

Translationskopplung via Termination-Reinitiation in Archaea und Bacteria

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

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

von

Madeleine Huber

aus Ditzingen

Frankfurt am Main 2021

(D30)

Vom Fachbereich Biowissenschaften (15)
der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Sven Klimpel

Erstgutachter: Prof. Dr. Jörg Soppa

Zweitgutachter: Prof. Dr. Eckard Boles

Datum der Disputation:

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Zusammenfassung.....	viii
II. Einleitung	1
1. Die drei Domänen des Lebens	1
2. Modellorganismen	4
3. Genexpression	5
4. Gekoppelte Translation an bicistronischer mRNA	12
5. Termination-Reinitiation.....	15
6. Zielsetzung der Arbeit.....	17
III. Material und Methoden	18
1. Materialien	18
1.1. Laborausstattung	18
1.2. Chemikalien	19
1.3. Verbrauchsmaterialien	21
1.4. Oligonukleotide	22
1.5. Kit-Systeme.....	26
1.6. Größenstandards	27
1.7. Computerprogramme und Datenbanken.....	27
1.8. Enzyme	28
1.9. Plasmide	29
2. Organismen und Kultivierung	30
2.1. Organismen.....	30
2.1.1. Anzucht von <i>H. volcanii</i>	31
2.1.2. Anzucht von <i>E. coli</i>	32
2.1.3. Anlegen von Dauerkulturen	34
2.1.4. Zelldichtebestimmung.....	35

2.1.5.	Transformation von den verwendeten Organismen.....	35
3.	Methoden	37
3.1.	Molekularbiologische Methoden.....	37
3.1.1.	Isolierung und Reinigung von DNA.....	37
3.1.2.	Photometrische Bestimmung von Nukleinsäuren	39
3.1.3.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	39
3.1.4.	Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung von Nukleinsäuren	45
3.1.5.	Klonieren	46
3.1.6.	Sequenzierung	48
3.1.7.	Isolierung von RNA.....	48
3.1.8.	Denaturierende RNA-Agarosegelelektrophorese	49
3.1.9.	Northern-Blot	50
3.1.10.	Quantitative PCR (qPCR)	54
3.1.11.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)	55
3.1.12.	Western-Blot.....	59
3.1.13.	Isolierung von Ribosomen	61
3.1.14.	Markierung von Ribosomen mit 6xHis-Tag.....	62
3.1.15.	<i>in vitro</i> Transkription	62
3.1.16.	Herstellung von S30 Lysat.....	63
3.1.17.	Entfernung von ribosomalen Untereinheiten mittels His-Tag.....	64
3.1.18.	Zellfreie Protein Expression mittels <i>in vitro</i> Translation	65
3.2.	Biochemische Methoden	67
3.2.1.	Enzymassays	67
3.2.2.	Gesamt Proteinbestimmung mittels Bicinchoninsäure.....	76
IV.	Ergebnisse	77
1.	Termination-Reinitiation in <i>Haloferax volcanii</i>	77
2.	Intragene Shine-Dalgarno Sequenzen in <i>Haloferax volcanii</i>	80
3.	Termination-Reinitiation in <i>Escherichia coli</i>	83

4.	Intragene Shine-Dalgarno Sequenzen in <i>Escherichia coli</i>	85
5.	Bioinformatische Analyse von 720 prokaryotischen Genomen.....	87
6.	Intergene Bereiche in <i>Haloflexax volcanii</i>	93
7.	Intergene Bereiche in <i>Escherichia coli</i>	97
8.	Bioinformatische Analyse intergener Bereiche	99
9.	Etablierung einer Methode zur Untersuchung des Mechanismus der Termination-Reinitiation	101
V.	Diskussion.....	114
1.	Gekoppelte Translation an überlappenden Genpaaren in Archaea und Bacteria	114
2.	Intergene SD Sequenzen und deren Funktion in der Termination-Reinitiation	117
3.	Abstände zwischen Genen auf polycistronischer mRNA und die Bedeutung für die gekoppelte Translation	122
4.	Optimierung einer Methode zur genauen Untersuchung des Termination-Reinitiations-Mechanismus in Prokaryoten	124
VI.	Literaturverzeichnis	129
VII.	Anhang.....	142
1.	Abkürzungsverzeichnis.....	142
2.	Abbildungen und Tabellen.....	144
3.	Tagungsbeiträge.....	157
4.	Danksagung	158
5.	Curriculum Vitae	159
6.	Erklärung	160

Abbildungsverzeichnis

	Seite
Abbildung 1 Stammbaum der drei Domänen des Lebens.	2
Abbildung 2 SD Sequenzen innerhalb überlappender Genpaare.	11
Abbildung 3 Mechanismen der Translationsinitiation an Genen auf polycistronischer mRNA.	14
Abbildung 4 Schematische Darstellung der Translationskopplung bei eukaryontischen Viren.	15
Abbildung 5 Termination-Reinitiation in <i>H. volcanii</i>	80
Abbildung 6 Intragene SD Sequenzen in <i>H. volcanii</i>	82
Abbildung 7 Termination-Reinitiation in <i>E. coli</i>	85
Abbildung 8 Intragene SD Sequenzen in <i>E. coli</i>	87
Abbildung 9 Bioinformatische Analyse von 720 annotierten prokaryotischen Genomen auf SD Sequenzen.	90
Abbildung 10 Bioinformatische Analyse von 720 annotierten prokaryotischen Genomen auf starke SD Sequenzen.	92
Abbildung 11 Intergene Bereiche in <i>H. volcanii</i>	96
Abbildung 12 Intergene Bereiche in <i>E. coli</i>	98
Abbildung 13 Bioinformatische Analyse zu Abständen von seriellen Genpaaren. ...	100
Abbildung 14 Versuchsablauf zu 30S und 70S Unterscheidung bei der Termination-Reinitiation in <i>E. coli</i>	103
Abbildung 15 <i>In vitro</i> Transkriptions-Verifizierung mittels Polyacrylamidgel.	104
Abbildung 16 Schematische Darstellung der mRNA-Konstrukte.	105
Abbildung 17 Proteinnachweis mittels Coomassie- und Silberfärbung.	106
Abbildung 18 50S Untereinheit Isolation aus S30 Lysat mittels His-Tag markiertem L33.	108
Abbildung 19 GFP-Nachweis von GFP nach <i>in vitro</i> Translation mittels S30 Lysat.	109
Abbildung 20 Ribosomenprofile mit Verifizierung mittels RNA-Agarosegel und Protein Gel.	110
Abbildung 21 Test der Ribosomenfunktionalität.	111
Abbildung 22 Massen-Spektrum der 50S Untereinheiten.	112
Abbildung 23 Schematischer Aufbau einer PLGA mRNA nach (Mawn <i>et al.</i> , 2002)..	113

Tabellenverzeichnis

	Seite
Tabelle 1 Verwendete Geräte sowie deren Hersteller	18
Tabelle 2 Verwendete Chemikalien und deren Hersteller.....	19
Tabelle 3 Verwendete Materialien und deren Hersteller	21
Tabelle 4 Oligonukleotide zur Klonierung von Plasmidkonstrukten mit ihrer Beschreibung und Sequenz.....	22
Tabelle 5 Oligonukleotide zur Herstellung von Sonden	24
Tabelle 6 Oligonukleotide für die Zielgerichtete Mutagenese	25
Tabelle 7 TE Puffer.....	26
Tabelle 8 Verwendete Kits mit deren Verwendung und Herstellern.....	26
Tabelle 9 Verwendete Größenstandards und deren Hersteller.....	27
Tabelle 10 Verwendete Software und Datenbanken	27
Tabelle 11 Restriktionsenzyme mit Erkennungssequenz und Hersteller	28
Tabelle 12 Polymerasen und Ligasen und deren Hersteller	28
Tabelle 13 Sonstige Enzyme deren Beschreibung und Hersteller	29
Tabelle 14 Bakterienstämme mit ihrem Genotyp und Herkunft	30
Tabelle 15 <i>Haloferax volcanii</i> Stämme mit ihrem Genotyp und ihrer Herkunft.....	31
Tabelle 16 Komplex Medium	31
Tabelle 17 <i>E. coli</i> Medium	33
Tabelle 18 Lösungen für die Transformation von <i>H. volcanii</i>	36
Tabelle 19 Lösungen zur Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i>	37
Tabelle 20 Lösungen für die Isolation genomischer DNA aus <i>H. volcanii</i>	38
Tabelle 21 PCR Ansatz der Phusion-Polymerase	40
Tabelle 22 PCR Programm für die Phusion- Polymerase.....	40
Tabelle 23 Fusions-PCR Programm.....	41
Tabelle 24 PCR-Ansatz für die Site-Directed-Mutagenesis	41
Tabelle 25 PCR-Programm für die Site-Directed-Mutagenesis-PCR.....	42
Tabelle 26 Lösungen für die laboreigene <i>Taq</i> -PCR.....	43
Tabelle 27 PCR-Ansatz für die Laboreigene <i>Taq</i> -Polymerase	43
Tabelle 28 PCR-Programm für die laboreigene <i>Taq</i> -Polymerase.....	44
Tabelle 29 PCR-Ansatz für die Biozym <i>Taq</i> -Polymerase	44
Tabelle 30 PCR-Programm für die Biozym <i>Taq</i> -Polymerase.....	44
Tabelle 31 Lösungen für die Herstellung Digoxygenin-markierter Sonden	45

Tabelle 32 Lösungen für die DNA-Gelelektrophorese	46
Tabelle 33 blunt-End-Ligation.....	47
Tabelle 34 sticky-End-Ligation.....	47
Tabelle 35 Puffer und Ansätze für das Gibson Assembly.....	48
Tabelle 36 Lösungen für die RNA-Isolation	49
Tabelle 37 Lösungen für RNA-Gele.....	50
Tabelle 38 Lösungen für den Northern-Blot.....	51
Tabelle 39 Lösungen für die Hybridisierung einer Sonde	52
Tabelle 40 Lösungen für den Chemolumineszenznachweis.....	53
Tabelle 41 Ansatz einer cDNA Synthese mittels reverser Transkription.....	54
Tabelle 42 Ansatz für die qRT PCR.....	54
Tabelle 43 PCR Programm für die qRT-PCR	55
Tabelle 44 Puffer und Lösungen für die SDS-Gelelektrophorese	56
Tabelle 45 Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele für Polyacrylamidgele .	58
Tabelle 46 Lösungen für die Silberfärbung von SDS-Gelen	59
Tabelle 47 Lösungen für den Western-Blot	60
Tabelle 48 Zusammensetzung für ein Polyacrylamid-RNA Gel.....	63
Tabelle 49 Puffer für der S30 Lysat Herstellung	64
Tabelle 50 Puffer und Lösungen für die Affinitätsaufreinigung mit His-Tag	65
Tabelle 51 Puffer und Lösungen für eine <i>in vitro</i> Translation.....	66
Tabelle 52 Puffer und Lösungen für den DHFR Enzym-Asaay.....	69
Tabelle 53 Puffer und Lösungen für den AraDH Enzym-Assay.....	71
Tabelle 54 Puffer und Lösungen für den GlpD Enzymaktivitätstest.....	74
Tabelle 55 Puffer und Lösungen für den GusA Enzymaktivitätstest.....	76
Tabelle 56 Sequenzen der untersuchten überlappenden Genpaare in <i>H. volcanii</i> ...	78
Tabelle 57 Überlappende Genpaare und deren Sequenzen in <i>E. coli</i>	83
Tabelle 58 Konstrukte zur Analyse der intragenen Bereiche für <i>HVO_0685/0686</i> ...	93
Tabelle 59 Putative Formation von Proteinkomplexen Genpaare von <i>H. volcanii</i> und <i>E. coli</i>	101

I. Zusammenfassung

Operons wurden zuerst im Jahre 1961 beschrieben. Bis heute ist bekannt, dass die prokaryotischen Domänen Bacteria und Archaea Gene sowohl in monocistronischen als auch in bi- oder polycistronischen Transkripten exprimieren können. Häufig überlappen Gene sogar in ihren Sequenzen. Diese überlappenden Genpaare stehen nicht in Korrelation mit der Kompaktheit ihres Genoms. Das führt zu der Annahme, dass eine Art der Regulation vorliegt, welche weitere Proteine oder Gene nicht benötigt. Diese könnte eine gekoppelte Translation sein. Das bedeutet die Translation des stromabwärts-liegenden Gens ist abhängig von der Translation eines stromaufwärts-liegenden Gens. Diese Abhängigkeit kann zum Beispiel durch lang reichende Sekundärstrukturen entstehen, bei welchen Ribosomenbindestellen (RBS) des stromabwärts-liegenden Gens blockiert sind. Die *de novo*-Initiation am stromabwärts-liegenden Gen kann nur stattfinden, wenn das erste Gen translatiert wird und dabei die Sekundärstruktur an der RBS aufgeschmolzen wird. Für Genpaare in *E. coli* ist dieser Mechanismus gut untersucht. Ein anderes Beispiel für die Translationskopplung ist die Termination-Reinitiation, bei welcher ein Ribosom das erste Gen translatiert bis zum Stop-Codon, dort terminiert und direkt am stromabwärts-liegenden Start-Codon reinitiiert. Der Mechanismus via Termination-Reinitiation ist bis jetzt nur für eukaryontische Viren beschrieben worden. Im Gegensatz zu einer Kopplung über Sekundärstrukturen kommt es bei der Termination-Reinitiation am stromabwärts-liegenden Gen nicht zu einer *de novo*-Initiation sondern eine Reinitiation des Ribosoms findet statt. Diese Arbeit analysiert jene Art der Translationskopplung an Genen polycistronischer mRNAs in jeweils einem Modellorganismus als Vertreter der Archaea (*Haloferax volcanii*) und Bacteria (*Escherichia coli*). Hierfür wurden Reportergenvektoren erstellt, welche die überlappenden Genpaare an Reportergene fusionierten. Für diese Reportergene ist es möglich die Transkriptmenge zu quantifizieren sowie für die exprimierten Proteine Enzymassays durchgeführt werden können. Aus beiden Werten können Translationseffizienzen berechnet werden indem jeweils die Enzymaktivität pro Transkriptmenge ermittelt wird. Durch ein prämaures Stop-Codon in diesen Konstrukten ist es möglich zu unterscheiden ob es für die Translation des zweiten Gens essentiell ist, dass das Ribosom den Überlapp erreicht. Hiermit konnte für neun Genpaare in *H. volcanii* und vier Genpaare in *E. coli* gezeigt werden, dass eine Art

der Kopplung stattfindet bei der es sich um eine Termination-Reinitiation handelt. Des Weiteren wurde analysiert, welche Auswirkungen intragene Shine-Dalgarno Sequenzen bei dem Event der Translationskopplung besitzen. Durch die Mutation solcher Motive und dem Vergleich der Translationseffizienzen der Konstrukte, mit und ohne einer SD Sequenz, wird für alle analysierten Genpaare beider Modellorganismen gezeigt, dass die SD Sequenz einen Einfluss auf diese Art der Kopplung hat. Zwischen den Genpaaren ist dieser Einfluss jedoch stark variabel. Weiterhin wurde der maximale Abstand zwischen zwei bicistronischen Genen untersucht, für welchen Translationskopplung via Termination-Reinitiation noch stattfinden kann. Hierfür wird durch site-directed mutagenesis jeweils ein prämaures Stop-Codon im stromaufwärts-liegenden Gen eingebracht, welches den intergenen Abstand zwischen den Genen in den jeweiligen Konstrukten vergrößert. Der Vergleich aller Konstrukte eines Genpaars zeigt in beiden Modellorganismen, dass die Termination-Reinitiation vom intergenen Abstand abhängig ist und die Translationseffizienz des stromabwärts-liegenden Reporters bereits ab 15 Nukleotiden Abstand abnimmt.

Eine weitere Fragestellung dieser Arbeit war es, den genauen Mechanismus der Termination-Reinitiation zu analysieren. Für Ribosomen gibt es an der mRNA nach der Termination der Translation zwei Möglichkeiten: Entweder als 70S Ribosom bestehen zu bleiben und ein weiteres Start-Codon auf der mRNA zu suchen oder in seine beiden Untereinheiten zu dissoziieren, während die 50S Untereinheit die mRNA verlässt und die 30S Untereinheit über Wechselwirkungen an der mRNA verbleiben kann. Um diesen Mechanismus auf molekularer Ebene zu untersuchen, wird ein Versuchsablauf vorgestellt. Dieser ermöglicht das Event bei der Termination-Reinitiation *in vitro* zu analysieren. Eine Unterscheidung von 30S oder 70S Ribosomen bei der Reinitiation der Translation des stromabwärts-liegenden Gens wird ermöglicht. Die Idee dabei basiert auf einem *ribosome display*, bei welchem Translationskomplexe am Ende der Translation nicht in ihre Bestandteile zerfallen können, da die eingesetzte mRNA kein Stop-Codon enthält. Der genaue Versuchsablauf, die benötigten Bestandteile sowie *proof-of-principal* Versuche sind in der Arbeit dargestellt und mögliche Optimierungen werden diskutiert.

II. Einleitung

1. Die drei Domänen des Lebens

Das Leben auf der Erde wird heute in drei Domänen unterteilt. Bis 1977 erfolgte die Einteilung ausschließlich in Prokaryoten und Eukaryoten aufgrund der Tatsache, dass Eukaryoten einen membranumhüllten Zellkern besitzen welcher Prokaryoten fehlt (Reeve and Schmitz 2005). Eukaryoten gelten außerdem als deutlich größer im Vergleich zu Prokaryoten. Während Archaea für lange Zeit zu den Bacteria gezählt wurden, fand der Evolutionsbiologe Carl Woese mit seinen Kollegen eine phylogenetische Taxonomie, um die Organismen nach ihren 16S bzw. 18S rRNA Sequenzunterschieden einzuteilen. Es entstand ein Stammbaum, welcher Bacteria und Eukarya und damals neu Archaea in die bis heute bekannten drei Domänen des Lebens einteilt (Woese, Kandler, and Wheelis 1990). Im Laufe der Zeit kamen mittels neuer Techniken immer weitere und tiefere Erkenntnisse über die drei Domänen des Lebens hinzu, sodass eine aktuelle Version des Stammbaums, welcher in Abbildung 1 dargestellt ist, entstanden ist. Für einen höher diversifizierten Stammbaum wurden die Gensequenzen von 16 ribosomalen Proteinen miteinander verglichen. Hier sind auch nicht kultivierbare Bacteria (Candidate Phyla Radiation = CPR) gezeigt und der Stammbaum weist eine quantitative Visualisierung der Biodiversität auf (Hug *et al.* 2016). Die am meisten vertretenen Lebewesen sind demnach die Bacteria gefolgt von den Archaea und dann den Eukarya. Die Positionierung des Ursprungs der Eukarya ist ein sehr umstrittenes Thema (Williams *et al.* 2013; Pace 2006; Lake *et al.* 1984; Cox *et al.* 2008). Von Eukaryoten wird angenommen, dass sie evolutionäre Chimäre sind, welche durch endosymbiontische Fusion von Bacteria und Archaea entstanden sind (Martin *et al.* 2015). In dem hier gezeigten Stammbaum werden die Eukaryoten nach einer Reihe von ribosomalen Proteinsequenzen eingeordnet, was eine Einordnung anhand der Erbschaft, im Gegensatz zur Einordnung nach lipidischen oder zellulären Strukturen, ermöglicht (Williams *et al.* 2013).

Madigan *et al.* 2009). Bedingungen wie sehr hohe oder niedrige Temperaturen oder pH-Werte, hohe Salzkonzentrationen oder anoxische Bedingungen halten Archaea nicht von Ihrem Wachstum ab (Willey *et al.* 2008). Es konnte jedoch bewiesen werden, dass Archaea auch häufig in gemäßigteren Lebensräumen gefunden und isoliert werden können wie zum Beispiel in Böden und Seen (Alberts *et al.* 2002). So unterschiedlich wie die Lebensräume sind, sind demnach auch die bevorzugten Wachstumsbedingungen von Archaea. Sie können aerob, fakultativ aerob oder strikt anaerob wachsen. Auch die Morphologie ist sehr divers, so können sie zum Beispiel stäbchenförmig, kugelförmig, spiralförmig, kubisch, tellerförmig, unregelmäßig geformt oder pleomorph sein (Willey *et al.* 2008).

Bacteria decken den größten Teil der Biodiversität des Lebens auf der Erde ab (siehe Abbildung 1). Durch ihr ubiquitäres Vorkommen sind die Lebensräume und damit ihre bevorzugten Wachstumsbedingungen sehr divers. Viele Bakterien verdoppeln sich mit hoher Geschwindigkeit und verschiedene Organismen können die unterschiedlichsten Kohlenwasserstoffe als Energiequelle nutzen wie zum Beispiel Phenol oder Petroleum (Davis, Woods, and Niesel 1996). Die Fähigkeit wechselnde Umweltbedingungen schnell zu erkennen und sich daran anzupassen ist für Bacteria eine bekannte und gut untersuchte Eigenschaft. So sind zum Beispiel viele Mechanismen bekannt, welche auf der Ebene der Transkription (Balleza *et al.* 2009) oder Translation (Tollerson and Ibbas 2020) die Genexpression der Zelle bei wechselnden Umweltbedingungen regulieren.

Nach der Unterteilung der Organismen in unterschiedliche Domänen ist es für die Analyse von genetischen Regulationen interessant, mehr als nur eine Domäne zu betrachten. Insbesondere da Archaea Eigenschaften sowohl mit Bacteria als auch mit Eukarya teilen. So sind die archaealen Proteine häufig homolog zu denen der Eukaryoten. Dies gilt für Proteine der Replikation, Transkription, Translation und der homologen Rekombination (Klenk 2007; White 2011; Lindås and Bernander 2013; Alberts *et al.* 2002; Madigan *et al.* 2009). Mit Bacteria teilen die Archaea die Eigenschaft eines zirkulären Chromosoms sowie die Organisation ihrer Gene in Operons (Lindås and Bernander 2013). Auch verschiedene Stoffwechselwege sind identisch in Archaea und Bacteria (Alberts *et al.* 2002; Willey *et al.* 2008; Madigan *et al.* 2009). Die Zellteilung ist ein Fall, bei welchem Archaea unterteilt sind in eine Gruppe (Crenarchaeota) welche den Eukarya und eine andere (Euryarchaeota) den

Bacteria ähnelt (Lindås and Bernander 2013). Archaea besitzen allerdings auch Strukturen welche spezifisch für die Domäne sind. Ein Beispiel hierfür ist das Archaeellum, welches zur Fortbewegung genutzt wird. Trotz Ähnlichkeiten zum bakteriellen Flagellum ist es in der Struktur und Funktion für Archaea einzigartig (Albers and Jarrell 2015). Auf Grund der sowohl bestehenden Gemeinsamkeiten als auch der Unterschiede wurde in dieser Arbeit jeweils ein Stellvertreter der Bacteria und einer der Archaea auf die Fragestellungen untersucht. Diese sind im Folgenden genauer beschrieben.

2. Modellorganismen

Haloferax volcanii

Das halophile Archaeon *H. volcanii* gehört zu den Euryarchaeota und wurde aus dem Sediment des Toten Meers isoliert und in 1975 erstmals beschrieben (Mullakhanbhai and Larsen 1975). Das ca. vier Megabasenpaare (Mp) große Genom, mit einem durchschnittlichen GC-Gehalt von 65% (Hartman *et al.* 2010), ist vollständig sequenziert und die Genomsequenz des D2-Stammes über die Datenbank HaloLex zugänglich (Pfeiffer *et al.* 2008). Die fünf zirkulären, genomischen Elemente setzen sich zusammen aus einem Hauptchromosom (~2,8 Megabasenpaare (Mb)), drei kleineren Chromosomen pHV1 (85,1 Kilobasenpaare (kb)), pHV3 (438 kb) und pHV4 (636 kb), sowie einem Plasmid pHV2 (6,35 kb) (Hartman *et al.* 2010). Als Modellorganismus eignet sich *H. volcanii* besonders aufgrund seiner guten genetischen Zugänglichkeit und seinem bereits etablierten Transformationssystem mit einer hoch effizienten Transformationsfrequenz von $10^6/\mu\text{g}$ (Soppa 2006). Weitere Vorteile sind etablierte genomische Techniken und Modifikationen chromosomaler Gene durch den Austausch mit *in vitro*-mutierten Varianten. Ein genetisches System besteht und wurde optimiert für *in frame*-Deletionen von Genen mittels der PopIn-/PopOut-Methode (Hammelmann and Soppa 2008; Allers *et al.* 2004; Bitan-Banin, Ortenberg, and Mevarech 2003). Molekularbiologische Methoden wie DNA- oder RNA-Isolation sowie die konditionale Überexpression von Proteinen sind ebenfalls verfügbar (Allers 2010). Zusätzlich ist *H. volcanii* unter Laborbedingungen einfach kultivierbar. Die Generationszeit beträgt drei bis vier Stunden unter den optimalen Wachstumsbedingungen von 2,1 M NaCl-Konzentration und einer Temperatur von 42°C. An die hohe Salzkonzentration sind halophile Archaea adaptiert, indem sie auf Veränderungen des Salzgehaltes in der

Umgebung reagieren können und dabei den Metabolismus an die äußeren Bedingungen anpassen. *H. volcanii* gehört dabei zu den sogenannten *salt-in*-Strategen welche bis zu 5M KCl im Zytoplasma anreichern können um die osmotische Balance zu halten (Litchfield 2011).

Escherichia coli

Das Bakterium *E. coli* gehört zu den γ -Proteobacterien und wurde erstmals von seinem Namensgeber Theodor Escherich 1886 im Darm von Säuglingen entdeckt. Das im Darmtrakt von warmblütigen Tieren, Reptilien und Menschen vorkommende Bakterium (Gordon and Cowling 2003) ist fakultativ anaerob, gramnegativ und stäbchenförmig. Das bereits 1997 vollständig sequenzierte Genom von *E. coli* K12 MG1655 (Blattner *et al.* 1997) hat 4,6 Mb und umfasst 4603 Gene. Das Bakterium besitzt seine optimale Wachstumstemperatur bei 37°C und unter anaeroben Bedingungen nutzt das Oxidase-negative Bakterium unter anderem die gemischte Säuregärung zur Energiegewinnung (Darnton *et al.* 2007). Mit 20-30 Minuten besitzt *E. coli* eine extrem kurze Generationszeit und die Möglichkeit, gezielt und einfach genetische Manipulationen einzuführen zu können, machen es zu einem der beliebtesten Modellorganismen für Bakterien.

3. Genexpression

Die Genexpression ist ein vielseitig untersuchter und bekannter Mechanismus, der sich in den grundlegenden Schritten bei Eukarya und Prokarya nicht unterscheidet. Diese sind die Transkription, Translation, posttranslationale Modifikation und die Faltung von Proteinen (Madigan *et al.* 2009). Während die Expression von Genen bei Eukaryoten aufgrund der räumlichen Trennung der Transkription und Translation, sowie weiteren Modifikationen durch zum Beispiel Exons und Introns (codierende und nicht codierende Bereiche) komplexer verläuft, kann bei Prokaryoten die Transkription und Translation der Gene im gleichen Zell-Kompartiment und gekoppelt verlaufen (French *et al.* 2007; Martin and Koonin 2006). Die einzelnen Schritte der Transkription und Translation sind im Folgenden mit Ihren Gemeinsamkeiten und Unterschieden in den verschiedenen Domänen aufgeführt.

Die Transkription, der erste Schritt der Genexpression, beschreibt die enzymatische Synthese der messenger RNA (mRNA) an der DNA Matrize, welche die genetische Information der Zelle enthält. Weitere Formen von RNA sind die transfer RNA (tRNA)

und die ribosomale RNA (rRNA). RNA spielt dabei genetisch (mRNA) und funktional (tRNA und rRNA) eine Rolle (Madigan *et al.* 2009). Die Synthese der RNA beruht auf dem Prinzip der komplementären Basenpaarung. Bei der Transkription von mRNA entsteht ein Einzelstrang im Gegensatz zum DNA Doppelstrang. Weitere Unterschiede von RNA und DNA sind der Einbau der Base Uracil statt in RNA sowie dem Vorhandensein von Ribosen anstelle von Desoxyribosen. Die Transkription in Bacteria wird durch die Bindung einer RNA-Polymerase an sogenannte Promotorsequenzen initiiert. Diese befinden sich stromaufwärts zur Sequenz, welche transkribiert werden soll. Eine RNA-Polymerase ist ein Holoenzym, welches sich aus vier Untereinheiten zusammensetzt. Dabei ist die Sigma-Untereinheit verantwortlich für die Erkennung der Promotor-Sequenzen. Durch die Bewegung der RNA Polymerase wird die DNA Doppelhelix zeitweilig geöffnet und die Elongation der Transkription durch Einsetzen der Ribonukleotide ATP, GTP, CTP und UTP beginnt. Die mRNA entspricht dem Sense-Strang (5'-3') der DNA, da sie komplementär zum Antisense-Strang (3'-5') synthetisiert wird (Madigan *et al.* 2009). Die Termination der Transkription wird durch eine Terminator-Sequenz herbeigeführt. Durch umgekehrte Wiederholungssequenzen in der transkribierten DNA bilden sich in der RNA Stammschleifenstrukturen. Diese führen zur Termination der Transkription, wenn darauf eine Reihe von Uridinresten folgt. Ein weiterer Mechanismus ist der Rho-Faktor. Dieser bindet an die RNA und terminiert die Transkription sobald es zu einem Pausieren an einer Terminationsstelle kommt (Platt 1986). Die mRNA in Bacteria und Archaea ist dabei häufig polycistronisch, das heißt mehrere Gene werden co-transkribiert, wenn sie von Promotor- und Terminator-Sequenzen flankiert werden. Gegensätzlich dazu verhalten sich mRNAs in Eukarya, diese sind ausschließlich monocistronisch.

Eukarya und Archaea sind sich in Ihrer Transkription ähnlich und unterscheiden sich in den folgenden Punkten zur Transkription in Bacteria: Die RNA Polymerasen, wovon Eukarya mindestens drei besitzen, Archaea nur eine, bestehen aus 11-13 Untereinheiten und sind damit deutlich komplexer als die der Bakterien. Zusätzlich sind Promotor-Sequenzen umfassender und weitere Initiationsfaktoren sind für einen Transkriptionsstart notwendig. Auch die Termination unterscheidet sich indem Eukaryoten Proteine als Terminatorfaktoren benötigen und Archaea wie für *Thermococcus kodakarensis* gezeigt, oligo-T-Sequenzen die Termination stimulieren (Santangelo *et al.* 2009) oder wie für *H. volcanii* zusätzlich zu den oligo-T-Sequenzen

gezeigt werden konnte das Haarnadelstrukturen sowie das Motiv AGATC zur Termination der Transkription führt (Berkemer *et al.* 2020).

Die Translation, bei welcher die mRNA Sequenz in eine Aminosäure Sequenz übersetzt wird, erfolgt am Ribosom. Diese sind wie bereits erwähnt aus ribosomaler RNA (rRNA) aber auch aus Proteinen aufgebaut. In den drei Domänen des Lebens unterscheiden sich die Ribosomen in ihrer Zusammensetzung. Bakterien und Archaea besitzen 30S und 50S Untereinheiten, welche in 70S Ribosomen resultieren (S ist die Svedberg-Einheit, ein Maß für die Partikelgröße) und Eukaryoten besitzen 40S und 60S Untereinheiten, diese resultieren in 80S Ribosomen. Prokaryoten besitzen eine 16S rRNA (1500 Basen lang und Bestandteil der 30S Untereinheit mit 21 ribosomalen Proteinen) und 23S sowie 5S rRNA (2900 Basen bzw. 120 Basen lang und Bestandteil der 50S Untereinheit mit 31 ribosomalen Proteinen) (Baker *et al.* 2010). Eukaryoten besitzen eine 18S rRNA (1874 Basen lang und Bestandteil der 40S Untereinheit mit 33 ribosomalen Proteinen) sowie 5S, 5,8S und 28S rRNA (120 Basen, 160 Basen und 4718 Basen lang und Bestandteil der 60S Untereinheit mit 49 ribosomalen Proteinen) (Madigan *et al.* 2009). Die Schritte der Translation sind in Pro- und Eukaryoten die folgenden: Initiation, Elongation, Termination und das Ribosomen Recycling.

Die Mechanismen für die Initiation der Translation sind für die drei Domänen sehr divers. Identisch ist jedoch, dass mRNA, eine Initiator tRNA, kleine und große Untereinheit des Ribosoms, sowie Initiationsfaktoren benötigt werden (Baker *et al.* 2010). Für Bacteria gibt es drei Initiationsfaktoren, während für Archaea und Eukarya mehr als zehn Gene für Initiationsfaktoren der Translation codieren (Londei 2005). Unterschiedlich ist auch die Initiator-tRNA, diese ist in Archaea und Eukarya mit Methionin beladen und in Bacteria mit Formyl-Methionin. Wie bereits beschrieben spielen transfer-RNAs (tRNAs) eine funktionale Rolle bei der Genexpression. Die konventionelle Kleeblattstruktur von tRNAs schützt diese nicht nur vor dem Abbau, sondern ermöglicht auch die Funktion der RNA, Aminosäuren zum Ribosom zu transferieren. Die Translationsinitiation ist der Geschwindigkeits-definierende Schritt, entscheidend darüber welche Proteine zu welchen Mengen exprimiert werden. Nachfolgend werden die bekannten Mechanismen für die jeweiligen Domänen beschrieben.

Für Eukaryoten ist der relativ komplexe *Scanning*-Mechanismus bekannt, hierbei wird das Ribosom mit einer Reihe von Faktoren an die mRNA gebunden. Die Wechselwirkung zwischen mRNA und rRNA des Ribosoms ist hier nicht ausreichend. Die kleine ribosomale Untereinheit (40S) wird in einem Komplex mit Proteinen an die 5'-UTR der mRNA gebunden und scannt entlang der mRNA, bis es ein Start-Codon findet um die Translation zu starten (Kozak 1999, 2002). Während bei Eukaryoten klassischerweise immer ein Ribosom entlang der mRNA scannt und beim ersten AUG die Translation startet ist es in Prokaryoten möglich, an weiteren, stromabwärts-liegenden AUG-Codons zu starten. Dies ist notwendig, da in Prokaryoten polycistronische mRNAs vorkommen können. Ribosomen können in Eukaryoten nur direkt an die mRNA binden wenn in deren 5'-UTRs so genannte IRES (*internal ribosome entry sites*) Strukturen vorhanden sind, welche sich stromaufwärts des Translations-Starts befinden und Ribosomen an die richtige Position an die mRNA rekrutieren (Hellen *et al.* 2001; Wilson, Powell, and Hoover 2000).

Für Prokaryoten sind Mechanismen für die Translations-Initiation beschrieben, welche entweder abhängig von einer Shine-Dalgarno (SD) Sequenz (Shine and Dalgarno 1973) oder davon unabhängig sind, außerdem gibt es den leaderless-Mechanismus. Für Bacteria ist dabei der SD-Mechanismus der bekannteste. Hierbei bindet das Ribosom an eine SD Sequenz, welche sich in der 5'-UTR der mRNA befindet. Diese purinreiche Sequenz wird ebenfalls Ribosomenbindestelle (RBS) genannt, da hier eine Wechselwirkung des 3'-Endes der 16S rRNA des Ribosoms mit der mRNA über Watson-Crick Basenpaarung möglich ist. Hierfür wird folgendes SD-Motiv 5'-UAAGGAGG-3' im richtigen Abstand zum Start-Codon benötigt (Ringquist *et al.* 1992; Vimberg *et al.* 2007; H. Chen *et al.* 1994). Durch diese Interaktion wird das Ribosom direkt in die richtige Position für die Initiation an die mRNA gebracht (McLennan *et al.* 2013). Für die Regulation der Translations-Initiation sind in Bakterien unterschiedliche Mechanismen bekannt, welche die Ribosomenbindestelle blockieren können. Zum Beispiel durch die Basenpaarung von small RNAs mit mRNAs (Altuvia *et al.* 1998; Osterman *et al.* 2013; Majoalani *et al.* 1998; Storz, Opdyke, and Zhang 2004). Alternativ können Sekundärstrukturen der mRNA die RBS maskieren. Riboswitche, Sekundärstrukturen, welche in der zu translatierenden mRNA vorkommen, können durch binden kleiner Moleküle ebenfalls die Translation-Initiation regulieren (Winkler, Nahvi, and Breaker 2002; Mandal and Breaker 2004).

Auch regulatorische Proteine können durch binden der mRNA die Translations-Initiation regulieren (Moine *et al.* 1990; Babitzke, Baker, and Romeo 2009).

Für Archaea sind Mechanismen der Translations-Initiation für mRNAs mit und ohne 5'-UTRs beschrieben worden (Benelli *et al.* 2003). SD Sequenzen werden in Archaea zwar gefunden, im Großteil aller Transkripte sind diese jedoch nicht vorhanden. Für *H. volcanii* konnte bereits bewiesen werden, dass SD-Sequenzen in 5'-UTRs keine Funktion in der Translations-Initiation besitzen (Kramer *et al.* 2014). Das geht einher mit der Betrachtung aller annotierten Translations-Initiations-Regionen (TIR) aus Lokiarchaeota-Genomen, welche zeigen das die SD Sequenz in 5'-UTRs nicht weit verbreitet ist (Imachi *et al.* 2020). Die meisten Transkripte in Archaea, für manche Spezies bis zu 70% aller Transkripte, besitzen gar keine 5'-UTRs (Wurtzel *et al.* 2010; Gelsinger *et al.* 2020; Slupska *et al.* 2001; Ma *et al.* 2002). Hier befindet sich das Start-Codon nur wenige Nukleotide nach, oder direkt am Beginn der mRNA. Diese Transkripte werden als *leaderless* bezeichnet wenn vor dem Start-Codon fünf oder weniger Nukleotide vorhanden sind (Babski *et al.* 2016). Für fast alle Archaea ist jedoch anzunehmen das Transkripte mit und ohne 5'-UTR, als auch mit und ohne SD Sequenz co-Existieren, auch bei solchen Spezies mit vorherrschenden leaderless Transkripten (Ma *et al.* 2002; Wurtzel *et al.* 2010). Daher wird vermutet das Archaea Translations-Initiations-Mechanismen für Transkripte mit und ohne 5'-UTR besitzen (Benelli *et al.* 2003). Der *leaderless* Translations-Initiations-Mechanismus gilt als der ursprüngliche Mechanismus, welcher vom LUCA (*l*ast *u*niversal *c*ommon *a*ncestor) übertragen und von Archaea aufgrund der langsameren Evolutionsrate beibehalten wurde (Grill *et al.* 2000; Benelli *et al.* 2003). Als Beweis dafür konnte gezeigt werden, dass zumindest *in vitro*, leaderless Transkripte in allen Domänen funktional sind (Grill *et al.* 2000). Befindet sich keine SD-Sequenz vor dem Transkriptionsstart, findet die Initiation in Archaea ähnlich wie bei Eukarya statt, wo die 30S ribosomale Untereinheit in einem Komplex mit der Initiator tRNA und Initiationsfaktoren an die mRNA gebunden wird.

Die Geschwindigkeit der Translations-Initiation wird hauptsächlich definiert durch die Bildung der ersten Peptidbindung, diese ist abhängig von den Eigenschaften der darauffolgenden Aminosäuren (Marintchev and Wagner 2004).

Die drei anderen Phasen der Translation weisen im Gegensatz zur Initiation sehr große Ähnlichkeiten in allen Domänen des Lebens auf (Malys and McCarthy 2011).

Sobald die große ribosomale Untereinheit rekrutiert ist, gehen alle Mechanismen in die Elongationsphase über. Die Translations-Elongation erfolgt am Ribosom, der makromolekulare Ribonukleotidkomplex katalysiert die Verknüpfung der Aminosäuren. Diese gelangen mit Hilfe der tRNAs zum Ribosom und die Polypeptidkette wird fortlaufend synthetisiert unter der Verwendung verschiedener Elongationsfaktoren. Der richtige Einbau von Aminosäuren ist durch die Erkennungs-Sequenz von drei Nukleotiden an der tRNA gewährleistet. Dieses Anti-Codon ist in der Lage mit der mRNA zu wechselwirken und nur bei korrekter Basenpaarung wird die Aminosäure an der tRNA durch eine Peptidbindung an das Polypeptid geknüpft. Der genetische Code und auch die ribosomalen RNAs sind für die Translation hoch konserviert in den drei Domänen (Malys and McCarthy 2011). In Prokaryoten und Eukaryoten können bei der Translations-Elongation mehrere Ribosomen an einer mRNA zur selben Zeit translatieren, was zu einer Stabilisierung der mRNA führt (French *et al.* 2007).

Für alle Domänen gilt: wird ein Stop-Codon (UAA, UAG oder UGA) erkannt, wird die Translation terminiert und die *Release*-Faktoren, welche sich in den Domänen unterscheiden, setzen die Polypeptidkette frei. Beim Ribosomen-Recycling werden schließlich noch die ribosomalen Untereinheiten und die mRNA voneinander getrennt (Marintchev and Wagner 2004).

Wie bereits erwähnt, wurde für *H. volcanii* gezeigt, dass der SD-Mechanismus bei der Translations-Initiation nicht genutzt wird. In einer bioinformatischen Analyse wurden jedoch viele solcher SD-Motive gefunden. Diese befinden sich allerdings nicht in 5'-UTRs sondern am Ende von Genen, welche sehr dicht oder sogar überlappend mit dem stromabwärts-liegenden Gen auf bicistronischen mRNAs vorliegen (siehe Abbildung 2). Die Kurven in Abbildung 2 zeigen das relative Vorkommen von SD-Motiven, welche in den letzten 10 Nukleotiden stromaufwärts eines Start-Codons zur Consensus SD Sequenz passen.

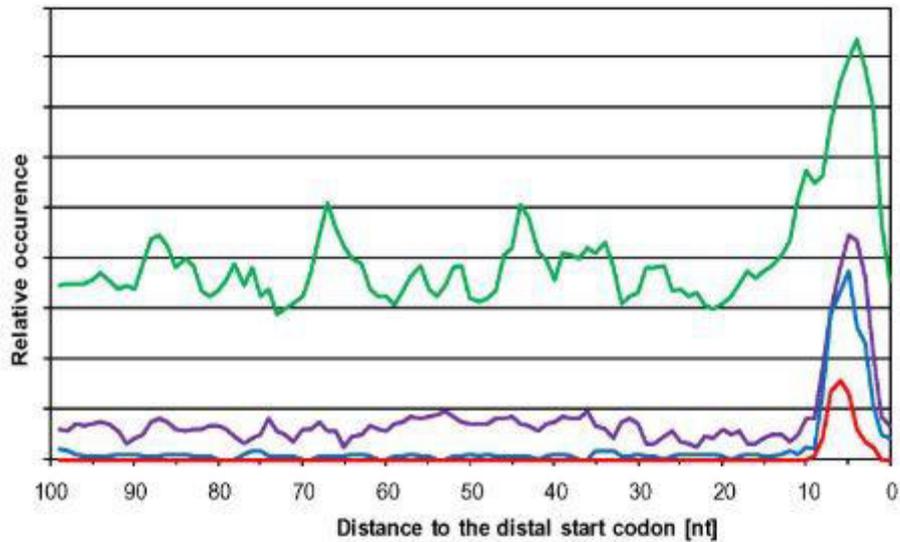


Abbildung 2 SD Sequenzen innerhalb überlappender Genpaare nach (Kramer *et al.* 2014). 100 Nukleotide stromaufwärts aller Gene, welche weniger als 10 Nukleotide Abstand zu dem stromabwärts-liegenden Gen besitzen wurden aus *H. volcanii* ausgewählt. Darin wurde nach dem Vorhandensein von SD- Motiven gesucht. Die x-Achse gibt die Position in den 100 Nukleotiden stromaufwärts zum Start-Codon an und die Kurven unterscheiden sich durch die Anzahl der Nukleotide, welche einer SD-Consensus Sequenz entsprechen. Grün zeigt das relative Vorkommen von 5 Nukleotiden passend zur SD, Lila zeigt 6 Nukleotide, Blau 7 Nukleotide und Rot 8 Nukleotide.

Aufgrund dieser Feststellung ergab sich die Fragestellung der Funktion von SD-Motiven an dieser Position. Eine Möglichkeit ist das Pausieren der Ribosomen und damit verbunden eine Translationskopplung von bicistronischen Transkripten. Die bekannten Versionen einer gekoppelten Translation sind im Folgenden beschrieben.

4. Gekoppelte Translation an bicistronischer mRNA

In Prokaryoten sind Gene häufig in Operons angeordnet hinter einem gemeinsamen Promotor. Diese werden in polycistronische mRNAs transkribiert. Erstmals definiert wurden Operons 1961, als genetische Einheit für die koordinierte Transkription (Jacob and Monod 1961). In Abbildung 3a ist gezeigt, wie die Translation an polycistronischer mRNA an jedem Gen unabhängig von dem anderen mit unterschiedlichen Ribosomen initiiert wird. Die Translationseffizienz ist somit abhängig von den jeweiligen Translations-Initiations-Regionen (TIRs). Diese unabhängige Translations-Initiation ist ein gut untersuchter und weit verbreiteter Mechanismus für Operons in Prokaryoten (Quax *et al.* 2013). Ein weiterer Beweis für die unabhängige Translation von Genen auf einem Transkript ist der Nachweis von *in vivo* Strukturanalysen in *E. coli* für Gene auf polycistronischer mRNA, welche unterschiedlich starke RNA-Strukturen besitzen und so die Translation beeinflussen (Burkhardt *et al.* 2017).

Der Vorteil von polycistronischer mRNA ist jedoch, dass eine gekoppelte Translation von zwei oder mehr Genen möglich ist. Grundsätzlich gilt, dass Translationskopplung einen Mechanismus beschreibt, bei welchem die Translation eines stromabwärts-liegenden Gens abhängig ist von der Translation des davorliegenden Gens. 1984 konnte für das Tryptophan-Biosynthese-Operon eine gekoppelte Translation gezeigt werden, bei welcher die Translation von *trpA* abhängig ist von dem davorliegenden Gen *trpB* (Aksoy, Squires, and Squires 1984). Seitdem konnte eine Kopplung für weitere Operons nachgewiesen werden, wie für das Operon *atpHA* (Rex *et al.* 1994), *rplJL* (Petersen 1989), *motAB* (Way *et al.* 2000) und *infC-rpmL* (Lesaget *et al.* 1992). In diesen Fällen ist eine Kopplung durch Sekundärstrukturen gewährleistet. Das bedeutet Basenpaarung oder Pseudoknoten bilden sich in der mRNA aus zwischen der TIR des stromabwärts-liegenden Gens mit Teilen des offenen Leserahmens (*open reading frames* =ORF) des stromaufwärts-liegenden Gens (Rex *et al.* 1994; Chang, Green, and Wolf 1995; Chiaruttini, Milet, and Springer 1996). Abbildung 3b zeigt eine Translationskopplung nach dem *upstream translation-dependent de novo initiation* (UTNI) Mechanismus. Die Translation des stromabwärts-liegenden Gens (Blau) ist strikt reguliert über die Translation des stromaufwärts-liegenden Gens. Wird das erste Gen auf der mRNA translatiert, schmilzt das Ribosom im Zuge dessen die Sekundärstrukturen auf, welche zunächst die Ribosomenbindestelle (RBS)

maskieren. Sobald diese frei ist, kann es zu einer *de novo*-Initiation der Translation vom zweiten Gen kommen. Die Translation erfolgt also abhängig voneinander jedoch mit unterschiedlichen TIRs, deren Stärke die Translationsrate der jeweiligen Proteine reguliert. So kann zum Beispiel das zweite Gen deutlich mehr exprimiert werden, wie es für das Genpaar *rplJL* gezeigt wurde. RplL wurde fünffach mehr exprimiert als RplJ (Lesaget *et al.* 1992). Das Gegenteil ist somit auch möglich, eine deutlich geringere Expression des stromabwärts-liegenden Gens wurde zum Beispiel für das Genpaar *atpEF* nachgewiesen. Hier ist AtpF zehnfach geringer exprimiert als AtpE (Hellmuth *et al.* 1991).

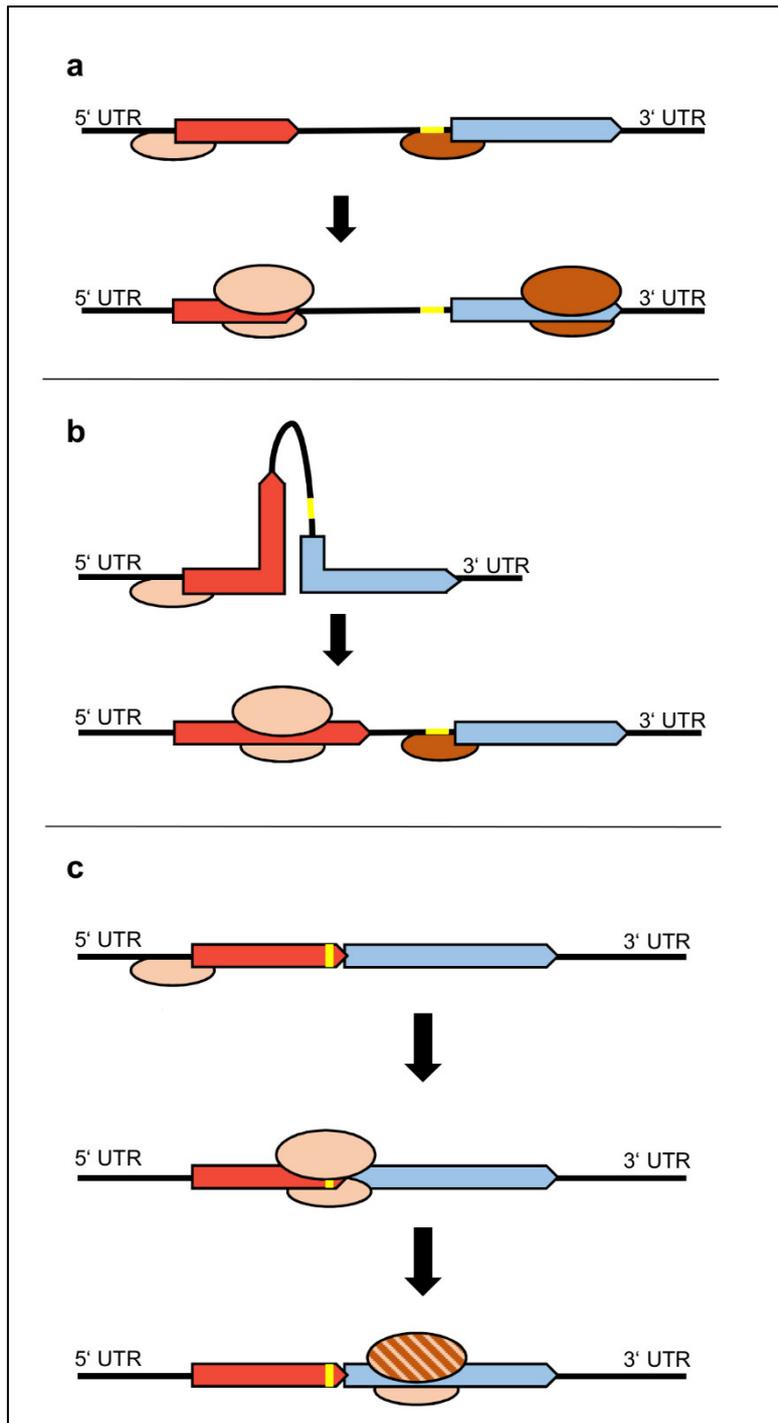


Abbildung 3 Mechanismen der Translations-Initiation an Genen auf polycistronischer mRNA.
a. Unabhängiger Mechanismus der Translation. An den Genen der bicistronischen mRNA, mit intergenen Bereichen, kann jeweils ein Ribosom unabhängig von dem anderen die Translation starten. **b.** UTNI Mechanismus der Translationskopplung. Gene besitzen intergene Regionen auf der mRNA. Sekundärstrukturen blockieren die RBS (Gelb) des stromabwärts-liegenden Gens und die Translation kann nur stattfinden, wenn das erste Gen (Rot) translatiert wird und dabei die Strukturen zerstört. Eine *de novo*-Initiation wird ermöglicht am zweiten Gen (Blau). **c.** Translationskopplung via Termination-Reinitiation an überlappenden Genen. Das Ribosom, welches das erste Gen (Rot) translatiert reinitiiert an dem zweiten Gen (Blau) oder zumindest die gleichen 30S Untereinheit.

5. Termination-Reinitiation

Ein weiterer Mechanismus der Translationskopplung ist die Termination-Reinitiation (TeRe). Hier ist es das gleiche Ribosom, oder zumindest die gleiche kleine Untereinheit des Ribosoms, welches am ersten Gen terminiert und am stromabwärts-liegenden Gen reinitiiert (Abbildung 3c). Dieser Mechanismus ist bisher hauptsächlich an eukaryontischen Viren gezeigt worden (Powell 2010; Powell *et al.* 2011). In Abbildung 4 ist eine schematische Darstellung dieses Ereignisses gezeigt. Abschnitt 1 zeigt die aktive Translation des ersten Gens (ORF1) auf einem bicistronischen Transkript. Wenn das 80S Ribosom das Stop-Codon des ersten Gens erreicht, dissoziiert die 60S Untereinheit und nur die 40S Untereinheit wird von den sogenannten TURBS (*t*ermination *u*pstream *r*ibosomal *b*inding *s*ites) an der mRNA gehalten (Abbildung 4 Abschnitt 2). Diese befinden sich ungefähr in den letzten 70 Nukleotiden stromaufwärts des Stop-Codons des ersten ORF und können mit der ribosomalen RNA wechselwirken (Powell *et al.* 2011). Abschnitt 3 zeigt den letzten Schritt, die Reinitiation, welche stattfindet sobald eine neue 60S ribosomale Untereinheit rekrutiert wurde.

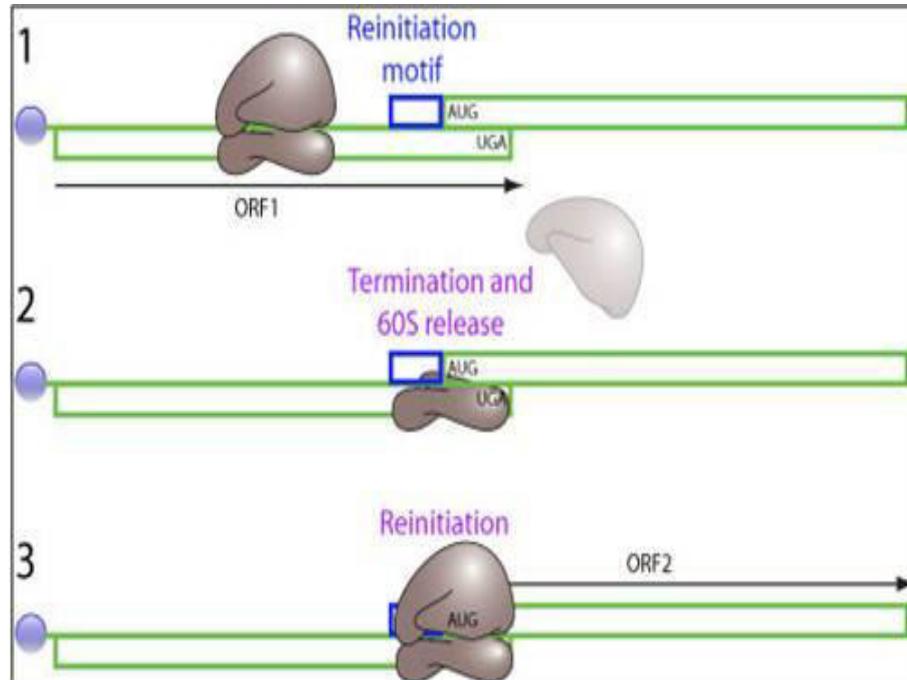


Abbildung 4 Schematische Darstellung der Translationskopplung bei eukaryontischen Viren (ExpASy, ViralZone 2015). 1. Aktive Translation an bicistronischer mRNA. 2. Das Stop-Codon des ersten ORF wird erreicht, die 60S Untereinheit dissoziiert während die 40S Untereinheit durch TURBS an der mRNA gehalten wird. 3. Eine 60S Untereinheit wird rekrutiert und die Re-Initiation am ORF2 wird ermöglicht.

Für Bacteria ist bisher wenig über diesen Mechanismus bekannt. Es wurde jedoch bereits vorgeschlagen, dass diese Art der gekoppelten Translation stattfindet. Experimentell konnte gezeigt werden, dass Ribosomen an einem künstlichem Stop-Codon terminieren und in der Lage sind an einem nahegelegenen Methionin-Codon zu reinitiiieren (Karamyshev *et al.* 2004). Sowie gezeigt wurde, dass Ribosomen an nativen Stop-Codons terminieren und bevorzugt an Start-Codons reinitiiieren welche künstlich in der Nähe eingebracht wurden. Weiter entfernte native Start-Codons werden dann weniger genutzt (Adhin and van Duin 1990). Die Länge von Abständen zwischen Genen auf polycistronischer mRNA, welche eine Termination-Reinitiation ermöglichen, sind ein sehr umstrittenes Thema. Die Hypothese ist jedoch naheliegend, dass die Effizienz der Reinitiation negativ korreliert mit der Distanz zwischen Stop-Codon und Start-Codon des folgenden Gens. Dieser Mechanismus erfordert, dass das Ribosom entlang der mRNA scannt bis es ein neues Start-Codon findet. Die Wahrscheinlichkeit einer Dissoziation des Ribosoms von der mRNA mit steigendem Abstand wird größer und korrelierend damit wird eine Reinitiation unwahrscheinlicher.

Der kleinste Abstand zwischen zwei Genen ist ein Überlappen der Gene. Dabei nutzen die Gene dieselben Nukleotide für das jeweilige Start- und Stop-Codon. Mögliche Varianten sind **TGATG** (Start-Codon in fett gedruckt), mit einem Nukleotid überlappend oder **ATGA**, mit vier Nukleotiden überlappend. Das überlappende Genpaare keine Seltenheit sind, kann in der Datenbank *PairWise Neighbours* betrachtet werden. Hier ist es möglich, prokaryotische Genome anhand ihrer überlappenden Gene in allen vorkommenden Orientierungen zu untersuchen (Pallejà *et al.* 2009). Wobei gezeigt wurde, dass co-direktional überlappende Gene häufiger vorkommen als konvergente oder divergente, sowie dass Überlappes mit vier Nukleotiden am häufigsten sind (Pallejà *et al.* 2009). Der Vergleich von 198 Genomen konnte ebenfalls zeigen, dass überlappende Genpaare stärker als solche ohne Überlapp konserviert sind und dass die Frequenz von überlappenden Genen nicht im Zusammenhang zur Genomgröße steht (Johnson and Chisholm 2004).

Diese Arbeit befasst sich mit der Fragestellung, ob an überlappenden Genpaaren in *H. volcanii* und *E. coli* eine Translationskopplung via Termination-Reinitiation stattfindet, und wie genau dieser Mechanismus funktioniert, sowie welche die limitierenden Faktoren sind.

6. Zielsetzung der Arbeit

Ziel der Arbeit war es, die Translationskopplung an überlappenden Genpaaren in Bakterien und Archaea zu untersuchen. Dafür wurden aus beiden Domänen ein Modellorganismus ausgewählt, welcher diese repräsentiert. *H. volcanii* und *E. coli* bieten sich vor allem wegen der guten Etablierung von Methoden und der genetischen Zugänglichkeit als Modellorganismen an. Das ubiquitäre Vorkommen von überlappenden Genen in Prokaryoten ließ die Vermutung zu, dass es sich um eine Kopplung via Termination-Reinitiation handelt. Nachdem dies für die untersuchten Modellorganismen *H. volcanii* und *E. coli* im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte (Huber *et al.* 2019), sollte der Mechanismus in beiden Domänen weiter analysiert werden. So sollten zum Beispiel die Bedeutung von intragenen Shine-Dalgarno Sequenzen analysiert werden, welche sich jeweils im stromaufwärts-liegenden Gen, im passenden Abstand zum Start-Codon des stromabwärts-liegenden Gens befinden. Die Veränderung der Motive soll an Genpaaren für *H. volcanii* und *E. coli* mittels *site directed mutagenesis* eingeführt und die Translationseffizienzen bei der Kopplung durch die Fusion an Reportergene analysiert werden. Zusätzlich sollte der maximale intergene Abstand ermittelt werden, welcher möglich ist sodass noch eine Translation an bicistronischen Transkripten gekoppelt ablaufen kann. Bei allen Versuchsmodellen wurden jeweils mehrere Genpaare zur Analyse herangezogen um auszuschließen das es sich bei einzelnen Genpaaren um eine Ausnahme handelt.

Zusätzlich war es Ziel dieser Arbeit, den Kopplungsmechanismus auf molekularer Ebene zu untersuchen. Hierfür wurde eine Methode aufgestellt und etabliert, welche das genaue Verhalten von ribosomalen Untereinheiten an der mRNA während der Kopplung beschreiben kann. Dazu soll die Grundidee des *ribosome-display* herangezogen werden (Plückthun 2012). *In vitro* Translations-Komplexe können aufgereinigt und analysiert werden, da die eingesetzte mRNA kein Stop-Codon enthält und somit die Translation zwar terminiert jedoch nicht die Bestandteile voneinander gelöst werden können. Eine genau Veruchsabfolge mit nötigen Kontrollen soll erarbeitet werden sowie erste *proof-of-principal* Experimente durchgeführt werden sollen. Ergebnisse sowie mögliche Alternativen oder Optimierung sollen dargestellt und diskutiert werden.

III. Material und Methoden

1. Materialien

1.1. Laborausstattung

Alle in dieser Arbeit verwendeten Geräte sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 1 Verwendete Geräte sowie deren Hersteller

Gerät	Hersteller
Autoklav	Wolf-SANOclav, Bad Überkingen-Hausen
Block Thermostat BT1302	Grant Instruments, Cambridge, GB
Brutschrank T165	Rubbarth Apperate GmbH, Laatzen
FastPrep™-24 Instrument	MP Biomedicals GmbH, Heidelberg
Fraction Collector Foxy Jr.	Teledyne Isco, Lincoln, USA
Geldokumentation E.A.S.Y. 440 K	Herolab, Wiesloch
Gradient Master 107	Biocomp, Fredericton, Canada
Hybridisierungsöfen Mini Oven MK II	MWG Biotech, Ebersberg
Hybridisierungsöfen HB-1000	UVP, Upland, USA
Mastercycler®	Eppendorf, Hamburg
Magnetrührer MR 3000	Heidolph Instruments, Schwabach
Magnetrührer RET basic IKA®	Labortechnik, Staufen
Magnetrührer Yellow MAGHS7 IKA®	Labortechnik, Staufen
Mikrowelle R-7180	Sharp Electronics, Hamburg
Nanodrop Spektrophotometer ND-1000	NanoDrop Technologies, Wilmington, USA
pH-Meter CG 825	Schott, Mainz
Photometer Specorf S 600	Analytik Jena, Jena
Rotor-Gene RG-3000	Corbett Research, Melbourne, AU
Shaker G10 Gyratory ®	New Brunswick Scientific, New York, USA
Sorvall RC 6+ Centrifuge	Thermo Scientific, Waltham, USA
Spectramax Microplate Spectrophotometer	Sunnyvale, CA, USA
Sonifier	Branson, Danbury, USA
Thermal Cycler 2720	Eppendorf, Hamburg
Tris Pump	Teledyne Isco, Lincoln, USA
UV-Stratalinker 1800	Stratagene, Leiden, NL
Vortex Genie 2 ®	Scientific Industries, New York, USA
Waage TE1245OCE	Sartorius, Göttingen
Waage PM 4800 Delta Range ®	Mettler, Gießen
Wasserbad	Julabo EM, Seelbach
Zentrifuge 5417	Eppendorf, Hamburg

Gerät	Hersteller
Zentrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg
Ultrazentrifuge Optima XPN	Beckmann Coulter, Krefeld
UV/VIS Detektor	Teledyne Isco, Lincoln, USA

1.2. Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien sowie der Hersteller sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 2 Verwendete Chemikalien und deren Hersteller

Chemikalie	Hersteller
Agarose	Applichem, Darmstadt
Agar	BD, Heidelberg
L-Alanin	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Ammoniumchlorid	VWR, Darmstadt
Ammoniumchlorid N15	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Ammonium Glutamat	MP Biomedicals, Solom, USA
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Anti-Dig-Antikörper	Roche, Mannheim
L-Arabinose	Roth, Karlsruhe
L-Arginin Monohydrochlorid	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
L-Asparagin	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
L-Asparaginsäure	Merck, Darmstadt
Bacto TM -Agar	BD, Heidelberg
Bacto TM -Hefeextrakt	BD, Heidelberg
Bacto TM -Trypton	BD, Heidelberg
Blockingreagenz	Roche, Mannheim
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
CDP-Star Working Solution	Roche, Mannheim
Co-Enzym-A	Böhringer, Mannheim
L-Cystein	Merck, Darmstadt
D(+)- Saccharose	Roth, Karlsruhe
DEPC	Roth, Karlsruhe
Desoxyribonukleotidtriphosphat (dNTPs)	Fermentas, St. Leon-Rot
Dextransulfat	Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
DTT	Roth, Karlsruhe
Entwicklerlösung	Kodak, Stuttgart
Essigsäure	VWR, Darmstadt
Ethanol>99%p.a.	VWR, Darmstadt

Chemikalie	Hersteller
Ethidiumbromid	Fluka, Neu-Ulm
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Ficoll 400	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Fixierlösung	Kodak, Stuttgart
Folinsäure	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Formamid	AppliChem, Darmstadt
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
L-Glutamin	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
L-Glutaminsäure	Merck, Darmstadt
L-Glycin	VWR, Darmstadt
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycerin-3-Phosphat	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Hefe-t-RNA	Roche, Mannheim
HEPES	Roth, Karlsruhe
Hexa-Histidin Antibody	Santa Cruz, Dallas, USA
L-Histidin	AppliChem, Darmstadt
IPTG	AppliChem, Darmstadt
L-Isoleucin	AppliChem, Darmstadt
Isopropanol	VWR, Darmstadt
Kaliumacetat	VWR, Darmstadt
Kaliumchlorid	VWR, Darmstadt
Kalium Glutamat	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Roth, Karlsruhe
L-Leucin	Merck, Darmstadt
L-Lysin	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Lysozym	Roth, Karlsruhe
Maleinsäure	Roth, Karlsruhe
Magermilchpulver	VWR, Darmstadt
Magnesiumchlorid	VWR, Darmstadt
Magnesium Glutamat	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Magnesiumsulfat heptahydrat	VWR, Darmstadt
Manganchlorid Tetrahydrat	VWR, Darmstadt
L-Methionin	Merck, Darmstadt
MOPS	Roth, Karlsruhe
N-Laurylsarcosin	AppliChem, Darmstadt
Natriumacetat	VWR, Darmstadt
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	VWR, Darmstadt
Novobiozin	Sigma, St. Louis, USA
Polyethylenglucol (PEG)	AppliChem, Darmstadt
Phenazinmethosulfat (PMS)	Sigma, St. Louis, USA
L-Phenylalanin	Roth, Karlsruhe

Chemikalie	Hersteller
L-Prolin	Roth, Karlsruhe
Polyvinylpyrrolidon	Merck, Darmstadt
Rinderserumalbumin	Roth, Karlsruhe
RNase	AppliChem, Darmstadt
Salzsäure	VWR, Darmstadt
L-Serin	Roth, Karlsruhe
Succrose	VWR, Darmstadt
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Thiazolyl-Blau-Tetrazolium-Bromid (MTT)	Sigma, St. Louis, USA
L-Threonin	Roth, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)aminomethan(Tris)	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Roth, Karlsruhe
Tri-Natriumcitrat · 2 H ₂ O	Roth, Karlsruhe
L-Tryptophan	Roth, Karlsruhe
L-Tyrosin	Merck, Darmstadt
L-Valin	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Tween 20	Roth, Karlsruhe

1.3. Verbrauchsmaterialien

Alle verwendeten Verbrauchsmaterialien dieser Arbeit sowie deren Hersteller sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

Tabelle 3 Verwendete Materialien und deren Hersteller

Material	Hersteller
Blottingpapier, 0,37 mm; 1,4 mm	Carl Roth, Karlsruhe
Küvetten 10 x 4 x 45 mm	Sarstedt, Nümbrecht
Mikrotiterplatten, 96-Well	Sarstedt, Nümbrecht
Nylon-Membran	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Nitrocellulose-Membran	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Pasteurpipetten	Hirschmann, Eberstadt
PCR- Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
Petrischalen	GBO, Gremsmünster, AUS
Pipettenspitzen 20 µL, 200 µL, 1000 µL	Sarstedt, Nümbrecht
Reagenz- und Zentrifugenröhre 15 mL, 50 mL	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäß 1,5 mL, 2 mL	Sarstedt, Nümbrecht
Röntgenfilm	Kodak, New York, USA

1.4. Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind in den nachfolgenden Tabellen aufgeführt. Dabei wird unterschieden zwischen den Oligonukleotiden welche für die Klonierung von Plasmidkonstrukten (Tabelle 4), zur Herstellung von Sonden (Tabelle 5) zur Transkriptlevel Analyse sowie zur zielgerichteten Mutagenese (Tabelle 6) genutzt wurden. Alle hier gelisteten Oligonukleotide wurden von Merck, Darmstadt bezogen.

Tabelle 4 Oligonukleotide zur Klonierung von Plasmidkonstrukten mit ihrer Beschreibung und Sequenz

Name	Beschreibung	Sequenz (5'-3' Richtung)
M13-20	Für K-PCR oder Seq in MCS pSK(+)	GTAAAACGACGGCCAGTG
M13	Für K-PCR oder Seq in MCS pSK(+)	GGAAACAGCTATGACCATG
T3	Für K-PCR oder Seq in MCS pSK(+)	AATTAACCCTCACTAAAGGG
T7	Seq in MCS pSK(+)	GTAATACGAC
M13	Seq in MCS pSK(+)	GGAAACAGCTATGACCATG
SL8	<i>hyfH</i> fw	CGATCCATGGTTGTGGGCGCAAGCGAGC GTC
SL9	<i>hyfH</i> rev	CGATCTCGAGGCTGACATGTTGTGTAAG CACTGG
SL12	<i>ydbHynbE</i> fw	CGATCCATGGTTACGCTTTGGCGATAAT CTCC
SL13	<i>ydbHynbE</i> rev	GCATCTCGAGTGACGTCAACGCAGCCAG
SeqRI5	<i>glpD</i> --> Insert	GCGCCGACGACGCCCTGTGG
SeqRI6	<i>gusA</i> --> Insert	CACCAACGCTGATCAATTCC
pQE30rev.	Für K-PCR oder Seq in MCS pQE60	GTTCTGAGGTCATTACTGG
pQE60fw.	Für K-PCR oder Seq in MCS pQE60	GTGAGCGGATAACAATTTC
mRNA_gfp_fw	fw. Primer vor Pt7 JOE Plasmide	GGCCATGCATGCATC
mRNA_gfp_rev	rev. Primer hinter <i>gfp</i> JOE Plasmide	CGCTTCTGCGTTCTG
NEB 5'gfp_fw	fw. Primer mit 5'-UTR-NEB von <i>gfp</i>	CGAATTAATACGACTCACTATAGGGCTT AAGTATAAGGAGGAAAAAATTAAGAAGG AGATATACATATGACCATG
NEB 3'gfp_rev	rev. Primer mit 3'-UTR-NEB von <i>gfp</i>	AAACCCCTCCGTTTGAGAGGGGTTATGC TAGTTATTACTTGTACAGCTCGTCCATG C
tolA_fw.	<i>tolA</i> fw. von gDNA Sall Überhang	CCGTTATCTGGTGGGGTCGACCAGAAGC AAGCTGAAGAG

Name	Beschreibung	Sequenz (5'-3' Richtung)
tolA_rev.	<i>tolA</i> rev. von gDNA HindIII Überhang	GCGATAAAGCTTTTCAGTTGCCGCTTTC
ydbH XhoI_fw.	<i>ydbH</i> fw. Mit XhoI Überhang	CATCATCACCATCACCACCTCGAGATGC TGGGTAATATAAAGCCG
ydbH 264 Sall_rev.	<i>ydbH</i> rev. Mit Sall Überhang	CAGCTTGCTTCTGGTCGACGTTCAATAA CCAGCGGC
5'UTR_astD_fw	<i>astD</i> fw. mit Klonierungsstellen und 5'-UTR von gDNA	GATGGGTACCGCGAATTAATACGACTCA CTATAGGGCTTAAGTATAAGGAGGAAAA AATATGCTCGAGCATCATCACCATCACC ACACTTTATGGATTAACGGTGACTGG
3'UTR_astD_rev	<i>astD</i> rev. nach 549 Nt mit HindIII und BamHI von gDNA	GATGGGATCCTAACTAGCATAACCCCTC TCTAAACGGAGGGGTTTAAGCTTCATA AACGCATTACCGCTTCG
astD_fw	<i>astD</i> fw. von gDNA fw mit XhoI Überhang	GATGCTCGAGGGACTCTCTTGCGGTCTG GTTTC
astB_rev	<i>astB</i> rev. von gDNA rev mit HindIII Überhang	GTAGAAGCTTGGCGTGCAACTTTTTCCA GTACC
astB_fw Hisx6	<i>astB</i> fw. von gDNA mit His Fusion	GGTGGTGCGATGAACCATCATCACCATC ACCACGCCTGGGAAGTCAATTTTCG
astD_rev Hisx6	<i>astD</i> rev. von gDNA mit His Fusion	ATTGACTTCCCAGGCGTGGTGATGGTGA TGATGGTTCATCGCACCCACCTC
L9_gDNA_fw	<i>rplI</i> fw. von gDNA, Überhang mit XhoI und NcoI Schnittstellen	CTCGAGCCATGGGGATGCAAGTTATTCT GCTTG
L9_gDNA_rev	<i>rplI</i> rev. von gDNA, Überhang mit BamHI und Sall Schnittstellen	GTCGACGGATCCTTCAGCTACTACGTTT ACG
S6_gDNA_fw	<i>rpsF</i> fw. von gDNA, Überhang mit XhoI und NcoI Schnittstellen	CTCGAGCCATCGGGATGCGTCATTACGA AATCG
S6_gDNA_rev	<i>rpsF</i> rev. von gDNA, Überhang mit BamHI und Sall Schnittstellen	GTCGACGGATCCCTCTTCAGAATCCCCA GCTTCAG
L33_gDNA_fw	<i>rpmG</i> fw. von gDNA, Überhang mit XhoI und NcoI Schnittstellen	CTCGAGCCATCGGGATGGCTAAAGGTA TTCGTG
L33_gDNA_rev	<i>rpmG</i> rev. von gDNA, Überhang mit BamHI und Sall Schnittstellen	GTCGACGGATCCTTTGATTTTCGCTTCT TTGTAG
S13_gDNA_fw	<i>rpsM</i> fw. von gDNA, Überhang mit XhoI und NcoI Schnittstellen	CTCGAGCCATGGGGGTGGCCCGTATAGC AGGC

Name	Beschreibung	Sequenz (5'-3' Richtung)
S13_gDNA_rev	<i>rpsM</i> rev. von gDNA, Überhang mit BamHI und Sall Schnittstellen	GTCGACGGATCCTTTCTTGATCGGTTTG CGCGG
PLGA-mRNA I	Hybridisiert zu PLGA mRNA	CAAGGAGGTTGCCGTACTGAGTCGTAGC TATTCGAAGGAGGT
PLGA-mRNA II	Hybridisiert zu PLGA mRNA	CGTAGAATCCGGCCTAAACGTAGCTAAG GAGGTGTAACCT
PLGA-mRNA II	Hybridisiert zu PLGA mRNA	CGTAGAATCCGGCCTAAACGTAGCTAAG GAGGTGTAACCT
PLGA-mRNA III	Hybridisiert zu PLGA mRNA	GAGTAACGTTGCTTGCAGAAGGAGGTAG CTAGCCAGTTGCAGTCAGTCCAGGTAC
PLGA-mRNA VI	Hybridisiert zu PLGA mRNA	GGATTCTACGACCTCCTTCGAATAGCTA CGACTCAGTACGGCAACCTCCTTGGTAC
PLGA-mRNA V	Hybridisiert zu PLGA mRNA	GTTACTCAGGTTACACCTCCTTAGCTAC GTTTAGGCC
PLGA-mRNA VI	Hybridisiert zu PLGA mRNA	CTGGACTGACTGCAACTGGCTAGCTACC TCCTTCTGCAAGCAAC

Tabelle 5 Oligonukleotide zur Herstellung von Sonden mit ihrer Beschreibung und Sequenz

Name	Beschreibung	Sequenz (5'-3' Richtung)
<i>glpD_fw</i>	Amplifizierung einer <i>glpD</i> Sonde fw.	CGCGGTTTATCCGTGCTGATGCTG GAGG
<i>glpD_rev</i>	Amplifizierung einer <i>glpD</i> Sonde rev.	GCCGGTATCGATATCTTCCGATTC CACAATCCAC
<i>gusA_fw</i>	Amplifizierung einer <i>gusA</i> Sonde fw.	GGGTGGACGATATCACCGTGGTGA CG
<i>gusA_rev</i>	Amplifizierung einer <i>gusA</i> Sonde rev.	CAATCACCACGATGCCATGTTCAT CTGC
<i>araDH_fw</i>	Amplifizierung einer <i>araDH</i> Sonde fw.	GTGAGGCGCTTGGCAACTAC
<i>araDH_rev</i>	Amplifizierung einer <i>araDH</i> Sonde rev.	GAGATATCGGTCGTCGTTCCGCC
<i>dhfr_fw</i>	Amplifizierung einer <i>dhfr</i> Sonde fw.	TGCCGGGGAGCGCCCAAATC
<i>dhfr_rev</i>	Amplifizierung einer <i>dhfr</i> Sonde rev.	GGTACTGCTTTTTGTGGCG

Tabelle 6 Oligonukleotide für die Zielgerichtete Mutagenese mit ihrer Beschreibung und Sequenz in rot markiert sind die Positionen der Sequenz welche durch die Mutation verändert werden

Name	Beschreibung	Sequenz (5'-3' Richtung)
L9_QC_for.	Ersetzt Leu an Position 75 durch ein Cys	GAAGTT TGT GCGAGCTGCTAATGCTCGCGC
L9_QC_rev.	Ersetzt Leu an Position 75 durch ein Cys	ACA AACTTCAGCCAGTTTAGC
S6_QC_for.	Ersetzt Asp an Position 41 durch ein Cys	CTGGAA TGC TGGGGCCGCCGTCAGCTGGC
S6_QC_rev.	Ersetzt Asp an Position 41 durch ein Cys	GCT TTCCAGACGGTGGATCTTGC
L33_QC_for.	Ersetzt Lys an Position 29 durch ein Cys	CCACTACG TGT AACAAACGTACTAAGCCGG
L33_QC_rev.	Ersetzt Lys an Position 29 durch ein Cys	ACA CGTAGTGGTATAGAAG
S13_QC_for. 10	Ersetzt Asp an Position 10 durch ein Cys	CATTCCT TGT CATAAGCATGCCGTAA TCG
S13_QC_rev. 10	Ersetzt Asp an Position 10 durch ein Cys	ACA AGGAATGTTAATGCCTGC
S13_QC_for. 85	Ersetzt Cys an Position 85 durch ein Ser	CTTGGT AGC TATCGCGGTTTGCGTCA TCG
S13_QC_rev. 85	Ersetzt Cys an Position 85 durch ein Ser	GCT ACCAAGATCCATCAGGCGC
1594_TGA+14_fw	<i>HVO_1594</i> fw. TGA 14 NT Abstand	CCGCCT TGA CTGGAGGTGACCGCATG
1594_TGA+14_rev.	<i>HVO_1594</i> rev. TGA 14 NT Abstand	TC AGGCGGTGAAGAAGCC
1594_TGA+23_fw	<i>HVO_1594</i> fw. TGA 23 NT Abstand	GCTTC TGA ACCGCCAAACTGGAGGTG
1594_TGA+23_rev.	<i>HVO_1594</i> rev. TGA 23 NT Abstand	TC AGAAGCCGCCCGTGTGTC
2431_TGA+14_fw.	<i>HVO_2431</i> fw. TGA 14 NT Abstand	CGGAT TGA GGAGGTGACCGCCG
2431_TGA+14_rev.	<i>HVO_2431</i> rev. TGA 14 NT Abstand	TC AATCCGAGCGCTCCTC
2431_TGA+23_fw.	<i>HVO_2431</i> fw. TGA 23 NT Abstand	GGAG TGA TCCGATTGGGGAGGTG
2431_TGA+23_rev.	<i>HVO_2431</i> rev. TGA 23 NT Abstand	TC ACTCCTCCAAGTAGGTCACGAG

Name	Beschreibung	Sequenz
2555_TGA+14_fw.	HVO_2555 fw. TGA 14 NT Abstand	GAGATT TG AGGAGGTGACGAGTGATG G
2555_TGA+14_rev.	HVO_2555 rev. TGA 14 NT Abstand	TCA AATCTCGACGACGACGTG
2555_TGA+23_fw.	HVO_2555 fw. TGA 23 NT Abstand	CGT CTGA GAGATTATGGGAGGTGACG AG
2555_TGA+23_rev.	HVO_2555 rev. TGA 23 NT Abstand	TC AGACGACGTGAGATTTTCGTCTTC

Die trocken gelieferten Oligonukleotide wurden in TE Puffer (Tabelle 7) gelöst.

Tabelle 7 TE Puffer

Name	Substanz	Menge	Endkonzentration
TE Puffer	1 M Tris-HCl pH 8.0	10 mL	10 mM
	1 M EDTA	1 mL	1 mM
ad 1 L mit H₂O bidest			

1.5. Kit-Systeme

Tabelle 8 Verwendete Kits mit deren Verwendung und Hersteller

Kit	Verwendung	Hersteller
E.Z.N.A.® Cycle Pure Kit	Aufreinigung von PCR-Produkten	VWR, Darmstadt
E.Z.N.A.® Gel Extraktion Kit	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	VWR, Darmstadt
E.Z.N.A.® Plasmid Isolation Kit NucleoSpin RNA	Plasmid-Isolation RNA-Isolation	VWR, Darmstadt Machery-Nagel, Düren, DE
NucleoSpin Plasmid Easy Pure	Plasmid-Isolation	Machery-Nagel, Düren, DE
BC Assay Protein Quantification Kit	Bestimmung von Proteinmengen	Uptima, Montluçon Cedex, France
PurExpress Kit	<i>in vitro</i> Translation	New England Biolabs

1.6. Größenstandards

Alle verwendeten Größenstandards für die unterschiedlichen Gele sind in der nachfolgenden Tabelle mit deren Hersteller aufgelistet.

Tabelle 9 Verwendete Größenstandards und deren Hersteller

Größenstandard	Hersteller
Ribo Ruler High Range RNA Ladder	Thermo scientific
RiboRuler Low Range RNA Ladder	Thermo scientific
GeneRuler 1kb DNA Ladder	Thermo scientific
GeneRuler 100 bp+ DNA Ladder	Thermo scientific
PageRuler Prestained	Thermo scientific
PageRuler LR unstained	Thermo scientific

1.7. Computerprogramme und Datenbanken

Für die Erstellung von Versuchen und Auswertungen von Daten wurden die Programme in Tabelle 10 verwendet.

Tabelle 10 Verwendete Software und Datenbanken

Software/Datenbank	Hersteller
Clone Manager 9 Professional Edition	Scientific & Educational Software, Cary, USA
Geldoku Software EasyWin 32	Herolab, Wiesloch
Gimp 2.8	S. Kimball, P. Mattis und das GIMP-Team
HaloLex: https://www.halolex.mpg.de/public/	Max-Planck Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. München
ImageJ	Wayne Rasband, NIH
Microsoft Office 2013	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Nanodrop 3.5.1	Coleman Rech., Orlando, USA
Peak Track	Isco Inc., Lincoln, USA
Rotor Gene 6.1	Corbett Reaseach, Melburne, Australien
SnapGene Viewer	GLS Biotech LLC, San Diego, USA
SoftMaxPro 5.4.5	Molecular Device, Sunnyvale, USA
WinASPECT	Analytik Jena AG, Jena

1.8. Enzyme

Alle in dieser Arbeit verwendeten Enzyme unterteilt in Restriktionsenzyme (Tabelle 11), Polymerasen und Ligasen (Tabelle 12) sowie sonstige Enzyme (Tabelle 13) werden mit Beschreibung und Hersteller aufgeführt.

Tabelle 11 Restriktionsenzyme mit Erkennungssequenz und Hersteller

Enzym	Erkennungssequenz	Hersteller
BamHI	5'...G GATCC...3' 3'...CCTAG G...5'	Thermo Scientific, Waltham, USA
BglII	5'...A GATCT...3' 3'...TCTAG A...5'	Thermo Scientific, Waltham, USA
EcoRV	5'...GAT TAC...3' 3'...CTA ATG...5'	Thermo Scientific, Waltham, USA
DpnI	5'...GA ^{CH₃} TC...3' 3'...CT _{CH₃} AG...5'	Thermo Scientific, Waltham, USA
HindIII	5'...A AGCTT...3' 3'...TTCGA A...5'	Thermo Scientific, Waltham, USA
KpnI	5'...GGTAC C...3' 3'...C CATGG...5'	Thermo Scientific, Waltham, USA
NcoI	5'...C CATGG...3' 3'...GGTAC C...5'	Thermo Scientific, Waltham, USA
NdeI	5'...CA TATG...3' 3'...GTAT AC...5'	Thermo Scientific, Waltham, USA
PstI	5'...CTGCA G...3' 3'...G ACGTC...5'	Thermo Scientific, Waltham, USA
Sall	5'...G TCGAC...3' 3'...CAGCT G...5'	Thermo Scientific, Waltham, USA
XhoI	5'...C TCGAG...3' 3'...GAGCT C...3'	Thermo Scientific, Waltham, USA

Tabelle 12 Polymerasen und Ligasen und deren Hersteller

Enzym	Enzymklasse	Hersteller
<i>Taq</i>	DNA-Polymerase	Eigenisolation AK Soppa
<i>Taq</i>	DNA-Polymerase	Biozym Scientific, Oldendorf
T4-DNA-Ligase	Ligase	Thermo Scientific, Waltham, USA
<i>Phusion</i>	DNA-Polymerase	Thermo Scientific, Waltham, USA
T7-Polymerase	RNA Polymerase	Thermo Scientific, Waltham, USA

Tabelle 13 Sonstige Enzyme deren Beschreibung und Hersteller

Enzym	Beschreibung	Hersteller
Lysozym	Spaltet Peptidoglykane	AppliChem, Darmstadt
DNase I	Spaltet DNA	Thermo Scientific, Waltham, USA
RNasin	Ribonuklease Inhibitor	Promega, Madison, USA
SUPERase-In	RNase Inhibitor	Thermo Scientific, Waltham, USA
T5 Exonuklease	Verdaut 5'-Enden der DNA	Thermo Scientific, Waltham, USA
M-MLV reverse Transkriptase point mutant	RNA-Anhängige DNA Polymerase	Promega, Madison, USA

1.9. Plasmide

Die in dieser Arbeit erstellten und verwendeten Plasmide sind in Anhang 1 (siehe Anhang) mit Ihrem Namen, Nummerierung und wichtigen Charakteristika aufgeführt.

2. Organismen und Kultivierung

2.1. Organismen

Verwendete Bakterienstämme sowie ihr Genotyp sind in der nachfolgenden Tabelle (siehe Tabelle 14) dargestellt.

Tabelle 14 Bakterienstämme mit ihrem Genotyp und Herkunft

Organismus	Genotyp	Herkunft
<i>E. coli</i> XL-1 blue	<i>supE44, hsaR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1, lac[F'proAB, lacZΔM15 Tn10(tetR)]</i>	(Bullock, Fernandez, and Short 1987)
<i>E. coli</i> JW3389	$\Delta(\text{araD-araB})567, \Delta\text{lacZ4787}(\text{:rrnB-3}), \lambda^{-}, \Delta\text{glpD759}(\text{:kan}), \text{rph-1}, \Delta(\text{rhaD-rhaB})568, \text{hsdR514}, \Delta\text{gusA}(\text{:kan})$	(Baba <i>et al.</i> 2006)
<i>E. coli</i> K12 MG1655	$F^{-}, \lambda\text{mda-1}, \text{ilvG}^{-}, \text{rfb-50}, \text{rph-1}$	(Blattner <i>et al.</i> 1997)
<i>E. coli</i> ΔS6	$\Delta(\text{araD-araB})567, \Delta\text{lacZ4787}(\text{:rrnB-3}), \lambda, \Delta\text{rpsF}(\text{:kan}), \text{rph-1}, \Delta(\text{rhaD-rhaB})568, \text{hsdR514}$	(Baba <i>et al.</i> 2006)
<i>E. coli</i> ΔS13	MC150 $\Delta\text{recA } \Delta\text{lacZ } \Delta\text{rpsM}(\text{:kan})$	(Cukras and Green 2005)
<i>E. coli</i> ΔL9	$\Delta(\text{araD-araB})567, \Delta\text{lacZ4787}(\text{:rrnB-3}), \lambda^{-}, \Delta\text{rplI}(\text{:kan}), \text{rph-1}, \Delta(\text{rhaD-rhaB})568, \text{hsdR514}$	(Baba <i>et al.</i> 2006)
<i>E. coli</i> ΔL33	$\Delta(\text{araD-araB})567, \Delta\text{lacZ4787}(\text{:rrnB-3}), \lambda, \Delta\text{rpmG}(\text{:kan}), \text{rph-1}, \Delta(\text{rhaD-rhaB})568, \text{hsdR514}$	(Baba <i>et al.</i> 2006)
<i>E. coli</i> M15 pREP4	<i>Nal^S, Str^S, Rif^S, Thi⁻, Lac⁻, Ara⁺, Gal⁺, Mtl⁻, F⁻, RecA⁺, Uvr⁺, Lon⁺, plasmidische Expression lac Repressor Gen</i>	Qiagen N.V., Hilden

Verwendete *H. volcanii* Stämme sowie ihr Genotyp sind im Folgenden (Tabelle 15) aufgestellt.

Tabelle 15 *Haloferax volcanii* Stämme mit ihrem Genotyp und ihrer Herkunft

Organismus	Genotyp	Quelle
<i>Haloferax volcanii</i> H26	$\Delta pyrE2$	(Allers <i>et al.</i> 2004)
<i>H. volcanii</i> H26 $\Delta dhfr$	$\Delta pyrE2; \Delta dhfr$	(Rizzo 2018)

2.1.1. Anzucht von *H. volcanii*

Alle Medien wurden bei 121°C für 25 Minuten autoklaviert. Hitzeempfindliche Zusätze wurden sterilfiltriert durch Filter mit Porengrößen von 0,2 µm oder 0,4 µm und zu den abgekühlten Medien hinzugegeben. Agarplatten wurden bei 4°C gelagert, Medien ohne Antibiotika bei Raumtemperatur.

Die *H. volcanii* Stämme wurden in Komplexmedium kultiviert, dessen Zusammensetzung in der nachfolgenden Tabelle 16 beschrieben ist. 30 mL Flüssigkulturen wurden in 100 mL Erlenmeyerkolben bei 42°C und 275 rpm in einem Volumen von 30 mL Medium angezogen, beimpfte Agarplatten wurden bei 42°C inkubiert.

Tabelle 16 Komplexmedium

Name	Substanz	Menge	Endkonzentration
Salzlösung	NaCl	125 g	2,1 M
	MgCl ₂ ·6 H ₂ O	45 g	220 mM
	MgSO ₄ ·7 H ₂ O	10 g	41 mM
	KCl	10 g	13 mM
	CaCl ₂ ·2 H ₂ O	1,34 g	9 mM
	1M Tris/HCl pH 7.2	50 mL	50 mM
ad 900 mL mit VE-H₂O autoklavieren			
Nährstofflösung	Hefeextrakt	3 g	0,3% (w/v)
	Trypton	5 g	0,5% (w/v)
ad 100 mL mit VE-H₂O autoklavieren			

Name	Substanz	Menge	Endkonzentration
Spurensalze	ZnSO ₄ ·7 H ₂ O	0,1 g	3,5 µM
	MnCl ₂ ·4 H ₂ O	0,03 g	1,5 µM
	H ₃ BO ₃	0,3 g	50 µM
	CoCl ₂ ·6 H ₂ O	0,2 g	8,5 µM
	CuCl ₂ ·2 H ₂ O	0,01 g	0,5 µM
	NiCl ₂ ·6 H ₂ O	0,02 g	1 µM
	Na ₂ MoO ₄ · H ₂ O	0,03 g	1 µM
		ad 100 mL mit H₂O bideest. pH 3-4 sterilfiltrieren 1 mL/L Medium	
Eisensulfat	FeSO ₄ ·7 H ₂ O	0,23 g	8 µM
		ad 100mL mit H₂O bideest. pH 3-4 sterilfiltrieren 1 mL/L Medium	
Uracil	Uracil	0,5 g	50 µg/mL
		ad 10 mL mit DMSO 1 mL/L Medium	

Nach dem Autoklavieren wurden Salzlösung und Nährstofflösung zusammengegossen und mit jeweils 1 mL Spurensalzen, Eisensulfat und Uracil supplementiert. Für Festmedien wurden der Salzlösung vor dem autoklavieren 1,2% Agar hinzugegeben. Zur Erstellung von Basalsalz wurden die 900 mL Salzlösung mit autoklaviertem VE-H₂O auf 1 L aufgefüllt.

2.1.2. Anzucht von *E. coli*

Alle Medien wurden bei 121°C für 25 Minuten autoklaviert. Hitzeempfindliche Zusätze wurden sterilfiltriert durch Filter mit Porengrößen von 0,2 µm oder 0,4 µm und zu den abgekühlten Medien hinzugegeben. Agarplatten wurden bei 4°C gelagert, Medien ohne Antibiotika bei Raumtemperatur.

Die *E. coli* Stämme werden in entsprechendem Medium bei 37°C und 220 rpm als Flüssigkultur angezogen. Beimpfte Platten wurden bei 37°C inkubiert. Die Zusammensetzung für Medien ist in Tabelle 17 gezeigt

Tabelle 17 *E. coli* Medium

Name	Substanz	Menge	Endkonzentration
SOB ⁺	Trypton	20 g	2% (w/v)
	Hefeextrakt	5 g	0,5% (w/v)
	NaCl	0,6 g	10 mM
	KCl	0,187 g	2,5 mM
	1M MgCl ₂ /MgSO ₄	10 mL	10 mM
		ad 1 mL mit VE-H₂O autoklavieren	
10x M9-Salze	Na ₂ HPO ₄ ·7 H ₂ O	75,2 g	337 mM
	KH ₂ PO ₄	30 g	220 mM
	NaCl	5 g	85,5 mM
	NH ₄ Cl	5 g	9,3 mM
		ad 1 L mit VE-H₂O autoklavieren	
20%Glucose	Glucose	200 g	20% (w/v)
		ad 1 L mit VE-H₂O autoklavieren	
MgSO ₄	MgSO ₄ ·7 H ₂ O	24,65 g	1 M
		ad 100 mL mit VE- H₂O autoklavieren	
CaCl ₂	CaCl ₂ ·2 H ₂ O	14,70 g	1 M
		ad 100 mL mit VE- H₂O autoklavieren	
Biotin	Biotin	50 mg	1 mg/mL
		ad 50 mL mit VE-H₂O sterilfiltrieren 1 mL Aliquots bei -20°C lagern	
Thiamin	Thiamin-HCl	50 mg	1 mg/mL
		ad 50 mL mit VE-H₂O sterilfiltrieren 1 mL Aliquots bei -20°C lagern	

Name	Substanz	Menge	Endkonzentration
100x Spuren- Elemente	EDTA	5 g ad 800 mL mit VE- H₂O pH 7.5 mit NaOH	13,4 mM
	FeCl ₃ ·6 H ₂ O	0,83 g	3,1 mM
	ZnCl ₂	84 mg	0,62 mM
	CuCl ₂ ·2 H ₂ O	13 mg	76 µM
	CoCl ₂ ·2 H ₂ O	10 mg	42 µM
	H ₃ BO ₃	10 mg	162 µM
	MnCl ₂ ·4 H ₂ O	1,6 mg ad 1 L mit VE-H₂O sterilfiltrieren	8,1 µM
M9-Medium	10x M9-Salze	100 mL	1x
	20% Glucose (w/v)	20 mL	0,4% (w/v)
	1 M MgSO ₄	1 mL	1 mM
	1 M CaCl ₂	0,3 mL	0,3 mM
	1 mg/mL Biotin	1 mL	1 µg
	1 mg/mL Thiamin	1 mL	1 µg
	100x Spuren- Elemente	10 mL ad 1 L mit VE-H₂O	1x

Für die Herstellung von ¹⁵N-Markierten Ribosomen wurde ¹⁵NH₄Cl in die 10x M9-Salze eingesetzt. Festmedien wurden mit 1,2% Agar vor dem Autoklavieren angesetzt.

2.1.3. Anlegen von Dauerkulturen

Erstellen von Dauerkulturen von *H. volcanii*

Zur Erstellung von Dauerkulturen aus *H. volcanii* Kulturen wurden 25 mL einer spätexponentiellen Kultur in Szintillationsgefäße überführt und diese fest verschlossen. Die Kulturen werden bei Raumtemperatur gelagert.

Erstellen von Dauerkulturen aus *E. coli*

Um *E. coli* Dauerkulturen herzustellen wurden zweimal 2 mL einer über-Nacht-Kultur bei 6.000 rpm für eine Minute zentrifugiert und das Zellsediment in 600 mL Medium resuspendiert. Hinzu wurden 300 µL 80%iges Glycerin gegeben und die beiden Lösungen gemischt. Dieser Ansatz wird bei -80°C gelagert.

2.1.4. Zelldichtebestimmung

Die Bestimmung der Zelldichte erfolgte entweder photometrisch indem 1 mL der Kultur in angepassten Verdünnungen in eine Küvette pipetiert wurde und die optische Dichte bei OD₆₀₀ gemessen wurde. Oder die Zelldichte wurde mittels der Neubauer Zählkammer bestimmt. Hierfür wurden jeweils vier Großquadrate ausgezählt und die Zellzahl pro mL mit der folgenden Formel berechnet:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{mL}} = \frac{\text{gezählte Zellzahl} * \text{Verdünnungsstufe}}{64} * 2 * 10^7$$

2.1.5. Transformation der verwendeten Organismen

Transformation von *H. volcanii*

Für die Transformation von *H. volcanii* wurden 2 mL einer frischen exponentiellen Kultur bei 8000 rpm für 2 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment in 180 µL SBL/EDTA-Lösung resuspendiert. Anschließend wurden 20 µL der DNA Lösung (2-5 µg Plasmid in 0,8 M NaCl) hinzugefügt und durch 20-faches invertieren des Reaktionsgefäßes gemischt. Es folgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für 5 Minuten. Anschließend wurden 230 µl PEG-Lösung in den Deckel der Reaktionsgefäße gegeben und durch schnelles Schwenken mit der Zellsuspension gemischt. Es folgte eine weitere Inkubation bei Raumtemperatur für 20 Minuten, diese wurde beendet durch die Zugabe von 1,5 mL SVL-Lösung. 100 µL der Zellsuspension werden auf Selektivmedium ausgestrichen und für 4-5 Tage bei 42°C inkubiert. Verwendete Puffer und Lösungen sind in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet (Tabelle 18).

Tabelle 18 Lösungen für die Transformation von *H. volcanii*

Name	Substanz	Menge	Endkonzentration
Sphäroplasten- bildungslösung (SBL)	NaCl	23,37 g	0,8 M
	KCl	1 g	27 mM
	1 M Tris/Hcl pH 8.2	25 mL	25 mM
	Saccharose	75 g ad 500 mL mit VE-H₂O sterilfiltrieren	15% (w/v)
SBL/EDTA	EDTA	1,89 g ad 100 mL mit SBL pH 8.2 sterilfiltrieren	50 mM
PEG-Lösung	PEG-600	6 mL	60% (v/v)
	SBL	4 mL	
Sphäroplasten- verdünnungslösung (SVL)	NaCl	100 g	3,4 M
	MgSo ₄ ·7 H ₂ O	21,6 g	175 mM
	KCl	1,25 g	34 mM
	1 M Tris/HCl pH 7.2	25 mL	50 mM
	CaCl ₂ ·2 H ₂ O	0,36 g	5 mM
	Saccharose	75 g ad 500 mL mit VE-H₂O sterilfiltrieren	15% (w/v)

Herstellung von kompetenten *E. coli* Zellen für die Hitzeschock-Transformation

Für die Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen für die Hitzeschock-Transformation wurden 250 mL mit einer über Nacht Kultur auf eine Start OD₆₀₀ von 0,05 inokuliert. Die Zellen wurden schüttelnd bei 37°C inkubiert und bei einer OD₆₀₀ von 0,6 geerntet. Hierfür wurde die Kultur zunächst auf Eis für 10 Minuten abgekühlt, anschließend folgte eine Zentrifugation bei 4000 rpm und 4°C für 10 Minuten. Das Zellsediment wurde nach dem Verwerfen des Überstandes in 50 mL kaltem TB-Puffer suspensiert und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte eine weitere Zentrifugation bei 4000 rpm und 4°C für 10 Minuten. Der Überstand wurde abermals verworfen und das Zellsediment in 20 mL TB-Puffer resuspendiert. Dazu werden 1,4 mL DMSO (Endkonzentration 7% (v/v)) gegeben und vorsichtig gemischt durch leichtes Schwenken. Nach einer weiteren Inkubation der Probe auf Eis für 10 Minuten werden

die Zellen als 200 μL Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgt bei -80°C . Die benötigten Lösungen sind in Tabelle 19 dargestellt.

Tabelle 19 Lösungen zur Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*

Name	Substanz	Menge	Endkonzentration
TB-Puffer	MOPS	0,21 g	10 mM
	$\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,22 g	15 mM
	KCl	1,86 g	250 mM
	$\text{MnCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,89 g	55 mM
		ad 90 mL mit H_2O bidest. pH 6,8 mit KOH ad 100 mL mit H_2O bidest. sterilfiltrieren bei 4°C lagern	

Transformation von chemisch kompetenten *E. coli* Zellen

Für die Transformation von *E. coli* wurden Aliquots von chemisch kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut. Zu 100 μL Zellen wurden 25 ng Plasmid-DNA oder 5 μL Ligationsansatz gegeben und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock von 45 Sekunden bei 42°C und eine Inkubation auf Eis für weitere 2 Minuten. Der Transformationsansatz wurde anschließend auf Selektivmedium ausgestrichen und die Platten bei 37°C über Nacht inkubiert.

3. Methoden

3.1. Molekularbiologische Methoden

3.1.1. Isolierung und Reinigung von DNA

Isolierung von genomischer DNA aus *H. volcanii*

Für die Isolation von genomischer DNA wurden 10 mL einer exponentiellen *H. volcanii* Kultur mit einer Zentrifugation bei 4.000 rpm und RT für 15 Minuten sedimentiert. Das Pellet wurde in 300 μL Basalsalz resuspendiert und mit der Zugabe von 2,5 mL Lyse Puffer wurde mittels invertieren lysiert. Die Wasserphase wurde dann vorsichtig mit 5 mL Ethanol überschichtet und die an der Phasengrenze ausfallende DNA mit einer gebogenen Glaskapillare aufgewickelt. Die DNA wurde so für 5 Minuten inkubiert und anschließend zwei Mal in Ethanol und darauf folgend zwei Mal in Diethylether gewaschen. Zum Lösen wurde die DNA in 1 mL TE-Puffer

gegeben. Gelagert wurde die genomische DNA bei 4°C. Die verwendeten Lösungen sind in der nachfolgenden Tabelle (siehe Tabelle 20) aufgelistet.

Tabelle 20 Lösungen für die Isolation genomischer DNA aus *H. volcanii*

Name	Substanz	Menge	Endkonzentration
Lyse-Puffer	NaCl	2,9 g	100 mM
	1 M Tris/HCl pH 8.0	50 mL	10 mM
	EDTA	0,146 g	1 mM
	SDS	0,25 g	0,05%
ad 500 mL mit VE-H₂O			
TE-Puffer	1 M Tris/HCl pH 8.0	10 mL	10 mM
	1 M EDTA pH 8.0	1 mL	1 mM
ad 1 L mit VE-H₂O			

Isolation von genomischer DNA aus *E. coli*

Für die Isolation genomischer DNA aus *E. coli* wurden 1,5 mL einer über Nacht Kultur bei 10.000 rpm für 30 Sekunden zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstands wurde das Pellet in 400 µL TE-Puffer (siehe Tabelle 7) resuspendiert. Die Lyse der Zellen erfolgte durch die Zugabe von 50 µL 10% SDS (v/v) und 50 µL Proteinase K und einer Inkubation der Probe für eine Stunde bei 37°C. Die Probe wurde im Anschluss durch eine Kanüle (Sterican, Gr.17) gepresst und zu 500 µL Zelllysat wurden 500 µL 1:1 Phenol/Chloroform gegeben und gemischt. Es folgte eine Zentrifugation bei 10.000 rpm für 5 Minuten und die obere Phase wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Dieser Schritt wurde wiederholt bis keine Interphase mehr zu sehen war. Dann wurde DNA mittels Chloroform extrahiert und die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt bevor 1 mL 95% Ethanol und 25 µL 5 M NaCl hinzugegeben wurden und eine weitere Zentrifugation folgte bei 10.000 rpm und 4°C für 10 Minuten. Das entstandene Pellet wurde luftgetrocknet und schließlich mit 100 µL TE-Puffer gelöst. Für den Verdau der RNA wurden 5 µL RNaseA (5 mg/mL in TE-Puffer pH 8.0) dazu gegeben und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Es folgte eine weitere Fällung mit 250 µL Isopropanol und 40 µL 5 M Ammonium-Acetat, welche nach der Zugabe und Mischen für 10 Minuten inkubiert wurde bei RT. Die Proben wurden für 5 Minuten bei 10.000 rpm sedimentiert und das entstandene Pellet mit 500 µL 70% Ethanol gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 10.000 rpm für 5 Minuten

wurde der Überstand verworfen und die genomische DNA in einem angemessenen Volumen TE Puffer gelöst.

Isolation von Plasmid DNA aus *E. coli*

Für die Isolation von Plasmid DNA aus *E. coli* wurde das NucleoSpin Plasmid Easy Pure Kit von Machery-Nagel oder das Plasmid Isolation Kit von E.Z.N.A von VWR jeweils nach Herstellerangaben verwendet.

Reinigung linearer DNA-Moleküle

Für die Reinigung von mittels PCR amplifizierten DNA Molekülen sowie Restriktionsverdauen wurde das E.Z.N.A.-Kit von VWR (Cycle Pure DNA) nach Herstellerangaben verwendet.

3.1.2. Photometrische Bestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte photometrisch am Nanodrop 2000c. Es wurden jeweils zuerst 1 µL der Referenz aufgetragen und gemessen und im Anschluss 1 µL der zu messenden Probe.

3.1.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

PCR zur Amplifikation eines Inserts für die Klonierung

Um Inserts für die Klonierung zu generieren wurde die *Phusion* High-Fidelity DNA Polymerase verwendet, welche eine Proof-Reading Funktion besitzt. Für die Klonierung in *E. coli* wurde ein dNTPs-Mix mit 50% GC-Gehalt verwendet und für *H. volcanii* eine dNTPs-Mix mit 66% GC-Gehalt, jeweils angepasst an den Guanin und Cytosin Gehalt des Genoms des jeweiligen Organismus (siehe Tabelle 26). Außerdem wird der Puffer der Polymerase je nach Organismus und GC-Gehalt gewählt. Für *E. coli* der HF-Puffer und für *H. volcanii* der GC-Puffer. Ein PCR Ansatz ist in Tabelle 21 gezeigt.

Tabelle 21 PCR Ansatz der *Phusion*-Polymerase

Substanz	Menge	Endkonzentration
5x Puffer	10 µL	1x
dNTPs	8 µL	Variabel
10 µM Oligonukleotid 1	2 µL	0,4 µM
10 µM Oligonukleotid 2	2 µL	0,4 µM
<i>Phusion</i> Polymerase	0,2 µL	0,5 U
Template	Variabel	10 ng Plasmid bzw. 50 ng gDNA /50µL
ad 50 µL H₂O bideest.		

Ein PCR-Programm ist in der nächsten Tabelle (Tabelle 22) dargestellt. Dabei ist die Annealing-Temperatur jeweils von den Schmelztemperaturen der verwendeten Oligonukleotiden abhängig und die Elongationszeit bezieht sich auf die Länge des Amplifikats, es ist zu beachten, dass die *Phusion*-Polymerase 15 Sekunden pro 1 kb benötigt.

Tabelle 22 PCR Programm für die *Phusion*- Polymerase

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	98	2 Min Plasmid, 5 Min gDNA	1
Denaturierung	98	30 Sekunden	
Annealing	variabel	30 Sekunden	25-30
Elongation	72	variabel	
Aufbewahrung	4	∞	1

Fusions-PCR von zwei DNA Molekülen

Für die Fusionierung von zwei PCR-Produkten, mit überlappenden Sequenzbereichen, wurde die Fusions-PCR verwendet. In der ersten PCR zur Erstellung der Fragmente werden Primer verwendet welche einen 12-15 bp langen komplementären Überlapp erzeugten. In dieser PCR wurde die *Phusion*-Polymerase verwendet. Zu Beginn der Reaktion werden keine Primer hinzugegeben um ein Anlagern und Amplifizieren ausgehend vom Überlapp zu ermöglichen. Nach 5 Zyklen wurden dann Primer hinzugegeben, welche jeweils am äußeren Ende der Fragmente hybridisieren, um das komplette Fragment zu amplifizieren. Von den beiden Fragmenten wurden jeweils 200 ng eingesetzt. Die folgende Tabelle 23 zeigt das Programm für die Fusions-PCR.

Tabelle 23 Fusions-PCR Programm

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	98	2 Minuten	1
Denaturierung	98	30 Sekunden	
Annealing	variabel	1 Minute	5
Elongation	72	variabel	
Zugabe von jeweils 2,5 µL der Oligonukleotide			
Denaturierung	98	30 Sekunden	
Annealing	variabel	1 Minute	25-30
Elongation	72	variabel	
Aufbewahrung	4	∞	1

Zielgerichtete Mutagenese (Site-directed-Mutagenesis-PCR)

Für die spezifische Veränderung von Sequenzen wurde eine Site-directed-Mutagenesis-PCR mit der Phusion Polymerase durchgeführt. Die Methode wurde nach dem QuickChange[®] Site-Directed Mutagenesis Kit (#200518) von Stratagene (San Diego, USA) geplant. Oligonukleotide welche die Mutation einführen sollen besitzen jeweils am 5'-Ende den Bereich der Mutation an 15-20 hybridisierenden Nukleotiden. Die Methode beruht auf der Amplifizierung eines kompletten Plasmids, welches daher eine Größe von 5 kb nicht überschreiten sollte. Der Ansatz (Tabelle 24) sowie das PCR-Programm (Tabelle 25) sind in den Tabellen zu sehen.

Tabelle 24 PCR-Ansatz für die Site-Directed-Mutagenesis

Substanz	Menge	Endkonzentration
5xHF Puffer	10 µL	1x
dNTPs	8 µL	320 µM
10µM Oligonukleotid 1	1,2 µL	0,24 µM
10µM Oligonukleotid 2	1,2 µL	0,24 µM
Phusion Polymerase	0,2 µL	0,5 U
Template	Variabel	50 ng /50 µL
ad 50 µL H₂O bidest.		

Tabelle 25 PCR-Programm für die Site-Directed-Mutagenesis-PCR

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit	Zyklenzahl
Initiale			
Denaturierung	98	30 Sekunden	1
Denaturierung	98	30 Sekunden	
Annealing	variabel	1 Minute	18
Elongation	72	1 kb/min	
Aufbewahrung	4	∞	1

Anschließend wurde der Ansatz mit 2 µL DpnI versetzt und für 2 Stunden bei 37°C inkubiert um alle methylierte Ursprungs-DNA zu verdauen und nur neue, mutierte Plasmide zu erhalten. Diese werden für eine Transformation von chemisch kompetenten *E. coli* X11 *blue* Zellen verwendet (siehe 2.1.5).

Kolonie-PCR

Für die Analyse von transformierten Kolonien wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Diese erfolgte mit der laboreigenen *Taq* (Tabelle 26, Tabelle 27, Tabelle 28) oder der *Taq*-Polymerase von Biozym (Tabelle 12, Tabelle 29, Tabelle 30). Es wurde jeweils mit sterilen Pipettenspitzen ein Klon gepickt und auf einer Sicherungsplatte ausgestrichen. Für *E. coli* kann die Spitze direkt in den PCR Ansatz getaucht werden. Für *H. volcanii* wird die Spitze zunächst in 20 µL-50 µL H₂O bidest. getaucht und von diesen, lysierten Zellen, werden 2 µL in die PCR eingesetzt.

Tabelle 26 Lösungen für die laboreigene *Taq*-PCR

Name	Substanz	Menge	Endkonzentration
10x PCR-Puffer	3 M KCl	8,33 mL	500 mM
	1,5 M Tris/HCl pH 9.0	3,33 mL	100 mM
	Triton-X	500 µL	1% (v/v)
	ad 50 mL H₂O bidest. 2mL Aliquots bei -20°C lagern		
dNTP66-Lösung	100 mM dATP	100 µL	1 mM
	100 mM dTTP	100 µL	1 mM
	100 mM dGTP	150 µL	1,5 mM
	100 mM dCTP	150 µL	1,5 mM
ad10 mL H₂O bidest. 1 mL Aliquots bei -20°C lagern			
dNTP50-Lösung	100 mM dATP	100 µL	1 mM
	100 mM dTTP	100 µL	1 mM
	100 mM dGTP	100 µL	1 mM
	100 mM dCTP	100 µL	1 mM
ad10 mL H₂O bidest. 1 mL Aliquots bei -20°C lagern			

Tabelle 27 PCR-Ansatz für die laboreigene *Taq*-Polymerase

Substanz	Menge	Endkonzentration
10x PCR-Puffer	2 µL	1x
25 mM MgCl ₂	1,2 µL	1,5 mM
dNTPs	4 µL	variabel
10 µM Oligonukleotid 1	1 µL	0,5 µM
10 µM Oligonukleotid 2	1 µL	0,5 µM
Taq-Polymerase	0,5 µL	
ad 20 µL H₂O bidest.		

Tabelle 28 PCR-Programm für die laboreigene *Taq*-Polymerase

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	96	5 Minuten	1
Denaturierung	96	30 Sekunden	
Annealing	variabel	30 Sekunden	30
Elongation	72	1 kb/min	
Aufbewahrung	4	∞	1

Tabelle 29 PCR-Ansatz für die Biozym *Taq*-Polymerase

Substanz	Menge	Endkonzentration
5x PCR-Puffer	4 µL	1x
dNTPs	4 µL	variabel
10 µM Oligonukleotid 1	1 µL	0,5 µM
10 µM Oligonukleotid 2	1 µL	0,5 µM
<i>Taq</i> -Polymerase	0,125 µL	0,625 U
ad 20 µL H₂O bidest.		

Tabelle 30 PCR-Programm für die Biozym *Taq*-Polymerase

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	95	5 Minuten	1
Denaturierung	95	15 Sekunden	
Annealing	variabel	15 Sekunden	30
Elongation	72	4 kb/min	
Aufbewahrung	4	∞	1

PCR zur Herstellung Digoxigenin-markierter Sonden

Für die Generierung von Digoxigenin-markierten Sonden wurde ein 100 μL PCR-Ansatz der laboreigenen *Taq*-Polymerase (siehe Tabelle 27) mit lowT-dNTPs (Tabelle 31) angesetzt. Der Ansatz wird auf zwei Reaktionsgefäße verteilt und in eines der beiden werden 0,5 μL Dig-dUTPs hinzugefügt, während der andere als Kontrolle dient. Die Elongationszeit wird auf 2 Minuten verlängert bei einem 500 Bp langen Fragment, um den verlangsamten Einbau von Dig-dUTP zu ermöglichen. Nach der PCR wurden die Ansätze mit und ohne Dig-dUTP gelektrophoretisch analysiert, da der korrekte Einbau zu einem verlangsamten Laufverhalten führt.

Tabelle 31 Lösungen für die Herstellung Digoxigenin-markierter Sonden

Name	Substanz	Menge	Endkonzentration
low-T-dNTP66-Lösung	100 mM dATP	100 μL	1 mM
	100 mM dTTP	20 μL	0,2 mM
	100 mM dGTP	150 μL	1,5 mM
	100 mM dCTP	150 μL	1,5 mM
ad10 mL H₂O bidest. 1 mL Aliquots bei -20°C lagern			
low-T-dNTP50-Lösung	100 mM dATP	100 μL	1 mM
	100 mM dTTP	20 μL	0,2 mM
	100 mM dGTP	100 μL	1 mM
	100 mM dCTP	100 μL	1 mM
ad10 mL H₂O bidest. 1 mL Aliquots bei -20°C lagern			

3.1.4. Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung von Nukleinsäuren

Für die elektrophoretische Auftrennung von DNA wurden 0,7-2%ige Agarosegele verwendet. Diese wurden mit 1x TBE-Puffer hergestellt, welcher ebenfalls als Laufpuffer verwendet wurde. Von den Größenstandards (siehe Tabelle 9) wurden jeweils 5 μL eingesetzt und die Proben mit 6x Probenpuffer versetzt (Endkonzentration = 1x). Für analytische Gele wurden jeweils 5-10 μL Probe verwendet und für präperative Gele 60-120 μL . Kleine Gele wurden für 1 Stunde bei 100 V laufen gelassen und große Gele bei 120 V für 1,5-2 Stunden. Die Gele wurden

anschließend im Ethidiumbromidbad (2 mg/mL) gefärbt und die DNA unter UV-Licht detektiert. In Tabelle 32 sind die Rezepte für die benötigten Lösungen aufgelistet.

Tabelle 32 Lösungen für die DNA-Gelelektrophorese

Name	Substanz	Menge	Endkonzentration
10x Tris-Borat-EDTA (TBE)	Tris	107,82 g	0,89 M
	H ₃ BO ₃	55,03 g	0,89 M
	Na ₂ EDTA	7,45 g	0,02 M
ad 1 L mit VE-H₂O			
Vor Verwendung 1:10 verdünnen			
6x Ladebuffer	Tris	121 mg	10 mM
	Harnstoff	42 g	7 M
	EDTA	813 mg	28 mM
	87% Glycerin	40 mL	34,8% (v/v)
	Bromphenolblau	100 mg	0,1% (w/v)
ad100 mL mit VE-H₂O			

3.1.5. Klonieren

Spaltung von DNA mit Hilfe von Restriktionsenzymen

Für die Spaltung der DNA wurden Restriktionsenzyme der Firma NEB GmbH (Frankfurt am Main) und ThermoFischer Scientific Inc. (Wilmington, USA) verwendet. Die Spaltung erfolgte jeweils nach Herstellerangaben.

Ligation von DNA Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten wurde sowohl für DNA-Fragmente mit *blunt-ends* als auch mit *sticky-ends* durchgeführt. Es wurden jeweils 50 ng Plasmid mit dem dreifachen Überschuss an Insert eingesetzt. Die folgende Formel zeigt wie die Menge an Insert berechnet wurde:

$$\text{Menge Insert (ng)} = \frac{\text{Menge an Vektor (ng)} * \text{Insertlänge (bp)}}{\text{Vektorlänge (bp)}} * 3$$

Die folgenden Tabellen zeigen die Ansätze für eine *blunt-End* Ligation (Tabelle 33) bzw. eine *sticky-End* Ligation (Tabelle 34). Wobei sie sich maßgeblich durch die Zugabe von Restriktionsenzym in dem *blunt-End* Ansatz unterscheiden um falsch-positive Klone zu verringern. Eine Gradienten-Ligation erfolgt in einem Eisbad bei 37°C über Nacht, sodass ein Temperatur-Gradient entsteht und die optimalen

Temperaturen für die Ligase und Restriktionsenzym (in dieser Reihenfolge) durchlaufen werden.

Tabelle 33 Ansatz für eine *blunt-End*-Ligation

Substanz	Menge
Plasmid (50 ng)	variabel
Insert (x3)	Variabel
T4-DNA-Ligase	1 µL
10xPuffer des Restriktionsenzym	2 µL
Restriktionsenzym	1 µL
10mM ATP	1 µL
ad 20 µL H₂O bidest. Gradienten-Ligation über Nacht	

Tabelle 34 Ansatz für eine *sticky-End*-Ligation

Substanz	Menge
Plasmid (50 ng)	variabel
Insert (x3)	Variabel
T4-DNA-Ligase	1 µL
10xT4-Ligase-Puffer	2 µL
ad 20 µL H₂O bidest. mindestens 20 Minuten bei Raumtemperatur	

Die Ligase wurde inaktiviert bei 65°C für 20 Minuten und die Ansätze in kompetente *E. coli* transformiert (siehe 2.1.5).

Gibson-Assembly

Das Gibson-Assembly nach (Gibson *et al.* 2009) wurde verwendet um ein Plasmid mit einem oder mehreren Inserts zu ligieren. Mittels Phusion-PCR wurden zuerst Fragmente von Plasmid und Inserts erstellt, welche 25 Nukleotide lange komplementäre Enden zueinander besitzen. Diese werden durch die verwendeten Primer eingebracht. Die Mengenverhältnisse werden mit der folgenden Formel berechnet.

$$\text{Menge Insert(ng)} = \frac{\text{Länge des Inserts (kb)}}{\text{Länge des Vektors (kb)}} \times 50\text{ng} \times 3$$

Der Ansatz wurde wie in der nachfolgenden Tabelle (siehe Tabelle 35) beschrieben angesetzt und für 1 Stunde bei 50°C inkubiert und anschließend wurden 2 µL für die Transformation von kompetenten *E. coli* Zellen eingesetzt.

Tabelle 35 Puffer und Ansätze für das Gibson Assembly

Name	Substanz	Menge	Endkonzentration
5x Isothermal	PEG-800	1,5 g	25% (w/v)
Reaktions Puffer (IRP)	1 M Tris-HCl pH 7.5	3 mL	500 mM
	2 M MgCl ₂	150 µL	50 mM
	1 M DTT	300 µL	50 mM
	dATP, dCTP, dGTP, dTTP	je 60 µL	je 1 mM
	100 mM NAD	300 µL ad 6 mL mit H₂O bidest 70 µL Aliquots bei -20°C gelagert	5 mM
2x Master Mix	5x IRP	64 µL	1x
	10 U/µL T5 Exonuclease	0,13 µL	0,008 U
	40 U/µL <i>Taq</i> -DNA Ligase	32 µL	8 U
	2 U/µL Phusion	4 µL ad 60 µL mit H₂O bidest. 5 µL Aliquots bei -20°C gelagert	0,05 U
	Reaktionsansatz	2x Master Mix Vektor DNA Insert DNA	5 µL variabel variabel ad 10 µL H₂O bidest

3.1.6. Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmid DNA wurde von der Firma Eurofins Scientific (Luxemburg) durchgeführt. Die Vorbereitung der Proben erfolgte dafür nach Angaben der Firma.

3.1.7. Isolierung von RNA

Für die Isolierung von gesamt RNA wurden 2-4 mL der zu untersuchenden Kultur geerntet durch eine Zentrifugation bei 13.000 rpm für 5 Minuten. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 400 µL Aufschlusspuffer resuspendiert.

Für die Isolation der RNA aus *E. coli* folgte an dieser Stelle eine zusätzliche Sonifizierung auf Stufe 3 für 30 Sekunden (Output control 30%), diese wurde pro Probe drei Mal wiederholt mit jeweils 1 Minute Pause auf Eis dazwischen.

Jeder Probe werden 50 µL 2 M Natriumacetat pH 4 (in H₂O_{DEPC}) zugegeben und anschließend für 5 Sekunden mittels vortexen gemischt. Dann wurden 500 µL wassergesättigtes Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (P/C/I) zugegeben und die Proben ein weiteres Mal für 5 Sekunden mittels vortexen gemischt. Anschließend folgte eine Inkubation für 30 Minuten bei -20°C und danach wurden die Proben für 15 Minuten bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Von der wässrigen Phase wurden 400 µL in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1 mL kaltem 96% Ethanol gemischt durch vortexen. Es folgte eine weitere Inkubation bei -20°C für mindestens 1 Stunde. Die Proben wurden für 1 Stunde bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die RNA wurden dann mit 500 µL kaltem 70%igem Ethanol (in H₂O_{DEPC}) gewaschen und nochmals zentrifugiert bei 13.000 rpm und 4°C für 15 Minuten. Der Überstand wurde entfernt und die RNA getrocknet für mindestens 15 Minuten unter dem Abzug. Gelöst wurde die RNA in 30 µL H₂O_{DEPC} bei 60°C für 10 Minuten. In der folgenden Tabelle (Tabelle 36) sind die verwendeten Lösungen gezeigt.

Tabelle 36 Lösungen für die RNA-Isolation

Name	Substanz	Menge	Endkonzentration
Aufschlusslösung	750 mM Natriumcitrat-Lösung pH7	7 mL	35 mM
	30% (w/v) N-Laurylsarcosin	3,5 mL	0,7% (w/v)
	β-Mercaptoethanol	1 mL	0,7% (w/v)
	Guanidiniumthiocyanat	100 g	67% (w/v)
	H ₂ O _{DEPC}	127 mL	

3.1.8. Denaturierende RNA-Agarosegelelektrophorese

Für ein 1%iges RNA-Gel wurden 0,8 g Agarose eingewogen und in 70 mL H₂O_{DEPC} durch Kochen gelöst. Hierzu wurden unter Rühren 8 mL 10xMOPS gegeben und mit zu einer Temperatur von etwa 60°C rührend abgekühlt. Unter dem Abzug wurden 3 mL 37% Formaldehyd hinzugegeben und zum Aushärten wurde die Lösung in einen Gelschlitten mit gewünschtem Kamm gegeben.

Die zu analysierenden RNA-Proben (1-4 µg) wurden mit 1,25x RNA Probenpuffer versetzt. Auch 1 µL des Markers (LowRange oder HighRange siehe Tabelle 9) wurden mit RNA Ladepuffer versetzt. Alle Proben wurden für 10 Minuten auf 60°C erhitzt und danach für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Die RNA wird auf dem Gel für 2 Stunden bei 100 V aufgetrennt. Als Laufpuffer dient 1x MOPS Puffer. Anschließend kann das Gel unter UV-Licht detektiert werden. Die Rezepte aller verwendeten Lösungen sind in Tabelle 37 dargestellt.

Tabelle 37 Lösungen für RNA-Gele

Name	Substanz	Menge	Endkonzentration
10x MOPS	MOPS	104,7 g	500 mM
	EDTA	3,7 g	10 mM
		ad 1 L mit H₂O_{DEPC} pH 7 autoklavieren 1:10 Verdünnen für Laufpuffer	
RNA- Probenpuffer	10xMOPS	1 mL	1x
	100% Formamid	5 mL	50% (v/v)
	37% Formaldehyd	1,84 mL	6,8% (v/v)
	87% Glycerin	1,34 mL	11,7% (v/v)
	Bromphenolblau	10 mg	0,1% (w/v)
	Ethidiumbromid (0,1mg/mL)	50 µL	50 µg/mL
	H ₂ O _{DEPC}	770 µL	

3.1.9. Northern-Blot

Für die Erstellung eines Northern-Blots wurde zunächst ein RNA-Gel laufen gelassen. Im Anschluss wurde der Blot wie folgt aufgebaut. Zunächst werden 17 Blatt eines 1,4 mm dicken Blottingpapiers als Basis verwendet. Darauf wurden drei Blatt eines 0,37 mm dicken Blottingpapiers, welche in 20x SSC-Puffer äquilibriert wurden, gelegt. Darauf folgte die positiv geladene Nylonmembran, diese wurde zunächst 10 Minuten in H₂O_{DEPC} vorgequollen und dann in 20x SSC-Puffer äquilibriert. Als nächstes wurde das RNA-Gel auf den Stapel gelegt, gefolgt von weiteren drei dünnen Blottingpapieren, äquilibriert in 20 x SSC-Puffer. Luftblasen wurden herausgewalzt und eine Pufferbrücke wurde auf den Stapel gelegt, welche diesen mit

zwei 20x SSC-Puffer-Reservoirs verbindet. Auf den Stapel wurde als letztes ein Gelschlitten gelegt auf welche eine gefüllte 250 mL Schottfalsche gestellt wurde um den Blot zu beschweren. Das Blotten erfolgte für mindestens 16 Stunden.

Vor dem kompletten Abbau des Blots wurden die Taschen des RNA Gels mit Bleistift auf der Membran markiert. Die Membran wurde dann im Stratalinker bei 120 mJ UV-quervernetzt. Für die Überprüfung des Blottingvorgangs sowie zum Sichtbarmachen der Markerbanden konnte die Membran mittels Methylenblau-Lösung für 5 Minuten gefärbt werden und mittels $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ für 15 Minuten entfärbt. Markerbanden wurden mit dem Bleistift nachgezeichnet. Alle benötigten Lösungen sind in der nachfolgenden Tabelle (Tabelle 38) aufgelistet.

Tabelle 38 Lösungen für den Northern-Blot

Name	Substanz	Menge	Endkonzentration
20x SSC-Puffer	NaCl	175,3 g	3 M
	tri-Natriumcitrat·2H ₂ O	88,2 g ad 1 L mit VE-H₂O pH 7 autoklavieren	300 mM
Methylenblau-Lösung	Methylenblau Nartium-Acetat	0,04 g 4,1 g ad 100 mL mit VE-H₂O pH 5	0,04% (w/v) 0,5 M

Hybridisierung der Membran mit einer Sonde

In einem Hybridisierungsröhrchen wurde die Membran für 1 Stunde in Hybridisierungspuffer mit tRNA (120µg/mL) unter langsamem Drehen bei 50°C vorhybridisiert. Die Sonde wurde für 5 Minuten bei 96°C denaturiert, wenn es die erste Verwendung war, oder bei 96°C für 10 Minuten, wenn die Sonde wiederverwendet wurde. In den Hybridisierungspuffer mit tRNA wurden 30 µL der Dig-UTP markierten Sonde hinzugefügt. Wurde eine Sonde wiederverwendet wurde der Hybridisierungspuffer der Vorhybridisierung verworfen und die bereits in Hybridisierungspuffer vorliegende Sonde in das Röhrchen gegeben. Die

Hybridisierung erfolgte bei 50°C über Nacht. Alle Lösungen für die Hybridisierung sind in Tabelle 39 dargestellt.

Tabelle 39 Lösungen für die Hybridisierung einer Sonde

Name	Substanz	Menge	Endkonzentration
100x Denhardt-Lösung	Rinderserumalbumin	10 g	2% (w/v)
	Ficoll 400	10 g	2% (w/v)
	Polyvinylpyrolidon	10 g	2% (w/v)
ad 500 mL VE-H₂O filtrern durch Faltenfilter bei -20°C lagern			
Hybridisierungs-Puffer	20x SSC-Puffer	250 mL	5x
	100x Denhardt-Lsg	30 mL	3x
	SDS	5 g	0,5% (w/v)
	30% (w/v) N-Laurylsarcosin	6,7 mL	0,2% (w/v)
	Dextransulfat	50 g	5% (w/v)
ad 500 mL VE-H₂O autoklavieren Zugabe von			
	Formamid	500 mL	50% (v/v)

Chemilumineszenznachweis

Alle nachfolgend erklärten Schritte erfolgten im Hybridisierungsröhrchen. Die Waschschrte jeweils bei schnellem Drehen und die Inkubationsschritte bei langsamem Drehen. Zunächst wurde die Sonde entfernt und zur Wiederverwendung bei -20°C gelagert. Die Membran wurde zwei Mal für 5 Minuten bei 50°C in 50 mL 2x SSC-Puffer + 0,5% (w/v) SDS gewaschen. Anschließend folgten zwei Waschschrte bei 50°C in 1x SSC-Puffer + 0,5% (w/v) SDS für jeweils 15 Minuten. Die Membran wurde einmal kurz in Waschpuffer geschwenkt und es folgte die Inkubation bei Raumtemperatur in 20 mL Blocking-Lösung für 30 Minuten. Anschließend wurde die Membran für weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur in 20 mL Blocking-Lösung mit 1 µL Anti-Dig-UTP-Antikörper inkubiert. Es folgten zwei weitere Waschschrte in 80 mL Waschpuffer bei Raumtemperatur für 10 Minuten, bevor die Membran dann in 20 mL Detektionspuffer für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Die letzte Inkubation der Membran erfolgte bei Raumtemperatur für 5 Minuten in 15 mL CDP-Star-Working-Solution (15 mL

Detektionspuffer + 10 µL CDP-Star). Die noch feuchte Membran wurde in einer Folie in eine Röntgenkassette gelegt. Die Detektion der Chemolumineszenz erfolgte in der Dunkelkammer unter Rotlicht. Zunächst wurde ein Röntgenfilm für die gewünschte Zeit aufgelegt. Die Dauer ist dabei abhängig von der Sonde und dem Transkriptlevel und wird je nach Versuch an die Intensität der Banden angepasst. Der Film wurde dann in der Entwicklerlösung geschwenkt bis Banden auf dem Film zu erkennen waren, anschließend wird der Film kurz in Wasser gewaschen und für die Fixierung mindestens 3 Minuten in Fixierer geschwenkt bevor er ein weiteres Mal in Wasser gewaschen und zum Trocknen an der Luft aufgehängt wurde. Die Markerbanden wurden anschließend von der Membran auf den Film übertragen. Die verwendeten Lösungen sind in Tabelle 40 gezeigt.

Tabelle 40 Lösungen für den Chemolumineszenznachweis

Name	Substanz	Menge	Endkonzentration
Maleinsäure-Puffer	Maleinsäure	11,6 g	100 mM
	NaCl	8,77 g	150 mM
		ad 1 L mit VE H₂O pH 7.5 mit NaOH autoklavieren	
Blockingpuffer	Blocking-Reagenz	10 g	1% (w/v)
		ad 1 L mit Maleinsäurepuffer autoklavieren lagern bei 4°C	
Waschpuffer	Tween 20	1,5 mL	0,3% (v/v)
		ad 500 mL mit Maleinsäurepuffer	
Detektions-Puffer	Tris	12,11 g	100 mM
	NaCl	5,84 g	100 mM
	MgCl ₂	4,77 g	50 mM
		ad 1 L mit VE-H₂O pH 9.5	

3.1.10. Quantitative PCR (qPCR)

Für die Bestimmung von Transkriptleveln wurde unter anderem die quantitative PCR verwendet. Hierfür wurde als erstes die gesamte RNA wie in 3.1.7 beschrieben isoliert. Mit diesen Proben wurde ein DNase-Verdau mit der DNaseI von Thermo Scientific nach Herstellerangaben zweimal durchgeführt um DNA-freie RNA Proben zu erhalten. Hiervon wurde eine cDNA-Synthese durchgeführt mittels reverser Transkription. Es wurden jeweils reverse Primer für die zu untersuchenden Gene eingesetzt sowie ein reverse Primer für ein *H. volcanii housekeeping* Gen (*hstA*). Der Reaktions-Ansatz ist in der folgenden Tabelle aufgeführt. (Tabelle 41)

Tabelle 41 Ansatz einer cDNA Synthese mittels reverser Transkription

Substanz	Menge	Endkonzentration
Gesamt-RNA		1 µg
5x Puffer	4 µL	1x
dNTPs 66Mix	4 µL	20% (v/v)
Oligonukleotid (rev.)	0,5 µL	0,5 µM
	ad. 19 µL H₂O_{DEPC}	

Der Ansatz wurde zunächst für 5 Minuten bei 65°C denaturiert und dann für 5 Minuten bei 55°C inkubiert für eine Anlagerung der Oligonukleotide. Es wurde 1 µL reverse Transkriptase hinzugegeben und der Ansatz für eine Stunde bei 55°C inkubiert. Nach einer weiteren Zugabe der reversen Transkriptase von 0,5 µL wurde der Ansatz für eine weitere Stunde bei 55°C inkubiert. Die Inaktivierung erfolgte bei 80°C für 5 Minuten.

Die cDNA wurde in den Verdünnungen 1:10 und 1:100 in die quantitative Real-Time-PCR eingesetzt. Hierfür ist nachfolgend der Reaktionsansatz dargestellt (siehe Tabelle 42).

Tabelle 42 Ansatz für die qRT PCR

Substanz	Menge
H ₂ O	3,8 µL
10x Puffer (Biozym)	2 µL
dNTPs	5 µL
10x dsGreen	2 µL
fw. Oligonukleotid (20µM)	1,6 µL
rev. Oligonukleotid (20µM)	1,6 µL
Probe (in der jeweiligen Verdünnung)	4 µL

Jeweils drei technische Replikate pro Verdünnung wurden mit dem Reaktionsansatz in den Reaktionsgefäßen gemischt und in dem Cycler Rotor-Gene RT-6 amplifiziert. Dafür wurde das nachfolgende Programm verwendet. (siehe Tabelle 43)

Tabelle 43 PCR Programm für die qRT-PCR

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	96	2 Minuten	1
Denaturierung	96	30 Sekunden	
Annealing	65	30 Sekunden	40
Elongation	72	30 Sekunden	
Finale Elongation	72	3 Minuten	1
Schmelzkurve	bis 96°C		1
Aufbewahrung	4°C	∞	1

Die Analyse erfolgte mit dem Rotor-Gene 6 Programm. Es wurde für jede Probe ein C_T -Wert festgelegt (*cycle threshold*), dieser gibt die genaue Zellzykluszahl an, zu welchem das Fluoreszenzsignal, aufgrund der enthaltenen DNA Menge, den Hintergrund überschreitet. Die Auswertung erfolgte nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode (Livak and Schmittgen 2001).

3.1.11. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Für die Auftrennung von Proteinen der SDS-PAGE wurden je nach Größe Polyacrylamidgele in 12% oder Tris-Tricine Gele nach (Schägger 2006) verwendet. Letztere eignen sich vor allem für die Auftrennung von Proteinen von 1 kDa bis 20 kDa. Alle dafür benötigten Puffer und Lösungen sind in Tabelle 44 aufgeführt.

SDS-PAGE Gele wurden mit den in Tabelle 45 angegebenen Rezepten hergestellt und die Proben mit vierfach-Ladepuffer (sodass eine Endkonzentration von einfach entsteht) gemischt und bei 95°C für 5 Minuten denaturiert. Die Proben wurden auf Eis abgekühlt und auf das Gel aufgetragen. Im Sammelgel liefen die Proben bei 100 V und im Trenngel bei 120-150 V.

Für die Tris-Tricine-SDS-PAGE wurden die Gele nach Ihren Rezepten in Tabelle 45 angefertigt und die Proben mit dem vierfach Ladepuffer gemischt, sodass eine einfach Endkonzentration entstand. Die Denaturierung erfolgte bei 95°C für 10 Minuten und die Proben wurden auf Eis abgekühlt bevor sie auf das Gel aufgetragen wurden. Die Auftrennung erfolgt im Sammelgel bei 40 V und im Trenngel bei 60-80 mA.

Tabelle 44 Puffer und Lösungen für die SDS-Gelelektrophorese

Name	Substanz	Menge	Endkonzentration
Trenngelpuffer	Tris SDS	181,65 g 3,84 g ad 1 L mit VE-H₂O pH 8.8 mit HCl	1,5 M 0,384% (w/v)
Sammelgelpuffer	Tris SDS	60,55 g 4 g ad 1 L mit VE-H₂O pH 6.8 mit HCl	0,5 M 0,4% (w/v)
APS	Ammoniumper- oxidsulfat	10 mg ad 100 mL mit H₂O bidest. bei -20°C lagern	10% (w/v)
4x SDS- Probenpuffer	1,25 M Tris/HCl pH 6.8 SDS β-Mercapto- ethanol 87% Glycerin Bromphenolblau	0,5 mL 0,25 g 0,5 mL 1,16 mL 5 mg ad 5 mL mit H₂O bidest.	125 mM 5% (w/v) 10% (v/v) 20% (v/v) 0,1% (w/v)
10x SDS- Laufpuffer	Tris Glycin SDS	30 g 144 g 10 g ad 1 L mit VE-H₂O vor Verwendung 1:10 verdünnen	248 mM 1,9 M 1% (w/v)
Tris-Tricine-Puffer und Lösungen:			
10x Anoden- Puffer	Tris 37% HCl	121,14 g 18 mL ad 1 L mit VE-H₂O pH 8.9 vor Verwendung 1:10 verdünnen	1 M 225 mM

Name	Substanz	Menge	Endkonzentration
10x Kathoden Puffer	Tris	121,14 g	1 M
	Tricine	179,17 g	1 M
	SDS	10 g	1% (w/v)
ad 1L mit VE-H₂O pH 8.25 vor Verwendung 1:10 verdünnen			
3x Gel Puffer	Tris	363,42 g	3 M
	SDS	3 g (w/v)	0,3% (w/v)
ad 1 L mit VE-H₂O pH 8.45			
4x Probenpuffer	SDS	120 mg	12% (w/v)
	Mercapto-ethanol	600 µL	6% (v/v)
	Glycerol	3,4 mL	30% (w/v)
	Coomassie G-250	5 mg	0,05% (w/v)
	1M Tris/HCl pH 7.0	1.5 mL	150 mM
ad 10 mL mit VE- H₂O			
AB-3-Stock- Lösung	Acrylamid	48 g	49,5% (w/v)
	Bisacrylamid	1,5 g	3% (w/v)
ad 100 mL mit H₂O bidest.			

Tabelle 45 Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele für Polyacrylamidgele

Gel	Bestandteil	Menge
SDS-PAGE:		
Trenngel	H ₂ O bidest.	1,64 mL
	Trenngelpuffer	1,29 mL
	30% Acrylamid	2 mL
	10% APS	75 µL
	TEMED	5 µL
Sammelgel	H ₂ O bidest.	1,5 mL
	Sammelgelpuffer	635 µL
	30% Acrylamid	333 µL
	10% APS	40 µL
	TEMED	3,5 µL
Tris-Tricine-SDS-PAGE (2Gele)		
Trenngel:	AB-3	2,5 mL
	3x Gel-Puffer	2,5 mL
	87% Glycerin	600 µL
	H ₂ O bidest.	1,9 mL
	10% APS	25 µL
	TEMED	5 µL
Sammelgel	AB-3	500 µL
	3x Gel-Puffer	1,5 mL
	H ₂ O bidest.	4 mL
	10% APS	45 µl
	TEMED	7,5 µL

Für die Detektion der Proteine wurden die Gele im Anschluss mit Coomassie oder Silber gefärbt. Die Lösungen für die Coomassie Färbung sind in Tabelle 47 aufgelistet. Die Silberfärbung ist im Folgenden und in Tabelle 46 beschrieben. Für eine Silberfärbung wurde das Gel zuerst für 15 Minuten in der Fixierlösung schüttelnd inkubiert. Es folgte eine Inkubation für 30 Minuten in der Sensitivierungslösung. Dann wurde das Gel dreimal je 5 Minuten in H₂O bidest gewaschen. Darauf folgend wurde das Gel 20 Minuten in der Silbernitratlösung gefärbt und dann zweimal für eine Minute in H₂O bidest gewaschen. Die Entwicklung erfolgte für 5-10 Minuten in der Entwicklerlösung bis ausreichen Banden zu erkennen waren. Gestoppt wird die Reaktion mit der Zugabe der Stopplösung. Darin wurde das Gel weitere 10 Minuten inkubiert. Vor der Detektion des Gels wurde es nochmal dreimal für 5 Minuten in H₂O gewaschen.

Tabelle 46 Lösungen für die Silberfärbung von SDS-Gelen

Name	Substanz	Menge	Endkonzentration
Fixierlösung	Ethanol	50 mL	40% (v/v)
	Essigsäure	12,5 mL	10% (v/v)
		ad. 125 mL mit H₂O bideest.	
Sensitivierungs- lösung	Ethanol	7,5 mL	6% (v/v)
	5% (w/v)		
	Natrium- thiosulfat	5 mL	0,2% (w/v)
	Natriumacetat	8,4 g	820 mM
		ad. 125 mL mit H₂O bideest.	
Silbernitrat- lösung	Silbernitrat	0,3 g	15 mM
		ad. 125 mL mit H₂O bideest.	
Entwickler- lösung	Natriumcarbonat	3 g	230 mM
	5% (w/v)		
	Natrium- thiosulfat	2,5 µL	0,0625% (w/v)
	37%		
	Formaldehyd	50 µL	0,015% (v/v)
		ad. 125 mL mit H₂O bideest.	
Stopplösung	EDTA	1,8 g	80 mM
		ad. 62,5 mL mit H₂O bideest.	

3.1.12. Western-Blot

Für die Erstellung eines Western-Blots wurde ein Elektroblothing genutzt. Dafür wurden fünf 0,37 mm dicke Filterpapiere in Transferpuffer äquilibriert und als Basis gelegt. Darauf kam die PVDF-Membran, diese wurde für 10 Minuten in Transferpuffer vorgequollen. Hierauf kommt das zu blottende SDS-Gel und weitere fünf 0,37 mm dicke, in Transferpuffer äquilibrierte Filterpapiere. Alle Luftblasen wurden aus dem Stapel gewalzt und die Proteine für 2 h bei 3 mA/cm² geblottet.

Um die Proteinübertragung zu kontrollieren wurde im Anschluss das SDS-Gel für 15 Minuten bei Raumtemperatur in Coomassie gefärbt und über Nacht in Entfärberlösung entfärbt. Die Membran wurde für 10 Minuten in Tintenfärbelösung inkubiert und für 30 Minuten in H₂O bidest. entfärbt. Wurde ein ungefärbter Marker genutzt konnte dieser nun mit Bleistift nachgezeichnet werden. Die Membran wurde kurz in PBS geschwenkt und dann in 5% (w/v) Milchpulver in PBS für eine Stunde geblockt. Im Anschluss wurde die Membran in PBS geschwenkt und über Nacht in dem 1. Antikörper, dem H3-His in einer Verdünnung von 1:4.000 in 5% (w/v) Milchpulver in PBST, inkubiert. Dann wurde die Membran drei Mal für 10 Minuten in PBST gewaschen. Die nächste Inkubation im 2. Antikörper, dem Anti-Mouse igG-Peroxidase-Antikörper in einer Verdünnung von 1:10.000, erfolgte für eine Stunde in 5% (w/v) Milchpulver in PBS. Darauf folgten weitere drei Waschschrte für jeweils 10 Minuten in PBST. Alle verwendeten Lösungen sind in Tabelle 47 dargestellt. Für die Detektion wurde Roti[®] Lumin nach Herstellerangaben verwendet. Die Detektion findet in der Dunkelkammer statt wie in (3.1.9, Chemielumineszenznachweis) beschrieben.

Tabelle 47 Lösungen für den Western-Blot

Name	Substanz	Menge	Endkonzentration
Coomassie-Färbelösung	Coomassie Blue R-250	0,5 g	0,05% (w/v)
	Methanol	545 mL	55% (v/v)
	Eisessig	92 mL	9,2% (v/v)
	H ₂ O bidest.	363 mL	
Entfärbelösung	Methanol	500 mL	25% (w/v)
	Eisessig	100 mL	5% (w/v)
	H ₂ O bidest.	1400 mL	
Tintenfärbelösung	Tween 20	0,5 mL	0,05% (w/v)
	Eisessigsäure	10 mL	1% (v/v)
	Tinte	1 mL	0,1% (v/v)
		ad 1 L mit PBS	
Transferpuffer	Tris	3 g	25 mM
	Glycin	11,3 g	150 mM
	Methanol	100 mL	
		ad 1 L mit VE-H₂O	
		pH 8,5 mit HCl	

Name	Substanz	Menge	Endkonzentration
PBS	NaCl	8 g	138 mM
	KCl	0,2 g	2,6 μ M
	Na ₂ HPO ₄	1,15 g	8,1 μ M
	KH ₂ PO ₄	0,2 g	1,5 mM
		ad 1 L mit VE- H₂O	
PBST	PBS	999 mL	
	Tween 20	1 mL	0,1% (v/v)

3.1.13. Isolierung von ribosomalen-Untereinheiten

Für die Isolierung von Ribosomen aus *E. coli* wurden zunächst Zellextrakte hergestellt. Dafür wurde 500 mL SOB+ Medium mit einer über Nacht Kultur auf eine Start OD₆₀₀ von 0,05 inokuliert. Bei einer OD₆₀₀ von 0,6-0,75 wurden die Zellen durch eine Zentrifugation bei 4000 rpm und 4°C für 10 Minuten geerntet. Das Zellsediment wurde in 5 mL Ribosomen-Resuspensionspuffer gelöst und ein weiteres Mal sedimentiert bei 4.000 rpm und 4°C für 5 Minuten. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment pro ein Gramm in 2 mL Ribosomen-Resuspensionspuffer aufgenommen. Der Aufschluss der Zellen erfolgte mittels Sonifizierung, dreimal für 30 Sekunden (output control 30%) auf Stufe 3 mit jeweils 1 Minute Pause auf Eis dazwischen. Zelltrümmer wurden bei einer Zentrifugation für 1 Stunde bei 13.000 rpm und 4°C sedimentiert und der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Das Lysat wurde anschließend auf ein 30%iges (w/v) Succhrose-Kissen (in Ribosomen-Resuspensionspuffer) gegeben und mittels Ultra-Zentrifugation bei 37.000 rpm für 20 Stunden bei 4°C zentrifugiert (SW40Ti Rotor) um die Ribosomen zu pelletieren. Das Pellet wurde gewaschen in 1 mL Ribosomen-Dissoziationspuffer und anschließend in 1 mL Ribosomen-Dissoziationspuffer gelöst durch Schütteln der Proben bei 4°C für eine Stunde. An dem Nanodrop kann dann die Absorption bei 260 nm gemessen werden. Für die anschließende Trennung werden 100-200 μ g RNA auf die Gradienten aufgetragen.

Für die Trennung der ribosomalen Untereinheiten werden Succrose-Gradienten von 10%-30% (w/v) in Ribosomen-Dissoziationspuffer verwendet. Die Gradienten werden erstellt mittels dem Gradient Master 107 Gradienten-Mischer (Gradient Master 107, Biocomp, Canada) und in einem SW40Ti Rotor bei 19.000 rpm und 4°C für

19 Stunden zentrifugiert. Das anschließende Fraktionieren der Gradienten erfolgt am Foxy Jr. Fraktionierer bei einer Pump-Geschwindigkeit von 60%. Die Fraktionen werden in Intervallen von 20 Sekunden gesammelt. Die gemessenen Absorptionen wurden mit der Peak Trak Software ausgewertet. Für die 30S und 50S Peaks können die gesammelten Fraktionen vereinigt werden und die Untereinheiten mittels Microcons jeweils ankonzentriert werden (nach Herstellerangaben).

3.1.14. Markierung von Ribosomen mit 6xHis-Tag

Für die Markierung von ribosomalen Untereinheiten wurden die *E. coli* Δ rProtein-Stämme verwendet (siehe Tabelle 14). Die Plasmide welche die jeweils deletierten Proteine mit einem His-Tag am N-Terminus besitzen und unter einem konstitutiven *blaP*-Promotor stehen wurden in die Δ rProtein-Stämme transformiert. Aus diesen Stämmen wurden ribosomale Untereinheiten wie in 3.1.13 beschrieben, isoliert.

3.1.15. *in vitro* Transkription

Die Herstellung von mRNA erfolgte durch eine *in vitro* Transkription mit der T7 RNA Polymerase. Hierfür wurde die Anleitung des Herstellers Thermo Scientific verwendet. Als Template kann linearisierte DNA aus einer PCR oder aus einem Restriktionsverdau eingesetzt werden. Zur Analyse der *in vitro* Transkription wurden denaturierende Polyacrylamid Gele verwendet (siehe Tabelle 48). Hierfür wurden jeweils 3 μ L *in vitro* Transkriptionsansatz mit 3 μ L RNA-Probenpuffer (Bestandteil des T7-RNA Polymerase Kits) versetzt und für 10 Minuten bei 70°C denaturiert. Nach einem Abkühlen auf Eis für 2 Minuten wurden die Proben auf das Gel aufgetragen und für 2 Stunden bei 100 V aufgetrennt.

Tabelle 48 Zusammensetzung für ein Polyacrylamid-RNA Gel

Gel	Bestandteil	Menge
Polyacrylamid-RNA Gel	10x TBE	1 mL
	30% Bisacrylamid	2,5 mL
	Urea	4,5 g
		ad 10 mL mit H ₂ O bidest.
	10% APS	150 µL
	TEMED	10 µL

3.1.16. Herstellung von S30 Lysat

Für die Herstellung *in vitro* Translationslysats (S30 Lysat) aus *E. coli* Kulturen wurden 500 mL SOB+ Medium mit einer stationären über Nacht Kultur auf eine Start OD₆₀₀ von 0,05 inokuliert. Die Zellernte erfolgte bei einer OD₆₀₀ von 3. Hierfür wurden die Kulturen für 10 Minuten auf Eis abgekühlt bevor sie bei 4.000 rpm bei 4°C für 10 Minuten zentrifugiert wurden. Die Pellets wurden in 5 mL S30 Puffer gewaschen und jeweils zwei werden in einem 15 mL Reaktionsgefäß vereinigt. Es folgte eine Zentrifugation bei 4.000 rpm und 4°C für 5 Minuten. Der Überstand wurde verworfen und die Zellsedimente gewogen. Pro Gramm Zellen wurde 1 mL S30 Puffer hinzugefügt und die Pellets resuspendiert. Der Aufschluss der Zellen wurde mittels Sonifikation durchgeführt. 1 Minute /mL Zellen wurde auf Stufe 3 für 30 Sekunden (output control 30%) sonifiziert mit jeweils einer Minute Pause alle 60 Sekunden auf Eis. Die Proben wurden auf 2 mL Reaktionsgefäße aufgeteilt und für eine Stunde bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend in ein neues Reaktionsgefäß überführt und ein weiteres Mal bei 13.000 rpm und 4°C für eine Stunde zentrifugiert. Der Überstand ist das S30 Lysat. Dieses wurde zunächst bei 37°C für 80 Minuten schüttelnd inkubiert um eine ‚run-off‘ Reaktion zu gewährleisten. Dieser Schritt gilt in der Literatur als unvermeidlich um aktives Zell-freies Lysat zu erhalten, indem die Ribosomen von den mRNAs getrennt werden (Failmezger *et al.* 2016). Das Lysat wurde für mindestens 4 Stunden gegen das 100-Fache Volumen an S30 Puffer bei 4°C dialysiert mit einem 10 kDa Cut-Off Dialyse-Schlauch. Im Anschluss wurde nochmal für 20 Minuten bei 4.000 rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein frisches Gefäß überführt. Die gesamt-Proteinmenge des Lysates wurde mittels BCA Assay analysiert (3.2.1). Als Richtwert gilt hier 37,5 mg/mL (Failmezger *et al.* 2016). Vom Lysat wurden 130 µL Aliquotes in flüssigem Stickstoff

gefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. In der folgenden Tabelle 49 ist der verwendete Puffer aufgelistet.

Tabelle 49 Puffer für der S30 Lysat Herstellung

Name	Substanz	Menge	Endkonzentration
S30 Puffer	Magnesium Acetat	1,99 g	14 mM
	Kalium Acetat	5,9 g	60 mM
	Tris	1,2 g	10 mM
		pH 8.0 mit Essigsäure	
	DTT	0,3 g	2 mM
		ad 1 L mit H₂O DEPC	

3.1.17. Entfernung von ribosomalen Untereinheiten mittels His-Tag

Für die Entfernung von ribosomalen Untereinheiten aus S30 Lysat wurde eine Affinitätschromatographie mittels eines His-Tags durchgeführt. Es wurde S30 Zelllysat erstellt (3.1.16) aus Stämmen welche ein ribosomales Protein deletiert hatten, welches plasmidisch mit einem His-Tag am N-Terminus eingebracht wurde. Das Lysat wurde direkt in die Affinitätschromatographie eingesetzt. Die Aufreinigung erfolgte in einem Batch-Verfahren dafür wurden zunächst Sepharose Beads mit NiCl inkubiert um eine Nickel Chelat Sepharose (NCS) Matrix herzustellen. Zu 100 μL Beads wurden 200 μL S30 Lysat und 50 μL 100 mM Imidazol (Endkonzentration 40 mM) gegeben und die Suspension für 30 Minuten rotierend inkubiert bei RT. Es folgt eine Zentrifugation für 5 Minuten bei 13.000 rpm und RT. Der Überstand wurde als Durchfluss aufgehoben. Zu den Beads wurde zweimal 1 mL Waschpuffer gegeben für 5 Minuten rotierend inkubiert und dann wieder zentrifugiert für 5 Minuten bei 13.000 rpm und RT. Die Überstände wurden als Waschen 1 und 2 aufgehoben. Im Anschluss wurden die Beads eluiert. Hierfür wurden 100 μL Elutionspuffer auf die Beads gegeben und für 5 Minuten rotierend inkubiert. Die Zentrifugation erfolgte bei 13.000 rpm für 5 Minuten. Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt und die Überstände als Elution 1, 2 und 3 aufgehoben. Die Beads konnten anschließend in 100 μL 20% (v/v) Ethanol bei 4°C aufgehoben werden.

Für die Analyse der gesammelten Proben wurde anschließend eine RNA-Fällung (siehe 3.1.7) durchgeführt und die Proben auf einem RNA-Agarosegel (siehe 3.1.4) analysiert.

Die verwendeten Puffer und Lösungen sind in Tabelle 50 aufgelistet.

Tabelle 50 Puffer und Lösungen für die Affinitätsaufreinigung mit His-Tag

Name	Substanz	Menge	Endkonzentration
NiCl ₂ -Lösung	NiCl ₂	12,9 g ad 500 mL H ₂ O bidest.	0,2 M
Waschpuffer	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O NaCl Imidazol	6,9 g 17,54 g 1,36 g ad 1 L H ₂ O bidest. pH 8.0 mit NaOH	50 mM 300 mM 20 mM
Elutionspuffer	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O NaCl Imidazol	6,9 g 17,54 g 17 g ad 1 L H ₂ O bidest. pH 8.0 mit NaOH	50 mM 300 mM 250 mM

3.1.18. Zellfreie Protein Expression mittels *in vitro* Translation

Für eine *in vitro* Translation wurde ein Standard Mix nach (Failmezger *et al.* 2017) verwendet. Dafür benötigt wird die aus 3.1.15 hergestellte mRNA sowie das S30 Lysat aus 3.1.16. Die Reaktionsbestandteile wurden auf Eis aufgetaut, sofern sie gefroren gelagert wurden, zügig zusammenpipetiert und anschließend für mindestens 1 Stunde bei 37°C inkubiert. In der folgenden Tabelle (siehe Tabelle 51) sind die verwendeten Puffer und Lösungen sowie der Standard Mix Ansatz aufgelistet. Im Falle einer verwendeten *gfp*-mRNA wurde die Fluoreszenz der Proben am Fluoreszenz MTP-Photometer gemessen.

Tabelle 51 Puffer und Lösungen für eine *in vitro* Translation

Name	Substanz	Menge	Endkonzentration
5x Energie-Puffer	1 M HEPES-KOH pH 8.0	2 mL	400 mM
	NTPs		
	100mM ATP	300 µL	6 mM
	100mM GTP	250 µL	5 mM
	100mM CTP	250 µL	5 mM
	100mM UTP	250 µL	5 mM
	Folinsäure	500 µL	170 µg/mL
	CoA	5 mg	1,3 mM
	NAD	5 mg	1,5 mM
	Pyruvat	220 mg	500 mM
		ad 5 mL mit H₂O_{DEPC} 60 µL Aliquots bei -80°C lagern	
AS-Lösung	280 mM Alanin (1)	26 µL	1,8 mM
	154 mM Arginin (2)	25 µL	0,925 mM
	104 mM Asparagin (3)	11 µL	0,3 mM
	139 mM Asparaginsäure (4)	14 µL	0,5 mM
	31 mM Cystein (20)	5 µL	0,04 mM
	156 mM Glutaminsäure (6)	16 µL	0,6 mM
	177 mM Glutamin (5)	27 µL	1,2 mM
	222 mM Glycin (7)	20 µL	1,1 mM
	54 mM Histidin (8)	6 µL	0,08 mM
	158 mM Isoleucin (9)	16 µL	0,6 mM
	311 mM Leucin (19)	47 µL	3,7 mM
	125 mM Lysin (10)	20 µL	0,6 mM
	84 mM Methionin (11)	13 µL	0,3 mM
	119 mM Phenylalanin (12)	27 µL	0,8 mM
	122 mM Prolin (13)	12 µL	0,4 mM
	158 mM Serin (14)	15 µL	0,6 mM
	146 mM Threonin (15)	14 µL	0,5 mM
	44 mM Tryptophan (17)	10 µL	0,1 mM
	78 mM Tyrosin (18)	12 µL	0,2 mM
	215 mM Valin (16)	32 µL	1,72 mM
	Stammlösungen in 5 M KOH (Pipetier Reihenfolge)	ad 4 mL mit H₂O bidest. pH 7.5	

Name	Substanz	Menge	Endkonzentration
Translations Ansatz	200 mM DTT	2,5 μ L	2 mM
	4,5 M Kalium Gutamat	5 μ L	90 mM
	2 M Ammonium Glutamat	2,5 μ L	20 mM
	1,8 M Magnesium Glutamat	2,5 μ L	18 mM
	265,5 mM AS-Lösung	1 μ L	1 mM
	S30 Lysat	120 μ L	48% (v/v)
	5x Energie-Puffer	50 μ L	1x
	RNA	variabel	1-2 μ g
		ad 250 μL mit H₂O_{DEPC}	

3.2. Biochemische Methoden

3.2.1. Enzymassays

Für den Nachweis von Enzymaktivitäten werden jeweils Stämme verwendet, welche das zu analysierende Enzym im Genom deletiert haben oder nachweislich eine vernachlässigbare Aktivität des im Genom codierten Proteins besitzen. Die Sequenz des Reporterenzym wird dabei auf einem Plasmid in die Zelle transformiert und unter einem induzierbarem Tryptophanase A Promotor (p_{tnaA}) in *H. volcanii* oder einem induzierbaren Arabinose Promotor (p_{BAD}) in *E. coli* exprimiert. Durch die Fusion an Gene oder Genfragmente ist die Genexpression auf Proteinlevel analysierbar.

Dihydrofolatreduktase Enzymassay in *H. volcanii*

Die Dihydrofolat-Reduktase (DHFR) ist ein Reporterenzym und für *H. volcanii* routinemäßig eingesetzt (P. Kramer *et al.* 2014; Babski *et al.* 2016). Die DHFR katalysiert die Reaktion von Dihydrofolat zu Tetrahydrofolat und die dadurch ablaufende Oxidation von NADPH zu NADP⁺. NADPH ist photometrisch messbar bei 340 nm. Um Hintergrund-Signale zu vermeiden, wird der Assay in einem $\Delta dhfr$ Stamm (siehe Tabelle 15) durchgeführt. Der Assay wurde an die Anwendung in einer Mikrotiterplatte angepasst um das parallele Testen von einigen Proben zur selben Zeit zur ermöglichen. Alle in dieser Arbeit untersuchten Konstrukte stehen unter einem indizierbaren Promotor (p_{tnaA}).

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Komplexmedium. Stämme mit den Plasmiden welche die zu analysierenden Genpaare codierten wurde zu einer frischen stationären Kultur gezogen. Daraus wurden Kulturen inokuliert, welche beim

Erreichen einer exponentiellen Phase von $4 \cdot 10^8$ Zellen/mL verwendet wurden, um eine weitere Kultur zu inokulieren. Diese wurde bei der gleichen Zelldichte, exponentiell geerntet.

Für die Zellernte wurden zum einen zweimal 2 mL Aliquots bei 13.000 rpm für 2 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert und die Pellets für die spätere RNA Isolation bei -80°C aufbewahrt. Für den Enzymassay wurden 20 mL der Kulturen bei 4.000 rpm bei 4°C für 15 Minuten zentrifugiert. Die Pellets wurden resuspendiert und in 5 mL Basalsalz gewaschen. Es folgte eine Zentrifugation bei 4000 rpm und 4°C für 15 Minuten. Die Pellets wurden in 1 mL Basalsalz aufgenommen und in 1,5 mL Reaktionsgefäße überführt.

Für den Aufschluss der Zellen wurden die Suspensionen dreimal für 30 Sekunden (duty cycle 50%, output control 3) sonifiziert. Zwischen den einzelnen Schritten wurde jeweils eine Pause von einer Minute auf Eis durchgeführt. Um Zelltrümmer zu entfernen wurden die Proben abschließend bei 13.000 rpm und 4°C für 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zum Einsatz in dem Enzymassay auf Eis gehalten.

Im Laufe der Promotion wurde an dieser Stelle noch ein weiterer Schritt eingeführt: Um die NADPH Konzentrationen in den Proben zu verdünnen, wurden diese über Nacht dialysiert bei 4°C gegen das 100-Fache Volumen an Basalsalz.

Während der Enzymassay vorbereitet wurde, wurde das MTP-Photometer für mindestens 30 Minuten auf 37°C vorgewärmt. Der Enzymassay wurde in einer MTP durchgeführt. Von den Zelllysaten wurden Verdünnungen von 1:2 und 1:5 verwendet. Davon wurden 100 μL eingesetzt. Dazu wurden 150 μL 4 M KCl, welches auf 40°C erwärmt wird, und 25 μL DHF Lösung pipetiert. Die Reaktion wurde gestartet durch die Zugabe von 25 μL NADPH und die Messung sofort im MTP-Photometer begonnen. Diese lief für 20 Minuten bei einer OD von 340 nm und Messungen alle 20 Sekunden. Für die Analyse der Volumenaktivität wurden Verdünnungen betrachtet, welche einen linearen Abstieg der Absorptionsänderung für mindestens 180 Sekunden besaßen. Mit der Photometer Software wurde die Veränderung der Extinktion pro Minute ($\Delta E/\text{min}$) berechnet. Dieser Wert, der Negativkontrolle, wurde von allen $\Delta E/\text{min}$ Werten der gemessenen Proben abgezogen, um die spezifische Veränderung von DHFR zu erhalten. Um die Volumenaktivität aus $\Delta E/\text{min}$ zu berechnen wurde die folgende Formel verwendet:

$$\text{Volumenaktivität [U/ml]} = \frac{\frac{\Delta E}{\text{min}}}{\epsilon * d} \times D$$

- U: Enzymaktivität ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$); 1 U = 16,67 nkat
 $\Delta E/\text{min}$: Extinktionsänderung bei 340 nm (min^{-1})
 ϵ : Extinktionskoeffizient von NADPH ($6,220 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)
d: Schichtdicke der Küvette [cm] (300 μL in einer 96-Well MTP:0,95 cm)
D: Verdünnung der Probe

Für alle Proben wurde die Proteinkonzentration bestimmt (3.2.2). Die spezifische Aktivität von DHFR ergab sich aus der Berechnung von der Volumenaktivität dividiert durch die Proteinkonzentration. Alle Puffer und Lösungen sind in Tabelle 52 dargestellt.

Tabelle 52 Puffer und Lösungen für den DHFR Enzym-Asay

Name	Substanz	Menge	Endkonzentration
Phosphat-Citrat-Puffer	$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$	11,4 g	50 mM
	KH_2PO_4	6,8 g	50 mM
	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$	10,5 g	50 mM
		ad 1 L mit H_2O bidest. pH 6 mit KOH	
3M KCl-Puffer	KCl	111,83 g ad 500 mL mit Phosphat- Citrat-Puffer autoklavieren	3 M
4M KCl-Puffer	KCl	149,1 g ad 500 mL mit Phosphat- Citrat-Puffer autoklavieren	4M
Dihydrofolat-Lösung	10 mM DHF Stammlösung	180 μL ad 3 mL mit 3 M KCl frisch ansetzen auf Eis lagern	0,6 mM

Name	Substanz	Menge	Endkonzentration
NADPH-Lösung	NADPH	8 mg ad 5 mL mit H ₂ O bidest. frisch ansetzen auf Eis lagern	2 mM
DHFR- Reaktionsansatz	Zelllysate	100 µL	-
	4 M KCl	150 µL	2 M
	2 mM NADPH	25 µL	0,16 mM
	0,6 mM DHF	25 µL	0,05 mM

Arabinose-Dehydrogenase Enzymassay in *H. volcanii*

Die Arabinose-Dehydrogenase (AraDH) katalysiert die Oxidation von L-Arabinose zu L-Arabinose-1,4-Lacton unter der Verwendung der Cofaktoren NAD⁺ und NADP⁺, wobei eine Präferenz des Cofaktors NADP⁺ gezeigt wurde (Johnsen *et al.* 2013). Die Reduktion von NADP⁺ zu NADPH kann bei 340 nm in einer Absorptionzunahme gemessen werden. Da die Hintergrundaktivität der genomischen AraDH in Abwesenheit von Arabinose vernachlässigbar ist, wurden keine $\Delta araDH$ Stämme sondern, $\Delta dhfr$ Stämme (siehe Tabelle 15) verwendet. Der Assay wurde an die Anwendung in einer Mikrotiterplatte angepasst um das parallele Testen von einigen Proben zur selben Zeit zu ermöglichen. Alle in dieser Arbeit untersuchten Konstrukte stehen unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors (p_{tnaA}).

Die Zellkultivierung, -ernte und der Aufschluss erfolgten wie bei dem DHFR Enzymassay beschrieben (s.o.).

Während der Vorbereitung für den Enzymassay, wurde das MTP-Photometer für mindestens 30 Minuten auf 37°C vorgewärmt. Der Enzymassay wurde in einer MTP durchgeführt. Von den Zelllysaten wurden Verdünnungen von 1:5 und 1:10 verwendet. Davon wurden 100 µL eingesetzt. Hinzu kamen 150 µL 3 M KCl, welches auf 40°C erwärmt wurde, und 25 µL Arabinose Lösung. Die Reaktion wurde gestartet durch die Zugabe von 25 µL NADP und die Messung sofort im MTP-Photometer begonnen. Diese lief für 20 Minuten bei einer OD von 340 nm und Messungen alle 20 Sekunden. Für die Analyse der Volumenaktivität wurden Verdünnungen betrachtet, welche einen linearen Anstieg der Absorptionsänderung für mindestens 180 Sekunden besaßen. Mit der Photometer Software wurde die Veränderung der

Extinktion pro Minute ($\Delta E/\text{min}$) berechnet. Der $\Delta E/\text{min}$ Wert der Negativkontrolle, wurde von allen $\Delta E/\text{min}$ Werten der gemessenen Proben abgezogen um die spezifische Veränderung von AraDH zu erhalten. Um die Volumenaktivität aus $\Delta E/\text{min}$ zu berechnen, wurde die folgende Formel verwendet:

$$\text{Volumenaktivität [U/ml]} = \frac{\frac{\Delta E}{\text{min}}}{\epsilon * d} \times D$$

- U: Enzymaktivität ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$); 1 U = 16,67 nkat
 $\Delta E/\text{min}$: Extinktionsänderung bei 340 nm (min^{-1})
 ϵ : Extinktionskoeffizient von NADPH ($6,220 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)
d: Schichtdicke der Küvette [cm] (300 μL in einer 96-Well MTP: 0,95 cm)
D: Verdünnung der Probe

Für alle Proben wurde die Proteinkonzentration bestimmt (3.2.2). Die spezifische Aktivität von AraDH ergab sich aus der Berechnung von der Volumenaktivität dividiert durch die Proteinkonzentration. Verwendete Puffer und Lösungen sind in Tabelle 53 dargestellt.

Tabelle 53 Puffer und Lösungen für den AraDH Enzym-Assay

Name	Substanz	Menge	Endkonzentration
Tris-KCl-Puffer	Tris	12,1 g	0,2 M
	KCl	111,8 g ad 500 mL mit H₂O bidest. pH 8.5	3 M
NADP ⁺ Lösung	NADP ⁺	0,11 g ad 3 mL mit H₂O bidest. frisch Ansätzen auf Eis lagern	48 mM
Arabinose-Lösung	Arabinose	1,8 g ad 50 mL mit H₂O bidest.	240 mM
AraDH-Reaktionsansatz	Zellysate	100 μL	-
	Tris-KCl-Puffer	150 μL	0,1 M; 1,5 M
	NADP ⁺ Lösung	25 μL	4 mM
	Arabinose-Lösung	25 μL	20 mM

Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase Enzymassay

Der kürzlich für *E. coli* etablierte Enzymassay mit Glycerin-3-Phosphat Dehydrogenase (GlpD) als Reporter (Wegener *et al.* 2016), beruht auf der Oxidation von Glycerin-3-Phosphat (G3P) zu Dihydroxyacetonphosphat (DHAP). Diese Oxidation ist gekoppelt an die Reduktion des gelben Substrates Tetrazol-3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zu einem blau-violettem Formazan, welche vermittelt wird durch den Elektronentransporter Phenazin-Methansulfat (PMS). Diese Reaktion führt zu einer Zunahme der Absorption bei 570 nm und wird gemessen, um die GlpD Aktivität zu quantifizieren. Um Hintergrund zu vermeiden wird der Assay in einem $\Delta glpD$ *E. coli* Stamm (JW3389, siehe Tabelle 14) durchgeführt. Der Assay wurde an die Anwendung in einer Mikrotiterplatte angepasst um das parallele Testen von einigen Proben zur selben Zeit zur ermöglichen. Alle in dieser Arbeit untersuchten Konstrukte stehen unter einem induzierbaren Arabinose Promotor (p_{BAD}).

Zunächst wurden 50 mL Medium aus Über-Nacht-Kultur inokuliert, welche die gewünschten Stämme enthielten, auf eine Start OD_{600} von 0,05. Der p_{BAD} Promotor wurde induziert mit 0,2% (w/v) Arabinose wenn eine OD_{600} von 0,6 erreicht wurde. Nach 30 Minuten Inkubation bei 37°C wurden die Kulturen geerntet durch eine Zentrifugation von jeweils 20 mL Kultur bei 4.000 rpm und 4°C für 10 Minuten. Für die Transkript-Quantifizierung wurden zusätzlich 8 mL der jeweiligen Kultur geerntet (4000 rpm, 4°C, 10 Minuten). Diese Pellets wurden bei -80°C gelagert bis zur gesamt RNA Isolierung (3.1.7). Die Pellets für den Enzymassay wurden in 1 mL GlpD Aufschlusspuffer resuspendiert und der Zellaufschluss erfolgte mittels Schütteln der Proben mit Glasbeads (0,5 mm Durchmesser; 500 mg/ Reaktionsgefäß) in einem FastPrep™ (MP Biomedicals) drei mal für 45 Sekunden bei einer Intensität von 6,5 mit jeweils 20 Sekunden Pause auf Eis dazwischen. Zur Sedimentation der Glasbeads und Zelltrümmern wurden abschließend die Proben bei 13.000 rpm und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde dann in frische Reaktionsgefäße überführt und auf Eis gehalten.

Während der Vorbereitung für den Enzymassay, wurde das MTP-Photometer für mindestens 30 Minuten auf 37°C vorgewärmt. Für jede Reaktion wurden 65 μ L Probe in einer Verdünnung in ein Well der MTP pipettiert. Die verwendeten Verdünnungen für GlpD sind 1:10 und 1:100 und wurden jeweils in technischen Duplikaten

gemessen. Es wurden 160 μL des GlpD Reaktionspuffers (inklusive sn-G3P) zu den Proben gegeben und sofort die Messung im MTP-Photometer gestartet. Die Absorptionsänderung wurde über einen Zeitraum von 30 Minuten alle 20 Sekunden bei 570 nm gemessen. Für die Analyse der Volumenaktivität wurden Verdünnungen betrachtet, welche einen linearen Anstieg der Absorptionsänderung für mindestens 180 Sekunden besaßen. Mit der Photometer Software wurde die Veränderung der Extinktion pro Minute ($\Delta E/\text{min}$) berechnet. Der $\Delta E/\text{min}$ Wert der Negativkontrolle, wird von allen $\Delta E/\text{min}$ Werten der gemessenen Proben abgezogen um die spezifische Veränderung von GlpD zu erhalten. Um die Volumenaktivität aus $\Delta E/\text{min}$ zu berechnen, wurde die folgende Formel verwendet:

$$\text{Volumenaktivität [U/ml]} = \frac{\frac{\Delta E}{\text{min}}}{\epsilon * d} \times D$$

- U: Enzymaktivität ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$); 1 U = 16,67 nkat
 $\Delta E/\text{min}$: Extinktionsänderung bei 570 nm (min^{-1})
 ϵ : Extinktionskoeffizient des Produkts Formazan ($17 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)
d: Schichtdicke der Küvette [cm] (300 μL in einer 96-Well MTP:0,95cm)
D: Verdünnung der Probe

Für alle Proben wurde die Proteinkonzentration bestimmt (3.2.2). Die spezifische Aktivität von GlpD ergab sich aus der Berechnung von der Volumenaktivität dividiert durch die Proteinkonzentration. Alle benötigte Puffer für den Assay sind in Tabelle 54 dargestellt.

Tabelle 54 Puffer und Lösungen für den GlpD Enzymaktivitätstest

Name	Substanz	Menge	Endkonzentration
GlpD- Aufschlusspuffer	500 mM Na ₂ HPO ₄	10 mL	50 mM
	5 M NaCl	10 mL	500 mM
	4% (v/v) Triton-X-100	10 mL	0,4% (v/v)
	ad 100 mL mit H₂O bidest. pH 8		
GlpD- Reaktionspuffer	11,25 mM MTT	1 mL	1,125 mM
	56,3 mM PMS	1 mL	5,63 mM
	1 M Tris-HCl pH 7.4	840 µL	84 mM
	4% (v/v) Triton-X-100	1 mL	0,4% (v/v)
	ad 10 mL mit H₂O bidest. Zugabe von 1 mL		
	Glycerin 3-Phosphat		7,8 mg/mL

beta-Glucoronidase Enzymassay in *E. coli*

Die beta-Glucoronidase (GusA) ist ein gut etabliertes Reporterenzym für einige Spezies (Jefferson 1989). Für *E. coli* bietet es sich an, da es zum Beispiel eine bessere Transkriptstabilität besitzt als das bekannte und oft verwendete Reportergen beta-Galaktosidase (*lacZ*) (Wegener *et al.* 2016). Die Aktivität von GusA kann bestimmt werden über den Einsatz von künstlichem para-Nitrophenyl-β-D-Glucoronid (pNPG). pNPG wird konvertiert zu Glucuronsäure und para-Nitrophenol (pNP), welches photometrisch bei 405 nm gemessen werden kann. Um Hintergrundsignale zu vermeiden wird ein $\Delta gusA$ *E. coli* Stamm (JW3389, siehe Tabelle 14) verwendet. Der Assay wurde an die Anwendung in einer Mikrotiterplatte angepasst um das parallele Testen von einigen Proben zur selben Zeit zur ermöglichen. Alle in dieser Arbeit untersuchten Konstrukte stehen unter einem induzierbaren Arabinose Promotor (p_{BAD}).

Die Anzucht und Ernte der Zellen unterscheidet sich nicht von der für das Reporterenzym GlpD (s.o.) mit der Ausnahme, dass hier ein GusA Aufschlusspuffer auf die Zellpellets gegeben wurde für die Lyse der Zellen.

Für die Messung am MTP Photometer wurde dieses mindestens 30 Minuten vorher auf 37°C erwärmt. Alle Proben wurden in den Verdünnungen 1:2 und 1:10 eingesetzt. Dafür wurden 120 µL der entsprechenden Verdünnung in Wells der MTP pipettiert in technischen Duplikaten. Jeweils 150 µL 2x β-Glucuronidase Puffer und 30 µL pNPG wurden hinzugegeben und sofort mit der Messung begonnen. Die Änderung der Absorption erfolgte bei 405 nm für 30 Minuten mit Messungen alle 20 Sekunden. Für die Analyse der Volumenaktivität wurden Verdünnungen betrachtet, welche einen linearen Anstieg der Absorptionsänderung für mindestens 180 Sekunden besaßen. Mit der Photometer Software wurde die Veränderung der Extinktion pro Minute ($\Delta E/\text{min}$) berechnet. Der Wert $\Delta E/\text{min}$ der Negativkontrolle, wird von allen $\Delta E/\text{min}$ Werten der gemessenen Proben abgezogen um die spezifische Veränderung von GusA zu erhalten. Um die Volumenaktivität aus $\Delta E/\text{min}$ zu berechnen, wurde die folgende Formel verwendet:

$$\text{Volumenaktivität [U/ml]} = \frac{\frac{\Delta E}{\text{min}}}{\varepsilon * d} \times D$$

- U: Enzymaktivität ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$); 1 U = 16,67 nkat
 $\Delta E/\text{min}$: Extinktionsänderung bei 405 nm (min^{-1})
 ε : Extinktionskoeffizient des Produkts Formazan ($18,1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)
d: Schichtdicke der Küvette [cm] (300 µL in einer 96-Well MTP: 0,95 cm)
D: Verdünnung der Probe

Für alle Proben wurde die Proteinkonzentration bestimmt (3.2.2). Die spezifische Aktivität von GusA ergab sich aus der Berechnung von der Volumenaktivität dividiert durch die Proteinkonzentration. Für den Enzymassay verwendete Puffer und Lösungen sind in Tabelle 55 aufgelistet.

Tabelle 55 Puffer und Lösungen für den GusA Enzymaktivitätstest

Name	Substanz	Menge	Endkonzentration
Natriumphosphat-Puffer	1 M Na ₂ HPO ₄	28,85 mL	0,05 M
	1 M NaH ₂ PO ₄	21,15 mL	0,05 M
		ad 1 L mit H₂O bidest. pH 7	
β-Glucuronidase-Auflösungspuffer	1 M Natriumphosphat-Puffer	100 mL	10 mM
	0,1 M KCl	100 mL	10 mM
	10 mM MgSO ₄	100 mL	1 mM
β-Glucuronidase-Puffer	1 M Natriumphosphat-Puffer	996,6 mL	100 mM
	β-Mercaptoethanol	1395 µL	20 mM
	Triton-X-100	2 mL	0,2% (v/v)
		ad 1 L mit H₂O bidest.	
pNPG	pNPG	24 mg ad 3 mL mit 0,1 M Tris-HCl frisch ansetzen	8 mg/mL

3.2.2. Gesamt Proteinbestimmung mittels Bicinchoninsäure

Für die Bestimmung der gesamten Proteinmenge wurde das PIERCE™ BCA (Bicinchoninsäure) Protein Assay Kit verwendet. Es wurden 20 µL der Proben, in den vom Hersteller angegebenen Verdünnungen (1:10 und 1:100), sowie eine Standardreihe (0 mg/mL-2 mg/mL) von Bovine Serum Albumin (BSA) in eine MTP pipettiert und mit 200 µL der im Kit enthaltenen Lösungen A und B (im Verhältnis 50:1) für mindestens 40 Minuten bei 37°C inkubiert. Die colorimetrische Biuret-Reaktion führte zu einer blau-violetten Farbe, welche photometrisch quantifiziert werden konnte bei 562 nm. Mittels der BSA-Standardkurve wurden die Proteinkonzentrationen der Proben in mg/mL berechnet.

IV. Ergebnisse

1. Termination-Reinitiation in *Haloferax volcanii*

In einer Studie von 2014 (Kramer *et al.* 2014) stellte sich heraus, dass für *H. volcanii* Shine-Dalgarno Sequenzen in 5'-UTRs von Genen keinerlei Verwendung für die Translations-Initiation besitzen. Es wurde jedoch im Zuge der bioinformatischen Analyse des Genoms von *H. volcanii* festgestellt, dass ein Großteil der Gene in Genpaaren vorliegt und in diesen intragene SD Sequenzen gefunden werden können (siehe Abbildung 2). Die Hypothese, dass hier eine gekoppelte Translation der Gene stattfindet, liegt nahe. Für die Analyse einer Translationskopplung wurden für *H. volcanii* insgesamt 9 Genpaare ausgesucht, welche nativ entweder einen Start-, Stop-Codon Überlapp von vier Nukleotiden (**ATGA**) besitzen, keinen Abstand zwischen Start- und Stop-Codon oder ein Nukleotid Abstand dazwischen (**ATGTGA** und **ATGxTGA**) besitzen. Da 792 Genpaare mit weniger als zehn Nukleotiden intergenem Abstand in *H. volcanii* gefunden wurden, ist ebenfalls ein Genpaar mit zehn Nukleotiden Abstand zwischen TGA und ATG ausgewählt worden (*flgA1/flgA2*). Die Paare mit dem am häufigsten vorkommenden Überlapp von vier Nukleotiden codieren für zwei Untereinheiten des Urease Enzyms (*ureB/ureC*), ein Aminosäuren-Bindeprotein/ Homoserin Dehydrogenase (*aa.-bin. Prot./hom1*) und für zwei Paare von ribosomalen Proteinen (*rpl30/rpl15* und *rpl5/rps15*). Alle besitzen eine intragene Shine-Dalgarno (iSD) Sequenz im passenden Abstand zum Start-Codon des stromabwärts-liegenden Gens. In Tabelle 56 sind die nativen Sequenz-Abschnitte mit Start- (Blau) und Stop-Codon (fett gedruckt), iSD Sequenz (unterstrichen) und die passende Sequenz davon (Rot) zur Consensus Sequenz (GGAGGTGA) sowie die Genbezeichnungen und HVO-Nummern aufgeführt.

Tabelle 56 Sequenzen der untersuchten überlappenden Genpaare in *H. volcanii*. Die ausgewählten Genpaare sind mit ihren HVO-Nummern, Bezeichnungen und Sequenzen im Bereich des Überlapps dargestellt. Unterstrichen zeigt jeweils die Position der intragenen SD Sequenz, Rot die Basen welche mit der 16S rRNA wechselwirken können, Fett ist das Stop-Codon des stromaufwärts-liegenden Gens und Blau das Start-Codon des stromabwärts-liegenden Gens.

	Gene Designation	Gene ubstream	Sequence (overlap)	Gene Designation	Gene downstream
<i>H. volcanii</i>	HVO_0147	<i>ureB</i>	CGGCACCGC <u>GGAGGGGT</u> CGAGCGAATGACGAAGGAC	HVO_0148	<i>ureC</i>
	HVO_0357	<i>aa-bin. Prot.</i>	ACCGCTCGC <u>GGAGGGGT</u> CCCAATGAGCCTCAGACTC	HVO_0358	<i>hom1</i>
	HVO_2543	<i>rpl30</i>	CGAACTCCT <u>GGAGGACAT</u> GCGATGACGTCCAAGAAG	HVO_2542	<i>rpl15</i>
	HVO_2551	<i>rpl5</i>	GTTTCGACGT <u>GGAGGTTGAAGA</u> ATGAGCGATAGCGAA	HVO_2550	<i>rps15</i>
	HVO_1210	<i>flgA1</i>	ATTGCGCTC <u>TGAGGAGAT</u> TCAAATGTTCAACAACAT	HVO_1211	<i>flgA2</i>
	HVO_2431	<i>glnP</i>	TCGGATTGG <u>GGAGGTG</u> ACCGCCGATGACGCTCGTC	HVO_2430	<i>glnQ</i>
	HVO_1594	<i>cna</i>	CGCCAAACT <u>GGAGGTG</u> ACCGCATGACGCTCGTCTC	HVO_1595	<i>con. hyp. prot.</i>
	HVO_0685	<i>hyp. prot.</i>	GCGGCCGAC <u>GGAGGTGAGT</u> GATGGAAGTCTCT	HVO_0686	<i>con. hyp. prot.</i>
	HVO_2555	<i>rps17</i>	GAGATTATG <u>GGAGGTG</u> ACGAGTGAATGGAAGTCTCT	HVO_2554	<i>rpl14</i>

Für die Analyse der Translationskopplung wurden zunächst die Genpaare mit dem stromabwärts-liegenden Gen (*y*) in einem Vektor an das *dhfr* Reporter-gen fusioniert (Schematische Darstellung in Abbildung 5a). Die Dihydrofolat-Reduktase ist für *H. volcanii* ein gut etabliertes Reportergensystem (Brenneis and Soppa 2009; Kramer *et al.* 2014). Für jedes Genpaar wurden zwei Versionen konstruiert, welche sich durch das Vorhandensein eines prämaternen Stop-Codon im vorderen Teil von Gen *x* unterscheiden. Ohne Stop-Codon kann an diesem Konstrukt die Translation ablaufen, wie es nativ an diesem Genpaar *in vivo* abläuft. Das prämaturne Stop-Codon jedoch terminiert die Translation der am 5'-Ende initiierenden Ribosomen. In diesen Konstrukten kann nur im Falle einer *de novo*-Initiation am Start-Codon des stromabwärts-liegenden Gens eine Translation des Reportergens *dhfr* stattfinden. Die Konstrukte ohne oder mit (-/+) Stop-Codon ermöglichen also eine Unterscheidung zwischen einer Translation, welche am 5'-Ende der mRNA beginnt und über die komplette mRNA hinweg stattfindet oder einer Translation, welche an beiden Startcodons der bicistronischen mRNA initiieren kann. Für die Berechnung einer Translationseffizienz wird zusätzlich zur Quantifizierung der Enzymaktivität das Transkriptlevel mittels Northern-Blot Analyse bestimmt. Die Ergebnisse für die DHFR Enzymaktivität sind in Anhang 2a und für die *dhfr* Transkriptlevel in Anhang 2b dargestellt. Die Enzymaktivität pro Transkript ermöglicht die Berechnung der Translationseffizienz. Für alle fünf Genpaare (Abbildung 5b) konnte gezeigt werden, dass eine Translationseffizienz für die native Sequenz besteht und im Falle des eingebrachten Stop-Codons keine Translation des stromabwärts-liegenden Gens mehr stattfindet. Für diese Genpaare kann also eine Translationskopplung mittels

Termination-Reinitiation gezeigt werden, da stromabwärts-liegende Gene nur translatiert werden, wenn das translatierende Ribosom den Überlapp erreicht. Um die benötigte Sequenz für diesen Mechanismus eingrenzen zu können, wurden anschließend die stromaufwärts-liegenden Gene, von vier nativ überlappenden Genen, mit dem Reporter gen *dhfr* fusioniert, sodass ein **ATGA** zwischen Gen *x* und *dhfr* entsteht (Schematische Darstellung in Abbildung 5c). Die Translationseffizienzen der ohne oder mit (-/+) prämaures Stop-Codon Varianten zeigen das gleiche Ergebnis (Abbildung 5d) wie die Varianten welche mit Gen *y* an den Reporter fusioniert sind. Für die Varianten mit vorzeitigem Stop-Codon kann keine Translationseffizienz mehr gezeigt werden, verglichen mit den Varianten der nativen Sequenz. Auch hier findet eine gekoppelte Translation mittels Termination-Reinitiation statt. Gen *y* ist dabei nicht ausschlaggebend für diesen Mechanismus, da auch ohne die Sequenz die Kopplung weiterhin besteht. Die benötigte Sequenz muss sich also stromaufwärts vom Überlapp in Gen *x* befinden.

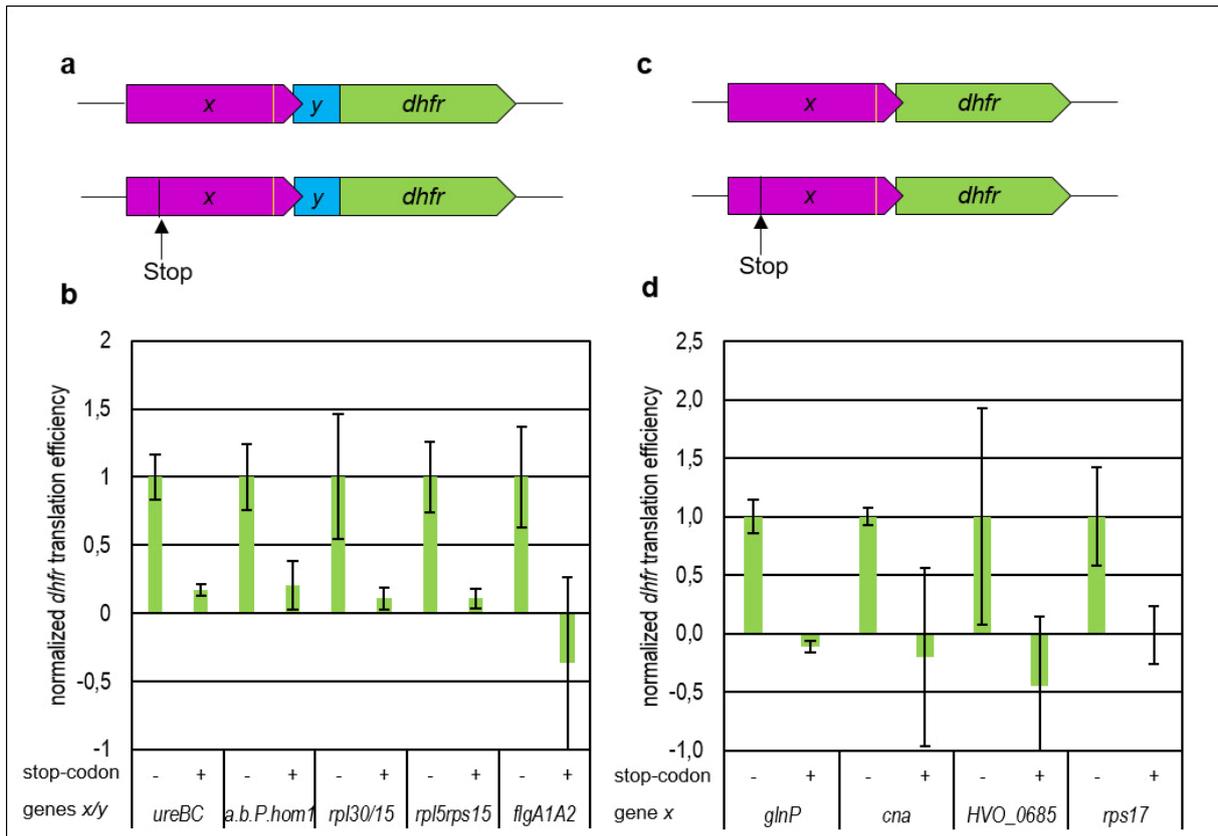


Abbildung 5 Termination-Reinitiation in *H. volcanii*. **a.** Schematische Darstellung der analysierten Konstrukte ohne und mit prämaturnem Stop-Codon. In Magenta ist Gen x und in Blau Gen y dargestellt mit der Fusion an das Reportergen *dhfr* (Grün). In Gelb ist jeweils die Position der intragenen SD Sequenz gezeigt. **b.** Durchschnittliche Translationseffizienzen von jeweils drei biologischen Replikaten mit der Standardabweichung von Konstrukten $-/+$ prämaturnes Stop-Codon, jeweils normiert auf die durchschnittliche Translationseffizienz des Konstrukts ohne Stop. **c.** Schematische Darstellung der analysierten Konstrukte ohne und mit prämaturnem Stop-Codon für die künstlichen Überlappung mit *dhfr*. In Magenta ist Gen x dargestellt mit dem Überlappung an das Reportergen *dhfr* (Grün). In Gelb ist jeweils die Position der intragenen SD Sequenz gezeigt. **d.** Durchschnittliche Translationseffizienzen von jeweils drei biologischen Replikaten mit der Standardabweichung von Konstrukten $-/+$ prämaturnes Stop-Codon, jeweils normiert auf die durchschnittliche Translationseffizienz des Konstrukts ohne Stop.

2. Intragenen Shine-Dalgarno Sequenzen in *Haloferax volcanii*

Da Sequenzen der stromabwärts-liegenden Gene (*y*) keinen Einfluss auf die Translationskopplung in *H. volcanii* gezeigt haben (Abbildung 5d), wurde die Analyse im stromaufwärts-liegenden Gen detaillierter durchgeführt. Da in *H. volcanii* nachweislich keine SD Sequenzen in 5'-UTRs verwendet werden, legt das Vorhandensein von SD Motiven innerhalb überlappender Gene (Kramer *et al.* 2014) die Fragestellung nahe, ob iSD Sequenzen an der Translationskopplung beteiligt sind. Für eukaryontische Viren ist bekannt, dass sogenannte TURBS (*Termination-upstream-ribosomal-binding-sites*) die kleine Untereinheit der Ribosomen an die bicistronische mRNA binden, wenn die Translation des ersten Gens terminiert und die große ribosomale Untereinheit dissoziiert. Die Reinitiation wird ermöglicht, sobald wieder eine 60S Untereinheit rekrutiert wird (Powell 2010; Powell *et al.* 2011;

Naphine *et al.* 2009). Eine ähnliche Funktion ist für iSD Sequenzen vorstellbar, da auch diese in der Lage sind mit der kleinen ribosomalen Untereinheit zu wechselwirken und diese dadurch eventuell lang genug an der mRNA halten können, um eine Reinitiation zu ermöglichen. Um die Bedeutung der iSD Sequenzen in *H. volcanii* zu untersuchen, wurden die überlappenden Genpaare einer *site directed mutagenesis* unterzogen, welche die iSD Motive zu Basen austauscht, die nicht mit der anti-SD Sequenz der 16S rRNA wechselwirken können. Hierbei wurde darauf geachtet, die Aminosäure-Sequenz so wenig wie möglich zu verändern. In Abbildung 6a ist schematisch dargestellt wie 5 Genpaare (x/y), fusioniert an *dhfr* mit Gen y , sich durch das Vorhandensein einer iSD Sequenz (Gelb bzw. Gelb durchgestrichen) unterscheiden. Für alle konstruierten Versionen wurden die DHFR Enzymaktivität (siehe Anhang 3a) sowie die Transkriptlevel mittels einer *dhfr* Sonde quantifiziert (siehe Anhang 3b). Aus der Division dieser beiden Werte konnte eine Translationseffizienz berechnet werden. Diese unterscheidet sich für die analysierten Konstrukte folgendermaßen (Abbildung 6b): Für die Urease Untereinheiten (*ureB/ureC*) nimmt die Translationseffizienz ohne iSD Sequenz um 50% ab. Für das Genpaar der Aminosäure-Bindeprotein/Homoserin Dehydrogenase ist ebenfalls eine Abnahme von diesmal 60% nach Austauschen der iSD Sequenz zu sehen. Die ribosomalen Proteine *rpl30/rpl15* zeigen eine Zunahme der Translationseffizienz von 70%, während die ribosomalen Proteine *rpl5/rps15* eine Abnahme von 20% zeigen. Auch in diesem Ansatz wurden nativ überlappende Genpaare nur mit Gen x an das Reporter gen *dhfr* fusioniert, sodass ein **ATGA** Überlapp entsteht (schematisch gezeigt in Abbildung 6c). Hier sind für die Translationseffizienzen auch unterschiedliche Ergebnisse zu sehen, jedoch nur Abnahmen der Translationseffizienz von 70% bei *glnP*, 20% für *cna* und 80% für *HVO_0685*. Für alle untersuchten Konstrukte ist ein Effekt sichtbar, wenn die iSD Sequenz nicht mehr der consensus Shine-Dalgarno Sequenz entspricht. Dieser Effekt ist jedoch unterschiedlich bei den verschiedenen Genpaaren. Eine Funktion der iSD ist zu sehen, wenn auch gezeigt werden konnte, dass dieser Sequenzabschnitt nicht essenziell für den Mechanismus der Termination-Reinitiation in *H. volcanii* ist.

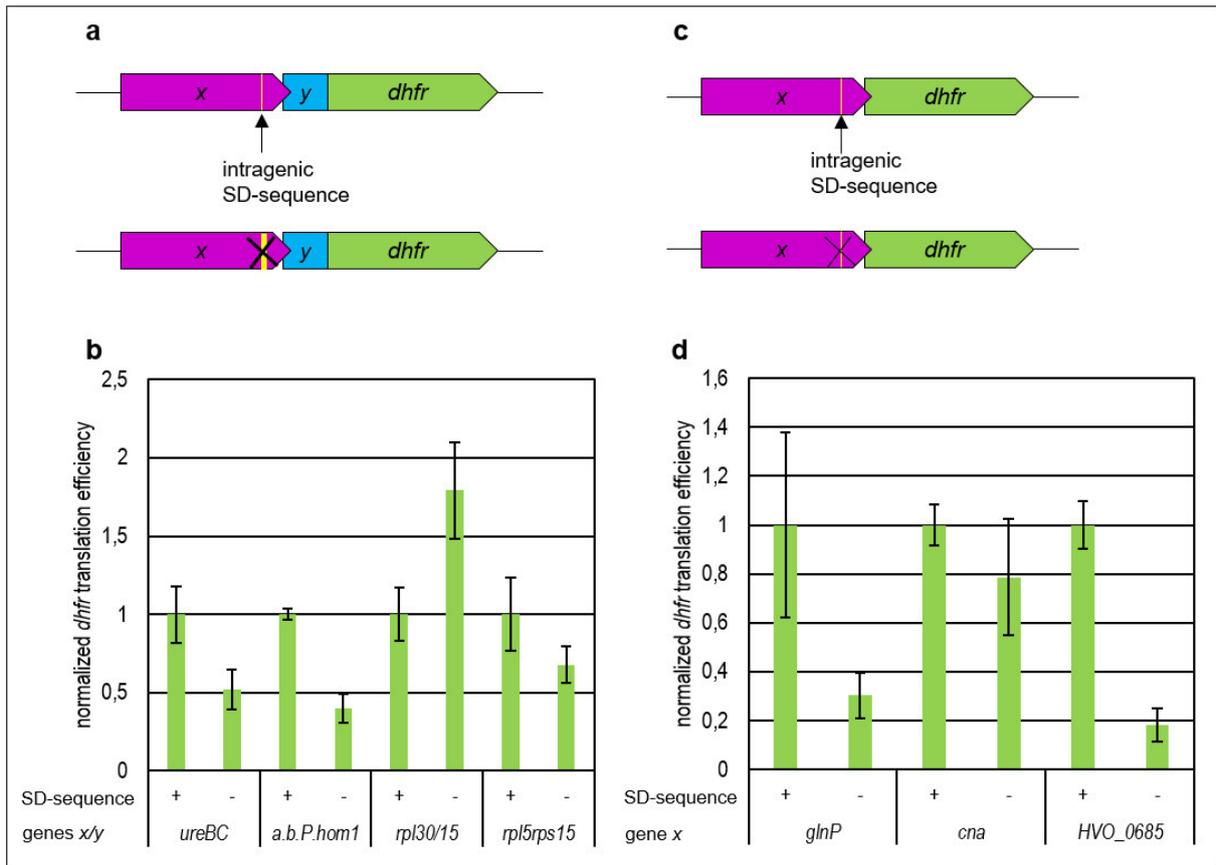


Abbildung 6 Intragene SD Sequenzen in *H. volcanii*. **a.** Schematische Darstellung der analysierten Konstrukte mit und ohne iSD Motiv. In Magenta ist Gen x und in Blau Gen y dargestellt mit der Fusion an das Reporter gen *dhfr* (Grün). In Gelb ist jeweils die Position der iSD Sequenz gezeigt. **b.** Durchschnittliche Translationseffizienzen von jeweils drei biologischen Replikaten mit der Standardabweichung von Konstrukten +/- iSD, jeweils normiert auf die durchschnittliche Translationseffizienz des Konstrukts mit iSD. **c.** Schematische Darstellung der analysierten Konstrukte mit und ohne iSD Motiv für die künstlichen Überlappungen mit *dhfr*. In Magenta ist Gen x dargestellt mit dem Überlapp an das Reporter gen *dhfr* (Grün). In Gelb ist jeweils die Position der iSD Sequenz gezeigt. **d.** Durchschnittliche Translationseffizienzen von jeweils drei biologischen Replikaten mit der Standardabweichung von Konstrukten +/- iSD, jeweils normiert auf die durchschnittliche Translationseffizienz des Konstrukts mit iSD.

3. Termination-Reinitiation in *Escherichia coli*

Um den Mechanismus auch in der zweiten prokaryotischen Domäne zu analysieren, wurde ein Ansatz in *E. coli* gewählt. Für Bakterien ist die gekoppelte Translation ein weit untersuchter Mechanismus. Bisher wurden dafür jedoch eukaryontische (Spanjaard and van Duin 1989) oder virale (Inokuchi *et al.* 2000; Yoo and RajBhandary 2008; Adhin and van Duin 1990) Gene untersucht und dabei das Transkriptlevel meist außer Acht gelassen. Letzteres spielt jedoch nachweislich eine bedeutende Rolle (Wegener *et al.* 2016). Neu an diesem Ansatz ist, dass sowohl die Enzymaktivität als auch die Transkriptlevel an nativen *E. coli* Genpaaren betrachtet wurden, welche mit einem Start-, Stop-Codon (**ATGA**) überlappen.

Für *E. coli* wurden dafür 5 solcher nativ überlappenden Genpaare mit einem Überlapp von vier Nukleotiden (**ATGA**) ausgewählt, welche im passenden Abstand zum Start-Codon des stromabwärts-liegenden Gens ein Shine-Dalgarno Motiv besitzen. Die ausgewählten Paare kodieren für zwei Untereinheiten einer Hydrogenase (*hyfH/hyfI*), zwei Untereinheiten einer Dehydrogenase (*astD/astB*), zwei Untereinheiten einer Biotin Synthetase (*bioB/bioF*), zwei hypothetische Proteine (*ydbH/ynbE*) und zwei Untereinheiten eines Menachinon Biosynthese Enzyms (*menD/menH*). In Tabelle 57 sind die Gen-Namen, Sequenzen im Bereich des Überlapps und b-Nummern dieser aufgeführt. Für die Sequenzen ist jeweils in Blau das Start-Codon von Gen x, in Fett das Stop-Codon von Gen y und unterstrichen die Position der iSD Sequenz gezeigt, wobei in Rot die Basen gezeigt sind, welche mit der Consensus Shine-Dalgarno Sequenz von Bacteria (TAAGGAGG) übereinstimmen.

Tabelle 57 Überlappende Genpaare und deren Sequenzen in *E. coli*. Die analysierten Genpaare für *E. coli* mit Ihren b-Nummern, Bezeichnungen sowie Sequenzabschnitte im Bereich des Überlapps. Unterstrichen ist jeweils die Position der SD Sequenz, Rot der Abschnitt welcher in der Lage ist mit der aSD auf der 16S rRNA zu wechselwirken, Fett gedruckt ist das Stop-Codon des stromaufwärts-liegenden Gens und Blau das Startcodon des stromabwärts-liegenden Gens.

	Gene Designation	Gene upstream	Sequence (overlap)	Gene Designation	Gene downstream
<i>E. coli</i>	b2488	<i>hyfH</i>	CTGCTGGTGGCT TAAGGAG CAGCT ATGA AGTCCAGTGC	b2489	<i>hyfI</i>
	b1746	<i>astD</i>	GATTTTCCG ATGAGG TGGTGCC ATGA AACGCCTGGG	b1745	<i>astB</i>
	b0775	<i>bioB</i>	AATATTACA CGCGG CAGCATT ATGA AGCTGGCAGGA	b0776	<i>bioF</i>
	b1381	<i>ydbH</i>	GGAAAAGAGT GTGAGGA AAAACA ATGA AAAATTTTAC	b1382	<i>ynbE</i>
	b2264	<i>menD</i>	TCTGGCGCAGG TAAGCC ATTT ATGA ATCCTGCACGCG	b2263	<i>menH</i>

Für die Analyse in *E. coli* wurden ebenfalls Versionen konstruiert, welche die native Sequenz eines Überlapps enthalten bzw. eine Version mit einem prämaturnen Stop-Codon. Die überlappenden Gene wurden hier in ein Doppelreportergen-System

kloniert. Gen *x* besitzt somit eine Translations-Fusion an den Reporter Glycerin-3-Phosphat Dehydrogenase (*glpD*) und Gen *y* an den β -Glucuronidase (*gusA*) Reporter (Schematische Darstellung in Abbildung 7a). Da für die kompletten Gene *x* und *y* keine stabilen Transkripte nachgewiesen werden konnten, wurden diese in Vorarbeiten verkürzt, bis stabile mRNA nachgewiesen werden konnte. Von Gen *x* sind 99 Nukleotide an den ersten Reporter (*glpD*) fusioniert und von Gen *y* 30 Nukleotide, fusioniert an den zweiten Reporter (*gusA*) (Vogtmann 2015). Das Doppelreporterkonstrukt ermöglicht sowohl für die Translation von Gen *x* als auch für die Translation von Gen *y* Translationseffizienzen zu erfassen. Als prämaures Stop-Codon ist hier das native Stop-Codon von *glpD* genutzt worden. Für die Berechnung der Translationseffizienzen wurden jeweils die Enzymaktivitäten der Reportergene gemessen (siehe Anhang 4a für GlpD und b für GusA) sowie die Transkriptlevel des bicistronischen Transkripts sowohl mit einer Sonde gegen *glpD* (Anhang 4c) und einer Sonde gegen *gusA* (siehe Anhang 4d) quantifiziert. Während für den stromaufwärts-liegenden Reporter *glpD* für alle + Stop-Codon Konstrukte der fünf Genpaare eine Translationseffizienz gezeigt werden kann, welche mindestens so hoch ist wie die Translationseffizienz ohne (–) Stop-Codon, so ist für das Genpaar *hyfH/hyfl* deutlich zu sehen, dass die Translationseffizienz mehr als vierfach so hoch ist, wenn ein prämaures Stop-Codon eingebracht wurde. Hier ist es möglich das HyfH am C-Terminalen Ende von GlpD die Aktivität inhibiert. Für das stromabwärts-liegende Reporter gen *gusA* ist zu sehen, dass in drei von fünf Fällen ein prämaures Stop-Codon dazu führt, dass keine Translation mehr stattfindet. *hyfH/hyfl*, *astD/astB* und *ydbH/ynbE* besitzen demnach eine starke gekoppelte Translation. Für das Genpaar *menD/menH* verringert sich die Translationseffizienz mit einem vorzeitigen Stop-Codon um 60%, somit sind 40% der Translation mittels *de novo*-Initiation an diesem Genpaar möglich. Für *bioB/bioF* konnte keine gekoppelte Translation nachgewiesen werden, das könnte an der sehr schwachen iSD Sequenz liegen (Tabelle 57). Sowohl ohne als auch mit prämaurem Stop-Codon ist die Translationseffizienz des stromabwärts-liegenden Reporters identisch (Abbildung 7c).

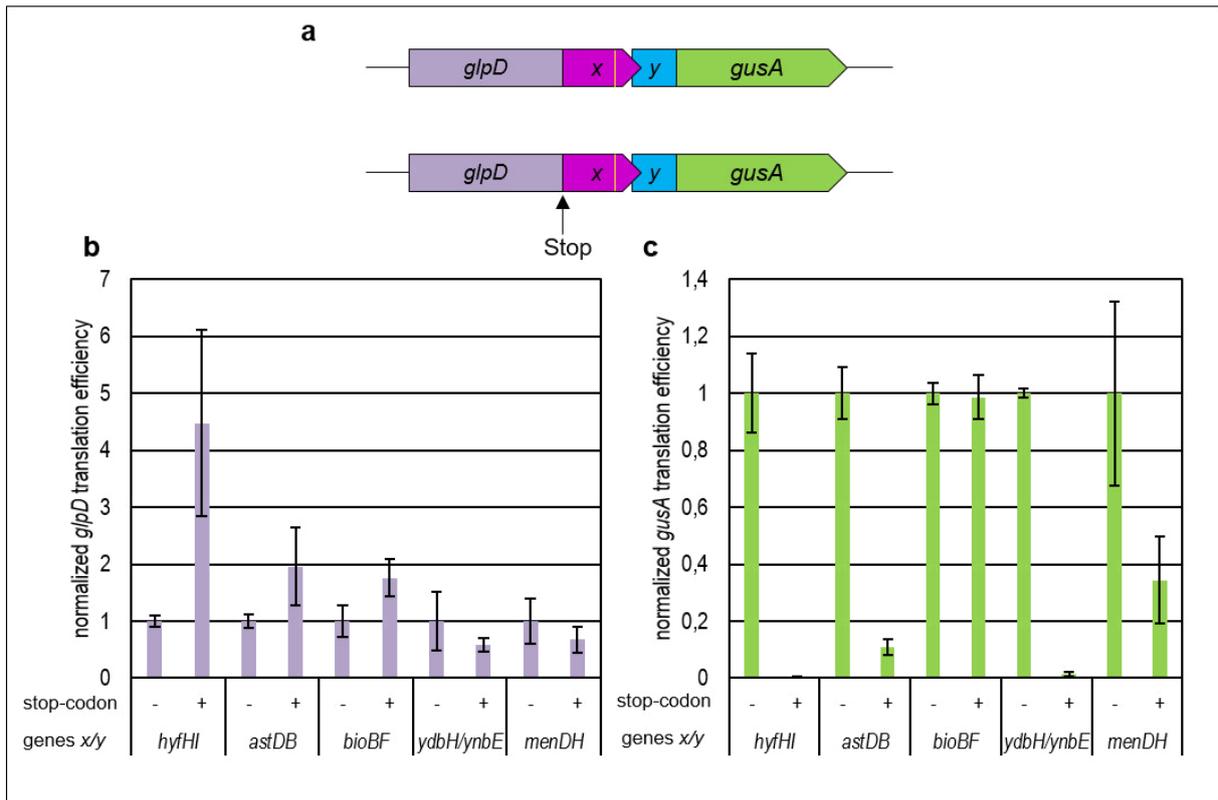


Abbildung 7 Termination-Reinitiation in *E. coli*. a. Schematische Darstellung der Doppelreportergenkonstrukte ohne und mit prämatuerm Stop-Codon (-/+). In Magenta ist Gen *x* mit der Fusion an das Reporter-gen *glpD* (Lila) dargestellt und in Blau Gen *y* mit der Fusion an das Reporter-gen *gusA* (Grün). In Gelb ist jeweils die Position der intragenen SD Sequenz gezeigt. b. Durchschnittliche Translationseffizienzen des *glpD* Reportergens. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte von drei biologischen Replikaten mit der Standardabweichung von Konstrukten -/+ prämatuere Stop-Codon, jeweils normiert auf die durchschnittliche Translationseffizienz des Konstrukts ohne Stop. c. Durchschnittliche Translationseffizienzen des *gusA* Reportergens. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte von drei biologischen Replikaten mit der Standardabweichung von Konstrukten -/+ prämatuere Stop-Codon, jeweils normiert auf die durchschnittliche Translationseffizienz des Konstrukts ohne Stop-Codon.

4. Intragene Shine-Dalgarno Sequenzen in *Escherichia coli*

Für *E. coli* ist der Mechanismus der Translations-Initiation mittels SD-Sequenzen ein gut untersuchter Mechanismus. Auch für überlappende Genpaare in *E. coli* sind Shine-Dalgarno Motive innerhalb der stromaufwärts-liegenden Gene gefunden worden, welche mit einem passenden Abstand zum nächsten Start-Codon vorliegen. Die Funktion an dieser Position ist bisher noch unklar. Die für diese Arbeit ausgewählten fünf Genpaare von *E. coli* besitzen alle im richtigen Abstand unterschiedlich starke iSD Sequenzen (siehe Tabelle 57). Zur Untersuchung, wie sich die Motive auf die Kopplung der Translation auswirken, wurden die Sequenzen durch *site directed mutagenesis* zu Basen verändert, welche nicht in der Lage sind mit der anti-SD Sequenz der 16S rRNA zu wechselwirken. In Abbildung 8a ist schematisch dargestellt, wie sich die analysierten Konstrukte unterscheiden. In beiden Fällen ist das überlappende Genpaar mit den letzten 99 Nukleotiden von Gen *x* an den Reporter *glpD*, sowie mit den 30 ersten Nukleotiden von Gen *y* an *gusA*

fusioniert. Die iSD Sequenz (gezeigt in Gelb) ist in der "-" Version (gezeigt in Gelb durchgestrichen) zu einer nicht Consensus-Sequenz mutiert. Auch hier wurde für alle generierten Varianten die Enzymaktivität der fusionierten Reporter gemessen (siehe Anhang 5a für GlpD und b für GusA) sowie die Transkriptlevel der bicistronischen mRNA mittels Sonden gegen beide fusionierten Reporter im Northern-Blot quantifiziert (siehe Anhang 5c für *glpD* und d für *gusA*). Für alle Transkriptlevel sind vergleichbar hohe Werte quantifiziert worden. Eine Ausnahme ist das Genpaar *menD/menH*, hier zeigt sich, dass nach der Mutagenese der iSD Sequenz der Wert mehr als zweifach erhöht wird. Das ist ein deutlicher Beweis dafür, wie die Stabilität der mRNA schon nach den kleinsten Veränderungen beeinflusst wird und wie wichtig es ist, das Transkriptlevel für die Analyse einer Translation mit einzubeziehen. Abbildung 8b zeigt die berechneten Translationseffizienzen aller Konstrukte für den stromaufwärts-liegenden Reporter *glpD*. Die Werte sind jeweils auf die Konstrukte mit nativer Sequenz normalisiert. Es sind nicht signifikante Unterschiede zu erkennen, außer für *hyfH/hyfl*. Die Translationseffizienz nimmt hier durch die Mutation für den Reporter *glpD* um 60% ab. Für den stromabwärts-liegenden Reporter *gusA* sind die Translationseffizienzen in Abbildung 8c dargestellt. Mit der jeweils mutierten SD Sequenz ist eine verringerte Translationseffizienz um 70% für *hyfH/hyfl*, 90% für *astD/astB*, 98% für *ydbH/ynbE* und 65% für *menD/menH* zu sehen. Nur das Genpaar *bioB/bioF* ist eine Ausnahme und nach der Veränderung der SD Sequenz ist keine Veränderung der Translationseffizienz zu sehen. Wie bereits oben erwähnt, besitzt *bioB/bioF* eine sehr schwache iSD. Sollte diese nicht als eine solche wirken können ist der Austausch der Basen nicht relevant und das erzielte Ergebnis nicht verwunderlich.

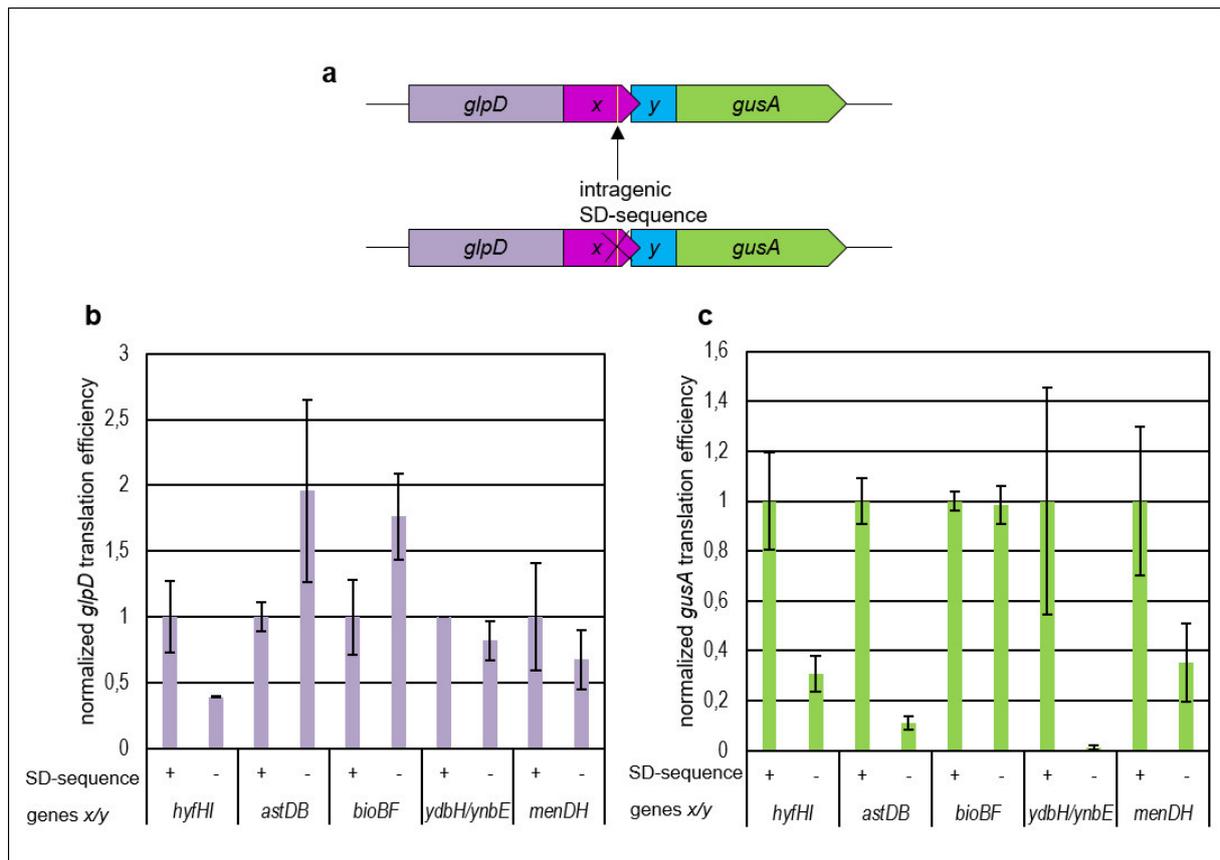


Abbildung 8 Intragenetische SD Sequenzen in *E. coli*. **a.** Schematische Darstellung der Doppelreportergenkonstrukte mit (gelber Balken) und ohne (durchgestrichener gelber Balken) SD Sequenz. In Magenta ist Gen x mit der Fusion an das Reporter-gen *glpD* (Lila) dargestellt und in Blau Gen y mit der Fusion an das Reporter-gen *gusA* (Grün). **b.** Durchschnittliche Translationseffizienzen des *glpD* Reportergens. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte von drei biologischen Replikaten mit der Standardabweichung von Konstrukten +/-SD-Sequenz, jeweils normiert auf die durchschnittliche Translationseffizienz des Konstrukts mit SD Sequenz. **c.** Durchschnittliche Translationseffizienzen des *gusA* Reportergens. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte von drei biologischen Replikaten mit der Standardabweichung von Konstrukten +/-SD-Sequenz, jeweils normiert auf die durchschnittliche Translationseffizienz des Konstrukts mit SD Sequenz

5. Bioinformatische Analyse von 720 prokaryotischen Genomen

Die von Shine und Dalgarno ursprünglich entdeckte und nach Ihnen benannte Shine-Dalgarno Sequenz (Shine and Dalgarno 1973), befindet sich in prokaryotischer mRNA in der 5'-UTR im optimalem Abstand von 5 Nukleotiden (Chen *et al.* 1994) zum Start-Codon des Transkriptes und kann zur Initiation der Translation mit dem 3'-Ende der 16S rRNA wechselwirken. Während der Shine-Dalgarno Mechanismus in Bacteria für die Translations-Initiation ein gut untersuchter und detailliert beschriebener Prozess ist (Naphthine *et al.* 2009; Powell 2010; Powell *et al.* 2011) kann für Archaea nur bedingt angenommen werden, dass dieser Mechanismus ebenfalls genutzt wird, da nur wenige Transkripte eine 5'-UTR besitzen. Ein Beispiel hierfür ist *H. volcanii* bei welchem 72% der Transkripte *leaderless* sind (Babski *et al.* 2016). Aufgrund der Feststellung (Kramer *et al.* 2014), dass für den

Modellorganismus *H. volcanii* in der 5'-UTR einer mRNA die SD Sequenz keine Rolle spielt, wurde eine bioinformatische Analyse von 720 annotierten Genomen aus Bacteria und Archaea von der Arbeitsgruppe von Eugene Koonin aus dem NIH in Bethesda, USA durchgeführt. Dabei wurden unterschiedliche Faktoren analysiert, welche das Vorhandensein sowie die Stärke der SD Motive an unterschiedlichen Stellen betreffen. Die Ergebnisse sind in den folgenden Abbildungen (Abbildung 9 und Abbildung 10) dargestellt. Die 720 Genome wurden zu vereinfachten Darstellung in 24 Gruppen zusammengefasst.

In Abbildung 9 sind die Ergebnisse für die Analyse von Shine-Dalgarno Sequenzen gezeigt. Unterschieden wird zum einen in überlappende Genpaare, an welchen eine Translationskopplung möglich ist. Sowie in 5'-UTRs von Genen, welche mindestens 200 Nukleotide Abstand zum nächsten Gen stromaufwärts besitzen (als *leading* Gene bezeichnet) und somit eine *de novo*-Initiation notwendig ist. Die jeweilige Anzahl von überlappenden Genpaaren welche eine SD Sequenz besitzen, ist in Abschnitt a zu sehen. Es ist zu erkennen, dass für alle untersuchten Genome überlappende Genpaare gefunden wurden, welche eine SD Sequenz besitzen. 20 der 24 Gruppen besitzen mindestens 50% oder mehr und zehn Gruppen sogar über 70% von Genpaaren mit SD-Sequenz. An überlappenden Genpaaren in Archaea und Bacteria ist also eine iSD Sequenz meist vorhanden, was die Notwendigkeit dieser Consensus Sequenz in Genpaaren unterstützt. Besonders für die in dieser Arbeit untersuchten Organismen *H. volcanii*, welches den Haloarchaea zugeordnet wird (siehe Abbildung 9a, orangener Pfeil), und *E. coli*, welches zu den γ -Proteobacteria gezählt wird (siehe Abbildung 9a, grüner Pfeil), sind jeweils Anteile von 72% bzw. 55% gezeigt. Für beide Organismen ist bekannt, dass mehr als die Hälfte der Gene in Genpaaren auf bi- oder polycistronischer mRNA vorliegen (Pallejà *et al.* 2009). Diese bioinformatische Analyse zeigt, dass zusätzlich für beide Organismen jeweils eine große Anzahl an intragenen SD Sequenzen gefunden werden. In Abbildung 9b sind die Anteile der Gruppen gezeigt, welche eine *leading* Sequenz, also eine 5'-UTR besitzen, in welcher eine SD Sequenz vorkommt. Hier ist die Varianz innerhalb der 24 Gruppen sehr groß. Nur vier Gruppen haben einen Mittelwert von 70% oder höher (*Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Synergistetes* und *Thermotogae*). Bei der Translations-Initiation sind SD Sequenzen hier also typischerweise involviert. Für die beiden in dieser Arbeit untersuchten Organismen bzw. ihre Gruppen zeigen sich Werte von 20% (Haloarchaea, Abbildung 9b orangener Pfeil) und 39% (γ -Proteobacteria,

Abbildung 9b grüner Pfeil). Im Durchschnitt lässt sich sagen, dass die Anteile der SD Sequenzen in überlappenden Genpaaren höher ist als bei denen in einer 5'-UTR. Das wird in Abbildung 9c nochmals verbildlicht, hier sind die Quotienten der Abschnitte a und b für die jeweiligen Gruppen gezeigt. Die rote Linie ist auf der Höhe von 1 eingezeichnet und abgesehen von zwei Gruppen liegen alle mindestens auf 1 oder höher. Der Quotient für die Gruppe der Haloarchaea liegt bei 3,4, (siehe Abbildung 9b orangener Pfeil) was damit einhergeht, dass diese Gruppe kaum Transkripte mit 5'-UTRs besitzt. Da hier sehr viele SD Sequenzen innerhalb der überlappenden Genpaare gezeigt werden können, stellt sich die Frage der Funktion.

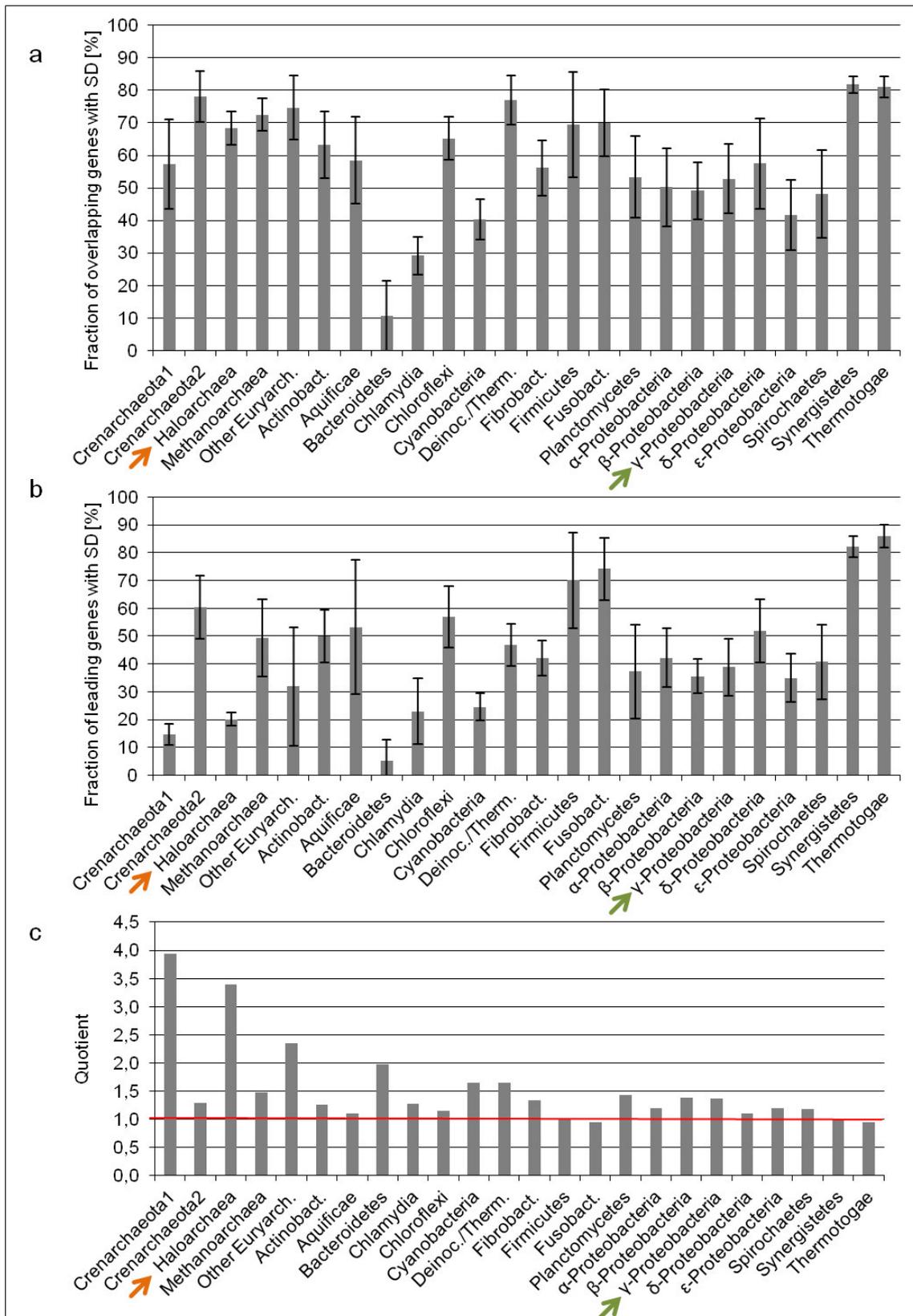


Abbildung 9 Bioinformatische Analyse von 720 annotierten prokaryotischen Genomen auf SD Sequenzen. Die 720 annotierten Genome zusammengefasst in 24 Gruppen zeigen in **a.** die Anteile der überlappenden Genpaare mit SD Sequenz und der jeweiligen Standardabweichung in einer Gruppe. **b.** zeigt die Anteile der Gruppen, welche eine 5'-UTR besitzen und darin enthalten eine SD Sequenz. **c.** Zeigt den Quotienten der Werte aus a und b. In Allen Abschnitten ist die Gruppe der Haloarchaeota mit einem orangenen Pfeil und die der γ -Proteobacteria mit einem grünen Pfeil gekennzeichnet (Huber *et al.* 2019).

Um eine konkretere Aussage über die Position und Verwendung von SD Sequenzen machen zu können, wurden die gleichen 720 annotierten Genome auf starke SD Sequenzen untersucht (Abbildung 10). Als eine starke SD Sequenz ist hier eine Sequenz angegeben, welche mindestens eine Bindungsenergie ΔG von $-8,3$ kJ/mol zur komplementären Sequenz in der 16S rRNA am 3'-Ende besitzt. Abschnitt a in Abbildung 10 zeigt den Anteil der Gene vom jeweiligen Genom, welche in überlappenden Genpaaren vorliegen und darin eine starke SD Sequenz besitzen. Die Gruppe der Haloarchaea hat 24% (siehe Abbildung 10a, orangener Pfeil) während γ -Proteobacteria 8% (siehe Abbildung 10a, grüner Pfeil) starke SD Sequenzen besitzen. In Abschnitt b sind die Fraktionen der starken SD Sequenzen in 5'-UTRs zu sehen. Auch hier ist eine große Varianz vorhanden, obwohl direkt auffällt, dass der Durchschnitt deutlich unter zehn liegt. Haloarchaea besitzen hier einen Anteil von 2 % (siehe Abbildung 10b, orangener Pfeil) während γ -Proteobacteria 5% (siehe Abbildung 10b, grüner Pfeil) besitzen. Abschnitt c zeigt auch hier den Quotienten der Diagramme a und b und es ist erkennbar, dass für 6 Gruppen der Quotient ≥ 1 ist, jedoch in 12 Gruppen größer als 2 und somit in überlappenden Genpaaren häufiger eine starke SD Sequenz gefunden werden kann als das in 5'-UTRs von Transkripten der Fall ist. Die bioinformatischen Ergebnisse bestärken die Vermutung, dass SD Sequenzen nicht nur für die Translations-Initiation verwendet werden, sondern auch weitere Mechanismen an dieser Sequenz stattfinden.

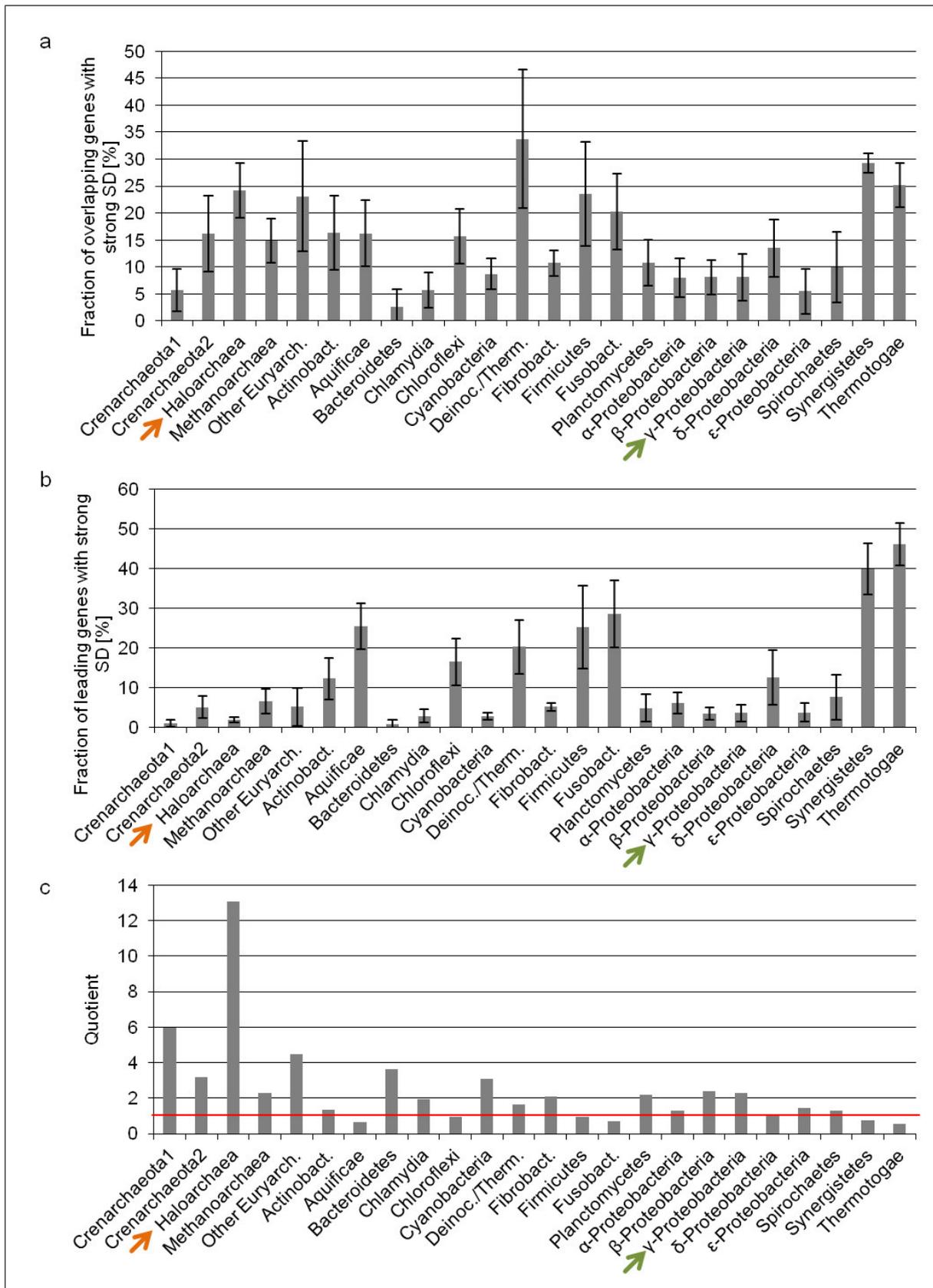


Abbildung 10 Bioinformatische Analyse von 720 annotierten prokaryotischen Genomen auf starke SD Sequenzen. Die 720 annotierten Genome zusammengefasst in 24 Gruppen zeigen in **a.** die Abschnitte der überlappenden Genpaare mit starker SD Sequenz und der jeweiligen Standardabweichung in einer Gruppe. **b.** zeigt die Abschnitte der Gruppen, welche eine 5'-UTR besitzen und darin enthalten eine starke SD Sequenz. **c.** Zeigt den Quotienten der Werte aus a und b. In Allen Abschnitten ist die Gruppe der Haloarchaeota mit einem orangenen Pfeil und die der γ-Proteobacteria mit einem grünen Pfeil gekennzeichnet (nach Huber *et al.*, 2019)

6. Intergene Bereiche in *Haloferax volcanii*

Dass eine Translationskopplung an überlappenden Genpaaren in *H. volcanii* stattfindet, konnte bereits erfolgreich bewiesen werden (siehe Ergebnisse 1. Termination-Reinitiation in *Haloferax volcanii*). Es wurden ebenfalls, wie bereits erwähnt, 792 Gene gefunden, welche zehn Nukleotide oder weniger Abstand zwischen dem Stop- und Start-Codon der beiden Gene besitzen. An einem Beispiel hierfür wurde gezeigt, dass auch ein Abstand von zehn Nukleotiden in *H. volcanii* noch zu einer erfolgreichen Kopplung der Translation führt (Abbildung 5b, *flgA1/flgA2*). Um diese Feststellung weiter zu analysieren, wurde zunächst das Genpaar *HVO_0685/0686* ausgewählt. Dieses Genpaar besitzt einen Abstand von einem Nukleotid zwischen Stop- und Start-Codon in der nativen Sequenz (TGAx**ATG**) (siehe Tabelle 56). Auch für dieses Beispiel konnte bereits eine Kopplung gezeigt werden (Abbildung 5b). In einer Masterarbeit von Guerino Rizzo wurden nun prämaturre Stop-Codons an unterschiedlichen Positionen durch *site directed mutagenesis* eingebracht, um künstliche intergene Bereiche zwischen den beiden Genen zu erzeugen (Rizzo 2018). Die intragene Shine-Dalgarno Sequenz wurde dabei möglichst nicht verändert. In Tabelle 58 sind die Sequenzen des überlappenden Bereichs für den die native *HVO_0685/0686* Sequenz sowie für die erstellten Mutanten mit den unterschiedlich großen intergenen Bereichen aufgelistet.

Tabelle 58 Konstrukte zur Analyse der intergenen Bereiche für *HVO_0685/0686*. Die mutierten Konstrukte des Genpaares *HVO_0685/0686* sind jeweils mit der Bezeichnung der Sequenz im Bereich des Überlapps angezeigt, sowie der intergene Bereich in Nukleotiden angegeben ist. Die unterstrichenen Nukleotide zeigen jeweils die SD Sequenz, in Blau ist das Start-Codon des γ -Gens und in Rot das Stop-Codon des α -Gens markiert.

name	sequence	Intergenic distance
HVO_0685/0686_TGA-5	TTGGCCGGGACACCGCGGGGCGGACGGGTTGAGT TAGATG TOGAT TCAGC	-5nt
HVO_0685/0686	TTGGCCGGGACACCGCGGGGCGGACGGGTTGAGT TAGATG TOGATG TCAGA	+1nt
HVO_0685/0686_TGA+5	TTGGCCGGGACACCGCGGGGCGGACGGGTTGAGT TAGATG TCAGATG TCAGATG TCG	+5nt
HVO_0685/0686_TGA+13	TTGGCCGGGACACCGCGGGGCGGACGGGTTGAGT TAGATG TCAGATG TCAGATG TCGATG	+13nt
HVO_0685/0686_TGA+19	TTGGCCGGGACACCGCGGGGCGGACGGGTTGAGT TAGATG TCAGATG TCAGATG TCGATG	+19nt
HVO_0685/0686_TGA+22	TTGGCCGGGACACCGCGGGGCGGACGGGTTGAGT TAGATG TCAGATG TCAGATG TCGATG	+22nt
HVO_0685/0686_TGA+34	TTCT TAG CGGACACCGCGGGGCGGACGGGTTGAGT TAGATG TCAGATG TCAGATG TCGATG	+34nt

Für die Analyse der Konstrukte wurde für *H. volcanii* an dieser Stelle ebenfalls ein Doppelreportergenkonstrukt eingeführt. Dabei wird die Arabinose Dehydrogenase (*araDH*) als stromaufwärts-fusioniertes Reportergen an Gen x verwendet (schematische Darstellung in Abbildung 11a). Die gemessenen Enzymaktivitäten für die verwendeten Reporter sowie das quantifizierte mRNA-Level sind im Anhang 6 für

das Reporterogen *araDH* gezeigt und in Anhang 7 für den Reporter *dhfr*. Die berechneten Translationseffizienzen für beide Reporter, fusioniert an die unterschiedlichen Konstrukte, sind in Abbildung 11b und 11c zu sehen. Abbildung 11b zeigt dabei die Translationseffizienzen für den stromaufwärts-fusionierten Reporter *araDH*. Die Ergebnisse sind normiert auf die Werte der nativen Sequenz +1 (wt). Alle mutierten Konstrukte mit unterschiedlichen Abständen zeigen keinen signifikanten Unterschied in der Translationseffizienz des Reporters durch die eingebrachten prämaternen Stop-Codons. In Abbildung 11c sind die berechneten Translationseffizienzen des stromabwärts-fusionierten Reporterogens *dhfr* gezeigt. Auch hier wurden alle Ergebnisse auf die der nativ vorliegenden Sequenz mit einem Abstand von einem Nukleotid zwischen Stop- und Start-Codon (wt) normiert. Betrachtet man zunächst die Translationseffizienz mit dem stromabwärts-verschobenen Stop-Codon (-5), so zeigt sich kein Unterschied verglichen mit der wt-Sequenz. Die Konstrukte mit den vergrößerten Abständen hingegen zeigen eine starke negative Korrelation zwischen der Länge der intergenen Bereiche und der Translationseffizienz der Translationskopplung. Der Abstand von fünf Nukleotiden (+5) ergibt in diesem Genpaar bereits eine um 30%ige verringerte Translationseffizienz verglichen mit dem wt. Die Abstände von 13 und 19 Nukleotiden lassen die Translationseffizienz weiter sinken auf lediglich 40% der wt Effizienz und ab 22 Nukleotiden Abstand ist keine Kopplung von den beiden Reportern zu sehen (+22 und +34 in Abbildung 11c). Auf Grund dieser Ergebnisse wurden für drei weitere Genpaare intergene Bereiche von 14 Nt und 23 Nt konstruiert und untersucht. Die drei Genpaare unterscheiden sich in ihren nativen Sequenzüberlappen, während *HVO_2431/2430* und *HVO_1594/1595* einen Überlapp von vier Nukleotiden (**ATGA**) besitzen, überlappt das Genpaar *HVO_2555/2554* in der wt-Sequenz mit nur einem Nukleotid (**TGATG**). Es wurden Enzymassays für die fusionierten Reporter durchgeführt (Ergebnisse in Anhang 6a für die AraDH und Anhang 7a für DHFR). Für *HVO_2555/2554* wurde die Transkriptlevel-Bestimmung mittels Northern-Blot Analyse mit spezifischen Sonden gegen die Reporterogene durchgeführt und für die Genpaare *HVO_2431/2430* und *HVO_1594/1595*, wurde das Transkriptlevel mittels quantitativer PCR (qPCR) bestimmt (Ergebnisse in Anhang 6b für *araDH* und Anhang 7b für *dhfr*). Die berechneten Translationseffizienzen für das stromaufwärts-liegende Reporterogen *araDH* sind in Abbildung 11d gezeigt. Für die Genpaare *HVO_2431/2430* und

HVO_2555/2554 liegen die Unterschiede innerhalb der Standardabweichungen, für *HVO_1594/1595* jedoch ist mit einem Abstand von +23 Nukleotiden eine 3,5-Fach höhere Translationseffizienz zu sehen. Das kann an der Fusion des stromaufwärts-liegenden Gens an den Reporter liegen, welches möglicherweise den Reporter in seiner Aktivität inhibiert und durch die verkürzte Sequenz von Gen x wird die Aktivität wieder erhöht. Für die Translationseffizienzen des stromabwärts-liegenden Reporters *dhfr* ist in Abbildung 11e zu sehen, dass ein intergener Abstand von 14 Nukleotiden einen variablen Effekt hat. Für *HVO_2431/2430* ist eine Translationseffizienz von nur noch 50% verglichen mit dem wt zu sehen, während *HVO_2555/2554* eine um 40% verringerte Translationseffizienz besitzt und *HVO_1594/1595* nur eine um 10% verringerte Translationseffizienz. Für 23 Nukleotide Abstand lässt sich jedoch für alle drei analysierten Genpaare zeigen, dass hier keine Translationseffizienz mehr zu sehen ist und somit keine Kopplung mehr stattfindet. Für alle vier Genpaare wurde gezeigt, dass der Überlapp oder extrem kurze intergene Bereiche Voraussetzung für eine gekoppelte Translation in *H. volcanii* sind.

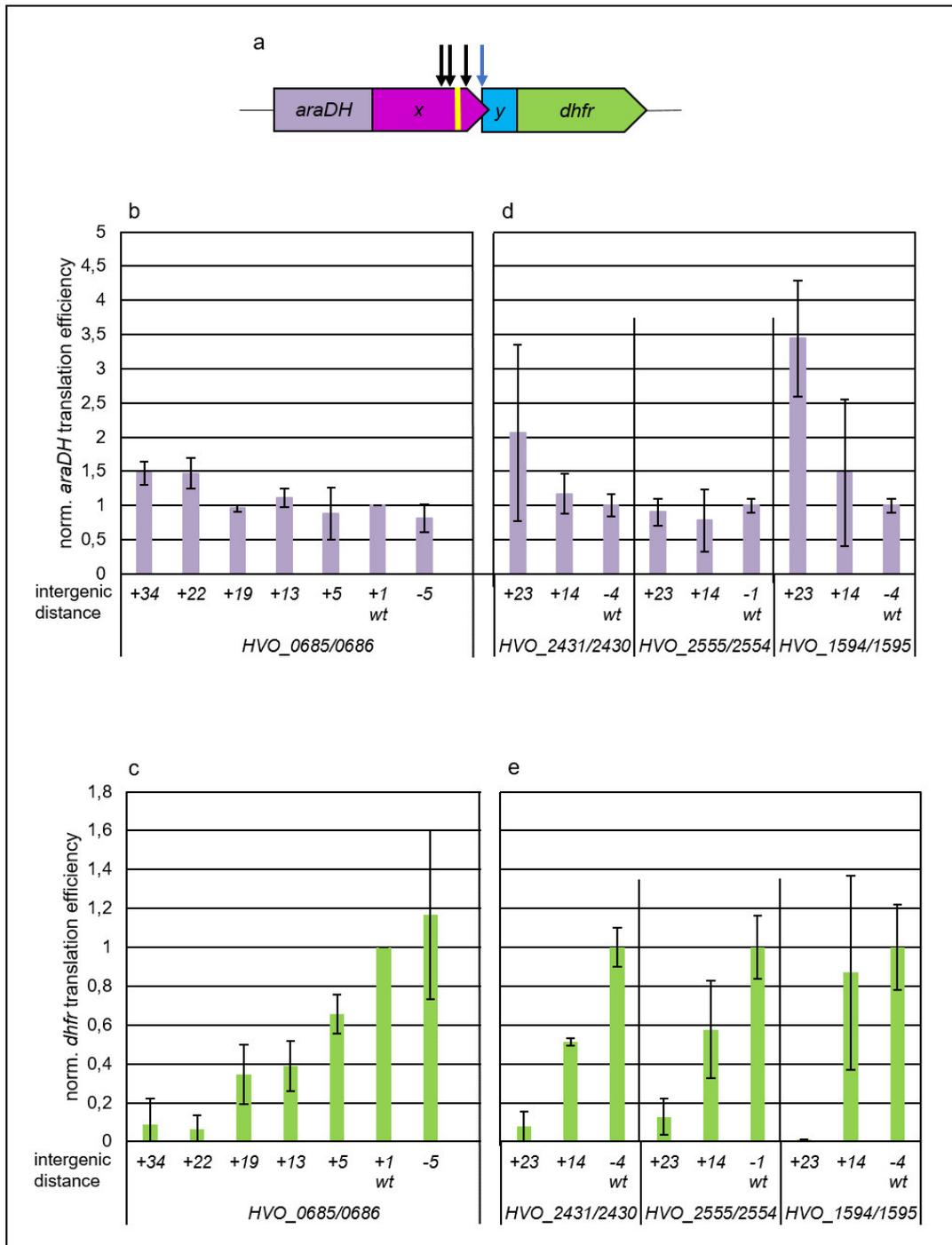


Abbildung 11 Intergene Bereiche in *H. volcanii*. **a.** Schematische Darstellung der verschiedenen analysierten Konstrukte mit dem stromaufwärts-fusionierten Reporter *araDH* (lila) und dem stromabwärts-fusionierten Reporter *dhfr* (grün). Der blaue Pfeil zeigt die Position des wt Stop-Codons und die schwarzen Pfeile die jeweils vorzeitig eingebrachten Stop-Codons. **b.** Durchschnittliche Translationseffizienzen für den *araDH* Reporter für das Genpaar *HVO-0685/0686* drei biologische Replikate sind jeweils in ihrem Mittelwert gezeigt mit der daraus entstandenen Standardabweichung. Alle Daten sind normiert auf die durchschnittliche Translationseffizienz des wt. **c.** Durchschnittliche Translationseffizienzen für den *dhfr* Reporter für das Genpaar *HVO-0685/0686* drei biologische Replikate sind jeweils in ihrem Mittelwert gezeigt mit der daraus entstandenen Standardabweichung. Alle Daten sind normiert auf die durchschnittliche Translationseffizienz des wt. **d.** Durchschnittliche Translationseffizienzen für den *araDH* Reporter für die Genpaare *HVO_2431/2430*, *HVO_2555/2554*, *HVO_1594/1595*, drei biologische Replikate sind jeweils in ihrem Mittelwert gezeigt mit der daraus entstandenen Standardabweichung. Alle Daten sind normiert auf die jeweilige durchschnittliche Translationseffizienz des wt. **e.** Durchschnittliche Translationseffizienz für den stromabwärts-liegenden Reporter *dhfr*, für die Genpaare *HVO_2431/2430*, *HVO_2555/2554*, *HVO_1594/1595*, drei biologische Replikate sind jeweils in ihrem Mittelwert gezeigt mit der daraus entstandenen Standardabweichung. Alle Daten sind normiert auf die jeweilige durchschnittliche Translationseffizienz des wt.

7. Intergene Bereiche in *Escherichia coli*

Für den Modellorganismus *E. coli* ist die Translationskopplung und die Analyse des maximalen Abstands zwischen zwei Genen einer bicistronischen mRNA ein kontrovers diskutiertes Thema. Für diese Arbeit wurden drei, bereits auf Translationskopplung untersuchte, Genpaare ausgewählt und prämatüre Stop-Codons mittels *site directed mutagenesis* eingebracht, welche intergene Bereiche von 2 Nt, 14 Nt und 38 Nt erzeugen. Die nativen Sequenzen besitzen jeweils ein Start-Stop Überlapp von **ATGA**. Für alle Konstrukte wurden die Enzymaktivitäten für die fusionierten Reporter gemessen und die Transkriptlevel bestimmt (siehe Anhang 8 für *glpD* und Anhang 9 für *gusA*). In Abbildung 12b sind jeweils alle berechneten Translationseffizienzen für den stromaufwärts-fusionierten Reporter *glpD* gezeigt. Für alle getesteten Konstrukte ist eine Translationseffizienz der stromaufwärts-liegenden Gene zu detektieren, wenn auch diese geringfügig von der der nativen Sequenz (wt) abweichen. Für den stromabwärts-fusionierten Reporter *gusA* ergibt sich ein anderes Muster für die unterschiedlich langen intergenen Bereiche. Für das Genpaar *hyfH/hyfI*, welches in der Masterarbeit von Anna Lena Maisch (Maisch 2019) gemessen wurde, ist zu sehen, dass der intergene Bereich von 2 Nukleotiden nur eine geringe Auswirkung auf die Translationseffizienz hat und zu einer um 10% verringerten Translationseffizienz führt. Der Abstand von einem Nukleotid führt zu einer um 40% verringerten Translationseffizienz und bei 38 Nukleotiden intergenem Bereich ist mit 90% Abnahme nicht mehr von einer gekoppelten Translation zu sprechen. Das Genpaar *ydbH/ynbE* wurde ebenfalls in der Masterarbeit von Frau Maisch analysiert und zeigt ein ähnliches Verhalten. 2 Nukleotide führen zu einer verringerten Translationskopplung um 30%, 14 Nukleotide Abstand zu einer 50%igen Verringerung und 38 Nukleotide lassen mit 90% verringerter Translationseffizienz keine gekoppelte Translation mehr beschreiben. Das Genpaar *menD/menH* hingegen verhält sich unterschiedlich zu den beiden anderen. Hier ist nach zwei Nukleotiden Abstand bereits eine Verringerung der Translationseffizienz um 70% gezeigt und bei einem Abstand von 14 Nukleotiden sinkt diese um weitere 10%. Mit der Distanz von 38 Nukleotiden ist auch hier keine Kopplung mehr vorhanden (Abbildung 12c). Somit lässt sich für alle drei analysierten Genpaare von *E. coli* zeigen, dass ein Abstand von mehr als 38 Nukleotiden für eine Translationskopplung mittels Termination-Reinitiation zu groß ist.

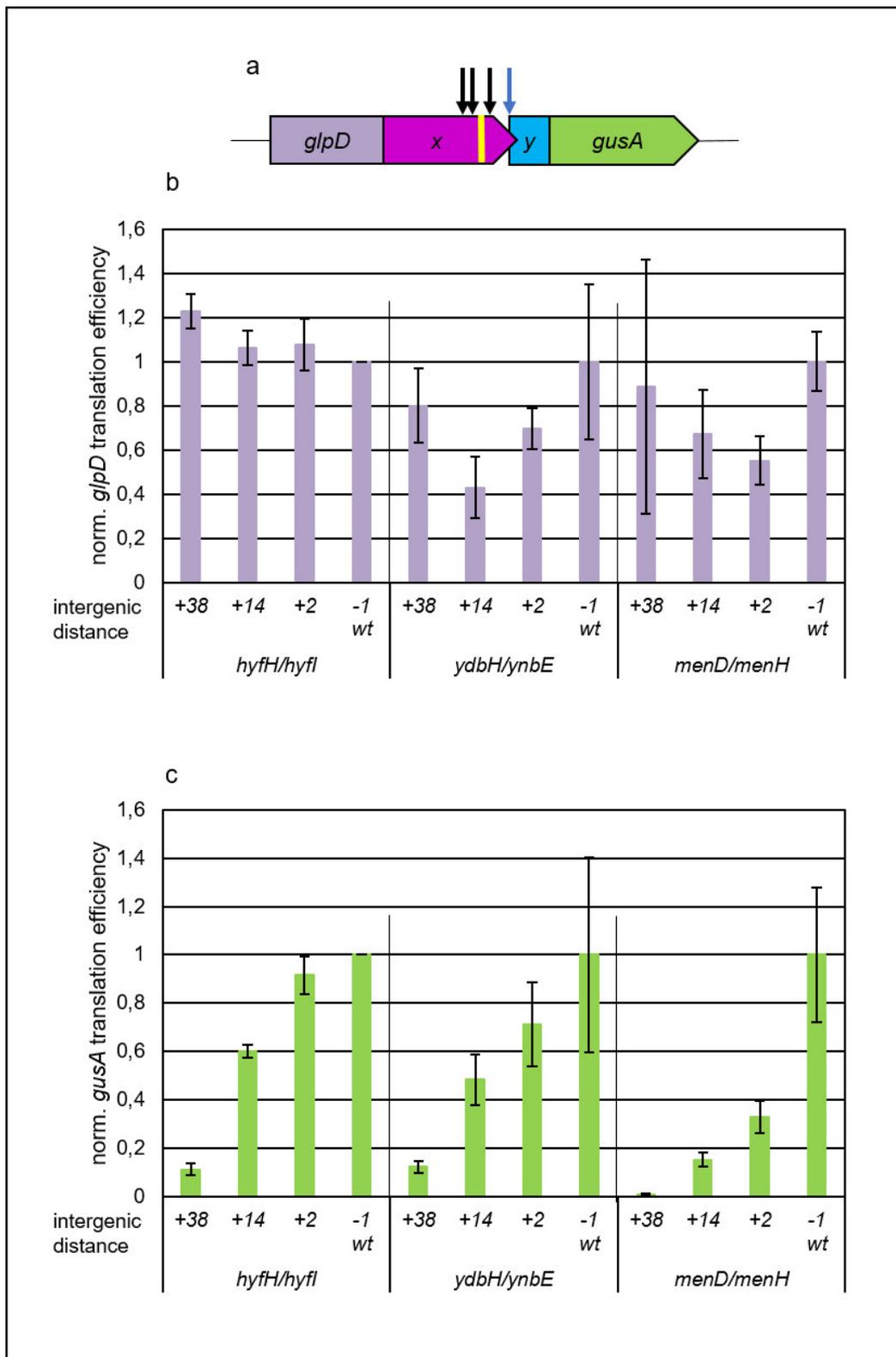


Abbildung 12 Intergene Bereiche in *E. coli*. **a.** Schematische Darstellung der verschiedenen analysierten Konstrukte mit dem stromaufwärts-fusionierten Reporter *glpD* (lila) und dem stromabwärts-fusionierten Reporter *gusA* (grün). Der blaue Pfeil zeigt die Position des wt Stop-Codons und die schwarzen Pfeile die jeweils vorzeitig eingebrachten Stop-Codons. **b.** Durchschnittliche Translationseffizienzen für den *glpD* Reporter für die Genpaare *hyfH/hyfI*, *ydbH/ydbE* und *menD/menH*, drei biologische Replikate sind jeweils in ihrem Mittelwert gezeigt mit der daraus entstandenen Standardabweichung. Alle Daten sind normiert auf die jeweilige durchschnittliche Translationseffizienz des wt. **c.** Durchschnittliche Translationseffizienz für den stromabwärts-liegenden Reporter *gusA* für die Genpaare *hyfH/hyfI*, *ydbH/ydbE* und *menD/menH*, drei biologische Replikate sind jeweils in ihrem Mittelwert gezeigt mit der daraus entstandenen Standardabweichung. Alle Daten sind normiert auf die jeweilige durchschnittliche Translationseffizienz des wt.

8. Bioinformatische Analyse intergener Bereiche

Aufgrund der experimentellen Ergebnisse von intergenen Bereichen in *H. volcanii* und *E. coli* (s.o.) kann die Hypothese aufgestellt werden, dass native Genpaare mit mehr als 10 Nukleotiden Abstand im Genom nur selten vorkommen. Hierfür wurde eine bioinformatische Analyse für die Modellorganismen *H. volcanii* und *E. coli* von Friedhelm Pfeiffer (MPI für Biochemie, Martinsried) durchgeführt. Es wurden intergene Bereiche von allen seriellen Genpaaren berechnet, wobei divergente und konvergente Genpaare ausgeschlossen wurden, da an diesen keine Translationskopplung möglich ist. Die Darstellung der Distanzen zwischen Genpaaren in Bezug auf die Anzahl ist in der nachfolgenden Abbildung dargestellt (siehe Abbildung 13). Abschnitt a zeigt das Ergebnis für *H. volcanii*. Der vier Nukleotid Start-; Stop-Codon Überlapp (**ATGA**) überwiegt mit 350 Genpaaren in der Anzahl deutlich allen anderen Abständen. Zwischen -4 und +10 Nukleotiden Abstand sind noch Genpaare zu beobachten. Für größere Abstände sind jedoch keine Genpaare mehr zu erkennen (Abbildung 13a). Für *E. coli* ist das Ergebnis der Analyse in Abschnitt b gezeigt. Auch hier zeigt sich ein ähnliches Muster. Besonders fällt der Peak bei vier Nukleotiden Abstand mit dem Start-; Stop-Codon Überlapp mit 260 Genpaaren auf. Auffällig ist, dass ein Überlapp von einem Nukleotid (**TGATG**) auch bei 160 Genpaaren vorkommt. Weitere Peaks sind bei neun und zehn Nukleotiden Abstand zu sehen, welche jeweils bei ungefähr 60 Genpaaren vorkommen. Bei einigen wenigen Genpaaren sind zusätzlich Abstände zwischen 10 und 40 Nukleotiden gefunden worden. Hier kann angenommen werden, dass diese Genpaare nicht gekoppelt translatiert werden, da der Abstand groß genug für eine Ribosomenbindestelle vor dem stromabwärts-liegenden Gen ist (Abbildung 13b). Für die beiden untersuchten Organismen lässt sich eine Ähnlichkeit in der Verteilung von intergenen Bereichen feststellen, wenn auch Unterschiede zu finden sind.

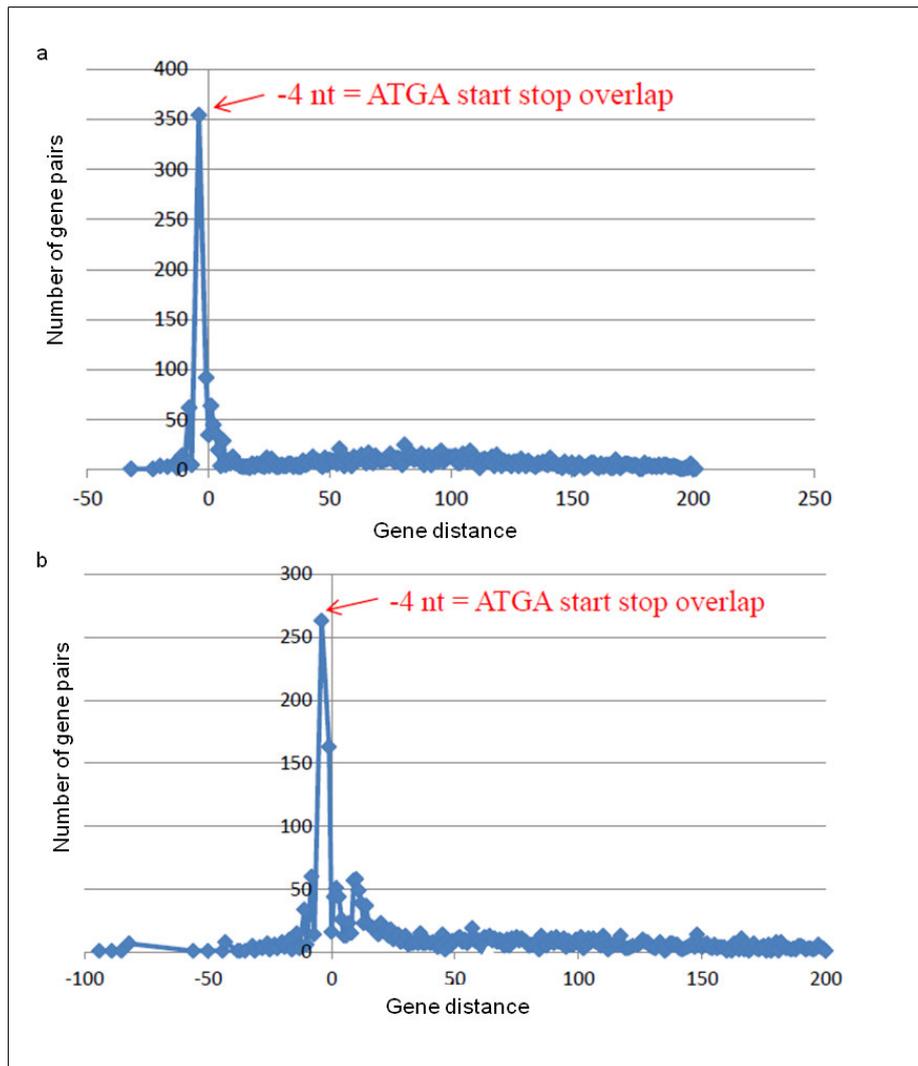


Abbildung 13 Bioinformatische Analyse zu Abständen von seriellen Genpaaren. Divergente und Konvergente Genpaare wurden ausgeschlossen **a.** Anzahl der Genpaare mit jeweiligem Abstand zwischen den Genen in *H. volcanii*. **b.** Anzahl der Genpaare mit jeweiligem Abstand zwischen den Genen in *E. coli*

Ein großer Vorteil der gekoppelten Translation ist die Formation von Proteinkomplexen während der Translation (Kramer *et al.* 2009). So konnte gezeigt werden, dass die Bildung eines Luciferase-Komplexes aus den Untereinheiten LuxA und LuxB effizienter erfolgt, wenn die beiden Untereinheiten auf einem polycistronischen Transkript vorliegen, verglichen mit dem Vorliegen der Transkripte auf separaten mRNAs (Shieh *et al.* 2015). Die Vorteile einer Formation von heteromeren Proteinkomplexen während der gekoppelten Translation sind zum Beispiel, dass bei der Bildung eines instabilen Proteins, welches ein zweites Protein zur korrekten Faltung benötigt, ein genaues Verhältnis von 1:1 in der Zelle in räumlicher Nähe vorliegt. Daraus folgte die Hypothese, dass die Formation von heteromeren Proteinkomplexen ein evolutionärer Vorteil ist, welcher zur translationalen Kopplung via Termination-Reinitiation an überlappenden Genpaaren

fürte. Im Zuge der bioinformatischen Analyse zu intergenen Bereichen wurde daher zusätzlich zum Abstand zwischen den Genpaaren analysiert, ob sich aus den codierten Proteinen bekannter Weise Proteinkomplexe bilden. Dazu wurden die Genpaare wie folgt in Gruppen eingeteilt: Gruppe 1 sind Genpaare mit Abständen von +8 bis -10 Nukleotiden, hier wird davon ausgegangen, dass eine Translationskopplung möglich ist. Gruppe 2 beinhaltet Genpaare mit größeren Abständen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 59 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass für beide Organismen die Formation von Proteinkomplexen erhöht ist, wenn der Abstand zwischen den Genen geringer ausfällt und eine Translationskopplung möglich wäre. Für *H. volcanii* ist eine 6,9-fache Anreicherung und für *E. coli* eine 2,7-fache Anreicherung zu sehen, wenn die Gene mit kurzen Abständen vorliegen. Somit wird angenommen, dass ein Vorteil der Translationskopplung via Termination-Reinitiation darin besteht, schnell und effizient heteromere Proteinkomplexe zu bilden.

Tabelle 59 Putative Formation von Proteinkomplexen. Genpaare von *H. volcanii* und *E. coli* unterteilt in Gruppe 1 mit geringem Abstand (-8 bis +10 Nukleotide) und Gruppe 2 mit größerem Abstand. Die Anzahl der bekannten Proteinkomplexe ist jeweils absolut sowie prozentual angegeben.

	<i>H. volcanii</i>		<i>E. coli</i>	
	Anzahl	%	Anzahl	%
Serielle Genpaare mit Abständen von -8 bis +10 Nukleotiden (Gruppe 1)				
Heteromerer Komplex	253	45	249	30
keine Komplex-Formation	307	55	571	70
Serielle Genpaare mit größeren Abständen (Gruppe 2)				
Heteromerer Komplex	62	6,5	221	11
keine Komplex-Formation	889	93,5	1793	89
Anreicherung von Komplex-Formation bei Genpaaren mit kurzen Abständen				
	6,9-fach		2,7-fach	

9. Etablierung einer Methode zur Untersuchung des Mechanismus der Termination-Reinitiation

Für überlappende Genpaare aus eukaryontischen Viren ist bekannt, dass es bei der Translation an bicistronischer mRNA zu einem Austausch der großen ribosomalen Untereinheit kommt, wenn das erste Gen vollständig translatiert wurde und bevor die Initiation des zweiten Gens beginnt (Abbildung 4). Da bisherige Untersuchungen gezeigt haben, dass bei *H. volcanii* und *E. coli* das Ribosom, welches die Translation am 5'-Ende startet auch das Ribosom ist, welches bei der gekoppelten Translation an der Genüberlappstelle reinitiiert (Huber *et al.* 2019), stellt sich die Frage, ob es zu

einem Austausch der großen Untereinheit kommt, wie bei dem Mechanismus der eukaryontischen Viren, oder aber ob das komplette Ribosom als 70S bestehen bleibt.

Für den genauen Mechanismus der Termination-Reinitiation in Prokaryoten ist bisher nicht bekannt, wie sich die Ribosomen nach der Termination an der mRNA verhalten. Um diese Fragestellung zu beantworten, wurde im Laufe dieser Doktorarbeit eine Methode optimiert, welche auf der Idee eines Ribosome Displays beruht (Plückthun 2012). Das Ribosome Display ermöglicht einen terminierten, aber noch nicht dissoziierten Translationskomplex mitsamt der ribosomalen Untereinheiten, mRNA und Polypeptidkette aus einer *in vitro* Translation aufzureinigen. Die Reassoziierung der Ribosomen von der mRNA und damit einhergehend die Freisetzung des Proteins wird verhindert, da kein Stop-Codon am 3' Ende der mRNA enthalten ist. Werden markierte Ribosomen in eine *in vitro* Translation eingesetzt, kann in einem aufgereinigten Komplex am Ende detektiert werden, ob die Ribosomen, welche zum Start der Reaktion eingesetzt wurden, das bicistronische Transkript translatiert haben oder aber ob es zu einem Austausch der 50S Untereinheit kam, welche nach dem Start, in einer hohen Konzentration und anders markiert der Reaktion hinzugefügt wurde. Für den Aufbau dieses Versuches ist eine Reihe an Bausteinen nötig, um eine *in vitro* Translation durchführen zu können, mit welcher die komplexe Fragestellung des Mechanismus einer Termination-Reinitiation analysiert werden kann.

In Abbildung 14 ist schematisch der geplante Versuchsablauf dargestellt. Während auf der horizontalen Achse (3,6,8-11) die Abfolge der Experimente dargestellt ist, zeigen die vertikal angebrachten Felder (1,2,4,5 a und b sowie 7 a und b) die einzelnen Komponenten, welche hergestellt werden müssen. Im Folgenden werden die einzelnen Unterpunkte sowie die Vorversuche und deren Ergebnisse dazu erläutert.

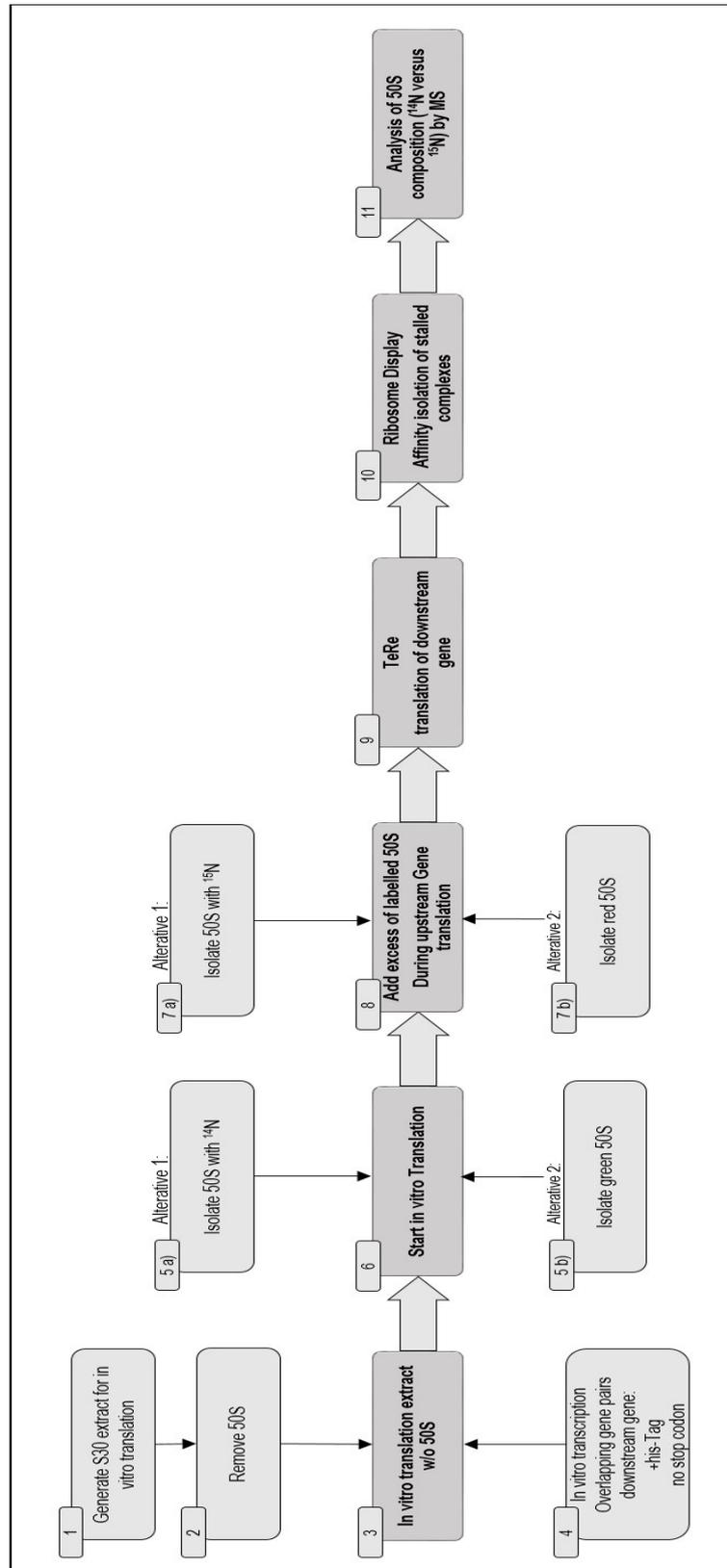


Abbildung 14 Versuchsablauf zu 30S und 70S Unterscheidung bei der Termination-Reinitiation in *E. coli*. Hellgraue Felder zeigen die Komponenten, welche hergestellt oder aufgereinigt werden müssen, um den Versuchsablauf (in Dunkelgrauen Feldern, 3;6;8;9;10;11 in dieser Reihenfolge) zu ermöglichen

Für den ersten Versuchsschritt (Abbildung 14, 3) wird eine mRNA benötigt, welche kein Stop-Codon enthält (4) sowie *in vitro* Translationslysate (1), aus welchem die 50S Untereinheit entfernt wurde (2). Für die Herstellung der mRNA (Abbildung 14, 4) wurde eine *in vitro* Transkription mit einer handelsüblichen T7 RNA-Polymerase nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Verifizierung der Größe der mRNA wurde mit Hilfe eines Polyacrylamid-Gel durchgeführt (Beispielgel in Abbildung 15).

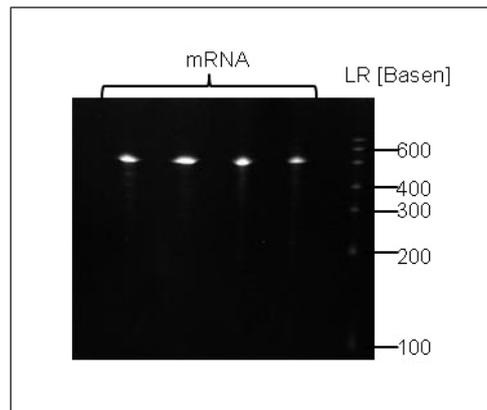


Abbildung 15 *In vitro* Transkriptions-Verifizierung mittels Polyacrylamidgel. Die synthetisierte mRNA mittels T7 RNA-Polymerase wurde auf ein 7,5% PA-Gel aufgetragen. Der LR-RNA-Marker wurde zum Vergleich der Größe der mRNA eingesetzt. Für alle hier gezeigten RNA-Proben ist eine klare Bande in der Höhe von 500 Basen zu sehen.

Für den geplanten Versuchsablauf in Abbildung 14 werden unterschiedliche Konstrukte der mRNA benötigt, um eine Unterscheidung der am Ende enthaltenen Komplexe zu ermöglichen. Es werden Genpaare eingesetzt, für die bereits eine Translationskopplung via Termination-Reinitiation gezeigt werden konnte. Im Folgenden sind die geplanten Konstrukte gezeigt (Abbildung 16). Zur Unterscheidung, ob es beim Mechanismus der Termination-Reinitiation zu einem Austausch der 50S Untereinheit kommt, werden verschiedene Kontrollen benötigt. Alle geplanten mRNAs besitzen dabei die gleichen UTRs am 5'- und 3'-Ende, welche die Translation ermöglichen und die Transkriptstabilität durch die Ausbildung von *stemloops* erhöhen. So ist die mRNA vor allem am 5'-Ende vor RNase E geschützt, wie bereits für das *ompA* Gen oder das T7 Gen 10 gezeigt werden konnte, diese mRNAs zeigen ungewöhnlich lange Halbwertszeiten (Emory and Belasco 1990; Lopez and Dreyfus 1996). Stromaufwärts zum Start-Codon befindet sich eine Ribosomenbindestelle. Für diesen Versuch ist essentiell, dass das 3'-Ende der konstruierten mRNA kein Stop-Codon enthält (Plückthun 2012). In Abbildung 16a ist schematisch die mRNA gezeigt, welche monocistronisch für nur ein Gen codiert und demnach keine Translationskopplung stattfinden kann, es dient somit als

Negativkontrolle. Komplexe, die mit dieser mRNA aufgereinigt werden, enthalten immer das 70S Ribosom mit welchem die Translation gestartet hat. Das mRNA-Konstrukt b (siehe Abbildung 16) ist bicistronisch mit einem C-terminalen His-Tag an Gen *y*. Hier kann eine Translationskopplung via Termination-Reinitiation stattfinden und der *ribosome display* Komplex über den His-Tag aufgereinigt werden. Dieses Konstrukt ermöglicht die Unterscheidung ob es zu einem Austausch der 50S ribosomalen Untereinheit kommt oder nicht. Konstrukt c ist ebenfalls bicistronisch, wobei der His-Tag C-terminal an Gen *x* ist. Hier kann ebenfalls eine Translationskopplung stattfinden der Komplex am Ende jedoch nur über den His-Tag aufgereinigt werden, wenn es zu einer Bildung des Proteinkomplexes direkt am Ribosom kommt (Kramer *et al.* 2009). Oder Protein X bleibt am Ribosom über unspezifische Bindungen bis zum Ende der Translation von Gen *y* verbleibt. Dieses Konstrukt ermöglicht somit eine weitere Fragestellung, die der heteromeren Komplexen zu untersuchen.

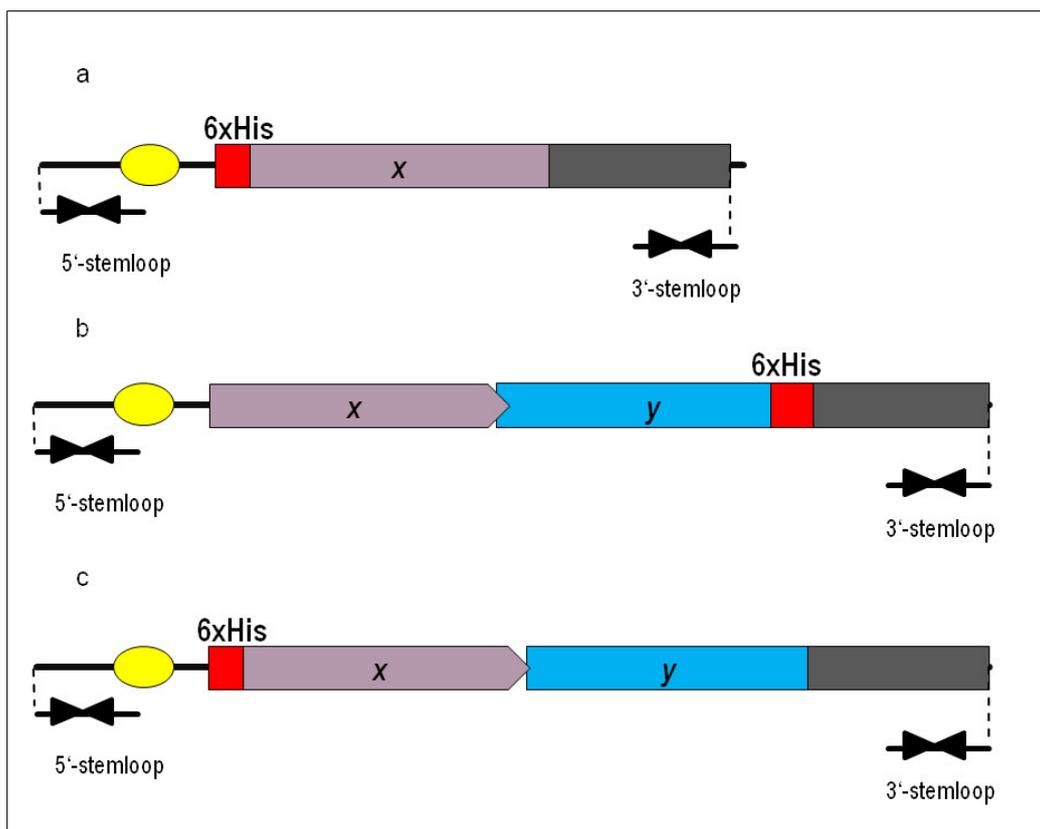


Abbildung 16 Schematische Darstellung der mRNA-Konstrukte. Alle mRNA Konstrukte besitzen einen *stemloop* am 5'- und 3'-Ende zur Stabilisierung der mRNA. In Gelb ist die Ribosomenbindestelle gekennzeichnet. Rot zeigt die Position des His-Tags. Die Gene *x* (Lila) und *y* (blau) unterscheiden sich in den Konstrukten, wobei **a.** lediglich Gen *x* besitzt mit einem N-terminalen His-Tag, **b.** enthält einen Genüberlapp mit C-terminalen His-Tag an Gen *y* und **c.** enthält ebenfalls einen Genüberlapp mit einem N-terminalen His-Tag an Gen *x*. In Grau ist jeweils ein *Spacer* am 3'-Ende der mRNA, welcher ermöglicht, dass ein Ribosomen mRNA Komplex das komplette Protein von Gen *x* oder *y* translatiert hat.

Um die Funktionalität der mRNA nachzuweisen, wurde zunächst mit einem *in vitro* Translationslysate, welches kommerziell für *E. coli* erhältlich ist, gearbeitet (PURE System) (Foshag *et al.* 2018; Shimizu *et al.* 2001). In Abbildung 17 ist ein Proteingel einer *in vitro* Translation aus dem Kit von NEB mit einer selbst synthetisierten mRNA zu sehen. Die Proben wurden nach den Zeitpunkten 0 Stunden, 1 Stunde und 2 Stunden Inkubation bei 37°C geerntet und auf das Gel aufgetragen. Das Gel wurde zunächst mit Coomassie gefärbt (a) und anschließend silbergefärbt um eine bessere Markierung der Proteine zu erreichen (b). Nach 2 Stunden Inkubation der *in vitro* Translation ist auf der Höhe von 19 kDa eine neue Bande zu erkennen (Pfeil in Abbildung 17). Diese stimmt mit der Größe des Proteins überein, für welches die mRNA hinzugefügt wurde.

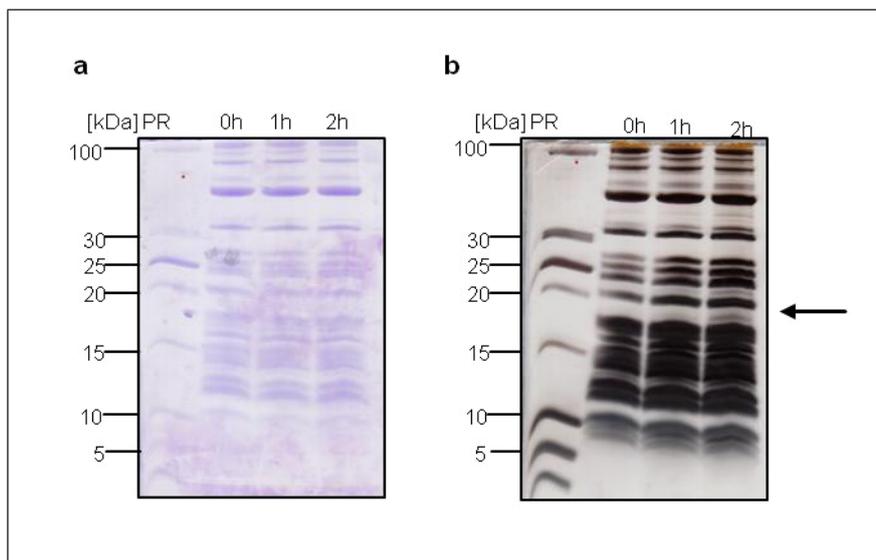


Abbildung 17 Proteinnachweis mittels Coomassie- und Silberfärbung. *In vitro* Translation mit PURExpress Kit von NEB und selbst transkribierter mRNA für das Gen *ydbH*. Proben wurden nach 0h, 1h und 2h Inkubation bei 37°C auf das Gel aufgetragen und zunächst mit Coomassie gefärbt (a), und anschließend mit Silberfärbung behandelt. (b). Der Pfeil rechts zeigt auf das neu synthetisierte Protein nach 2 Stunden.

Die Herstellung des *in vitro* Translationslysates aus *E. coli* (Abbildung 14,1) für ein kostengünstiges *up-scaling* erfolgte aus Stämmen, welche jeweils ein nicht essentielles ribosomales Protein deletiert hatten (Tabelle 14). Somit besteht die Möglichkeit, 50S Ribosomen im Lysat zu markieren und sie aus dem Lysat zu entfernen (Abbildung 14, 2). Die Δ Protein Stämme (Δ S6, Δ L9 und Δ L33) wurden aus der *Keio collection* (Baba *et al.* 2006) käuflich erworben, sowie ein Δ S13 *E. coli* Stamm von dem Rachel Green Labor gestellt (Cukras and Green 2005). Das Entfernen der ribosomalen Untereinheiten erfolgt über die Markierung des deletierten Proteins plasmidisch mit einem N-terminalen His-Tag (siehe 3.1.17). Die N-terminale

Position des His-Tags wurde mit Hilfe des Programmes Pymol ausgewählt. Hier ist es möglich, die komplette Ribosomenstruktur zu betrachten und einzelne Proteine oder rRNAs im Detail hervorzuheben. Für alle Proteine wurde der N-Terminus als geeignet befunden, da er näher an der Oberfläche des Ribosoms ist als der C-Terminus. Mit den vier Deletions-Mutanten ergeben sich für jede ribosomale Untereinheit jeweils zwei Möglichkeiten, um die Untereinheit aus einem Lysat zu entfernen. Zunächst wurde der Versuch in *E. coli* Δ L33 mit L33-His-Tag durchgeführt. Abbildung 18 zeigt die Fraktionen der Affinitätschromatographie zur Isolation der 50S Ribosomen aus dem Lysat. Das Lysat wurde auf eine Ni-NTA Säule gegeben und Proben vom Lysat (L), Durchfluss (FT), der Waschschrte 1 und 2 (W1, W2) sowie die Elutionsfraktionen (E1-3) wurden mittels Proteingel (Abbildung 18a) und nach der Fällung der RNA mit Hilfe eines RNA-Gels (Abbildung 18b) analysiert. Für das Proteingel ist eine Aussage sehr schwierig, da in dem kompletten Lysat viele Proteine enthalten sind, welche die Zuordnung erschweren. Die letzte Spur enthält aufgereinigte 50S Untereinheiten. Wenn auch in den Elutionsfraktionen die Proteine der 50S identifiziert werden können, so ist es dennoch nicht möglich zu verifizieren, ob der Durchfluss diese Proteine nicht mehr enthält. Hierbei hilft das RNA-Gel. Es konnte gezeigt werden, dass die 50S Untereinheit spezifisch an das Säulenmaterial gebunden hat und eluiert werden kann (siehe Abbildung 18b E1-E3). Im Durchfluss (FT) kann jedoch noch 23S rRNA auf der Höhe von 3000 Basen nachgewiesen werden, somit ist noch keine komplette Isolation und Entfernung der 50S Untereinheit aus dem S30 Lysat möglich.

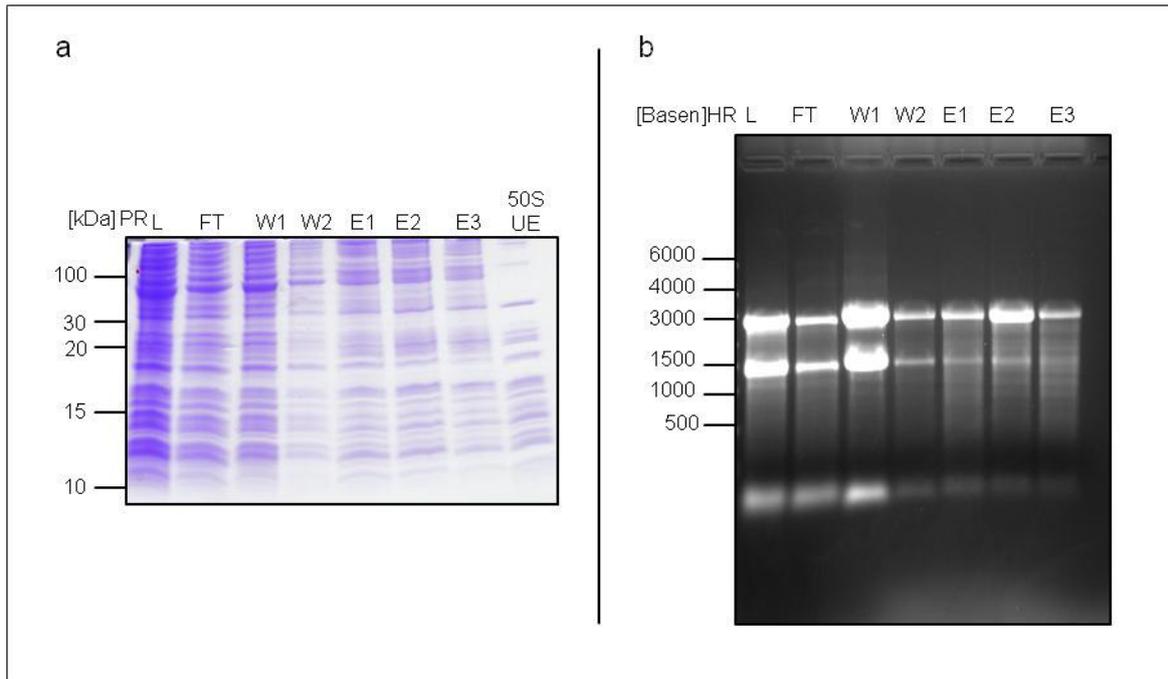


Abbildung 18 50S Untereinheit Isolation aus S30 Lysat mittels His-Tag markiertem L33. Nach der Ni-NTA Aufreinigung von S30 Lysat aus Δ L33 *E. coli* +L33-Hisx6 wurden das Lysat (L), der Durchfluss (FT), die Waschschrte (W1, W2) und die Elutionen (E1, E2 und E3) auf ein SDS Gel aufgetragen (a) mit zusätzlich aufgereinigter 50S Untereinheit für den Bandenabgleich der ribosomalen Proteine aus der 50S Untereinheit. Sowie aus den Proben der Affinitätsaufreinigung RNA Isoliert wurde und mittels RNA-Agarosegel aufgetrennt wurde (b).

Für selbst hergestelltes S30 Lysat bietet sich der Nachweis von neu exprimierten Proteinen mittels Proteingelen nicht an, da zu viele Banden kein auswertbares Ergebnis ermöglichen. Um dennoch nachweisen zu können, dass auch mit S30 Lysat die transkribierte mRNA translatiert wurde, ist mittels GFP und Fluoreszenzmessung ein *proof of principal* Experiment durchgeführt worden. Entsprechende Sequenzen, welche GFP in *E. coli* codieren (pJOE4056.2) stellte die AG Siemann-Herzberg zur Verfügung (Failmezger *et al.* 2017). Für den Nachweis der funktionalen Translation von GFP im *in vitro* Translationslysat wurden verschiedene Ansätze gewählt (Abbildung 19). Die transkribierte mRNA wurde zum einen mit Hilfe des miRNA-Kits (Machery-Nagel) aufgereinigt, zum anderen wurde der *in vitro* Translation zusätzlich T7 RNA-Polymerase hinzugegeben. In einem Ansatz wurde die transkribierte mRNA direkt aus der *in vitro* Transkription eingesetzt. Ein weiterer Ansatz wurde gewählt, in welchem linearisierte DNA mit T7 Polymerase eingesetzt wurde um eine gekoppelte Transkription und Translation zu ermöglichen (Failmezger *et al.* 2016). Als Negativkontrolle wurde ein Ansatz mitgeführt, welcher keine mRNA oder DNA enthielt und somit kein GFP exprimieren konnte. Alle der getesteten *in vitro* Translationsansätze zeigen ein relatives Fluoreszenzsignal, welches sich vom Hintergrundsignal der Negativkontrolle abhebt (Abbildung 19). Für die aufgereinigte

mRNA ließ sich das beste Ergebnis erzielen. Als allgemeine Kontrolle, dass bei der angeregten Wellenlänge GFP gemessen wird, wurde *E. coli* Zelllysat einer GFP-markierten Protein Überproduktion in verschiedenen Verdünnungen mit gemessen.

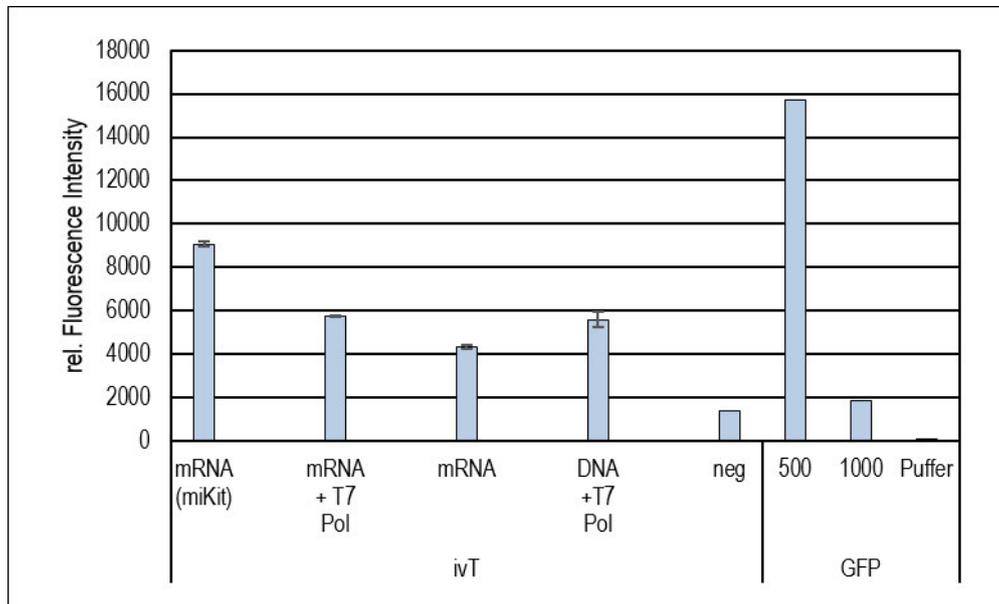


Abbildung 19 GFP-Nachweis nach *in vitro* Translation mittels S30 Lysat. Für die *in vitro* Translation wurden unterschiedliche mRNA Aufreinigungs-Methoden gewählt. Ganz links im Diagramm ist die Reaktion mit mRNA aus dem miKit von Machery-Nagel gezeigt. Die zweite Position zeigt das GFP-Signal einer *in vitro* Translation mit mRNA und zusätzlicher T7 RNA Polymerase. Die dritte Position die Fluoreszenzintensität von mRNA, welche aus der *in vitro* Transkription, ohne Aufreinigung, hinzugefügt wurde. Die vierte Position stellt linearisierte DNA mit T7-RNA Polymerase im S30 Lysat und die fünfte Position stellt S30 Lysat ohne Template als negativ Kontrolle dar. Die drei Positionen auf der rechten Seite zeigen verdünntes 1:500 und 1:1000 GFP, welches mit *E. coli* überproduziert wurde sowie den Puffer ohne GFP.

Nachdem funktionales *in vitro* S30 Lysat und mRNA hergestellt wurden, folgt im Versuchsablauf (Abbildung 14, 6) der nächste Schritt: der Start der Translation durch Zugabe von 50S ribosomaler Untereinheit. Dafür wurden Ribosomen isoliert und in ihre Untereinheiten mittels Dichtegradient aufgetrennt. Die Isolation aus *E. coli* erfolgte in Puffern mit niedrigem Mg^{2+} -Gehalt, um eine Dissoziation der Untereinheiten zu erhalten. Die Trennung der ribosomalen Untereinheiten erfolgt mittels Dichtegradienten (Succrose 10-30% (v/v)) und anschließender Fraktionierung. Abbildung 20 zeigt beispielhaft Ribosomenprofile von Ribosomen aus Komplexmedium (a). Für den Nachweis der korrekten Trennung und Intaktheit der ribosomalen Untereinheiten wurden zum einen Fraktionen der einzelnen Peaks mittels Phenol-Chloroform gefällt und auf einem RNA-Agarosegel analysiert (c) sowie die Fraktionen auf ein SDS-Gel aufgetragen, um die Proteinbanden mit Ergebnissen der Literatur abzugleichen (d). Alle Ergebnisse weisen auf vollständige und komplett voneinander getrennte ribosomale Untereinheiten hin.

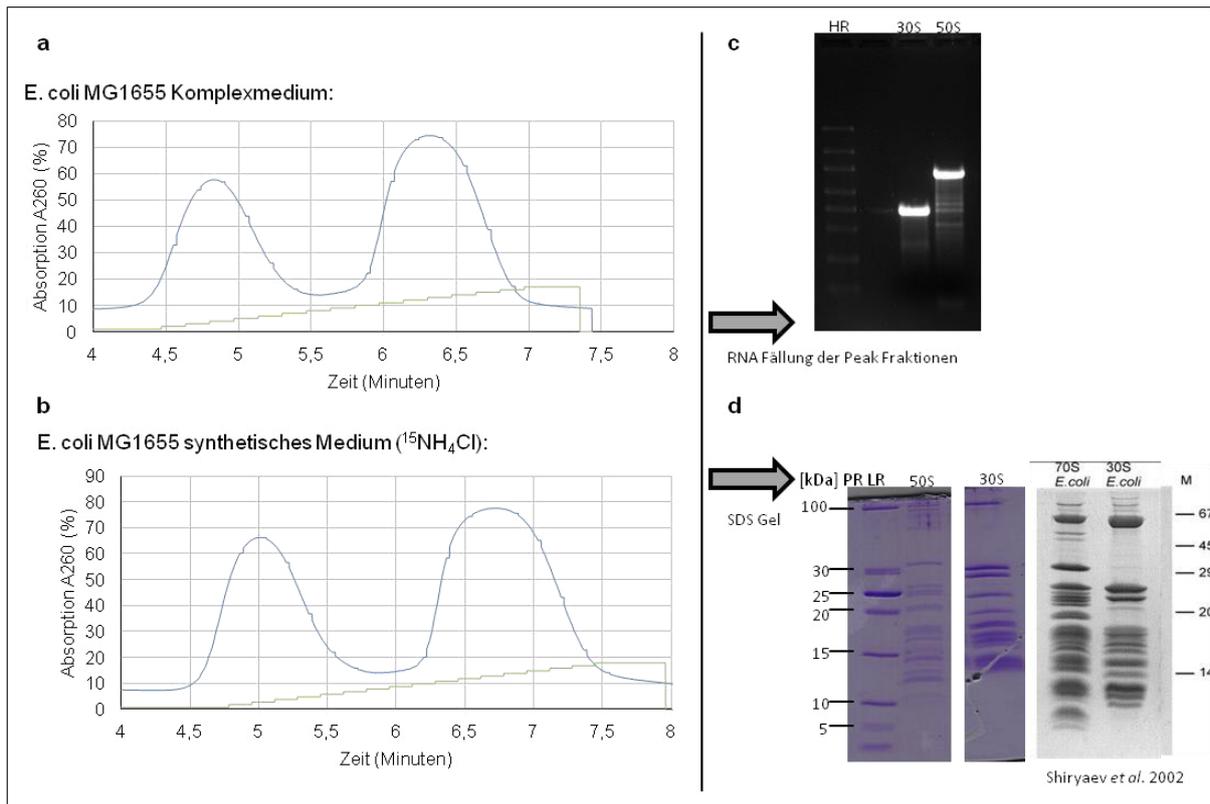


Abbildung 20 Ribosomenprofile mit Verifizierung mittels RNA-Agarosegel und Proteingel. **a.** Ribosomenprofil von *E. coli* MG1655 Zellen in Komplexmedium. 200µg gesamt RNA wurden auf einem 10-30 % (v/v) Succrose Gradienten fraktioniert. **b.** Ribosomenprofil von *E. coli* MG1655 Zellen in synthetischem M9-Medium mit $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ als Stickstoffquelle. 200µg gesamt-RNA wurden auf einem 10-30 % (v/v) Succrose Gradienten fraktioniert. **c.** Phenol-Chloroform gefällte Fraktionen des 30S Peaks (bei 5 Minuten) und des 50S Peaks (bei 6,5 Minuten) auf einem RNA-Agarosegel. **d.** Coomassie gefärbtes SDS Gel mit den 50S und 30S Fraktionen verglichen mit Werten der Literatur von (Shiryayev *et al.* 2002).

Um sicherzustellen, dass isolierte Ribosomen noch funktional sind, wurden sie dem PURExpress Kit von NEB, in einer *in vitro* Translation von der mitgelieferten Positivkontrolle von *dhfr* mRNA, hinzugefügt. In Abbildung 21 ist der Vergleich der Translation ohne und mit zusätzlichen selbst isolierten Ribosomen zu sehen. Abbildung 21a zeigt die Proben auf einem Proteingel und der Pfeil deutet auf die Bande des neu produzierten Proteins hin. Durch die Quantifizierung der Bandenintensität (mit ImageJ) auf Pfeilhöhe (Abbildung 21b) zeigt sich, dass nach der Zugabe von isolierten 30S und 50S Untereinheiten die Menge an gebildetem Protein erhöht ist. Die isolierten, hinzugefügten Ribosomen in der Reaktion sind also in der Lage, mRNA zu translatieren.

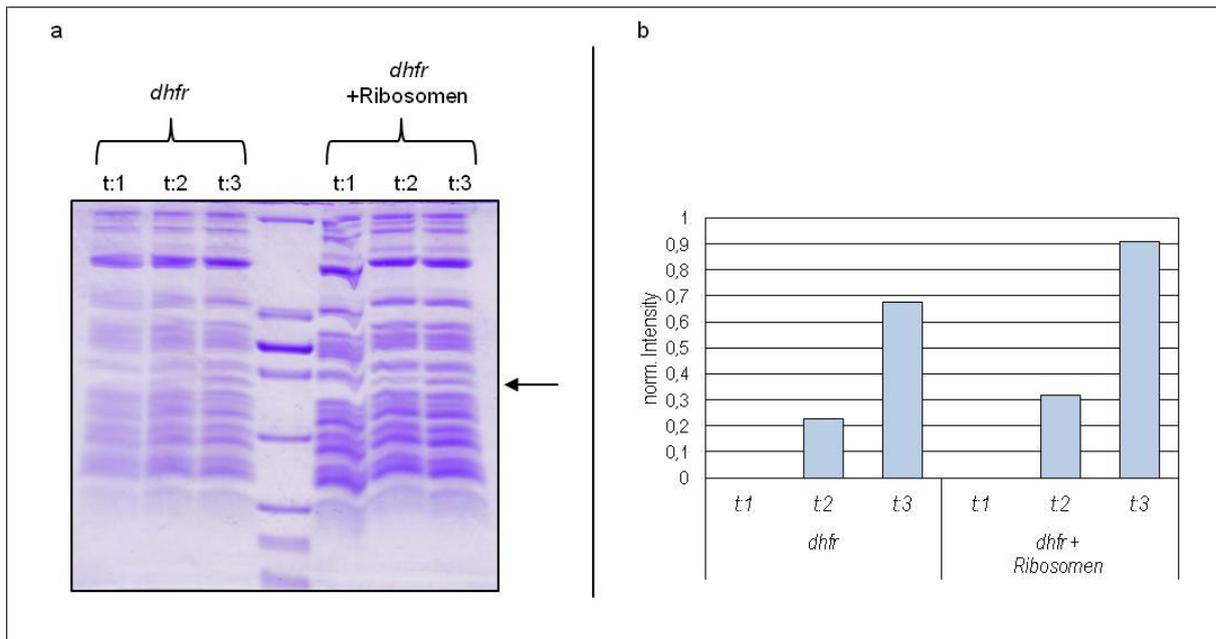


Abbildung 21 Test der Ribosomenfunktionalität. NEB PurExpress *in vitro* Translations-Kit mit *dhfr* mRNA als Positivkontrolle. Einmal nach Herstellerangaben und einmal mit zusätzlich hinzugefügten isolierten Ribosomen. **a.** zeigt ein Coomassie gefärbtes SDS Gel mit den *in vitro* Translations-Proben jeweils zu den Zeitpunkten t:1 nach 0h, t:2 nach 1h und t:3 nach 2h. Der Pfeil zeigt auf die neu synthetisierte Proteinbande im Gel. **b.** Die Intensität der Dhfr Banden quantifiziert mit ImageJ für das Kit nach Hersteller Angaben (links) und mit hinzugefügten Ribosomen (rechts). Die Intensität des Hintergrundes t:1 wurde jeweils abgezogen.

Nachdem die *in vitro* Translation gestartet ist, sollen in großem Überschuss markierte ribosomale Untereinheiten der Reaktion hinzugefügt. Hierfür wurden Ribosomen aus Kulturen mit schwerem Stickstoff (^{15}N) isoliert (Abbildung 14, 7a). Die Zellen werden dafür in Minimalmedium mit $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ angezogen und die Ribosomen mittels Dichtegradienten in ihre Untereinheiten aufgetrennt (Abbildung 20b). Für eine korrekte und vollständige Markierung der Ribosomen wurden die isolierten Untereinheiten mit ^{14}N und ^{15}N mittels Massenspektrometrie in der Gruppe von Julian Langer (MPI für Biophysik, Frankfurt am Main) untersucht und verglichen. In Abbildung 22 ist für jeweils 50S Untereinheiten ein Massenspektrum zu sehen. Abbildung 22a: zeigt die unmarkierten Untereinheiten und Abbildung 22b. die 50S Untereinheiten, welche mit ^{15}N markiert wurden. Es ist zu erkennen, dass die Massenpeaks sich jeweils nach rechts verschoben haben und demnach schwerer sind. Der Einbau des schweren Stickstoffs konnte somit verifiziert werden.

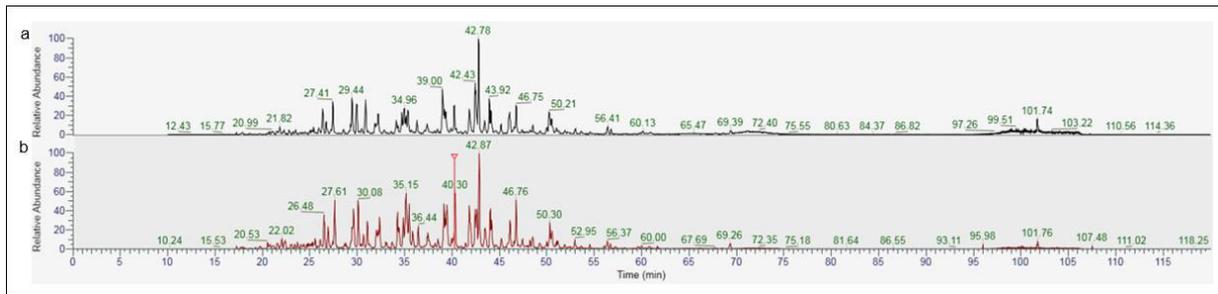


Abbildung 22 Massenspektrum der 50S Untereinheiten. Schwere (^{15}N) und leichte isolierte Ribosomen wurden zur Massenspektrometrie gegeben. **a.** Zeigt die Massenpeaks für 50S Untereinheiten mit ^{14}N . **b.** zeigt die Peaks für ^{15}N markierte 50S Ribosomen, welche alle nach rechts verschoben und somit schwerer sind.

Eine weitere Möglichkeit ribosomale Untereinheiten zu markieren und voneinander unterscheiden zu können, ist die Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen (Abbildung 14, 5b und 7b). Hierfür wurden im Zuge dieser Arbeit Plasmide konstruiert, welche die deletierten ribosomalen Proteine aus den Δ Proteinstämmen (S6, S13, L9 und L33) enthalten. Die Sequenzen der Proteine wurden jedoch mittels *site directed mutagenesis* so verändert, dass jeweils nur ein Cystein an einer definierten Stelle vorhanden ist. Die definierte Position wurde mittels Pymol Strukturanalysen bestimmt. Zusätzlich besitzen alle einen His-Tag, um die Überproduktion und Aufreinigung der Proteine zu ermöglichen. Zu reinem Protein kann Thiol-Fluoreszenz-Farbstoff gegeben werden. Dieser lagert sich spezifisch an die SH Gruppe des Cysteins an und markiert somit das Protein. Diese markierten ribosomalen Proteine können zu aufgereinigten Ribosomen, welchen das besagte Protein fehlt, gegeben werden und ein Zusammenfügen von ribosomalen Protein und Ribosom wird erwartet (Ermolenko *et al.* 2007).

Für den Versuchsablauf aus Abbildung 14 wurden dementsprechend alle Komponenten hergestellt, wenn auch einige Schritte noch Optimierung benötigen. Nach dem Starten der Reaktion kann ein Überschuss an markierten, isolierten ribosomalen Untereinheiten hinzugefügt werden (Abbildung 14, 8). Um zu verhindern, dass Ribosomen mehrfach im Verlauf der Reaktion am 5'-Ende der mRNA die Translation initiieren, wurde eine RNA konstruiert, welche 4 SD Motive besitzt, ohne Start-Codon in passendem Abstand dahinter (schematische Darstellung in Abbildung 23). Diese mRNA codiert für poly-(α -L-Glutaminsäure) (PLGA) und besitzt viermal eine SD Sequenz, welche mit bis zu 7 Nukleotiden mit der 16S rRNA wechselwirken kann. Aufgrund der nicht vorhandenen Start-Codons ist jedoch an keiner der vier SD Sequenzen eine Translations-Initiation möglich. Nachweislich binden 30S Ribosomen an diese mRNA, sie nicht in der Lage die Translation zu

starten und werden so aus der Reaktion für die Translation unfähig gemacht (Mawn *et al.* 2002).

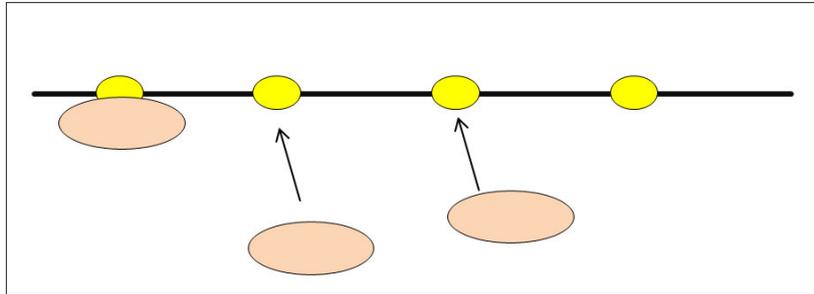


Abbildung 23 Schematischer Aufbau einer PLGA (poly-(α -L-Glutaminsäure)-mRNA nach (Mawn *et al.* 2002). Schematische Darstellung einer PLGA mRNA zum entfernen überschüssiger 30S Ribosomen (Hellrot) durch SD Motive (Gelb) ohne passendes Startcodon stromabwärts.

Die Translation erfolgt dann für die unterschiedlichen Kontrollen (Abbildung 16) und im Falle eines bicistronischen Transkripts kann es zu einem Austausch der 50S Untereinheit kommen (Abbildung 14, 9). Nach Ablauf der Reaktion können Komplexe aufgereinigt werden, welche aus mRNA, 70S Ribosom und His-Tag-markiertem Protein bestehen (Abbildung 14, 10). Für die Unterscheidung der 50S Untereinheiten kann dann im Falle der ^{15}N markierten Ribosomen eine Massenspektrometrie durchgeführt (Abbildung 14, 11), oder aber im Falle der Fluoreszenzmarkierung kann im Fluoreszenzphotometer die Markierung analysiert werden.

V. Diskussion

1. Gekoppelte Translation an überlappenden Genpaaren in Archaea und Bacteria

In Prokaryoten sind überlappende Genpaare weit verbreitet. Die Analyse von 198 prokaryotischen Genomen hat gezeigt, dass überlappende Genpaare in allen mikrobiellen Genomen vorkommen. Es wird daher angenommen, dass die mögliche Translationskopplung an überlappenden Genpaaren vermeidet, dass komplexere Regulationswege benötigt werden. Somit werden weniger Regulations-Faktoren als Gene oder Proteine benötigt und die Sequenz-Konservierung wird dadurch indirekt beeinflusst. (Johnson and Chisholm 2004). Gene, welche auf einer polycistronischen mRNA codiert vorliegen, gelten als gekoppelt translatiert, wenn die Translation des stromaufwärts-liegenden Gens für die Translation des stromabwärts-liegenden Gens essentiell ist. Bei einer Translationskopplung mit hoher Effizienz folgt daraus, dass die translatierten Proteine in gleicher Konzentration vorhanden sind. Das hat mehrere Vorteile: Zum Beispiel, wenn es sich bei den Proteinen um Toxin und Antitoxin handelt. Das Toxin wird nicht alleine produziert und eine mögliche Schädigung der Zelle durch verlangsamte Produktion des Antitoxins wird verhindert. Ein weiteres Beispiel sind Proteine, welche für den Transport an die richtige Stelle in der Zelle oder für die korrekte Faltung ein unterstützendes Protein benötigen. Ein drittes Beispiel ist ein Komplex aus einer regulatorischen und enzymatischen Einheit, welche allein Energie verbrauchen würde ohne reguliert zu werden. Für alle Beispiele bietet sich eine hoch regulierte 1:1 Bildung der Proteine an, welche durch eine Translationskopplung gewährleistet sein kann. In dieser Arbeit wurden überlappende Genpaare aus *H. volcanii* und *E. coli* auf eine Translationskopplung hin untersucht. Die beiden Modellorganismen wurden als Vertreter der Archaea und Bakterien gewählt um eine Erkenntnis über beide prokaryotische Domänen zu erhalten. Die neun untersuchten Genpaare von *H. volcanii* enthielten sechs überlappende Genpaare, mit einem Überlapp von vier Nukleotiden (**ATGA**), eins mit einem Überlapp von einem Nukleotid (**TGATG**) und ein weiteres mit einem Nukleotid zwischen Stop-Codon und Start-Codon (**TGAX**ATG****). Eine Ausnahme mit zehn Nukleotiden zwischen den Genen (**TGAX₁₀**ATG****) wurde für *H. volcanii* ebenfalls untersucht. Für *E. coli* wurden fünf Genpaare mit einem Überlapp von vier Nukleotiden (**ATGA**) ausgewählt. In alle Konstrukte wurde ein prämaures Stop-

Codon eingebracht (schematisch dargestellt in Abbildung 5a und Abbildung 7a), welches zu unterscheiden erlaubte, ob es sich um eine gekoppelte Translation oder um eine unabhängige *de novo*-Initiation am stromabwärts-liegenden Gen handelt. Für die Berechnung einer Translationseffizienz wurde jeweils die Enzymaktivität sowie das Transkriptlevel quantifiziert. Es kann also eine Translation von Enzymaktivität / Transkriptmenge berechnet werden. Dass es besonders wichtig ist, auch das Transkriptlevel in Betracht zu ziehen, konnte bei einer Studie gezeigt werden, welche unterschiedliche 5'-UTRs vor Reporter genen in *E. coli* analysiert. Diese zeigt, dass wenn das Transkript nur mäßig translatiert wird, die Stabilität der mRNA herabgesetzt wird (Wegener *et al.* 2016).

Für *H. volcanii* konnten für die Konstruktion der Reporter gen-Plasmide jeweils die kompletten Gensequenzen verwendet werden, da diese auch, im Gegensatz zu *E. coli* Genen, auf RNA-Ebene mit langen nicht translatierten Bereichen stabil waren. Neun untersuchte *H. volcanii* Genpaare zeigen bei eingebrachten prämaternen Stop-Codons, verglichen mit der nativen Sequenz, dasselbe Ergebnis. Ist das Ribosom nicht in der Lage den Überlapp zu erreichen, so findet keine Translation des stromabwärts-liegenden Reporters (*dhfr*) statt. Dies ist in Abbildung 5 gezeigt für sowohl überlappende Gene (b) als auch für Fusionen welche einen **ATGA**-Überlapp von Gen *x* mit dem Reporter *dhfr* besitzen (d). Es ist somit deutlich, dass in diesen getesteten Beispielen eine gekoppelte Translation stattfindet, welche strikt von der Translation des stromaufwärts-liegenden Gens abhängt. Zum jetzigen Stand ist das die erste Studie zum Nachweis einer Translationskopplung in Archaea. In *H. volcanii* liegen 433 Genpaare vor, welche einen Überlapp von einem oder vier Nukleotiden besitzen (Kramer *et al.* 2014). Das weist darauf hin, dass mehr als 10% aller *H. volcanii* Gene mittels Termination-Reinitiation translatiert werden können.

Die Translationskopplung in Bakterien war zuerst genetisch untersucht worden, indem *Nonsense*-Mutationen im stromaufwärts-liegenden Gen zur Translations-Unterdrückung des stromabwärts-liegenden Gens führten. Für das Tryptophan-Operon konnte hier bereits gezeigt werden, dass der Überlapp von einem Nukleotid zwischen Start- und Stop-Codon (**TGATG**) bei den Genen *trpE* und *trpD* zu einer gekoppelten Translation führt, während der Abstand von elf Nukleotiden zwischen *trpC* und *trpB* auf der gleichen mRNA keine Art der Kopplung zeigt (Oppenheim and Yanofsky 1980). Das Vorkommen von Reinitiation an polycistronischer mRNA ist ein,

in Bakterien, schon seit 1982 postulierter Mechanismus, welcher bis heute weiter in zahlreichen Studien untersucht wurde (Schümperli *et al.* 1982; Baughman and Nomura 1983; Aksoy, Squires, and Squires 1984; Petersen 1989; Chiaruttini *et al.* 1996; Heurgu and Champ 2002; Levin-Karp *et al.* 2013; Tian and Salis 2015). In dieser Arbeit wurde jedoch erstmals an nativen *E. coli* Genen eine Translationseffizienz untersucht, während vorherige Arbeiten häufig eukaryontische Gene (Fukuhara and Universitaire 1982) oder Phagen Gene (Adhin and van Duin 1990; Inokuchi *et al.* 2000; Yoo and RajBhandary 2008) verwendet haben, sowie das Transkriptlevel außer Acht gelassen wurde (Hellmuth *et al.* 1991; Bird 1980; Van Himbergen, Van Geffen, and van Duin 1993). Die fünf untersuchten Genpaare sind auf eine Länge von 99 Nukleotiden von Gen *x* und 30 Nukleotiden von Gen *y* verkürzt worden, da die Transkriptstabilität in *E. coli* für nicht translatierte mRNAs sehr gering ist (Selinger *et al.* 2003). Mit dieser Gen-Länge ist eine Translationskopplung über lang-reichende Interaktionen nicht mehr möglich und die gezeigten Ergebnisse in Abbildung 7c sprechen für eine Kopplung via Termination-Reinitiation, da die Translationseffizienz für den stromabwärts-fusionierten Reporter abnimmt sobald ein prämaures Stop-Codon eingebracht wurde. Außer bei dem Genpaar *bioB/bioF*, bei welchem kein Effekt nach Einbringen eines prämauren Stop-Codons zu sehen ist. Hier kann davon ausgegangen werden, dass nativ eine Kopplung mittels UTNI Mechanismus stattfindet, für welchen lang-reichende Sequenzen zur Ausbildung von Wechselwirkungen notwendig sind, welche in diesem Modell fehlen. Oder aber an dieser Stelle findet keine Art der Kopplung statt. Die Charakterisierung von 14 Genpaaren hat zusammenfassend gezeigt, dass in beiden Modellorganismen für Archaea und Bacteria eine strikte Kopplung der Translation via Termination-Reinitiation stattfindet und somit die evolutionäre Selektion von überlappenden Genpaaren bestimmt wird. Die Daten dieser Arbeit (Abbildung 5 und Abbildung 7) beweisen, dass der Überlapp an Genpaaren von dem stromaufwärts translatierenden Ribosomen erreicht werden muss, um eine Translationseffizienz des nächsten Gens nachweisen zu können. Somit muss zumindest ein Teil des Ribosoms (mindestens die 30S Untereinheit), welches das stromaufwärts-liegende Gen translatiert an der Translation des stromabwärts-liegenden Gens beteiligt sein. In einer kürzlich publizierten Arbeit von Saito *et al.* 2020 wird diese Erkenntnis jedoch für *E. coli* in Frage gestellt. Durch den *knock-down* des Ribosomen Recycling Faktors (RRF) in *E. coli* konnte gezeigt werden, dass die Reinitiation von gekoppelt

translatierten Genpaaren nicht beeinflusst wird. Würde wie von Adhin und van Duin angenommen nur die 30S Untereinheit an der mRNA bleiben, müsste durch den Verlust des RRF die Expression des stromabwärts-liegenden Gens reduziert sein. Das kann mit den Daten aus Abbildung 5 und 7 jedoch nicht gezeigt werden da sich ohne prämaures Stop-Codon die Translationseffizienz des stromabwärts-liegenden Reporters ähnlich verhält zu dem stromaufwärts-liegenden Reporter. Bleibt bei der Reinitiation das 70S Ribosom bestehen wie von Yamamoto *et al.* 2016 beschrieben, sollte die Expression des stromabwärts-liegenden Gens erhöht sein, durch den Verlust der RRF Aktivität (Saito *et al.* 2020). Auch dieses Ergebnis kann mit den Ergebnissen in Abbildung 5 und 7 nicht gezeigt werden. Der genaue Mechanismus der Termination-Reinitiation, wie er aus dem Ergebnissen dieser Arbeit hervorgeht, wird später noch betrachtet. Zunächst wird jedoch betrachtet wie sich intragene SD Sequenzen auf die untersuchte Translations-Kopplung auswirken.

2. Intergene SD Sequenzen und deren Funktion in der Termination-Reinitiation

Die SD Sequenz ist ein kurzes Motiv, welches die Translations-Initiation durch die direkte Basenpaarung mit der anti-Shine-Dalgarno Sequenz (aSD) auf der 16S rRNA einleitet (Shine und Dalgarno, 1974). Während die Rolle der SD Sequenz in Bezug auf die Translations-Initiation in Bakterien für Jahrzehnte untersucht wurde (de Smit and van Duin 1990; Barrick *et al.* 1994; Chen *et al.* 1994) konnte gezeigt werden, dass in Archaea zum Beispiel in *Sulfolobus solfataricus* mit 69% (Wurtzel *et al.* 2010) und für *H. volcanii* mit 72% (Babski *et al.* 2016) Transkripte ohne 5'-UTR und somit ohne SD Sequenz vertreten sind. Das sind zwei Repräsentanten der Crenarchaeota I und Haloarchaea, welche vermuten lassen, dass SD Sequenzen in Archaea bei der Translations-Initiation keine wichtige Rolle spielen. Für *H. volcanii* konnte diese Vermutung bereits experimentell bestätigt werden (Kramer *et al.* 2014). Für die Modellorganismen *H. volcanii* und *E. coli* konnte jedoch in den analysierten Genpaaren dieser Arbeit eine intragene SD Sequenz gefunden werden, welche im passenden Abstand zum Start-Codon des stromabwärts-liegenden Gens, mit der optimalen Länge von 6 ± 2 Nukleotiden vorliegen (Vimberg *et al.* 2007). Für viele bakterielle Spezies wurde gezeigt, dass SD Sequenzen innerhalb proteincodierender Gene vorliegen (Diwan and Agashe 2016; Umu *et al.* 2016; Yang *et al.* 2016). Bisher ist über die Funktion dieser wenig bekannt. Bei der Sequenz-Konservierung-Analyse

von Hockenberry *et al.*, 2018, stellte sich heraus das intragene SD Sequenzen vor *downstream* Genen in Multigen-Operons der analysierten Enterobacteriales hochkonserviert sind. Demnach ist eine Funktion dieser sehr wahrscheinlich, da die Sequenzen evolutionär beibehalten wurden. Li *et al.* 2012 schlagen für SD Sequenzen innerhalb einer proteincodierten Sequenz vor, dass diese als Regulation der Translations-Geschwindigkeit genutzt werden können, indem die mRNA an die ribosomale Untereinheit bindet und diese so am Vorangehen zum folgenden Codon hindert. Dass solche Translations-Pausen entstehen, konnte mit einigen *Ribosome-Profiling*-Arbeiten bereits unterstützt werden (Li *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2013). Passend dazu, wurde die Funktion einer SD Sequenz in einem Termination-Reinitiations-Ereignis an überlappenden Genpaaren, ähnlich den TURBS in eukaryontischen Viren, gemutmaßt (Powell *et al.* 2011; Powell 2010). Das heißt, es wird angenommen, dass die SD Sequenz dabei hilft die Ribosomen an der mRNA zu halten, wenn die Translation an Gen *x* terminiert und bevor eine Reinitiation an Gen *y* stattfinden kann. Die genaue Bedeutung dieser Sequenz-Motive wurde für sieben Genpaare aus *H. volcanii* und für fünf Genpaare aus *E. coli* untersucht. Hierfür wurden die iSD Sequenzen zu einer Sequenz mutiert, welche nicht mit der SD konsensus Sequenz übereinstimmt. Die Analyse von mutierten SD Motiven zeigt, dass die Translationseffizienzen der stromabwärts-liegenden Gene variieren. Es ist kein einheitliches Ergebnis für alle untersuchten Genpaare in *H. volcanii* zu erkennen (Abbildung 6). Durch die Veränderung der SD Motive sind bei den Konstrukten, welche mit den Genen *x/y* an die *dhfr* fusioniert sind, Abnahmen von 50% (*ureBC*), 60% (*a.b.P.hom1*) und 20% (*rpl5/rps15*) gezeigt, sowie eine Zunahme der Translationseffizienz (*rpl30/rpl15*) um 70%. Die Fusionen von Gen *x* mit dem Reporter gen *dhfr* zu einem **ATGA**-Überlapp zeigen Abnahmen der Translationseffizienz von 70% (*glnP*), 20% (*cna*) und 80% (*HVO_0685*). Somit haben intragene SD Sequenzen einen Einfluss auf die Termination-Reinitiation, dieser ist jedoch für jedes Genpaar variabel. Für *E. coli* konnte ein ähnliches Muster gezeigt werden (Abbildung 8). Nach der Veränderung der SD Motive kam es hier zu Abnahmen von 70% (*hyfH/hyfI*), 90% (*astD/astB*), 100% (*ydbH/ynbE*) sowie 65% (*menD/menH*). In einem Fall (*bioB/bioF*) kann durch die veränderte SD Sequenz kein Effekt gezeigt werden. Dieses Genpaar hat zum einen nur eine sehr schwache SD Sequenz (siehe Tabelle 57) und zeigte auch keine Kopplung durch Termination-Reinitiation (Abbildung 7c). Für die restlichen Genpaare wird jedoch gezeigt, dass die

SD Sequenz einen Effekt auf die Translationskopplung durch Termination-Reinitiation hat. Wie auch schon bei *H. volcanii*, ist dieser jedoch für jedes analysierte Genpaar in *E. coli* variabel. In dem biophysikalischen Modell von Tian and Salis 2015 wird gezeigt, dass das Vorhandensein von SD Sequenzen innerhalb überlappender Gene für die Reinitiation der Translation nicht benötigt wird. Auch für die *de novo* Translations-Initiation konnte eine kürzlich publizierte Studie für *E. coli* zeigen, dass mutierte aSD-Sequenzen in der 16S rRNA nicht dazu führen, dass Ribosomen bei der Translations-Initiation an der falschen Stelle initiieren. Die Ribosomen sind trotz der nicht mehr möglichen Wechselwirkung mit der SD Sequenz an der mRNA in der Lage, korrekte Translations-Initiationscodons zu finden (Saito, Green, and Buskirk 2020). Statt der SD Motive wurde alternativ postuliert, dass lokale mRNA-Strukturen sowie Faltungs-Kinetiken eine Rolle spielen bei der Rekrutierung der Ribosomen zur Startstelle. Durch die Mutation der SD Sequenzen in dieser Arbeit ist es möglich, dass die Strukturen der mRNA an dieser Stelle verändert wurden und dadurch die Bindungsmöglichkeiten der Ribosomen herabgesetzt werden. Wie in zahlreichen Translations-Initiations-Studien bereits gezeigt wurde, steht die Sekundärstruktur der mRNA im Bereich der Initiationsstelle in Korrelation mit dem Protein-Level der fusionierten Reportergene (Salis, Mirskwy, and Voigt 2009; Kudla et al. 2009; Goodman, Church, and Kosuri 2013). Jedoch kann das mit den Versuchen dieser Arbeit nicht verglichen werden, da die Translationskopplung an den Genpaaren bewiesen ist und eine *de novo*-Initiation ausgeschlossen werden kann. Mögliche Sekundärstrukturen durch langreichende Wechselwirkung können bei den erhaltenen Ergebnissen aufgrund der erstellten Konstrukte keine Rolle spielen. Eine Kopplung ist hier trotz mutierter SD Sequenz in den meisten Fällen noch möglich. Bis auf zwei Ausnahmen (*rpl30/rpl15* in Abbildung 6 und *bioB/bioF* in Abbildung 8) wird gezeigt, dass es zu einer Abnahme der Translationseffizienz ohne SD Motiv führt. Der genaue Mechanismus und die Funktion der Motive kann zum jetzigen Zeitpunkt allerdings noch nicht eindeutig geklärt werden.

Die experimentellen Daten zu SD Sequenzen innerhalb überlappender Genpaare wurden durch die bioinformatische Analyse von 720 annotierten prokaryotischen Genomen unterstützt. Durchgeführt wurden diese von Eugene Koonins Gruppe aus dem National Institute of Health (NIH in Bethesda, USA). Die untersuchten Genome wurden für eine bessere Darstellungsmöglichkeit in 24 Gruppen eingeteilt. Alle

Gruppen besitzen überlappende co-direktionale Genpaare mit intragenen SD Sequenzen in relativ hohen Anteilen (siehe Abbildung 9a). Diese ermöglichen zwar generell eine gekoppelte Translation, bisher wurden jedoch nur wenige weitere Spezies experimentell auf eine solche Translationskopplung untersucht. Eine Studie zu einem Genpaar des Archaeon *Sulfolobus Solfataricus* zeigt zum Beispiel die Analyse eines *in vitro*-Translations-Assay. Das untersuchte Genpaar hat aufeinanderfolgende Stop-Start-Codons (UGAGUG) sowie ein SD Motiv in dem stromaufwärts-liegenden Gen. Durch die Analyse von Mutanten konnte hier gezeigt werden, dass die Translation nicht gekoppelt abläuft (Condo, Ciammaruconi, and Benelli 1999). Für eine Aussage darüber, welche Gruppen in Prokaryoten Genüberlapp zur Translationskopplung nutzen, sind selbstverständlich weitere Studien notwendig. Die Analyse von SD Sequenzen sowie starken SD Sequenzen zeigt zwei Möglichkeiten der Initiation: Liegt die SD Sequenz innerhalb eines Genüberlapps kann von einer Reinitiation ausgegangen werden und vor *leading* Genen von einem *de novo*-Mechanismus (Abbildung 9 und Abbildung 10). Die Verteilung in den eingeteilten 24 Gruppen ist divers und hat gezeigt, dass es unterschiedliche Nutzungen der SD Sequenzen gibt, welche in die folgenden vier Gruppen aufgeteilt wurden: Die erste Gruppe macht mittleren Gebrauch von SD Motiven sowohl für eine *de novo*-Initiation als auch für eine Reinitiation. Starke SD Sequenzen werden kaum genutzt. Zu dieser Gruppe gehören zum Beispiel *Fimbrobacteria*, alle fünf Gruppen der Proteobakterien, die *Planctomyceten* und die *Spirochaeten*. Hier lassen sich die experimentellen Ergebnisse von *E. coli* aus den γ -Proteobakterien sehr gut einordnen, da als Lehrbuchwissen bekannt ist, dass SD Sequenzen für die Initiation der Translation verwendet werden (Madigan *et al.* 2009) und für intragene SD Sequenzen eine Funktion gezeigt wurde für eine Termination-Reinitiation (Abbildung 8). Die zweite Gruppe nutzt SD Motive sowie starke SD Motive sowohl für die Reinitiation als auch für die *de novo*-Initiation. Dazu gehören die *Aquificae*, *Firmicutes*, *Fusio bacteria*, *Synergistetes* und *Thermotogae* (Abbildung 9 und Abbildung 10). Charakteristisch für Gruppe 3 sind Chrenarchaeota I, Haloarchaea und Cyanobacteria. Hier wird die SD Sequenz kaum, wenn überhaupt, für die *de novo*-Initiation genutzt. Das kann unterstützt werden mit den Anteilen der *leaderless* Transkripte in *H. volcanii* von 72% (Babski *et al.* 2016) und *Sulfolobus Solfataricus* mit 69% (Wurtzel *et al.* 2010) in welchen ohne 5'UTR auch keine SD Sequenz vorhanden sein kann. Eine gekoppelte Translation welche eine *de novo*-

Initiation beinhaltet (UTNI) ist somit nicht sehr wahrscheinlich, sondern eine Kopplung durch Termination-Reinitiation. Dies konnte mit der bioinformatischen Analyse verstärkt werden, welche zeigt, dass jeweils drei Gruppen von Bakterien und Archaea, darunter die Haloarchaea, SD Motive hauptsächlich für die Reinitiation nutzen und nicht für eine *de novo*-Initiation. Dies ist in Abbildung 9c dargestellt mit Werten über 1,5. Die vierte Gruppe scheint SD Motive weder für eine *de novo*-Initiation noch für eine Reinitiation zu nutzen. Hierzu zählen nur die *Bacteroidetes*, welche Anteile von jeweils unter 10% besitzen (siehe Abbildung 9 und Abbildung 10) Entgegen der Literaturangaben, welche für Bakterien zeigten, dass die Stärke von SD Sequenzen nicht in Korrelation mit der Belegung von Ribosomen auf der mRNA steht (Schrader *et al.* 2014; Campo *et al.* 2015; Li *et al.* 2014), zeigen diese Daten, dass SD Motive in Prokaryoten evolutionsbedingt beibehalten und demnach auch verwendet werden.

3. Abstände zwischen Genen auf polycistronischer mRNA und die Bedeutung für die gekoppelte Translation

Polycistronische mRNAs in Prokaryoten sind nicht gleichzusetzen mit überlappenden Genpaaren. Viele Operons liegen nicht mit überlappenden Sequenzen, sondern mit intergenen Bereichen vor. Solche Gene können entweder unabhängig voneinander translatiert (Abbildung 3a) werden oder aber über den UTNI-Mechanismus gekoppelt sein (Abbildung 3b). Es sind einige Fälle bekannt bei denen die Translation eine *de novo*-Initiation, wie bei dem UTNI-Mechanismus beschrieben, beinhaltet. Durch erhöhte Proteinlevel des stromabwärts-liegenden Gens verglichen mit dem Proteinlevel des stromaufwärts-liegenden Gens konnte an drei Operons, welche für ribosomale Proteine, die F-Typ ATPase und Cas Proteine codieren, bewiesen werden, dass ein UTNI-Mechanismus stattfindet (Quax *et al.*, 2013). Für *H. volcanii* konnten 792 Gene gefunden werden, welche einen Abstand von bis zu 10 Nukleotiden besitzen (Babski *et al.* 2016). Für eins davon wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass mit diesem Abstand noch immer eine Translationskopplung möglich ist (Abbildung 5, flgA1/flgA2). Als Schlüsselrolle gilt in der Translationskopplung der Abstand zwischen zwei Genen auf einer polycistronischen mRNA. Genauer gesagt: ist die Anzahl der Nukleotide zwischen dem Stop-Codon des einen Gens und Start-Codon des nächsten Gens ausschlaggebend. Für die genauere Analyse wie weit der Abstand zwischen zwei Genen sein kann, dass noch eine Termination-Reinitiation stattfindet, wurde zunächst das native Genpaar *HVO_0685/0686* aus *H. volcanii* untersucht. Dieses besitzt im nativen Zustand einen Abstand von einem Nukleotid (Tabelle 56). Die sukzessive Vergrößerung des intergenen Abstands hat gezeigt, dass mit einer Distanz von fünf Nukleotiden die Translationseffizienz bereits um 30% abnimmt. Die Abstände von 13 und 19 Nukleotiden haben Abnahmen von 60% und 65% (Abbildung 11c) gezeigt. Da für Archaea ein solcher Mechanismus bisher nicht untersucht wurde, wird betrachtet was über die zweite prokaryotische Domäne, die Bakterien, bisher bekannt ist. Laut Literatur ist ein Abstand von weniger als 25 Nukleotiden optimal für eine gekoppelte Translation in Bakterien (Levin-Karp *et al.* 2013; Tian and Salis 2015). Angenommen dies ist anwendbar für *H. volcanii*, so befindet sich hier ebenfalls ein Großteil der Gene in der richtigen Positionierung. Die erhaltenen Ergebnisse dieser Arbeit zeigen jedoch das sich *H. volcanii* von den Literaturwerten für *E. coli* unterscheidet, da ein Abstand von 22 Nukleotiden bei dem Genpaar *HVO_0685/0686* bereits keine Translationskopplung mehr erlaubt und

somit der maximale Abstand zwischen zwei Genen für eine mögliche Translationskopplung unter 20 Nukleotiden liegt (Abbildung 11c). Um auszuschließen, dass es sich bei dem analysierten Genpaar um eine Ausnahme handelt, wurden für beide Modellorganismen, *H. volcanii* und *E. coli*, jeweils drei weitere Genpaare auf den maximalen intergenen Abstand untersucht. Für *H. volcanii* ist bei allen untersuchten Genpaaren mit einem Abstand von 13 bzw. 14 Nukleotiden noch eine Translationseffizienz von mindestens 40%, verglichen mit der nativen Sequenz, zu sehen. Ab einem Abstand von 22 bzw. 23 Nukleotiden kann für keines der vier analysierten Genpaare mehr von einer Translationskopplung gesprochen werden (Abbildung 11). Für *E. coli* ist in 75% der intergenen Regionen in polycistronischen Transkripten der Abstand kürzer als 25 Nukleotide (Yamamoto *et al.* 2016), was darauf hinweist, dass ein hoher Anteil der Gene im Genom von *E. coli* optimal positioniert ist für die gekoppelte Translation. Dem widerspricht ein von Qin *et al.* vorgeschlagener Scanning-Mechanismus, bei welchem das Ribosom bis zu 60 Nukleotide entlang der mRNA wandern kann bis zu einem weiteren Start-Codon (Qin *et al.* 2016). Hierbei bleibt das 70S Ribosom bestehen. Ein solches 70S Ribosomen Scanning entlang der mRNA lässt die Frage offen, wie eine Reinitiation stattfindet, da der Initiations-Mechanismus durch biochemische Aktivitäten von fMet-RNA und Initiationsfaktoren an der 30S Untereinheit gut charakterisiert ist (Simonetti *et al.* 2009). Die erhaltenen Ergebnisse für *E. coli* in dieser Arbeit zeigen bei 14 Nukleotiden intergenem Abstand in zwei Fällen noch eine Translationseffizienz von mindestens 50% (*hyfH/hyfI* und *ydbH/ynbE*). Für das dritte analysierte Genpaar (*menD/menH*) kann bereits nach zwei Nukleotiden Abstand nur noch eine 30%ige Translationseffizienz berechnet werden und mit einem Abstand von 14 Nukleotiden nur noch knapp 20%. Für alle drei Genpaare ist zu sehen, dass die Translationskopplung ab einem Abstand von 38 Nukleotiden nicht mehr stattfindet (Abbildung 12). Somit kann gezeigt werden dass ein 70S Scanning-Mechanismus ausgeschlossen werden kann für die Translations-Kopplung in *E. coli*. Zusammenfassend wird gezeigt, dass Abstände ab 13 Nukleotiden bei *H. volcanii* und *E. coli* bereits zu einem Einbruch der Translationseffizienz des stromabwärts-liegenden Gens führen. Unterstützend zu diesen Erkenntnissen sind die Ergebnisse der bioinformatischen Analyse von Friedhelm Pfeiffer (Max Plank Institut für Biochemie, Martinsried) heranzuziehen (Abbildung 13). In den Genomen der beiden untersuchten Modellorganismen sind jeweils Abstand-Peaks bei -4 Nukleotiden

gefunden worden. Es konnte gezeigt werden, dass die Initiations-Rate bedeutend höher ist wenn die Gene mit -4 Nukleotiden (**ATGA**) überlappen. An diesen Nukleotiden ist es der Initiator-tRNA möglich, im Komplex mit der 30S ribosomalen Untereinheit mit ihrem Anti-Codon Loop (3'-UACU-5') Watson-Crick Basenpaarung mit der mRNA aufzubauen (Schmitt *et al.* 1980).

4. Optimierung einer Methode zur genauen Untersuchung des Termination-Reinitiations-Mechanismus in Prokaryoten

Translationskopplung ist ein ubiquitärer Mechanismus, welcher die Protein Expression in Operons kontrolliert. Die Effekte wurden bereits in vielen Studien untersucht (Rex *et al.* 1994; Hellmuth *et al.* 1991; Lesaget *et al.* 1992; Schümperli *et al.* 1982; Aksoy, Squires, and Squires 1984; Oppenheim and Yanofsky 1980; Levin-Karp *et al.* 2013), der genaue Mechanismus der Termination-Reinitiation ist jedoch noch nicht bekannt. Hierfür wurden kürzlich zwei mögliche Mechanismen postuliert: 1) Ribosomen translatieren das erste Gen bis zum Stop-Codon und bleiben als 70S Ribosom bestehen, um auf der mRNA nach einem neuen Start-Codon zu scannen (Yamamoto *et al.* 2016), oder 2). Nach der Termination dissoziiert die ribosomale 50S Untereinheit durch Ribosomen-Recycling-Faktoren (RRF) von der mRNA. Die 30S Untereinheit scannt entlang der mRNA und reinitiiert an einem stromabwärts-liegenden Gen, sobald eine neue 50S Untereinheit reassoziert wurde (Adhin und van Duin, 1990; Rex *et al.*, 1994). In einer biophysikalischen Studie wurde dieser mögliche Reinitiations-Mechanismus in Bakterien wie folgt beschrieben: Wenn das 70S Ribosom ein Stop-Codon erreicht, dissoziiert es von der mRNA. Der 30S Untereinheit ist es jedoch möglich, durch die positive Ladung der Plattform locker gebunden an der mRNA zu verbleiben. Durch nicht spezifische Interaktionen kann die Untereinheit entlang der mRNA in beide Richtungen, scannen und hat dabei eine geringe Chance von der mRNA zu fallen (Tian and Salis 2015). Dieser Mechanismus ist vergleichbar mit dem bereits gut analysierten Termination-Reinitiations-Ereignis bei eukaryontischen Viren (Powell *et al.* 2011; Powell 2010). Die beiden Möglichkeiten unterscheiden sich also grundlegend darin, ob die 50S Untereinheit an der mRNA ausgetauscht wird oder nicht. Um diese Fragestellung beantworten zu können wurde in dieser Arbeit eine Methode entwickelt, welche eine Unterscheidung ermöglicht ob bei dem Ereignis der Termination-Reinitiation die 30S Untereinheit oder das komplette 70S Ribosom an der mRNA verbleibt (Versuchsablauf in

Abbildung 14). Die Idee der Methode beruht auf dem *ribosome display*. Bei diesem ist es möglich, einen Translations-Komplex aufzureinigen, welcher aufgrund eines nicht vorhandenen Stop-Codons nicht in der Lage ist in seine Bestandteile zu dissoziieren. Der komplette Versuch erfolgt *in vitro* und die zu translatierende mRNA wird so geplant, dass am 5'- oder 3'-Ende ein His-Tag translatiert wird, an welchem der Komplex aufgereinigt werden kann (Plückthun 2012). Die einzelnen benötigten Bestandteile dieses Versuches konnten in dieser Arbeit bereits produziert und in *proof-of-principal* Experimenten als funktional verifiziert werden. Nachfolgend sind die einzelnen Bestandteile, sowie der jetzige Stand und weitere Optimierungsmöglichkeiten diskutiert.

In vitro Translationslysat (S30) wurde, wie in der Literatur beschrieben hergestellt (Foshag *et al.* 2018). Dafür wurden *E. coli* Deletionsstämme herangezogen (Baba *et al.* 2006; Cukras and Green 2005), welche das jeweilige ribosomale Protein (S6, S13, L9 oder L33) plasmidisch und fusioniert an einen His-Tag enthalten. Es besteht somit die Möglichkeit, die ribosomalen Untereinheiten aus dem Lysat anhand des His-Tags zu entfernen (siehe Abbildung 18). Da davon ausgegangen werden kann, dass das im Stamm deletierte Protein in die Ribosomen eingebaut wird, wenn dieses, konstitutiv von einem Plasmid, exprimiert wird. Der Schritt zur Entfernung der Ribosomen aus dem Lysat bedarf allerdings noch weiterer Optimierung. Es ist zu sehen, dass das Säulenmaterial entweder überladen war und daher nicht die kompletten, markierten Proteine gebunden wurden (siehe 50S Untereinheit in Durchfluss und in den Waschschritten in Abbildung 18) oder aber die Zugänglichkeit der Histidin-Markierung an der eingebrachten Position nicht optimal ist. Zur Optimierung kann hier zum einen ein anderer Tag verwendet werden, wie zum Beispiel der Strep-II-Tag oder ein Linker kann zwischen Histidin-Markierung und Protein-Sequenz gebracht werden, um sicherzustellen, dass die Markierung weiter aus dem Ribosom ragt (Wu *et al.* 2018). Dass das selbsthergestellte S30 Lysat funktional ist und Protein translatiert wird, ist in Abbildung 19 mit dem Nachweis von GFP gezeigt.

mRNA konnte ebenfalls erfolgreich transkribiert werden (siehe Abbildung 15) und in einem Ansatz mit gekauftem *in vitro* Translationslysat (PURExpress) zu Protein translatiert werden, wie in Abbildung 17 mittels Silbergefärbung dargestellt wurde. Die Nachweisgrenze mit Coomassie liegt bei 0,1 µg Protein pro Bande (Kang *et al.* 2002) und reicht hier nicht aus für den Nachweis des translatierten Proteins im Gel.

Daher wurde die nachweisstärkere Methode einer Silberfärbung (Nachweisgrenze: 0,1-1 ng Protein/ Bande) gewählt (Rabilloud, Carpentier, and Tarroux 1988). Nach zwei Stunden Inkubation der *in vitro* Translation kann ein Protein auf der richtigen Höhe detektiert werden, welches vorher nicht zu sehen war. Zusätzlich war auch das GFP zum Test des S30 Lysats von selbst hergestellter mRNA transkribiert worden.

Zum Start der *in vitro* Translation werden in dem geplanten Versuchsablauf ribosomale Untereinheiten benötigt. Dafür wurden Ribosomen isoliert und in ihre Untereinheiten getrennt. Das geschah sowohl für leichte (^{14}N) als auch schwere (^{15}N) Ribosomen. Abbildung 20 zeigt die Profile und den Nachweis der getrennten Untereinheiten in Form von RNA Gelen. Der Nachweis, dass diese Ribosomen funktional sind, ist in Abbildung 21 dargestellt. Da die quantifizierte Proteinbande nach der Zugabe von selbst isolierten ribosomalen Untereinheiten stärker ist.

Zusätzlich wurden die leichten (^{14}N) und schweren (^{15}N) ribosomalen Untereinheiten in der Massenspektrometrie von Julian Langer (MPI für Biophysik, Frankfurt) untersucht und die Ergebnisse zeigen, dass der Einbau von ^{15}N und damit die Markierung der Ribosomen funktioniert hat (Abbildung 22).

Mit all diesen Bestandteilen und unterschiedlichen Kontrollen in Form von mRNA-Konstrukten (siehe Abbildung 16) ist es nun theoretisch möglich, den Mechanismus der Termination-Reinitiation wie folgt zu analysieren: Zu einem *in vitro* Translationslysat ohne 50S Ribosomen wird eine mRNA sowie ribosomale ^{14}N -50S Untereinheiten gegeben um einen Start der Translation zu ermöglichen. Nach kurzer Zeit wird ein Überschuss an markierten ^{15}N -50S Ribosomen hinzugegeben, so dass wenn es zu einem Austausch der 50S Untereinheit an der mRNA kommt, mit großer Wahrscheinlichkeit eine schwere Untereinheit eingesetzt wird. Hier kommen die Kontrollen der mRNA ins Spiel. An der mRNA, welche nur ein Gen (x) enthält, kann keine Termination-Reinitiation stattfinden, somit ist diese die Negativkontrolle (Abbildung 16a). Es wird erwartet, dass der Komplex nur leichte ribosomale ^{14}N -50S Untereinheiten enthält. Das zweite mRNA Konstrukt (Abbildung 16b) lässt auch nach Austausch der großen ribosomalen Untereinheit die Aufreinigung des Komplexes zu, da der His-Tag am C-terminalen Ende von Gen y kloniert vorliegt. Die Unterscheidung der markierten und nicht markierten ribosomalen Untereinheiten in den Komplexen erfolgt nach der Aufreinigung der Translationskomplexe mittels Massenspektrometrie. Hierfür können vorab Standardkurven erstellt werden.

Mischungen, welche definierte Verhältnisse von markierten und nicht-markierten Ribosomen erhalten, werden dafür massenspektrometrisch gemessen.

Als eine Alternative wurden bereits Vorarbeiten durchgeführt, welche ermöglichen, die ribosomalen Untereinheiten über die deletierten ribosomalen Proteine mit Fluoreszenz-Farbstoffen zu markieren und diese in den aufgereinigten Komplexen dann im Fluoreszenz-Photometer zu analysieren. Dieser Nachweis ist eventuell sensitiver als die Markierung mit schwerem Stickstoff. Durch die Markierung der Fluoreszenz sind nicht markierte Ribosomen nicht störend, da sie nicht im Fluoreszenz-Photometer sichtbar werden. Es ist hier jedoch notwendig die Translation einigermaßen synchronisiert zu starten und zu verhindern, dass Polyribosomen an der mRNA vorhanden sind. Diese könnten das Ergebnis verfälschen.

Dass es sich um den 30S Mechanismus handelt, wird durch Studien unterstützt wie von Chen *et al.* 2017, welche zeigt, dass für die Termination der Translation ein Recycling bzw. ein Splitten der Ribosomen benötigt wird (Chen *et al.* 2017). Der Mechanismus der Termination ist vor allem in Bakterien ein vielfach und genau untersuchter Mechanismus (Borg, Pavlov, and Ehrenberg 2016; Hirokawa *et al.* 2005; Prabhakar *et al.* 2017), jedoch in keinem der bisher veröffentlichten Studien in den Bezug auf eine Translationskopplung an überlappenden Genpaaren und eine Reinitiation nach der Termination. Ob für dieses Ereignis ebenfalls ein Splitten der Ribosomen notwendig ist, kann mit dem aktuellen Stand der Forschung noch nicht mit Sicherheit gesagt werden. Die in dieser Arbeit geplante und vorbereitete Methode kann dazu beitragen, diesen Mechanismus genauer zu untersuchen.

Eine weiterführende Fragestellung, welche mit diesem Versuchsaufbau und der mRNA aus Abbildung 16c untersucht werden kann, ist die Bildung von Heteromeren-Protein-Komplexen während einer gekoppelten Translation. Ein großer Vorteil einer solchen co-translationalen-Komplexbildung ist das unspezifische oder gar problematische Interaktionen in einer überfüllten Zellumgebung verhindert werden (Ellis 2001). Das erste Mal wurde eine co-translational-Komplexbildung aus heteromeren Untereinheiten für *E. coli* in 1964 vorgeschlagen (Kiho and Rich 1964). Bis heute ist dies vor allem für Eukaryoten ein gut untersuchtes Thema (Fiebiger *et al.* 2005; Halbach *et al.* 2009; L. Chang *et al.* 2006). Die neuste Studie für *E. coli* ist 2015 von Shieh *et al.* publiziert worden. In dieser konnte gezeigt werden, dass die Untereinheiten der Luciferase co-Translational gebildet werden, was befürwortet,

dass es nicht zu einem Austausch der ribosomalen 50S Untereinheit kommt und sich die Proteine am Ribosom aufhalten können, um bereits während der Translation miteinander wechselwirken zu können (Shieh *et al.* 2015). Die in Abbildung 16c gezeigte mRNA ermöglicht diesen Versuch indem das bei einer Translation exprimierte Protein X mit dem His-Tag markiert ist. Wenn dieses am Ribosom verweilt bis auch das zweite translatiert wurde und die beiden Proteine einen Komplex bilden so ist es möglich den *ribosome-display*-Komplex aufzureinigen. Die vorgestellte Methode ermöglicht somit nicht nur zu unterscheiden ob es sich bei der Termination-Reinitiation um eine 30S ribosomale Untereinheit oder ein 70S Ribosom handelt, sondern zusätzlich für *E. coli* Einblicke zum Thema co-translationale-Komplexbildung zu verschaffen.

VI. Literaturverzeichnis

- Adhin, Malti R., and Jan van Duin. 1990. "Scanning Model for Translational Reinitiation in Eubacteria." *Journal of Molecular Biology* 213 (4): 811–18. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80265-7](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80265-7).
- Aksoy, S., C. L. Squires, and C. Squires. 1984. "Translational Coupling of the *TrpB* and *TrpA* Genes in the *Escherichia Coli* Tryptophan Operon." *Journal of Bacteriology* 157 (2): 363–67. <https://doi.org/10.1128/jb.157.2.363-367.1984>.
- Albers, Sonja Verena, and Ken F. Jarrell. 2015. "The Archaeum: How Archaea Swim." *Frontiers in Microbiology* 6 (23): 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00023>.
- Alberts, Bruce, Alexander D. Johnson, Julian Lewis, David Morgan, Martin Raff, Keith Roberts, and Peter Walter. 2002. *Molekularbiologie Der Zelle*. Weinheim: Wiley-VHC.
- Allers, Thorsten. 2010. "Overexpression and Purification of Halophilic Proteins in *Haloferax Volcanii*" 1 (4): 288–90. <https://doi.org/10.1128/AEM.02670-09.Since>.
- Allers, Thorsten, Hien-ping Ngo, Moshe Mevarech, and Robert G Lloyd. 2004. "Development of Additional Selectable Markers for the Halophilic Archaeon." *Applied and Environmental Microbiology* 70 (2): 943–53. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.2.943>.
- Altuvia, Shoshy, Aixia Zhang, Liron Argaman, Anita Tiwari, and Gisela Storz. 1998. "The *Escherichia Coli* *OxyS* Regulatory RNA Represses *FhlA* Translation by Blocking Ribosome Binding." *EMBO Journal* 17 (20): 6069–75. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.20.6069>.
- Baba, Tomoya, Takeshi Ara, Miki Hasegawa, Yuki Takai, Yoshiko Okumura, Miki Baba, Kirill A. Datsenko, Masaru Tomita, Barry L. Wanner, and Hirotada Mori. 2006. "Construction of *Escherichia Coli* K-12 in-Frame, Single-Gene Knockout Mutants: The Keio Collection." *Molecular Systems Biology* 2 (2006.0008): 1–22. <https://doi.org/10.1038/msb4100050>.
- Babitzke, Paul, Carol S. Baker, and Tony Romeo. 2009. "Regulation of Translation Initiation by RNA Binding Proteins." *Annu Rev Microbiol.* 63 (1): 27/44. <https://doi.org/10.14952/SEIKAGAKU.2016.880135>.
- Babski, Julia, Karina A. Haas, Daniela Näther-Schindler, Friedhelm Pfeiffer, Konrad U. Förstner, Matthias Hammelmann, Rolf Hilker, *et al.* 2016. "Genome-Wide Identification of Transcriptional Start Sites in the Haloarchaeon *Haloferax Volcanii* Based on Differential RNA-Seq (DRNA-Seq)." *BMC Genomics* 17 (1): 1–19. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2920-y>.
- Baker, Tania A., Stephen P. Bell, Alexander Gann, Michael Levine, Richard Losick, and James D. Watson. 2010. *Molekularbiologie*. Pearson Studium.

- Balleza, Enrique, Lucia Lopez-Bojorquez, Agustino Martinez-Antonio, Osbaldo Resendis-Antonio, Irma Lozada-Chavez, Yalbi I Balderas-Martinez, Sergio Encarnacion, and Julio Collado-vides. 2009. "Regulation by Transcription Factors in Bacteria: Beyond Description." *FEMS Microbiology Reviews* 33 (2009): 133–51. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00145.x>.
- Baughman, Gail, and Masayasu Nomura. 1983. "Localization of the Target Site for Translational Regulation of the L11 Operon and Direct Evidence for Translational Coupling in *Escherichia Coli*." *Cell* 34 (3): 979–88. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90555-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90555-X).
- Benelli, Dario, Enzo Maone, Paola Londei, Roma La, Sapienza Policlinico, and Viale Regina Elena. 2003. "Two Different Mechanisms for Ribosome / mRNA Interaction in Archaeal Translation Initiation" 50 (2): 635–43. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03721.x>.
- Berkemer, Sarah J, Lisa-katharina Maier, Fabian Amman, Stephan H Bernhart, Julia Wörtz, Pascal Märkle, Friedhelm Pfeiffer, Peter F Stadler, and Anita Marchfelder. 2020. "Identification of RNA 3' Ends and Termination Sites In." *RNA Biology* 17 (5): 633–76. <https://doi.org/10.1080/15476286.2020.1723328>.
- Bird, Adrian P. 1980. "Restoration of a Translational Stop-Start Overlap Reinstates Translational Coupling in a Mutant *TrpB'*-*TrpA* Gene Pair of the *Escherichia Coli* Tryptophan Operon." *Nucleic Acids Res.* 8 (4): 1499–1504. <https://doi.org/10.1093/nar/17.22.9333>.
- Bitan-Banin, Gili, Ron Ortenberg, and Moshe Mevarech. 2003. "Development of a Gene Knockout System for the Halophilic Archaeon *Haloferax Volcanii* by Use of the *PyrE* Gene." *Journal of Bacteriology* 185 (3): 772–78. <https://doi.org/10.1128/JB.185.3.772-778.2003>.
- Blattner, Frederick R., Guy Plunkett, Craig A. Bloch, Nicole T. Perna, Valerie Burland, Monica Riley, Julio Collado-Vides, *et al.* 1997. "The Complete Genome Sequence of *Escherichia Coli* K-12." *Science* 277 (5331): 1453–62. <https://doi.org/10.1126/science.277.5331.1453>.
- Borg, Anneli, Michael Pavlov, and Måns Ehrenberg. 2016. "Complete Kinetic Mechanism for Recycling of the Bacterial Ribosome." *Rna* 22 (1): 10–21. <https://doi.org/10.1261/rna.053157.115>.
- Brenneis, Mariam, and Jörg Soppa. 2009. "Regulation of Translation in Haloarchaea: 5' - and 3'-UTRs Are Essential and Have to Functionally Interact in Vivo." *PLoS ONE* 4 (2): 18–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004484>.
- Bullock, W.O., J.M. Fernandez, and J.M. Short. 1987. "XL1-Blue-a High-Efficiency Plasmid Transforming *RecA Echerichia Coli* Strain with β -Galactosidase Selection." *Biotechniques* 5 (3): 376–79.
- Burkhardt, David H, Silvi Rouskin, Yan Zhang, and Gene-wei Li. 2017. "Operon MRNAs Are Organized into ORF- Centric Structures That Predict Translation Efficiency." *ELife* 6 (e22037): 1–23. <https://doi.org/10.7554/eLife.22037>.

- Campo, Cristian Del, Alexander Bartholomäus, Ivan Fedyunin, and Zoya Ignatova. 2015. "Secondary Structure across the Bacterial Transcriptome Reveals Versatile Roles in mRNA Regulation and Function." *PLoS Genetics* 11 (10): 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005613>.
- Chang, Jinghua Tsai, Cristina Barthel-rosa Green, and Richard E Wolf. 1995. "Inhibition of Translation Initiation on *Escherichia Coli* Gnd mRNA by Formation of a Long-Range Secondary Structure Involving the Ribosome Binding Site and the Internal Complementary Sequence." *Journal of Bacteriology* 177 (22): 6560–67. <https://doi.org/10.1128/jb.177.22.6560-6567.1995>.
- Chang, Lynne, Yaron Shav-tal, Tatjana Trcek, Robert H Singer, and Robert D Goldman. 2006. "Assembling an Intermediate Fi Lament Network by Dynamic Cotranslation." *JCB* 172 (5): 747–58. <https://doi.org/10.1083/jcb.200511033>.
- Chen, Hongyun, Matthew Bjerknes, Ravindra Kumar, and Ernest Jay. 1994. "Determination of the Optimal Aligned Spacing between the Shine-Dalgarno Sequence and the Translation Initiation Codon of *Escherichia Coli* MRNAs." *Nucleic Acids Res.* 22 (23): 4953–57. <https://doi.org/10.1093/nar/22.23.4953>.
- Chen, Yuanwei, Akira Kaji, Hideko Kaji, and Barry S. Cooperman. 2017. "The Kinetic Mechanism of Bacterial Ribosome Recycling." *Nucleic Acids Research* 45 (17): 10168–77. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx694>.
- Chiaruttini, C., M. Milet, M. De Smit, and M. Springer. 1996. "Translational Coupling in the *Escherichia Coli* Operon Encoding Translation Initiation Factor IF3 and Ribosomal Proteins L20 and L35." *Biochimie* 78 (7): 555–67. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(96\)80002-2](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(96)80002-2).
- Chiaruttini, C, M Milet, and M Springer. 1996. "A Long-Range RNA-RNA Interaction Forms a Pseudoknot Required for Translational Control of the IF3-L35-L20 Ribosomal Protein Operon in *Escherichia Coli*." *EMBO Journal* 15 (16): 4402–13.
- Condo, Ivano, Andrea Ciammaruconi, and Dario Benelli. 1999. "Cis -Acting Signals Controlling Translational Initiation in the Thermophilic Archaeon *Sulfolobus Solfataricus*." *Molecular Microbiology* 34 (2): 377–84.
- Cox, Cymon J, Peter G Foster, Robert P Hirt, Simon R Harris, and T Martin Embley. 2008. "The Archaeobacterial Origin of Eukaryotes." *PNAS* 105 (51): 20356–61. <https://doi.org/10.1073/pnas.0810647105>.
- Cukras, Anthony R., and Rachel Green. 2005. "Multiple Effects of S13 in Modulating the Strength of Intersubunit Interactions in the Ribosome During Translation." *J Mol Biol.* 349 (1): 47–59. <https://doi.org/10.1021/nl061786n.Core-Shell>.
- Darnton, Nicholas C., Linda Turner, Svetlana Rojevsky, and Howard C. Berg. 2007. "On Torque and Tumbling in Swimming *Escherichia Coli*." *Journal of Bacteriology* 189 (5): 1756–64. <https://doi.org/10.1128/JB.01501-06>.
- Davis, Carles P., Gail Woods, and David Niesel. 1996. *Medical Microbiology*. Edited by Samuel Baron. Texas: Galveston (TX).

- Ellis, R John. 2001. "Macromolecular Crowding: An Important but Neglected Aspect of the Intracellular Environment." *Current Opinion in Structural Biology* 26 (10): 114–19. [https://doi.org/10.1016/s0959-440x\(00\)00172-x](https://doi.org/10.1016/s0959-440x(00)00172-x).
- Emory, Sheri A, and Joel G Belasco. 1990. "The *OmpA* 5' Untranslated RNA Segment Functions in *Escherichia Coli* as a Growth-Rate-Regulated mRNA Stabilizer Whose Activity Is Unrelated to Translational Efficiency." *Journal of Bacteriology* 172 (8): 4472–81. <https://doi.org/10.1128/jb.172.8.4472-4481.1990>.
- Ermolenko, Dimitri, Zigurts K. Majumdar, Robyn Hickerson, Clint Spiegel, Robert M. Clegg, and Harry F. Noller. 2007. "Observation of Intersubunit Movement of the Ribosome in Solution Using FRET." *J Mol Biol.* 370 (36): 530–40. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.04.042>.
- Failmezger, Jurek, Robert Nitschel, Andes Sanchez-Kopper, Michael Kraml, and Martin Siemann-herzberg. 2016. "Site-Specific Cleavage of Ribosomal RNA in *Escherichia Coli* -Based Cell-Free Protein Synthesis Systems." *PLoS ONE* 11 (12): 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168764>.
- Failmezger, Jurek, Michael Rauter, Robert Nitschel, Michael Kraml, and Martin Siemann-Herzberg. 2017. "Cell-Free Protein Synthesis from Non-Growing, Stressed *Escherichia Coli*." *Scientific Reports* 7 (1): 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16767-7>.
- Fiebigler, Edda, Domenico Tortorella, Marie-helene Jouvin, Jean-pierre Kinet, and Hidde L Ploegh. 2005. "Cotranslational Endoplasmic Reticulum Assembly of FcERI Controls the Formation of Functional IgE-Binding Receptors." *JEM* 201 (2): 267–77. <https://doi.org/10.1084/jem.20041384>.
- Foshag, Daniel, Erik Henrich, Ekkehard Hiller, Miriam Schäfer, Christian Kerger, Anke Burger-Kentischer, Irene Diaz-Moreno, *et al.* 2018. "The *E. Coli* S30 Lysate Proteome: A Prototype for Cell-Free Protein Production." *New Biotechnology* 40 (Pt B): 245–60. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2017.09.005>.
- French, Sarah L., Thomas J. Santangelo, Ann L. Beyer, and John N. Reeve. 2007. "Transcription and Translation Are Coupled in Archaea." *Molecular Biology and Evolution* 24 (4): 893–95. <https://doi.org/10.1093/molbev/msm007>.
- Fukuhara, Hiroshi, and Centre Universitaire. 1982. "Translational Reinitiation in the Presence and Absence of a Shine and Dalgarno Sequence." *Nucleic Acids Research* 10 (21): 6571–77. <https://doi.org/10.1093/nar/17.14.5501>.
- Gelsinger, Diego Rivera, Emma Dallon, Rahul Reddy, Fuad Mohammad, Allen R Buskirk, and Jocelyne Diruggiero. 2020. "NAR Breakthrough Article Ribosome Profiling in Archaea Reveals Leaderless Translation, Novel Translational Initiation Sites, and Ribosome Pausing at Single Codon Resolution." *Nucleic Acids Res.* 48 (10): 1–16. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa304>.
- Gibson, Daniel G., Lei Young, Ray Yuan Chuang, J. Craig Venter, Clyde A. Hutchison, and Hamilton O. Smith. 2009. "Enzymatic Assembly of DNA Molecules up to Several Hundred Kilobases." *Nature Methods* 6 (5): 343–45. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1318>.

- Goodman, Daniel B, George M Church, and Sriram Kosuri. 2013. "Causes and Effects of N-Terminal Codon Bias in Bacterial Genes." *Science* 342 (475): 475–79. <https://doi.org/10.1126/science.1241934>.
- Gordon, David M., and Ann Cowling. 2003. "The Distribution and Genetic Structure of *Escherichia Coli* in Australian Vertebrates: Host and Geographic Effects." *Microbiology* 149 (12): 3575–86. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26486-0>.
- Grill, Sonja, Claudio O Gualerzi, Paola Londei, and Udo Bla. 2000. "Selective Stimulation of Translation of Leaderless MRNA by Initiation Factor 2: Evolutionary Implications for Translation." *EMBO Journal* 19 (15): 4101–10. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.15.4101>.
- Halbach, Andre, Haidi Zhang, Agnieszka Wengi, Zofia Jablonska, Isabel M L Gruber, Regula E Halbeisen, Patrick Kemmeren, *et al.* 2009. "Cotranslational Assembly of the Yeast SET1C Histone Methyltransferase Complex." *The EMBO Journal* 28 (19): 2959–70. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.240>.
- Hammelman, M., and Jörg Soppa. 2008. "Optimized Generation of Vectors for the Construction of *Haloferax Volcanii* Deletion Mutants." *Journal of Microbiological Methods* 75 (2): 201–4. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.05.029>.
- Hartman, Amber L., Cédric Norais, Jonathan H. Badger, Stéphane Delmas, Sam Haldenby, Ramana Madupu, Jeffrey Robinson, *et al.* 2010. "The Complete Genome Sequence of *Haloferax Volcanii* DS2, a Model Archaeon." *PLoS ONE* 5 (3): 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009605>.
- Hellen, Christopher U T, Peter Sarnow, Christopher U T Hellen, and Peter Sarnow. 2001. "Internal Ribosome Entry Sites in Eukaryotic MRNA Molecules Internal Ribosome Entry Sites in Eukaryotic MRNA Molecules." *Genes and Development* 15 (13): 1593–1612. <https://doi.org/10.1101/gad.891101>.
- Hellmuth, K., G. Rex, B. Surin, R. Zinck, and J. E.G. McCarthy. 1991. "Translational Coupling Varying in Efficiency between Different Pairs of Genes in the Central Region of the *Atp* Operon of *Escherichia Coli*." *Molecular Microbiology* 5 (4): 813–24. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1991.tb00754.x>.
- Heurgu, Valérie, and Stéphanie Champ. 2002. "The *HemK* Gene in *Escherichia Coli* Encodes the N5-Glutamine Methyltransferase That Modifies Peptide Release Factors." *EMBO Journal* 21 (4): 769–78. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.4.769>.
- Himbergen, J. Van, B. Van Geffen, and J. van Duin. 1993. "Translational Control by a Long Range RNA-RNA Interaction; a Basepair Substitution Analysis." *Nucleic Acids Research* 21 (8): 1713–17. <https://doi.org/10.1093/nar/21.8.1713>.
- Hirokawa, Go, Romana M. Nijman, V. Samuel Raj, Hideko Kaji, Kazuei Igarashi, and Akira Kaji. 2005. "The Role of Ribosome Recycling Factor in Dissociation of 70S Ribosomes into Subunits." *Rna* 11 (8): 1317–28. <https://doi.org/10.1261/rna.2520405>.

- Huber, Madeleine, Faure Guilhem, Sebastian Laass, Esther Kolbe, Kristina Seitz, Christina Wehrheim, Yuri I. Wolf, Eugene V. Koonin, and Jörg Soppa. 2019. "Translational Coupling via Termination-Reinitiation in Archaea and Bacteria." *Nature Communications* 10 (1): 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11999-9>.
- Hug, Laura A., Brett J. Baker, Karthik Anantharaman, Christopher T. Brown, Alexander J. Probst, Cindy J. Castelle, Cristina N. Butterfield, *et al.* 2016. "A New View of the Tree of Life." *Nature Microbiology* 1 (5): 1–6. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.48>.
- Imachi, Hiroyuki, Masaru K Nobu, Nozomi Nakahara, Yuki Morono, Miyuki Ogawara, Yoshihiro Takaki, Yoshinori Takano, *et al.* 2020. "Isolation of an Archaeon at the Prokaryote – Eukaryote Interface." *Nature* 577 (7791): 519–25. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1916-6>.
- Inokuchi, Yoshio, Akikazu Hirashima, Yasuhiko Sekine, Laszlo Janosi, and Akira Kaji. 2000. "Role of Ribosome Recycling Factor (RRF) in Translational Coupling." *EMBO Journal* 19 (14): 3788–98. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.14.3788>.
- Jacob, Franis, and Jacques Monod. 1961. "Genetic Regulatory Mechanisms in the Synthesis of Proteins." *J Mol Biol.* 3: 318–56. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(61\)80072-7](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(61)80072-7).
- Jefferson, R. A. 1989. "The *GUS* Reporter Gene System." *Nature* 342 (6251): 837–38. <https://doi.org/10.1038/342837a0>.
- Johnsen, Ulrike, Jan Moritz Sutter, Henning Zaiß, and Peter Schönheit. 2013. "L-Arabinose Degradation Pathway in the Haloarchaeon *Haloferax Volcanii* Involves a Novel Type of L-Arabinose Dehydrogenase." *Extremophiles* 17 (6): 897–909. <https://doi.org/10.1007/s00792-013-0572-2>.
- Johnson, Zackary I, and Sallie W Chisholm. 2004. "Properties of Overlapping Genes Are Conserved across Microbial Genomes." *Genome Research* 14 (11): 2268–72. <https://doi.org/10.1101/gr.2433104.2268>.
- Kang, Donghoon, Yong Song Gho, Myungkoo Suh, and Chulhun Kang. 2002. "Highly Sensitive and Fast Protein Detection with Coomassie Brilliant Blue in Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis." *Bull. Korean Chem. Soc.* 23 (11): 1511–12. <https://doi.org/10.5012/bkcs.2002.23.11.1511>.
- Karamyshev, Andrey L, Zemfira N Karamysheva, Tohru Yamami, Koichi Ito, and Yoshikazu Nakamura. 2004. "Transient Idling of Posttermination Ribosomes Ready to Reinitiate Protein Synthesis." *Biochimie* 86 (12): 933–38. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2004.08.006>.
- Kiho, Yukio, and Alexander Rich. 1964. "Induced Enzyme Formed on Bacterial Polyribosomes." *Proc Natl Acad Sci USA* 51 (1): 731–35. <https://doi.org/10.1073/pnas.51.1.111>.
- Klenk, Hans-Peter. 2007. "Features of Genomes." In *Archaea: Evolution, Physiology, and Molecular Biology*, edited by Roger A Garrett and Hans-Peter Klenk, 75–94. Victoria, Australia: Wiley-Balackwell.

- Kozak, Marilyn. 1999. "Initiation of Translation in Prokaryotes and Eukaryotes." *Gene* 234 (2): 187–208. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(99\)00210-3](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(99)00210-3).
- Kozak, Marilyn. 2002. "Pusing the Limits of the Scanning Mechanism for Initiation of Translation." *Gene* 299 (1–2): 1–34. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(02\)01056-9](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(02)01056-9).
- Kramer, Günter, Daniel Boehringer, Nenad Ban, and Bernd Bukau. 2009. "The Ribosome as a Platform for Co-Translational Processing, Folding and Targeting of Newly Synthesized Proteins." *Nature Structural and Molecular Biology* 16 (6): 589–97. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1614>.
- Kramer, Piet, Katrin Gäbel, Friedhelm Pfeiffer, and Jörg Soppa. 2014. "*Haloferax Volcanii*, a Prokaryotic Species That Does Not Use the Shine Dalgarno Mechanism for Translation Initiation at 5'-UTRs." *PLoS ONE* 9 (4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094979>.
- Kudla, Grzegorz, Andrew W. Murray, David Tollervey, and Joshua B. Plotkin. 2009. "Coding-Sequence Determinants of Gene Expression in *Escherichia Coli*." *Science* 324 (5924): 255–58. <https://doi.org/10.1126/science.1170160.Coding-sequence>.
- Lake, James A, Eric Henderson, Melanie Oakes, and Michael W Clark. 1984. "Eocytes: A New Ribosome Structure Indicates a Kingdom with a Close Relationship to Eukaryotes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 81 (12): 3786–90. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.12.3786>.
- Lesaget, P, C Chiaruttini, M Graffe, J Dondon, M Milet, and M Springer. 1992. "Messenger RNA Secondary Structure and Translational Coupling in the *Escherichia Coli* Operon Encoding Translation Initiation Factor IF3 and the Ribosomal Proteins , L35 and L20." *J. Mol. Biol.* 228 (2): 366–86. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(92\)90827-7](https://doi.org/10.1016/0022-2836(92)90827-7).
- Levin-Karp, Ayelet, Uri Barenholz, Tasneem Bareia, Michal Dayagi, Lior Zelcbuch, Niv Antonovsky, Elad Noor, and Ron Milo. 2013. "Quantifying Translational Coupling in *E. Coli* Synthetic Operons Using RBS Modulation and Fluorescent Reporters." *ACS Synthetic Biology* 2 (6): 327–36. <https://doi.org/10.1021/sb400002n>.
- Li, Gene-Wei, David H Burkhardt, Carol Gross, and Jonathan S. Weissman. 2014. "Quantifying Absolute Protein Synthesis Rates Reveals Principles Underlying Allocation of Cellular Resources." *Cell* 157 (3): 624–35. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.033.Quantifying>.
- Lindås, Ann Christin, and Rolf Bernander. 2013. "The Cell Cycle of Archaea." *Nature Reviews Microbiology* 11 (9): 627–38. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3077>.
- Litchfield, Carol D. 2011. "Potential for Industrial Products from the Halophilic Archaea." *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 38 (10): 1635–47. <https://doi.org/10.1007/s10295-011-1021-9>.
- Livak, Kenneth J., and Thomas D. Schmittgen. 2001. "Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method." *Methods* 25 (4): 402–8. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.

- Londei, Paola. 2005. "Evolution of Translational Initiation: New Insights from the Archaea." *FEMS Microbiology Reviews* 29 (2): 185–200. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.10.002>.
- Lopez, P. J., and M. Dreyfus. 1996. "The *LacZ* mRNA Can Be Stabilised by the T7 Late mRNA Leader in *E. Coli*." *Biochimie* 78 (6): 408–15. [https://doi.org/10.1016/0300-9084\(96\)84747-x](https://doi.org/10.1016/0300-9084(96)84747-x).
- Ma, Jiong, Allan Campbell, Samuel Karlin, Jiong Ma, Allan Campbell, and Samuel Karlin. 2002. "Correlations between Shine-Dalgarno Sequences and Gene Features Such as Predicted Expression Levels and Operon Structures." *Journal of Bacteriology* 184 (20): 5733–45. <https://doi.org/10.1128/JB.184.20.5733>.
- Madigan, Michael T., Kelly S. Bender, Daniel H. Buckley, Matthew W. Sattley, and David A. Stahl. 2009. *Brock Mikrobiologie*. München: Pearson Studium.
- Maisch, Anna Lena. 2019. "Untersuchung Der Translationskopplung Durch Termination-Reinitiation an Überlappenden Genpaaren in *Escherichia Coli*." Goethe Universität Frankfurt am Main.
- Majoalani, Nadim, Christofer Cuning, Darren Sledjeski, Tom Elliott, and Susan Gottesman. 1998. "*DsrA* RNA Regulates Translation of *RpoS* Message by an Anti-Antisense Mechanism, Independent of Its Action as an Antisilencer of Transcription." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (21): 12462–67. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.21.12462>.
- Malys, Naglis, and John E.G. McCarthy. 2011. "Translation Initiation: Variations in the Mechanism Can Be Anticipated." *Cellular and Molecular Life Sciences* 68 (6): 991–1003. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0588-z>.
- Mandal, Maumita, and Ronald R. Breaker. 2004. "Gene Regulation by Riboswitches." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5 (6): 451–63. <https://doi.org/10.1038/nrm1403>.
- Marintchev, Assen, and Gerhard Wagner. 2004. "Translation Initiation: Structures, Mechanisms and Evolution." *Quarterly Reviews of Biophysics* 37 (3–4): 197–284. <https://doi.org/10.1017/S0033583505004026>.
- Martin, William F, Sriram Garg, Verena Zimorski, and William F Martin. 2015. "Endosymbiotic Theories for Eukaryote Origin." *Philosophical Transactions B* 370 (1678): 1–17. <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0330>.
- Martin, William, and Eugene V. Koonin. 2006. "A Positive Definition of Prokaryotes." *Nature* 442 (7105): 868. <https://doi.org/10.1038/442868c>.
- Mawn, Mary V, Maurille J Fournier, David A Tirrell, Thomas L Mason, Mary V Mawn, Maurille J Fournier, David A Tirrell, and Thomas L Mason. 2002. "Depletion of Free 30S Ribosomal Subunits in *Escherichia Coli* by Expression of RNA Containing Shine-Dalgarno-Like Sequences." *Journal of Bacteriology* 184 (2): 494–502. <https://doi.org/10.1128/JB.184.2.494>.

- McLennan, Alexander, Andy Bates, Phil Turner, and Mike White. 2013. *Molekularbiologie*. Wiley-VCH.
- Moine, Hervé, Pascale Romby, Mathias Springer, Marianne Grunberg-Manago, Jean Pierre Ebel, Bernard Ehresmann, and Chantal Ehresmann. 1990. "Escherichia Coli Threonyl-TRNA Synthetase and TRNA-Thr Modulate the Binding of the Ribosome to the Translational Initiation Site of the ThrS mRNA." *Journal of Molecular Biology* 216 (2): 299–310. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80321-3](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80321-3).
- Mullakhanbhai, Moiz F., and Helge Larsen. 1975. "Halobacterium Volcanii Spec. Nov., a Dead Sea Halobacterium with a Moderate Salt Requirement." *Archives of Microbiology* 104 (1): 207–14. <https://doi.org/10.1007/BF00447326>.
- Naphthine, Sawsan, Robert A. Lever, Michael L. Powell, Richard J. Jackson, T. David K. Brown, and Ian Brierley. 2009. "Expression of the VP2 Protein of Murine Norovirus by a Translation Termination-Reinitiation Strategy." *PLoS ONE* 4 (12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008390>.
- Oppenheim, D. S., and C. Yanofsky. 1980. "Translational Coupling during Expression of the Tryptophan Operon of Escherichia Coli." *Genetics* 95 (4): 785–95.
- Osterman, Ilya A., Sergey A. Evfratov, Petr V. Sergiev, and Olga A. Dontsova. 2013. "Comparison of mRNA Features Affecting Translation Initiation and Reinitiation." *Nucleic Acids Research* 41 (1): 474–86. <https://doi.org/10.1093/nar/gks989>.
- Pace, Norman R. 2006. "Time for a Change." *Nature* 441 (7091): 289. <https://doi.org/10.1038/441289a>.
- Pallejà, Albert, Tomàs Reverter, Santiago Garcia-vallvé, and Antoni Romeu. 2009. "PairWise Neighbours Database: Overlaps and Spacers among Prokaryote Genomes." *BMC Genomics* 10 (281): 1–10. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-281>.
- Petersen, Carsten. 1989. "Long-Range Translational Coupling in the RplJL-RpoBC Operon of Escherichia Coli." *Journal of Molecular Biology* 206 (2): 323–32. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(89\)90482-8](https://doi.org/10.1016/0022-2836(89)90482-8).
- Pfeiffer, Friedhelm, Alexander Broicher, Thomas Gillich, Kathrin Klee, José Mejía, Markus Rampp, and Dieter Oesterhelt. 2008. "Genome Information Management and Integrated Data Analysis with HaloLex." *Archives of Microbiology* 190 (3): 281–99. <https://doi.org/10.1007/s00203-008-0389-z>.
- Platt, Terry. 1986. "Transcription Termination and the Regulation of Gene Expression." *Ann. Rev. Biochem.* 55: 339–72.
- Plückthun, Andreas. 2012. "Ribosome Display: A Perspective." In *Ribosome Display and Related Technologies*, edited by Julie Douthwaite and Ronald Jackson, 805:75–85. Springer Sciences+ Business Media. <https://doi.org/10.1007/978-1-61779-379-0>.
- Powell, Michael L. 2010. "Translational Termination-Reinitiation in RNA Viruses." *Biochemical Society Transactions* 38 (6): 1558–64. <https://doi.org/10.1042/BST0381558>.

- Powell, Michael L., Kendra E. Leigh, Tuija A.A. Pöyry, Richard J. Jackson, T. David K. Brown, and Ian Brierley. 2011. "Further Characterisation of the Translational Termination-Reinitiation Signal of the Influenza B Virus Segment 7 RNA." *PLoS ONE* 6 (2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016822>.
- Prabhakar, Arjun, Mark C. Capece, Alexey Petrov, Junhong Choi, and Joseph D. Puglisi. 2017. "Post-Termination Ribosome Intermediate Acts as the Gateway to Ribosome Recycling." *Cell Reports* 20 (1): 161–72. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.06.028>.
- Qin, Bo, Hiroshi Yamamoto, Takuya Ueda, Umesh Varshney, and Knud H. Nierhaus. 2016. "The Termination Phase in Protein Synthesis Is Not Obligatorily Followed by the RRF/EF-G-Dependent Recycling Phase." *Journal of Molecular Biology* 428 (18): 3577–87. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.05.019>.
- Quax, Tessa E.F., Yuri I. Wolf, Jasper J. Koehorst, Omri Wurtzel, Richard vanderOost, Wenqi Ran, Fabian Blombach, *et al.* 2013. "Differential Translation Tunes Uneven Production of Operon-Encoded Proteins." *Cell Reports* 4 (5): 938–44. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.07.049>.
- Rabilloud, Thierry, Gilles Carpentier, and Ohilippe Tarroux. 1988. "Improvement and Simplification of Low-Background Silver Staining of Proteins by Using Sodium Dithionite." *Elektrophoresis* 9 (6): 288–91. <https://doi.org/10.1002/elps.1150090608>.
- Reeve, John N., and Ruth A. Schmitz. 2005. "Biology, Biochemistry and the Molecular Machinery of Archaea." *Current Opinion in Microbiology* 8 (6): 627–29. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2005.10.017>.
- Rex, G., B. Surin, G. Besse, B. Schneppe, and J. E.G. McCarthy. 1994. "The Mechanism of Translational Coupling in *Escherichia Coli*. Higher Order Structure in the *AtpHA* mRNA Acts as a Conformational Switch Regulating the Access of de Novo Initiating Ribosomes." *Journal of Biological Chemistry* 269 (27): 18118–27.
- Ringquist, Steven, Sidney Shineding, Doug Barrick, Louis Green, Jonathan Binkley, Gary D Stormo, and Gold. 1992. "Translation Initiation in *Escherichia Coli*: Sequences within the Ribosome-Binding Site." *Molecular Microbiology* 6 (9): 1219–29. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1992.tb01561.x>.
- Rizzo, Guerino. 2018. "Untersuchung Der Translationstermination-Reinitiation an Überlappenden Genpaaren in *Haloferax Volcanii*." Goethe Universität Frankfurt am Main.
- Saito, Kazuki, Rachel Green, and Allen R. Buskirk. 2020. "Translational Initiation in *E. Coli* Occurs at the Correct Sites Genome-Wide in the Absence of mRNA-RRNA Base-Pairing." *ELife* 9: 1–19. <https://doi.org/10.7554/eLife.55002>.
- Salis, Howard M., Ethan A. Mirskwy, and Christopher A. Voigt. 2009. "Automated Design of Synthetic Ribosome Binding Sites to Precisely Control Protein Expression." *Nature Biotechnology* 27 (10): 946–50. <https://doi.org/10.1038/nbt.1568.Automated>.

- Santangelo, Thomas J, L Cubonova, Katherine M Skinner, and John N Reeve. 2009. "Archaeal Intrinsic Transcription Termination In Vivo." *Journal of Bacteriology* 191 (22): 7102–8. <https://doi.org/10.1128/JB.00982-09>.
- Schägger, Hermann. 2006. "Tricine-SDS-PAGE." *Nature Protocols* 1 (1): 16–22. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.4>.
- Schmitt, Marion, Ulrike Manderschied, Apostolos Kyriatsoulis, and Ute Bkinckmann. 1980. "Tetranucleotides as Effectors for the Binding of Initiator TRNA to *Escherichia Coli* Ribosomes." *J. Biochem.* 109: 291–99.
- Schrader, Jared M, Bo Zhou, Gene-wei Li, Keren Lasker, W Seth Childers, Brandon Williams, Tao Long, *et al.* 2014. "The Coding and Noncoding Architecture of the *Caulobacter Crescentus* Genome" 10 (7): e1004463. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004463>.
- Schümperli, Daniel, Keith McKenney, Donna A. Sobieski, and Martin Rosenberg. 1982. "Translational Coupling at an Intercistronic Boundary of the *Escherichia Coli* Galactose Operon." *Cell* 30 (3): 865–71. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(82\)90291-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(82)90291-4).
- Selinger, Douglas W, Rini Mukherjee Saxena, Kevin J Cheung, George M Church, and Carsten Rosenow. 2003. "Global RNA Half-Life Analysis in *Escherichia Coli* Reveals Positional Patterns of Transcript Degradation." *Genome Research* 13 (2): 216–23. <https://doi.org/10.1101/gr.912603>.
- Shieh, Yu Wei, Pablo Minguez, Peer Bork, Josef J. Auburger, D. Lys Guilbride, Günter Kramer, and Bernd Bukau. 2015. "Operon Structure and Cotranslational Subunit Association Direct Protein Assembly in Bacteria." *Science* 350 (6261): 678–80. <https://doi.org/10.1126/science.aac8171>.
- Shimizu, Yoshiro, Yukihide Tomari, Tsutomu Suzuki, Takashi Yokogawa, Kazuya Nishikawa, and Takuya Ueda. 2001. "Cell-Free Translation Reconstituted with Purified Components." *Nature Biotechnology* 19 (8): 751–55. <https://doi.org/10.1038/90802>.
- Shine, J, and L Dalgarno. 1973. "The 3'-Terminal Sequence of *Escherichia Coli* 16S Ribosomal RNA: Complementarity to Nonsense Triplets and Ribosome Binding Sites." *Proc Natl Acad Sci U S A* 71 (4): 1342–46.
- Shiryaev, Vyacheslav M, Olga M Selivanova, Thomas Hartsch, Igor V Nazimov, and Alexander S Spirin. 2002. "Ribosomal Protein S1 from *Thermus Thermophilus* : Its Detection , Identification and Overproduction 1." *FEBS Letters* 525 (2635): 88–92. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(02\)03092-2](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(02)03092-2).
- Slupska, Malgorzata M, Angela G King, Sorel Fitz-gibbon, John Besemer, Mark Borodovsky, and Jeffrey H Miller. 2001. "Leaderless Transcripts of the Crenarchaeal Hyperthermophile *Pyrobaculum Aerophilum*." *J Mol Biol.* 309: 347–60. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.4669>.
- Soppa, Jörg. 2006. "From Genomes to Function: Haloarchaea as Model Organisms." *Microbiology* 152 (3): 585–90. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28504-0>.

- Spanjaard, Remco A., and Jan van Duin. 1989. "Translational Reinitiation in the Presence and Absence of a Shine and Dalgarno Sequence." *Nucleic Acids Research* 17 (14): 5501–7. <https://doi.org/10.1093/nar/17.14.5501>.
- Storz, Gisela, Jason A. Opdyke, and Aixia Zhang. 2004. "Controlling mRNA Stability and Translation with Small, Noncoding RNAs." *Current Opinion in Microbiology* 7 (2): 140–44. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2004.02.015>.
- Tian, Tian, and Howard M. Salis. 2015. "A Predictive Biophysical Model of Translational Coupling to Coordinate and Control Protein Expression in Bacterial Operons." *Nucleic Acids Research* 43 (14): 7137–51. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv635>.
- Tollerson, Rodney II, and Michael Ibba. 2020. "Translational Regulation of Environmental Adaptation in Bacteria" 295 (13): 10434–45. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV120.012742>.
- Vimberg, Vladimir, Age Tats, Maida Remm, and Tanel Tenson. 2007. "Translation Initiation Region Sequence Preferences in *Escherichia Coli*." *BMC Molecular Biology* 8: 1–13. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-8-100>.
- Vogtmann, Kristina. 2015. "Translationsinitiation an Distalen Genen Polycistronischer Transkripte in *E. Coli*." Goethe Universität Frankfurt am Main.
- Way, Susan M Van, Edan R Hosking, Timothy F Braun, and Michael D Manson. 2000. "Mot Protein Assembly into the Bacterial Flagellum: A Model Based on Mutational Analysis of the *MotB* Gene." *JMB* 297 (1): 7–24. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.3548>.
- Wegener, Marius, Kristina Vogtmann, Madeleine Huber, Sebastian Laass, and Jörg Soppa. 2016. "The *GlpD* Gene Is a Novel Reporter Gene for *E. Coli* That Is Superior to Established Reporter Genes like *LacZ* and *GusA*." *Journal of Microbiological Methods* 131: 181–87. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.10.015>.
- White, Malcolm F. 2011. "Homologous Recombination in the Archaea: The Means Justify the Ends." *Biochemical Society Transactions* 39 (1): 15–19. <https://doi.org/10.1042/BST0390015>.
- Willey, Joanne M, Linda Sherwood, Christopher J. Woolverton, and Lansing M Prescott. 2008. *Prescott, Harley, and Klein's Microbiology*. New York: McGraw-Hill Higher Education.
- Williams, Tom A, Peter G Foster, Cymon J Cox, and T Martin Embley. 2013. "An Archaeal Origin of Eukaryotes Supports Only Two Primary Domains of Life." *Nature* 504 (7479): 231–36. <https://doi.org/10.1038/nature12779>.
- Wilson, Joan E, Marguerite J Powell, and Susan E Hoover. 2000. "Naturally Occurring Dicistronic Cricket Paralysis Virus RNA Is Regulated by Two Internal Ribosome Entry Sites." *Molecular and Cellular Biology* 20 (14): 4990–99.
- Winkler, Wade, Ali Nahvi, and Ronald R. Breaker. 2002. "Thiamine Derivatives Bind Messenger RNAs Directly to Regulate Bacterial Gene Expression." *Nature* 419 (6910): 952–56. <https://doi.org/10.1038/nature01145>.

- Woese, C. R., O. Kandler, and M. L. Wheelis. 1990. "Towards a Natural System of Organisms: Proposal for the Domains Archaea, Bacteria, and Eucarya." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (12): 4576–79. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.12.4576>.
- Wu, Xia, Keith Fraser, Jian Zha, and Jonathan S Dordick. 2018. "Biological and Medical Applications of Materials and Interfaces Flexible Peptide Linkers Enhance the Antimicrobial Activity of Surface Immobilized Bacteriolytic Enzymes Flexible Peptide Linkers Enhance the Antimicrobial Activity of Surface Immobilized Bac." *Applied Materials and Interfaces* 10 (43): 36746–56. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b14411>.
- Wurtzel, Omri, Rajat Sapra, Feng Chen, Yiwen Zhu, Blake A. Simmons, and Rotem Sorek. 2010. "A Single-Base Resolution Map of an Archaeal Transcriptome." *Genome Research* 20 (1): 133–41. <https://doi.org/10.1101/gr.100396.109>.
- Yamamoto, Hiroshi, Daniela Wittek, Romi Gupta, Bo Qin, Takuya Ueda, Roland Krause, Kaori Yamamoto, Renate Albrecht, Markus Pech, and Knud H. Nierhaus. 2016. "70S-Scanning Initiation Is a Novel and Frequent Initiation Mode of Ribosomal Translation in Bacteria." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113 (9): E1180–89. <https://doi.org/10.1073/pnas.1524554113>.
- Yoo, Jae Ho, and Uttam L. RajBhandary. 2008. "Requirements for Translation Re-Initiation in *Escherichia Coli*: Roles of Initiator tRNA and Initiation Factors IF2 and IF3." *Molecular Microbiology* 67 (5): 1012–26. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06104.x>.

VII. Anhang

1. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bezeichnung
AP	Alkalische Phosphatase
Amp	Ampicillin
AraDH	Arabinose-Dehydrogenase
ATP	Adenosintriphosphat
β-Gal	β-Galaktosidase
BCA	Bicinchoninsäure Assay
Bp	Basenpaare
CAT	Chloramphenicol-Acetyltransferase
Co-A	Coenzym-A
dig-dUTPs	Digoxigeninmarkiertes desoxiribo-Uraciltriphosphat
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
DHF	Dihydrofolat
DHFR	Dihydrofolat-Reduktase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>et al.</i>	<i>et alia</i>
<i>Fw</i>	<i>forward</i>
gDNA	genomische DNA
GlpD	Glycerin-3-Phosphat Dehydrogenase
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
GusA	β-Glucuronidase
G3P	Glycerin-3-Phosphat
<i>H. volcanii</i>	<i>Haloferax volcanii</i>
inkl.	inklusive
IRES	Interne ribosomale Eintrittsstelle
iSD	Intragene Shine-Dalgarno Sequenz
Kan	Kanamycin
MCS	<i>multiple cloning site</i>

Abkürzung	Bezeichnung
NADP+	Nicotinamidadeninukleotidphosphat (oxidierte Form)
mRNA	Messenger RNA
MTT	3-(4,5- Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NADPH	Nicotinamidadeninukleotidphosphat (reduzierte Form)
Nt	Nukleotide
ORF	<i>Open reading frame</i>
ORI	<i>Origin of replication</i>
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PMS	Phenazin-Methanosulfat
pNPG	p-Nitrophenyl- β -D-Glucopyranosid
Pol	Polymerase
RBS	Ribosomenbindestelle
qRT-PCR	<i>Real-Time quantitative PCR</i>
RE	Restriktionsenzym
<i>Rev</i>	<i>reverse</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNaseE	RibonukleaseE
RRF	Ribosomen Recycling Faktor
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
SD	Shine-Dalgarno
TeRe	Termination-Reinitiation
TIR	Translations-Initiations-Region
tRNA	transfer RNA
UTNI	<i>upstream translation dependent de novo Initiation</i>
UTR	<i>Untranslated Region</i>
UV	Ultraviolett

2. Abbildungen und Tabellen

Anhang 1 Plasmide mit ihrer Nummerierung, Namen und Beschreibung. Während die Plasmide 1 und 2 von Sebastian Laass gestellt wurden sind alle folgenden Plasmide in dieser Arbeit konstruiert worden.

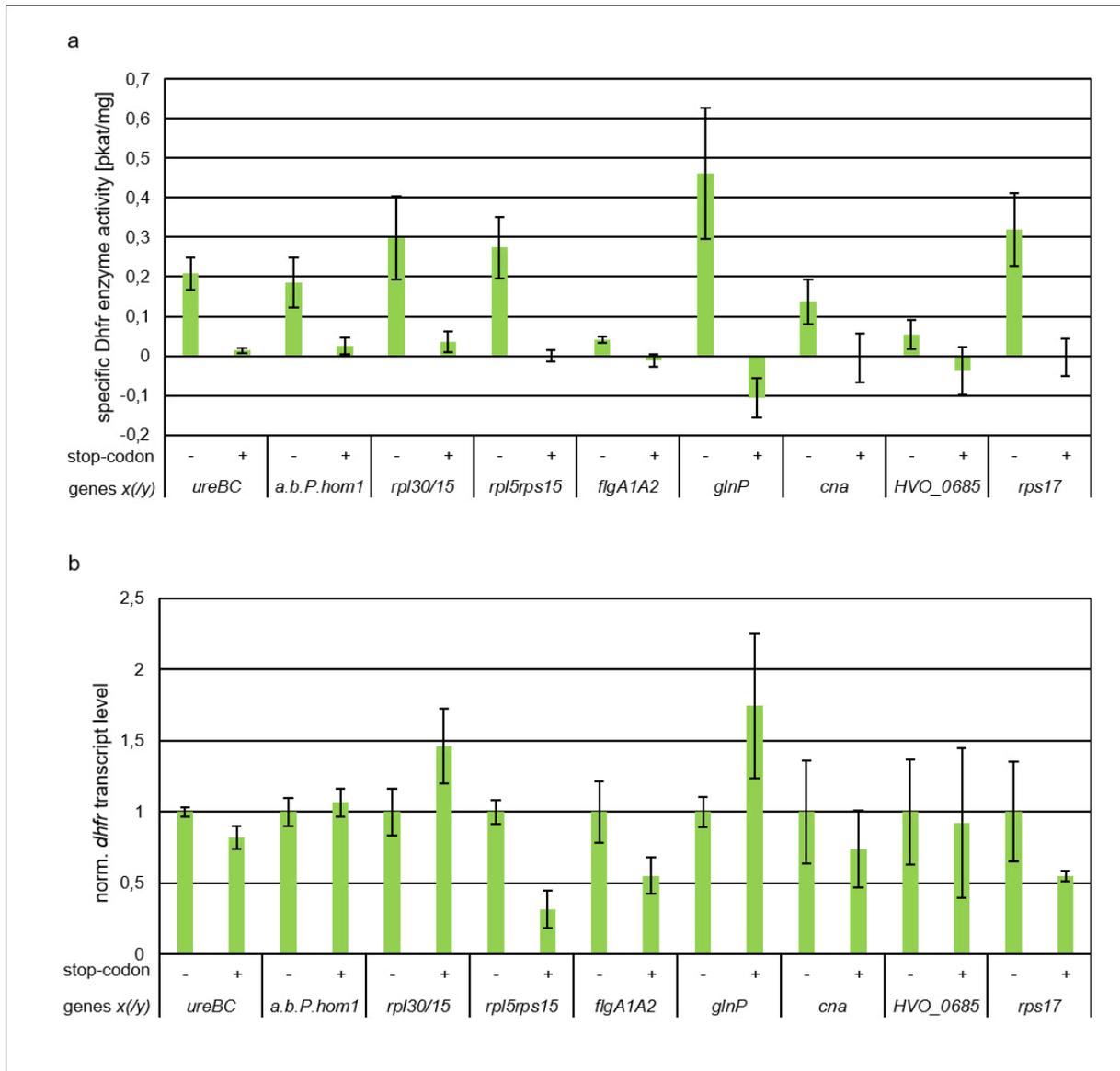
#	Name	Beschreibung
1	pSLRI (-) F.	pSL Derivat. AraP <i>glpD</i> (ohne Stop) und <i>gusA</i> (mit Linker)
2	pSLRI (N) F.	pSL Derivat. AraP <i>glpD</i> (natives Stop) und <i>gusA</i> (mit Linker)
3	pSLRI- <i>astDB</i>	pSL Derivat. AraP <i>glpD</i> -Fusion mit 99 Nt <i>astD</i> (NcoI) und <i>gusA</i> fusion mit 30 Nt <i>astB</i> (XhoI); Amp. Resistenz
4	pSLRI- <i>astDB</i> -SD0	pSL Derivat. AraP <i>glpD</i> -Fusion mit 99 Nt <i>astD</i> und <i>gusA</i> -Fusion mit 30 Nt <i>astB</i> ; Mutation zu SD0; Amp. Resistenz
5	pSK- <i>astDB</i> -SD0	pSK Derivat. AraP 99 Nt <i>astD</i> und 30 Nt <i>astB</i> ; Mutation zu SD0; Amp. Resistenz
6	pSK- <i>astDB</i>	pSK 99 Nt <i>astD</i> / 30 Nt <i>ast B</i> NcoI und XhoI Schnittstellen; Amp. Resistenz
7	pSLRI- <i>bioBF</i> (N)	pSL Derivat. AraP <i>glpD</i> (natives Stop)-Fusion mit 99 Nt <i>bioB</i> (NcoI) und <i>gusA</i> -Fusion mit 30 Nt <i>bioF</i> (XhoI); Amp. Resistenz
8	pSLRI- <i>bioBF</i> -SD0	pSL Derivat. AraP <i>glpD</i> -Fusion mit 99 Nt <i>bioB</i> und <i>gusA</i> -Fusion mit 30 Nt <i>bioF</i> ; Mutation zu SD0; Amp. Resistenz
9	pSK- <i>bioBF</i>	pSK 99 Nt <i>bioB</i> / 30 Nt <i>bioF</i> NcoI und XhoI Schnittstellen; Amp. Resistenz
10	pSLRI- <i>menDH</i> (-)	pSL Derivat. AraP <i>glpD</i> (ohne Stop)-Fusion mit 99 Nt <i>menD</i> (NcoI) und <i>gusA</i> -Fusion mit 30 Nt <i>menH</i> (XhoI); Amp. Resistenz
11	pSLRI- <i>menDH</i> (N)	pSL Derivat. AraP <i>glpD</i> (natives Stop)-Fusion mit 99 Nt <i>menD</i> (NcoI) und <i>gusA</i> -Fusion mit 30 Nt <i>menH</i> (XhoI); Amp. Resistenz
12	pSLRI- <i>menDH</i> -SD0	pSL Derivat. AraP <i>glpD</i> -Fusion mit 99 Nt <i>menD</i> und <i>gusA</i> -Fusion mit 30 Nt <i>menH</i> ; Mutation zu SD0; Amp. Resistenz
13	pSK- <i>menDH</i>	pSK 99 Nt <i>menD</i> / 30 Nt <i>menH</i> NcoI und XhoI Schnittstellen; Amp. Resistenz
14	pSLRI- <i>hyfHI</i> (-)	pSL Derivat. AraP <i>glpD</i> (ohne Stop)-Fusion mit 99 Nt <i>hyfH</i> (NcoI) und <i>gusA</i> -Fusion mit 30 Nt <i>hyfI</i> (XhoI); Amp.

#	Name	Beschreibung
15	pSLRI- <i>hyfHI</i> (N)	pSL Derivat. AraP <i>glpD</i> (natives Stop)-Fusion mit 99 Nt <i>hyfH</i> (NcoI) und <i>gusA</i> -Fusion mit 30 Nt <i>hyfI</i> (XhoI); Amp. Resistenz
16	pSLRI- <i>hyfHI</i> -SD0	pSL Derivat. AraP <i>glpD</i> -Fusion mit 99 Nt <i>hyfH</i> und <i>gusA</i> -Fusion mit 30 Nt <i>hyfI</i> ; Mutation zu SD0; Amp. Resistenz
17	pSK- <i>hyfHI</i> -SD0	pSK Derivat. AraP 99 Nt <i>hyfH</i> und 30 Nt <i>hyfI</i> ; Mutation zu SD0; Amp. Resistenz
18	pSK- <i>hyfHI</i>	pSK 99 Nt <i>hyfH</i> / 30 Nt <i>hyfI</i> NcoI und XhoI Schnittstellen; Amp. Resistenz
19	pSLRI- <i>ydbHynbE</i> (-)	pSL Derivat. AraP <i>glpD</i> (ohne Stop)-Fusion mit 99 Nt <i>ydbH</i> (NcoI) und <i>gusA</i> -Fusion mit 30 Nt <i>ynbE</i> (XhoI); Amp. Resistenz
20	pSLRI- <i>ydbHynbE</i> (N)	pSL Derivat. AraP <i>glpD</i> (natives Stop)-Fusion mit 99 Nt <i>ydbH</i> (NcoI) und <i>gusA</i> -Fusion mit 30 Nt <i>ynbE</i> (XhoI); Amp. Resistenz
21	pSLRI- <i>ydbHynbE</i> -SD0	pSL Derivat. AraP <i>glpD</i> -Fusion mit 99 Nt <i>ydbH</i> und <i>gusA</i> -Fusion mit 30 Nt <i>ynbE</i> ; Mutation zu SD0; Amp. Resistenz
22	pSK- <i>ydbHynbE</i>	pSK 99 Nt <i>ydbH</i> / 30 Nt <i>ynbE</i> NcoI und XhoI Schnittstellen; Amp. Resistenz
23	pSLRI (-) <i>rplJ</i>	pSL Derivat. AraP <i>glpD</i> (ohne Stop)-Fusion mit 99 Nt <i>rpl</i> und <i>gusA</i> -Fusion mit 30 Nt <i>rpJ</i> ; Amp. Resistenz
24	pSLRI (N) <i>rplJ</i>	pSL Derivat. AraP <i>glpD</i> (natives Stop)-Fusion mit 99 Nt <i>rpl</i> und <i>gusA</i> -Fusion mit 30 Nt <i>rpJ</i> ; Amp. Resistenz
25	pPL23- <i>csgB-gusA</i>	pPL Derivat. <i>csgB</i> 5'-UTR an <i>gusA</i> Reporter; Amp. Resistenz (Ursprung Petra L.)
26	pSK- <i>gapA</i>	pSK Derivat. <i>gapA</i> 5'-UTR; Amp. Resistenz
27	pAG3- <i>gapA-gusA</i>	pPL Derivat. <i>gapA</i> 5'-UTR an <i>gusA</i> Reporter; Amp. Resistenz (Ursprung Alessandra G.)
28	pDT- <i>cmK-gusA</i>	pDT Derivat. <i>cmK</i> 5'-UTR an <i>gusA</i> Reporter; Amp. Resistenz (Ursprung Dragan T.)
29	pSK- <i>cmK</i> SD0	pSK Derivat. <i>cmK</i> 5'-UTR mit mutierter SD0; Amp. Resistenz

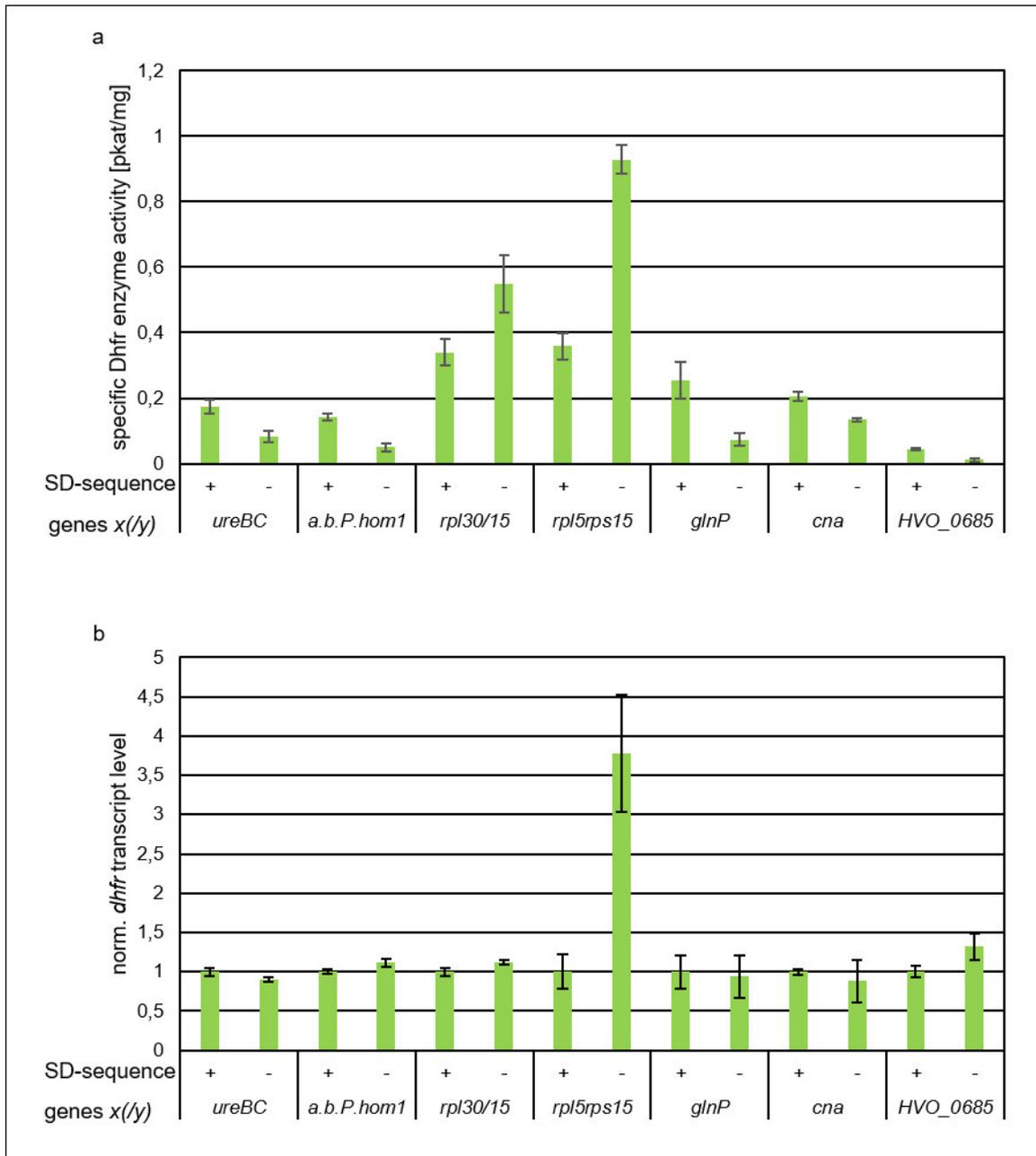
#	Name	Beschreibung
30	pSK- <i>fumC</i> SD0	pSK Derivat. <i>fumC</i> 5'-UTR mit mutierter SD0; Amp. Resistenz
31	pSK- <i>fumC</i>	pSK Derivat. <i>fumC</i> 5'-UTR; Amp. Resistenz
32	pSK- <i>guaB</i> SD0	pSK Derivat. <i>guaB</i> 5'-UTR mit mutierter SD0; Amp. Resistenz
33	pSK-T7- <i>cmK</i>	pSK Derivat. T7 RNA Polymerase Bindestelle; <i>cmK</i> 5'-UTR; Amp. Resistenz
34	pSK- <i>cmK-ydbH</i> ctrl	pSK Derivat . T7 Polymerase Bindestelle; <i>cmK</i> 5'-UTR und <i>ydbH</i> Abschnitt mit Bindestelle für Fluoreszenz Oligo; Amp. Resistenz
35	pSK- <i>cmK-ydbHynbE</i>	pSK Derivat . T7 Polymerase Bindestelle; <i>cmK</i> 5'-UTR und <i>ydbH/ynbE</i> mit Bindestelle für Fluoreszenz Oligo; Amp. Resistenz
36	pSK-30SfRNA-groß	pSK Derivat. T7 Polymerase Bindestelle; 30S fRNA Sequenz; Amp. Resistenz
37	pSK- <i>rplI</i> (L9)	pSK Derivat. <i>rplI</i> (L9) über XhoI und Sall kloniert. NcoI und BamHI für Umklonierung; Amp. Resistenz
38	pSK- <i>rplI</i> (L9) QC	pSK Derivat. <i>rplI</i> (L9) Leu zu Cys Austausch an Position 75; Amp. Resistenz
39	pQE60- <i>rplI</i> (L9)	pQE60 Derivat. <i>rplI</i> (L9) über NcoI und BamHI kloniert; T5 Promotor C-Terminaler 6xHis-Tag; Amp. Resistenz
40	pQE60-T7- <i>rplI</i> (L9)	pQE60 Derivat. <i>rplI</i> (L9) über NcoI und BamHI kloniert; T7 Promotor C-Terminaler 6xHis-Tag; Amp. Resistenz
41	pQE60-blaP- <i>rplI</i> (L9)	pQE60 Derivat. <i>rplI</i> (L9) über NcoI und BamHI kloniert; blaP Promotor C-Terminaler 6xHis-Tag; Amp. Resistenz
42	pSK- <i>rpmG</i> (L33)	pSK Derivat. <i>rpmG</i> (L33) über XhoI und Sall kloniert; NcoI und BamHI; Amp. Resistenz
43	pSK- <i>rpmG</i> (L33) QC	pSK Derivat. <i>rpmG</i> (L33) Lys zu Cys Austausch an Position 29; Amp. Resistenz
44	pQE60- <i>rpmG</i> (L33)	pQE60 Derivat. <i>rpmG</i> (L33) über NcoI und BamHI kloniert; T5 Promotor C-Terminaler 6xHis-Tag; Amp.. Resistenz

#	Name	Beschreibung
45	pQE60-T7- <i>rpmG</i> (L33)	pQE60 Derivat. <i>rpmG</i> (L33) über NcoI und BamHI kloniert; T7 Promotor C-Terminaler 6xHis-Tag; Amp. Resistenz
46	pQE60- <i>blaP-rpmG</i> (L33)	pQE60 Derivat. <i>rpmG</i> (L33) über NcoI und BamHI kloniert; <i>blaP</i> Promotor C-Terminaler 6xHis-Tag; Amp. Resistenz
47	pSK- <i>rpsF</i> (S6)	pSK Derivat. <i>rpsF</i> (S6) über XhoI und Sall kloniert. NcoI und BamHI; Amp. Resistenz
48	pSK- <i>rpsF</i> (S6) QC	pSK Derivat. <i>rpsF</i> (S6) Asp zu Cys austausch an Position 41; Amp. Resistenz
49	pQE60- <i>rpsF</i> (S6)	pQE60 Derivat. <i>rpsF</i> (S6) über NcoI und BamHI kloniert; T5 Promotor C-Terminaler 6xHis-Tag; Amp. Resistenz
50	pQE60-T7- <i>rpsF</i> (S6)	pQE60 Derivat. <i>rpsF</i> (S6) über NcoI und BamHI kloniert; T7 Promotor C-Terminaler 6xHis-Tag; Amp. Resistenz
51	pQE60- <i>blaP-rpsF</i> (S6)	pQE60 Derivat. <i>rpsF</i> (S6) über NcoI und BamHI kloniert; <i>blaP</i> Promotor C-Terminaler 6xHis-Tag; Amp. Resistenz
52	pSK- <i>rpsM</i> (S13) QC.10	pSK Derivat. <i>rpsM</i> (S13) Asp zu Cys Austausch an Position 10; Amp. Resistenz
53	pSK- <i>rpsM</i> (S13) QC.85	pSK Derivat. <i>rpsM</i> (S13) Cys zu Ser Austausch an Position 85; Amp. Resistenz
54	pSK- <i>rpsM</i> (S13)	pSK Derivat. <i>rpsM</i> (S13) über XhoI und Sall kloniert. NcoI und BamHI; Amp. Resistenz
55	pSK- <i>rpsM</i> (13) QC85.10	pSK Derivat. <i>rpsM</i> (S13) Cys an Position 10 und Ser an Position 85; Amp. Resistenz
56	pQE60- <i>rpsM</i> (S13)	pQE60 Derivat. <i>rpsM</i> (S13) über NcoI und BamHI kloniert; T5 Promotor C-Terminaler 6xHis-Tag; Amp. Resistenz
57	pQE60-T7- <i>rpsM</i> (S13)	pQE60 Derivat. <i>rpsM</i> (S13) über NcoI und BamHI kloniert; T7 Promotor C-Terminaler 6xHis-Tag; Amp. Resistenz
58	pQE60- <i>blaP-rpsM</i> (S13)	pQE60 Derivat. <i>rpsM</i> (S13) über NcoI und BamHI kloniert; <i>blaP</i> Promotor C-Terminaler 6xHis-Tag; Amp. Resistenz
59	pSK-NEB5'-UTR- <i>ydbH264</i> -NEB3'-UTR-TAA	pSK Derivat. T7 RNA Polymerase Bindestelle; 5'-UTR von NEB Kit- <i>ydbH</i> Abschnitt (264nt) 3'-UTR von NEB Kit - <i>tolA</i> Spacer und TAA; Amp. Resistenz

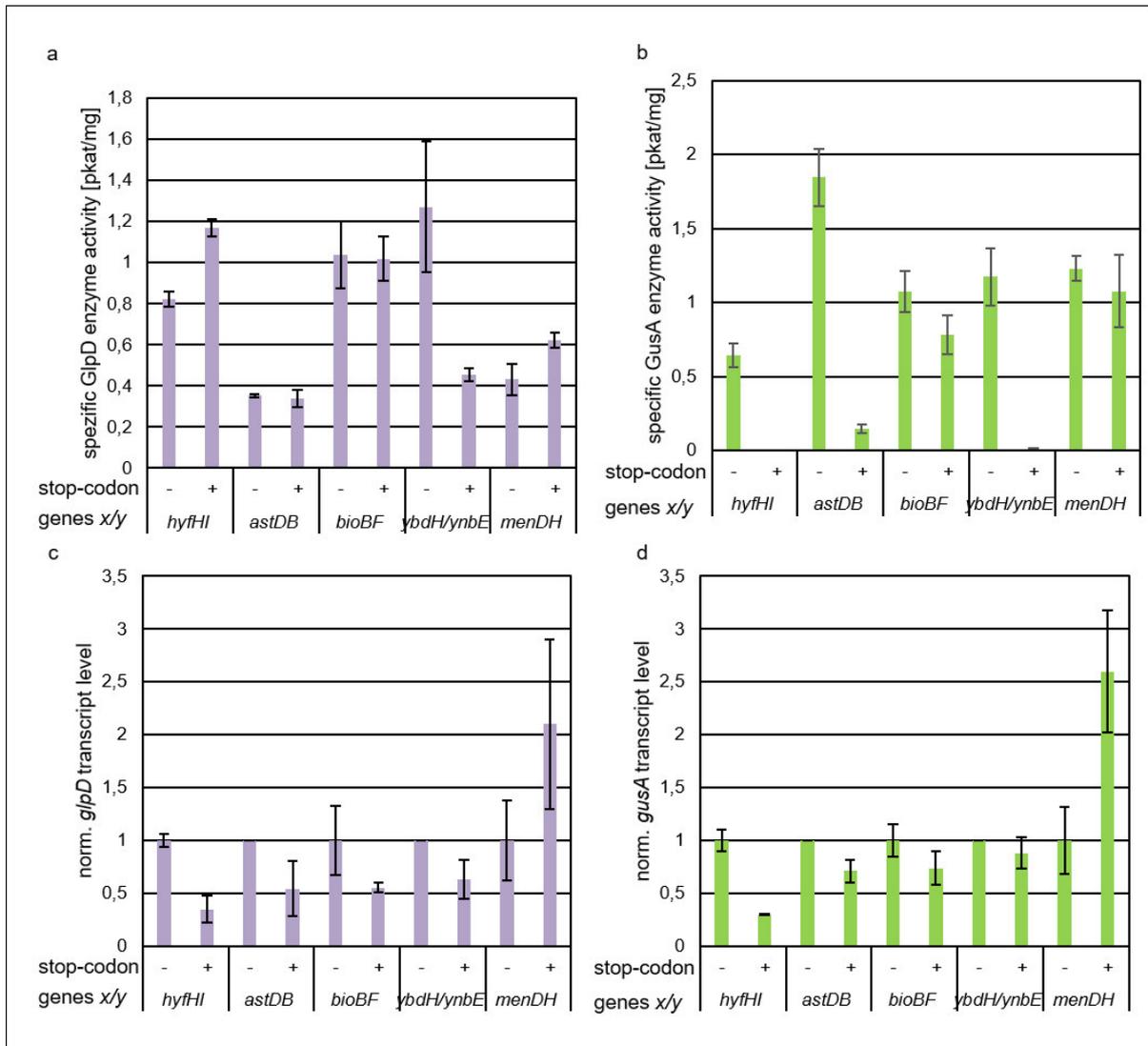
#	Name	Beschreibung
62	pSK-NEB5'-UTR- <i>astD</i> -6H- <i>astB</i> - NEB3'UTR	pSK Derivat. T7 RNA Polymerase Bindestelle; 5'-UTR von NEB Kit. <i>astD</i> -His6- <i>astB</i> Genpaar über XhoI und HindIII; 3'-UTR aus NEB Kit. Amp. Resistenz
63	pSK- <i>menDH</i> wt.	pSK Derivat. 99Nt <i>menD</i> 30Nt <i>menH</i> NcoI und XhoI Schnittstellen
64	pSK- <i>menDH</i> -TGA2	pSK Derivat. 99Nt <i>menD</i> 30Nt <i>menH</i> NcoI und XhoI Schnittstellen. Prämaures Stop-Codon TGA+2
65	pSK- <i>menDH</i> -TGA14	pSK Derivat. 99Nt <i>menD</i> 30Nt <i>menH</i> NcoI und XhoI Schnittstellen. Prämaures Stop-Codon TGA+14
66	pSK- <i>menDH</i> -TGA39	pSK Derivat. 99Nt <i>menD</i> 30Nt <i>menH</i> NcoI und XhoI Schnittstellen. Prämaures Stop-Codon TGA+39
67	pSLRI-Flex- <i>menDH</i> (wt)	pSL Derivat. AraP <i>glpD</i> (ohne Stop)-Fusion mit 99Nt <i>menD</i> (NcoI) und <i>gusA</i> -Fusion mit 30Nt <i>menH</i> (XhoI); Amp. Resistenz
68	pSLRI-Flex- <i>menDH</i> (+2)	pSL Derivat. AraP <i>glpD</i> (ohne Stop)-Fusion mit 99Nt <i>menD</i> (NcoI), prämaures Stop-Codon TGA+2 und <i>gusA</i> -Fusion mit 30Nt <i>menH</i> (XhoI); Amp. Resistenz
69	pSLRI-Flex- <i>menDH</i> (+14)	pSL Derivat. AraP <i>glpD</i> (ohne Stop)-Fusion mit 99Nt <i>menD</i> (NcoI), prämaures Stop-Codon TGA+14 und <i>gusA</i> -Fusion mit 30Nt <i>menH</i> (XhoI); Amp. Resistenz
70	pSLRI-Flex- <i>menDH</i> (+38)	pSL Derivat. AraP <i>glpD</i> (ohne Stop)-Fusion mit 99Nt <i>menD</i> (NcoI), prämaures Stop-Codon TGA+38 und <i>gusA</i> -Fusion mit 30Nt <i>menH</i> (XhoI); Amp. Resistenz
71	pSK-RS-B- <i>glpD</i>	pSK Derivat. Theophyllin-Riboswitch-B an <i>glpD</i> ; Amp. Resistenz



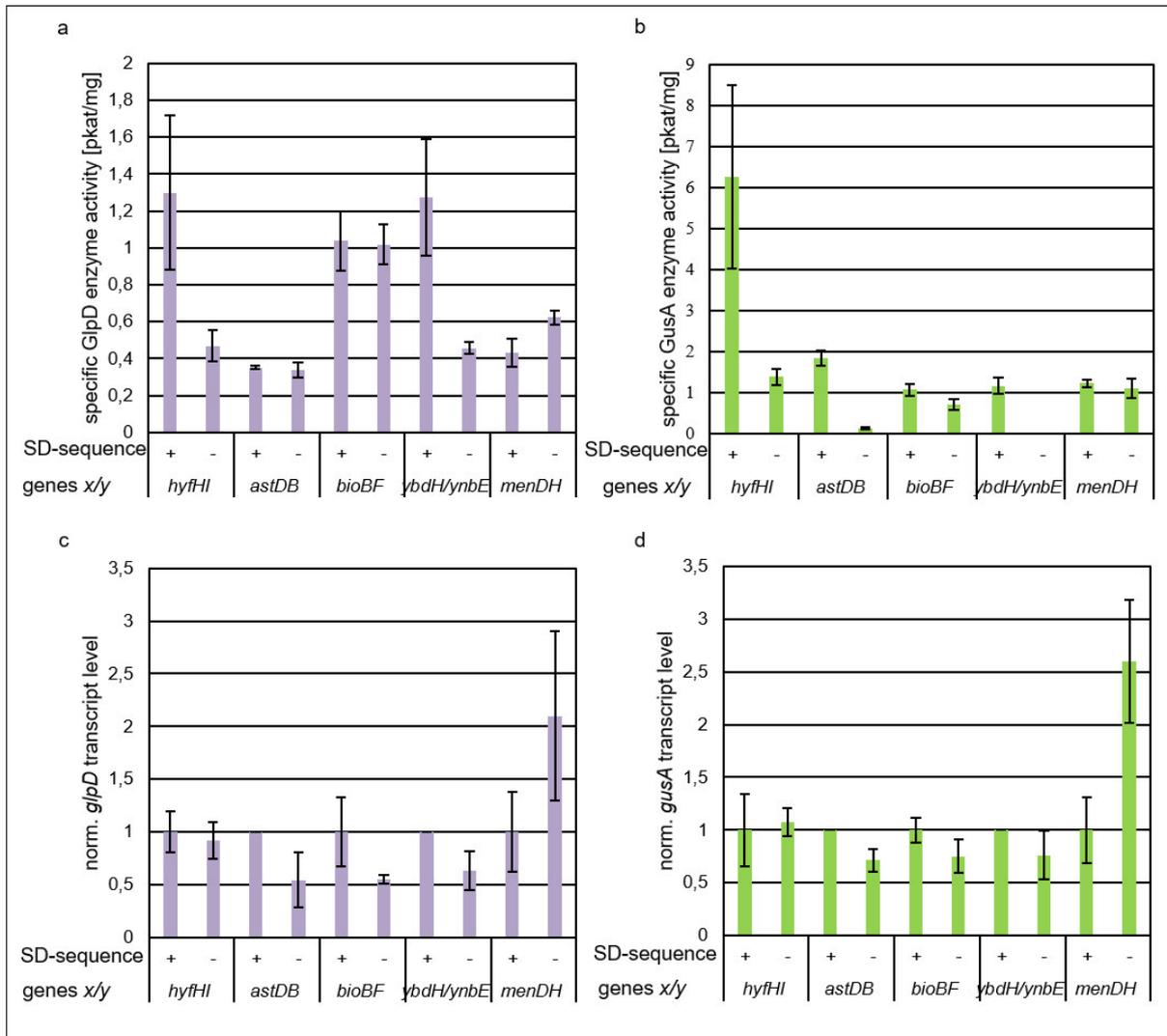
Anhang 2 Enzymaktivität und Transkriptlevel der prämaternen Stop-Codon Varianten aus *H. volcanii*. **a.** Die quantifizierten Enzymaktivitäten in pkat/mg des fusionierten Reportergens *dhfr* sind dargestellt für die analysierten Genpaare in dem jeweiligen Mittelwert von drei biologischen Replikaten und deren Standardabweichung. Verglichen werden jeweils Konstrukte ohne (-) und mit (+) prämaternem Stop-Codon. **b.** Zeigt die Mittelwerte drei biologischer Replikate der quantifizierten *dhfr* Transkriptlevel mit der Standardabweichung, Jeweils normiert auf den Wert des Konstrukts ohne prämaternem Stop-Codon (-). Die Quantifizierung erfolgte mittels ImageJ aus Northern-Blots, welche mit *dhfr* spezifischen Sonden detektiert wurden.



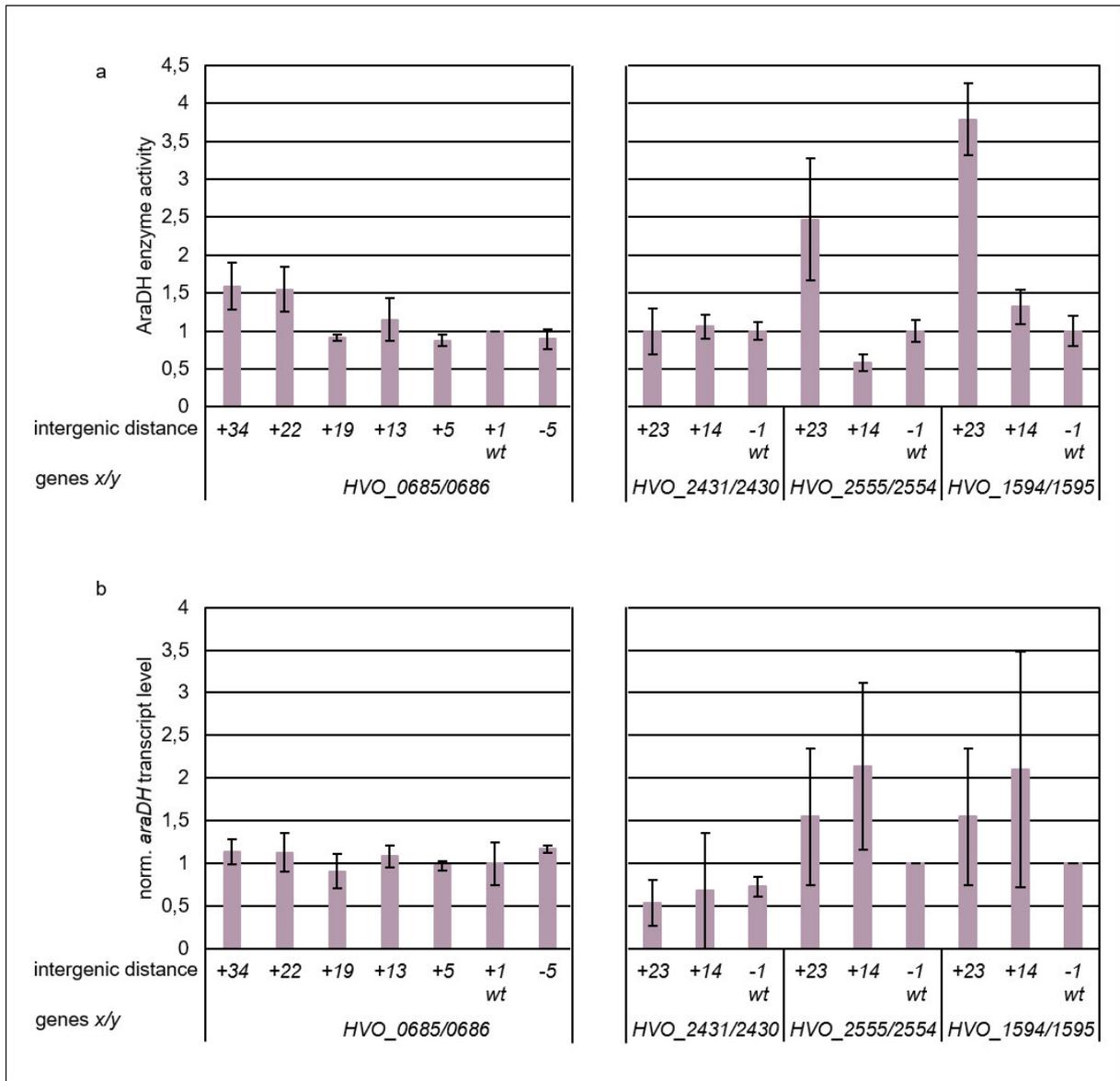
Anhang 3 Dhfr Enzymaktivität sowie Transkriptlevel der SD Mutanten aus *H. volcanii*. **a.** Die quantifizierten Enzymaktivitäten in pkat/mg des fusionierten Reportergens *dhfr* sind dargestellt für die analysierten Genpaare in dem jeweiligen Mittelwert von drei biologischen Replikaten und deren Standardabweichung. Verglichen werden jeweils Konstrukte mit (+) und ohne (-) intergenes SD-Motiv. **b.** Zeigt die Mittelwerte drei biologischer Replikate der quantifizierten *dhfr* Transkriptlevel mit der Standardabweichung, Jeweils normiert auf den Wert des Konstrukts mit SD-Motiv (+). Die Quantifizierung erfolgte mittels ImageJ aus Northern-Blots, welche mit *dhfr* spezifischen Sonden detektiert wurden.



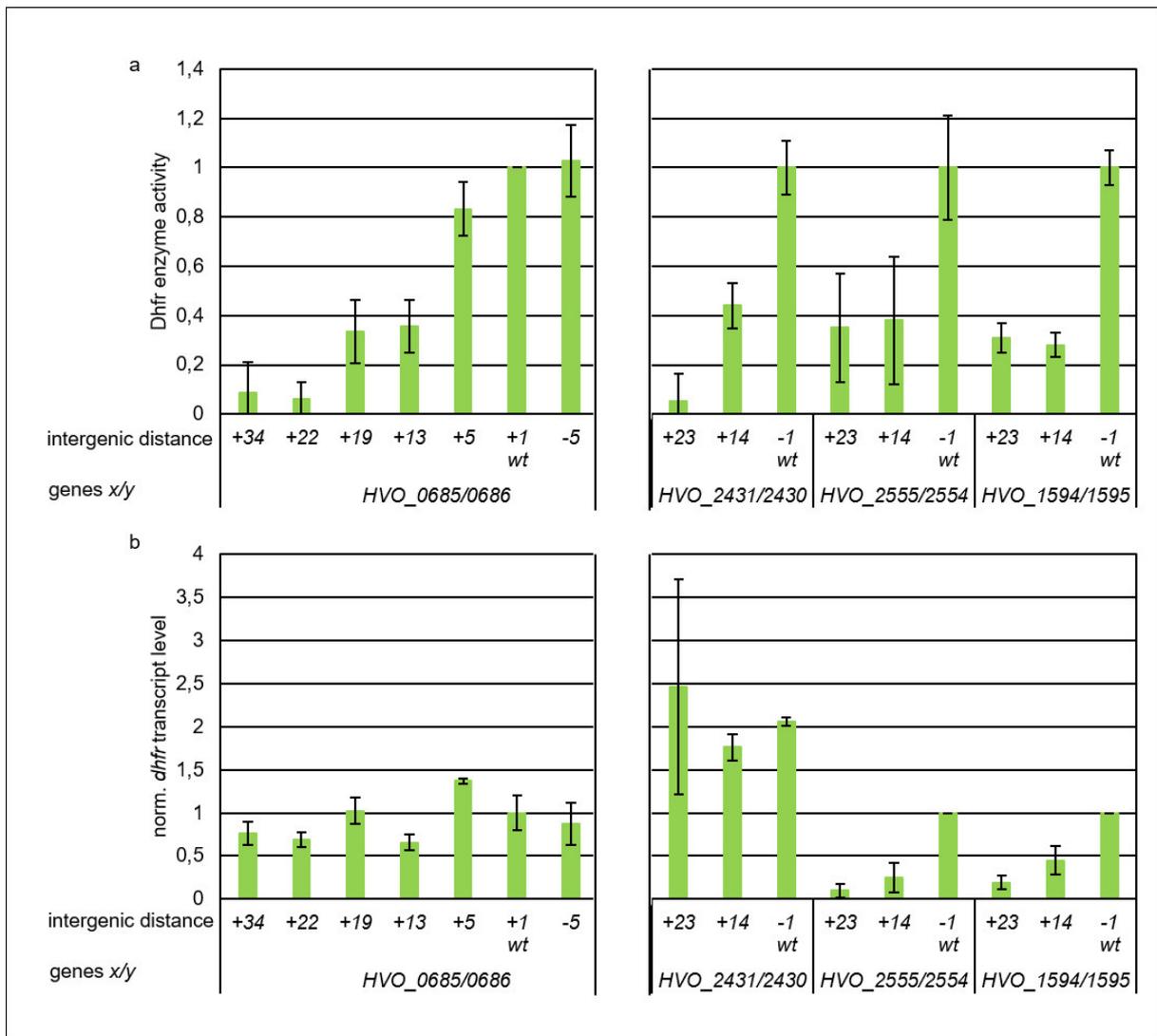
Anhang 4 Enzymaktivität und Transkriptlevel der prämaternen Stop-Codon Varianten aus *E. coli*. **a.** Die quantifizierten Enzymaktivitäten in pkat/mg des fusionierten Reportergens *glpD* sind dargestellt für die analysierten Genpaare in dem jeweiligen Mittelwert von drei biologischen Replikaten und deren Standardabweichung. Verglichen werden jeweils Konstrukte ohne (-) und mit (+) prämaternem Stop-Codon. **b.** Die quantifizierten Enzymaktivitäten in pkat/mg des fusionierten Reportergens *gusA* sind dargestellt für die analysierten Genpaare in dem jeweiligen Mittelwert von drei biologischen Replikaten und deren Standardabweichung. Verglichen werden jeweils Konstrukte ohne (-) und mit (+) prämaternem Stop-Codon. **c.** Zeigt die Mittelwerte drei biologischer Replikate der quantifizierten *glpD* Transkriptlevel mit der Standardabweichung, Jeweils normiert auf den Wert des Konstrukts ohne prämaternem Stop-Codon (-). Die Quantifizierung erfolgte mittels ImageJ aus Northern-Blots, welche mit *glpD* spezifischen Sonden detektiert wurden. **d.** Zeigt die Mittelwerte drei biologischer Replikate der quantifizierten *gusA* Transkriptlevel mit der Standardabweichung, Jeweils normiert auf den Wert des Konstrukts ohne prämaternem Stop-Codon (-). Die Quantifizierung erfolgte mittels ImageJ aus Northern-Blots, welche mit *gusA* spezifischen Sonden detektiert wurden.



Anhang 5 GIpD und GusA Enzymaktivität sowie Transkriptlevel der SD Mutanten in *E. coli*. **a.** Die quantifizierten Enzymaktivitäten in pkat/mg des fusionierten Reportergens *gIpD* sind dargestellt für die analysierten Genpaare in dem jeweiligen Mittelwert von drei biologischen Replikaten und deren Standardabweichung. Verglichen werden jeweils Konstrukte mit (+) und ohne (-) SD-Motive innerhalb der überlappenden Gene. **b.** Die quantifizierten Enzymaktivitäten in pkat/mg des fusionierten Reportergens *gusA* sind dargestellt für die analysierten Genpaare in dem jeweiligen Mittelwert von drei biologischen Replikaten und deren Standardabweichung. Verglichen werden jeweils Konstrukte mit (+) und ohne (-) SD-Motive innerhalb der überlappenden Gene. **c.** Zeigt die Mittelwerte drei biologischer Replikate der quantifizierten *gIpD* Transkriptlevel mit der Standardabweichung, Jeweils normiert auf den Wert des Konstrukts mit SD-Motiv (+). Die Quantifizierung erfolgte mittels ImageJ aus Northern-Blots, welche mit *gIpD* spezifischen Sonden detektiert wurden. **d.** Zeigt die Mittelwerte drei biologischer Replikate der quantifizierten *gusA* Transkriptlevel mit der Standardabweichung, Jeweils normiert auf den Wert des Konstrukts mit SD-Motiv (+). Die Quantifizierung erfolgte mittels ImageJ aus Northern-Blots, welche mit *gusA* spezifischen Sonden detektiert wurden.

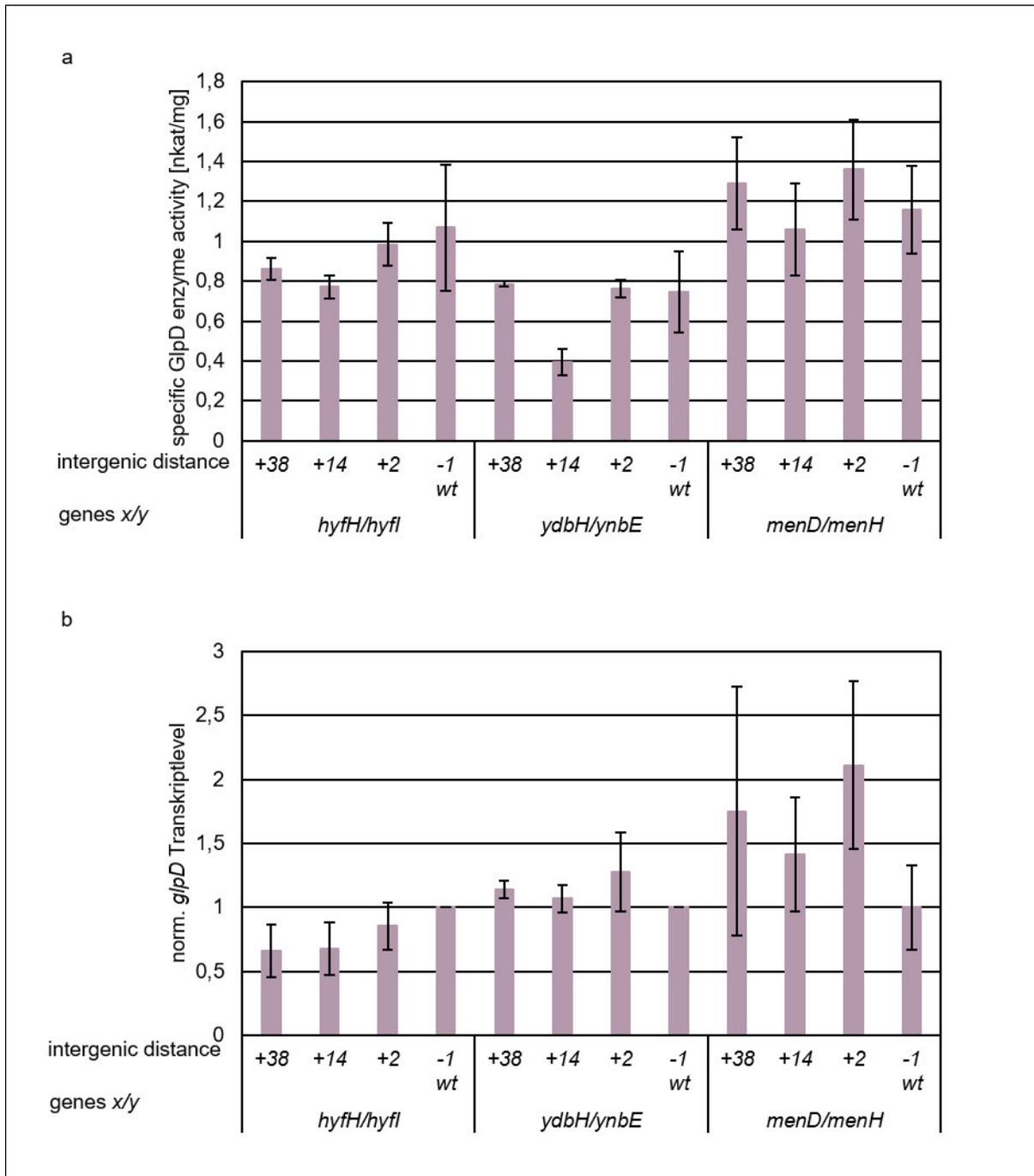


Anhang 6 AraDH Enzymaktivität sowie *araDH* Transkriptlevel der intergenen Bereiche Mutanten in *H. volcanii*. **a.** Links: Die quantifizierten AraDH Enzymaktivitäten für das Genpaar *HVO_0685/0686* sind in pkat/mg im Mittelwert von drei biologischen Replikaten und deren Standardabweichung dargestellt. Der native Abstand ist mit wt markiert, die anderen Konstrukte wurden mit +34, +22, +19, +5 und -5 für den jeweils intergenen Abstand bzw. den Überlapp markiert. Rechts: Die quantifizierten AraDH Enzymaktivitäten für drei weitere Genpaare sind in pkat/mg im Mittelwert von drei biologischen Replikaten und deren Standardabweichung dargestellt. Der native Abstand ist jeweils mit wt markiert. Die anderen Konstrukte wurden mit +23 und +14 für den jeweiligen intergenen Abstand beschriftet. **b.** Links: Die quantifizierten Transkriptlevel für *araDH* sind für das Genpaar *HVO_0685/0686* in jeweils Mittelwerten aus drei biologischen Replikaten und der Standardabweichung gezeigt. Die mittels *araDH* spezifischen Sonden detektierten Transkripte auf einem Northern-Blot wurden mit Hilfe des Programms ImageJ ausgewertet. Der native Abstand ist mit wt markiert, die anderen Konstrukte wurden mit +34, +22, +19, +5 und -5 für den jeweils intergenen Abstand bzw. den Überlapp markiert. Rechts: Die quantifizierten Transkriptlevel für *araDH* sind für drei weitere Genpaare in jeweils Mittelwerten aus drei biologischen Replikaten und der Standardabweichung gezeigt. Die mittels *araDH* spezifischen Sonden detektierten Transkripte auf einem Northern-Blot wurden mit Hilfe des Programms ImageJ ausgewertet. Der native Abstand ist jeweils mit wt markiert. Die anderen Konstrukte wurden mit +23 und +14 für den jeweiligen intergenen Abstand beschriftet.

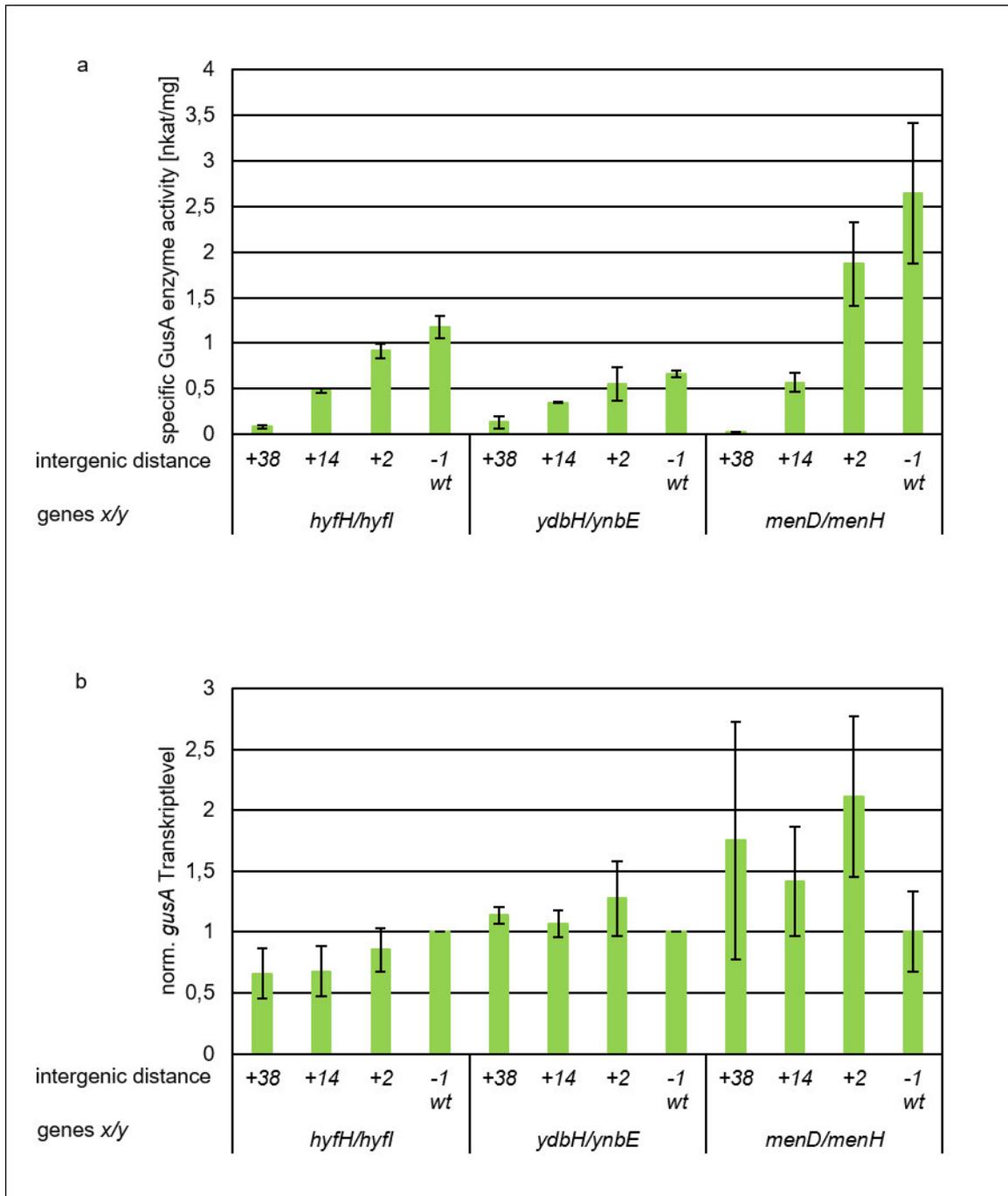


Anhang 7 Dhfr Enzymaktivität sowie *dhfr* Transkriptlevel der intergenen Bereiche Mutanten in *H. volcanii*.

a. Links: Die quantifizierten Dhfr Enzymaktivitäten für das Genpaar *HVO_0685/0686* sind in pkat/mg im Mittelwert von drei biologischen Replikaten und deren Standardabweichung dargestellt. Der native Abstand ist mit wt markiert, die anderen Konstrukte wurden mit +34, +22, +19, +5 und -5 für den jeweils intergenen Abstand bzw. den Überlapp markiert. Rechts: Die quantifizierten Dhfr Enzymaktivitäten für drei weitere Genpaare sind in pkat/mg im Mittelwert von drei biologischen Replikaten und deren Standardabweichung dargestellt. Der native Abstand ist jeweils mit wt markiert. Die anderen Konstrukte wurden mit +23 und +14 für den jeweiligen intergenen Abstand beschriftet. **b.** Links: Die quantifizierten Transkriptlevel für *dhfr* sind für das Genpaar *HVO_0685/0686* in jeweils Mittelwerten aus drei biologischen Replikaten und der Standardabweichung gezeigt. Die mittels *dhfr* spezifischen Sonden detektierten Transkripte auf einem Northern-Blot wurden mit Hilfe des Programms ImageJ ausgewertet. Der native Abstand ist mit wt markiert, die anderen Konstrukte wurden mit +34, +22, +19, +5 und -5 für den jeweils intergenen Abstand bzw. den Überlapp markiert. Rechts: Die quantifizierten Transkriptlevel für *dhfr* sind für drei weitere Genpaare in jeweils Mittelwerten aus drei biologischen Replikaten und der Standardabweichung gezeigt. Die mittels *dhfr* spezifischen Sonden detektierten Transkripte auf einem Northern-Blot wurden mit Hilfe des Programms ImageJ ausgewertet. Der native Abstand ist jeweils mit wt markiert. Die anderen Konstrukte wurden mit +23 und +14 für den jeweiligen intergenen Abstand beschriftet.



Anhang 8 GlpD Enzymaktivität sowie *glpD* Transkriptlevel der intergenen Bereiche Mutanten in *E. coli*.
a Die quantifizierten GlpD Enzymaktivitäten für die Genpaare *hyfH/hyfI*, *ydbH/ynbE* und *menD/menH* sind in nkat/mg im Mittelwert von drei biologischen Replikaten und deren Standardabweichung dargestellt. Der native Abstand ist mit wt markiert, die anderen Konstrukte wurden mit +38, +14 und +2 für den jeweils intergenen Abstand beschriftet. **b.** Die quantifizierten Transkriptlevel für *glpD* sind für die Genpaare *hyfH/hyfI*, *ydbH/ynbE* und *menD/menH* in jeweils Mittelwerten aus drei biologischen Replikaten und der Standardabweichung gezeigt. Die mittels *glpD* spezifischen Sonden detektierten Transkripte auf einem Northern-Blot wurden mit Hilfe des Programmes ImageJ ausgewertet. Der native Abstand ist mit wt markiert, die anderen Konstrukte wurden mit +38, +14 und +2 für den jeweils intergenen Abstand bzw. den Überlapp markiert.



Anhang 9 GusA Enzymaktivität sowie *gusA* Transkriptlevel der intergenen Bereiche Konstrukte in *E. coli*.
a. Die quantifizierten GusA Enzymaktivitäten für die Genpaare *hyfH/hyfI*, *ydbH/ydbE* und *menD/menH* sind in nkat/mg im Mittelwert von drei biologischen Replikaten und deren Standardabweichung dargestellt. Der native Abstand ist mit wt markiert, die anderen Konstrukte wurden mit +38, +14 und +2 für den jeweils intergenen Abstand beschriftet. **b.** Die quantifizierten Transkriptlevel für *gusA* sind für die Genpaare *hyfH/hyfI*, *ydbH/ydbE* und *menD/menH* in jeweils Mittelwerten aus drei biologischen Replikaten und der Standardabweichung gezeigt. Die mittels *gusA* spezifischen Sonden detektierten Transkripte auf einem Northern-Blot wurden mit Hilfe des Programmes ImageJ ausgewertet. Der native Abstand ist mit wt markiert, die anderen Konstrukte wurden mit +38, +14 und +2 für den jeweils intergenen Abstand bzw. den Überlapp markiert.

3. Tagungsbeiträge

- 03/2017 Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie, Würzburg
Posterpräsentation: "*Translational coupling via Termination-Reinitiation in E. coli*"
- 09/2017 18th Frankfurt meeting on genome function and gene regulation in Archaea, Schmitten
Vortrag: "*Translational coupling via Termination-Reinitiation in H. volcanii*"
- 04/2018 Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie, Wolfsburg
Posterpräsentation: "*Translational coupling via Termination-Reinitiation in H. volcanii and E. coli*"
- 09/2018 19th Frankfurt meeting on genome function and gene regulation in Archaea, Schmitten
Vortrag: "Detailed *characterization of haloarchaeal small regulatory RNAs*"
- 02/2019 RNA Club
Vortrag: "*Translational coupling via Termination-Reinitiation in Archaea and Bacteria*"
- 07/2019 Gordon Research Conference Archaea; Ecology, Metabolism & Molecular Biology, Les Diablerets, Schweiz
Posterpräsentation: "*Translational coupling via Termination-Reinitiation in Archaea and Bacteria*"
- 09/2019 20th Frankfurt meeting on genome function and gene regulation in Archaea, Schmitten
Vortrag: "*Translational coupling via Termination-Reinitiation in Archaea (and Bacteria)*"
- 03/2020 Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie, Leipzig
Posterpräsentation: "*Translational coupling via Termination-Reinitiation in Archaea and Bacteria*"

6. Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig durchgeführt und verfasst habe und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Frankfurt am Main, 05.Februar.2021

Madeleine Huber