17): p. 1369-73.
68. Vogel, J., *RNomics in Escherichia coli detects new sRNA species and indicates parallel transcriptional output in bacteria*. Nucleic Acids Research, 2003. **31**(22): p. 6435-6443.
69. Tjaden, B., et al., *Transcriptome analysis of Escherichia coli using high-density oligonucleotide probe arrays*. Nucleic Acids Res, 2002. **30**(17): p. 3732-8.
70. Zhang, A., et al., *Global analysis of small RNA and mRNA targets of Hfq*. Mol Microbiol, 2003. **50**(4): p. 1111-24.
71. Rasmussen, A.A., et al., *Regulation of ompA mRNA stability: the role of a small regulatory RNA in growth phase-dependent control*. Mol Microbiol, 2005. **58**(5): p. 1421-9.
72. Møller, T., et al., *Hfq: a bacterial Sm-like protein that mediates RNA-RNA interaction*. Molecular Cell, 2002. **9**(1): p. 23-30.
73. Guillier, M. and S. Gottesman, *Remodelling of the Escherichia coli outer membrane by two small regulatory RNAs*. Mol Microbiol, 2006. **59**(1): p. 231-247.
74. Papenfort, K., et al., *SigmaE-dependent small RNAs of Salmonella respond to membrane stress by accelerating global omp mRNA decay*. Mol Microbiol, 2006. **62**(6): p. 1674-88.
75. Macke, T.J., et al., *RNAMotif, an RNA secondary structure definition and search algorithm*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(22): p. 4724-35.
76. Rigali, S., et al., *Feast or famine: the global regulator DasR links nutrient stress to antibiotic production by Streptomyces*. EMBO Rep, 2008. **9**(7): p. 670-5.
77. Saito, A., et al., *The dasABC gene cluster, adjacent to dasR, encodes a novel ABC transporter for the uptake of N,N'-diacetylchitobiose in Streptomyces coelicolor A3(2)*. Appl Environ Microbiol, 2007. **73**(9): p. 3000-8.
78. Rigali, S., et al., *The sugar phosphotransferase system of Streptomyces coelicolor is regulated by the GntR-family regulator DasR and links N-acetylglucosamine metabolism to the control of development*. Mol Microbiol, 2006. **61**(5): p. 1237-51.
79. Rigali, S., et al., *Extending the classification of bacterial transcription factors beyond the helix-turn-helix motif as an alternative approach to discover new cis/trans relationships*. Nucleic Acids Research, 2004. **32**(11): p. 3418-26.
80. Sosinsky, A., et al., *Target Explorer: An automated tool for the identification of new target genes for a specified set of transcription factors*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(13): p. 3589-92.
81. Hiard, S., et al., *PREDetector: a new tool to identify regulatory elements in bacterial genomes*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2007. **357**(4): p. 861-4.
82. Washietl, S., I.L. Hofacker, and P.F. Stadler, *Fast and reliable prediction of noncoding RNAs*. Proc Natl Acad Sci USA, 2005. **102**(7): p. 2454-9.

83. E. P. Nawrocki, D.L.K., S. R. Eddy, *Infernal 1.0: Inference of RNA alignments*. Bioinformatics, 2009.
84. Rutherford, K., et al., *Artemis: sequence visualization and annotation*. Bioinformatics, 2000. **16**(10): p. 944-5.
85. Hunt, A.C., et al., *The bldC developmental locus of Streptomyces coelicolor encodes a member of a family of small DNA-binding proteins related to the DNA-binding domains of the MerR family*. Journal of Bacteriology, 2005. **187**(2): p. 716-28.
86. Nguyen, K.T., et al., *A central regulator of morphological differentiation in the multicellular bacterium Streptomyces coelicolor*. Mol Microbiol, 2002. **46**(5): p. 1223-38.
87. Labes, G., M.J. Bibb, and W. Wohlleben, *Isolation and characterization of a strong promoter element from the Streptomyces ghanaensis phage I19 using the gentamicin resistance gene (aacC1) of Tn 1696 as reporter*. Microbiology, 1997. **143** (Pt 5): p. 1503-12.
88. Gust, B., et al., *Lambda red-mediated genetic manipulation of antibiotic-producing Streptomyces*. Adv Appl Microbiol, 2004. **54**: p. 107-28.
89. Gust, B., et al., *PCR-targeted Streptomyces gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(4): p. 1541-6.
90. Datsenko, K.A. and B.L. Wanner, *One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products*. Proc Natl Acad Sci USA, 2000. **97**(12): p. 6640-5.
91. [cited; Available from: http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_coelicolor/].
92. Wehmeier, U.F., *New multifunctional Escherichia coli-Streptomyces shuttle vectors allowing blue-white screening on XGal plates*. Gene, 1995. **165**(1): p. 149-50.
93. Hodgson, D.A. and K.F. Chater, *A Chromosomal Locus Controlling Extracellular Agarase Production by Streptomyces coelicolor A3(2), and its Inactivation by Chromosomal Integration of Plasmid SCP 1* J Gen Microbiol, 1981. **124**: p. 339-348.
94. Buttner, M.J., I.M. Fearnley, and M.J. Bibb, *The agarase gene (dagA) of Streptomyces coelicolor A3(2): nucleotide sequence and transcriptional analysis*. Mol Gen Genet, 1987. **209**(1): p. 101-9.
95. Widdick, D.A., et al., *The twin-arginine translocation pathway is a major route of protein export in Streptomyces coelicolor*. Proc Natl Acad Sci USA, 2006. **103**(47): p. 17927-32.
96. Widdick, D.A., et al., *A facile reporter system for the experimental identification of twin-arginine translocation (Tat) signal peptides from all kingdoms of life*. Journal of Molecular Biology, 2008. **375**(3): p. 595-603.
97. Rigali, S., et al., *The sugar phosphotransferase system of Streptomyces coelicolor is regulated by the GntR-family regulator DasR and links N-acetylglucosamine metabolism to the control of development*. Mol Microbiol, 2006. **61**(5): p. 1237-51.
98. Elliot, M.A. and B.K. Leskiw, *The BldD protein from Streptomyces coelicolor is a DNA-binding protein*. J Bacteriol, 1999. **181**(21): p. 6832-5.
99. Elliot, M., et al., *The bldD gene of Streptomyces coelicolor A3(2): a regulatory gene involved in morphogenesis and antibiotic production*. J Bacteriol, 1998. **180**(6): p. 1549-55.
100. Elliot, M.A., et al., *BldD is a direct regulator of key developmental genes in Streptomyces coelicolor A3(2)*. Mol Microbiol, 2001. **40**(1): p. 257-69.
101. Kelemen, G.H., et al., *A connection between stress and development in the multicellular prokaryote Streptomyces coelicolor A3(2)*. Mol Microbiol, 2001. **40**(4):

- p. 804-14.
102. Bibb, M.J., V. Molle, and M.J. Buttner, *sigma(BldN), an extracytoplasmic function RNA polymerase sigma factor required for aerial mycelium formation in Streptomyces coelicolor A3(2)*. Journal of Bacteriology, 2000. **182**(16): p. 4606-16.
 103. Pope, M.K., B. Green, and J. Westpheling, *The bldB gene encodes a small protein required for morphogenesis, antibiotic production, and catabolite control in Streptomyces coelicolor*. J Bacteriol, 1998. **180**(6): p. 1556-62.
 104. Bibb, M.J. and M.J. Buttner, *The Streptomyces coelicolor developmental transcription factor sigmaBldN is synthesized as a proprotein*. J Bacteriol, 2003. **185**(7): p. 2338-45.
 105. Bibb, M.J., V. Molle, and M.J. Buttner, *sigma(BldN), an extracytoplasmic function RNA polymerase sigma factor required for aerial mycelium formation in Streptomyces coelicolor A3(2)*. J Bacteriol, 2000. **182**(16): p. 4606-16.
 106. Parashar, A., et al., *BldG and SCO3548 interact antagonistically to control key developmental processes in Streptomyces coelicolor*. Journal of Bacteriology, 2009.
 107. Merrick, M.J., *A morphological and genetic mapping study of bald colony mutants of Streptomyces coelicolor*. J Gen Microbiol, 1976. **96**(2): p. 299-315.
 108. Repoila, F. and F. Darfeuille, *Small regulatory non-coding RNAs in bacteria: physiology and mechanistic aspects*. Biol Cell, 2009. **101**(2): p. 117-31.
 109. Jousselin, A., L. Metzinger, and B. Felden, *On the facultative requirement of the bacterial RNA chaperone, Hfq*. Trends Microbiol, 2009.
 110. Servín-González, L., et al., *Transcriptional regulation of the four promoters of the agarase gene (dagA) of Streptomyces coelicolor A3(2)*. Microbiology, 1994. **140** (Pt 10): p. 2555-65.
 111. Parro, V., et al., *Overproduction and purification of an agarase of bacterial origin*. J Biotechnol, 1997. **58**(1): p. 59-66.
 112. Parro, V. and R.P. Mellado, *Effect of glucose on agarase overproduction by Streptomyces*. Gene, 1994. **145**(1): p. 49-55.
 113. Gottesman, S., et al., *Small RNA regulators and the bacterial response to stress*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2006. **71**: p. 1-11.
 114. Reuther, J. and W. Wohlleben, *Nitrogen metabolism in Streptomyces coelicolor: transcriptional and post-translational regulation*. J Mol Microbiol Biotechnol, 2007. **12**(1-2): p. 139-46.
 115. Hodgson, D.A., *Primary metabolism and its control in streptomycetes: a most unusual group of bacteria*. Adv Microb Physiol, 2000. **42**: p. 47-238.
 116. Brawner, M., et al., *Characterization of Streptomyces promoter sequences using the Escherichia coli galactokinase gene*. Gene, 1985. **40**(2-3): p. 191-201.
 117. Mattatall, N.R. and K.E. Sanderson, *Salmonella typhimurium LT2 possesses three distinct 23S rRNA intervening sequences*. J Bacteriol, 1996. **178**(8): p. 2272-8.
 118. Schägger, H. and G. von Jagow, *Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa*. Anal Biochem, 1987. **166**(2): p. 368-79.

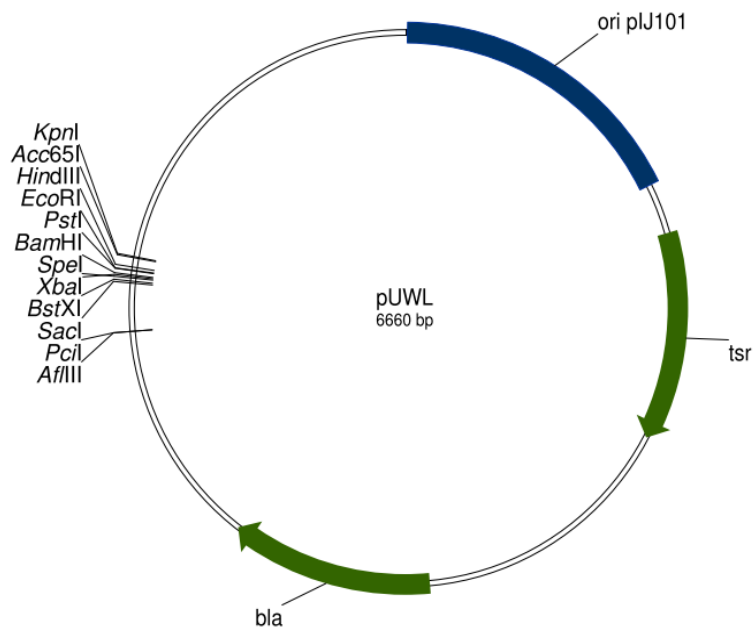
7. Anhang

Schematische Übersicht über das ReDirect System

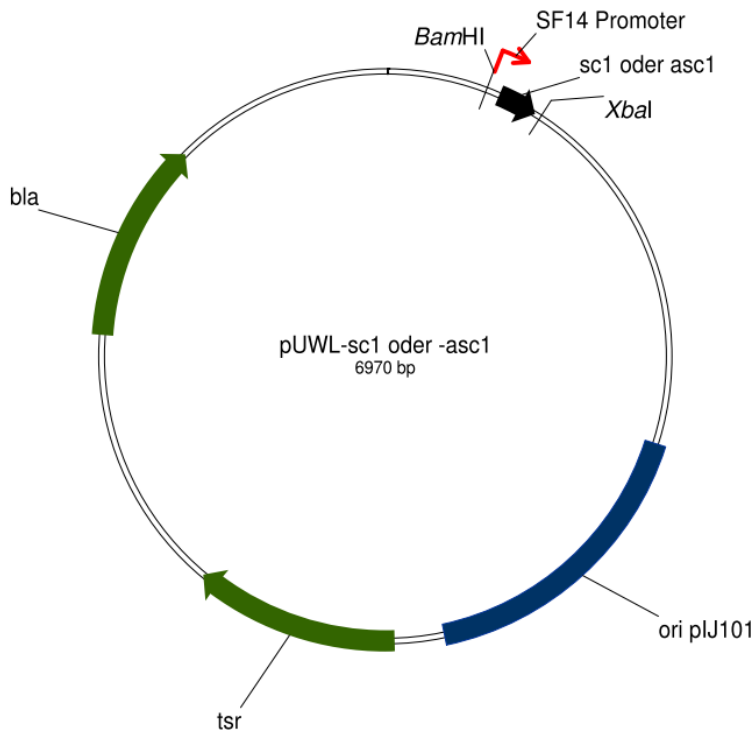


Überblick über das ReDirect System zur Deletion von Genen in *S. coelicolor* (aus Gust 2002).

Plasmidkarte pUWL



Plasmidkarte pUWL-sc+ bzw. pUWL-asc1



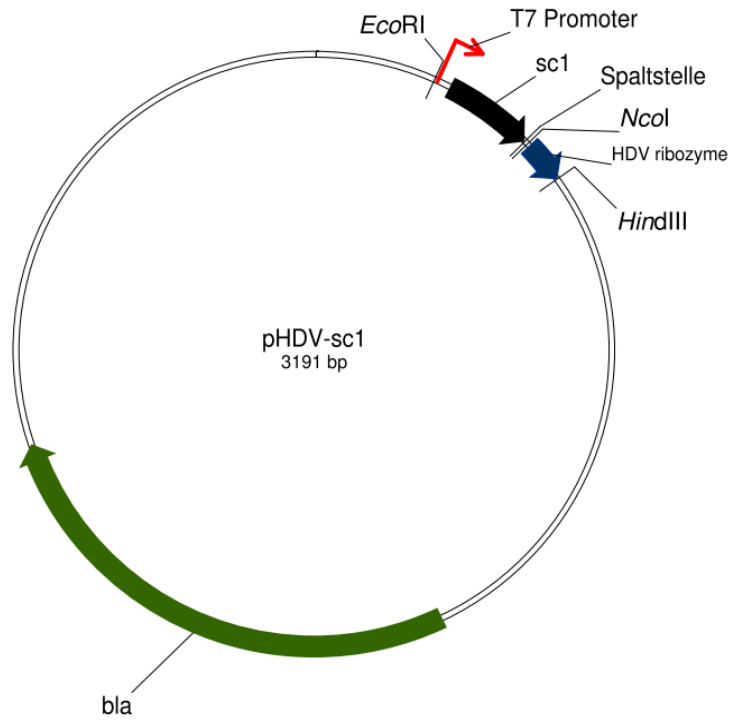
Ausschnitt aus pUWL-sc1+



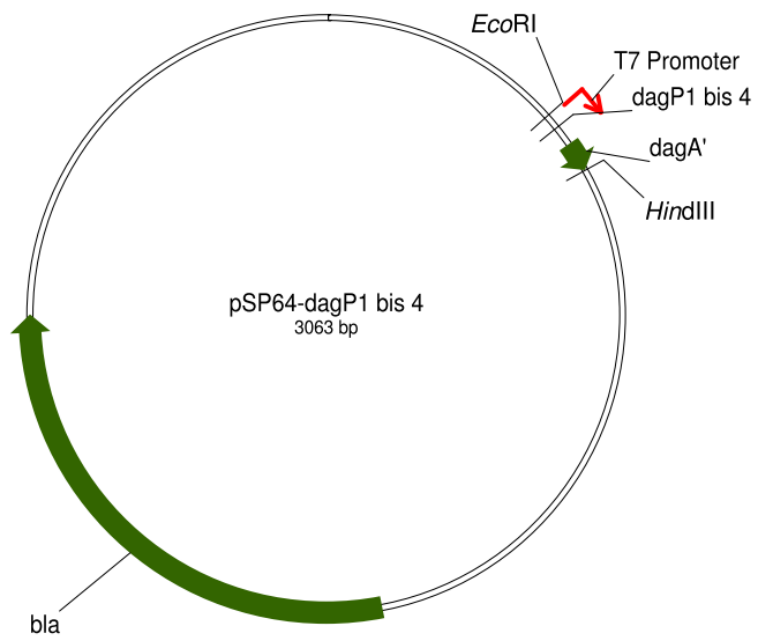
Ausschnitt aus pUWL-asc1



Plasmidkarte pHDV-sc1



Plasmidkarte pSP64-dagP1 bis 4



Ausschnitt aus pSP64-dagP1

```
      EcoRI          P1
      ~~~~~          ^
      T7
TTACGAATTC TAATACGACT CACTATAGGG CAGCCAGGCG GGAATCGAAG AAGGAGAACG ATCGTGGTCA ACCGACGTGA
AATGCTTAAAG ATTATGCTGA GTGATATCCC GTCGGTCCGC CCTTAGCTTC TTCCTCTTGC TAGCACCAGT TGGCTGCACT
-----
      dagA'
TCTCATCAAG TGGAGTGCCG TCGCACTCGG AGCAAGCTTG TATTCTATAG
AGAGTAGTTC ACCTCACGGC AGCGTGAGCC TCGTTCGAAC ATAAGATATC
-----
      HindIII
      ~~~~~
```

Ausschnitt aus pSP64-dagP2

```
      EcoRI          P2
      ~~~~~          ^
      T7
TTACGAATTC TAATACGACT CACTATAGGG TGGCGCCAG GGTCTGCGGA AGTCATTGCC AAATATAAGA TTCTTCAGCC
AATGCTTAAAG ATTATGCTGA GTGATATCCC ACCGCGGGTC CCAGACGCCT TCAGTAACGG TTTATATTCT AAGAAGTCGG
-----
      dagA'
AGGGCGGAAT CGAAGAAGGA GAACGATCGT GGTCAACCGA CGTGATCTCA TCAAGTGGAG TGCCGTCGCA CTCGGAGCAA
TCCGCCCTTA GCTTCTTCTT CTTGCTAGCA CCAGTTGGCT GCACTAGAGT AGTTCACCTC ACGGCAGCGT GAGCCTCGTT
-----
      HindIII
      ~~~~~
      HindII
      ~~~~~
GCTTGTATTC
CGAACATAAG
-----
```

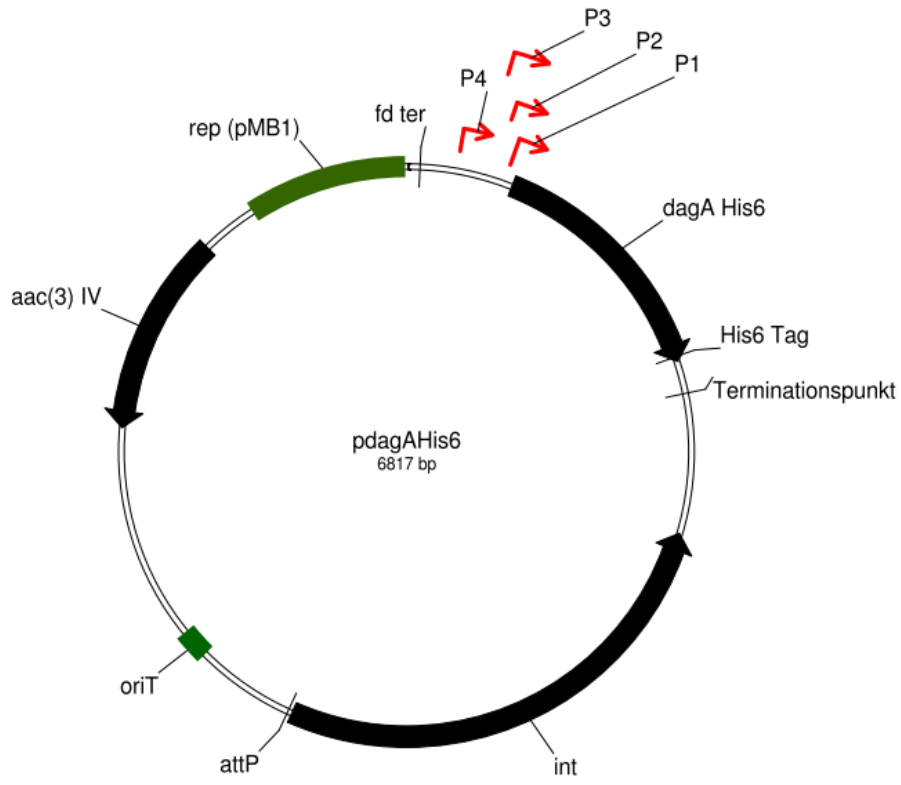
Ausschnitt aus pSP64-dagP3

```
      EcoRI          P3
      ~~~~~          ^
      T7
TTACGAATTC TAATACGACT CACTATAGGG CGTGGGCGTT CCGGAAC TTT TTGCACGCAC GCGAGCTCTC GAATTTTGGC
AATGCTTAAAG ATTATGCTGA GTGATATCCC GCACCCGCAA GGCCTTGAAA AACGTGCGTG CGCTCGAGAG CTTAAAACCG
-----
      dagA'
GCCCAGGGTC TGC GGAAGTC ATTGCCAAAT ATAAGATTCT TCAGCCAGGC GGGAAATCGAA GAAGGAGAAC GATCGTGGTC
CGGGTCCCAG ACGCCTTCAG TAACGGTTTA TATTCTAAGA AGTCGGTCCG CCCTTAGCTT CTTCCTCTTG CTAGCACCAG
-----
      dagA'
AACCGACGTG ATCTCATCAA GTGGAGTGCC GTCGCACTCG GAGCAAGCTT GTATTCTATA
TTGGCTGCAC TAGAGTAGTT CACCTCACGG CAGCGTGAGC CTCGTTTCGAA CATAAGATAT
-----
      HindIII
      ~~~~~
```

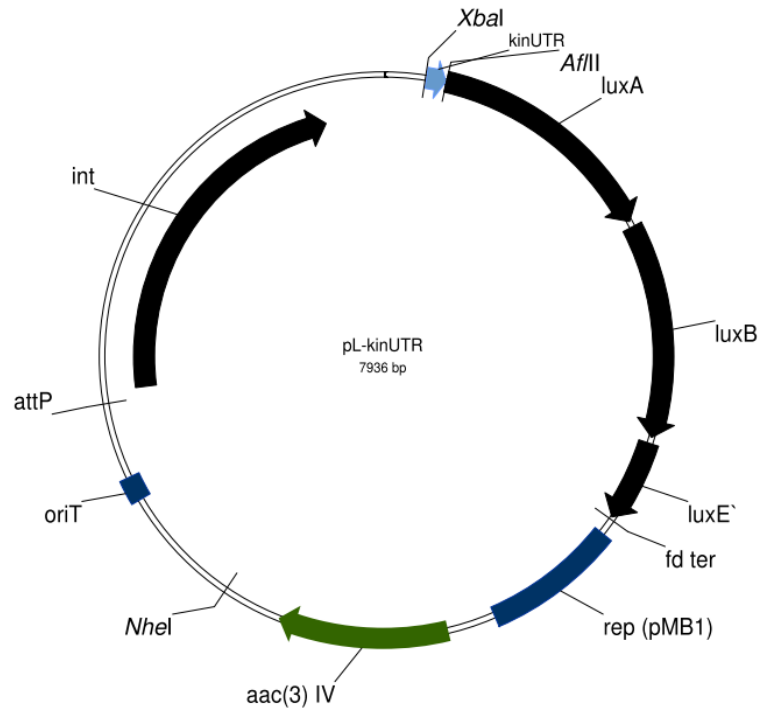
Ausschnitt aus pSP64-dagP4

```
      EcoRI          P4
      ~~~~~          ^
      T7
TTACGAATTC TAATACGACT CACTATAGGG AACCGGTTCA CCTCATTGAA TGATCAGGCG AGCGAAAAGCC CAGAAACTTA
AATGCTTAAAG ATTATGCTGA GTGATATCCC TTGGCCAAGT GGAGTAACTT ACTAGTCCGC TCGCTTTCGG GTCTTTGAAT
-----
      dagA'
CCTCCTGGAG CCTAGCTCCT CCTGCGCCGT GGAATGATCG TGCCACGTGG GCGTTCGGGA ACTTTTTGCA CGCACGCGAG
GGAGGACCTC GGATCGAGGA GGACGCGGCA CCTTACTAGC ACGGTGCACC CGCAAGGCCT TGA AAAACGT GCGTGCCTC
CTCTCGAATT TTGGCGCCCA GGGTCTGCGG AAGTCATTGC CAAATATAAG ATTCTTACG CAGGCGGGAA TCGAAGAAGG
GAGAGCTTAA AACCGCGGGT CCCAGACGCC TTCAGTAACG GTTTATATTC TAAGAAGTCG GTCCGCCCTT AGCTTCTTCC
-----
      dagA'
AGAACGATCG TGGTCAACCG ACGTGATCTC ATCAAGTGGG GTCCGTCGCG ACTCGGAGCA AGCTTGTATT CTATAGTGTC
TCTTGCTAGC ACCAGTTGGC TGCACTAGAG TAGTTCACCT CACGGCAGCG TGAGCCTCGT TCGAACATAA GATATCACAG
-----
      HindIII
      ~~~~~
```

Plasmidkarte pdagAHis6



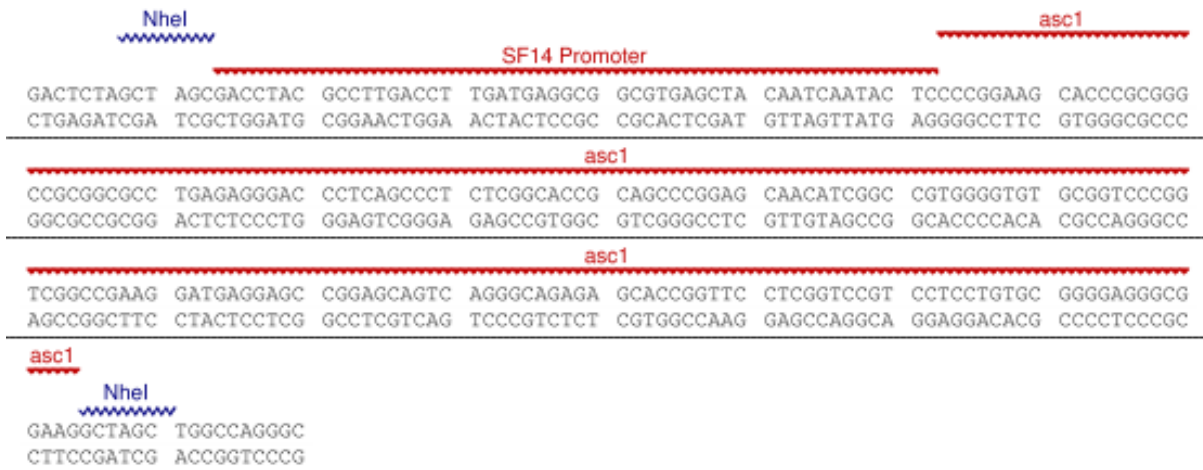
Plasmidkarte pL-kinUTR



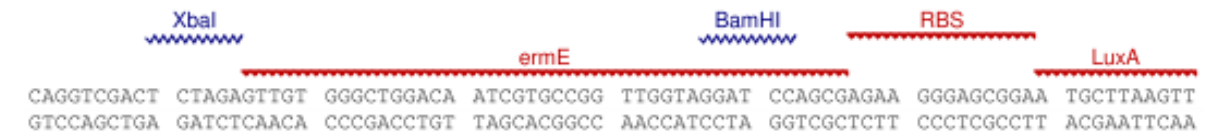
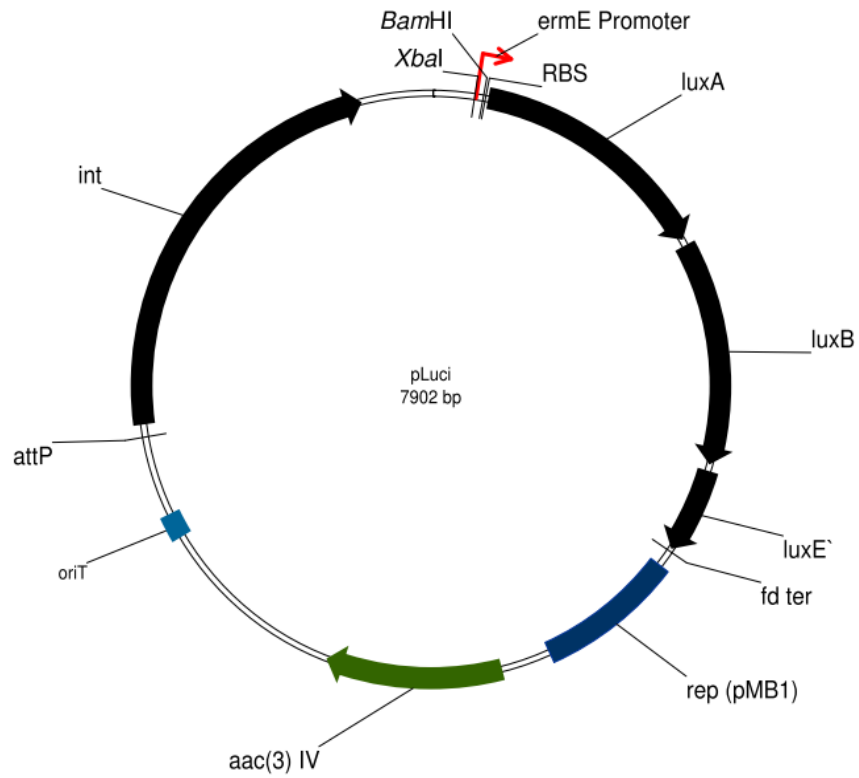
Ausschnitt aus pL-kinUTR-sc1. Das sc1 Regulon wurde mit NheI in das Plasmid pL-kinUTR kloniert.

sc1 5'UTR										
NheI										
CCTGCAGGTC	GACTCTAGCT	AGCGCCAACG	GGGTTAGGCT	TCTGGCGGCT	GCCCGGACGG	CGGTGCGGTC	GGCACAAGTA	GGACGTCCAG	CTGAGATCGA	TCGCGGTTGC
GGACGTCCAG	CTGAGATCGA	TCGCGGTTGC	CCCAATCCGA	AGACCGCCGA	CGGGCCTGCC	GCCACGCCAG	CCGTGTTTCA	GGTGTGTTGT	TGTTGCAGGT	GGCGTACCTG
sc1 5'UTR										
CCAACAACAA	ACAACGTCCA	CCGCATGGAC	ACGGTTAGTG	GTCTAGTCCA	CAATGGTTGC	TGAGGAACTG	ACCGTGTTC	GGTGTGTTGT	TGTTGCAGGT	GGCGTACCTG
GGTGTGTTGT	TGTTGCAGGT	GGCGTACCTG	TGCCAATCAC	CAGATCAGGT	GTTACCAACG	ACTCCTTGAC	TGGCACAAGT			
sc1										
sc1 5'UTR										
TCACGCAAGG	TGATCGTCAG	GCTTCCGCCC	TCCCGCACA	GGAGGACGGA	CCGAGGAACC	GGTGCTCTCT	GCCCTGACTG	AGTGCGTTCC	ACTAGCAGTC	CGAAGGCGGG
AGTGCGTTCC	ACTAGCAGTC	CGAAGGCGGG	AGGGGCGTGT	CCTCCTGCCT	GGCTCCTTGG	CCACGAGAGA	CGGGACTGAC			
sc1										
CTCCGGCTCC	TCATCCTTCG	GCCGACCGGG	ACCGCACACC	CCACGGCCGA	TGTTGCTCCG	GGCTGCGGTG	CCGAGAGGGC	GAGGCCGAGG	AGTAGGAAGC	CGGCTGGCCC
GAGGCCGAGG	AGTAGGAAGC	CGGCTGGCCC	TGGCGTGTGG	GGTGCCGGCT	ACAACGAGGC	CCGACGCCAC	GGCTCTCCCG			
sc1										
NheI										
TGAGGGTCCC	TCTCAGGCGC	CGCGGCCCGC	GGGTGCTTCC	GGGGCTAGCT	GGCCAGGGCC			ACTCCCAGGG	AGAGTCCGCG	GCGCCGGGCG
ACTCCCAGGG	AGAGTCCGCG	GCGCCGGGCG	CCCACGAAGG	CCCCGATCGA	CCGGTCCCGG					

Ausschnitt aus pL-kinUTR-asc1. asc1 wurde mit NheI in das Plasmid pL-kinUTR kloniert. Die Expression steuert der SF14 Promoter.



Plasmidkarte und Promoterregion von pLuci



- ANHANG -

ID	Strang	mit tap von	bis	laenge	ohne tap von	bis	laenge	gen vorher	gen nachher	ueberlappend sense / antisense	bemerkung
2	-				35039	35099	60	0042	0043		
3	-				44972	45027	55	0058	0059	0058 a	Nr. 4 selbe IGR
4	-	45071	45128	57				0058	0059		Nr. 3 selbe IGR
8	-	84822	84851	29				0101	0102		
10	+	158309	158363	54				0167	0168		
14	+	184865	184916	51				0193	0194		
18	-				202308	202326	18	0211	0212		
22	-	236725	236743	18				0246	0247		Nr. 21 selbe IGR as
24	+				279597	279630	33	0286	0287		
25	+	299154	299182	28				0304	0305		
26	+	302141	302163	22				0305	0306	0306 a	
28	-	310319	310347	28				0312	0313		as zu Operon Loch ?
29	+				387357	387430	73	0373	0374	0373 a	
31	+	395702	395908	206				0380	0381		as zu Nr.32
33	-	398816	398874	58				0382	0383		as zu Operon Loch ?
35	-				471223	471264	41	0451	0452		
36	-				482327	482348	21	0460	0461		
37	+				484265	484299	34	0462	0463		
40	+	537545	537595	50				0503	0504		
41	+	545745	545814	69				0509	0510	0510 komplett as	
42	+	553161	553249	88				0519	0520		
43	-	555961	555989	28				0523	0524		as zur RBS 0524
44	+	558727	558792	65				0526	0527		as zu 3'UTR 0527
46	-				559094	559144	50	0527	0528		
47	-				575093	575118	25	0541	0542		as zu unbek. Feature 3' von 0542
48	+	589932	589975	43				0549	0550		as zu Nr. 49
49	-	589932	589973	41				0549	0550		as zu Nr. 48
50	-	637222	637262	40				0595	0596		
51	+	639810	639837	27				0599	0600	0596 a	
52	+	647368	647389	21				0606	0607		
54	-	651435	651460	25				0611	0612		as zu Nr. 53
56	+	677033	677190	157				0635	0636		as zu Nr. 57
57	-	677033	677079	46				0635	0636		as zu Nr. 56
58	-				679467	679520	53	0637	0638		3' UTR ?
59	+	681905	681933	28				0640	0641		3' UTR? as zu Nr. 60
60	-	681922	681975	53				0640	0641	0641 a	as zu Nr. 59
61	+	717150	717185	35				0675	0676		
62	+	723137	723168	31				0680	0681		5' UTR ?
63	-	724547	724602	55				0681	0682		
64	-	736491	736522	31				0694	0695		as zu Operon Loch ?

- ANHANG -

ID	Strang	mit tap		laenge	ohne tap		laenge	gen vorher	gen nachher	ueberlappend senne / antisense	bemerkung
		von	bis		von	bis					
65	-				742178	742225	47	0700	0701		
67	-	743902	743961	59				0703	0704	0704 a	
68	+				745757	745810	53	0705	0706	0705 a	
69	-				764093	764142	49	0720	0721		
70	+				776418	776458	40	0733	0734		
71	+				779816	779889	73	0736	0737	0736 a	
72	+				789174	789246	72	0746	0747		
73	-	805811	805855	44				0760	0761		
74	-	806087	806167	80	806037	806167	130	0761	0762		3' UTR 0762 ?
75	-	809923	809945	22	809948	809987	39	0764	0765		
76	-				827109	827134	25	0779	0780		5' UTR ?
77	+	838865	838905	40	838829	838905	76	0791	0792		
78	+	899420	899500	80	899451	899498	47	0853	0854		
80	-				967752	967806	54	0921	0922		
82	-				1007238	1007260	22	0957	0958		
83	+	1008746	1008804	58	1008748	1008800	52	0958	0959		
84	+	1024446	1024464	18				0972	0973		
86	-	1054643	1054688	45				0998	0999		
87	-	1057038	1057069	31				1000	1001		
88	-				1059954	1060033	79	1004	1005		
89	-				1076855	1076900	45	1020	1021		Nr. 90 selbe IGR
90	-	1076923	1076989	66				1020	1021		Nr. 89 selbe IGR
91	+	1078484	1078550	66				1022	1023		
92	+	1087230	1087335	105				1028	1029		5' UTR ?
93	+	1100911	1100937	26				1044	1045		5' UTR ?
98	-	1161587	1161629	42	1161609	1161700	91	1103	1104		
99	+	1193304	1193364	60				1134	1135		
100	+	1205837	1205869	32	1205838	1205870	32	1146	1147		
101	+				1234783	1234828	45	1171	1172		5' UTR ?
102	+	1238546	1238592	46	1238544	1238590	46	1174	1175		
103	+				1265775	1265795	20	1193	1194		
104	+				1283231	1283269	38	1211	1212	1211 a	
106	-				1285307	1285327	20	1213	1214		Nr. 105 107 selbe IGR
107	+	1285400	1285427	27				1213	1214		Nr. 105 106 selbe IGR
109	+	1305808	1305857	49				1230	1231	1230 a	
113	-				1333678	1333703	25	1262	1263		
116	-				1363170	1363305	135	1290	1291	1291 a	
117	-				1385300	1385349	49	1307	1308		
118	-	1397462	1397484	22				1321	1322		5' UTR ?
119	-	1402527	1402557	30				1326	1327		

- ANHANG -

ID	Strang	mit tap von	bis	laenge	ohne tap von	bis	laenge	gen vorher	gen nachher	ueberlappend sense / antisense	bemerkung
120	-				1425395	1425431	36	1349	1350		
121	-				1437709	1437729	20	1359	1360		as zu : 3x degenerate repeat: CCTC(G/A)GACGTAGTCCGGCGGCCCGACCCCG
122	-	1440926	1441015	89	1440924	1441015	91	1362	1363		
123	-	1442177	1442207	30				1363	1364	1364 s	
125	+	1451590	1451702	112	1451590	1451693	103	1373	1374		3' UTR ?
126	-				1451738	1451761	23	1373	1374		Nr. 126 selbe IGR
127	-				1452420	1452439	19	1374	1375	1374 a	Nr. 125 selbe IGR
128	+	1452497	1452610	113	1452566	1452584	18	1374	1375		Nr. 128 selbe IGR
129	+				1452993	1453027	34	1375	1376		
132	-				1465198	1465249	51	1387	1388		
133	-	1467793	1467867	74				1388	1389		3' UTR oder Operon ?
139	-				1490402	1490420	18	1402	1403		as 5' UTR Nr. 138
141	-				1507545	1507573	28	1412	1413		
142	-	1509412	1509476	64	1509282	1509476	194	1413	1414		
143	-				1510073	1510109	36	1414	1415		5' UTR ?
145	+	1517814	1517834	20				1421	1422		
146	-				1519407	1519426	19	1423	1424		
147	+	1522823	1522866	43	1522822	1522870	48	1426	1427		5' UTR ?
148	-				1524419	1524524	105	1428	1429		
149	+	1529406	1529457	51	1529406	1529480	74	1433	1434		5' UTR ?
150	-				1539391	1539414	23	1443	1444		
151	+	1550066	1550105	39				1452	1453		sense zu : degenerate repeat 3x(A/G)TGGG(C/G)
153	+	1557828	1557860	32				1459	1460		
155	-				1577686	1577721	35	1475	1476		3' UTR ? Nr. 156 selbe IGR
157	-				1580459	1580514	55	1477	1478		5' UTR ?
160	-				1602540	1602572	32	1499	1500		
161	-	1606595	1606616	21	1606594	1606616	22	1503	1504		
162	-	1609839	1609863	24	1609728	1609864	136	1505	1506		
163	-				1623553	1623575	22	1507	1508		
164	-				1636263	1636298	35	1529	1530		
165	-	1639031	1639050	19				1531	1532		
167	+	1650810	1650849	39				1541	1542		Nr. 168,169 selbe IGR
169	-	1650988	1651067	79				1541	1542	1542 a	Nr. 167,168 selbe IGR
170	-	1652541	1652579	38				1543	1544		5' UTR ?
179	-	1662840	1662880	40				1553	1554		
181	-	1668144	1668163	19				1555	1556		5' UTR ?
182	-	1671900	1671970	70				1559	1560		Nr. 183 selbe IGR
183	-	1672044	1672072	28				1559	1560		Nr. 182 selbe IGR

- ANHANG -

ID	Strang	von	bis	mit tap laenge	von	bis	ohne tap laenge	gen vorher	gen nachher	ueberlappend sense / antisense	bemerkung
186	+	1704028	1704097	69				1593	1594		
187	-	1710266	1710296	30				1597	1598		
189	+	1711835	1711858	23				1600	1601		Nr. 188.190 selbe IGR
190	-	1711967	1712074	107	1711967	1712073	106	1600	1601		Nr. 188.189 selbe IGR
191	+				1713356	1713412	56	1602	1603		
192	-	1719722	1719775	53				1608	1609		
193	+	1744687	1744895	208				1630	1631	1630 a	
197	+	1760171	1760192	21				1646	1647		
198	-	1761835	1761968	133	1761833	1761936	103	1647	1648		5' UTR ? Nr. 199 selbe IGR
199	-	1761991	1762024	33	1767502	1767546	44	1647	1648		3' UTR ? Nr. 198 selbe IGR
201	-	1772717	1772757	40				1652	1653		
203	-	1795211	1795255	44				1656	1657		5' UTR ?
205	-							1674	1675		
208	+				1807280	1807305	25	1686	1687		G-rich repeat region
209	-	1816341	1816378	37				1694	1695		Nr. 210 selbe IGR
212	+	1843759	1843783	24				1723	1724		5' UTR ?
213	-	1875631	1875678	47				1753	1754		Nr. 214 selbe IGR as zu Nr. 214
214	+	1875657	1875700	43				1753	1754		Nr. 213 selbe IGR as zu Nr. 213
216	-	1881905	1881959	54				1760	1761		
217	-				1883494	1883524	30	1762	1763		
219	+	1887207	1887271	64				1767	1768		as zu 5' UTR Nr. 218
220	-				1892367	1892388	21	1772	1773		
221	-	1898402	1898448	46				1776	1777		
222	-	1916393	1916432	39				1791	SCOR04		20nt stem loop
226	+	1924368	1924433	65				1794	1795		
227	-				1924970	1924996	26	1795	1796		
228	-				1926101	1926157	56	1796	1797		
229	-	1926093	1926134	41	1927564	1927603	39	1798	1799		
230	-	1932927	1933171	244				1804	1805	1805 a	
232	+	1950867	1950948	81	1950867	1950942	75	1820	1821		
235	-	1993561	1993618	57				1859	1860		
237	+	2000442	2000464	22	2000421	2000463	42	1865	1866		
238	+				2001818	2001866	48	1867	1868		as zu Nr. 239
239	-				2001815	2001864	49	1867	1868		as zu Nr. 238
240	-	2006173	2006200	27	2006173	2006200	27	1871	1872		as zu Nr. 241
241	+	2006180	2006200	20				1871	1872		as zu Nr. 240
242	-	2027985	2028028	43				1893	1894		
244	-	2040544	2040932	388	2040544	2040934	390	1905	1906		
245	-	2050466	2050512	46	2050466	2050512	46	1915	1916	1915 a	
248	-	2064873	2064908	35				1932	1933		

- ANHANG -

ID	Strang	mit tap		ohne tap		laenge	gen vorher	gen nachher	ueberlappend sense / antisense	bemerkung
		von	bis	von	bis					
249	-	2077564	2077608	44			1943	1944		
251	-	2118877	2118959	82	2118877	2118959	1979	1980		
253	+	2120438	2120458	20			1982	1983		Nr. 252 selbe IGR
254	-	2125620	2125644	24	2125617	2125644	1986	1987		
256	+				2134769	2134796	1998	1999		
260	-				2170226	2170369	2024	2025		
261	-	2176460	2176532	72			2026	2027		
262	-	2177560	2177603	43	2177583	2177603	2027	2028		5' UTR ?
263	-	2190449	2190479	30			2039	2040		5' UTR ?
264	-	2199395	2199468	73			2151	2052		
269	+	2218448	2218514	66			2067	2068		
270	-				2225902	2225923	2074	2075		5' UTR ?
272	+	2235740	2235766	26	2235747	2235781	2082	2083		
273	-	2248679	2248759	80			2092	2093		
274	+	2249741	2249897	156			2093	2094		
275	-	2255339	2255437	98			2097	2098		5' UTR ?
276	-				2255284	2255438	154	2098		
277	-	2257986	2258061	75	2256413	2256455	42	2099		
278	-	2258131	2258212	81	2257983	2258060	77	2100		Nr. 278 selbe IGR
280	-				2258115	2258212	97	2100		Nr. 277 selbe IGR
282	-	2308522	2308771	249	2271017	2271051	34	2112		
285	-	2313554	2313583	29	2308641	2308771	130	2146		
286	+	2319452	2319547	95			2150	2151		
287	-						2156	2157		as zu Nr. 287
288	-				2319478	2319550	72	2156		as zu Nr. 286
290	-	2332831	2332909	78	2324731	2324826	95	2161		5' UTR ?
291	+	2344054	2344122	68	2332839	2332909	70	2168		
294	+	2362900	2362953	53			2179	2180		
296	-				2366335	2366365	30	2194		
297	+				2366432	2366452	20	2198		Nr. 297 selbe IGR
299	+				2374240	2374281	41	2209		Nr. 296 selbe IGR
300	-	2400300	2400321	21			2231	2232		
304	+	2424207	2424263	56			2256	2257		
305	+				2458925	2458992	67	2287		as zu 23nt stem loop
309	-	2490118	2490137	19	2490113	2490138	25	2318		as zu 5' UTR Nr. 310
311	+				2516679	2516738	59	2346		as zu Nr. 312
312	-	2516693	2516738	45			2346	2347		as zu Nr. 311
313	-	2517577	2517636	59			2347	2348		Nr. 314 selbe IGR
314	-				2517795	2517838	43	2347		Nr. 313 selbe IGR
315	-	2523141	2523176	35			2354	SCO110	2354 a	

ID	Strang	von		mit tap		laenge		von		ohne tap		laenge		gen vorher	gen nachher	ueberlappende sense / antisense	bemerkung
		von	bis	von	bis	von	bis	von	bis	von	bis						
316	-							2533503	2533524	21		2363	2364			2364 a	
317	-							2535350	2535410	60		2365	2366				
318	-	2537279	2537322	43		2537274	2537322	48				2367	2368				
319	-	2538581	2538615	34								2369	2370				
320	+	2539397	2539448	51								2370	2371				
321	+							2552066	2552145	79		2382	2383				
322	+	2563094	2563148	54								2390	2391				3' UTR ?
323	-	2563766	2563830	64								2391	2392				
324	-	2565902	2565943	41								2393	2394				
325	+	2600214	2600287	73		2600215	2600245	30				2425	2426				
327	+	2625429	2625658	229		2625462	2625625	163				2445	2446				5' UTR ?
328	+					2629372	2629442	70				2446	2447				
332	-	2647313	2647343	30							SC0113	2461	2461				5' UTR ?
334	-	2702360	2702391	31							2503	2504	2504				
336	-	2707223	2707300	77							2508	2509	2509				
337	-	2723809	2723946	137		2723809	2723849	40			2525	2526	2526				5' UTR ? Nr. 338 selbe IGR
338	+					2723964	2723987	23			2525	2526	2526				Nr. 337 selbe IGR
341	-					2747353	2747403	50			2548	2549	2549				
350	+	2804917	2804945	28							2591	2592	2592				
352	+							2812292	2812338	46		2595	2596				
354	+							2813000	2813018	18		2597	2598				
355	-							2818516	2818571	55		2599	2600				as zu Nr. 353
357	-							2834812	2834837	25		2610	2611				
358	-	2835955	2836014	59				2836145	2836188	43		2611	2612				Nr. 359 selbe IGR
359	-							2836686	2836706	20		2611	2612				Nr. 358 selbe IGR
360	-	2836685	2836706	21				2847500	2847550	50		2620	2613				
364	-							2847880	2847901	21		SC0116	SC0116				
366	-							2847880	2847901	21		SC0117	2621			SC0117 a	18 nt stem loop
368	+	2851860	2851881	21							2624	2625	2625				
369	-							2854033	2854078	45		2626	2627				Nr. 370 selbe IGR
370	+	2854039	2854085	46							2626	2627	2627				Nr. 369 selbe IGR
371	+	2860744	2860832	88		2860741	2860834	93			2633	2634	2634				
375	-	2886670	2886690	20							2655	2656	2656				
376	-	2895033	2895090	57							2662	2663	2663				
378	-	2918407	2918451	44							2677	2678	2678				
379	+	2929585	2929632	47							2685	SC0118	SC0118				
380	+					2960971	2961117	146			2716	2717	2717			2717 a	
381	-					2966577	2966658	81			2721	2722	2722				
382	-	2970217	2970237	20							2723	2724	2724				
383	+	2982224	2982500	276		2982224	2982506	282			2735	2736	2736				Nr. 384 selbe IGR

- ANHANG -

ID	Strang	mit tap		ohne tap		gen vorher		gen nachher		ueberlappend sense / antisense	bemerkung
		von	bis	laenge	von	bis	laenge	gen vorher	gen nachher		
384	+	2982570	2982745	175	2982570	2982669	99	2735	2736		Nr. 383 selbe IGR
387	-	2996357	2996439	82	2996404	2996439	35	2749	2750		
388	-	3001012	3001067	55				2753	2754		
389	+	3006738	3006766	28				2758	2759		
390	-				3016308	3016338	30	2765	2766		
391	-				3033235	3033271	36	2279	2280		
392	+	3047088	3047113	25	3046954	3047106	152	2791	2791		
395	-	3063758	3063811	53				2805	2806	Nr. 396 a	Nr. 396 selbe IGR
396	+	3063797	3063820	23				2805	2806	Nr. 395 a	Nr. 395 selbe IGR
397	+	3064665	3064739	74				2806	2807		
400	+	3082275	3082345	70	3082275	3082389	114	2821	2822		
401	-				3084178	3084230	52	2823	2824		
403	+	3094995	3095032	37				2835	SC0122		
405	-				3099422	3099475	53	2837	2838		
406	-	3100524	3100554	30				2838	2839		
407	-				3129611	3129630	19	2874	2875		
408	+	3134299	3134383	84				2878	2879		Nr. 408 selbe IGR
409	+	3134543	3134574	31				2878	2879		Nr. 407 selbe IGR
410	+	3137055	3137112	57				2881	2882		5' UTR ?
417	-	3174064	3174149	85				2923	2924		as zu many degenerate AAGGCC repeats
419	-	3204782	3204818	36				2948	2949		
420	-	3206703	3206752	49				2950	2951		
422	+	3208720	3208809	89	3208719	3208810	91	2951	2952		Nr. 421 selbe IGR
423	+	3211220	3211285	65				2952	2953		as zu Nr. 424
424	-	3211218	3211279	61	3211214	3211282	68	2952	2953		as zu Nr. 423
425	-	3217808	3217866	58				2959	2960		
427	-	3224017	3224040	23				2963	2964		
430	+	3230634	3230663	29	3230634	3230663	29	2969	2960		
431	-	3234651	3234689	38				2973	2974		
432	-				3236342	3236365	23	2974	2975		
434	-	3246742	3246766	24				2980	2981	2981 a	
435	-	3273862	3273912	50				2999	3000		
438	-				3283649	3283786	137	3009	3010		5' UTR ?
441	-	3302062	3302083	21	3302046	3302067	21	SC0109	3020		
442	+	3305073	3305115	42	3305067	3305115	48	3022	3023		
443	-	3306724	3306797	73				3023	3024		
444	-	3320593	3320639	46				3033	3034		
445	-				3321097	3321120	23	3034	3035		Nr. 446 447 selbe IGR
446	-	3321216	3321353	137				3034	3035		Nr. 445 447 selbe IGR
447	+	3321484	3321542	58	3321484	3321510	26	3034	3035		Nr. 445 446 selbe IGR

- ANHANG -

ID	Strang	mit tap		laenge	ohne tap			gen vorher	gen nachher	ueberlappend sense / antisense	bemerkung
		von	bis		von	bis	laenge				
449	+	3336541	3336640	99			3045	3046			
451	-	3348251	3348275	24	3348251	3348275	3053	3053			
453	+	3356847	3356910	63	3356847	3356931	3063	3064		Nr. 454 selbe IGR	
454	+	3357019	3357098	79	3357086	3357107	3063	3064		Nr. 453 selbe IGR	
457	+	3361649	3361673	24			3068	3069		Terminator ?	
458	+				3367627	3367653	3073	3074		stem loop	
459	-	3370090	3370220	130	3370156	3370220	3076	3077		as zu Nr. 460	
461	-	3380978	3380999	21			SCOT24	3088			
463	-	3386400	3386446	46			3091	3092			
464	+	3387877	3387937	60	3387885	3387937	3092	3092		5' UTR ? Nr. 465 selbe IGR	
465	+	3388022	3388041	19			3092	3092		Nr. 464 selbe IGR	
466	-	3391932	3391970	38			3096	3097		Nr. 467 selbe IGR	
467	-				3392014	3392064	3096	3097		Nr. 466 selbe IGR	
468	-				3408861	3408934	3109	3110			
469	-	3412315	3412385	70	3412338	3412385	3111	3112			
470	-	3418761	3418793	32			3116	3117			
476	-	3467138	3467183	45			3165	3166			
479	-	3483299	3483390	91			3177	3178			
481	+				3491275	3491338	3184	3185			
482	+	3492992	3493032	40	3492992	3493013	3185	3186			
484	+	3509991	3510032	41			3201	3202		Nr. 485 486 selbe IGR	
485	+				3510073	3510101	3201	3202		Nr. 484 486 selbe IGR	
486	-	3510095	3510126	31	3510095	3510186	3201	3202		Nr. 484 485 selbe IGR	
493	+				3543270	3543289	3229	3230		Nr. 492 selbe IGR	
494	-				3585739	3585790	3234	3235			
495	-	3588689	3588722	33			3236	3237		5' UTR ?	
496	+	3605516	3605553	37			3252	3253			
497	-				3610429	3610448	3260	3261		Nr. 498 selbe IGR	
498	-	3610551	3610610	59	3610546	3610567	3260	3261		Nr. 497 selbe IGR	
499	+	3613055	3613251	196			3262	3263		as zu Nr. 500	
500	-	3613207	3613317	110			3262	3263		as zu Nr. 499	
501	+	3616915	3616946	31	3616903	3616946	3270	3271			
502	+	3619562	3619587	25			3275	3276			
503	-	3634145	3634195	50	3634145	3634194	3285	3286			
504	-	3636270	3636308	38	3636269	3636308	3286	3287			
505	+	3639959	3640066	107	3639959	3640025	3290	3291			
507	-	3652147	3652209	62			3302	3303			
509	-	3665087	3665114	27	3665092	3665114	3313	3314			
510	-				3667970	3668010	3316	3317			
511	-	3673209	3673252	43	3673215	3673253	3320	3321		Nr. 512 513 selbe IGR	

- ANHANG -

ID	Strang	mit tap		laenge	ohne tap		laenge	gen vorher	gen nachher	ueberlappend sense / antisense	bemerkung
		von	bis		von	bis					
512	-	3673370	3673438	68	3673313	3673438	125	3320	3321		as zu Nr. 513 Nr. 511 513 selbe IGR
513	+				3673385	3673409	24	3320	3321		as zu Nr. 512 Nr. 511 512 selbe IGR
514	+	3675098	3675329	231	3675098	3675310	212	3322	3323		
515	-	3679785	3679813	28	3679786	3679809	23	3326	3327		
517	-	3680301	3680330	29	3680274	3680340	66	3328	3329		5' UTR ?
520	+	3691217	3691314	97	3691217	3691268	51	SC0r12	3334		
521	-	3698381	3698425	44				3340	3341		
523	-	3708214	3708265	51				3349	3350		3' UTR ?
525	-				3716819	3716845	26	3357	3358		
526	-	3722279	3722362	83				3364	3365		
528	-	3723622	3723673	51				3365	3366		Nr. 527 selbe IGR
532	-	3739269	3739352	83	3739305	3739352	47	3373	3374		
533	-	3740476	3740524	48				3375	3376		
535	+	3750255	3750290	35				3385	3386		
536	-	3760407	3760526	119				3395	3396		
538	-	3761802	3761850	48	3761806	3761850	44	3396	3397		as zu Nr. 537
539	+	3764087	3764124	37				3397	3398		
540	-	3770152	3770249	97				3404	3405		as zu Nr. 541
541	+				3770178	3770278	100	3404	3405		as zu Nr. 540
542	-	3775011	3775090	79				3408	3409		
543	-	3778470	3778507	37				3411	3412		
544	-	3786918	3786955	37				3420	3421		
545	-	3787841	3787865	24				3421	3422		
546	-	3799105	3799147	42	3799083	3799143	60	3436	3437		Nr. 547 selbe IGR
547	-	3799258	3799369	111				3436	3437		Nr. 546 selbe IGR
548	-				3808110	3808129	19	3444	3445		
549	+	3821524	3821568	44				3470	3471		3470 a
550	-				3883750	3883803	53	3514	3515		
551	+	3904793	3904821	28				3536	3537		
556	-	3924683	3924715	32				3549	3550		Nr. 555 selbe IGR
557	-	3933527	3933668	141	3933527	3933629	102	3557	3558		
558	+	3934693	3934919	226	3934693	3934919	226	3558	3559		
559	+	3943300	3943365	65				3563	3564		
560	-	3950070	3950118	48				3570	3571		Nr. 561 selbe IGR
564	-	3957803	3957847	44				3579	3580		Nr. 565 selbe IGR
565	-	3958028	3958181	153	3958068	3958181	113	3579	3580		Nr. 564 selbe IGR
566	-	3979710	3979782	72				3602	3603		
574	-	4006743	4006818	75				3628	3629		
575	-	4008304	4008329	25				3629	3630		
577	+	4013796	4013853	57				3635	3636		

- ANHANG -

ID	Strang	mit tap		laenge	ohne tap		laenge	gen vorher	gen nachher	ueberlappend sense / antisense	bemerkung
		von	bis		von	bis					
578	-	4028828	4028852	24				3649	3650		
579	-				4033388	4033411	23	3654	3655		
583	-				4048385	4048445	60	3667	3668		
585	-	4061887	4061946	59				3678	SC0130		Nr. 586 selbe IGR
586	-				4061988	4062018	30	3678	SC0130		Nr. 585 selbe IGR
590	+				4067670	4067762	92	3684	3685		5' UTR ?
591	-				4070888	4070960	72	3688	3689		
592	-	4091094	4091245	151	4091223	4091245	22	3715	3716		
594	-				4105281	4105299	18	3730	3731		as zu Nr. 593
597	-				4120129	4120170	41	3749	3750		
598	+				4128934	4128979	45	3755	3756	3756 a	
600	-				4140164	4140188	24	3765	3766		
601	+	4141343	4141392	49	4141343	4141386	43	3766	3767		
604	+				4186627	4186658	31	3807	3808		Nr. 605 selbe IGR
605	+	4186679	4186801	122	4186679	4186703	24	3807	3808		Nr. 604 selbe IGR
607	-	4200503	4200542	39				3820	3821		Nr. 608 selbe IGR
608	+	4200647	4200689	42	4200646	4200683	37	3820	3821		
610	+	4226855	4226874	19				SC0131	3843		Nr. 607 selbe IGR
611	+				4227007	4227033	26	SC0131	3843		as zu Nr. 609 Nr. 611 612 selbe IGR
612	+	4227103	4227165	62				SC0131	3843		Nr. 610 612 selbe IGR
614	+	4239193	4239213	20				3853	3854		
615	+	4241419	4241488	69				3856	3857		
616	-	4243354	4243384	30				3858	SC0132		
619	+	4257983	4258030	47	4257985	4258031	46	3869	3870		
622	-	4259941	4259964	23				SC0133	3872		Nr. 621 selbe IGR
623	-	4265483	4265574	91				3874	3875		
624	-	4268497	4268537	40				3877	3878		
625	+	4269940	4270004	64				3878	3879		as zu Nr. 626
626	-				4269994	4270017	23	3878	3879		as zu Nr. 625
627	-				4270053	4270074	21	3878	3879		Nr. 628 629 selbe IGR
628	-	4270139	4270243	104				3878	3879		Nr. 627 629 selbe IGR
629	+	4270687	4270775	88				3878	3879		
630	+	4272736	4272773	37				3879	3880		
632	+	4272883	4272990	107	4272963	4273011	48	3879	3880	3879 a	
633	+	4279232	4279280	48				3887	3888		
634	-	4281567	4281614	47				3890	3891		
635	-	4285078	4285122	44				3893	3894		
636	-	4295576	4295598	22				3900	3901		Nr. 637 selbe IGR
637	+	4295791	4295839	48				3900	3901		Nr. 636 selbe IGR
638	+				4298625	4298677	52	3901	3902		

- ANHANG -

ID	Strang	mit tap		ohne tap		gen vorther	gen nachther	ueberlappend sense / antisense	bemerkung
		von	bis	laenge	von				
641	-	4303093	4303145	52		3095	3906		as zu Nr. 640
642	-	4312819	4312842	23		3916	3917		
643	+	4315358	4315484	126	4315358	3919	3940		
644	+	4318070	4318109	39		3923	3924		
646	+	4323842	4324023	181	4323897	3928	3929		Nr. 647 648 selbe IGR
647	-				4324185	3928	3929		Nr. 646 648 selbe IGR
648	+				4324389	3928	3929		Nr. 646 647 selbe IGR
649	-	4326703	4326774	71	4326704	3930	3931		
650	-	4336388	4336433	45		3940	3941		
651	+	4337721	4337812	91		3941	3942		
652	-				4339447	3943	3944		Nr. 653 selbe IGR
654	+	4359568	4359620	52	4359568	3959	3960		
655	-				4367958	3966	3967		
656	+	4372114	4372192	78		3970	3971		
657	-				4373683	3971	3972		Nr. 658 selbe IGR
658	+	4373868	4374017	149		3971	3972		Nr. 657 selbe IGR
659	-	4375708	4375752	44	4375704	3973	3974		
660	-	4376864	4376916	52		3974	3975		
662	+	4388910	4389012	102		3991	3992	3991 a	
663	+	4392026	4392069	43		3997	3998		
664	-	4393905	4393959	54		3998	3999		
665	+	4396795	4396844	49		4001	4002		
669	-	4407762	4407795	33		SC0135	SC0136		as zu Nr. 668
671	+	4409011	4409052	41		4012	4013	SC0136 a	
672	-	4430632	4430651	19	4430625	4033	4034		
674	+	4440574	4440594	20		4048	4049		
675	-	4451566	4451619	53	4451566	4059	4060		
676	-	4452105	4452168	63	4452108	4060	4061		
677	+	4452713	4452734	21		4061	4062	4061 a	
679	-	4460917	4460967	50		4068	4069		as zu Nr. 680
683	-	4470016	4470149	133	4470009	SC0140	4076		
684	-	4470592	4470666	74		4076	4077		
685	-	4482024	4482062	38		4087	4088		
687	+				4484877	4090	4091		Nr. 688 689 selbe IGR
688	+	4485055	4485135	80	4485137	4090	4091		Nr. 687 689 selbe IGR
690	-	4485863	4485885	22		4091	4092		
694	-	4492736	4492756	20		4093	4094		
695	+	4494009	4494098	89	4494011	4095	4096		
698	+	4507126	4507163	37		4107	4108		
699	+	4508408	4508455	47		4108	4109		

- ANHANG -

ID	Strang	mit tap		laenge	ohne tap		laenge	gen vorher	gen nachher	ueberlappende sense / antisense	bemerkung
		von	bis		von	bis					
700	-				4512211	4512237	26	4112	4113	4112 a	Nr. 701 selbe IGR
702	+				4515080	4515100	20	4114	4115	4114 a	Nr. 703 704 705 selbe IGR
704	+	4515318	4515426	108	4515318	4515426	108	4114	4115		Nr. 702 703 705 selbe IGR
705	+				4515625	4515651	26	4114	4115		Nr. 702 703 704
706	+				4523447	4523471	24	4117	4118		
707	+	4524409	4524455	46				4118	4119		
709	-	4545677	4545855	178				4131	4132		as zu Nr. 710
710	+				4545730	4545843	113	4131	4132		as zu Nr. 709
712	-	4549961	4550070	109				4134	4135		
713	+	4551104	4551240	136				4135	4136		
714	-				4553539	4553621	82	4138	4139		
716	-	4577134	4577179	45	4577134	4577179	45	4159	4160		
717	+	4580774	4580833	59	4580774	4580933	159	4163	4164		
721	+	4596982	4597036	54				4186	4187		as zu Nr. 722
724	-	4608512	4608534	22				4199	4200		
725	+				4608955	4608992	37	4200	4201		3x conserved repeat unit: CGGGCGGCTCAGGCCGTCGGTCCAGCAGGA
726	-	4610714	4610746	32				4201	4202		
729	-	4635247	4635271	24				4230	4231		
730	-	4636094	4636112	18				4231	4232		
731	+	4637292	4637336	44	4637283	4637327	44	4232	4233		
732	-				4637348	4637392	44	4232	4233		
733	+				4637423	4637468	45	4232	4233		as zu Nr. 734
734	-	4637452	4637492	40	4637438	4637466	28	4232	4233		as zu Nr. 733
735	-	4646323	4646396	73				4240	SC0147		as zu Nr. 736
736	+	4646376	4646451	75				4240	SC0147		as zu Nr. 735
741	-	4674417	4674452	35				4260	4261		Nr. 742 selbe IGR
742	-	4674466	4674543	77				4260	4261		Nr. 741 selbe IGR
746	+				4710814	4710858	44	4295	4296		Nr. 747 selbe IGR
748	-	4727135	4727189	54				4315	4316		
749	-	4729331	4729385	54	4729325	4729384	59	4316	4317		5' UTR ?
750	+	4729789	4729884	95				4317	4318		
753	+				4741580	4741620	40	4329	4330		
754	-	4759779	4759797	18				4345	4346		
756	+	4788414	4788467	53				4373	4374		
757	-	4805579	4805789	210	4805579	4805789	210	4388	4389		
758	+	4811627	4811647	20				4394	4395		Nr. 759 selbe IGR
759	-				4811744	4811763	19	4394	4395		Nr. 758 selbe IGR
761	+	4829513	4829578	65	4829514	4829574	60	4411	4412		
762	-	4842637	4842714	77	4842721	4842750	29	4425	4426		

- ANHANG -

ID	Strang	mit tap		laenge	ohne tap		gen vorher	gen nachher	ueberlappend sense / antisense	bemerkung
		von	bis		von	bis				
763	-	4862445	4862472	27	4864529	4864551	4439	4440		
765	-						4441	4442		
766	+	4865863	4865902	39			4443	4444	4443 a	as zu 5' UTR
767	-	4880218	4880272	54			4457	4458		
769	+	4893759	4893835	76	4893840	4893888	4474	4475		
770	+				4899161	4899205	4479	4480		
771	+	4899988	4900024	36			4480	4481		
772	+	4916254	4916297	43	4916271	4916294	4497	4498		
773	-				4916334	4916368	4497	4498		
774	+	4916377	4916525	148			4497	4498		
777	-	4926005	4926107	102	4926031	4926107	4505	4506		5' UTR ?
778	+	4933736	4933777	41			4508	4509		5' UTR ?
780	+	4976468	4976513	45			4558	4559		5' UTR ?
783	-	5019502	5019529	27			4595	4596		Nr. 782 selbe IGR
784	+				5037357	5037376	4612	4613		
788	-	5055057	5055172	115	5055055	5055158	4631	SCOp01		SCOp01 = attB Phagen Attachment Site
789	-	5061118	5061144	26			4634	SCOr49		
794	+	5062770	5062842	72			4637	4638		
799	+	5072701	5072751	50	5072700	5072751	4647	4648		
801	+	5077503	5077558	55			4653	4654		
803	+	5088759	5088834	75	5088759	5088859	4658	4659		
805	+	5092007	5092060	53	5092007	5092054	47	4661		
806	+	5108122	5108205	151	5108122	5108273	4676	4677	4677 a	as zu Nr. 807
809	-				5108888	5108934	4677	4678		as zu Nr. 808
812	-				5111859	5111950	4682	4683	4682 a	as zu Nr. 811
813	+	5113413	5113449	36	5113412	5113447	4683	4684		Nr. 814 815 selbe IGR
814	-				5113473	5113498	4683	4684		Nr. 813 815 selbe IGR
817	-				5113954	5113984	4684	4685		as zu Nr. 816
819	-	5115564	5115588	24			4685	4686		as zu Nr. 818
822	-	5116753	5116788	35	5116750	5116771	4688	4689		
823	-	5116812	5117055	243	5116812	5117055	4688	4689		as zu Nr. 824
824	+				5116963	5117057	4688	4689		as zu Nr. 823
825	+				5117596	5117614	4689	4690		as zu Nr. 826
826	-				5117593	5117612	4689	4690		as zu Nr. 825
830	+				5121060	5121094	4696	4697		
832	-	5123851	5123870	19	5123851	5123870	4698	4699	4698 s 4699 a	as zu Linker im Operon
833	+	5127140	5127161	21			4700	4701		
834	+	5127282	5127536	254			4700	4701		as zu Nr. 835
835	-				5127278	5127296	4700	4701		as zu Nr. 834
836	+	5133041	5133082	41	5133041	5133089	4711	4712		

- ANHANG -

ID	Strang	mit tap		laenge	ohne tap		gen vorher	gen nachher	ueberlappend sense / antisense	bemerkung
		von	bis		von	bis				
840	+				5137412	5137472	60	4721	4722	Nr. 841 selbe IGR
841	+				5137568	5137586	18	4721	4722	Nr. 840 selbe IGR
843	+				5140675	5140696	21	4724	4725	as zu Nr. 844
844	-				5140674	5140696	22	4724	4725	as zu Nr. 843
847	-				5142293	5142321	28	4728	4729	au zu Nr. 846
848	+				5144055	5144169	114	4730	4731	Linker in Operon ?
852	+				5179611	5179654	43	4767	4768	
855	+				5185701	5185725	24	4772	4773	
857	+				5194376	5194418	42	4776	4776	Nr. 858 selbe IGR
859	+				5197629	5197650	21	4778	4779	
860	-				5204236	5204293	57	4783	4784	Nr. 861 selbe IGR
861	-				5204393	5204413	20	4783	4784	Nr. 860 selbe IGR
862	-				5204855	5204982	127	4784	4785	5' UTR ?
863	-				5215310	5215375	65	4793	4794	
864	-				5221136	5221179	43	4797	4798	
865	+				5224226	5224260	34	4799	4800	as zu Nr. 866
866	-				5224234	5224319	85	4799	4800	as zu Nr. 865
867	+				5224380	5224464	84	4799	4800	Nr. 865 866 selbe IGR
868	+				5234868	5234908	40	4807	4808	
869	-				5241089	5241120	31	4812	4813	Nr. 870 selbe IGR
870	-				5241186	5241211	25	4812	4813	Nr. 869 selbe IGR
872	-				5255401	5255442	41	4825	4826	Nr. 873 selbe IGR
873	+				5255564	5255595	31	4825	4826	Nr. 872 selbe IGR
874	+				5257257	5257339	82	4826	4827	
877	-				5294119	5294140	21	4865	4866	
878	-				5315477	5315566	89	4882	4883	Nr. 879 selbe IGR
881	-				5336268	5336329	61	4902	4903	3' UTR ?
882	+				5340510	5340533	23	4907	4908	
883	+				5341347	5341369	22	4908	4909	
884	+				5349055	5349120	65	4915	4916	
886	+				5355184	5355227	43	4920	4921	possible stem loop. Score 57: 19/19 (100%) matches, 0 gaps
888	-				5367513	5367543	30	4932	4933	possible stem loop. Score 65: 27/28 (96%) matches, 1 gaps
889	+				5368512	5368567	55	4933	4934	
891	+				5380011	5380061	50	4945	4946	Nr. 890 selbe IGR
893	-				5395877	5395920	43	4960	4961	
894	-				5396541	5396563	22	4961	4962	
896	+				5400607	5400632	25	4965	4966	
897	+				5405873	5405903	30	4969	4970	as zu Linker im Operon ?

– ANHANG –

ID	Strang	mit tap		ohne tap		gen vorher	gen nachher	ueberlappend sense / antisense	bemerkung
		von	bis	laenge	von	bis	laenge		
898	+				5418156	5418251	95		
899	-	5420770	5420816	46					4980
900	+	5421144	5421162	18					4982
901	-	5421136	5421185	49	5421140	5421186	46		4982
904	-	5443056	5443098	42					5004
906	+				5453662	5453679	17		5017
907	+	5462580	5462627	47	5462580	5462607	27		5028
908	+	5464551	5464575	24	5464551	5464737	186		5028
909	+	5465535	5465569	34					5029
910	-				5479748	5479780	32		5040
911	-	5488115	5488150	35					5047
912	+				5501696	5501734	38		5061
913	+				5516265	5516288	23		5073
916	+				5528013	5528047	34		5084
918	-				5528859	5528877	18		5085
921	-	5536333	5536392	59					5094
923	-				5556465	5556497	32		5111
925	-	5569414	5569472	58	5569414	5569471	57		5121
926	+	5571770	5571828	58	5571770	5571790	20		5122
927	+	5583241	5583302	61					5135
928	-	5589585	5589625	40					5141
930	+	5592666	5592695	29					5145
931	+	5593465	5593537	72	5593465	5593586	121		5146
932	+	5593587	5593686	99	5593587	5593686	99		5146
933	+	5598133	5598216	83					5150
935	-	5602219	5602262	43					5154
936	-	5604864	5604928	64	5604895	5604988	93		5157
937	-				5605047	5605099	52		5157
938	-	5605131	5605294	163					5157
939	+	5605253	5605282	29					5157
940	-	5614962	5614991	29					5166
941	-	5615135	5615153	18					5166
942	-				5615273	5615314	41		5166
943	+	5616243	5616310	67					5167
945	-				5617964	5617983	19		5170
947	-				5626412	5626430	18		5177
948	+	5634455	5634493	38					5182
949	-	5634497	5634543	46					5182
								5178 a	5183

- ANHANG -

ID	Strang	mit tap		laenge	ohne tap		laenge	gen vorher		gen nachher	ueberlappende sense / antisense	bemerkung
		von	bis		von	bis		gen vorher	gen nachher			
950	-	5644358	5644391	33				5186	5187			probable stemloop. Score 56: 20/21 (95%) matches; 0 gaps
952	+	5659375	5659422	47		5659447	78	5201	5202			
953	+	5664669	5664703	34				5205	5205			Terminator der tRNA ?
955	-	5670068	5670197	129				5210	5211			5' UTR ?
956	+					5675004	89	5215	5216			
958	+	5678981	5679008	27				5219	5220			
959	-					5701664	17	5239	5240			
961	-					5702230	21	5240	5241			
962	+					5702352	62	5240	5241			Nr. 960 962 selbe IGR Nr. 960 961 selbe IGR
964	+	5712433	5712462	29		5712388	70	5250	5251			
965	-	5714662	5714686	24				5254	5255			5' UTR ?
966	-	5719519	5719596	77				5260	5261			Nr. 967 selbe IGR
967	+	5719657	5719693	36				5260	5261			Nr. 966 selbe IGR
968	-					5755853	33	5283	5284			
969	+	5761888	5762007	119				5288	5289			
970	-	5778733	5778782	49				5305	5306			
972	-	5814786	5814861	75				5345	5346		5346 a	
975	+	5824639	5824685	46				5355	5356			Nr. 976 selbe IGR
977	+	5825846	5825947	101			230	5356	5357			as zu Nr. 978 Nr. 979 selbe IGR
978	-					5825938	17	5356	5357			as zu Nr. 977 Nr. 979 selbe IGR
980	+	5836644	5836696	52				5365	5366			
981	+	5837260	5837393	133			75	5366	5367			
982	+					5840090	63	5370	5371			
985	+	5844671	5844691	20		5844671	59	5374	5375			
986	+	5854073	5854132	59				5385	5386			
987	+					5858800	53	5389	5390			
988	-	5862644	5862679	35				5393	5394			
990	-	5869926	5869988	62		5869926	62	5397	5398			
991	+	5873048	5873117	69				5400	5401			
992	+	5888395	5888538	143		5888494	23	5418	5419			
993	+	5911289	5911373	84				5436	5437			
994	+					5912217	31	5438	5439			5' UTR ? as zu Nr. 995
995	-	5912207	5912257	50				5438	5439			as zu Nr. 994
998	-	5961987	5962095	108				5475	5476		5439 a 5476 a	
999	+					5968679	45	5480	5481			
1001	+	5981029	5981147	118				5494	5495			
1002	+	5988496	5988562	66				5501	5502			
1003	+	6002909	6003012	103		6002909	108	5511	5512			
1004	+	6006756	6006812	56				5514	5515			

- ANHANG -

ID	Strang	mit tap		laenge	ohne tap		laenge	gen vorher	gen nachher	ueberlappend sense / antisense	bemerkung
		von	bis		von	bis					
1006	+	6014969	6014992	23				5520	5521		Nr. 1005 selbe IGR
1007	+				6015185	6015250	65	5521	5522		Linker in Operon ?
1008	+	6016340	6016376	36	6016323	6016382	59	5522	5523		
1009	+	6023430	6023541	111	6023451	6023544	93	5528	5529		
1011	-	6044587	6044618	31				5544	5545		5' UTR ? Nr. 1012 1013 selbe IGR
1012	-	6044627	6044664	37				5544	5545		Nr. 1011 1013 selbe IGR
1013	+	6045079	6045153	74	6045079	6045147	68	5544	5545		Nr. 1001 1012 selbe IGR
1016	+	6051887	6051928	41				5552	5553		
1017	+	6054116	6054145	29				5554	5555		hairpin_loop with 17bp stem
1018	+	6054640	6054681	41				5555	5556		
1019	-				6059984	6060006	22	5561	5562		Nr. 1020 selbe IGR
1020	+	6060008	6060119	111				5561	5562		Nr. 1019 selbe IGR
1022	-	6062282	6062401	119	6062343	6062401	58	5564	5565		5' UTR ?
1024	+	6074168	6074220	52	6074181	6074219	38	5576	5577		
1025	+	6074232	6074255	23				5576	5577		as zu Nr. 1026
1026	-				6074231	6074256	25	5576	5577		as zu Nr. 1025
1027	-				6074049	6074137	88	5576	5577		
1028	+				6074292	6074505	213	5576	5577		
1029	-				6074572	6074606	34	5576	5577		
1030	+	6074660	6074708	48				5576	5577		as zu Nr. 1031
1031	-	6074684	6074739	55	6074698	6074739	41	5576	5577		as zu Nr. 1030
1033	+	6080016	6080056	40				5578	5579		Nr. 1034 selbe IGR
1034	+	6080070	6080100	30				5578	5579		Nr. 1033 selbe IGR
1035	-	6083825	6083946	121				5581	5582		Nr. 1036 selbe IGR
1036	+	6084050	6084174	124	6084050	6084153	103	5581	5582		Nr. 1035 selbe IGR
1037	+	6085733	6085814	81	6085733	6085814	81	5582	5583		
1039	+				6091960	6091993	33	5586	5587		Terminator ? hairpin loop with 22/23 bp stem
1040	+	6097063	6097143	80	6097063	6097092	29	5590	5591		as zu Nr. 1041
1041	-				6097025	6097062	37	5590	5591		as zu Nr. 1040
1042	+	6099370	6099415	45				5594	5595		3' UTR ?
1044	+	6102676	6102718	42				5598	5599		
1047	-	6110487	6110688	201	6110660	6110687	27	5610	5611		
1048	+	6125400	6125459	59	6125400	6125461	61	5625	5626		Nr. 1049 selbe IGR
1049	+				6125489	6125527	38	5625	5626		Nr. 1948 selbe IGR
1050	-	6131021	6131079	58				5629	5630		5' UTR ? Nr. 1051 1052 selbe IGR
1051	+				6131338	6131386	48	5629	5630		as zu Nr. 1052
1052	-				6131339	6131399	60	5629	5630		as zu Nr. 1051
1054	+				6144136	6144154	18	5645	5646		
1055	-	6149823	6149849	26				5650	5651		
1057	-	6176284	6176412	128	6176370	6176412	42	5675	5676		

- ANHANG -

ID	Strang	von	bis	laenge	mit tap	von	bis	laenge	ohne tap	von	bis	laenge	gen vorher	gen nachher	ueberlappend sense / antisense	bemerkung
1058	-	6186457	6186576	119									5682	5683		
1063	-	6221499	6221568	69		6221531	6221570	39	6221570	6221570	39	5709	5710	5711		
1065	+					6225925	6225972	47				5735	5736	5737		
1068	+	6259063	6259117	54								5736	5737	5737		Nr. 1070 selbe IGR
1069	+	6259496	6259539	43		6259581	6259703	122	6259703	6259703	122	5736	5737	5737		Nr. 1069 selbe IGR
1070	+	6259589	6259636	47		6269576	6269702	126	6269702	6269702	126	5745	5746	5746		Nr. 1073 selbe IGR
1072	+					6269851	6269984	133	6269984	6269984	133	5745	5746	5746		Nr. 1072 selbe IGR
1073	+											5750	5751	5751		
1075	+	6289046	6289106	60								5755	5756	5756		
1078	+	6293476	6293525	49								5769	5770	5770		
1079	+	6307937	6307963	26								5772	5773	5773		
1080	-	6309887	6310031	144								5793	5794	5794		
1082	+					6330214	6330246	32	6330246	6330246	32	5802	5803	5803		
1084	-	6345578	6345617	39		6345580	6345653	73	6345653	6345653	73	5803	5804	5804		
1085	-					6346564	6346639	75	6346639	6346639	75	5809	5810	5810		
1086	+	6353795	6353845	50		6353800	6353869	69	6353869	6353869	69	5814	5815	5815		
1087	-	6358843	6358966	123								5820	5821	5821		Nr. 1088 selbe IGR
1089	+	6369263	6369289	26								5821	5822	5822		as zu Nr. 1091
1090	-	6370296	6370788	492		6370544	6370601	57	6370601	6370601	57	5821	5822	5822		as zu Nr. 1090
1091	+					6370722	6370740	18	6370740	6370740	18	5827	5828	5828		3' UTR?
1092	+					6377956	6377993	37	6377993	6377993	37	5840	5841	5841		
1094	+	6393913	6394027	114		6393976	6394029	53	6394029	6394029	53	5855	5856	5856		
1096	-	6412335	6412511	176		6412354	6412510	156	6412510	6412510	156	5861	5862	5862		Nr. 1098 selbe IGR
1097	-	6419058	6419107	49		6419234	6419260	26	6419260	6419260	26	5861	5862	5862		Nr. 1097 selbe IGR
1098	+	6419234	6419265	31		6421225	6421242	17	6421242	6421242	17	5863	5864	5864		Nr. 1100 selbe IGR
1099	+											5863	5864	5864		Nr. 1099 selbe IGR
1100	+					6421334	6421410	76	6421410	6421410	76	5920	5921	5921		hairpin loop with 19/20 bp stem Terminator von 5921 ?
1103	-	6489557	6489574	17								5921	5922	5922		5' UTR ?
1104	-	6489860	6489982	122		6489886	6489981	95	6489981	6489981	95	5929	5930	5930		5' UTR ?
1105	+	6498253	6498285	32		6517291	6517390	99	6517390	6517390	99	5948	5949	5949		
1106	+	6517291	6517390	99								5998	5999	5999		as zu Nr. 1109
1110	-	6575137	6575212	75								5999	6000	6000		
1111	+	6578132	6578205	73								6003	6004	6004		
1112	-	6580108	6580142	34								6011	6012	6012		hairpin with 19/20 bp stem Terminator von 6011 ?
1113	+					6592958	6593000	42	6593000	6593000	42	6056	6057	6057		
1115	-					6648944	6648966	22	6648966	6648966	22	6061	6062	6062		
1116	+					6654082	6654107	25	6654107	6654107	25	6083	6084	6084		
1117	+					6682708	6682740	32	6682740	6682740	32	6088	6089	6089		5' UTR ?
1118	+	6687700	6687838	138												

- ANHANG -

ID	Strang	mit tap		laenge	ohne tap		laenge	gen vorher	gen nachher	ueberlappend sense / antisense	bemerkung
		von	bis		von	bis					
1120	-				6692313	6692360	47	6091	6092		5' UTR Nr. 1121 selbe IGR
1121	+				6692628	6692647	19	6091	6092		Nr. 1120 selbe IGR
1122	-				6696832	6696850	18	6096	6097		Nr. 1123 selbe IGR
1123	-	6696982	6697062	80	6702582	6702610	28	6096	6097		3' UTR? Nr. 1122 selbe IGR
1124	-				6702634	6702704	70	6102	6103		Nr. 1125 1126 selbe IGR
1125	-							6102	6103		Nr. 1124 1126 selbe IGR
1126	-	6702740	6702818	78	6706606	6706666	60	6105	6106		Nr. 1124 1125 selbe IGR
1127	+	6706584	6706666	82				6105	6106		as zu Nr. 1128
1131	+	6754916	6754937	21	6760562	6760585	23	6153	6154		
1132	+							6157	6158	6158 a	
1134	-	6765565	6765609	44				6161	6162		
1135	+	6773663	6773739	76				6169	6170		
1136	-				6777811	6777918	107	6172	6173	6173 a	
1139	+	6889566	6889617	51				6263	6264		5' UTR ?
1141	-				6891248	6891270	22	6265	6266		as zu Nr. 1140
1142	-	6932031	6932051	20				6275	6276		
1143	+	6937783	6937869	86	6937824	6937868	44	6279	6280		Nr. 1144 selbe IGR
1145	+	6939760	6939778	18	6939725	6939795	70	6280	6281		
1146	-	6941661	6941695	34				6281	6282		
1149	-	6946404	6946426	22				6286	6287		
1150	-	6953444	6953486	42				6293	6294		
1151	-	6971494	6971550	56				6310	6311	6311 a	
1154	+				7019062	7019080	18	6357	6358		
1155	+	7037644	7037692	48				6374	6375		
1156	-				7041258	7041275	17	6377	6378		
1157	-	7045479	7045561	82				6381	6382		
1158	+				7054767	7054902	135	6387	6388		
1159	+				7068909	7068941	32	6403	6404		
1163	+				7155411	7155449	38	6466	6467		
1164	-				7163367	7163396	29	6473	6474		
1165	-	7166510	7166624	114				6475	6476		
1167	-	7174850	7174902	52				6483	6484		
1169	-				7199171	7199224	53	6508	6509	6508 a	as zu Nr. 1168
1171	+	7267200	7267224	24				6564	6565		
1174	+				7300933	7300954	21	SC0162	6589		
1175	+				7326196	7326215	19	6604	6605		
1176	+	7343041	7343111	70				6621	6622		
1178	-				7347522	7347543	21	6634	6625		Nr. 1179 selbe IGR
1179	-	7347581	7347602	21				6634	6625		Nr. 1178 selbe IGR
1180	-				7358549	7358586	37	6630	6631	6630 a	as zu Terminator

- ANHANG -

ID	Strang	mit tap		ohne tap	gen vorher	gen nachher	ueberlappend sense / antisense	bemerkung
		von	bis					
1183	+	7445149	7445202		6694	6695		
1184	-	7467541	7467604	7467539	6712	6713	6712 a	
1185	-	7471699	7471744		6717	6718		5' UTR ?
1186	+	7482779	7482836		6729	6730		
1187	-	7499403	7499466	7499410	6742	6743		3' UTR ?
1189	+			7513854	6756	6757		
1190	+	7520633	7520677		6763	6764		as zu Nr. 1191
1191	-	7520638	7520686		6763	6764		as zu Nr. 1190
1192	+	7564426	7564448	7564428	6804	6805		
1194	+	7568116	7568267		6806	6807	6807 a	
1195	-	7570471	7570556	7570364	6807	6808		
1196	+	7585711	7585759		6821	6822		Nr. 1197 selbe IGR
1197	-	7585920	7585953	7585854	6827	6828		Nr. 1196 selbe IGR
1198	-	7598795	7598846		6827	6828		Nr. 1199 selbe IGR
1199	+	7598998	7599064		6827	6828		Nr. 1198 selbe IGR
1201	+			7619507	6845	6846	6846 a	
1203	-	7653848	7653904		6884	6885		
1204	+	7672451	7672669		6907	6908		
1205	+	7679631	7679740		6915	6916		
1206	+	7688336	7688465	7688336	6924	6925		
1207	+			7715735	6951	6952		
1208	+	7717033	7717109	7717104	6952	6953		
1209	-			7730602	6963	6964		
1211	+	7753813	7753867		6985	6986		
1212	+	7759124	7759163		6991	SC0165		5' UTR ?
1213	-			7791585	7013	7014		
1214	-	7842728	7842837	7842741	7051	7052		
1215	+			7869653	7079	7080		
1216	+	7886039	7886143		7094	7095	7095 a	
1219	-			7980930	7179	7180		
1220	-	7994376	7994417		7190	7191		19 nt stemloop
1221	+			7995575	7191	7192		5' UTR ?
1222	-	7999605	7999664		7195	7196		
1223	+	8006653	8006696	8006653	7203	7204		as zu Nr. 1224
1224	-	8006680	8006697		7203	7204		as zu Nr. 1223
1225	-			8026150	7220	7221		
1226	-	8027637	8027677		7221	7222		
1227	-			8061794	7251	7252		55 bp imperfect inverted repeat Nr. 1228 1229 1230 selbe IGR
1228	+	8061837	8061858	8061818	7251	7252		Nr. 1227 1229 1230 selbe IGR

ID	Strang	von	mit tap bis	laenge	von	ohne tap bis	laenge	gen vorher	gen nachher	ueberlappend sense / antisense	bemerkung
1229	-	8061943	8062007	64	8061944	8062007	63	7251	7252		Nr. 1227 1228 1230 selbe IGR
1231	-	8075124	8075179	55				7264	7265		
1232	+				8084879	8084903	24	7276	7277		5' UTR ?
1234	+	8095618	8095635	17				7290	7291		
1235	-	8107085	8107132	47				7298	7299	7290 a	
1236	-	8126938	8126979	41				7319	7320		5' UTR ?
1237	+	8175488	8175533	45	8175486	8175506	20	7361	7362		
1238	+	8225839	8225883	44				7410	7411		
1239	+				8272612	8272669	57	7458	7459		
1242	-	8282173	8282202	29				7468	7469		
1243	-	8322215	8322247	32				7507	7508		
1246	-	8333520	8333542	22				7517	7518		
1248	+	8357770	8357811	41	8357798	8357819	21	7536	7537		3' UTR ?
1249	-	8372580	8372621	41				7549	7550		
1250	-	8427312	8427436	124	8427321	8427436	115	7600	7601		
1251	-				8453813	8453843	30	7626	7627		
1257	+	8488336	8488469	133	8488336	8488447	111	7661	7662		
1258	+				8489879	8489940	61	7662	7663	7663 a	
1259	+	8491075	8491117	42				7665	7666		
1260	+	8552486	8552514	28				7717	7718		
1263	-				8626259	8626299	40	7805	7806		
1264	-				8629957	8629978	21	7810	7811		
1266	+	8641339	8641477	138				7821	7822		

8. Curriculum vitae

Michael-Paul Vockenhuber

geboren am 29.02.1980

in Wien

Ausbildung

- | | |
|-------------------|---|
| 2000 | Abitur am Ohm Gymnasium Erlangen
Leistungskurse: Biologie und Englisch |
| 09/2000 – 09/2005 | Biologiestudium an der Friedrich-Alexander Universität Erlangen
Abschluss: Diplom Biologie
Hauptfach: Mikrobiologie
Nebenfächer: Biochemie, Zoologie und Informatik |
| 01/2005 – 10/2005 | Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie der Friedrich-Alexander
Universität Erlangen (Betreuer: PD Dr. Friedrich Titgemeyer)

Titel: C-Regulation in <i>Streptomyces coelicolor</i> |
| 01/2006 – | Doktorarbeit am Institut für Mikrobiologie der Friedrich-Alexander
Universität Erlangen, seit 8/2007 am Institut für Molekulare
Biowissenschaften der Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt
(Betreuer: Prof. Dr. Beatrix Süß) |

Teilnahme an internationalen Konferenzen und Workshops

‚Practical Course on Computational RNA Biology‘, April 2006, Tübingen

4. Treffen der GBM Studiengruppe ‚RNA Biochemie‘, September 2006, Kassel

Poster: Vorhersage von sRNAs in *Streptomyces coelicolor*

VAAM/GBM Jahrestagung, 2006, Jena

Poster: Affinity Purification of Proteins in Streptomycetes

Theoretischer Kurs ‚RNA Structure and Function‘, April 2006, Triest, Italien

25. Rabensteiner Kolleg 2007, Pottenstein

Internationale Konferenz des SFB 579, 2007, Frankfurt

Poster: sRNAs in *Streptomyces coelicolor*

Kickoff Meeting ‚Sensorische und regulatorische RNAs in Prokaryoten‘, September 2007, Bochum

Vortrag und Poster: Identifizierung von sRNAs in *Streptomyces coelicolor*

VAAM/GBM Jahrestagung 2008, Frankfurt

Poster: The sRNA sc1 of *Streptomyces coelicolor*

‚EMBO Practical Course on Computational RNA Biology‘, April 2008, Carghese, Korsika

26. Rabensteiner Kolleg 2007, Pottenstein

Vortrag: Identification and characterization of sRNAs in *Streptomyces coelicolor*

‚13th Annual Meeting of the RNA Society‘, August 2008, Berlin

Poster: The sRNA sc1 of *Streptomyces coelicolor*

Schwerpunkttagung ‚Sensorische und regulatorische RNAs in Prokaryoten‘, September 2008, Kassel

Vortrag und Poster: The sRNA sc1 of *Streptomyces coelicolor*

Internationale Konferenz des SFB 579, Jänner 2009, Schmitten

Poster: The sRNA sc1 of *Streptomyces coelicolor*

Internationale Konferenz des SPP1258, Juni 2009, Berlin

Poster: The sRNA sc1 of *Streptomyces coelicolor*

Internationale Konferenz ‚Biology of Steptomycetes‘, Oktober 2009, Münster

Vortrag: The sRNA sc1 of *Streptomyces coelicolor*

9. RNA Club, Oktober 2009, Frankfurt

Vortrag: The sRNA sc1 of *Streptomyces coelicolor*