

# Charakterisierung neuer sRNAs und RNA-Bindeproteine im Pflanzenpathogen *Xanthomonas*

## Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I

– Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Halle (Saale)

vorgelegt von

M. Sc. Monika Dorothea Helm

geb. am 20.06.1988 in Herdecke

Verteidigung: 17.08.2020

Gutachter/in:

1. Prof. Dr. Ulla Bonas
2. Prof. Dr. Sven-Erik Behrens
3. Prof. Dr. Petra Dersch

## Zusammenfassung

Das Gram-negative Pflanzenpathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (*Xcv*) verursacht die bakterielle Fleckenkrankheit auf Tomaten- und Paprikapflanzen. In Vorarbeiten wurden 24 sRNAs (small RNAs) aus *Xcv* identifiziert, validiert und zum Teil untersucht, wobei ein Einfluss auf die Virulenz einiger sRNAs in *Xcv* nachgewiesen wurde. Ziel dieser Arbeit war die Identifikation (i) neuer sRNAs aus *Xcv* und (ii) neuer RNA-Bindeproteine, welche eine Rolle in der Virulenz spielen. In vorherigen Arbeiten generierte RNA-seq Daten wurden händisch auf das Vorhandensein möglicher neuer sRNAs hin untersucht und die sRNA Kandidaten mittels Northern Blot auf ihre Transkriptlänge und auf eine HrpG- oder HrpX-abhängige Regulation geprüft. Auf diese Weise konnten, zusätzlich zu den bereits 24 bekannten sRNAs, 13 neue sRNAs identifiziert werden, deren Expression jedoch HrpG- und HrpX-unabhängig ist. Alle im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstellten Mutanten in bereits bekannten sRNA-Genen von *Xcv* verhielten sich wie der Wildtyp und wurden nicht weiter untersucht. Pulldown-Experimente mit anschließender massenspektrometrischer Untersuchung (MS-Analyse) identifizierten das sRNA-Bindeprotein DeaD, eine ATP-anhängige RNA-Helikase. In weiteren Pulldown-Experimenten stellte sich heraus, dass DeaD *in vitro* eine generelle Affinität zu RNA aufweist. Infektionsstudien von *Xcv* mit *deaD*-Mutanten zeigten eine deutlich verminderte Virulenz in Tomaten- und Paprikapflanzen. Interessanterweise werden die für die Pathogenität von *Xcv* essenziellen Regulatoren HrpG und HrpX durch DeaD reguliert. HrpG wird auf Transkript-Ebene und HrpX posttranskriptionell reguliert. Ein Wachstumseffekt einer *deaD*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp wurde bei niedrigen Temperaturen nachgewiesen, war jedoch bei für *Xcv* optimalen Temperaturen nicht sichtbar. Somit wurde in dieser Arbeit die Helikase DeaD erstmals aus einem pflanzlichen pathogenen Bakterium charakterisiert und als neuer Virulenzfaktor identifiziert.

## Summary

The gram negative plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (*Xcv*) is the causal agent of bacterial spot disease and infects tomato and pepper plants. In previous work 24 sRNAs from *Xcv* were identified, validated, and for some an influence on virulence could be shown. The aim of this work was to identify (i) new sRNAs from *Xcv* and (ii) new RNA-binding proteins, which play a role in virulence. RNA-seq data, which were generated in previous work, were searched through „by eye“ for the presence of possible new sRNAs. These candidates were tested for their transcript length and for HrpG- or HrpX-dependent regulation using Northern Blots. In addition to the 24 known sRNAs, 13 new sRNAs could be identified. The expression of the new identified sRNAs was independent of HrpG and HrpX. All mutants from already known sRNA genes which we created behaved like the wild type. Pulldown experiments with following mass spectrometric analysis (MS-analysis) identified the sRNA binding protein DeaD, an ATP-dependent RNA helicase. Further pulldown experiments showed that DeaD has a general affinity for RNA *in vitro*. Infection studies of *Xcv* with *deaD* mutants showed a significantly reduced virulence in tomato and pepper plants. Interestingly the regulators HrpG and HrpX, which are essential for the pathogenicity of *Xcv*, are regulated by DeaD. HrpG is regulated at the transcript level and HrpX posttranscriptionally. At temperatures below the optimum of *Xcv* it could be shown that the *deaD* mutant grew slower than the wild type. The helicase DeaD was characterized for the first time from a plant pathogenic bacterium and shown to be a virulence factor.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Das phytopathogene Bakterium <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> (<i>Xcv</i>)</b>	<b>1</b>
1.1.1	Die essenziellen Pathogenitätsfaktoren HrpG und HrpX regulieren die Transkription von Virulenz-assoziierten Genen	2
<b>1.2</b>	<b>Posttranskriptionelle Regulation in Bakterien: Die Schlüsselkomponenten</b>	<b>4</b>
1.2.1	Die Rolle von sRNAs in der posttranskriptionellen Regulation	5
	Die Rolle von bakteriellen sRNAs in der Virulenz	6
1.2.2	Bakterielle RNA-Bindeproteine und ihre Rolle in der posttranskriptionellen Regulation	7
	Hfq: ein globaler Mediator der sRNA-mRNA-Interaktion	7
	CsrA: ein globaler Regulator mit limitierten sRNA-Interaktoren	8
	Kälteschockproteine: globale RNA-Chaperons	9
<b>1.3</b>	<b>RNA-DEAD-Box-Helikasen in Bakterien</b>	<b>9</b>
1.3.1	Charakteristika von RNA-DEAD-Box-Helikasen	10
<b>1.4</b>	<b>Ziele dieser Arbeit</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>12</b>
<b>2.1</b>	<b>Material</b>	<b>12</b>
2.1.1	Medien	12
2.1.2	Antibiotika	12
2.1.3	Verwendete Bakterienstämme	13
2.1.4	Verwendete Oligonukleotide	18
2.1.5	Verwendete Northern-Blot-Sonden	21
<b>2.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>22</b>
2.2.1	Anzucht und Lagerung von Bakterien	22
2.2.2	Erstellung von <i>Xcv</i> -Mutanten	22
	Erstellung von sRNA-Deletionsmutanten	22
	Erstellung der $\Delta$ deaD-Mutante und der DEAD-Motiv-Mutante	22
	Erstellung von sRNA-Expressions-Mutanten	23
2.2.3	Anzucht von Tomaten- und Paprikapflanzen	23
2.2.4	Infektion von Tomaten und Paprikapflanzen mit <i>Xcv</i>	23
2.2.5	Wachstumskurven mit <i>Xcv</i>	24
	In vitro Wachstumskurven	24
	In planta Wachstumskurven	24
2.2.6	Identifikation neuer sRNA-Kandidaten	24
2.2.7	RNA-Isolation	24
2.2.8	Northern Blot	25
2.2.9	<i>In vitro</i> Transkription von biotin-markierten sRNAs	25
2.2.10	Pulldown-Experiment für die Identifizierung neuer sRNA-Bindeproteine	26
2.2.11	MS-Analyse zur Identifikation von RNA-Bindeproteinen	27
2.2.12	Messung der Fluoreszenz von GFP-Reporterkonstrukten in <i>Xcv</i>	27
2.2.13	SDS-PAGE und Western Blot	27

2.2.14	Quantitative RT-PCR .....	28
2.2.15	Rekombinante Proteinexpression in <i>E. coli</i> .....	28
2.2.16	Bestimmung der ATPase Aktivität von DeaD.....	29
2.2.17	Translationsassay .....	29
2.2.18	Verwendete Programme für bioinformatische Analysen.....	30
2.2.19	Statistische Methoden .....	30
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>31</b>
<b>3.1</b>	<b>Identifizierung und Charakterisierung von sRNAs .....</b>	<b>31</b>
3.1.1	Neu identifizierte sRNAs werden HrpX/HrpG-unabhängig reguliert.....	31
3.1.2	Das Plasmid pBRM-P+T eignet sich für die sRNA-Überexpression .....	35
3.1.3	Die Deletion beziehungsweise Überexpression von sRNAs hat keinen Effekt auf die Virulenz von <i>Xcv</i> .....	36
3.1.4	Deletion und Überexpression ausgewählter sRNA-Gene hat keinen Einfluss auf das Wachstum <i>in vitro</i> .....	38
<b>3.2</b>	<b>Identifizierung und Charakterisierung von RNA-Bindeproteinen .....</b>	<b>40</b>
3.2.1	Die Pulldown-Strategie eignet sich für die Kandidaten-Suche neuer (s)RNA-Bindeproteine .....	40
3.2.2	Ein unbekanntes Protein bindet sRNAs .....	41
3.2.3	Die RNA-DEAD-Box-Helikase DeaD bindet sRNAs <i>in vitro</i> .....	42
3.2.4	Die RNA-DEAD-Box-Helikase DeaD ist <i>in vitro</i> ein unspezifisches RNA-Bindeprotein .....	45
3.2.5	Die Deletion von <i>deaD</i> vermindert die Virulenz von <i>Xcv in planta</i> .....	46
3.2.6	Die Deletion von <i>deaD</i> in <i>Xcv</i> führt zu reduziertem Wachstum bei 16°C.....	48
3.2.7	DeaD reguliert die essenziellen Faktoren der Virulenz von <i>Xcv</i> auf Transkriptebeine.....	50
3.2.8	DeaD beeinflusst essenzielle Pathogenitätsfaktoren von <i>Xcv</i> auch auf Proteinebene .....	51
3.2.9	DeaD beeinträchtigt die Synthese von HrpG/X regulierten Proteinen.....	54
3.2.10	Die Mutation der 5'UTR von <i>hrpX</i> führt zu DeaD-unabhängiger Proteinsynthese von HrpX .....	55
3.2.11	DeaD stimuliert die Translation von HrpX auch <i>in vitro</i> .....	58
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>62</b>
<b>4.1</b>	<b>Das Potential der neuen sRNAs aus <i>Xcv</i> .....</b>	<b>62</b>
4.1.1	Neu identifizierte sRNAs haben zum Teil proteinkodierende Kapazität .....	62
4.1.2	Das Detektionslimit ist entscheidend für die Identifikation neuer sRNAs.....	62
4.1.3	Die Sequenzierdaten und die Northern-Blot-Ergebnisse zeigten weitestgehend Übereinstimmungen .....	63
<b>4.2</b>	<b>Die Untersuchung von bereits publizierten sRNAs aus <i>Xcv</i> ergab nur wenige neue Erkenntnisse .....</b>	<b>63</b>
4.2.1	Modifikation des Expressionsvektors zur Expression von sRNAs .....	63
4.2.2	sRNA Mutanten verhalten sich wie der Wildtyp .....	64
4.2.3	Die Überexpression von sX4 war nicht nachweisbar.....	65

<b>4.3</b>	<b>Identifizierung von RNA-Bindeproteinen .....</b>	<b>65</b>
4.3.1	Detektion von DeaD durch den anti-Maus Antikörper.....	65
4.3.2	DeaD zeigte unspezifische Interaktionen mit RNA.....	66
4.3.3	DeaD: ein neues sRNA-Bindeprotein?.....	67
4.3.4	DEAD-Box Helikasen sind in der Regel nicht redundant.....	69
4.3.5	DeaD ist für eine erfolgreiche Infektion von Vorteil.....	69
4.3.6	DeaD reguliert HrpX auf Transkript- und Proteinebene .....	70
4.3.7	Die Überexpression von DeaD in den Komplementationstämmen führt zu Abweichungen in den Messwerten .....	73
4.3.8	Die Expression von <i>deaD</i> ist bei niedrigen Temperaturen von Vorteil.....	74
<b>5</b>	<b>Ausblick.....</b>	<b>76</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>77</b>
<b>7</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>85</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>90</b>
<b>9</b>	<b>Erklärung.....</b>	<b>91</b>
<b>10</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>92</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
Avr	Avirulenz
Bp	Basenpaar
cDNA	<i>copy (complementary) DNA</i>
csr	<i>Carbon storage regulator</i>
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
ECW	<i>Early Cal Wonder</i> ; Kultivar Solanum Capsicum (Paprika)
Gent	Gentamycin
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
Gfo	Glukose-Fruktose-Oxidoreduktase
Hfq	<i>Host-factor required for phage Q<math>\beta</math> RNA replication</i>
HR	„ <i>Hypersensitive Response</i> “ (programmierter Zelltod)
Hrp	<i>hypersensitive response and pathogenicity</i>
Kan	Kanamycin
KBE	Koloniebildende Einheit
kDa	Kilo Dalton
NYG	Nutrient Yeast Glycerol (Medium für <i>Xcv</i> )
LB	Lysogenic Broth
MA	Minimal Medium A
mRNA	Messenger RNA

Nt	Nukleotid
NYG	<i>Nutrient-Yeast-Glycerol</i> ; Komplexmedium
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PCR	<i>Polymerase-Chain-Reaction</i>
pv	Pathovar
RBP	RNA-Bindeprotein
RBS	Ribosomen-Bindestelle
RNA-seq	RNA-Sequenzierung
SD	<i>Shine-Dalgarno</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SF	Superfamilie
Spec	Spectinomycin
spp.	Subspezies
sRNA	<i>Small RNA</i>
T3SS	Typ-III-Sekretionssystem
TE	Totalextrakt
UTR	<i>Untranslated region</i>
Xcv	<i>Xanthomonas campestris pv. vesicatoria</i>



## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Infektion von Paprika-Blatt und Frucht durch <i>Xcv</i> .....	2
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Infektion einer Pflanzenzelle mit <i>Xcv</i> .....	3
Abbildung 3: Regulationsmechanismus von sRNAs .....	6
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Motive von DEAD-Box-Helikasen .....	11
Abbildung 5: Schematische Darstellung von RNA-seq-Daten zur Identifikation neuer sRNA-Kandidaten.....	31
Abbildung 6: Die neu identifizierten sRNAs werden HrpG-/HrpX-unabhängig exprimiert .....	33
Abbildung 7: Das modifizierte Plasmid pBRM-P+T eignet sich gut für die sRNA-Expression. ....	36
Abbildung 8: Die Deletion beziehungsweise Überexpression ausgewählter sRNA-Gene hat keinen Einfluss auf die Virulenz von <i>Xcv</i> . ....	37
Abbildung 9: Northern Blot zur Detektion der sRNAs sX2, sX4, sX8 und sX11.....	38
Abbildung 10: Die Deletion und die Überexpression von sRNA-Genen haben keinen Effekt auf das Wachstum <i>in vitro</i> .....	39
Abbildung 11: sX7, sX16 und sX17 binden im Pulldown an CsrA .....	41
Abbildung 12: Ein Unbekanntes Protein bindet sRNAs im Pulldown-Experiment .....	42
Abbildung 13: Unbekanntes Protein bindet im Pulldown an sX4.....	43
Abbildung 14: Bestätigung der Detektion von DeaD durch anti-c-Myc (anti-Maus).....	44
Abbildung 15: DeaD interagiert mit verschiedenen <i>in vitro</i> transkribierten RNAs. ....	45
Abbildung 16: Schematische Darstellung der <i>deaD</i> -Mutanten .....	46
Abbildung 17: Die Deletion von <i>deaD</i> bzw. des DEAD-Motivs reduziert die Virulenz von <i>Xcv</i> in Paprika- und Tomatenpflanzen .....	47
Abbildung 18: Die <i>deaD</i> -Mutante verhält sich in Bezug auf das Wachstum <i>in planta</i> wie der Wildtyp. ....	48
Abbildung 19: Das Wachstum von der <i>deaD</i> -Mutante ist bei 16°C im Vergleich zum Wildtyp vermindert .....	49
Abbildung 20: Die Transkriptmengen von <i>deaD</i> sind bei 16 °C deutlich erhöht .....	50
Abbildung 21: Die Deletion von <i>deaD</i> vermindert die Abundanz der Transkripte essenzieller Virulenzfaktoren .....	51
Abbildung 22: Die Deletion von <i>deaD</i> vermindert die Abundanz von HrpX und HrpG auf Proteinebene .....	53
Abbildung 23: Die Mutation von <i>deaD</i> hat einen negativen Effekt auf HrpX-regulierte Gene .....	54
Abbildung 24: Punktmutationen in der 5'-UTR von <i>hrpX</i> lösen die Loop-Strukturen auf .....	56
Abbildung 25: Die Mutation der 5'-UTR von <i>hrpX</i> hebt die Regulation durch DeaD auf .....	57
Abbildung 26: Coomassie-gefärbtes SDS-Gel von Proben der Proteinreinigung von DeaD und $\Delta$ Box.....	58
Abbildung 27: Die spezifische Aktivität von DeaD steigt im Verlauf der Reinigung, während die spezifische Aktivität von $\Delta$ Box auf einem basalen Level bleibt .....	59
Abbildung 28: Aktives DeaD führt zu effizienterer Translation von Gfo und HrpX .....	60
Abbildung 29: Nukleotidsequenz der 5' UTR von <i>gfo</i> , <i>hrpX</i> und <i>hrpG</i> inklusive Start Codon.....	72
Abbildung 30: Schematische Darstellung des regulatorischen Einflusses von DeaD auf HrpG und HrpX.....	73

## Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: verwendete Medien</i> .....	12
<i>Tabelle 2: Verwendete Antibiotika</i> .....	13
<i>Tabelle 3: Verwendete Bakterienstämme</i> .....	13
<i>Tabelle 4: Verwendete Plasmide</i> .....	14
<i>Tabelle 5: Verwendete Oligonukleotide</i> .....	18
<i>Tabelle 6: Verwendete Sonden zur Detektion von sRNAs</i> .....	21
<i>Tabelle 7: rNTP-Mix</i> .....	26
<i>Tabelle 8: Reaktionslösung für die in vitro Transkription</i> .....	26
<i>Tabelle 9: Verwendete Antikörper</i> .....	28
<i>Tabelle 10: In dieser Arbeit verwendete Software</i> .....	30
<i>Tabelle 11: Validierte sRNAs aus Xcv</i> .....	34
<i>Tabelle 12: Abundanteste Xcv Proteine in der MS-Analyse nach Pulldown mit sX4</i> .....	43
<i>Tabelle 13: Sonden zur Validierung neuer sRNAs</i> .....	85
<i>Tabelle 14: Mittels MS identifizierte Proteine, nach Pulldown mit sX4 der Kontrolle</i> .....	87
<i>Tabelle 15: qRT-PCR Daten von groEL (Referenz), hrpG, hrpX, hrcC und hrcJ von drei biologischen Replikaten</i> ...	89

# 1 Einleitung

## 1.1 Das phytopathogene Bakterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv)

Pathogene Bakterien verursachen eine Vielzahl von Erkrankungen bei Menschen, Tieren und Pflanzen. Zurzeit sind circa 10 Bakteriengattungen bekannt, die Pflanzen befallen können. Von diesen gehören die meisten zur Gruppe der Gram-negativen Bakterien. Beispiele hierfür sind Bakterien der Gattungen *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Agrobacterium* und *Xanthomonas* (Fuchs, 2014). Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit einem Vertreter der Gattung *Xanthomonas*. Xanthomonaden sind in der Regel stäbchenförmig und obligat aerob. Sie besitzen ein polares Flagellum zur Fortbewegung und ihr Temperaturoptimum liegt bei 25-30 °C, weshalb sie in der Regel in wärmeren und feuchteren Regionen verbreitet sind. Die Kolonien von Xanthomonaden sind auf Grund des membran-gebundenen Pigments, Xanthomonadin, gelb gefärbt (Büttner and Bonas, 2010). Xanthomonaden werden entsprechend ihres Wirtsspektrums in verschiedene Untergruppen, die Pathovaren (pv.), eingeteilt. Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv). Die Wirtspflanzen von Xcv sind Tomaten- und Paprikapflanzen. Die Übertragung von Xcv auf oberirdische Pflanzenteile geschieht durch Wind und Wasser. Man vermutet, dass das Bakterium auf der Pflanzenoberfläche persistiert, bevor es durch Stomata oder Verwundungsstellen in den Interzellularraum des pflanzlichen Gewebes gelangt und sich dort lokal vermehrt (Agrios, 2005). Die Krankheit, die durch Infektion mit *Xanthomonas* auftritt, äußert sich in Form brauner Flecken (Nekrosen) auf Blättern und Früchten (Abbildung 1) und wird daher als „bakterielle Fleckenkrankheit“ bezeichnet. Viele Kulturpflanzen werden von anderen *Xanthomonas* Subspezies befallen, wie beispielsweise Reis (*Xanthomonas oryzae*), Zitruspflanzen (*Xanthomonas citri*) oder Getreide (*Xanthomonas translucens*). Da die Infektion von Kulturpflanzen in der Regel zu hohen Ernteeinbußen führt, ist die Erforschung der Virulenzfaktoren der entsprechenden Xanthomonaden von wirtschaftlichem Interesse (Chan and Goodwin, 1999).

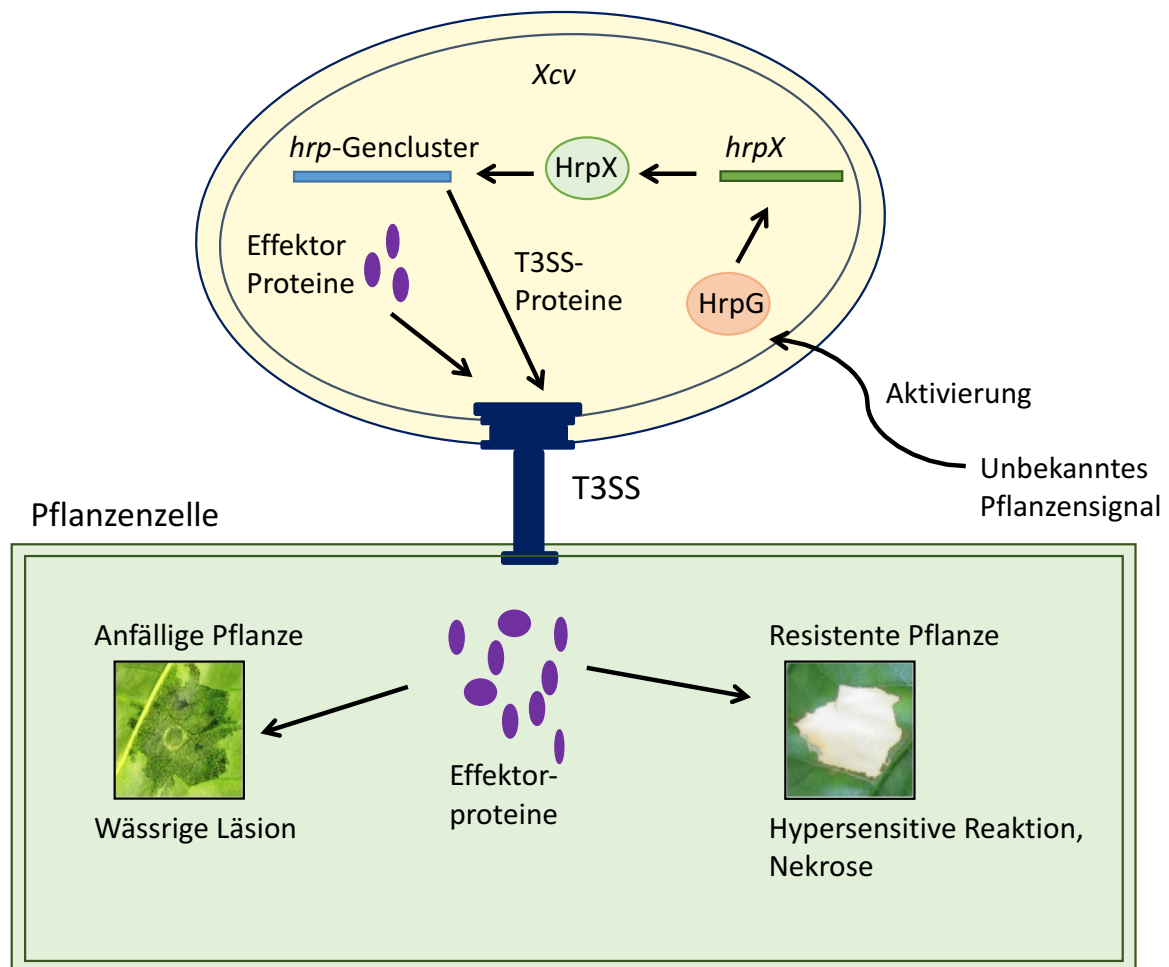


**Abbildung 1: Infektion von Tomaten-Blatt und Paprika-Frucht durch *Xcv*.** Die durch *Xcv* ausgelöste bakterielle Fleckenkrankheit äußert sich in Form von wässrigen Läsionen, die im Verlauf der Krankheit nekrotisch werden. (Bildquellen: <https://forestryimages.org> und <https://microbewiki.kenyon.edu>)

### **1.1.1 Die essenziellen Pathogenitätsfaktoren HrpG und HrpX regulieren die Transkription von Virulenz-assoziierten Genen**

*Xcv* gehört mit einem GC-Gehalt (Anteil von Guanin und Cytosin an der Gesamtheit der enthaltenen Nukleinbasen der DNA in Prozent) von 65% zu den so genannten GC-reichen Organismen. Die Publikation der Sequenzierung und Annotation des *Xcv* Genoms (Thieme et al., 2005) war zwar nicht die erste auf dem Gebiet, jedoch gehört sie bis heute mit zu den besten in Bezug auf die Annotation eines Xanthomonaden. Auf Basis dieser Daten wurden bisher mögliche Pathogenitätsfaktoren und Typ-III-Effektorproteine identifiziert (Thieme et al., 2005, Schulze et al., 2012). Typ-III-Effektorproteine werden vom Typ-III-Sekretionssystem (T3SS) direkt ins Zytoplasma der Pflanzenzelle transloziert (Kay and Bonas, 2009). Das T3SS ist in den meisten Gram-negativen Pathogenen von Pflanzen, Tieren und dem Menschen konserviert, ähnelt einer molekularen Spritze und ist essenziell für Pathogenität (Büttner and Bonas, 2010). Der Pilus (in Tierpathogenen „Nadel“ genannt), welcher mit dem Basalapparat assoziiert ist, dient als Transportkanal und durchspannt die pflanzliche Zellwand (Kay and Bonas, 2009). Die Effektorproteine gelangen durch das in die Plasmamembran inserierte Translokon ins Zellinnere und helfen Pathogenen bei der Etablierung der Infektion der Wirtspflanze, indem sie die angeborene Immunantwort unterdrücken und vermutlich das Nährstoffangebot erhöhen (Büttner, 2016, Büttner et al., 2002). Die mehr als 20 verschiedenen Komponenten des T3SS werden im *hrp*-Gencluster (*hypersensitive response and pathogenicity*) kodiert. Sie sind essenziell für die Pathogenität von *Xcv* (Lindgren et al.,

1986, Bonas, 1994). Kommt *Xcv* mit Pflanzenzellen in Kontakt, wird eine regulatorische Kaskade in Gang gesetzt, die eine Infektion begünstigt (Abbildung 2).



**Abbildung 2: Schematische Darstellung der Infektion einer Pflanzenzelle mit *Xcv*.** Der Kontakt von *Xcv* mit einer Pflanzenzelle führt, durch ein noch nicht identifiziertes Signal, zu der Aktivierung von HrpG. Aktives HrpG induziert die Expression des AraC-Typ Transkriptionsaktivators *hrpX* (Koebnik et al., 2006, Wengelnik et al., 1996b), was zur Expression der für die Pathogenität essenziellen *hrp*-Operons führt, sowie von weiteren virulenzassozierten Genen, z.B. für Effektorproteine. Die *hrp*-Region kodiert Proteine für das Typ-III-Sekretionssystem (T3SS), das in der Lage ist, Effektorproteine in Pflanzenzellen zu translozieren. Eine Infektion von suszeptiblen Pflanzen führt zu wässrigen Läsionen, gefolgt von Nekrose. In resistenten Pflanzen wird der Pathogen erkannt, was zu einer hypersensitiven Reaktion (HR) führt. Die HR ist ein schneller programmierter Zelltod infizierter Pflanzenzellen und stoppt die Bakterielle Vermehrung. In der obigen Abbildung sind die Laborphänotypen beider Reaktionen gezeigt. Ein Laborphänotyp bezeichnet in diesem Fall die Pflanzenreaktion nach Kontakt (in der Regel durch Inokulation einer Bakteriensuspension in das pflanzliche Blattgewebe) mit einer unnatürlich hohen Menge an Bakterien.

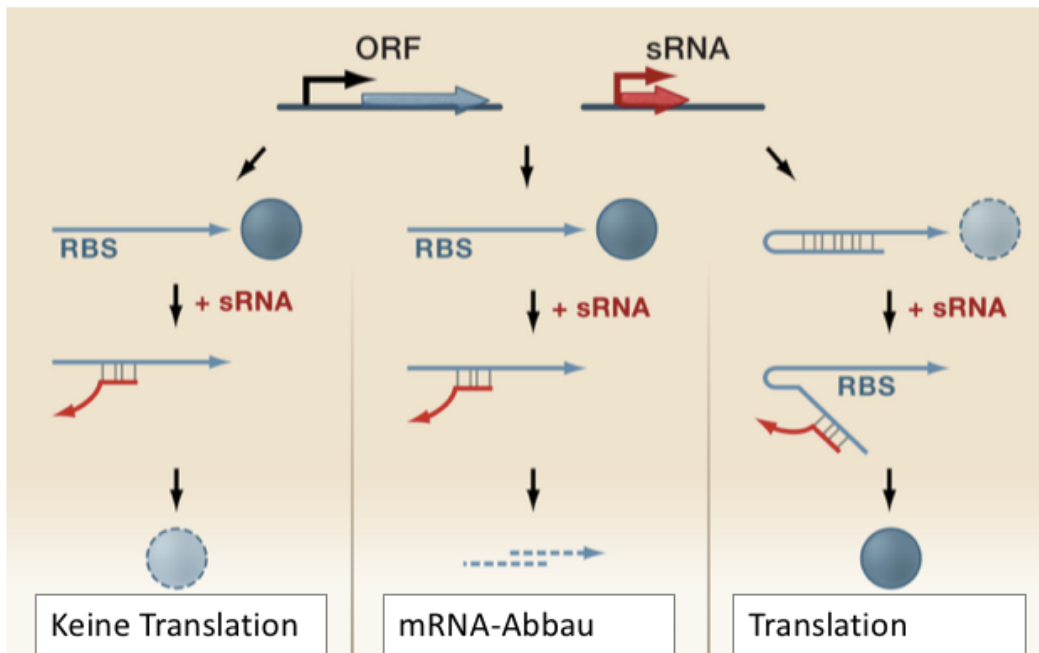
Die Schlüsselregulatoren sind HrpG (Transkriptionsfaktor der OmpR-Familie) und HrpX. Man vermutet, dass HrpG posttranslational durch eine unbekannte Sensorhistidinkinase phosphoryliert und dadurch aktiviert wird. Aktives HrpG führt zur Expression von *hrpX*. HrpX ist ein AraC-Typ-Transkriptionsaktivator (Koebnik et al., 2006, Wengelnik et al., 1996b) und induziert die Expression des *hrp*-Genclusters, was zur Ausbildung des T3SS führt, und weiterer Virulenz-assoziiierter Gene, wie bspw. Gene für Typ-III-Effektorproteine (Wengelnik and Bonas, 1996, Noel et al., 2001). Abgesehen vom T3SS gibt es weitere Sekretionssysteme in Gram-negativen Bakterien, die Proteine oder auch DNA transportieren können. Das T2SS, beispielsweise, transportiert Toxine und hydrolytische Enzyme (bspw. Proteasen) (Johnson et al., 2006, Sandkvist, 2001) und das T4SS bakterielle DNA und Proteine (Alvarez-Martinez and Christie, 2009, Juhas et al., 2008).

## **1.2 Posttranskriptionelle Regulation in Bakterien: Die Schlüsselkomponenten**

Vor etwa 20 Jahren rückte die RNA, und somit die posttranskriptionelle Regulation, mehr in das Interesse der Wissenschaft (Marzluff W“B”, 2015). Bis zu diesem Zeitpunkt beschränkte sich das Verständnis der Regulation der Proteinbiosynthese auf die Kontrolle der Initiation der Transkription. Die posttranskriptionelle Regulation ist jedoch eine weitere, wichtige Ebene der Regulation. Besonders Bakterien, für die eine schnelle Adaptierung an sich verändernde Umweltbedingungen wichtig ist, profitieren vom energetisch günstigen Regulationsmechanismus der posttranskriptionellen Regulation (Merritt et al., 2014). Diese beinhaltet die Regulation der Proteinbiosynthese auf Transkriptebeine, beispielsweise durch Modifikation der Stabilität von mRNAs und der Zugänglichkeit der Ribosomen-Bindestelle (RBS) (Picard et al., 2009). An vielen posttranskriptionellen Mechanismen sind kurze, nicht proteinkodierende RNAs (sRNAs) und RNA-Bindeproteine (RBPs) beteiligt. Die prominentesten RNA-Bindeproteine sind Hfq, CsrA und einige Kälteschockproteine, wie CspA und DeaD (Romeo et al., 2013, De Lay et al., 2013, Nogueira and Springer, 2000). Im Folgenden wird auf die Rolle der verschiedenen Schlüsselkomponenten in der prokaryotischen posttranskriptionellen Regulation eingegangen, wobei der Fokus auf bakterielle sRNAs und auf einige der genannten RBPs gelegt wird.

### 1.2.1 Die Rolle von sRNAs in der posttranskriptionellen Regulation

Da sich die vorliegende Arbeit mit einem bakteriellen Modellorganismus beschäftigt, wird im Folgenden lediglich auf die regulatorische Funktion von sRNAs in Bakterien eingegangen. Als erste regulatorische RNA wurde 1984 CX28 beschrieben, die *ompF* in *E. coli* reguliert, indem es die Promotorregion blockiert. (Mizuno et al., 1984). Seither entdeckte man, dass sRNAs sowohl in Pro- als auch in Eukaryoten eine bedeutende Rolle in der Regulation der Proteinbiosynthese spielen. Bakterielle sRNAs bilden eine heterogene Gruppe und sind in der Regel 50-250 Nukleotide lang (Sharma and Vogel, 2009). Sie besitzen eine regulatorische Funktion auf RNA-Ebene. Zunehmend werden aber auch Beispiele bekannt, in denen sRNAs eine duale Funktion als regulatorische RNA und mRNA erfüllen (Wadler and Vanderpool, 2007, Vanderpool and Gottesman, 2007, Waters et al., 2011, Silby and Levy, 2008). Die Funktion von sRNAs basiert maßgeblich auf der Kontrolle der Stabilität und/oder der Induktion oder Inhibierung der Translation ihrer Ziel-mRNAs. Dies soll im Folgenden genauer erläutert werden. Die Initiation der Translation in Prokaryoten basiert in der Regel auf der Bindung der 30S-Ribosomenuntereinheit an die 5'-untranslatierte Region (UTR) der mRNA. Hierbei interagiert die 16S rRNA, welche Teil der 30S-Ribosomenuntereinheit ist, durch komplementäre Basenpaarung mit der Ribosomenbindestelle (RBS). Die RBS ist in *E. coli* und anderen Bakterien konserviert (Consensus in *E. coli*: AGGAGGU, Shine-Dalgarno-Sequenz), (Steitz, 1969). sRNAs können durch komplementäre Basenpaarung in der Nähe der RBS die Ausbildung von mRNA-Sekundärstrukturen beeinflussen, oder die RBS durch direkte Interaktion maskieren, und damit die Translationsinitiation beeinflussen (Abbildung 3). In beiden Fällen wird die Translation drastisch vermindert (Johansson et al., 2002, Novick et al., 1993). In *Xcv* ist bisher keine konservierte Sequenz bekannt, die als RBS dient. Einzig ein T/A reiches Motiv, welches im Bereich von -10 Nukleotiden relativ zum Transkriptionsstart liegt ist bekannt (Schmidtke et al., 2012). Dies erschwert die Vorhersage der Funktion einer strukturierten 5'UTR, sowie eine Vorhersage potentieller Bindestellen von sRNAs, da nicht mit Sicherheit bestimmt werden kann, ob eine Sekundärstruktur eine RBS blockiert oder nicht. Eine gehemmte Translation geht häufig mit einer geringeren mRNA-Stabilität einher, da Nicht-translatierte mRNAs anfällig für einen Angriff durch die Endoribonuklease RNase E sind, wodurch die sRNA-vermittelte Repression der Translation irreversibel wird (Rauhut and Klug, 1999, Morita et al., 2006).



**Abbildung 3: Regulationsmechanismus von sRNAs.** Gene (dargestellt in blau) und in *trans* kodierte sRNAs (dargestellt in rot) haben eingeschränkte Komplementarität. sRNAs können in der 5'UTR, in der Nähe der RBS binden, wodurch die Translation der mRNA gehemmt wird (links), oder es zum Abbau der mRNA kommt (Mitte). In manchen Fällen fördern sRNAs die Translation, indem sie Sekundärstrukturen auflösen, die die RBS blockieren (rechts). Abbildung verändert nach Waters and Storz (2009).

#### Die Rolle von bakteriellen sRNAs in der Virulenz

In den letzten Jahren entdeckte man zunehmend die regulatorische Rolle von sRNAs in verschiedensten biologischen Prozessen, u. a. in der Biofilmbildung (Bak et al., 2015), dem Zuckertransport (Papenfert et al., 2013) und auch in der Virulenz (Toledo-Arana et al., 2009, Schmidtke et al., 2013, Han et al., 2013). Bekannte Beispiele, in denen eine sRNA eine Virulenzfunktion hat, sind RNAIII und FasX aus *Staphylococcus aureus*. RNAIII ist eine der ersten sRNAs, für die ein direkter Einfluss auf die Virulenz gezeigt werden konnte (Novick et al., 1993). Die erfolgreiche Infektion des Wirts beginnt in der Regel mit Adhäsion an die Wirtszelle. Steigt im Verlauf der Infektion die Zelldichte, wird die Expression von RNAIII induziert, was die Reduktion früher Virulenzfaktoren und die Induktion der Expression später Virulenzfaktoren zur Folge hat. Die Regulation der Genexpression beruht in diesem Fall auf der Blockierung bzw. Freigabe der RBS von mRNAs für regulatorische Proteine. Im Fall von FasX wird die Synthese eines Schlüsselvirulenzfaktors (Ska) stimuliert, indem die sRNA FasX an die 5'UTR der *ska*-mRNA, außerhalb der RBS der mRNA bindet. Dadurch wird die Ausbildung



einer Sekundärstruktur induziert, die die mRNA vor dem Abbau schützt und deren Translation fördert (Ramirez-Pena et al., 2010). Mittlerweile sind zahlreiche weitere Beispiele bekannt, in denen sRNAs die Expression von Virulenzfaktoren modulieren und so, durch Feinregulation der Genexpression, eine erfolgreiche Infektion unterstützen. Die meisten dieser Studien beziehen sich auf tierpathogene Bakterien. Für *Xcv* sind bisher zwei sRNAs (sX12, sX13) bekannt, die eine Rolle in der Virulenz spielen (Schmidtke et al., 2013, Schmidtke et al., 2012). Die Expression von sX12 wird durch HrpX induziert (Schmidtke et al., 2012). Infektionsstudien von Pflanzen mit sX12- und sX13 Deletionsmutanten zeigten eine verminderte Virulenz im Vergleich zum Wildtyp. Für sX13 konnte außerdem gezeigt werden, dass sie die Synthese von T3SS-Komponenten positiv beeinflusst. Des Weiteren wurden mittels *Microarray* einige Ziel-mRNAs für sX13 identifiziert, welche mit der Flagellum medierten Chemotaxis in Verbindung gebracht werden (Schmidtke et al., 2013). Aus Tierpathogenen weiß man, dass sRNAs in der Regel einen Proteininteraktor benötigen (Hfq, CsrA), um beispielsweise eine effiziente Basenpaarung mit einer mRNA ausbilden zu können (Van Assche et al., 2015). Für sX12 konnte bisher keine Interaktion mit CsrA gezeigt werden (Brock, 2013), jedoch eine Interaktion mit Hfq. Bei sX13 konnte ebenfalls keine Bindung an CsrA (Brock, 2013), jedoch ein Hfq unabhängiger Wirkmechanismus nachgewiesen werden (Schmidtke et al., 2013). Dieses Ergebnis erweitert den Spielraum für mögliche weitere sRNA-Bindepartner in *Xcv*, da keines der bekannten RBPs für den Wirkmechanismus von sX13 nötig zu sein scheint.

### **1.2.2 Bakterielle RNA-Bindeproteine und ihre Rolle in der posttranskriptionellen Regulation**

Die gezielte Suche nach neuen sRNAs und die Erforschung ihrer biologischen Relevanz zeigte, dass sRNAs in Kombination mit einem RBP wirken (Van Assche et al., 2015). Die bekanntesten RBPs, die mit sRNA-Regulation in Prokaryoten in Verbindung gebracht werden, werden im Folgenden erläutert.

#### *Hfq: ein globaler Mediator der sRNA-mRNA-Interaktion*

Hfq (*Host-factor required for phage Q $\beta$  RNA replication*) ist ein konserviertes sRNA Bindepartner in Prokaryoten. Hfq ist ein (L)Sm-Protein (*like-Sm-Protein*), das die Interaktion von sRNAs mit mRNA-Zielsequenzen vermittelt (Sauer, 2013). Entdeckt wurde Hfq in *E. coli*, als notwendiger Faktor für die Replikation des Phagen Q $\beta$  (Barrera et al., 1993, Miranda et al., 1997). Die Rolle von Hfq als sRNA-Bindeprotein wurde erst später erkannt. Hfq spielt in vielen

Bakterien und Archaeen eine Rolle bei der posttranskriptionellen Regulation. Die meisten der bisher bekannten sRNAs binden an Hfq (Moller et al., 2002). Bei einer zeitgleichen Interaktion einer sRNA und der entsprechenden Ziel-mRNA mit Hfq kommt es in den meisten Fällen zur Inhibierung der Translation der mRNA und einem RNase E-induzierten Abbau der mRNA (De Lay et al., 2013, Maki et al., 2008, Morita et al., 2006). Die sRNA hingegen wird in der Regel durch die Interaktion mit Hfq vor dem Abbau geschützt (Folichon et al., 2003). Die Deletion von *hfq* hat in vielen Fällen pleiotrope Effekte zur Folge. Viele Tierpathogene wie *Salmonella* spp. und *E. coli* zeigen nach Verlust von Hfq eine Reduktion im Wachstum, im *Quorum sensing* (Lenz et al., 2004) und in der Virulenz, bis hin zum vollständigen Verlust der Pathogenität (Shakhnovich et al., 2009, Sittka et al., 2007). Diese Phänotypen resultieren aus dem Verlust der sRNA-Aktivität. In einigen Bakterienspezies, beispielsweise *Staphylococcus aureus* (Bohn et al., 2007), hat der Verlust von *hfq* keinen detektierbaren Effekt. Dies lässt die Spekulation zu, dass es weitere sRNA-Bindeproteine gibt, die ähnliche Funktionen wie Hfq übernehmen. Auch in *Xcv* hatte die Einführung einer Frameshift-Mutation in *hfq* keinen Effekt auf die Virulenz, jedoch ein verändertes Wachstum in Kultur zur Folge (Brock, 2013). Mittels Koimmunopräzipitation und anschließender RNA-Sequenzierung wurde bestätigt, dass Hfq in *Xcv* als sRNA-Bindeprotein fungiert und einige sRNAs (sX1, sX5, sX8, sX11 und sX13) bindet. Weitere Untersuchungen ergaben, dass die von Hfq gebundenen sRNAs bei Anwesenheit von Hfq stärker abundant sind, als in Abwesenheit von Hfq (Brock, 2013).

#### *CsrA: ein globaler Regulator mit limitierten sRNA-Interaktoren*

Das zweite in Bakterien gut untersuchte Protein, für das sRNA-Interaktionen gezeigt wurden, ist CsrA/RsmA (Carbon storage regulator A/Repressor of secondary metabolites A). CsrA wurde ursprünglich als Regulator von Kohlenstoff-Stoffwechselprozessen (Glykogen Biosynthese und Glukogenese) in *E.coli* beschrieben (Romeo et al., 1993), spielt jedoch ebenfalls eine Rolle in Virulenz, Motilität und *Quorum sensing* (Romeo et al., 2013, Barnard et al., 2004, Altier et al., 2000). CsrA ist ein posttranskriptioneller Regulator, der im Zusammenspiel mit sRNAs die Translation und die Stabilität von Ziel-mRNAs beeinflusst. Der Wirkmechanismus von CsrA basiert auf einer molekularen Mimikry (Toledo-Arana et al., 2007). CsrA bindet eine Zielsequenz in der 5'UTR einer mRNA, die sich in der Regel in der Nähe der RBS befindet. Die Ribosomen-Bindung, und damit die Translation, wird auf diese Weise blockiert und führt oftmals zum Abbau der mRNA (Dubey et al., 2003). Bestimmte sRNAs (in *E. coli* CsrB (Romeo, 1998) und CsrC (Dubey et al., 2003); in *Xcv* sX7, sX16 und sX17 (Brock,

2013)) weisen ähnliche Bindestellen wie die entsprechenden CsrA-Ziel-mRNAs auf, wodurch die Ziel-mRNAs bei Anwesenheit dieser sRNAs für die Translation freigegeben werden. Der Verlust von CsrA hat, auf Grund seiner weitreichenden regulatorischen Funktion, in der Regel einen pleiotropen Effekt. Die sRNA-Interaktoren, die an der Regulation der Zielgene beteiligt sind, sind mittlerweile in vielen Organismen bekannt und beinhalten in der Regel lediglich eine Handvoll verschiedener sRNAs (Nogueira and Springer, 2000).

#### *Kälteschockproteine: globale RNA-Chaperons*

Setzt man Bakterien von ihrem Optimum abweichenden Temperaturen aus, sind sie gezwungen sich den veränderten Bedingungen anzupassen. Im Falle eines Kälteschocks müssen die Bakterien beispielsweise einer veränderten Fluidität der cytoplasmatischen Membran und der Ausbildung von stabilen Sekundärstrukturen innerhalb von mRNAs entgegenwirken, welche die Translation von mRNAs hemmen können (Phadtare, 2004). Eines der Proteine, das die effiziente Translation von mRNAs bei niedrigen Temperaturen unterstützt, ist CspA. CspA gehört zu einer Gruppe von kleinen (65-75 Aminosäuren), stark konservierten Kälteschockproteinen. In *E. coli* sind neun dieser Proteine (CspA-CspI) kodiert. CspA wirkt als RNA-Chaperon, das die Sekundärstruktur von RNAs durch eine schwache Interaktion destabilisiert (Jiang et al., 1997). In *Xcv* wurden drei Gene annotiert, die Kälteschockproteine kodieren (*XCV1389*, *XCV1522*, *XCV2592*) (Thieme et al., 2005).

### **1.3 RNA-DEAD-Box-Helikasen in Bakterien**

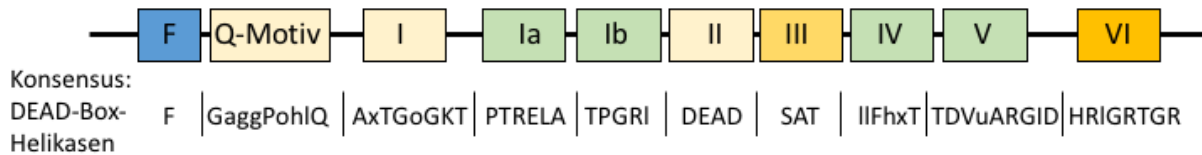
Eine weitere Proteinklasse, die in Verbindung mit posttranskriptioneller Regulation steht, ist die Klasse der sogenannten RNA-DEAD-Box-Helikasen. Da sich im Verlauf der Arbeit eine besondere Rolle für eine der bekannten RNA-DEAD-Box-Helikasen herauskristallisierte, werden diese Proteine im Folgenden vorgestellt.

In den meisten Verbildlichungen von RNA-Molekülen werden diese als lineare, Einzelstränge dargestellt. Die Realität in der Zelle sieht jedoch anders aus. RNA-Moleküle interagieren mit verschiedensten Proteinen oder Proteinkomplexen und neigen dazu, intramolekulare Bindungen in Form von Sekundärstrukturen auszubilden (Jacek Nowakowski, 1997). Je nach Sekundärstruktur und den gegebenen Umweltbedingungen, z.B. Temperatur, kann ein Entfaltungshelfer notwendig sein, um die RNA in einem funktionalen Zustand zu halten. RNA-Helikasen sind Enzyme, die unter Energieaufwand (ATP-Hydrolyse) die Entfaltung von RNA

bewirken (Owtrim, 2013). Eine Untergruppe von RNA-Helikasen sind die sogenannten RNA-DEAD-Box-Helikasen.

### **1.3.1 Charakteristika von RNA-DEAD-Box-Helikasen**

RNA- und DNA-Helikasen können auf Grund ihrer Sequenz und Struktur in sechs Superfamilien (SF) eingeordnet werden (Gorbalenya and Koonin, 1993). SFI und SFII beinhalten nicht-ringförmige Helikasen, SFIII bis SFIV ringförmige. In Eukaryoten sind alle RNA-Helikasen nicht-ringförmig und gehören demnach zur SFI und SFII. DEAD-Box-Helikasen gehören zur SFII und weisen mehrere konservierte Motive auf (Linder et al. (1989); Abbildung 4). Das Q-Motiv ist lediglich in DEAD-Box-Helikasen zu finden und nicht in nahe verwandten Proteinen, wie den DEAH-Box-Helikasen. Das Q-Motiv ist mitunter verantwortlich für die ATP-Bindung (Adenin-Bindung)(Tanner, 2003). Da dieses Motiv ebenfalls für eine effiziente RNA-Bindung notwendig ist, wird vermutet, dass es als Sensor fungiert. Dieser erlaubt die ATP-Hydrolyse nur dann, wenn ein RNA-Substrat gebunden ist (Cordin et al., 2004). Motiv I, welches auch als Walker-A-Motiv bekannt ist, kommt in allen bekannten Helikasen vor und ist essenziell für die ATP-Bindung (Bindung an Pyrophosphat und koordiniertes  $Mg^{2+}$ ). Motiv Ia und Ib sind verantwortlich für die Bindung des RNA-Substrats. Der genaue Mechanismus der RNA-Bindung ist bisher nicht bekannt (Kim et al., 1998, Redder et al., 2015). Motiv II, auch DEAD-Motiv oder Walker-B-Motiv genannt, ist das namensgebende Motiv für die Proteinfamilie der DEAD-Box-Helikasen. Das DEAD-Motiv ist neben dem Q-Motiv und Motiv I essenziell für die Bindung von ATP. Mutationen innerhalb dieses Motivs vermindern in aller Regel die ATPase-Aktivität des Enzyms, jedoch ohne die RNA-Bindung zu beeinträchtigen (Pause and Sonenberg, 1992). Glutamat und das erste Aspartat des DEAD-Motivs sind notwendig für die Interaktion mit ATP und somit essenziell. Das zweite Aspartat des DEAD-Motivs ist vermutlich notwendig, für die Interaktion mit Motiv VI, wodurch die ATP-Bindetasche komplettiert wird (Caruthers et al., 2000). Das Alanin ist weniger stark konserviert und kann ohne größere funktionelle Verluste durch andere Aminosäuren ausgetauscht werden. Von Motiv III und VI wird vermutet, dass sie eine ähnliche Funktion wie das Q-Motiv haben, da die Mutationen der Motive allenfalls einen schwachen Einfluss auf ATP-Hydrolyse und RNA-Bindung haben (Pause and Sonenberg, 1992, Rocak et al., 2005). Die Motive IV und V sind bisher schlecht untersucht. Man nimmt an, dass sie für die RNA-Bindung verantwortlich sind (Caruthers et al., 2000, Caruthers and McKay, 2002).



**Abbildung 4: Schematische Darstellung der Motive von DEAD-Box-Helikasen.** DEAD-Box-Helikasen weisen stark konservierte Motive für ATP-Bindung (gelb), ATP-Hydrolyse (orange) und RNA-Bindung (grün) auf. Die Motive weisen spezielle Aminosäuresequenzähnlichkeiten auf (siehe Buchstabencode, wobei a: aromatische Aminosäure, g: geladene Aminosäure, o: alkoholische Aminosäure, h: hydrophobe Aminosäure l: aliphatische Aminosäure).

## 1.4 Ziele dieser Arbeit

Eines der Ziele dieser Arbeit war es, einen aktuellen, bereits vorhandenen RNA-*seq*-Datensatz von *Xcv* (E. Löschner, A. Nuss, U. Bonas, unpubliziert) auf das Vorhandensein von möglichen sRNAs hin zu untersuchen. Zur Erstellung des Datensatzes wurden in Vorarbeiten die *Xcv* Stämme 85-10 und 85\* (exprimiert konstitutiv aktives HrpG) in NYG angezogen, in der stationären Wachstumsphase geerntet und eine RNA-*seq*-Analyse durchgeführt. Der Datensatz sollte in dieser Arbeit händisch auf potentielle sRNA Kandidaten hin untersucht werden und diese mittels Northern Blot validiert werden. Außerdem sollte geprüft werden, ob die gefundenen sRNAs unter Infektionsbedingungen reguliert werden. Dazu wurde die Expression aller sRNA Kandidaten in der exponentiellen und in der stationären Wachstumsphase jeweils im Wildtypstamm *Xcv* 85-10 und in *Xcv* 85-10 pFG72-1 *hrpG*\* und *Xcv* 85-10  $\Delta$ *hrpX* pFG72-1 *hrpG*\* im Northern Blot gesichtet. *Xcv* 85-10 pFG72-1 *hrpG*\* besitzt eine Punktmutation in *hrpG* (*hrpG*\*), welche dazu führt, dass HrpG konstitutiv aktiv ist (Wengelnik et al., 1999). In *Xcv* 85-10  $\Delta$ *hrpX* pFG72-1 *hrpG*\* ist zusätzlich *hrpX* deletiert.

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit beschäftigte sich mit der sRNA-vermittelten posttranskriptionellen Regulation. Es ist bekannt, dass die Mutation von *hfq* in *Xcv* keinen sichtbaren Effekt auf Virulenz, Wachstum und Kolonie-Form und Größe hat (Brock, 2013). Die Deletion von CsrA hat einen pleiotropen Effekt. Bekannte sRNAs aus *Xcv*, welche einen Einfluss auf die Virulenz haben, binden nicht an CsrA und agieren Hfq unabhängig (Schmidtke et al., 2013). Das zweite Ziel dieser Arbeit sollte daher die Identifizierung eines RNA-Bindeproteins sein, welches mit sRNAs interagiert und eine Rolle in der Virulenz hat.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Medien

Tabelle 1: verwendete Medien

Medium	Zusammensetzung	Angezogene Bakterien	Referenz
NYG (Nutrient Yeast Glycerol)	0,5% (w/v) Pepton, 0,3% (w/v) Hefe-Extrakt, 0,2% Glycerin	<i>Xcv</i>	(Daniels et al., 1984)
MA (Minimal Medium A)	60 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 33 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 7,6 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 1,7 mM Natriumacetat, 10 mM Saccharose, 0,3% (w/v) Casaminosäuren, 1 mM MgSO <sub>4</sub>	<i>Xcv</i>	(Ausubel, 1996)
LB (Lysogeny Broth)	1% (w/v) Trypton, 0,5% (w/v) Hefe-Extrakt, 1% (w/v) NaCl, pH 7,5	<i>E. coli</i>	(Miller, 1972)
XVM2	320 µM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 160 µM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 10 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 5 mM MgSO <sub>4</sub> ×7 H <sub>2</sub> O, 20 mM NaCl, 10 mM Saccharose, 10 mM Fructose, 0,03% (w/v) Casaminosäuren, 1 mM CaCl <sub>2</sub> ×2 H <sub>2</sub> O, 10 µM FeSO <sub>4</sub> ×7 H <sub>2</sub> O, pH 7,6	<i>Xcv</i>	(Wengelnik and Bonas, 1996)

Zur Herstellung von Nährplatten wurde das entsprechende Medium mit 1 bzw. 1,5% Agar versetzt. Vor Verwendung aller Medien wurden diese mittels Autoklavieren (20 min, 120 °C,  $1,1 \times 10^5$  Pa) sterilisiert.

#### 2.1.2 Antibiotika

Zur Selektion von Bakterien mit Resistenzen wurden nach dem Autoklavieren verschiedene Antibiotika eingesetzt (Tabelle 2).

Für Blau-Weiß-Selektionen wurde eine Lösung mit 0,004% X-β-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid verwendet.

**Tabelle 2: Verwendete Antibiotika**

Antibiotikum	Konzentration
Ampicillin (Amp)	Feste Medien: 100 µg/ml Flüssige Medien: 50 µg/ml
Gentamycin (Gm)	Feste Medien: 15 µg/ml Flüssige Medien: 7,5 µg/ml
Kanamycin (Km)	25 µg/ml
Rifampicin (Rif)	100 µg/ml
Spectinomycin (Spec)	100 µg/ml

### 2.1.3 Verwendete Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme werden in Tabelle 3 zusammengefasst.

**Tabelle 3: Verwendete Bakterienstämme**

Stamm	Genotyp/Beschreibung	Referenz
<i>E. coli</i>		
One Shot Top10	F- <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139</i> Δ( <i>araleu</i> )7697 <i>galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i>	Thermo Fisher Scientific
DH5αλPir	<i>endA1 hsdR17</i> ( <i>rK<sup>-</sup> mK<sup>+</sup></i> ) <i>supE44 thi-1 recA1 gyrA</i> [Nal <sup>r</sup> ] <i>relA1</i> Δ[ <i>lacZYA-argF</i> ]U169, F'[φ80 <i>dlacZ</i> Δ( <i>lacZ</i> )M15] [λ <i>pir</i> ]	(Menard et al., 1993)
BL21(DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub></i> ( <i>r<sub>B</sub><sup>-</sup>, m<sub>B</sub><sup>-</sup></i> ) <i>dcm+</i> <i>gal</i> λ(DE3)	Agilent Technologies
Helfer (pRK2013) MM294	F- <i>endA1 hsdR17</i> ( <i>rK<sup>-</sup> mK<sup>+</sup></i> ) <i>glnV44 thi<sup>-</sup> 1relA1RfbD1 SpoT1</i> ; Helferstamm für die Konjugation; pRK2013 trägt <i>tra</i> -Gene für den Aufbau des Konjugationsapparates	(Backman et al., 1976)

Stamm	Genotyp/Beschreibung	Referenz
<b><i>Xanthomonas campestris</i> pathovar <i>vesicatoria</i> (Xcv) 85-10</b>		
85-10	Wildtyp, Rif <sup>R</sup> , <i>avrBs1</i> und <i>avrBs2</i>	(Bonas et al., 1989)
$\Delta sX2$	Derivat von 85-10; Chromosomale Deletion von <i>sX2</i>	Diese Arbeit
$\Delta sX4$	Derivat von 85-10; Chromosomale Deletion von <i>sX4</i>	Diese Arbeit
$\Delta sX8$	Derivat von 85-10; Chromosomale Deletion von <i>sX8</i>	Diese Arbeit
$\Delta sX11$	Derivat von 85-10; Chromosomale Deletion von <i>sX11</i>	Diese Arbeit
$\Delta deaD$	Derivat von 85-10; Chromosomale Deletion von <i>deaD</i> (Deletion von Codon 48 bis zum Stopp)	Diese Arbeit
$\Delta Box$	Derivat von 85-10; Chromosomale Deletion der DEAD-Box von <i>deaD</i>	Diese Arbeit
<i>deaD_D178A</i>	Derivat von 85-10; Punktmutation in <i>deaD</i> von Aspartat <sub>178</sub> des DEAD-Motivs zu Alanin	Diese Arbeit

In Tabelle 4 werden die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide aufgeführt

**Tabelle 4: Verwendete Plasmide**

Plasmid	Resistenz	Beschreibung	Referenz
<b>Verwendete Leer- bzw. Kontrollvektoren</b>			
pOGG2	Spec	„golden-gate-cloning vector“ zum Erstellen von Deletionsmutanten	(Schulze et al., 2012)
pBRM-P+T	Gent	Derivat von pBRM-P mit zusätzlichem flussaufwärts gelegenen Terminator	diese Arbeit
pBRM-P	Gent	„golden-gate-cloning vector“ ohne Promotor, „broad host-range vector“, 3 x c-Myc	(Lorenz et al., 2012)
pBRM	Gent	„golden-gate-cloning vector“ mit <i>lac</i> -Promotor, „broad host-range vector“, 3 x c-Myc	(Lorenz et al., 2012)
pUC57	Amp	Klonierungsvektor für <i>blunt-end</i> Ligation	GenScript
pGGE5	Kan	pQE60 <i>backbone</i> , T7-Promotor, 6 x His, <i>ccdB</i>	S. Thieme, unpubliziert



Plasmid	Resistenz	Beschreibung	Referenz
pFX-P	Spec	„golden-gate cloning vector“, für GFP-Reporter-Assay, ohne Promotor und Startcodon	Schmidtke <i>et al.</i> , 2013
<b>Verwendete Plasmide zur Erstellung von sRNA Deletionsmutanten</b>			
pOGG2_ΔsX2	Spec	Derivat von pOGG2, zur Deletion des sX2-Lokus	diese Arbeit
pOGG2_ΔsX4	Spec	Derivat von pOGG2, zur Deletion des sX4-Lokus	diese Arbeit
pOGG2_ΔsX8	Spec	Derivat von pOGG2, zur Deletion des sX8-Lokus	diese Arbeit
pOGG2_ΔsX11	Spec	Derivat von pOGG2, zur Deletion des sX11-Lokus	diese Arbeit
<b>Verwendete Plasmide für sRNA-Überexpression</b>			
psX2	Gent	Derivat von pBRM-P+T zur Expression von sX2 unter Kontrolle des nativen Promotors	diese Arbeit
psX4	Gent	Derivat von pBRM-P+T zur Expression von sX4 unter Kontrolle des nativen Promotors	diese Arbeit
psX8	Gent	Derivat von pBRM-P+T zur Expression von sX8 unter Kontrolle des nativen Promotors	diese Arbeit
psX11	Gent	Derivat von pBRM-P+T zur Expression von sX11 unter Kontrolle des nativen Promotors	diese Arbeit
<b>Verwendete Plasmide für Proteinexpression</b>			
pBRM-P_csrA-Myc	Gent	Derivat von pBRM-P zur Expression von <i>csrA</i> -c-Myc unter Kontrolle des eigenen Promotors	J. Brock und U. Bonas, unpubliziert
pBRM_ybeY-Myc	Gent	Derivat von pBRM zur Expression von <i>ybeY</i> -c-Myc unter Kontrolle des Lac-Promotors	diese Arbeit
pBRM_cspA-Myc	Gent	Derivat von pBRM zur Expression von <i>cspA</i> -c-Myc unter Kontrolle des Lac-Promotors	diese Arbeit
p <i>deaD</i>	Gent	Derivat von pBRM-P+T zur Expression von <i>deaD</i> und Komplementation von Δ <i>deaD</i>	diese Arbeit
p <i>rhlB</i>	Gent	Derivat von pBRM-P+T zur Expression von <i>rhlB</i>	diese Arbeit

Plasmid	Resistenz	Beschreibung	Referenz
pGGE5_ <i>deaD</i> -His	Kan	Derivat von pGGE5, Expressionsvektor für rekombinante Expression von His-markiertem DeaD in <i>E. coli</i>	diese Arbeit
pGGE5_ <i>xcv0792</i> -His	Kan	Derivat von pGGE5, Expressionsvektor für rekombinante Expression von His-markiertem Xcv0792 in <i>E. coli</i>	diese Arbeit
pGGE5_ $\Delta$ Box-His	Kan	Derivat von pGGE5, Expressionsvektor für rekombinante Expression von mutiertem, Hia-markiertem DeaD <i>E. coli</i>	
phrpG* (pFG72-1) (pUFR)	Kan	incW, mob <sup>+</sup> , lacZ $\alpha$ , Cos, enthält ein konstitutiv, aktives hrpG (hrpG*)	(Wengelnik et al., 1999)
<b>Template Plasmide für <i>in vitro</i> Transkription</b>			
pUC57_ <i>sX2</i>	Amp	Derivat von pUC57, Vorlage für <i>in vitro</i> Transkription der sRNA sX2	diese Arbeit
pUC57_ <i>sX4</i>	Amp	Derivat von pUC57, Vorlage für <i>in vitro</i> Transkription der sRNA sX4	diese Arbeit
pUC57_ <i>sX7</i>	Amp	Derivat von pUC57, Vorlage für <i>in vitro</i> Transkription der sRNA sX9	diese Arbeit
pUC57_ <i>sX8</i>	Amp	Derivat von pUC57, Vorlage für <i>in vitro</i> Transkription der sRNA sX8	diese Arbeit
pUC57_ <i>sX11</i>	Amp	Derivat von pUC57, Vorlage für <i>in vitro</i> Transkription der sRNA sX11	diese Arbeit
pUC57_ <i>sX12</i>	Amp	Derivat von pUC57, Vorlage für <i>in vitro</i> Transkription der sRNA sX12	diese Arbeit
pUC57_ <i>sX16</i>	Amp	Derivat von pUC57, Vorlage für <i>in vitro</i> Transkription der sRNA sX16	diese Arbeit
pUC57_ <i>sX17</i>	Amp	Derivat von pUC57, Vorlage für <i>in vitro</i> Transkription der sRNA sX16	diese Arbeit
pUC57_ <i>coding</i>	Amp	Derivat von pUC57, Vorlage für <i>in vitro</i> Transkription eines Teils der mRNA von <i>groEL</i>	diese Arbeit
pUC57_ <i>intergen</i>	Amp	Derivat von pUC57, Vorlage für <i>in vitro</i> Transkription einer intergenischen, nicht codierenden Region	diese Arbeit

Plasmid	Resistenz	Beschreibung	Referenz
pUC57_6S	Amp	Derivat von pUC57, Vorlage für <i>in vitro</i> Transkription der sRNA 6S	diese Arbeit
pUC57_hfq	Amp	Derivat von pUC57, Vorlage für <i>in vitro</i> Transkription der <i>hfq</i> mRNA	diese Arbeit
pUC57_5'UTR	Amp	Derivat von pUC57, Vorlage für <i>in vitro</i> Transkription des 5'UTRs von XopB	diese Arbeit
<b>Plasmide für GFP-Reporterassay</b>			
pFX0	Spec	Derivat von pFX-P, <i>gfp</i> ohne Promotor und Startcodon	Schmidtke <i>et al.</i> , 2013
pFX1	Spec	Derivat von pFX-P, <i>gfp</i> unter Kontrolle von $P_{lac}$	Schmidtke <i>et al.</i> , 2013
pFX pnatX	Spec	Derivat von pFX-P, der natürliche Promotor von <i>hrpX</i> , sowie der native 5'UTR und 18 Codons sind an GFP fusioniert	diese Arbeit
pFX pnatG	Spec	Derivat von pFX-P, der natürliche Promotor von <i>hrpG</i> , sowie der native 5'UTR und 18 Codons sind an GFP fusioniert	Cornelius Schmidtke (unpubliziert)
pFX <i>placX</i>	Spec	Derivat von pFX-P, Expression von 18 Codons von <i>hrpX</i> , fusioniert an GFP, mit natürlichem 5'UTR unter Kontrolle des lac-Promotors	Cornelius Schmidtke (unpubliziert)
pFX <i>placG</i>	Spec	Derivat von pFX-P, Expression von 18 Codons von <i>hrpG</i> , fusioniert an GFP, mit natürlichem 5'UTR unter Kontrolle des lac-Promotors	Cornelius Schmidtke (unpubliziert)
pFX_hrpXmut1	Spec	Derivat von pFX-P, Expression von 18 Codons von <i>hrpX</i> , fusioniert an GFP, mit mutiertem 5'UTR zur partiellen Auflösung der Sekundärstruktur unter Kontrolle des natürlichen Promotors	diese Arbeit
pFX_hrpXmut2	Spec	Derivat von pFX-P, Expression von 18 Codons von <i>hrpX</i> , fusioniert an GFP, mit mutiertem 5'UTR zur Auflösung der Sekundärstruktur unter Kontrolle des natürlichen Promotors	diese Arbeit

### 2.1.4 Verwendete Oligonukleotide

In Tabelle 5 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide zusammengefasst.

**Tabelle 5: Verwendete Oligonukleotide**

Name	Sequenz
<b>Primer zur Erstellung von sRNA Deletionsmutanten</b>	
$\Delta sX2\_li\_fw$	5'-TTTGGTCTCTCGACAACACAGTGACGAGCATCAT-3'
$\Delta sX2\_li\_rev$	5'-TTTGGTCTCTCTCTCGCAGCGGTCTAGTCTGAAG-3'
$\Delta sX2\_re\_fw$	5'-TTTGGTCTCTAGAGGGGTAAGAAGCCAATGCCGC-3'
$\Delta sX2\_re\_rev$	5'-TTTGGTCTCTATGGCACTACAACCTCCGGCATT-3'
$\Delta sX4\_li\_fw$	5'-TTTGGTCTCTCGACGGTGCGGTCTTTCTAAGTGT-3'
$\Delta sX4\_li\_rev$	5'-TTTGGTCTCTCTCTATCGTCAACCCTTCTTCTC-3'
$\Delta sX4\_re\_fw$	5'-TTTGGTCTCTAGAGAAGGGGGCTTTTGTATGT-3'
$\Delta sX4\_re\_rev$	5'-TTTGGTCTCTATGGGCAATCAAACCGTCAACAC-3'
$\Delta sX8\_li\_fw$	5'-TTTGGTCTCTCGACATCCAGCGCTTCAGATCGAC-3'
$\Delta sX8\_li\_rev$	5'-TTTGGTCTCTCTCTATAGACCTGCACGCAGCACA-3'
$\Delta sX8\_re\_fw$	5'-TTTGGTCTCTAGAGTGCAGAAATATGAGCGGTGGT-3'
$\Delta sX8\_re\_rev$	5'-TTTGGTCTCTATGGGCTACGCAACGGCTCCAG-3'
$\Delta sX11\_li\_fw$	5'-CAGGATCCGAAATCTTCGGCCACACCAC-3'
$\Delta sX11\_li\_rev$	5'-AACAAGCTTGGCGTTCAGCATAGTGAGG-3'
$\Delta sX11\_re\_fw$	5'-ATTAAGCTTGCCTACTACTGGCGTTATTCT-3'
$\Delta sX11\_re\_rev$	5'-GCATCTAGACGACATCCTGCTCGGCA-3'
<b>Primer zur Erstellung von <i>deaD</i>-Mutanten</b>	
$\Delta deaD\_li\_fw$	5'-TTTGGTCTCTCGACGTTTCATCGCGCAGTGCC-3'
$\Delta deaD\_li\_rev$	5'-TTTGGTCTCTTAAGGCTGCCCGGCGCT-3'
$\Delta deaD\_re\_fw$	5'-TTTGGTCTCTCTTACGACTCGTAGCCGACATTG-3'
$\Delta deaD\_re\_rev$	5'-TTTGGTCTCTATGGCGAATGCGCGTTTTTCAGTC-3'
$\Delta Box\_li\_fw$	5'-TTTGGTCTCTCGACGTACATGTTCGATCTGGCCACC-3'
$\Delta Box\_li\_rev$	5'-TTTGGTCTCTGAAATGCTGCGCATGGGCTTC-3'
$\Delta Box\_re\_fw$	5'-TTTGGTCTCTTTCCAGCACCAGCGTCTTGAGCT-3'
$\Delta Box\_re\_rev$	5'-TTTGGTCTCTATGGGATGCCGCGATGCTGCTGC-3'
$deaD\_D178A\_li\_fw$	5'-TTTGGTCTCTCGACGTACATGTTCGATCTGGCCACC-3'
$deaD\_D178A\_li\_rev$	5'-TTTGGTCTCTGCAGCCGCCGAGAAATGCTGCGCATGGGCTTC-3'
$deaD\_D178A\_re\_fw$	5'-TTTGGTCTCTCTGCCAGCACCAGCGTCTTGAGCT-3'
$deaD\_D178A\_re\_rev$	5'-TTTGGTCTCTATGGGATGCCGCGATGCTGCTGC-3'
<b>Primer zur Erstellung von Expressionskonstrukten</b>	
pBRM-P+T_sX2_fw	5'-TTTGGTCTCTATTCCGATGAGGGGCATGTCTTCAG-3'
pBRM-P+T_sX2_rev	5'-TTTGGTCTCTCACCGGCACCGCCTTACAGCGG-3'
pBRM-P+T_sX4_fw	5'-TTTGGTCTCTATTCTGGGCGGCAATTTGGGACATT-3'

Name	Sequenz
pBRM-P+T_sX4_rev	5'-TTTGGTCTCTCACCGGATCGGGCGGATTGTAGTCA-3'
pBRM-P+T_sX8_fw	5'-TTTGGTCTCTATTCCAGGTCTATAGAGGTCAAGTGGAA-3'
pBRM-P+T_sX8_rev	5'-TTTGGTCTCTCACCGGACACCGCAGCACCAC-3'
pBRM-P+T_sX11_fw	5'-TTTGGTCTCTATTCAAGTTCGCGGACATTCCATTCAA-3'
pBRM-P+T_sX11_rev	5'-TTTGGTCTCTAAGCCCCGGCCGACAGGCGCG-3'
pBRM-P+T_deaD_fw	5'-TTTGGTCTCTTACCTCAAATAGCTGGCCGCCACCTT-3'
pBRM-P+T_deaD_rev	5'-TTTGGTCTCTTACCTTACTCGCCGCGCGGCTT-3'
Term_upstream_fw	5'-TTTGGTCTCTGGTATTCGAGCATTTAAATCTAGAGGCATC-3'
Term_upstream_rev	5'-TTTGGTCTCTATTCCGTACCCTAGGTCTAGGGC-3'
Term_downstream_fw	5'-TTTGGTCTCTGGTATTCGAGCATTTAAATCTAGAGGCATC-3'
Term_downstream_rev	5'-TTTGGTCTCTACCCGTACCCTAGGTCTAGGGC-3'
pGGE5_deaD_fw	5'-TTTGGTCTCTTATGATGCTGCTTTGCGCCTGCCGGCTCCG-3'
pGGE5_deaD_rev	5'-TTTGGTCTCTCACCTCGCCGCGCGGCTTCGGCGGACCC-3'
pGGE5_ΔdeaD_li_fw	5'-TTTGGTCTCTTATGATGCTGCTTTGCGCCTGCCGGCTCCG-3'
pGGE5_ΔdeaD_li_rev	5'-TTTGGTCTCTGAAATGCTGCGCATGGGCTTC-3'
pGGE5_ΔdeaD_re_fw	5'-TTTGGTCTCTTTTCCAGCACCAGCGTCTTGAGCT-3'
pGGE5_ΔdeaD_re_rev	5'-TTTGGTCTCTCACCTCGCCGCGCGGCTTCGGCGGACCC-3'
pGGE5_xcv0792_fw	5'-TTTGGTCTCTTATGTCGCAATACATCTACACCATGAACCGCGTC-3'
pGGE5_xcv0792_rev	5'-TTTGGTCTCTCACCTTCAAGGCCTTCAAACGCAAACGCTTCG-3'
pBRM_YbeY-Myc_fw	5'-CAGGGTCTCTTATGGTGGCAAAAATCACCAAAACCTTC-3'
pBRM_YbeY-Myc_rev	5'-CAGGGTCTCTCACCTCGGCCGACGCCTGCA-3'
pBRM_CspA-Myc_fw	5'-TTTGGTCTCTATTGGGATGGGGACAGTCCCG-3'
pBRM_CspA-Myc_rev	5'-TTTGGTCTCTCACCGACCGCCTGCACCTGGTCA-3'
<b>Primer für <i>in vitro</i> Transkription von sRNAs</b>	
sX2_ivT_fw	5'-ACCAGCTGTGCAGCCCTAGA-3'
sX2_ivT_rev	5'-AAACGAAGACACCGCGCGGT-3'
sX2_T7	5'-TTTTAATACGACTCACTATAGGGCACCCAGCTGTGCAGCCCTA-3'
sX4_ivT_fw	5'-GTAGGGGACACTTCCCACTGA-3'
sX4_ivT_rev	5'-TCTCACCCCCCAATGCCGC-3'
sX4_T7	5'-TTTTAATACGACTCACTATAGGGGTAGGGGACACTTCCCACTG-3'
sX7_ivT_fw	5'-AGTTTTTCTATCGCGGGGACGG-3'
sX7_ivT_rev	5'-CAATGCGCCGTCCATGGCGCC-3'
sX7_T7	5'-TTAATACGACTCACTATAGGTAGTTTTTCTATCGCGGGGACGG-3'
sX8_ivT_fw	5'-GGCTTCGCTGGCCACCTCG-3'
sX8_ivT_rev	5'-AAAACCTGGATATCGAGCG-3'
sX8_T7	5'-TTTTAATACGACTCACTATAGGGCTTCGCTGGCCACC-3'
sX11_ivT_fw	5'-TTACGCCAGTCGCAGCATCC-3'
sX11_ivT_rev	5'-AAAGAAAAACCCCGGACGTACAA-3'
sX11_T7	5'-TTTTAATACGACTCACTATAGGGACGCCAGTCGCAGCATCC-3'
sX12_ivT_fw	5'-TTGAGGCCTGCACATCC-3'

Name	Sequenz
sX12_ivT_rev	5'-AAAAGCAGGAGCCCCG-3'
sX12_T7	5'-TTTTAATACGACTCACTATAGGGAGGCCTGCACATCC-3'
sX16_ivT_fw	5'-TTATACGGTTCGACGCGAGGAT-3'
sX16_ivT_rev	5'-CACAGGCCAAAAACGAAAAACG-3'
sX16_T7	5'-TTTTAATACGACTCACTATAATACGGTTCGACGCGAG-3'
sX17_ivT_fw	5'-ACCTCGCGGCCACGTTGTCCT-3'
sX17_ivT_rev	5'-CAGCCGCAAGGGCCCAAGAAC-3'
sX17_T7	5'-TAATACGACTCACTATAGGTACCTCGCGGCCACGTTGTCCTCG-3'
coding_ivT_fw	5'-AATGCCGTGAAGGCCACCCT-3'
coding_ivT_rev	5'-TGACCATCTGCGCGCCCATG-3'
coding_ivT_T7	5'-TTTTAATACGACTCACTATAGGGAATGCCGTGAAGGCCACCCT-3'
intergen_ivT_fw	5'-GTTGCCGATGAAACAGTGG-3'
intergen_ivT_rev	5'-GAAGTTGCCTCAGGGTGAG-3'
intergen_ivT_T7	5'-TTTTAATACGACTCACTATAGGGTTGCCGATGAAACAGTGG-3'
5UTR_ivT_fw	5'-GACCACGTCATAGGGCAGAT-3'
5UTR_ivT_rev	5'-TCGTAAAATCCGGTTCTGCT-3'
5UTR_ivT_T7	5'-TTTTAATACGACTCACTATAGGGACCACGTCATAGGGCAGAT-3'
6S_ivT_fw	5'-GCGTCTCTGCTGTAAACGAC-3'
6S_ivT_rev	5'-AAAAAAGAAACGACGCCGAAG-3'
6S_ivT_T7	5'-TTTTAATACGACTCACTATAGGGCGTTCTCTGCTGTAAACGAC-3'
hfq_ivT_fw	5'-ATGGCTAAGGGGCAATCTTTACA-3'
hfq_ivT_rev	5'-TTACTGCTCGACGTCGTCATC-3'
hfq_ivT_T7	5'-TTAATACGACTCACTATAGGGATGGCTAAGGGGCAATCTTTACA-3'
<b>Primer für GFP-Reportersystem</b>	
pFX_HrpX_pnat_fw	5'-TTTGGTCTCTATTCATTGGCGTAGACCGGCGATAT-3'
pFX_HrpX_pnat_rev	5'-TTTGGTCTCTTAGCACGTTCTGCGTATGACAAC-3'
pFX_HrpXmut_fw	5'-TTTGGTCTCTATTCATTGGCGTAGACCGGCGATAT-3'
pFX_HrpXmut_rev	5'-TTTGGTCTCTACTCGCTGGCGCAAACG-3'
pFX_HrpXmut1_fw	5'-TTTGGTCTCTGAGTTCGGCGCCTATTATATTT-3'
pFX_HrpXmut1_rev	5'-TTTGGTCTCTTAGCACGTTCTGCGTATGACAAC-3'
pFX_HrpXmut2_fw	5'-TTTGGTCTCTGAGTTCGGCAACTATTATATTTTGC-3'
pFX_HrpXmut2_rev	5'-TTTGGTCTCTTAGCACGTTCTGCGTATGACAAC-3'
<b>Primer für pRT-PCR</b>	
RT_XCV0612_fw	5'-ATGAGGCGCATTCTATGCTGT-3'
RT_XCV0612_rev	5'-AATCAGTACGTCGAGGCCAATC-3'
qRT_hrcJ_fw	5'-ATCAGGTGTCCTATTCGCTGGA-3'
qRT_hrcJ_rev	5'-TTTCGTAGGTGAGTCCCTCCAC-3'
qRT_hrpX_fw	5'-GATGAGGTCAGCTTGTTCCGGTG-3'
qRT_hrpX_rev	5'-GTCTGTAAGGCCAACGTGCTCTG-3'

Name	Sequenz
qRT_hrpG_fw	5'-ACAACATTCTGGCCTGGTATCG-3'
qRT_hrpG_rev	5'-TTGCGCAACTGTAGATGTGCT-3'
qRT_hrcC_fw	5'-TTCAAATACGTCGCCGACAA-3'
qRT_hrcC_rev	5'-TGCGCATAATGCAACTGAAA-3'
qRT_16S_fw	5'-TACGCTAATACCGCATACGAC-3'
qRT_16S_rev	5'-TGGCACGAAGTTAGCCGGTG-3'
qRT_GroEL_fw	5'-CCAAGGAAATCGAACTGGC-3'
qRT_GroEL_rev	5'-GACCTTCTTCATCGCTTCG-3'

### 2.1.5 Verwendete Northern-Blot-Sonden

Die Northern-Blot Sonden wurden entsprechend der Sequenz der zu erwartenden sRNA designt. Dabei wurde, wenn möglich, eine Sonde gewählt, die keine Sekundärstruktur ausbildet und eine Schmelztemperatur von 57°C besitzt. Die in Tabelle 6 verwendeten Sonden wurden im Northern Blot zur Detektion von sRNAs eingesetzt. Weitere Sonden, die verwendet wurden, jedoch nicht zur Identifikation neuer sRNAs führten werden im Anhang in Tabelle 13 aufgelistet.

**Tabelle 6: Verwendete Sonden zur Detektion von sRNAs**

Name	Sequenz
sX2	5'-CCTTTAAGCTGCCTAGATGC-3'
sX4	5'-CAAATTGTTTCAGGAACCTTACGC-3'
sX8	5'-GGGAAACGAGACTTGCACTA-3'
sX11	5'-AGTAGTAGGCTTGCTCAGAGCC-3'
sX12	5'-TACCTTTTCGACGAGGATGTG-3'
sX18	5'-AGCGCGGCCACGAATCCTGC-3'
sX19	5'-GTTCTAGTTGGCCGCTGATG-3'
sX20	5'-GATCTTTACCGAGCCCTGG-3'
sX21	5'-ATGCATCAAACCAGGGCAA-3'
sX22	5'-CTCCATGTGATCCCAGCATT-3'
sX23	5'-GGTTGGCGTTATTGAGGTTG-3'
sX24	5'-AATGCATCTCTGTCACCACA-3'
sX25	5'-GGGCAGGTTTCCTTTCAATG-3'
sX26	5'-CGACTGGTGGCGCATGGCGT-3'
sX27	5'-AATTACGTTCTCGCCACCAC-3'
sX28	5'-GGCCCTAACGACCTATCTTC-3'
sX29	5'-GCCGCTAGCCAACCTATTG-3'
sX30	5'-TTGTTTCAGTTGCCCTCGAT-3'
5S	5'-CCTGGCGATGACCTACCTCTC-3'

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Anzucht und Lagerung von Bakterien

Die Anzucht aller *E.-coli*-Stämme erfolgte in LB-Medium (Tabelle 1) bei 37 °C. Die Anzucht von *Xcv* erfolgte in NYG-Medium (Tabelle 1) bzw. in MA (pH: 7-Medium) oder XVM2 (Tabelle 1) bei jeweils 30 °C, wenn nicht anders erwähnt. Zur dauerhaften Lagerung von Bakterienstämmen wurden Bakterienkulturen mit 7% DMSO versetzt und bei - 80°C tiefgefroren.

### 2.2.2 Erstellung von *Xcv*-Mutanten

#### *Erstellung von sRNA-Deletionsmutanten*

Zur Erstellung von sRNA-Deletionsmutanten wurden je 800 Bp flussaufwärts und flussabwärts vom zu deletierenden Bereich amplifiziert, fusioniert und in den Vektor pOGG2 kloniert. Dieser Vektor enthält zwei Selektionsmarker. Ein Spectinomycin-Resistenzgen und ein Levansucrase-Gen (*sacB*, Sensitivität gegenüber Saccharose). Nach Transformation des Vektors pOGG2 in DH5 $\alpha$ λPir-Zellen erfolgte der Transfer des Plasmids in *Xcv* mittels triparentaler Konjugation. Im Anschluss erfolgte eine mehrstufige Selektion zur Sicherstellung der Deletion in das *Xcv*-Genom. Hierfür wurde zunächst auf das Vorhandensein des Vektors selektiert und anschließend auf das erste Rekombinationsereignis, in dem der Vektor ins Genom von *Xcv* integriert. Zum Schluss wurde auf das zweite Rekombinationsereignis selektiert, in dem der Vektor aus dem Genom entfernt wird. Hierbei entstanden entweder die Wildtyp-Ausgangssituation oder die Deletion wurde eingeführt. Die Überprüfung der Deletion erfolgte mittels PCR.

#### *Erstellung der $\Delta$ deaD-Mutante und der DEAD-Motiv-Mutante*

Zur Untersuchung des Einflusses der DEAD-Box-Helikase DeaD auf die Virulenz wurden verschiedene Mutanten erstellt. Zum einen wurde nahezu das gesamte Gen deletiert ( $\Delta$ deaD) und zum anderen wurden Mutanten hergestellt, bei denen lediglich das DEAD-Motiv mutiert oder deletiert wurde: DEAD zu DEAA und  $\Delta$ Box. Die Deletion des gesamten Gens war nicht möglich, da es einen überlappenden Bereich des N-Terminus von *deaD* mit dem N-Terminus von *rpoE5* gibt. Als dennoch erfolgversprechende Klonierungsstrategie wurden sowohl 47 Aminosäuren ab annotiertem Start und zusätzlich ein Stopp-Codon im Genom aufrechterhalten. Für die Erstellung aller Mutanten wurden die jeweiligen flankierenden



Bereiche des Gens in pOGG2 kloniert und wie in 2.2.2 (Erstellung von sRNA-Deletionsmutanten) verfahren.

#### *Erstellung von sRNA-Expressions-Mutanten*

Da kleine RNAs auf RNA-Ebene funktional sind, war für ihre Expression ein Vektor notwendig, bei dem keine zusätzlichen Nukleotide vom Vektorrückgrad transkribiert werden. Hierfür wurde der Vektor pBRM-P+T erstellt. Im Unterschied zu pBRM-P enthält pBRM-P+T zwei *rrnB* Terminatoren. Einen unmittelbar flussaufwärts von der Insertionsregion, um die Entstehung längerer Transkripte durch einen flussaufwärts gelegenen Promotor zu verhindern. Die Schnittstelle zur Integration des GOI (*gene of interest*) wurde dabei nicht verändert. Anschließend wurde der komplette Locus der sRNAs inklusive circa 100 Bp flussaufwärts und flussabwärts des Locus in den Vektor kloniert, um sowohl eine Transkription der sRNA unter dem nativen Promotor als auch eine effiziente Termination der Transkription zu gewährleisten.

### **2.2.3 Anzucht von Tomaten- und Paprikapflanzen**

Für Infektionsversuche wurden sowohl Tomaten- als auch Paprikapflanzen angezogen. Für die Studien mit Tomatenpflanzen (*Solanum lycopersicum*) wurden die Kultivare Moneymaker und Heinz verwendet. Von Paprikapflanzen (*Capsicum annuum*) wurden die Kultivare ECW (*Early Cal Wonder*) und ECW-10R verwendet. Die ECW-10R-Pflanzen besitzen im Unterschied zu den ECW-Pflanzen das Resistenzgen *Bs1*, wodurch nach *Xcv*-85-10-Infektion eine Resistenzreaktion ausgelöst wird (Minsavage, 1990). Die Anzucht aller Pflanzen erfolgte im Gewächshaus unter Langtag-Bedingungen (16 h Licht,  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), 26-28 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60-70%. Mindestens 24 h vor jedem Infektionsexperiment wurden die Paprikapflanzen in einen Lichtschrank (Percival CLF Plant Climatics) umgestellt (16 h Licht,  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; 65% Luftfeuchtigkeit und 26 °C Tages- bzw. 22 °C Nacht-Temperatur), um eine reproduzierbare Umgebung für die Pflanzen zu gewährleisten.

### **2.2.4 Infektion von Tomaten und Paprikapflanzen mit *Xcv***

Für Infektionsversuche von Tomaten- und Paprikapflanzen wurden die zu testenden *Xcv*-Stämme zunächst über Nacht auf NYG-Nährmedium-Platten mit Rifampicin angezogen. Anschließend wurden die Bakterien in 10 mM  $\text{MgCl}_2$  resuspendiert und eine optische Dichte von 0,2 und 0,02 am Photometer (Pharmacia Biotech Ultospec 3000) eingestellt. Die

Bakteriensuspensionen wurden auf der Blattunterseite der Pflanzen mit Hilfe einer Spritze (ohne Kanüle) inokuliert. Resistenzreaktionen wurden nach 18-48 h dokumentiert, Symptome von anfälligen Pflanzen nach 5-9 d. Alle Infektionsversuche wurden mindestens dreimal in verschiedenen Pflanzen und an verschiedenen Blattpositionen durchgeführt.

### **2.2.5 Wachstumskurven mit Xcv**

#### *In vitro* Wachstumskurven

Zur Erstellung von *in vitro* Wachstumskurven wurde eine Vorkultur der zu vergleichenden Stämme in NYG (Tabelle 1) über Nacht angezogen und eine Hauptkultur in MA (pH 7) oder XVM2 (Tabelle 1) mit einer OD von 0,2 angeimpft. Der Wachstumsverlauf wurde bei 16 °C oder 30 °C über 24 h beobachtet.

#### *In planta* Wachstumskurven

Für die *in planta* Wachstumskurven wurden ECW-Pflanzen mit einer Bakteriensuspension mit einer Zellzahl von  $10^4$  KBE/ml inokuliert. Nach je 0, 3, 7, 10 und 14 Tagen erfolgte eine Probenentnahme und Aufschluss des Blattgewebes mittels Schwingmühle (Retsch MM301). Anschließend wurden verschiedene Verdünnungen des bakterienhaltigen Überstandes auf Nährmediumplatten mit Rifamicin und Cycloheximid plattiert.

### **2.2.6 Identifikation neuer sRNA-Kandidaten**

Zur Identifikation von neuen sRNA-Kandidaten wurde ein bereits vorhandener Datensatz einer RNA-Seq-Analyse verwendet (Evelyn Löschner, Aaron Nuss, Petra Dersch, Ulla Bonas; unpubliziert). Zur Erstellung des Datensatzes wurde Xcv 85-10 und ein 85\* Stamm (mit konstitutiv aktivem HrpG) in NYG (Tabelle 1) angezogen und in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet. Mit Hilfe dieses Datensatzes wurde händisch nach Kandidaten gesucht, indem Transkripte ausgewählt wurden, die zwischen 50 und 300 Nukleotide lang waren und zu keiner bekannten proteinkodierenden Sequenz gehören. Im Anschluss wurden die gefundenen Kandidaten mittels Northern Blot validiert.

### **2.2.7 RNA-Isolation**

Zur Isolation von RNA aus Xcv wurden zunächst die gewünschten Stämme in Flüssigkultur angezogen und bei der gewünschten OD geerntet. Die RNA wurde mittels TRI-Reagenz (Trizol)(Chomczynski and Sacchi, 1987) isoliert. Für die Phasentrennung wurden Phase Lock

Gel™ Tubes (5PRIME) verwendet. Im Anschluss erfolgte ein Verdau mittels DNase I und eine erneute Reinigung mittels PCI-Reagenz (Roti-Phelol; Roth). Die Fällung der RNA erfolgte durch Ethanol, versetzt mit 0,3 M Natriumacetat. Nach Waschen in 70% Ethanol wurde die Konzentration der gereinigten RNA mittels NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (260 nm) bestimmt.

### 2.2.8 Northern Blot

Zur Validierung der sRNA-Kandidaten und zur Überprüfung der sRNA-Überexpressionen wurden Northern Blots durchgeführt. Hierfür wurde ein 6%iges Polyacrylamidgel, versetzt mit 7 M Harnstoff, in 1× TBE-Puffer (TRIS-Borat-EDTA-Puffer; 89 mM TRIS Base, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA, pH 8,0), verwendet. 10 µg der isolierten gesamt RNA wurden mit Formamid-Ladepuffer (1 mM EDTA, 50% Glycerin, 0,03% Bromphenol-Blau, 0,03% Xylen-Cyanol-Blau) versetzt, bei 90 °C denaturiert und anschließend auf das Gel geladen. Zur Abschätzung der Größe der detektierten Signale wurde ein  $\gamma$ -ATP markierter DNA-Marker (pUC Mix Marker, 8; Fermentas GmbH) verwendet. Die Auftrennung im Gel erfolgte in TBE-Puffer. Anschließend wurde die RNA auf eine Nylon-Membran (Amersham Hybond™; GE Healthcare) transferiert und mittels UV-Crosslink (CL-1000 Ultraviolet Crosslinkers) fixiert. Für die Prähybridisierung und die Hybridisierung mit 5'-markierten Oligonukleotiden (denaturiert bei 95 °C, 5 min) wurde Amersham Rapid-hyb Buffer (GE Healthcare) verwendet. Prähybridisierung und Hybridisierung fanden für jeweils 1 h bei 42 °C statt (Hybridisierungsofen GFL 7601). Anschließend wurde nacheinander mit 5 × SSC (*saline sodium citrate*-Puffer 20-fach: 3 M NaCl, 0,3 M Trinatriumcitrat, pH 7,3), 1 × SSC und 0,5 × SSC jeweils mit 0,1% SDS versetzt gewaschen. Die Detektion erfolgte mit Hilfe des Phosphoimager Systems FLA-3000 (Fujifilm). Für die Detektion der neuen sRNAs wurden vorhandene Membranen mehrfach verwendet. Dafür wurden die Membranen in Wasser mit 0,5% SDS, aufgekocht und so die radioaktiv markierten Sonden der vorherigen Hybridisierung entfernt.

### 2.2.9 *In vitro* Transkription von Biotin-markierten sRNAs

Zur Erstellung der Templates für die *in vitro* Transkription von sRNAs wurden die jeweiligen sRNAs mit genspezifischen Primern amplifiziert und *blunt-end*™ in einen pUC57 Vektor ohne T7 Promotor kloniert. Anschließend wurde mit Hilfe eines Primers, der einen T7-Promotor enthielt und einem genspezifischen Primer, ein *run-off* PCR-Produkt generiert. Für die *in vitro* Transkription wurden 500 ng *run-off* PCR-Produkt eingesetzt. Dabei wurde der rNTP-Mix nach

Herstellerprotokoll (T7 RNA Polymerase; Promega) hergestellt, mit der Ausnahme, dass biotinyliertes UTP (Biotin-4-UTP; Jena Bioscience) im gleichen Verhältnis wie rATP, rGTP und rCTP eingesetzt wurde und rUTP lediglich im Verhältnis 1:2 (s. Tabelle 7). Anschließend wurde die Reaktionslösung gemäß Tabelle 8 angesetzt. Im Anschluss an die Transkription wurde das PCR Template verdaut (RQ1 RNase-Free DNase; Promega) und wie in 2.2.7 beschrieben, mittels TRI-Reagenz isoliert und anschließend gefällt.

**Tabelle 7: rNTP-Mix**

rNTP	Volumen (µl)
rATP (2,5 mM)	2,5
rGTP (2,5 mM)	2,5
rCTP (2,5 mM)	2,5
rUTP (2,5 mM)	1,25
Biotin-4-UTP (2,5 mM)	2,5

**Tabelle 8: Reaktionslösung für die *in vitro* Transkription**

Reagenz	Volumen (µl)
<i>Transcription Optimized 5x Buffer</i>	20 µl
DTT (100 mM)	10 µl
<i>Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor</i>	1 µl
rNTP-Mix	4,5 µl
<i>Phage RNA polymerase</i>	4 µl
500 ng <i>run-off</i> PCR-Produkt	X µl; entsprechen 500 ng PCR-Produkt
Nuklease freies Wasser	Auf finales Volumen von 100 µl

### 2.2.10 Pulldown-Experiment für die Identifizierung neuer sRNA-Bindeproteine

Der gesamte Pulldown wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Es wurden je 100 pmol biotinylierte sRNAs (siehe 2.2.9) eingesetzt und mit 15 µl der Streptavidin-Beads (Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin T1; Invitrogen), die zuvor mit Bindepuffer (5 mM Tris; 0,5 mM EDTA; 1 M NaCl; pH 7,5) äquilibriert wurden, für 10 min inkubiert. Anschließend wurde einmal mit Aufschlusspuffer (10 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl) gewaschen und für 30 min mit *Xcv*-Zelllysat inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Aufschlusspuffer wurden die gebundenen Proteine in SDS Probenpuffer bei 95 °C im Heizblock (Eppendorf *Thermomixer comfort*) eluiert.

### **2.2.11 MS-Analyse zur Identifikation von RNA-Bindeproteinen**

Zur Identifikation eines neuen RNA-Bindeproteins wurde eine Region im Gel mit einer Coomassie-gefärbten Proteinbande, sowie eine Kontrollregion auf gleicher Höhe, aus einem SDS-Gel ausgeschnitten. Alle zur Probenaufbereitung verwendeten Lösungen entsprachen dem Reinheitsstandard LC-MS-Grade. Die extrahierten Gelstücke wurden, wie in Lu et al. (2015) beschrieben, für die Analyse vorbereitet. Die anschließende Messung erfolgte an einer Synapt G2-2 nach Helm et al. (2014) unter Verwendung von 2 fMol Glykogenphosphorylase B (Waters) als internen Kalibrierstandard für die absolute Quantifizierung. Für den Datenbankabgleich wurde die UniProt Proteindatenbank für *Xcv* 85-10 ([uniprot.org/proteomes/UP000177877](http://uniprot.org/proteomes/UP000177877), Stand Juli 2015) verwendet.

### **2.2.12 Messung der Fluoreszenz von GFP-Reporterkonstrukten in *Xcv***

Für die Messung der GFP-Fluoreszenz von Reporterkonstrukten in *Xcv*, wurden die jeweiligen Stämme für 20 h in Zellkulturplatten (Greiner, CELLSTAR) mit 1 ml XVM2 Medium bei 16 °C und unter Schütteln inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung der GFP-Fluoreszenz im Microplate Reader (SpectraFluor Plus; Tecan Trading AG) bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 535 nm. Die erhaltenen Werte wurden auf die OD normalisiert.

### **2.2.13 SDS-PAGE und Western Blot**

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrer molekularen Masse erfolgte mittels SDS-PAGE (SERVAGE<sup>TM</sup>TG PRiME 10%). Im Anschluss wurden die Gele mit kolloidalem Coomassie (0,02% CBB-G250, 5% Aluminiumsulfat, 10% Ethanol, 2% ortho-Phosphorsäure) gefärbt, oder für einen immunologischen Nachweis mittels Western Blot auf Nitrocellulose-Membranen im Tank-Blot-Verfahren (Hoefer TE 22) übertragen. Im Anschluss wurden die Membranen blockiert (TBST mit 5% Milchpulver) und über Nacht bei 4 °C mit dem jeweiligen primären Antikörper inkubiert. Die Detektion erfolgte nach Inkubation mit dem sekundären, Peroxidase-gekoppelten Antikörper, mittels Chemilumineszenz-Verfahren (ECL). Alle verwendeten Antikörper werden in Tabelle 9 zusammengefasst. Als Mengenkontrolle wurden die Membranen mit Silber gefärbt (5 min in 2% Natriumcitrat, 0,8% Eisensulfat, 0,2% Silbernitrat), oder GroEL detektiert.

**Tabelle 9: Verwendete Antikörper**

Primärer Antikörper	Sekundärer Antikörper	Referenz
anti-c-Myc	anti-Maus	Roche Diagnostics
anti-penta-His	anti-Maus	Qiagen
anti-GFP	anti-Maus	Roche Diagnostics
anti-GroEL	anti-Kaninchen	Enzo Life Science
anti-HrcJ	anti-Kaninchen	(Rossier et al., 2000)
anti-HrcC	anti-Kaninchen	(Rossier et al., 2000)
anti-HrpF	anti-Kaninchen	(Rossier et al., 2000)

#### 2.2.14 Quantitative RT-PCR

Zum Umschreiben von RNA in cDNA wurde das RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo) verwendet und nach Herstellerprotokoll angewandt: Pro Reaktion wurden 2 µg RNA und 1 µl *random*-Hexamer-Primer (100 µM) in einem Gesamtvolumen von 12 µl angesetzt. Primer und RNA wurden für 5 min bei 65 °C im Heizblock denaturiert und anschließend 8 µl der Reaktionslösung bestehend aus 5x *Reaction Buffer* (4 µl), *RiboLock RNase Inhibitor* (1 µl), 10 mM *dNTP mix* (2 µl) und *Reverse Transcriptase* (1 µl) hinzugefügt. Die cDNA-Synthese erfolgte für 60 min bei 45 °C im (Thermocycler Biometra T3000). Im Anschluss wurden die Proben für 5 min auf 70 °C erhitzt. Die erhaltene cDNA wurde 1:100 eingesetzt. Die quantitative *real-time* PCR (qRT-PCR) wurde wie in Schmidtke et al. 2013 beschrieben durchgeführt.

#### 2.2.15 Rekombinante Proteinexpression in *E. coli*

Um Proteine rekombinant in *E. coli* synthetisieren zu können, wurden die zu untersuchenden Gene in pGGE5 (S. Thieme, unpubliziert) kloniert, um das entstehende Protein mit einem C-Terminalen His-Tag zu versehen. Eine Vorkultur wurde in LB (mit Kanamycin) angeimpft, 4-5 h bei 37 °C inkubiert und anschließend über Nacht bei 4 °C gelagert. Die Hauptkultur (Start-OD 0,2) wurde dann aus der Vorkultur hergestellt und bei einer OD von 0,5-0,7 wurde die Proteinsynthese mit 0,5 M IPTG induziert. Die Kulturen wurden über Nacht bei 16 °C angezogen und anschließend durch Zentrifugation (Avanti J-26XP) geerntet. Das Zellpellet wurde dann entweder entsprechend seiner OD in Laemmli-Puffer (4-fach konzentriert: 0,5 M Tris-HCl, 0,8% Glycerol, 10 % SDS, 0,01 % Bromphenol-Blau, 0,25 % β-Mecaptoethanol) gelöst und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert, oder für die Proteinreinigung in 3 ml Aufschlusspuffer (100 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 25% Glycerin, 0,05% Tween

20, pH 7,5) gelöst und unter Zugabe von Proteinase-Inhibitor (cOmplete EDTA-free, Roche) mittels dreimaligem Durchlauf an der French-Press (Spectronic SLM Aminco French Pressure Cell Press) aufgeschlossen. Nach RNA- und DNA-Verdau wurde bei  $14.000 \times g$  zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5417R). Der so erhaltene Totalextrakt wurde auf eine äquilibrierte Ni-NTA Matrix (3 ml His60 Ni Superflow Resin, Clontech) gegeben und für eine Stunde bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  unter ständigem Invertieren (Argos RotoFlex R2001) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 5 Säulenvolumen Aufschlusspuffer, wurden die gebundenen Proteine schrittweise eluiert. Die Elution der intakten DEAD-Box-Helikase (DeaD) erfolgte in fünf Schritten: 1.) 4 ml 20 mM Imidazol, 2.) 3 ml 50 mM Imidazol, 3.) 2 ml 200 mM Imidazol, 4.) 2 ml 300 mM Imidazol, 5.) 2 ml 500 mM Imidazol. Die inaktive Helikase ( $\Delta$ Box) hingegen wurde in vier Schritten eluiert: je 1 ml 50 mM, 50 mM, 300 mM 300 mM Imidazol. Nach jedem Schritt wurden Proben für die spätere Analyse mittels SDS-PAGE genommen. Die Elutionsfraktionen mit dem größten Anteil an Protein von Interesse wurden für 4 Stunden und nach Puffer-Tausch noch einmal über Nacht dialysiert (20 mM Tris, 250 mM KCl, 1 mM DTT, 50% Glycerol, pH 8,0). Das gereinigte Protein wurde im Anschluss zur Bestimmung der Aktivität weiterverwendet oder für die *in vitro* Translation eingesetzt.

#### **2.2.16 Bestimmung der ATPase Aktivität von DeaD**

Während und nach der Reinigung wurde mittels Malachite Green Phosphate Assay (BioAssay System) die ATPase Aktivität von DeaD bestimmt, wobei nach Herstellerprotokoll vorgegangen wurde. Hierfür wurde mit Hilfe des *Phosphate Standard* eine Eichgerade für den Bereich von 0 bis  $40 \mu\text{M}$  Phosphat erstellt. Für die Messung von freiem Phosphat in der Probe, wurden  $20 \mu\text{l}$  der Proteinprobe ( $1,5 \text{ mg/ml}$ ) mit  $1 \mu\text{g}$  *Xcv* gesamt-RNA und  $0,375 \text{ mM}$  ATP in einem Gesamtvolumen von  $100 \mu\text{l}$  für eine Stunde bei  $16^\circ\text{C}$  inkubiert.  $80 \mu\text{l}$  dieser Reaktion wurden durch Zugabe von  $20 \mu\text{l}$  *Working Reagent* (*Reagent A* und *Reagent B* im Verhältnis 100:1) gestoppt. Der dadurch ausgelöste Farbumschlag wurde nach 30 min am Photometer bei einer Wellenlänge von  $620 \text{ nm}$  bestimmt.

#### **2.2.17 Translationsassay**

Zum Vergleich des Einflusses von DeaD auf die Translation ausgewählter mRNAs wurde das PURExpress *In Vitro* Protein Synthesis Kit (NEB) verwendet und nach Herstellerprotokoll vorgegangen. Laut dieses Protokolls wurden  $10 \mu\text{l}$  von *Solution A*,  $7,5 \mu\text{l}$  von *Solution B*,  $1 \mu\text{l}$  RNase Inhibitor und ein Volumen X (entsprechend  $250 \text{ ng}$  Template-DNA), sowie  $2 \mu\text{l}$  einer

Lösung mit 1,5 mg/ml gereinigtem Protein vermischt und mit Puffer auf 25 µl aufgefüllt. Die Reaktionszeit betrug 4 Stunden bei 20°C (Thermocycler Biometra T3000).

### 2.2.18 Verwendete Programme für bioinformatische Analysen

Alle verwendeten Programme sind in Tabelle 10 aufgelistet. NCBI Blast wurde verwendet, um die Konservierung der neu identifizierten sRNAs in anderen Organismen zu überprüfen. Die CLC Genomics Workbench wurde verwendet, um mit Hilfe von Sequenzierdaten (Daten Evelyn Löschner; unpubliziert) neue sRNA Kandidaten zu identifizieren. Mit RNAfold wurden Sekundärstrukturvorhersagen der 5'-UTR von *hrpX* getroffen.

**Tabelle 10: In dieser Arbeit verwendete Software**

Programm	Homepage
NCBI Blast	<a href="http://blast.ncbi.nlm.nih.gov">blast.ncbi.nlm.nih.gov</a>
CLC Genomics Workbench	<a href="http://www.qiagenbioinformatics.com/products/clc-genomics-workbench">www.qiagenbioinformatics.com/products/clc-genomics-workbench</a>
RNAfold	<a href="http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi">rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi</a>

### 2.2.19 Statistische Methoden

Zur Bestimmung von signifikanten Unterschieden der Werte von mindestens drei unabhängigen Experimenten, wurde der studentische *t*-Test angewandt, wobei *p*-Werte im Bereich  $0,05 \geq p > 0,01$  mit \*, im Bereich  $0,01 \geq p > 0,001$  mit \*\* und im Bereich  $p \leq 0,001$  mit \*\*\* gekennzeichnet sind.

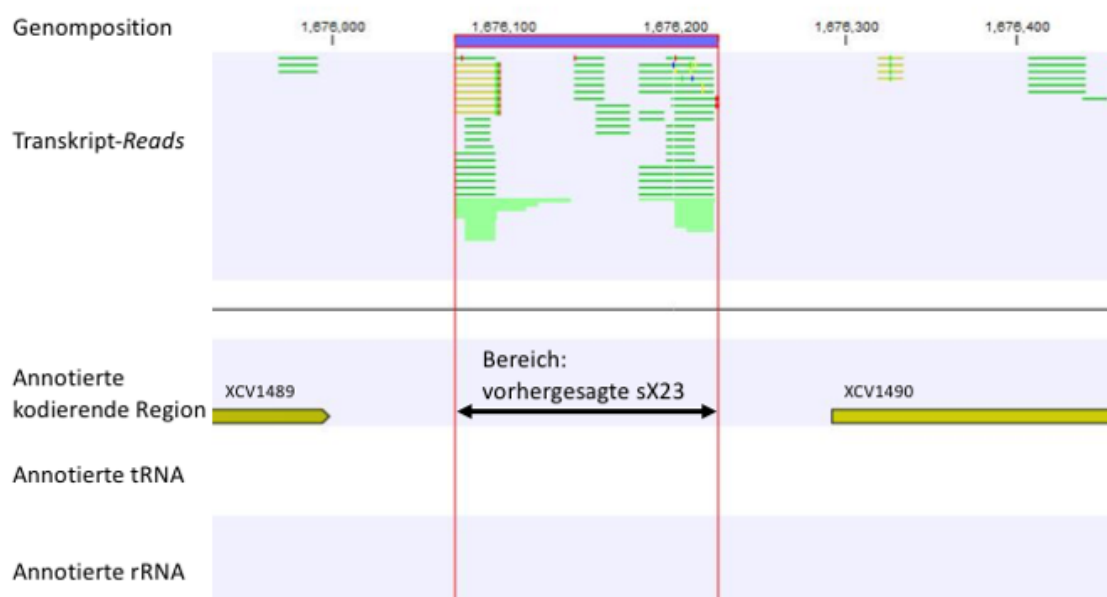


### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Identifizierung und Charakterisierung von sRNAs

##### 3.1.1 Neu identifizierte sRNAs werden HrpX/HrpG-unabhängig reguliert

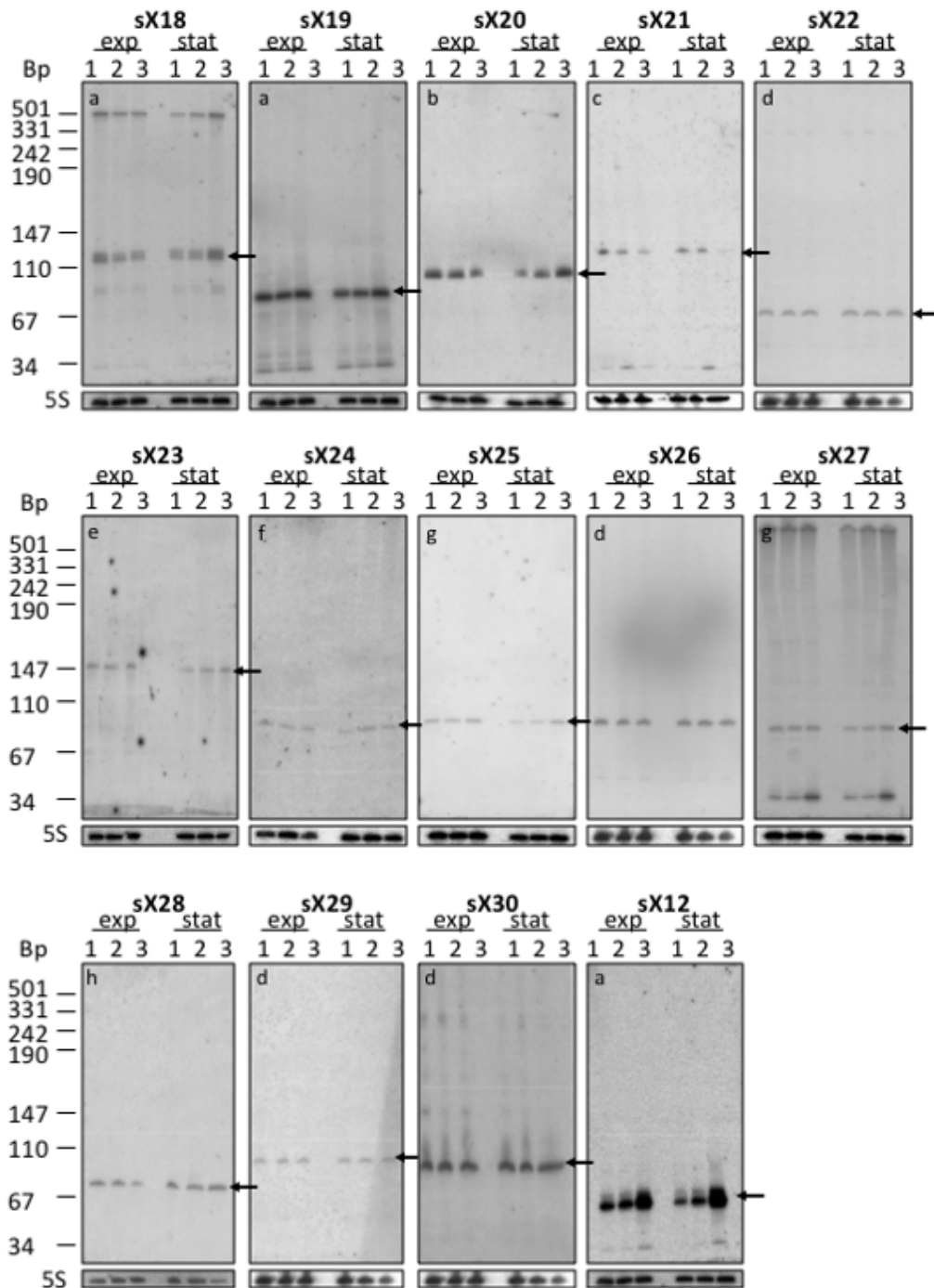
Die Identifizierung neuer sRNAs aus *Xcv* erfolgte zunächst bioinformatisch, anhand von RNA-Seq-Daten, die in Vorarbeiten von E. Löschner, A. Nuss und U. Bonas erstellt wurden (Daten unpubliziert). Hierfür wurde in den Transkript-Reads (sequenzierte cDNA, die zum 5,17 Mb großen *Xcv*-Genom (Thieme et al., 2005) zugeordnet werden konnte) des kompletten Datensatzes, händisch nach sRNA-Kandidaten gesucht. Es wurden 80 Kandidaten gefunden, die zu keinem annotierten Protein-kodierenden-Bereich gehörten und eine Transkript-Länge von maximal 300 Nukleotiden (nt) aufwiesen. Die Sequenzierdaten für den Kandidaten sX23 sind beispielhaft in Abbildung 5 dargestellt.



**Abbildung 5: Schematische Darstellung von RNA-seq-Daten zur Identifikation neuer sRNA-Kandidaten.** Die Sequenzierdaten wurden im Hinblick auf Transkripte untersucht, die zu keiner annotierten proteinkodierenden Region, tRNA oder rRNA gehören. Dargestellt sind Transkript-Reads (grün: Plusstrang, gelb: zu mehr als einer Genomregion passend) der Kandidaten-sRNA sX23 (markierter Bereich), sowie bekannte proteinkodierende Regionen (gelbe Pfeile).

Für jeden der 80 Kandidaten wurde eine genspezifische, etwa 20 Nukleotid-lange Oligonukleotidsonde abgeleitet, welche am 5'-Ende mittels  $^{32}\text{P}$  markiert wurde. Die Expression aller sRNA-Kandidaten wurde in der exponentiellen und der stationären

Wachstumsphase jeweils im Wildtypstamm *Xcv* 85-10 (Thieme et al., 2005) und in den Mutanten *Xcv* 85-10 pFG72-1 *hrpG\** und *Xcv* 85-10  $\Delta$ *hrpX* pFG72-1 *hrpG\** untersucht. Die *Xcv* 85-10 pFG72-1 *hrpG\**-Mutante besitzt eine Punktmutation in *hrpG* (*hrpG\**), welche dazu führt, dass HrpG konstitutiv aktiv ist (Wengelnik et al., 1999). In der *Xcv* 85-10  $\Delta$ *hrpX* pFG72-1 *hrpG\**-Mutante ist zusätzlich *hrpX* deletiert, so dass nur durch HrpG-regulierte Gene studiert werden können. Ein Vergleich der sRNA-Expressionsmuster der drei untersuchten Stämme gibt Aufschluss über eine Co-Regulation mit dem T3SS und ermöglicht Rückschlüsse auf eine mögliche Virulenzfunktion. Wie die Northern Blots zeigen, war die RNA-Akkumulation in allen Fällen in den drei untersuchten Stämmen vergleichbar (Abbildung 6). Insgesamt wurden 13 der 80 Kandidaten als neue sRNAs mit einer Transkriptlänge von unter 300 nt bestätigt (Abbildung 6). Für zwei weitere Kandidaten, sX18 und sX27 (Abbildung 6), war zusätzlich zum sRNA-Transkript ein deutlich längeres Transkript im Northern Blot sichtbar. Dies deutet auf eine Prozessierung der sRNA aus einem längeren Transkript oder eine Kreuzreaktion der Sonde hin. Weitere 6 Kandidaten mit einer Länge von mehr als 300 nt (Daten nicht gezeigt) wurden als sRNAs ausgeschlossen. Für die verbleibenden Kandidaten konnte kein Signal im Northern Blot detektiert werden. Die Ladekontrolle (5S-RNA) zeigt, dass in allen Spuren annähernd gleiche Mengen RNA geladen wurde. Als Kontrolle, dass sich regulierte Transkripte nachweisen lassen, wurde die bekannte sRNA sX12 detektiert (Abbildung 6), welche HrpG-abhängig exprimiert wird (Schmidtke et al., 2012). Es zeigte sich wie erwartet, eine stärkere Abundanz von sX12 in *Xcv* 85-10 pFG72-1 *hrpG\** im Vergleich zu sX12 in *Xcv* 85-10 und *Xcv* 85-10  $\Delta$ *hrpX* pFG72-1 *hrpG\** (Abbildung 6). Ein Vergleich der im Northern Blot detektierten sRNA-Längen mit den anhand der RNA-seq-Daten erwarteten Längen ergab eine gute Übereinstimmung (Tabelle 11). Die neu identifizierten sRNAs sind unterschiedlich stark konserviert. Beispielsweise wurden die Sequenzen von sX19, sX24, sX27, sX28 und sX29 ausschließlich in *Xcv* gefunden, sX18, sX20 und sX26 jedoch auch in einigen weiteren Xanthomonaden. Von sX21, sX22, sX23, sX25 und sX30 hingegen wurden Homologe im Genom von mindestens 5 Xanthomonaden gefunden. sX23 scheint eine besonders gut konservierte sRNA zu sein, da sie nicht nur in der Gattung *Xanthomonas*, sondern auch in der verwandten Gattung *Stenotrophomonas* (*S. maltophilia*, *S. nitritireducens*, *S. rhizophila*) und in *Pseudoxanthomonas* (*P. spadix*) vorkommt. Für die Homologie-Suche der aus *Xcv* neu identifizierten sRNAs wurde eine Nukleotid-Identität und eine Sequenz-Abdeckung von mindestens 90% vorausgesetzt.



**Abbildung 6: Die neu identifizierten sRNAs werden HrpG-/HrpX-unabhängig exprimiert.** Geladen wurden je 10 µg Gesamt-RNA von *Xcv* Kulturen aus der exponentiellen (exp) und der stationären (stat) Wachstumsphase (NYG Medium) aus (1) *Xcv* 85-10, (2) *Xcv* 85-10  $\Delta$ *hrpX* pFG72-1 *hrpG*\* (*Xcv* 85-10, konstitutiv aktives HrpG und deletiertes *hrpX*) und (3) *Xcv* 85-10 pFG72-1 *hrpG*\* (*Xcv* 85-10, konstitutiv aktives HrpG). Die Pfeile markieren Signale mit erwarteter Größe. Die Buchstaben a-h bezeichnen verschiedene Membranen. Die Membranen wurden mehrfach mit verschiedenen Sonden hybridisiert. sX12 (unten rechts) diente als Nachweiskontrolle für eine HrpG-abhängig regulierte sRNA. Als Mengenkontrolle diente 5S rRNA.

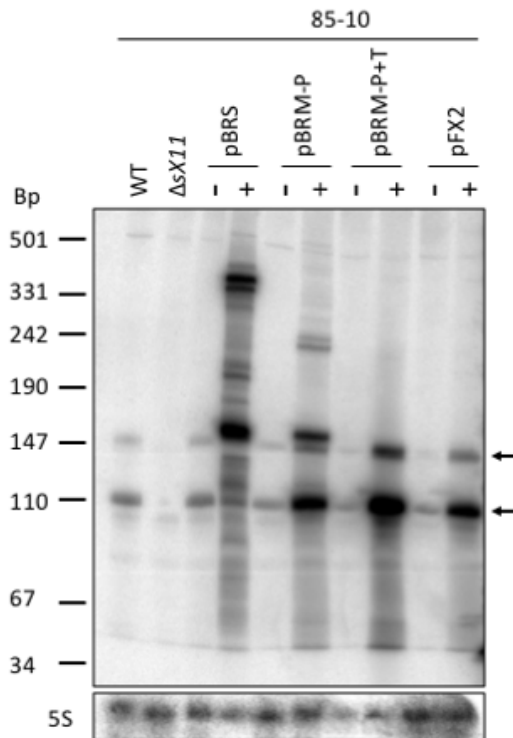
**Tabelle 11: Validierte sRNAs aus *Xcv***

sRNA (Strang)	Start-Stopp <sup>A</sup>	Erwartete Länge (Nt) (Sequenzierung)	Detektierte Länge (Nt) (Northern Blot)	Konservierung
sX18 (-)	82.166-82.044	122	120	<i>Xcm</i> <sup>1</sup>
sX19 (-)	149.432-149.352	80	80	
sX20 (+)	429.488-429.607	119	110	<i>Xax</i> <sup>2</sup> ; <i>Xp</i> <sup>3</sup>
sX21 (+)	1.317.605- 1.317.713	108	140	<i>Xad</i> <sup>4</sup> ; <i>Xax</i> <sup>2</sup> ; <i>Xcc</i> <sup>5</sup> ; <i>Xcg</i> <sup>6</sup> ; <i>Xcm</i> <sup>1</sup> ; <i>Xp</i> <sup>3</sup>
sX22 (+)	1.322.802- 1.322.872	70	70	<i>Xa</i> <sup>7</sup> ; <i>Xac</i> <sup>8</sup> ; <i>Xaj</i> <sup>9</sup> ; <i>Xcr</i> <sup>10</sup> ; <i>Xfa</i> <sup>11</sup> ; <i>Xv</i> <sup>12</sup>
sX23 (+)	1.676.072- 1.676.225	153	140	<i>Xa</i> <sup>7</sup> ; <i>Xac</i> <sup>8</sup> ; <i>Xad</i> <sup>4</sup> ; <i>Xaj</i> <sup>9</sup> ; <i>Xax</i> <sup>2</sup> ; <i>Xcc</i> <sup>5</sup> ; <i>Xcg</i> <sup>6</sup> ; <i>Xcm</i> <sup>1</sup> ; <i>Xcr</i> <sup>10</sup> ; <i>Xfa</i> <sup>11</sup> ; <i>Xff</i> <sup>13</sup> ; <i>Xg</i> <sup>14</sup> ; <i>Xoc</i> <sup>15</sup> ; <i>Xoo</i> <sup>16</sup> ; <i>Xp</i> <sup>3</sup> ; <i>Xs</i> <sup>17</sup> ; <i>Xtt</i> <sup>18</sup> ; <i>Xtu</i> <sup>19</sup> ; <i>Xv</i> <sup>12</sup> ; <i>Ps</i> <sup>20</sup> ; <i>Sm</i> <sup>21</sup> ; <i>Sn</i> <sup>22</sup> ; <i>Sr</i> <sup>23</sup>
sX24 (+)	1.734.918- 1.735.012	95	90	
sX25 (+)	1.916.742- 1.916.823	81	90	<i>Xax</i> <sup>2</sup> ; <i>Xff</i> <sup>13</sup> ; <i>Xp</i> <sup>3</sup> ; <i>Xv</i> <sup>12</sup>
sX26 (+)	1.925.720- 1.925.823	103	90	<i>Xax</i> <sup>2</sup> ; <i>Xp</i> <sup>3</sup>
sX27 (+)	2.087.975- 2.088.063	88	80	
sX28 (-)	3.285.467- 3.285.549	82	80	
sX29 (-)	3.431.668- 3.431.715	47	90	
sX30 (-)	3.570.025- 3.569.945	80	90	<i>Xa</i> <sup>7</sup> ; <i>Xax</i> <sup>2</sup> ; <i>Xac</i> <sup>8</sup> ; <i>Xcg</i> <sup>6</sup> ; <i>Xcm</i> <sup>1</sup> ; <i>Xfa</i> <sup>11</sup> ; <i>Xff</i> <sup>13</sup> ; <i>Xp</i> <sup>3</sup> ; <i>Xv</i> <sup>12</sup>

<sup>A</sup> genomische Position in *Xcv* 85-10 (NC\_007508) <sup>1</sup> *Xanthomonas citri* pv. *malvacearum*; <sup>2</sup> *Xanthomonas axonopodis* pv. *citrumelo*; <sup>3</sup> *X. perforans*; <sup>4</sup> *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae*; <sup>5</sup> *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*; <sup>6</sup> *Xanthomonas citri* pv. *glycines*; <sup>7</sup> *Xanthomonas axonopodis*; <sup>8</sup> *Xanthomonas citri* pv. *citri*; <sup>9</sup> *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*; <sup>10</sup> *Xanthomonas campestris* pv. *raphani*; <sup>11</sup> *Xanthomonas fuscans* pv. *aurantifolii*; <sup>12</sup> *Xanthomonas citri* pv. *vignicola*; <sup>13</sup> *Xanthomonas fuscans* pv. *fuscans*; <sup>14</sup> *Xanthomonas gardneri*; <sup>15</sup> *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*; <sup>16</sup> *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*; <sup>17</sup> *Xanthomonas sacchari*; <sup>18</sup> *Xanthomonas translucens* pv. *translucens*; <sup>19</sup> *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa*; <sup>20</sup> *Pseudoxanthomonas spadix*; <sup>21</sup> *Stenotrophomonas maltophilia*; <sup>22</sup> *Stenotrophomonas nitritireducens*; <sup>23</sup> *Stenotrophomonas rhizophila*

### 3.1.2 Das Plasmid pBRM-P+T eignet sich für die sRNA-Überexpression

Zur Charakterisierung von sRNAs sollten diese ekto­pisch in *Xcv* exprimiert werden. Da sRNAs auf RNA-Ebene wirken, sollte ausgeschlossen werden, dass bei deren Expression Nebenprodukte mit einer anderen Länge entstehen. Daher wurde die sRNA sX11 (Schmidtke et al., 2012), welche erfahrungsgemäß gut detektierbar ist, in verschiedene Vektoren kloniert, in *Xcv* 85-10 transformiert und mittels Northern Blot und sX11-spezifischer Sonde überprüft. Getestet wurden die Vektoren pBRS, pBRM-P, pFX2 und der in dieser Arbeit erstellte pBRM-P+T (s. 2.2.2). In pBRS wird die Transkription durch den *Lac*-Promotor gesteuert, während in pBRM-P, pFX2 und pBRM-P+T der natürliche Promotor verwendet wird. Der Vektor pBRM-P+T enthält im Vergleich zu pBRM-P einen zusätzlichen, von der Insertionsregion stromaufwärts gelegenen *rrnB* T1 Transkriptionsterminator. Der Terminator soll verhindern, dass Transkripte, die durch einen stromaufwärts gelegenen Promotor entstehen könnten, synthetisiert werden. Zur Wahl eines geeigneten Expressionsvektors wurde RNA von *Xcv* Stämmen untersucht, die den Kontrollvektor enthielten und von Stämmen, die sX11 ekto­pisch exprimierten. Als Kontrollen wurde Gesamt-RNA von *Xcv* 85-10 und einer sX11-Deletionsmutante (*Xcv*  $\Delta$ sX11) analysiert (Abbildung 7). In allen Stämmen wurden, wie bereits beschrieben (Schmidtke et al., 2012), zwei Signale detektiert (siehe Pfeile in Abbildung 7), welche in *Xcv*  $\Delta$ sX11 fehlten. Im Fall der pBRS- und pBRM-P-Derivate wurden zusätzliche, längere Signale detektiert. Für pBRM-P+T und pFX2 konnten ausschließlich die für sX11 erwarteten Signale nachgewiesen werden. Da die Transkriptmenge nach der Expression von pBRM-P+T im Vergleich zu pFX2 etwas höher erschien, wurden für die im Folgenden gezeigten sRNA-Überexpressionsexperimente Derivate des pBRM-P+T Plasmids erstellt und verwendet.

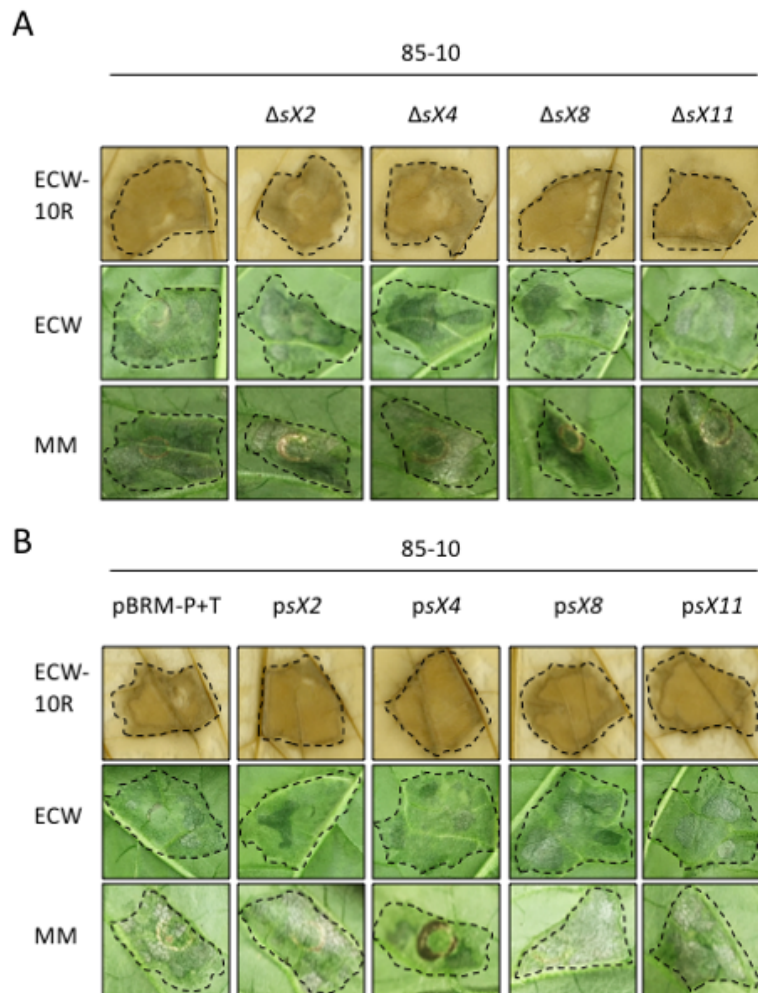


**Abbildung 7: Das modifizierte Plasmid pBRM-P+T eignet sich gut für die sRNA-Expression.** Getestet wurden die Expression von sX11 in den Expressionsvektoren pBRS, pBRM-P, pBRM-P+T und pFX2. Geladen wurde je 10 µg Gesamt-RNA aus in NYG-Medium angezogenen Bakterien der *Xcv*-Stämme 85-10,  $\Delta sX11$ , sowie RNA von Stämmen mit den angegebenen Kontrollplasmiden (-) bzw. entsprechende sX11-Expressionsplasmiden (+). Mittels sX11-spezifischer Sonde (oben) wurde die Expression der sRNA untersucht. Die Pfeile kennzeichnen die publizierten Größen von sX11 (Schmidtke et al., 2012). Die Detektion der 5S rRNA diente als Mengenkontrolle (unten).

### 3.1.3 Die Deletion beziehungsweise Überexpression von sRNAs hat keinen Effekt auf die Virulenz von *Xcv*

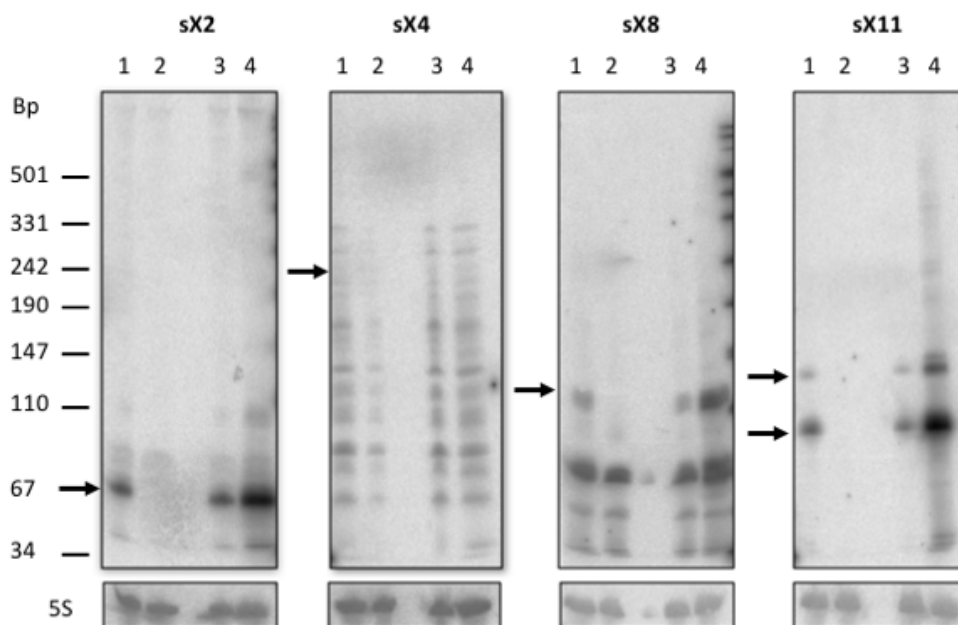
Um die Gene der publizierten sRNAs *sX2*, *sX4*, *sX8* und *sX11* (Schmidtke et al., 2012) hinsichtlich einer möglichen Virulenzfunktion zu charakterisieren, wurden Deletionsmutanten mit Hilfe des Suizidplasmids pOGG2 (Schulze et al., 2012) erstellt (siehe 2.2.2). Die Integration der Mutation in das *Xcv* 85-10 Genom basiert auf homologer Rekombination. Der Nachweis der eingeführten Deletion erfolgte mittels PCR. Die Deletionsmutanten wurden in Blätter der Paprikapflanzen der Kultivare ECW und ECW-10R und Tomatenpflanzen (Kultivar Moneymaker) inokuliert und die pflanzliche Reaktion im Vergleich zu *Xcv* 85-10 beurteilt. ECW-10R-Pflanzen zeigen auf Grund des Resistenzgens *bs1* eine Resistenzreaktion in Form

einer HR, die auf der Erkennung des Effektorproteins AvrBs1 beruht. Keine der getesteten Deletionsmutanten unterschied sich vom Wildtypstamm hinsichtlich der Ausprägung der HR bei resistenten Pflanzen bzw. der Symptombildung bei anfälligen Pflanzen (Abbildung 8 A). Es wurden je 3 unabhängig erstellte Mutanten getestet und je vier unabhängige Infektionsexperimente durchgeführt.



**Abbildung 8: Deletion bzw. Überexpression ausgewählter sRNA-Gene hat keinen Einfluss auf die Virulenz von *Xcv*.** Derivate des *Xcv* Stamms 85-10, mit (A) Deletionen in sRNA-Genen ( $\Delta sX2$ ,  $\Delta sX4$ ,  $\Delta sX8$ ,  $\Delta sX11$ ) bzw. (B) mit pBRM-P+T-Plasmiden zur sRNA-Überexpression (psX2, psX4, psX8, psX11), wurden mit einer  $OD_{600nm} = 0,2$  in Blätter von Paprika- (ECW-10R und ECW) und in Tomatenpflanzen (Moneymaker; MM) inokuliert. Als Positivkontrolle diente *Xcv* 85-10 bzw. *Xcv* 85-10 (pBRM-P+T). Die Dokumentation der Reaktionen erfolgte für ECW-10R-Pflanzen nach einem Tag, für ECW- und Money-Maker-Pflanzen nach vier Tagen. Für eine bessere Visualisierung der HR wurden die Blätter der ECW-10R-Pflanzen in 70% Ethanol gebleicht. Gestrichelte Linien markieren den Infektionsbereich. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis von insgesamt vier durchgeführten Experimenten.

Um zu testen, ob eine Überexpression ausgewählter sRNAs eine Veränderung des Phänotyps während der Pflanzeninfektion zur Folge hat, wurden diese überexprimiert. Dazu wurden die Gene für sX2, sX4, sX8 und sX11 in pBRM-P+T kloniert und in *Xcv* 85-10 transformiert. Keiner der getesteten Stämme wies einen veränderten Phänotyp *in planta* auf (Abbildung 8 B). Die Überexpression wurde über Northern Blot-Analysen verifiziert (Abbildung 9). In Northern Blots mit RNA aus *Xcv* 85-10 und *Xcv* 85-10 pBRM-P+T wurden für sX2, sX8 und sX11 Signale von erwarteter Größe detektiert, nicht jedoch in den Deletionsmutanten (Abbildung 9 jeweils Spur 1 und Spur 2). In den Stämmen, die den Expressionsvektor enthielten, war ein deutlich stärkeres Signal auf Höhe der jeweiligen sRNA sichtbar. Für sX4 konnte weder die Deletion noch die Überexpression bestätigt werden.



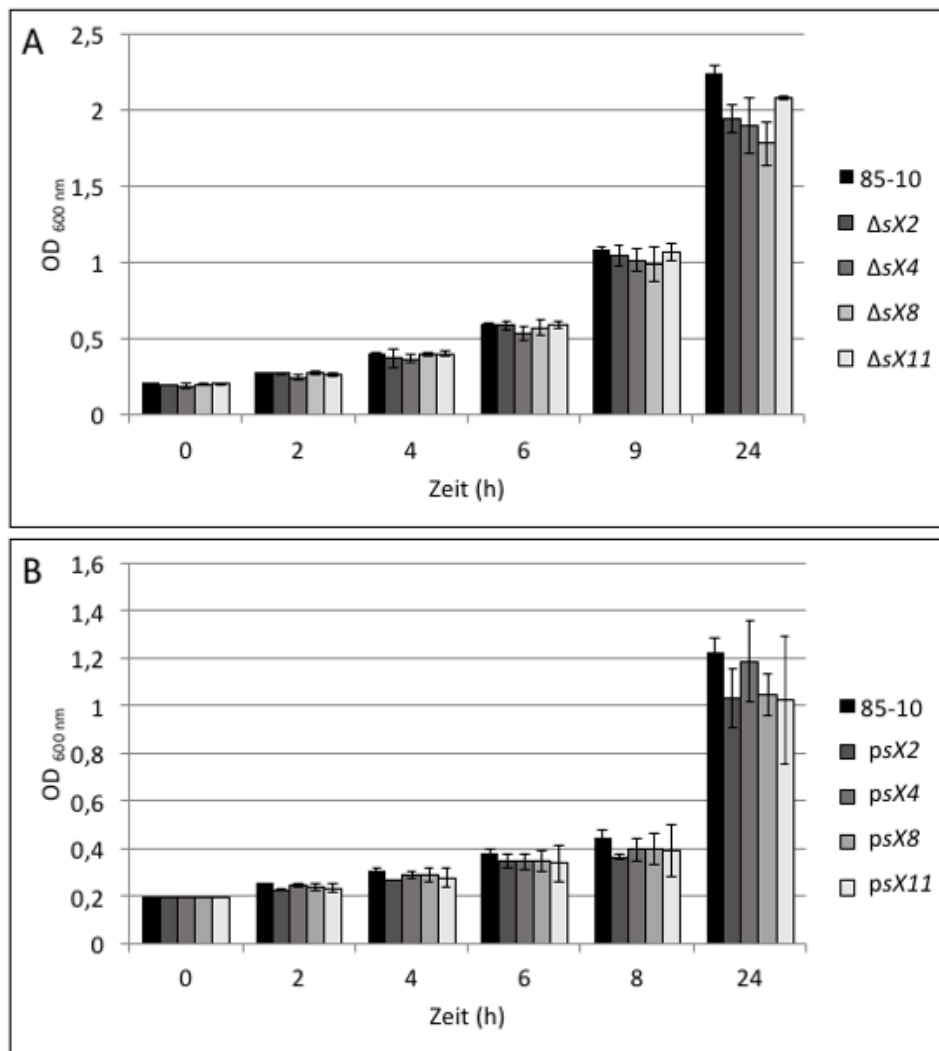
**Abbildung 9: Northern Blot zur Detektion der sRNAs sX2, sX4, sX8 und sX11.** Geladen wurde je 10 µg RNA aus in NYG-Flüssigmedium angezogenen Stämmen: *Xcv* 85-10 (1), entsprechende sRNA-Deletionsmutante (2), *Xcv* 85-10 pBRM-P+T (3) entsprechender sRNA-Expressionsstamm (4). Als Mengenkontrolle diente die 5S rRNA. Die Abbildung zeigt eines von zwei durchgeführten Experimenten mit vergleichbaren Ergebnissen.

### 3.1.4 Deletion und Überexpression ausgewählter sRNA-Gene hat keinen Einfluss auf das Wachstum *in vitro*

Zur weiteren Charakterisierung der sRNA-Gen-Deletionsmutanten und Überexpressionsstämme wurden *in vitro* Wachstumskurven in einem Minimalmedium (MA pH7) erstellt. Hierfür wurde die optische Dichte (OD<sub>600 nm</sub>) nach 0, 2, 4, 6, 9 und 24 h gemessen. Verglichen



wurde das Wachstum von *Xcv* 85-10 (WT) mit dem der *Xcv* sRNA-Gen-Deletionsmutanten  $\Delta sX2$ ,  $\Delta sX4$ ,  $\Delta sX8$  und  $\Delta sX11$ . Zudem wurde das Wachstum von *Xcv* 85-10 pBRM-P+T mit Stämmen verglichen, die *sX2*, *sX4*, *sX8* bzw. *sX11* (*Xcv*-Stämme: *psX2*, *psX4*, *psX8* und *psX11*) überexprimierten. Für keinen der erstellten Expressionsstämme wurde ein abweichendes Wachstum im Vergleich zum Wildtyp festgestellt (Abbildung 10).

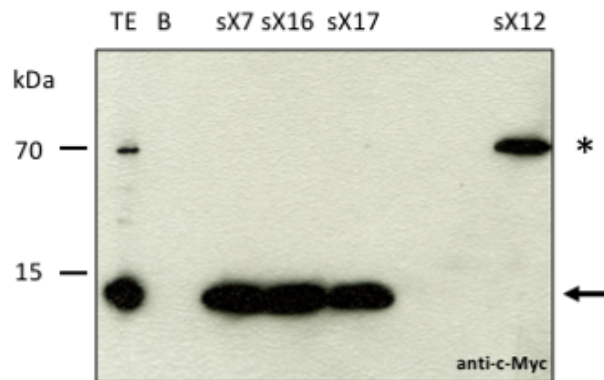


**Abbildung 10: Die Deletion und die Überexpression von sRNA-Genen haben keinen Effekt auf das Wachstum *in vitro*.** Alle Stämme wurden in Minimalmedium (MA pH 7,0) angezogen und das Wachstum über einen Zeitraum von 24 Stunden gemessen. **A)** Wachstum von *Xcv* 85-10 im Vergleich zu den *Xcv* Deletionsmutanten von *sX2* ( $\Delta sX2$ ), *sX4* ( $\Delta sX4$ ), *sX8* ( $\Delta sX8$ ) und *sX11* ( $\Delta sX11$ ). **B)** Wachstum von *Xcv* 85-10 pBRM-P+T (WT) im Vergleich zu *Xcv* Stämmen, die die sRNAs *sX2* (*psX2*), *sX4* (*psX4*), *sX8* (*psX8*) und *sX11* (*psX11*) ektopisch exprimieren. Dargestellt ist jeweils eine repräsentative Wachstumskurve, bestehend aus je drei parallel angeimpften Kulturen. Die Fehlerbalken zeigen die Abweichung innerhalb eines Experiments. Es wurden insgesamt drei unabhängigen Experimente mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt.

## 3.2 Identifizierung und Charakterisierung von RNA-Bindeproteinen

### 3.2.1 Die Pulldown-Strategie eignet sich für die Kandidaten-Suche neuer (s)RNA-Bindeproteine

Zur Identifizierung neuer sRNA-Bindeproteine wurde eine Pulldown-Strategie verfolgt, da diese in ähnlichen Experimenten erfolgreich war (Wächter et al., 2013). Zur Überprüfung der experimentellen Strategie wurde zunächst bestätigt, dass eine Bindung von bekannten Interaktionspartnern nachgewiesen werden kann. Hierfür wurden die sRNAs sX7, sX16 und sX17 ausgewählt, welche nachgewiesenermaßen mit CsrA interagieren (J. Brock, U. Bonas, unpubliziert). Biotinylierte sRNAs wurden auf Streptavidin-Beads immobilisiert und mit *Xcv*-Totalextrakt inkubiert. Dazu wurde ein *Xcv* Stamm verwendet, welcher CsrA-c-Myc ektopisch exprimiert (*Xcv* 85-10 *pcsrA*; Expression von CsrA 3x c-Myc unter Kontrolle des eigenen Promotors). Die c-Myc-markierte Proteinvariante von CsrA erlaubt eine Detektion des Proteins im Western Blot. Die gebundenen Proteine wurden nach erfolgter Auftrennung mittels SDS-PAGE auf eine Nitrocellulose Membran übertragen und gebundenes CsrA mittels c-Myc spezifischem Antikörper detektiert. In Abbildung 11 ist ein Signal für CsrA-c-Myc nach dem Pulldown mit sX7, sX16 und sX17 erkennbar. Eine Bindung dieser sRNAs an CsrA-c-Myc hat demnach stattgefunden. Als Negativkontrolle wurden Streptavidin-Beads ohne Zugabe von biotinylierten sRNAs mit Zellysate inkubiert, um eine direkte Bindung von CsrA-c-Myc an die Beads auszuschließen. Wie erwartet, konnte keine CsrA-c-Myc Bindung an die Beads nachgewiesen werden. Als weitere Kontrolle wurde sX12 im Pulldown getestet. Für sX12 ist bisher kein Interaktionspartner bekannt, und eine Interaktion mit CsrA-c-Myc ist auf Grund der Datenlage (Brock, 2013) unwahrscheinlich. Für sX12 konnte kein CsrA-Myc in der Elutionsfraktion nachgewiesen werden. Interessanterweise war jedoch ein weiteres Signal sichtbar (in Abbildung 11 mit \* markiert), welches auch im Totalextrakt bei circa 70 kDa erkennbar ist.

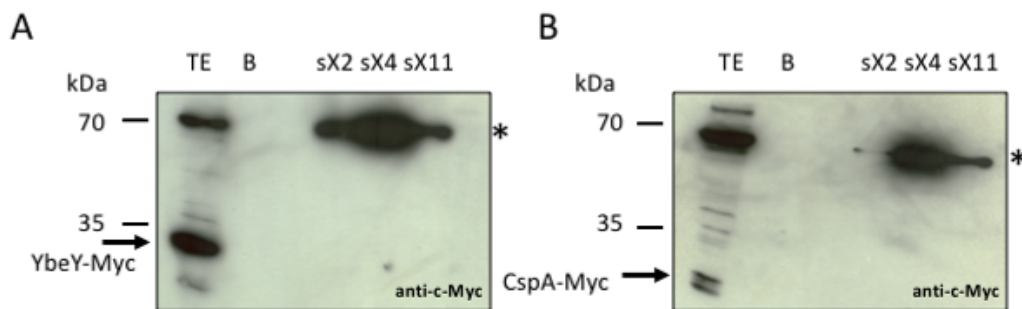


**Abbildung 11: sX7, sX16 und sX17 binden im Pulldown an CsrA.** Detektion von CsrA-Myc nach Pulldown mit sX7, sX16 und sX17 und Auftrennung der gebundenen Proteine mittels SDS-PAGE. Geladen wurde: Totalextrakt (TE) von *Xcv* 85-10 *pcsrA*, Bead-Kontrolle (B) und die Eluate der Pulldown Experimente mit sX7, sX16 und sX17. Der Pfeil markiert die erwartete Größe von CsrA-Myc, der Stern markiert ein zusätzlich detektiertes Signal. Zusätzlich zur Bead-Kontrolle (B) diente sX12 als RNA- Negativkontrolle. Gezeigt ist eins von zwei Experimenten mit vergleichbaren Ergebnissen.

### 3.2.2 Ein unbekanntes Protein bindet sRNAs

Nachdem die experimentelle Strategie validiert wurde, sollten Protein-Interaktionspartner getestet werden, welche nach Literatur-Angaben als sRNA-Bindeproteine in Frage kommen könnten. Hierfür wurden YbeY (XCV2642) und CspA (XCV2592) aus *Xcv* ausgewählt, da die Mutation von *ybey* in *S. meliloti* einen ähnlichen Phänotyp wie die Mutation von *hfq* aufweist (Pandey et al., 2011). Außerdem sind strukturelle Ähnlichkeiten zur MID Domäne von Argonautproteinen beschrieben, die in Eukaryoten vorkommen und an RNA-Interferenz-Reaktionen (RNAi) beteiligt sind (Pandey et al., 2014). CspA wurde ausgewählt, da eine Interaktion mit RNA gezeigt werden konnte (Jiang et al., 1997), jedoch nicht mit sRNAs. Beide Proteine wurden ektopisch in *Xcv* 85-10 mit Myc-Epitop exprimiert, um eine Interaktion mit ausgewählten sRNAs mittels Pulldown zu testen. Im Totalextrakt (TE) war ein starkes Signal für YbeY-c-Myc sichtbar, nach einem Pulldown mit sX2, sX4 und sX11 jedoch nicht (Abbildung 12, A). Eine Interaktion von YbeY mit den untersuchten sRNAs konnte demnach nicht gezeigt werden. Im Gegensatz dazu war CspA bereits im Totalextrakt (TE) nur schwach detektierbar (Abbildung 12, B). Nach Pulldown mit den sRNAs war kein CspA im Eluat detektierbar. In beiden Versuchen war jedoch ein circa 70 kDa Protein detektierbar, welches weder der Größe von YbeY-c-Myc noch CspA-c-Myc entspricht. Dieses Signal konnte nach Pulldown mit den

getesteten sRNAs im Eluat detektiert werden, nicht jedoch in der Bead-Kontrolle (Abbildung 12, mit \* markierte Signale). Ein Signal auf gleicher Höhe wurde bereits in vorherigen Experimenten (Abbildung 11) nachgewiesen, was darauf hindeutet, dass einer der verwendeten Antikörper ein nicht-Myc-markiertes Protein detektiert, welches auch sRNAs bindet.

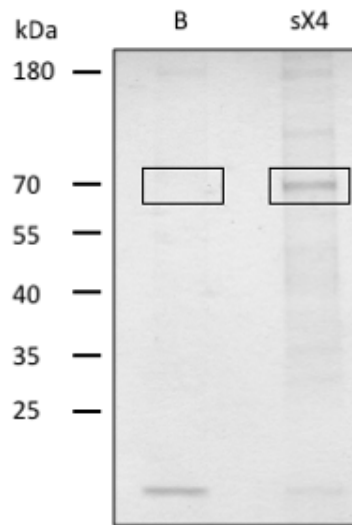


**Abbildung 12: Ein Unbekanntes Protein bindet sRNAs im Pulldown-Experiment.** Western Blot Detektion von YbeY-c-Myc (A) und CspA-c-Myc (B) nach Pulldown und Auftrennung der gebundenen Proteine mittels SDS-PAGE. Geladen wurde Totalextrakt (TE) von *Xcv 85-10 pybey* und *Xcv 85-10 pmspA*, eine Bead-Kontrolle (B) und die Eluate nach Pulldown mit sX2, sX4 und sX11. Der Pfeil markiert die erwartete Größe von YbeY-c-Myc (A) und CspA-c-Myc (B), der Stern markiert die zusätzlich detektierten Signale bei circa 70 kDa. Gezeigt ist eins von zwei Experimenten mit vergleichbaren Ergebnissen.

### 3.2.3 Die RNA-DEAD-Box-Helikase DeaD bindet sRNAs *in vitro*

Zur Identifizierung des unbekanntes 70-kDa-Proteins wurde der Pulldown mit sX4 wiederholt. Diese sRNA wurde ausgewählt, da sie die deutlichste Proteinanreicherung im Pulldown zeigte (Abbildung 12). Nach Auftrennung der Proteine im Eluat mittels SDS-PAGE wurde das Gel in kolloidalem Coomassie gefärbt, um die Proteine zu visualisieren. Auch in diesem Versuch war ein Proteinsignal bei circa 70 kDa sichtbar (Abbildung 13). In der Kontrolle war das Signal, wie schon im vorherigen Versuch (Abbildung 12), nicht zu sehen. Zur Identifizierung des nach dem Pulldown angereicherten Proteins wurden die Gelbereiche aus Spur sX4 und ein Kontrollbereich auf gleicher Höhe in der Spur der Bead-Kontrolle ausgeschnitten (Abbildung 13 als Kasten gekennzeichnet) und für eine quantitative massenspektrometrische Analyse (MS) aufbereitet (siehe 2.2.11). Hierbei wurden die in der Probe vorhandenen Proteine durch Zugabe eines Referenzproteins (Glykogenphosphorylase B; Kaninchen) absolut quantifiziert.

Das Pulldown-Experiment, sowie die Auftrennung der Proteine im Gel erfolgte dreimal mit reproduzierbaren Ergebnissen.



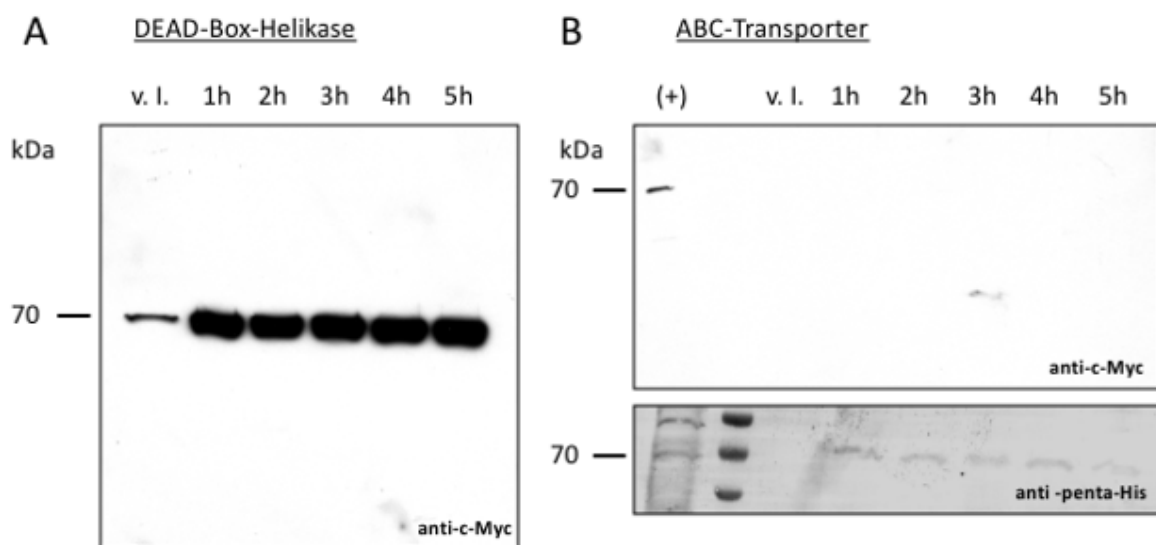
**Abbildung 13: Unbekanntes Protein bindet im Pulldown an sX4.** Auftrennung der gebundenen Proteine nach Pulldown mit sX4 (sX4) bzw. der Bead Kontrolle (B) mittels SDS-PAGE. Anschließend erfolgte eine Coomassie-Färbung. Das bei 70 kDa detektierbare Proteinsignal, sowie eine Kontrollregion auf gleicher Höhe (**siehe Kästen**) wurde aus dem Gel ausgeschnitten und mittels MS analysiert (siehe 2.2.11).

In Tabelle 12 sind die 3 abundantesten Proteine der Analyse aufgeführt. Für die MS-Analyse wurde ein biologisches Replikat in drei technischen Replikaten gemessen. Das mit 26 fmol/ $\mu$ l abundanteste Protein war eine RNA-DEAD-Box-Helikase (DeaD), gefolgt von einem mutmaßlichen ABC-Transporter (14 fmol/ $\mu$ l) und einem DNA *mismatch repair protein* (9 fmol/ $\mu$ l). Die Liste aller identifizierten Proteine befindet sich im Anhang (Tabelle 14).

**Tabelle 12: Abundanteste Xcv Proteine in der MS-Analyse nach Pulldown mit sX4**

Identifiziertes Protein aus Xcv 85-10	Menge (fmol/ $\mu$ l) in Kontrollregion	Menge (fmol/ $\mu$ l) nach Pulldown mit sX4
RNA-DEAD-Box-Helikase DeaD (Q3BRA8)	3	26
Mutmaßlicher ABC-Transporter (Q3BXJ0)	2	14
<i>DNA-mismatch-repair protein</i> MutL (Q3BSD0)	0,7	9

Um zu überprüfen, welches der identifizierten Proteine an sRNAs bindet und durch die Antikörper-Kombination anti-c-Myc, anti-Maus detektiert werden kann, wurden die zwei abundantesten Proteine rekombinant in *E. coli* exprimiert und im Western Blot überprüft, welches der Proteine mit den anti-c-Myc bzw. anti-Maus Antikörpern detektiert wird. Zusätzlich wurden die Gene mit einem His-Epitop für eine spätere Reinigung versehen. In Abbildung 14 ist ersichtlich, dass die RNA-DEAD-Box-Helikase durch die Antikörper anti-c-Myc, anti-Maus detektiert werden konnte, wohingegen der mutmaßliche ABC-Transporter nicht detektiert wird. Als Positivkontrolle diente ein *Xcv* 85-10 Totalextrakt, da im TE, wie in den vorangegangenen Versuchen, ein Signal bei circa 70 kDa zu erwarten war.

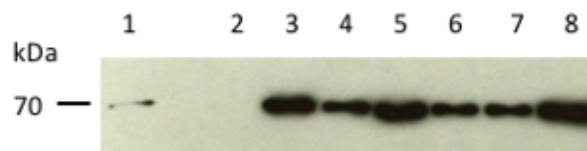


**Abbildung 14: Bestätigung der Detektion von DeaD durch anti-c-Myc (anti-Maus).** Geladen wurden jeweils gleiche Zellzahlen von *E. coli* Zellextrakt vor der Induktion mit IPTG (v. l.) und 1-5 h nach Induktion. **A)** Detektion der His-getaggten RNA-DEAD-Box-Helikase mit anti-c-Myc, anti-Maus Antikörpern. **B) Oben:** Detektion des His-getaggten ABC-Transporters mit anti-c-Myc, anti-Maus Antikörpern. Als positiv Kontrolle (+) diente *Xcv* Totalextrakt. **Unten:** Detektion des His-getaggten ABC-Transporters mit anti-penta-His, anti-Maus Antikörpern. Gezeigt ist eins von zwei durchgeführten Experimenten mit vergleichbaren Ergebnissen.

Zur Überprüfung der Expression des ABC-Transporters in *E. coli* wurde zusätzlich eine Immunodetektion mittels anti-penta-His Antikörper durchgeführt. Die Expression des His-markierten ABC-Transporters wurde bestätigt. In einem weiteren Versuch (Daten nicht gezeigt) konnte außerdem nachgewiesen werden, dass allein durch Verwendung des anti-Maus Antikörpers die RNA-DEAD-Box-Helikase detektiert werden kann. Somit beruht die Detektion nicht auf dem primären anti-c-Myc Antikörper, sondern dem anti-Maus Antikörper.

### 3.2.4 Die RNA-DEAD-Box-Helikase DeaD ist *in vitro* ein unspezifisches RNA-Bindeprotein

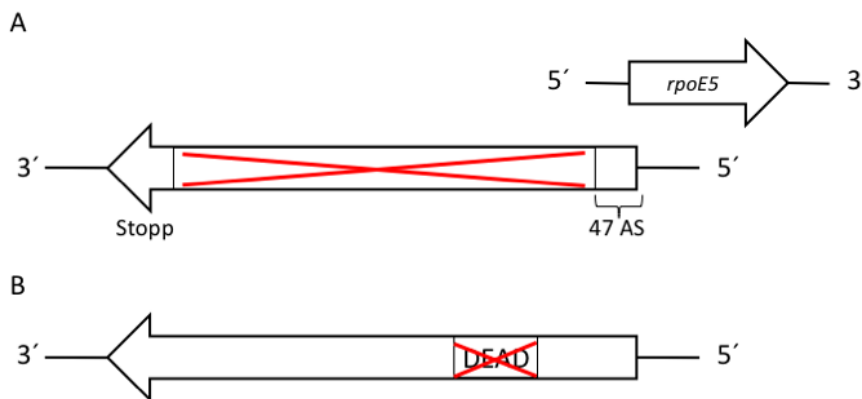
In den oben gezeigten Pulldown-Experimenten konnte eine Interaktion von DeaD mit sRNAs gezeigt werden. Um die Spezifität von DeaD gegenüber verschiedenen RNAs genauer zu untersuchen, wurde ein weiterer Pulldown mit verschiedenen RNA-Typen aus *Xcv* 85-10 durchgeführt. Es wurden folgende RNAs immobilisiert: sX4, ein Teil der 5'UTR einer mRNA (5'UTR von *XopX*), ein Teil der kodierenden Region einer mRNA (*groEL*), ein Transkript einer intergenischen Region, 6S RNA und *hfq* mRNA (Abbildung 15). Die Expression von DeaD wurde erfolgreich mittels Western Blot überprüft. Eine Spezifität für bestimmte RNAs konnte *in vitro* nicht festgestellt werden, obwohl einige RNAs (sX4, *groEL*, *hfq*) größere Mengen von DeaD binden können.



**Abbildung 15: DeaD interagiert mit verschiedenen *in vitro* transkribierten RNAs.** Western Blot (anti-c-Myc, anti-Maus) zur Detektion von DeaD nach einer SDS-PAGE von Proteinen der Elutionsfraktionen eines Pulldown-Experiments mit *in vitro* transkribierter RNA von: sX4 (3), der 5'UTR von *xopB* (4), der mRNA von *groEL* (5), einem Transkript einer intergenischen Region (6), 6S RNA (7) und der mRNA von *hfq* (8). Als Positivkontrolle diente *Xcv* Totalextrakt (1). Als negativ Kontrolle wurde eine Bead-Kontrolle durchgeführt (2). Gezeigt ist eins von zwei durchgeführten Experimenten mit vergleichbaren Ergebnissen.

### 3.2.5 Die Deletion von *deaD* vermindert die Virulenz von *Xcv* in *planta*

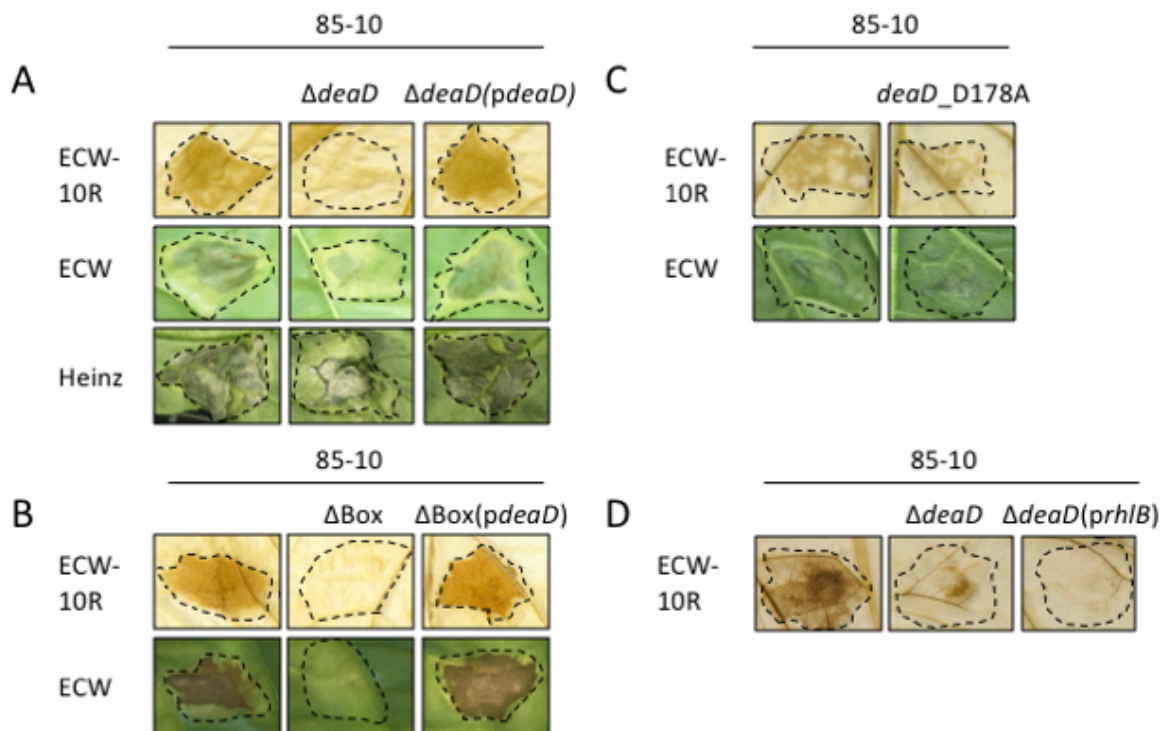
Um eine mögliche Rolle von DeaD in der Virulenz von *Xanthomonas* zu untersuchen, wurden verschiedene Mutanten erstellt und die pflanzliche Reaktion in Infektionsexperimenten von Paprika- (ECW und ECW-10R) und Tomatenpflanzen (Heinz) getestet. Abbildung 16 zeigt die schematische Darstellung der beiden erstellten Mutanten. Die *Xcv*  $\Delta$ *deaD*-Mutante sowie die *Xcv*  $\Delta$ Box-Mutante (Deletion des DEAD-Motivs) zeigten eine drastische Reduktion der Virulenz in ECW sowie eine reduzierte HR in ECW-10R (Abbildung 17, **A** und **B**). Die Untersuchung der *Xcv*  $\Delta$ *deaD*-Mutante in suszeptiblen Tomaten-Pflanzen zeigte ebenfalls eine verzögerte Virulenz, die jedoch weniger stark ausgeprägt war als in Paprika.



**Abbildung 16: Schematische Darstellung der *deaD*-Mutanten.** Zur Untersuchung der Funktion von DeaD in der Virulenz wurden verschiedene Mutanten erstellt. **(A)** Die Deletion des kompletten Gens war nicht möglich, da es laut Annotation eine Überschneidung mit dem Gen des RNA-Polymerase Sigma-E Faktors (*rpoE5*) gibt. In *Xcv*  $\Delta$ *deaD* verblieben daher die ersten 47 Aminosäuren so wie das native Stoppcodon im Genom. In der *Xcv*  $\Delta$ Box-Mutante **(B)** wurden das namensgebende, vier Aminosäure lange DEAD-Motiv deletiert.

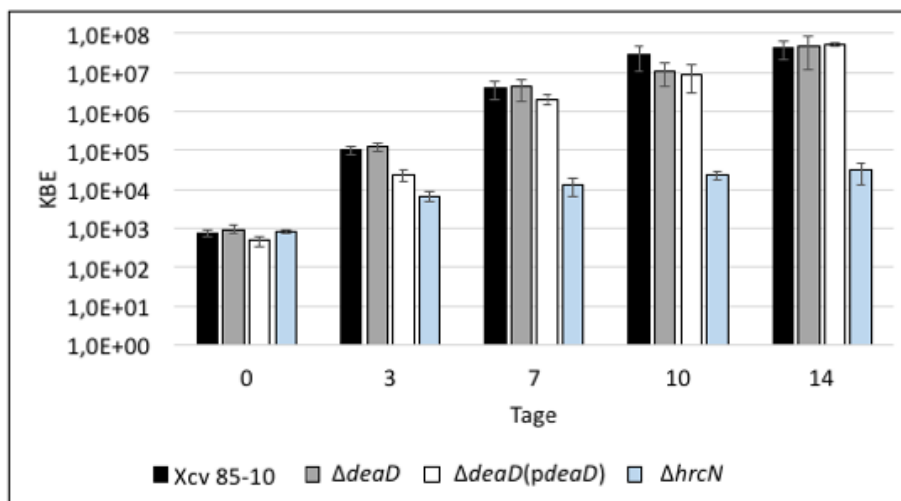
Beide Mutanten konnten durch ektopische Expression des Gens (mit *pdeaD*) in allen getesteten Pflanzen komplementiert werden. Die Einführung einer einzelnen Punktmutation im DEAD-Motiv zu DEAA (*deaD*\_D178A) führte nicht zu verminderter Virulenz (Abbildung 17 **C**). Da bekannt ist, dass DEAD-Box-Helikasen partielle Redundanz aufweisen können, wobei besonders die funktionelle Überschneidung von RhlB mit DeaD genannt wird (Prud'homme-Genereux et al., 2004), wurde untersucht, ob die Virulenz der *Xcv*  $\Delta$ *deaD*-Mutante durch ektopische Expression von *rhlB* komplementiert wird. Dies war jedoch nicht der Fall (Abbildung 17 **D**).





**Abbildung 17: Die Deletion von *deaD* bzw. des DEAD-Motivs reduziert die Virulenz von *Xcv* in Paprika- und Tomatenpflanzen.** Die Inokulation in allen hier gezeigten Versuchen erfolgte mit einer  $OD_{600nm} = 0,2$ . Die Dokumentation der Pflanzenreaktion erfolgte für ECW-10R nach 48 h, in ECW nach 6 d und in Heinz nach 5 d. Für eine bessere Visualisierung der HR wurden die Blätter der ECW-10R Pflanzen in Ethanol gebleicht. Die gestrichelten Linien markieren den Infektionsbereich. Infektion von ECW-10R und ECW mit (A) *Xcv*  $\Delta deaD$  und (B) *Xcv*  $\Delta Box$ . Sowohl *Xcv* 85-10 als auch die Mutanten enthielten den Kontrollvektor (pBRM-P+T). (C) Vergleich der Symptome einer Punktmutante (*Xcv* *deaD*\_D178A) zu *Xcv* 85-10. (D) Zusätzliche Expression von *rhlB* in *Xcv*  $\Delta deaD$  komplementiert nicht den Virulenz-Phänotyp. Alle Infektionsexperimente wurden mindestens dreimal durchgeführt, gezeigt ist je ein repräsentatives Beispiel.

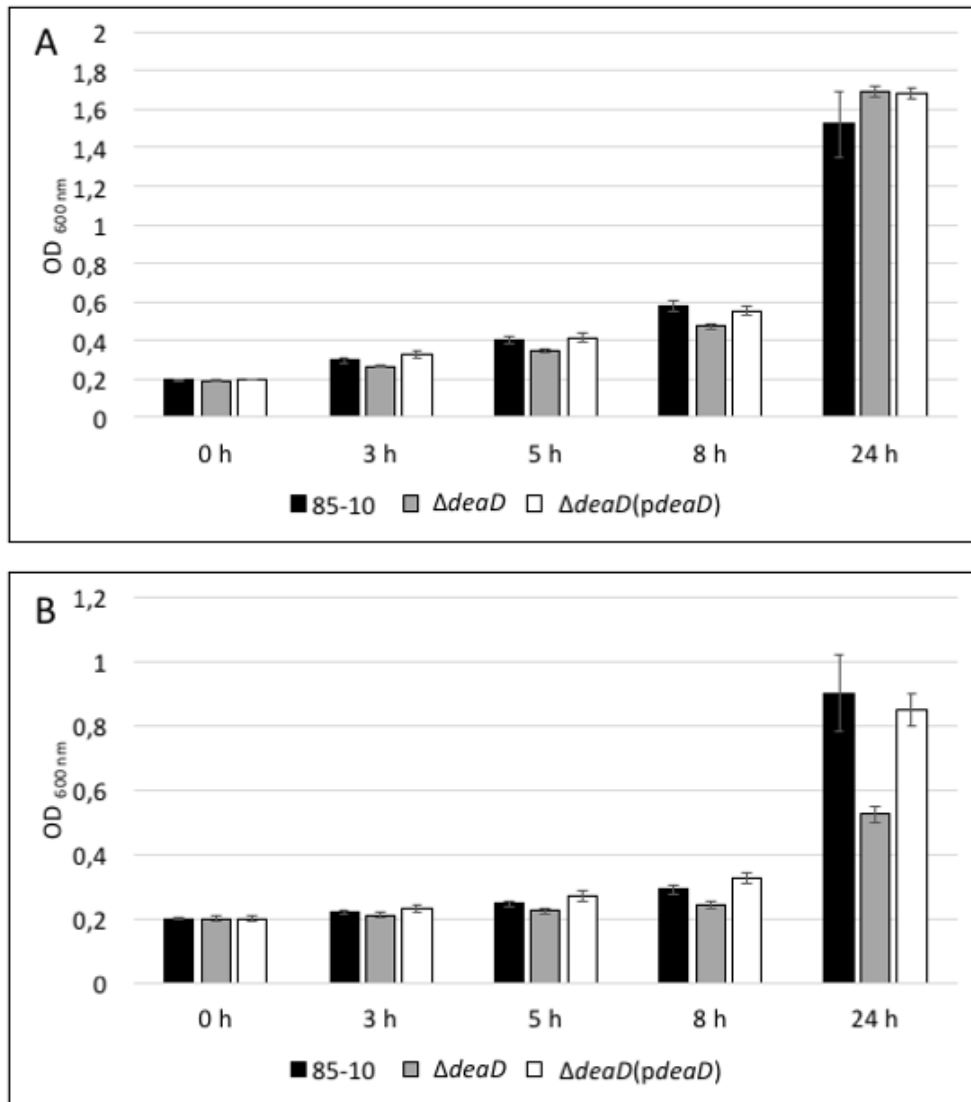
Zusätzlich zur Beobachtung makroskopischer Reaktionen von infizierten Wirtspflanzen wurde das Wachstum von *Xcv*  $\Delta deaD$  im Vergleich zu *Xcv* 85-10 und einem (den Virulenz-Phänotyp) komplementierenden Stamm (*Xcv*  $\Delta deaD(pdeaD)$ ) in Paprika (ECW) untersucht. Als Referenz für einen nicht pathogenen und im Wachstum beeinträchtigten Stamm, wurde *Xcv*  $\Delta hrcN$  inokuliert, welcher kein funktionales T3SS ausbildet. Während die *Xcv*  $\Delta hrcN$ -Mutante, wie erwartet, nur schwach in der Pflanze wuchs, hatte die Deletion von *deaD* keinen Effekt auf das bakterielle Wachstum in der Pflanze (Abbildung 18).



**Abbildung 18: Die *deaD*-Mutante verhält sich in Bezug auf das Wachstum *in planta* wie der Wildtyp.** *Xcv* 85-10 und Derivate ( $\Delta deaD$  (jeweils mit Kontrollvektor, pBRS), dem komplementierenden Stamm,  $\Delta deaD(pdeaD)$  und  $\Delta hrcN$ ) wurden mit  $OD_{600\text{ nm}} = 0,4$  in Blätter von ECW Paprikapflanzen inokuliert. Nach 0, 3, 7, 10 und 14 Tagen wurden Proben entnommen und die Zahl der KBE (=Kolonie-Bildenden-Einheiten) bestimmt. Die Datenpunkte repräsentieren drei biologische Replikate, von drei verschiedenen Pflanzen. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung eines Experiments. Das Experiment wurde dreimal mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt.

### 3.2.6 Die Deletion von *deaD* in *Xcv* führt zu reduziertem Wachstum bei 16°C

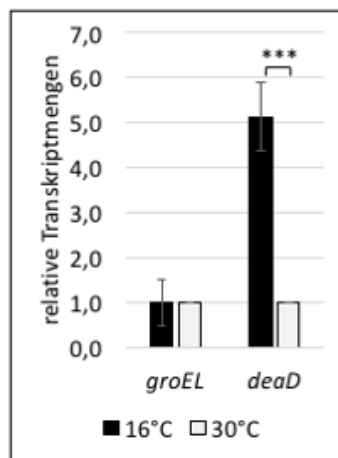
Ein in der Literatur häufig beschriebener Phänotyp einer *deaD*-Mutante ist ein reduziertes Wachstum bei niedrigen Temperaturen (Jones et al., 1996, Charollais et al., 2004). Um dies für die *Xcv* Mutante zu testen, wurde das Wachstum von *Xcv* 85-10, der *Xcv*  $\Delta deaD$ -Mutante, und dem komplementierenden Stamm, *Xcv*  $\Delta deaD(pdeaD)$  bei verschiedenen Temperaturen in Flüssigkultur gemessen. Die Bakterien wurden für 24 Stunden mit einer Start- $OD_{600\text{ nm}}$  von 0,2 in XVM2 bei 30 °C bzw. bei 16 °C kultiviert. XVM2 ist ein Minimalmedium, welches die *hrp*-Genexpression stimuliert, vermutlich da es die Bedingungen im Apoplasten der Pflanze simuliert (Wengelnik et al., 1996a). Bei 30 °C, bei welcher Temperatur *Xcv* in der Regel angezogen wird, wuchsen alle untersuchten Stämme vergleichbar schnell. (Abbildung 19 A). Bei einer Wachstumstemperatur von 16 °C wies *Xcv*  $\Delta deaD$  ein signifikant vermindertes Wachstum auf. Dieser Effekt war am deutlichsten nach 24 Stunden: die  $OD_{600\text{ nm}}$  war mit circa 0,5 um etwa 50% reduziert (Abbildung 19 B).



**Abbildung 19: Das Wachstum von der *Xcv deaD*-Mutante ist bei 16°C im Vergleich zu *Xcv* 85-10 vermindert.** Wachstum von *Xcv* 85-10 im Vergleich zu *Xcv*  $\Delta deaD$  (jeweils mit Kontrollvektor, pBRM-P+T), und *Xcv*  $\Delta deaD(pdeaD)$  in XVM2 bei 30°C (A) und bei 16°C (B). Gezeigt ist das Ergebnis eines repräsentativen Experiments. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung. Das Experiment wurde insgesamt dreimal mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt.

Um die Wachstumsunterschiede bei verschiedenen Temperaturen weiter zu untersuchen, wurden die Transkriptmengen von *deaD* und *groEL* bei 16°C und bei 30°C bestimmt. Es wurde angenommen, dass die Menge der *groEL* mRNA nicht durch die Temperatur beeinflusst wird (Kontrollgen). Die Normalisierung der Messwerte erfolgte anhand der 16S mRNA und die Transkriptmengen von *groEL* und *deaD* bei 30°C und 16°C relativ zueinander bestimmt. Zu sehen ist, dass die *groEL* Transkriptmengen für beide Bedingungen ähnlich ist, während die

*deaD* mRNA bei 16°C auf eine circa fünffache Menge anstieg (Abbildung 20), was vermuten lässt, dass DeaD bei dieser Temperatur eine wichtige physiologische Rolle spielt.

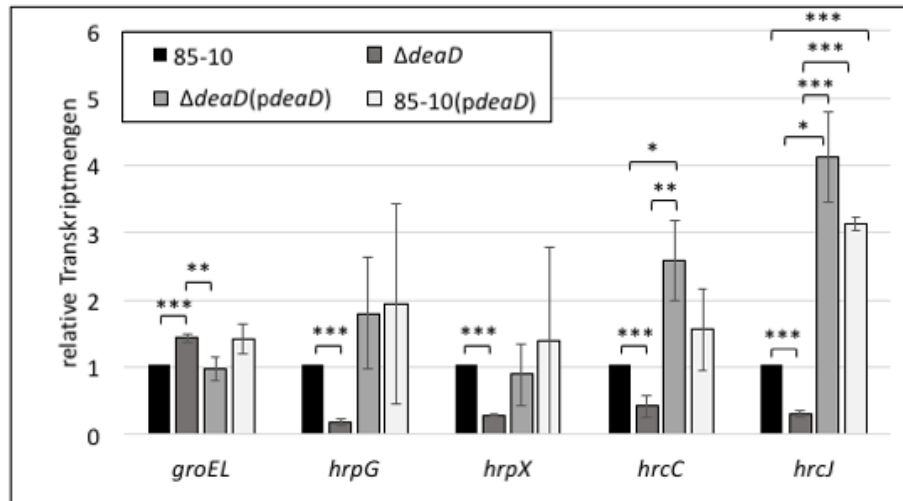


**Abbildung 20: Die Transkriptmengen von *deaD* sind bei 16 °C deutlich erhöht.** *Xcv* 85-10 wurde bei 16 °C und bei 30°C in XVM2 angezogen und die gesamt-RNA isoliert. Anschließend erfolgte die qRT-PCR-Analyse von *deaD* im Vergleich zu *groEL*. Die Transkriptmengen von *groEL* und *deaD* wurden mit Hilfe der 16S RNA-Menge normalisiert und die bei 30 °C bestimmten Transkriptmengen jeweils auf 1 gesetzt. Das obige Diagramm repräsentiert das Mittel aus drei unabhängigen Experimenten. Zur Angabe des Signifikanzniveaus wurde  $p \leq 0,001$  mit \*\*\* gekennzeichnet.

### 3.2.7 DeaD reguliert die essenziellen Faktoren der Virulenz von *Xcv* auf Transkriptebene

Um den Einfluss von DeaD auf die Virulenz von *Xcv* genauer zu untersuchen, wurden die relativen Transkriptlevel der essenziellen Pathogenitätsfaktoren HrpG und HrpX in *Xcv* mittels qRT-PCR bestimmt. In beiden Fällen waren die Transkripte in der *Xcv*  $\Delta$ *deaD*-Mutante reduziert: für *hrpX* um 30% und für *hrpG* um 20% (Abbildung 21). Die Transkriptmengen von zwei der von HrpG/HrpX regulierten Gene, *hrcC* und *hrcJ*, zeigten ebenfalls eine deutliche Reduktion. Die Deletion von *deaD* führte jedoch nicht zu einem generellen, negativen Effekt auf die Transkriptionsmaschinerie, wie die Daten für *groEL* zeigen (Abbildung 21). Durch die ektopische Expression von *deaD* konnten alle Transkriptmengen-Änderungen komplementiert werden (Abbildung 21). Es gab jedoch in allen Stämmen, die DeaD ektopisch exprimieren eine starke Varianz zwischen den biologischen Replikaten. In allen Fällen wurden die Transkriptmengen auf das Wildtyp Niveau angehoben, in einigen Fällen stiegen die Transkriptmengen jedoch darüber hinaus an. Dies führte zum Teil zu hohen Standardfehlern, was dazu führte, dass keine signifikanten Unterschiede zwischen den Transkriptmengen in *Xcv*

$\Delta deaD$  und  $Xcv \Delta deaD(pdeaD)$  berechnet werden konnten, obwohl ein deutlicher Unterschied vorhanden war. Die Messdaten dieses Experiments werden im Anhang (Tabelle 15) aufgeführt. Durch die Expression von *DeaD* in  $Xcv$  85-10 zeigten sich ähnliche Ergebnisse wie in den Komplementationstämmen, woraus sich schließen lässt, dass die ektopische Expression von *DeaD* zu einer Überexpression führt, was die nach oben abweichenden Werte in den Komplementations-Stämmen erklärt.

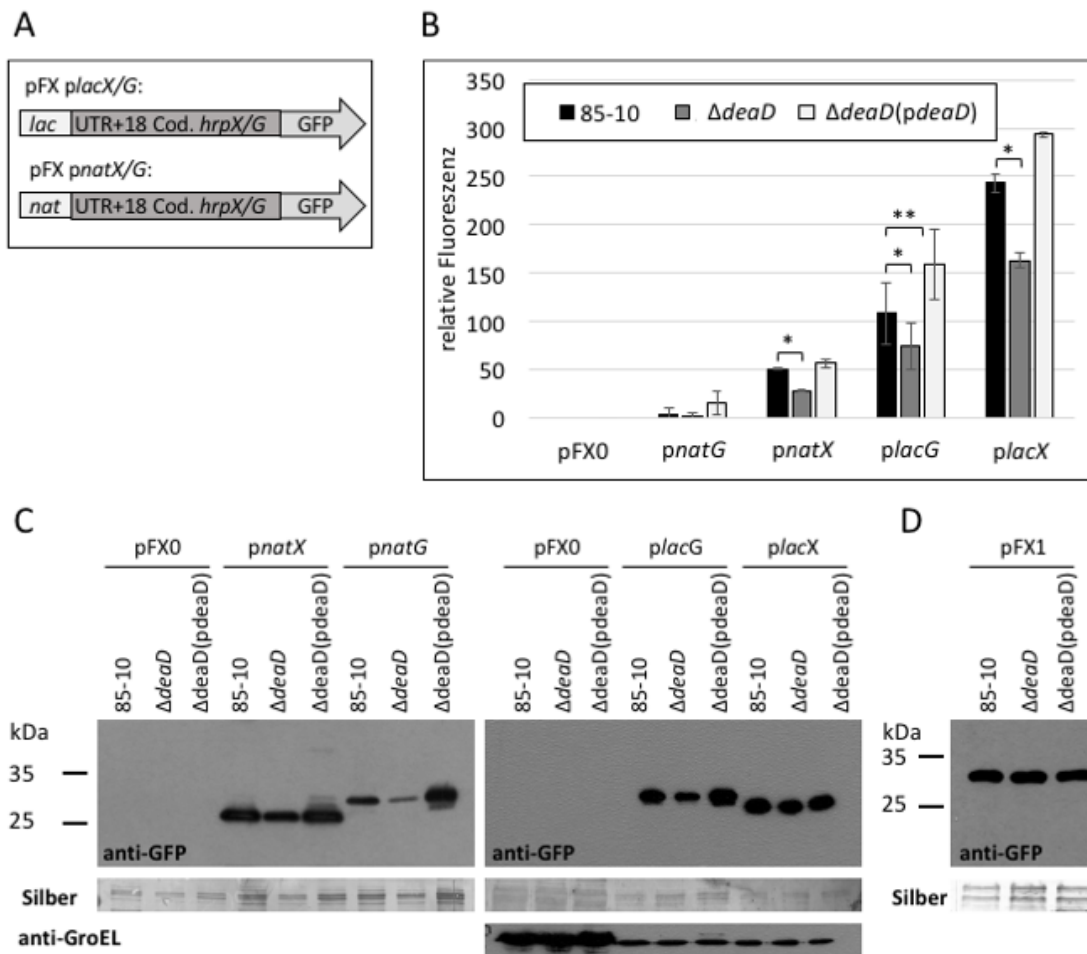


**Abbildung 21: Die Deletion von *deaD* vermindert die Abundanz der Transkripte essenzieller Virulenzfaktoren.** Die  $Xcv$  Stämme 85-10,  $\Delta deaD$  (je mit Kontrollvektor pBRM-P+T),  $\Delta deaD(pdeaD)$  und 85-10(*pdeaD*) wurden bei 16°C in XVM2 angezogen, die gesamt-RNA isoliert und cDNA synthetisiert. Dargestellt sind Transkriptlevel von *groEL*, *hrpG*, *hrpX*, *hrcC* und *hrcJ*. Die obigen Daten zeigen das Mittel von drei biologischen Replikaten. Signifikante Änderungen der Transkriptlevel sind mit \* markiert, wobei  $0,05 \geq p > 0,01$  mit \* gekennzeichnet ist,  $0,01 \geq p > 0,001$  mit \*\* und  $p \leq 0,001$  mit \*\*\*.

### 3.2.8 DeaD beeinflusst essenzielle Pathogenitätsfaktoren von $Xcv$ auch auf Proteinebene

Da sowohl *hrpG* als auch *hrpX* Transkriptmengen von DeaD beeinflusst werden, könnten auch die Proteinlevel beider Regulatoren vermindert sein. Da bereits gezeigt wurde, dass DeaD einen direkten Einfluss auf die Translation von Zielgenen hat (Lu et al., 1999, Intile et al., 2015) sollte getestet werden, ob dies auch in  $Xcv$  der Fall ist. Im Folgenden wurde getestet, ob eine Reduktion des Proteinlevels auf der Reduktion von Transkripten beruht, oder ob DeaD zusätzlich einen positiven posttranskriptionellen Einfluss ausübt. Hierfür wurde ein GFP-Reportersystem verwendet, in dem die 5'UTR der zu testenden mRNA inklusive 18 Codons des kodierenden Bereichs an *gfp* fusioniert wurde (Abbildung 22 A). Es wurden zum einen der

native Promotor (Bezeichnung der Konstrukte: *pnat*) des jeweiligen Gens verwendet, und zum anderen der *lac*-Promotor (Bezeichnung der Konstrukte: *plac*). Der in *Xcv* konstitutiv aktive *lac*-Promotor wurde verwendet, da man hier davon ausgeht, dass *hrpX* unabhängig von HrpG exprimiert wird. Ist eine Verminderung im Proteinlevel von HrpX nachweisbar, während die Transkription durch den *lac*-Promotor gesteuert wird, beruht diese Regulation auf dem direkten Einfluss von DeaD auf HrpX, und nicht auf dem indirekten Einfluss von HrpG auf die Expression von *hrpX*. Abbildung 22 **B** zeigt die Fluoreszenzmessung der Reporterkonstrukte in den *Xcv* Stämmen 85-10 (mit Kontrollvektor pBRM-P+T),  $\Delta deaD$  und  $\Delta deaD(pdeaD)$ . Zusätzlich wurde die Hintergrundfluoreszenz der gleichen Stämme mit pFX0 (pFX-Derivat mit *gfp* ohne Promotor) gemessen. Diese war in allen Experimenten an der Nachweisgrenze. Für *placX*, *placG* und *pnatX* wurde eine signifikante Verminderung der Proteinlevel in  $\Delta deaD$  beobachtet. Diese Effekte konnten durch ektoische Expression von *deaD* komplementiert werden. Für *pnatG* konnte auf Grund der Fluoreszenzmessung keine Aussage getroffen werden, da die Messwerte nur knapp über dem Hintergrund lagen. Daher wurde zusätzlich das Totalextrakt mittels SDS-PAGE und anschließendem Western Blot untersucht (Abbildung 22 **C**). Auch hier wurden die verminderten GFP-Level in *placX*, *placG* und *pnatX* bestätigt und auch für *pnatG* eine Verminderung der Proteinlevel beobachtet. Als Mengenkontrolle wurde eine Silberfärbung der Membran durchgeführt, bzw. *groEL* im Western Blot detektiert. Um auszuschließen, dass DeaD einen Einfluss auf den *lac*-Promotor oder die GFP-Synthese hat, bzw. einen generellen Einfluss auf die Translation, wurde außerdem die GFP-Synthese in den *Xcv* Stämmen 85-10,  $\Delta deaD$  und  $\Delta deaD(pdeaD)$  mit pFX1 überprüft (Abbildung 22 **D**). In pFX1 wird die Transkription von *gfp* durch den *lac*-Promotor reguliert. Die Detektion von GFP im Western Blot zeigte, dass kein Einfluss auf die GFP-Synthese durch die Deletion von *deaD* vorhanden war (Abbildung 22 **D**).

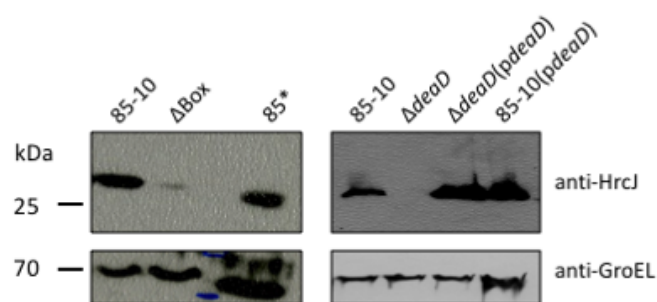


**Abbildung 22: Die Deletion von *deaD* vermindert die Abundanz von HrpX und HrpG auf Proteinebene.** **A)** Schematische Darstellung der verwendeten Konstrukte **B)** Gezeigt ist die relative Fluoreszenz (normalisiert auf  $OD_{600\text{ nm}}$ ) von den *Xcv* Stämmen: 85-10,  $\Delta deaD$  und  $\Delta deaD(pdeaD)$ , mit den GFP-Reporterkonstrukten *pnatG/pnatX* (GFP-Fusion jeweils mit natürlichem Promotor), *placG/placX* (GFP-Fusion mit *lac*-Promotor). Als Kontrolle für Hintergrundfluoreszenz dienten die gleichen Stämme mit pFX0. Zusätzlich zu den GFP-Reporterkonstrukten enthielten *Xcv* 85-10 und *Xcv*  $\Delta deaD$  das Kontrollplasmid pBRM-P+T. Die gezeigten Daten repräsentieren das Mittel aus 3 unabhängigen Experimenten. Signifikante Änderungen im Proteinlevel sind mit \* gekennzeichnet, wobei  $0,05 \geq p > 0,01$  mit \* gekennzeichnet ist und  $0,01 \geq p > 0,001$  mit \*\* **C)** Western Blot zur Detektion von GFP-Fusionskonstrukten mittels anti-GFP (anti-Maus). Geladen wurden die Totalextrakte von den *Xcv* Stämmen 85-10 mit Kontrollplasmid (pBRM-P+T),  $\Delta deaD$  mit Kontrollplasmid (pBRM-P+T) und  $\Delta deaD(pdeaD)$  jeweils mit pFX0 (Hintergrundkontrolle), *pnatX*, *pnatG*, *placX* und *placG*. Links: Geladen wurden je 20  $\mu\text{l}$  des Totalextrakts mit einer  $OD_{600\text{ nm}}$  von 0,5. Als Mengenkontrolle diente eine Silberfärbung der Membran. Rechts: Geladen wurden 20  $\mu\text{l}$  des Totalextrakts mit einer  $OD$  von 0,5 von allen pFX0-enthaltenden Stämmen und 10  $\mu\text{l}$  von allen *placG*- und *placX*-

enthaltenden Stämmen. Als Mengenkontrolle wurde eine Silberfärbung der Membran bzw. eine Western-Blot-Detektion von GroEL durchgeführt. Gezeigt ist je ein repräsentatives Experiment von insgesamt dreien. **D)** Geladen wurden 5 µl des Totalextrakts von den *Xcv* Stämmen 85-10 mit Kontrollplasmid (pBRM-P+T),  $\Delta deaD$  mit Kontrollplasmid (pBRM-P+T) und  $\Delta deaD pdeaD$  jeweils mit pFX1, zur Expression von GFP unter Kontrolle des *lac*-Promotors. Gezeigt ist je ein repräsentatives Experiment von insgesamt dreien.

### 3.2.9 DeaD beeinträchtigt die Synthese von HrpG/X regulierten Proteinen

In Abschnitt 3.2.7 wurde gezeigt, dass nicht nur die Transkriptlevel von HrpG und HrpX durch die Deletion von *deaD* negativ beeinflusst werden, sondern auch Gene, deren Transkription durch HrpG und HrpX aktiviert werden (*hrcC* und *hrcJ*). Eine verminderte Proteinsynthese von durch HrpG und HrpX regulierten Genen wäre daher ebenfalls zu erwarten und sollte anhand des Beispiels von HrcJ untersucht werden. Es wurde ein Western Blot durchgeführt, um die HrcJ-Level in den *Xcv* Stämmen 85-10,  $\Delta deaD$ ,  $\Delta deaD(pdeaD)$  und 85-10(*pdeaD*) und  $\Delta$ Box zu bestimmen. Als Positivkontrolle diente Totalextrakt von 85\*. Alle Kulturen wurden für 24 Stunden bei 16°C in XVM2 angezogen und Proteine im Western Blot mittels HrcJ spezifischem Antikörper detektiert. Sowohl in *Xcv*  $\Delta$ Box als auch in *Xcv*  $\Delta deaD$  ist eine drastische Verminderung der Proteinlevel von HrcJ zu erkennen (Abbildung 23). Nach sehr langen Belichtungszeiten des Films waren in beiden Fällen schwache Signale für HrcJ detektierbar (Daten nicht gezeigt). Als Mengenkontrolle diente GroEL.



**Abbildung 23: Die Mutation von *deaD* hat einen negativen Effekt auf HrpX-regulierte Gene.**

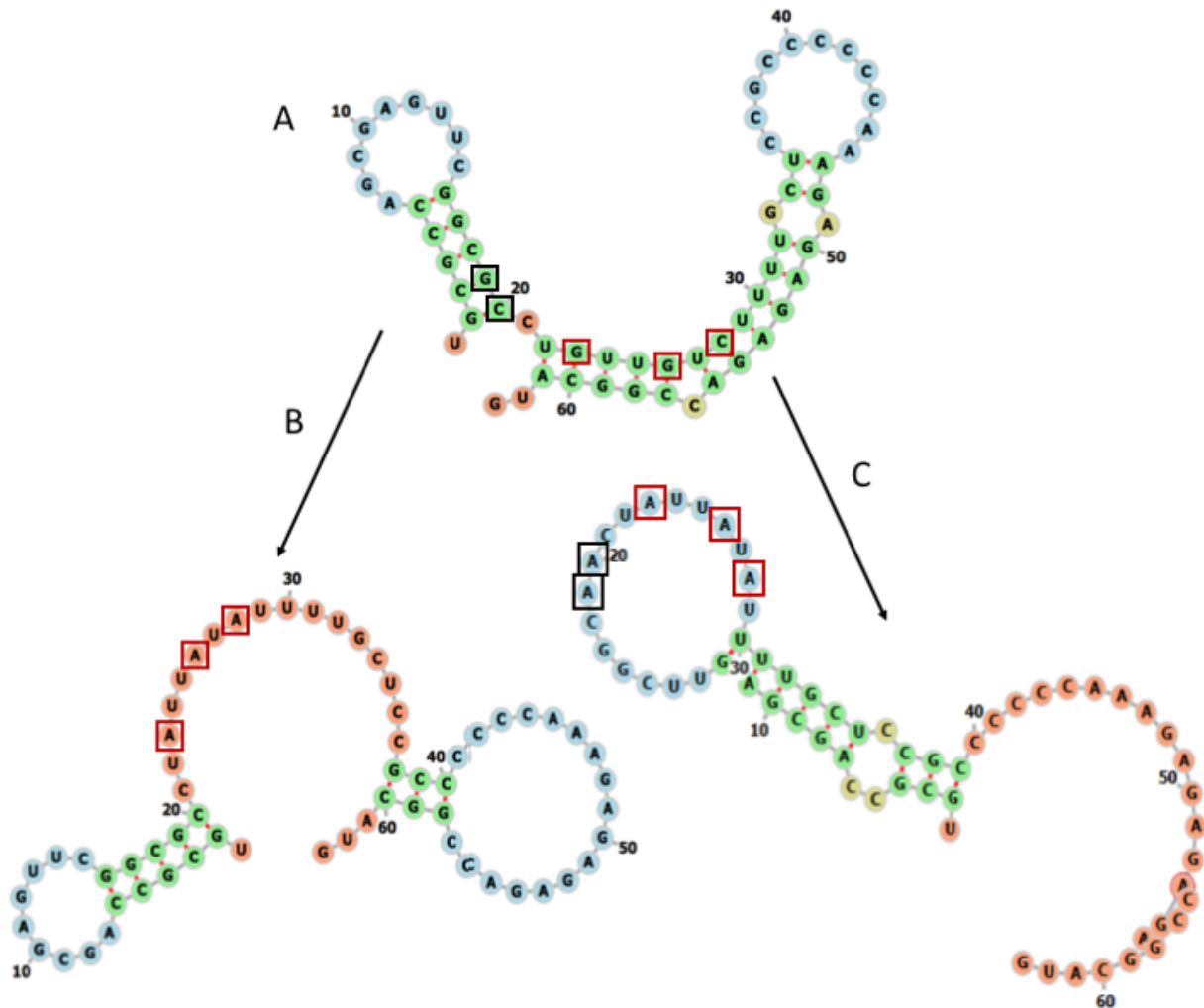
Links: Western-Blot-Detektion von HrcJ in den *Xcv* Stämmen 85-10 im Vergleich zu  $\Delta$ Box und 85\* (Positivkontrolle) Rechts: Western-Blot-Detektion von HrcJ in den *Xcv* Stämmen 85-10 im Vergleich zu  $\Delta deaD$ ,  $\Delta deaD(pdeaD)$  und 85-10(*pdeaD*). Als Mengenkontrolle wurde eine Detektion von GroEL durchgeführt. Die obige Abbildung repräsentiert drei unabhängig durchgeführte Experimente mit vergleichbaren Ergebnissen.



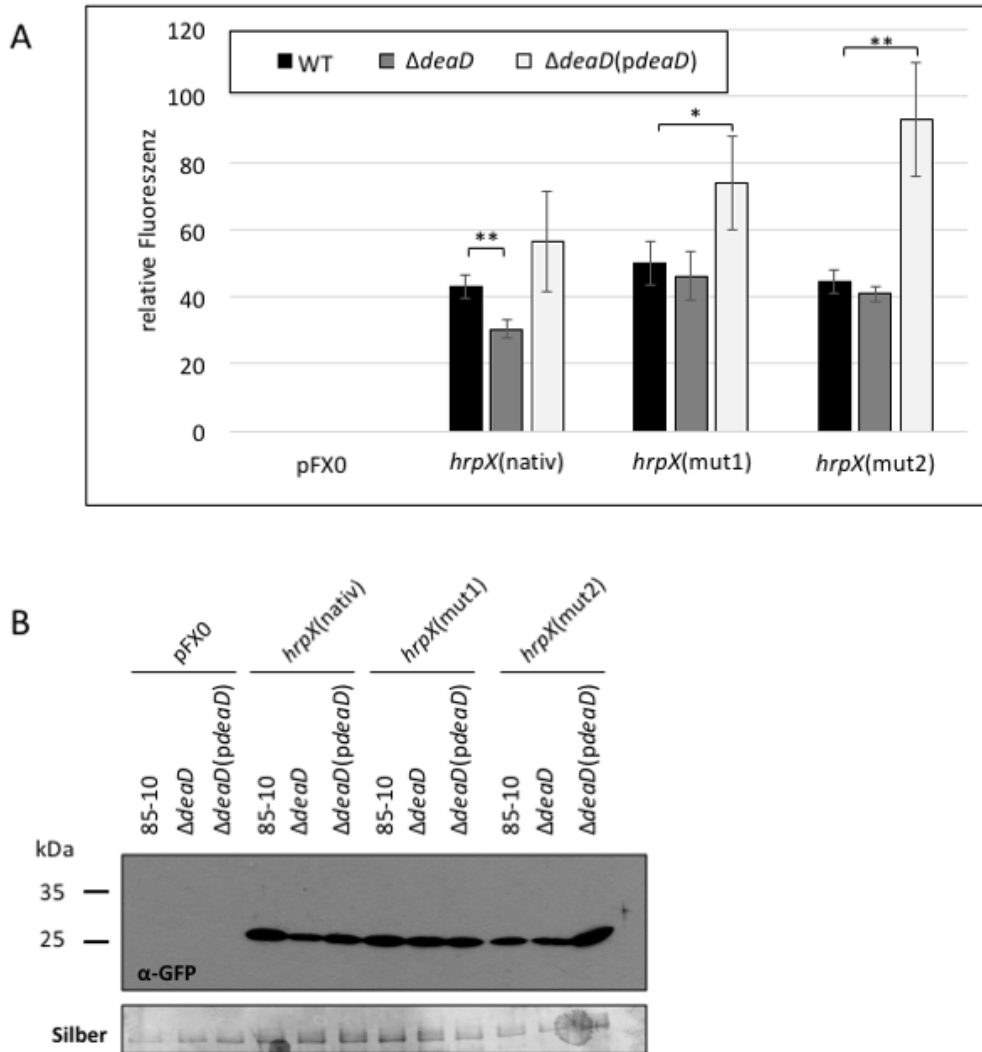
### 3.2.10 Die Mutation der 5'UTR von *hrpX* führt zu DeaD-unabhängiger Proteinsynthese von HrpX

Ein Einfluss von DeaD auf die Translation bestimmter Gene *in vivo* wurde bereits gezeigt (Intile et al., 2015, Lu et al., 1999). Ein erster Hinweis, dass dies auch in *Xcv* 85-10 der Fall ist, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit dadurch erbracht, dass die Transkription von *hrpX* unter Kontrolle des *Lac*-Promotors von der regulatorischen Ebene durch HrpG entkoppelt wurde (vergl. 3.2.8) und ein regulatorischer Einfluss von DeaD auf *hrpX* trotzdem nachweisbar war. Vakulskas und Mitarbeiter (Vakulskas et al., 2014) vermuteten, dass DeaD in *E. coli* die Translation von Genen reguliert, indem es die 5'UTR von mRNAs entwindet und so besser zugänglich für die Bindung von Ribosomen macht. Trifft diese Hypothese auch für *hrpX* zu, sollte die Translationseffizienz unabhängig von DeaD werden, wenn man eine 5'UTR konstruiert, in der die Ribosomenbindestelle unstrukturiert, also frei zugänglich, vorliegt. Um dies zu untersuchen, wurden zwei *hrpX*-Mutanten erstellt, in denen Punktmutationen in der 5'UTR von *hrpX* dazu führen, dass die mutmaßliche Ribosomenbindestelle laut Vorhersagen unstrukturiert vorliegt, bzw. in einer sich leicht zu lösenden Sekundärstruktur (siehe Abbildung 24). Anschließend wurde die Translationseffizienz von *hrpX* mit nativer 5'UTR (*hrpX*(nativ)) und mit den zwei mutierten Varianten (*hrpX*(mut1) und *hrpX*(mut2)), mit Hilfe des bereits in 3.2.8 beschriebenen GFP-Reportersystem untersucht. Abbildung 25 A bestätigt die bereits nachgewiesene Reduktion von HrpX auf Proteinebene mittels GFP-Fluoreszenzmessung in *Xcv*  $\Delta$ *deaD* im Vergleich zu *Xcv* 85-10, wenn die native 5'UTR an *gfp* fusioniert wird. Fügt man die oben beschriebenen Punktmutationen ein, hebt sich diese Regulation vollständig auf. Es gibt keinen Unterschied mehr in der Proteinmenge von HrpX in der Mutante im Vergleich zum Wildtyp. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass DeaD durch die Auflösung von Sekundärstrukturen regulatorisch wirkt. In den Stämmen, in denen *deaD* ektopisch exprimiert wurde, waren die Proteinmengen von HrpX in der Regel höher als im Vergleichsstamm ohne ektopische Expression von *deaD*. Auch im Fall von *hrpX*(mut1) und *hrpX*(mut2) waren die Proteinmengen signifikant höher, wenn *deaD* ektopisch exprimiert wurde. Dies spricht dafür, dass eine Überexpression von DeaD trotz mutierter UTR einen positiven Effekt auf die Translation hat. Abbildung 25 B zeigt die Proteinproben der Stämme, welche für die Fluoreszenzmessung in Abbildung 25 A verwendet wurden in einer Western Blot-Detektion von GFP. Der Western Blot bestätigt die in A gezeigten regulatorischen Effekte. Die Hochregulation der Proteinmengen durch Überexpression von DeaD war lediglich bei *Xcv*

85-10 *hrpX*(mut2) auffällig. Als Mengenkontrolle wurde eine Silberfärbung der Membran durchgeführt.



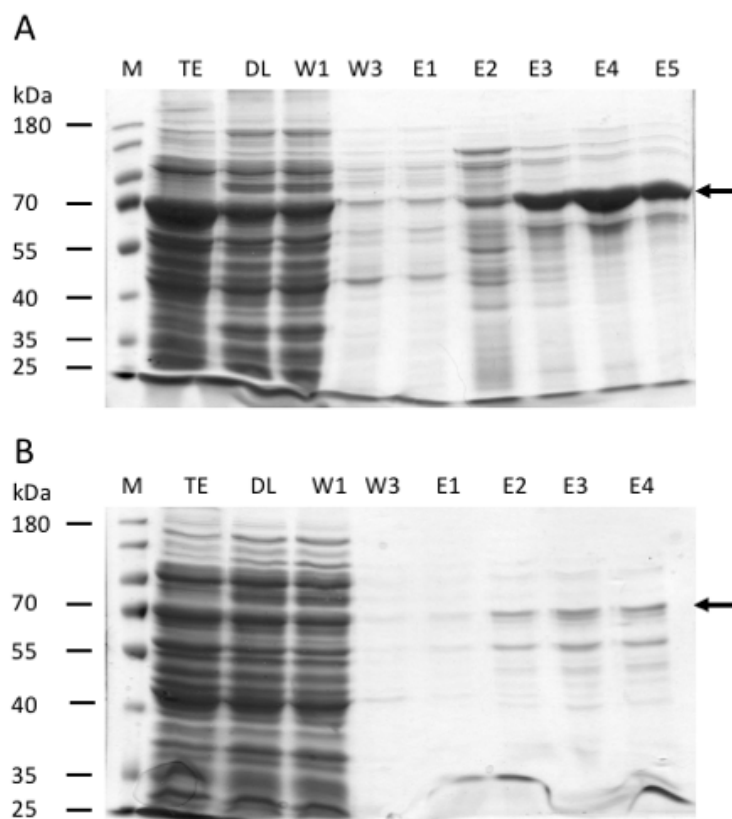
**Abbildung 24: Punktmutationen in der 5'-UTR von *hrpX* lösen die Loop-Strukturen auf.** Sekundärstrukturvorhersage (nach RNAfold) der 5'-UTR vom Transkriptionsstart bis zum Translationsstart (inklusive Start-Codon). In grün und blau sind Haarnadel-Strukturen dargestellt. Gelbe Nucleotide bilden kleine ungepaarte Regionen innerhalb einer solchen Struktur. In orange werden alle ungepaarten Nucleotide dargestellt, welche sich am 3'- oder 5'-Ende befinden, oder zwei Haarnadelstrukturen verbinden. In **A** ist die Vorhersage für die native 5'-UTR von *hrpX* gezeigt. In **B** und **C** mutierte Nucleotide sind eingerahmt. **B** und **C** zeigen die Konsequenzen für die Sekundärstruktur nach Mutation von drei ( $G \rightarrow A$ ,  $G \rightarrow A$ ,  $C \rightarrow A$ , **B**: *hrpX*(mut1)) bzw. fünf Nucleotiden (zusätzlich zu *hrpX*(mut1)  $G \rightarrow A$ ,  $C \rightarrow A$  zu **C**: *hrpX*(mut2)).



**Abbildung 25: Die Mutation der 5'-UTR von *hrpX* hebt die Regulation durch DeaD auf. A)** Relative GFP-Fluoreszenz von den *Xcv* Stämmen 85-10,  $\Delta deaD$  und  $\Delta deaD(pdeaD)$  mit verschiedenen HrpX-Reporterkonstrukten. *Xcv* 85-10 und *Xcv*  $\Delta deaD$  besitzen zusätzlich den Kontrollvektor (pBRM-P+T). Gemessen wurde die Fluoreszenz der GFP-Fusion von HrpX mit nativer 5'UTR (*hrpX(nat)*), HrpX mit Mutationen in Loop 2 (*hrpX(mut1)*) und Mutationen in Loop 1 und Loop 2 (*hrpX(mut2)*) in drei unabhängigen Experimenten, mit je drei biologischen Replikaten. Als Hintergrund-Kontrolle wurde die Fluoreszenz von allen Stämmen mit pFX0 gemessen. Signifikante Änderungen der Transkriptlevel sind mit \* markiert, wobei  $0,05 \geq p > 0,01$  mit \* gekennzeichnet ist und  $0,01 \geq p > 0,001$  mit \*\*. **B)** Western Blot-Detektion der HrpX-GFP-Reporterkonstrukte (von **A**) mittels GFP-Antikörper. Zur Mengenkontrolle wurde die Membran silbergefärbt.

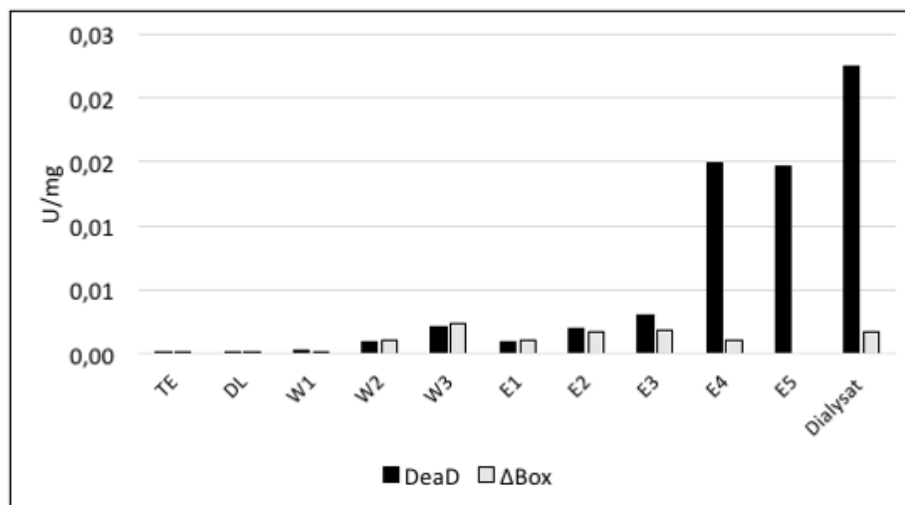
### 3.2.11 DeaD stimuliert die Translation von HrpX auch *in vitro*

Verschiedene Ergebnisse wiesen bereits darauf hin, dass DeaD die Translation von HrpX positiv beeinflusst (3.2.9; 3.2.10). Daher wurde zusätzlich ein Translationsassay durchgeführt. Dazu wurde sowohl die Wildtyp DEAD-Box-Helikase als auch die inaktive Proteinvariante  $\Delta$ Box mittels Affinitätschromatografie aus *E. coli* Extrakten gereinigt. Verwendet wurden His-markierte Proteinvarianten, welche an einer Nickel-NTA-Säule immobilisiert, und mittels Imidazol eluiert wurden. Im Verlauf der Reinigung wurde die spezifische Aktivität beider Proteinvarianten bestimmt, verglichen und beide gereinigten Proteine für eine *in vitro* Translation von HrpX und einem Referenzprotein (Gfo) eingesetzt.



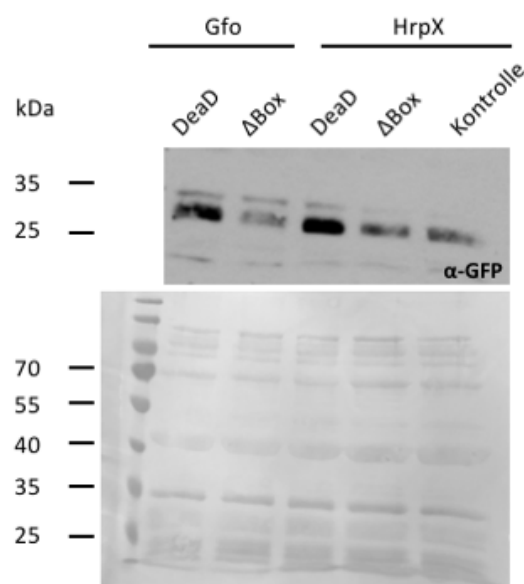
**Abbildung 26: Coomassie-gefärbtes SDS-Gel von Proben der Proteinreinigung von DeaD und  $\Delta$ Box im Vergleich. A) Reinigungsverlauf von DeaD. B) Reinigungsverlauf von  $\Delta$ Box.** *E. coli* Stämme, welche das Protein von Interesse exprimierten wurden bei 30°C angezogen. Die Proteinreinigung erfolgte mittels Nickel-Affinitätschromatografie. Auf die oben gezeigten Gele aufgetragen wurden Proteinproben vom Totalextrakt (TE) von *E. coli* (exprimiert DeaD bzw.  $\Delta$ Box), vom Durchlauf (DL), nach Bindung des Proteins von Interesse an die Matrix, von Waschschritten (W1 und W3) und von den verschiedenen Elutionsfraktionen (E1-E5). Geladen wurden jeweils 20  $\mu$ l der entsprechenden Proben. Die Pfeile markieren jeweils das Protein von Interesse. Die Reinigung wurde dreimal mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt.

Außerdem wurden Proben für eine SDS-PAGE genommen, um den Verlauf der Reinigung zu dokumentieren (Abbildung 26). Für DeaD war eine deutliche Anreicherung in den Elutionsfraktionen erreichbar. Die Anreicherung der inaktiven Variante  $\Delta$ Box gelang weniger gut. Die Elutionsfraktionen beider Proteinvarianten enthielten Verunreinigungen, wurden dennoch für weitere Experimente verwendet. Von DeaD wurden die Elutionsfraktionen E4 und E5 vereinigt und im Folgenden verwendet, von  $\Delta$ Box wurden die Elutionsfraktionen E3 und E4 verwendet. Zur Beurteilung der Effektivität der Reinigung und zur Einschätzung der Aktivität des gereinigten Proteins, wurde nach Dialyse eine ATPase-Assay durchgeführt, in dem die ATPase-Aktivität der gereinigten Proteine bestimmt wurde. Hierfür wurde die Menge an freiem Phosphat nach Zugabe von ATP und die spezifische Aktivität (bezogen auf die Proteinmenge) bestimmt. Abbildung 27 zeigt die spezifische Aktivität von DeaD und  $\Delta$ Box während, und nach der Reinigung. Zu sehen ist, dass die spezifische Aktivität von DeaD während des Reinigungsprozesses steigt, während die spezifische Aktivität von der katalytisch inaktiven Proteinvariante,  $\Delta$ Box, auf einem basalen Level bleibt. Dieses Ergebnis spricht für eine erfolgreiche Anreicherung von aktivem DeaD.



**Abbildung 27: Die spezifische Aktivität von DeaD steigt im Verlauf der Reinigung, während die spezifische Aktivität von  $\Delta$ Box auf einem basalen Level bleibt.** Die Bestimmung der spezifischen Aktivität erfolgte nach Inkubation der gereinigten Proteine mit ATP, bei 20°C. Bestimmt wurde die Entstehung von freiem Phosphat und diese wurde dann auf die vorhandene Proteinmenge in der Probe normalisiert. Die obige Abbildung repräsentiert eines von drei Experimenten mit vergleichbaren Ergebnissen.

Um zu prüfen, ob DeaD die Translation von HrpX fördert, wurde im Anschluss an die Reinigung und dem erfolgreichen Nachweis der ATPase Aktivität von DeaD ein *in vitro* Translationsassay durchgeführt. Hierfür wurde die Translation von *hrpX* (5'UTR und 18 Codons) und *gfo* (5'UTR und 18 Codons) fusioniert an *gfp* untersucht. *gfo* (Glukose-Fruktose-Oxidoreduktase) wurde als Kontrolle ausgewählt, da die verwendete Translationsmaschinerie aus *E. coli* stammt, und *gfo*, anders als die meisten *Xcv* Transkripte, eine Shine-Dalgarno-ähnliche Sequenz besitzt. Diese Sequenz ist in *E. coli* für eine effiziente Translation notwendig, *hrpX* hingegen besitzt keine perfekte Shine-Dalgarno-Sequenz. Abbildung 28 zeigt die Western Blot Detektion der *in vitro* translatierten Reporterkonstrukte. Verglichen wurde jeweils die Translationseffizienz von *gfo* und *hrpX* nach Zugabe von DeaD und  $\Delta$ Box in gleichen Mengen. Zusätzlich wurde die Translation von *hrpX* nach Pufferzugabe, ohne gereinigtes Protein überprüft, um auszuschließen, dass die Zugabe des Puffers einen positiven, oder negativen, Einfluss auf die Translation hat. Die Ladekontrolle erfolgte mittels Ponceau-Färbung (Abbildung 28, unten).



**Abbildung 28: Aktives DeaD führt zu effizienterer Translation von Gfo und HrpX.** Oben: Western-Blot-Detektion von GFP-Reporterkonstrukten. Die 5'UTR von *gfo* und *hrpX*, sowie jeweils 18 Codons wurden an *gfp* fusioniert und die Translationseffizienz nach *in vitro* Translation überprüft. Geladen wurden jeweils 20  $\mu$ l (gesamter Translationsansatz) von Gfo (1,2) und HrpX (3,4) nach Zugabe von aktivem DeaD (1,3) und  $\Delta$ Box (2,4). Als Kontrolle wurde außerdem ein Ansatz geladen, in dem lediglich Puffer zugesetzt wurde (5). Als Mengenkontrolle diente eine Ponceau-Färbung der Membran (Unten). Das gezeigte Ergebnis wurde in zwei unabhängigen Experimenten bestätigt.

Eine Translation von HrpX und Gfo konnte nachgewiesen werden (Abbildung 28), nicht aber von HrpG (Daten nicht gezeigt). Ein Rückschluss von DeaD auf die Translation von HrpG konnte daher nicht gezogen werden. Die Immunodetektion von GFP zeigte eine verstärkte Translation von Gfo und HrpX, jeweils nach Zugabe von DeaD im Vergleich zu  $\Delta$ Box (Vergleiche Abbildung 28, Spur 1 und 2, und Spur 3 und 4). Nach Zugabe von Puffer, ohne gereinigtes Protein, waren die Mengen von translatiertem HrpX vergleichbar mit den Mengen, die nach Zugabe von  $\Delta$ Box entstanden (Vergleiche Abbildung 28, Spur 4 und 5).

## 4 Diskussion

### 4.1 Das Potential der neuen sRNAs aus *Xcv*

#### 4.1.1 Neu identifizierte sRNAs haben zum Teil proteinkodierende Kapazität

Die Identifikation von neuen sRNAs erfolgt in der Regel auf der Basis von RNA-*seq*-Daten, die auf kleine Transkripte hin untersucht werden, die zu keinem bekannten proteinkodierenden Bereich gehören (Schmidtke et al., 2012, Liang et al., 2011, Sharma and Vogel, 2009). Im Anschluss werden die so ausgewählten Kandidaten mittels Northern Blot validiert (Ghosh et al., 2017, Schroeder et al., 2016). Ob diese Transkripte *in vivo* zu einem kleinen Protein translatiert werden, wurde nicht untersucht. Einige Studien zeigen, dass einige sRNAs auch translatiert werden und eine duale Funktion, auf RNA und auf Proteinlevel haben können (Wadler and Vanderpool, 2007, Waters et al., 2011, Vanderpool and Gottesman, 2007). Um einen Eindruck über die theoretische Proteinkodierungskapazität zu bekommen, wurde für alle in dieser Arbeit identifizierten sRNAs eine *in silico open-reading-frame* Vorhersage durchgeführt. Dabei wurde ersichtlich, dass sich in fast allen sRNAs bioinformatisch *open-reading-frames* nachweisen lassen, die in der Regel deutlich kürzer waren als das Transkript zulassen würde. Ausnahmen hiervon waren sX21, sX24 und sX25. Bei sX21 befinden sich 102 der 108 transkribierten Nukleotide in einem möglichen *open-reading-frame*, bei sX24 sind es 83 von 95 Nukleotiden und sX25 bildet vom ersten bis zum vorletzten Nukleotid einen einzigen möglichen *open-reading-frame*. Die Möglichkeit, dass hier eine Übersetzung in ein kleines Protein erfolgt, ist also gegeben und könnte in Zukunft untersucht werden.

#### 4.1.2 Das Detektionslimit ist entscheidend für die Identifikation neuer sRNAs

Im Zusammenhang mit der Identifikation der neuen sRNAs in *Xcv* fällt weiterhin auf, dass die Detektierbarkeit der sRNAs im Northern Blot vergleichsweise schlecht war. In vorherigen Studien konnten sRNAs ohne Probleme im Northern Blot detektiert werden (Schmidtke et al. (2012)). Dieser Unterschied war zunächst unerwartet, lässt sich jedoch durch die maßgebliche Verbesserung der Sequenziertiefe in den letzten Jahren erklären. Die verbesserte Sequenziertiefe ermöglicht nunmehr auch die Detektion niedrig abundanter Transkripte, welche sich aber mit klassischen molekularbiologischen Methoden schwerer nachweisen lassen. Deutlich wird dies auch in der vorliegenden Arbeit. Von 80 getesteten Kandidaten zeigten lediglich 19 Kandidaten ein Signal im Northern Blot. Für einen Großteil (61 Kandidaten)



war kein Transkript im Northern Blot nachweisbar. Eine alternative Möglichkeit zur Detektion von sRNA Transkripten bietet die wesentlich sensitivere RT-PCR (Dean et al., 2002). Ihr Nachteil ist, dass sie keine Rückschlüsse auf die Größe des ursprünglichen Transkripts zulässt, was für die Validierung neuer kleiner RNAs aber essenziell ist. Eine zusätzliche Bestätigung der Transkriptgröße (beispielsweise über RACE-PCR (*rapid amplification of cDNA-ends with polymerase chain reaction*)) wäre dann erforderlich.

Geht man von besser untersuchten Modellorganismen wie bspw. *E. coli* (80-100 bestätigte sRNAs) (Raghavan et al., 2011, Gottesman and Storz, 2011) oder *Salmonella* spp. (mehr als 60 bestätigte sRNAs) (Sittka et al., 2008) aus, wird deutlich, dass auch *Xcv* Potential für das Auffinden von weiteren sRNAs besitzt; geeignete Ansätze hierfür müssen gefunden werden.

#### **4.1.3 Die Sequenzierdaten und die Northern-Blot-Ergebnisse zeigten weitestgehend Übereinstimmungen**

Zur Bestätigung der sRNAs, die im Northern Blot detektiert wurden, wurden die Sequenzierdaten mit den Northern-Blot-Ergebnissen verglichen. Dabei war eine Übereinstimmung der Größe der sequenzierten Transkripte und der im Northern Blot detektierten Transkripte zu erwarten. Dies konnte für fast alle sRNA-Transkripte bestätigt werden. Eine Ausnahme bildet sX29, bei der die Sequenzierdaten und das im Northern Blot detektierte Signal einen Unterschied von etwa 40 Nukleotide aufwiesen. Mögliche Erklärungen dafür sind eine Kreuzreaktion der Sonde mit einem Transkript einer ähnlichen Sequenz, oder eine ungenaue Transkriptlängen-Bestimmung der Sequenzierdaten, auf Grund Transkript-Instabilität.

## **4.2 Die Untersuchung von bereits publizierten sRNAs aus *Xcv* ergab nur wenige neue Erkenntnisse**

### **4.2.1 Modifikation des Expressionsvektors zur Expression von sRNAs**

Für die Funktionalität von sRNAs ist die Sekundärstruktur der RNA häufig von Bedeutung (Schmidtke et al., 2013, Brantl, 2007). Da fehlende oder zusätzliche Nukleotide die Struktur maßgeblich beeinflussen können, ist eine korrekte Faltung der RNA nur sichergestellt, wenn die sRNA, in der nativ vorkommenden Länge hergestellt wird. Bei jeder in dieser Arbeit exprimierten sRNAs aus *Xcv* 85-10 wurde daher durch einen Vergleich mit der nativ

exprimierten sRNA überprüft, ob ektopisch exprimierte sRNAs der korrekten Länge entstehen. Dabei wurde festgestellt, dass die bisher verwendeten Konstrukte sich nicht für eine Expression von sRNAs eignen, da Transkripte in teilweise stark abweichender Größe entstehen, die darüber hinaus zum Teil abundanter sind, als die native sRNA (Abbildung 7). Eine Abweichung in der Länge des Transkripts muss nicht zwangsläufig zu einer Fehlfaltung oder einer nicht-funktionalen sRNA führen. In vorherigen Studien mit sRNA-Deletionsmutanten konnten phänotypische Abweichungen der Mutante vom Wildtyp durch ektopische Expression von zu langen sRNAs komplementiert werden (Schmidtke et al., 2013, Schmidtke et al., 2012). Jedoch ist zur Sicherstellung einer korrekten Faltung die Expression von Transkripten der richtigen Länge ratsam. Um diesem Ziel gerecht zu werden, wurde das Plasmid pBRM-P+T entwickelt und in allen weiteren Experimenten verwendet. Die Funktion von pBRM-P+T, nämlich die Expression von ausschließlich Transkripten mit korrekter Größe, konnte für die bekannte sRNA sX11 (Schmidtke et al., 2012) gezeigt werden (Abbildung 7). In allen Experimenten, in denen funktionale sRNAs exprimiert werden sollten, wurde daher der in dieser Arbeit erstellte Vektor pBRM-P+T verwendet. Für sX11 wurde publiziert, dass die sRNA in zwei stabilen Varianten vorkommt (Schmidtke et al., 2012). Diese Annahme erfolgte auf Grund von Sequenzierdaten und der Detektion von zwei stabilen Transkripten im Northern Blot, welche mit einer für sX11 spezifischen Sonde detektiert wurden. In dieser Arbeit konnte durch die Detektion zweier Signale im Northern Blot, welche in *Xcv ΔsX11* abwesend sind, unabhängig bestätigt werden, dass sX11 in zwei stabilen Varianten vorkommt (Abbildung 7).

#### **4.2.2 sRNA Mutanten verhalten sich wie der Wildtyp**

Zur Charakterisierung der Funktion von Genen werden in der Regel Mutationen in das betreffende Gen ins Genom integriert und geprüft, ob die entsprechenden Mutanten eine Abweichung vom Wildtyp zeigen. Im Falle der Charakterisierung von sRNAs eignet sich besonders die Erstellung von Deletionsmutanten, da häufig keine funktionellen Motive bekannt sind, die zur Mutation geeignet sind. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit sRNA-Deletionsmutanten erstellt. Die getesteten Mutanten verhielten sich in allen untersuchten Merkmalen (Virulenz/Wachstum) ausnahmslos wie der Wildtyp (Abbildung 8). Dieses Ergebnis ist wenig überraschend, da bisher kaum Studien bekannt sind, in denen die Deletion einer sRNA zu einem makroskopischen Effekt führt (Liang et al., 2011, Papenfort and Vogel, 2010). Es wird angenommen, dass sRNAs in der Regel für die Feinregulation von Genen

verantwortlich sind (Lenz et al., 2004). Ein Verlust auf der Ebene einer solchen Feinregulation führt zu weniger drastischen Effekten, die oft nur auf molekularbiologischer Ebene (bspw. auf Transkriptebene von Ziel-mRNAs) nachweisbar sind (Papenfort et al., 2008, Guillier and Gottesman, 2006). Es gibt bisher nur wenige Ausnahmen, in denen die Deletion einer sRNA zu einem makroskopischer Effekt führte (Schmidtke et al., 2013, Jaschinski et al., 2014). Da nach Quellenlage (Bak et al., 2015, De Lay and Gottesman, 2012) davon auszugehen war, dass die Überexpression von sRNAs zu deutlicheren Phänotypen führen können als deren Deletion, wurden in dieser Arbeit zusätzlich zu den erstellten sRNA Deletionsmutanten auch sRNAs überexprimiert. Hierdurch konnte jedoch ebenfalls kein nachweisbarer Effekt erzielt werden (Abbildung 8).

#### **4.2.3 Die Überexpression von sX4 war nicht nachweisbar**

Zur Bestätigung der Überexpression der ausgewählten sRNAs wurden entsprechende Northern Blots durchgeführt. Für sX4 konnte kein eindeutiges Ergebnis erzielt werden (Abbildung 9). Mittels Northern Blot und unter Verwendung einer Sonde, welche sX4 bindet, wurden mehrere Signale, unterschiedlicher Größe nachgewiesen. Dies war auch schon in vorherigen Studien der Fall (Schmidtke et al., 2012). In der vorliegenden Arbeit waren die Signale, die mit der sX4-spezifischen Sonde detektiert wurden in der Deletionsmutante, dem Wildtyp und dem Überexpressions-Stamm jedoch identisch. Eine Erklärung hierfür könnte eine unspezifische Bindung der sX4 Sonde an andere Transkripte sein. Zur genauen Überprüfung empfiehlt es sich, eine weitere Sonde, mit anderer Sequenz, gegen sX4 zu testen. Aus Zeitgründen konnte dies in der vorliegenden Arbeit nicht vorgenommen werden.

### **4.3 Identifizierung von RNA-Bindeproteinen**

#### **4.3.1 Detektion von DeaD durch den anti-Maus Antikörper**

Für die Identifizierung von RNA-Bindeprotein-Kandidaten wurde ein Pulldown-Experiment durchgeführt, da diese Strategie für ähnliche Fragestellungen erfolgreich angewandt wurde (Wächter et al., 2013). Mit Hilfe des Pulldowns mit CsrA bindenden sRNAs und der erfolgreichen Detektion von CsrA-Myc im Eluat, konnte die experimentelle Strategie für *Xcv* bestätigt werden (Abbildung 11). Eine unspezifische Bindung von CsrA-Myc an Beads oder an RNA konnte durch die Bead- und sX12-Kontrollen ausgeschlossen werden. In der sX12-Kontrolle zeigt sich darüber hinaus ein Signal für die später identifizierte Helikase, DeaD. Im

Pulldown mit CsrA-bindenden sRNAs war dieses Signal nicht sichtbar, was unerwartet ist, da in dieser Arbeit gezeigt wurde, dass DeaD eine generelle Affinität für RNA hat (Abbildung 15). Dass DeaD im Pulldown mit CsrA bindenden sRNAs nicht nachweisbar war, ist vermutlich auf die Tatsache zurück zu führen, dass CsrA-Myc im Stamm, welcher für die Herstellung des Totalextrakts verwendet wurde, überexprimiert wurde. Es ist davon auszugehen, dass alle angebotenen sRNAs durch die spezifische Bindung an CsrA abgedeckt sind, und DeaD somit verdrängt wird und nicht in nachweisbarer Menge an die angebotenen sRNAs bindet. Das Prinzip der Verdrängung von weniger spezifischen Bindepartnern ist bekannt (Rees and Lilley, 2011).

Die Kreuzreaktion des anti-Maus-Antikörpers mit DeaD war überraschend und in dieser Arbeit nützlich, da ein einfacher Nachweis von DeaD per Western Blot möglich wurde. Die Begründung für diese Kreuzreaktion ist schwer nachvollziehbar, da es sich bei dem verwendeten Antikörper laut GE Healthcare um einen polyclonalen Antikörper handelt, der verschiedene Epitope bindet und durch den Hersteller Affinitätschromatografie gereinigt wird (schriftliche Kommunikation, FisherDE ProductSupport, Juli 2018). Eine Einschränkung bezüglich der Bindestelle des Antikörpers an DeaD wäre demnach nicht möglich.

#### **4.3.2 DeaD zeigte unspezifische Interaktionen mit RNA**

Im Lauf dieser Arbeit wurde DeaD auf Grund seiner Interaktion mit sRNAs gefunden. Daher sollte getestet werden, ob DeaD lediglich mit sRNAs interagiert, oder auch mit anderen RNA-Typen. Es konnte eine Interaktion mit allen getesteten RNAs gezeigt werden, was auf eine niedrige Spezifität von DeaD, zumindest *in vitro*, hinweist (Abbildung 15). Diese Beobachtungen decken sich mit der Literatur (Rocak and Linder, 2004, Iost et al., 1999, Hirling et al., 1989). Da Helikasen, wenn sie beispielsweise als Translationsinitiatoren fungieren, in der Regel ein breites Substratspektrum aufweisen, wird vermutet, dass sie im Allgemeinen keine hohe Spezifität haben, weil dies für ihre Funktion hinderlich wäre (Cordin et al., 2006). Eine alternative Theorie besagt, dass die Spezifität für bestimmte Substrate durch einen weiteren Protein-Bindungspartner realisiert wird (Kossen et al., 2002, Silverman et al., 2003). Eine Identifikation solcher Protein-Bindungspartner steht aus.

In Bakterien gibt es einen Ausnahmefall, bei dem eine RNA-DEAD-Box-Helikase eine hohe Substratspezifität aufweist. Die Helikase DbpA bindet an Helix 92 der 23S-rRNA, welche Teil der großen ribosomalen Untereinheit (50S) ist, und unterstützt die Ribosomenbiogenese

durch strukturelle Veränderungen innerhalb dieser RNA (Fuller-Pace et al., 1993). Die Substratspezifität wird in diesem Fall durch den nicht konservierten C-Terminalen Bereich des Proteins erreicht (Karginov et al., 2005, Wang et al., 2006). Der Rückschluss, dass der C-terminale Bereich von anderen DEAD-Box Helikasen ebenfalls Substratspezifität vermittelt, ist somit naheliegend. Wie bereits erwähnt, konnte eine Substratspezifität jedoch bisher für keine weitere RNA-DEAD-Box-Helikase nachgewiesen werden (Diges and Uhlenbeck, 2001, Nicol and Fuller-Pace, 1995). Es ist außerdem bekannt, dass die Anwesenheit von RNA die ATPase-Aktivität bei RNA-DEAD-Box-Helikasen steigert, was auf eine Kooperativität zwischen RNA-Bindung und ATP-Hydrolyse hindeutet (Rocak and Linder, 2004).

#### **4.3.3 DeaD: ein neues sRNA-Bindeprotein?**

Wie oben beschrieben, wurde DeaD zwar im Zusammenhang mit der Interaktion mit sRNAs aus *Xcv* gefunden, eine Spezifität für sRNAs schien jedoch nicht vorzuliegen und konnte im Verlauf der Arbeit nicht gezeigt werden. Es gibt jedoch Studien, die darauf hinweisen, dass DeaD für die Funktionalität von sRNAs eine Rolle spielen könnte. Ein Indiz hierfür ist eine Studie, die darauf hindeutet, dass DeaD mit Hfq interagiert (Butland et al., 2005). Diese Interaktion ist im Kontext der Funktionsweise von sRNAs äußerst interessant. Hfq bindet circa 30% aller bekannten sRNAs aus *E. coli* (Zhang et al., 2003). Eine Bindung von Hfq an DeaD könnte daher bedeuten, dass DeaD für die sRNA-vermittelte *Target*-Regulation notwendig ist. Weitere Untersuchungen zur Hfq-DeaD-Interaktion, oder der Rolle von DeaD für die Funktion von sRNAs, sind bisher nicht erfolgt, bieten jedoch einen vielversprechenden Forschungszweig, sofern sich die Interaktion von Hfq mit DeaD in *Xcv* bestätigen würde.

Ein weiterer interessanter Forschungszweig im Zusammenhang mit DeaD ist die Interaktion von Hfq und DeaD mit RNase E. RNase E ist eine Endonuklease, die einzelsträngige RNA-Regionen spaltet und so maßgeblich zum Abbau von mRNAs beiträgt (Cormack et al., 1993). Der C-terminale Bereich von RNase E hingegen bildet eine Interaktionsplattform für weitere Proteinpartner, welche zusammen das sogenannte RNA-Degradosom bilden (Bandyra et al., 2013). Zu diesen Interaktionspartnern gehören PNPase (3'-5'-Exoribonuklease), eine Enolase, deren Rolle im mRNA-Abbau unbekannt ist, und in der Regel die DEAD-Box-Helikase RhlB. Es wird vermutet, dass RhlB gefaltete mRNAs entwindet, um sie für den Angriff der beteiligten RNasen besser zugänglich zu machen (Liou et al., 2002). Eine weitere Studie zeigte, dass das RNA-Degradosom unter verschiedenen Bedingungen aus verschiedenen Proteininteraktoren

zusammengesetzt sein kann (Prud'homme-Genereux et al., 2004). Sie wies nach, dass RhlB in *E. coli* bei kälteren Temperaturen durch DeaD ersetzt wird. Daraus leitet sich die Hypothese ab, dass das RNA-Degradosom unter verschiedenen Umwelteinflüssen den Bedingungen angepasste Proteininteraktoren haben kann. Diese Tatsache in Kombination mit dem Fakt, dass auch Hfq mit RNase E interagiert (Ikeda et al., 2011, De Lay et al., 2013), spricht für einen Regulationsmechanismus auf posttranskriptioneller Ebene, bei dem DeaD unter bestimmten Bedingungen (bspw. Kälte), im Zusammenspiel mit Hfq-gebundenen sRNAs, für den Abbau von gebundenen Ziel mRNAs verantwortlich sein könnte. Studien, die diese Fragestellung behandeln, liegen aktuell noch nicht vor. Der einzige Zusammenhang einer sRNA regulierten mRNA und DeaD wurde in der Studie von Resch et al. (2010) aufgezeigt, in der es um die sRNA-vermittelte posttranskriptionelle Regulation von RpoS (stationärer Sigma-Faktor) in *E. coli* geht. Die sRNA DsrA, die hauptsächlich bei kühleren Temperaturen (25°C) synthetisiert wird, kann eine inhibitorische Haarnadelstruktur innerhalb der mRNA, welche die Ribosomenbindestelle maskiert öffnen, um die mRNA für Translation zugänglich zu machen. Wie für viele sRNA-mRNA-Interaktionen üblich, wird auch in diesem Fall die Bindung der beiden RNAs durch Hfq vermittelt. Die Studie ergab ebenfalls, dass die Interaktion von Hfq mit sRNA und mRNA allein zu keiner Erhöhung der Translation führt. Erst durch die Anwesenheit von DeaD konnte eine Verstärkung der Proteinsynthese für RpoS nachgewiesen werden. Daraus leiteten die Autoren Resch et al. (2010) die Hypothese ab, dass DeaD notwendig ist, um die inhibitorische Haarnadelstruktur der mRNA zu öffnen, bevor DsrA, zusammen mit Hfq, an die mRNA binden kann, um eine effiziente Translation zu ermöglichen.

Die in Resch et al. (2010) vorgestellte Hypothese eröffnet auch für *Xcv* interessante Optionen. In der vorliegenden Arbeit konnte ein positiver Einfluss von DeaD auf die Translation von HrpX nachgewiesen werden. Es wurde vermutet, dass DeaD die 5'UTR von der *hrpX*-mRNA entwindet, um sie für eine effiziente Translation zugänglich zu machen. Die Rolle einer sRNA, die zusammen mit Hfq diesen Translations-fördernden Zustand stabilisiert, sollte in diesem Modell nicht ausgeschlossen werden. Da DeaD ein durch Kälte-induziertes Protein ist, ist davon auszugehen, dass die sRNA, die die Translation von *hrpX* bei kalten Temperaturen fördert, sofern sie existiert, ebenfalls durch Kälte induziert wird. Über kälteinduzierte sRNAs in *Xcv* ist bisher nichts bekannt. Im Zusammenhang mit der Regulation von der HrpX Synthese durch DeaD ist dies ein interessanter Untersuchungsansatz.

#### **4.3.4 DEAD-Box Helikasen sind in der Regel nicht redundant**

Anders als in Eukaryoten sind RNA-DEAD-Box-Helikasen in Bakterien nicht essenziell. Die phänotypische Abweichung vom Wildtyp nach Deletion von einer, oder sogar mehreren RNA-DEAD-Box-Helikasen ist nur gering (Iost and Dreyfus, 2006). Die Vermutung, dass die Helikasen teilweise redundant sind, liegt daher nahe, konnte jedoch bis auf einige wenige Beispiele nicht bestätigt werden. Eine partielle Redundanz wurde für DeaD und RhlE gezeigt. Die Überexpression von RhlE in *E. coli* führte in *E. coli*  $\Delta deaD$  zur Aufhebung des verminderten Wachstums bei niedrigen Temperaturen (Iost and Dreyfus, 2006). Als Erklärung hierfür wird vermutet, dass RhlE die Rolle von DeaD im RNA-Degradosom ersetzt. Hinweise darauf ergeben sich aus Studien an *P. syringae*, in denen gezeigt wurde, dass das entsprechende RhlE Homolog bei kälteren Temperaturen mit dem RNA-Degradosom interagiert (Purusharth et al., 2005). In *Xcv* konnte eine solche Redundanz nicht gezeigt werden, da keine stabile Expression von RhlE erreicht werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Eine weitere mögliche Redundanz besteht zwischen DeaD und RhlB. Auch hierfür liegt die Begründung in der Interaktion beider Helikasen mit dem RNA-Degradosom (Prud'homme-Genereux et al., 2004). In *in-vitro*-Studien wurde gezeigt, dass die Helikasen austauschbar sind, dies wurde jedoch bisher in keiner *in-vivo*-Studie weiter untersucht. Die Überexpression von RhlB in *Xcv* konnte die volle Virulenz nach Deletion von *deaD* nicht wiederherstellen (Abbildung 17). Ob eine Komplementation des verminderten Wachstums von *Xcv*  $\Delta deaD$  bei niedrigen Temperaturen stattfindet, wurde noch nicht untersucht.

#### **4.3.5 DeaD ist für eine erfolgreiche Infektion von Vorteil**

Einige Studien zeigen, dass die Expression von DeaD für die Infektion des Wirtes von Vorteil ist, beziehungsweise, dass eine erfolgreiche Infektion durch das Fehlen von DeaD beeinträchtigt ist (Heung and Del Poeta, 2005, Intile et al., 2015, Tan et al., 2016). Eine Studie, die einen besonders interessanten Aspekt aufwirft, ist die von Intile et al. (2015), die zeigt, dass DeaD in *P. aeruginosa* die Translation von ExsA positiv beeinflusst. Dies ist von Interesse, da ExsA ein AraC-Typ Transkriptionsaktivator ist, welcher die Expression des T3SS reguliert. Da auch HrpX aus *Xcv* ein AraC-Typ-Transkriptionsaktivator für die Expression von Komponenten für das T3SS ist, lag die Hypothese nahe, dass DeaD in *Xcv* einen regulatorischen Einfluss auf HrpX hat. Zwischen ExsA und HrpX besteht keine konservierte Sequenz-Homologie auf Transkriptebene, so dass diese Hypothese lediglich auf den funktionellen Eigenschaften

basiert. In Intile et al. (2015) wurde außerdem nachgewiesen, dass DeaD einen Einfluss auf die Proteinmenge von ExsA hat, ohne dass die Transkriptlevel beeinträchtigt waren, woraus eine posttranskriptionelle Regulation abgeleitet wurde. Zur Überprüfung eines möglichen regulatorischen Effekts von DeaD auf HrpX wurden daher in dieser Arbeit in *Xcv* die Transkriptlevel über qPCR und die Proteinlevel durch GFP-Reporterkonstrukte bestimmt (Abbildung 21, Abbildung 22). DeaD hat in *Xcv* sowohl einen Einfluss auf Transkriptebene, als auch auf Proteinebene von *hrpX*. Zusätzlich wurde ein Einfluss auf die Transkriptlevel von *hrpG* festgestellt. Diese Ergebnisse unterscheiden sich deutlich von den in Intile et al. (2015) publizierten Informationen aus *P. aeruginosa* und warfen die Frage auf, auf welcher oder welchen Ebenen HrpX von DeaD reguliert wird. Im Folgenden sollen daher die verschiedenen regulatorischen Ebenen, durch die die Synthese von HrpX beeinflusst wird genauer betrachtet werden. Ziel war ein wahrscheinliches Modell auf Grundlage der in dieser Arbeit aufgenommenen Daten zu erstellen.

#### **4.3.6 DeaD reguliert HrpX auf Transkript- und Proteinebene**

Die Tatsache, dass eine Verminderung von *hrpG*-Transkript in *Xcv*  $\Delta$ *deaD* gemessen werden konnte, war zunächst unerwartet und könnte bedeuten, dass HrpX lediglich indirekt durch DeaD reguliert wird, da verminderte HrpG-Level auf Grund der regulatorischen Kaskade auch automatisch zu verminderter *hrpX* Transkription führen. Dies konnte ausgeschlossen werden, da eine Reduktion der HrpX-Proteinmenge nachweisbar war, auch wenn die Transkription von *hrpX* durch den konstitutiv aktiven *Lac*-Promotor reguliert wurde. Man kann annehmen, dass die Transkription von *hrpX* durch den *Lac*-Promotor unabhängig von HrpG wird, so dass in diesem Fall ein direkter Einfluss von DeaD auf die Translation von HrpX besteht. Im natürlichen System ist eine Akkumulation der Effekte durch die Reduktion von HrpG und von HrpX durch DeaD wahrscheinlich.

Um zu überprüfen, ob HrpX posttranskriptionell von DeaD reguliert wird, wurden die Proteinmengen von HrpX zum einen über das GFP-Reportersystem bestimmt und zum anderen ein Translationsassay durchgeführt. Die Messungen von HrpX mit Hilfe des GFP-Reportersystems ergaben, dass HrpX, dessen Expression durch den *Lac*-Promotor kontrolliert wird, verminderte Proteinlevel aufweist. Ein regulatorischer Effekt von DeaD auf die *Lac*-Promotor vermittelte Transkription konnte durch die Bestimmung der *Lac*-Promotor vermittelten GFP-Proteinsynthese ausgeschlossen werden. Eine posttranskriptionelle



Regulation von HrpX durch DeaD wurde daher zusätzlich zum Einfluss von DeaD auf HrpG angenommen. Beispiele für die Rolle von DEAD-Box-Helikasen in der Translation gibt es bereits (Lu et al., 1999, Vakulskas et al., 2014, Intile et al., 2015). In der Regel basiert die Funktion der Helikase darauf, dass die Ribosomenbindestelle zugänglich gemacht wird. In *in vitro* Experimenten mit MS2 aus *E. coli*, wurde gezeigt, dass die strukturierte MS2-mRNA in Abwesenheit von DeaD schlechter translatiert wird. Bei weniger stark strukturierten mRNAs konnte dies nicht gezeigt werden (Lu et al., 1999). Auch im bereits erwähnten Beispiel der Regulation von ExsA wird angenommen, dass DeaD notwendig ist, um die 5'UTR für Ribosomen zugänglich zu machen (Intile et al., 2015). Eine genauere Untersuchung diesbezüglich steht noch aus. In dieser Arbeit wurde, in Anlehnung an die in der Literatur gefundenen und oben genannten Fakten, untersucht, ob DeaD die Translation von HrpX fördert, indem es die Sekundärstruktur von der *hrpX*-mRNA entwindet. Dafür wurde die 5' UTR von *hrpX* dahingehend modifiziert, dass *in silico* vorhergesagte Sekundärstrukturen vor dem Translationsstart möglichst vermieden wurden. Es konnte gezeigt werden, dass eine solche mutmaßliche Auflösung der Sekundärstruktur tatsächlich zu einer erhöhten Translation von HrpX in *Xcv ΔdeaD* führt (Vergleichbar mit Translation im Wildtyp, Abbildung 25). Dies bestätigt die Hypothese, dass DeaD einen Einfluss auf die Translation von HrpX hat, indem es für die Translation hinderliche Sekundärstrukturen in der 5'UTR der mRNA auflöst.

Zusätzlich wurde die Hypothese in einem weiteren unabhängigen Experiment bestätigt, wofür ein Translationsassay verwendet wurde, in dem die Translation von HrpX *in vitro* untersucht wurde. Für dieses Experiment wurde die Translationsmaschinerie von *E. coli* verwendet. Hier besteht die Möglichkeit, dass diese sich anders verhält als die *Xcv* Translationsmaschinerie, jedoch gibt es keine Daten, die darauf hinweisen, dass dies im vorliegenden Versuch der Fall sein könnte. Um möglichst natürliche Bedingungen zu wählen, wurde für den Translationsassay ein Konstrukt verwendet, welches die natürliche 5'UTR von *hrpX*, sowie dessen natürlichen Promotor enthält. Es wurden die Proteinmengen von HrpX und Gfo bestimmt. Gfo wurde als Kontrolle ausgewählt, da die 5'UTR eine Sequenz enthält, die der Shine-Dalgarno-Sequenz entspricht und daher sowohl als Positivkontrolle für eine mögliche Translation von *Xcv* Transkripten durch die *E.-coli*-Translationsmaschinerie als auch als nichtreguliertes Kontroll-Transkript dienen kann. Über die Regulation von *gfo* in *Xcv* ist nichts bekannt. Im durchgeführten Experiment war erkennbar, dass die Zugabe aktiver DEAD-Box-Helikase zu einer erhöhten Translation von HrpX und Gfo führte. Zu beachten war jedoch auch,

dass die Reinigung der aktiven Proteinvariante zu besseren Ergebnissen führte, als die Reinigung der inaktiven Variante. Kritisch betrachtet werden muss daher, ob die inaktive Variante zu schlechteren Ergebnissen führt, weil die Verunreinigungen größer sind. Dies kann auf Grund der Puffer-Kontrolle ausgeschlossen werden. Hätte die  $\Delta$ Box-Protein-Variante eine Restaktivität, oder hätte eine der Kontaminanten einen Einfluss auf die Translation von HrpX, würde man nach Zugabe von gereinigtem  $\Delta$ Box eine intermediäre Proteinmenge (zwischen Puffer-Kontrolle und aktiver DeaD) erwarten. Da dies nicht der Fall ist, kann mit Hilfe dieses Versuchs und den Ergebnissen der vorangegangenen Versuche bestätigt werden, dass DeaD die HrpX-Synthese auf posttranskriptioneller Ebene reguliert. Ein posttranskriptioneller Einfluss von DeaD auf HrpG konnte nicht untersucht werden, da mit Hilfe der *E.-coli*-Translationsmaschinerie keine Synthese von HrpG nachgewiesen werden konnte. Da weder *hrpX* noch *hrpG* eine offensichtliche Shine-Dalgarno Sequenz aufweisen (Abbildung 29), ist nicht klar, warum eine Synthese von HrpX einwandfrei, die von HrpG hingegen gar nicht nachweisbar war.

```

5'UTR gfo
gcagtacgccccacactcgcaAGGAGGTttgcATG

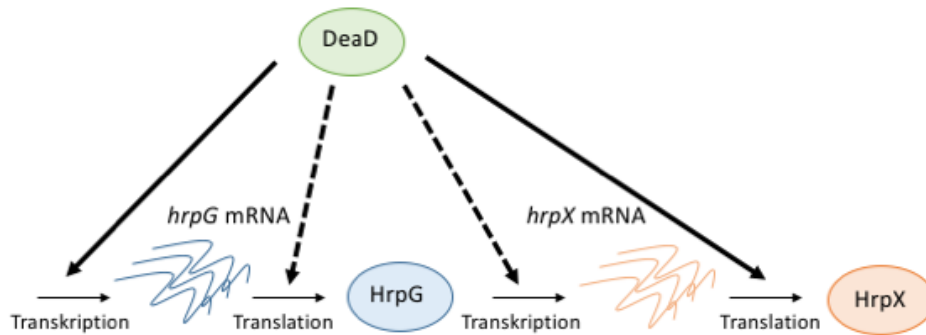
5'UTR hrpX
gcgccagcgagttcggcgcctgttcttttgcctccgcccccaagagagagaccggcATG

5'UTR hrpG
gtccagctccaactggactctccccgccaaccgactgtccgacgatgcagcatcttgaagatggatttgcct
ggcattggccgaccgcaccggcgcccgtcccatgctgtgcttgaacgacgcgaaggccgcctgaATG

```

**Abbildung 29:** Nukleotidsequenz der 5' UTR von *gfo*, *hrpX* und *hrpG* inklusive Start Codon. Die Shine-Dalgarno-ähnliche Sequenz in *gfo*, welche sich typischerweise 4-14 Nukleotide vor dem Translationsstart befindet, ist unterstrichen und das Start-Codon der jeweiligen mRNA **fett** dargestellt. Die mRNAs von *hrpX* und *hrpG* weisen keine Shine-Dalgarno-ähnliche Sequenz auf.

Zusammen mit dem regulatorischen Einfluss von DeaD auf die HrpG-Transkription kann angenommen werden, dass DeaD, zumindest bei Temperaturen, die unter dem Wachstumsoptimum für *Xcv* liegen, einen maßgeblichen regulatorischen Einfluss auf die Virulenz von *Xcv* hat. Abbildung 30 fasst die aus dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse in Bezug auf die Regulation von HrpG und HrpX zusammen.



**Abbildung 30: Schematische Darstellung des regulatorischen Einflusses von DeaD auf HrpG und HrpX.** Anhand der in dieser Arbeit gewonnenen Daten konnte gezeigt werden, dass DeaD einen regulatorischen Einfluss auf die Transkriptlevel von HrpG und auf die Proteinsynthese von HrpX hat (markiert mit durchgezogenen Pfeilen). Weitere regulatorische Einflüsse von DeaD auf die Proteinsynthese von HrpG und die Transkription von HrpX konnten nicht mit Sicherheit ausgeschlossen oder bewiesen werden (markiert mit gestrichelten Pfeilen).

#### 4.3.7 Die Überexpression von DeaD in den Komplementationsstämmen führt zu Abweichungen in den Messwerten

Die in der Arbeit verwendeten Komplementationsstämme führten alle trotz Verwendung des nativen Promotors zu einer Überexpression von DeaD, welche vermutlich durch die Kopienzahl des eingebrachten Vektors begründet ist. Ersichtlich war diese Überexpression von DeaD in Versuchen, in denen ein Komplementationsstamm in einem Western Blot und dem sekundären anti-Maus-Antikörper verwendet wurde (Daten nicht gezeigt). In diesen Fällen konnte DeaD, wie schon in vorherigen Versuchen, durch den sekundären Antikörper detektiert werden, jedoch lediglich in den Komplementationsstämmen, nicht in *Xcv* 85-10 oder *Xcv*  $\Delta$ *deaD*. Diese Überexpression führte in einigen Fällen zu einer höheren Schwankung der Messwerte einzelner biologischer Replikate. Ein besonders drastischer Fall war beispielweise die Bestimmung der Transkriptmengen verschiedener durch DeaD direkt oder indirekt regulierte Gene. Die Schwankung innerhalb der biologischen Replikate war hier teilweise so hoch, dass mathematisch betrachtet, kein signifikanter Unterschied zur Deletionsmutante feststellbar war. Hervorzuheben ist, dass alle Werte lediglich nach oben abwichen (Anhang Tabelle 15), so dass eine Komplementation in jedem Fall erreicht wurde, es jedoch auf Grund der Überexpression von DeaD, zum Teil, zu einer verschieden starken Überexpression der regulierten Zielgene kam. Umgehen lässt sich dieses Problem lediglich durch eine genomische Reintegration des deletierten Gens unter Verwendung des nativen

Promotors. Auf diese Weise bleibt die Kopienzahl mit der natürlichen Situation identisch und es sollte zu keiner messbaren Abweichung vom Wildtyp kommen. Aus zeitlichen Gründen wurde in dieser Arbeit keine Reintegration von *DeaD* vorgenommen. Zukünftige Arbeiten könnten diese beinhalten, um die in dieser Arbeit erstellten Daten stichprobenartig zu überprüfen.

#### **4.3.8 Die Expression von *deaD* ist bei niedrigen Temperaturen von Vorteil**

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Deletion von *deaD* zu einem verminderten Wachstum von Kulturen führt, die bei niedrigeren Temperaturen angezogen werden. Diese Tatsache entspricht den in der Literatur gefundenen Ergebnissen. Für *E. coli* konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass die Deletion von *deaD* einen Einfluss auf das Wachstum bei kälteren Temperaturen hat (Charollais et al., 2004, Jones et al., 1996). Charollais et al. (2004) führten das verminderte Wachstum nach der Deletion von *deaD* auf eine beeinträchtigte Biogenese der ribosomalen 50S Untereinheit zurück. In ihren Studien weisen sie mittels Gradientenzentrifugation nach, dass die ribosomalen Untereinheiten im Wildtyp maßgeblich in Polysomen (Ribosomen gebunden an mRNA) nachgewiesen werden kann, während in *E. coli*  $\Delta$ *deaD* eine Anreicherung von freier 30S Untereinheit nachgewiesen werden konnte. Daraus leiteten sie einen Defekt in der 50S Biogenese ab. Dieser Effekt konnte nur bei verminderten Temperaturen nachgewiesen werden, weshalb angenommen wurde, dass *DeaD* nur bei kälteren Temperaturen die Ribosomenbiogenese unterstützt. Abschließend benennen sie weitere mögliche Rollen von *DeaD* in anderen biologischen Prozessen wie bspw. der Transaktion, oder dem RNA-Abbau, erklären diese jedoch als sekundäre Effekte oder alternative Funktionen von *DeaD*. Jones et al. (1996) weisen ebenfalls auf eine Kolo-kalisation von *DeaD* mit Ribosomen hin, führen dies jedoch auf eine Funktion von *DeaD* während der Translation zurück. Begründet wird dies durch die Tatsache, dass eine Interaktion sowohl mit der 30S als auch mit der 50S Untereinheit nachgewiesen wurde und die Mengenverhältnisse annähernd stöchiometrisch waren. Ihrer Meinung nach unterstützt *DeaD* die Translation von mRNAs durch die Auflösung von Sekundärstrukturen innerhalb der RNA. Zusätzlich wird diese Hypothese dadurch gestützt, dass nicht die Synthese aller Proteine von der Deletion von *deaD* beeinträchtigt werden.

In beiden oben genannten Studien wird ein vermindertes Wachstum von Kulturen beschrieben, die bei niedrigeren Temperaturen angezogen werden und kein *DeaD* aufweisen.

Die Begründung für diese Tatsache fällt jedoch unterschiedlich aus. Ein Beweis, auf Grund welcher Eigenschaft von DeaD es zu dem verminderten Wachstum bei kalten Temperaturen kommt, steht noch aus und kann auch für *Xcv* nicht sicher beantwortet werden. Die aktuelle Datenlage für *Xcv* lässt vermuten, dass es sich eher um einen posttranskriptionellen Einfluss von DeaD auf bestimmte Zielgene handelt, und nicht um einen generellen Effekt auf die Proteinsynthese, welcher durch eine verminderte Ribosomenbiogenese entstehen würde. Begründet wird dies durch die Tatsache, dass die Synthese von mehreren Proteinen (GroEL, GFP) durch die Deletion von DeaD unbeeinflusst war. Dennoch war der Effekt auf die Proteinsynthese weitreichender als vermutet (unerwartete Beeinflussung der Synthese von Gfo und weiteren in dieser Arbeit nicht vorgestellten Proteinen). Aus den oben genannten Studien sollte nicht zwangsläufig geschlossen werden, dass DeaD lediglich bei kälteren Temperaturen funktional ist. In Vakulskas et al. (2014) konnte in *E. coli* gezeigt werden, dass DeaD einen Einfluss auf die Translation bestimmter Zielgene hat. Dieser Einfluss ist unabhängig von der Umgebungstemperatur sichtbar. Die vorliegende Arbeit beschränkt sich aus Zeitgründen auf die Untersuchung von DeaD bei niedrigeren Temperaturen. Einige Vorversuche geben einen Anlass für die Vermutung, dass DeaD auch in *Xcv* bei moderaten Temperaturen (30 °C) eine regulatorische Funktion auf die Translation von Zielgenen hat (Daten nicht gezeigt). Eine abschließende Bestätigung durch unabhängige Experimente steht diesbezüglich aus.

## 5 Ausblick

Im Zusammenhang mit der Identifikation von neuen sRNAs aus *Xcv* bleibt zu klären, ob und welche der sRNAs translatiert werden können. Die Identifikation und die Funktion von dabei entstehenden sogenannten Mikroproteinen ist aktuell ein aufstrebender Forschungszweig, der auch in *Xcv* weiterverfolgt werden könnte.

Aus der in dieser Arbeit identifizierten Rolle von DeaD in der Virulenz von *Xcv* ergeben sich mehrere Möglichkeiten für die weitere Untersuchung. Eine zu klärende Frage ist beispielsweise, ob DeaD die Etablierung der Infektion lediglich bei niedrigeren Temperaturen fördert, oder auch bei für *Xcv* idealen Temperaturen einen Einfluss hat. Hierfür müsste man die Infektion der Pflanze durch *Xcv* bei verschiedenen Temperatur Bereichen vergleichen.

Eine weitere Kernfrage mit hohem Potential, ist die Rolle von DeaD in einem möglichen Zusammenspiel mit sRNAs. Dazu müsste untersucht werden, ob DeaD einen direkten Einfluss auf sRNAs hat, beispielsweise durch eine direkte Bindung und Entwindung von DeaD an sRNAs, welche die Funktion von sRNAs fördert, oder indirekt wirkt, wie es beispielsweise für RpoS in *E. coli* der Fall ist. Analog zu dem Regulationsmechanismus von RpoS in *E. coli*, könnte man auf Grund der in dieser Arbeit erhobenen Daten, in Bezug auf die Regulation der Synthese von HrpX durch DeaD spekulieren, dass es eine sRNA gibt, die im Zusammenspiel mit Hfq die Synthese von HrpX fördert. Das Auffinden einer solchen sRNA ist von besonderem Interesse und gäbe eine direkte Verbindung von DeaD zur sRNA vermittelten Regulation von Virulenz. Die Daten dieser Arbeit liefern dafür den Hinweis, dass es wahrscheinlich ist, dass eine durch Kälte induzierte sRNA gesucht wird. Die Interaktion von DeaD mit Hfq ist in diesem speziellen Szenario zwar nicht erforderlich würde aber eine weitere Brücke zu der Rolle von DeaD für die Funktion von sRNAs schlagen, sofern man sie in *Xcv* nachweisen kann.

Des Weiteren bleibt die Frage zu klären, ob DeaD in *Xcv* eine Rolle im RNA-Abbau spielt, also eine Interaktion mit dem RNA-Degradosom stattfindet. Dazu könnten Interaktionsstudien mit Proteinen des RNA-Degradosoms gemacht werden.

## 6 Literaturverzeichnis

- Agrios, G. (2005) *Plant Pathology*. 5th Edition, ELSEVIER.
- Altier, C., Suyemoto, M. and Lawhon, S. D. (2000) 'Regulation of *Salmonella enterica* serovar typhimurium invasion genes by *csrA*', *Infect Immun*, 68(12), pp. 6790-7.
- Alvarez-Martinez, C. E. and Christie, P. J. (2009) 'Biological diversity of prokaryotic type IV secretion systems', *Microbiol Mol Biol Rev*, 73(4), pp. 775-808.
- Ausubel, F. M. B., R.; Kingston, R. E.; Moore D. D.; Seidman, J. G.; Smith, J. A. & Struhl, K. (1996) *Current Protocols in Molecular Biology*. New York.
- Backman, K., Ptashne, M. and Gilbert, W. (1976) 'Construction of plasmids carrying the *cl* gene of bacteriophage lambda', *Proc Natl Acad Sci USA*, 73(11), pp. 4174-8.
- Bak, G., Lee, J., Suk, S., Kim, D., Young Lee, J., Kim, K. S., Choi, B. S. and Lee, Y. (2015) 'Identification of novel sRNAs involved in biofilm formation, motility, and fimbriae formation in *Escherichia coli*', *Sci Rep*, 5, pp. 15287.
- Bandyra, K. J., Bouvier, M., Carpousis, A. J. and Luisi, B. F. (2013) 'The social fabric of the RNA degradosome', *Biochim Biophys Acta*, 1829(6-7), pp. 514-22.
- Barnard, F. M., Loughlin, M. F., Fainberg, H. P., Messenger, M. P., Ussery, D. W., Williams, P. and Jenks, P. J. (2004) 'Global regulation of virulence and the stress response by CsrA in the highly adapted human gastric pathogen *Helicobacter pylori*', *Mol Microbiol*, 51(1), pp. 15-32.
- Barrera, I., Schuppli, D., Sogo, J. M. and Weber, H. (1993) 'Different mechanisms of recognition of bacteriophage Q beta plus and minus strand RNAs by Q beta replicase', *J Mol Biol*, 232(2), pp. 512-21.
- Bohn, C., Rigoulay, C. and Bouloc, P. (2007) 'No detectable effect of RNA-binding protein Hfq absence in *Staphylococcus aureus*', *BMC Microbiol*, 7, pp. 10.
- Bonas, U. (1994) '*hrp* genes of phytopathogenic bacteria', *Curr Top Microbiol Immunol*, 192, pp. 79-98.
- Bonas, U., Stall, R. E. and Staskawicz, B. (1989) 'Genetic and structural characterization of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*', *Mol Gen Genet*, 218(1), pp. 127-36.
- Brantl, S. (2007) 'Regulatory mechanisms employed by *cis*-encoded antisense RNAs', *Curr Opin Microbiol*, 10(2), pp. 102-9.
- Brock, J. (2013) Die Rolle der RNA-Bindeproteine CsrA und Hfq in der Virulenz von *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Butland, G., Peregrin-Alvarez, J. M., Li, J., Yang, W., Yang, X., Canadien, V., Starostine, A., Richards, D., Beattie, B., Krogan, N., Davey, M., Parkinson, J., Greenblatt, J. and Emili, A. (2005) 'Interaction network containing conserved and essential protein complexes in *Escherichia coli*', *Nature*, 433(7025), pp. 531-7.
- Büttner, D. (2016) 'Behind the lines-actions of bacterial type III effector proteins in plant cells', *FEMS Microbiol Rev*, 40(6), pp. 894-937.
- Büttner, D. and Bonas, U. (2010) 'Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors', *FEMS Microbiol Rev*, 34(2), pp. 107-33.
- Büttner, D., Nennstiel, D., Klusener, B. and Bonas, U. (2002) 'Functional analysis of HrpF, a putative type III translocon protein from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*', *J Bacteriol*, 184(9), pp. 2389-98.
- Caruthers, J. M., Johnson, E. R. and McKay, D. B. (2000) 'Crystal structure of yeast initiation factor 4A, a DEAD-box RNA helicase', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(24), pp. 13080-5.

- Caruthers, J. M. and McKay, D. B. (2002) 'Helicase structure and mechanism', *Curr Opin Struct Biol*, 12(1), pp. 123-33.
- Chan, J. W. and Goodwin, P. H. (1999) 'The molecular genetics of virulence of *Xanthomonas campestris*', *Biotechnol Adv*, 17(6), pp. 489-508.
- Charollais, J., Dreyfus, M. and Iost, I. (2004) 'CsdA, a cold-shock RNA helicase from *Escherichia coli*, is involved in the biogenesis of 50S ribosomal subunit', *Nucleic Acids Res*, 32(9), pp. 2751-9.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) 'Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction', *Anal Biochem*, 162(1), pp. 156-9.
- Cordin, O., Banroques, J., Tanner, N. K. and Linder, P. (2006) 'The DEAD-box protein family of RNA helicases', *Gene*, 367, pp. 17-37.
- Cordin, O., Tanner, N. K., Doere, M., Linder, P. and Banroques, J. (2004) 'The newly discovered Q motif of DEAD-box RNA helicases regulates RNA-binding and helicase activity', *EMBO J*, 23(13), pp. 2478-87.
- Cormack, R. S., Genereaux, J. L. and Mackie, G. A. (1993) 'RNase E activity is conferred by a single polypeptide: overexpression, purification, and properties of the *ams/rne/hmp1* gene product', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(19), pp. 9006-10.
- Daniels, M. J., Barber, C. E., Turner, P. C., Sawczyc, M. K., Byrde, R. J. and Fielding, A. H. (1984) 'Cloning of genes involved in pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* using the broad host range cosmid pLAFR1', *Embo j*, 3(13), pp. 3323-8.
- De Lay, N. and Gottesman, S. (2012) 'A complex network of small non-coding RNAs regulate motility in *Escherichia coli*', *Mol Microbiol*, 86(3), pp. 524-38.
- De Lay, N., Schu, D. J. and Gottesman, S. (2013) 'Bacterial small RNA-based negative regulation: Hfq and its accomplices', *J Biol Chem*, 288(12), pp. 7996-8003.
- Dean, J. D., Goodwin, P. H. and Hsiang, T. (2002) 'Comparison of relative RT-PCR and northern blot analyses to measure expression of  $\beta$ -1,3-glucanase in *Nicotiana benthamiana* infected with *Colltotrichum destructivum*', *Plant Molecular Biology Reporter*, 20(4), pp. 347-356.
- Diges, C. M. and Uhlenbeck, O. C. (2001) '*Escherichia coli* DbpA is an RNA helicase that requires hairpin 92 of 23S rRNA', *EMBO J*, 20(19), pp. 5503-12.
- Dubey, A. K., Baker, C. S., Suzuki, K., Jones, A. D., Pandit, P., Romeo, T. and Babinzke, P. (2003) 'CsrA regulates translation of the *Escherichia coli* carbon starvation gene, *cstA*, by blocking ribosome access to the *cstA* transcript', *J Bacteriol*, 185(15), pp. 4450-60.
- Folichon, M., Arluison, V., Pellegrini, O., Huntzinger, E., Regnier, P. and Hajnsdorf, E. (2003) 'The poly(A) binding protein Hfq protects RNA from RNase E and exoribonucleolytic degradation', *Nucleic Acids Res*, 31(24), pp. 7302-10.
- Fuchs, G. (2014) *Allgemeine Mikrobiologie*. Thieme.
- Fuller-Pace, F. V., Nicol, S. M., Reid, A. D. and Lane, D. P. (1993) 'DbpA: a DEAD box protein specifically activated by 23s rRNA', *EMBO J*, 12(9), pp. 3619-26.
- Ghosh, S., Dureja, C., Khatri, I., Subramanian, S., Raychaudhuri, S. and Ghosh, S. (2017) 'Identification of novel small RNAs in *Burkholderia cenocepacia* KC-01 expressed under iron limitation and oxidative stress conditions', *Microbiology*.
- Gorbalenya, A. E. and Koonin, E. V. (1993) 'Helicases - amino-acid-sequence comparisons and structure-function-relationships', *Current Opinion in Structural Biology*, 3(3), pp. 419-429.
- Gottesman, S. and Storz, G. (2011) 'Bacterial small RNA regulators: versatile roles and rapidly evolving variations', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3(12).



- Guillier, M. and Gottesman, S. (2006) 'Remodelling of the *Escherichia coli* outer membrane by two small regulatory RNAs', *Mol Microbiol*, 59(1), pp. 231-47.
- Han, Y., Liu, L., Fang, N., Yang, R. and Zhou, D. (2013) 'Regulation of pathogenicity by noncoding RNAs in bacteria', *Future Microbiol*, 8(5), pp. 579-91.
- Helm, S., Dobritzsch, D., Rodiger, A., Agne, B. and Baginsky, S. (2014) 'Protein identification and quantification by data-independent acquisition and multi-parallel collision-induced dissociation mass spectrometry (MS(E)) in the chloroplast stroma proteome', *J Proteomics*, 98, pp. 79-89.
- Heung, L. J. and Del Poeta, M. (2005) 'Unlocking the DEAD-box: a key to cryptococcal virulence?', *J Clin Invest*, 115(3), pp. 593-5.
- Hirling, H., Scheffner, M., Restle, T. and Stahl, H. (1989) 'RNA helicase activity associated with the human p68 protein', *Nature*, 339(6225), pp. 562-4.
- Ikeda, Y., Yagi, M., Morita, T. and Aiba, H. (2011) 'Hfq binding at RhlB-recognition region of RNase E is crucial for the rapid degradation of target mRNAs mediated by sRNAs in *Escherichia coli*', *Mol Microbiol*, 79(2), pp. 419-32.
- Intile, P. J., Balzer, G. J., Wolfgang, M. C. and Yahr, T. L. (2015) 'The RNA helicase Dead stimulates ExsA translation to promote expression of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system', *J Bacteriol*, 197(16), pp. 2664-74.
- Iost, I. and Dreyfus, M. (2006) 'DEAD-box RNA helicases in *Escherichia coli*', *Nucleic Acids Res*, 34(15), pp. 4189-97.
- Iost, I., Dreyfus, M. and Linder, P. (1999) 'Ded1p, a DEAD-box protein required for translation initiation in *Saccharomyces cerevisiae*, is an RNA helicase', *J Biol Chem*, 274(25), pp. 17677-83.
- Jacek Nowakowski, I. T. J. (1997) *Seminars in Virology*. Elsevier, p. 153-165.
- Jaschinski, K., Babski, J., Lehr, M., Burmester, A., Benz, J., Heyer, R., Dorr, M., Marchfelder, A. and Soppa, J. (2014) 'Generation and phenotyping of a collection of sRNA gene deletion mutants of the haloarchaeon *Haloferax volcanii*', *PLoS One*, 9(3), pp. e90763.
- Jiang, W., Hou, Y. and Inouye, M. (1997) 'CspA, the major cold-shock protein of *Escherichia coli*, is an RNA chaperone', *J Biol Chem*, 272(1), pp. 196-202.
- Johansson, J., Mandin, P., Renzoni, A., Chiaruttini, C., Springer, M. and Cossart, P. (2002) 'An RNA thermosensor controls expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes*', *Cell*, 110(5), pp. 551-61.
- Johnson, T. L., Abendroth, J., Hol, W. G. and Sandkvist, M. (2006) 'Type II secretion: from structure to function', *FEMS Microbiol Lett*, 255(2), pp. 175-86.
- Jones, P. G., Mitta, M., Kim, Y., Jiang, W. and Inouye, M. (1996) 'Cold shock induces a major ribosomal-associated protein that unwinds double-stranded RNA in *Escherichia coli*', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(1), pp. 76-80.
- Juhas, M., Crook, D. W. and Hood, D. W. (2008) 'Type IV secretion systems: tools of bacterial horizontal gene transfer and virulence', *Cell Microbiol*, 10(12), pp. 2377-86.
- Karginov, F. V., Caruthers, J. M., Hu, Y., McKay, D. B. and Uhlenbeck, O. C. (2005) 'YxiN is a modular protein combining a DEx(D/H) core and a specific RNA-binding domain', *J Biol Chem*, 280(42), pp. 35499-505.
- Kay, S. and Bonas, U. (2009) 'How *Xanthomonas* type III effectors manipulate the host plant', *Curr Opin Microbiol*, 12(1), pp. 37-43.
- Kim, J. L., Morgenstern, K. A., Griffith, J. P., Dwyer, M. D., Thomson, J. A., Murcko, M. A., Lin, C. and Caron, P. R. (1998) 'Hepatitis C virus NS3 RNA helicase domain with a bound oligonucleotide: the crystal structure provides insights into the mode of unwinding', *Structure*, 6(1), pp. 89-100.

- Koebnik, R., Kruger, A., Thieme, F., Urban, A. and Bonas, U. (2006) 'Specific binding of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* AraC-type transcriptional activator HrpX to plant-inducible promoter boxes', *J Bacteriol*, 188(21), pp. 7652-60.
- Kossen, K., Karginov, F. V. and Uhlenbeck, O. C. (2002) 'The carboxy-terminal domain of the DExDH protein YxiN is sufficient to confer specificity for 23S rRNA', *J Mol Biol*, 324(4), pp. 625-36.
- Lenz, D. H., Mok, K. C., Lilley, B. N., Kulkarni, R. V., Wingreen, N. S. and Bassler, B. L. (2004) 'The small RNA chaperone Hfq and multiple small RNAs control quorum sensing in *Vibrio harveyi* and *Vibrio cholerae*', *Cell*, 118(1), pp. 69-82.
- Liang, H., Zhao, Y.-T., Zhang, J.-Q., Wang, X.-J., Fang, R.-X. and Jia, Y.-T. (2011) 'Identification and functional characterization of small non-coding RNAs in *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae*', *BMC Genomics*, 12, pp. 87-87.
- Linder, P., Lasko, P. F., Ashburner, M., Leroy, P., Nielsen, P. J., Nishi, K., Schnier, J. and Slonimski, P. P. (1989) 'Birth of the D-E-A-D box', *Nature*, 337(6203), pp. 121-2.
- Lindgren, P. B., Peet, R. C. and Panopoulos, N. J. (1986) 'Gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. "*phaseolicola*" controls pathogenicity of bean plants and hypersensitivity of nonhost plants', *J Bacteriol*, 168(2), pp. 512-22.
- Liou, G. G., Chang, H. Y., Lin, C. S. and Lin-Chao, S. (2002) 'DEAD box RhlB RNA helicase physically associates with exoribonuclease PNPase to degrade double-stranded RNA independent of the degradosome-assembling region of RNase E', *J Biol Chem*, 277(43), pp. 41157-62.
- Lorenz, C., Hausner, J. and Büttner, D. (2012) 'HrcQ provides a docking site for early and late type III secretion substrates from *Xanthomonas*', *PLoS One*, 7(11), pp. e51063.
- Lu, J., Aoki, H. and Ganoza, M. C. (1999) 'Molecular characterization of a prokaryotic translation factor homologous to the eukaryotic initiation factor eIF4A', *Int J Biochem Cell Biol*, 31(1), pp. 215-29.
- Lu, Q., Ding, S., Reiland, S., Rödiger, A., Roschitzki, B., Xue, P., Grisse, W., Lu, C. and Baginsky, S. (2015) 'Identification and characterization of chloroplast casein kinase II from *Oryza sativa* (rice)', *J Exp Bot*, 66(1), pp. 175-87.
- Maki, K., Uno, K., Morita, T. and Aiba, H. (2008) 'RNA, but not protein partners, is directly responsible for translational silencing by a bacterial Hfq-binding small RNA', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(30), pp. 10332-7.
- Marzluff W "B", F. (2015) 'Twenty years of RNA: reflections on post-transcriptional regulation', *Rna*, 21(4), pp. 687-9.
- Menard, R., Sansonetti, P. J. and Parsot, C. (1993) 'Nonpolar mutagenesis of the *ipa* genes defines IpaB, IpaC, and IpaD as effectors of *Shigella flexneri* entry into epithelial cells', *J Bacteriol*, 175(18), pp. 5899-906.
- Merritt, J., Chen, Z., Liu, N. and Kreth, J. (2014) 'Posttranscriptional regulation of oral bacterial adaptive responses', *Curr Oral Health Rep*, 1(1), pp. 50-58.
- Miller, J. H. (1972) *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Minsavage, G. V. U. o. F., Gainesville) Dahlbeck, D. Whalen, M.C. Kearney, B. et al. (1990) 'Gene-for-gene relationships specifying disease resistance in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*: pepper interactions', *Mol Plant Microbe Interact*, 3(1), pp. 41-47.
- Miranda, G., Schuppli, D., Barrera, I., Hausherr, C., Sogo, J. M. and Weber, H. (1997) 'Recognition of bacteriophage Qbeta plus strand RNA as a template by Qbeta replicase: role of RNA interactions mediated by ribosomal proteins S1 and host factor', *J Mol Biol*, 267(5), pp. 1089-103.

- Mizuno, T., Chou, M. Y. and Inouye, M. (1984) 'A unique mechanism regulating gene expression: translational inhibition by a complementary RNA transcript (micRNA)', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81(7), pp. 1966-70.
- Moller, T., Franch, T., Hojrup, P., Keene, D. R., Bachinger, H. P., Brennan, R. G. and Valentin-Hansen, P. (2002) 'Hfq: a bacterial Sm-like protein that mediates RNA-RNA interaction', *Mol Cell*, 9(1), pp. 23-30.
- Morita, T., Mochizuki, Y. and Aiba, H. (2006) 'Translational repression is sufficient for gene silencing by bacterial small noncoding RNAs in the absence of mRNA destruction', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(13), pp. 4858-63.
- Nicol, S. M. and Fuller-Pace, F. V. (1995) 'The "DEAD box" protein DbpA interacts specifically with the peptidyltransferase center in 23S rRNA', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(25), pp. 11681-5.
- Noel, L., Thieme, F., Nennstiel, D. and Bonas, U. (2001) 'cDNA-AFLP analysis unravels a genome-wide *hrpG*-regulon in the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*', *Mol Microbiol*, 41(6), pp. 1271-81.
- Nogueira, T. and Springer, M. (2000) 'Post-transcriptional control by global regulators of gene expression in bacteria', *Curr Opin Microbiol*, 3(2), pp. 154-8.
- Novick, R. P., Ross, H. F., Projan, S. J., Kornblum, J., Kreiswirth, B. and Moghazeh, S. (1993) 'Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule', *EMBO J*, 12(10), pp. 3967-75.
- Owtrim, G. W. (2013) 'RNA helicases: diverse roles in prokaryotic response to abiotic stress', *RNA Biol*, 10(1), pp. 96-110.
- Pandey, S. P., Minesinger, B. K., Kumar, J. and Walker, G. C. (2011) 'A highly conserved protein of unknown function in *Sinorhizobium meliloti* affects sRNA regulation similar to Hfq', *Nucleic Acids Res*, 39(11), pp. 4691-708.
- Pandey, S. P., Winkler, J. A., Li, H., Camacho, D. M., Collins, J. J. and Walker, G. C. (2014) 'Central role for RNase YbeY in Hfq-dependent and Hfq-independent small-RNA regulation in bacteria', *BMC Genomics*, 15, pp. 121.
- Papenfors, K., Pfeiffer, V., Lucchini, S., Sonawane, A., Hinton, J. C. and Vogel, J. (2008) 'Systematic deletion of *Salmonella* small RNA genes identifies CyaR, a conserved CRP-dependent riboregulator of OmpX synthesis', *Mol Microbiol*, 68(4), pp. 890-906.
- Papenfors, K., Sun, Y., Miyakoshi, M., Vanderpool, C. K. and Vogel, J. (2013) 'Small RNA-mediated activation of sugar phosphatase mRNA regulates glucose homeostasis', *Cell*, 153(2), pp. 426-37.
- Papenfors, K. and Vogel, J. (2010) 'Regulatory RNA in bacterial pathogens', *Cell Host Microbe*, 8(1), pp. 116-27.
- Pause, A. and Sonenberg, N. (1992) 'Mutational analysis of a DEAD box RNA helicase: the mammalian translation initiation factor eIF-4A', *Embo j*, 11(7), pp. 2643-54.
- Phadtare, S. (2004) 'Recent developments in bacterial cold-shock response', *Curr Issues Mol Biol*, 6(2), pp. 125-36.
- Picard, F., Dressaire, C., Girbal, L. and Coccagn-Bousquet, M. (2009) 'Examination of post-transcriptional regulations in prokaryotes by integrative biology', *C R Biol*, 332(11), pp. 958-73.
- Prud'homme-Genereux, A., Beran, R. K., Iost, I., Ramey, C. S., Mackie, G. A. and Simons, R. W. (2004) 'Physical and functional interactions among RNase E, polynucleotide phosphorylase and the cold-shock protein, CsdA: evidence for a 'cold shock degradosome'', *Mol Microbiol*, 54(5), pp. 1409-21.

- Purusharth, R. I., Klein, F., Sulthana, S., Jager, S., Jagannadham, M. V., Evguenieva-Hackenberg, E., Ray, M. K. and Klug, G. (2005) 'Exoribonuclease R interacts with endoribonuclease E and an RNA helicase in the psychrotrophic bacterium *Pseudomonas syringae* Lz4W', *J Biol Chem*, 280(15), pp. 14572-8.
- Raghavan, R., Groisman, E. A. and Ochman, H. (2011) 'Genome-wide detection of novel regulatory RNAs in *E. coli*', *Genome Res*, 21(9), pp. 1487-97.
- Ramirez-Pena, E., Trevino, J., Liu, Z., Perez, N. and Sumbly, P. (2010) 'The group A *Streptococcus* small regulatory RNA FasX enhances streptokinase activity by increasing the stability of the *ska* mRNA transcript', *Mol Microbiol*, 78(6), pp. 1332-47.
- Rauhut, R. and Klug, G. (1999) 'mRNA degradation in bacteria', *FEMS Microbiol Rev*, 23(3), pp. 353-70.
- Redder, P., Hausmann, S., Khemici, V., Yasrebi, H. and Linder, P. (2015) 'Bacterial versatility requires DEAD-box RNA helicases', *FEMS Microbiol Rev*, 39(3), pp. 392-412.
- Rees, J. S. and Lilley, K. S. (2011) 'Method for suppressing non-specific protein interactions observed with affinity resins', *Methods*, 54(4), pp. 407-12.
- Resch, A., Vecerek, B., Palavra, K. and Blasi, U. (2010) 'Requirement of the CsdA DEAD-box helicase for low temperature riboregulation of *rpoS* mRNA', *RNA Biol*, 7(6), pp. 796-802.
- Rocak, S., Emery, B., Tanner, N. K. and Linder, P. (2005) 'Characterization of the ATPase and unwinding activities of the yeast DEAD-box protein Has1p and the analysis of the roles of the conserved motifs', *Nucleic Acids Res*, 33(3), pp. 999-1009.
- Rocak, S. and Linder, P. (2004) 'DEAD-box proteins: the driving forces behind RNA metabolism', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5(3), pp. 232-41.
- Romeo, T. (1998) 'Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non-coding RNA molecule CsrB', *Mol Microbiol*, 29(6), pp. 1321-30.
- Romeo, T., Gong, M., Liu, M. Y. and Brun-Zinkernagel, A. M. (1993) 'Identification and molecular characterization of *csrA*, a pleiotropic gene from *Escherichia coli* that affects glycogen biosynthesis, gluconeogenesis, cell size, and surface properties', *J Bacteriol*, 175(15), pp. 4744-55.
- Romeo, T., Vakulskas, C. A. and Babitzke, P. (2013) 'Post-transcriptional regulation on a global scale: form and function of Csr/Rsm systems', *Environ Microbiol*, 15(2), pp. 313-24.
- Rossier, O., Van den Ackerveken, G. and Bonas, U. (2000) 'HrpB2 and HrpF from *Xanthomonas* are type III-secreted proteins and essential for pathogenicity and recognition by the host plant', *Mol Microbiol*, 38(4), pp. 828-38.
- Sandkvist, M. (2001) 'Type II secretion and pathogenesis', *Infect Immun*, 69(6), pp. 3523-35.
- Sauer, E. (2013) 'Structure and RNA-binding properties of the bacterial LSm protein Hfq', *RNA Biol*, 10(4), pp. 610-8.
- Schmidtke, C., Abendroth, U., Brock, J., Serrania, J., Becker, A. and Bonas, U. (2013) 'Small RNA sX13: a multifaceted regulator of virulence in the plant pathogen *Xanthomonas*', *PLoS Pathog*, 9(9), pp. e1003626.
- Schmidtke, C., Findeiss, S., Sharma, C. M., Kuhfuss, J., Hoffmann, S., Vogel, J., Stadler, P. F. and Bonas, U. (2012) 'Genome-wide transcriptome analysis of the plant pathogen *Xanthomonas* identifies sRNAs with putative virulence functions', *Nucleic Acids Res*, 40(5), pp. 2020-31.
- Schroeder, C. L., Narra, H. P., Sahni, A., Rojas, M., Khanipov, K., Patel, J., Shah, R., Fofanov, Y. and Sahni, S. K. (2016) 'Identification and characterization of novel small RNAs in *Rickettsia prowazekii*', *Front Microbiol*, 7, pp. 859.

- Schulze, S., Kay, S., Buttner, D., Egler, M., Eschen-Lippold, L., Hause, G., Kruger, A., Lee, J., Muller, O., Scheel, D., Szczesny, R., Thieme, F. and Bonas, U. (2012) 'Analysis of new type III effectors from *Xanthomonas* uncovers XopB and XopS as suppressors of plant immunity', *New Phytol*, 195(4), pp. 894-911.
- Shakhnovich, E. A., Davis, B. M. and Waldor, M. K. (2009) 'Hfq negatively regulates type III secretion in EHEC and several other pathogens', *Mol Microbiol*, 74(2), pp. 347-63.
- Sharma, C. M. and Vogel, J. (2009) 'Experimental approaches for the discovery and characterization of regulatory small RNA', *Curr Opin Microbiol*, 12(5), pp. 536-46.
- Silby, M. W. and Levy, S. B. (2008) 'Overlapping protein-encoding genes in *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1', *PLoS Genet*, 4(6), pp. e1000094.
- Silverman, E., Edwalds-Gilbert, G. and Lin, R. J. (2003) 'DExD/H-box proteins and their partners: helping RNA helicases unwind', *Gene*, 312, pp. 1-16.
- Sittka, A., Lucchini, S., Papenfort, K., Sharma, C. M., Rolle, K., Binnewies, T. T., Hinton, J. C. and Vogel, J. (2008) 'Deep sequencing analysis of small noncoding RNA and mRNA targets of the global post-transcriptional regulator, Hfq', *PLoS Genet*, 4(8), pp. e1000163.
- Sittka, A., Pfeiffer, V., Tedin, K. and Vogel, J. (2007) 'The RNA chaperone Hfq is essential for the virulence of *Salmonella typhimurium*', *Mol Microbiol*, 63(1), pp. 193-217.
- Steitz, J. A. (1969) 'Polypeptide chain initiation: nucleotide sequences of the three ribosomal binding sites in bacteriophage R17 RNA', *Nature*, 224(5223), pp. 957-64.
- Tan, H., Zhang, L., Zhao, Q., Chen, R., Liu, C., Weng, Y., Peng, Q., Bai, F., Cheng, Z., Jin, S., Wu, W. and Jin, Y. (2016) 'DeaD contributes to *Pseudomonas aeruginosa* virulence in a mouse acute pneumonia model', *FEMS Microbiol Lett*, 363(20).
- Tanner, N. K. (2003) 'The newly identified Q motif of DEAD box helicases is involved in adenine recognition', *Cell Cycle*, 2(1), pp. 18-9.
- Thieme, F., Koebnik, R., Bekel, T., Berger, C., Boch, J., Buttner, D., Caldana, C., Gaigalat, L., Goesmann, A., Kay, S., Kirchner, O., Lanz, C., Linke, B., McHardy, A. C., Meyer, F., Mittenhuber, G., Nies, D. H., Niesbach-Klosgen, U., Patschkowski, T., Ruckert, C., Rupp, O., Schneiker, S., Schuster, S. C., Vorholter, F. J., Weber, E., Puhler, A., Bonas, U., Bartels, D. and Kaiser, O. (2005) 'Insights into genome plasticity and pathogenicity of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by the complete genome sequence', *J Bacteriol*, 187(21), pp. 7254-66.
- Toledo-Arana, A., Dussurget, O., Nikitas, G., Sesto, N., Guet-Revillet, H., Balestrino, D., Loh, E., Gripenland, J., Tiensuu, T., Vaitkevicius, K., Barthelemy, M., Vergassola, M., Nahori, M. A., Soubigou, G., Regnault, B., Coppee, J. Y., Lecuit, M., Johansson, J. and Cossart, P. (2009) 'The *Listeria* transcriptional landscape from saprophytism to virulence', *Nature*, 459(7249), pp. 950-6.
- Toledo-Arana, A., Repoila, F. and Cossart, P. (2007) 'Small noncoding RNAs controlling pathogenesis', *Curr Opin Microbiol*, 10(2), pp. 182-8.
- Vakulskas, C. A., Pannuri, A., Cortes-Selva, D., Zere, T. R., Ahmer, B. M., Babitzke, P. and Romeo, T. (2014) 'Global effects of the DEAD-box RNA helicase DeaD (CsdA) on gene expression over a broad range of temperatures', *Mol Microbiol*, 92(5), pp. 945-58.
- Van Assche, E., Van Puyvelde, S., Vanderleyden, J. and Steenackers, H. P. (2015) 'RNA-binding proteins involved in post-transcriptional regulation in bacteria', *Front Microbiol*, 6, pp. 141.
- Vanderpool, C. K. and Gottesman, S. (2007) 'The novel transcription factor SgrR coordinates the response to glucose-phosphate stress', *J Bacteriol*, 189(6), pp. 2238-48.

- Wächter, K., Kohn, M., Stohr, N. and Huttelmaier, S. (2013) 'Subcellular localization and RNP formation of IGF2BPs (IGF2 mRNA-binding proteins) is modulated by distinct RNA-binding domains', *Biol Chem*, 394(8), pp. 1077-90.
- Wadler, C. S. and Vanderpool, C. K. (2007) 'A dual function for a bacterial small RNA: SgrS performs base pairing-dependent regulation and encodes a functional polypeptide', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(51), pp. 20454-9.
- Wang, S., Hu, Y., Overgaard, M. T., Karginov, F. V., Uhlenbeck, O. C. and McKay, D. B. (2006) 'The domain of the *Bacillus subtilis* DEAD-box helicase YxiN that is responsible for specific binding of 23S rRNA has an RNA recognition motif fold', *RNA*, 12(6), pp. 959-67.
- Waters, L. S., Sandoval, M. and Storz, G. (2011) 'The *Escherichia coli* MntR miniregulon includes genes encoding a small protein and an efflux pump required for manganese homeostasis', *J Bacteriol*, 193(21), pp. 5887-97.
- Waters, L. S. and Storz, G. (2009) 'Regulatory RNAs in bacteria', *Cell*, 136(4), pp. 615-28.
- Wengelnik, K. and Bonas, U. (1996) 'HrpXv, an AraC-type regulator, activates expression of five of the six loci in the *hrp* cluster of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*', *J Bacteriol*, 178(12), pp. 3462-9.
- Wengelnik, K., Marie, C., Russel, M. and Bonas, U. (1996a) 'Expression and localization of HrpA1, a protein of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* essential for pathogenicity and induction of the hypersensitive reaction', *J Bacteriol*, 178(4), pp. 1061-9.
- Wengelnik, K., Rossier, O. and Bonas, U. (1999) 'Mutations in the Regulatory Gene *hrpG* of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* Result in Constitutive Expression of All *hrp* Genes', *J Bacteriol*, 181(21), pp. 6828-31.
- Wengelnik, K., Van den Ackerveken, G. and Bonas, U. (1996b) 'HrpG, a key *hrp* regulatory protein of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is homologous to two-component response regulators', *Mol Plant Microbe Interact*, 9(8), pp. 704-12.
- Zhang, A., Wassarman, K. M., Rosenow, C., Tjaden, B. C., Storz, G. and Gottesman, S. (2003) 'Global analysis of small RNA and mRNA targets of Hfq', *Mol Microbiol*, 50(4), pp. 1111-24.

## 7 Anhang

**Tabelle 13: Sonden zur Validierung neuer sRNAs**

Sondenbezeichnung	Sequenz	Northern
sRNA_1	TCGTCGTGTCATTGCATTGG	mRNA
sRNA_2	AGCGCGGCCACGAATCCTGC	sX18
sRNA_3	GGACAGACGACCAAGGGATG	mRNA
sRNA_4	CCACGGAGCTTACAGGGAC	leer
sRNA_5	TGCACCGTCTTCCTGTA ACT	leer
sRNA_6	CCCCTGAAGAAATGTGTGGC	mRNA
sRNA_7	GTTCTAGTTGGCCGCTGATG	sRNA
sRNA_8	CTTTCTTACGTGGCCCCTGT	leer
sRNA_9	GGGCACAGCACCATAGTTTG	leer
sRNA_10	TGTCTCTGCTCATCGTCACT	leer
sRNA_11	CGCTTGGCATCAGACTGTTT	mRNA
sRNA_12	GAGACGGGATTCTTCGATGC	leer
sRNA_13	TTAGCCAAGCTCCAAGTGTG	leer
sRNA_14	GATCCTGTTCTTGTCTCCCG	leer
sRNA_15	CTGCATGATTAGATCCAACG	leer
sRNA_16	CAGTTCTGTACGAGCGTCTG	leer
sRNA_17	AAAATGCGGCCTAACA ACTC	leer
sRNA_18	GATCTTTACCGAGCCCTGG	sRNA
sRNA_19	CATGAACAAGCCGGACACTC	leer
sRNA_20	GATGCAGGATCATAGTGCGC	leer
sRNA_21	CACATTTCTCGGCTGGAATC	leer
sRNA_22	GCGCCTGTTTTCTTCATCTC	leer
sRNA_23	CACACACTCAAGAGCCCATG	leer
sRNA_24	CGCTTGAATTCGTGAAGG	leer
sRNA_25	ATGCATCAAACCAGGGCAA	sRNA
sRNA_26	CTCCATGTGATCCCAGCATT	sRNA
sRNA_27	ATTCATGGCGCCGAAAAG	leer
sRNA_28	CGACAGATTCATGTTGACGT	leer
sRNA_29	AGCGTGAAACTTTTGGTCTC	leer
sRNA_30	CCTTTGGGTTACTGCCTTTC	leer
sRNA_31	GGTTGGCGTTATTGAGGTTG	sRNA
sRNA_32	AATGCATCTCTGTCACCACA	sRNA
sRNA_33	TGTCATGCAGGTGTAACAAA	leer
sRNA_34	CGTTGTCGATACCAGCATCT	leer
sRNA_35	CGTTTTGCTCAATGACACC	leer
sRNA_36	GGGCAGGTTTCCTTCAATG	sRNA

Sondenbezeichnung	Sequenz	Northern
sRNA_37	CGACTGGTGGCGCATGGCGT	sRNA
sRNA_38	CGATTCTTTGCGTCTCTCAC	leer
sRNA_39	GAGAGTGATAAGCGCAACAG	leer
sRNA_40	GACGAATCCTGTCAGCTCTC	leer
sRNA_41	TTTCTACAACCGTGGCATCA	leer
sRNA_42	GTTTTGCGGGTTTCACAG	leer
sRNA_43	GCTGCGGTCAAAGGTGAT	leer
sRNA_44	GCCGTAGGCCTTATGAAACA	leer
sRNA_45	AATTACGTTCTCGCCACCAC	sRNA
sRNA_46	TGGTGCTGACGAAATGAGAA	leer
sRNA_47	TGGAAGGCTAAGACGCAGAT	leer
sRNA_48	GTTGCCGTTAGTGTGGATGA	leer
sRNA_49	GCATCCAATACAGCAGCAGA	leer
sRNA_50		nicht getestet
sRNA_51	CGCTCCTTGGGACTAGATTG	leer
sRNA_52	TAGACCTGGTAGGGGAAGTG	leer
sRNA_53	GACGATGAGTGAGCTGTACG	leer
sRNA_54	TGTAAGCCTCCTCATGTGC	leer
sRNA_55	CGAAGAAATCTCCAGCAAGG	leer
sRNA_56	ATGACATGGGCAACTCCACT	leer
sRNA_57	AGCGATCAATGGATTTTTGC	leer
sRNA_58	GTGTCCAGTTGGTTGGCTTT	leer
sRNA_59	GTTGCGTGTGCAGTGGTG	leer
sRNA_60	ATTTCCGCATTTTCACTTGG	leer
sRNA_61	TTTTGACAGCGTTGGCCTAT	mRNA
sRNA_62	TGCCCTTAACAAGCAGATCC	leer
sRNA_63	TTACTGGAATCACGGCCTTC	leer
sRNA_64	CCTTCGCAGTTCATGTAGCA	leer
sRNA_65	GGCCCTAACGACCTATCTTC	sRNA
sRNA_66	TTGGCAACCCATCTTCTCAT	leer
sRNA_67	GCCGCTAGCCAACTCTATTG	sRNA
sRNA_68	ATTAATCCACAGGCGGTGAC	leer
sRNA_69	ACTCCCATGGACGGGTTC	leer
sRNA_70	CCGTACCGTCATGTCACAAA	mRNA
sRNA_71	GTCTGACGGTTGCTGATGAC	leer
sRNA_72	TTGTTTCAGTTGCCCTCGAT	sRNA
sRNA_73	CAATAGGATCAATGCGATGC	leer
sRNA_74	ACTCTCTCCGCAGCAATGT	leer
sRNA_75	TTTCTGACGTGAGTCGTTTCG	leer
sRNA_76	CGCCTTTTCATCCGTGTC	leer



Sondenbezeichnung	Sequenz	Northern
sRNA_77	GGGGTGATCCAAAAATGATA	leer
sRNA_78	CTTGGCTATGATCGGGTATC	leer
sRNA_79	AGGCTTACGAGGCTTCATC	leer
sRNA_80	CTTGCAAGAAGAGCTGACG	leer
sRNA_81	AGCTGCCTCTCTTCACTTG	leer
sRNA_82	CTAACAAGACGTAGCGAGCA	leer
sRNA_83	CTGTCTCGATGGTGACGTG	leer
sRNA_84	CCTGAAATGTCTCGAAGGAC	leer
sRNA_85	CTTCTACAGTCACCGCAAGA	leer
sRNA_86	GAACAGTGAATGGCCTTACC	leer
sRNA_87	ATTGGGTAAAAGTGCAGACG	leer
sRNA_88	GATCCTGCAACGCAACATT	leer
sRNA_89	TTTGTGGATCGACTTGATTG	Leer

**Tabelle 14: Mittels MS identifizierte Proteine, nach Pulldown mit sX4 der Kontrolle**

UniProt Identifier	Beschreibung	Menge (fmol/ $\mu$ l) nach Pulldown mit sX4	Menge (fmol/ $\mu$ l) in Kontrollregion)
Q3BRA8	ATP abhängige RNA Helikase; DeaD	26,1	3,0
Q3BXJ0	Mutmaßlicher ABC- Transporter	14,0	2,3
Q3BSD0	DNA-mismatch Reparaturprotein; mutL	9,2	0,7
Q3BP11	ATP-Synthase	8,3	4,4
Q3BM99	ATP-abhängige DNA Helikase	5,6	0,7
Q3BQD6	ABC-Transporter	5,4	0,4
Q3BSV9	Ribonuklease E	3,8	
Q3BP62	Uncharakterisiertes Protein	3,5	
Q3BZ99	Uncharakterisiertes Protein	3,3	0,5
Q3BUT4	DNA Topoisomerase 4	3,2	0,4
Q3BSE6	ABC-Transporter	3,2	
Q3BW08	Histidinkinase Antwortregulator	3,1	

UniProt Identifier	Beschreibung	Menge (fmol/μl) nach Pulldown mit sX4	Menge (fmol/μl) in Kontrollregion)
Q3C017	Uncharakterisiertes Protein	2,9	
Q3BNX8	Histidinkinase Antwortregulator	2,8	
Q3BWR2	Phosphat-Kinase	2,8	
Q3BTZ2	Histidinkinase	2,8	
Q3BTY3	ATP-abhängige Protease; ClpA	2,5	
Q3BV75	Ribonuklease R	2,4	
Q3BWW0	Elongationsfaktor; TypA	2,3	
Q3BMW4	Glukose-6-Phosphat- 1-Dehydrogenase	2,2	0,3
Q3BRP4	Transkriptions Terminator; NusA	2,1	4,1
Q3BSL5	Pseudouridin- Synthase	2,1	0,3
Q3BUX4	Histidinkinase Antwortregulator	1,9	
Q3BZ11	Biotin Carboxylase	1,9	5,3
Q3BVV9	Elongationsfaktor 4	1,6	
Q3BPY7	Multifunktionales Fusionsprotein	1,3	
Q3BMH2	Glycin-tRNA-Ligase	1,2	
Q3BNH6	Transkriptions- Terminationsfaktor Rho	0,9	
Q3BYH5	Glykogen Operon Protein; GlgX		2,7
Q3BP03	Komponente von Pyruvat- Dehydrogesase Komplex		0,7
Q3BSN6	30S ribosomales Protein		0,6
Q3BS21	Chaperon; HtpG		0,6
Q3BWP9	Lon Protease		0,4
Q3BVB8	Chaperon; DnaK		0,3

UniProt Identifier	Beschreibung	Menge (fmol/ $\mu$ l) nach Pulldown mit sX4	Menge (fmol/ $\mu$ l) in Kontrollregion)
Q3BP05	Dihydrolipoyl Dehydrogenase		0,3
Q3BWZ0	RNA-Polymerase Untereinheit		1,3
Q3BQ64	Glykogen Operon Protein, GlgX2		0,1
Q3BRI2	Metallopeptidase		0,7
Q3BW21	Mutmaßliche Glycyl- Aminopeptidase		0,3
Q3BXT2	PepN Protein		0,4
Q3BMX4	Mutmaßliches Thioredoxin		0,4
Q3BZQ8	Ctp Protein		0,2

**Tabelle 15: qRT-PCR Daten von *groEL* (Referenz), *hrpG*, *hrpX*, *hrcC* und *hrcJ* von drei biologischen Replikaten.**

Experiment 1	GroEL	HrpG	HrpX	HrcC	HrcJ
85-10	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
$\Delta$ <i>deaD</i>	1,50	0,13	0,28	0,29	0,25
$\Delta$ <i>deaD pdeaD</i>	0,80	2,93	1,51	2,77	5,00
85-10 <i>pdeaD</i>	1,10	4,00	3,34	0,75	3,18
Experiment 2	GroEL	HrpG	HrpX	HrcC	HrcJ
85-10	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
$\Delta$ <i>deaD</i>	1,36	0,26	0,31	0,31	0,28
$\Delta$ <i>deaD pdeaD</i>	1,21	1,48	0,69	1,77	3,36
85-10 <i>pdeaD</i>	1,57	1,28	0,53	1,72	3,20
Experiment 3	GroEL	HrpG	HrpX	HrcC	HrcJ
85-10	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
$\Delta$ <i>deaD</i>	1,45	0,17	0,28	0,65	0,38
$\Delta$ <i>deaD pdeaD</i>	0,91	0,97	0,46	3,21	4,01
85-10 <i>pdeaD</i>	1,57	0,56	0,31	2,22	2,99

## 8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt **Ulla Bonas**, die mir während der letzten Jahre als Mentorin zur Seite stand. Unsere gemeinsame Arbeit gestaltete sich als sehr konstruktiv und produktiv. Besonders bei aufkommenden Problemen stand Ulla stets mit guten Ideen an meiner Seite und war auch aufgeschlossen gegenüber neuen Wegen. Vielen Dank, dass ich darauf bauen konnte, eine kompetente und durchsetzungsfähige Wissenschaftlerin als Beraterin zu haben, die in der Lage war mir den Rücken zu stärken.

**Cornelius Schmidtke** leistete wichtige Vorarbeiten für das Thema meiner Dissertation. Durch ihn war die Methodik für die Identifikation neuer sRNAs bereits etabliert und einige sRNAs, auf die ich für Mutagenese-Studien zurückgegriffen habe bekannt. Genauso wichtig für mich war jedoch die Beratung durch **Cornelius**. Gemeinsam entwickelten wir Ideen und Strategien, die wir im Anschluss mit Ulla diskutieren konnten. Dabei war Cornelius fachliche Kompetenz ebenso ausgeprägt, wie sein Einfühlungsvermögen. Vielen Dank für die gemeinsame Zeit, dein Engagement und dein Ideenreichtum.

Weitere Vorarbeiten in Form eines RNA-*seq*-Datensatzes wurden durch **Evelyn Löschner** erbracht. Vielen Dank, dass ich darauf zurückgreifen durfte. Außerdem möchte ich mich bei **Evelyn** und bei **Ulrike Abendroth** für die Beratung und Unterstützung im Laborbereich bedanken.

**Hannelore Espenhahn** danke ich für die Ausführung von alltäglichen Laborarbeiten, durch die ich viel Zeit sparen konnte. **Matthias Jordan** danke ich für die Durchführung der *in planta* Wachstumskurven.

**Bianca Rosinsky** danke ich für die liebevolle Anzucht unserer Versuchspflanzen.

Ich möchte mich außerdem bei allen bedanken, die den Arbeitsplatz zu einem Ort gemacht haben, an dem ich mich wohl fühlen konnte. Mit **Peter John, Maik Reschke, Tina Hoppe und Johannes Ganter** genoss ich unzählige Mittagspausen, bei denen manchmal Tränen gelacht wurden. Mit **Jens Hausner** führten zufällige Treffen auf dem Flur zu spannenden fachlichen Diskussionen, in die wir uns spontan vertiefen konnten.

Weiterhin danke ich allen bisher nicht namentlich erwähnten **Mitgliedern der AG-Bonas**, die mich auf meinem Weg begleiteten.

Mein Dank gilt außerdem dem **GRK1591** für die Finanzierung und den spannenden Austausch mit Wissenschaftlern auf thematisch nahegelegenen Gebieten. Im Besonderen bedanke ich mich bei **Sven-Erik Behrens** und **Selma Gago-Zachert**, die die Arbeit im Rahmen unserer Thesis Committees mit neuen Ideen bereicherten. **Marcel Köhn** gilt mein Dank für das Anlernen des Pulldown-Experiments.

Mein Dank gilt auch **Sacha Baginsky** und **Stefan Helm**, die die MS-gestützte Identifikation von DeaD möglich gemacht haben.

## 9 Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe. Mit dieser Arbeit bewerbe ich mich erstmals um die Erlangung des Doktorgrades.

Halle (Saale), 20.02.2020

Unterschrift

## 10 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name                      Monika Dorothea Helm (geb. Arnold)

### Beruflicher Werdegang

Mai 2018-Februar 2020    Verfassen der Dissertation und Elternzeit

Nov. 2014-April 2018    **wissenschaftliche Mitarbeiterin** an der MLU Halle-Wittenberg mit dem Ziel des Verfassens einer Dissertation; Anstellung im Rahmen des Graduiertenkollegs 1591. Thema der Dissertation: „Charakterisierung neuer sRNAs und RNA-Bindeproteine im Pflanzenpathogen *Xanthomonas*“; Betreuung: Prof. Dr. Ulla Bonas, Bereich Pflanzengenetik

Okt. 2012-Okt. 2014    **Master Studium Biochemie und Biotechnologie** an der MLU Halle-Wittenberg (Gesamtprädikat 1,3). Abschlussarbeit am Leibniz Institut für Pflanzenbiochemie bei Prof. Dr. Bettina Hause mit dem Thema: Identifizierung früher OPDA responsiver Gene in *Arabidopsis thaliana* (Publikation: Arnold MD. (2016) The Recently Identified Isoleucine Conjugate of cis-12-Oxo-Phytodienoic Acid Is Partially Active in cis-12-Oxo-Phytodienoic Acid-Specific Gene Expression of *Arabidopsis thaliana*; PLoS One)

Okt. 2009-Sept. 2012    **Bachelor Studium Biochemie und Biotechnologie** an der MLU Halle-Wittenberg (Gesamtprädikat 2,8)

Juli 2008-Sept. 2009    Sechs monatiges Praktikum am Gemeinschaftskrankenhaus Herdecke und vier monatiges Praktikum am Leibniz-Institut für Arbeitsforschung an der TU Dortmund (Toxikologie)

Juni 2008                      Abitur an der Friedrich-Harkort-Schule Herdecke

Halle (Saale), 20.02.2020