

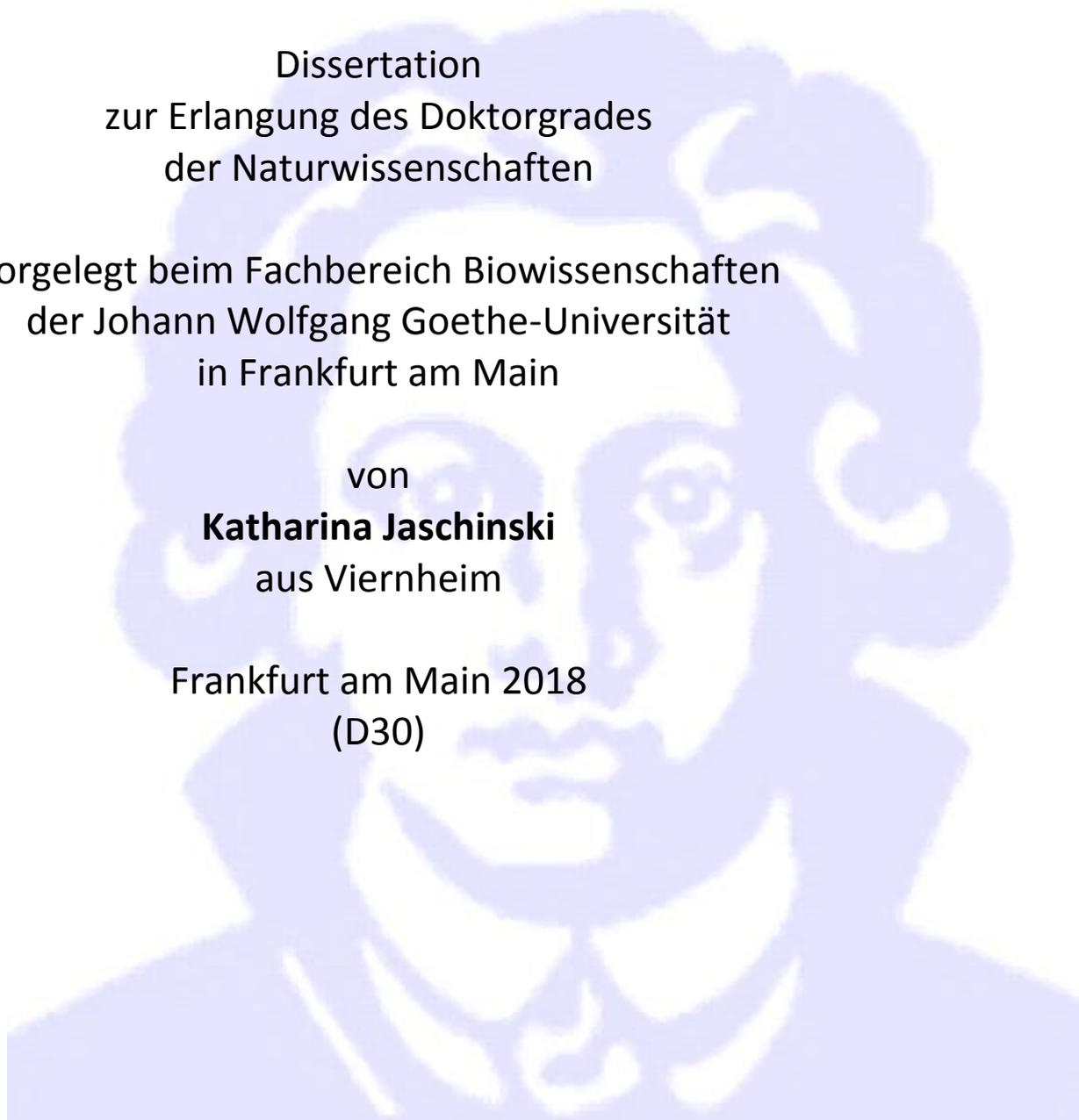
**Charakterisierung kleiner
regulatorischer RNAs von *Haloferax
volcanii* und Identifizierung ihrer Ziele**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biowissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Katharina Jaschinski
aus Viernheim

Frankfurt am Main 2018
(D30)



vom Fachbereich Biowissenschaften (15) der

Johann Wolfgang Goethe - Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Sven Klimpel

Gutachter: Prof. Dr. Jörg Soppa

Prof. Dr. Beatrix Süß

Datum der Disputation: 05.06.2018

I. ZUSAMMENFASSUNG	5
II. EINLEITUNG	7
1. Die Drei Domänen des Lebens	7
1.1 Die dritte Domäne des Lebens: Die Archaea	7
1.2 <i>Haloferax volcanii</i> als archaealer Modellorganismus	10
2. Kleine regulatorische Ribonukleinsäuren	10
2.1 Kleine Ribonukleinsäuren in Eukaryoten	11
2.2 Kleine Ribonukleinsäuren in Bakterien	13
2.3 Kleine Ribonukleinsäuren in Archaea	15
2.4 Ziele archaealer sRNAs	17
2.5 Die Familie der Sm/LSm-Proteine	18
3. Eigenschaften und <i>in vivo</i>-Charakterisierungen der sRNA₁₃₂ von <i>Haloferax volcanii</i>	20
4. ABC-Transportsysteme	22
4.1 Struktur und Funktion	22
4.2 Phosphataufnahme durch ABC-Transporter	24
4.3 Regulation der Phosphataufnahme in <i>Halobacterium salinarum</i>	25
5. Zielsetzung	26
III. MATERIAL UND METHODEN	27
1. Materialien	27
1.1 Chemikalien	27
1.2 Verbrauchsmaterial	29
1.3 Molekularbiologische Kits	30
1.4 Laborgeräte	30
1.5 Software und Computerprogramme	32
1.6 Web-Server	32
1.7 Größenstandards	33
1.8 Oligonukleotide	33
1.9 Enzyme	34
1.10 Plasmide	34
2. Organismen	35
2.1 <i>Haloferax volcanii</i>	35
2.2 <i>Escherichia coli</i>	37

3. Mikrobiologische Methoden	37
3.1 Medien für <i>Haloferax volcanii</i>	37
3.2 Zellzucht von <i>Haloferax volcanii</i>	40
3.3 Dauerkulturen <i>Haloferax volcanii</i>	40
3.4 Medien für <i>Escherichia coli</i>	40
3.5 Zellzucht von <i>Escherichia coli</i>	41
3.6 Dauerkulturen <i>Escherichia coli</i>	41
3.7 Auswertung der phänotypischen Charakterisierung von sRNA-Deletionsmutanten	41
3.8 Mikroskopische Analyse	42
3.9 Phosphatentzug	42
3.10 Konkurrierendes Wachstum von <i>Haloferax volcanii</i>	42
4. Molekularbiologische Methoden	44
4.1 Isolierung genomischer DNA aus <i>Haloferax volcanii</i>	44
4.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	44
4.3 Denaturierende Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA	45
4.4 Polymerase-Kettenreaktion	46
4.5 Sequenzierungen nach Sanger	50
4.6 DNA-Mikroarray von <i>Haloferax volcanii</i>	50
4.7 Reinigung von DNA-Fragmenten	56
4.8 DNA-Spaltung mit Restriktionsenzymen	56
4.9 Ligation	56
4.10 Vorbereitung von <i>Escherichia coli</i> -Zellen für die Transformation	57
4.11 Transformation von <i>Escherichia coli</i>	57
4.12 Transformation von <i>Haloferax volcanii</i>	58
4.13 Southern Blot-Analyse	59
4.14 Hybridisierung und Chemolumineszenz Nachweis	61
4.15 RNA-Isolation	63
4.16 Denaturierende Gelelektrophorese zur Auftrennung von RNA und Northern Blot-Analyse	64
5. Biochemische Methoden	65
5.1 Proteinfällung	65
5.2 Proteinbestimmung	66
5.3 Natriumdodecyl-Polyacrylamidgelelektrophorese	66
5.4 Dihydrofolatreduktase-Reportergen Analyse	68
6. In silico-Analysen	71
6.1 Sequenzkonservierung mittels Nukleotid BLAST	71
6.2 Strukturkonservierung mittels LocaRNA	72

IV. ERGEBNISSE	73
1. Phänotypische Charakterisierung von sRNA-Deletionsmutanten von <i>Haloferax volcanii</i>	73
1.1 Phänotypisierung von sRNA-Deletionsmutanten	73
1.2 Einfluss der sRNAs auf die Regulation des Zellmetabolismus	78
1.3 sRNAs involviert in extreme Salzbedingungen	79
1.4 Adaptation nach Stress-Induktion	81
1.5 Einfluss von sRNAs auf das Schwärmverhalten	82
2. Regulation verschiedener sRNAs und die Suche nach potentiellen Zielgenen	84
2.1 Analyse der Transkriptlevel von sRNA ₃₆₂ bei verschiedenen Wachstumsbedingungen	84
2.2 Transkriptomanalyse der sRNA _{htsf468}	84
2.3 Identifikation der potentiellen Ziel-mRNA OsmC von sRNA ₄₇₉	86
3. Regulation der sRNA₃₀ und Identifikation von potentiellen Zielen	90
3.1 Differentielle Expression der sRNA	90
3.2 Differentielles Wachstum bei 42 und 51°C	91
3.3 Transkriptionelle Analyse potentieller Zielgene	91
3.4 Transkriptomanalyse nach Hitzeschock-Induktion	92
3.5 1D-Proteom nach Hitzeschock-Induktion	94
4. sRNA₁₃₂ und putative Zielgene	96
4.1 <i>In silico</i> -Analysen von sRNA ₁₃₂ und <i>HVO_A0477-80</i>	96
4.2 Mechanismen der phosphatabhängigen Regulation	99
4.3 Identifikation des Phospho-Regulons mittels DNA-Mikroarray	105
4.4 Charakterisierung des Phospho-Regulons	109
V. DISKUSSION	118
1. Die Bedeutung kleiner RNAs und ihrer biologischen Funktionen für <i>Haloferax volcanii</i>	118
2. Regulation von sRNAs	122
3. Die Anwendung bioinformatischer Methoden zur Identifikation von Zielgenen	124
4. Von der biologischen Funktion zum potentiellen Interaktionspartner	126
5. Identifikation und Verifikation potentieller Zielgene	130
6. Phosphatabhängige Regulation zweier ABC-Transport-Systeme von <i>Haloferax volcanii</i> durch sRNA₁₃₂	135

7. Ziele, Wirkweisen und Bedeutung archaealer sRNAs	138
VI. LITERATURVERZEICHNIS	I
VII. ANHANG	I
1. Abbildungen und Tabellen	I
2. Abbildungsverzeichnis	VI
3. Tabellenverzeichnis	I
4. Abkürzungsverzeichnis	I
5. Publikationen	I
5.1 Publikationen in wissenschaftlichen Fachzeitschriften	I
5.2 Vorträge auf wissenschaftlichen Kongressen	II
5.3 Posterpräsentationen auf wissenschaftlichen Kongressen	II

I. ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen dieser Arbeit wurden sRNAs des halophilen Archaeons *Haloferax volcanii* hinsichtlich ihrer biologischen und ihrer regulatorischen Funktion charakterisiert.

Um einen Überblick über die biologischen Funktionen archaealer sRNAs zu erhalten, wurde eine umfassende phänotypische Charakterisierung von 27 sRNA-Deletionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp ausgewertet. Im Zuge dieser phänotypischen Charakterisierungen wurden zehn verschiedene Wachstumsbedingungen, morphologische Unterschiede und Veränderungen in der Zellmotilität untersucht. Hierbei zeigten nahezu alle Deletionsmutanten unter mindestens einer der getesteten Bedingungen phänotypische Unterschiede. Durch den Verlust von sRNAs wurden sowohl sogenannte Gain-of-function als auch Loss-of-function Phänotypen beobachtet. Haloarchaeale sRNAs spielen eine wichtige Rolle beim Wachstum mit verschiedenen Salzkonzentrationen, mit verschiedenen Kohlenstoffquellen und beim Schwärmverhalten, sind jedoch weniger in die Adaptation an diverse Stressbedingungen involviert.

Zur näheren Charakterisierung der regulatorischen Funktion archaealer sRNAs wurden sRNA₃₆₂, sRNA_{htsf468} und sRNA₄₇₉ mittels molekulargenetischer Methoden wie Northern Blot-Analyse und DNA-Mikroarray sowie bioinformatischer *in silico*-Analyse untersucht. Das Expressionslevel von sRNA₃₆₂ konnte bestimmt und potentielle Zielgene für sRNA_{htsf468} und sRNA₄₇₉ identifiziert werden.

Eine vorangegangene Studie zeigte den Einfluss von sRNA₃₀ unter Hitzestress und führte zur Identifikation differentiell produzierter Proteine in Abwesenheit der sRNA. In dieser Arbeit wurde mittels Northern Blot-Analysen die Expression der sRNA₃₀ charakterisiert. Das Wachstum in An- und Abwesenheit von sRNA₃₀ wurde bei 42°C und 51°C phänotypisch charakterisiert und der regulatorische Einfluss der sRNA auf die mRNA differentiell regulierter Proteine durch Northern Blot-Analyse überprüft. Eine Transkriptomanalyse mittels DNA-Mikroarray nach Hitzeschock-Induktion führte zur Identifikation differentiell regulierter Gene involviert in Transportprozesse, Metabolismus, Transkriptionsregulation und die Expression anderer sRNAs. Die differentielle Regulation des Proteoms nach Hitzeschockinduktion in An- und

Abwesenheit von sRNA₃₀ konnte bestätigt werden.

Desweiteren wurde in dieser Arbeit sRNA₁₃₂ und deren phosphatabhängige Regulation der Ziel-mRNA *HVO_A0477-80* näher charakterisiert. Eine Induktionskinetik nach Phosphatentzug bestätigte die Bedeutung von sRNA₁₃₂ für die verstärkte Expression des Operons *HVO_A0477-80* unter Phosphatmangel-Bedingungen und verwies auf die Existenz weiterer Regulationsmechanismen. Während vor und nach Phosphatentzug kein Unterschied bezüglich der Zellmorphologie von Wildtyp und Deletionsmutante zu erkennen war, führte das Wachstum mit einem starken Phosphatüberschuss von 5 mM zu einer Zellverlängerung der Deletionsmutante. Die Konkurrenz der nativen 3'-UTR des Operons *HVO_A0477-80* mit einer Vektor-kodierten artifiziellen 3'-UTR legt eine Regulation über die Bindung von sRNA₁₃₂ an die 3'-UTR nahe. Der Transkriptomvergleich nach Phosphatentzug in An- und Abwesenheit von sRNA₁₃₂ führte zur Identifikation des Phosphoregulons der sRNA. Zu diesem Phosphoregulon gehören unter anderem zwei Glycerinphosphat-Dehydrogenasen, Transkriptionsregulatoren, eine Polyphosphatkinase und eine Glycerolphosphodiesterase. Zudem waren die Transkriptlevel der beiden ABC-Transporter *HVO_A0477-80* und *HVO_2375-8* für anorganisches Phosphat und des Transporters *HVO_B0292-5* für Glycerinaldehyd-3-Phosphat in Abwesenheit der sRNA verringert. Die beiden ABC-Transportsysteme für anorganisches Phosphat wurden im Rahmen dieser Arbeit deletiert und weiter charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass das ABC-Transportsystem *HVO_2375-8* bei geringen Phosphatkonzentrationen leicht induziert wird und das Transkriptlevel in Anwesenheit von sRNA₁₃₂ erhöht ist. Wachstumsversuche der jeweiligen Deletionsmutante in direkter Konkurrenz mit dem Wildtyp zeigten, dass keiner der beiden ABC-Transporter den anderen vollständig ersetzen kann und der Wildtyp mit beiden intakten ABC-Transportern unter phosphatlimitierenden Bedingungen einen Wachstumsvorteil besitzt. *In silico*-Analysen der Promotorbereiche von sRNA und ABC-Transporter legen zudem die Existenz von P-Boxen nahe.

II. EINLEITUNG

1. DIE DREI DOMÄNEN DES LEBENS

Nach der Entdeckung der Mikroorganismen durch Luis Pasteur (1822-95) und Robert Koch (1843-1910) wurde die phylogenetische Klassifizierung von Eukarya und Prokarya unter Berücksichtigung von phänotypischen Merkmalen wie Zellmorphologie, Physiologie und Pathogenität vorgenommen. 1977 schlugen Woese und Fox eine phylogenetische Taxonomie beruhend auf Sequenzierungen der hoch-konservierten kleinen ribosomalen Untereinheit, der 16S (Prokarya) bzw. 18S (Eukarya) rRNA, vor (Woese und Fox, 1977). Fehlende Übereinstimmung der 16S rRNA von methanogenen Mikroorganismen mit den Sequenzdaten typischer Bakterien führten zur Definition einer neuen Gruppe von Prokaryoten, den „Archaeobakterien“ (Fox *et al.*, 1977): Die Unterteilung in die drei Domänen des Lebens Eukarya, Bakteria und Archaea war geboren.

1.1 DIE DRITTE DOMÄNE DES LEBENS: DIE ARCHAEA

Heutige phylogenetische Klassifizierungen ziehen zusätzlich zu den Sequenzierungen der kleinen ribosomalen Untereinheit die Konservierung von Gen- und Proteinsequenzen heran (Eme und Doolittle, 2015). Erschwert werden phylogenetische Einordnungen durch die Möglichkeit von Prokaryoten ihre Erbinformation nicht nur durch asexuelle Zellteilung, sondern durch „sexuelle Fortpflanzung“ mittels Transformation, Konjugation oder Transduktion zu verbreiten. Dies führt zu horizontalem Gentransfer zwischen verschiedenen prokaryotischen Arten (Allers und Mevarech, 2005). Die phylogenetische Einordnung bleibt somit weiterhin eine Herausforderung und ist ständigen Änderungen und Neueinordnungen unterzogen.

Aktuelle Analysen unterteilen die Archaea in die sogenannte „TACK“ Supergruppe, die Euryarchaeota und die „DPANN“ Supergruppe (s. Abbildung 1). Der „TACK“ Supergruppe werden die seit langem bekannten Crenarchaeota und Korarchaeota und die kürzlich entdeckten Thaum-, Loki-, Bathy- und Aigarchaeota zugeordnet. Der „DPANN“ Supergruppe werden archaeale Nano-Organismen wie beispielsweise Nanoarchaea untergeordnet (Eme und Doolittle, 2015).

Doch wie sind Archaea im Bezug auf die Domänen der Eukaryota und Bakteria einzuordnen? Aufgrund ihrer Zellmorphologie und Zellgröße sind sie den Bakterien ähnlicher als den Eukaryoten. Sie sind ebenfalls Prokaryoten und besitzen somit keinen Zellkern. Wie bakterielle Mikroorganismen besitzen Archaea ein ringförmiges Chromosom und einige Vertreter ein oder mehrere Plasmide (Zillig, 1991). Die Sequenzierung der 16S rRNA und viele molekulare Mechanismen lassen jedoch eine engere Verwandtschaft zu den Eukaryoten vermuten. So ähnelt ihre Transkriptions- und Translationsmaschinerie und auch die DNA-Replikation der von Eukaryoten (Huet *et al.*, 1983; Edgell und Doolittle, 1997; Forterre *et al.*, 2002; Hirata *et al.*, 2008; Jun *et al.*, 2011).

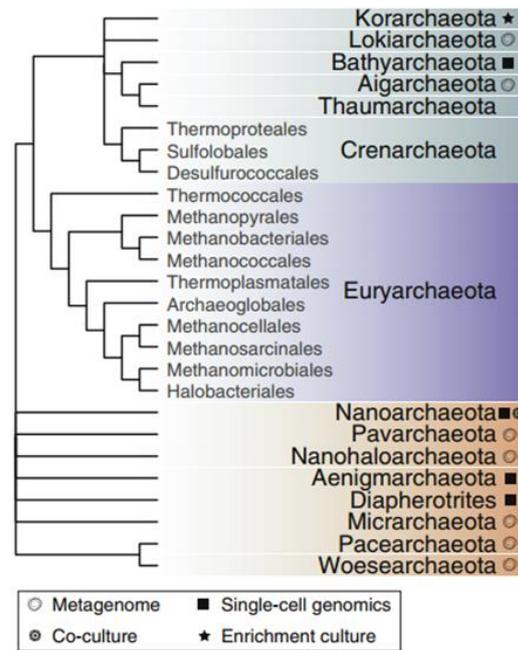


Abbildung 1: Stammbaum zur phylogenetischen Einordnung der Archaea (Eme und Doolittle, 2015). Petrol: "TACK" Supergruppe; lila: Euryarchaeota; orange: "DPANN" Supergruppe. Symbole: Methode zur Gewinnung der DNA-Sequenz (unausgefüllter Kreis: Metagenomik; ausgefüllter Kreis: Co-Kultur, Viereck: Einzelzell-Genomik; Stern: Anreicherungskultur). Phyla bei denen zumindest ein Repräsentant aus Reinkultur stammt, sind nicht mit einem Symbol versehen. Abstammungen, die nur auf 16S rRNA-Sequenzierungen beruhen sind nicht dargestellt.

Zudem gibt es einige Eigenschaften, die sowohl Bakterien als auch Archaea besitzen, aber keine Homologien aufweisen. Diese sind vermutlich durch konvergente Evolution entstanden. Ein Beispiel sind die archaealen Flagellen, die trotz gemeinsamer struktureller und funktioneller Eigenschaften nicht homolog zu bakteriellen Flagellen sind (Albers und Jarrell, 2015). Zudem sind viele Stoffwechsellzyme, die in Struktur- und Funktion bakteriellen Enzymen gleichen, ebenfalls nicht homolog. Auch der Aufbau ihrer Zellwand und der Cytoplasmamembran unterscheidet sich vollkommen von Eukaryoten und Bakterien. Archaeale Zellwände besitzen im Gegensatz zu Bakterien kein Peptidoglykan (Murein) und ihre Zelloberfläche ist mit einer kristallinen Proteinstruktur bedeckt (S-Layer) (Albers und Meyer, 2011). Die Zellmembran besteht aus Etherlipiden und ist nahezu undurchlässig für Ionen und Protonen. Die semipermeable Zellmembran von Eukarya und Bakteria hingegen ist aus Esterlipiden

zusammen gesetzt (van de Vossenberg *et al.*, 1998; Boucher *et al.*, 2004). Zudem ist die Methanogenese ausschließlich auf Vertreter der Archaea begrenzt. Die jährliche Methanproduktion durch methanogene Archaea liegt bei 1 Gt. Dies entspricht schätzungsweise 74% der jährlichen Methanemission in unserer Atmosphäre und trägt somit in extremem Ausmaß zum Klimawandel bei (Offre *et al.*, 2013). Die restliche Methanemission entsteht im Zuge der Energiegewinnung und der Verbrennung von Biomasse oder Müll. Die heutige Wissenschaft ordnet Archaea, die eine nähere Verwandtschaft zu Eukaryoten als zu Bakterien besitzen, als Schwesterngruppe der Eukarya und Bakteria ein (Forterre, 2013; Caetano-Anolles *et al.*, 2014).

Archaea stellen bis zu 20% der gesamten Biomasse (DeLong und Pace, 2001) und sind in diversen Ökosystemen wie zum Beispiel im Boden oder Meerwasser vorzufinden. Obwohl sie zudem in hoher Fülle im menschlichen Darm, der Mundhöhle und auf der Haut (Bang und Schmitz, 2015) zu finden sind, ist unter ihnen bislang kein pathogener Vertreter gefunden worden (Cavicchioli *et al.*, 2003). Darüber hinaus gibt es viele extremophile Archaea, die unwirtliche Lebensräume besiedeln. So wurden beispielsweise halophile, acidophile, alkaliphile, thermophile und psychrophile Vertreter gefunden. Ein Beispiel ist das hyperthermophile Archaeon *Thermococcus alcaliphilus* sp. nov.. Dies ist ein schwefelreduzierendes Archaeon, das aus einem hydrothermalen System der Insel Volcano nahe Sizilien isoliert wurde. *T. alcaliphilus* wächst bei Temperaturen zwischen 56 und 90°C und in einem alkalischen pH-Bereich von 6,5 bis 10,5 mit einem pH-Optimum von 9,0 (Horikoshi, 1999). Das psychrophile Archaeon *Methanogenium frigidum* wurde aus dem antarktischen Ace Lake isoliert und besitzt ein Temperaturoptimum von 15°C. Bei Temperaturen oberhalb von 18°C ist kein Wachstum möglich (Saunders *et al.*, 2003).

Die nahe Verwandtschaft von Archaea zu Eukaryoten macht sie als eukaryotische Modellsysteme interessant. Ihr Vorkommen in extremen Habitaten erhöht ihre Bedeutung für biotechnologische Anwendungen und führt zu einem industriellen Interesse an ihrer Erforschung.

1.2 HALOFERAX VOLCANII ALS ARCHAEMAILER MODELLOORGANISMUS

Haloferax volcanii ist ein halophiles Archaeon welches zu den Euryarchaeota gehört und 1975 aus dem toten Meer isoliert wurde (Mullakhanbhai und Larsen, 1975). Sein Genom ist etwa 4 Mega-Basenpaare (Mbp) groß und besteht aus einem zirkulären Hauptchromosom, drei kleineren zirkulären Chromosomen (pHV1, pHV3 und pHV4) und dem Plasmid pHV2. Die Genomsequenz wurde 2010 von Hartman *et al.* veröffentlicht und ist über die Datenbank HaloLex (Pfeiffer *et al.*, 2008) zugänglich. Für die Arbeit mit *H. volcanii* als (halo-)archaeales Modellsystem ist zunächst die gute Kultivierbarkeit unter Laborbedingungen von essentieller Bedeutung. *H. volcanii* ist mesophil und hat sein Wachstumsoptimum bei 42°C. Die optimale Salzkonzentration liegt bei 2,1 M NaCl, seine Generationszeit in Vollmedium beträgt drei Stunden und seine Transformationsfrequenz liegt bei 10^6 Transformanden/ μg DNA (Soppa, 2006, 2011). Desweiteren ist die Verfügbarkeit von funktionellen genomischen Techniken unabdingbar. Für *H. volcanii* wurde ein effizientes genetisches Knockout-System mittels PopIn-/PopOut-Methode entwickelt und optimiert (Bitan-Banin *et al.*, 2003; Allers *et al.*, 2004; Hammelmann und Soppa, 2008). Zudem sind Techniken zu molekularbiologischen Methoden wie DNA- und RNA-Isolation oder die konditionale Überexpression von Proteinen verfügbar (Allers *et al.*, 2010). Ein System für das Wachstum von *H. volcanii* in der Mikrotiterplatte wurde entwickelt und optimiert (van Ooyen und Soppa, 2007; Jantzer *et al.*, 2011). Dies ermöglicht die simultane phänotypische Charakterisierung vieler Mutanten im Vergleich zum Wildtyp und kann so einen schnellen Hinweis auf mögliche Genfunktionen geben.

2. KLEINE REGULATORISCHE RIBONUKLEINSÄUREN

Die Translationsinitiation ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Translation (Kozak, 1999). Zur effizienten Translationsregulation kommt der stringenten post-transkriptionellen Regulation eine enorme Bedeutung zu. Neben proteinbasierter Regulation durch Translationsfaktoren, spielen regulatorische RNA-Elemente wie beispielsweise Riboswitches (Waters und Storz, 2009) und RNA-Thermometer (Johansson *et al.*, 2002) und auch kleine nicht-kodierende, regulatorische RNAs eine wichtige Rolle.

2.1 KLEINE RIBONUKLEINSÄUREN IN EUKARYOTEN

In den letzten Jahrzehnten wurden viele Klassen regulatorischer, nicht-kodierende RNAs (ncRNAs) in Eukaryoten identifiziert. ncRNAs regulieren hauptsächlich über posttranskriptionelles (PTGS) und transkriptionelles Gen-Silencing (TGS). Am besten untersucht sind kleine ncRNAs, die eine Länge von etwa 20-30 nt besitzen und in drei Hauptgruppen untergliedert werden: microRNAs (miRNAs), small interfering RNAs (siRNAs) und piwi-interacting RNAs (piRNAs). miRNAs und siRNAs sind meist in Argonaut-Proteinkomplexe eingebunden und leiten diese über sequenzspezifische Erkennungsmotive zu homologen Sequenzen ihrer Ziel-mRNAs (Wang und Chekanova, 2016). Während miRNAs und siRNAs in allen eukaryotischen Zellen wichtige regulatorische Funktionen übernehmen, kommen piRNAs nur in tierischen Zellen vor. Dort sind sie in das Gene-silencing von Transposons während der Spermatogenese involviert. Die Interaktion kleiner RNAs mit ihrer Ziel-mRNA führt zur sogenannten RNA-Interferenz, d.h. dem RNase-vermitteltem Abbau der Ziel-mRNA, der Inhibition der Translation oder der Repression der Transkription (Castel und Martienssen, 2013).

Komparative Genomanalysen konservierter Sequenzmotive führen zu der heutigen Annahme, dass eukaryotische miRNAs etwa 20-30% der humanen Gene regulieren (Xie *et al.*, 2005; Lewis *et al.*, 2005; Maciotta *et al.*, 2013). Zudem können einige miRNAs eine große Anzahl verschiedener mRNAs regulieren (Krek *et al.*, 2005; Lewis *et al.*, 2005; Betel *et al.*, 2008; Friedman *et al.*, 2009). miRNAs sind endogene, im Zellkern prozessierte, kleine, nicht-kodierende RNAs, die mit ihrer Ziel-mRNA eine imperfekte Basenpaarung eingehen. In der Regel regulieren eukaryotische miRNAs die Translation und/oder Stabilität ihrer Ziel-mRNAs über die Bindung an die 3'-UTR. Dies führt meist zu einer Inhibition der Translation und/oder dem Abbau der Ziel-mRNA. Die für die Basenpaarung wichtige Sequenz liegt meist in der 5'-Region der miRNA (Iorio und Croce, 2012). miRNAs sind involviert in die Zelldifferenzierung (Wang *et al.*, 2008) und in die Ausbildung pluripotenter Embryonalzellen (Lin *et al.*, 2008). Einige miRNAs können als Tumorsupressor- oder Onkogene wirken (Takamizawa *et al.*, 2004; He *et al.*, 2005; Choi *et al.*, 2011) und spielen eine wichtige Rolle bei der Tumorenstehung und -entwicklung. Fehl-exprimierte miRNAs können so zur Entstehung von beispielsweise Brust- oder Darmkrebs beitragen (Takahashi *et al.*, 2014). siRNAs hingegen werden außerhalb des

Zellkerns prozessiert. Sie gehen eine perfekte Basenpaarung mit ihrer Ziel-mRNA ein und vermitteln das Gene-Silencing bei der Abwehr von Fremd-DNA/-RNA bei Infektion mit Viren (Li *et al.*, 2016).

Desweiteren gibt es lange nicht-kodierende RNAs (lncRNAs). lncRNAs besitzen eine geringe Sequenzkonservierung und eine Länge von über 200 Nukleotiden (nt). Aufgrund ihrer Lokalisation werden sie in fünf Klassen unterteilt (Mathy und Chen, 2017): Sense lncRNAs befinden sich auf dem codogenen Strang eines Gens und antisense lncRNAs auf dem Matrizenstrang. Lange intergene RNAs (lincRNAs) sind zwischen zwei proteinkodierenden Genen, intronic lncRNAs hingegen innerhalb der kodierenden Sequenz eines Gens lokalisiert. Als fünfte Klasse werden enhancer RNAs (eRNAs), die durch bidirektionale Transkription von Enhancer Regionen entstehen, unterschieden. lncRNAs können über diverse Mechanismen eine positive oder negative regulatorische Funktion ausüben (Wang und Chang, 2011). Sie können beispielsweise als Signalmoleküle zur transkriptionellen Regulation dienen. Eine weitere Möglichkeit ist ihre Funktion als „molekulare Köder“: Die Bindung an RNA-bindende Ziel-Proteine, wie Transkriptionsfaktoren oder chromatinverändernde Proteine, oder an kleine ncRNAs, führt zu einer indirekten Regulation über die Konkurrenz mit dem eigentlichen Ziel. lncRNAs können auch als Ziel-Moleküle wirken und RNasen zu ihren Ziel-mRNAs führen und so den Abbau der mRNA initialisieren. Eine weitere Möglichkeit ist die regulatorische Funktion über die räumliche Anordnung der lncRNA. Hierbei werden beispielsweise verschiedene Effektor-Proteine oder Protein-Untereinheiten in räumliche Nähe zur Ziel-mRNA gebracht und somit ihre transkriptionelle Aktivierung oder Reprimierung ermöglicht. Ein Beispiel für eine lncRNA ist linc-p21, deren Expression durch das Tumorsuppressorgen p53 induziert wird. linc-p21 reprimiert durch Bindung und Modulierung des heterogenen nukleären Ribonukleoproteins K (hnRNP-K) hunderte, p53-regulierte Gene (Huarte *et al.*, 2010).

Weitere Klassen eukaryotischer RNAs sind small nucleolar RNAs (snoRNAs), die in C/D-Box und H/ACA-Box snoRNAs unterteilt werden. Sie sind im Nukleolus lokalisiert und leiten Methyltransferasen und Pseudouridin-Synthasen zur ribosomalen RNA (rRNA) und katalysieren so spezifische rRNA-Modifikationen, die die Stabilität, Faltung und die Eigenschaften zur Proteininteraktion beeinflussen (Bratkovic und Rogelj, 2014).

Deletionen eines genetischen Lokus des Chromosoms 15, der mehrere snoRNAs kodiert, führt zum Ausbruch des Prader-Willi-Syndroms, einer Krankheit die zu einer Störung in der Entwicklung führt (Sahoo *et al.*, 2008; Duker *et al.*, 2010).

Zudem sind tRNA-derived fragments (tRFs) eine weitere Klasse eukaryotischer kleiner RNAs. Sie entstehen durch Prozessierung von tRNAs und Vorläufer-tRNAs und erfüllen wichtige regulatorische Funktionen (Gebetsberger und Polacek, 2013).

2.2 KLEINE RIBONUKLEINSÄUREN IN BAKTERIEN

Die post-transkriptionelle Regulation in Bakterien erfolgt hauptsächlich durch kleine nicht-kodierende RNAs (sRNAs), die in zwei Hauptklassen, *in cis*-antisense RNAs (asRNAs) und *in trans*-kodierte sRNAs, unterteilt werden (Storz *et al.*, 2005; Brantl, 2007). *cis*-kodierte asRNAs sind auf dem selben genomischen Lokus wie ihre Ziel-mRNA angeordnet. Sie werden auf dem Gegenstrang ihrer Ziel-mRNA exprimiert und sind somit vollständig komplementär zu ihrer Ziel-mRNA. *Trans*-kodierte sRNAs sind in intergenen Bereichen kodiert und regulieren ihre Ziel mRNA über eine imperfekte Basenpaarung. Eine weitere Gruppe bakterieller sRNAs bilden sense RNAs, die in der kodierenden Region der mRNA lokalisiert sind oder diese überlappen und deren Funktion bislang ungeklärt ist (Schlüter *et al.*, 2010; Mitschke *et al.*, 2011b). Die Mehrheit besitzt keine eigenen Promotorelemente und besteht wahrscheinlich aus stabilen Abbauprodukten reifer mRNA. Einige von ihnen dienen möglicherweise, ähnlich wie eukaryotische kleine RNAs, als „molekulare Köder“ für andere sRNAs durch Mimikry der Ziel-mRNA (Mitschke *et al.*, 2011a). Zudem gibt es die Gruppe der CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) RNAs (crRNAs). crRNAs besitzen eine Länge von 23-47 nt und dienen der prokaryotischen Immunabwehr von viraler oder von Plasmid-DNA (Barrangou *et al.*, 2007).

Bakterielle sRNAs sind zwischen 50 und 250 nt lang und ihre Gesamtzahl liegt bei 200-300 sRNA-Molekülen pro Zelle (Vogel und Papenfort, 2006; Papenfort und Vanderpool, 2015). Es gibt nur wenige Beispiele konstitutiv exprimierter sRNAs in *Escherichia coli* und *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. typhimurium*), die meisten sRNAs werden hingegen differentiell exprimiert (Wagner und Romby, 2015). Sie sind involviert in die Adaptation an Stress- und Wachstumsbedingungen und spielen eine große Rolle bei der

Ausbildung von Virulenz-Faktoren (Papenfort und Vogel, 2009). Während einige sRNAs ihre regulatorische Wirkung über die direkte Bindung an Proteine ausüben (Babitzke und Romeo, 2007, 2007; Wassarman, 2007), reguliert ein Großteil der sRNAs über Basenpaarung mit spezifischen Ziel-mRNAs (Vogel und Wagner, 2007). Die meisten bakteriellen sRNAs interagieren mit der 5'-UTR ihrer Ziel-mRNA, maskieren die Ribosomen-Bindestelle und reprimieren so die Initiation der Translation (z.B. die sRNAs RhyB und GcvB (Sharma *et al.*, 2007; Vecerek *et al.*, 2007)). Eine weitere Möglichkeit ist der regulatorische Einfluss einer sRNA auf die mRNA-Stabilität über den Ribonuklease E (RNase E)-vermittelten Abbau (Waters und Storz, 2009). Im Laufe der Zeit wurden ebenfalls einige Beispiele für eine positive Regulation mittels Aktivierung der Translation oder einer Transkriptstabilisierung gefunden. Meist führt die Bindung der sRNA an die 5'-UTR ihrer Ziel-mRNA zu einer Aktivierung über den sogenannten anti-Antisense Mechanismus. Hierbei werden inhibierende Sekundärstruktur-Elemente wie Hairpin-Strukturen durch Bindung der sRNA aufgelöst. Diese Freilegung der Ribosomen-Bindestelle resultiert in der Aktivierung der Translation (Prevost *et al.*, 2007; Hammer und Bassler, 2007). Eine Aktivierung kann jedoch auch durch Bindung der kodierenden Sequenz (Papenfort *et al.*, 2013) oder durch Bindung an die 3'-UTR resultierend in einer Stabilisierung der mRNA erfolgen (Papenfort und Vanderpool, 2015).

Bakterielle *trans*-kodierte sRNAs besitzen zumeist mehrere Ziel-mRNAs wie beispielsweise die sRNA RhyB in *E. coli* (Massé *et al.*, 2005). Zusammen mit dem Fe²⁺-abhängigen Repressor Fur (ferric uptake regulator) reguliert die sRNA RhyB die Eisen-Homöostase (Massé *et al.*, 2007). Ist Eisen im Überfluss vorhanden, werden die für die Aufnahme von Eisen wichtigen Gene von Fur reprimiert. Unter Eisenmangel-Bedingungen jedoch reprimiert RhyB mehr als 15 Ziel-mRNAs, die für nicht-essentielle eisenbindende Proteine kodieren, und unter anderem auch über eine negative Rückkopplung den Regulator Fur selbst. Diese Repression führt zur Synthese von eisenakquirierenden Enzymen (Massé und Gottesman, 2002; Vecerek *et al.*, 2003; Massé *et al.*, 2005). RhyB-Homologe gibt es auch in vielen gram-positiven Organismen. Zum Beispiel übernimmt die sRNA FsrA in *Bacillus subtilis* eine vergleichbare regulatorische Funktion (Smaldone *et al.*, 2012b; Smaldone *et al.*, 2012a).

Die Regulation mehrerer Ziel-mRNAs durch eine sRNA wird durch die imperfekte

Basenpaarung an relativ kurzen Interaktionstellen von 10-25 nt Länge ermöglicht (Papenfort und Vogel, 2009; Waters und Storz, 2009). Zudem lässt die Gesamtlänge einer sRNA von bis zu 250 nt die Ausbildung mehrerer Ziel-Sequenzen pro sRNA-Molekül zu. Über Deep-Sequencing Analysen konnten mehr als 700 Ziel-mRNAs in *S. typhimurium* identifiziert werden, die Gesamtzahl an sRNAs liegt jedoch nur bei etwa 100 Molekülen pro Zelle (Sittka *et al.*, 2008; Sittka *et al.*, 2009). Neuere Studien konnten zeigen, dass GU-reiche Basenpaarsequenzen (Sharma *et al.*, 2011) und homopolymere Sequenzen (Pernitzsch *et al.*, 2014) wichtig für dieses sogenannte „Multi-Targeting“ sind. Denn GU-reiche Sequenzen ermöglichen nicht-kanonische Basenpaarungen, wie GU-Wobble-Basenpaarungen. Die sRNA GcvB reguliert eine Reihe von Ziel-mRNAs (DppA, OppA,...) über die Bindung konservierter, GU-reicher Sequenzen an CA-reiche Enhancer Elemente (Sharma *et al.*, 2007).

2.3 KLEINE RIBONUKLEINSÄUREN IN ARCHAEA

Bisher ist nicht viel über sRNAs in Archaea bekannt, das derzeitige Wissen besteht hauptsächlich aus den Untersuchungen folgender sechs Arten: *Archaeoglobus fulgidus*, *Sulfolobus solfataricus*, *Methanocaldococcus jannaschii*, *Methanosarcina mazei*, *Pyrococcus furiosus* und *H. volcanii* (Babski *et al.*, 2014).

In Archaea wurden Homologe der eukaryotischen Argonaut-Proteine gefunden und am Beispiel von *M. jannaschii* untersucht (Willkomm *et al.*, 2015). Archaeale Argonaut-Proteine ähneln sowohl strukturell als auch mechanistisch ihren eukaryotischen Homologen, unterscheiden sich jedoch bezüglich der Diskriminierung der chemischen Struktur ihres Ziel-Substrats (Willkomm *et al.*, 2016; Willkomm *et al.*, 2017). Im Jahr 2000 wurden die snoRNAs als erste kleine nicht-kodierende RNA-Spezies entdeckt (Gaspin *et al.*, 2000; Omer *et al.*, 2000). Ähnlich wie eukaryotische snoRNAs katalysieren sie die Methylierung und Pseudouridinylierung von rRNA- und tRNA-Molekülen (Dennis *et al.*, 2001; Noon *et al.*, 2003). Einige Zeit später wurden durch bioinformatische (Schattner, 2002; Klein *et al.*, 2002; Eddy, 2002) und experimentelle Analysen wie RNomics (Tang *et al.*, 2002; TH Tang *et al.*, 2002; Tang *et al.*, 2005), Co-Immunopräzipitation (Zago *et al.*, 2005) und Hochdurchsatzsequenzierung (HTS) (Wurtzel *et al.*, 2010) neben den bekannten snoRNAs eine Reihe weiterer sRNAs identifiziert. Diese Ansätze erweiterten

die archaeale sRNA-Population um asRNAs, sense RNAs und intergene sRNAs. In ersten Ansätzen konnten zunächst wenige sRNAs in den verschiedenen Organismen identifiziert werden. Durch anschließende genomweite Transkriptomanalysen konnte die Anzahl experimentell identifizierter sRNAs dramatisch erhöht werden. In *M. mazei* wurden mittels Sequenzierung einer cDNA-Bibliothek (RNA-Seq) neben 242 intergenen sRNAs und asRNAs, auch 40 sRNA Kandidaten, die zusätzlich für kleine offene Leserahmen (ORFs) mit einer Länge von maximal 30 Aminosäuren kodieren, identifiziert (Jäger *et al.*, 2009). Weitere RNA-Seq-Analysen in *S. solfataricus* führten zur Identifikation von 310 intergenen sRNAs und asRNAs (Wurtzel *et al.*, 2010). Zudem konnte eine große Anzahl von sRNAs mit einer ungefähren Länge von 20 nt identifiziert werden (Xu *et al.*, 2012).

Transkriptomanalysen mittels RNA-Seq in *H. volcanii* konnte die Gesamtzahl von sRNAs auf knapp 190 intergene sRNAs und asRNAs erhöhen (Heyer *et al.*, 2012). Hierbei konnten alle sRNAs die durch einen vorherigen RNomics Ansatz identifiziert wurden (Straub *et al.*, 2009), jedoch nicht alle sRNAs, die durch die zwei bioinformatischen Studien vorhergesagt wurden, bestätigt werden (Babski *et al.*, 2011). Dies weist darauf hin, dass diese sRNAs unter den gewählten Bedingungen nicht exprimiert werden und die tatsächliche Anzahl an sRNAs höher liegt (Babski *et al.*, 2014). In einer aktuellen differentiellen RNA-Sequenzierungs-Studie (dRNA-Seq-Studie) von Babski *et al.*, 2016 konnte die Gesamtzahl von sRNAs auf etwa 2900 erhöht werden.

Mittels Northern Blot-Analysen, Mikroarray-Experimenten und RNA-Seq konnte die differentielle Expression von sRNA-Genen unter verschiedenen Bedingungen, wie verschiedene Salzkonzentrationen, unterschiedliche Stickstoffverfügbarkeit oder verschiedene Wachstumsphasen, gezeigt werden (Jäger *et al.*, 2009; Straub *et al.*, 2009; Heyer *et al.*, 2012). Zudem konnte durch phänotypische Charakterisierung einiger sRNA-Deletionsmutanten die Involvierung von sRNA-Genen in biologische Prozesse gezeigt werden. Zum Beispiel zeigte die Deletion der sRNA₃₀ verglichen mit dem Wildtyp ein starkes Wachstumsdefizit bei 51°C, während bei 48°C kein Unterschied beobachtet werden konnte (Straub *et al.*, 2009). Ein weiteres Beispiel für die stringente Regulation durch archaeale sRNAs ist sRNA₁₅₄ von *M. mazei*. Diese sRNA wird ausschließlich unter Stickstoff-Limitierung exprimiert und durch den Transkriptionsregulator NrpR reguliert.

Zudem zeigt die Deletionsmutante der sRNA₁₅₄ einen schweren Wachstumsdefekt unter Stickstofflimitierung, jedoch keinen Wachstumsphänotyp unter Stickstoff-Verfügbarkeit. Dies weist auf den bedeutenden regulatorischen Einfluss von sRNA₁₅₄ unter Stickstofflimitierenden Bedingungen hin (Ehlers *et al.*, 2011).

Weitere Gruppen kleiner RNAs in Archaea stellen tRFs und crRNAs dar. Es gibt Hinweise, dass archaeale tRFs ähnlich wie eukaryotische tRFs wichtige regulatorische Funktionen übernehmen (Babski *et al.*, 2014). crRNAs dienen ähnlich wie bakterielle crRNAs der Immunabwehr von Fremd-DNA (Marchfelder *et al.*, 2012).

2.4 ZIELE ARCHAELER SRNAS

Eine Reihe von bioinformatischen Programmen und Web-Servern bieten die Möglichkeit eukaryotische und bakterielle Ziel-mRNAs und -Proteine von sRNAs *in silico* zu identifizieren (Washietl *et al.*, 2005; Tjaden *et al.*, 2006; Backofen und Hess, 2010; Rennie *et al.*, 2016). Programme wie IntaRNA und copraRNA ermöglichen unter Einbeziehung von RNA-Struktur und thermodynamischer Eigenschaften die Vorhersage von möglichen Interaktionspartnern und -domänen und die Identifikation ganzer regulatorischer Netzwerke (Wright *et al.*, 2014). Solche Programme zur Vorhersage wurden anhand bereits identifizierter Ziele kleiner RNAs entwickelt. Während bakterielle sRNAs zumeist nahe oder direkt an die Ribosomenbindestelle der 5'-UTR ihrer Ziel-mRNAs binden (Waters und Storz, 2009), binden kleine RNAs in Eukaryoten bevorzugt an das 3'-Ende ihrer Ziel-mRNA (Huang *et al.*, 2013). Die Anwendung solcher Programme zur Identifikation archaealer Ziel-mRNAs gestaltet sich als schwierig, da bislang nur sehr wenig über die Interaktion archaealer sRNAs mit ihren Ziel-mRNAs bekannt ist.

In *M. mazei* führte die Kombination aus genetischen Ansätzen, Transkriptomanalysen und einer bioinformatischen Vorhersage zur Identifikation der ersten archaealen Ziel-mRNA (Jäger *et al.*, 2012). sRNA₁₆₂ reguliert über zwei distinkte Bindestellen sowohl *in cis* als auch *in trans*. Zum einen führt die Maskierung der Ribosomenbindestelle der *in trans*-kodierten mRNA MM2441 des Operons MM2440-MM2441 zu einer diskoordinierten Translation des Operons. Zum anderen konnte die Regulation der *in cis*-kodierten mRNA MM2442 durch Bindung an deren 5'-UTR gezeigt werden

(vgl. Abbildung 2.A). Die Regulation archaealer sRNAs kann jedoch auch über die Bindung an die 3'-UTR erfolgen (s. Abbildung 2.B). Ein Beispiel für eine mögliche Regulation ist die asRNA asR3 (Bernick *et al.*, 2012). Durch vergleichende RNA-Seq-

Analysen in vier *Pyrobaculum*-Spezies

wurde eine Interaktion von asR3 mit dem 3'-Ende und einem Teil der 3'-UTR der Triosephosphatisomerase identifiziert. Ein weiteres

Beispiel ist die asRNA₂₅₇₍₁₎ von *S. solfataricus*, die an die 3'-UTR eines putativen Phosphattransporters

bindet (Märtens *et al.*, 2013). Phosphatmangel führt zu einer geringeren Menge an sRNA und einer erhöhten Expression des Phosphattransporters.

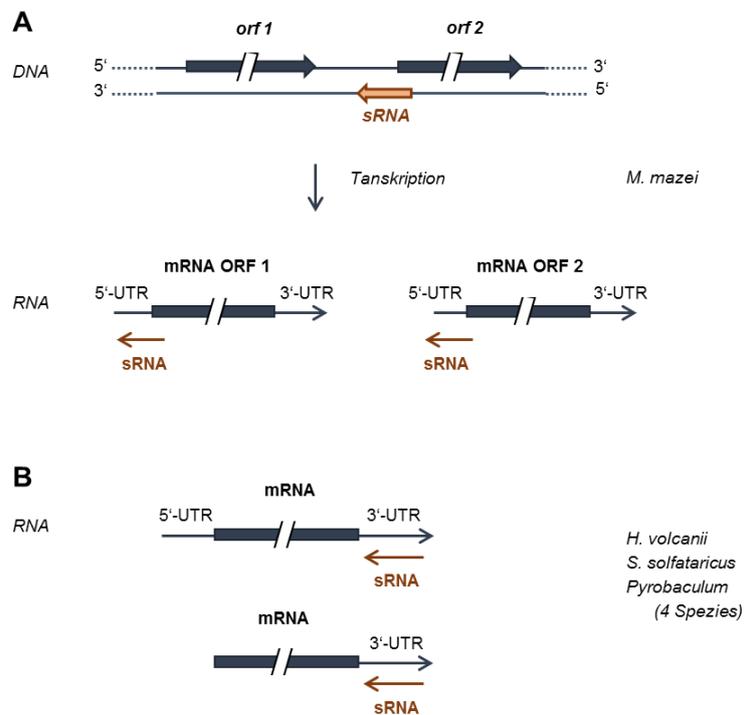


Abbildung 2: Schematischer Überblick über Interaktionen archaealer sRNAs mit ihren Ziel-mRNAs veröffentlicht in Babski *et al.* (2014). **A.** Gezeigt ist die chromosomale Anordnung der sRNA₁₆₄ von *M. mazei* und ihre Interaktion *in cis* bzw. *in trans* mit zwei Ziel-mRNAs. **B.** Die potentielle Interaktion von sRNAs mit der 3'-UTR ihrer Ziel-mRNAs in einigen archaealen Spezies ist schematisch anhand von Transkripten mit 5'-UTR und leaderlosen-Transkripten skizziert.

2.5 DIE FAMILIE DER SM/LSM-PROTEINE

Die Sm und Sm-ähnlichen (LSm)-Proteine bilden zusammen mit Hfq eine Familie kleiner RNA-bindender Proteine, die bei der post-transkriptionellen Genregulation durch kleine regulatorische RNAs wichtige regulatorische Funktionen als RNA-Chaperone übernehmen. Sie sind in allen drei Domänen des Lebens vertreten und bilden multimere Ringstrukturen aus. In vielen Arten, über alle drei Domänen des Lebens verteilt, sind zwei Sequenzmotive konserviert. Diese Sm1- und Sm2-Domänen sind durch eine variable Linker-Domäne verbunden (Hermann *et al.*, 1995; Mura *et al.*, 2013).

Eukaryotische Sm/LSm-Proteine bilden heteroheptamere Ringstrukturen aus mehr als 20 verschiedenen LSm-Proteinen (Khusial *et al.*, 2005; Veretnik *et al.*, 2009) und dienen

als Grundgerüst für die Interaktion einer sRNA mit ihrer Ziel-mRNA (Wilusz und Wilusz, 2013; Mura *et al.*, 2013). Sie sind involviert in die Regulation des Splicens von Vorläufer mRNA (pre-mRNA), der Prozessierung nuklearer RNA, der Translation und der mRNA-Stabilität (Møller *et al.*, 2002; Wilusz und Wilusz, 2005).

In gram-negativen Enterobakterien exponiert das RNA-Chaperon host factor Q β (Hfq) durch Faltung von sRNA und mRNA einzelsträngige Paarungs-Regionen und erleichtert so die Ausbildung der RNA-RNA Duplices *trans*-kodierter sRNAs mit ihrer Ziel-mRNA (Henderson *et al.*, 2013). Zudem ist Hfq in RNA-Protein Wechselwirkungen involviert und interagiert mit Schlüsselenzymen der mRNA-Regulation wie die RNA-Polymerase, die Polynukleotid Phosphorylase (PNPase) und RNase E (Moll *et al.*, 2003; Folichon *et al.*, 2005). Hfq bildet homohexamere Ringstrukturen aus und besitzt zwei Bindemotive. Zum einen zur Bindung PolyA-reicher Sequenzen der mRNA (Link *et al.*, 2009; Lorenz *et al.*, 2010) und zum anderen U oder A/U-reiche Sequenzen zur Bindung U-reicher Terminationssequenzen der sRNAs (Schumacher *et al.*, 2002; Otaka *et al.*, 2011; Ishikawa *et al.*, 2012). Desweiteren ist das Arginin-Muster auf der Oberfläche von Hfq wichtig für die sRNA-Bindung (Sauer *et al.*, 2012; Panja *et al.*, 2013).

Mechanistisch kann Hfq an den unterschiedlichen regulatorischen Prozessen von sRNAs, wie der Repression der Translationsinitiation durch sterische Hinderung des Ribosoms oder der Aktivierung der Translation durch Auflösen von Sekundärstrukturen, die die RBS blockieren, beteiligt sein. Zudem kann durch die Bindung des sRNA-Hfq-Komplexes die mRNA stabilisiert oder deren Abbau begünstigt werden (Møller *et al.*, 2002; Gottesman, 2004; Vogel und Luisi, 2011). Ein weiterer Hinweis für die enorme Bedeutung von Hfq ist die hohe Konservierung in 50% der bakteriellen Arten (Valentin-Hansen *et al.*, 2004). Hfq enthält eine zweigeteilte Sm-Domäne, die aus 4-7 hoch konservierten Aminosäuren besteht und am N-terminalen Ende des Moleküls lokalisiert ist (Valentin-Hansen *et al.*, 2004). Zudem zeigten Deletions- bzw. Insertionsmutanten von Hfq eine Reihe pleiotropher Phänotypen, die die generelle Stressantwort und die Expression von Virulenz-Genen betreffen (Ha und Kim, 2014; Papenfort und Vanderpool, 2015). HTS- und Mikroarray-Analysen ergaben, dass etwa 20% des gesamten Genoms von *S. typhimurium* bzw. *E. coli* in der Deletionsmutante von Hfq differentiell reguliert sind (Guisbert *et al.*, 2007; Sittka *et al.*, 2008; Ansong *et al.*, 2009). Im Vergleich dazu

scheint Hfq im gram-positiven Organismus *Bacillus subtilis* eine weniger bedeutende Rolle zu spielen (Hämmerle *et al.*, 2014). In Transkriptomanalysen waren nur sechs von etwa 100 sRNA-Genen differentiell exprimiert.

In Archaea ist die Familie der Sm-ähnlichen archaealen Proteine (SmAPs) nur wenig erforscht. Kristallstrukturen konnten zeigen, dass SmAPs homohepta- bzw. homohexamere Ringstrukturen, ähnlich dem bakteriellen Hfq, ausbilden (Törö *et al.*, 2001; Mura *et al.*, 2001; Collins *et al.*, 2001; Nielsen *et al.*, 2007; Fischer *et al.*, 2010). Bisher konnte nicht aufgeklärt werden, ob SmAPs die Funktion als RNA-Chaperon, ähnlich dem bakteriellen Hfq, oder eine Gerüst-Funktion, ähnlich eukaryotischer Sm-Proteine, ausüben, oder ob sie eine komplett andere Funktion übernehmen. Strukturell ähneln sie eher eukaryotischen Sm-Proteinen, weshalb die Entdeckung eines Hfq-ähnlichen LSm-Proteins in *M. jannaschii* sehr überraschend war. In einer Studie konnte der pleiotrophe Phänotyp der Hfq-Deletionsmutante von *E. coli* durch das Hfq-ähnliche Protein von *M. jannaschii* teilweise komplementiert werden (Nielsen *et al.*, 2007).

H. volcanii kodiert ein LSm-Protein. Charakterisierungen konnten *in vitro* die Bindung an OligoU-RNA, an eine sRNA und einige tRNAs zeigen (Fischer *et al.*, 2010). Zudem konnten durch Co-Immunopräzipitation mit dem LSm-Protein *in vivo* mehr als 15 sRNA-Interaktionspartner und eine Reihe von Proteininteraktionspartnern identifiziert werden. Die identifizierten Proteininteraktionspartner sind unter anderem in die Translation, den Nukleinsäuremetabolismus und Stress involviert. Dies lässt auf eine Involvierung des LSm-Proteins in den RNA-Metabolismus schließen (Fischer *et al.*, 2010). Die Deletion der Sm1-Domäne des LSm-Proteins resultierte in einer Änderung des Transkriptoms. Unter anderem waren die Transkriptmengen der Gene, die das Schwärmverhalten beeinflussen in der Deletionsmutante erhöht. Phänotypische Charakterisierungen konnten ein erhöhtes Schwärmverhalten der Deletionsmutante gegenüber dem Wildtyp bestätigen (Maier *et al.*, 2015).

3. EIGENSCHAFTEN UND *IN VIVO*-CHARAKTERISIERUNGEN DER SRNA₁₃₂ VON *HALOFERAX VOLCANII*

In einer RNomics-Studie wurden 21 sRNAs von *H. volcanii* experimentell identifiziert (Straub *et al.*, 2009). Zwölf dieser sRNA-Gene, unter anderem das Gen für sRNA₁₃₂,

besitzen die drei basalen Promotorelemente TFIIB-Erkennungselement (BRE), TATA-Box und das -10-Motiv. Die Expression der $sRNA_{132}$ konnte zudem mittels Northern Blot-Analyse verifiziert werden.

$sRNA_{132}$ ist auf dem Hauptchromosom zwischen zwei konservierten, hypothetischen Proteinen lokalisiert und besitzt eine Länge von 140 nt (Kliemt[Masterthesis], 2014). In einer näheren Charakterisierung wurde eine Transkriptomanalyse von Wildtyp und Deletionsmutante der $sRNA_{132}$ mittels DNA-Mikroarray durchgeführt (Babski[Dissertation], 2013). Hierbei konnte die Regulation einer sehr geringen Anzahl von Genen gezeigt werden. In Abwesenheit der $sRNA_{132}$ wurde die verstärkte Expression von vier Genen und die verringerte Expression von zwölf Genen, einschließlich des Operons *HVO_A0477-80*, welches für ein ATP-bindende Kasette (ABC)-Transportsystem mit dem putativen Substrat Phosphat kodiert, festgestellt. Die starke Reduktion des Transkriptlevels von *HVO_A0477-80* konnte mittels Northern Blot-Analyse verifiziert werden. *In silico*-Analysen mit der Datenbank HaloLex konnten eine nahezu perfekte Bindung der $sRNA_{132}$ über 20 bp antisense zur 3'-UTR des ABC-Transporters identifiziert werden (vgl. Abbildung 3).

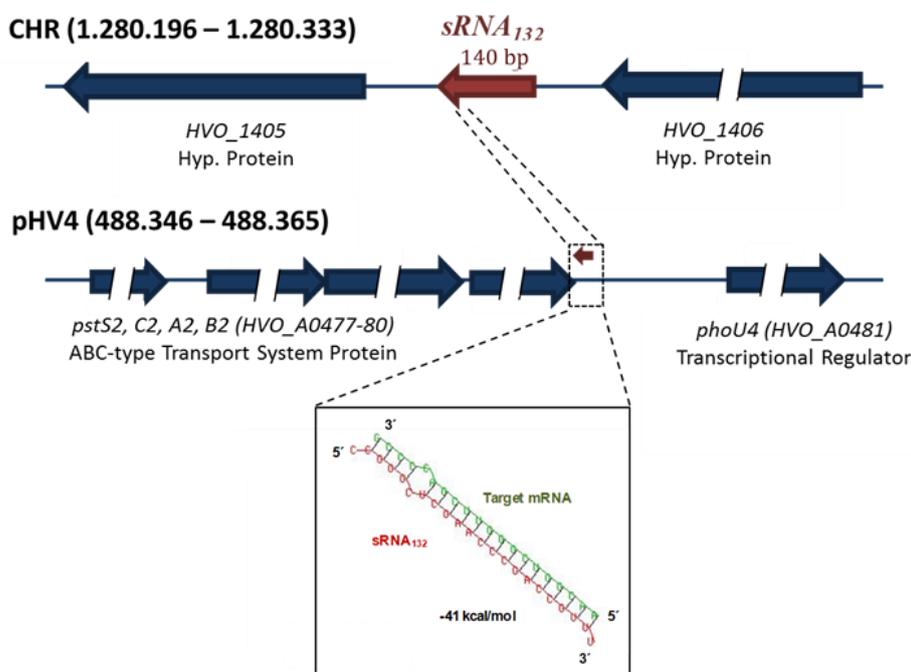


Abbildung 3: Chromosomale Lokalisation der $sRNA_{132}$ und des *in silico* vorhergesagten Ziel-Operons *HVO_A0477-80*. Die Bindestelle von $sRNA_{132}$ antisense zur 3'-UTR des Transkriptes *HVO_A0480* ist in der genomischen Organisation mit einem roten Pfeil angezeigt. Die Interaktion zwischen $sRNA$ und mRNA ist über 20 bp mit nur einer einzigen Basenfehlpaarung komplementär und wurde mittels RNAhybrid vorhergesagt (hervorgehoben im Rechteck) (Babski[Dissertation], 2013).

Da das putative Substrat des ABC-Transportsystems *HVO_A0477-80* Phosphat ist, wurde die Phosphatabhängigkeit der *sRNA*₁₃₂ in einer weiteren Arbeit näher charakterisiert (Kliemt[Masterthesis], 2014). Insbesondere bei niedrigen Phosphatkonzentrationen besitzt *sRNA*₁₃₂ einen aktivierenden oder stabilisierenden Einfluss auf das ABC-Transportsystem *HVO_A0477-80* von *H. volcanii*. Sowohl *sRNA* als auch das ABC-Transportsystem *HVO_A0477-80* zeigen bei geringen Phosphatkonzentrationen (0 und 0,03 mM) eine induzierte Expression. Bei geringen Phosphatkonzentrationen jedoch scheint es neben der *sRNA* noch weitere wichtige regulatorische Faktoren für die Expression des Operons zu geben. *sRNA*₁₃₂ ist zudem maßgeblich an der schnellen Regulation des Operons *HVO_A0477-80* nach einem Phosphatentzug beteiligt. In direkter Konkurrenz von Wildtyp und Deletionsmutante der *sRNA*₁₃₂ besitzt der Wildtyp einen deutlichen Wachstumsvorteil.

4. ABC-TRANSPORTSYSTEME

4.1 STRUKTUR UND FUNKTION

ABC-Transporter sind universell in allen drei Domänen des Lebens zu finden. Sie katalysieren den energieabhängigen Transport von Substraten durch die Lipiddoppelschicht der Zellmembran (Locher, 2016). ABC-Transporter repräsentieren eine der größten Familien von Transmembranproteinen. In *E. coli* beispielsweise gibt es etwa 80 ABC-Transporter, dies entspricht 5% des Genoms (Linton und Higgins, 1998). Im menschlichen Genom sind 48 ABC-Transporter kodiert (Schmitt und Tampé, 2002).

ABC-Transporter bestehen aus zwei hydrophilen Proteinen, die jeweils eine Nukleotid-Bindedomäne (NBD) aufweisen, und zwei hydrophoben Proteinen mit Transmembrandomänen (TMDs). Die NBDs befinden sich im Cytoplasma und rufen eine, durch ATP-Hydrolyse angetriebene, konformationelle Änderung der TMDs hervor. Dies ermöglicht den Transport von Substraten durch die Membran (s. Abbildung 4).

Für den spezifischen Substrat-Transport benötigen ABC-Transporter zusätzlich ein periplasmatisches oder lipidverankertes Substratbindeprotein (SBP). Dieses SBP ermöglicht eine hohe Affinität und Substratspezifität (Maqbool *et al.*, 2015). Eine hohe

Diversität verschiedener SBPs ermöglicht den Im- bzw. Export einer großen Bandbreite unterschiedlicher Substrate wie beispielsweise Metallionen, Zuckermoleküle, Aminosäuren oder Peptide. Sie spielen auch eine große Rolle in der Ausbildung von bakteriellen Resistenzen gegenüber Toxinen, da sie deren Export katalysieren (Davidson *et al.*, 2008). Neben der Transportfunktion sind

bakterielle ABC-Transporter auch in zelluläre Prozesse, wie die DNA-Reparatur (Goosen und Moolenaar, 2001) oder die Translationsregulation (Chakraborty, 2001), involviert. In Eukaryoten dienen ABC-

Transporter hauptsächlich dem Export von Giftstoffen. Mutationen eukaryotischer ABC-Transporter führen zu einer Reihe von genetischen Funktionsstörungen wie beispielsweise zystischer Fibrose, neurologischen Defekten, Anämien oder Resistenzen gegenüber Medikamenten (Dean *et al.*, 2001).

Es werden zwei Typen von ABC-Transportern unterschieden (Locher, 2016). Auf der einen Seite gibt es die Typ I ABC-Transporter, die aufgrund ihrer geringen ATPase-Rate relativ langsam sind und Transportsysteme mit geringer bis mittlerer Affinität darstellen. ATP-Bindung und ATP-Hydrolyse der NBDs führen direkt zur offenen bzw. geschlossenen Konformation. Zum anderen werden Typ II ABC-Transporter unterschieden, die eine höhere Substrataffinität besitzen und größere, hydrophobe Substrate, wie zum Beispiel Metallchelate, transportieren. Hierbei spielt zusätzlich zur ATP-Bindung, -Hydrolyse und -Freisetzung auch die Substratbindung eine wichtige Rolle. Für Typ II ABC-Transporter kann in geringem Ausmaß eine nutzlose ATP-Hydrolyse gemessen werden.

In Archaea und Eubakterien bestehen die ABC-Transporter aus vier separaten Untereinheiten, in höheren Eukaryoten hingegen sind diese in der Regel fusioniert (Schmitt und Tampé, 2002).

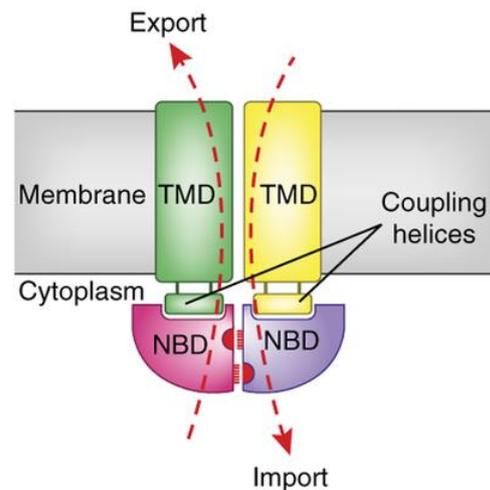


Abbildung 4: Schematischer Aufbau eines ABC-Transporters bestehend aus zwei membrandurchspannenden TMDs und zwei cytosolischen NBDs. Unter ATP-Hydrolyse an den NBDs werden konformationelle Änderungen hervorgerufen, die den Substratexport bzw. -import ermöglichen. Abbildung entnommen aus Locher (2016).

4.2 PHOSPHATAUFNAHME DURCH ABC-TRANSPORTER

Phosphor ist, bezogen auf die zelluläre Zusammensetzung, das fünftwichtigste Element (Santos-Beneit, 2015). Als Bestandteil von Nukleinsäuren, Membranlipiden und der universellen Energiewährung jeder Zelle, dem ATP, sind Phosphat und die Mechanismen zur Phosphataufnahme essentiell für jede lebende Zelle. Die bevorzugte Phosphatquelle für alle Organismen ist anorganisches Phosphat. Das Vorkommen anorganischer Phosphate in der Umwelt, insbesondere im Boden, ist relativ gering, sodass die Adaptation an Phosphatlimitierung mittels effizienter Systeme zur Aufnahme und Speicherung essentiell für alle Mikroorganismen ist.

Das ABC-Transportsystem für phosphatspezifischen Transport (Pst) ist ein aktives Transportsystem mit einer hohen Affinität zu anorganischem Phosphat. In *E. coli* setzt sich das Pst-System aus einem periplasmatischen SBP für anorganisches Phosphat (PstS), zwei TMDs (PstA und PstC) und der dimeren ATP-Bindedomäne (PstB) zusammen. Zusammen mit dem Pho-Regulator PhoU wird das ABC-Transportsystem als Operon exprimiert und ist Teil des Pho-Regulons, welches insgesamt aus 30 Genen besteht (Wanner, 1993; Hsieh und Wanner, 2010). Unter Phosphatlimitierung vermittelt PhoU das Signal zur membrangebundenen Histidin-Kinase PhoR (McGrath *et al.*, 2013). Diese ist Teil des Zweikomponentensystems PhoR-PhoB und phosphoryliert den Transkriptionsregulator PhoB. Phosphoryliertes PhoB bindet an die 10 bp stromaufwärts des -10-Motivs gelegene Pho-Box. An die Pho-Box gebundenes PhoB leitet die RNA-Polymerase zum Promotorbereich der Gene des Pho-Regulons und führt somit zu einer effizienten Nutzung von anorganischem Phosphat unter Phosphatlimitierung. Die bakterielle Pho-Box besteht in der Regel aus einer konservierten, jedoch in verschiedenen Spezies variablen, Folge an Tandem-Wiederholung von 6-7 bp. Sie ist getrennt durch eine kurze nicht-konservierte Sequenz (Qi *et al.*, 1997).

In Eukaryoten wie *Saccharomyces cerevisiae* ist die Regulation des Pho-Regulons komplexer und beinhaltet eine größere Anzahl an Regulatoren (Persson *et al.*, 2003). Hinweise auf ein Pho-Regulon in Archaea wurden bereits bei *Sulfolobus acidocaldarius*, der zu den Crenarchaeota gehört, gefunden (Osorio und Jerez, 1996). Bei dem Euryarchaeon *Halobacterium salinarum* konnte das Pho-Stimulon bereits näher charakterisiert werden (Wende *et al.*, 2009; Furtwängler *et al.*, 2010).

4.3 REGULATION DER PHOSPHATAUFNAHME IN *HALOBACTERIUM SALINARUM*

Zur Untersuchung der phosphatabhängigen Regulation von *H. salinarum* wurden komparative Transkriptomanalysen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Phosphatentzug durchgeführt (Wende *et al.*, 2009). Hierbei wurden 17 Gene, die unter Phosphatlimitierung mehr als 900-fach induziert wurden, zu einem sogenannten Pho-Stimulon zusammengefasst. Zu diesem Pho-Stimulon gehören die Gencluster der beiden phosphatspezifischen ABC-Transporter Pst1 und Pst2, das Gencluster des Glycerin-3-phosphatspezifischen ABC-Transporters Ugp, eine alkalische Phosphatase, eine Exonuklease und drei PhoU-Proteine. Die beiden ABC-Transporter Pst1 und Pst2 transportieren anorganisches Phosphat in die Zelle. Der ABC-Transporter Ugp ist das einzige bekannte Transportsystem für Organophosphate in *H. salinarum* und importiert Glycerin-3-Phosphat, welches anschließend zu Phosphat abgebaut werden kann. Desweiteren gehört eine Exonuklease und eine alkalische Phosphatase zum Pho-Stimulon. Exonukleasen hydrolysieren extrazelluläre Nukleinsäuren zu Mononukleotiden, sodass diese zugänglich für alkalische Phosphatasen werden. Diese spalten Phosphorsäureester-Verbindungen und anorganisches Phosphat wird frei, welches wiederum durch die ABC-Transporter Pst1 und Pst2 importiert werden kann.

Bisherige Untersuchungen von *H. salinarum* deuten darauf hin, dass die ABC-Transporter Pst1 und Pst2 die einzigen funktionellen Transportsysteme für anorganisches Phosphat darstellen (Furtwängler *et al.*, 2010). Der ABC-Transporter Pst1 besitzt einen K_m -Wert von 0,14 μM und besitzt somit eine höhere Phosphataffinität als Pst2 mit einem K_m -Wert von 0,68 μM (Furtwängler *et al.*, 2010). Unter Phosphatlimitierung konnte eine deutlich stärkere Induktion des ABC-Transporters Pst1 im Vergleich zu Pst2 beobachtet werden. Ein Hinweis auf die phosphatabhängige Regulation der ABC-Transporter Pst1 und Pst2 des Pho-Stimulons ist das Vorkommen *cis*-aktiver Elemente (Furtwängler *et al.*, 2010). Diese sogenannten Pho-Boxen bestehen aus AT-reichen Sequenzen, die im Promotorbereich stromaufwärts der jeweiligen TATA-Boxen lokalisiert sind. Solche AT-Reichen Sequenzen wurden *in silico* auch für das ABC-Typ Transportsystem Ugp gefunden. Im Gegensatz zu *E. coli* besitzt *H. salinarum* kein Zweikomponentensystem zur Expression des Pho-Stimulons und misst vergleichbar mit dem Eukaryoten *S. cerevisiae* die interne Phosphatkonzentration (Auesukaree *et al.*,

2004; Wende *et al.*, 2009).

5. ZIELSETZUNG

Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine Charakterisierung von sRNAs und Identifizierung möglicher Interaktionspartner in *H. volcanii* erfolgen. In einem ersten Schritt sollte das simultane Phänotypenscreening von 27 sRNA-Deletionsmutanten unter zehn verschiedenen Wachstumsbedingungen sowie das Schwärmverhalten im Vergleich zum Wildtyp ausgewertet werden. Diese phänotypischen Charakterisierungen sollten einen Überblick über die biologischen Funktionen von sRNAs in *H. volcanii* geben und ihre weitere Charakterisierung ermöglichen.

Im Folgenden sollte die nähere Charakterisierung von sRNA₃₆₂, sRNA_{htsf468} und sRNA₄₇₉ erfolgen. Diverse Methoden wie Northern Blot- und Mikroarray-Analysen und *in silico*-Vorhersagen sollten einen Zusammenhang zwischen den biologischen Funktionen der sRNAs und ihren Wirkweisen schaffen und mögliche Interaktionspartner identifizieren.

Eine weitere sRNA, die näher charakterisiert werden sollte, ist sRNA₃₀. Diese sRNA zeigte in einer früheren Studie die Involvierung in die Adaptation an Hitzestress. Ziel war es mögliche RNA- und Proteininteraktionspartner nach Hitzeschockinduktion zu identifizieren.

Abschließend sollte sRNA₁₃₂ hinsichtlich potentieller Ziel-mRNAs näher untersucht werden. Transkriptomanalysen und *in silico*-Vorhersagen führten zur Identifizierung der 3'-UTR des Transkriptes des ABC-Transport-Systems *HVO_A0477-80* für anorganisches Phosphat als potentielle Bindestelle. Ziel war es die phosphatabhängige Expression dieses Operons in Abhängigkeit der sRNA₁₃₂ näher zu charakterisieren. Hierfür sollten Transkriptomanalysen mittels Northern Blot- und Mikroarray-Analyse, Induktionskinetiken und Enzymtests mit Reporterfusionen durchgeführt werden. Nach Identifikation des zweiten ABC-Transportsystems für anorganisches Phosphat *HVO_2375-8* als weiteres potentielles Ziel, sollten konkurrierende Wachstumsversuche der jeweiligen Deletionsmutanten beider ABC-Transporter mit dem Wildtyp und die Identifikation möglicher *cis*-aktiver Elemente erfolgen.

III. MATERIAL UND METHODEN

1. MATERIALIEN

1.1 CHEMIKALIEN

Produkt	Hersteller
β -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
β -Nicotinamidenindinukleotid	AppliChem; Darmstadt
3-(N-Morpholino)propansulfonsäure	Roth, Karlsruhe
5'-Fluorotsäure	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Acetanhydrid	Roth, Karlsruhe
Acrylamid-/Bisacrylamidlösung ProtoGel®	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
Agarose	Roth, Karlsruhe
Amersham™ Cy3-dUTP	GE Healthcare Life Science, Freiburg
Amersham™ Cy5-dUTP	GE Healthcare Life Science, Freiburg
Ampicillin, Natriumsalz	Serva, Heidelberg
Ammoniumperoxodisulfat	Merck, Darmstadt
Anti-DIG-AP	Roche, Mannheim
Bacto™-Agar	BD, Heidelberg
Bacto™-Cas Aminosäuren	BD, Heidelberg
Bacto™-Hefeextrakt	BD, Heidelberg
Bacto™-Trypton	BD, Heidelberg
Betain	Fluka, Neu Ulm
Big Dye Terminator RR Mix	Applied Biosystems, Weiterstadt
Blocking Reagenz	Roche, Mannheim
BME Vitaminsolution 100x	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Chloroform	Fluka, Neu Ulm
Coomassie Blue R-250	Roth, Karlsruhe
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Dextransulfat	Roth, Karlsruhe
Dichlorethan	Roth, Karlsruhe
Diethylether 99% p.a.	Merck, Darmstadt

Produkt	Hersteller
Diethylpyrocarbonat	AppliChem, Darmstadt
Digoxigenin-Deoxyridin-triphosphat	Roche, Mannheim
Dihydrofolat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dikaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid	Roth, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat-Diphosphat	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol	Roth, Karlsruhe
Eisensulfat-Heptahydrat	Roth, Karlsruhe
Entwickler Kodak GBX	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol 99% p.a.	Roth, Karlsruhe
Ether	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Fluka, Neu-Ulm
Ethylendiamintetraessigsäure	Roth, Karlsruhe
Ficoll 400	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Fixierer Kodak GBX	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Formaldehyd 37%	Roth, Karlsruhe
Formamid >99% p.a.	Roth, Karlsruhe
Fruktose	Merck, Darmstadt
Glucose-Monohydrat	Merck, Darmstadt
Glycerin 87%	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Guanidiniumthiocyanat	Roth, Karlsruhe
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
Hefe-tRNA	Roche, Mannheim
Isoamylalkohol	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kobalt(II)-chlorid-Hexahydrat	Roth, Karlsruhe
Kupferchlorid-Dihydrat	AppliChem, Darmstadt
L-Tryptophan	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid-Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Roth, Karlsruhe
Maleinsäure	Roth, Karlsruhe
Manganchlorid-Tetrahydrat	Merck, Darmstadt
Methanol p.a.	Roth, Karlsruhe

Produkt	Hersteller
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
Natriummolybdat-Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Natriumpyruvat	Fluka, Neu-Ulm
Nexterion® Oligo Hyb	Schott, Jena
Nickelchlorid-Hexahydrat	Roth, Karlsruhe
Nicotinamidadenindinukleotid	AppliChem, Darmstadt
Nicotinamidadenindinukleotidphosphat	AppliChem, Darmstadt
N-Lauroylsarcosinat (30% (w/v))	AppliChem, Darmstadt
Novobiocin Natrium Salz	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Phenol, TE-gesättigt	Roth, Karlsruhe
Polyethylen Glycol 600	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Polyethylen Glycol 8000	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Polyvinylpyrrolidon	Merck, Darmstadt
Proteinase Inhibitor Cocktail Tablets	Roche, Mannheim
Rinderserumalbumin	Roth, Karlsruhe
Saccharose	Roth, Karlsruhe
Salzsäure	Roth, Karlsruhe
Tetramethylethyldiamin	Serva, Heidelberg
Trichloracetat	Riedel-de Haën, Seelze
<i>tri</i> -Natriumcitrat-Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Roth, Karlsruhe
Tween® 20	Roth, Karlsruhe
Uracil	AppliChem, Darmstadt
Wasserstoffperoxid	Roth, Karlsruhe
Zinksulfat-Heptahydrat	Roth, Karlsruhe
Zitronensäure-Monohydrat	AppliChem, Darmstadt

1.2 VERBRAUCHSMATERIAL

Produkt	Hersteller
BioMax Light Film	Kodak, Stuttgart
Deckgläser 18 x 18 mm	Knittel Glas, Braunschweig

Produkt	Hersteller
Eppendorf-Reaktionsgefäß (1,5 ml/2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Erlenmeyerkolben	Schott Duran, Mainz
Gel-Blotting-Papier (0,37 mm/1,4 mm)	Roth, Karlsruhe
Gelträger (Poly-L-Lysin) für DNA-Mikroarray	PolyAn, Berlin
Mikrotiterplatten 96-well, Flachboden	Sarstedt, Nürnberg
Mikrotiterplatten 96-well, Rundboden	Sarstedt, Nürnberg
Multiply® Pro Gefäß	Sarstedt, Nürnberg
Multiply® PCR-Plate (96 Well)	Sarstedt, Nürnberg
Multiply® µ Strip Pro 8er Kette	Sarstedt, Nürnberg
Nylonmembran Amersham Hybond™-N+	GE Healthcare, München
Nylonmembran Roti® Nylon plus	Roth, Karlsruhe
Objektträger 76 x 26 mm	Diagonal, Münster
Pasteurpipetten	WU, Mainz
PCR-Film adhesive	Eppendorf, Hamburg
Petrischalen	Sarstedt, Nürnberg
Pipettenspitzen (2,5,20, 200 und 1000 µl)	Sarstedt, Nürnberg
Reagenzgläser	Assistent, Sondheim/Rhön
Reaktionsgefäße (15 ml/ 50 ml)	Sarstedt, Nürnberg
Sterilfilter Filtropur S 0,45 µm PAT	Sarstedt, Nürnberg

1.3 MOLEKULARBIOLOGISCHE KITS

Produkt	Hersteller
Anti-Digoxigenin Alkalische Phosphatase	Roche, Mannheim
AxyPrep™ DNA Gel Extraction Kit 250-prep	Axygen Biosciences, Union City, USA
BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
CDP-Star	Roche, Mannheim
PCR Purification Kit	Seqlab, Göttingen
MinElute™ PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Pierce® BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
PureYield™ Plasmid Midiprep Systems	Promega, Mannheim
Nucleospin® miRNA-Kit	Macherey-Nagel, Düren

1.4 LABORGERÄTE

Produkt	Hersteller
Block Thermostat	Grant Instruments, Cambridge, GB
Brutschrank B6060	Heraeus Instruments, Hanau

Produkt	Hersteller
Brutschrank T257	Rubbarth Apparate GmbH, Laatzen
Brutschrank Typ UT 5042	Heraeus Instruments, Hanau
Centrifuge 5417	Eppendorf, Hamburg
Centrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg
Feuchtigkeitskammer	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Gyratory Shaker G-10	New Brunswick, Nürtingen
Heizblock	Liebisch, Bielefeld
High Resolution System E.A.S.Y 440K	Herolab, Wiesloch
Hybridisierungsöfen HB-1000	UVP, Upland, USA
Innova 4300 Inkubator shaker	New Brunswick, Nürtingen
Microcentrifuge SD 220 VAC	Roth, Karlsruhe
Mikroplatten Spectrophotometer SPECTRAmax® 340PC	Molecular Devices, USA
Mikroskop Axiostar Plus	Carl Zeiss, Göttingen
Mikrotiterplattenschüttler Titramax 1.000	Heidolph Instruments, Schwabach
Minioven MkII	Hybaid, Heidelberg
Nanodrop Spektrophotometer ND-1000	Nanodrop Technologie, USA
Neubauer Zählkammer (0,2 mm Tiefe)	Hirschmann, Eberstadt
pH-Meter CG 825	Schott, Mainz
Photometer Specord S 600	Analytik Jena, Jena
Pipette 0,1-2,5µl MicroOne®	Starlab, Ahrensberg
Pipette 2-20 µl Labmate	Abimed, Langenfeld
Pipette 20-200 µl	Gilson, Middleton, USA
Pipette 100-1000 µl	Gilson, Middleton, USA
Pipettierhilfe, Accurpette	VWR, Darmstadt
Rotilabo®-Röntgenkassette	Roth, Karlsruhe
SANOclav	Adolf Wolf, Bad Überkingen
Speed Vac SC 110	Savant, Farmingdale, NY, USA
Thermocycler Gene Amp PCR System 2400	Applied Biosystems, Weiterstadt
Thermocycler Gene Amp PCR-System 9700	Applied Biosystems, Weiterstadt
Thermocycler Mastercycler®Gradient	Eppendorf, Hamburg
Thermocycler Thermal Cycler 2720	Applied Biosystems, Weiterstadt
UV-Stratalinker 1800	Stratagene, Leiden, NL
Vakuum-Pumpe	Welch, Memmingen
Vakuum-Station	Promega, Mannheim
Vortex Genie 2®	Scientific Industries, USA
Waage PB300	Mettler, Gießen

Produkt	Hersteller
Waage PM 4800 Delta Range®	Mettler, Gießen
Waage TE1245OCE	Sartorius, Göttingen
Wasserbadschüttler 1083	GfL GmbH, Burgwedel
Zentrifuge Avanti J-25	Beckmann Instr. GmbH, München

1.5 SOFTWARE UND COMPUTERPROGRAMME

Software/Computerprogramm	Hersteller
Acuity® 4.0	Molecular Devices, Sunnyvale, USA
Adobe Photoshop	Adobe Systems Inc., San Jose, USA
AxioVision	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena
BioEdit	Ibis Biosciences, Carlsbad, USA
Citavi	Swiss Academic Software GmbH, Wädenswil, Schweiz
Clone Manager 7, Version 7.01	Scientific & Educational, Cary, USA
E.A.S.Y Win 32-Software	Herolab, Wiesloch
GenePix® Pro 7	Molecular Devices, Sunnyvale, USA
ImageJ 1.8.0	NIH, Maryland, USA
Microsoft Office 2013	Microsoft Corporation, Redmond, USA
SeaView 4.6.1	LBBE, Villeurbanne, Frankreich
Softmax® Pro 5.4.5	Molecular Devices, Sunnyvale, USA
WinASPECT®	Analytik Jena AG, Jena

1.6 WEB-SERVER

Name	Internetadresse	Quelle
HaloLex	https://www.halolex.mpg.de/public/index.jsp	Pfeiffer <i>et al.</i> (2008)
IntaRNA	http://rna.informatik.uni-freiburg.de:8080/IntaRNA/Input.jsp	Wright <i>et al.</i> (2014)
LocARNA	http://rna.informatik.uni-freiburg.de/LocARNA/Input.jsp	Will <i>et al.</i> (2012)
MBGD	http://mbgd.genome.ad.jp/	Uchiyama <i>et al.</i> (2015)
NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast	Johnson <i>et al.</i> (2008)
RNAfold	http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi	Lorenz <i>et al.</i> (2011)
RNAhybrid	https://bibiserv.cebitec.uni-bielefeld.de/rnahybrid/submission.html	Rehmsmeier <i>et al.</i> (2004)
TargetRNA	http://cs.wellesley.edu/~btjaden/predictions/halofera_x/index.html	Tjaden (2008)

Name	Internetadresse	Quelle
UCSC	http://archaea.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway?db=haloVolc1	Chan <i>et al.</i> (2012)

1.7 GRÖßENSTANDARDS

Größenstandard	Hersteller
GeneRuler 100 bp Plus	ThermoFisher Scientific, Waltham MA, USA
GeneRuler 1 kb Plus	ThermoFisher Scientific, Waltham MA, USA
PageRuler Prestained Protein Ladder	ThermoFisher Scientific, Waltham MA, USA
RiboRuler RNA Ladder High Range	ThermoFisher Scientific, Waltham MA, USA
RiboRuler RNA Ladder Low Range	ThermoFisher Scientific, Waltham MA, USA

1.8 OLIGONUKLEOTIDE

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1: Verwendete Oligonukleotide. Gezeigt sind Name, Sequenz von 5' nach 3' und Verwendungszweck. Rot: Überhänge mit komplementärer Sequenz zu dem zu fusionierenden Fragment.

Name	Sequenz von 5' nach 3'	Verwendungszweck
HVO_A0477-80_P1	CTTCGCTTCGAACACGTCGAGACGGGAC	Fragment 1 zur Deletion des Operons <i>HVO_A0477-80</i>
HVO_A0477-80_P2	TTACCCGAACTTGCCATCTTGCGCCATCACGTGGACTGACCC	
HVO_A0477-80_P3	GTGATGGCGCAAGATGGCAAGTTCGGGTAA	Fragment 2 zur Deletion des Operons <i>HVO_A0477-80</i>
HVO_A0477-80_P4	CGGTCGGGTTC CCGCCGGAGCGTCTGTTCGAGAC	
P1_Del 3'-UTR A0480	CCCGTCCC GAAGAGCATCGCG	Fragment 1 zur Deletion der Bindestelle der sRNA ¹³² in der 3'-UTR des Operons <i>HVO_A0477-80</i>
P2_Del 3'-UTR A0480	GGTCGTCGAGAACC TTACCCGAACTTGCCGCTGATGTAGTCCTC	
P3_Del 3'-UTR A0480	GGCAAGTTCGGGTAA	Fragment 2 zur Deletion der Bindestelle der sRNA ¹³² in der 3'-UTR des Operons <i>HVO_A0477-80</i>
P4_Del 3'-UTR A0480	GGTTCGACGACCTG CGGCCG GCCGACGAGGTTGCGGGCG	
P1_Del 2375-78	CGGAACGGGGCGTCAAGAACAGC	Fragment 1 zur Deletion des Operons <i>HVO_2375-8</i>
P2_Del 2375-78	CGACGCGCTG GCGAAAGACCGCTGTCCGAGT TACGC	
P3_Del 2375-78	GCGGTCTTTCGCCAGCGCGTCAAGACTACA	Fragment 2 zur Deletion des Operons <i>HVO_2375-8</i>
P4_Del 2375-78	TCACCGG CCCCGATGCGTTCGAGGTCGG	
M ₁₃₋₂₀	AATTAACCCTCACCCTAAAGGA	Klonierungen und Sequenzierungen
T ₃	GTA AACGACGGCCAGTG	
HVO_0596_for	GCGGGGCGAACTCCGTCGG	Sonde Northern Blot <i>HVO_0596</i>
HVO_0596_rev	CCGGGCCGGCGTCTATCGC	
HVO_0597_for	GTCCACCGAGAAATCCAGACCCG	Sonde Northern Blot <i>HVO_0597 (osmC)</i>
HVO_0597_rev	CCGCCGGTCAACGAGAGCG	

Name	Sequenz von 5' nach 3'	Verwendungszweck
HVO_2398_for	CGAGTCCACCGACGCCGGCG	Sonde Northern Blot
HVO_2398_rev	CGGGCGATGAAGGCGCGCTG	HVO_2398
HVO_2027_for	GCTTGAAGAACGCCAGCGCCGCG	Sonde Northern Blot
HVO_2027_rev	CCGACGAATCCGAACGAGCACGC	HVO_2027
HVO_B0143_for	CGAGCCAGTTCACGTTCCCCGC	Sonde Northern Blot
HVO_B0143_rev neu	CCGCGAGGACGCACCCGACC	HVO_B0143
HVO_B0144_for neu	CGCGGGAAGCGGGCTCCTTGC	Sonde Northern Blot
HVO_B0144_rev neu	CGCCGCCGGTCTGGTATGGTAGAAG	HVO_B0144
sRNA362_for	CGTCGTGTACATAAGACGCGCCC	Sonde Northern Blot
sRNA362_rev	CTCGGTGGGCACGAGGCCCA	sRNA ₃₆₂
sRNA _{htsf468} _for	AGGACGCGGACTTGGCCCCGCTG	Sonde Northern Blot
sRNA _{htsf468} _rev	AGGAGAACCTCTTGAGATCAATTTACCATA GTACGG	sRNA _{htsf468}
sRNA479_for	GAAACCTCATGACACCCATCAGCCG	Sonde Northern Blot
sRNA479_rev	CAATGTCTATCATGAATAGAACGATGGCGC	sRNA _{sRNA479}
sRNA30_for	CCGCACGACGCTGTCTGGTCGG	Sonde Northern Blot
sRNA30_rev	GGTAGAAATGTAGGGGCGGACCATCGGG	sRNA _{sRNA30}
for Sonde HVO_A0477-80	CCACGCGCTGAATGGCGTCTCC	Sonde Northern Blot
rev Sonde HVO_A0477-80	GAGATGCGCGCCGCTGCTG	HVO_A0477-80
for Sonde HVO_2375	CAACGACGTGACCCCCGTCGAAC	Sonde Northern Blot
rev Sonde HVO_2375	CGAACTCCGCGACGTGTTCTTCC	HVO_2375
DHFR_Northern_for	CGCCGAGAACCGGTCATCGGC	Sonde Northern Blot
DHFR_Northern_rev	CGTCGAGTCCCACTCGGCGGCG	HVO_1279 (dhfr)

1.9 ENZYME

Enzym	Hersteller
M-MLV Reverse Transkriptase, RNase H Minus, Punktmutation	Promega, Mannheim
Pfu-DNA-Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Phusion-DNA-Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Restriktionsendonukleasen	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
RNase A	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
T4-DNA-Ligase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Taq-DNA-Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Taq-DNA-Polymerase	Bio & Sell, Feucht/Nuremberg

1.10 PLASMIDE

Für diese Arbeit wurden die Plasmide pKJ15 und pKJ16 zur Deletion der ABC-Transportsysteme *HVO_A0477-80* (*pst2*) und *HVO_2375-78* (*pst1*) verwendet.

Desweiteren wurden für die *in vivo*-Charakterisierung mittels DHFR-Reportergeren Assays die Plasmide pMB1-NcoI, pNP10, pJB21 und pJK03 eingesetzt. Alle für diese Arbeit verwendeten und generierten Plasmide sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Verwendete und generierte Plasmide. Angegeben sind Plasmid-Name, Ursprung, das verwendete Hintergrund-Plasmid und Verwendungszweck in dieser Arbeit.

Plasmid	Ursprung	Hintergrund	Verwendungszweck
pKJ15	Diese Arbeit	pMH101	Deletion des ABC-Transporters <i>HVO_2375-78</i> (<i>pst1</i>)
pKJ16	Diese Arbeit	pMH101	Deletion der 3'-UTR des ABC-Transporters <i>HVO_A0477-80</i> (<i>pst2</i>)
pMB1-NcoI	Mariam Brenneis/Jessica Schmitt	pMB1	DHFR-Reportergeren Analysen (Kontrolle)
pNP10	Nadja Patenge		DHFR-Reportergeren Analysen (Kontrolle)
pJB21	Julia Babski	pMB1-NcoI	DHFR-Reportergeren Analysen (3'-UTR von <i>HVO_A0480</i>)
pJK03	Jana Kiemt	pMB1-NcoI	DHFR-Reportergeren Analysen (mutierte 3'-UTR von <i>HVO_A0480</i>)

2. ORGANISMEN

In dieser Arbeit wurden verschiedene Deletionsmutanten und zwei verschiedene Elternstämme von *H. volcanii* verwendet. Außerdem wurde ein *E. coli*-Stamm für Klonierungen eingesetzt.

2.1 HALOFERAX VOLCANII

In dieser Arbeit wurde mit den Stämmen *H. volcanii* H26 (Δ *pyrE2*) und H119 (Δ *pyrE2*; Δ *trpA*; Δ *leuB*) und den nachfolgend aufgelisteten Deletionsmutanten gearbeitet (s. Tabelle 3).

Tabelle 3: Verwendete Stämme. Aufgelistet sind Stamm-Name, verwendeter Elternstamm, Genotyp und Ursprung des Plasmids.

Name	Elternstamm	Genotyp	Ursprung
H26		Δ <i>pyrE2</i>	Thorsten Allers, Nottingham, UK
H119		Δ <i>pyrE2</i> ; Δ <i>trpA</i> :: <i>sRNA</i> ₃₆₂ ; Δ <i>leu2</i>	Anita Marchfelder, Universität Ulm
H26Δ<i>sRNA</i>₃₀	H26	Δ <i>pyrE2</i> ; Δ <i>sRNA</i> ₃₀	Julia Babski, AK Soppa
H26Δ<i>sRNA</i>₁₃₂	H26	Δ <i>pyrE2</i> ; Δ <i>sRNA</i> ₁₃₂	Julia Babski, AK Soppa
H26Δ<i>sRNA</i>₁₉₄	H26	Δ <i>pyrE2</i> ; Δ <i>sRNA</i> ₁₉₄	Julia Babski, AK Soppa
H26Δ<i>HVO_A0477-80</i>	H26	Δ <i>pyrE2</i> ; Δ <i>HVO_A0477-80</i>	Diese Arbeit
H26Δ<i>HVO_2375-78</i>	H26	Δ <i>pyrE2</i> ; Δ <i>HVO_2375-78</i>	Diese Arbeit
H26Δ<i>HVO_2528</i>	H26	Δ <i>pyrE2</i> ; Δ <i>HVO_2528</i>	Karolin Zerulla, AK Soppa
H26Δ<i>dhfr</i>	H26	Δ <i>pyrE2</i> ; Δ <i>dhfr</i>	Diese Arbeit

Name	Elternstamm	Genotyp	Ursprung
H26ΔsRNA₁₃₂Δdhfr	H26	Δ pyrE2; Δ sRNA ₁₃₂ ; Δ dhfr	Jana Kliemt
H26ΔsRNA₁₉₄Δdhfr	H26	Δ pyrE2; Δ sRNA ₁₉₄ ; Δ dhfr	Diese Arbeit

Die Auswertung der Daten für die phänotypische Charakterisierung von 27 sRNA-Deletionsmutanten erfolgte im Rahmen dieser Doktorarbeit. Die Charakterisierung wurde in meiner Diplomarbeit durchgeführt (Jantzer[Diplomarbeit]; 2011). Hierbei wurden Deletionsmutanten zweier verschiedener Elternstämme verglichen, *H. volcanii* H26 und H119 (Heyer *et al.*, 2012; Jaschinski *et al.*, 2014). Die entsprechenden Deletionsmutanten sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4: Auflistung der 27 Deletionsmutanten für die phänotypische Charakterisierung. Gezeigt sind Stamm-Name, verwendeter Elternstamm, Genotyp und Ursprung des Plasmids (Jaschinski *et al.*, 2014). *Veröffentlicht in Heyer *et al.* (2012).

Name	Elternstamm	Genotyp	Ursprung
H26ΔsRNA₆₃	H26	Δ pyrE2; Δ sRNA ₆₃	AG Soppa
H26ΔsRNA₁₃₂	H26	Δ pyrE2; Δ sRNA ₁₃₂	AG Soppa
H26ΔsRNA₁₆₈	H26	Δ pyrE2; Δ sRNA ₁₆₈	AG Soppa
H26ΔsRNA₁₉₄	H26	Δ pyrE2; Δ sRNA ₁₉₄	AG Soppa
H26ΔsRNA₂₃₅	H26	Δ pyrE2; Δ sRNA ₂₃₅	AG Soppa
H26ΔsRNA₂₈₈	H26	Δ pyrE2; Δ sRNA ₂₈₈	AG Soppa
H26ΔsRNA₃₀₈	H26	Δ pyrE2; Δ sRNA ₃₀₈	AG Soppa
H119ΔsRNA₃₆₂	H119	Δ pyrE2; Δ trpA:: Δ sRNA ₃₆₂ ; Δ leu2	AG Marchfelder
H119ΔsRNA₄₅₀	H119	Δ pyrE2; Δ trpA:: Δ sRNA ₄₅₀ ; Δ leu2	AG Marchfelder
H119ΔsRNA₄₇₉	H119	Δ pyrE2; Δ trpA:: Δ sRNA ₄₇₉ ; Δ leu2	AG Marchfelder
H26ΔsRNA₅₀₀	H26	Δ pyrE2; Δ sRNA ₅₀₀	AG Soppa
H119ΔsRNA₅₂₉	H119	Δ pyrE2; Δ trpA:: Δ sRNA ₅₂₉ ; Δ leu2	AG Marchfelder
H26ΔsRNA_{H225.2R}	H26	Δ pyrE2; Δ sRNA _{H225.2R}	AG Soppa
H26ΔsRNA_{htsf182}	H26	Δ pyrE2; Δ sRNA _{htsf182}	AG Soppa
H26ΔsRNA_{htsf209}	H26	Δ pyrE2; Δ sRNA _{htsf209}	AG Soppa
H26ΔsRNA_{htsf242}	H26	Δ pyrE2; Δ sRNA _{htsf242}	AG Soppa
H26ΔsRNA_{htsf339}	H26	Δ pyrE2; Δ sRNA _{htsf339}	AG Soppa
H26ΔsRNA_{htsf359}	H26	Δ pyrE2; Δ sRNA _{htsf359}	AG Soppa
H26ΔsRNA_{htsf416}	H26	Δ pyrE2; Δ sRNA _{htsf416}	AG Soppa
H26ΔsRNA_{htsf467}	H26	Δ pyrE2; Δ sRNA _{htsf467}	AG Soppa
H26ΔsRNA_{htsf468}	H26	Δ pyrE2; Δ sRNA _{htsf468}	AG Soppa
H26ΔsRNA_{htsf494}	H26	Δ pyrE2; Δ sRNA _{htsf494}	AG Soppa
H26ΔsRNA_{htsf574}	H26	Δ pyrE2; Δ sRNA _{htsf574}	AG Soppa
*H119ΔsRNA_{htsf4}	H119	Δ pyrE2; Δ trpA:: Δ sRNA _{htsf4} ; Δ leu2	AG Marchfelder
*H119ΔsRNA_{htsf10}	H119	Δ pyrE2; Δ trpA:: Δ sRNA _{htsf10} ; Δ leu2	AG Marchfelder
H119ΔsRNA_{htsf14}	H119	Δ pyrE2; Δ trpA:: Δ sRNA _{htsf14} ; Δ leu2	AG Marchfelder
*H119ΔsRNA_{htsf21}	H119	Δ pyrE2; Δ trpA:: Δ sRNA _{htsf21} ; Δ leu2	AG Marchfelder

2.2 *ESCHERICHIA COLI*

Für die Klonierung der Deletionsplasmide wurde der *E. coli*-Stamm XL1 blue MRF' (Bullock *et al.*, 1987) von der Firma Stratagene (Leiden; NL) verwendet. Der Genotyp dieses Stammes lautet $\Delta(mcrA)183$; $\Delta(mcrCB\text{-}'\text{ hsdSMR-mrr})173$; *recA1*; *endA1*; *gyrA96*; *thi-1*; *hsdR17*; *supE44*; *relA1 lac* [F' *proAB+lacI*Z Δ M15 Tn10 (Tet^R)].

3. MIKROBIOLOGISCHE METHODEN

Alle steril zu verwendenden Medien, Puffer und Lösungen wurden autoklaviert (20 min bei 121°C, 1 bar Überdruck) oder mithilfe eines Sterilfilters entkeimt.

3.1 MEDIEN FÜR *HALOFERAX VOLCANII*

Zur Zellanzucht von *H. volcanii* wurde flüssiges oder festes Medium verwendet. Feste Medien wurden vor dem Autoklavieren mit 14 g Agar pro Liter Medium versetzt (1,4%).

3.1.1 Synthetisches Medium für *Haloferax volcanii*

Das synthetische Medium wurde modifiziert nach Nieuwlandt und Daniels (1990). Es schafft definierte Bedingungen für das Zellwachstum von *H. volcanii*. Bei bestimmten Kohlenstoffquellen produziert *H. volcanii* Säure, deshalb wurde bei der Kohlenstoffquelle Glukose(*) zusätzlich 2 M MOPS als Puffersubstanz ins Medium gegeben. In Tabelle 5 ist die Zusammensetzung des synthetischen Mediums für *H. volcanii* aufgeführt. Da bei dem verwendeten Stamm *H. volcanii* H26 das Uracil-Biosynthesegen deletiert wurde, wurde das synthetische Medium mit 50 µg/ml Uracil supplementiert. Ausnahme bildete das synthetische Medium für die PopIn-Selektion, hierbei wurde kein Uracil in das Medium gegeben.

Tabelle 5: Zusammensetzung der Salzlösung und der Supplemente zur Herstellung des synthetischen Mediums. Angegeben sind die benötigten Komponenten, ihre Endkonzentration im Medium und die verwendete Menge. *Die Zugabe von MOPS als Puffersubstanz bei Kohlenstoffquellen, die zur Säure verstoffwechselt werden.

Lösung	Komponente	Endkonzentration	Menge
Salzlösung	NaCl	2,14 M	125 g
	MgCl ₂ * 6 H ₂ O	221 mM	45 g
	MgSO ₄ * 7 H ₂ O	40,6 mM	10 g
	KCl	134 mM	10 g

Lösung	Komponente	Endkonzentration	Menge
	CaCl ₂ * 2 H ₂ O	9 mM	1,34 g
	1 M Tris/HCl; pH 7,2	50 mM	50 ml
	*2 M MOPS/NaOH; pH 7,2	50 mM	50 ml
		ad 900 ml H₂O	autoklavieren
Supplemente	1 M K ₂ HPO ₄	1 mM	1 ml
	1 M NH ₄ Cl	10 mM	10 ml
	Spurenelementlösung	0,1% (v/v)	1 ml
	Eisensulfatlösung	8 µM	1 ml
	1% (v/v) Vitaminlösung	0,1% (v/v)	1 ml
	Uracil-Lösung	50 µg/ml	1 ml
	Kohlenstoffquelle	s. Tabelle 7	
		ad 1 l H₂O	steril hinzu geben

Die Inhaltsstoffe der in Tabelle 5 aufgeführten Supplemente sind in Tabelle 6 gezeigt.

Tabelle 6: Zusammensetzung von Supplement-, Eisensulfat- und Uracil-Lösung. Diese Zusätze wurden zur Herstellung des synthetischen Mediums und zum Teil zur Herstellung des Komplexmediums benötigt. Angegeben sind die eingesetzte Komponente, ihre Endkonzentration im Medium und die jeweils verwendete Menge.

Lösung	Komponente	Endkonzentration	Menge
Spurenelement-lösung	ZnSO ₄ * 7 H ₂ O	3,5 µM	0,1 g
	MnCl ₂ * 4 H ₂ O	1,5 µM	0,03 g
	H ₃ BO ₃	50 µM	0,3 g
	CoCl ₂ * 6 H ₂ O	8,5 µM	0,2 g
	CuCl ₂ * 2 H ₂ O	0,5 µM	0,01 g
	NiCl ₂ * 6 H ₂ O	1 µM	0,02 g
	Na ₂ MoO ₄ * 2H ₂ O	1 µM	0,03 g
		ad 100 ml H₂O bidest.	pH 3-4 (HCl)
Eisensulfatlösung	FeSO ₄ * 7 H ₂ O	8 µM	0,23 g
		ad 100 ml H₂O bidest.	pH 3-4 (HCl) sterilfiltrieren
Uracil-Lösung	Uracil	50 mg/ml	0,5 g
	ad 10 ml DMSO		

Je nach Verwendungszweck wurden verschiedene Kohlenstoffquellen eingesetzt (s. Tabelle 7). Das PopIn-Selektivmedium wurde mit Casaminsäuren (CAS) supplementiert. Für die Untersuchungen zur Phosphatabhängigkeit von sRNA₁₃₂ und der Gencluster *HVO_A0477-80* und *HVO_2375-8* wurde synthetisches Medium mit der Kohlenstoffquelle Glukose versetzt.

Tabelle 7: Kohlenstoffquellen, die zur Herstellung des synthetischen Mediums verwendet wurden. Angegeben sind Endkonzentration und verwendete Menge auf einen Liter Medium. *Als Stoffwechselprodukt bei der Verwendung von Glucose entsteht Säure.

Kohlenstoffquelle	Endkonzentration	Menge (ad 1 l)
*20% (w/v) Glukose	0,5% (v/v)	25 ml
20% (w/v) Casaminosäuren	0,25% (v/v)	12,5 ml

3.1.2 Komplexmedium für *Haloferax volcanii*

Für das Komplexmedium modifiziert nach Nieuwlandt und Daniels (1990) wurde 900 ml Salzlösung (s. III.3.1.1) verwendet und nach dem Autoklavieren 100 ml Nährstofflösung und je 1 ml Eisensulfat- und Spurenelementlösung hinzugegeben. Zusätzlich wurde zur PopOut-Selektion 5'-FOA in einer Endkonzentration von 100 µg/ml hinzugegeben (s. Tabelle 8). Für alle Stämme mit extrachromosomalen Reportergerätenkonstrukten (Novobiocin-Resistenz) wurde Novobiocin in einer Endkonzentration von 0,4 µg/ml eingesetzt.

Tabelle 8: Nährstofflösung und Supplemente zur Selektion

Lösung	Komponente	Endkonzentration	Menge
Nährstofflösung	Hefeextrakt	0,3% (w/v)	3 g
	Trypton	0,5% (w/v)	5 g
		ad 100 ml H₂O bidest.	autoklavieren
5'-FOA	5'-Fluororotsäure	100 mg/ml ad 10 ml DMSO	1 g
Novobiocin	Novobiocin Natrium Salz	1 mg/ml ad 5 ml H₂O bidest.	0,005 g

3.1.3 Lagerung der Medien

Flüssiges Medium, welches mit 5'-FOA oder Novobiocin versetzt wurde, wurde bei 4°C bis zu vier Wochen gelagert. Die restlichen flüssigen Medien wurden bei Raumtemperatur und alle Agarplatten bei 4°C gelagert. Flüssiges SOB⁺-Medium wurde falls erforderlich direkt vor der Verwendung mit Ampicillin versetzt.

Die Spurenelement- und die Eisensulfatlösung wurden bei 4°C aufbewahrt. Die Vitaminlösung sowie die Stammlösungen von Novobiocin, Ampicillin und 5'-FOA wurden aliquotiert und bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert. Alle restlichen Lösungen wurden bei Raumtemperatur gelagert.

3.2 ZELLZUCHT VON *HALOFERAX VOLCANII*

Als Standardbedingung für Zellanzucht und Wachstumsversuche wurde synthetisches Medium mit der Kohlenstoffquelle Glucose verwendet. Wenn nicht anders angegeben erfolgte die Zellkultivierung von *H. volcanii* in 25 ml flüssigem Medium in sterilen 100 ml Erlenmeyerkolben bei 250 Upm und 42°C. Feste Medien wurden im Brutschrank bei 42°C inkubiert. Die Zelldichte wurde in den Küvetten mit dem Photometer Specord® S 600 und in den Mikrotiterplatten (MTPs) mit dem MTP-Photometer bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt.

3.3 DAUERKULTUREN *HALOFERAX VOLCANII*

Für die langfristige Lagerung von *H. volcanii* wurde 25 ml stationäre Kultur in ein steriles Szintillationsgefäß überführt und bei Raumtemperatur gelagert.

Eine weitere Methode zur dauerhaften Einlagerung von Kulturen war das Anlegen von Glycerin-Dauerkulturen, die anschließend bei -80°C gelagert. Hierzu wurden 30 ml spät-exponentieller Kulturen für 15 min bei 4000 Upm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Vor Gebrauch muss das Freezing-Medium durch invertieren gemischt werden (Zusammensetzung s. Tabelle 9). Das Zellsediment wurde vorsichtig in 750 µl Freezing-Medium resuspendiert und in sterile Kryoröhrchen überführt. Mit weiteren 750 µl Freezing-Medium wurde das Sedimentationsgefäß ausgespült, in das Kryoröhrchen überführt und durch langsames auf- und abpipettieren resuspendiert. Die Kryoröhrchen wurden zunächst für mindestens 5 min auf Eis oder im Kühlschrank inkubiert, anschließend über Nacht bei -20°C gelagert. Danach wurden die Dauerkulturen bei -80°C gelagert.

Tabelle 9: Zusammensetzung des Freezing-Mediums für das Anlegen von Glycerin-Kulturen zur dauerhaften Einlagerung von *H. volcanii*-Zellen. Angegeben sind Komponente, Endkonzentration und verwendete Menge.

Lösung	Komponente	Endkonzentration	Menge
Freezing-Medium	entsprechendes Selektivmedium	45,5% (v/v)	11,2 ml
	87% Glycerin (autoklaviert)	54,5% (v/v)	18,8 ml

3.4 MEDIEN FÜR *ESCHERICHIA COLI*

Zur Zellanzucht von *E. coli* wurde SOB⁺-Medium (s. Tabelle 10) nach Hanahan (1983)

verwendet. Für die Herstellung fester Medien wurde vor dem Autoklavieren 12 g Agar auf 1 l SOB⁺-Medium (1,2%) gegeben. Zur Selektion positiver Klone wurde 1 ml Ampicillin (Stammlösung: 100 mg/ml) zu einer Endkonzentration von 100 µg/ml auf 1 l Medium gegeben (SOB⁺-Amp-Medium).

Tabelle 10: Die Zusammensetzung des SOB⁺-Mediums zur Zellanzucht von *E. coli*. Angegeben sind Menge und Endkonzentration der einzelnen Komponenten.

Komponente	Endkonzentration	Menge
Trypton	2% (w/v)	20 g
Hefeextrakt	0,5% (w/v)	5 g
NaCl	10 mM	0,6 g
KCl	2,5 mM	0,187 g
1 M MgCl₂/MgSO₄	10 mM	10 ml
		ad 1 l H₂O bidest.

3.5 ZELLZUCHT VON *ESCHERICHIA COLI*

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte in SOB⁺-Medium (wenn nötig mit 100 µg/ml Ampicillin versetzt) bei 37°C und 250 Upm. Die Inkubation von festem Medium erfolgte über Nacht bei 37°C. Anschließend erfolgte die Lagerung bei 4°C.

3.6 DAUERKULTUREN *ESCHERICHIA COLI*

Zur langfristigen Aufbewahrung von *E. coli*-Kulturen wurde 1 ml frische Kultur zu einer 67%-igen Glycerinlösung hinzugegeben, gemischt und bei -80°C gelagert.

3.7 AUSWERTUNG DER PHÄNOTYPISCHEN CHARAKTERISIERUNG VON sRNA-DELETIONSMUTANTEN

Die Durchführung und Bedingungen der phänotypischen Charakterisierung wurden in Jaschinski *et al.* (2014) beschrieben. Die Wachstumsversuche wurden unter zehn verschiedenen Bedingungen in der Mikrotiterplatte durchgeführt: fünf verschiedene Kohlenstoffquellen (Glucose [Standardbedingung], CAS, Xylose, Acetat und Isoleucin), verschiedene Osmolaritäten (1,2 M; 2,1 M [Standardbedingung] und 4 M NaCl) und vier verschiedene Stressbedingungen (oxidativer Stress, Alkohol-, Kälte- und Salzstress). In dieser Doktorarbeit erfolgte die Auswertung der phänotypischen Charakterisierung von 27 sRNA-Deletionsmutanten im Vergleich zum Elternstamm. Zudem wurde das Schwärmverhalten von 17 sRNA-Deletionsmutanten untersucht. Anhand der Mittelwerte dreier biologischer Replikate wurden die Wachstumskurven erstellt.

Wachstumsausbeute, Verdopplungszeit und Dauer der Latenzphase wurden zusammen mit der entsprechenden Standardabweichung berechnet.

3.8 MIKROSKOPISCHE ANALYSE

Die Zellmorphologie der *H. volcanii*-Stämme wurde mit dem Lichtmikroskop (Carl Zeiss, Jena) beobachtet und mit dem Programm AxioVision 4.8.2 (Carl Zeiss, Jena) dokumentiert.

3.9 PHOSPHATENTZUG

Für den Phosphatentzug wurde von 150 ml Vorkulturen des Stammes H26 und der Deletionsmutante H26 Δ 132 in synthetischem Medium mit 1 mM Phosphat und der Kohlenstoffquelle Glucose kultiviert. In der exponentiellen Wachstumsphase wurden zunächst 2 ml der Vorkultur zur Isolation von RNA-Proben abgenommen (0 min **vor** Phosphatentzug). Danach wurden von jeder Vorkultur jeweils viermal 30 ml bei 13.000 Upm in sterilen Zentrifugenbechern für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurden jeweils drei der Zellsedimente in 10 ml synthetischem Medium mit 0 M Phosphat und jeweils eines der Zellsedimente in 10 ml synthetischem Medium mit 1 mM Phosphat aufgenommen und mittels Rührfischen resuspendiert. Dieser Waschschrift wurde ein weiteres mal wiederholt und die Zellsedimente anschließend in 30 ml des entsprechenden Mediums aufgenommen. Zum direkten Vergleich des Einflusses des Waschvorgangs auf das Transkriptlevel des Operons *HVO_A0477-80* und der *sRNA₁₃₂* wurden direkt nach dem Waschen erneut RNA-Proben entnommen (0 min **nach** Phosphatentzug). Der Phosphatentzug wurde in Dreifachbestimmung durchgeführt und jeweils eine Kontrollkultur mitgeführt. Die Versuchskulturen wurden anschließend bei 42°C und 250 Upm inkubiert. Für die Ermittlung der Transkriptlevel wurden nach 5, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 180, 240 min und nach 23 h Inkubation Proben entnommen.

3.10 KONKURRIERENDES WACHSTUM VON *HALOFERAX VOLCANII*

Für das konkurrierende Wachstum wurden Wildtyp und Deletionsmutante miteinander gemischt und Wachstumsvorteile der Deletionsstämme in direkter Konkurrenz beobachtet. Hierfür wurde die Deletionsmutante H26 Δ *HVO_2528* als Vergleichsstamm eingesetzt. Bei diesem Stamm wurde das Gen *HVO_2528*, welches für

die Phytoen-Dehydrogenase kodiert, deletiert. Dieses Enzym ist Bestandteil der Carotinoid-Biosynthese und katalysiert die Dehydrogenierung von Phytoen zu Zeta-Carotin. Ohne die Phytoen-Dehydrogenase kann die Carotinoid-Biosynthese nicht mehr erfolgen. Der Deletionsstamm besitzt deshalb nicht mehr die charakteristische rote Färbung in der stationären Wachstumsphase. Dieser sogenannte weiße Wildtyp kann auf Agar-Platten aufgrund weißer Kolonien von dem roten Deletionsstamm unterschieden werden.

Für das konkurrierende Wachstum wurden die Deletionsmutanten *H26ΔHVO_A0477-80* und *H26ΔHVO_2375-78* jeweils mit dem weißen Wildtyp verglichen. Hierzu wurden je 1×10^8 Zellen exponentieller Vorkulturen ($3-5 \times 10^8$ Zellen/ml) des weißen Wildtyps und einer roten Deletionsmutante abgenommen, vereint und für 5 min bei 13.000 Upm zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 5 ml synthetischem Medium mit 0 M Phosphat und der Kohlenstoffquelle Glucose aufgenommen, mittels Rührfischen resuspendiert und wiederholt zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 30 ml synthetischen Medium mit 0 M Phosphat aufgenommen (T0), erneut durch kurzes Rühren resuspendiert und bei 42°C und 250 Upm inkubiert. Die Versuche wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt. Nach 2-3 Verdopplungen (T1) wurden $1-2 \times 10^8$ Zellen abzentrifugiert, in synthetischem Medium mit 10 µM Phosphat aufgenommen und erneut inkubiert. Nach erneuten 2-3 Verdopplungen (T2) wurde der Vorgang wiederholt und die Zellen in synthetischem Medium mit 20 µM Phosphat aufgenommen. Nach diesem Schema wurde die Phosphatkonzentration Schrittweise auf 50 µM Phosphat (T6) erhöht. Abweichend hierzu wurde für das konkurrierende Wachstum mit der Deletion des ABC-Transport-Systems *HVO_2375-78* keine schrittweise Erhöhung der Phosphatkonzentration vorgenommen, sondern nach 2-3 Verdopplungen jeweils Phosphat in einer Endkonzentration von 10 µM hinzugegeben. Die Zugabe von 10 µM Phosphat erfolgte insgesamt siebenmal (T8).

Nach Adaptation der Zellen an die jeweilige Phosphatkonzentration (Zeitpunkte T0 bis T6) wurden jeweils 50 µl (abweichend zum Zeitpunkt T1 bei *ΔHVO_0477-80* 100 µl) der Verdünnungen 10^{-4} , 10^{-5} und 10^{-6} auf Platten mit Komplexmedium ausplattiert und mehrere Tage bei 42°C inkubiert. Anschließend wurde die Anzahl der weißen und roten Kolonien bestimmt.

4. MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

4.1 ISOLIERUNG GENOMISCHER DNA AUS *HALOFERAX VOLCANII*

Die Lösungen zur Isolierung chromosomaler DNA aus *H. volcanii* sind in Tabelle 11 angegeben. Zunächst wurden 10 ml einer exponentiellen Kultur für 15 min bei 3220 g und 20°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellsediment wurde in 300 µl Basalsalz aufgenommen und mit 2,5 ml Lyse-Puffer bis zum vollständigen Zellaufschluss gemischt. Anschließend wurde die Wasserphase mit 5 ml EtOH überschichtet und an der Phasengrenze ausfallende genomische DNA auf eine Glaskapillare gewickelt. Dann wurden beide Phasen gemischt und 5 min in dem Gefäß belassen, wodurch die DNA partiell dehydrierte und somit fester an die Kapillare gebunden wurde. Im Anschluss wurde die DNA zweimal in EtOH und danach zweimal in Ether gewaschen. Die DNA wurde für einige Minuten an der Luft getrocknet und in TE-Puffer gelöst. Um die DNA vollständig zu lösen, wurde diese für etwa 10 min auf 60°C erhitzt und anschließend über Nacht bei 4°C inkubiert. Die DNA-Konzentration wurde mit dem Nanodrop Spektrophotometer bestimmt.

Tabelle 11: Puffer zur Isolation chromosomaler DNA. Aufgelistet sind die Puffer-Zusammensetzung, die Endkonzentration und die Menge der einzelnen Komponenten.

Puffer	Komponente	Endkonzentration	Menge
Lyse-Puffer	1 M NaCl	100 mM	5 ml
	1 M Tris/HCl pH 8,0	10 mM	0,5 ml
	0,5 M EDTA	1 mM	0,1 ml
	20% SDS	0,05%	0,125 ml
			ad 50 ml H₂O bidest.
TE-Puffer	1 M Tris/HCl pH 8,0	10 mM	0,5 ml
	0,5 M EDTA	1 mM	0,1 ml
			ad 50 ml H₂O bidest.

4.2 ISOLIERUNG VON PLASMID-DNA AUS *ESCHERICHIA COLI*

Zur Isolation geringer Mengen Plasmid-DNA wurden die Lösungen aus Tabelle 12 verwendet. Zunächst wurde 1 ml einer exponentiellen Vorkultur von *E. coli* für 30 s bei 13.000 Upm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellsediment in 150 µl Puffer 1 resuspendiert. Anschließend wurde 150 µl Puffer 2 hinzugegeben und zehnmals vorsichtig invertiert. Danach erfolgte die Zugabe von 150 µl Puffer 3 und vorsichtiges

Mischen durch erneutes zehnmaliges Invertieren. Dann wurde für 10 min bei 13.000 Upm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Zum Überstand wurde 1 ml 96%-iges Ethanol hinzugegeben und gemischt. Danach wurde für 15 min bei 13.000 Upm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach der vorsichtigen Zugabe von 500 µl 70%-igem Ethanol zum Sediment, ohne dieses zu lösen, erfolgte eine weitere Zentrifugation für 5 min bei 13.000 Upm. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment getrocknet. Abschließend wurde das Sediment in 50 µl TE-Puffer resuspendiert.

Zur Isolation größerer Mengen Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde das Midiprep-Kit von Sigma verwendet. Es wurden 50 ml einer über Nacht inkubierten Kultur verwendet und nach Angaben des Herstellers isoliert.

Tabelle 12: Puffer und Lösungen zur Isolation von Plasmid-DNA. Angegeben sind die Komponente, ihre Endkonzentration und die eingesetzte Menge.

Lösung	Komponente	Endkonzentration	Menge
Puffer 1	1 M Tris/HCl; pH 8	50 mM	5 ml
	EDTA	10 mM	0,29 g
	Rnase A (10 mg/ml)	100 µg/ml	1 ml
	ad 100 ml H₂O bidest.		Lagerung bei 4°C
Puffer 2	1 M NaOH	0,2 M	20 ml
	20 % SDS	1% (w/v)	5 ml
	ad 100 ml H₂O bidest.		Lagerung bei RT
Puffer 3	Kaliumacetat	3,2 M	31,4 g
	ad 100 ml H₂O bidest.	pH 5,5 mit Essigsäure	eisgekühlt
Ethanol	Ethanol (96%)	70%	73 ml
	ad 100 ml H₂O bidest.		
Ethanol	Ethanol (96%)	96%	100 ml
TE-Puffer	s. III.4.1		

4.3 DENATURIERENDE GELELEKTROPHORESE ZUR AUFTRENNUNG VON DNA

Die Auftrennung von Nukleinsäuren erfolgte mittels Gelelektrophorese in einer Agarose-Gelmatrix. Zur Herstellung der Agarosegele wurde zunächst Agarose zu einem definierten Prozentsatz (0,7-1,8%) in 1-fach Tris-Borat-EDTA(TBE)-Puffer (Verdünnung des 10-fach TBE-Puffers mit H₂O bidest.) durch Erhitzen gelöst. Die Agarose-Lösung wurde nach Abkühlen auf 60°C in einen Gelschlitten mit aufgesetztem Kamm gegeben.

In Tabelle 13 sind die benötigten Puffer und Lösungen aufgelistet.

Tabelle 13: Puffer zur Herstellung der Agarosegele und für die Gelelektrophorese. Die Zusammensetzung der Puffer, die Endkonzentration und die Menge der einzelnen Komponenten ist aufgelistet.

Lösung	Komponente	Endkonzentration	Menge
10-fach TBE-Puffer	Tris	0,89 M	107,81 g
	Borsäure	0,89 M	55,03 g
	Na ₂ EDTA	0,02 M	7,45 g
	ad 1 l H₂O bidest.		
DNA-Probenpuffer (6-fach)	1 M Tris/HCl pH 8,0	10 mM	1 ml
	Harnstoff	42% (w/v)	42 g
	EDTA	0,8% (w/v)	813 mg
	80% Glycerin (v/v)	32% (v/v)	40 ml
	Bromphenolblau	0,1% (w/v)	100 mg
	ad 100 ml H₂O bidest.		

Die mit 1-fach konzentriertem DNA-Probenpuffer beschwerten Nukleinsäuren wurden in die Taschen des Agarosegels gegeben. Durch Anlegen einer Spannung von 60-100 V (je nach Größe des Gels und der Anzahl der Gele in einer Gelkammer) bewegten sich die negativ geladenen Nukleinsäuremoleküle zum Pluspol der Spannungsquelle. Die Größe der Nukleinsäuremoleküle bestimmte hierbei die Geschwindigkeit beim Durchqueren der Gelmatrix. Zusätzlich zu den Proben wurde der geeignete Größenstandard zur Identifikation der Größe der Nukleinsäuren aufgetragen.

Die Färbung der Gele erfolgte in einer Ethidiumbromidlösung in der Ethidiumbromid zu einer Endkonzentration von 1 mg/l in H₂O bidest. gelöst wurde. Ethidiumbromid ist ein in die DNA interkalierender Farbstoff, der durch Bestrahlung mit UV-Licht fluoresziert. Die Geldokumentation der Agarosegele erfolgte mit dem High Resolution System E.A.S.Y 440K der Firma Herolab, Wiesloch.

4.4 POLYMERASE-KETTENREAKTION

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde zur Amplifikation von DNA-Fragmenten eingesetzt. Das grundlegende Prinzip dieser molekularbiologischen Methode besteht aus der Denaturierung der doppelsträngigen DNA, dem Anlagern der Oligonukleotide an die einzelsträngige DNA (Annealing) und der anschließenden Synthese des Komplementärstranges durch die DNA-Polymerase in 3'-Richtung (Elongation). Durch

Wiederholung dieser drei Schritte wird der, durch die Oligonukleotide begrenzte, DNA-Abschnitt amplifiziert. Die verwendete Annealing-Temperatur lag 5-10°C unterhalb der Schmelztemperatur der Oligonukleotide. Nach Beendigung der Zyklen wurde eine terminale Elongation, bei der sämtliche freien 3'-Enden verlängert werden sollten, angeschlossen.

Aufgrund der hohen Temperaturen muss für die PCR-Reaktion eine thermostabile Polymerase verwendet werden. Im Zuge dieser Arbeit wurden drei Polymerasen verwendet. Zunächst die *Taq*-Polymerase, welche ursprünglich aus *Thermus aquaticus* stammt und eine DNA-Syntheserate von 1000 bp pro min erreicht. Die *Taq*-Polymerase besitzt zwar eine 5'-3'-, jedoch keine 3'-5'-Exonukleaseaktivität und somit keine Korrekturlesefunktion. Desweiteren wurde die *Pfu*-Polymerase, die ursprünglich aus *P. furiosus* stammt, verwendet. Diese Polymerase besitzt eine Syntheserate von etwa 500 bp pro min. Da die *Pfu*-Polymerase sowohl eine 5'-3'- als auch eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität besitzt, ist sie genauer als die *Taq*-Polymerase und wurde bevorzugt für Klonierungen verwendet. Die dritte verwendete Polymerase ist die hoch präzise, artifizielle Phusion-Polymerase. Sie besitzt ebenfalls sowohl eine 5'-3'- als auch eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität und eine Syntheserate von 1000 bp innerhalb von 15-30 s. Die Phusion-Polymerase eignet sich besonders für die Amplifikation langer DNA-Fragmente. Alle drei Polymerasen benötigen Magnesiumchlorid und das freie 3'-OH-Ende der Nukleotide für die Initiation der Polymerisation. In Tabelle 14 sind eingesetzte Mengen der verschiedenen DNA-Matrizen und die zur Amplifikation verwendete Zyklenzahl aufgeführt.

Tabelle 14: Mengen der verschiedenen DNA-Matrizen und zur Amplifikation benötigte Zyklenzahlen.

Art der Matrize	Menge	Zyklenzahl
Plasmid-DNA	50 ng	25-30
genomische DNA	200 ng	25-30
PCR-Produkt	200 ng	10-15

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten wurden die in Tabelle 15 angegebenen Puffer und Lösungen verwendet.

Tabelle 15: Puffer und Lösungen zur Amplifikation von DNA-Fragmenten. Angegeben sind die Zusammensetzungen und die verwendete Menge und die Endkonzentration der einzelnen Komponenten.

Lösung	Komponente	Endkonzentration	Menge
10-fach PCR-Puffer für <i>Taq</i>-Polymerase	KCl	500 mM	3,75 g
	Tris/HCl; pH 9,0	100 mM	1,2 g
	Triton X-100	1% (w/v)	1 g
	ad 100 ml H₂O bidest. pH 9,0 mit HCl		
10-fach PCR-Puffer für <i>Pfu</i>-Polymerase	Qiagen	1-fach	
dNTP66-Mix (66% GC-Gehalt)	dATP (100 mM)	1 mM	10 µl
	dTTP (100 mM)	1 mM	10 µl
	dCTP (100 mM)	1,5 mM	15 µl
	dGTP (100 mM)	1,5 mM	15 µl
	ad 1 ml H₂O bidest.		

Der Standard-PCR-Ansatz und das Standard-PCR-Programm zur Amplifikation der verschiedenen PCR-Fragmente sind in Tabelle 16 und 17 aufgelistet.

Tabelle 16: Standard PCR-Ansatz zur Amplifikation von DNA-Fragmenten. Aufgelistet sind Menge und Endkonzentration der einzelnen Komponenten.

Komponente	Endkonz.	Menge
DNA-Matrize	x ng	x µl
10x Polymerase-Puffer	10% (v/v)	10 µl
DNA Polymerase	1% (v/v)	1 µl
dNTP66-Mix	16% (v/v)	16 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1,6 mM	6,4 µl
Zusätze	s. u.	y µl
Oligonukleotid 1 (20 pmol/µl)	1 pmol	5 µl
Oligonukleotid 2 (20 pmol/µl)	1 pmol	5 µl
	ad 100 µl H₂O bidest.	56,6 µl - (x+y) µl

Tabelle 17: Standard PCR-Programm zur Amplifikation von DNA-Fragmenten. Angegeben sind Temperatur, Dauer und die Zyklenzahl der Amplifikations-Schritte.

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklenzahl
initiale Denaturierung	96°C	5 min	1
Denaturierung	96°C	30 s.	s. Tabelle 14
Annealing	x°C	30 s.	s. Tabelle 14
Elongation	72°C	90 s.	s. Tabelle 14
additionalere Elongation	72°C	5 min	1
Lagerung	4°C	∞	1

Zur Amplifikation der PCR-Produkte wurde entweder die *Taq*-Polymerase oder die *Pfu*-Polymerase mit den entsprechenden Puffern verwendet. Zur Optimierung der PCR-

Reaktionen wurde 1 M Betain (25 µl 4 M Betainlösung auf 100 µl PCR-Ansatz) oder 5% DMSO eingesetzt.

4.4.1 Fusions-PCR

Für die Fusion wurden die zuvor amplifizierten Fragmente zunächst gereinigt und je 200 ng als DNA-Matrize verwendet. Im ersten Schritt wurde eine Standard-PCR ohne Zugabe der Oligonukleotide für fünf Zyklen durchgeführt. Hierbei wurde die Annealing-Temperatur auf 60 s verlängert und die Elongationszeit auf 105 s erhöht. Anschließend wurden die entsprechenden Oligonukleotide hinzugegeben und eine zweite PCR für weitere 15 Zyklen durchgeführt, wobei im Vergleich zur Standard-PCR die Elongationszeit auf 2 min erhöht wurde.

Im ersten Reaktionsteil, ohne Zugabe der Oligonukleotide, lagern sich die komplementären Überhänge der beiden Fragmente an. Da die DNA-Polymerase für die DNA-Synthese ein freies 3'-OH-Ende benötigt, kann ausschließlich die Überlagerung der Überhänge des 5'-3'-Stranges von F1 und des 3'-5'-Stranges von F2 zur Synthese des Fusionsprodukts führen. Im zweiten Schritt führt die Zugabe der Oligonukleotide zur Amplifikation des Fusionsprodukts.

4.4.2 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR mit ganzen Zellen als DNA-Matrize dient zur schnellen Analyse einzelner Klone. Durch Verwendung einer MTP und Mehrkanalpipette konnten hierbei die Klone vieler sRNA-Deletionen parallel und mit geringem Mehraufwand getestet werden. Als Polymerase diente die *Taq*-Polymerase.

Bei *E. coli* Klonen betrug die Annealing-Temperatur 50°C und es wurde ein Klon zu 20 µl des PCR-Ansatzes gegeben. Bei *H. volcanii* Klonen wurden diese zur Erhöhung der Effizienz der PCR zunächst in 30 µl H₂O lysiert und 1 µl davon zu 20 µl PCR-Ansatz gegeben. Die Annealing-Temperatur betrug hierbei 67°C. Bei Verwendung von Plasmid-DNA als DNA-Matrize wurde 1 µl des Deletionsplasmids auf 20 µl PCR-Ansatz gegeben.

4.4.3 Herstellung von Digoxigenin-markierten Sonden mittels PCR

Die Herstellung der DNA-Gensonden erfolgte analog zur Standard PCR-Reaktion. Abweichend hierzu wurde das Reaktionsvolumen auf 50 µl halbiert, es wurden je 1 µl der entsprechenden Plasmid-DNA als DNA-Matrize und je 2 µl jedes Oligonukleotids (20 pmol/µl) eingesetzt. Die Elongationszeit wurde aufgrund des langsameren Einbaus von Digoxigenin-markiertem Desoxyuridin (DIG-dUTP) (1 µl einer 1 mM Stammlösung) auf 2 min erhöht. Statt des dNTP66-Mix wurde 1 µl eines dNTP-Mix mit einer verringerten Konzentration an dTTP (dNTP-Mix low dTTP) und einer erhöhten Konzentration von 4 mM MgCl₂ eingesetzt. Bei der Erzeugung der Sonden wurde als Kontrolle jeweils ein Ansatz ohne Zugabe von DIG-dUTP mitgeführt. Zudem wurde die Zyklenzahl auf 30 erhöht.

4.5 SEQUENZIERUNGEN NACH SANGER

Im Sequenzieransatz wurde 5 µl Oligonukleotid (5 pmol/µl) mit 5 µl der zu sequenzierenden Probe in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß gemischt. Für die Sequenzierung von PCR-Produkten wurden die Ausgangslösungen auf eine Konzentration von 20 bis 80 ng/µl und für Plasmid-DNA auf eine Konzentration von 80 bis 100 ng/µl eingestellt. Die Schmelztemperatur des Oligonukleotids lag zwischen 52 und 58°C und die Länge zwischen 17 und 19 bp. Das 3'-Ende des Oligonukleotids bestand aus mindestens einem und maximal drei Desoxyguanosin oder Desoxycytidin. Abfolgen von mehr als vier gleichen Basen wurden vermieden.

Die Sequenzierungen wurden von der Firma GATC Biotech AG (Köln) durchgeführt und erfolgten mit dem ABI 3730xl DNA-Analyzer-System (Gerät mit 96 Kapillaren) basierend auf der Kettenabbruch-Methode nach Sanger *et al.* (1992).

4.6 DNA-MIKROARRAY VON *HALOFERAX VOLCANII*

Für den DNA-Mikroarray wurden mit Poly-L-Lysin beschichtete Glasträger von der Firma PolyAn (Berlin) bezogen und bei einer Luftfeuchte von 45% gedruckt. Der DNA-Mikroarray bestand hauptsächlich aus über das Genom verteilten Spots, welche aus DNA-Molekülen mit einer Größe von etwa 1,5 kbp zusammengesetzt waren. Da die mittlere Gengröße von *H. volcanii* etwa 1 kbp beträgt, sind durchschnittlich 1,5 Gene auf

einem Spot vertreten. Bei kleineren Genen können jedoch auch mehrere Gene auf einem Spot gedruckt worden sein. Einige Gene waren auf mehreren Spots vertreten, andere Gene waren nur teilweise bzw. ein Teil der Gene gar nicht auf den Mikroarray gedruckt. Zusätzlich wurde eine Reihe von ausgewählten Genen (z.B. sRNAs) als Oligonukleotide auf den Mikroarray gedruckt. Die gedruckten Glasträger wurden dunkel im Exsikkator gelagert.

4.6.1 Vorbehandlung der Glasträger

Die Glasträger wurden in eine Feuchtigkeitskammer gelegt und für 10-15 min inkubiert bis ein Glitzern der Spots zu erkennen war. Anschließend wurden die Glasträger mit der unbedruckten Seite auf einen auf 80°C vorgeheizten Heizblock mit umgedrehten Einsätzen gelegt und für 2-3 min getrocknet. Nachdem alle Spots trocken waren, wurden die Glasträger im UV-Stratalinker® 1800 bei 150 mJ quervernetzt.

4.6.2 Blocken der Glasträger

Die Vorbehandelten Glasträger wurden anschließend geblockt. Hierzu wurden alle Arbeiten aufgrund der Toxizität von Dichlorethan unter dem Abzug durchgeführt. Während des gesamten Vorgangs durften die Glasträger nicht antrocknen. Die verwendeten Lösungen sind in Tabelle 18 angegeben.

Tabelle 18: Lösungen zum Blocken der Glasträger für den DNA-Mikroarray. Angegeben sind die einzelnen Komponenten, ihre Endkonzentration und ihre entsprechende Menge. Die Angaben reichen zum Blocken von 20 Glasträgern.

Lösung	Komponente	Endkonzentration	Menge
Acetanhydrid-Dichlorethan	Acetanhydrid	4 %	8 ml
	ad 200 ml Dichlorethan	immer frisch ansetzen!	
Tris-Saline-Puffer	NaCl	600 mM	17,5 g
	1 M Tris/HCl, pH7,5	100 mM	50 ml
	ad 500 ml H₂O bidest.		

Zunächst wurden die Glasträger vorsichtig in 200 ml Acetanhydrid-Dichlorethan-Lösung eingetaucht und über Nacht bei Raumtemperatur in einem lichtundurchlässigen Gefäß leicht geschüttelt (max. 30 Upm). Danach wurden die Glasträger vorsichtig in Tris-Saline-Puffer gewaschen und in ein neues Gefäß mit

frischem Tris-Saline-Puffer überführt und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Glasträger dreimal für 30 s in frischem H₂O bidest. gewaschen und zum Trocknen für mindestens 10 min bei maximal 500 Upm zentrifugiert. Die Lagerung der Glasträger erfolgte dunkel im Exsikkator.

4.6.3 cDNA-Synthese und Vorbereitung der Proben für den Mikroarray

Mittels DNA-Mikroarray wurden zwei RNA-Proben miteinander verglichen. Hierzu musste zunächst stabilere cDNA synthetisiert werden. Zusätzlich zum Low-T-dNTP-Mix, der eine geringere Menge an Desoxythymidintriphosphat (dTTP) enthielt, wurden beiden Vergleichsproben unterschiedlich fluoreszierende Desoxyuridintriphosphate (dUTPs) zur Verfügung gestellt. Für die cDNA-Synthese der ersten RNA-Probe wurden die fluoreszierenden Nukleotide Amersham™ Cy5-dUTP, die eine Emission bei 635 nm besitzen, verwendet. Die synthetisierte cDNA fluoreszierte rot. Die cDNA-Synthese der zweiten RNA-Probe wurde unter Zugabe von Amersham™ Cy3-dUTP durchgeführt. Die synthetisierte cDNA emittierte grünes Licht bei 532 nm. Für jeden Mikroarray wurde jeweils eine RNA-Probe mit Amersham™ Cy5-dUTP und die andere mit Amersham™ Cy3-dUTP versetzt. Der Ansatz für die cDNA-Synthese einer RNA-Probe ist in Tabelle 19 gezeigt. Um die fluoreszierenden Nukleotide vor dem Zerfall zu schützen, wurden die Reaktionsgefäße während der Inkubationszeiten lichtgeschützt behandelt. Für die cDNA-Synthese wurde zunächst der Reaktionsansatz ohne die Zugabe des Enzyms für 5 min bei 65°C denaturiert und anschließend zwei min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte die cDNA-Synthese durch Zugabe von 2 µl M-MLV-Reverse Transkriptase und einer Inkubation bei 42°C für zwei Stunden. Nach der ersten Stunde wurde nochmals 1 µl Reverse Transkriptase hinzugefügt.

Tabelle 19: Ansatz für die cDNA-Synthese von RNA-Proben für den DNA-Mikroarray. Angegeben sind die einzelnen Komponenten, ihre Endkonzentration und Menge.

Lösung	Komponente	Endkonzentration	Menge
Low-T-dNTP-Mix	dATP	5 mM	4 µl
	dCTP	5 mM	
	dGTP	5 mM	
	dTTP	2 mM	
Amersham™ Cy3-dUTP (1 mM)/		25 µM	1 µl
Amersham™ Cy5-dUTP (1 mM)			

Lösung	Komponente	Endkonzentration	Menge
Hexamer-Mix (1 mg/ml)		15 µM	0,6 µl
M-MLV 5-fach Reaktionspuffer		1-fach	8 µl
M-MLV Reverse Transkriptase (200 U/µl)		10 U/µl	2 µl
ad 40 µl Nuklease-freies Wasser			

Nach der cDNA-Synthese erfolgte die Vorbereitung der Proben für den DNA-Mikroarray. Die benötigten Lösungen sind in Tabelle 20 aufgeführt.

Tabelle 20: Lösungen zur Vorbereitung der Proben für den DNA-Mikroarray.

Lösung	Menge
EDTA, pH 7,9 (0,5 M)	5 µl
NaOH (0,1 M)	10 µl
Tris/HCl, pH 7,5 (1 M)	25 µl
Hefe-tRNA (4 mg/ml)	2 µl
Nexterion® Oligo Hyb	122 µl
(Hybridisierungslösung)	<i>Lagerung bei 4°C; vor Gebrauch auf Raumtemperatur erwärmen!</i>

Im Anschluss an die cDNA-Synthese erfolgte die Inaktivierung aller Enzyme (M-MLV-Reverse Transkriptase, RNase, DNase) durch die Zugabe von 5 µl 0,5 M EDTA (pH 7,9) und 10 µl 0,1 M NaOH für 15-60 min bei 65°C. Danach wurde die Lösung auf Raumtemperatur abgekühlt, 25 µl 1 M Tris/HCl (pH 7,5) hinzugegeben und die Proben vereinigt. Die vereinigten Proben wurden mit dem MinElute™ PCR Purification Kit der Firma Qiagen nach Herstellerangaben aufgereinigt und mit 16 µl Nuklease-freiem Wasser eluiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 2 µl Hefe-tRNA und das Auffüllen mit Nexterion Oligo Hyb auf 140 µl. Dieser Hybridisierungspuffer musste vor Benutzung auf Raumtemperatur gebracht und Präzipitate gegebenenfalls gelöst werden. Abschließend wurde der Ansatz für 5 min bei 95°C inkubiert und bis zur Hybridisierung bei 45°C gehalten.

4.6.4 Hybridisierung des DNA-Mikroarrays

Für die Hybridisierungsstation (Tecan HS 4800 Pro Hybridisierungsstation) wurden die in Tabelle 21 aufgelisteten Puffer jeweils frisch vorbereitet. Für die Lösungen wurde pro Glasträger ein Volumen von 200 ml, bei drei oder vier Glasträgern ein Volumen von 500 ml benötigt.

Tabelle 21: Benötigte Lösungen für die Hybridisierung des DNA-Mikroarrays mittels Tecan HS 4800 Pro Hybridisierungsstation. Aufgelistet ist der Kanal zum Anschluss an die Hybridisierungsstation, die benötigte Lösung, deren Zusammensetzung, die Endkonzentration der einzelnen Komponenten und die eingesetzte Menge.

Kanal	Lösung	Komponente	Endkonzentration	Menge
1	Prähybridisierungslösung	BSA	10 mg/ml	2 g
		20-fach SSC	3,5-fach	35 ml
		20% SDS	0,1%	1 ml
		ad 200 ml H ₂ O bidest		
2	H ₂ O bidest.			200 ml
3	Natronlauge	1 M NaOH	100 mM	20 ml
		ad 200 ml H ₂ O bidest.		
4	Waschpuffer 1	20-fach SSC	0,5-fach	6,25 ml
		20% SDS	0,01%	125 µl
		ad 250 ml H ₂ O bidest.		
5	Waschpuffer 2	20-fach SSC	0,06-fach	750 µl
		ad 250 ml H ₂ O bidest.		

Zunächst wurden die Flaschen mit den frisch angesetzten Lösungen an den entsprechenden Anschlüssen befestigt, die Heizung eingeschaltet und die vorbehandelten Glasträger eingelegt. In nicht benutzte Positionen wurden sogenannte „Dummies“ eingelegt. Anschließend wurde die Stickstoffversorgung und dann das Programm „Hv_PolyAn_PolyLysin“ gestartet. Die Programmierung ist in Tabelle 22 gezeigt.

Tabelle 22: Programm der Tecan Hybridisierungsstation HS 4800 Pro zur Hybridisierung der Glasträger. Gezeigt sind die einzelnen Schritte, der Vorgang, die Temperatur und die Programm-Beschreibung.

Schritt	Vorgang	Temp.	Programm-Beschreibung
1	Waschen	50°C	First: Yes; Channel 1; Run 2; Wash time: 1 min; Soak time: 0 min
2	Prähybridisierung	50°C	Agitation Frequency: High; High Viscosity Mode: Yes; time: 1 h
3	Waschen	25°C	First: No; Channel 2; Run 2; Wash time: 1 min; Soak time: 0 min
4	Waschen	25°C	First: No; Channel 3; Run 2; Wash time: 1 min; Soak time: 0 min
5	Prähybridisierung	25°C	Agitation Frequency: High; High Viscosity Mode: Yes; time: 30 min
6	Waschen	25°C	First: No; Channel 2; Run 2; Wash time: 1 min; Soak time: 0 min
7	Injektion der Proben	42°C	Agitation: Yes; BCR: No
8	Hybridisierung	42°C	Agitation Frequency: High; High Viscosity Mode: Yes; time: 16 h
9	Waschen	25°C	First: No; Channel 4; Run 1; Wash time: 1 min; Soak time: 1 min

Schritt	Vorgang	Temp.	Programm-Beschreibung
10	Waschen	25°C	First: No; Channel 5; Run 1; Wash time: 1 min; Soak time: 1 min
11	Waschen	25°C	First: No; Channel 4; Run 1; Wash time: 1 min; Soak time: 1 min
12	Waschen	25°C	First: No; Channel 5; Run 1; Wash time: 1 min; Soak time: 1 min
13	Trocknen	25°C	2 min; Final Manifold Cleaning: No; Channel: No

4.6.5 Auswertung des DNA-Mikroarrays

Zur Auswertung des DNA-Mikroarrays wurden die Glasträger nach der Hybridisierung mit dem Scanner GenePix® 4200A von Molecular Devices eingescannt und mit der Software GenePix® Pro 7 ausgewertet. Die Scans der Rot- (635 nm) und Grünwerte (531 nm) wurden unter Hardware-Settings eingestellt. Die Photomultiplier-Verstärkung (PMT-Gain) wurde zunächst in beiden Kanälen auf 550 und die Leistung auf 70% gestellt. Anschließend wurde ein Vorschau-Scan über einen kurzen Bereich gemacht. Danach wurden die Einstellungen PMT-Verstärkung optimiert, um eine optimale Laserintensität zu erhalten, sodass auf der einen Seite möglichst wenige weiße Spots (zu starkes Signal), auf der anderen Seite deutliche Signale zu erkennen waren. Hierzu wurde das automatisch erstellte Histogramm beachtet. Um die Positionen der Spots auf dem Array zu identifizieren und zuzuordnen wurde die zum Druck gehörende Arraylist geladen. Anschließend wurde die korrekte Orientierung der Raster überprüft und bei Bedarf die einzelnen Spots korrigiert. Danach wurden die Intensitäten mit GenePix® Pro 7 analysiert und als GPR-Datei abgespeichert. Die anschließende Auswertung der GPR-Dateien erfolgte mit Microsoft® Excel. Hierzu wurden zunächst die jeweiligen Hintergrundintensitäten von den Rot- bzw. Grünwerten abgezogen und die Mediane des Signal-Rausch-Verhältnisses (SNR Median) bestimmt. In die weitere Auswertung wurden ausschließlich SNR Median-Werte von mindestens drei einbezogen. Anschließend wurden die Kontrollspots herausgefiltert und im Scatter Blot die Rot- gegen die Grünwerte der auswertbaren Spots aufgetragen. Falls eine Verschiebung der Spots in einer Bananenform entlang der Mittelachse festgestellt werden konnte, wurden die Werte mit dem Programm Acuity® von Molecular Devices korrigiert. Aus mehreren Mikroarrays wurde die mittlere Ratio bestimmt und Spots, deren Transkriptlevel mindestens zweifach erhöht bzw. verringert waren, als differentiell reguliert definiert.

4.7 REINIGUNG VON DNA-FRAGMENTEN

Für die Reinigung von PCR-Produkten wurden verschiedene molekularbiologische Kits verwendet. Zur Reinigung von PCR-Produkten aus Lösungen und Agarosegelen wurde das ‚PCR-Kombi-Kit‘ von *Seqlab* und das ‚Monarch DNA Extraction Kit‘ von *New England Biolabs* jeweils nach Anleitung des Herstellers verwendet. Desweiteren wurde zur Reinigung von DNA aus Agarosegelen das ‚Gelelution Kit‘ von *Seqlab* und das ‚Monarch Gelelution Kit‘ von *New England Biolabs* jeweils nach Herstellerangaben verwendet.

4.8 DNA-SPALTUNG MIT RESTRIKTIONSENZYMEN

Für die analytische und präparative Spaltung von DNA wurden die Restriktionsenzyme von der Firma Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) bezogen und nach Anleitung des Herstellers mit den empfohlenen Puffern verwendet. Zur Spaltung von 1 µg DNA wurde pro Stunde 1 U des Restriktionsenzym benötigt. Für die analytische Spaltung von Plasmid-DNA wurden 0,5 µg, für die präparative Restriktion von Plasmid-DNA 5 µg eingesetzt. Für die Southern Blot Analyse wurden 2 µg chromosomaler DNA gespalten.

4.9 LIGATION

Die Ligation von gespaltenem Vektor pMH101 mit dem Fusionsprodukt wurde nach den Angaben in Tabelle 23 angesetzt und die Menge des Inserts anhand folgender Formel berechnet:

$$\text{Menge des Inserts [ng]} = \frac{150 \text{ ng Vektor} * \text{Länge des Inserts [bp]}}{\text{Länge des Vektors [bp]}} * 3$$

Wie in der Formel gezeigt ist, wurde für die Ligation die dreifache molare Menge des Inserts eingesetzt. Zur Erhöhung des Ligationserfolges wurde das entsprechende Restriktionsenzym mit seinem Puffer und das von der T₄-DNA-Ligase zur Aktivität benötigte ATP zum Ansatz hinzugegeben. Vor einer ersten Probenentnahme (Probe vor der Ligation) wurde der Ansatz mit Eis gekühlt. Nach einer Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur wurde erneut eine Probe entnommen (Probe nach der Ligation). Nach der Entnahme wurden beide Proben direkt für 20 min bei 80°C hitzeinaktiviert und zur Dokumentation des Ligationserfolges auf ein 1%-iges analytisches Gel aufgetragen.

Tabelle 23: Reaktionsansatz für die Ligation von geschnittenem Vektor und Fusionsprodukt (Insert).

Komponente	Endkonzentration	Vol. [μ l]
150 ng gespaltener Vektor	7,5 ng/ μ l	x
Insert	x ng	x
Restriktionsenzym (1 U/ μ l)	0,05 U/ μ l	1
10 mM ATP	0,5 mM	1
2-fach Puffer	1-fach	2
T4-DNA-Ligase (1 U/ μ l)	0,05 U/ μ l	1
ad 20 μl H₂O bidest.		

4.10 VORBEREITUNG VON *ESCHERICHIA COLI*-ZELLEN FÜR DIE TRANSFORMATION

Die *E. coli*-Zellen wurden nach Inoue *et al.* (1990) für die Transformation vorbereitet. 250 ml einer über Nacht gewachsenen Kultur wurden bis zu einer OD_{600 nm} von 0,6 bei 37°C inkubiert. Die Kultur wurde für 10 min auf Eis abgekühlt, in eisgekühlte Zentrifugenbecher gefüllt und für 10 min und 2.500 x g bei 4°C zentrifugiert. Das Zellsediment wurde anschließend in 80 ml eiskaltem TB-Puffer (s. Tabelle 24) resuspendiert, für 10 min auf Eis inkubiert und für 10 min bei 2.500 x g zentrifugiert. Das Zellsediment wurde erneut in 20 ml TB-Puffer resuspendiert, 1,4 ml DMSO hinzugegeben, vorsichtig gemischt und für 10 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden 200 μ l Aliquots in kalte Eppendorf-Cups gegeben, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C dauerhaft gelagert.

Tabelle 24: Zusammensetzung des TB-Puffers zur Vorbereitung von *E. coli*-Zellen auf die Transformation.

Komponente	Endkonzentration	Menge
MOPS	10 mM	0,21 g
CaCl ₂ * H ₂ O	15 mM	0,22 g
KCl	250 mM	1,86 g
	ad 90 ml H₂O bidest.	pH 6,8 mit KOH
MgCl ₂ * 2 H ₂ O	55 mM	0,89 g
	ad 100 ml H₂O bidest.	sterilfiltrieren

4.11 TRANSFORMATION VON *ESCHERICHIA COLI*

Die Transformation von *E. coli*-Zellen wurde nach Dower *et al.* (1988) durchgeführt. Zunächst wurde ein 200 μ l-Aliquot vorbereiteter *E. coli* XI1-blue Zellen langsam auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 5 μ l der Plasmid-DNA hinzugegeben, vorsichtig gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen ohne Bewegung für 45 s bei 42°C im Wasserbad inkubiert und sofort für 2 min auf Eis abgekühlt. Der plötzliche

Temperaturanstieg führte zur Ausbildung von Poren in der Zellmembran. Zudem wurden durch die stark calciumhaltige Umgebung die elektrostatischen Abstoßungskräfte zwischen der Zellmembran und der DNA ausgeglichen und die Aufnahme der Fremd-DNA in die Zelle ermöglicht. Zu den Zellen wurden 800 µl SOB⁺ hinzugeben und diese eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 100 µl dieser Zellsuspension auf SOB⁺-Amp-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.12 TRANSFORMATION VON *HALOFERAX VOLCANII*

In der exponentiellen Wachstumsphase wurde 2 ml einer *H. volcanii*-Kultur abgenommen, für 2 min bei 6.800 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellsediment wurde anschließend vorsichtig in 180 µl Sphäroplasten Bildungslösung, im Verhältnis 1:10 mit EDTA gemischt, (SBL/EDTA-Lösung) aufgenommen. Zur mikroskopischen Kontrolle wurden 10 µl abgenommen und auf Sphäroplastenbildung (Ausbildung einer runden Zellform) überprüft. Zu der Suspension wurden 20 µl DNA-Lösung hinzugegeben und vorsichtig 20 Mal umgedreht. Für die DNA-Lösung wurden 2-5 µg der zu transformierenden Plasmid-DNA in 4 M NaCl zu einer Endkonzentration von 0,8 M NaCl gelöst. Nach einer Inkubation für 5 min bei 20°C wurden 210 µl Polyethylenglycol (PEG)-Lösung in den Deckel der Eppendorfreaktionsgefäße gegeben. Durch rasches Schwenken wurden die beiden Lösungen gemischt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur mikroskopischen Kontrolle des Transformationserfolges wurden erneut 10 µl abgenommen und eine Zusammenlagerung der Sphäroplasten beobachtet. Zu dem Ansatz wurden 1.600 µl Sphäroplasten Verdünnungslösung (SVL) gegeben und durch Umschwenken gründlich gemischt. Abschließend wurden 100 µl der Zellsuspension auf PopIn-Medium ausgestrichen. Für die Transformation von *H. volcanii* wurden die in Tabelle 25 beschriebenen Medien und Lösungen benötigt.

Tabelle 25: Medien und Lösungen für die Transformation von *H. volcanii*. Aufgelistet sind die Endkonzentration und Mengen der einzelnen Komponenten.

Lösung	Komponente	Endkonzentration	Menge
SBL	NaCl	0,8 M	23,4 g
	KCl	27 mM	1 g
	1 M Tris/HCl; pH 8,2	50 mM	25 ml
	Saccharose	15% (w/v)	75 g
		ad 500 ml H₂O bidest	sterilfiltrieren

Lösung	Komponente	Endkonzentration	Menge
SVL	NaCl	3,4 M	100 g
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	175 mM	21,6 g
	KCl	34 mM	1,25 g
	1 M Tris/HCl; pH 7,2	50 mM	25 ml
	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	5 mM	0,36 g
	Saccharose	15% (w/v)	75 g
		ad 500 ml H₂O bidest.	sterilfiltrieren
EDTA-Lösung	EDTA	0,5 M	18,5 g
		ad 100 ml SBL; pH 8,2	sterilfiltrieren
SBL/EDTA-Lösung	SBL	90% (v/v)	9 ml
	EDTA-Lösung	10% (v/v)	1 ml
NaCl-Lösung	NaCl	4 M	23,4 g
		ad 100 ml H₂O bidest.	autoklavieren
PEG-Lösung	PEG 600	60% (v/v)	6 ml
	SBL/EDTA-Lösung	40% (v/v)	4 ml

4.13 SOUTHERN BLOT-ANALYSE

Die Southern Blot-Analyse (Southern, 1975) wurde zum Nachweis der PopIn- und PopOut-Klone verwendet. Mittels Southern Blot-Analyse wurde die in einem Agarosegel aufgetrennte DNA durch Kapillarkräfte auf eine Nylonmembran übertragen. Im Anschluss konnte durch Hybridisierung mit einer markierten Sonde der Nachweis erfolgen.

Der Southern Blot beruht auf dem Prinzip der Kapillarkräfte. Der 20-fach SSC Puffer wird durch das Gel und die Membran bis hin zu dem trockenen, dicken Blotting-Papier gesogen. Hierbei nimmt der Puffer durch die hohe Salzkonzentration die DNA auf. Beim Durchqueren der positiv geladenen Nylonmembran bindet die negativ geladene DNA an diese. Die benötigten Lösungen für den Southern Blot sind in Tabelle 26 angegeben.

Tabelle 26: Lösungen und Puffer für die Southern Blot-Analyse. Gezeigt sind die einzelnen Komponenten, ihre Endkonzentration und ihre Menge.

Lösung	Komponente	Endkonzentration	Menge
20-fach SSC-Puffer	NaCl	3 M	175,3 g
	<i>tri</i> -Natriumcitrat	300 mM	88,2 g
	ad 1 l H₂O bidest	pH 7,0	autoklavieren
HCl	HCl	0,25 M	9,12 g
		ad 1 l H₂O bidest.	

Lösung	Komponente	Endkonzentration	Menge
NaOH/NaCl	NaOH	0,5 M	20 g
	NaCl	1,5 M	87,7 g
	ad 1 l H₂O bidest.		
Tris/HCl/NaCl	Tris	0,5 M	60,6 g
	NaCl	1,5 M	87,7 g
	ad 1 l H₂O bidest.	pH 8,0 mit HCl	

Zunächst wurde genomische DNA isoliert (s. III.4.1) und 2 µg mit dem entsprechenden Restriktionsenzym bzw. den entsprechenden Restriktionsenzymen gespalten (s. III.4.8). Anschließend wurden die DNA-Fragmente in einem 1%-igen Agarosegel aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und dokumentiert. Das Gel wurde zunächst für 10 min in 0,25 M HCl und für 45 min in 0,5 M NaOH/ 1,5 M NaCl gewaschen. Anschließend wurde das Gel durch Inkubation in 0,5 M Tris/HCl pH8/1,5 M NaCl für 60 min neutralisiert. Vor dem Blotten wurde das Gel 10 min in 20-fach SSC-Puffer geschwenkt. Für den Blot wurden 20 Blatt 1,4 mm dickes Blotting-Papier (dickes Blotting-Papier) auf einen festen Untergrund gelegt. Anschließend wurden drei Blatt 0,37 mm dickes Blotting-Papier (dünnere Blotting-Papier) in 20-fach SSC-Puffer äquilibriert und bündig auf das dicke Blotting-Papier gelegt. Die Luftblasen wurden nach Auftragen jeder neuen Schicht durch Rollen mit einem Reagenzglas entfernt. Die Nylonmembran, die für 10 min in H₂O bidest. vorgequollen war, wurde ebenfalls in 20-fach SSC-Puffer äquilibriert und oben aufgelegt. Anschließend wurde das Agarosegel auf die Nylonmembran gelegt und die Luftblasen entfernt. Auf das Gel wurden erneut drei Blatt dünnes in 20-fach SSC-Puffer äquilibriertes Blotting-Papier gelegt. Anschließend wurde, um das Austrocknen zu verhindern, eine in 20-fach SSC-Puffer äquilibrierte Brücke aus dünnem Blottingpapier aufgelegt und deren Enden in zwei Behälter mit 20-fach SSC-Puffer getaucht. Abschließend wurde eine Acrylplatte und eine Schottflasche als Gewicht auf das Blottingpapier aufgestellt. Der Aufbau ist in Abbildung 5 dargestellt.

Nach dem Southern Blot wurde die DNA im Stratalinker bei 120 mJ mit der Membran mittels UV-Licht quervernetzt und somit fest an die Membran gebunden.

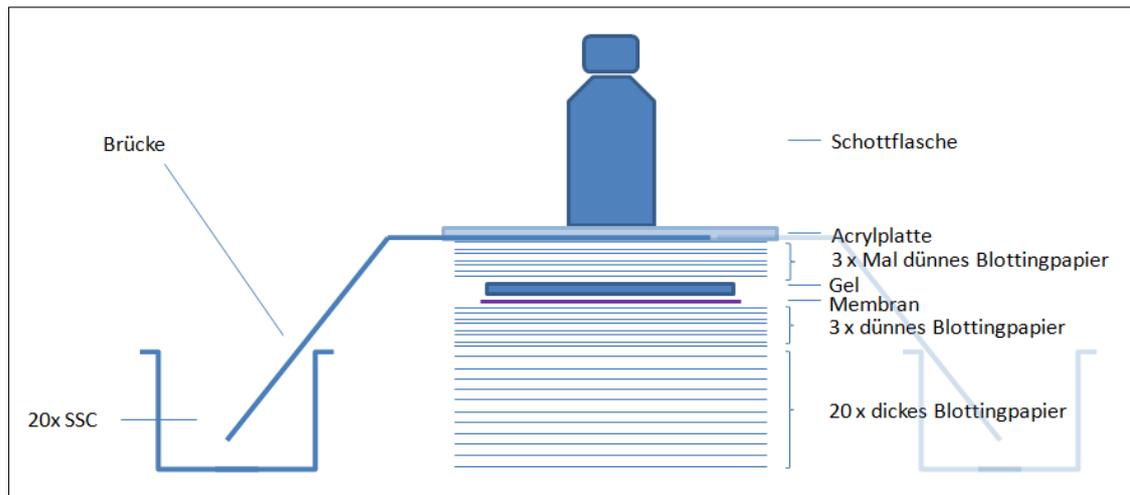


Abbildung 5: Aufbau des Southern Blots. Gezeigt sind die verschiedenen Schichten aus Blotting-Papier, die Membran und das Gel. Die in 20-fach SSC-Puffer getauchte Brücke aus dünnem Blotting-Papier dient zum ständigen Puffernachschub und verhindert das Austrocknen des Blottingpapiers. Die Acrylplatte und die Schottflasche dienen zum Beschweren des Blots.

4.14 HYBRIDISIERUNG UND CHEMOLUMINESZENZ NACHWEIS

Für den Nachweis der DNA-Fragmente wurde die Membran mit der DNA-Sonde (III.4.4.3) hybridisiert. Die benötigten Lösungen und Puffer sind in Tabelle 27 aufgelistet.

Tabelle 27: Lösung für die Hybridisierung der Membran.

Lösung	Komponente	Endkonzentration	Menge
100-fach Denhardt-Lösung	BSA	2% (w/v)	10 g
	Ficoll 400	2% (w/v)	10 g
	Polyvinylpyrrolidon	2% (w/v)	10 g
	ad 500 ml H₂O bidest.	sterilfiltrieren	Lagerung: -20°C
Hybridisierungspuffer	20-fach SSC-Puffer	5-fach	250 ml
	100-fach Denhardt-Lösung	3-fach	30 ml
	SDS	0,5% (w/v)	5 g
	N-Laurylsarcosin	0,2% (w/v)	2 ml
	Dextransulfat	5% (w/v)	50 g
	100 % Formamid	50% (w/v)	500 ml
			ad 500 ml H₂O bidest. autoklavieren

Die Vorhybridisierung und Hybridisierung der Membran wurde bei 50°C im Hybridisierungs-ofen durchgeführt. Zur Vorhybridisierung wurde die Membran zunächst für eine Stunde bei 50°C in Hybridisierungspuffer inkubiert. Die Hybridisierung der Membran erfolgte für 16 Stunden in 15 ml Hybridisierungspuffer mit 30 µl der zuvor für 5 min bei 95°C denaturierten DNA-Sonde.

Für den nachfolgenden Chemolumineszenz Nachweis wurden die Puffer und Lösungen benötigt, die in Tabelle 28 angegeben sind.

Tabelle 28: Puffer und Lösungen für den Chemolumineszenz Nachweis. Aufgelistet sind die einzelnen Komponenten der Lösungen, ihre Endkonzentration und ihre Menge.

Lösung	Komponente	Endkonzentration	Menge
2-fach SSC-Puffer	20-fach SSC-Puffer	10% (v/v)	100 ml
	SDS ad 1 l H₂O bidest.	0,1% (w/v)	1 g
1-fach SSC-Puffer	20-fach SSC-Puffer	5% (v/v)	50 ml
	SDS ad 1 l H₂O bidest.	0,1% (w/v)	1 g
Maleinsäurepuffer	Maleinsäure	100 mM	11,6 g
	NaCl ad 1 l H₂O bidest.	150 mM autoklavieren	8,77 g pH 7,5
Waschpuffer	Tween®20		750 µl
	ad 500 ml Maleinsäurepuffer	frisch ansetzen!	
Blockinglösung	Blockingreagenz	1% (w/v)	10 g
	ad 1 l Maleinsäurepuffer	autoklavieren	Lagerung bei 4°C
Antikörperlösung	Anti-DIG-AP-Konjugat	5‰ (v/v)	1 µl
	ad 20 ml Blockinglösung		
Detektionspuffer	Tris/HCl	100 mM	12,11 g
	NaCl	100 mM	5,84 g
	MgCl ₂ x 6 H ₂ O	50 mM	10,17 g
	ad 1 l H₂O bidest.	pH 9,5	
CDP-Star Lösung	CDP-Star	0,07% (w/v)	10 µl
	ad 15 ml Detektionspuffer	wiederverwendbar	Lagerung bei 4°C

Nach der Hybridisierung wurde 2 mal für 5 min in 2-fach SSC-Puffer und anschließend 2 mal für 15 min in 1-fach SSC-Puffer bei 50°C gewaschen. Die folgenden Schritte wurden bei Raumtemperatur im Hybridisierungsofen durchgeführt. Nach kurzer Inkubation in Waschpuffer wurde für 30 min in 20 ml Blockinglösung inkubiert. Anschließend wurde die Antikörperlösung für 30 min auf der Membran belassen. Danach wurde die Membran 2 mal für 15 min in 100 ml Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde die Membran für 2-5 min in Detektionspuffer und für 5 min in CDP-Star Lösung inkubiert. Die noch feuchte Membran wurde in eine Folie gelegt und für verschiedene Zeitabschnitte auf einem Röntgenfilm exponiert. Danach wurde der Film entwickelt, kurz in Wasser gespült und fixiert.

4.15 RNA-ISOLATION

Für alle Arbeiten mit RNA wurden, zur Beseitigung von RNasen, der Arbeitsplatz und benötigte Glasgefäße zuvor mit einer 3%-igen H₂O₂-Lösung gereinigt. Zudem wurden Handschuhe getragen.

Die RNA-Isolation erfolgte mittels Phenol/Chloroform-Fällung. Die hergestellten Lösungen sind in Tabelle 29 aufgelistet. Zunächst wurden 2 ml einer exponentiellen *H. volcanii*-Kultur für 1 min bei 13.000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt und das Zellsediment in 400 µl Aufschlusslösung resuspendiert. Unter dem Abzug wurden 50 µl 2 M Natriumacetat, 400 µl TE-gesättigtes Phenol (Roth, Karlsruhe) und 100 µl Chloroform/Isoamylalkohol hinzugegeben und nach jeder Zugabe gründlich durchmischt. Anschließend erfolgte eine 30-minütige Inkubation bei -20°C. Danach wurde für 15 min bei 13.000 Upm zentrifugiert, möglichst viel des wässrigen Überstands (etwa 400 µl) abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es wurde 1 ml 96%-iger Ethanol zur wässrigen Phase gegeben, gut gemischt und für mindestens 30 min, falls möglich über Nacht, bei -20°C inkubiert. Danach wurde für 30 min bei 13.000 Upm zentrifugiert und der Überstand vollständig entfernt. Nach der vorsichtigen Zugabe von 500 µl 70%-igem Ethanol wurde für 15 min bei 13.000 Upm zentrifugiert und erneut der Überstand verworfen. Das Sediment wurde unter dem Abzug getrocknet und anschließend in 30-60 µl H₂O_{DEPC} für 10 min bei 60°C gelöst. Die RNA-Konzentration wurde mittels Nanodrop Spektrophotometer bestimmt und die Integrität mit einem denaturierendem RNA-Gel überprüft.

Tabelle 29: Zusammensetzungen der Lösungen zur Isolation von RNA mittels Phenol/Chloroform-Fällung. Angegeben sind die einzelnen Komponenten der Lösungen, ihre Endkonzentration und ihre Menge.

Lösung	Komponente	Endkonzentration	Menge
Aufschlusslösung	Guanidiniumthiocyanat	4 M	100 g
	750 mM Na-Citrat-Lösung	25 mM	7 ml
	30% (w/v) N-Lauoylsarcosinat	0,5%	3,5 ml
		ad 210 ml H₂O_{DEPC}	pH 7,0
	β-Mercaptoethanol	0,1 mM	1 ml
	<i>(β-Mercaptoethanol wurde erst nach dem Autoklavieren hinzugeben!)</i>		
2 M Natriumacetat	Natriumacetat	2 M	16,4 g
		ad 100 ml H ₂ O _{DEPC}	<i>pH 4,0 mit Essigsäure</i>
Chloroform/ Isoamylalkohol	Chloroform	24 Teile	96 ml
	Isoamylalkohol	1 Teil	4 ml

Lösung	Komponente	Endkonzentration	Menge
70%-iges EtOH	96% EtOH p.a.	70%	70 ml

Um hoch reine RNA zu erhalten wurde die RNA-Isolation mit dem Nucleospin® miRNA-Kit nach Angaben des Herstellers Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Düren) durchgeführt.

4.16 DENATURIERENDE GELELEKTROPHORESE ZUR AUFTRENNUNG VON RNA UND NORTHERN BLOT-ANALYSE

Die Northern Blot-Analyse wurde für den Nachweis spezifischer Transkripte verwendet. Zunächst wurde die isolierte RNA in einem 1 bis 1,8%-igen Agarose-Gel aufgetrennt. Für die Agarose-Gele wurde RNase-freies H₂O_{DEPC} verwendet. Die Zusammensetzung der Gele und die nötigen Puffer sind Tabelle 30 zu entnehmen. Die Zugabe von Formaldehyd erfolgte erst nach dem Abkühlen der Agarose-Lösung unterhalb von 70°C unter dem Abzug.

Tabelle 30: Benötigte Lösungen und Bestandteile der RNA-Gele für die Northern Blot-Analyse.

Lösung	Komponente	Endkonzentration	Menge
10-fach MOPS-Puffer	MOPS	500 mM	104,7 g
	EDTA	10 mM	3,7 g
	ad 1 l H ₂ O bidest.; pH 7,0		
H₂O_{DEPC}	DEPC	1% (v/v)	1 ml
	ad 1 l H ₂ O bidest.		
RNA-Agarosegel	H ₂ O _{DEPC}		68,6 ml
	10-fach MOPS-Puffer	1-fach	8 ml
	37% Formaldehyd	1,3%	2,9 ml
	ad 80 ml H ₂ O _{DEPC}		
0,25-fach RNA-Probenpuffer	10-fach MOPS-Puffer	1-fach	1 ml
	100% Formamid	50%	5 ml
	37% Formaldehyd	6,8%	1,84 ml
	87% Glycerin	11,7%	1,34 ml
	Bromphenolblau	1,5 mM	0,01 g
	0,1 mg/ml Ethidiumbromid	1,27 µM	0,05 ml
ad 10 ml H ₂ O _{DEPC}			

Um ein einheitliches Volumen auf das RNA-Gel aufzutragen wurden 1-5 µg jeder RNA-Probe mit H₂O_{DEPC} versetzt. Anschließend wurden die so vorbereiteten Proben mit 0,25-fach RNA-Probenpuffer versetzt, für 10 min bei 60°C denaturiert und auf das Gel

aufgetragen. Als Laufpuffer wurde 1-fach MOPS-Puffer (10-fach MOPS-Puffer 1:10 mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ verdünnt) verwendet. Anschließend wurde das Gel im Gegensatz zum Southern Blot nicht gewaschen sondern direkt geblottet. Der Transfer auf die Membran wurde wie beim Southern Blot durchgeführt (s. III.4.13). Die Hybridisierung und der Chemolumineszenz Nachweis wurde wie in Absatz III.4.14 beschrieben durchgeführt. Abweichend hierzu wurde bei der Vorhybridisierung Hefe-tRNA in einer Endkonzentration von 120 $\mu\text{g}/\text{ml}$ hinzugegeben.

5. BIOCHEMISCHE METHODEN

5.1 PROTEINFÄLLUNG

Die benötigten Lösungen für die Proteinfällung mit Methanol und Chloroform sind in Tabelle 31 angegeben.

Tabelle 31: Lösungen für die Proteinfällung mit Methanol und Chloroform. Angegeben sind die einzelnen Komponenten in ihrer Endkonzentration und Menge.

Lösung	Komponente	Menge
DNase/Proteinase Inhibitor-Mix	DNase-Inhibitor	10 μl
	Proteinase-Inhibitor	10 μl
25 mM Tris/HCl; pH 8,0		400 μl

Für die Proteinisolation wurden 10 ml der exponentiellen Kulturen für 20 min bei 3.200 x g zentrifugiert. Die Lyse der Zellen erfolgte durch Aufnahme des Zellsediments in 1 ml H_2O . Danach wurden je 20 μl DNase/Proteinase Inhibitor-Mix hinzugegeben, gemischt und für 15-30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Homogenisierung des Gemischs erfolgte eine Zugabe von 4 ml Methanol. Dann wurde 1 ml Chloroform hinzugegeben und erneut gemischt. Nach der Zugabe von 1 ml H_2O wurde erneut homogenisiert und anschließend bei 3.200 x g zentrifugiert. Die Proteine befanden sich nach der Zentrifugation in der Interphase. Die obere Phase wurde abgenommen und verworfen. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 3 ml Methanol und eine erneute Zentrifugation für 5 min bei 3.200 x g. Danach wurde der Überstand verworfen und das Proteinsediment nach dem Trocknen in 400 μl 25 mM Tris/HCl aufgenommen und bei 65°C gelöst.

5.2 PROTEINBESTIMMUNG

Die Proteinmengen wurden mit dem BCA Protein Assay Kit nach Pierce von der Firma Thermo Fisher Scientific bestimmt. Zunächst wurde eine Eichreihe mit dem Protein BSA erstellt. Hierzu wurde BSA in Konzentrationen von 0/ 0,1/ 0,2/ 0,4/ 0,6/ 0,8/ 1,0/ 1,2/ 1,4/ 1,6/ 1,8 und 2,0 mg/ml in H₂O bidest. (Proteingele) bzw. in Basalsalz (Reporterassays) gelöst. 10 µl der Verdünnungsreihe wurden in Doppelbestimmung in die Vertiefungen einer MTP gegeben. Die Proteinproben wurden unverdünnt und in einer Verdünnung von 1 zu 2 ebenfalls in die Vertiefungen einer MTP gegeben. Die Proteinbestimmungen wurden anschließend nach Angaben des Herstellers durchgeführt, für 20-25 min bei 37°C inkubiert und anschließend bei 550 nm gemessen.

5.3 NATRIUMDODECYL-POLYACRYLAMIDGELEKTROPHORESE

Zur Auftrennung von Proteinen wurden 70 µg der gefällten Proteine mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt. Zur Auftrennung der größeren Proteine wurde ein 12%-iges SDS-Gel und zur Auftrennung kleinerer Proteine ein 18%-iges SDS-Gel verwendet. In Tabelle 32 sind alle für die SDS-PAGE benötigten Puffer und Lösungen aufgelistet.

Tabelle 32: Zusammensetzung der Lösungen und Puffer zur Herstellung der SDS-Gele und Durchführung der SDS-PAGE.

Lösung	Komponente	Endkonzentration	Menge
Trenngelpuffer	Tris/HCl pH 8,0	1,5 M	181,7 g
	SDS	0,384% (w/v)	3,84 g
ad 1 l H₂O bidest.			
Sammelgelpuffer	Tris/HCl pH 6,8	0,5 M	60,6 g
	SDS	0,4% (w/v)	4 g
ad 1 l H₂O bidest.			
APS-Lösung	Ammoniumperoxodisulfat	10% (w/v)	20 mg
ad 2 ml H₂O bidest.		täglich frisch ansetzen!	
TCA-Lösung	Trichloracetat	3 M	24,8 g
ad 50 ml H₂O bidest.			
4-fach Probenpuffer	0,5 M Tris/HCl pH 6,8	0,13 M	3,125 ml
	86% Glycerin	49 % (v/v)	6,84 ml
	SDS	10% (w/v)	1,2 g
	Bromphenolblau	0,5% (w/v)	60 mg
	ad 12 ml H ₂ O bidest.		
Vor Gebrauch 4 Teile Puffer und 1 Teil β-Mercaptoethanol mischen!			

Lösung	Komponente	Endkonzentration	Menge
10-fach Laufpuffer	Tris	3% (w/v)	30 g
	Glycin	14,4% (w/v)	144 g
	SDS	1% (w/v)	10 g
	ad 1 l H₂O bidest.		
Coomassie-Färbelösung	Coomassie Blue R-250		0,5 g
	Methanol		545 ml
	Eisessig		92 ml
	ad 1 l H₂O bidest.		
Entfärbelösung	Methanol		500 ml
	Eisessig		100 ml
	ad 2 l H₂O bidest.		

Die Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel sind in Tabelle 33 angegeben. In dieser Arbeit wurde die Acrylamid-/Bisacralamidlösung ProtoGel® (Verhältnis 37,5:1) der Firma Biozym, Oldenburg verwendet. Die Gesamtmenge des Acrylamidgemisches und der Anteil an Bisacrylamid bestimmt die Porengröße und somit die Durchlässigkeit für Proteine eines bestimmten Molekulargewichts. In dieser Arbeit wurde zur Veränderung der Porengröße der SDS-Gele die Gesamtmenge des Acrylamidgemisches variiert. Für Proteine mit einem Molekulargewicht von 30-120 kDa eignen sich 10%-ige, für Proteine mit einem Molekulargewicht von 10-60 kDa 15%-ige und für Proteine mit einem Molekulargewicht von 1,5-10 kDa 18%-ige Trenngele (Der Experimentator, Proteinbiochemie/Proteomics, 2010).

Tabelle 33: Zusammensetzung der Lösungen zur Herstellung der SDS-Gele.

Lösung	Komponente	Menge
Trenngel	Trenngelpuffer	2,6 ml
	APS-Lösung	150 µl
	TEMED	10 µl
12%	Acrylamid-/Bisacralamidlösung ProtoGel® (37,5:1)	3,2 ml
	H ₂ O bidest.	4,1 ml
18%	Acrylamid-/Bisacralamidlösung ProtoGel® (37,5:1)	4,8 ml
	H ₂ O bidest.	2,48 ml
Sammelgel	Sammelgelpuffer	1,27 ml
	APS-Lösung	80 µl
	TEMED	7 µl
	Acrylamid-/Bisacralamidlösung ProtoGel® (37,5:1)	666 µl
	H ₂ O bidest.	3 ml

Für die Herstellung der Gele wurde ein Gießstand verwendet. Die Zugabe von APS-Lösung und TEMED startet die Polymerisation, deshalb wurden diese Lösungen erst zum Schluss hinzugegeben.

Zunächst wurde das Trenngel wie in Tabelle 33 beschrieben hergestellt, gemischt, im Gießstand auf der Höhe von etwa 4/5 der Laufstrecke gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach Polymerisation des Trenngels (mind. 30 min) wurde das Sammelgel hergestellt, gemischt und gegossen. Dann wurde der Kamm eingesetzt.

Nach vollständiger Polymerisation wurden die Gele mit den Proteinproben beladen oder in feuchten Papiertüchern eingeschlagen und ca. drei Monate bei 4°C gelagert.

Die Proteinproben wurden durch Zugabe der berechneten Menge an 4-fach Probenpuffer zu 70 µg der gefällten Proteine für die Gelelektrophorese vorbereitet. Anschließend wurden die Proteinproben für 5 min auf 60°C erhitzt, kurz zentrifugiert und auf Eis abgekühlt.

5.4 DIHYDROFOLATREDUKTASE-REPORTERGEN ANALYSE

Für die Reporter-gen-Analysen wurden Deletionsstämme der nativen Dihydrofolatreduktase (DHFR) verwendet. Die verwendeten Reporter-gen-Konstrukte basierten auf dem Vektor pMB1-NcoI. Dieser wurde stets als Kontroll-Vektor mitgeführt. Zusätzlich wurde, um eine plasmidspezifische Hintergrund-Aktivität auszuschließen, der Vektor pNP10 als Kontrolle mitgeführt. Dieser basierte nicht auf dem Vektor pMB1-NcoI und kodierte nicht für die DHFR.

Zunächst wurden die Klone von der Platte in 30 ml synthetischem Medium mit der Kohlenstoffquelle Glucose und einer Phosphatkonzentration von 1 mM inokuliert und bis zur stationären Phase inkubiert. Das Medium wurde mit Novobiozin in einer Endkonzentration von 0,4 µg/ml versetzt und bis zu vier Wochen im Kühlschrank aufbewahrt. Mit den frischen stationären Kulturen wurden Vorkulturen inokuliert und bis zur exponentiellen Wachstumsphase (ca. 4×10^8 Zellen/ml) inkubiert. Die exponentiellen Vorkulturen wurden für das Inokulum der Hauptkulturen verwendet. Von den exponentiellen Hauptkulturen (3 bis 5×10^8 Zellen/ml) wurden für die RNA-Isolation je zweimal 2 ml Kultur entnommen und bei 13.000 Upm für 2 min bei

Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment in 400 µl Aufschlusspuffer resuspendiert. Die Proben wurden bei -80°C bis zur RNA-Isolation gelagert und mittels Phenol-/Chloroformfällung (s. III.4.15) isoliert. Für den Enzymtest wurden weitere 20 ml der Hauptkultur für 15 min bei 40°C und 4.000 Upm sedimentiert. Der Überstand wurde entfernt und das Zellsediment in 5 ml Basalsalz resuspendiert. Anschließend wurden die Kulturen bei 4°C und 4.000 Upm für weitere 15 min sedimentiert. Das Zellsediment wurde in 1 ml Basalsalz resuspendiert. Die gewaschenen Zellen wurden anschließend mittels Ultraschall sonifiziert (3 x 30 s, duty cycle 50%, output control 3). Danach wurden die Zelllysate konstant auf Eis gehalten.

Die Zusammensetzungen der verwendeten Lösungen sind in Tabelle 34 angegeben. Die NADPH- und DHF-Lösungen wurden am Versuchstag frisch angesetzt und konstant auf Eis gelagert.

Tabelle 34: Zusammensetzung und Konzentrationen der Puffer und Lösungen, die für den Enzymtest verwendet wurden.

Lösung	Komponente	Endkonzentration	Menge
Phosphat-/Citratpuffer	K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O	50 mM	11,4 g
	KH ₂ PO ₄	50 mM	6,8 g
	C ₆ H ₈ O ₇ x H ₂ O	50 mM	10,5 g
	ad 1 l H₂O bidest., pH 6,0 mit KOH einstellen		
3 M KCl	KCl	3 M	111,8 g
	ad 500 ml Phosphat-/Citratpuffer		
4 M KCl	KCl	4 M	149,1 g
	ad 500 ml Phosphat-/Citratpuffer		
DHF-Lösung	DHF-Stammlösung (10 mM in H ₂ O bidest.)	0,6 mM	180 µl
	ad 3 ml 3 M KCl		
	Täglich frisch ansetzen und lichtgeschützt auf Eis lagern!		
NADPH-Lösung	NADPH+H ⁺	2 mM	0,008 g
	ad 5 ml H₂O bidest.		

Der Enzymtest wurde in Mikrotiterplatten durchgeführt. Dies ermöglichte die parallele Messung von bis zu 96 Einzelreaktionen. Das Gesamtvolumen eines Reaktionsansatzes betrug 200 µl. Tabelle 35 zeigt die Zusammensetzung des Enzymtests pro Vertiefung der Mikrotiterplatte. Die Zelllysate wurden unverdünnt und, mit Basalsalz verdünnt, in den Verdünnungsstufen 1:2 und 1:5 in den Enzymtest eingesetzt. Jede Verdünnung wurde in Dreifachbestimmung gemessen.

Tabelle 35: Reaktionsansatz des Enzymtests pro Vertiefung der Mikrotiterplatte. Angegeben sind Endkonzentration und Menge der einzelnen Lösungen.

Lösung	Endkonzentration	Menge
Zellysat	0,7 M KCl/ NaCl	100 µl
4 M KCl	1,5 M KCl/ NaCl	150 µl
2 mM NADPH	0,16 mM	25 µl
0,6 mM DHF	0,05 mM	25 µl

Das Enzym DHFR katalysiert die Umwandlung von Dihydrofolsäure zu Tetrahydrofolsäure. Hierbei wird NADPH+H⁺ zu NADP⁺ oxidiert. Der NADPH-Zerfall wurde photometrisch bei 340 nm bestimmt. Für die anschließende Auswertung wurde die geringste Verdünnungsstufe, bei der die Extinktionsabnahme für mindestens 3 min linear war, ausgewählt. In diesem Zeitbereich wurde die maximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht. Für alle gemessenen Konstrukte wurde die gleiche Verdünnungsstufe ausgewertet. Die Schichtdicke und die Extinktionsänderung pro Minute wurde mit dem Programm SoftMax Pro 5.4.5 von Molecular Devices bestimmt. Die Hintergrundaktivität entsprach der Extinktionsänderung der Stämme mit pNP10-Konstrukten. Diese wurde direkt von der bestimmten Extinktionsänderung abgezogen. Bei maximaler Reaktionsgeschwindigkeit korreliert die Menge des Enzyms DHFR mit der Menge an oxidiertem NADPH. Die spezifische Enzymaktivität gilt somit als Gradmesser für die Menge an DHFR und wurde mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes nach folgender Formel bestimmt:

$$U / \text{min} = \frac{\left(\frac{\Delta E}{\text{min}}\right)}{(\varepsilon * c)} * d$$

- U:** Spezifische Aktivität (µmol*min⁻¹ ≈ 16,67 nkat)
ΔE: Extinktionsänderung (min⁻¹)
ε: spezifischer Extinktionskoeffizient NADPH (6,220 mM⁻¹*cm⁻¹)
c: Konzentration (mg*ml⁻¹)
d: Schichtdicke der Küvette (cm)

Die Transkriptmenge wurde mittels Normierung der Signalintensitäten der Northern Blot-Analyse auf die 16S-rRNA bestimmt. Zur Berechnung der relativen spezifischen Enzymaktivität und der relativen Transkriptmenge wurde auf die Kontrollkultur (pMB1-Ncol) normiert. Die relative Translationseffizienz wurde durch Division von relativer

spezifischer Enzymaktivität durch die relative Transkriptmenge berechnet.

$$\text{relative Translationseffizienz} = \frac{\text{relative spezifische Enzymaktivität}}{\text{relative Transkriptmenge}}$$

6. IN SILICO-ANALYSEN

6.1 SEQUENZKONSERVIERUNG MITTELS NUKLEOTID BLAST

Die Sequenzkonservierungen wurden mithilfe des Nukleotid BLASTs (Basic Local Alignment Search Tool) des Web-Servers NCBI (Johnson *et al.*, 2008) bestimmt. Zur Ermittlung der Konservierung des Operons *HVO_A0477-80* wurde die durch cr-RT-PCR ermittelte Sequenz mitsamt dem nicht-kodierenden Genombereich der 3'-UTR (pHV4: 483.383-488.507/F) verwendet. Die Konservierung von *HVO_2375-8* wurde anhand des gesamten Genombereichs des Operons ermittelt (CHR: 2.239.456-2.244.046/F). Für die Sequenzkonservierung von *sRNA₁₃₂* wurde ebenfalls die durch cr-RT-PCR ermittelte Sequenz verwendet (CHR: 1.280.196-1.280.335/R).

Um den Konservierungsgrad des potentiellen Promotorbereichs von *sRNA₁₃₂* zu bestimmen, wurde zusätzlich zur Genomsequenz der sRNA der 150 nt stromaufwärts gelegene Genbereich verwendet (CHR: 1.280.196-1.280.485/R). Für die Konservierung des potentiellen Promotorbereichs der Operons *HVO_2375-8* und *HVO_A0477-80* wurden 150 nt stromaufwärts des entsprechenden Operons und das darauffolgende Gen (*HVO_2375* bzw. *HVO_A0477*) in den Nukleotid BLAST eingesetzt (150 nt+*HVO_2375* (CHR: 2.239.306-2.240.493/F); 150 nt+*HVO_A0477-80* (pHV4: 483.233-484.573/F)). In Tabelle 36 sind die Parameter zur Ermittlung der Konservierungen aufgelistet.

Tabelle 36: Parameter zur Ermittlung von Sequenzkonservierungen von *sRNA₁₃₂* und der Operons *HVO_2375-8* und *HVO_A0477-80* bzw. der entsprechenden Promotorsequenzen.

Parameter	Auswahl
<u>Microbial Nucleotide BLAST (blastn):</u>	
Database	Draft Genomes
Organism	Halobacteriales (taxid:2235)
Optimize for	Highly similar sequences (megablast): Yes Optimize for More dissimilar sequences (discontiguous megablast): No Optimize for Somewhat similar sequences (blastn): No

Parameter	Auswahl
Algorithm parameters:	
Max. Target sequences	100
Short queries	Automatically adjust parameters for short input sequences: Yes
Exspect threshold	10
Word size	28
Max matches in a query range	0
Match/Mismatch Scores	1,-2
Gap Costs	Linear
Filter	Low complexity regions: Yes
Mask	Mask for lookup table only: Yes Mask lower case letters: No

6.2 STRUKTURKONSERVIERUNG MITTELS LOCARNA

Die Strukturkonservierung der sRNA₁₃₂ wurde mithilfe des Programms LocARNA (Will *et al.*, 2012) der Universität Freiburg mit den in Tabelle 37 Parametern durchgeführt.

Tabelle 37: Parameter, ihre Beschreibung und die verwendeten Einstellungen zur Ermittlung der Strukturkonservierung von sRNA₁₃₂.

Parameter	Beschreibung	Einstellung
Sequence and Structure	Sequence Input in FASTA Format	[.fa]
Alignment	Alignment Type	Global
	Alignment Mode	LocARNA-P
Alignment Scoring	Structure Weight	200
	Indel Opening Score	-500
	Indel Score	-350
	Use Ribosum File	TRUE
	Match Score	50
	Mismatch Score	0
RNA Folding	Local folding: max. base pair span	150
	Temperature in °C	42.0
	Energy parameter set (Vienna package)	rna_turner2004.par Turner model, 2004
Heuristics for speed/accuracy tradeoff	Minimal Pair Probability	5.0E-4
	Minimal Probability for Constructing the Guide Tree	0.005
	Maximal Difference for Sizes of Matched Arcs	30
	Maximal Difference for Alignment Edges	60
Other Parameters	Ignore Constraints	yes
	Disallow Lonely Pairs	yes
	Use alifold consensus dot plots	no
	Consistency Transformation (LocARNA-P only)	yes
	Keep Sequence Input Order	no

IV. ERGEBNISSE

1. PHÄNOTYPISCHE CHARAKTERISIERUNG VON sRNA-DELETIONSMUTANTEN VON *HALOFERAX VOLCANII*

In einer groß angelegten phänotypischen Charakterisierung wurden 27 sRNA-Deletionsmutanten unter zehn verschiedenen Wachstumsbedingungen mit dem Wildtyp verglichen (Jantzer[Diplomarbeit]; 2011). Die Kulturen wurden in synthetischem Medium mit vier verschiedenen Kohlenstoffquellen (Glucose, CAS, Xylose und Acetat) phänotypisch charakterisiert. Desweiteren wurde das Wachstum unter Hochsalzbedingungen (4 M NaCl), unter Niedrigsalzbedingungen (0,7 M NaCl) und bei einer optimalen Salzkonzentration von 2,1 M NaCl (Standardbedingung) untersucht. Zusätzlich wurde eine phänotypische Charakterisierung der sRNA-Deletionsmutanten nach Induktion von vier verschiedenen Stressbedingungen durchgeführt. Zum einen wurden die Zellen oxidativem Stress mittels Zugabe von 4 mM Paraquat- bzw. Alkoholstress mittels Zugabe von 1% EtOH ausgesetzt, zum anderen wurde Kälte- bzw. Niedrigsalzstress appliziert. Alle Deletionsmutanten wurden morphologisch hinsichtlich ihrer Zellform, Zellgröße, Koloniefarbe und Koloniegröße mit dem Wildtyp verglichen. Zudem wurde das Schwärmverhalten hinsichtlich Bewegung und Chemotaxis von 17 Deletionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp charakterisiert (Jantzer[Diplomarbeit]; 2011). Für die Charakterisierungen wurde in der Regel der Elternstamm *H. volcanii* H26 verwendet. Einige der untersuchten Deletionsmutanten wurden von der Partnerarbeitsgruppe AG-Marchfelder aus Ulm zur Verfügung gestellt. Zur Charakterisierung dieser Deletionsmutanten wurde deren Elternstamm *H. volcanii* H119 als Vergleichsstamm verwendet.

Die Auswertung und Zusammenstellung der Daten erfolgte im Rahmen dieser Doktorarbeit (Heyer *et al.*, 2012; Jaschinski *et al.*, 2014).

1.1 PHÄNOTYPISIERUNG VON sRNA-DELETIONSMUTANTEN

Das Wachstumsverhalten von 27 verschiedenen Deletionsmutanten wurde bezüglich der Dauer der Latenzphase, der Verdopplungszeit und der Wachstumsausbeute ausgewertet. Alle Wachstumsversuche wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt

und führten somit zu einem Datensatz mit mehr als 1000 Wachstumskurven. Die Erhebung dieser Daten und die parallele Auswertung von Kolonieförmigkeit, Koloniefarbe, Zellgröße und Zellmorphologie wurde nur durch die Kultivierbarkeit von *H. volcanii* in der Mikrotiterplatte ermöglicht (van Ooyen und Soppa, 2007; Jantzer *et al.*, 2011). Von 17 Deletionsmutanten wurde zudem eine Auswertung des Schwärmverhaltens vorgenommen. Eine Zusammenstellung aller phänotypischen Unterschiede im Vergleich zu dem entsprechenden Wildtyp-Stamm (H26 bzw. H119) ist in Tabelle 38 gezeigt. Hierzu fand zunächst eine Datenerhebung der durchschnittlichen Verdopplungszeiten und Wachstumsausbeuten mit den dazugehörigen Standardabweichungen statt. Diese Werte sind im Anhang in Tabelle A1 und A2 zu finden. Als phänotypischer Unterschied wurden alle Werte mit einer Abweichung von mindestens 10% im Vergleich zum Wildtyp definiert. Ausschließlich signifikante Werte wurden berücksichtigt.

Tabelle 38: Zusammenstellung phänotypischer Unterschiede von sRNA-Deletionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp von mindestens 10% (fett gedruckt). Gezeigt sind die Dauer der Latenzphase verglichen mit dem Wildtyp (Wt) und die prozentualen Abweichungen der Verdopplungszeit (Zeit in Stunden), der Wachstumsausbeute und des Schwärmsradius bezogen auf den Wildtyp. Abkürzungen: keine Daten (k.D). ¹aufgrund ungleichmäßigem Wachstum des Wildtyps nicht signifikant. Veröffentlicht in Jaschinski *et al.* (2014) und *Heyer *et al.* (2012).

sRNA-Deletionsmutante	Wachstumsbedingung	Latenzphase	Verdopplungszeit [% des Wt] (Zeit in Std.)	Wachstumsausbeute [% des Wt]	Schwärmsradius [% des Wt]
H26Δ63	CAS	verlängert	108% (6,0)	97%	121%
	Xylose	verkürzt	72% (10,5)	110%	
	Glucose (4 M)	gleich	99% (6,4)	85%	
H26Δ132	4 mM Paraquat		71% (8,0)	125%	83%
H26Δ168	Glucose (1,2 M)	gleich	116% (10,8)	98%	40%
H26Δ194	CAS	verkürzt	108% (5,9)	102%	79%
	Glucose (1,2 M)	verkürzt	89% (8,3)	101%	
	Glucose (2,1 M)	verkürzt	93% (6,6)	91%	
	Glucose (4 M)	verkürzt	81% (5,3)	87%	
H26Δ235	Glucose (1,2 M)	verlängert	105% (9,7)	107%	77%
	Glucose (2,1 M)	verlängert	95% (6,8)	94%	
	Glucose (4 M)	gleich	103% (6,7)	70%	
H26Δ288	Glucose (4 M)	gleich	98% (6,4)	77%	85%
H26Δ308	4 mM Paraquat		95% (10,6)	126%	35%
H119Δ362	CAS	verlängert	124% (7,8)	98%	k.D.
	Xylose	verlängert	n.a.	92%	
	Acetat	verlängert	viel länger	72%	
	Glucose (2,1 M)	verlängert	109% (7,9)	91%	
	Glucose (4 M)	verlängert	95% (6,1)	92%	
H119Δ450	Acetat	verlängert	97% (16,5)	90%	k.D.
	Glucose (1,2 M)	gleich	57% (10,4)	110%	
H119Δ479	Acetat	verlängert	139% (23,6)	90%	k.D.
	Glucose (1,2 M)	gleich	55% (10,0)	114%	
H26Δ500	4 mM Paraquat		94% (10,5)	129%	29%

sRNA-Deletionsmutante	Wachstumsbedingung	Latenzphase	Verdopplungszeit [% des Wt] (Zeit in Std.)	Wachstumsausbeute [% des Wt]	Schwärmsradius [% des Wt]
H119Δ529	Glucose (4 M)	gleich	118% (7,6)	87%	k.D.
H26ΔH225.2R	Acetat	verlängert	viel länger	98%	94%
	Glucose (1,2 M)	verlängert	172% (19,1)	77%	
	Glucose (2,1 M)	verlängert	92% (6,9)	88%	
	Salzstress		93% (9,0)	137%	
	Kältestress		gleich		123%
H26Δhtsf182					63%
H26Δhtsf242	Glucose (2,1 M)	verlängert	108% (9,1)	101%	k.D.
H26Δhtsf339	Acetat	verlängert	102% (19,8)	101%	k.D.
H26Δhtsf416	Acetat	verlängert	93% (18,0)	107%	70%
	Glucose (2,1 M)	verlängert	110% (9,3)	98%	
H26Δhtsf468	Xylose	gleich	35% (24,9)	113%	47%
	Glucose (2,1 M)	gleich	140% (10,6)	63%	
	Glucose (4 M)	verlängert	120% (5,9)	78%	
H26Δhtsf494	Acetat	gleich	82% (15,8)	107%	72%
H26Δhtsf574	Glucose (2,1 M)	verlängert	117% (9,9)	101%	k.D.
H119Δhts4*	Acetat	verlängert	n.a.	76%	k.D.
	Glucose (2,1 M)	gleich	106% (7,7)	87%	
	Glucose (4 M)	n.a.	110% (7,0)	84%	
H119Δhts10*	Acetat	verlängert	n.a.	87%	k.D.
	Glucose (1,2 M)	gleich	81% (14,7) ¹	113%	
	Glucose (4 M)	n.a.	106% (6,8)	89%	
H119Δhts14	Xylose	n.a.	83% (72,4)	121%	113%
	Acetat	verkürzt	85% (28,4)	138%	
	Glucose (2,1 M)	n.a.	98% (7,5)	113%	
	Salzstress		68% (11,7)	203%	
	Kältestress		98% (8,4)	74%	
H119Δhts21*	Acetat	verkürzt	86% (28,7)	134%	100%
	Glucose (2,1 M)	n.a.	102% (7,8)	120%	
	Salzstress		64% (11,0)	264%	

Insgesamt zeigten 24 der 27 getesteten Deletionsmutanten unter mindestens einer der getesteten Bedingungen phänotypische Merkmale. In der Summe konnten 54 phänotypische Unterschiede verglichen zu dem entsprechenden Elternstamm identifiziert werden (s. Abbildung 6).

Einige Mutanten zeigten einen sehr differenzierten Phänotyp unter einer der getesteten Bedingungen wie zum Beispiel die Deletionsmutanten H26ΔsRNA₁₃₂ oder H26ΔsRNA₁₆₈. Bei anderen Deletionsmutanten wurden pleiotrophe Phänotypen beobachtet. Diese Mutanten zeigten unter mehreren der getesteten Bedingungen phänotypische Unterschiede. Beispielsweise zeigte die Deletionsmutante H26ΔsRNA_{H225.2R} sowohl bei Wachstum unter Niedrigsalzbedingungen als auch bei Wachstum mit den Kohlenstoffquellen Acetat und Glucose phänotypische Unterschiede zum Wildtyp.

Zusätzlich wurden Phänotypen bei der Adaptation an Niedrigsalz- und Kältestress beobachtet.

Es wurden Wachstumsdefizite, sogenannte „Loss-of-function“ (LOF)-Phänotypen, bei denen die Deletion eines sRNA-Gens zu einem verminderten Wachstum führte, aber auch sogenannte „Gain-of-function“ (GOF)-Phänotypen beobachtet. Hierbei resultierte die Deletion einer sRNA in einem verbesserten Wachstum. Insgesamt gab es etwa halb so viele GOF-Phänotypen wie LOF-Phänotypen (s. Abbildung 6). Bei Verdopplungszeit und Wachstumsausbeute ist das Verhältnis an GOF- und LOF-Phänotypen nahezu identisch. Im Bezug auf Schwärmverhalten und Latenzphase konnten deutlich mehr LOF-Phänotypen beobachtet werden.

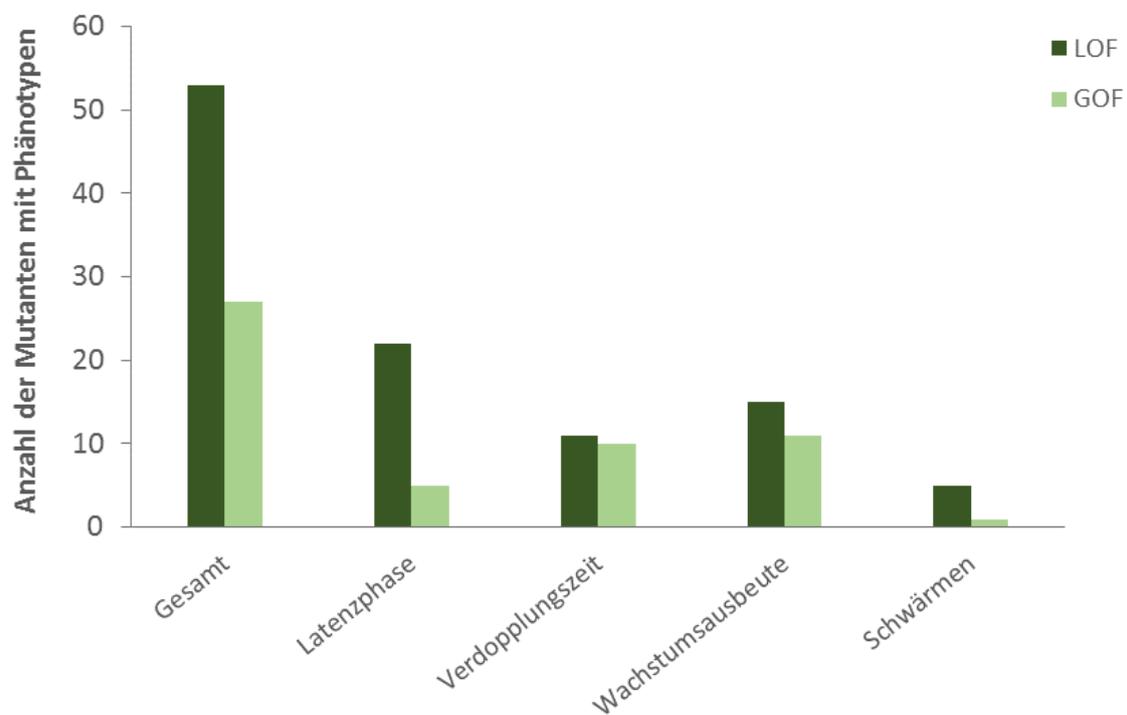


Abbildung 6: Verteilung von „Loss-of-function“ (LOF)- und „Gain-of-function“ (GOF)-Phänotypen. Gezeigt ist die Gesamtzahl an GOF- (hell grün) und LOF-Phänotypen (dunkel grün). Zudem ist die Anzahl der Mutanten mit einem GOF- und einem LOF-Phänotyp bezüglich der Latenzphase, der Verdopplungszeit, der Wachstumsausbeute und des Schwärmverhaltens gezeigt.

Ein Phänotyp, der zu einer vollständigen Inhibition des Zellwachstums der Deletionsmutante führte, konnte nicht beobachtet werden. Die Verteilung der festgestellten Phänotypen ist in Abbildung 7 gezeigt. Da einige Mutanten unter verschiedenen Bedingungen Phänotypen aufwiesen, überstieg die Anzahl der Phänotypen die Gesamtzahl der getesteten Mutanten. Bedingungen, die unter allen drei Salzkonzentrationen oder ausschließlich bei Standardbedingungen beobachtet wurden,

sind aus der Grafik ausgeschlossen, da diese Phänotypen nicht eindeutig der Salzkonzentration bzw. der Kohlenstoffquelle zugeordnet werden konnten. Das Wachstum mit der Kohlenstoffquelle Glucose entspricht gleichzeitig auch dem Wachstum bei einer optimalen Salzkonzentration von 2,1 M NaCl. Phänotypen, die jedoch entweder der Kohlenstoffquelle Glukose, oder der Salzkonzentration von 2,1 M NaCl zugeordnet werden konnten, sind in Abbildung 7 unter der entsprechenden Bedingungen aufgeführt.

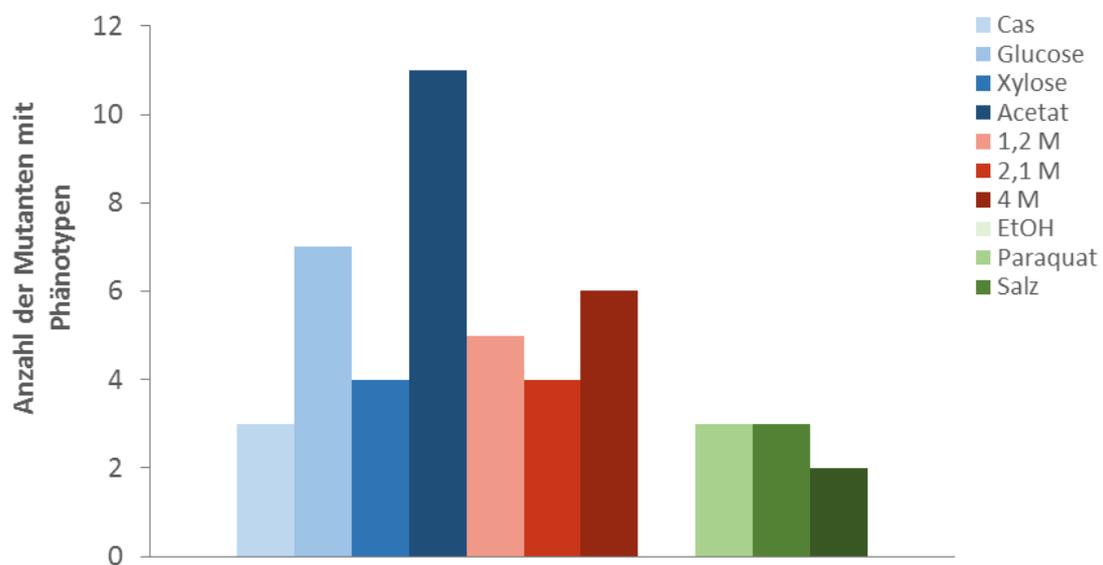


Abbildung 7: Anzahl der Phänotypen unter den verschiedenen Bedingungen. Die Kohlenstoffquellen sind in blau, die Salzkonzentrationen in rot und die Stressbedingungen in grün Tönen dargestellt. Glucose wurde ebenfalls als Standardbedingung für die Zellanzucht verwendet. In der Grafik ist diese Bedingung als Kohlenstoffquelle und als Salzkonzentration von 2,1 M NaCl aufgeführt.

Ein grafischer Überblick über die Verteilung der Phänotypen bezüglich ihrer Ausprägung, d.h. in der Latenzphase, der Verdopplungszeit oder der Wachstumsausbeute, ist in Abbildung 8 gezeigt und wird im folgenden näher beschrieben.

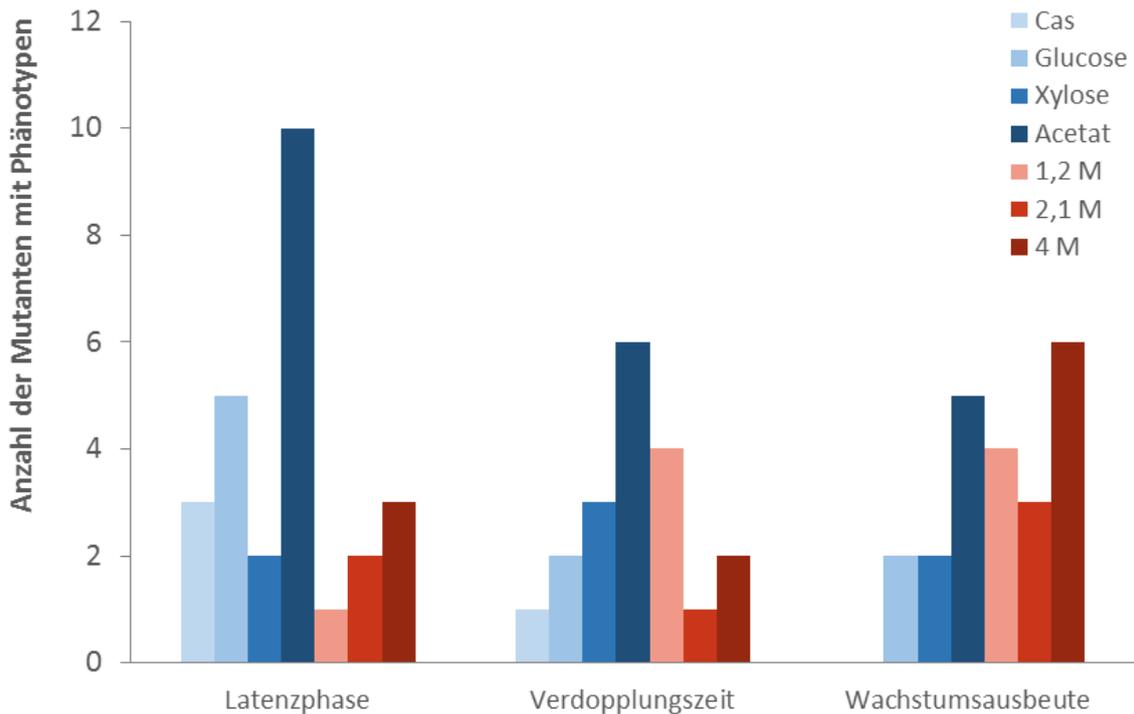


Abbildung 8: Verteilung der Mutanten mit Phänotypen bezüglich der Wachstumsbedingungen und der Art des Phänotyps. Gezeigt sind nur die verschiedenen Kohlenstoffquellen und Salzkonzentrationen.

1.2 EINFLUSS DER SRNAS AUF DIE REGULATION DES ZELLMETABOLISMUS

Die Art der Kohlenstoffquelle hat einen Einfluss auf Art und Ausprägung des Phänotyps. Die Verdopplungszeit von *H. volcanii* in der Mikrotiterplatte lag bei Wachstum mit CAS in etwa bei 4 Stunden, mit Glucose bei sieben bis acht Stunden, mit Xylose in etwa bei 15 Stunden und mit Acetat bei etwa 18 Stunden (Jaschinski *et al.*, 2014). In der Tendenz ist ein Anstieg der Anzahl der Mutanten mit einem Phänotyp insbesondere bezüglich der Verdopplungszeit mit einer schlechteren Verwertbarkeit der Stoffwechselquelle zu beobachten (vgl. Abbildung 7 und 8). Bei Wachstum mit der guten Kohlenstoffquelle CAS konnte nur ein Phänotyp bezüglich der Verdopplungszeit beobachtet werden, während bei Wachstum mit Acetat sechs Mutanten einen Phänotyp in der Verdopplungszeit und fünf in der Wachstumsausbeute zeigten. Zudem ist die Ausprägung der Phänotypen in der Regel milder. Mit CAS als Kohlenstoffquelle zeigte die Deletionsmutante H26 Δ sRNA₁₉₄ eine leicht verkürzte Latenzphase (s. Abbildung 9.A). Bei Wachstum auf Xylose war die Latenzphase und Verdopplungszeit der Deletionsmutante H26 Δ sRNA₆₃ deutlich verkürzt. Diese Deletionsmutante besaß einen GOF-Phänotyp (Abbildung 9.B). Bei Wachstum mit Acetat konnten Phänotypen mit noch deutlicherer Ausprägung

beobachtet werden. Ein Beispiel ist die Deletionsmutante $H119\Delta sRNA_{362}$, die eine stark verlängerte Latenzphase und Verdopplungszeit und eine verringerte Wachstumsausbeute zeigte (Abbildung 9.C).

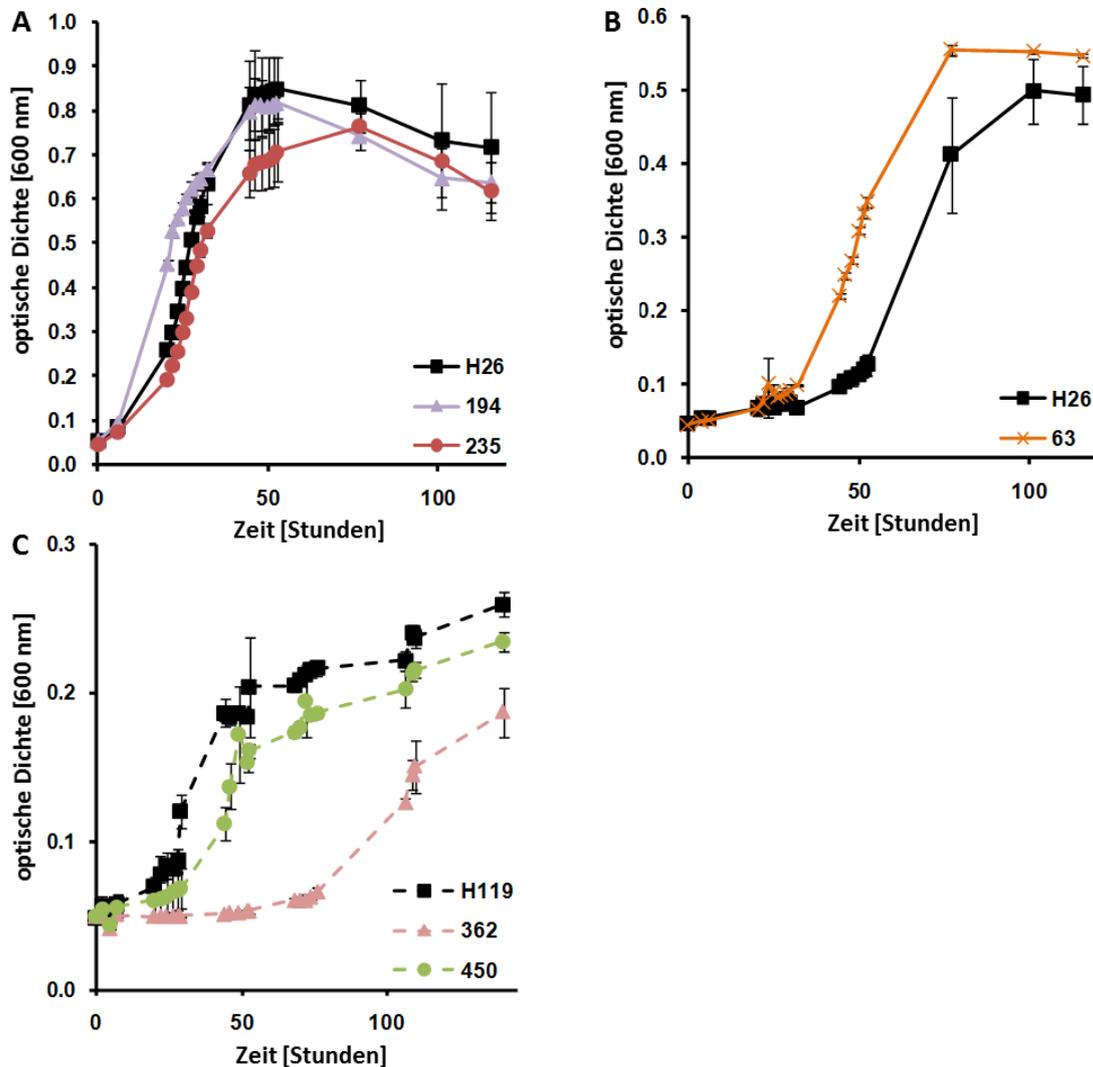


Abbildung 9: Wachstumskurven des Elternstamms (schwarz) verglichen mit ausgewählten Deletionsmutanten bei Wachstum mit verschiedenen Kohlenstoffquellen. **A.** Wachstum des Elternstamms H26, $H26\Delta sRNA_{194}$ (lila) und $H26\Delta sRNA_{235}$ (rot) mit CAS. **B.** Wachstum des Elternstamms H26 und $H26\Delta sRNA_{63}$ (orange) mit Xylose. **C.** Wachstum des Elternstamms H119, $H119\Delta sRNA_{362}$ (rosa) und $H119\Delta sRNA_{450}$ (grün) mit Acetat.

1.3 sRNAs INVOLVIERT IN EXTREME SALZBEDINGUNGEN

Für das Wachstum der sRNA-Deletionsmutanten bei extremen Salzbedingungen wie Niedrigsalzbedingungen mit 1,2 M NaCl und Hochsalzbedingungen mit 4 M NaCl, sowie unter Standardbedingungen mit 2,1 M NaCl wurden Phänotypen identifiziert (vgl. Abbildung 10). Es wurden sowohl LOF-Phänotypen, als auch GOF-Phänotypen bei allen drei Salzkonzentrationen gefunden. Bei 1,2 M NaCl besaß die Deletionsmutante

$H26\Delta sRNA_{H225.2R}$ beispielsweise eine verlängerte Latenzphase und Verdopplungszeit im Vergleich zum Elternstamm (Abbildung 10.A). Abbildung 10.B und 10.C zeigen beispielhaft einige Phänotypen bei 2,1 M und 4 M NaCl. Hierbei wurden jeweils sowohl GOF-Phänotypen ($H26\Delta sRNA_{194}$), als auch LOF-Phänotypen ($H26\Delta sRNA_{63}$, $H26\Delta sRNA_{235}$, $H26\Delta sRNA_{288}$) beobachtet. Generell waren die Phänotypen eher mild.

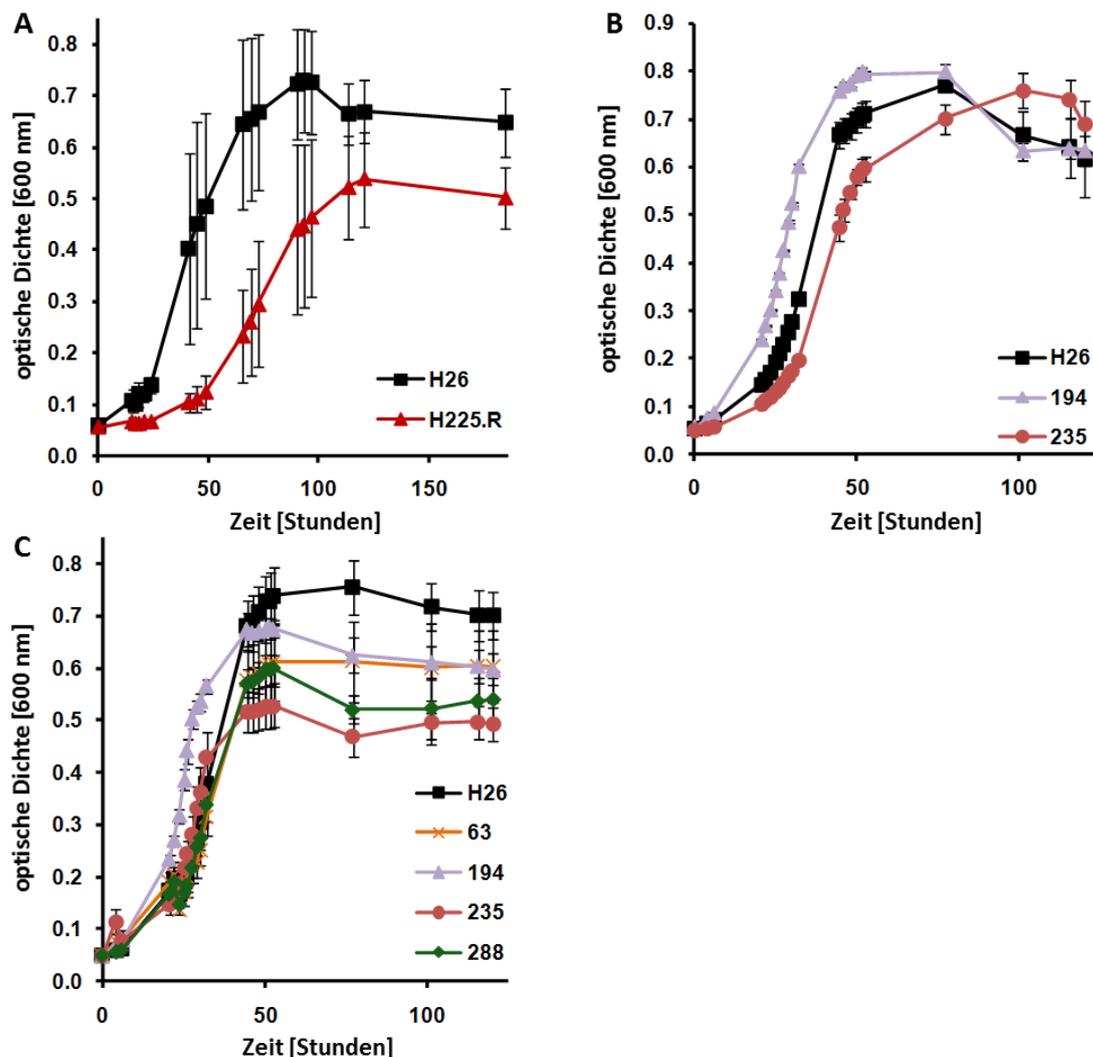


Abbildung 10: Wachstumskurven ausgewählter Deletionsmutanten im Vergleich zum Elternstamm H26 (schwarz). **A.** Wachstum des Elternstamms H26 und $H26\Delta sRNA_{H225.2R}$ (rot) bei 1,2 M NaCl. **B.** Wachstum des Elternstamms H26, $H26\Delta sRNA_{194}$ (lila) und $H26\Delta sRNA_{235}$ (rot) bei 2,1 M NaCl. **C.** Wachstum des Elternstamms H26, $H26\Delta sRNA_{63}$ (orange), $H26\Delta sRNA_{194}$ (lila), $H26\Delta sRNA_{235}$ (rot) und $H26\Delta sRNA_{288}$ (grün) bei 4 M NaCl.

18 der 27 Deletionsmutanten zeigten unter mindestens einer der drei Salzkonzentrationen einen Phänotyp. Wie bereits erwähnt könnten einige dieser Phänotypen aufgrund der Involvierung der entsprechenden sRNA in die Regulation wichtiger Prozesse für das Wachstum mit Glucose hervorgerufen worden sein. Um eine

eindeutige Zuordnung zu ermöglichen, wurden Phänotypen, die ausschließlich bei 2,1 M NaCl oder unter allen drei Salzkonzentrationen gefunden wurden, ausgeschlossen. Es blieben neun Deletionsmutanten, deren Phänotyp ausschließlich der Osmoadaptation zugeordnet werden kann.

1.4 ADAPTATION NACH STRESS-INDUKTION

Um den Einfluss von sRNAs von *H. volcanii* auf die Adaptation an Stressbedingungen zu untersuchen, wurden vier verschiedene Stressbedingungen induziert (Jantzer[Diplomarbeit], 2011): osmotischer Stress, Kältestress, Lösungsmittelstress hervorgerufen durch EtOH und oxidativer Stress durch Paraquat-Zugabe. Nach Induktion von Kältestress zeigte eine Deletionsmutante ($H26\Delta sRNA_{H225.2R}$) einen GOF- und eine Deletionsmutante ($H119\Delta sRNA_{hts21}$) einen LOF-Phänotyp. Abbildung 11.A zeigt die erhöhte Wachstumsausbeute von $H26\Delta sRNA_{H225.2R}$ nach Induktion von Kälteschock, während nach Wachstum unter Standardbedingungen eine reduzierte Wachstumsausbeute beobachtet wurde (s. Abbildung 11.C). Die Induktion von osmotischem Stress führte bei drei Deletionsmutanten ($H26\Delta sRNA_{H225.2R}$, $H119\Delta sRNA_{hts14}$ und $H119\Delta sRNA_{hts21}$) zu einem GOF-Phänotyp. Die Deletionsmutante $H26\Delta sRNA_{htsf468}$ zeigte eine reduzierte Wachstumsausbeute (s. Abbildung 11.B). Da dieser Phänotyp ebenfalls bei Standardbedingungen beobachtet wurde (vgl. Abbildung 11.C), konnte dieser Effekt jedoch dem Wachstum mit der Kohlenstoffquelle Glucose zugeordnet werden. Nach Induktion von oxidativem Stress wurde bei drei Deletionsmutanten ein GOF-Phänotyp beobachtet, alle drei erreichten eine um 25-30% erhöhte Wachstumsausbeute verglichen mit dem Wildtyp (s. Abbildung 11.D). Nach Stressinduktion mit Ethanol konnte bei keiner Mutante ein Phänotyp beobachtet werden. Zusammengefasst zeigte nur die Mutante $H26\Delta sRNA_{htsf468}$ nach Induktion einer der vier gewählten Stressbedingungen einen LOF-Phänotyp und die Mutanten $H26\Delta sRNA_{H225.2R}$, $H26\Delta sRNA_{132}$, $H26\Delta sRNA_{308}$ und $H26\Delta sRNA_{500}$ einen GOF-Phänotyp.

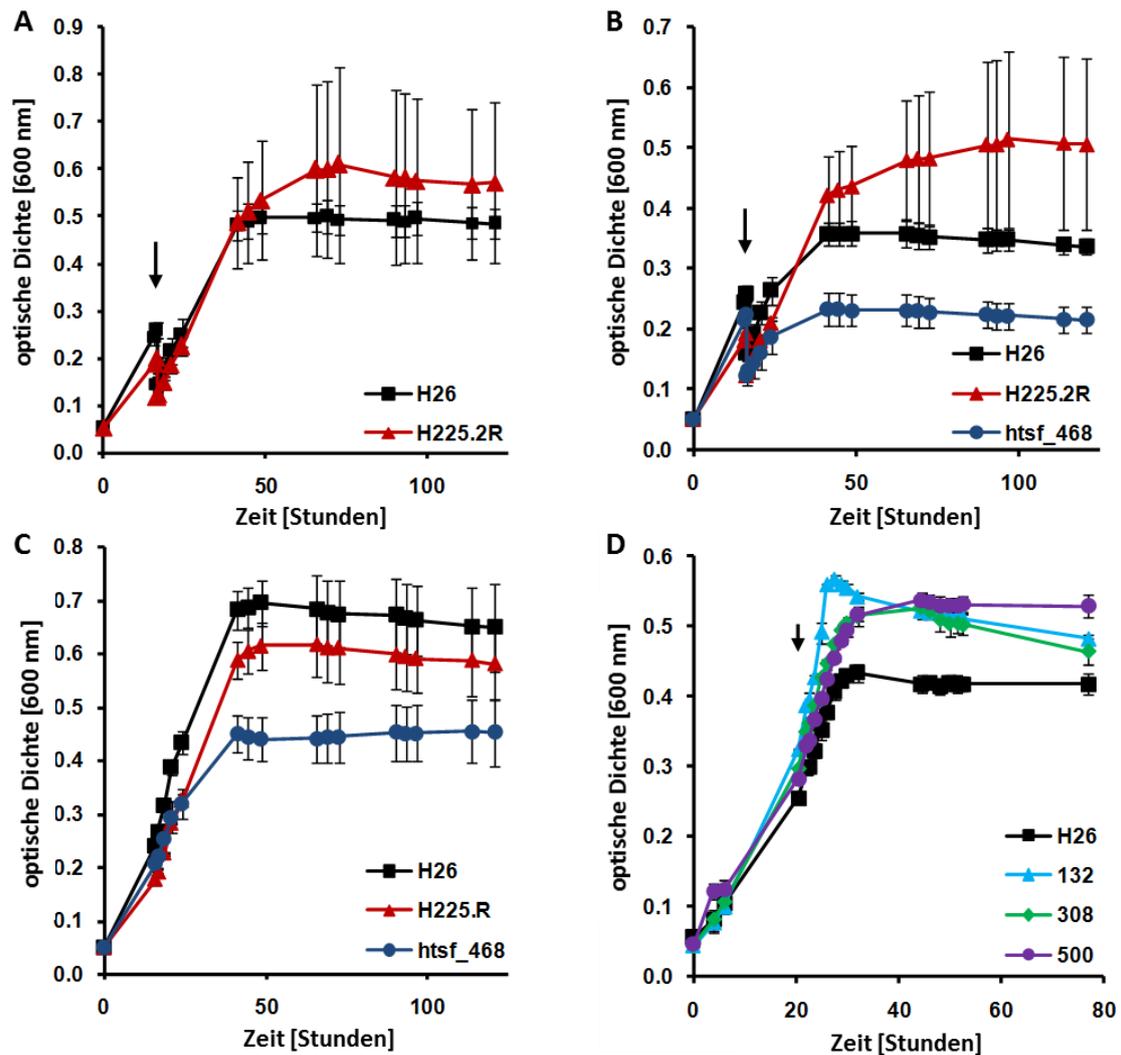


Abbildung 11: Wachstum von Wildtyp (schwarz) und Deletionsmutanten (bunt) nach Induktion verschiedener Stressbedingungen. **A.** Elternstamm H26 und $H26\Delta sRNA_{H225.2R}$ (rot) nach Induktion von Kälteschock. **B.** Elternstamm H26, $H26\Delta sRNA_{H225.2R}$ (rot) und $H26\Delta sRNA_{htsf468}$ (blau) nach Induktion von osmotischem Stress. **C.** Wachstum des Elternstamms H26, $H26\Delta sRNA_{H225.2R}$ (rot) und $H26\Delta sRNA_{htsf468}$ (blau) unter Standardbedingungen. **D.** Elternstamm H26, $H26\Delta\Delta sRNA_{132}$ (hellblau), $H26\Delta sRNA_{308}$ (grün) und $H26\Delta sRNA_{500}$ (lila) nach Induktion von oxidativem Stress.

1.5 EINFLUSS VON SRNAs AUF DAS SCHWÄRMVERHALTEN

Mehr als ein Drittel der getesteten sRNA-Deletionsmutanten zeigten ein abweichendes Schwärmverhalten im Vergleich zum Wildtyp. Hierbei zeigte nur die Mutante $H26\Delta 63$ eine erhöhte Beweglichkeit im Vergleich zum Wildtyp, während die Deletionsmutanten von insgesamt fünf sRNA-Genen ($H26\Delta sRNA_{168}$, $H26\Delta sRNA_{308}$, $H26\Delta sRNA_{500}$, $H26\Delta sRNA_{htsf182}$ und $H26\Delta sRNA_{htsf468}$) zu einer reduzierten Schwärmaktivität führten (s. Abbildung 12).

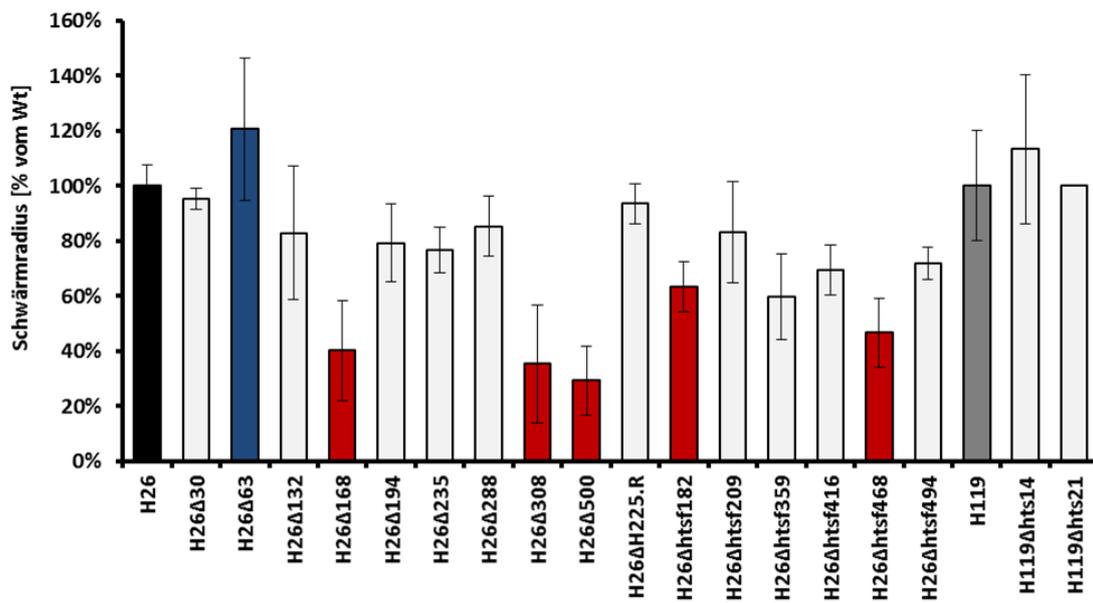


Abbildung 12: Schwärmverhalten von 17 Deletionsmutanten im Vergleich zu dem entsprechenden Elternstamm (H26 in schwarz und H119 in grau). H26Δ*sRNA*₆₃ zeigt eine erhöhte Schwärmaktivität (blau) und die Mutanten H26Δ*sRNA*₁₆₈; H26Δ*sRNA*₃₀₈, H26Δ*sRNA*₅₀₀, H26Δ*sRNA*_{htsf182} und H26Δ*sRNA*_{htsf468} besitzen eine verringerte Schwärmaktivität (rot).

2. REGULATION VERSCHIEDENER sRNAs UND DIE SUCHE NACH POTENTIELLEN ZIELGENEN

Nachdem durch phänotypische Charakterisierung von sRNA-Deletionsmutanten die Involvierung von sRNAs in viele biologische Prozesse gezeigt werden konnte, war das nächste Ziel potentielle Zielgene zu identifizieren und den regulatorischen Einfluss von sRNAs nachzuweisen. Hierzu wurden einige sRNAs, die in wichtige biologische Prozesse involviert sind und deren Deletion Phänotypen verursacht, für eine weitere Charakterisierung ausgewählt.

2.1 ANALYSE DER TRANSKRIPTLEVEL VON sRNA₃₆₂ BEI VERSCHIEDENEN WACHSTUMSBEDINGUNGEN

In einer RNomics-Studie wurde sRNA₃₆₂ mit einer Größe von 142 nt identifiziert und mittels Northern Blot-Analyse verifiziert (Straub *et al.*, 2009). Die sRNA ist im intergenen Bereich zwischen dem Transkriptionsinitiationfaktor *tfb8* (*HVO_A0137*) und dem konservierten hypothetischen Protein *HVO_A0138* auf dem zirkulären Chromsom pHV4 lokalisiert (pHV4: 135.199-135.340 /F). Mittels Phänotypisierung wurde bei einigen Kohlenstoffquellen (CAS, Xylose, Acetat und Glucose) eine verlängerte Latenzphase und somit eine langsamere Anpassung an unterschiedliche Kohlenstoffquellen beobachtet (vgl. Tabelle 38). Insbesondere Wachstum mit Acetat als Kohlenstoffquelle führte zu einer stark verlängerten Latenzphase und Verdopplungszeit. Die Analyse des Transkriptlevels der sRNA zeigte kaum Unterschiede bei den verschiedenen Kohlenstoffquellen (s. Abbildung A1 im Anhang). In der exponentiellen Wachstumsphase war das Transkriptlevel der sRNA nach Wachstum mit der Kohlenstoffquelle Glucose am höchsten. Wachstum mit Xylose bzw. Acetat führte zu einer leichten Reduktion des Transkriptlevels der sRNA₃₆₂ um den Faktor 0,7 bzw. 0,8.

2.2 TRANSKRIPTOMANALYSE DER sRNA_{HTSF468}

Im Zuge des ersten HTS-Ansatzes zur Identifikation kleiner RNAs in *H. volcanii* wurde die differentiell regulierte intergene sRNA_{htsf468} identifiziert und eine Deletionsmutante generiert (Jantzer[Diplomarbeit], 2011; Heyer *et al.*, 2012). Durch den Vergleich der HTS-Daten unter verschiedenen Bedingungen wurde ein erhöhtes Transkriptlevel der sRNA_{htsf468} bei 2,5 M NaCl und 45°C in der stationären Wachstumsphase festgestellt

(Jantzer[Diplomarbeit], 2011). Ihre Größe wurde mittels cr-RT-PCR bestimmt und beträgt 193 nt (Mhedhbi[Bachelorthesis], 2012). $sRNA_{htsf468}$ ist auf dem zirkulären Chromosom pHV1 zwischen dem Gen der $sRNA_{htsf467}$ und dem Gen *HVO_C0058*, welches homolog zu einer nicht funktionalen ISH4-Typ Transposase ist, lokalisiert. Die Deletionsmutante von $sRNA_{htsf468}$ zeigte bei Wachstum auf Xylose eine stark verkürzte Verdopplungszeit. Wachstum mit der Kohlenstoffquelle Glucose führte sowohl bei 2,1 M, als auch bei 4 M NaCl zu einer verlängerten Verdopplungszeit und verringerten Wachstumsausbeute (vgl. Tabelle 38). Da dies auf eine mögliche Involvierung in die Adaptation an Salzkonzentrationen oberhalb von 2,1 M NaCl deutete, wurde das Transkriptom von Elternstamm H26 und Deletionsmutante $H26\Delta sRNA_{htsf468}$ bei Wachstum mit 4 M NaCl in der exponentiellen Wachstumsphase mittels DNA-Mikroarray verglichen. Der Mikroarray wurde in Dreifachbestimmung durchgeführt (s. Tabelle A3 im Anhang). Gene, deren Expression in zwei oder drei Mikroarrays mindestens zweifach erhöht bzw. erniedrigt waren, wurden in die Auswertung einbezogen. Die Standardabweichung betrug maximal 40%. In Abwesenheit der $sRNA$ zeigte ausschließlich das Gen der $sRNA_{30}$ eine um etwa 50% verminderte Expression. Insgesamt waren die Transkriptmengen von sieben Spots in Abwesenheit der $sRNA_{htsf468}$ zwischen zwei- und vierfach erhöht. Davon kodierten sechs Spots für andere $sRNAs$. Ein Spot enthielt die Sonde für das Gen *HVO_B0128*, welches für ein Glucose-1-Dehydrogenase-verwandtes Protein kodiert (2,4-Fach erhöht).

Das Programm TargetRNA (Tjaden, 2008) wurde zur Identifikation von potentiellen Ziel-mRNAs kleiner RNAs entwickelt und für bakterielle $sRNAs$ optimiert. Die *in silico*-Analyse führte zur Identifikation von drei potentiellen Ziel-mRNAs (s. Tabelle 39). Nach der Identifikation musste überprüft werden, ob die entsprechenden Interaktionsbereiche tatsächlich innerhalb der kodierenden Sequenz bzw. des möglichen UTR-Bereichs lokalisiert sind, oder ob es sich um falsch positive Treffer handelt. Danach blieben zwei potentielle Ziel-mRNAs. Die mRNA für ein konserviertes hypothetisches Protein (*HVO_A0476*) und die mRNA für das Protein B des UvrABC-Systems (*HVO_0029*), einer Exzinuklease, die ein wichtiger Bestandteil der Nukleotidexzisionsreparatur ist. Die Überprüfung dieser potentiellen Ziel-mRNAs steht noch aus, da es keine Übereinstimmung zu Array-Daten gab und mit aussichtsreicheren $sRNA$ -Kandidaten

weiter gearbeitet wurde.

Tabelle 39: Potentielle Ziel-mRNAs ermittelt durch *in silico*-Analyse mit dem Programm TargetRNA. Aufgelistet sind die genomische Region, die HVO-Nummer, die Genfunktion und der p-Wert der Ziel-mRNAs. Falsch positive Ergebnisse sind in grauer Schrift dargestellt.

genomische Region	HVO_Nr.	Genfunktion	p-Wert
CHR: 1.676.279-1.676.323 /R	<i>HVO_1812</i>	kons. Hyp. Prot.	0,0006
pHV4: 483.179-483.210 /R	<i>HVO_A0476</i>	kons. hyp. Prot.	0,0012
CHR: 30.263-30.286 /F	<i>HVO_0029</i>	UvrABC-System Protein B	0,0061

2.3 IDENTIFIKATION DER POTENTIELLEN ZIEL-MRNA OSMC VON sRNA₄₇₉

Die 166 nt große sRNA₄₇₉ wurde wie sRNA₃₆₂ in der RNomics-Studie identifiziert und mittels Northern Blot-Analyse verifiziert (Straub *et al.*, 2009). Aktuelle HTS-Daten führten zu einer Erweiterung der ursprüngliche Genomregion auf 213 bp (Babski *et al.*, 2016). Das Gen der sRNA liegt auf dem linearen Chromsom pHV4 (207.661-207.873 /F) (s. Abbildung 13.A).

Eine *in silico*-Analyse der Sequenz der sRNA₄₇₉ mittels TargetRNA führte zur Identifikation von zehn möglichen Ziel-mRNAs (s. Tabelle 40). Nach der Identifikation musste wiederum ausgeschlossen werden, dass es sich um falsch positive Treffer handelte. Nach Überprüfung blieben sieben potentielle mRNA-Interaktionspartner der sRNA₄₇₉.

Tabelle 40: Potentielle Ziel-mRNAs ermittelt mit dem Programm TargetRNA. Aufgelistet sind der genomische Bereich der Interaktion, die HVO-Nummer(n), die Genfunktion und der p-Wert. Falsch positive Ergebnisse sind in grauer Schrift dargestellt

genomische Region	HVO-Nr(n)	Genfunktion	p-Wert
pHV3 (249.367-249.396/R)	<i>HVO_B0124</i>	ABC-Transportsystem (Permease)	0,0002
CHR (528.434-528.452/F)	<i>HVO_0596-7</i>	kons. hyp. Prot./Protein der OsmC-Familie	0,0005
CHR (921.454-921.478/R)	<i>HVO_1013</i>	Protohäm-IX-Geranyltransferase	0,0050
pHV4 (522.902-522.923/F)	<i>HVO_A0518</i>	Homolog zu Methylmalonyl-CoA Epimerase (nicht funkt.)	0,0050
CHR (663.000-663.037/R)	<i>HVO_0742</i>	kons. hyp. Prot.	0,0058
CHR (1.468.760-1.468.785/F)	<i>HVO_1597</i>	kons. hyp. Prot.	0,0058
pHV3 (95.509-95.525/R)	<i>HVO_B0084-5</i>	Protein der DUF336-Familie/Glycosid-Hydrolase	0,0058
CHR (918.941-918.972/R)	<i>HVO_A1008</i>	kons. hyp. Prot. (nicht funktional)	0,0069
CHR (1.062.948-1.062.977/R)	<i>HVO_1164</i>	Hydrolase (HD-Familie)	0,0056
pHV4 (52.124-52.139/F)	<i>HVO_A0060</i>	Protein der DUF955-Familie	0,0096

Von diesen potentiellen Ziel-mRNAs war der intergene Bereich der beiden eng benachbarten Gene *HVO_0596*, einem konservierten hypothetischen Protein, und *HVO_0597*, einem Protein der OsmC-Familie, besonders signifikant (p -Wert = 0,0005) (s. Abbildung 13.B). Die beiden Gene sind ausschließlich von einem intergenen Bereich von nur 64 bp getrennt. Dies könnte auf die Expression im Operon oder einen 5'- bzw. 3'-UTR-Bereich einer der beiden Gene hinweisen. Die putative Bindestelle liegt 8 nt nach dem Transkriptionsstop von *HVO_0596* und 39 nt vor dem Transkriptionsstart des Gens *HVO_0597* und erstreckt sich über 18 bp kovalenter Bindung von sRNA und mRNA (s. Abbildung 13.C).

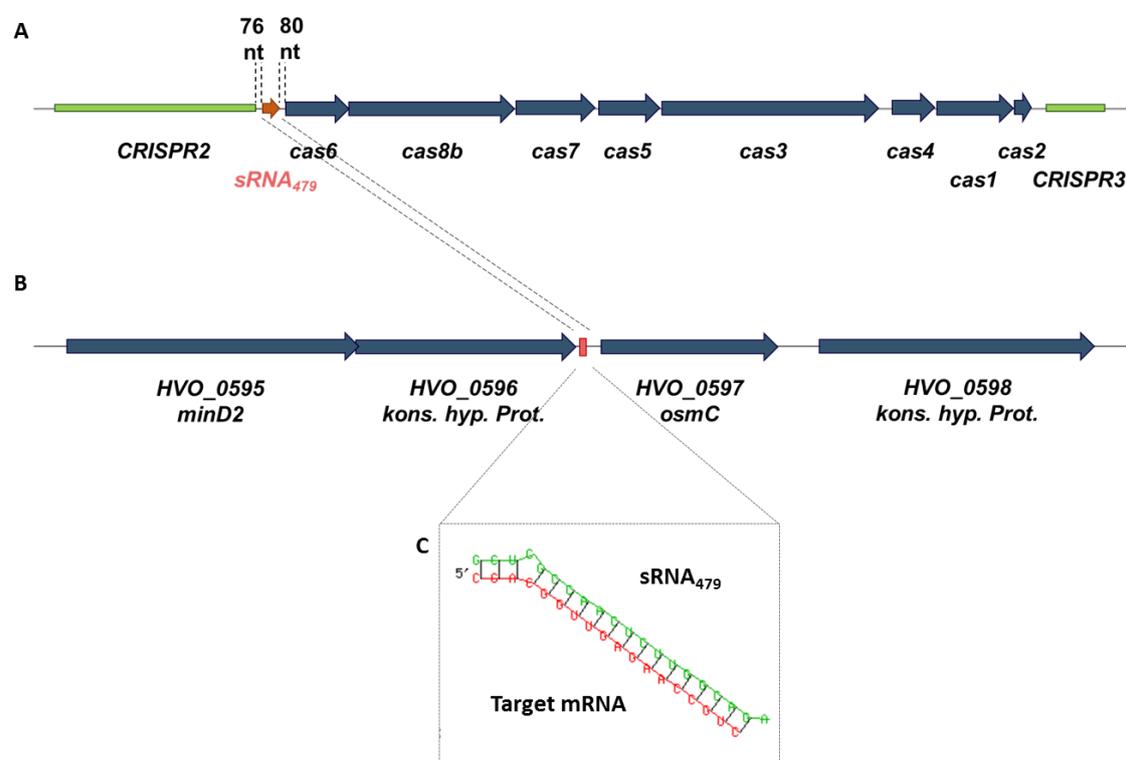


Abbildung 13: Genomische Lokalisation der sRNA₄₇₉ innerhalb eines CRISPR/Cas-Lokus auf dem linearen Chromosom pHV4 und ihre potentielle Interaktion mit einer Ziel-mRNA vorhergesagt mittels TargetRNA. **A.** Dargestellt ist die genomische Region zwischen 204.861-218.673. Der Abstand zu den benachbarten Genen CRISPR2-RNA bzw. cas6 beträgt 76 bzw. 80 nt. **B.** Gezeigt ist die potentielle Interaktion im intergenen Bereich zwischen *HVO_0596* (konserviertes hypothetisches Protein) und *HVO_0597* (*osmC*). **C.** Potentieller Interaktionsbereich der sRNA₄₇₉ mit der potentiellen 5'-UTR von *HVO_0597* vorhergesagt mit RNAhybrid (Rehmsmeier *et al.*, 2004).

Das Gen *HVO_0597* kodiert für das osmotisch induzierbare Protein OsmC, einer Hydroperoxidase. Für dieses Protein konnte in *E. coli* die Involvement in die Abwehr von oxidativem Stress gezeigt werden (Conter *et al.*, 2001). In Reporterassays wurde der

Promotorbereich der sRNA₄₇₉ stromaufwärts des Reportergens *dhfr* inseriert und die DHFR-Aktivität unter verschiedenen Bedingungen untersucht. Unter anderem konnte nur eine leichte, nicht signifikante Erhöhung der Promotoraktivität 60 min nach Induktion von oxidativem Stress beobachtet werden (Lehr[Diplomarbeit], 2010). In Wachstumsversuchen führte die Induktion von oxidativem Stress bei der Deletionsmutante der sRNA₄₇₉ zu keinem phänotypischen Unterschied verglichen mit dem Wildtyp (s. Tabelle A1 und A2 im Anhang).

In der Northern Blot-Analyse mit einer Sonde gegen das Gen *HVO_0596*, mit einer Größe von 585 bp, konnte kein Transkript detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Das Gen *HVO_0597* ist ohne mögliche UTRs mit einer Größe von 468 bp annotiert. Die Verwendung einer Sonde gegen das Gen *HVO_0597* führte zur Detektion eines monocistronischen Transkriptes in der Größenordnung von 400-500 nt (s. Abbildung 14 und 15). Vor der Induktion von osmotischem Stress wurde das Transkript nur sehr schwach detektiert (vor Stress). Im Vergleich zum Wildtyp konnte jedoch eine erhöhte

Expression in Abwesenheit von sRNA₄₇₉ beobachtet werden. Direkt nach Induktion von oxidativem Stress (1'), durch Zugabe von 4 mM Paraquat, war das Transkript von *HVO_0597* sowohl im Wildtyp als auch in der sRNA-Deletionsmutante sehr stark induziert (s. Abbildung 14 und 15). Das Transkriptlevel von *HVO_0597* fiel bis zu einem Zeitpunkt von 60 min

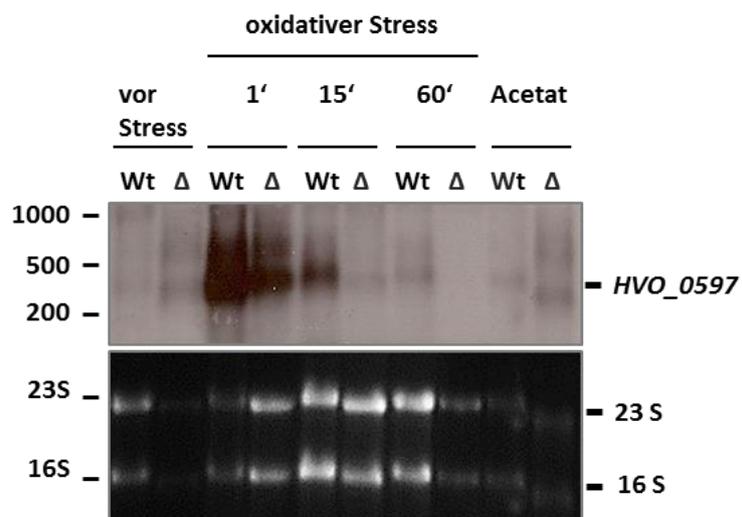


Abbildung 14: Northern Blot-Analyse mit einer Sonde gegen *HVO_0597* (*osmC*). RNA wurde aus Kulturen des Wildtyps (Wt) und Deletionsmutante der sRNA₄₇₉ (Δ) isoliert. Aufgetragen sind Proben nach Wachstum mit Glucose (vor Stress), 1, 15 und 60 min nach der Induktion von oxidativem Stress und nach Wachstum mit Acetat als Kohlenstoffquelle. Der Größenstandard ist in nt angegeben. Als Kontrolle sind die 23S und 16S rRNA gezeigt.

nach Induktion von oxidativem Stress wieder auf das Transkriptlevel vor Stressinduktion ab (s. Abbildung 15). In Abwesenheit von sRNA₄₇₉ war das Transkriptlevel direkt nach der Induktion von oxidativem Stress und 60 min später nur etwa halb so hoch wie im

Wildtyp. Nach 15 min war das Transkriptlevel, verglichen mit dem Wildtyp, sogar um das Zehnfache reduziert (s. Abbildung 15). Das Expressionslevel des Transkriptes nach Wachstum mit einer Sonde gegen *HVO_0597* war in der Deletionsmutante der *sRNA₄₇₉* nahezu doppelt so stark wie im Wildtyp (s. Abbildung 15).

Die starke Induktion von *osmC* nach Zugabe von Paraquat lässt auf dessen Funktion in die Adaptation an oxidativen Stress schließen. *sRNA₄₇₉* ist ein positiver Regulator von *osmC*. Im Vergleich zum Wildtyp ist das Transkriptlevel von *osmC* in der *sRNA*-Deletionsmutante zwar deutlich verringert, ein Wachstumsphänotyp konnte nach Induktion von oxidativem Stress jedoch nicht beobachtet werden. Die Versuche zeigten, dass die regulatorische Kontrolle von *osmC* mindestens einem weiteren Faktor unterliegt. Weiterführende Untersuchungen der regulatorischen Funktion von *sRNA₄₇₉* wurden nicht durchgeführt, da eine nähere Charakterisierung von *sRNA₃₀* und *sRNA₁₃₂* im Hinblick auf deren potentielle Ziele erfolgte.

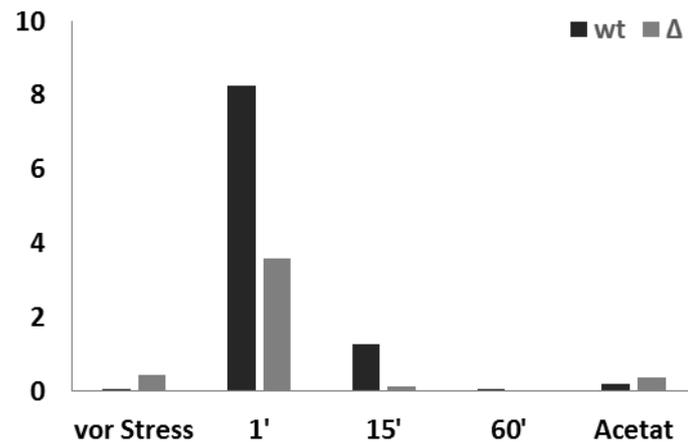


Abbildung 15: Auswertung der Northern Blot-Analyse mit einer Sonde gegen das Transkript *HVO_0597* (*osmC*). Gezeigt sind die Transkriptlevel von Wildtyp (Wt, schwarz) und Deletionsmutante der *sRNA₄₇₉* (Δ , grau) nach Normierung auf die 16S rRNA. Ausgewertet wurden die Transkriptlevel von *osmC* nach Wachstum mit Acetat und vor (vor Stress), direkt nach (1') und 15 und 60 min nach Induktion von oxidativem

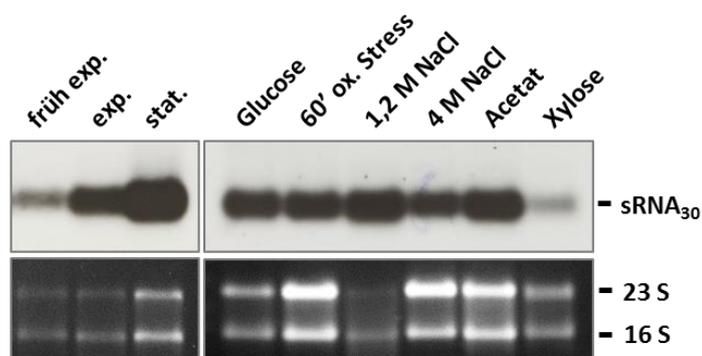
3. REGULATION DER sRNA₃₀ UND IDENTIFIKATION VON POTENTIELLEN ZIELEN

Die Phänotypisierung von sRNA-Deletionsmutanten kann einen wichtigen Hinweis auf ihre biologischen Funktionen geben. Dies kann einen Hinweis auf Wachstumsbedingungen geben, die für eine nähere Charakterisierung der sRNA und ihrer Wirkweise von Bedeutung sind. sRNA₃₀ wurde bereits in einer früheren Studie näher charakterisiert (Straub *et al.*, 2009). Ihre Deletionsmutante zeigte einen starken Wachstumsdefekt bei 51°C.

3.1 DIFFERENTIELLE EXPRESSION DER sRNA

Neben der Phänotypisierung durch Wachstumsanalysen von Deletionsmutanten bietet die Analyse der Expression einer sRNA unter verschiedenen Bedingungen eine weitere Möglichkeit einen Einblick in ihre biologischen Funktionen zu erhalten.

Die Expression von sRNA₃₀ wurde nach Wachstum in Komplexmedium in verschiedenen Wachstumsphasen mittels Northern Blot analysiert (s. Abbildung 16). Das Transkriptlevel der sRNA nahm von der früh-exponentiellen zur spät-exponentiellen Wachstumsphase um das 1,7-Fache zu und stieg in der stationären Wachstumsphase weiter an. Zum Vergleich der Expression der sRNA₃₀ bei verschiedenen



Kohlenstoffquellen wurde synthetisches Medium verwendet. Die Expression wurde nach Wachstum mit den Kohlenstoffquellen Glucose,

Abbildung 16: Northern Blot-Analyse der Expression von sRNA₃₀ in verschiedenen Wachstumsphasen (früh exponentiell, exponentiell und stationär), nach Wachstum mit verschiedenen Kohlenstoffquellen (Glucose, Acetat, Xylose), nach 60 min oxidativem Stress und verschiedenen Salzkonzentrationen (1,2 M, 2,1 M und 4 M NaCl). 2,1 M NaCl entspricht der Standard Salzkonzentration (Glucose).

Acetat und Xylose analysiert. Hierbei war das Expressionslevel bei Glucose am höchsten und nahm nur leicht nach Wachstum mit Acetat (0,8-fach) ab. Wachstum mit Xylose führte zu einer halb so starken Expression der sRNA verglichen mit dem Wachstum auf Glucose.

Alle weiteren Wachstumsbedingungen wurden in synthetischem Medium mit der Kohlenstoffquelle Glucose durchgeführt. Die Induktion von 60 Minuten oxidativem Stress führte zu einer Reduktion des Expressionslevels der $sRNA_{30}$ um das 0,6-Fache. Der Vergleich verschiedener Salzkonzentrationen zeigte, dass die $sRNA$ am stärksten unter Niedrigsalzbedingungen von 1,2 M NaCl exprimiert war. Die Expression lag, verglichen zur Standardsalzkonzentration von 2,1 M, um das 2,6-Fache und, verglichen mit Hochsalzbedingungen (4 M NaCl), um das 3,6-Fache höher.

3.2 DIFFERENTIELLES WACHSTUM BEI 42 UND 51°C

In einer früheren Studie zeigte die $sRNA_{30}$ einen starken Wachstumsdefekt bei 51°C (Straub *et al.*, 2009). Zunächst erfolgte die Reproduktion dieses Wachstumsphänotyps. Hierbei konnte ein geringes Wachstumsdefizit bei 42°C und ein starkes Wachstumsdefizit, resultierend in einer stark verlängerten Latenzphase der $sRNA$ -Deletionsmutante bei 51°C, beobachtet werden (s. Abbildung 17).

In einer Northern Blot-Analyse konnten allerdings keine Unterschiede im Expressionslevel der $sRNA_{30}$ nach Wachstum bei 42 und 51°C festgestellt werden (s. Abbildung A2 im Anhang).

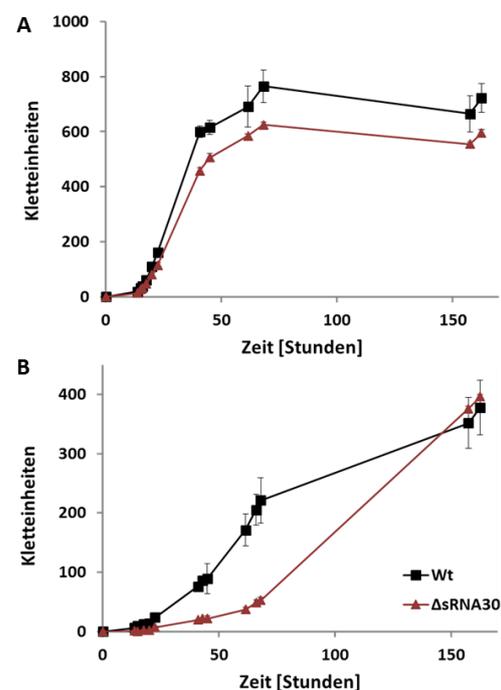


Abbildung 17: Vergleich des Wachstums des Elternstamms H26 (Wt) (schwarz) mit der Deletionsmutante der $sRNA_{30}$ ($\Delta sRNA_{30}$) (rot). **A.** Wachstum bei 42°C. **B.** Wachstum bei 51°C.

3.3 TRANSKRIPTIONELLE ANALYSE POTENTIELLER ZIELGENE

In einer ersten Studie zur Charakterisierung haloarchaealer $sRNAs$ in *H. volcanii* wurde 2D-Gelelektrophorese zur Analyse des Proteoms zweier $sRNA$ -Deletionsmutanten durchgeführt (Straub *et al.*, 2009). Hierbei wurde die differentielle Regulation von vier Proteinen in Wildtyp und $H26\Delta sRNA_{30}$ gezeigt. Desweiteren wurde ein Transkriptomvergleich von Wildtyp und Deletionsmutante der $sRNA_{30}$ mittels DNA-

Mikroarray durchgeführt (Babski, unveröffentlichte Daten). Insgesamt wurden vier funktionell interessante potentielle Zielgene ausgewählt und mittels Northern Blot analysiert, um eine mögliche Regulation auf post-transkriptioneller Ebene durch sRNA₃₀ nachzuweisen. Ausgewählt wurden das ATP-Bindeprotein eines ABC-Transportsystems mit dem putativen Substrat Zink (*HVO_2398*), eine terminale Quinol-Oxidase (*HVO_2027*) (2D-Gele), eine Histidin-Kinase (*HVO_B0143*) und das SBP eines eisenabhängigen ABC-Transporters (*HVO_B0144*) (DNA-Mikroarray). Nur für das Gen *HVO_2398* konnte ein Signal auf Höhe der annotierten Gengröße bestimmt werden.

Das Gen *HVO_2398* besitzt eine Länge von 870 bp und zeigte in Abwesenheit von sRNA₃₀ eine stark verminderte Expression. Das Gen *HVO_2398* ist eines von drei Genen des ABC-Transportsystems *HVO_2397-9* mit einer Gesamtlänge von 2967 bp. Im Northern Blot wurde ein Transkript knapp unterhalb von 3000 bp detektiert (s. Abbildung 18). Dies weist auf die Expression des ABC-Transportsystems als polycistronische mRNA, bestehend aus den Transkripten dieser drei Gene, hin. Aufgrund des Wachstumsdefekts von *H26ΔsRNA₃₀* bei 51°C wurde das Transkriptlevel des Operons *HVO_2397-99* in Wildtyp und Deletionsmutante sowohl nach Wachstum bei 42°C als auch bei 51°C bestimmt. Bei beiden Wachstumstemperaturen wurde eine verstärkte Expression des Operons in Abwesenheit von sRNA₃₀ festgestellt (vgl. Abbildung 18).

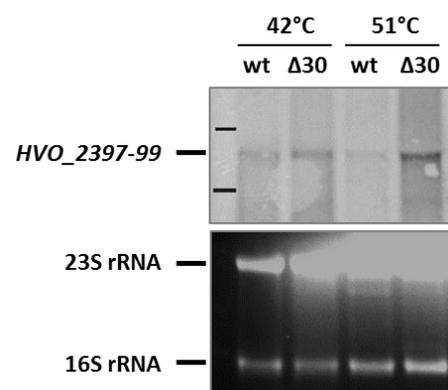


Abbildung 18: Northern Blot-Analyse von Wildtyp und Δ sRNA₃₀ nach Wachstum bei 42°C und 51°C. Es wurde eine Sonde gegen das Transkript des Gens *HVO_2398* verwendet.

3.4 TRANSKRIPTOMANALYSE NACH HITZESCHOCK-INDUKTION

Die Wachstumsversuche legten eine Involvierung von sRNA₃₀ in die Adaptation an hohe Wachstumstemperaturen nahe. Deshalb wurde eine Transkriptom-Analyse von Wildtyp und Deletionsmutante der sRNA₃₀ mittels DNA-Mikroarray nach Hitzeschock für 15 min bei 51°C im Wasserbad durchgeführt. Tabelle 41 zeigt eine Übersicht über die in Zweifach- bzw. Dreifachbestimmung regulierten Gene unterteilt in Funktionsklassen. Insgesamt zeigten nur zwölf Spots eine differentielle Regulation wobei die Gene nur eine um das 2,4-Fache erhöhte bzw. das 2,5-Fache verringerte Expression zeigten. Im Stamm ohne

sRNA₃₀ war sRNA₂₆₄ schwächer und die beiden sRNA-Gene sRNA₂₄sense und sRNA₁₀ waren stärker exprimiert. Zudem waren einige Gene involviert in Transportvorgänge wie zum Beispiel ein ABC-Transporter mit dem putativen Substrat Zucker und drei Gene des Zellmetabolismus reguliert. Desweiteren waren einige Regulator-Proteine und eine Reihe konservierter hypothetischer Proteine reguliert.

Tabelle 41: Vergleich des Transkriptom von Wildtyp und Deletionsmutante H26ΔsRNA₃₀ nach 15-minütigem Hitzeschock bei 51°C im Wasserbad mittels DNA-Mikroarray. Gezeigt sind die mindestens zweifach erhöhten bzw. verringerten Transkriptlevel der Spots. Aufgelistet sind die HVO-Nummern, die Genfunktionen, der Grad der Regulation und die Standardabweichung (s.a.). Es wurden nur regulierte Gene mit einer Standardabweichung von maximal 40% berücksichtigt. Zum besseren Überblick sind Gene mit erhöhtem Transkriptlevel normal und mit verringertem Transkriptlevel fett gedruckt.

HVO-Nummern	Genfunktionen	Regulation	s.a. [%]
<u>sRNAs</u>			
	sRNA ₂₆₄	0,4	1
	sRNA ₂₄ sense	2,2	35
	sRNA ₁₀	2,4	19
<u>Transport</u>			
HVO_2996	Anionen-Permease	0,4	12
HVO_2031-2	ABC-Typ Transportsystem (putatives Substrat Zucker): SBP (<i>tsgA12</i>); ATP-bindendes Protein (<i>tsgD12</i>)	0,5	40
HVO_B0194	LppX-Protein Familie	2,1	39
HVO_B0276	Protein der DMT-Superfamilie	2,4	36
<u>Metabolismus</u>			
HVO_2995	Ferredoxin (2Fe-2S)	0,4	12
HVO_0541	Aconitat-Hydratase (<i>citB2</i> , <i>acnA</i>)	2,0	29
HVO_B0376	Protein Aldo-Keto-Reduktase-Familie (Oxidoreduktase)	2,1	30
<u>Sonstiges</u>			
HVO_0376-8	hypothetische Proteine	0,5	40
HVO_0540	konserviertes hypothetisches Protein	2,0	29
HVO_B0193	Transkriptionsregulator der ArsR-Familie	2,1	39
HVO_B0191-2	konservierte hypothetische Proteine	2,1	39
HVO_B0374-5	konserviertes hypothetisches Protein; Protein der Spo0M-Familie (Sporulation)	2,1	30
HVO_0632	Sensor-Box Histidin-Kinase	2,1	40
HVO_0266-70	Protein der UPF0395-Familie; Homolog zu den strukturellen Virus-Proteinen HGPV1-VP2 und HGPV1-VP3; zwei konservierte hypothetische Proteine	2,2	24
HVO_B0275	konserviertes hypothetisches Protein	2,4	36

3.5 1D-PROTEOM NACH HITZESCHOCK-INDUKTION

Eine Reihe bakterieller sRNAs üben ihre regulatorische Funktion über direkte Interaktion mit Proteinen aus. Um mögliche Proteininteraktionspartner von sRNA₃₀ zu identifizieren wurde eine 1D-Proteom-Analyse mittels denaturierenden SDS-Gelen durchgeführt. Das Proteom von Wildtyp und sRNA-Deletionsmutante wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Hitzeschockinduktion (5, 15, 30, 60, 120 und 240 min) verglichen (s. Abbildung 19).

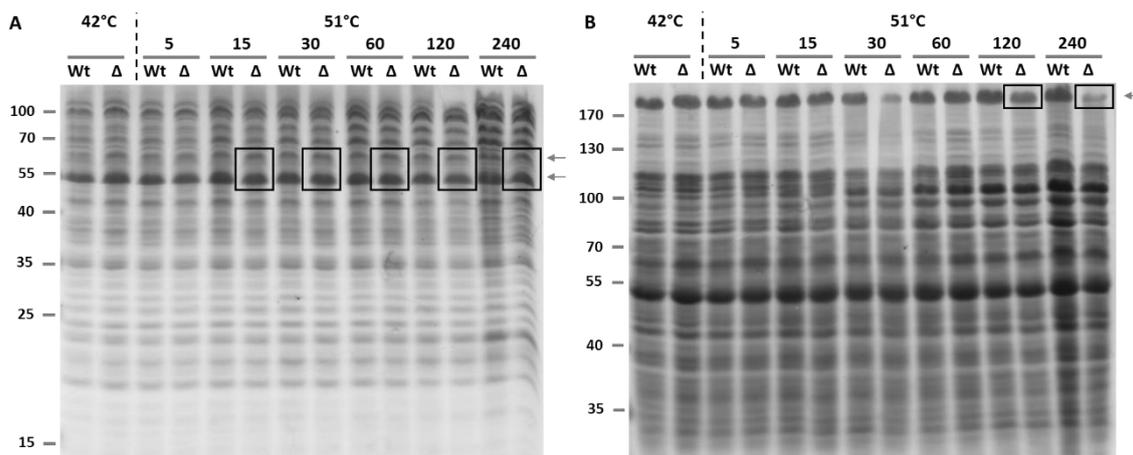


Abbildung 19: Vergleich des Proteoms von Wildtyp (Wt) und H26ΔsRNA₃₀ (Δ) nach Hitzeschock mittels denaturierender SDS-Gelelektrophorese. Aufgetragen wurden Proteinproben beider Stämme vor (42°C) und nach (51°C) 5, 15, 30, 60, 120 und 240 min Hitzeschockinduktion bei 51°C. Veränderte Proteinproduktionen bei der Deletionsmutante im Vergleich zum Wildtyp sind in den entsprechenden Spuren mit einem Rechteck und Pfeil gekennzeichnet. Der Größenstandard ist jeweils im linken Bereich der Proteingele gezeigt und in kDa angegeben **A.** 15%-iges SDS-Gel zur Auftrennung kleinerer Proteine. **B.** 8%-iges SDS-Gel zur Auftrennung größerer Proteine.

Zur Identifikation kleiner Proteine wurde ein 15%-iges (A) und zur Identifikation größerer Proteine ein 8%-iges (B) Acrylamidgel verwendet. Das Proteom in der Deletionsmutante unterschied sich nur geringfügig von dem des Wildtyps. Zwei Proteinsignale bei etwa 55 und 65 kDa (A) und bei mehr als 170 kDa (B) zeigten eine leicht verringerte Proteinproduktion in Abwesenheit der sRNA. In späteren Wiederholungen des Versuchs konnten diese nicht reproduziert werden.

Um Unterschiede des Proteoms eindeutig dem Fehlen der sRNA₃₀ und deren Bedeutung bei Adaptation an Hitzeschock zuordnen zu können, wurden in weiteren Versuchen parallel Kontrollkulturen bei 42°C mitgeführt. Hierbei konnten einige Proteinsignale, die nach Hitzeschock verstärkt exprimiert wurden, und andere Proteinsignale, die nach Hitzeschock ein verringertes Transkriptlevel aufwiesen, identifiziert werden

4. SRNA₁₃₂ UND PUTATIVE ZIELGENE

4.1 IN SILCO-ANALYSEN VON SRNA₁₃₂ UND HVO_A0477-80

Wichtige Nukleotidsequenzen für den Interaktionsbereich oder die Struktur von sRNAs sind oftmals weniger von Mutationen betroffen. Konservierungen von Sequenz und Struktur einer sRNA können so einen wichtigen Hinweis auf ihre Funktionsweise geben.

4.1.1 Konservierung von sRNA₁₃₂ und den Genclustern HVO_A0477-80 und HVO_2375-8

Die Sequenzkonservierung der Gene von sRNA₁₃₂ und von beiden ABC-Transportsystemen wurde durch einen „Nucleotide BLAST“ mit der Datenbank NCBI (Johnson *et al.*, 2008) ermittelt (s. III.6.1). Für die sRNA und das Operon HVO_A477-80 wurden die durch cr-RT-PCR ermittelten Enden für die Suchanfrage verwendet. Im Laufe der Arbeit wurde das zweite ABC-Transportsystem für anorganisches Phosphat HVO_2375-8 als potentiell Ziel von sRNA₁₃₂ identifiziert. Für das Gencluster HVO_2375-8 wurde die in der Datenbank HaloLex annotierte Sequenz, die alle vier Gene umspannt, eingesetzt. Die Konservierungen wurden mit 112 Genomsequenzen („Draft Genomes“) der Ordnung Halobacteriales (taxid:2235) abgeglichen. Ausgewertet wurden ausschließlich hoch konservierte Sequenzen mit einer „Query Cover“ von mindestens 90% und einer Sequenzidentität von mindestens 75%.

sRNA₁₃₂ war in zwölf *Haloferax* Spezies mit einer Sequenzidentität von mehr als 90% hoch konserviert. Abbildung 21 zeigt die Konservierung der sRNA, grafisch dargestellt mit dem Programm SeaView 4.6.1 (Gouy *et al.*, 2010).

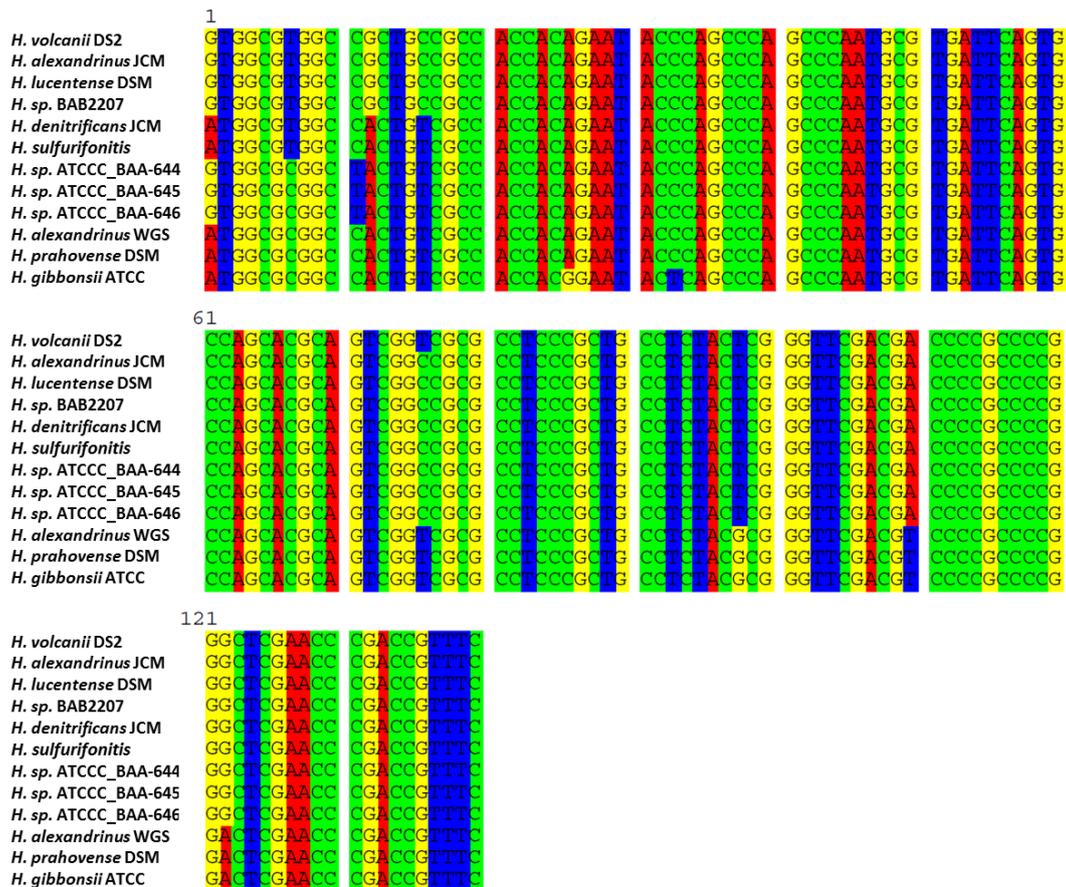


Abbildung 21: Konservierung der sRNA₁₃₂ ermittelt durch „Nucleotide BLAST“ mit dem Server NCBI. Die Darstellung erfolgte mit dem Programm SeaView. Die sRNA ist in zwölf *Haloferax* Spezies mit einer Sequenzidentität von mehr als 90% konserviert. Farblich markiert sind die vier Nukleotide: gelb: G; blau: T; grün: C; rot: A

In Tabelle 42 sind alle Arten, in denen das Gen der sRNA₁₃₂ und die Gencluster *HVO_A0477-80* und *HVO_2375-8* konserviert waren, gezeigt. Alle drei Gensequenzen zeigten ausschließlich in *Haloferax* Arten eine hohe Sequenzkonservierung. Die konservierten Arten waren für die drei analysierten Gensequenzen sehr ähnlich. In allen zwölf Arten in denen die Gensequenz der sRNA₁₃₂ konserviert war, war mindestens eines der beiden Gencluster ebenfalls konserviert. Das Gencluster *HVO_A0477-80* war in 16 und das Gencluster *HVO_2375-8* in 15 Arten der Gattung *Haloferax* konserviert. In den Arten *H. mediterranei*, *H. sp.* ATB1 und *H. mucosum* waren ausschließlich die ABC-Transporter, nicht jedoch sRNA₁₃₂ hoch konserviert. In *H. sulfurifontis* waren nur sRNA₁₃₂ und das ABC-Transportsystem *HVO_2375-8* konserviert. Die genetische Lokalisation von sRNA₁₃₂ war mit einer Sequenzidentität von mindestens 90% in acht Arten konserviert (s. Tabelle 42). Hierzu wurde die Sequenzkonservierung des Genbereichs des stromabwärts der sRNA gelegenen Gens

HVO_1405 bis zum Genende des stromaufwärtsgelegenen Gens *HVO_1406* analysiert.

Tabelle 42: Auflistung aller Arten, bei denen die Gensequenzen der sRNA₁₃₂ oder mindestens eines der Gencluster *HVO_A0477-80*, *HVO_2375-8* konserviert waren. Sequenzkonservierungen wurden mittels Nucleotide Blast der Datenbank NCBI identifiziert. War die Gensequenz in der Art konserviert wurde eine 1 und falls nicht eine 0 vergeben. Der Konservierungsgrad entspricht der Anzahl der in der entsprechenden Art konservierten Gensequenzen (1-3). *Sequenzkonservierung der genetischen Lokalisation der sRNA₁₃₂.

Art	sRNA ₁₃₂	<i>HVO_A0477-80</i>	<i>HVO_2375-8</i>	Konservierungsgrad
<i>*H. volcanii</i>	1	1	1	3
<i>*H. sp. BAB2207</i>	1	1	1	3
<i>H. gibbonsii</i>	1	1	1	3
<i>H. alexandrinus</i> WGS	1	1	1	3
<i>*H. lucentense</i>	1	1	1	3
<i>H. prahovense</i>	1	1	1	3
<i>*H. alexandrinus</i> JCM	1	1	1	3
<i>*H. denitrificans</i>	1	1	1	3
<i>*H. sp. ATCC_BAA-644</i>	1	1	1	3
<i>*H. sp. ATCC_BAA-645</i>	1	1	1	3
<i>*H. sp. ATCC_BAA-646</i>	1	1	1	3
<i>H. mediterranei</i>	0	1	1	2
<i>H. sp. ATB1</i>	0	1	1	2
<i>H. mucosum</i>	0	1	1	2
<i>H. sulfurifontis</i>	1	0	1	2
<i>H. larsenii</i>	0	1	0	1
<i>H. elongans</i>	0	1	0	1

4.1.2 Sequenz und vorhergesagte Faltung der sRNA₁₃₂

Die Strukturkonservierung wurde mit dem Programm LocARNA (Will *et al.*, 2012) der Universität Freiburg durchgeführt. Hierzu wurden die Nukleotidsequenzen der sRNA₁₃₂ aller zwölf konservierten Arten (vgl. IV.4.1.1) in das Programm LocARNA (Will *et al.*, 2012) eingegeben und die Strukturkonservierung ermittelt (s. III.6.2 und Abbildung 22). Hervorgehoben ist die putative Bindestelle am 3'-Ende der sRNA₁₃₂. Diese ist bis auf eine Basenfehlpaarung über 20 nt komplementär zur 3'-UTR des Operons *HVO_A0477-80*. Die Bindestelle befindet sich zum Großteil innerhalb des doppelsträngigen Bereichs einer Haarnadel-Struktur.

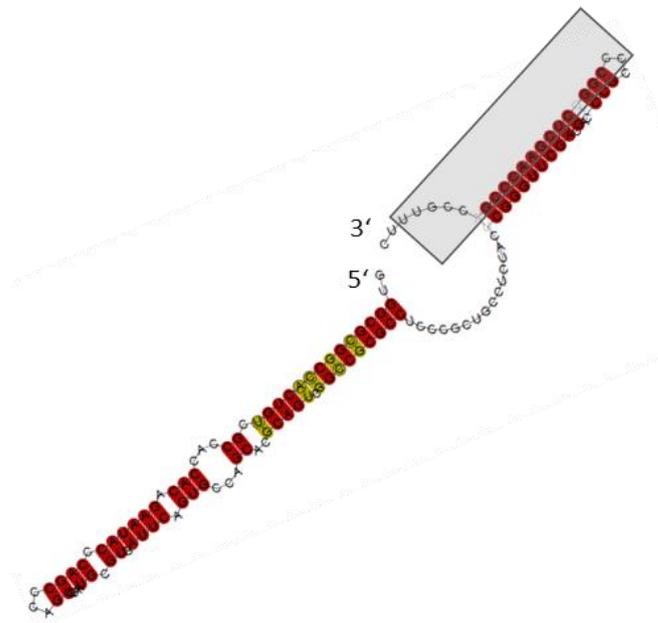


Abbildung 22: Konservierte Struktur der $sRNA_{132}$ ermittelt mit dem Programm LocARNA der Universität Freiburg. Die potentielle Binderegion der $sRNA$, komplementär zur 3'-UTR des Operons $HVO_A0477-80$, ist mit einem Rechteck hervorgehoben. Der Farbton steht für die Anzahl (C-G, G-C, A-U, U-A, G-U, U-G) unterschiedlicher Basenpaare und gibt den Grad der Sequenzkonservierung an (1-6: rot: 1; gelb: 2; grün: 3; hellblau: 4; blau: 5; lila: 6).

4.2 MECHANISMEN DER PHOSPHATABHÄNGIGEN REGULATION

Das Operon $HVO_A0477-80$ ist als ABC-Transporter mit dem putativen Substrat Phosphat annotiert. In einer vorherigen Arbeit konnte bereits die phosphatabhängige Expression des Operons $HVO_A0477-80$ und der $sRNA_{132}$ bei Phosphatkonzentrationen zwischen 0 und 1 mM gezeigt werden (Kliemt, 2014[Masterarbeit]).

4.2.1 Regulation von $sRNA_{132}$ und des ABC-Transporters $HVO_A0477-80$

In dieser Arbeit wurde die Phosphatabhängigkeit des Operons $HVO_A0477-80$ und der $sRNA_{132}$ überprüft. Die Phosphatabhängigkeit konnte bestätigt werden und für ein breiteres Spektrum an Phosphatkonzentrationen (0 bis 5 mM) gezeigt werden (s. Abbildung 23). Bei 0 mM Phosphat war die Expression des Operons am stärksten.

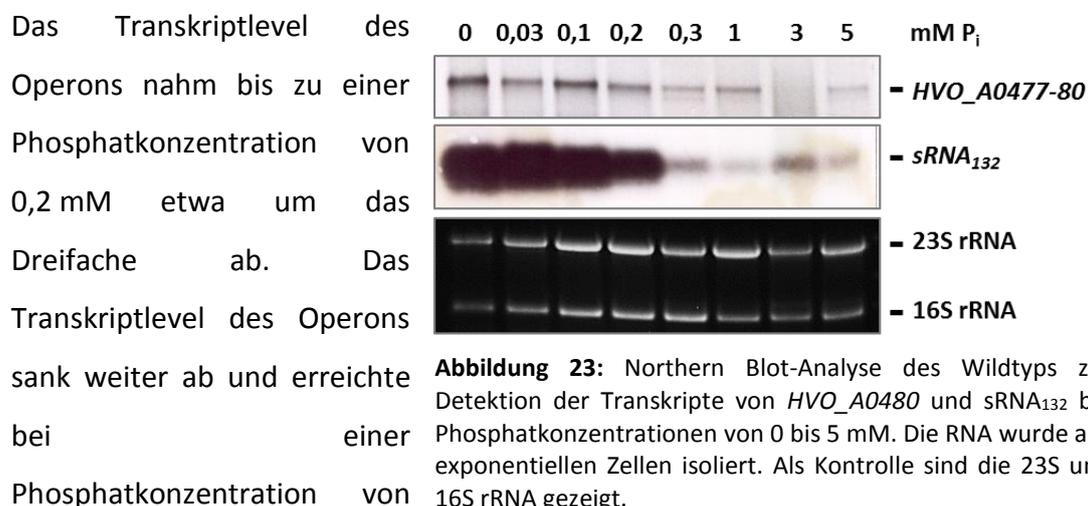


Abbildung 23: Northern Blot-Analyse des Wildtyps zur Detektion der Transkripte von HVO_A0480 und $sRNA_{132}$ bei Phosphatkonzentrationen von 0 bis 5 mM. Die RNA wurde aus exponentiellen Zellen isoliert. Als Kontrolle sind die 23S und 16S rRNA gezeigt.

5 mM mit einer Neunfach geringeren Expression im Vergleich zu 0 mM sein Minimum. Von 0,2 auf 0,3 mM Phosphat war ein starker Abfall des Transkriptlevels der *sRNA₁₃₂* um das Fünffache zu beobachten. Zwischen 0,3 und 5 mM konnte ein relativ konstantes Transkriptlevel beobachtet werden.

In einer weiteren Northern Blot-Analyse wurden die Transkriptlevel des Operons und der *sRNA₁₃₂* in Wildtyp und *sRNA*-Deletionsmutante bei Phosphatkonzentrationen zwischen 0 und 5 mM verglichen (s. Abbildung 24). In der *sRNA*-Deletionsmutante konnte zwischen 0 und 0,1 mM Phosphat kein Unterschied im Expressionlevel des Operons beobachtet werden. Das Signal befindet sich in diesem Bereich vermutlich bereits in der Sättigung. Zwischen 0 und 0,1 mM Phosphat war das Transkriptlevel

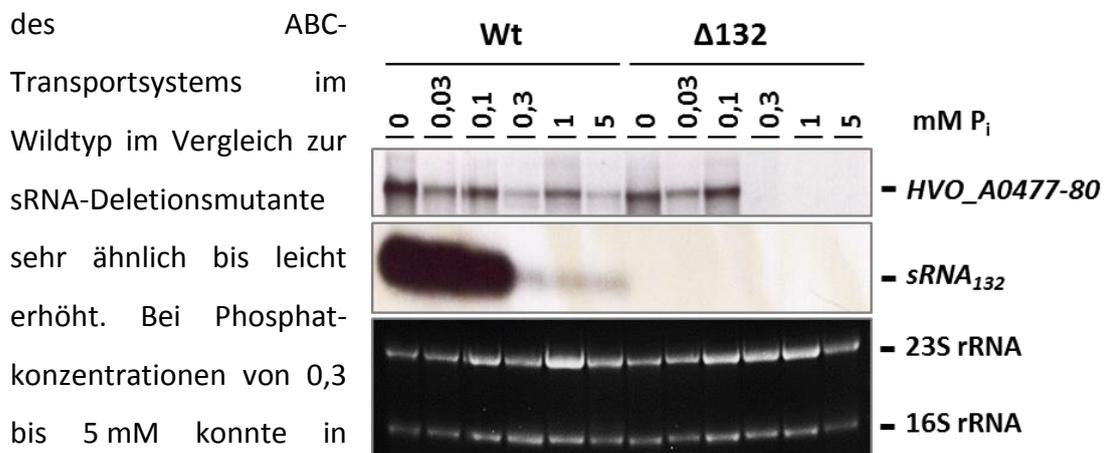


Abbildung 24: Northern Blot-Analyse von Wildtyp und Deletionsmutante der *sRNA₁₃₂* zum Vergleich der Transkriptlevel von *HVO_A0480* und *sRNA₁₃₂* bei Phosphatkonzentrationen von 0 bis 5 mM. Die RNA wurde aus exponentiellen Zellen isoliert. Als Kontrolle sind die 23S und 16S rRNA gezeigt.

4.2.2 Induktions-Kinetik nach Phosphatentzug

Bei einer Phosphatkonzentration von 0 mM ist das Transkript des Operons *HVO_A0477-80* und der *sRNA₁₃₂* im Wildtyp maximal exprimiert. In Abwesenheit der *sRNA* ist die Expression des Operons nur ein Drittel so stark. Um die Involvierung der *sRNA* an die Adaptation an phosphatlimitierende Bedingungen zu überprüfen, wurde den Zellen Phosphat entzogen.

Exponentielle Zellen von Wildtyp H26 und H26 Δ sRNA₁₃₂ kultiviert in synthetischem Medium mit 1 mM Phosphat wurden zweimal in Medium ohne Phosphatquelle gewaschen und anschließend in diesem Medium inkubiert. Zusätzlich wurde eine Kontrollkultur bei 1 mM Phosphat mitgeführt. Diese Kultur wurde in Medium versetzt mit 1 mM Phosphat gewaschen. Eine Induktion der Expression des Operons durch den Phosphatentzug in An- und Abwesenheit der sRNA wurde direkt nach 0, 5, 15, 60 und 180 min überprüft (s. Abbildung 25). In Anwesenheit der sRNA₁₃₂ wurde das Operon vor dem Phosphatentzug detektiert. Direkt nach dem Phosphatentzug konnte zunächst weder in der Kontrollkultur, noch in der Versuchskultur die Expression des Operons gemessen werden. Nach 5 min konnte eine Induktion der Expression des Operons in beiden Kulturen beobachtet werden. Ohne Phosphatquelle stieg das Transkriptlevel des Operons bis auf 180 min hin an. In der Kontrollkultur wurde das maximale Transkriptlevel bereits nach 15 min erreicht und sank danach wieder ab. Die Induktion des ABC-Transportsystems, trotz des Waschens

in Anwesenheit von Phosphat, ist auf eine kurzzeitige Unterversorgung mit Phosphat während der Zentrifugationsschritte zurückzuführen. Nach 180 min konnte bei einer längeren Belichtungszeit nur noch eine sehr geringe Transkriptmenge detektiert werden (Daten nicht gezeigt). In Abwesenheit der sRNA₁₃₂ erfolgte in der Kontrollkultur auch nach extrem langer

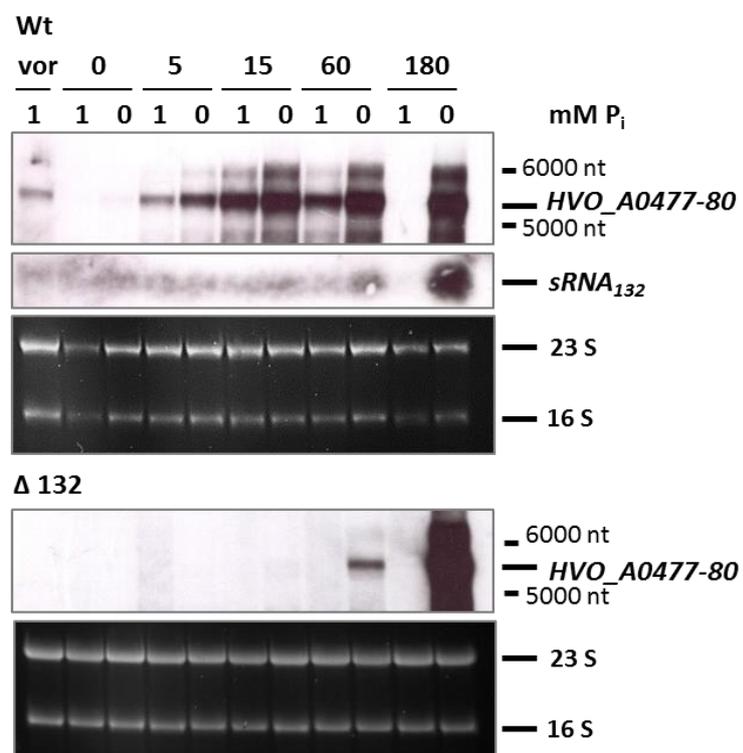


Abbildung 25: Northern Blot-Analyse zu verschiedenen Zeitpunkten nach Phosphatentzug. Gezeigt sind Proben vor dem Phosphatentzug (vor), Proben einer Kontrollkultur inkubiert bei 1 mM Phosphat (1) und Proben der Versuchskultur (0) nach 0, 5, 15, 60 und 180 min Phosphatentzug. Im Wildtyp (Wt) wurde eine zweifache Sonde gegen *HVO_A0480* und die *sRNA*₁₃₂ verwendet. In der sRNA-Deletionsmutante (Δ 132) eine Sonde gegen *HVO_A0480*. Als Ladekontrollen sind jeweils die 23S und 16S rRNA gezeigt.

Belichtungszeit keine Expression des Operons. In der Versuchskultur konnte nach Phosphatentzug zunächst keine Induktion des Operons beobachtet werden. Erst nach 60 min konnte ein Transkript des Operons beobachtet werden, dies stieg nach 180 min nochmals deutlich an.

Das Transkriptlevel der *sRNA₁₃₂* in der Kontrollkultur stieg direkt nach dem Waschvorgang kurzzeitig an. Sank dann jedoch leicht ab, bis es nach 180 min nahezu Null erreichte. Das Transkriptlevel der *sRNA* in der Versuchskultur blieb nach dem Phosphatentzug zunächst nahezu gleich. Nach 15 min wurde jedoch eine leichte Induktion der *sRNA* beobachtet, die nach 180 min in etwa auf das Fünffache verglichen mit dem Transkriptlevel vor dem Phosphatentzug anstieg (vgl. Abbildung 25).

Durch den direkten Vergleich der Kinetik des Phosphatentzugs von Wildtyp und *sRNA*-Deletionsmutante sollte der Zeitpunkt, zu dem der Unterschied im Transkriptlevel des Operons in beiden Kulturen maximal wurde, ermittelt werden (s. Abbildung 26). Der kurzzeitige Verlust des Transkriptes des ABC-Transportsystems ist auf den Wachvorgang zurückzuführen. In Abwesenheit der *sRNA₁₃₂* wurde eine schwache Induktion des Operons gemessen, die nach 180 min ihr Maximum erreichte und bis auf Wildtyp-Niveau anstieg. In Anwesenheit der *sRNA* hingegen wurde das Transkript des Operons *HVO_A0477-80* deutlich stärker induziert. Bereits direkt nach Phosphatentzug konnte eine leichte Induktion des Transkriptes des ABC-Transporters beobachtet werden. Nach fünf Minuten überstieg das Transkriptlevel des Operons bereits dessen Transkriptlevel vor der Induktion. Der Unterschied im Transkriptlevel des Operons zwischen Wildtyp und *sRNA*-Deletionsmutante wurde nach 30 min maximal (s. Abbildung 26 und A3 im Anhang).

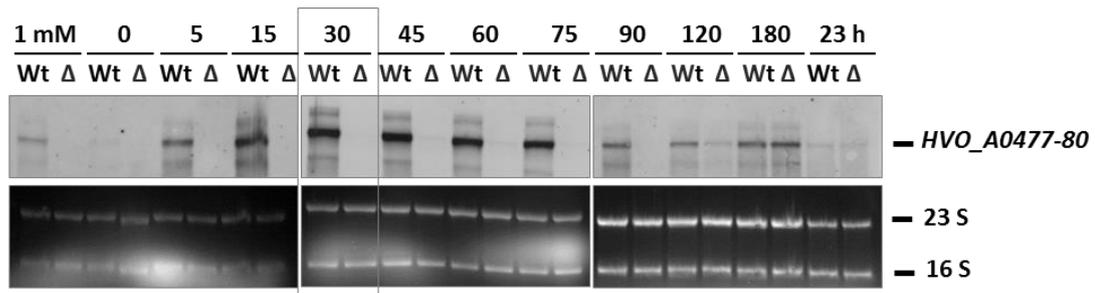


Abbildung 26: Induktionskinetik von *HVO_A0477-80* in Wildtyp (Wt) und Deletionsmutante der *sRNA₁₃₂* (Δ) nach Phosphatentzug. Gezeigt sind Proben vor dem Phosphatentzug (1 mM) und nach 0, 5, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 120 und 180 min und 23 Stunden Phosphatentzug. Als Ladekontrollen sind jeweils die 23S und 16S rRNA gezeigt. Rechteck: Zeitpunkt zu dem der Unterschied im Transkriptlevel in Wildtyp und Deletionsmutante maximal war.

4.2.3 Zellmorphologie unter Phosphatüberschuss

Vor dem Phosphatentzug und zu allen Zeitpunkten danach wurde eine mikroskopische Kontrolle der Proben durchgeführt. Sowohl die Zellen des Wildtyps, als auch die Zellen der Deletionsmutante der *sRNA₁₃₂* zeigten ein kokkales Erscheinungsbild (s. Abbildung A4 im Anhang). Nach Wachstum mit 5 mM Phosphat konnte in der exponentiellen Wachstumsphase eine Zellverlängerung der *sRNA*-Deletionsmutante im Gegensatz zum Wildtyp beobachtet werden (s. Abbildung 27).

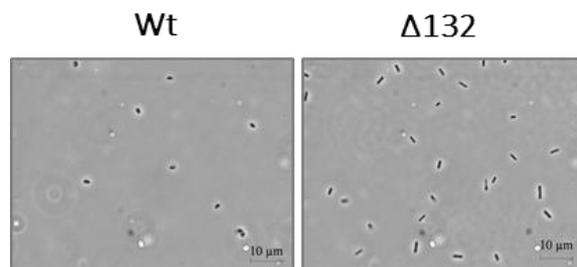


Abbildung 27: Lichtmikroskopie von Wildtyp (Wt) und Deletionsmutante der *sRNA₁₃₂* (Δ 132) in synthetischem Medium mit 5 mM Phosphat in der exponentiellen Wachstumsphase.

4.2.4 *In vivo*-Nachweis der Bindung von *sRNA₁₃₂* an die 3'-UTR von *HVO_A0477-80*

Zum Nachweis der Regulation von *sRNA₁₃₂* über die Bindung der 3'-UTR des Operons *HVO_A0477-80* wurden die Reportergenkonstrukte pJB21 und pJK03 verwendet (Babski[Dissertation], 2013; Kliemt[Masterthesis], 2014). Beide Reportergenkonstrukte sind Derivate des Plasmids pMB1-NcoI. Bei dem Konstrukt pJB21 ist die native 3'-UTR des Operons *HVO_A0477-80* stromabwärts der *dhfr* inseriert. Das Konstrukt pJK03 trägt ebenfalls die 3'-UTR, jedoch mit einer Deletion von 18 nt der *sRNA*-Bindestelle.

In dieser Arbeit sollte der *in vivo*-Nachweis der sRNA-Regulation über die direkte Bindung an die 3'-UTR des Operons *HVO_A0477-80* erfolgen. Zudem sollte diese Regulation durch Mutation der sRNA-Bindestelle wieder aufgehoben werden. Die vorhergehenden Reporter-genversuche wurden nach Wachstum in Medium mit 0,3 mM Phosphat durchgeführt (Kliemt[Masterthesis], 2014). Im Gegensatz dazu wurden die Reporter-genversuche in dieser Arbeit nach einem 30-minütigen Phosphatentzug durchgeführt. Diese Bedingungen wurden gewählt, da hierbei der Unterschied des Transkriptlevels des Operons in Wildtyp verglichen mit der Deletionsmutante maximal war. In der Northern Blot-Analyse wurden die Transkriptlevel der in den Enzymtest eingesetzten Proben bestimmt (s. Abbildung 28). Auf dem Kontrollplasmid pNP10 ist keine *dhfr* kodiert, dementsprechend wurde kein *dhfr*-Transkript detektiert. In Proben der Stämme transformiert mit dem Kontrollplasmid pMB1 wurde ein Transkript bei etwa 500 nt detektiert. Für das Reporter-genkonstrukt pJB21 wurde ein um die 3'-UTR verlängertes Transkript bei etwa 650 nt detektiert. Bei den in Mehrfachbestimmung durchgeführten Reporter-genassays konnte keine einheitliche Regulation gemessen werden (Daten nicht gezeigt). Es wäre eine verringerte Transkriptmenge der *dhfr* im Konstrukt pJB21 und somit eine Destabilisierung des *dhfr*-Transkriptes mit 3'-UTR zu erwarten gewesen. Auch die An- bzw. Abwesenheit der sRNA hatte keinen Einfluss auf die Stabilität des *dhfr*-Transkriptes mit 3'-UTR (Daten nicht gezeigt). Bei einem positiven regulatorischen Einfluss der sRNA₁₃₂ auf die 3'-UTR des Operons *HVO_A0477-80* wäre eine erhöhte Transkriptmenge der *dhfr* im Wildtypstamm mit dem Plasmid pJB21 im Vergleich zur Deletionsmutante zu erwarten gewesen. Desweiteren wurde die

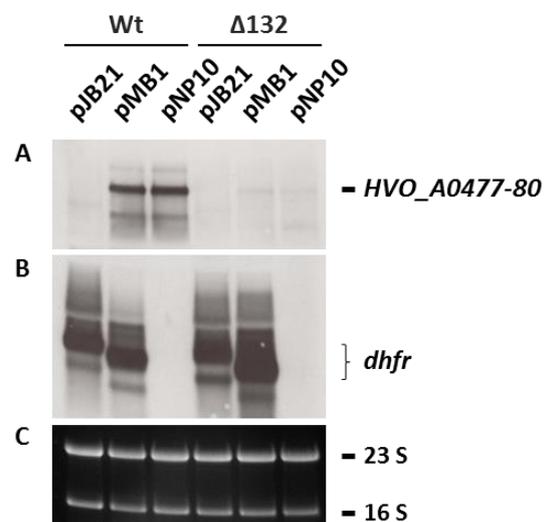


Abbildung 28: Northern Blot-Analyse der RNA-Proben für den Reporter-genassay entnommen nach 30-minütigem Phosphatentzug. Gezeigt sind Proben des Wildtyps (Wt) und der sRNA-Deletionsmutante ($\Delta 132$), jeweils transformiert mit dem Plasmid pJB21, pMB1 oder pNP10. **A.** Mit einer Sonde gegen das Gen *HVO_A0480* wurde das Transkript des Operons *HVO_A0477-80* detektiert. **B.** Sonde gegen das Transkript der *dhfr*. Die Größen entsprechen dem Transkript der *dhfr* mit (pJB21) und ohne 3'-UTR (pMB1). **C.** Ladekontrolle 16 und 23 S rRNA.

Enzymaktivität und Translationseffizienz der DHFR bestimmt und in den Stämmen transformiert mit den verschiedenen Plasmiden ohne 3'-UTR, mit artifizieller 3'-UTR und mit mutierter 3'-UTR verglichen. Mit 3'-UTR wurden in unabhängigen Experimenten in Abwesenheit der sRNA sowohl verringerte als auch erhöhte spezifische Enzymaktivitäten und auch Translationseffizienzen im Vergleich zum Wildtyp gemessen (Daten nicht gezeigt).

Das Transkript des Operons *HVO_A0477-80* wurde bei den beiden Kontrollkonstrukten pMB1 und pNP10 in An-, jedoch nicht in Abwesenheit der sRNA detektiert (s. Abbildung 28). Interessanterweise fehlte es in Anwesenheit der sRNA auch im Wildtyp-Stamm transformiert mit dem Reporter-genkonstrukt pJB21, welches die native 3'-UTR des Operons kodiert. In weiteren Versuchen mit dem Reporter-genkonstrukt pJK03, welches die 3'-UTR mit deletierter sRNA-Bindestelle kodiert, wurde wiederum das Transkript des Operons gemessen (s. Abbildung A5 im Anhang). Zudem wurde eine Sonde gegen die sRNA₁₃₂ verwendet. Hierbei konnte die sRNA in allen Wildtyp-Stämmen, außer dem Stamm, der die Plasmid-kodierte native 3'-UTR des Operons enthielt (pJB21), nachgewiesen werden.

Um diesen Effekt zu überprüfen und ein Problem mit dem verwendeten Wildtyp-Stamm auszuschließen, wurden die Konstrukte pJB21 und pMB1 erneut transformiert. RNA-Proben wurden vor der Transformation und nach der Transformation entnommen und in der Northern Blot-Analyse verglichen. Hierbei wurde sowohl im Stamm mit dem Reporter-genkonstrukt pJB21, welches die native 3'-UTR enthielt, als auch bei der Kontrolle pMB1 das Transkript des Operons detektiert (s. Abbildung A6 im Anhang). Im Gegensatz zum Reporter-genassay wurden die RNA-Proben nicht nach 30-minütigem Phosphatentzug, sondern nach Wachstum bei 1 mM Phosphat entnommen. Unter dieser Bedingung wurde der regulatorische Einfluss der sRNA zwar ebenfalls gezeigt, der Unterschied im Transkriptlevel des Operons in An- bzw. Abwesenheit der sRNA war jedoch geringer als nach dem 30-minütigen Phosphatentzug (s. IV.4.2.1 und IV.4.2.2).

4.3 IDENTIFIKATION DES PHOSPHO-REGULONS MITTELS DNA-MIKROARRAY

Zur Identifikation eines Phospho-Regulons in Abhängigkeit der sRNA₁₃₂ wurde das Transkriptom von Wildtyp und sRNA-Deletionsmutante nach 30-minütigem

Phosphatentzug mittels DNA-Mikroarray verglichen. Dieser Zeitpunkt wurde gewählt, da hierbei die Regulation des Operons *HVO_A0477-80* durch *sRNA₁₃₂* am stärksten war (vgl. 4.2.2). Der Mikroarray wurde in Vierfachbestimmung durchgeführt. Ausgewertet wurden Spots, die in mindestens zwei Mikroarrays differentiell reguliert waren. In das Cluster regulierter Gene wurden Spots aufgenommen, deren Transkriptlevel mindestens um den Faktor zwei erhöht bzw. erniedrigt waren. Tabelle 43 und 44 zeigen die Gencluster regulierter Spots. Spots, deren Gene in mehrere Funktionsklassen unterteilt werden konnten, wurden mehrfach aufgeführt und die entsprechenden Gene hervorgehoben. Insgesamt war das Transkriptlevel von 28 Spots um das 2- bis 4,3-Fache erhöht (s. Tabelle 43). Diesen Spots wurden eine Reihe regulatorischer Proteine, unter anderem vier Zinkfinger Proteine und ein Transkriptionsregulator der ArsR-Familie zugeordnet. Insgesamt war das Transkriptlevel von fünf *sRNA*-Genen erhöht: die intergenen *sRNAs* *sRNA₃₀₈*, *sRNA₄₄₈* und *sRNA_{p12}* und die *asRNAs* *asRNA₅₈* und *asRNA₁₁₂*. Zu den Stoffwechsellzymen mit erhöhtem Transkriptlevel gehörten eine Glycerol-3-Phosphat- und eine Glycerol-1-Phosphat-Dehydrogenase. Zudem waren die Transkriptlevel von sechs Spots mit Genen für ABC-Transporter, einige Transmembranproteine und ein S-Layer Glycoprotein erhöht.

In Tabelle 44 ist das Cluster aller Gene, deren Transkriptlevel in der *sRNA*-Deletionsmutante mindestens zweifach verringert waren, aufgeführt. Insgesamt zeigten 19 Spots in Abwesenheit der *sRNA* verringerte Transkriptlevel. In der Deletionsmutante erfolgte keine Expression des Transkriptes der *sRNA₁₃₂*, deren Transkriptlevel um den Faktor 20 verringert war und somit nahe der Hintergrund-Aktivität lag. Die Ergebnisse bestätigten zudem die stark verminderte Expression des Transkriptes des Operons *HVO_A0477-80*. Die entsprechenden drei Spots gehörten zu den am stärksten regulierten Spots und waren 2,5- bis mehr als 8-fach verringert. Desweiteren wurden verringerte Transkriptlevel von sechs Spots bestehend aus Genen, die für Transmembran- und Transportproteine kodieren, gemessen. Dazu gehörte das SBP eines ABC-Transporters mit dem putativen Substrat Glycerol-3-Phosphat. Zudem war das Transkriptlevel des zweiten ABC-Transportsystem *HVO_2375-8* von *H. volcanii* mit dem putativen Substrat Phosphat um den Faktor zwei verringert. Zu den beiden Transkriptionsregulatoren mit verringerter Transkriptmenge gehörten der

Transkriptionsfaktor *tfb12* und das homolog zum Transkriptionsregulator *phoU2*, welcher die Phosphataufnahme reguliert. Die putativen Gene kodierend für Proteine zur Regulation der Phosphataufnahme *phoU1* und *phoU2* waren nur teilweise und die Regulatoren *phoU3* und *phoU4* gar nicht auf den Mikroarray gedruckt. Zu den acht Spots involviert in den Zellmetabolismus, die in der sRNA-Deletionsmutante verringerte Transkriptlevel aufwiesen, gehörte eine Polyphosphatkinase und eine Glycerolphosphodiesterase.

Tabelle 43: Vergleich des Transkriptom von Wildtyp und Deletionsmutante der sRNA₁₃₂ nach 30-minütigem Phosphatentzug mittels DNA-Mikroarray. In der sRNA-Deletionsmutante mindestens um den Faktor zwei erhöhte Spots. Gezeigt sind die HVO-Nummern, die Genfunktionen und der Grad der Regulation. Die Arrays wurden in Vierfach Bestimmung durchgeführt.

HVO-Nr.	Genfunktion(en)	Regulation
Regulatoren		
<i>HVO_B0191-94</i>	2x kons. hyp. Prot./ Transkriptionsregulator der ArsR Familie (HTH-Motiv)/ LppX-Domäne Protein (Lipoprotein)	4,12
<i>HVO_1359</i>	kleines CPxCG-Zinkfinger Protein	2,77
<i>HVO_2704-06</i>	DUF1628 Domäne Protein (Transmembranprotein)/ kons. hyp. Prot./ Translationsinitiationsfaktor aIF-2B-δ Untereinheit	2,28
<i>HVO_2805_A</i>	kleines CPxCG-Zinkfinger Protein	2,18
<i>HVO_A0260-61</i>	ISH5 Transposase ISHvo11/ ISH14 Transposase HfIRS9 (nicht funktionell)/ HTH-Domäne Protein	2,18
<i>HVO_2901</i>	kleines CPxCG-Zinkfinger Protein	2,16
<i>HVO_0416</i>	kleines CPxCG-Zinkfinger Protein	2,14
<i>HVO_2034-35</i>	ABC-Transportsystem (putatives Substrat Zucker): Permease (<i>tsgC12</i>)/ Transkriptionsregulator der TrmB-Familie (maltosespezifischer Repressor))	2,09
<i>HVO_2970-74</i>	Transkriptionsregulator der TrmB-Familie (maltosespezifischer Repressor)) / 3x kons. hyp. Prot./ Cupin2-Superfamilie Fass-Domäne Protein	2,02
sRNAs		
<i>HVO_1355s</i>	sRNA₃₀₈	3,66
<i>asHVO_A0008</i>	sRNA₅₈ (Antisense zu IS1341-type transposase ISHvo19)	2,37
<i>HVO_1726s</i>	sRNA₄₄₈	2,17
<i>asHVO_A0251</i>	asRNA₁₁₂ (Antisense zu HTH Domäne Protein)	2,04
<i>HVO_2806s</i>	sRNA_{p12}	2,01
Stoffwechsel		
<i>HVO_A0470-71</i>	Glyoxalase-Domäne Protein/ Protein mit α/β Hydrolasefaltung	2,55
<i>HVO_B0205-06</i>	Laccase (Oxidoreduktase) (<i>lccA</i>)/ kons. hyp. Prot.	2,48
<i>HVO_A0269</i>	Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase (Untereinheit A) (<i>glpA2</i>)	2,16
<i>HVO_0822-23</i>	Glycerol-1-Phosphat-Dehydrogenase (NAD(P+)) (<i>glpA</i>)/ Protein der DUF420-Familie (Transmembranprotein)	2,06

HVO-Nr.	Genfunktion(en)	Regulation
Zellmembran/ Transport		
HVO_2704-06	DUF1628-Domäne Protein (Transmembranprotein)/ kons. hyp. Prot./ Translationsinitiationsfaktor aIF-2B- δ Untereinheit	2,28
HVO_2072	S-Layer Glycoprotein (csg)	2,17
HVO_2125-26	ABC-Transportsystem (putatives Substrat Dipeptid/Oloopeptid): Permease (dppB4)/ SBP (dppA4)	2,13
HVO_2034-35	ABC-Transportsystem (putatives Substrat Zucker): Permease (tsuC12)/ Transkriptionsregulator der TrmB-Familie (maltosespezifischer Repressor))	2,09
HVO_0822-23	Glycerol-1-Phosphat-Dehydrogenase (NAD(P+)) (<i>gldA</i>)/ Protein der DUF420-Familie (Transmembranprotein)	2,06
HVO_2970-74	Transkriptionsregulator der TrmB-Familie (maltosespezifischer Repressor))/ 3x kons. hyp. Prot./ Cupin2-Superfamilie Fass-Domäne Protein	2,02
Sonstiges		
HVO_1026_R	7S RNA Signalerkennungspartikel	4,25
nicht gefunden	436-D01	2,55
HVO_1431-33	Homolog zu strukturellem Virus-Protein HRPV1-VP4/ -VP3/ Homolog zu pHK2-ORF2	2,26
nicht gefunden	436-B04	2,18
HVO_A0260-61	ISH5 Transposase ISHvo11/ ISH14 Transposase HfIRS9 (nicht funktionell)/ HTH-Domäne Protein	2,18
nicht gefunden	457-A05	2,13
nicht gefunden	448-E09	2,09
HVO_1730	23S rRNA	2,05
nicht gefunden	446-B09	2,00

Tabelle 44: Vergleich des Transkriptom von Wildtyp und Deletionsmutante der sRNA₁₃₂ nach 30-minütigem Phosphatentzug mittels DNA-Mikroarray. In der sRNA-Deletionsmutante mindestens um den Faktor zwei erniedrigte Spots. Gezeigt sind die HVO-Nummern, die Genfunktionen und der Grad der Regulation. Die Arrays wurden in Vierfachbestimmung durchgeführt.

HVO-Nr.	Genfunktion(en)	Regulation
Regulatoren		
HVO_A0098/ HVO_A0100	Translationsinitiationsfaktor TFB (tfb12)/ ISHwa16 Transposase ISHvo16	0,43
HVO_2374-75	Homolog zu Transkriptionsregulator zur Phosphataufnahme (phoU2)/ ABC- Transporter: SBP (pstS1)	0,50
sRNAs		
HVO_1405s	sRNA₁₃₂	0,05
Zellmembran/ Transport		
HVO_A0476-77	kons. hyp. Prot./ ABC-Transporter (putatives Substrat Phosphat): SBP (pstS2)	0,12
HVO_A0477-78	ABC-Transporter (putatives Substrat Phosphat): SBP (pstS2)/ Permease (pstC2)	0,29
HVO_1989-91	tRNA (Pseudouridine(54)-N(1))-Methyltransferase (<i>trmY</i>) / tRNA-Pro/ ABC-Transporter: SBP	0,39
HVO_A0479-80	ABC-Transporter (putatives Substrat Phosphat): Permease (pstA2)/ ATP-Bindeprotein (pstB2)	0,42

HVO-Nr.	Genfunktion(en)	Regulation
HVO_B0291-92	Glycerolphosphodiesterase (<i>glpQ2</i> , <i>ugpQ2</i>)/ ABC-Transporter (putatives Substrat Glycerol-3-Phosphat): SBP (<i>ugpB</i>)	0,44
HVO_B0377-79	Protein der FemAB-Familie (Peptidoglycan Biosynthese - Transfer von Aminoacyl-Gruppen)/ putative Oxidoreduktase der PPOX-Familie/ Transportprotein der SSSF Familie (Transmembran Transport)	0,46
HVO_0899-901	ABC-Transporter (putatives Substrat verzweigt-kettige Aminosäuren): SBP (<i>livJ1</i>)/ Permease (<i>livH1</i>)/ Permease (<i>livM1</i>)	0,47
HVO_B0219-22	ABC-Transporter (putatives Substrat verzweigt-kettige Aminosäuren): Permease (<i>livM6</i>)/ ATP-Bindeprotein (<i>livG6</i>)/ ATP-Bindeprotein (<i>livF6</i>)/ Proteinkinase-Domäne Protein	0,48
HVO_2374-75	Homolog zu Transkriptionsregulator zur Phosphataufnahme (<i>phoU2</i>)/ ABC-Transporter: SBP (<i>pstS1</i>)	0,50
Stoffwechsel		
HVO_1989-91	tRNA (Pseudouridine(54)-N(1))-Methyltransferase (<i>trmY</i>) / tRNA-Pro/ ABC-Transporter: SBP	0,39
HVO_1650	Polyphosphatkinase (<i>ppk1</i>)	0,44
HVO_B0291-92	Glycerolphosphodiesterase (<i>glpQ2</i>, <i>ugpQ2</i>)/ ABC-Transporter (putatives Substrat Glycerol-3-Phosphat): SBP (<i>ugpB</i>)	0,44
HVO_0209-11	Glutaryl-CoA-Dehydrogenase (<i>acd1</i>) /kons. hyp. Prot./ Ferredoxin (3Fe-4S)(4Fe-4S), Zink-bindend (<i>ferB1</i>)	0,45
HVO_0452-54	Leucin-tRNA Ligase (<i>leuS</i>) / kons. hyp. Prot./ Alanin-Dehydrogenase (alanine <-> pyruvate) (<i>ala</i>)	0,45
HVO_B0377-79	Protein der FemAB-Familie (Peptidoglycan Biosynthese - Transfer von Aminoacyl-Gruppen)/ putative Oxidoreduktase der PPOX-Familie/ Transportprotein der SSSF Familie (Transmembran Transport)	0,46
HVO_2948	Phenylalanin-tRNA Ligase α-Untereinheit (<i>pheS</i>)	0,47
HVO_B0219-22	ABC-Transporter (putatives Substrat verzweigt-kettige Aminosäuren): Permease (<i>livM6</i>)/ ATP-Bindeprotein (<i>livG6</i>)/ ATP-Bindeprotein (<i>livF6</i>)/ Proteinkinase-Domäne Protein	0,48
Sonstiges		
nicht gefunden	449-C03	0,13
nicht gefunden	446-A02	0,43
nicht gefunden	446-A03	0,43
HVO_0209-11	Glutaryl-CoA-Dehydrogenase (<i>acd1</i>) /kons. hyp. Prot./ Ferredoxin (3Fe-4S)(4Fe-4S), Zink-bindend (<i>ferB1</i>)	0,45
HVO_B0173	Smc-ähnliches Protein Sph4 (<i>sph4</i>) (ATPase involviert in Chromosomenorganisation und -dynamik)	0,46
HVO_A0098/ HVO_A0100	Translationsinitiationsfaktor TFB (<i>tfb12</i>)/ ISHwa16 Transposase ISHvo16	0,43

4.4 CHARAKTERISIERUNG DES PHOSPHO-REGULONS

Phosphat ist als Bestandteil vieler organischer Verbindungen wie DNA, RNA, Membranlipiden und als universelle Energiewährung ATP essentiell für jede lebende Zelle. In natürlichen Habitaten ist das Vorkommen anorganischer Phosphate zumeist limitierend. Die Aufnahme von organischen und anorganischen Phosphaten durch geeignete Transportsysteme ist somit essentiell für alle Organismen.

4.4.1 Weitere putativ phosphatabhängige ABC-Transporter von *Haloferax volcanii*

In *H. volcanii* sind insgesamt sieben Transportproteine bzw. ABC-Transportsysteme annotiert, deren putative Substrate Phosphat, Phosphonat oder Glycerinaldehyd-3-Phosphat sind. Zudem gibt es das Transportprotein *HVO_B0172* für Phosphat, welches jedoch nicht funktionell ist (s. Tabelle 45).

Tabelle 45: Transportproteine und Transportsysteme für die putativen Substrate Phosphat, Phosphonat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat annotiert in *H. volcanii*.

HVO-Nr.	Genfunktion
<i>HVO_0248</i>	Transportprotein (Phosphat/Sulfat)
<i>HVO_0445-7</i>	ABC-Transportsystem (Phosphat/Phosphonat)
<i>HVO_2375-8</i>	ABC-Transportsystem (Phosphat)
<i>HVO_2996</i>	Transportprotein (Phosphat/Sulfat)
<i>HVO_A0460-1</i>	ABC-Transportsystem (Phosphat/Phosphonat)
<i>HVO_A0477-80</i>	ABC-Transportsystem (Phosphat)
<i>HVO_B0172</i>	Transportprotein (Phosphat/Sulfat) (nicht funktionell)
<i>HVO_B0292-5</i>	ABC-Transportsystem (Glycerinaldehyd-3-Phosphat)

Die beiden Transportproteine *HVO_0248* und *HVO_2996* sind annotiert für die Substrate Phosphat bzw. Sulfat und vermutlich Symporter. Die ABC-Transportsysteme *HVO_0455-7* und *HVO_A0460-1* sind annotiert für die Substrate Phosphat bzw. Phosphonat und keine kompletten ABC-Transporter, da sie nicht aus vier Proteinen bestehen. Bei *HVO_0455-7* fehlt eine der TMDs und *HVO_A0460-1* besteht ausschließlich aus beiden TMDs. Als putatives Substrat beider ABC-Transportsysteme *HVO_2375-8* und *HVO_A0477-80* ist anorganisches Phosphat annotiert. Als einziges Transportsystem für die Aufnahme von organischem Phosphat ist das ABC-Transportsystem *HVO_B0292-5* mit dem putativen Substrat Glycerinaldehyd-3-Phosphat annotiert. Alle drei ABC-Transportsysteme sind vollständig (ein SBP, zwei TMDs und eine ATP-Bindedomäne) und besitzen Homologe zu ABC-Transportsystemen OE4479-85, OE1675-9 und OE5166-70 von *H. salinarum* (s. Abbildung 29).

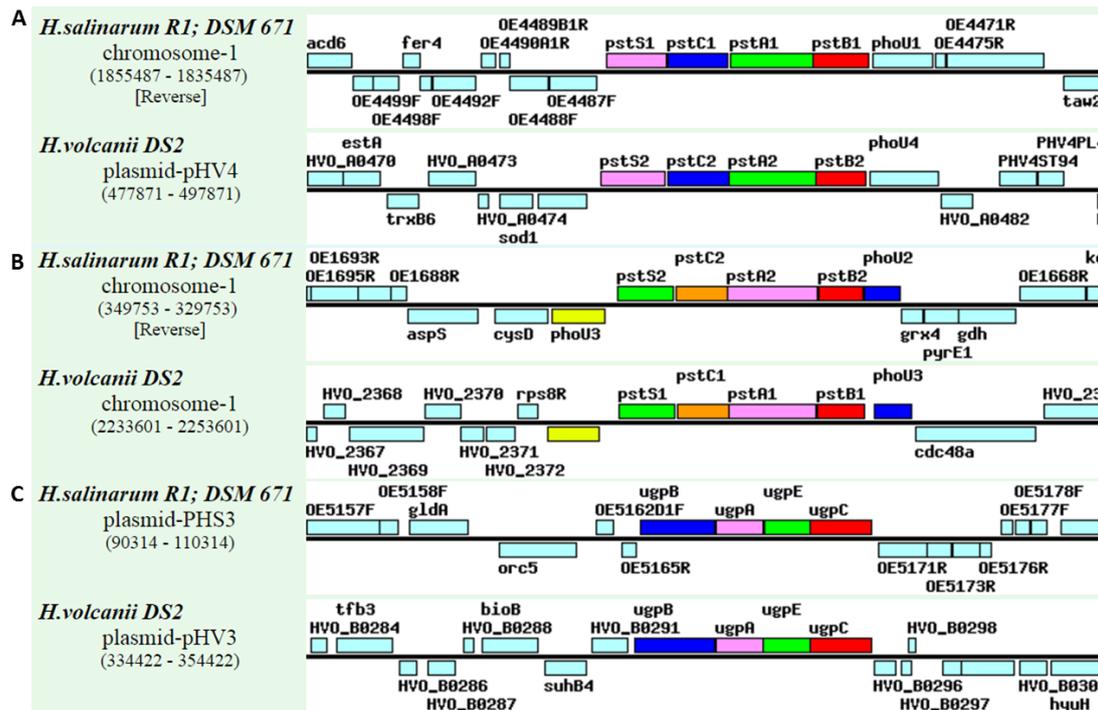


Abbildung 29: Orthologe und homologe Proteincluster der drei ABC-Transportsysteme für Phosphat von *H. salinarum* R1 DSM 671 und *H. volcanii* DS2 erstellt mittels Microbial Genome Database (MGDB). Gezeigt sind jeweils die Proteincluster von *H. salinarum* homolog zu dem ABC-Transportern *HVO_A0477-80* (*OE4479-85*) (A), *HVO_2375-8* (*OE1675-9*) (B) und *HVO_B0292-5* (*OE5166-70*) (C) von *H. volcanii*.

4.4.2 Deletion beider ABC-Transportsysteme

Für eine nähere Charakterisierung der beiden ABC-Transporter *HVO_A0477-80* und *HVO_2375-8* für anorganisches Phosphat wurde jeweils nahezu der komplette Genombereich im Elternstamm H26 deletiert.

4.4.3 Regulation beider ABC-Transportsysteme

Zum Vergleich der Expression des ABC-Transportsystems *HVO_2375-8* mit dem ABC-Transportsystem *HVO_A0477-80* wurde die RNA verschiedener Stämme im Northern Blot analysiert (vgl. Abbildung 30). Für das ABC-Transportsystem *HVO_2375-8* wurde eine Sonde gegen das Gen *HVO_2375*, kodierend für das SBP des ABC-Transporters *Pst1*, verwendet. Die Größe des detektierten Signals entspricht dem Einzeltranskript des Gens *HVO_2375* mit einer Größe von 1035 bp. Das Transkript des vollständigen ABC-Transportsystems *HVO_2375-8* (*pst1*) hat eine Gesamtlänge von etwa 4591 nt. In der RNA-Probe isoliert aus exponentiellen Zellen und kultiviert in synthetischem Medium war die Transkriptmenge stark erhöht. Deshalb konnten nur in dieser Probe, zusätzlich zu dem Haupttranskript, weitere Signale gemessen werden (s. Abbildung

A7 im Anhang). Neben dem Haupttranskript, das der Größe des Gens *HVO_2375* entspricht, wurden kleinere, vermutlich prozessierte Transkripte detektiert. In dieser RNA-Probe wurden zudem mehrere größere, vermutlich polycistronische, Transkripte identifiziert. Unter anderem konnte ein schwach exprimiertes Transkript mit der Größe des Volllängen-Transkriptes detektiert werden. Das Transkriptlevel des Gens *HVO_2375* lag bei exponentiellen Zellen kultiviert in synthetischem Medium mit 1 mM Phosphat in etwa um das 1,4-Fache höher als bei exponentiellen Zellen kultiviert in Komplexmedium und nahm in der stationären Phase um mehr als das Fünffache ab. Im Vergleich dazu wurde eine sehr geringe Expression des Transkriptes des ABC-Transportsystems *HVO_A0477-80* in Komplexmedium gemessen. In synthetischem Medium war die Expression des Transkriptes des Operons *HVO_A0477-80* ebenfalls in der stationären Phase verringert und in der exponentiellen Phase um den Faktor 2,5 erhöht.

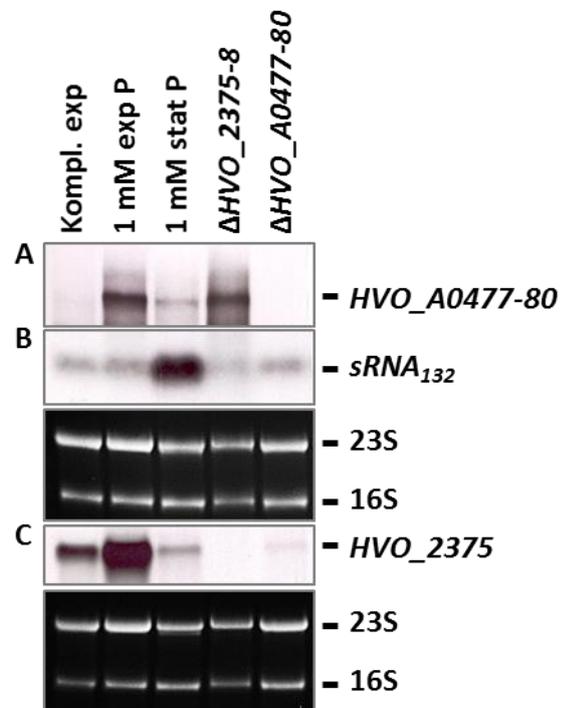


Abbildung 30: Northern Blot-Analyse zum Vergleich der Transkriptlevel von *HVO_A0477-80* (A), *sRNA₁₃₂* (B) und *HVO_2375* (C). Gezeigt ist die Expression der verschiedenen Transkripte in Komplexmedium (exponentielle Wachstumsphase) und in synthetischem Medium mit 1 mM Phosphat (exponentielle und stationäre Wachstumsphase). Zudem wurden die Transkriptlevel der ABC-Transporter in den jeweiligen Deletionsmutanten der ABC-Transportsysteme *H26ΔHVO_2375-8* bzw. *H26ΔHVO_A0477-80* (exponentielle Wachstumsphase, Komplexmedium) überprüft. Als Ladekontrollen sind jeweils die 23S und 16S rRNA gezeigt.

Um einen Einfluss der Deletion der ABC-Transportsysteme *HVO_A0477-80* bzw. *HVO_2375-8* auf die Transkription des jeweils anderen ABC-Transporters zu untersuchen, wurden die Transkriptlevel in der exponentiellen Wachstumsphase in synthetischem Medium mit 1 mM Phosphat in beiden Deletionsmutanten untersucht (s. Abbildung 30). Während das Transkript von *HVO_A0477-80* bei der Deletionsmutante *H26ΔHVO_2375-8* verglichen mit dem Wildtyp eine recht ähnliche

Expression aufwies, war das Transkript von *HVO_2375* bei der Deletionsmutante *H26ΔHVO_A0477-80* um das 70-Fache reduziert.

Unter allen Wachstumsbedingungen konnte das Transkript der *sRNA₁₃₂* detektiert werden (s. Abbildung 30). Das Transkriptlevel von *sRNA₁₃₂* war bei exponentiellen Kulturen in synthetischem Medium knapp doppelt so hoch wie in Komplexmedium. In der stationären Wachstumsphase war das Transkriptlevel der *sRNA₁₃₂* in etwa um das 2,5-Fache erhöht. Bei den Deletionsmutanten des ABC-Transportsystems *HVO_2375-8* und *HVO_A0477-80* lag das Transkriptlevel der *sRNA₁₃₂* auf Wildtyp-Niveau.

Um den Einfluss niedriger Phosphatkonzentrationen auf die Expression des SBPs *HVO_2375* zu untersuchen, wurde eine Northern Blot-Analyse von exponentiellen Kulturen nach Wachstum bei Phosphatkonzentrationen von 0, 0,03, 0,1, 0,2 und 0,3 mM durchgeführt (s. Abbildung 31). Es wurde eine Sonde gegen das Gen *HVO_2375* verwendet. Zudem sollte überprüft werden, ob *sRNA₁₃₂* ebenfalls einen regulatorischen Einfluss auf das Transkript von *HVO_2375* des zweiten phosphatabhängigen ABC-Transportsystems *HVO_2375-8* ausübt. Hierzu wurde das Transkriptlevel von *HVO_2375* bei allen Phosphatkonzentrationen zusätzlich in der *sRNA*-Deletionsmutante analysiert. Die Expression des SBP *HVO_2375* war im Wildtyp bei 0,03 mM Phosphat am höchsten und nahm mit zunehmender Phosphatkonzentration bis auf 0,3 mM Phosphat um den Faktor drei ab. Bei Wachstum mit 0 mM Phosphat wurde ein ähnliches Transkriptlevel wie bei 0,3 mM

Phosphat detektiert. Zur Verifikation sollte eine Wiederholung dieses Versuchs erfolgen. Das Transkriptlevel von *HVO_2375* in der *sRNA*-Deletionsmutante hatte bei einer Phosphatkonzentration von 0 mM sein Maximum und sank bei einer Phosphatkonzentration von

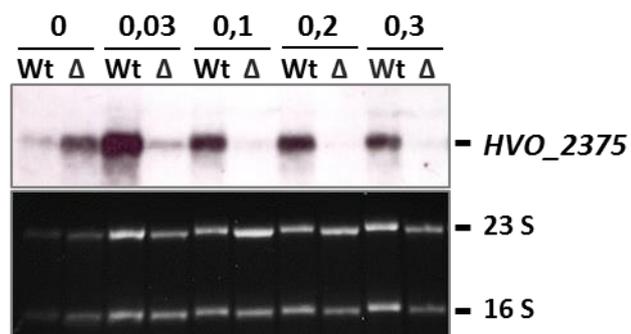


Abbildung 31: Northern Blot-Analyse des Transkriptlevels von *HVO_2375* von Wildtyp (Wt) und Deletionsmutante der *sRNA₁₃₂* (Δ) bei verschiedenen Phosphatkonzentrationen (0, 0,03, 0,1, 0,2 und 0,3 mM). RNA-Proben wurden aus exponentiellen Zellen isoliert. Als Ladekontrollen sind jeweils die 23S und 16S rRNA gezeigt.

0,03 mM bereits auf ein Drittel dieses Wertes ab. Mit steigender Phosphatkonzentration sank das Transkriptlevel nahezu auf Null.

4.4.4 Konkurrierendes Wachstum

Um die Bedeutung der beiden phosphatabhängigen ABC-Transportsysteme *HVO_A0477-80* und *HVO_2375-8* auf das Wachstum unter phosphatlimitierenden Bedingungen zu analysieren, wurde in konkurrierenden Wachstumsversuchen jeweils eine der beiden Deletionsmutanten im direkten Vergleich mit einem weißen Wildtyp (*H26ΔHVO_2528*) überprüft (s. Abbildung 32). Zunächst wurde die Deletionsmutante *H26ΔHVO_A0477-80* mit dem weißen Wildtyp vermischt. Danach

erfolgte der Phosphatentzug. Da das ABC-Transportsystem *HVO_A0477-80* homolog zu dem nieder-affinen ABC-Transporter OE4479-85 in *H. salinarum* ist, war dessen wichtige Rolle für die Aufnahme von Phosphat bei niedrigen Phosphatkonzentrationen zu

erwarten. Nach Phosphatentzug erfolgte eine stufenweise Erhöhung der Phosphatkonzentration um

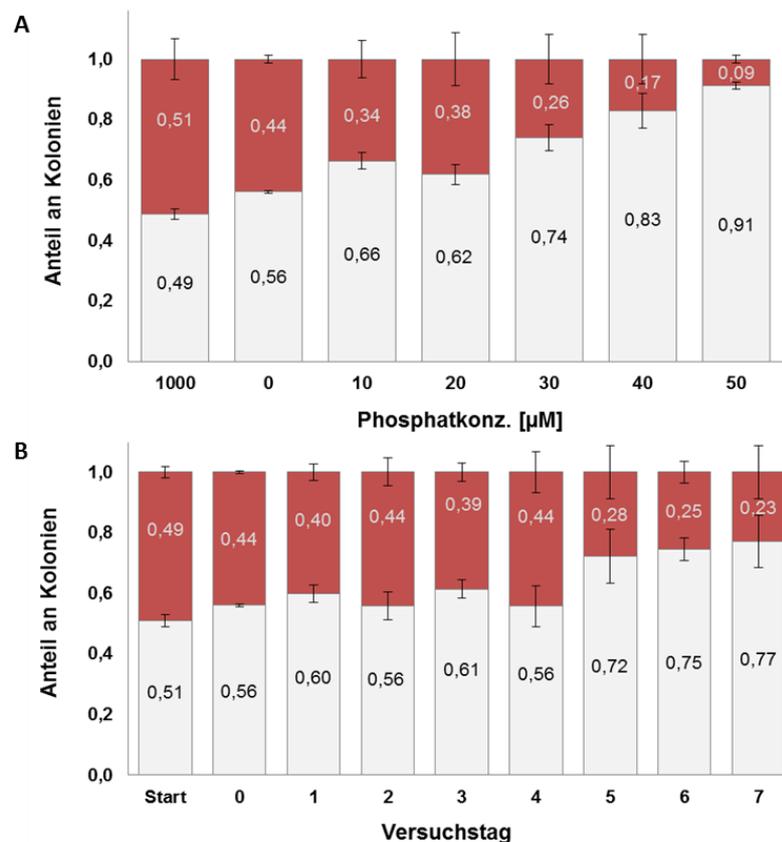


Abbildung 32: Anteil an roten und weißen Kolonien nach direkter Konkurrenz des weißen Wildtyps *H26ΔHVO_2528* und einer roten Deletionsmutante in Dreifachbestimmung. **A.** Vergleich des weißen Wildtyps (grau) mit der Deletion des ABC-Transportsystems *H26ΔHVO_A0477-80* (rot). Nach Phosphatentzug erfolgte an jedem Versuchstag eine stufenweise Erhöhung der Phosphatkonzentration von 10 auf 50 µM. **B.** Vergleich des weißen Wildtyps (grau) mit der Deletion des ABC-Transportsystems *H26ΔHVO_2375-8* (rot). Nach Phosphatentzug erfolgte an jedem Versuchstag (0-7) die Zugabe von 10 µM Phosphat. Start: Kolonienzahl nach Wachstum in synthetischem Medium mit 1 mM Phosphat; 0: Kolonienzahl nach Phosphatentzug.

jeweils 10 μM pro Versuchstag. Nach sechs Versuchstagen und einer Phosphatkonzentration von 50 μM machte die Anzahl an roten Kolonien, die der Deletionsmutante des ABC-Transporters *HVO_A0477-80* entsprachen, nur noch 10% der gesamten Kolonienzahl aus (s. Abbildung 32.A). In direkter Konkurrenz setzten sich demnach die Wildtyp-Zellen mit beiden intakten ABC-Transportern *HVO_A0477-80* und *HVO_2375-8* durch. Auch bei einer stufenweisen Erhöhung der Phosphatkonzentration, hatte die Deletionsmutante trotz der Anwesenheit des intakten ABC-Transportsystems *HVO_2375-8*, welches homolog zu dem ebenfalls niederaffinen ABC-Transporter OE4479-85 in *H. salinarum* ist, einen Wachstumsnachteil gegenüber dem Wildtyp mit beiden intakten ABC-Transportsystemen zur Aufnahme von Phosphat.

Um den Effekt der Deletion des ABC-Transportsystems *HVO_2375-8* auf das Wachstum bei niedrigen Phosphatkonzentrationen zu untersuchen, wurde ein zweiter konkurrierender Wachstumsversuch in Dreifachbestimmung durchgeführt. Hierbei wurde ebenfalls der weiße Wildtyp H26 Δ *HVO_2528* mit der roten Deletionsmutante H26 Δ *HVO_2375-8* gemischt und den Zellen Phosphat entzogen. Anschließend erfolgte an jedem Versuchstag eine Phosphatzugabe von 10 μM . Sieben Versuchstage nach dem Phosphatentzug führte das Fehlen des ABC-Transportsystems *HVO_2375-8* zu einer Reduktion der Kolonienzahl auf 20% der gesamten Kolonienzahl (s. Abbildung 32.B). Dies zeigt, dass beide ABC-Transportsysteme wichtig für die Phosphataufnahme unter phosphat-limitierenden Bedingungen sind. Keiner der beiden Transporter kann die Funktion des anderen ausgleichen. Eine Doppeldeletion beider ABC-Transportsysteme war zudem nicht möglich (Hammelman, unveröffentlichte Daten).

In *H. salinarum* konnte mittels Reporteranalysen die Bedeutung von *cis*-aktiven Elementen, sogenannten P-Boxen, für die phosphatabhängige Regulation beider ABC-Transportsysteme, homolog zu den ABC-Transportern *HVO_A0477-80* und *HVO_2375-8*, gezeigt werden. Diese P-Boxen bestehen aus AT-Reichen Sequenzen und sind stromaufwärts beider Gencluster lokalisiert (Furtwängler *et al.*, 2010).

Die stromaufwärts gelegenen Bereiche der sRNA und beider ABC-Transportsysteme wurden auf die Konservierung von Promotorelementen und solcher sogenannter Pho-Boxen mittels „Nucleotide BLAST“ der Datenbank NCBI hin untersucht. Die grafische Darstellung erfolgte mit dem Programm SeaView 4.6.1. Bei allen zwölf Arten in denen die sRNA konserviert ist, konnten Promotorelemente ohne Sequenzabweichungen zwischen den verschiedenen Arten identifiziert werden. Im Promotorbereich der sRNA₁₃₂ befindet sich die -10 Region (CA), eine TATA-Box (TTAT) bei -25 bis -22, das BRE bei -32 bis -31 und eine putative Pho-Box (TATATA) bei -70 bis -65 (s. Abbildung 33).

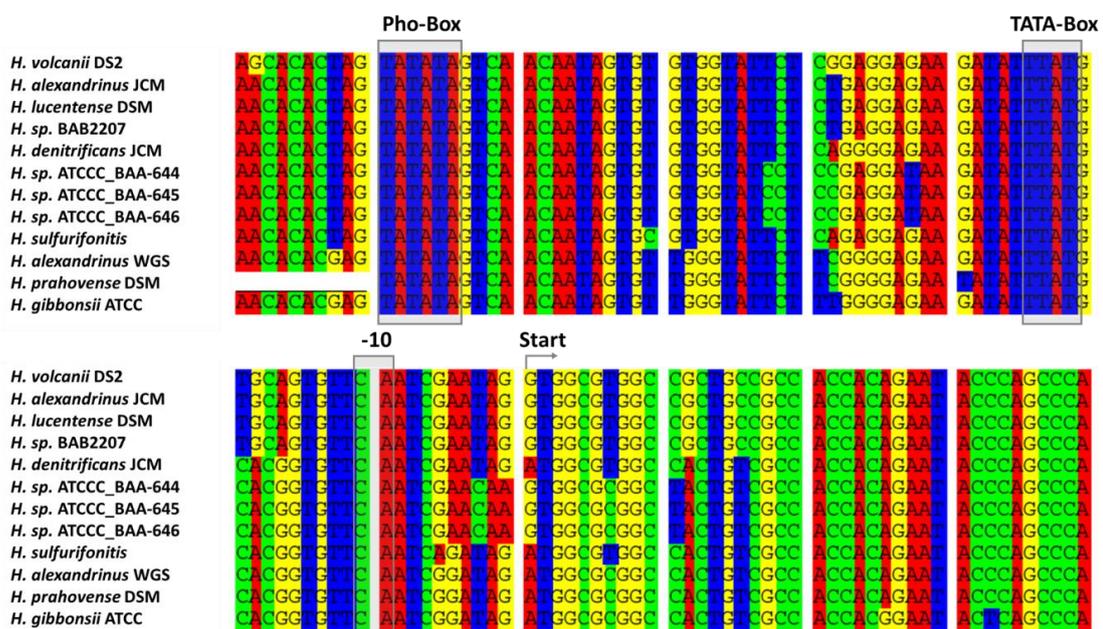


Abbildung 33: Konservierung der Promotorregion von sRNA₁₃₂ ermittelt durch „Nucleotide BLAST“ mit der Datenbank NCBI. Die Darstellung erfolgte mit dem Programm SeaView. Gezeigt sind folgende Promotorelemente: putative Pho-Box, TATA-Box, -10-Region und der Translationsstart der sRNA (Start). gelb: G; blau: T; grün: C; rot: A

Für das Operon *HVO_A0477-80* konnte stromaufwärts von 16 der 20 konservierten Gencluster und für das Operon *HVO_2375-8* stromaufwärts von allen 15 konservierten Genclustern ein Bereich mit konservierten Promotorelementen identifiziert werden. Für das Operon *HVO_A0477-80* wurde die -10-Region (CW), eine hoch konservierte TATA-Box (TTAT) bei -27 bis -24, das BRE (AA) bei -34 bis -35 und eine putative P-Box (TATTAT) bei -42 bis -37 identifiziert (s. Abbildung 34.A). Stromaufwärts des Operons *HVO_2375-8* lag eine weniger stark konservierte -10-Region (CC/CG/TT), eine hoch konservierte TATA-Box (TTAT) bei -29 bis -26 und eine Pho-Box (TATATA) bei -52 bis -47 (s. Abbildung 34.B).

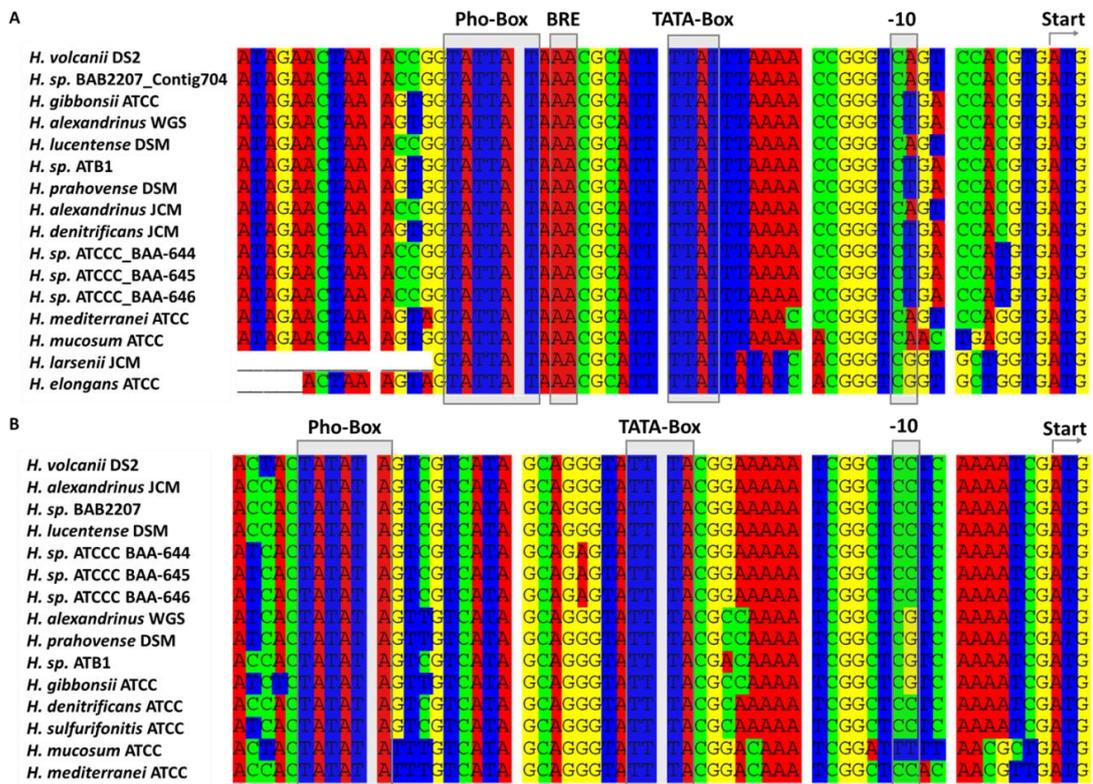


Abbildung 34: Konservierungen der Promotorelemente der ABC-Transporter *HVO_A0477-80* und *HVO_2375-8* von *H. volcanii* DS2 ermittelt durch „Nucleotide BLAST“ mit der Datenbank NCBI. Die Darstellung erfolgte mit dem Programm SeaView. Konservierungen der putativen P-Box, TATA-Box, -10-Region und des Translationsstarts (Start). **A.** *HVO_A0477-80* **B.** *HVO_2375-8* gelb: G; blau: T; grün: C; rot: A

V. DISKUSSION

Die Funktion und Wirkweise bakterieller und eukaryotischer kleiner RNAs ist bereits gut untersucht (Friedman *et al.*, 2009; Papenfort und Vogel, 2009; Storz *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2013; Borges und Martienssen, 2015; Wagner und Romby, 2015). Über sRNAs in Archaea ist deutlich weniger bekannt, ausschließlich snoRNAs sind bislang gut charakterisiert (Bachellerie *et al.*, 2002; Dennis und Omer, 2005; Lui und Lowe, 2013). Die Identifikation anderer sRNA-Spezies ist bereits in einigen Studien erfolgt (Tang *et al.*, 2005; Straub *et al.*, 2009; Babski *et al.*, 2011). Neueste Studien in *H. volcanii* lassen auf ein sRNA-Inventar schließen, das die Anzahl bakterieller sRNAs weit übersteigt und in der Größenordnung eukaryotischer kleiner RNAs liegt (Babski *et al.*, 2016). Über die biologische Funktion und Wirkweise archaealer sRNAs ist allerdings noch sehr wenig bekannt.

1. DIE BEDEUTUNG KLEINER RNAs UND IHRER BIOLOGISCHEN FUNKTIONEN FÜR *HALOFERAX VOLCANII*

Die phänotypische Charakterisierung von sRNA-Deletionsmutanten bietet die Möglichkeit Hinweise über die biologischen Funktionen von sRNAs zu erhalten. Bislang wurden nur sehr wenige Deletionsmutanten archaealer sRNAs phänotypisch charakterisiert. Die Deletionsmutante der sRNA₁₅₄ in *M. mazei* zeigte beispielsweise einen starken Wachstumsdefekt unter stickstofflimitierenden Bedingungen (Ehlers *et al.*, 2011). In *H. volcanii* führten die Deletionen von sRNA₃₀ bzw. sRNA₆₃ zu starken Wachstumsdefekten bei einer hohen Wachstumstemperatur bzw. niedrigen Salzkonzentrationen (Straub *et al.*, 2009).

In dieser Arbeit wurden die Daten der phänotypischen Charakterisierung von 27 sRNA-Deletionsmutanten von *H. volcanii* ausgewertet. Verglichen mit dem Wildtyp zeigten 24 sRNA-Deletionsmutanten unter mindestens einer der untersuchten Bedingungen phänotypische Unterschiede (s. Tabelle 38). Während einige sRNAs wie beispielsweise sRNA₁₃₂ einen sehr differenzierten regulatorischen Einfluss besitzen, sind andere sRNAs wie beispielsweise sRNA_{H225.2R} oder sRNA₁₉₄ in die Regulation vieler verschiedener biologischer Prozesse involviert und besitzen pleiotrope Phänotypen. Diese Ergebnisse konnten durch Transkriptomvergleiche des Wildtyps mit der jeweiligen sRNA-

Deletionsmutante weiter bestätigt werden. Zum Beispiel waren in Abwesenheit von sRNA₁₃₂ nur 16 Gene differentiell reguliert, die Deletion von sRNA₁₉₄ hingegen führte zur differentiellen Regulation von über 200 verschiedenen Genen (Babski[Dissertation], 2013). Die Auswertung der phänotypischen Charakterisierung zeigte, dass die enorme Diversität biologischer Prozesse, in die sRNAs von *H. volcanii* involviert sind, sehr hoch ist. Dies ist in Abbildung 35 schematisch skizziert. Beispiele für Phänotypen, die durch die Deletion einer sRNA hervorgerufen werden, sind die Adaptation an unterschiedliche Salzkonzentrationen, Zellmetabolismus, hohe Wachstumstemperaturen, Zellmorphologie, Zellmotilität und Chemotaxis (Jaschinski *et al.*, 2014).

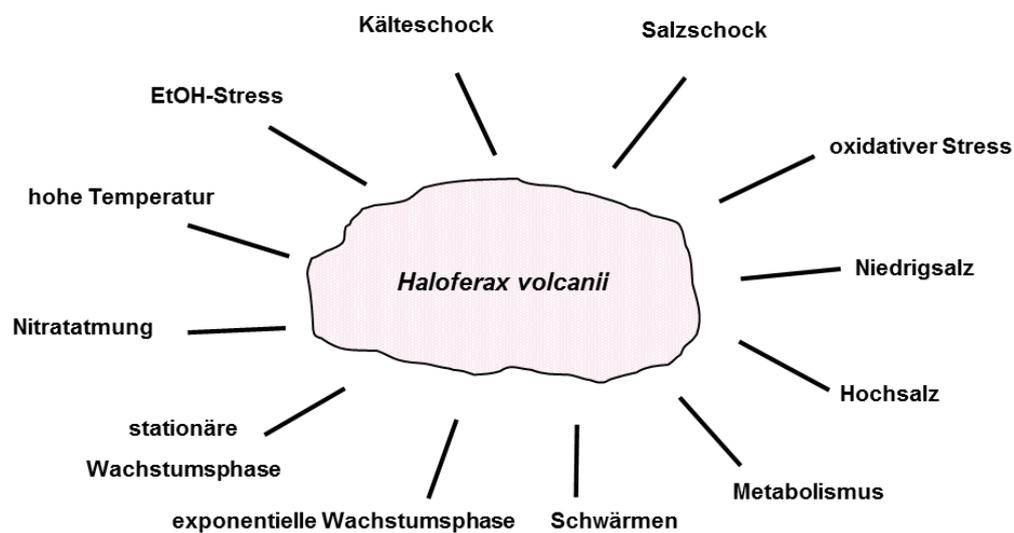


Abbildung 35: Schematischer Überblick über alle Bedingungen unter denen ein regulatorischer Einfluss von sRNAs von *H. volcanii* gezeigt werden konnte. Zusammenfassende Darstellung der Daten ermittelt durch phänotypische Charakterisierungen, Reporteranalysen, HTS- und Northern Blot-Analysen. Veröffentlicht in Jaschinski *et al.* (2014).

Ähnlich der Diversität archaealer sRNAs, sind sRNAs von Cyanobakterien ein regulatorischer Bestandteil verschiedener biologischer Prozesse wie Photosynthese, Hell-Dunkel-Adaptation, Metabolismus, Morphologie und abiotischem Stress (Hess *et al.*, 2014; Kopf und Hess, 2015). Beispielsweise ist das Transkriptlevel von sRNA SyR1 von *Synechocystis* sp. PCC6803 bei Starklicht sehr hoch und spielt möglicherweise eine Rolle in der Hell-Dunkel-Adaptation. Zudem führte die Überexpression von SyR1 zum Verlust der Zellpigmentierung (Mitschke *et al.*, 2011a). Im Gegensatz dazu besitzen sRNA-Deletionsmutanten bzw. -Überexpressionsmutanten in anderen bakteriellen Organismen oftmals keinen oder einen sehr subtilen Phänotyp und sind in der Regel für

das „Fein-Tuning“ von biologischen Prozessen verantwortlich (Shimoni *et al.*, 2007; Romby und Charpentier, 2010). Ein Beispiel ist die Regulation des Gens *ahrC*, welches für den transkriptionellen Aktivator des Genclusters für den Arginin-Katabolismus kodiert. sRNA SR1 ist involviert in das „Fein-Tuning“ des Arginin-Katabolismus und hat die mRNA *ahrC* als direktes Ziel. Kleine eukaryotische RNAs hingegen sind in die post-transkriptionelle Regulation fundamentaler biologischer Prozesse wie Zellproliferation, Embryogenese, Apoptose, Gensilencing und der Langzeitexpression über die Vermittlung von DNA-Methylierungen involviert (Huang *et al.*, 2013). Sie sind von großer Bedeutung für die Stabilität regulatorischer Netzwerke und ihre veränderte Genexpression kann zum Ausbruch diverser Krankheiten führen. Altersbedingte Mutationen der Kinase LRRK2 führen beispielsweise zu einem negativen regulatorischen Einfluss auf die miRNAs let-7 und miR-184*. Die verringerte Expression dieser miRNAs verhindert die translationale Repression der mRNAs *e2f1* und *dp* von *Drosophila* und führt zur Degeneration dopaminerger Neuronen und somit zum Ausbruch von Parkinson (Gehrke *et al.*, 2010).

Die Auswertung der phänotypischen Charakterisierung von sRNA-Deletionsmutanten von *H. volcanii* zeigte, dass ein Drittel aller getesteten Deletionsmutanten eindeutig in die Regulation des Wachstums bei Niedrig- bzw. Hochsalz involviert ist. Dieser hohe Anteil weist auf die enorme Bedeutung in der Anpassung an verschiedene Salzkonzentrationen für *H. volcanii* hin (vgl. IV.1.3). Die hohe Anpassungsfähigkeit führt für das halophile Archaeon zu einem evolutionären Vorteil in natürlichen Habitaten wie dem Toten Meer. Zudem ist die Verwertbarkeit der Kohlenstoffquelle ausschlaggebend für die Regulation durch sRNAs. Während bei Wachstum mit CAS nur eine von 27 Mutanten einen phänotypischen Unterschied mit einer um 24% verlängerten Verdopplungszeit zeigte, führte Wachstum mit Acetat bei sechs Deletionsmutanten zu unterschiedlichen Verdopplungszeiten und bei fünf Deletionsmutanten zu phänotypischen Unterschieden in der Wachstumsausbeute (s. Tabelle 38). Zudem sind die phänotypischen Unterschiede bei der Verwertung einer schlechten Kohlenstoffquelle wie Acetat deutlich stärker ausgeprägt als bei einer guten Kohlenstoffquelle wie CAS (vgl. Abbildung 9). Interessanterweise spielen sRNAs von *H. volcanii* bei der Adaptation an Stressbedingungen eine untergeordnete Rolle. Unter

den vier getesteten Bedingungen zeigten nur fünf der 27 Mutanten einen Phänotyp nach Stressinduktion. Ausschließlich eine Mutante wies einen LOF-Phänotyp auf. Im Gegensatz dazu konnte bei vier Mutanten ein GOF-Phänotyp beobachtet werden. Dies weist darauf hin, dass sRNAs in *H. volcanii* einen negativen regulatorischen Einfluss auf die Adaptation an Stressbedingungen haben. Viele bakterielle sRNAs sind in die Adaptation an zelluläre Stressbedingungen wie Membran- und oxidativem Stress involviert (Beisel und Storz, 2010).

Bei der Adaptation an neue Wachstumsbedingungen führte die Deletion von sRNA-Genen hauptsächlich zu LOF-Phänotypen, resultierend in einer verlängerten Latenzphase. Insgesamt zeigten sechs der 27 Deletionsmutanten ein verändertes Schwärmverhalten (s. Abbildung 12). Eine Deletionsmutante zeigte ein verbessertes Schwärmverhalten während fünf Deletionsmutanten eine verringerte Motilität gegenüber dem Wildtyp aufwiesen. Aktuelle Studien konnten die Involvierung bakterieller sRNAs in das Schwärmverhalten zeigen. Zunächst wurden in *E. coli* vier sRNAs (ArcZ, OmrA, OmrB und OxyS), die einen negativen, und eine sRNA (McaS), die einen positiven regulatorischen Einfluss auf die Motilität haben, identifiziert (De Lay und Gottesman, 2012; Thomason *et al.*, 2012; Mika und Hengge, 2013). Weiterhin wurden bei anderen bakteriellen Mikroorganismen wie *S. typhimurium*, *Helicobacter pylori* oder *Pseudomonas aeruginosa* sRNAs entdeckt, deren Deletionsmutanten eine verbesserte Motilität aufwiesen und somit einen reprimierenden Einfluss auf das Schwärmverhalten besitzen (Fuentes *et al.*, 2015; Lu *et al.*, 2016; Vannini *et al.*, 2016). Diese GOF-Phänotypen bakterieller sRNAs konnten bislang jedoch nur bezüglich der Motilität beobachtet werden. Bei *H. volcanii* wurden zwar doppelt so viele GOF-Phänotypen wie LOF-Phänotypen beobachtet (s. Abbildung 6), dennoch ist das Auftreten von GOF-Phänotypen durch Deletion einer sRNA ein häufiges Ereignis. In dieser Hinsicht ähneln archaeale sRNAs eher eukaryotischen kleinen RNAs. Für Knockout-Mutanten von eukaryotischen kleinen RNAs konnten häufig solche GOF-Phänotypen beobachtet werden (Neilson und Sharp, 2008). Zum Beispiel führte der Knockdown der sRNA miR-320 bei transgenen Mäusen nach einer simulierten Reperfusion zum Zellschutz, während die Überexpression dieser sRNA zur Apoptose von Herzmuskelzellen führte (Ren *et al.*, 2009).

Die oftmals stark ausgeprägten Phänotypen, die durch das Fehlen von sRNAs hervorgerufen werden, und die hohe Diversität an biologischen Funktionen in die sRNAs involviert sind, zeigt ihre enorme Bedeutung für die Regulation biologischer Prozesse in *H. volcanii*.

2. REGULATION VON sRNAs

Neben der phänotypischen Charakterisierung gibt auch die Expression und Regulation von sRNAs wichtige Einblicke in die biologische Funktion von sRNAs. In der HTS-Studie von Heyer *et al.* (2012) wurde die Expression von 145 intergenen sRNAs unter drei verschiedenen Bedingungen jeweils in der exponentiellen und der stationären Wachstumsphase verglichen. Für das HTS wurde RNA aus Zellen isoliert, die bei 2,1 M NaCl und 45°C und bei 2,5 M NaCl und einer Wachstumstemperatur von 45°C bzw. 48°C kultiviert worden waren (Jantzer[Diplomarbeit], 2011; Heyer *et al.*, 2012). Zu den sechs sRNAs mit der höchsten Expressionsrate nach Wachstum mit 2,1 M NaCl, verglichen mit der Expressionsrate bei 2,5 M NaCl, gehörte sRNA₃₀ (Hts144) (Heyer *et al.*, 2012). In dieser Arbeit wurde das Transkriptlevel der intergenen sRNA₃₀ mittels Northern Blot-Analyse nach Wachstum mit verschiedenen Salzkonzentrationen bestimmt (s. IV.3.1). Hierbei korrelierte die Reduktion der Salzkonzentration ebenfalls mit einer erhöhten Expression von sRNA₃₀. Das Transkriptlevel von sRNA₃₀ war, verglichen mit der Standardsalzkonzentration von 2,1 M, unter Niedrigsalzbedingungen von 1,2 M NaCl um das 2,6-Fache höher und, verglichen mit einer sehr hohen Salzkonzentration von 4 M NaCl, um das 3,6-Fache höher (s. Abbildung 16). Auch bei der HTS-Analyse von Heyer *et al.* (2012) konnte bei verschiedenen Salzkonzentrationen eine differentielle Expression einiger sRNAs von *H. volcanii* beobachtet werden. In der stationären Phase zeigten die sRNAs Hts5, Hts71 und Hts107 bei einer Salzkonzentration von 2,5 M eine verringerte, bei einer Salzkonzentration von 2,1 M hingegen eine erhöhte Expression (Heyer *et al.*, 2012). Dies zeigt, dass für das Archaeon *H. volcanii*, dessen optimale Salzkonzentration bei etwa 2 M NaCl liegt, die Adaption an verschiedene Salzkonzentrationen, insbesondere an Niedrigsalz, eine wichtige Rolle spielt.

Neben der Induktion von sRNA₃₀ unter Niedrigsalzbedingungen konnte nach einem

Hitzeschock von 42°C auf 51°C keine Induktion der Expression beobachtet werden (s. Abbildung A2 im Anhang). Dies deckt sich mit der Beobachtung von Heyer *et al.* (2012). Im experimentellen HTS war die Transkriptmenge keiner sRNA nach einer moderaten Temperaturerhöhung von 45°C auf 48,5°C erhöht. Zudem zeigten nur wenige sRNAs keine Expression. Dies weist zunächst auf eine eher untergeordnete Rolle von sRNAs bei der Adaptation an hohe Temperaturen hin. Dennoch spielt sRNA₃₀ eine wichtige Rolle bei der Adaptation an hohe Wachstumstemperaturen. Zum einen wurde in Abwesenheit von sRNA₃₀ ein starkes Wachstumsdefizit bei 50°C, nicht aber bei 42°C beobachtet (s. Abbildung 17). Zum anderen zeigte der Transkriptomvergleich von Wildtyp und Deletionsmutante der sRNA₃₀ nach 15-minütigem Hitzeschock die veränderte Expression einiger Gene, welche unter anderem in Transportprozesse, Metabolismus, Transkriptionsregulation und die Expression anderer sRNAs involviert sind (s. Tabelle 41). Die Expression einer sRNA kommt somit nicht als alleiniger Gradmesser für die Identifikation der biologischen Funktion einer sRNA in Frage und unterstreicht die Bedeutung phänotypischer Charakterisierungen bei der Entschlüsselung biologischer Funktionen.

In dieser Arbeit konnte eine spezifische differentielle Expression von sRNA₃₀ in Abhängigkeit der Wachstumsphase beobachtet werden (s. Abbildung 16). Hierbei war eine Zunahme bis hin zur spät-exponentiellen und ein erneuter Abfall des Expressionslevels in der stationären Wachstumsphase zu beobachten. In einer früheren Studie von Straub *et al.* (2009) wurden die Transkriptlevel von sRNA₃₀, sRNA₁₃₂ und sRNA₁₉₄ bei verschiedenen Salzkonzentrationen und Temperaturen in der exponentiellen und stationären Wachstumsphase mittels Northern Blot-Analyse charakterisiert. Hierbei wurde ebenfalls für sRNA₃₀ und sRNA₁₃₂ eine leichte Reduktion des Transkriptlevels in der stationären Phase beobachtet. Zudem zeigte sRNA₁₉₄ eine stark verringerte Expression in der stationären Wachstumsphase. Eine genomweite Analyse von *H. salinarum* und *H. volcanii* ergab, dass 10% bzw. 20% der Transkripte wachstumsphasenabhängig eine differentielle Translationsregulation zeigen (Lange *et al.*, 2007). Dies verdeutlicht die Bedeutung einer wachstumsphasenabhängigen Regulation für Haloarchaea. Die Wachstumsbedingungen, unter denen die Zellen bei Eintritt in die stationäre Phase kultiviert werden, sind ebenfalls entscheidend für die

Regulation der sRNAs (Heyer *et al.*, 2012). Dies macht die Beteiligung von archaealen sRNAs bei der Anpassung an verschiedene Wachstumsphasen sehr wahrscheinlich.

3. DIE ANWENDUNG BIOINFORMATISCHER METHODEN ZUR IDENTIFIKATION VON ZIELGENEN

Nach der Charakterisierung biologischer Funktionen von sRNAs ist die Identifikation potentieller Ziel-mRNAs zum Aufklären der regulatorischen Funktion archaealer sRNAs unerlässlich. Eine schnelle und einfache Methode hierfür bietet die bioinformatische Analyse. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Genom von *H. volcanii* mit dem Programm TargetRNA auf potentielle Zielgene für ausgewählte sRNAs wie beispielsweise sRNA₃₀, sRNA_{htsf468} und sRNA₄₇₉ untersucht (s. Tabelle 39, 40 und Daten nicht gezeigt). Der regulatorische Einfluss von sRNA₄₇₉ auf die mittels TargetRNA identifizierte Ziel-mRNA OsmC konnte durch eine anschließende Northern Blot-Analyse bestätigt werden (s. Tabelle 40 und Abbildung 14). Die bioinformatisch identifizierten Ziel-mRNAs aller anderen ausgewählten sRNAs wie beispielsweise sRNA₃₀ und sRNA_{htsf468} konnten weder durch anschließende Northern Blot-Analysen, noch durch den Abgleich mit den Daten aus Transkriptomanalysen bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Das Programm TargetRNA arbeitet mit den Parametern zur Identifikation bakterieller Ziel-mRNAs. Da nur sehr wenige archaeale Ziel-mRNAs identifiziert werden konnten, war es bisher nicht möglich Parameter für eine relativ zuverlässige Ziel-mRNA-Vorhersage für archaeale Organismen zu definieren. Für bakterielle sRNAs hingegen konnten bereits gezielt Programme wie CopraRNA oder IntaRNA entwickelt werden (Wright *et al.*, 2014). Das Programm IntaRNA ermöglicht eine Ziel-mRNA-Vorhersage von potentiellen Interaktionen in einem einzelnen Organismus. CopraRNA hingegen ist eine komparative Methode, welche die Vorhersage von Zielgenen kombiniert in ausgewählten Organismen ermöglicht. Mithilfe von CopraRNA konnten beispielsweise für die sRNA GcvB 35 Zielgene mit Homologen in *E. coli* oder *S. typhimurium* identifiziert und elf davon als Zielgene verifiziert werden (Wright *et al.*, 2013).

Eine weitere Erschwernis bei der Entwicklung verlässlicher bioinformatischer Programme für Ziel-mRNA Vorhersagen ist der geringe Grad an Sequenzkonservierung archaealer sRNAs. Von 27 überprüften sRNAs in *H. volcanii* waren die meisten sRNAs nicht konserviert. Drei sRNAs wiesen eine starke Sequenzkonservierung auf, die sich

jedoch ausschließlich auf andere Arten der Familie der *Halobacteriales* beschränkte (Jaschinski *et al.*, 2014). Auch sRNA₁₃₂ und der ABC-Transporter *HVO_A0477-80* sind ausschließlich innerhalb der Familie der *Halobacteriales*, nicht aber in anderen Archaea konserviert (s. IV.4.1.1). Bei *M. mazei* beschränkt sich die Konservierung von sRNAs ebenfalls hauptsächlich auf andere methanogene Archaea (Jäger *et al.*, 2009). Und Auch eukaryotische miRNAs zeigen nur einen geringen Grad an Sequenzkonservierung (Cuperus *et al.*, 2011). Bei Bakterien sind hoch konservierte sRNAs hauptsächlich in der gleichen phylogenetischen Gruppe zu finden, so zum Beispiel die sRNA Yfr1 die in nahezu allen Arten von Cyanobakterien vertreten ist (Georg und Hess, 2011). In *S. typhimurium* gibt es einige sRNAs die spezifisch für diese Gattung sind, andere wiederum sind hoch konserviert in vielen bakteriellen Arten und durch lateralen Gentransfer stark verbreitet (Vogel, 2009). *In trans*-kodierte, bakterielle sRNAs besitzen sogenannte „Seed“-Sequenzen. Diese sind definiert als Sequenzen, welche die Basenpaarung zwischen sRNA und Ziel-mRNA initialisieren oder diese stabilisieren. Sie sind oftmals im 5'-Bereich der sRNA lokalisiert und dienen zur Regulation mehrerer Ziel-mRNAs wie beispielsweise die sRNA RhyB, die viele *omp*-mRNAs reguliert (Papenfort *et al.*, 2010). Ist die „Seed“-Region in sRNA und Ziel-mRNA Co-konserviert konnten gute Erfolge bei der Aufklärung globaler Regulations-Netzwerke mithilfe von CopraRNA und IntaRNA erzielt werden (Wright *et al.*, 2013; Wright *et al.*, 2014). Wichtig für die Vorhersage ist die räumliche Struktur der sRNA. Diese kann jedoch durch sRNA-bindende Proteine, wie beispielsweise Hfq, verändert und zuvor unzugängliche Regionen an der Oberfläche präsentiert werden. Dies erschwert wiederum eine Vorhersage.

Die Identifizierung der potentiellen Ziel-mRNA des Operons *HVO_A0477-80* von sRNA₁₃₂ konnte mittels NCBI Nucleotide Blast erfolgen (s. Abbildung 3). Für viele andere sRNAs war das Durchsuchen des Genoms auf eine Sequenzkomplementarität nicht erfolgreich. Solch eine starke Komplementarität über 20 bp scheint für *in trans*-kodierte sRNAs in *H. volcanii* eher eine Ausnahme zu sein. Auch bei *in trans*-kodierten bakteriellen sRNAs ist häufig eine deutlich geringere Komplementarität zu finden (Gottesman und Storz, 2011). In der Regel umfasst diese „Seed“-Region 7-12 bp (Bandyra *et al.*, 2012).

4. VON DER BIOLOGISCHEN FUNKTION ZUM POTENTIELLEN INTERAKTIONSPARTNER

Das breit angelegte Phänotypenscreening führte zu einem globalen Überblick über die biologischen Funktionen in die sRNAs von *H. volcanii* involviert sind (s. Tabelle 38). Die biologischen Funktionen von sRNAs geben wichtige Hinweise darauf unter welchen Bedingungen weitere Charakterisierungen sinnvoll sind. In dieser Arbeit wurden zunächst sRNAs ausgewählt, die aufgrund der phänotypischen Ausprägung der entsprechenden Deletionsmutante eine Involvierung in wichtige biologische Funktionen vermuten ließen. Da das Wachstum in Mikrotiterplatten jedoch unter anderem bezüglich der Sauerstoffversorgung vom Wachstum im Kolben abweicht, können manche Phänotypen zwischen Mikrotiterplatte und Kolben variieren und müssen anschließend auf ihre Reproduzierbarkeit überprüft werden. Hierzu wurden sRNA₁₉₄, sRNA₃₆₂, sRNA_{htsf468}, sRNA₄₇₉, sRNA_{H225.2R} und sRNA_{hts10} näher charakterisiert (s. I.1, weitere Daten sind aufgrund fehlender Aussagekraft nicht gezeigt). Um einen besseren Überblick über die biologische Funktion einer sRNA zu erhalten und Bedingungen, die der Regulation durch sRNAs unterliegen, zu definieren, wurde zudem ihre differentielle Expression im HTS (Heyer *et al.*, 2012) und ihre Regulation in Reporterassays (Lehr[Diplomarbeit], 2010) berücksichtigt.

Eine Möglichkeit, um eine Verbindung zwischen der biologischen Funktion und dem tatsächlichen regulatorischen Einfluss einer sRNA, möglicherweise auf posttranskriptioneller Ebene, zu ziehen, bietet der Transkriptomvergleich. Die differentielle Regulation des Transkriptoms in An- und Abwesenheit einer sRNA und die Identifikation potentieller Zielgene kann mittels DNA-Mikroarray erfolgen. In dieser Arbeit wurde der DNA-Mikroarray genutzt, um das Transkriptom der Deletionsmutante von sRNA_{htfs468}, sRNA₃₀ bzw. sRNA₁₃₂ mit dem Transkriptom des Wildtyps zu vergleichen (s. IV.2.2, IV.3.4 und IV.4.3). Die Transkriptomvergleiche wurden unter Bedingungen durchgeführt für die mittels phänotypischer Charakterisierung eine regulatorische Involvierung der entsprechenden sRNA gezeigt werden konnte. Sowohl der Transkriptomvergleich in An- und Abwesenheit der sRNA_{htfs468} unter Hochsalzbedingungen als auch der Transkriptomvergleich in An- und Abwesenheit der sRNA₃₀ nach einem 15-minütigen Hitzeschock wiesen nur geringfügige regulatorische Veränderungen auf (s. Tabelle 41 und A3 im Anhang). Zudem konnte keine Verbindung zwischen den regulierten Genen

und den phänotypischen Merkmalen gezogen werden. Die DNA-Mikroarray-Analyse von sRNA₁₃₂ hingegen führte unter anderem zur Bestätigung des *in silico* vorhergesagten Zielgens *HVO_A0477-80* und zur Identifikation weiterer Zielgene wie zum Beispiel *HVO_2375* (s. Tabelle 43 und 44). Das Operon *HVO_A0477-80* kodiert für das ABC-Transportsystem Pst2 und das Gen *HVO_2375* für das SBP des ABC-Transportsystems Pst1. Beide ABC-Transportsysteme sind für den aktiven Transport des putativen Substrats anorganisches Phosphat annotiert. Die Verifikation der potentiellen Ziel-mRNAs des Operons *HVO_A0477-80* und des Gens *HVO_2375* konnte anschließend mittels Northern Blot-Analyse erfolgen (s. Abbildung 30).

Ein Problem bei der Identifikation von Zielgenen mittels DNA-Mikroarray sind sekundäre Effekte, die durch die veränderte Expression des direkten Ziels ausgelöst werden können. Dies kann die veränderte Expression einer Reihe von Genen zur Folge haben und die Suche nach dem direkten Ziel einer sRNA erschweren. Eine Möglichkeit, um solche sekundären Effekte zu minimieren, bietet der Transkriptomvergleich nach einer induzierten Expression. In *E. coli* führten hohe Expressionslevel der sRNAs OmrA und OmrB zur Identifikation negativ regulierter Membranproteine und zeigte den Einfluss dieser sRNAs auf die Zusammensetzung der äußeren Zellmembran (Guillier und Gottesman, 2006). Auch eine komparative Mikroarray-Analyse nach zehnminütiger Überexpression der sRNA GcvB führte zur Identifikation eines Regulons von mehr als 1% des *S. typhimurium*-Genoms (Sharma *et al.*, 2011). Während bei Bakterien bereits etablierte Systeme zur konditionalen Überexpression von sRNAs zur Verfügung stehen (Massé *et al.*, 2005; Papenfort *et al.*, 2006; Papenfort *et al.*, 2009), konnten bislang nur wenige sRNAs von *H. volcanii* erfolgreich überexprimiert werden (Menzel-Hobeck[Diplomarbeit], 2010). Oftmals wurde aufgrund einer unvollständigen Termination kein definiertes Transkript erhalten. In anderen Fällen erfolgte bereits ohne Induktion eine konstitutive Expression der sRNA. Ein effektives System zur induzierbaren Expression einer sRNA für *H. volcanii* bleibt weiterhin eine Herausforderung.

Neben der Analyse von Überexpressionsmutanten gibt es auch bei Bakterien eine Reihe von Beispielen bei denen der Transkriptomvergleich in An- und Abwesenheit einer sRNA zur Identifikation ihrer Zielgene führte. In *E. coli* konnte durch Vergleich des Transkriptoms in An- und Abwesenheit der sRNA GcvB mittels DNA-Mikroarray die

mRNA *CycA*, welche für eine in den Transport von Aminosäuren involvierte Permease kodiert, als Ziel identifiziert werden (Pulvermacher *et al.*, 2009). Und auch bei *Neisseria meningitidis* führte der Transkriptomvergleich von Wildtyp und sRNA-Deletionsmutante zur Identifikation der Fur-abhängigen, positiven Regulation des Operons *sdhCDAB*, welches für die Succinat-Dehydrogenase kodiert, durch die sRNA NrrF (Metruccio *et al.*, 2009).

In dieser Arbeit wurden im Arbeitskreis gedruckte DNA-Mikroarrays verwendet. Diese Arrays bestanden hauptsächlich aus Spots mit einer Größe von etwa 1,5 kbp. Je nach Gengröße waren in einem Spot mehrere Gene und dazwischen liegende intergene Bereiche vertreten. Zusätzlich waren einzelne Oligonukleotidsonden, zum Beispiel für eine Reihe von sRNA-Genen, auf den Mikroarray gedruckt. Dies ermöglichte die verhältnismäßig kostengünstige Verwendung von DNA-Mikroarrays. Sogenannte „Tiling-Mikroarrays“, die überlappende Genomregionen enthalten und das gesamte Genom abdecken, sind sehr kostspielig und müssen kommerziell erworben werden. Das Detektionslimit des DNA-Mikroarrays liegt zwischen der Hintergrundaktivität und dem Bereich der Sättigung. Hohe Hintergrundaktivitäten aufgrund von Kreuzhybridisierungen mindern die Sensitivität des Mikroarrays. Zudem wird durch die interne Normalisierung des DNA-Mikroarrays der Vergleich von Expressionsleveln zwischen verschiedenen Mikroarrays erschwert.

Neben dem Transkriptomvergleich mittels DNA-Mikroarray bieten Sequenzierungstechnologien die Möglichkeit zur experimentellen Identifikation möglicher Zielgene. Durch Weiterentwicklung der Methodik und Reduktion der Kosten in den letzten zehn Jahren (Reuter *et al.*, 2015) wurde die vermehrte Anwendung von HTS und dRNA-Seq zur Identifikation von Transkriptionsstartstellen (TSS) ermöglicht. Diese Sequenzierungsmethoden eignen sich für einen globalen Transkriptomvergleich und somit zur Identifikation potentieller Zielgene. Während der DNA-Mikroarray auf den Vergleich von zwei Bedingungen limitiert ist, können durch Sequenzierungen eine Reihe von Bedingungen verglichen werden. Im Vergleich zum DNA-Mikroarray ist zudem das Detektionslimit extrem erweitert, sodass sowohl kleinste Transkriptmengen als auch Millionen von Reads detektiert werden können. Die Sequenzierungstechnologie wurde sowohl für Eukaryoten und Bakterien als auch für einige Archaea zur Identifikation von

sRNAs und ihrer Zielgene erfolgreich eingesetzt (Sittka *et al.*, 2008; Sittka *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009; Heyer *et al.*, 2012; Babski *et al.*, 2016).

Durch einen Transkriptomvergleich mittels DNA-Mikroarray oder HTS kann nur die differentielle Genregulation durch sRNAs, die sowohl zur Inhibition der Translation als auch zum Abbau der Ziel-mRNA führen, nachgewiesen werden. Erfolgt kein Abbau der Ziel-mRNA, wie zum Beispiel durch die direkte Bindung der sRNA an ein Protein, können die Interaktionspartner nicht durch den Transkriptomvergleich identifiziert werden. In diesem Fall kann das Translatom mittels ein- oder zweidimensionaler Proteingele zur Identifikation direkter Proteininteraktionspartner analysiert werden. Da der Transkriptomvergleich in An- und Abwesenheit von sRNA₃₀ nicht zur Identifikation hitzeschockabhängiger, potentieller Zielgene führte, wurden eindimensionale Proteingele zur Identifikation von Proteininteraktionspartnern durchgeführt. Hierzu wurde das Translatom von Wildtyp und Deletionsmutante der sRNA₃₀ nach einem 15-minütigen Hitzeschock verglichen (vgl. Abbildung 19 und 20). Es konnten jedoch keine differentiell regulierten Proteinbanden identifiziert werden. Möglicherweise könnte die sensitivere zweidimensionale Gelelektrophorese zur Identifikation von Proteininteraktionspartnern führen. Für sRNA₃₀ bzw. sRNA₆₃ von *H. volcanii* wurde in vorhergehenden Versuchen mithilfe von zweidimensionaler Gelelektrophorese das Proteom von Wildtyp mit dem der entsprechenden Deletionsmutante, kultiviert in Komplexmedium, verglichen. Anschließende Massenspektrometrie ermöglichte die Identifikation direkt oder indirekt regulierter Proteine (Straub *et al.*, 2009). Für *E. coli* war es mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese möglich, durch Vergleich des Translatoms von Wildtyps und Überexpressionsmutante der sRNA MicA, den regulatorischen Einfluss von MicA auf die Proteine OmpA und OmpX zu zeigen (Udekwu *et al.*, 2005; Hammann *et al.*, 2014). Veränderungen des Translatoms können, neben der direkten Regulation von Proteininteraktionspartnern, auch auf die Regulation der entsprechenden Ziel-mRNA zurückzuführen sein. Eine Untersuchung des Translatoms bietet demnach eine ergänzende Methode bei der Identifikation von sRNA-Interaktionspartnern.

5. IDENTIFIKATION UND VERIFIKATION POTENTIELLER ZIELGENE

Durch Methoden zur Analyse des Transkriptoms oder Translatoms kann sehr schnell eine große Anzahl von potentiellen Interaktionspartnern identifiziert werden. Nach der Identifikation muss die Verifikation der direkten Interaktionspartner erfolgen. Der regulatorische Einfluss einer sRNA kann zum Beispiel mittels Northern Blot-Analyse verifiziert werden. In dieser Arbeit konnte zum einen das bioinformatisch vorhergesagte Transkript des Gens *osmC* mittels Northern Blot-Analyse als potentielles Ziel der sRNA₄₇₉ bestätigt werden. Allerdings lag das mit der Sonde gegen *osmC* detektierte Transkript in einer Größenordnung von 400-500 nt. *osmC* ist mit einer Länge von 468 bp annotiert. Um den Bereich der potentiellen Bindestelle zu umfassen, müsste das Transkript zusätzlich eine 5'-UTR mit einer Länge von 55 nt und somit eine Gesamtlänge von 523 nt besitzen (s. Abbildung 13). Zur Bestätigung der tatsächlichen Transkriptlänge könnte in zukünftigen Experimenten zunächst eine cr-RT-PCR durchgeführt werden. Direkt nach Induktion von oxidativem Stress konnte eine sehr starke Induktion des Transkriptlevels von *osmC*, die bereits 15 min später wieder deutlich abgeschwächt war, beobachtet werden (s. Abbildung 14). Dies weist darauf hin, dass OsmC von *H. volcanii* eine ähnliche Funktion wie bei *E. coli* erfüllt. OsmC von *E. coli* ist eine stressinduzierte Peroxireduktase und in die Abwehr von oxidativem Stress involviert (Conter *et al.*, 2001; Lesniak *et al.*, 2003). sRNA₄₇₉ scheint wichtig für die rasche Induktion von OsmC zur Abwehr von oxidativem Stress zu sein. Die Expression von OsmC ist in Abwesenheit der sRNA nach Induktion von oxidativem Stress stark verringert (s. Abbildung 15). Zudem zeigte die Deletionsmutante der sRNA₄₇₉ verglichen mit dem Wildtyp eine schlechtere Anpassung an das Wachstum auf Acetat, sowohl die Latenzphase als auch die Verdopplungszeit waren verlängert (s. Tabelle 38). In der Deletionsmutante war bei Wachstum mit Acetat und auch mit Glucose als Kohlenstoffquelle die Transkriptmenge von *osmC* im Vergleich zum Wildtyp stark erhöht (s. Abbildung 15). OsmC ist ein acetylphosphatabhängiges Effektorprotein, welches in *E. coli* bei hohen Acetylphosphatkonzentrationen induziert ist (Wolfe *et al.*, 2003). *H. volcanii* ist zum einen in der Lage den sogenannten „Acetat-Switch“, also dem Wechsel zwischen Assimilation und Dissimilation von Acetat, zu vollziehen (Bräsen und Schönheit, 2001; Wolfe *et al.*, 2003). Zum anderen kann der Abbau von Hexosen unter Bildung von Acetat über den Pentose Phosphatweg erfolgen (Johnsen *et al.*, 2009; Pickl und Schönheit, 2015). Insbesondere bei der Dissimilation von

Acetat, aber auch bei der Dissimilation von Glucose ist die Acetylphosphatkonzentration erhöht. Eine erhöhte Acetylphosphatkonzentration könnte ähnlich wie bei *E. coli* zu einer Induktion von OsmC in *H. volcanii* führen. Die starke Induktion des Transkriptlevels von *osmC* in Abwesenheit von sRNA₄₇₉ weist auf eine Repression von OsmC durch die sRNA hin. Eine ähnliche Regulation findet in *E. coli* statt, hier wird OsmC durch sRNA S-20 reprimiert (Noro *et al.*, 2017).

Desweiteren konnte in dieser Arbeit mittels Northern Blot-Analyse der positive regulatorische Einfluss der sRNA₁₃₂ von *H. volcanii* auf das ABC-Transportsystem *HVO_A0477-80* und auf das SBP des ABC-Transporters *HVO_2375-8* in Abhängigkeit der Verfügbarkeit von Phosphat gezeigt werden (s. IV.4.2.1 und IV.4.4.3). Auch in *S. typhimurium* wurde das Transkriptlevel von OmpX in 35 sRNA-Deletionsmutanten bestimmt. Die Deletion des Gens der sRNA CyaR führte zu einer verstärkten Expression der OmpX-mRNA (Papenfort *et al.*, 2008). Die Bestätigung der OmpX-mRNA als Ziel der sRNA CyaR erfolgte durch Komplementation der sRNA mit einem Plasmid mit hoher Kopienzahl. Dies führte zu einer Reduktion des Expressionslevels der Ziel-mRNA auf Wildtyp-Niveau.

Mittels Northern Blot-, Transkriptom- oder Translatom-Analyse kann zwar der regulatorische Einfluss auf einen Interaktionspartner verifiziert werden, ob eine direkte oder indirekte Regulation vorliegt bleibt jedoch weiter unklar. Viele potentielle Interaktionspartner sind sekundäre Ziele, die beispielsweise durch den direkten oder indirekten Einfluss der sRNA auf Transkriptionsfaktoren reguliert werden. Eine Möglichkeit, um Primärziele *in vivo* nachzuweisen, bieten Reporterassays. Durch die Verwendung eines heterologen Promotors, wird ausschließlich die post-translationale Regulation gemessen. Die anschließende Einführung von Mutationen und kompensatorischen Mutationen ermöglicht die Identifikation der Bindestelle in der Ziel-mRNA. In dieser Arbeit wurde der DHFR-Reporterassay zum Nachweis der direkten Bindung von sRNA₁₃₂ an die mRNA des ABC-Transportsystems *HVO_A0477-80* eingesetzt. Dieser Assay wurde bereits für das halophile Archaeon *H. volcanii* etabliert (Danner und Soppa, 1996; Brenneis und Soppa, 2009). Durch Fusion der 3'-UTR des ABC-Transporters *HVO_A0477-80* mit der DHFR sollte der *in vivo*-Nachweis der direkten Bindung von sRNA₁₃₂ an die 3'-UTR erfolgen. Aufgrund fehlender Reproduzierbarkeit der

Messergebnisse war dies jedoch nicht möglich (Daten nicht gezeigt). Für die Reportergerkonstrukte wurde der starke, konstitutive *fdx*-Promotor aus *H. salinarum* verwendet. Möglicherweise übersteigt die Menge der artifiziellen 3'-UTR die Menge der sRNA₁₃₂, sodass der regulatorische Einfluss durch diese Methode nicht mehr messbar ist. Um dieses Problem zu umgehen, könnte es erforderlich sein die Versuche mit dem nativem Promotor des ABC-Transportsystems zu wiederholen. In etablierten Reportergerassays für Bakterien werden Fusionen mit dem Reporterger β -Galactosidase (*lacZ*) oder dem "grün fluoreszierenden Protein" (Gfp) eingesetzt (Urban und Vogel, 2007; Mandin und Gottesman, 2009).

Obwohl der *in vivo*-Nachweis mithilfe des Reportergerassays nicht möglich war, ist eine direkte Interaktion von sRNA₁₃₂ mit der 3'-UTR der mRNA von *HVO_A0477-80* weiterhin anzunehmen. In der Northern Blot-Analyse konnte gezeigt werden, dass in Anwesenheit von sRNA₁₃₂ und artifizieller 3'-UTR auf dem extrachromosomalen Reportergerkonstrukt keine Expression des ABC-Transportsystems *HVO_A0477-80* stattfindet (s. Abbildung 28). Dies lässt auf eine Kompetition zwischen nativer und artifizieller 3'-UTR schließen. Die erhöhte Menge artifizieller 3'-UTR könnte die Bindung durch sRNA₁₃₂ begünstigen und somit ihre Bindung an die native 3'-UTR des ABC-Transportsystems und dessen Stabilisierung verhindern (s. Abbildung 36). Durch Einführung einer mutierten Bindestelle konnte die natürliche Stabilisierung der mRNA durch sRNA₁₃₂ wieder hergestellt werden (s. Abbildung A5 im Anhang).

Eine weitere Möglichkeit, um die direkte Interaktion von sRNA₁₃₂ mit der 3'-UTR des ABC-Transporters *HVO_A0477-80* nachzuweisen, könnte *in vitro* mittels „electrophoretic mobility shift assay“ (EMSA) oder „footprinting assay“ erfolgen. Bei *E. coli* konnte so die Bindestelle der sRNA MicA an die mRNA OmpA identifiziert werden (Udekwu *et al.*, 2005). Bei *S. typhimurium* wurde mithilfe von „footprinting assays“ die post-transkriptionelle Regulation der mRNA OmpD durch die sRNA MicC gezeigt und eine Bindestelle von maximal 12 bp in der kodierenden Sequenz identifiziert. Auch für das methanogene Archaeon *M. mazei* konnte anhand von Mutationen und kompensatorischen Mutationen mittels „footprinting assays“ und EMSA die Bindung der sRNA₁₆₂ an ihre Ziel-mRNAs MM2440-41 und MM2442 verifiziert werden (Jäger *et al.*, 2012). Durch „footprinting assays“ lässt sich zwar die genaue Bindestelle einer sRNA an

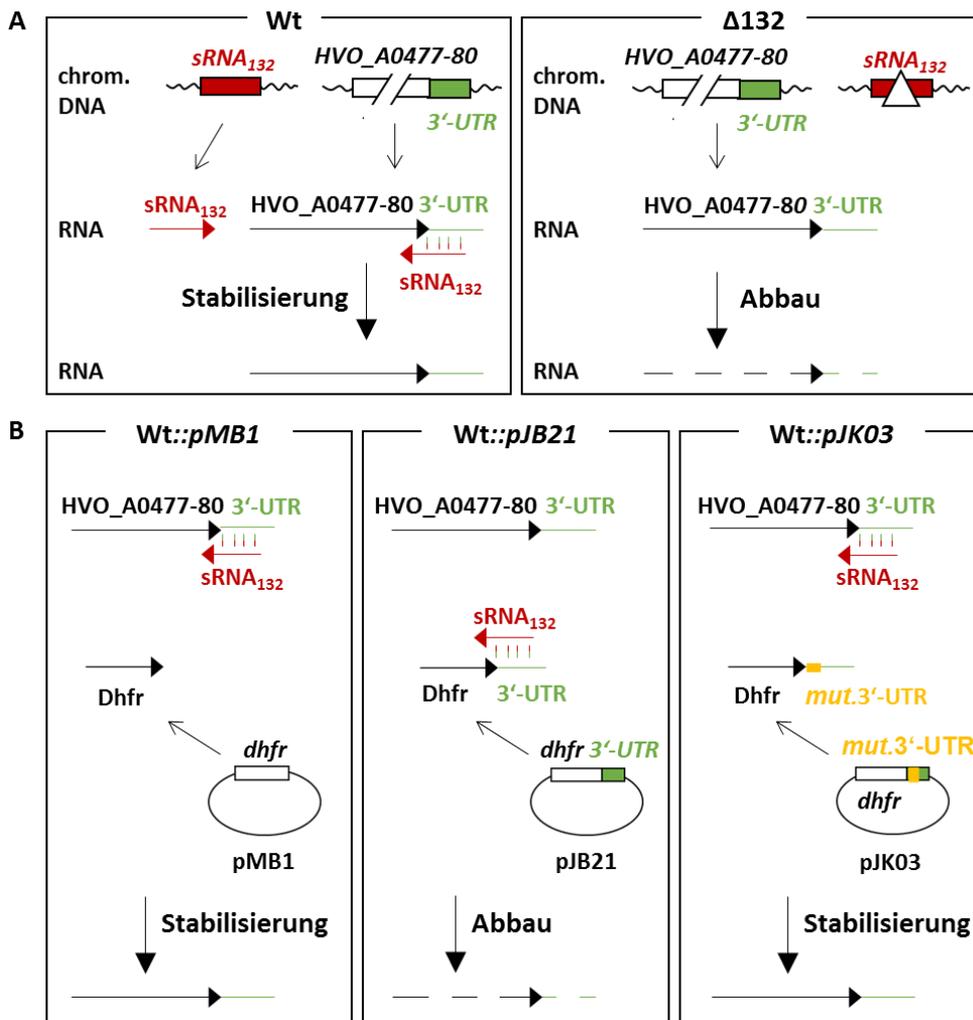


Abbildung 36: Schema für die Regulation durch Bindung von *sRNA₁₃₂* an die 3'-UTR der mRNA von *HVO_A0477-80*. **A.** Schema der Regulation in An- (Wt) und Abwesenheit ($\Delta 132$) von *sRNA₁₃₂*. Die Bindung der *sRNA* an die 3'-UTR führt zu einer Stabilisierung der mRNA. Ohne Bindung der 3'-UTR durch *sRNA₁₃₂* erfolgt der Abbau der mRNA. **B.** Schema für die Konkurrenz zwischen nativer und artifizierlicher 3'-UTR. Bei den Stämmen, transformiert mit den Reporter-gen-konstrukten pJK03 und pMB1, erfolgt eine Bindung der nativen 3'-UTR und eine Stabilisierung der mRNA. Bei dem Stamm transformiert mit dem Reporter-genkonstrukt pJB21 erfolgt eine Konkurrenz von nativer und artifizierlicher 3'-UTR. Aufgrund des Überschusses der artifizierlichen 3'-UTR erfolgt keine Bindung der nativen 3'-UTR und somit der Abbau der mRNA von *HVO_A0477-80*.

ihre Ziel-mRNA bestimmen, allerdings ist es wichtig bei solchen *in vitro*-Experimenten die physiologischen Bedingungen wie Temperatur, Salzgehalt oder RNA-Konzentrationen einzuhalten. Zudem spiegeln solche *in vitro*-Ansätze nicht die realen Bedingungen in der Zelle wieder, da für die Interaktion wichtige, zuvor unbekannte Proteine mit *sRNA* und/oder Ziel-mRNA wechselwirken können. Auch der Abbau durch RNasen kann eine wichtige Rolle spielen. Durch gezielte Zugabe von RNasen und Hfq zu *in vitro*-Ansätzen kann deren Einfluss auf die Translationsregulation der Ziel-mRNA aufgeklärt werden (Darfeuille *et al.*, 2007; Bandyra *et al.*, 2012). Solche *in vitro*-Methoden können wichtige Hinweise auf die Bindestelle und involvierte RNasen oder

Chaperone wie Hfq geben. Da jedoch weitere unbekannte Faktoren und die exakten physiologischen Bedingungen wichtig für die Translationsregulation sein können, bleibt der *in vivo*-Nachweis der sRNA-mRNA Regulation unerlässlich.

Eine weitere Möglichkeit zur experimentellen Zielgenidentifikation bieten Co-Immunopräzipitationen. Hierbei wird ein Antigen mit dem entsprechenden Antikörper aus einer Lösung aufgereinigt. Sm/LSm-Proteine bzw. das RNA-Chaperon Hfq vermitteln die Bindung kleiner RNAs an ihre Ziel-mRNA in Eukaryoten und Archaea bzw. in den meisten gram-negativen Bakterien. Durch Co-Immunopräzipitation können sRNAs und ihre direkten mRNA- und Proteininteraktionspartner aufgereinigt und mittels Sequenzierung bzw. Proteomics identifiziert werden. Die Co-Immunopräzipitation von Hfq führte beispielsweise in *E. coli* zur Identifikation von nahezu 300 Ziel-mRNAs und in *S. typhimurium* zur Identifikation von mehr als 700 Ziel-mRNAs (Sittka *et al.*, 2008; Bilusic *et al.*, 2014). In Archaea wurde ebenfalls eine Co-Immunopräzipitation mit dem LSm-Protein von *H. volcanii* durchgeführt. Hierbei wurden 20 sRNAs und 33 Proteine als Interaktionspartner identifiziert (Fischer *et al.*, 2010). Von den in dieser Doktorarbeit charakterisierten sRNAs zeigten sRNA₃₀, sRNA₁₃₂ und sRNA_{H225.2R} eine Interaktion mit dem LSm-Protein. Zusätzlich zu den identifizierten sRNAs wurde bei dieser Co-Immunopräzipitation eine Reihe von Proteinen, unter anderem Hitzeschockproteine, identifiziert. Dies unterstützt eine mögliche Involvierung der sRNA₃₀ in die Adaptation an Hitzestress.

Neben der Co-Immunopräzipitation mithilfe von RNA-bindenden Proteinen, können auch gezielt Interaktionspartner einer RNA identifiziert werden. Derzeit erfolgt die Präzipitation mittels biotinylierter sRNAs in *H. volcanii*, um mRNA- und Proteininteraktionspartner von sRNA₆₃ und sRNA₁₃₂ zu identifizieren und bereits identifizierte Interaktionspartner zu verifizieren (Kliemt *et al.*, unveröffentlichte Daten). Für das humanpathogene Epsilonproteobakterium *Helicobacter pylori* konnte durch die Ligation eines DNA-Aptamers an die sRNA HPnc6910, gefolgt von einer Massenspektrometrie, das Protein HP1334 als Interaktionspartner identifiziert werden (Rieder *et al.*, 2012). Da in *Helicobacter pylori*, ebenso wie in etwa 50% der Bakterien, das RNA-Chaperon Hfq fehlt (Rieder *et al.*, 2012), sind Hfq-unabhängige Methoden zur Identifikation von sRNA-Interaktionspartnern von großer Wichtigkeit.

6. PHOSPHATABHÄNGIGE REGULATION ZWEIER ABC-TRANSPORT-SYSTEME VON *HALOFERAX VOLCANII* DURCH sRNA₁₃₂

Die mittels RNomics identifizierte intergene sRNA₁₃₂ wurde bereits in vorherigen Arbeiten charakterisiert (Babski[Dissertation], 2013; Kliemt[Masterthesis], 2014). In diesen Versuchen wurde gezeigt, dass die Regulation des ABC-Transportsystems *HVO_A0477-80* durch sRNA₁₃₂ zudem phosphatabhängig ist. In dieser Arbeit wurde mithilfe von Northern Blot-Analysen der Zeitpunkt, zu dem der Unterschied des Transkriptlevels des ABC-Transporters *HVO_A0477-80* in An- und Abwesenheit von sRNA₁₃₂ maximal war, auf 30 Minuten nach vollständigen Phosphatentzug festgesetzt (s. Abbildung 26 und A3). Um einen Einblick in das Pho-Regulon von *H. volcanii* in Abhängigkeit von sRNA₁₃₂ zu gewinnen, wurden die zu diesem Zeitpunkt entnommenen RNA-Proben im DNA-Mikroarray verglichen (s. Tabelle 43 und 44). Insgesamt konnten dem Pho-Regulon 47 in An- und Abwesenheit von sRNA₁₃₂ differentiell regulierte Spots zugeordnet werden. Zu dem Pho-Regulon der sRNA₁₃₂ gehörten unter anderem der ABC-Transporter *HVO_A0477-80* und das Gen *HVO_2375*, welches für das SBP des ABC-Transporters *HVO_2375-8* kodiert. Beide ABC-Transporter sind für den Transport von anorganischem Phosphat annotiert und zeigten in Abwesenheit von sRNA₁₃₂ verringerte Transkriptlevel. Die Gensonde für *HVO_2375* befindet sich auf dem gleichen Spot wie der Phosphatregulator *phoU2*. Die Phosphatregulatoren *phoU1* und *phoU2* sind nur partiell auf den DNA-Mikroarray gedruckt und gemeinsam mit anderen Genen auf unterschiedlichen Spots vertreten. Die Phosphatregulatoren *phoU3* und *phoU4* sind nicht auf den DNA-Mikroarray gedruckt. In Abwesenheit von sRNA₁₃₂ konnte ebenfalls die verringerte Expression des SBPs des Glycerol-3-Phosphat-abhängigen ABC-Transporters *HVO_B0290-3* und mehrerer Kinasen gezeigt werden. Zudem waren in Abwesenheit der sRNA die Transkriptlevel von zwei Glycerolphosphat-Dehydrogenasen erhöht. Die Gene, die dem Pho-Regulon zugeordnet werden konnten, geben weitere Hinweise auf den wichtigen regulatorischen Einfluss von sRNA₁₃₂ auf die Adaptation von *H. volcanii* an Phosphatlimitierung. In *H. salinarum* wurde mittels DNA-Mikroarrays das Pho-Stimulon unter Phosphatlimitierung identifiziert. Zu diesem Pho-Stimulon gehören etwa 200 Gene, wovon 17 Gene unter Phosphatlimitierung eine mehr als 900-fache, differentielle Regulation zeigten (Wende *et al.*, 2009). Dem Pho-Stimulon wurde unter anderem das ABC-Transportsystem *pst1*, der Glycerol-3-Phosphat-Transporter *ugp*, die

alkalische Phosphatase und drei PhoU-Proteine zugeordnet. Der ABC-Transporter *HVO_A0477-80 (pst2)* von *H. volcanii* ist homolog zu dem hoch-affinen ABC-Transporter *pst1* von *H. salinarum* und gehörte in Abwesenheit von *sRNA₁₃₂* zu den am stärksten regulierten Genen. Der zu dem zweiten ABC-Transporter *HVO_2375-8 (pst1)* homologe ABC-Transporter *pst2* von *H. salinarum* ist niederaffin und war unter Phosphatlimitierung nur schwach exprimiert (Wende *et al.*, 2009). Bei dem in dieser Arbeit identifizierten Pho-Regulon der *sRNA₁₃₂* zeigte der ABC-Transporter *HVO_2375-8* ebenfalls eine geringere differentielle Regulation als der ABC-Transporter *HVO_A0477-80*. Der Glycerol-3-Phosphat-Transporter *ugp* von *H. salinarum* ist homolog zu dem Transporter *HVO_B0270-3* von *H. volcanii*, der dem Pho-Regulon der *sRNA₁₃₂* angehört. Desweiteren konnten Homologe der Phosphatregulatoren von *H. volcanii* dem Pho-Stimulon von *H. salinarum* zugeordnet werden. Um die Involvierung der Phosphatregulatoren in das Pho-Regulon von *H. volcanii* zu überprüfen, sollte in zukünftigen Experimenten ihre Expression in An- und Abwesenheit von *sRNA₁₃₂* mittels Northern Blot analysiert werden.

In nachfolgenden Northern Blot-Analysen wurde der aktivierende Einfluss von *sRNA₁₃₂* auf die Expression beider ABC-Transporter gezeigt und ihre phosphatabhängige Regulation verifiziert (s. Abbildung 30 und 31). Insbesondere bei niedrigen, wachstumslimitierenden Phosphatkonzentrationen zeigen sowohl *sRNA₁₃₂* als auch der ABC-Transporter *HVO_A0477-80* eine stark erhöhte Expression. Die Induktionskinetik nach Phosphatentzug zeigt ganz deutlich, dass in Abwesenheit von *sRNA₁₃₂* eine stark zeitverzögerte Expression des ABC-Transporters *HVO_A0477-80* stattfindet (s. Abbildung 25). Dies zeigt, dass es noch weitere Mechanismen zur Regulation dieses ABC-Transporters gibt und *sRNA₁₃₂* eine wichtige Rolle bei der ersten, schnellen Regulation spielt. Aufgrund der enormen Bedeutung von Phosphat für die Zelle unterliegt die Phosphataufnahme vermutlich weiteren regulatorischen Mechanismen. Möglicherweise durch die phosphatabhängige Expression von Transkriptionsfaktoren. Eine solche proteinbasierte Regulation könnte die verlangsamte Induktion der Expression des ABC-Transporters *HVO_A0477-80* in Abwesenheit der *sRNA₁₃₂* erklären. Während *sRNA₁₃₂* von *H. volcanii* unter Phosphatmangel eine stark erhöhte Expression zeigte (s. IV.4.2.1), führte eine Phosphatlimitierung zur verringerten Expression der

sRNA 257₁ in *S. solfataricus* (Märtens *et al.*, 2013). Zudem konnte gezeigt werden, dass sRNA 257₁ in die Repression eines phosphatabhängigen ABC-Transporters involviert ist.

In konkurrierenden Wachstumsversuchen des Wildtyps verglichen mit den jeweiligen Deletionsmutanten der ABC-Transporter *HVO_A0477-80* bzw. *HVO_2375-8* unter phosphatlimitierenden Bedingungen, setzte sich jeweils der Wildtyp mit dem intakten ABC-Transportsystem gegen die Deletionsmutante durch (s. Abbildung 31). Dies unterstreicht die Bedeutung dieser Transportsysteme für die Anpassung an geringe Phosphatkonzentrationen. In dem konkurrierenden Wachstumsversuch mit der Deletionsmutante des ABC-Transportsystems *HVO_A0477-80* setzen sich gegen Ende des Versuchs zu 91% die Wildtyp-Kolonien durch (s. Abbildung 32.A). Im Vergleich dazu führte die Deletion des ABC-Transportsystems *HVO_2375-8* ebenfalls zu einem Wachstumsvorteil des Wildtyp-Stammes. Dieser nahm zum Versuchsende 77% aller Kolonien ein (s. Abbildung 32.B). Wie bereits weiter oben erwähnt, besitzt der zum ABC-Transportsystem *HVO_A0477-80* von *H. volcanii* homologe ABC-Transporter Pst1 in *H. salinarum* eine höhere Phosphataffinität als dessen zweites ABC-Transportsystem Pst2 (Furtwängler *et al.*, 2010). Die konkurrierenden Wachstumsversuche zeigen, dass beide Transportsysteme eine wichtige Rolle für *H. volcanii* unter phosphatlimitierenden Bedingungen einnehmen.

In *H. salinarum* konnte die Bedeutung der Anwesenheit *cis*-aktiver Elemente für die phosphatabhängige Promotoraktivität der ABC-Transportsysteme *pst1* und *pst2* gezeigt werden (Furtwängler *et al.*, 2010). Diese P-Boxen bestehen aus AT-reichen Regionen stromaufwärts der Promotorelemente und wurden auch für den ABC-Transporter *ugp* identifiziert. In dieser Arbeit wurde die Konservierung der Promotorbereiche der ABC-Transporter *HVO_A0477-80* und *HVO_2375-8* und der sRNA₁₃₂ überprüft. Neben den konservierten Promotorelementen TATA-Box, -10- und in einem Fall des BR-Elements, enthielten diese drei Promotorregionen konservierte, AT-reiche Bereiche stromaufwärts der Promotorelemente. In nachfolgenden Versuchen wurde die phosphatabhängige Regulation putativer P-Boxen im Promotorbereich von sRNA₁₃₂ und des ABC-Transporters *HVO_A0477-80* von *H. volcanii* überprüft. Für die getesteten Promotorbereiche mit einer Länge von 150 nt konnten keine *cis*-aktiven Elemente identifiziert werden (Jana Kliemt, persönliche Kommunikation).

sRNA₁₃₂ besitzt einen aktivierenden regulatorischen Einfluss auf ABC-Transportsysteme zur Aufnahme von Phosphat aus der Umgebung und spielt somit eine wichtige Rolle unter phosphatlimitierenden Bedingungen. Um einen weiteren Einblick in die phosphatabhängige Regulation von sRNA₁₃₂ zu erhalten, könnte in zukünftigen Experimenten der Einfluss der sRNA₁₃₂ auf das ABC-Transportsystem *HVO_2375-8* und auf die Phosphatregulatoren PhoU1-4 untersucht werden.

7. ZIELE, WIRKWEISEN UND BEDEUTUNG ARCHAELER SRNAS

In allen drei Domänen des Lebens nehmen sRNAs als Translationsregulatoren eine wichtige Rolle ein. In Archaea wurden bisher nur in *M. mazei*, *S. solfataricus* und *Pyrobaculum* spp. Ziel-mRNAs kleiner sRNAs identifiziert. sRNA₁₆₂ von *M. mazei* reguliert durch Bindung ihres 5'-Bereichs an die Ribosomenbindestelle ihrer Ziel-mRNAs (Jäger *et al.*, 2012). Hierbei fungiert sie sowohl als *cis*-kodierte antisense RNA, als auch als *trans*-kodierte sRNA in der Translationsregulation ihrer Ziel-mRNAs MM2442 und MM2441. Die Mehrheit aller Transkripte von *M. mazei* besitzen lange 5'-UTRs (Jäger *et al.*, 2009). Somit ist eine translationale Regulation über die 5'-UTR sehr wahrscheinlich. Dies ähnelt der Regulation durch bakterielle sRNAs, die hauptsächlich durch Bindung der sRNA an die 5'-UTR stattfindet. Meist erfolgt durch Maskierung der Ribosomenbindestelle die Repression der Translation oder die Regulation der Stabilität der mRNA (Waters und Storz, 2009). Die Bindung der sRNA an sogenannte Enhancer-Elemente stromaufwärts der Shine Dalgarno (SD)-Sequenz kann wie im Falle der sRNA GcvB von *S. typhimurium* zur einer Repression der Translation führen (Sharma *et al.*, 2007). Eine weitere Möglichkeit ist eine Bindung an die kodierende Region der mRNA oder an die 3'-UTR. Dies resultiert oftmals in einer Aktivierung der Ziel-mRNA. Zudem können zwei Regionen innerhalb einer sRNA zwei verschiedene Ziel-mRNAs binden (Lease, 1998).

Im Gegensatz zu den Transkripten in *M. mazei* besitzen die Transkripte vieler anderer Archaea wie zum Beispiel *H. volcanii*, *H. salinarum*, *S. solfataricus* oder *Pyrobaculum aerophilum* in der Regel keine oder nur sehr kurze 5'-UTRs (Slupska *et al.*, 2001; Brenneis *et al.*, 2007; Wurtzel *et al.*, 2010). Dies würde eher für eine Bindung im ORF oder an die 3'-UTR der Ziel-mRNA sprechen. Bei *H. salinarum* und *H. volcanii* ist die Richtung der Translationsregulation in der 3'-UTR, nicht aber in der 5'-UTR, kodiert (Brenneis und

Soppa, 2009). Zudem besitzen 72% der proteinkodierenden Transkripte von *H. volcanii* keine 5'-UTR (Babski *et al.*, 2016). Da die Mehrheit aller Transkripte keine 5'-UTR besitzt und die SD-Sequenz nicht wichtig für die Translationsinitiation ist (Kramer *et al.*, 2014), wird eine translationale Regulation über die Bindung der 3'-UTR von Ziel-mRNAs durch haloarchaeale sRNAs sehr wahrscheinlich. Eine komparative RNA-Sequenzierung von vier *Pyrobaculum* Spezies führte zur Identifikation der 65 nt großen Antisense RNA asR3, die komplementär zu einem Sekundärelement in der 3'-UTR der Triosephosphat-Isomerase ist und diese möglicherweise reguliert (Bernick *et al.*, 2012). In *S. solfataricus* wurde unter Phosphatmangel die verstärkte Expression der sRNAs RNA257₁₋₄ und gleichzeitig die Reduktion der mRNA 1183 beobachtet (Märtens *et al.*, 2013). Zudem konnte gezeigt werden, dass die 3'-UTR von mRNA1183 wichtig für die Repression der mRNA ist. *In vitro* führte die Duplexbildung der RNA257₁ mit der 3'-UTR zum Abbau der mRNA1183. Auch in *H. volcanii* konnte mithilfe einer *in silico*-Analyse der sRNA₁₃₂ eine nahezu perfekte Bindestelle über 20 bp in der 3'-UTR des ABC-Transporters *HVO_A0477-80* identifiziert werden (s. Abbildung 3). In dieser Arbeit konnte die Induktion des ABC-Transporters *HVO_A0477-80* und der sRNA₁₃₂ durch Phosphatmangel *in vivo* gezeigt werden (s. Abbildung 25). Die nahezu perfekte Komplementarität der sRNA zu der 3'-UTR und die Konkurrenz der nativen 3'-UTR von *HVO_A0477-80* mit der artifiziellen 3'-UTR des extrachromosomalen DHFR-Konstrukts pJB21 legen eine Interaktion von sRNA₁₃₂ mit der 3'-UTR der polycistronischen mRNA von *HVO_A0477-80* nahe (s. Abbildung 28). Obwohl sich der Nachweis der sRNA-Bindung *in vivo* als schwierig erwiesen hat, könnte eine Wiederholung der Reporterassays mit dem natürlichen Promotor zum Erfolg führen. In dieser Arbeit wurde das Deletionsplasmid zur Herstellung einer Mutante mit der Deletion der sRNA-Bindestelle in der 3'-UTR des ABC-Transporters *HVO_A0477-80* erstellt (Daten nicht gezeigt). Mithilfe dieser Mutante könnte ebenfalls der *in vivo*-Nachweis anhand einer verringerten Expression des ABC-Transporters *HVO_A0477-80* im Vergleich zum Wildtyp mittels Northern Blot-Analyse erbracht werden. Eine zusätzliche Verifikation könnte mithilfe einer kompensatorischen Mutation, durch die die Expression wieder auf Wildtyp-Niveau angehoben werden könnte, erfolgen. Die Regulation von sRNAs über die Bindung der 3'-UTR ist sehr ähnlich zu eukaryotischen kleinen RNAs. Diese regulieren die Translation ihrer Ziel-mRNA(s) über Bindung an deren 3'-UTR (Huang *et al.*, 2013). In der Regel erfolgt der Abbau oder

die translationale Repression der Ziel-mRNA (Bartel, 2009). Zum Beispiel reprimiert die miRNA miR-34a die Expression von Survivin, einem Inhibitor der Apoptose, über die Bindung an dessen 3'-UTR (Huang *et al.*, 2015).

Bisher wurde der Mechanismus zur Translationsregulation durch archaeale sRNAs nicht näher erforscht. Im Falle der sRNA₁₃₂ ist eine Stabilisierung der Ziel-mRNA *HVO_A0477-80* durch direkte Bindung an die 3'-UTR sehr wahrscheinlich. Bei Bakterien erfolgt eine Aktivierung von Ziel-mRNAs beispielsweise durch die Bindung der sRNA an Attenuatorelemente wie Haarnadelstrukturen. Diese Bindung resultiert in einer Freilegung der Ribosomenbindestelle (Majdalani *et al.*, 2002; Brantl, 2015). Die sRNA DsrA bindet an eine selbst-inhibitorische Haarnadelstruktur der *rpoS*-mRNA und führt so zur Aktivierung der Translation über die Freilegung der Ribosomenbindestelle (Fröhlich und Vogel, 2009). Ein Beispiel für eine sRNA-basierte Stabilisierung ist die sRNA GadY von *E. coli*. Die Bindung von GadY an die 3'-UTR von *gadX* verhindert deren Abbau durch RNasen (Opdyke *et al.*, 2004).

sRNAs spielen eine große Rolle bei der Translationsregulation. Gegenüber regulatorischer Proteine wie Transkriptionsfaktoren haben sie den Vorteil einer schnelleren und weniger energieaufwändigen post-translationalen Regulation (Levine und Hwa, 2008). Bakterielle sRNAs erfüllen ihre Funktion im sogenannten „Fine-Tuning“ der post-translationalen Regulation (Shimoni *et al.*, 2007). Im Vergleich zu sRNAs sind Transkriptionsfaktoren gegenüber transkriptionellem Rauschen nicht sensitiv genug (Wagner und Romby, 2015). Die entstehende Ultrasensitivität von sRNAs nahe eines Schwellenwerts erschwert die Forschung und könnte Zell-Zell-Unterschiede und phänotypische Heterogenität erklären. Die differentielle Regulation von Genen mit gleichem transkriptionellem Ursprung, d.h. von Genen eines Genclusters, wird durch sRNAs ermöglicht. Zum Beispiel erfolgt eine differentielle Regulation der Gene des Galactose-Operons durch die sRNA Spot42 (Møller *et al.*, 2002). Ein großer Vorteil der sRNA-Regulation wird auch durch das sogenannte „Multi-Targeting“ erreicht. Zum Beispiel reguliert die sRNA RhyB aus *E. coli* mindestens 16 Gene (Papenfert und Vogel, 2009). Bei Bakterien ist etwa 80-95% der DNA proteinkodierend, nur etwa 1% des Genoms besteht aus nicht-kodierenden RNAs wie zum Beispiel rRNAs, tRNAs oder sRNAs (Mattick, 2004). Dies erhöht die Bedeutung eines „Multi-Targeting“ für bakterielle

sRNAs. Aktuelle Sequenzierungen konnten zeigen, dass der nicht-kodierende Anteil der translatierten RNA sehr hoch ist. In Vollmedium werden 47% aller annotierten, proteinkodierenden Gene von *H. volcanii* translatiert (Babski *et al.*, 2016). Dies entspricht jedoch nur 39% aller identifizierten TSS, während 61% nicht-kodierenden RNAs zugeordnet werden konnten. Der enorme Einfluss der nicht-kodierenden RNAs wird in Anbetracht des Transkriptoms im Vergleich zum Translatom (Proteom) besonders deutlich (vgl. Abbildung 37 entnommen aus Diederichs (2010)). Mehr als 85% des menschlichen Genoms werden in RNA transkribiert, weniger als 3% davon werden jedoch in Proteine translatiert (Hangauer *et al.*, 2013). Dies zeigt, dass die Mehrheit der RNA nicht aus Boten-mRNA, sondern aus nicht-kodierender RNA wie kleine RNAs, rRNAs, tRNAs, usw. besteht. Daraus lässt sich jedoch auch die erforderliche Sensitivität kleiner RNAs ableiten, die trotz der enormen RNA-Menge (transkriptionelles Rauschen) ihre regulatorische Funktion gezieht und äußerst spezifisch erfüllen.

In einer neuen dRNA-Seq-Studie von Babski *et al.* (2016) wurde die bisher angenommene Zahl von etwa 200 intergenen sRNAs in *H. volcanii* dramatisch nach oben korrigiert. Insgesamt erhöhte sich die Anzahl intergener sRNAs auf 395 und die

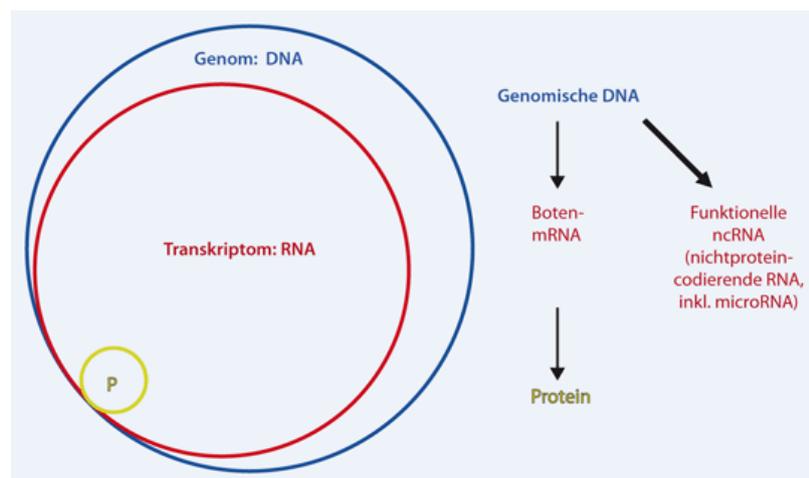


Abbildung 37: Informationsgehalt des humanen Genoms. Das gesamte Genom (blau) in Relation zu dem Transkriptom (rot) und dem Proteom (gelb). Entnommen aus Diederichs (2010).

der *cis*-Antisense RNAs auf 1244. Die große Anzahl an sRNAs und ihre Involvierung in eine Reihe von biologischen Funktionen wie Stickstofffixierung und Phosphatlimitierung unterstreichen ihre enorme Bedeutung für *H. volcanii*. Die Identifikation von Ziel-mRNAs und die Erforschung von Wirkweisen archaealer sRNAs bleibt weiterhin eine Herausforderung und stellt auch in Zukunft ein interessantes Forschungsgebiet dar.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

Albers S, Jarrell KF. (2015) The archaellum: how Archaea swim. *Frontiers in Microbiology*. **6**: 23.

Albers S, Meyer BH. (2011) The archaeal cell envelope. *Nature Reviews Microbiology*. **9**: 414–426.

Allers T, Barak S, Liddell S, Wardell K, Mevarech M. (2010) Improved strains and plasmid vectors for conditional overexpression of His-tagged proteins in *Haloferax volcanii*. *Applied and Environmental Microbiology*. **76**: 1759–1769.

Allers T, Mevarech M. (2005) Archaeal genetics - the third way. *Nature Reviews Genetics*. **6**: 58–73.

Allers T, Ngo H, Mevarech M, Lloyd RG. (2004) Development of additional selectable markers for the halophilic archaeon *Haloferax volcanii* based on the *leuB* and *trpA* genes. *Applied and Environmental Microbiology*. **70**: 943–953.

Ansong C, Yoon H, Porwollik S, Mottaz-Brewer H, Petritis BO, Jaitly N, Adkins JN, McClelland M, Heffron F, Smith RD. (2009) Global systems-level analysis of Hfq and SmpB deletion mutants in *Salmonella*: implications for virulence and global protein translation. *PLoS ONE*. **4**: e4809.

Auesukaree C, Homma T, Tochio H, Shirakawa M, Kaneko Y, Harashima S. (2004) Intracellular phosphate serves as a signal for the regulation of the PHO pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*. **279**: 17289–17294.

Babitzke P, Romeo T. (2007) CsrB sRNA family: sequestration of RNA-binding regulatory proteins. *Current Opinion in Microbiology*. **10**: 156–163.

Babski J. (2013) Identification and characterization of small non-coding regulatory RNAs (sRNAs) in the halophilic Archaeon *Haloferax volcanii*. [Dissertation], Goethe-Universität, Frankfurt am Main.

Babski J, Haas KA, Näther-Schindler D, Pfeiffer F, Forstner KU, Hammelmann M, Hilker R, Becker A, Sharma CM, Marchfelder A, Soppa J. (2016) Genome-wide identification of transcriptional start sites in the haloarchaeon *Haloferax volcanii* based on differential RNA-Seq (dRNA-Seq). *BMC Genomics*. **17**: 629.

Babski J, Maier L, Heyer R, Jaschinski K, Prasse D, Jäger D, Randau L, Schmitz RA, Marchfelder A, Soppa J. (2014) Small regulatory RNAs in Archaea. *RNA Biology*. **11**: 484–493.

Babski J, Tjaden B, Voss B, Jellen-Ritter A, Marchfelder A, Hess WR, Soppa J. (2011) Bioinformatic prediction and experimental verification of sRNAs in the haloarchaeon *Haloferax volcanii*. *RNA Biology*. **8**: 806–816.

Bachellerie JP, Cavallé J, Hüttenhofer A. (2002) The expanding snoRNA world. *Biochimie*. **84**: 775–790.

Backofen R, Hess WR. (2010) Computational prediction of sRNAs and their targets in bacteria. *RNA Biology*. **7**: 33–42.

- Bandyra KJ, Said N, Pfeiffer V, Gorna MW, Vogel J, Luisi BF. (2012)** The seed region of a small RNA drives the controlled destruction of the target mRNA by the endoribonuclease RNase E. *Molecular Cell*. **47**: 943–953.
- Bang C, Schmitz RA. (2015)** Archaea associated with human surfaces: not to be underestimated. *FEMS Microbiology Reviews*. **39**: 631–648.
- Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath P. (2007)** CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*. **315**: 1709–1712.
- Bartel DP. (2009)** MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. **136**: 215–233.
- Beisel CL, Storz G. (2010)** Base pairing small RNAs and their roles in global regulatory networks. *FEMS Microbiology Reviews*. **34**: 866–882.
- Bernick DL, Dennis PP, Lui LM, Lowe TM. (2012)** Diversity of Antisense and Other Non-Coding RNAs in Archaea Revealed by Comparative Small RNA Sequencing in Four *Pyrobaculum* Species. *Frontiers in Microbiology*. **3**: 231.
- Betel D, Wilson M, Gabow A, Marks DS, Sander C. (2008)** The microRNA.org resource: targets and expression. *Nucleic Acids Research*. **36**: D149–53.
- Bilusic I, Popitsch N, Rescheneder P, Schroeder R, Lybecker M. (2014)** Revisiting the coding potential of the *E. coli* genome through Hfq co-immunoprecipitation. *RNA Biology*. **11**: 641–654.
- Bitan-Banin G, Ortenberg R, Mevarech M. (2003)** Development of a gene knockout system for the halophilic archaeon *Haloferax volcanii* by use of the *pyrE* gene. *Journal of Bacteriology*. **185**: 772–778.
- Borges F, Martienssen RA. (2015)** The expanding world of small RNAs in plants. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. **16**: 727–741.
- Boucher Y, Kamekura M, Doolittle WF. (2004)** Origins and evolution of isoprenoid lipid biosynthesis in archaea. *Molecular Microbiology*. **52**: 515–527.
- Brantl S. (2007)** Regulatory mechanisms employed by *cis*-encoded antisense RNAs. *Current Opinion in Microbiology*. **10**: 102–109.
- Brantl S. (2015)** Antisense-RNA mediated control of plasmid replication - pIP501 revisited. *Plasmid*. **78**: 4–16.
- Bräsen C, Schönheit P. (2001)** Mechanisms of acetate formation and acetate activation in halophilic archaea. *Archives of Microbiology*. **175**: 360–368.
- Bratkovic T, Rogelj B. (2014)** The many faces of small nucleolar RNAs. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1839**: 438–443.
- Brenneis M, Hering O, Lange C, Soppa J. (2007)** Experimental characterization of *cis*-acting elements important for translation and transcription in halophilic archaea. *PLoS Genetics*. **3**: e229.
- Brenneis M, Soppa J. (2009)** Regulation of translation in haloarchaea: 5'- and 3'-UTRs are essential and have to functionally interact *in vivo*. *PLoS ONE*. **4**: e4484.

Caetano-Anolles G, Nasir A, Zhou K, Caetano-Anolles D, Mittenthal JE, Sun F, Kim KM. (2014) Archaea: the first domain of diversified life. *Archaea*. **2014**: 590214.

Castel SE, Martienssen RA. (2013) RNA interference in the nucleus: roles for small RNAs in transcription, epigenetics and beyond. *Nature Reviews Genetics*. **14**: 100–112.

Cavicchioli R, Curmi PMG, Saunders N, Thomas T. (2003) Pathogenic archaea: do they exist? *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*. **25**: 1119–1128.

Chakraborty K. (2001) Translational regulation by ABC systems. *Research in Microbiology*. **152**: 391–399.

Chan PP, Holmes AD, Smith AM, Tran D, Lowe TM. (2012) The UCSC Archaeal Genome Browser: 2012 update. *Nucleic Acids Research*. **40**: D646–52.

Choi YJ, Lin C, Ho JJ, He X, Okada N, Bu P, Zhong Y, Kim SY, Bennett MJ, Chen C, Ozturk A, Hicks GG, Hannon GJ, He L. (2011) miR-34 miRNAs provide a barrier for somatic cell reprogramming. *Nature Cell Biology*. **13**: 1353–1360.

Collins BM, Harrop SJ, Kornfeld GD, Dawes IW, Curmi PM, Mabbutt BC. (2001) Crystal structure of a heptameric Sm-like protein complex from archaea: implications for the structure and evolution of snRNPs. *Journal of Molecular Biology*. **309**: 915–923.

Conter A, Gangneux C, Suzanne M, Gutierrez C. (2001) Survival of *Escherichia coli* during long-term starvation: effects of aeration, NaCl, and the *rpoS* and *osmC* gene products. *Research in Microbiology*. **152**: 17–26.

Cuperus JT, Fahlgren N, Carrington JC. (2011) Evolution and functional diversification of MIRNA genes. *The Plant Cell*. **23**: 431–442.

Danner S, Soppa J. (1996) Characterization of the distal promoter element of halobacteria *in vivo* using saturation mutagenesis and selection. *Molecular Microbiology*. **19**: 1265–1276.

Darfeuille F, Unoson C, Vogel J, Wagner EGH. (2007) An antisense RNA inhibits translation by competing with standby ribosomes. *Molecular Cell*. **26**: 381–392.

Davidson AL, Dassa E, Orelle C, Chen J. (2008) Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **72**: 317–64, table of contents.

De Lay N, Gottesman S. (2012) A complex network of small non-coding RNAs regulate motility in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*. **86**: 524–538.

Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R. (2001) The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Research*. **11**: 1156–1166.

DeLong EF, Pace NR. (2001) Environmental diversity of bacteria and archaea. *Systematic Biology*. **50**: 470–478.

Dennis PP, Omer A. (2005) Small non-coding RNAs in Archaea. *Current Opinion in Microbiology*. **8**: 685–694.

Dennis PP, Omer A, Lowe T. (2001) A guided tour: small RNA function in Archaea. *Molecular Microbiology*. **40**: 509–519.

Diederichs S. (2010) Nichtcodierende RNA in malignen Tumoren. Eine neue Welt von Tumor-Biomarkern und Zielstrukturen in Krebszellen. *Der Pathologe*. **31**: 258–262.

Dower WJ, Miller JF, Ragsdale CW. (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Research*. **16**: 6127–6145.

Duker AL, Ballif BC, Bawle EV, Person RE, Mahadevan S, Alliman S, Thompson R, Traylor R, Bejjani BA, Shaffer LG, Rosenfeld JA, Lamb AN, Sahoo T. (2010) Paternally inherited microdeletion at 15q11.2 confirms a significant role for the SNORD116 C/D box snoRNA cluster in Prader-Willi syndrome. *European Journal of Human Genetics*. **18**: 1196–1201.

Eddy SR. (2002) Computational genomics of noncoding RNA genes. *Cell*. **109**: 137–140.

Edgell DR, Doolittle WF. (1997) Archaea and the origin(s) of DNA replication proteins. *Cell*. **89**: 995–998.

Ehlers C, Jäger D, Schmitz RA. (2011) Establishing a markerless genetic exchange system for *Methanosarcina mazei* strain Gö1 for constructing chromosomal mutants of small RNA genes. *Archaea*. **2011**: 439608.

Eme L, Doolittle WF. (2015) Archaea. *Current Biology: CB*. **25**: R851-5.

Fischer S, Benz J, Späth B, Maier L, Straub J, Granzow M, Raabe M, Urlaub H, Hoffmann J, Brutschy B, Allers T, Soppa J, Marchfelder A. (2010) The archaeal Lsm protein binds to small RNAs. *The Journal of Biological Chemistry*. **285**: 34429–34438.

Folichon M, Allemand F, Regnier P, Hajnsdorf E. (2005) Stimulation of poly(A) synthesis by *Escherichia coli* poly(A)polymerase I is correlated with Hfq binding to poly(A) tails. *The FEBS Journal*. **272**: 454–463.

Forterre P. (2013) The common ancestor of archaea and eukarya was not an archaeon. *Archaea*. **2013**: 372396.

Forterre P, Brochier C, Philippe H. (2002) Evolution of the Archaea. *Theoretical Population Biology*. **61**: 409–422.

Fox GE, Magrum LJ, Balch WE, Wolfe RS, Woese CR. (1977) Classification of methanogenic bacteria by 16S ribosomal RNA characterization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. **74**: 4537–4541.

Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. (2009) Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Research*. **19**: 92–105.

Fröhlich KS, Vogel J. (2009) Activation of gene expression by small RNA. *Current Opinion in Microbiology*. **12**: 674–682.

Fuentes DN, Calderon PF, Acuna LG, Rodas PI, Paredes-Sabja D, Fuentes JA, Gil F, Calderon IL. (2015) Motility modulation by the small non-coding RNA SroC in *Salmonella Typhimurium*. *FEMS Microbiology Letters*. **362**: fnv135.

- Furtwängler K, Tarasov V, Wende A, Schwarz C, Oesterhelt D. (2010)** Regulation of phosphate uptake via Pst transporters in *Halobacterium salinarum* R1. *Molecular Microbiology*. **76**: 378–392.
- Gaspin C, Cavaille J, Erauso G, Bachelier JP. (2000)** Archaeal homologs of eukaryotic methylation guide small nucleolar RNAs: lessons from the *Pyrococcus* genomes. *Journal of Molecular Biology*. **297**: 895–906.
- Gebetsberger J, Polacek N. (2013)** Slicing tRNAs to boost functional ncRNA diversity. *RNA Biology*. **10**: 1798–1806.
- Gehrke S, Imai Y, Sokol N, Lu B. (2010)** Pathogenic LRRK2 negatively regulates microRNA-mediated translational repression. *Nature*. **466**: 637–641.
- Georg J, Hess WR. (2011)** Regulatory RNAs in cyanobacteria: developmental decisions, stress responses and a plethora of chromosomally encoded *cis*-antisense RNAs. *Biological Chemistry*. **392**: 291–297.
- Goosen N, Moolenaar GF. (2001)** Role of ATP hydrolysis by UvrA and UvrB during nucleotide excision repair. *Research in Microbiology*. **152**: 401–409.
- Gottesman S. (2004)** The small RNA regulators of *Escherichia coli*: roles and mechanisms*. *Annual Review of Microbiology*. **58**: 303–328.
- Gottesman S, Storz G. (2011)** Bacterial small RNA regulators: versatile roles and rapidly evolving variations. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. **3**.
- Gouy M, Guindon S, Gascuel O. (2010)** SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular Biology and Evolution*. **27**: 221–224.
- Guillier M, Gottesman S. (2006)** Remodelling of the *Escherichia coli* outer membrane by two small regulatory RNAs. *Molecular Microbiology*. **59**: 231–247.
- Guisbert E, Rhodius VA, Ahuja N, Witkin E, Gross CA. (2007)** Hfq modulates the σ E-mediated envelope stress response and the σ 32-mediated cytoplasmic stress response in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. **189**: 1963–1973.
- Ha M, Kim VN. (2014)** Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. **15**: 509–524.
- Hammann P, Parmentier D, Cerciat M, Reimegard J, Helfer A, Boisset S, Guillier M, Vandenesch F, Wagner EGH, Romby P, Fechter P. (2014)** A method to map changes in bacterial surface composition induced by regulatory RNAs in *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Biochimie*. **106**: 175–179.
- Hammelmann M, Soppa J. (2008)** Optimized generation of vectors for the construction of *Haloferax volcanii* deletion mutants. *Journal of Microbiological Methods*. **75**: 201–204.
- Hammer BK, Bassler BL. (2007)** Regulatory small RNAs circumvent the conventional quorum sensing pathway in pandemic *Vibrio cholerae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. **104**: 11145–11149.
- Hämmerle H, Amman F, Vecerek B, Stulke J, Hofacker I, Bläsi U. (2014)** Impact of Hfq on the *Bacillus subtilis* transcriptome. *PLoS ONE*. **9**: e98661.

- Hanahan D. (1983)** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*. **166**: 557–580.
- Hangauer MJ, Vaughn IW, McManus MT. (2013)** Pervasive transcription of the human genome produces thousands of previously unidentified long intergenic noncoding RNAs. *PLoS Genetics*. **9**: e1003569.
- Hartman AL, Norais C, Badger JH, Delmas S, Haldenby S, Madupu R, Robinson J, Khouri H, Ren Q, Lowe TM, Maupin-Furlow J, Pohlschroder M, Daniels C, Pfeiffer F, Allers T, Eisen JA. (2010)** The complete genome sequence of *Haloferax volcanii* DS2, a model archaeon. *PLoS ONE*. **5**: e9605.
- He L, Thomson JM, Hemann MT, Hernando-Monge E, Mu D, Goodson S, Powers S, Cordon-Cardo C, Lowe SW, Hannon GJ, Hammond SM. (2005)** A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature*. **435**: 828–833.
- Henderson CA, Vincent HA, Casamento A, Stone CM, Phillips JO, Cary PD, Sobott F, Gowers DM, Taylor JE, Callaghan AJ. (2013)** Hfq binding changes the structure of *Escherichia coli* small noncoding RNAs OxyS and RprA, which are involved in the riboregulation of *rpoS*. *RNA*. **19**: 1089–1104.
- Hermann H, Fabrizio P, Raker VA, Foulaki K, Hornig H, Brahms H, Luhrmann R. (1995)** snRNP Sm proteins share two evolutionarily conserved sequence motifs which are involved in Sm protein-protein interactions. *The EMBO Journal*. **14**: 2076–2088.
- Hess WR, Berghoff BA, Wilde A, Steglich C, Klug G. (2014)** Riboregulators and the role of Hfq in photosynthetic bacteria. *RNA Biology*. **11**: 413–426.
- Heyer R, Dörr M, Jellen-Ritter A, Späth B, Babski J, Jaschinski K, Soppa J, Marchfelder A. (2012)** High throughput sequencing reveals a plethora of small RNAs including tRNA derived fragments in *Haloferax volcanii*. *RNA Biology*. **9**: 1011–1018.
- Hirata A, Klein BJ, Murakami KS. (2008)** The X-ray crystal structure of RNA polymerase from Archaea. *Nature*. **451**: 851–854.
- Horikoshi K. (1999)** Alkaliphiles: some applications of their products for biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **63**: 735-50, table of contents.
- Hsieh Y, Wanner BL. (2010)** Global regulation by the seven-component Pi signaling system. *Current Opinion in Microbiology*. **13**: 198–203.
- Huang J, Lyu H, Wang J, Liu B. (2015)** MicroRNA regulation and therapeutic targeting of survivin in cancer. *American Journal of Cancer Research*. **5**: 20–31.
- Huang Y, Zhang JL, Yu XL, Xu TS, Wang ZB, Cheng XC. (2013)** Molecular functions of small regulatory noncoding RNA. *Biochemistry (Mosc)*. **78**: 221–230.
- Huarte M, Guttman M, Feldser D, Garber M, Koziol MJ, Kenzelmann-Broz D, Khalil AM, Zuk O, Amit I, Rabani M, Attardi LD, Regev A, Lander ES, Jacks T, Rinn JL. (2010)** A large intergenic noncoding RNA induced by p53 mediates global gene repression in the p53 response. *Cell*. **142**: 409–419.

- Huet J, Schnabel R, Sentenac A, Zillig W. (1983)** Archaeobacteria and eukaryotes possess DNA-dependent RNA polymerases of a common type. *The EMBO Journal*. **2**: 1291–1294.
- Inoue H, Nojima H, Okayama H. (1990)** High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*. **96**: 23–28.
- Iorio MV, Croce CM. (2012)** MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. *EMBO Molecular Medicine*. **4**: 143–159.
- Ishikawa H, Otaka H, Maki K, Morita T, Aiba H. (2012)** The functional Hfq-binding module of bacterial sRNAs consists of a double or single hairpin preceded by a U-rich sequence and followed by a 3' poly(U) tail. *RNA*. **18**: 1062–1074.
- Jäger D, Pernitzsch SR, Richter AS, Backofen R, Sharma CM, Schmitz RA. (2012)** An archaeal sRNA targeting *cis*- and *trans*-encoded mRNAs via two distinct domains. *Nucleic Acids Research*. **40**: 10964–10979.
- Jäger D, Sharma CM, Thomsen J, Ehlers C, Vogel J, Schmitz RA. (2009)** Deep sequencing analysis of the *Methanosarcina mazei* Gö1 transcriptome in response to nitrogen availability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. **106**: 21878–21882.
- Jantzer K. (2011)** Generierung und Charakterisierung von sRNA-Mutanten von *Haloferax volcanii*. [Diplomarbeit], Goethe Universität, Frankfurt am Main.
- Jantzer K, Zerulla K, Soppa J. (2011)** Phenotyping in the archaea: optimization of growth parameters and analysis of mutants of *Haloferax volcanii*. *FEMS Microbiology Letters*. **322**: 123–130.
- Jaschinski K, Babski J, Lehr M, Burmester A, Benz J, Heyer R, Dörr M, Marchfelder A, Soppa J. (2014)** Generation and phenotyping of a collection of sRNA gene deletion mutants of the haloarchaeon *Haloferax volcanii*. *PloS ONE*. **9**: e90763.
- Johansson J, Mandin P, Renzoni A, Chiaruttini C, Springer M, Cossart P. (2002)** An RNA thermosensor controls expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes*. *Cell*. **110**: 551–561.
- Johnsen U, Dambeck M, Zaiss H, Fuhrer T, Soppa J, Sauer U, Schönheit P. (2009)** D-xylose degradation pathway in the halophilic archaeon *Haloferax volcanii*. *The Journal of Biological Chemistry*. **284**: 27290–27303.
- Johnson M, Zaretskaya I, Raytselis Y, Merezuk Y, McGinnis S, Madden TL. (2008)** NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Research*. **36**: W5–9.
- Jun S, Reichlen MJ, Tajiri M, Murakami KS. (2011)** Archaeal RNA polymerase and transcription regulation. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. **46**: 27–40.
- Khusial P, Plaag R, Zieve GW. (2005)** LSm proteins form heptameric rings that bind to RNA via repeating motifs. *Trends in Biochemical Sciences*. **30**: 522–528.
- Klein RJ, Misulovin Z, Eddy SR. (2002)** Noncoding RNA genes identified in AT-rich hyperthermophiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. **99**: 7542–7547.

- Kliemt J. (2014)** Charakterisierung der sRNA₁₃₂ in *Haloferax volcanii*. [Masterthesis], Goethe-Universität, Frankfurt am Main.
- Kopf M, Hess WR. (2015)** Regulatory RNAs in photosynthetic cyanobacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. **39**: 301–315.
- Kozak M. (1999)** Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. *Gene*. **234**: 187–208.
- Kramer P, Gäbel K, Pfeiffer F, Soppa J. (2014)** *Haloferax volcanii*, a prokaryotic species that does not use the Shine Dalgarno mechanism for translation initiation at 5'-UTRs. *PLoS ONE*. **9**: e94979.
- Krek A, Grun D, Poy MN, Wolf R, Rosenberg L, Epstein EJ, MacMenamin P, da Piedade I, Gunsalus KC, Stoffel M, Rajewsky N. (2005)** Combinatorial microRNA target predictions. *Nature Genetics*. **37**: 495–500.
- Lange C, Zaigler A, Hammelmann M, Twellmeyer J, Raddatz G, Schuster SC, Oesterhelt D, Soppa J. (2007)** Genome-wide analysis of growth phase-dependent translational and transcriptional regulation in halophilic archaea. *BMC Genomics*. **8**: 415.
- Lehr M. (2010)** Regulation von kleinen nicht kodierenden RNAs in *Haloferax volcanii*. [Diplomarbeit], Goethe-Universität, Frankfurt am Main.
- Lesniak J, Barton WA, Nikolov DB. (2003)** Structural and functional features of the *Escherichia coli* hydroperoxide resistance protein OsmC. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*. **12**: 2838–2843.
- Levine E, Hwa T. (2008)** Small RNAs establish gene expression thresholds. *Current Opinion in Microbiology*. **11**: 574–579.
- Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. (2005)** Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*. **120**: 15–20.
- Li M, Weng K, Shih S, Brewer G. (2016)** The evolving world of small RNAs from RNA viruses. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*. **7**: 575–588.
- Lin S, Chang DC, Chang-Lin S, Lin C, Wu DTS, Chen DT, Ying S. (2008)** Mir-302 reprograms human skin cancer cells into a pluripotent ES-cell-like state. *RNA*. **14**: 2115–2124.
- Link TM, Valentin-Hansen P, Brennan RG. (2009)** Structure of *Escherichia coli* Hfq bound to polyribadenylate RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. **106**: 19292–19297.
- Linton KJ, Higgins CF. (1998)** The *Escherichia coli* ATP-binding cassette (ABC) proteins. *Molecular Microbiology*. **28**: 5–13.
- Locher KP. (2016)** Mechanistic diversity in ATP-binding cassette (ABC) transporters. *Nature Structural & Molecular Biology*. **23**: 487–493.

- Lorenz C, Gesell T, Zimmermann B, Schoeberl U, Bilusic I, Rajkowitsch L, Waldsich C, Haeseler A von, Schroeder R. (2010)** Genomic SELEX for Hfq-binding RNAs identifies genomic aptamers predominantly in antisense transcripts. *Nucleic Acids Research*. **38**: 3794–3808.
- Lorenz R, Bernhart SH, Höner Zu Siederdisen C, Tafer H, Flamm C, Stadler PF, Hofacker IL. (2011)** ViennaRNA Package 2.0. *Algorithms for Molecular Biology*. **6**: 26.
- Lu P, Wang Y, Zhang Y, Hu Y, Thompson KM, Chen S** RpoS-dependent sRNA RgsA regulates Fis and AcpP in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, in press.
- Lui L, Lowe T. (2013)** Small nucleolar RNAs and RNA-guided post-transcriptional modification. *Essays in Biochemistry*. **54**: 53–77.
- Maciotta S, Meregalli M, Torrente Y. (2013)** The involvement of microRNAs in neurodegenerative diseases. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. **7**: 265.
- Maier L, Benz J, Fischer S, Alstetter M, Jaschinski K, Hilker R, Becker A, Allers T, Soppa J, Marchfelder A. (2015)** Deletion of the Sm1 encoding motif in the lsm gene results in distinct changes in the transcriptome and enhanced swarming activity of *Haloferax* cells. *Biochimie*. **117**: 129–137.
- Majdalani N, Hernandez D, Gottesman S. (2002)** Regulation and mode of action of the second small RNA activator of RpoS translation, RprA. *Molecular Microbiology*. **46**: 813–826.
- Mandin P, Gottesman S. (2009)** A genetic approach for finding small RNAs regulators of genes of interest identifies RybC as regulating the DpiA/DpiB two-component system. *Molecular Microbiology*. **72**: 551–565.
- Maqbool A, Horler RSP, Muller A, Wilkinson AJ, Wilson KS, Thomas GH. (2015)** The substrate-binding protein in bacterial ABC transporters: dissecting roles in the evolution of substrate specificity. *Biochemical Society Transactions*. **43**: 1011–1017.
- Marchfelder A, Fischer S, Brendel J, Stoll B, Maier L, Jäger D, Prasse D, Plagens A, Schmitz RA, Randau L. (2012)** Small RNAs for defence and regulation in archaea. *Extremophiles*. **16**: 685–696.
- Märtens B, Manoharadas S, Hasenöhrl D, Manica A, Bläsi U. (2013)** Antisense regulation by transposon-derived RNAs in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *EMBO Reports*. **14**: 527–533.
- Massé E, Gottesman S. (2002)** A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. **99**: 4620–4625.
- Massé E, Salvail H, Desnoyers G, Arguin M. (2007)** Small RNAs controlling iron metabolism. *Current Opinion in Microbiology*. **10**: 140–145.
- Massé E, Vanderpool CK, Gottesman S. (2005)** Effect of RyhB small RNA on global iron use in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. **187**: 6962–6971.
- Mathy NW, Chen X. (2017)** Long non-coding RNAs (lncRNAs) and their transcriptional control of inflammatory responses. *The Journal of Biological Chemistry*. **292**: 12375–12382.

- Mattick JS. (2004)** RNA regulation: a new genetics? *Nature Reviews Genetics*. **5**: 316–323.
- McGrath JW, Chin JP, Quinn JP. (2013)** Organophosphonates revealed: new insights into the microbial metabolism of ancient molecules. *Nature Reviews Microbiology*. **11**: 412–419.
- Menzel-Hobeck C. (2010)** sRNA Überexpression. [Diplomarbeit], Goethe Universität, Frankfurt am Main.
- Metruccio MME, Fantappie L, Serruto D, Muzzi A, Roncarati D, Donati C, Scarlato V, Delany I. (2009)** The Hfq-dependent small noncoding RNA NrrF directly mediates Fur-dependent positive regulation of succinate dehydrogenase in *Neisseria meningitidis*. *Journal of Bacteriology*. **191**: 1330–1342.
- Mhedhbi I. (2012)** Charakterisierung der sRNA_{htsf468} & experimentelle Verifikation des putativen Zielgens *HVO_B0370*. [Bachelorthesis], Goethe-Universität, Frankfurt am Main.
- Mika F, Hengge R. (2013)** Small Regulatory RNAs in the Control of Motility and Biofilm Formation in *E. coli* and *Salmonella*. *International Journal of Molecular Sciences*. **14**: 4560–4579.
- Mitschke J, Georg J, Scholz I, Sharma CM, Dienst D, Bantscheff J, Voß B, Steglich C, Wilde A, Vogel J, Hess WR. (2011a)** An experimentally anchored map of transcriptional start sites in the model cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. **108**: 2124–2129.
- Mitschke J, Vioque A, Haas F, Hess WR, Muro-Pastor AM. (2011b)** Dynamics of transcriptional start site selection during nitrogen stress-induced cell differentiation in *Anabaena* sp. PCC7120. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. **108**: 20130–20135.
- Moll I, Afonyushkin T, Vytvytska O, Kaberdin VR, Bläsi U. (2003)** Coincident Hfq binding and RNase E cleavage sites on mRNA and small regulatory RNAs. *RNA*. **9**: 1308–1314.
- Møller T, Franch T, Højrup P, Keene DR, Bächinger HP, Brennan RG, Valentin-Hansen P. (2002)** Hfq: A Bacterial Sm-like Protein that Mediates RNA-RNA Interaction. *Molecular Cell*. **9**: 23–30.
- Mullakhanbhai MF, Larsen H. (1975)** *Halobacterium volcanii* spec. nov., a Dead Sea halobacterium with a moderate salt requirement. *Archives of Microbiology*. **104**: 207–214.
- Mura C, Cascio D, Sawaya MR, Eisenberg DS. (2001)** The crystal structure of a heptameric archaeal Sm protein: Implications for the eukaryotic snRNP core. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. **98**: 5532–5537.
- Mura C, Randolph PS, Patterson J, Cozen AE. (2013)** Archaeal and eukaryotic homologs of Hfq: A structural and evolutionary perspective on Sm function. *RNA Biology*. **10**: 636–651.
- Neilson JR, Sharp PA. (2008)** Small RNA regulators of gene expression. *Cell*. **134**: 899–902.

- Nielsen JS, Boggild A, Andersen CBF, Nielsen G, Boysen A, Brodersen DE, Valentin-Hansen P. (2007)** An Hfq-like protein in archaea: crystal structure and functional characterization of the Sm protein from *Methanococcus jannaschii*. *RNA*. **13**: 2213–2223.
- Nieuwlandt DT, Daniels CJ. (1990)** An expression vector for the archaebacterium *Haloferax volcanii*. *Journal of Bacteriology*. **172**: 7104–7110.
- Noon KR, Guymon R, Crain PF, McCloskey JA, Thomm M, Lim J, Cavicchioli R. (2003)** Influence of temperature on tRNA modification in archaea: *Methanococcoides burtonii* (optimum growth temperature T_{opt} , 23 degrees C) and *Stetteria hydrogenophila* (T_{opt} , 95 degrees C). *Journal of Bacteriology*. **185**: 5483–5490.
- Noro E, Mori M, Makino G, Takai Y, Ohnuma S, Sato A, Tomita M, Nakahigashi K, Kanai A. (2017)** Systematic characterization of artificial small RNA-mediated inhibition of *Escherichia coli* growth. *RNA Biology*. **14**: 206–218.
- Offre P, Spang A, Schleper C. (2013)** Archaea in biogeochemical cycles. *Annual Review of Microbiology*. **67**: 437–457.
- Omer AD, Lowe TM, Russell AG, Ebhardt H, Eddy SR, Dennis PP. (2000)** Homologs of small nucleolar RNAs in Archaea. *Science*. **288**: 517–522.
- Opdyke JA, Kang J, Storz G. (2004)** GadY, a small-RNA regulator of acid response genes in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. **186**: 6698–6705.
- Osorio G, Jerez CA. (1996)** Adaptive response of the archaeon *Sulfolobus acidocaldarius* BC65 to phosphate starvation. *Microbiology*. **142**: 1531–1536.
- Otaka H, Ishikawa H, Morita T, Aiba H. (2011)** PolyU tail of rho-independent terminator of bacterial small RNAs is essential for Hfq action. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. **108**: 13059–13064.
- Panja S, Schu DJ, Woodson SA. (2013)** Conserved arginines on the rim of Hfq catalyze base pair formation and exchange. *Nucleic Acids Research*. **41**: 7536–7546.
- Papenfort K, Bouvier M, Mika F, Sharma CM, Vogel J. (2010)** Evidence for an autonomous 5' target recognition domain in an Hfq-associated small RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. **107**: 20435–20440.
- Papenfort K, Pfeiffer V, Lucchini S, Sonawane A, Hinton JCD, Vogel J. (2008)** Systematic deletion of *Salmonella* small RNA genes identifies CyaR, a conserved CRP-dependent riboregulator of OmpX synthesis. *Molecular Microbiology*. **68**: 890–906.
- Papenfort K, Pfeiffer V, Mika F, Lucchini S, Hinton JCD, Vogel J. (2006)** σ^E -dependent small RNAs of *Salmonella* respond to membrane stress by accelerating global omp mRNA decay. *Molecular Microbiology*. **62**: 1674–1688.
- Papenfort K, Said N, Welsink T, Lucchini S, Hinton JCD, Vogel J. (2009)** Specific and pleiotropic patterns of mRNA regulation by ArcZ, a conserved, Hfq-dependent small RNA. *Molecular Microbiology*. **74**: 139–158.
- Papenfort K, Sun Y, Miyakoshi M, Vanderpool CK, Vogel J. (2013)** Small RNA-mediated activation of sugar phosphatase mRNA regulates glucose homeostasis. *Cell*. **153**: 426–437.

- Papenfort K, Vanderpool CK. (2015)** Target activation by regulatory RNAs in bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. **39**: 362–378.
- Papenfort K, Vogel J. (2009)** Multiple target regulation by small noncoding RNAs rewires gene expression at the post-transcriptional level. *Research in Microbiology*. **160**: 278–287.
- Pernitzsch SR, Tirier SM, Beier D, Sharma CM. (2014)** A variable homopolymeric G-repeat defines small RNA-mediated posttranscriptional regulation of a chemotaxis receptor in *Helicobacter pylori*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. **111**: E501-10.
- Persson BL, Lagerstedt JO, Pratt JR, Pattison-Granberg J, Lundh K, Shokrollahzadeh S, Lundh F. (2003)** Regulation of phosphate acquisition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*. **43**: 225–244.
- Pfeiffer F, Broicher A, Gillich T, Klee K, Mejia J, Rampp M, Oesterhelt D. (2008)** Genome information management and integrated data analysis with HaloLex. *Archives of Microbiology*. **190**: 281–299.
- Pickl A, Schönheit P. (2015)** The oxidative pentose phosphate pathway in the haloarchaeon *Haloferax volcanii* involves a novel type of glucose-6-phosphate dehydrogenase--The archaeal Zwischenferment. *FEBS Letters*. **589**: 1105–1111.
- Prevost K, Salvail H, Desnoyers G, Jacques J, Phaneuf E, Masse E. (2007)** The small RNA RyhB activates the translation of *shiA* mRNA encoding a permease of shikimate, a compound involved in siderophore synthesis. *Molecular Microbiology*. **64**: 1260–1273.
- Pulvermacher SC, Stauffer LT, Stauffer GV. (2009)** Role of the sRNA GcvB in regulation of *cycA* in *Escherichia coli*. *Microbiology*. **155**: 106–114.
- Qi Y, Kobayashi Y, Hulett FM. (1997)** The *pst* operon of *Bacillus subtilis* has a phosphate-regulated promoter and is involved in phosphate transport but not in regulation of the *pho* regulon. *Journal of Bacteriology*. **179**: 2534–2539.
- Rehmsmeier M, Steffen P, Hochsmann M, Giegerich R. (2004)** Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes. *RNA*. **10**: 1507–1517.
- Ren X, Wu J, Wang X, Sartor MA, Qian J, Jones K, Nicolaou P, Pritchard TJ, Fan G. (2009)** MicroRNA-320 is involved in the regulation of cardiac ischemia/reperfusion injury by targeting heat-shock protein 20. *Circulation*. **119**: 2357–2366.
- Rennie W, Kanoria S, Liu C, Mallick B, Long D, Wolenc A, Carmack CS, Lu J, Ding Y. (2016)** STarMirDB: A database of microRNA binding sites. *RNA Biology*. **13**: 554–560.
- Reuter JA, Spacek DV, Snyder MP. (2015)** High-throughput sequencing technologies. *Molecular Cell*. **58**: 586–597.
- Rieder R, Reinhardt R, Sharma C, Vogel J. (2012)** Experimental tools to identify RNA-protein interactions in *Helicobacter pylori*. *RNA Biology*. **9**: 520–531.
- Romby P, Charpentier E. (2010)** An overview of RNAs with regulatory functions in gram-positive bacteria. *Cellular and Molecular Life Sciences*. **67**: 217–237.

- Sahoo T, del Gaudio D, German JR, Shinawi M, Peters SU, Person RE, Garnica A, Cheung SW, Beaudet AL. (2008)** Prader-Willi phenotype caused by paternal deficiency for the HBII-85 C/D box small nucleolar RNA cluster. *Nature Genetics*. **40**: 719–721.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. (1992)** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Biotechnology*. **24**: 104–108.
- Santos-Beneit F. (2015)** The Pho regulon: a huge regulatory network in bacteria. *Frontiers in Microbiology*. **6**: 402.
- Sauer E, Schmidt S, Weichenrieder O. (2012)** Small RNA binding to the lateral surface of Hfq hexamers and structural rearrangements upon mRNA target recognition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. **109**: 9396–9401.
- Saunders NFW, Thomas T, Curmi PMG, Mattick JS, Kuczek E, Slade R, Davis J, Franzmann PD, Boone D, Rusterholtz K, Feldman R, Gates C, Bench S, Sowers K, Kadner K, Aerts A, Dehal P, Detter C, Glavina T, Lucas S, Richardson P, Larimer F, Hauser L, Land M, Cavicchioli R. (2003)** Mechanisms of thermal adaptation revealed from the genomes of the Antarctic Archaea *Methanogenium frigidum* and *Methanococcoides burtonii*. *Genome Research*. **13**: 1580–1588.
- Schattner P. (2002)** Searching for RNA genes using base-composition statistics. *Nucleic Acids Research*. **30**: 2076–2082.
- Schlüter J, Reinkensmeier J, Daschkey S, Evguenieva-Hackenberg E, Janssen S, Jänicke S, Becker JD, Giegerich R, Becker A. (2010)** A genome-wide survey of sRNAs in the symbiotic nitrogen-fixing alpha-proteobacterium *Sinorhizobium meliloti*. *BMC Genomics*. **11**: 245.
- Schmitt L, Tampé R. (2002)** Structure and mechanism of ABC transporters. *Current Opinion in Structural Biology*. **12**: 754–760.
- Schumacher MA, Pearson RF, Moller T, Valentin-Hansen P, Brennan RG. (2002)** Structures of the pleiotropic translational regulator Hfq and an Hfq-RNA complex: a bacterial Sm-like protein. *The EMBO Journal*. **21**: 3546–3556.
- Sharma CM, Darfeuille F, Plantinga TH, Vogel J. (2007)** A small RNA regulates multiple ABC transporter mRNAs by targeting C/A-rich elements inside and upstream of ribosome-binding sites. *Genes & Development*. **21**: 2804–2817.
- Sharma CM, Papenfort K, Pernitzsch SR, Mollenkopf H, Hinton JCD, Vogel J. (2011)** Pervasive post-transcriptional control of genes involved in amino acid metabolism by the Hfq-dependent GcvB small RNA. *Molecular Microbiology*. **81**: 1144–1165.
- Shimoni Y, Friedlander G, Hetzroni G, Niv G, Altuvia S, Biham O, Margalit H. (2007)** Regulation of gene expression by small non-coding RNAs: a quantitative view. *Molecular Systems Biology*. **3**: 138.
- Sittka A, Lucchini S, Papenfort K, Sharma CM, Rolle K, Binnewies TT, Hinton JCD, Vogel J. (2008)** Deep sequencing analysis of small noncoding RNA and mRNA targets of the global post-transcriptional regulator, Hfq. *PLoS Genetics*. **4**: e1000163.

- Sittka A, Sharma CM, Rolle K, Vogel J. (2009)** Deep sequencing of *Salmonella* RNA associated with heterologous Hfq proteins *in vivo* reveals small RNAs as a major target class and identifies RNA processing phenotypes. *RNA Biology*. **6**: 266–275.
- Slupska MM, King AG, Fitz-Gibbon S, Besemer J, Borodovsky M, Miller JH. (2001)** Leaderless transcripts of the crenarchaeal hyperthermophile *Pyrobaculum aerophilum*. *Journal of Molecular Biology*. **309**: 347–360.
- Smaldone GT, Antelmann H, Gaballa A, Helmann JD. (2012a)** The FsrA sRNA and FbpB protein mediate the iron-dependent induction of the *Bacillus subtilis* LutABC iron-sulfur-containing oxidases. *Journal of Bacteriology*. **194**: 2586–2593.
- Smaldone GT, Revelles O, Gaballa A, Sauer U, Antelmann H, Helmann JD. (2012b)** A global investigation of the *Bacillus subtilis* iron-sparing response identifies major changes in metabolism. *Journal of Bacteriology*. **194**: 2594–2605.
- Soppa J. (2006)** From genomes to function: haloarchaea as model organisms. *Microbiology*. **152**: 585–590.
- Soppa J. (2011)** Functional genomic and advanced genetic studies reveal novel insights into the metabolism, regulation, and biology of *Haloferax volcanii*. *Archaea*. **2011**: 602408.
- Southern EM. (1975)** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology*. **98**: 503–517.
- Storz G, Altuvia S, Wassarman KM. (2005)** An abundance of RNA regulators. *Annual Review of Biochemistry*. **74**: 199–217.
- Storz G, Vogel J, Wassarman KM. (2011)** Regulation by small RNAs in bacteria: expanding frontiers. *Molecular Cell*. **43**: 880–891.
- Straub J, Brenneis M, Jellen-Ritter A, Heyer R, Soppa J, Marchfelder A. (2009)** Small RNAs in haloarchaea: identification, differential expression and biological function. *RNA Biology*. **6**: 281–292.
- Takahashi R, Miyazaki H, Ochiya T. (2014)** The role of microRNAs in the regulation of cancer stem cells. *Frontiers in Genetics*. **4**: 295.
- Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H, Endoh H, Harano T, Yatabe Y, Nagino M, Nimura Y, Mitsudomi T, Takahashi T. (2004)** Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Research*. **64**: 3753–3756.
- Tang T, Bachellerie J, Rozhdestvensky T, Bortolin M, Huber H, Drungowski M, Elge T, Brosius J, Huttenhofer A. (2002)** Identification of 86 candidates for small non-messenger RNAs from the archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. **99**: 7536–7541.
- Tang T, Polacek N, Zywicki M, Huber H, Brugger K, Garrett R, Bachellerie JP, Huttenhofer A. (2005)** Identification of novel non-coding RNAs as potential antisense regulators in the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Molecular Microbiology*. **55**: 469–481.

Tang TH, Rozhdestvensky TS, d'Orval BC, Bortolin M, Huber H, Charpentier B, Branlant C, Bachellerie J, Brosius J, Huttenhofer A. (2002) RNomics in Archaea reveals a further link between splicing of archaeal introns and rRNA processing. *Nucleic Acids Research*. **30**: 921–930.

Thomason MK, Fontaine F, Lay N de, Storz G. (2012) A small RNA that regulates motility and biofilm formation in response to changes in nutrient availability in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*. **84**: 17–35.

Tjaden B. (2008) TargetRNA: a tool for predicting targets of small RNA action in bacteria. *Nucleic Acids Research*. **36**: W109-13.

Tjaden B, Goodwin SS, Opdyke JA, Guillier M, Fu DX, Gottesman S, Storz G. (2006) Target prediction for small, noncoding RNAs in bacteria. *Nucleic Acids Research*. **34**: 2791–2802.

Törö I, Thore S, Mayer C, Basquin J, Seraphin B, Suck D. (2001) RNA binding in an Sm core domain: X-ray structure and functional analysis of an archaeal Sm protein complex. *The EMBO Journal*. **20**: 2293–2303.

Uchiyama I, Mihara M, Nishide H, Chiba H. (2015) MGD update 2015: microbial genome database for flexible ortholog analysis utilizing a diverse set of genomic data. *Nucleic Acids Research*. **43**: D270-6.

Udekwu KI, Darfeuille F, Vogel J, Reimegard J, Holmqvist E, Wagner EGH. (2005) Hfq-dependent regulation of OmpA synthesis is mediated by an antisense RNA. *Genes & Development*. **19**: 2355–2366.

Urban JH, Vogel J. (2007) Translational control and target recognition by *Escherichia coli* small RNAs *in vivo*. *Nucleic Acids Research*. **35**: 1018–1037.

Valentin-Hansen P, Eriksen M, Udesen C. (2004) The bacterial Sm-like protein Hfq: a key player in RNA transactions: A key player in RNA transactions. *Molecular Microbiology*. **51**: 1525–1533.

van de Vossenberg JL, Driessen AJ, Konings WN. (1998) The essence of being extremophilic: The role of the unique archaeal membrane lipids. *Extremophiles*. **2**: 163–170.

van Ooyen J, Soppa J. (2007) Three 2-oxoacid dehydrogenase operons in *Haloferax volcanii*: expression, deletion mutants and evolution. *Microbiology*. **153**: 3303–3313.

Vannini A, Roncarati D, Danielli A. (2016) The cag-pathogenicity island encoded CncR1 sRNA oppositely modulates *Helicobacter pylori* motility and adhesion to host cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*. **73**: 3151–3168.

Vecerek B, Moll I, Afonyushkin T, Kaberdin V, Bläsi U. (2003) Interaction of the RNA chaperone Hfq with mRNAs: direct and indirect roles of Hfq in iron metabolism of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*. **50**: 897–909.

Vecerek B, Moll I, Bläsi U. (2007) Control of Fur synthesis by the non-coding RNA RyhB and iron-responsive decoding. *The EMBO Journal*. **26**: 965–975.

- Veretnik S, Wills C, Youkharibache P, Valas RE, Bourne PE. (2009)** Sm/Lsm genes provide a glimpse into the early evolution of the spliceosome. *PLoS Computational Biology*. **5**: e1000315.
- Vogel J. (2009)** A rough guide to the non-coding RNA world of *Salmonella*. *Molecular Microbiology*. **71**: 1–11.
- Vogel J, Luisi BF. (2011)** Hfq and its constellation of RNA. *Nature Reviews Microbiology*. **9**: 578–589.
- Vogel J, Papenfort K. (2006)** Small non-coding RNAs and the bacterial outer membrane. *Current Opinion in Microbiology*. **9**: 605–611.
- Vogel J, Wagner EGH. (2007)** Target identification of small noncoding RNAs in bacteria. *Current Opinion in Microbiology*. **10**: 262–270.
- Wagner EGH, Romby P. (2015)** Small RNAs in bacteria and archaea: who they are, what they do, and how they do it. *Advances in Genetics*. **90**: 133–208.
- Wang HV, Chekanova JA. (2016)** Small RNAs: essential regulators of gene expression and defenses against environmental stresses in plants. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*. **7**: 356–381.
- Wang KC, Chang HY. (2011)** Molecular mechanisms of long noncoding RNAs. *Molecular Cell*. **43**: 904–914.
- Wang Y, Baskerville S, Shenoy A, Babiarz JE, Baehner L, Blelloch R. (2008)** Embryonic stem cell-specific microRNAs regulate the G1-S transition and promote rapid proliferation. *Nature Genetics*. **40**: 1478–1483.
- Wang Z, Gerstein M, Snyder M. (2009)** RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics*. **10**: 57–63.
- Wanner BL. (1993)** Gene regulation by phosphate in enteric bacteria. *Journal of Cellular Biochemistry*. **51**: 47–54.
- Washietl S, Hofacker IL, Stadler PF. (2005)** Fast and reliable prediction of noncoding RNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. **102**: 2454–2459.
- Wassarman KM. (2007)** 6S RNA: a regulator of transcription. *Molecular Microbiology*. **65**: 1425–1431.
- Waters LS, Storz G. (2009)** Regulatory RNAs in bacteria. *Cell*. **136**: 615–628.
- Wende A, Furtwangler K, Oesterhelt D. (2009)** Phosphate-dependent behavior of the archaeon *Halobacterium salinarum* strain R1. *Journal of Bacteriology*. **191**: 3852–3860.
- Will S, Joshi T, Hofacker IL, Stadler PF, Backofen R. (2012)** LocARNA-P: accurate boundary prediction and improved detection of structural RNAs. *RNA*. **18**: 900–914.
- Willkomm S, Oellig CA, Zander A, Restle T, Keegan R, Grohmann D, Schneider S. (2017)** Structural and mechanistic insights into an archaeal DNA-guided Argonaute protein. *Nature Microbiology*. **2**: 17035.
- Willkomm S, Zander A, Grohmann D, Restle T. (2016)** Mechanistic Insights into Archaeal and Human Argonaute Substrate Binding and Cleavage Properties. *PLoS ONE*. **11**: e0164695.

Willkomm S, Zander A, Gust A, Grohmann D. (2015) A prokaryotic twist on argonaute function. *Life*. **5**: 538–553.

Wilusz CJ, Wilusz J. (2005) Eukaryotic Lsm proteins: lessons from bacteria. *Nature Structural & Molecular Biology*. **12**: 1031–1036.

Wilusz CJ, Wilusz J. (2013) Lsm proteins and Hfq: Life at the 3' end. *RNA Biology*. **10**: 592–601.

Woese CR, Fox GE. (1977) Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **74**: 5088–5090.

Wolfe AJ, Chang D, Walker JD, Seitz-Partridge JE, Vidaurri MD, Lange CF, Pr BM, Henk MC, Larkin JC, Conway T. (2003) Evidence that acetyl phosphate functions as a global signal during biofilm development. *Molecular Microbiology*. **48**: 977–988.

Wright PR, Georg J, Mann M, Sorescu DA, Richter AS, Lott S, Kleinkauf R, Hess WR, Backofen R. (2014) CopraRNA and IntaRNA: predicting small RNA targets, networks and interaction domains. *Nucleic Acids Research*. **42**: W119-23.

Wright PR, Richter AS, Papenfort K, Mann M, Vogel J, Hess WR, Backofen R, Georg J. (2013) Comparative genomics boosts target prediction for bacterial small RNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. **110**: E3487-96.

Wurtzel O, Sapra R, Chen F, Zhu Y, Simmons BA, Sorek R. (2010) A single-base resolution map of an archaeal transcriptome. *Genome Research*. **20**: 133–141.

Xie X, Lu J, Kulbokas EJ, Golub TR, Mootha V, Lindblad-Toh K, Lander ES, Kellis M. (2005) Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals. *Nature*. **434**: 338–345.

Xu N, Li Y, Zhao Y, Guo L, Fang Y, Zhao J, Wang X, Huang L, Guo H. (2012) Identification and characterization of small RNAs in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *PLoS ONE*. **7**: e35306.

Zago MA, Dennis PP, Omer AD. (2005) The expanding world of small RNAs in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Molecular Microbiology*. **55**: 1812–1828.

Zillig W. (1991) Comparative biochemistry of Archaea and Bacteria. *Current Opinion in Genetics & Development*. **1**: 544–551.

VII. ANHANG

1. ABBILDUNGEN UND TABELLEN

Tabelle A1: Auswertung der phänotypischen Charakterisierung von *H. volcanii*. Wachstumsausbeute von 27 sRNA-Deletionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp (H26 bzw. H119). Aufgelistet sind die Abweichungen vom Wildtyp in Prozent und die Standardabweichung (s.a. in %). Phänotypen mit einer Standardabweichung von mindestens 10% sind fett gedruckt. Abkürzungen: ungleichmäßiges Wachstum des Wildtyps (¹); optische Dichte zum Zeitpunkt der Induktion höher oder geringer als der Wildtyp (²); Wachstumsrate ebenfalls höher bzw. geringer unter Standardbedingungen (³). Veröffentlicht in Jaschinski *et al.* (2014) und *Heyer *et al.* (2012).

Deletions- mutante	Wachstumsausbeute in Prozent (s.a. in %) des Wildtyps									
	CAS	Xylose	Acetat	1,2 M	2,1 M	4 M	ox. Stress	alk. Stress	Salz- stress	Kälte- stress
63	97 (0)	110 (0)	104 (4)	94 (5)	94 (4)	85 (12)	88 (1)	96 (4)	97 (4)	91 (3)
132	103 (1)	104 (4)	107 (4)	102 (5)	99 (2)	89 (10)	125 (1)	103 (3)	110 (4)	99 (2)
168	102 (1)	95 (13)	110 (2) ¹	98 (5)	95 (6)	85 (9)	119 (0)	98 (2)	97 (5)	91 (2)
194	102 (1)	100 (4)	109 (4)	101 (3)	91 (4)	87 (4)	124 (2) ²	94 (5)	110 (2)	95 (3)
235	98 (1)	113 (7)	110 (4) ¹	107 (6)	94 (4)	70 (7)	95 (10)	98 (3)	110 (2)	93 (4)
288	104 (2)	108 (4)	107 (2)	97 (6)	93 (2)	77 (8)	81 (2) ²	98 (2)	108 (7)	96 (5)
308	100 (1)	105 (7)	109 (2)	95 (7)	94 (1)	88 (7)	126 (3)	98 (3)	104 (3)	94 (2)
362	98 (2)	92 (6)	72 (9)	98 (7)	91 (2)	92 (3)	75 (6) ²	83 (3) ²	92 (1)	99 (2)
450	100 (2)	102 (8)	90 (3)	110 (2)	103 (2)	98 (2)	102 (1)	104 (5)	100 (4)	96 (1)
479	99 (2)	99 (6)	90 (2)	114 (2)	103 (2)	95 (2)	101 (1)	104 (4)	110 (2)	109 (2)
500	98 (1)	92 (15)	110 (3) ¹	89 (10)	92 (4)	84 (11)	129 (2)	96 (2)	100 (2)	88 (3)
529	95 (1)	111 (5)	79 (3)	98 (6)	94 (3)	87 (2)	82 (3) ²	88 (2) ²	103 (1)	106 (1)
H225.2R	107 (3)	107 (10)	98 (0)	77 (12)	88 (7)	94 (5)	87 (3) ³	94 (8)	137 (23)	123 (34)
htsf_182	98 (2)	99 (15)	98 (6)	91 (13)	92 (4)	96 (6)	100 (3)	96 (11)	98 (6)	102 (4)
htsf_209	96 (2)	100 (5)	96 (4)	90 (11)	96 (6)	91 (9)	96 (1)	92 (12)	95 (9)	100 (7)
htsf_242	100 (1)	106 (5)	102 (1)	96 (5)	101 (6)	93 (12)	74 (4) ²	114 (6) ¹	186 (3) ¹	95 (1)
htsf_339	100 (2)	108 (7)	101 (1)	96 (3)	95 (10)	102 (7)	101 (3)	120 (2) ¹	117 (2) ¹	97 (2)
htsf_359	101 (1)	106 (6)	106 (2)	97 (5)	103 (9)	102 (7)	83 (0) ²	118 (1) ¹	189 (4) ¹	97 (2)
htsf_416	102 (1)	107 (5)	107 (2)	93 (5)	98 (3)	101 (2)	77 (1) ²	115 (2) ¹	187 (2) ¹	96 (1)
htsf_467	100 (2)	106 (7)	104 (2)	90 (9)	92 (11)	102 (6)	86 (2) ²	114 (3) ¹	172 (9) ¹	97 (2)
htsf_468	99 (2)	113 (24)	91 (5)	91 (16)	63 (9)	78 (15)	90 (6)	64 (17) ³	65 (11) ³	57 (6) ³
htsf_494	102 (1)	96 (4)	107 (1)	100 (0)	107 (10)	99 (5)	80 (2) ²	116 (3) ¹	179 (9) ¹	94 (1)
htsf_574	103 (1)	95 (2)	108 (2)	95 (1)	101 (15)	101 (4)	74 (1) ²	106 (5)	193 (2) ¹	90 (3)
htsf4*	95 (1)	98 (2)	76 (2)	95 (2)	87 (2)	84 (3)	80 (2) ³	79 (1) ³	94 (2)	97 (2)
htsf10*	95 (2)	91 (2)	87 (3)	110 (1)	98 (2)	89 (3)	92 (1)	94 (2)	101 (3)	112 (2)
htsf14	104 (2)	120 (17)	140 (3)	102 (10)	110 (4)	111 (16) ¹	98 (4)	113 (5) ³	203 (38)	74 (17)
htsf21*	103 (2)	101 (2)	130 (7)	92 (9)	120 (2)	127 (2) ¹	95 (1)	120 (6) ³	264 (24)	103 (23)

Tabelle A2: Auswertung der phänotypischen Charakterisierung von *H. volcanii*. Verdopplungszeit von 27 sRNA-Deletionsmutanten verglichen unter zehn verschiedenen Bedingungen mit dem Wildtyp (H26 bzw. H119). Aufgelistet sind die Abweichungen vom Wildtyp in Prozent und die Standardabweichung (in %). Phänotypen mit einer Standardabweichung von mindestens 10% sind fett gedruckt. Abkürzungen: Daten nicht auswertbar (n.a.) (z.B. Unzureichende Messpunkte, unregelmäßiges Wachstum,...); Daten aufgrund unzureichender Messpunkte nicht auswertbar (gleich/ viel); ungleichmäßiges Wachstum des Wildtyps (¹); optische Dichte zum Zeitpunkt der Induktion höher oder geringer als der Wildtyp (²); Wachstumsrate ebenfalls höher bzw. geringer unter Standardbedingungen (³). Veröffentlicht in Jaschinski *et al.* (2014) und *Heyer *et al.* (2012).

Deletions- mutante	Verdopplungszeit in Prozent des Wildtyps									
	CAS	Xylose	Acetat	1,2 M	2,1 M	4 M	ox. Stress	alk. Stress	Salz- stress	Kälte- stress
63	108	72	81 ¹	91	107	99	n.a.	93	105	105
132	103	99	71 ¹	91	91	92	71	93	95	92
168	99	n.a.	82 ¹	116	102	96	100	92	99	106
194	108	91	84 ¹	89	93	81	158 ²	504 ²	95	103
235	101	96	82 ¹	105	95	103	96	101	105	104
288	104	105	92	107	102	98	n.a.	108	108	108
308	113	100	78 ¹	109	98	107	95	98	100	105
362	124	n.a.	viel	73 ¹	109	95	107	n.a.	93	106
450	101	106	97	57	109	108	105	n.a.	98	106
479	107	105	139	55	94	106	96	n.a.	91	104
500	114	n.a.	78 ¹	105	101	107	94	100	100	107
529	108	105	101	72 ¹	109	118	109	n.a.	91	105
H225.2R	100	99	viel	172	92	101	107	100	93	gleich
htsf_182	95	104	99	102	98	99	105	101	103	98
htsf_209	92	108	98	99	97	109	101	104	93	97
htsf_242	96	94	91	100	108	109	n.a.	90	103	100
htsf_339	96	97	102	105	94	90	n.a.	90	96	101
htsf_359	98	99	92	98	95	96	n.a.	96	94	93
htsf_416	96	106	93	102	110	99	n.a.	94	109	99
htsf_467	94	98	106	98	99	93	n.a.	99	90	99
htsf_468	97	35	103	n.a.	140	120	108	117 ³	139 ³	142 ³
htsf_494	100	103	82	100	90	94	n.a.	90	99	93
htsf_574	99	94	102	102	117	91	n.a.	94	103	105
htsf4*	104	n.a.	n.a.	67 ¹	106	110	104	n.a.	94	99
htsf10*	99	n.a.	n.a.	81 ¹	109	106	85	n.a.	94	96
htsf14	107	83	85	58 ¹	98	n.a.	97	96	68	98
htsf21*	100	102	86	87 ¹	102	n.a.	99	gleich	64	99

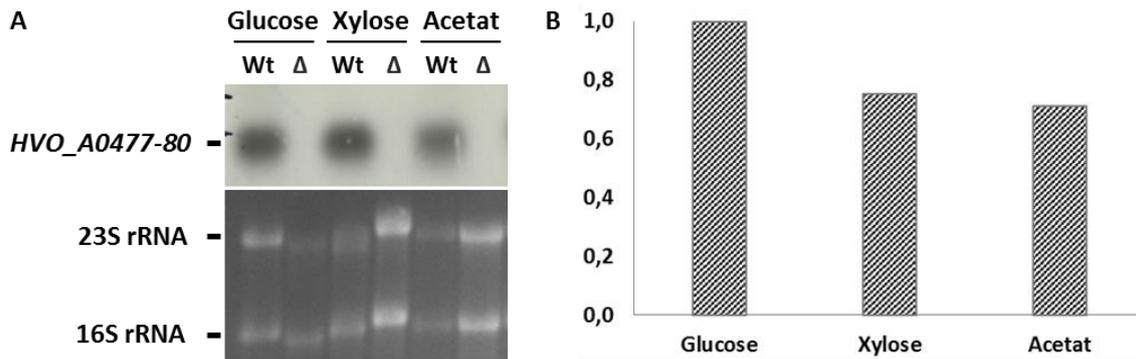


Abbildung A1: Expression von sRNA₃₆₂ nach Wachstum mit Glucose, Xylose und Acetat. **A.** Northern Blot-Analyse des Transkriptlevels in der exponentiellen Wachstumsphase. **B.** Auswertung der Northern Blot-Analyse. Relative Transkriptlevel bezogen auf das Wachstum unter Standardbedingungen (Glucose).

Tabelle A3: Transkriptomanalyse mittels DNA-Mikroarray. Vergleich der Deletionsmutante von sRNA_{htsf468} mit dem Wildtyp bei 4 M NaCl. Gezeigt sind die HVO-Nummer, der Grad der Regulation und die entsprechende Standardabweichung (s.a. in %) in Abwesenheit der sRNA.

HVO-Nr.	Genfunktion	Regulation	s.a. [%]
erhöhtes Transkriptlevel			
<i>HVO_B0275s</i>	sRNA ₃₀	0,5	24%
verringertes Transkriptlevel			
<i>HVO_A0172s</i>	sRNA ₃₄	2,3	34%
	sRNA _{H11.2}	2,4	11%
<i>HVO_2213s</i>	sRNA _{hts10}	2,3	27%
<i>HVO_B0128</i>	verwandtes Protein der Glucose-1-Dehydrogenase	2,4	6%
	sRNA _{10sense}	2,4	38%
<i>HVO_2293s</i>	sRNA _{hts16} (snoRNA)	2,6	10%
<i>HVO_2868s</i>	sRNA _{p10}	4,0	22%

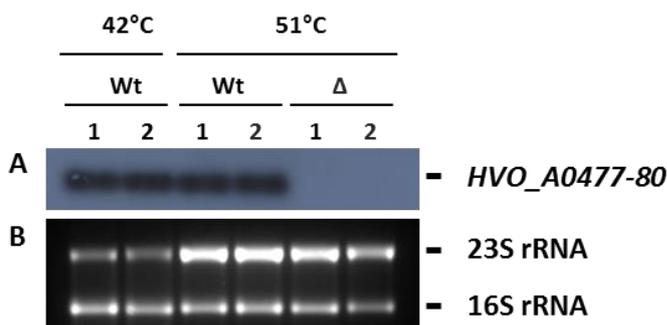


Abbildung A2: Northern Blot-Analyse von sRNA₃₀ nach 15-minütigem Hitzeschock (51°C). Aufgetragen sind jeweils zwei Proben des Wildtyps (Wt) vor (42°C) und nach Hitzeschock (51°C) und zwei Proben der Deletionsmutante von sRNA₃₀ (Δ) nach Hitzeschock. **A.** Transkriptlevel von sRNA₃₀ **B.** Ladekontrolle 16S und 23S rRNA

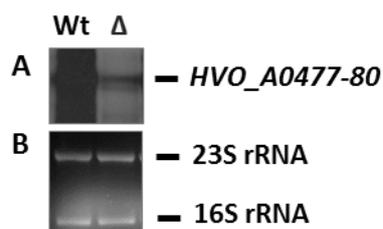


Abbildung A3: Northern Blot-Analyse von Wildtyp (Wt) und Deletionsmutante der sRNA₁₃₂ (Δ132) nach 30-minütigem Phosphatentzug. Zur Detektion des Operons in der sRNA-Deletionsmutante wurde die Belichtungszeit des Röntgenfilms auf 45 min erhöht. **A.** Transkriptlevel des Operons *HVO_A0477-80*. **B.** Ladekontrollen 23S und 16S rRNA.

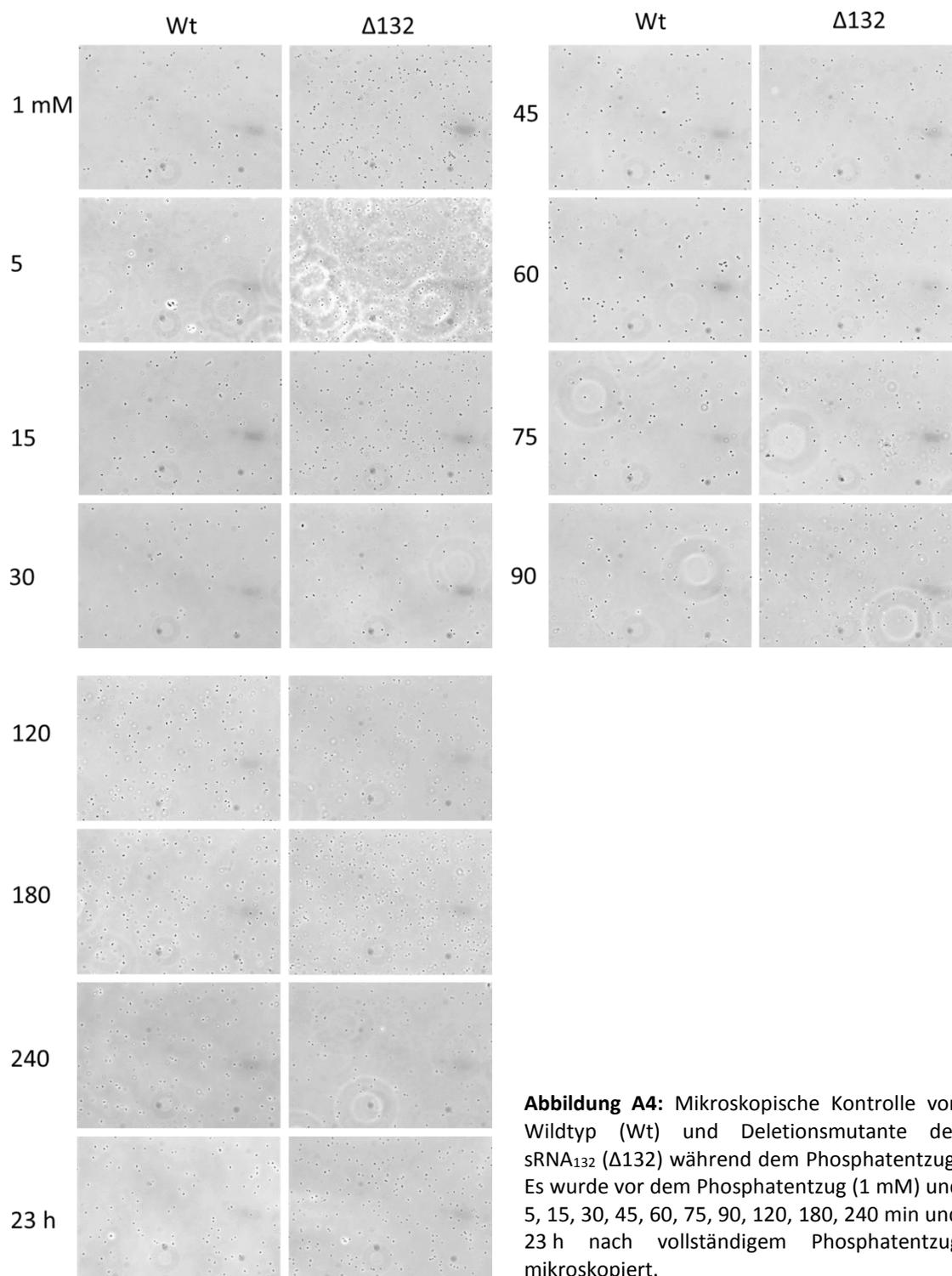


Abbildung A4: Mikroskopische Kontrolle von Wildtyp (Wt) und Deletionsmutante der $sRNA_{132}$ ($\Delta 132$) während dem Phosphatentzug. Es wurde vor dem Phosphatentzug (1 mM) und 5, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 180, 240 min und 23 h nach vollständigem Phosphatentzug mikroskopiert.

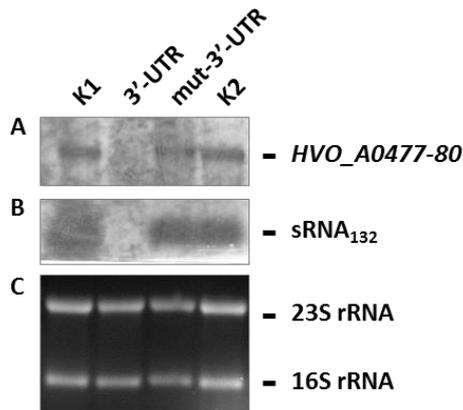


Abbildung A5: Northern Blot-Analyse zum *in vivo*-Nachweis der 3'-UTR-Bindung durch sRNA₁₃₂ nach 30-minütigem Phosphatentzug. Gezeigt sind Proben von Wildtyp-Stämmen jeweils transformiert mit dem Plasmid pMB1 (K1), pJB21 (3'-UTR), pJK03 (3'-UTR mit mutierter Bindestelle) oder pNP10 (K2). **A.** Sonde gegen das Gen *HVO_A0480* zur Detektion des Transkriptes des Operons *HVO_A0477-80*. **B.** Sonde gegen das Transkript von sRNA₁₃₂. **C.** Kontrolle 16S und 23S rRNA.

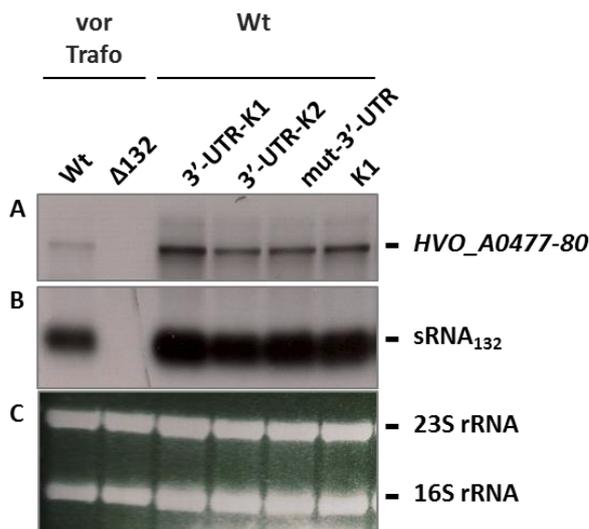


Abbildung A6: Northern Blot-Analyse von Wildtyp (Wt) und Deletionsmutante ($\Delta 132$) zur Kontrolle des *in vivo*-Nachweises. Gezeigt sind Wt und $\Delta 132$ (vor Trafo) und von Wt-Kulturen transformiert mit zwei verschiedenen Klonen von pJB21 (3'-UTR-K1 und -K2), mit pJK03 (3'-UTR mit mutierter Bindestelle) und mit dem Kontrollplasmid pMB1 ohne UTR (K1). **A.** Sonde gegen *HVO_A0480* zur Detektion des Operons *HVO_A0477-80*. **B.** Sonde gegen sRNA₁₃₂. **C.** Ladekontrolle 16S und 23S rRNA

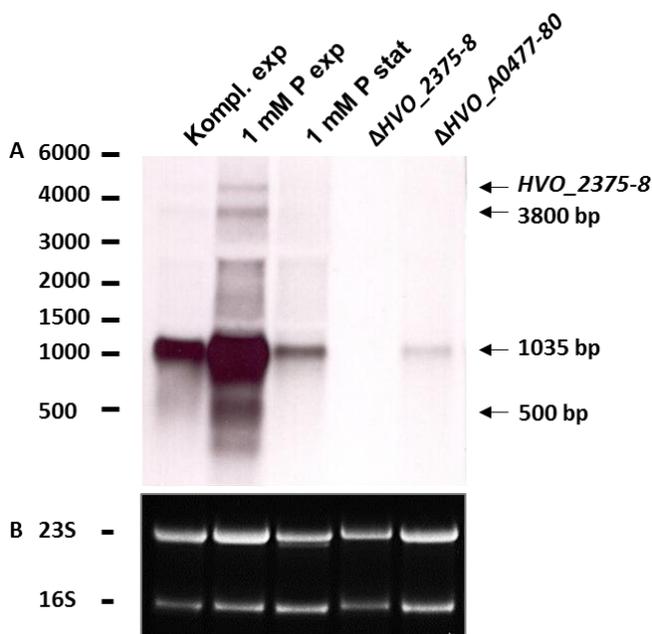


Abbildung A7: Northern Blot-Analyse zur Detektion prozessierter und nicht-prozessierter Transkripte von *HVO_2375-8*. RNA-Proben aus der exponentiellen Wachstumsphase bei Wachstum in Komplexmedium (Kompl. exp) und in der exponentiellen (1 mM exp P) und stationären Phase (1 mM stat P) bei Wachstum in synthetischem Medium mit 1 mM Phosphat. Gezeigt sind RNA-Proben der Deletionsmutante des ABC-Transportsystems $H26\Delta HVO_{2375-8}$ bzw. $H26\Delta HVO_{A0477-80}$ in der exponentiellen Wachstumsphase. **A.** Das Haupttranskript liegt bei etwa 1000 bp. Weitere Transkripte liegen unterhalb von 500 bp und etwa bei 500 bp. Zudem wurden Transkripte bei 1800, 3800 und zwischen 4000 und 5000 bp detektiert. **B.** Ladekontrolle 23S und 16S rRNA

2. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Stammbaum zur phylogenetischen Einordnung der Archaea	8
Abbildung 2: Schematischer Überblick über Interaktionen archaealer sRNAs mit ihren Ziel-mRNAs	18
Abbildung 3: Chromosomale Lokalisation der sRNA ₁₃₂ und des <i>in silico</i> vorhergesagten Ziel-Operons <i>HVO_A0477-80</i>	21
Abbildung 4: Schematischer Aufbau eines ABC-Transporters	23
Abbildung 5: Aufbau des Southern Blots	61
Abbildung 6: Verteilung von „Loss-of-function“ (LOF)- und „Gain-of-function“ (GOF)-Phänotypen	76
Abbildung 7: Anzahl der Phänotypen unter den verschiedenen Bedingungen	77
Abbildung 8: Verteilung der Mutanten mit Phänotypen bezüglich der Wachstumsbedingungen und der Art des Phänotyps	78
Abbildung 9: Wachstumskurven des Elternstamms (schwarz) verglichen mit ausgewählten Deletionsmutanten bei Wachstum mit verschiedenen Kohlenstoffquellen	79
Abbildung 10: Wachstumskurven ausgewählter Deletionsmutanten im Vergleich zum Elternstamm H26	80
Abbildung 11: Wachstum von Wildtyp (schwarz) und Deletionsmutanten (bunt) nach Induktion verschiedener Stressbedingungen	82
Abbildung 12: Schwärmverhalten von 17 Deletionsmutanten im Vergleich zu dem entsprechenden Elternstamm	83
Abbildung 13: Genomische Lokalisation der sRNA ₄₇₉ innerhalb eines CRISPR/Cas-Lokus auf dem linearen Chromosom pHV4 und ihre potentielle Interaktion mit einer Ziel-mRNA vorhergesagt mittels TargetRNA	87
Abbildung 14: Northern Blot-Analyse mit einer Sonde gegen <i>HVO_0597 (osmC)</i>	88
Abbildung 15: Auswertung der Northern Blot-Analyse mit einer Sonde gegen das Transkript <i>HVO_0597 (osmC)</i>	89
Abbildung 16: Northern Blot-Analyse der Expression von sRNA ₃₀ in verschiedenen Wachstumsphasen	90
Abbildung 17: Vergleich des Wachstums des Elternstamms H26 (Wt) (schwarz) mit der Deletionsmutante der sRNA ₃₀ (Δ sRNA ₃₀) (rot)	91
Abbildung 18: Northern Blot-Analyse von Wildtyp und Δ sRNA ₃₀ nach Wachstum bei 42°C und 51°C	92
Abbildung 19: Vergleich des Proteoms von Wildtyp (Wt) und H26 Δ sRNA ₃₀ (Δ) nach Hitzeschock mittels denaturierender SDS-Gelelektrophorese	94
Abbildung 20: Vergleich des Proteoms von Wildtyp (Wt) und H26 Δ sRNA ₃₀ (Δ) vor und nach Hitzeschockinduktion mittels denaturierender SDS-Gelelektrophorese	95

Abbildung 21: Konservierung der sRNA ₁₃₂ ermittelt durch „Nucleotide BLAST“ mit dem Server NCBI	97
Abbildung 22: Konservierte Struktur der sRNA ₁₃₂ ermittelt mit dem Programm LocARNA der Universität Freiburg	99
Abbildung 23: Northern Blot-Analyse des Wildtyps zur Detektion der Transkripte von <i>HVO_A0480</i> und sRNA ₁₃₂ bei Phosphatkonzentrationen von 0 bis 5 mM	99
Abbildung 24: Northern Blot-Analyse von Wildtyp und Deletionsmutante der sRNA ₁₃₂ zum Vergleich der Transkriptlevel von <i>HVO_A0480</i> und sRNA ₁₃₂ bei Phosphatkonzentrationen von 0 bis 5 mM	100
Abbildung 25: Northern Blot-Analyse zu verschiedenen Zeitpunkten nach Phosphatentzug	101
Abbildung 26: Induktionskinetik von <i>HVO_A0477-80</i> in Wildtyp (Wt) und Deletionsmutante der sRNA ₁₃₂ (Δ) nach Phosphatentzug	103
Abbildung 27: Lichtmikroskopie von Wildtyp (Wt) und Deletionsmutante der sRNA ₁₃₂ (Δ 132) in synthetischem Medium mit 5 mM Phosphat in der exponentiellen Wachstumsphase	103
Abbildung 28: Northern Blot-Analyse der RNA-Proben für den Reporterassay entnommen nach 30-minütigem Phosphatentzug	104
Abbildung 29: Orthologe und homologe Proteincluster der drei ABC-Transportsysteme für Phosphat von <i>H. salinarum</i> R1 DSM 671 und <i>H. volcanii</i> DS2 erstellt mittels Microbial Genome Database (MBGD)	111
Abbildung 30: Northern Blot-Analyse zum Vergleich der Transkriptlevel von <i>HVO_A0477-80</i> (A), sRNA ₁₃₂ (B) und <i>HVO_2375</i> (C)	112
Abbildung 31: Northern Blot-Analyse des Transkriptlevels von <i>HVO_2375</i> von Wildtyp (Wt) und Deletionsmutante der sRNA ₁₃₂ (Δ) bei verschiedenen Phosphatkonzentrationen	113
Abbildung 32: Anteil an roten und weißen Kolonien nach direkter Konkurrenz des weißen Wildtyps H26 Δ HVO_2528 und einer roten Deletionsmutante in Dreifachbestimmung	114
Abbildung 33: Konservierung der Promotorregion von sRNA ₁₃₂ ermittelt durch „Nucleotide BLAST“ mit der Datenbank NCBI	116
Abbildung 34: Konservierungen der Promotorelemente der ABC-Transporter <i>HVO_A0477-80</i> und <i>HVO_2375-8</i> von <i>H. volcanii</i> DS2 ermittelt durch „Nucleotide BLAST“ mit der Datenbank NCBI	117
Abbildung 35: Schematischer Überblick über alle Bedingungen unter denen ein regulatorischer Einfluss von sRNAs von <i>H. volcanii</i> gezeigt werden konnte	119
Abbildung 36: Schema für die Regulation durch Bindung von sRNA ₁₃₂ an die 3'-UTR der mRNA von <i>HVO_A0477-80</i>	133
Abbildung 37: Informationsgehalt des humanen Genoms	141
Abbildung A1: Expression von sRNA ₃₆₂ nach Wachstum mit Glucose, Xylose und Acetat	III
Abbildung A2: Northern Blot-Analyse von sRNA ₃₀ nach 15-minütigem Hitzeschock (51°C)	III
Abbildung A3: Northern Blot-Analyse von Wildtyp (Wt) und Deletionsmutante der sRNA ₁₃₂ (Δ 132) nach 30-minütigem Phosphatentzug	III

Abbildung A4: Mikroskopische Kontrolle von Wildtyp (Wt) und Deletionsmutante der sRNA ₁₃₂ (Δ 132) während dem Phosphatentzug	IV
Abbildung A5: Northern Blot-Analyse zum <i>in vivo</i> -Nachweis der 3'-UTR-Bindung durch sRNA ₁₃₂ nach 30-minütigem Phosphatentzug	V
Abbildung A6: Northern Blot-Analyse von Wildtyp (Wt) und Deletionsmutante (Δ 132) zur Kontrolle des <i>in vivo</i> -Nachweises	V
Abbildung A7: Northern Blot-Analyse zur Detektion prozessierter und nicht-prozessierter Transkripte von <i>HVO_2375</i>	V

3. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Verwendete Oligonukleotide	33
Tabelle 2: Verwendete und generierte Plasmide	35
Tabelle 3: Verwendete Stämme	35
Tabelle 4: Auflistung der 27 Deletionsmutanten für die phänotypische Charakterisierung	36
Tabelle 5: Zusammensetzung der Salzlösung und der Supplemente zur Herstellung des synthetischen Mediums	37
Tabelle 6: Zusammensetzung von Supplement-, Eisensulfat- und Uracil-Lösung	38
Tabelle 7: Kohlenstoffquellen, die zur Herstellung des synthetischen Mediums verwendet wurden	39
Tabelle 8: Nährstofflösung und Supplemente zur Selektion	39
Tabelle 9: Zusammensetzung des Freezing-Mediums für das Anlegen von Glycerin-Kulturen zur dauerhaften Einlagerung von <i>H. volcanii</i> -Zellen	40
Tabelle 10: Die Zusammensetzung des SOB+-Mediums zur Zellanzucht von <i>E. coli</i>	41
Tabelle 11: Puffer zur Isolation chromosomaler DNA	44
Tabelle 12: Puffer und Lösungen zur Isolation von Plasmid-DNA	45
Tabelle 13: Puffer zur Herstellung der Agarosegele und für die Gelelektrophorese	46
Tabelle 14: Mengen der verschiedenen DNA-Matrizen und zur Amplifikation benötigte Zyklenzahlen.....	47
Tabelle 15: Puffer und Lösungen zur Amplifikation von DNA-Fragmenten.....	48
Tabelle 16: Standard PCR-Ansatz zur Amplifikation von DNA-Fragmenten	48
Tabelle 17: Standard PCR-Programm zur Amplifikation von DNA-Fragmenten	48
Tabelle 18: Lösungen zum Blocken der Glasträger für den DNA-Mikroarray.....	51
Tabelle 19: Ansatz für die cDNA-Synthese von RNA-Proben für den DNA-Mikroarray.....	52
Tabelle 20: Lösungen zur Vorbereitung der Proben für den DNA-Mikroarray.....	53
Tabelle 21: Benötigte Lösungen für die Hybridisierung des DNA-Mikroarrays mittels Tecan HS 4800 Pro Hybridisierungsstation	54
Tabelle 22: Programm der Tecan Hybridisierungsstation HS 4800 Pro zur Hybridisierung der Glasträger	54
Tabelle 23: Reaktionsansatz für die Ligation von geschnittenem Vektor und Fusionsprodukt .	57
Tabelle 24: Zusammensetzung des TB-Puffers zur Vorbereitung von <i>E. coli</i> -Zellen auf die Transformation.....	57
Tabelle 25: Medien und Lösungen für die Transformation von <i>H. volcanii</i>	58
Tabelle 26: Lösungen und Puffer für die Southern Blot-Analyse.....	59
Tabelle 27: Lösung für die Hybridisierung der Membran	61
Tabelle 28: Puffer und Lösungen für den Chemolumineszenz Nachweis.....	62

Tabelle 29: Zusammensetzungen der Lösungen zur Isolation von RNA mittels Phenol/Chloroform-Fällung	63
Tabelle 30: Benötigte Lösungen und Bestandteile der RNA-Gele für die Northern Blot-Analyse	64
Tabelle 31: Lösungen für die Proteinfällung mit Methanol und Chloroform	65
Tabelle 32: Zusammensetzung der Lösungen und Puffer zur Herstellung der SDS-Gele und Durchführung der SDS-PAGE.....	66
Tabelle 33: Zusammensetzung der Lösungen zur Herstellung der SDS-Gele	67
Tabelle 34: Zusammensetzung und Konzentrationen der Puffer und Lösungen, die für den Enzymtest verwendet wurden	69
Tabelle 35: Reaktionsansatz des Enzymtests pro Vertiefung der Mikrotiterplatte.....	70
Tabelle 36: Parameter zur Ermittlung von Sequenzkonservierungen von <i>sRNA</i> ₁₃₂ und der Operons <i>HVO_2375-8</i> und <i>HVO_A0477-80</i> bzw. der entsprechenden Promotorsequenzen	71
Tabelle 37: Parameter, ihre Beschreibung und die verwendeten Einstellungen zur Ermittlung der Strukturkonservierung von <i>sRNA</i> ₁₃₂	72
Tabelle 38: Zusammenstellung phänotypischer Unterschiede von <i>sRNA</i> -Deletionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp von mindestens 10%.....	74
Tabelle 39: Potentielle Ziel-mRNAs ermittelt durch <i>in silico</i> -Analyse mit dem Programm TargetRNA	86
Tabelle 40: Potentielle Ziel-mRNAs ermittelt mit dem Programm TargetRNA	86
Tabelle 41: Vergleich des Transkriptom von Wildtyp und Deletionsmutante <i>H26ΔsRNA</i> ₃₀ nach 15-minütigem Hitzeschock bei 51°C im Wasserbad mittels DNA-Mikroarray.....	93
Tabelle 42: Auflistung aller Arten, bei denen die Gensequenzen der <i>sRNA</i> ₁₃₂ oder mindestens eines der Gencluster <i>HVO_A0477-80</i> , <i>HVO_2375-8</i> konserviert waren.....	98
Tabelle 43: Vergleich des Transkriptom von Wildtyp und Deletionsmutante der <i>sRNA</i> ₁₃₂ nach 30-minütigem Phosphatentzug mittels DNA-Mikroarray. In der <i>sRNA</i> -Deletionsmutante mindestens um den Faktor zwei erhöhte Spots	107
Tabelle 44: Vergleich des Transkriptom von Wildtyp und Deletionsmutante der <i>sRNA</i> ₁₃₂ nach 30-minütigem Phosphatentzug mittels DNA-Mikroarray. In der <i>sRNA</i> -Deletionsmutante mindestens um den Faktor zwei erniedrigte Spots	108
Tabelle 45: Transportproteine und Transportsysteme für die putativen Substrate Phosphat, Phosphonat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat annotiert in <i>H. volcanii</i>	110
Tabelle A1: Auswertung der phänotypischen Charakterisierung von <i>H. volcanii</i> . Wachstumsausbeute von 27 <i>sRNA</i> -Deletionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp	I
Tabelle A2: Auswertung der phänotypischen Charakterisierung von <i>H. volcanii</i> . Verdopplungszeit von 27 <i>sRNA</i> -Deletionsmutanten verglichen unter zehn verschiedenen Bedingungen mit dem Wildtyp	II
Tabelle A3: Transkriptomanalyse mittels DNA-Mikroarray. Vergleich der Deletionsmutante von <i>sRNA</i> _{htsf468} mit dem Wildtyp bei 4 M NaCl.....	III

4. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius	GOF	engl. Gain-of-function
µg	Mikrogramm	Gt	Gigatonne
µM	Mikromolar	H ₂ O	Wasser
µmol	Mikromol	H ₂ O bidest.	Aqua bidestillata
A	Adenin	H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
ABC	ATP-bindende Kasette	H ₃ BO ₃	Borsäure
ad	auffüllen auf	HCl	Salzsäure
APS	Ammoniumperoxodisulfat	Hfq	engl. host factor Qβ
asRNAs	<i>cis</i> -kodierte Antisense RNAs	hnRNP-K	heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein K
ATP	Adenosintriphosphat	HTS	Hochdurchsatzsequenzierung
BLAST	engl. basic local alignment search tool	k.D.	keine Daten
BRE	TFIIB-Erkennungselement	K ₂ HPO ₄	Dikaliumhydrogenphosphat
BSA	Rinderserumalbumin	kbp	Kilo-Basenpaare
c	Konzentration	KCl	Kaliumchlorid
C ₆ H ₈ O ₇	Zitronensäure	kons. hyp. Prot.	konserviertes hypothetisches Protein
CaCl ₂	Calciumchlorid	<i>lacZ</i>	β-Galactosidase
CAS	Casaminosäuren	lincRNAs	lange intergene RNAs
cm	Zentimeter	lncRNAs	lange nicht-kodierende RNAs
CoCl ₂	Cobalt(II)-Chlorid	LOF	engl. Loss-of-function
CRISPR	engl. clustered regularly interspaced short palindromic repeats	LSm	Sm-ähnliche
crRNAs	CRISPR RNAs	M	Molar
cr-RT-PCR	zirkularisierte RNA-Reverse Transkriptase-PCR	Mbp	Mega-Basenpaare
CuCl ₂	Kupfer(II)-Chlorid	MgCl ₂	Magnesiumchlorid
d	Schichtdicke	MgSO ₄	Magnesiumsulfat
dATP	Desoxyadenintri-phosphat	min	Minute(n)
dCTP	Desoxycytosintri-phosphat	mind.	mindestens
DEPC	Diethyl-dicarbonat	mJ	Millijoules
dGTP	Desoxyguanintri-phosphat	ml	Milliliter
DHF	Dihydrofolat	MnCl ₂	Manganchlorid
DIG	Digoxigenin	MOPS	3-(N-Morpholino)propan- sulfonsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid	mRNAs	messenger RNAs
DNA	Desoxyribonukleinsäure	MTPs	Mikrotiterplatten
dNTP	Desoxynukleotid-Triphosphat	Na ₂ MoO ₄	Natriummolybdat
DPANN	Supergruppe bestehend aus archaealen Nano-Organismen	NaCl	Natriumchlorid
dRNA-Seq	differentielle RNA- Sequenzierung	NADPH	Nicotinamidenindinukleotid- phosphat
dTTP	Desoxythymidintri-phosphat	NaOH	Natriumhydroxid
ε	spezifischer Extinktionskoeffizient	NBD	Nukleotid-Bindedomäne
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	ncRNAs	nicht-kodierende RNAs
EMSA	engl. electrophoretic mobility shift assay	NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
eRNAs	enhancer RNAs	NiCl ₂	Nickel(II)-Chlorid
EtOH	Ethanol	nkat	Nanokatal
FeSO ₄	Eisensulfat	nm	Nanometer
g	Gramm	nt	Nukleotid(e)
G	Guanin	ORFs	offene Leserahmen
Gfp	grün fluoreszierendes Protein	p.a.	pro analysi
		PAGE	Polyacrylamid- Gelelektrophorese
		P-Boxen	Phosphat-Box
		PCR	Polymerase-Kettenreaktion

PEG	Polyethylenglycol	SOB	engl. Super Optimal Broth
piRNAs	engl. piwi-interacting RNAs	Std.	Stunden
PMT-Gain	Photomultiplier-Verstärkung	SVL	Sphäroplasten
PNPase	Polynukleotid Phosphorylase		Verdünnungslösung
PolyA	Poly-Adenin	T	Thymin
pre-mRNA	Vorläufer mRNA	TACK	Supergruppe bestehend aus
Pst	phosphatspezifischer Transport		Thaum-, Loki-, Bathy-, Aig-,
PTGS	post-transkriptionelles Gen-Silencing		Cren- und Korarchaeota
RNA	Ribonukleinsäure	TBE	Tris-Borat-EDTA
RNase	Ribonuklease	TE	Tris-EDTA
RNA-Seq	Sequenzierung einer cDNA-Bibliothek	TEMED	Tetramethylethylendiamin
rRNA	ribosomale RNA	TGS	transkriptionelles Gen-Silencing
s.	siehe	TMDs	Transmembrandomänen
s.a.	Standardabweichung	tRFs	tRNA-derived fragments
SBL	Sphäroplasten Bildungslösung	Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
SBP	Substratbindeprotein	tRNA	transfer RNA
SDS	Natriumdodecylsulfat	TSS	Transkriptionsstartstellen
SD-Sequenz	Shine Dalgarno-Sequenz	U	Unit, Uracil
siRNAs	engl. small interfering RNAs	Upm	Umdrehungen pro Minute
S-Layer	engl. surface layer - Oberflächenschicht	UTR	untranslatierte Region
SmAPs	Sm-ähnliche archaeale Proteine	UV-Licht	Ultraviolettstrahlung
snoRNAs	small nucleolar RNAs	V	Volt
SNR Median	Median des Signal-Rausch-Verhältnisses	vgl.	vergleiche
		Wt	Wildtyp
		ZnSO ₄	Zinksulfat

5. PUBLIKATIONEN

5.1 PUBLIKATIONEN IN WISSENSCHAFTLICHEN FACHZEITSCHRIFTEN

Maier L-K, Benz J, Fischer S, Alstetter M, Jaschinski K, Hilker R, Becker A, Allers T, Soppa J, Marchfelder A. (2015) Deletion of the Sm1 encoding motif in the lsm gene results in distinct changes in the transcriptome and enhanced swarming activity of *Haloferax* cells. *Biochimie*. **117**: 129-37.

Jaschinski K, Babski J, Lehr M, Burmester A, Benz J, Heyer R, Dörr M, Marchfelder A, Soppa J. (2014) Generation and phenotyping of a collection of sRNA gene deletion mutants of the haloarchaeon *Haloferax volcanii*. *PLoS ONE*. **9** (3): e90763.

Babski J, Maier L-K, Heyer R., Jaschinski K, Prasse D, Jäger D, Randau L, Schmitz RA, Marchfelder A, Soppa J. (2014) Small regulatory RNAs in Archaea. *RNA Biology*. **11** (5): 484-93.

Heyer R, Dörr M, Jellen-Ritter A, Späth B, Babski J, Jaschinski K, Soppa J, Marchfelder A. (2012) High throughput sequencing reveals a plethora of small RNAs including tRNA derived fragments in *Haloferax volcanii*. *RNA Biology*. **9** (7): 1011-8.

Jantzer K, Zerulla K, Soppa J. (2011) Phenotyping in the archaea: optimization of growth parameters and analysis of mutants of *Haloferax volcanii*. *FEMS Microbiology Letters*. **322** (2): 123-30.

Fischer S, Benz J, Späth B, Jellen-Ritter A, Heyer R, Dörr M, Maier L-K, Menzel-Hobeck C, Lehr M, Jantzer K, Babski J, Soppa J, Marchfelder A. (2011) Regulatory RNAs in *Haloferax volcanii*. *Biochemical Society Transactions*. **39** (1): 159-62.

5.2 VORTRÄGE AUF WISSENSCHAFTLICHEN KONGRESSSEN

Kliemt J, Jaschinski K, Babski J, Soppa J. (2015) Target identification of sRNAs in the halophilic archaeon *Haloferax volcanii*. Vortrag auf *Follow-up Meeting of the members of the former DFG priority program SPP1258 and other interested scientists in the field „Sensory and Regulatory RNAs in Prokaryotes and CRISPR-Cas“* in Braunschweig

Jaschinski K, Babski J, Kliemt J, Soppa J. (2013) Characterization of sRNAs in the halophilic archaeon *Haloferax volcanii* and their capability to regulate translation via 3'-UTRs. Vortrag auf *14th Frankfurt Meeting on „Genome Function and Gene Regulation in Archaea“* in Schmittgen.

Jantzer K, Babski J, Menzel-Hobeck C, Heyer R, Marchfelder A, Soppa J. (2011) Generation and Characterization of sRNA Gene Deletion Mutants of *Haloferax volcanii*. Vortrag auf *13th Frankfurt Meeting on „Genome Function and Gene Regulation in Archaea“* in Wiesbaden-Naurod.

5.3 POSTERPRÄSENTATIONEN AUF WISSENSCHAFTLICHEN KONGRESSSEN

Jaschinski K, Kliemt J, Babski J, Soppa J. (2016) Identification of potential target mRNAs of sRNAs in the halophilic archaeon *Haloferax volcanii*. Posterpräsentation auf der Jahrestagung der Vereinigung für allgemeine Mikrobiologie (VAAM).

Jantzer K, Babski J, Lehr M, Mayer L-K, Heyer R, Marchfelder A, Soppa J. (2014). Biological roles and identification of potential mRNA targets of sRNAs in the halophilic archaeon *Haloferax volcanii*. Posterpräsentation auf der Jahrestagung der Vereinigung für allgemeine Mikrobiologie (VAAM) in Tübingen.

Lehr M, Jaschinski K, Stehr K, Babski J, Heyer R, Benz J, Marchfelder A, Soppa J. (2013) sRNAs in haloarchaea: Different strategies to unravel their biological functions. Posterpräsentation auf der Jahrestagung des Schwerpunktprogramms SPP1258. *Sensory and Regulatory RNAs in prokaryotes* in Würzburg.

Babski J, Kliemt J, Jaschinski K, Lehr M, Mayer L-K, Heyer R, Marchfelder A, Soppa J. (2013) Regulation of potential target mRNAs by sRNAs in the halophilic archaeon *Haloferax volcanii*. Posterpräsentation auf der Jahrestagung des Schwerpunktprogramms SPP1258. *Sensory and Regulatory RNAs in prokaryotes* in Würzburg.

Jantzer K, Babski J, Soppa J. (2012). Biological roles of sRNAs in the halophilic archaeon *Haloferax volcanii* and identification of potential mRNA targets. Posterpräsentation auf *11th UK Archaeal Conference* in Newcastle, Großbritannien.