

Regulation der Translation in *Haloferax volcanii*

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

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

von
Mariam Brenneis
aus Kabul, Afghanistan

Frankfurt am Main 2008
(D30)

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

Dekan: Prof. Dr. Volker Müller

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

Datum der Disputation: 26.8.2008

INHALTSVERZEICHNIS

I. ZUSAMMENFASSUNG	1
II. EINLEITUNG	3
1. Archaea	3
1.1 Die dritte Domäne des Lebens: Die Archaea	3
1.2 Haloarchaea als archaeale Modellorganismen	4
2. Archaeale Transkription	5
3. Translation	6
3.1 Die Proteinbiosynthese in Archaea	6
3.2 Die Initiation der Translation in Archaea	8
3.3 Regulation der Translation	12
4. Die untranslatierten Regionen von mRNAs: Struktur, Funktion, Evolution	17
5. Artificielle Aptamere und Ribozyme: Ihre Anwendung zur konditionalen Genexpression	18
6. Zielsetzung der Arbeit	21
III. MATERIAL UND METHODEN	23
1. Material	23
1.1 Laborausstattung	23
1.2 Verbrauchsmaterial	24
1.3 Chemikalien, Reagenzien und Lösungen	24
1.4 Enzyme	25
1.5 Plasmide	26
1.6 Oligonukleotide	28
1.7 Kit-Systeme	32
1.8 Größenstandards	32
1.9 Computerprogramme und Datenbanken	32
2. Organismen und Zellzucht	34
2.1 Organismen	34
2.2 Antibiotika	34
2.3 Medien und Zellkultivierung	34
2.4 Stammhaltung	36
2.5 Bestimmung der Zelldichte	37
3. Molekularbiologische Methoden	37
3.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	37
3.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>H. volcanii</i>	38
3.3 Reinigung von Nukleinsäuren	39

3.4 Photometrische Bestimmung von Nukleinsäure Konzentrationen	40
3.5 Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren	40
3.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	42
3.7 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	43
3.8 Ligation von DNA	43
3.9 Transformation von Mikroorganismen	44
3.10 DNA Sequenzierung nach Sanger	45
3.11 DNase-Behandlung von RNA	46
3.12 cDNA-Synthese	47
3.13 RealTime-PCR Analyse	47
3.14 crRT-PCR Analyse zur Bestimmung untranslatierter Regionen von mRNAs	48
4. Biochemische Methoden	49
4.1 DHFR-Aktivitätstest und Bestimmung der Translationseffizienz	49
4.2 Proteinbestimmung (BCA-Assay)	51
IV. ERGEBNISSE	52
1. Identifizierung der 5'- und 3'-UTRs haloarchaealer Transkripte mittels crRT-PCR	52
2. Identifizierung kleiner nichtkodierender RNAs in <i>H. volcanii</i> mittels crRT-PCR	55
3. Promotorstruktur in <i>H. volcanii</i>	57
4. Termination der Transkription in <i>H. volcanii</i>	58
5. Strukturelle Eigenschaften von UTR-Sequenzen	60
5.1 Transkripte mit und ohne 5'-UTR in <i>H. volcanii</i>	60
5.2 Charakterisierung der 3'-UTRs von Transkripten aus <i>H. volcanii</i>	62
6. Initiation der Translation in <i>H. volcanii</i>	63
6.1 Ein Reporter-gen-System zur Bestimmung der Translationseffizienzen in <i>H. volcanii</i>	63
6.2 Experimentelle Charakterisierung der <i>in vivo</i> Funktion ausgewählter nativer 5'- und 3'-UTRs in <i>H. volcanii</i>	64
6.3 Translationseffizienzen von Transkripten mit artifiziellen 5'-UTRs zufälliger Sequenz in <i>H. volcanii</i>	67
6.4 Einfluss der Struktur von 5'-UTRs auf die Effizienz der Initiation der Translation in <i>H. volcanii</i>	69
6.5 Einfluss der Position von Strukturelementen auf die Initiation der Translation in <i>H. volcanii</i>	72
7. Regulation der Translation in <i>H. volcanii</i>	75
7.1 5'-UTR und 3'-UTR sind notwendig und ausreichend für die Regulation der Translation in <i>H. volcanii</i>	76
7.2 Die 3'-UTRs bestimmen die Richtung der Wachstumsphasen-abhängigen Regulation der Translation	79
7.3 Einfluss der 3'-UTRs auf die Wachstumsphasen-abhängige Regulation der Translation	81

7.4 Einfluss der 5'-UTR auf die Wachstumsphasen-abhängige Regulation der Translation in <i>H. volcanii</i>	83
8. Ansätze zur konditionalen Genexpression in <i>H. volcanii</i>	86
8.1 Anwendung eines Tetracyclin-induzierbaren Aptamers zur konditionalen Genexpression in <i>H. volcanii</i>	86
8.2 Anwendung eines autokatalytischen <i>Hammerhead</i> -Ribozyms in <i>H. volcanii</i>	89
V. DISKUSSION	93
1. crRT-PCR: Eine effiziente Methode zur Bestimmung der untranslatierten Regionen von mRNAs	93
2. Transkription in <i>H. volcanii</i>	94
2.1 Promotorstrukturen	94
2.2 Termination der Transkription	96
3. mRNAs und ihre Untranslatierten Regionen in <i>H. volcanii</i>	98
3.1 5'-UTRs und ihre biologische Funktion in Haloarchaea	98
3.3 3'-UTRs und ihre biologische Funktion in Haloarchaea	99
4. Initiation der Translation in <i>H. volcanii</i>	100
4.1 Initiation der Translation bei Transkripten ohne 5'-UTR	100
4.2 Ein neuer Mechanismus zur Initiation der Transkription in Archaea	101
4.3 Einfluss strukturierter 5'-UTRs auf die Translationseffizienz	103
4.4 Initiation der Translation - ein Fazit	105
5. Regulation der Translation	106
6. Konditionale Genexpression in <i>H. volcanii</i>	112
6.1 Konditionale Genexpression durch ein Tetracyclin-abhängiges Aptamer	112
6.2 Anwendung von <i>Hammerhead</i> -Ribozymen	115
VI. LITERATURVERZEICHNIS	93
VII. ANHANG	129
1. Abkürzungsverzeichnis	129
2. Publikationen	132
2.1 Publikationen in wissenschaftlichen Journalen	132
2.2 Publikationen auf wissenschaftlichen Kongressen	133
3. Danksagung	134
4. Curriculum vitae	135

I. ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausgewählte 5'- und 3'-untranslatierte Regionen (UTRs) von mRNAs aus *H. volcanii* bestimmt. Dieses Datenset wurde verwendet um (1) haloarchaeale UTRs zu charakterisieren, (2) Konsensuselemente für die Transkriptionsinitiation und -termination zu verifizieren und (3) den Einfluss haloarchaealer UTRs auf die Initiation und Regulation der Translation zu untersuchen.

Es konnte gezeigt werden, dass alle untersuchten Transkripte nichtprozessierte 3'-UTRs mit einer durchschnittlichen Länge von 45 Nukleotiden besitzen. Darüber hinaus konnte ein putatives Transkriptionsterminationssignal bestehend aus einem pentaU-Motiv mit vorausgehender Haarnadelstruktur identifiziert werden. Die Analysen der Regionen stromaufwärts der experimentell bestimmten Transkriptionsstarts führten zur Identifizierung dreier konservierter Promotor Elemente: Der TATA-Box, dem BRE-Element und einem neuen Element an Position -10/-11. Überraschenderweise bestand die TATA-Box nur aus vier konservierten Nukleotiden.

Die Untersuchung der UTRs ergab, dass die größte Anteil der haloarchaealen Transkripte keine 5'-UTR besitzt. Falls eine 5'-UTR vorhanden ist, besitzen unerwarteterweise nur 15% der 5'-UTRs aus *H. volcanii* eine Shine-Dalgarno-Sequenz (SD-Sequenz). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass verschiedene native und artifizielle 5'-UTRs ohne SD-Sequenz sehr effizient *in vivo* translatiert werden. Außerdem hat die Sekundärstruktur der 5'-UTR und die Position struktureller Elemente offenbar einen entscheidenden Einfluss auf die Translatierbarkeit von Transkripten. Die Insertion von Strukturelementen nahe des Startkodons führte zu einer vollkommenen Repression der Translation, während die proximale Insertion des Motivs an das 5'-Ende der 5'-UTR keinen Einfluss auf die Translationseffizienz hatte. Zusammenfassend kann sowohl der eukaryotische *Scanning*-Mechanismus als auch die bakterielle Initiation der Translation über die SD-Sequenz für haloarchaeale Transkripte mit 5'-UTR ohne SD-Sequenz ausgeschlossen werden. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen bilden die Grundlage für weitere

Untersuchungen zur Identifizierung eines entsprechenden dritten Mechanismus zur Initiation der Translation in *H. volcanii*.

Eine aktuelle Studie zur globalen Analyse der Translationsregulation zeigte, dass der Anteil translational regulierter Gene in *H. volcanii* genauso hoch ist wie bei Eukaryoten (Lange *et al.*, 2007). Um die Rolle haloarchaealer UTRs bei der Regulation der Translation zu charakterisieren, wurden die UTRs zweier ausgewählter translationsregulierter Gene untersucht. Es stellte sich heraus, dass nur die Anwesenheit beider UTRs, 5'- und 3'-UTR, zu einer Wachstumsphasen-abhängigen Regulation der Translation führt. Dabei hat die 3'-UTR allein keinen Einfluss auf die Translationseffizienz, während die 5'-UTR die Translationseffizienz in beiden Wachstumsphasen reduziert. Es zeigte sich außerdem, dass die 3'-UTR für die „Richtung“ der Regulation auf Translationsebene verantwortlich ist und putative Strukturelemente möglicherweise in den Regulationsmechanismus involviert sind.

Zusammengefasst ergibt sich folgendes Modell der Translationsregulation in *H. volcanii*: Strukturierte 5'-UTRs führen zu einer Herabsetzung der konstitutiven Translationseffizienz. Dies kann differentiell durch regulatorische Faktoren kompensiert werden, welche spezifische Elemente der 3'-UTR binden.

Sowohl natürliche als auch artifizielle Aptamere und allosterische Ribozyme stellen effektive Werkzeuge zur exogen kontrollierten Genexpression dar. Daher wurde die Anwendbarkeit eines Tetracyclin-induzierbaren Aptamers und eines konstitutiven *Hammerhead*-Ribozyms in *H. volcanii* untersucht. Es stellte sich allerdings heraus, dass das Aptamer bereits ohne Tetracyclin starke inhibitorische Sekundärstrukturen ausbildet. Als Alternative wurden Reporterfusionen mit einem selbstspaltenden *Hammerhead*-Ribozym konstruiert. Die selbstspaltende Aktivität des *Hammerhead*-Ribozyms in *H. volcanii* konnte erfolgreich *in vivo* demonstriert werden, was die Grundlage zur Entwicklung konditionaler Expressionssysteme basierend auf dem *Hammerhead*-Ribozym in *H. volcanii* bildet.

II. EINLEITUNG

1. Archaea

1.1 Die dritte Domäne des Lebens: Die Archaea

Alle Lebewesen dieser Erde lassen sich in eine der drei Domänen Bacteria, Archaea oder Eucarya einordnen. Nachdem die Archaea zunächst nach der klassischen Taxonomie den Bakterien zugeordnet wurden, bilden diese heute aufgrund der von Woese durchgeführten 16S und 18S rRNA-Analysen phylogenetisch eine eigenständige dritte Domäne des Lebens (Abbildung 1; Woese & Fox, 1977).

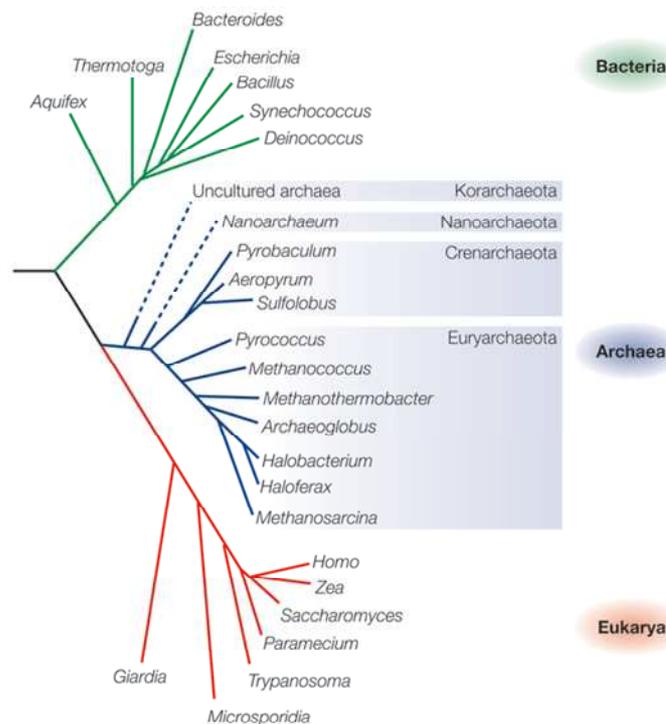


Abbildung 1: Phylogenetischer Stammbaum

Phylogenetischer Stammbaum nach Sequenzanalysen der 16S und 18S rRNA. Gestrichelte Linien stellen unsichere Positionen der Phyla im rRNA Stammbaum dar (Allers & Mevarech, 2005; Woese & Fox, 1977).

Der rRNA Stammbaum zeigt, dass die Domäne der Archaea aus verschiedenen Phyla besteht. Die Euryarchaeota mit ihren methanogenen, halophilen, thermophilen und psychrophilen Mitgliedern stellen die diverseste Gruppe dar. Einige Mitglieder der Crenarchaeota sind hyperthermophil oder psychrophil. *Nanoarchaeum equitans* ist der einzig bekannte Vertreter der Nanoarchaea und Korarchaeota sind nur durch DNA Sequenzanalysen aus der Umwelt bekannt,

kultivierte Isolate gibt es bisher nicht (Barns *et al.*, 1996; Reysenbach *et al.*, 2000).

Die monophyletischen Archaea zeichnen sich durch Eigenschaften aus, die sie mit den beiden anderen Domänen des Lebens teilen. Dennoch besitzen sie auch einige für die Domäne der Archaea charakteristische Eigenschaften wie z.B. ihre Zellmembranen und Zellwände (De Rosa *et al.*, 1986; Kandler & König, 1998; van de Vossenberg *et al.*, 1998), als auch bestimmte Proteine, die an verschiedenen zellulären Prozessen beteiligt sind (Amend & Shock, 2001; Makarova & Koonin, 2003; Roesser & Müller, 2001; Schafer *et al.*, 1999). In einer Reihe von informationsverarbeitenden Prozessen wie Replikation, Transkription und Translation sind die beteiligten archaealen Proteine den eukaryotischen Homologen bedeutend ähnlicher als den bakteriellen (Bell & Jackson, 2001; Dennis, 1997; Grabowski & Kelman, 2003; Huet *et al.*, 1983; Matsunaga *et al.*, 2001). Genomische Organisation und zentraler Metabolismus der Archaea zeigen allerdings eher bakteriellen Charakter (Rivera *et al.*, 1998).

Archaea sind weiter verbreitet als ursprünglich angenommen und machen mehr als 20% der gesamten Biomasse aus (DeLong & Pace, 2001). Zahlreiche Archaea sind außerdem an die Besiedlung extremer Habitats wie Salzseen, heiße Quellen und die Tiefsee spezialisiert.

1.2 Haloarchaea als archaeale Modellorganismen

Haloarchaea sind an Hochsalzbedingungen wie hypersaline Salzseen oder das Tote Meer, in denen Salzkonzentrationen im molaren Bereich bis zur Sättigung vorliegen, angepasst. Extrem halophile und halotolerante Vertreter existieren in allen Domänen des Lebens. Hier sind die Eukaryoten fast ausschließlich durch verschiedene Arten der Grünalge *Dunaliella* vertreten (Elevi Bardavid *et al.*, 2008). Halophile Bakterien findet man unter den γ -Proteobakterien, den Cyanobakterien und einigen gram-positiven Bakterien. Mit wenigen Ausnahmen sind Bakterien eher halotolerant (Madigan & Oren, 1999). Neben der Familie der Halobacteriaceae die ausschließlich aus halophilen Vertretern besteht, gibt es auch unter den methanogenen Archaea einige halophile Mitglieder.

Als Überlebensstrategie akkumulieren extrem halophile Archaea bis zu 4 M KCl und 1 M NaCl in der Zelle (Christian & Waltho, 1962). Proteine extrem halophiler

Organismen benötigen diese hohen Salzkonzentrationen zur Stabilisierung und für ihre Aktivität. Die Haloadaptation von Proteinen resultiert aus dem verstärkten Einbau saurer Aminosäurereste an der Oberfläche, die wiederum hydratisierte Ionen binden. Bei Salzkonzentrationen unter 0,5-1 M kommt es meistens zur Entfaltung dieser Proteine (Wright *et al.*, 2002).

Der halophile Modellorganismus *Haloflex volcanii* eignet sich hervorragend zur Studie der archaealen Biologie. Die komplette Genomsequenz ist bekannt (*Genome Bioinformatics Group of UC Santa Cruz* unter <http://archaea.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway?db=haloVolc1> und *H. volcanii Genome Website* unter <http://zdna2.umbi.umd.edu/~haloweb/hvo.html>), was *in silico* Analysen charakteristischer Eigenschaften ermöglicht. Für diesen Organismus sind außerdem Transkriptom, Translatom und Proteom Analysen etabliert (Karadzic & Maupin-Furlow, 2005; Lange *et al.*, 2007; Zaigler *et al.*, 2003). Außerdem stehen eine Reihe genetischer Methoden zur chromosomalen Deletion bzw. Mutation von Genen zur Verfügung (Bitan-Banin *et al.*, 2003), und *Shuttle* Plasmide sind vorhanden (Danner & Soppa, 1996). Zahlreiche biochemische, zellbiologische, genetische und strukturelle Methoden wurden zur Anwendung entsprechend der hohen physiologischen Salzkonzentrationen des haloarchaealen Cytoplasmas optimiert.

2. Archaeale Transkription

Zillig und Kollegen konnten 1980 zeigen, dass das informationsverarbeitende System der Archaea ähnlich zu dem der Eukaryoten ist (Huet *et al.*, 1983). So besitzen Archaea sowohl eine RNA-Polymerase, die homolog zur eukaryotischen RNA-Polymerase II ist, als auch basale Promotorelemente, die eher eukaryotischen Polymerase II Promotoren ähneln, und sich von den bakteriellen Promotoren unterscheiden (Bell & Jackson, 2001; Reiter *et al.*, 1988a). Für die Promotorerkennung und die Rekrutierung der archaealen Polymerase sind die basalen Transkriptionsfaktoren TBP (*TATA box binding protein*) und TFB (*Transcription factor B*) verantwortlich (Bell & Jackson, 2001). Dennoch ist die archaeale Transkriptionsmaschinerie sehr viel simpler als das eukaryotische

System, und stellt daher ein geeignetes Modellsystem für Transkriptionsanalysen dar.

Überraschenderweise zeigten Genomanalysen, dass Archaea auch eine Reihe an Homologen zu bakteriellen Transkriptionsregulatoren besitzen (Aravind & Koonin, 1999). Tatsächlich konnten bereits in *Archaeoglobus fulgidus* und *Methanococcus maripaludes* Repressoren *in vivo* studiert werden, die an Operatoren nahe des Promotors binden und direkt mit der Initiation der Transkription interferieren (Bell *et al.*, 1999a; Cohen-Kupiec *et al.*, 1997). Viele Archaea besitzen multiple TBP- und TFB-Isoformen, die möglicherweise Funktionen bei der Transkriptionsregulation einnehmen können. So ist beispielsweise die Expression eines *tfb*-Gens als Antwort auf einen Hitze Schock in *H. volcanii* induziert (Thompson *et al.*, 1999). Die Aktivierung der Gasvesikel Synthese in *H. salinarum* erfolgt durch Bindung des Regulators GvpE stromaufwärts der TATA-Box, was vermutlich zu einer direkten Interaktion mit der basalen Transkriptionsmaschinerie führt (Hofacker *et al.*, 2004). GvpE ähnelt allerdings wiederum einem basischen Leucin Zipper Protein, einem Motiv, das häufig bei eukaryotischen Regulatoren vorkommt.

Während der Mechanismus der Initiation der Transkription gut beschrieben ist (Bartlett, 2005; Bell *et al.*, 2001; Geiduschek & Ouhammouch, 2005; Soppa, 2001), ist über die Termination der Transkription in Archaea nur wenig bekannt. Bisherige Ergebnisse implizieren, dass oligo-U oder oligo-Pyrimidin Motive in die Termination der Transkription involviert sind (Reiter *et al.*, 1988b; Santangelo & Reeve, 2006; Spitalny & Thomm, 2008; Wich *et al.*, 1986). Allerdings scheint die Termination der Transkription in Archaea komplizierter zu sein, als bisher angenommen wurde und ein schlüssiger Mechanismus konnte bis jetzt nicht gefunden werden (Santangelo & Reeve, 2006).

3. Translation

3.1 Die Proteinbiosynthese in Archaea

Unter Translation versteht man die Synthese von Proteinen anhand ihrer mRNA Sequenz. Die Proteinbiosynthese gliedert sich in drei Abschnitte: Die Initiation der

Translation ist der erste und geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Translation. Die Initiation der Translation umfasst die Anlagerung der ribosomalen Untereinheiten und das Binden der Methionin-beladenen Initiator-tRNA am translationalen Startkodon. Die Elongation besteht aus der geordneten Verknüpfung von Aminosäuren, bis eines von drei translationalen Stopkodons (UAG, UAA oder UGA) erreicht wird. Hier wird der dritte Schritt der Translation, die Termination, eingeleitet. Für alle Schritte der Translation werden diverse Hilfsfaktoren benötigt.

Die Translation in Archaea besitzt, wie die Transkription, eher eukaryotischen Charakter, einige Merkmale sind allerdings eindeutig prokaryotischer Natur (Tabelle 1; Dennis & Omer, 2005). In Archaea existieren mehrere Translationsinitiationsfaktoren (aIFs) mit Homologien zu eukaryotischen Initiationsfaktoren (eIFs), während in Bakterien nur drei benötigt werden.

Tabelle 1: Vergleich der Translation zwischen Archaea, Bakterien und Eukaryoten

	Bacteria	Eucarya	Archaea
Ribosom	70S	80S	70S
Initiationsfaktoren	3 Initiationsfaktoren	>10 Initiationsfaktoren	>10 Initiationsfaktoren
Start-Aminosäure bei der Translation	Formyl-Methionin	Methionin	Methionin
mRNA	monocistronisch/ polycistronisch	monocistronisch	polycistronisch/ monocistronisch
RNA-Erkennungselement	SD-Sequenz	CAP-Struktur (<i>Scanning</i>); IRES	?
Organisation Transkription/Translation	Transkription/Translation gekoppelt	Transkription/Translation getrennt	Transkription/Translation gekoppelt in <i>T. kodakarensis</i>

Die Initiation der Translation in Archaea und Eukaryoten erfolgt über Methionin-beladene tRNAs, während Bakterien N-formyl-Methionin verwenden. Anders als bei Eukaryoten existieren in Archaea und Bakterien polycistronische mRNAs, und für einige Archaea konnte die Initiation der Translation über eine purinreiche Shine-Dalgarno-Sequenz (SD-Sequenz) in der 5'-UTR nachgewiesen werden. Ein weiteres bakterielles Merkmal ist die Kopplung von Transkription und Translation. Durch elektronenmikroskopische Aufnahmen konnte für das hyperthermophile Archaeon *Thermococcus kodakaraensis* eine mit der

Transkription gekoppelte Translation nachgewiesen werden (French *et al.*, 2007). Es ist noch unklar, inwiefern dieser Mechanismus auf andere Vertreter der Archaea übertragbar ist.

3.2 Die Initiation der Translation in Archaea

Bisher konnten in Eu- und Prokaryoten zwei verschiedene Mechanismen der Initiation der Translation identifiziert werden. Die bakterielle Initiation der Translation basiert auf einer Interaktion der purinreichen Shine-Dalgarno (SD) Sequenz, die einige Nukleotide stromaufwärts der kodierenden Region lokalisiert ist, mit dem 3'-Ende der 16S rRNA (Kozak, 1983; Kozak, 1999; Shine & Dalgarno, 1974). Der Abstand der SD-Sequenz zum Startkodon kann bei *E. coli* zwischen 9-13 Nukleotide variieren (Chen *et al.*, 1994). Die ribosomale Erkennung des Translationsstartes wird bei Bakterien durch die monomeren akzessorischen Faktoren IF1, IF2 und IF3 unterstützt (Gualerzi & Pon, 1990).

In Eukaryoten wiederum existiert ein komplexer *Scanning*-Mechanismus, der am 5'-Ende der RNA startet. Hier unterliegt die mRNA/Ribosomerkennung keiner direkten Interaktion zwischen rRNA und mRNA und benötigt die Unterstützung von mehr als zehn akzessorischen Faktoren (Tabelle 2). Das eukaryotische Modell der Translationsinitiation beschreibt die Bindung der 40S ribosomalen Untereinheit an das 5'-Ende der mRNA, die mit einer CAP-Struktur versehen ist. Nach der Bindung *scannt* die 40S ribosomale Untereinheit die mRNA in 3'-Richtung, bis das korrekte Initiationskodon erreicht ist (Kozak, 1989b; Kozak, 1999; Kozak, 2002). Der Anteil der UTRs mit stromaufwärts lokalisierten AUGs beträgt abhängig vom Organismus 15% bis 50% (Mignone *et al.*, 2002), wobei nicht immer das erste AUG Kodon als tatsächliches Startkodon fungiert. Es konnte gezeigt werden, dass die flankierenden Regionen des Startkodons eine Konsensussequenz aufweisen. Es ist anzunehmen, dass die flankierende Region des AUG Kodons, eine Rolle bei der Effizienz zur Erkennung dieses Kodons spielt (Mignone *et al.*, 2002). Eine zweite Option ist das *Leaky Scanning*, das die Kodierung mehrerer Proteine durch eine mRNA ermöglicht (Racine *et al.*, 2007).

Nur mit Hilfe interner Ribosom Bindestellen (IRES) ist eine CAP-unabhängige Translation möglich (Hellen & Sarnow, 2001; Jackson, 2005). Bisher wurden mindestens 85 zelluläre (Ratte, Mensch, *Drosophila*, Maus, Hefe, Pflanze, Maus)

und 39 virale (u. a. *Dicistroviridae*, *Picornaviridae*) IRESes identifiziert (Baird *et al.*, 2006). Man nimmt an, dass 10% des menschlichen Transkriptoms IRES-Elemente besitzt (Graber *et al.*, 2006). IRESes sind oft in den 5'-UTRs von mRNAs lokalisiert und erlauben die direkte Bindung des Ribosoms an das korrekte Startkodon ohne *Scanning* vom 5'-Ende. IRESes werden in der Regel bei mRNAs gefunden, die unter Stress-induzierten Bedingungen exprimiert werden (z.B. Apoptose oder Hitzeschock; Graber & Holcik, 2007; Vazquez-Pianzola *et al.*, 2007). Unter diesen Bedingungen ist die CAP-abhängige Translation häufig reprimiert.

Sowohl in Bakterien, als auch in eukaryotischen Mitochondrien konnten mRNAs ohne 5'-UTR identifiziert werden (Jones *et al.*, 2008; Weiner *et al.*, 2000). Man nimmt an, dass die Initiation dieser mRNAs durch die direkte Bindung undissoziierter Ribosomen und der Initiator-tRNA erfolgt (Andreev *et al.*, 2006; Moll *et al.*, 2004).

Nach der Sequenzierung des ersten kompletten archaealen Genoms konnten verschiedene Gene identifiziert werden, die Homologe zu eukaryotischen Translationsinitiationsfaktoren kodieren (Bell & Jackson, 1998; Dennis, 1997). Mittlerweile konnten in archaealen Genomen mehr als 21 putative Initiationsfaktoren gefunden werden (Tabelle 2). Das dem bakteriellen IF1 ähnliche Protein, eIF1A stimuliert die Bindung der met-tRNA_i an die P-Stelle des Ribosoms (Chaudhuri *et al.*, 1997), und unterstützt mit eIF1 das *Scanning* des Ribosoms und die Erkennung des korrekten Startkodons (Pestova *et al.*, 1998). Sowohl für IF1 und IF2 (Boileau *et al.*, 1983), als auch für die eukaryotischen Homologe eIF1A und eIF5B (Choi *et al.*, 2000; Marintchev *et al.*, 2003) konnte eine direkte Interaktion nachgewiesen werden. Es wird angenommen, dass dieser universelle IF1/IF-2 Komplex die ribosomale A-Stelle des Ribosoms besetzt, um die korrekte Bindung der Initiator-tRNA an der P-Stelle zu stimulieren und die Anlagerung der großen ribosomalen Untereinheit zu unterstützen (Roll-Mecak *et al.*, 2001). *In vitro* Experimente zeigten, dass rekombinantes aIF1A aus *Sulfolobus solfataricus* die Aktivität von aIF2 zur Bindung der met-tRNA_i an die P-Stelle des Ribosoms verstärkt, was eine Interaktion beider Proteine impliziert (Londei, 2005).

Tabelle 2: Initiationsfaktoren der Translation in den drei Domänen des Lebens(Lomakin *et al.*, 2006; Londei, 2005; Sonenberg & Hinnebusch, 2007)

	Bacteria	Eucarya	Archaea
Universell konservierte Faktoren	IF1 Stimuliert IF2	eIF1A Unterstützt <i>Scanning</i>	aIF1A Funktion unbekannt
	IF2 Bindet f-met tRNAi	eIF5B Unterstützt Assoziation der Untereinheiten	aIF2 Unterstützt tRNAi/Ribosom Bindung
	YCiH (nur in einigen Phyla) <i>Fidelity</i> Faktor	eIF1/SUI1 <i>Fidelity</i> Faktor	aSUI1 Funktion unbekannt
	EFP Stimuliert die erste Peptidbindung	eIF5A Stimuliert die erste Peptidbindung	aIF5A Funktion unbekannt
Domänen spezifische Faktoren	IF3 <i>Fidelity</i> Faktor	eIF1 <i>Fidelity</i> Faktor	aIF1 <i>Fidelity</i> Faktor
	-	eIF4F (Trimer) Bindet Cap, entwindet RNA	-
	-	eIF4E Bindet Cap	-
	-	eIF4G <i>Scaffold</i> Protein	-
	-	eIF4A DEAD Box Helikase	-
	-	eIF3 (Octamer) Interagiert mit eIF4F und dem Ribosom	-
	-	eIF2 (Trimer) Bindet met-tRNAi	a/eIF2 (Trimer) Bindet met-tRNAi
	-	eIF2B (Pentamer) Guanin Nukleotid Austausch Faktor	nur Untereinheiten α , β , δ , Funktion unbekannt
	-	eIF5 GTPase von eIF2	-
	-	eIF6 Verhindert Assoziation der ribosomalen Untereinheiten	aIF6 Funktion unbekannt

Bei Eukaryoten spielt der Initiationsfaktor SUI eine wichtige Rolle für die Erkennung des korrekten Initiationskodons. Für Archaea konnte für aSUI bisher nur eine Bindung der kleinen ribosomalen Untereinheit während Initiations- und Elongationsphase nachgewiesen werden (Londei, 2005). Der universelle Faktor IF5A stimuliert in Bakterien und Eukaryoten die Bildung der ersten Peptidbindung. Das $\alpha\gamma$ -Dimer von a/eIF2 ist notwendig und ausreichend zur Bindung der met-tRNAi während des Initiationsprozesses und daher kann angenommen werden, dass dieses den Initiator tRNA Bindungsfaktor in Archaea darstellt (Londei, 2005). Die Funktion der archaealen Homologe zu eIF2B und aIF6 ist bisher ungeklärt.

Die ersten Sequenzbestimmungen archaealer Transkripte ergaben, dass nicht alle archaealen mRNAs mit einer 5'-UTR ausgestattet sind (Betlach *et al.*, 1984; Blanck & Oesterhelt, 1987; Dunn *et al.*, 1981). Erst als im Rahmen einer bioinformatischen Studie 144 Gene des Archaeons *Sulfolobus solfataricus* untersucht wurden, kam die Theorie auf, dass in Archaea mindestens zwei verschiedene Translationsmechanismen parallel existieren. Die Ergebnisse dieser Studie implizierten, dass distale Gene in Operons eine SD-Sequenz besitzen, während monocistronische und proximale Gene in Operons keine 5'-UTR besitzen und daher ein alternativer Mechanismus zur Initiation der Translation existieren muss (Tolstrup *et al.*, 2000). Eine experimentelle Bestimmung der 5'-Enden von 10 Transkripten aus *Pyrobaculum aerophilum* unterstützte diese Annahme. Keines der Transkripte besaß eine 5'-UTR und eine begleitende Genomanalyse zeigte, dass die meisten, aber nicht alle monocistronischen und proximalen Gene in Operons keine 5'-UTR besitzen und der Anteil von mRNAs ohne 5'-UTR in haloarchaealen Genomen bei 30% liegt (Slupska *et al.*, 2001; Torarinsson *et al.*, 2005). Bioinformatische Analysen 18 archaealer Genome führten zu der Annahme, dass *P. aerophilum* keine Ausnahme darstellt. Für neun der untersuchten Spezies (*Archaeoglobus fulgidus*, *Thermoplasma acidophilum*, *Thermoplasma volcanium*, *S. solfataricus*, *Sulfolobus tokodaii*, *Sulfolobus acidocaldarius*, *Pyrobaculum aerophilum*, *Nanoarchaeum equitans*, *Halobacterium* sp. NRC-1) führte die Analyse zu der Vorhersage, dass diese auch einen hohen Anteil (31%-74%) an Transkripten ohne 5'-UTR zu besitzen (Torarinsson *et al.*, 2005). In zwei Studien konnte experimentell bewiesen werden, dass Transkripte trotz fehlender 5'-UTR effizient translatiert werden können. Mit Hilfe eines *in vitro* Translationssystems konnte für *S. solfataricus* gezeigt werden, dass durch eine Mutation der SD-Sequenz die Translation vollständig inhibiert wurde. Die Deletion der nativen 5'-UTR hingegen stellte die Translationseffizienz zum größten Teil wieder her (Condo *et al.*, 1999). Mit einem *in vivo* System für *H. volcanii* konnte gezeigt werden, dass die Mutation der nativen SD-Sequenz die Translationseffizienz signifikant reduzierte, eine Deletion der 5'-UTR hingegen die Proteinkonzentration mehr als 10-fach steigerte (Sartorius-Neef & Pfeifer, 2004). Man nimmt an, dass die Initiation der Translation bei Transkripten ohne 5'-UTR einen sehr alten und konservierten

Mechanismus darstellt, da mRNAs ohne 5'-UTR unabhängig von ihrer Herkunft mit bakteriellen, archaealen und eukaryotischen Systemen translatiert werden können (Grill *et al.*, 2000). In *E. coli* konnte gezeigt werden, dass die Translation von mRNAs ohne 5'-UTR durch einen Komplex aus 70S ribosomaler Untereinheit, met-tRNA_i und IF2-GTP durch Kodon/Antikodon Wechselwirkung initiiert wird (Moll *et al.*, 2004).

Die Tatsache, dass sich die Interaktionen der ribosomalen 30S Untereinheit und des Transkripts für Transkripte mit 5'-UTR und SD-Sequenz von Transkripten ohne 5'-UTR unterscheiden, verstärkt die Annahme, dass in Archaea mindestens zwei Mechanismen zur Initiation der Translation parallel existieren (Benelli *et al.*, 2003).

3.3 Regulation der Translation

Ein großer Bedarf besteht in der Untersuchung der regulierten Translation auf Ebene der System-Biologie, um Netzwerke der Translationskontrolle und sogenannte „RNA Operons“ aufzudecken. Vor Kurzem konnte gezeigt werden, dass die Expression spezifischer „RNA Operons“ koordiniert auf Ebene der Translation reguliert wird (Keene, 2007). In Hefe erfolgt eine koordinierte Kontrolle der Genexpression funktionell verwandter mRNAs durch die Familie der Puf-Proteine. Diese RNA bindenden Proteine kontrollieren dabei die Lokalisierung, Translation und Stabilität von mRNAs (Gerber *et al.*, 2004).

Die Regulation der Translation ist ein kritischer homöostatischer Mechanismus, der der Zelle eine rapide Anpassung an ihre intra- und extrazelluläre Umwelt erlaubt. Fehler bei der globalen oder mRNA-spezifischen Translation konnten mit Krankheiten in Verbindung gebracht werden (Bilanges & Stokoe, 2007; Sonenberg & Hinnebusch, 2007). So verursacht z.B. eine Mutation von FMRP, einem Protein, das die Translation eines bestimmten RNA-Sets reguliert, das Fragile X Syndrom (Zalfa *et al.*, 2006). Meistens erfolgt die Regulation der Translation auf Ebene der Initiation, da dies der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Proteinbiosynthese ist. Globale Analysen translationsregulierter Gene wurden bisher nur mit drei eukaryotischen Spezies durchgeführt: *Saccharomyces cerevisiae*, *Arabidopsis thaliana* und humanen Zelllinien (Kawaguchi *et al.*, 2004; Kawaguchi & Bailey-Serres, 2005; Mikulits *et al.*, 2000; Nicolai *et al.*, 2006). In

allen Studien konnten translationsregulierte Gene identifiziert werden, deren Anteile von 1% bis 25% variierten. Nur wenig ist bisher über die Regulation der Translation in Archaea bekannt. Eine aktuelle globale Analyse der translationalen Regulation der haloarchaealen Modellorganismen *H. volcanii* und *Halobacterium salinarum* ergab, dass 20% der Gene aus *H. salinarum* und 6% der Gene aus *H. volcanii* wachstumsphasen-abhängig differentiell translatiert werden (Lange *et al.*, 2007).

Globale Regulation der Translation durch Translationsinitiationsfaktoren

Die globale Regulation der Translation wird häufig durch Phosphorylierung oder Proteolyse genereller translationaler Initiationsfaktoren kontrolliert. Ein bekanntes Beispiel ist die Phosphorylierung des eukaryotischen Initiationsfaktors eIF2. Die Phosphorylierung des Initiationsfaktors an Ser51 der α -Untereinheit konvertiert eIF-GDP in einen kompetitiven Inhibitor zu eIF2B, dem Nukleotid-Austauschfaktor (Tabelle 2). Dies verhindert die Bildung des ternären Komplexes aus eIF2-GTP-tRNA_i zur Initiation der Translation (Sonenberg & Hinnebusch, 2007). *In vitro* Studien demonstrierten dass aIF2 aus dem Archaeon *Pyrococcus horikoshoo* phosphoryliert werden könnte (Tahara *et al.*, 2004). Daher ist zu vermuten, dass auch in Archaea eine globale Regulation der Translation durch aIF2 existiert.

RNA bindende Proteine als Regulatoren der Translation

Die mRNA-spezifische Regulation der Translation kann durch Proteine kontrolliert werden, die spezifische Sequenzelemente in den 5'- oder 3'-UTRs des Zieltranskripts erkennen. Diese Sequenzmotive können von kurzen Primärsequenzen bis hin zu spezifischen Sekundärstrukturen reichen.

Der eukaryotische Regulator IRP (*Iron Regulatory Protein*) erkennt unter niedrigen Eisen-Bedingungen spezifische Sekundärstrukturen (IREs, *Iron response elements*) in den 3'- oder 5'-UTRs von mRNAs, die für Gene der Eisen Homöostase kodieren (Wallander *et al.*, 2006). Durch die Bindung von IRP an das 5'-IRE der *ferritin*-mRNA wird die Rekrutierung des 43S Initiationskomplexes und somit die Initiation der Translation sterisch verhindert (Muckenthaler *et al.*, 1998).

Die Regulation der Translation durch 3'-UTR bindende Proteine ist weit verbreitet und spielt eine große Rolle bei der Differenzierung und anderen Prozessen. In *Xenopus oocytes* wird die Repression der Translation durch Maskin reguliert. Dieses Protein bindet simultan an das *Cytoplasmatic Polyadenylation-Element binding Protein* (CPEB), welches an die 3'-UTR gebunden ist, und an eIF4E am CAP. Man nimmt an, dass dies zu einer inaktiven zirkulären mRNA führt, die nicht fähig zur Rekrutierung des 43S Präinitiations Komplexes ist (Abbildung 2; Stebbins-Boaz *et al.*, 1999).

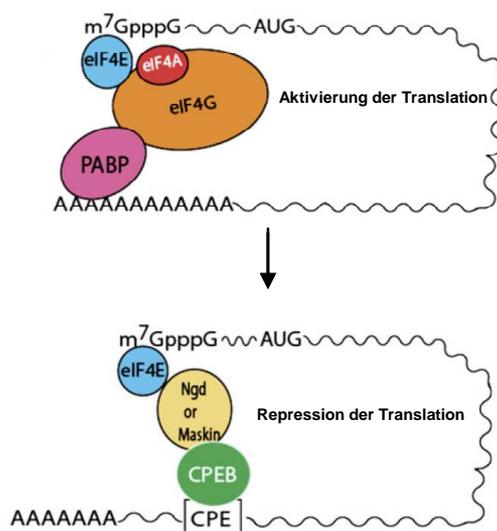


Abbildung 2: Modell für die CAP-abhängige Repression der Translation

Die Translation von mRNAs mit einem *Cytoplasmatic Polyadenylation-Element* (CPE) wird durch die Ablösung von eIF4G durch Maskin und dessen Interaktion mit dem CPE-bindenden (CPEB) Protein und eIF4E reprimiert (verändert nach Sonenberg & Hinnebusch, 2007).

Das CsrA Protein gehört zu einer Klasse RNA bindender Proteine, die ubiquitär in der bakteriellen Domäne vorkommen. Es konnte gezeigt werden, dass CsrA die Translation verschiedener mRNAs, wie z.B. der *hfq*-mRNA, blockiert, indem es an die 5'-UTR bindet und mit der Ribosom-Bindestelle (RBS) überlappt (Baker *et al.*, 2007). Für das Archaeon *Pyrococcus furiosus* wird angenommen, dass die Thymidilatsynthase die eigene Translation reguliert (Kanai *et al.*, 2006).

Sekundärstrukturen als regulatorische Motive in untranslatierten mRNA Regionen

Neben der Funktion als Zielsequenzen für regulatorische Proteine, können stark ausgeprägte Sekundärstrukturen innerhalb der 5'-UTR die Translation beeinflussen, indem das *Scanning* der Initiation blockiert wird. Die Repression der Translation strukturierter 5'-UTRs kann durch eine Konzentrationserhöhung des

Translationsinitiationsfaktors eIF4E kompensiert werden (Pickering & Willis, 2005).

RNA-Thermometer sind Temperatur-kontrollierte mRNA-Sensoren, die das thermische Signal direkt messen und in Genexpression umsetzen. Kofaktoren werden für diesen Prozess nicht benötigt. Dabei verhindern sekundäre RNA-Strukturen bei niedrigen Temperaturen den Zugang zur Ribosom-Bindestelle (RBS) und reprimieren so die Translation. Ein Temperaturanstieg führt zum Aufschmelzen der Struktur, wodurch die RBS freigelegt und die Translation ermöglicht wird (Chowdhury *et al.*, 2006).

Regulatorische nichtkodierende RNAs

In den letzten Jahren stellte sich heraus, dass die posttranskriptionale Regulation durch nichtkodierende RNAs (ncRNAs) in allen drei Domänen des Lebens eine entscheidende Rolle spielt. In Bakterien regulieren kleine ncRNAs in der Regel durch Basenpaarung mit der SD-Sequenz und/oder Interaktionen mit dem Startkodon die Translation (Gottesman, 2005). Hfq, ein ubiquitäres Protein, stellt einen pleiotrophen Regulator des prokaryotischen Metabolismus dar. Es kann kleine ncRNAs binden und unterstützt so die Regulation der Translation spezifischer Zieltranskripte (Zhang *et al.*, 2002).

Die bekanntesten Vertreter eukaryotischer regulatorischer RNAs sind u.a. microRNAs (miRNAs). Im Allgemeinen werden miRNAs durch den RISC Komplex gebunden, hybridisieren an die 3'-UTR der Ziel-mRNAs und reprimieren die Translation (Chu & Rana, 2007). Neuste Studien zeigen, dass auch miRNAs existieren, die die Translation fördern (Vasudevan *et al.*, 2007).

In Archaea konnten in den vergangenen Jahren durch bioinformatische und genetische Analysen kleine (100-200 Nukleotide) ncRNAs identifiziert werden (Narberhaus & Vogel, 2007; Tang *et al.*, 2005). Die Analysen beschränkten sich hierbei jedoch hauptsächlich auf C/D Box sRNAs. Ihre Funktion in Archaea ist allerdings unbekannt. Bisher konnten keine *bona fide* antisense RNAs in archaealen Genomen identifiziert werden, die über komplette Basenpaarungen an ihre Zieltranskripte binden können (Wagner *et al.*, 2002). Bioinformatische Analysen ergaben für *Methanosarcina mazei* mehr als 600 putative sRNAs (Narberhaus & Vogel, 2007) und in *Archaeoglobus fulgidus* konnten ncRNAs

identifiziert werden, die mit putativen Translationsinitiationsregionen überlappen und daher potentielle Regulatoren der Translation darstellen (Tang *et al.*, 2002).

Riboswitches

Einige natürlich vorkommende Riboswitches existieren in Eukaryoten (Sudarsan *et al.*, 2003), die Mehrzahl allerdings wurde in Bakterien gefunden. In *Bacillus subtilis* beispielsweise unterliegen mehr als 2,1% der Gene dem regulatorischen Einfluss Liganden-induzierbarer RNAs (Winkler, 2005). RNA Riboswitches spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation der Genexpression. Diese RNA-Schalter sind häufig in den 5'-UTRs von mRNAs lokalisiert. Sie besitzen eine Aptamer-Domäne, die für die Liganden-Bindung zuständig ist, und eine Expressionsplattform, die die Bindung des Liganden und Genexpression koppelt. Riboswitches können die Genexpression auf Ebene der Transkription und der Translation regulieren (Winkler & Breaker, 2005). Man nimmt außerdem an, dass Riboswitches eine wichtige Rolle bei der Prozessierung von RNAs spielen (Cheah *et al.*, 2007). Riboswitches können die Translation über die Degradation der mRNA oder über eine Blockade der SD-Sequenz regulieren (Winkler & Breaker, 2005). Der Thiamin Pyrophosphat (TPP) Riboswitch beispielsweise reguliert die Translation. Die Bindung von TPP induziert eine Sekundärstruktur, die eine Verdeckung der SD-Sequenz zur Folge hat und somit die Translation reprimiert (Sudarsan *et al.*, 2003).

Initiationsunabhängige Regulationsmechanismen

Die Regulation der Translation ist nicht nur auf die Initiation limitiert. Auf Ebene der Elongation erfolgt eine Regulation der Translation häufig durch *frameshifting*. Als *frameshifting* wird die Verschiebung der Ribosomen zu einem alternativen überlappenden ORF bezeichnet. Dieser Prozess verläuft reguliert und konnte für Archaea nachgewiesen werden (Cobucci-Ponzano *et al.*, 2006). Ein weiterer Mechanismus ist das Pausieren von Ribosomen an spezifischen Positionen während der Elongation, was eine herabgesetzte Translationseffizienz zur Folge hat (Chartrand *et al.*, 2002).

4. Die untranslatierten Regionen von mRNAs: Struktur, Funktion, Evolution

Bisher wurde angenommen, dass die mRNAs proteinkodierender Gene aller Organismen aus einer 5'-UTR, einem offenen Leserahmen und einer 3'-UTR bestehen. Die durchschnittliche 5'-UTR Länge ist mit 100-200 Nukleotiden relativ konstant für alle aufgeführten Taxa (Abbildung 3). Es ist bekannt, dass 3'-UTRs durchschnittlich länger sind als 5'-UTRs, und innerhalb der aufgeführten Taxa erheblich variieren können (Abbildung 3). Daher wird angenommen, dass die 3'-UTRs eine bedeutende Rolle bei der Transkript-spezifischen Regulation der Translation spielen.

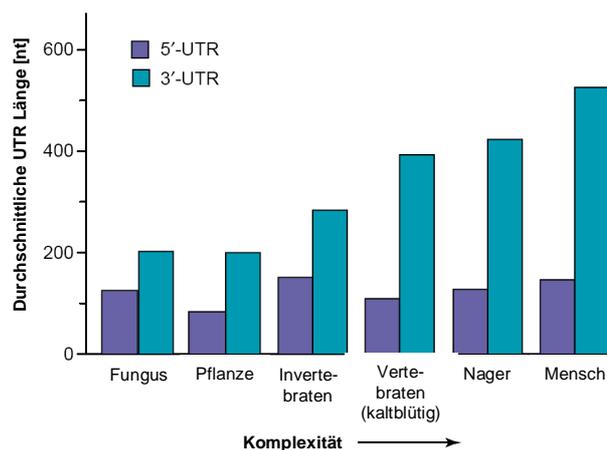


Abbildung 3: Länge der 5'- und 3'-UTRs von mRNAs verschiedener eukaryotischer Gruppen

Durchschnittliche Längen von 5'- und 3'-UTRs verschiedener Klassen und Spezies (verändert nach Mazumder *et al.*, 2003).

Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die Länge der 3'-UTRs im Laufe der Evolution mit zunehmender Komplexität des Organismus zunimmt (Abbildung 3; Mignone *et al.*, 2002). Neben der Regulation der Translation können UTRs zahlreiche weitere Funktionen einnehmen. Es konnte gezeigt werden, dass sie die Transkriptstabilität, Polyadenylierung von Transkripten, Genexpression und intrazelluläre RNA-Lokalisierung beeinflussen können (Chabanon *et al.*, 2004; de Moor *et al.*, 2005; Mazumder *et al.*, 2003; Mignone *et al.*, 2002; Pesole *et al.*, 2000).

Strukturelle Eigenschaften der 5'-UTR können die Effizienz der Translation beeinflussen. mRNAs, die für Proteine kodieren, die in Entwicklungsprozesse involviert sind (z.B. Wachstumsfaktoren, Transkriptionsfaktoren oder proto-

Oncogene) können 5'-UTRs besitzen, die länger als der Durchschnitt sind (Mignone *et al.*, 2002). Diese können für stromaufwärts gelegene offene Leserahmen, alternative AUG-Startkodons, Sekundärstrukturen oder andere spezifische Motive kodieren, die die Effizienz der Translation beeinflussen. Cis-agierende Elemente in den 5'-UTRs können die Lokalisierung einer mRNA festlegen (Chan *et al.*, 1999; Macdonald *et al.*, 1993), und Mutationen in den 5'-UTRs konnten mit Krankheiten in Verbindung gebracht werden (Chappell *et al.*, 2000; Hudder & Werner, 2000; Signori *et al.*, 2001).

Die Stabilität von mRNAs wird häufig über cis-agierende Elemente, wie AU-reiche Regionen, die innerhalb der 3'-UTRs lokalisiert sind, reguliert (Peng *et al.*, 1996). Eukaryotische 3'-UTRs können für die Lokalisierung von mRNAs verantwortlich sein (Ainger *et al.*, 1997; Bashirullah *et al.*, 2001; St Johnston *et al.*, 1991), und Mutationen in 3'-UTRs konnten mit Krankheiten assoziiert werden (Conne *et al.*, 2000).

Über die biologische Funktion von UTRs in Archaea ist nur wenig bekannt. Die einzige bisher charakterisierte Funktion ist der Selenocysteineinbau am Stopkodon in einigen methanogenen Archaea (Rother *et al.*, 2001).

5. Artificielle Aptamere und Ribozyme: Ihre Anwendung zur konditionalen Genexpression

Vor der Entdeckung nativer Riboswitches konnte bereits *in vitro* gezeigt werden, dass RNA zur Bindung verschiedener kleiner Moleküle fähig ist (Ellington & Szostak, 1990). Aptamere sind RNA-Elemente, die diverse Liganden wie Nukleotide, Aminosäuren, Koenzyme, Aminoglykoside und S-Adenosylmethionin mit hoher Affinität und Selektivität binden können (Burke & Gold, 1997; Hermann & Patel, 2000). In der freien Form liegt die Ligand-bindende Region oft völlig unstrukturiert vor und die Bindung des Liganden geht mit der Ausbildung und Stabilisierung starker Sekundärstrukturen einher. Dies stellt die Grundvoraussetzung zur Kopplung von Liganden-Bindung und genetischer Kontrolle dar. So kann die Fähigkeit der Aptamere, ihre Sekundärstruktur in der Anwesenheit eines Liganden zu verändern, für konditionale Genexpressions-

Systeme genutzt werden. Erste Ansätze zur konditionalen Genexpression *in vitro* und *in vivo* lieferten die Insertion artifizierender Aptamere in die 5'-UTR von Reportergenen (Werstuck & Green, 1998). Ein gut charakterisiertes Beispiel ist das Tetracyclin-Aptamer, welches eine bis zu 40fache Regulation hervorrufen kann (Weigand & Sues, 2007), und *in vitro* Tetracyclin mit einer Affinität von 0,8 nM bindet (Muller *et al.*, 2006). Strukturelle und enzymatische Analysen in Kombination mit Mutagenese-Experimenten konnten ein Modell der Tetracyclin-induzierten Regulation der Translation generieren (Abbildung 4).

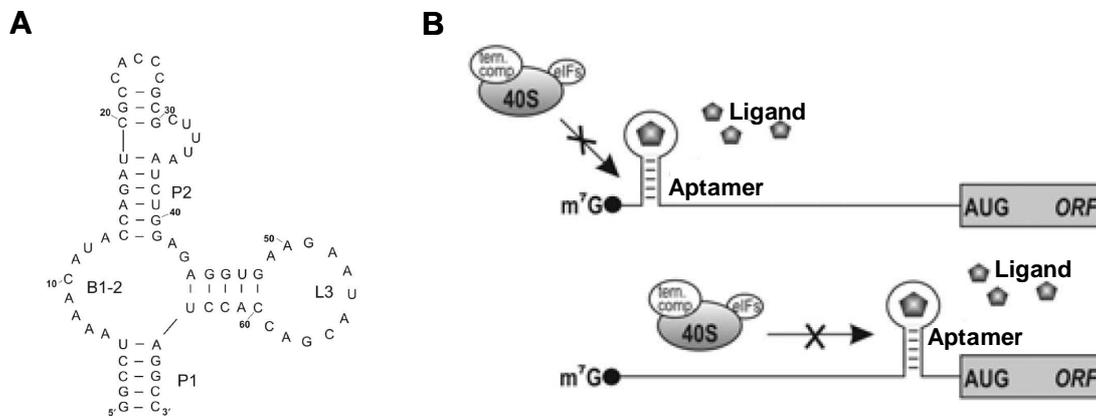


Abbildung 4: Artifizielles Tetracyclin Aptamer zur konditionalen Genexpression

(A) Sekundärstruktur des Tetracyclin Aptamers (Hanson *et al.*, 2005; Muller *et al.*, 2006). Stamm (P), *Bulge* (B) und *Loop* (L) (B) Kontrolle der Translationsinitiation durch die Insertion eines Aptamers in die 5'-UTR einer eukaryotischen mRNA. Die Applikation des Liganden stabilisiert die Ausbildung einer starken Sekundärstruktur, die entweder der Bindung der ribosomalen Untereinheit an die CAP-Struktur oder dem *Scanning* interferiert (Suess & Weigand, 2008).

Auch in Abwesenheit des Induktors Tetracyclin bilden die Stämme P1 und P2 das Gerüst des Aptamers. Die Ausbuchtung B1-2 und die Schleife L3 stellen die eigentliche Bindestelle für Tetracyclin dar. Dabei formt der obere Teil der Ausbuchtung B1-2 eine Art Deckel, der das Tetracyclin in der Bindetasche hält. Multiple Interaktionen des Tetracyclin zu B1-2 und L3 verursachen die intermolekulare Bindung innerhalb des Aptamers, ähnlich zu einem *Pseudoknot*. Dieser Komplex kann dann die Anlagerung des Ribosoms und somit die Initiation der Translation verhindern (Abbildung 4A; Hanson *et al.*, 2005; Muller *et al.*, 2006). Am CAP-lokalisierte Aptamere verhindern die Bindung des 43S ternären

Komplexes, während die Integration des Aptamers nahe des Startkodons das *Scanning* der kleinen ribosomalen Untereinheit blockieren (Abbildung 4B; Hanson *et al.*, 2003).

Selbstspaltende Ribozyme stellen ein weiteres Werkzeug zur konditionalen Genexpression dar. Dabei regulieren Ribozyme die Genexpression indem sie entweder die Degradation einer mRNA stimulieren oder durch Spaltung funktionelle RNA Elemente wie z.B. die RBS freisetzen (Ogawa & Maeda, 2008; Wieland & Hartig, 2008; Yen *et al.*, 2004). Zur konditionalen Genexpression ist die Entwicklung allosterischer Ribozyme notwendig. Dazu werden Aptamere mit nativen oder synthetischen Ribozymen fusioniert (Suess & Weigand, 2008). Allosterische Ribozyme, die unter physiologischen Bedingungen aktiv sind, konnten bereits identifiziert werden (Ogawa & Maeda, 2008; Soukup *et al.*, 2000). Durch die Aptamer-Fusion ist beispielsweise die Theophyllin-abhängige Regulation der Translation durch ein *Hammerhead*-Ribozym möglich. In inaktiver Form, ohne gebundenen Liganden, ist die SD-Sequenz durch das Ribozym verdeckt. Die Bindung des Liganden induziert die autokatalytische Spaltung des *Hammerhead*-Ribozyms. Dies hat die Freilegung der SD-Sequenz zur Folge, und ermöglicht so die Initiation der Translation.

Das minimale funktionale *Hammerhead*-Ribozym besteht aus drei Helices, enthält einen konservierten Kern aus 11 Nukleotiden und alle Motive, die für die Transesterifizierung zur autokatalytischen Spaltung des Ribozyms notwendig sind (Hammann & Lilley, 2002). Allerdings scheinen minimale *Hammerhead*-Ribozyme für eine effiziente *in vivo* Funktion und exogene Kontrolle der Genexpression nicht geeignet zu sein (Uhlenbeck, 2003). Es ist anzunehmen, dass die Effizienz der Spaltung unter relativ niedrigen, physiologischen Mg^{2+} -Konzentrationen nicht ausreichend zur kontrollierten Genexpression ist. Strukturelle Elemente außerhalb des minimalen *Hammerhead*-Ribozyms können durch Stabilisierung der tertiären Struktur die Spalt-Aktivität stark erhöhen (Khvorova *et al.*, 2003).

6. Zielsetzung der Arbeit

Die relativen Anteile von archaealen Transkripten mit und ohne 5'-UTR in verschiedenen Archaea wurden bereits *in silico* vorhergesagt (Torarinsson *et al.*, 2005). Diese Vorhersagen wurden allerdings für nur wenige 5'-UTRs experimentell verifiziert.

Noch weitaus weniger 3'-UTRs wurden bisher experimentell bestimmt. Sowohl der Anteil der Transkripte, die eine 3'-UTR besitzen, als auch die Längenverteilung der 3'-UTRs sind daher noch weitestgehend unbekannt. Vorhersagen über 3'-UTRs sind *in silico* nur schwierig zu treffen, da die archaeale Terminator-Struktur nicht bekannt ist. Zusätzlich ist eine posttranskriptionale Modifizierung der 3'-UTRs nicht auszuschließen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die 5'- und 3'-UTRs von Transkripten des halophilen Archaeons *H. volcanii* bestimmt werden. Diese UTR-Datenbank aus 5'- und 3'-UTRs sollte anschließend zur Charakterisierung haloarchaealer UTRs eingesetzt werden, um neue und zusätzliche Informationen über die Mechanismen der haloarchaealen Transkriptionsinitiation und -termination, als auch der Translationsinitiation zu gewinnen.

Über die Mechanismen der Translationsinitiation und -regulation in Archaea ist bisher nur wenig bekannt. Ein haloarchaeales Reporter-gen-System sollte zur Charakterisierung der *in vivo* Funktion ausgewählter 5'- und 3'-UTRs herangezogen und die biologische Rolle von UTRs in Haloarchaea im Rahmen der Translationsinitiation und der Translationsregulation untersucht werden.

Die Regulation der Genexpression ist auf Ebene von Transkription und Translation möglich. Artificielle Aptamere stellen Systeme zur konditionalen Genexpression dar. Die AG Süß (Institut für Molekulare Biowissenschaften, Universität Frankfurt) hat erfolgreich artificielle Aptamere entwickelt, die Tetracyclin-abhängig die Translation reprimieren (Hanson *et al.*, 2003; Hanson *et al.*, 2005; Muller *et al.*, 2006; Suess *et al.*, 2003; Weigand & Suess, 2007). Eine Alternative zur konditionalen Genexpression stellen allosterische Ribozyme, sogenannte Aptazyme, dar. Die Aptazyme kombinieren Aptamerdomänen mit Ribozymen (Ogawa & Maeda, 2008; Soukup *et al.*, 2000; Suess & Weigand, 2008). In Kooperation mit der AG Süß sollte die Funktion und die Anwendbarkeit

artifizieller Aptamere und Ribozyme in *H. volcanii* zur konditionalen Genexpression getestet werden. Da Archaea nicht sensitiv für Tetracyclin sind, stellen sie die idealen Wirtsorganismen für dieses System dar.

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Material

1.1 Laborausstattung

Gerät	Hersteller
Brutschrank B6060	Heraeus Instruments, Hanau
Brutschrank	Buchofer, Reutlingen
Centrifuge 5417	Eppendorf, Hamburg
Centrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg
Gene Amp PCR-System 2400	Applied Biosystems, Weiterstadt
Gene Amp PCR-System 9700	Applied Biosystems, Weiterstadt
GenePulser [®] Elektroporation System	Biorad, München
Heizblock	Liebisch, Bielefeld
High Resolution System E.A.S.Y 440K	Herolab, Wiesloch
Hybridisierungssofen Compact Line OV4	Biometra, Göttingen
Innova 4300 Inkubator shaker	New Brunswicks, Nürtingen
Klett-Colorimeter 800-3	Manostat Corporation, NY, USA
Mastercycler [®] gradient	Eppendorf, Hamburg
Mikroskop Axioskop Standard 25	Carl Zeiss, Oberkochen
Nanodrop Spectrophotometer ND-1000	Nanodrop Tech., Rockland, USA
Neubauer Zählkammer (0,2 mm Tiefe)	Hirschmann, Eberstadt
Pipette 2,5µl MicroOne [®]	Starlab, Ahrensberg
Pipette 20 µl Gilson	Gilson, Middleton, USA
Pipette 200 µl Gilson	Gilson, Middleton, USA
Pipette 1000 µl Gilson	Gilson, Middleton, USA
Pipettierhilfe, Pipetus [®]	Hirschmann, Eberstadt
pH-Meter CG 825	Schott, Mainz
RealTime-PCR Cycler Rotor Gene 3.5	Corbett Research, Mortlake, AU
SANOclav	Adolf Wolf, Bad Überkingen
Sonifier 250	Branson, Danbury, USA
Sorvall Zentrifuge RC 5C Plus	Du Pont, Wilmington, USA

Specord S600 Spectrophotometer	Analytic Jena, Jena
SPECTRAmax [®] 340PC	Mo. Devices, Sunnyvale, USA
Quartz Küvetten 6040, 10 mm	MAGV, Rabenau-Londorf
Vortex Genie 2 [®]	Scientific Industries, USA
Waage TE1245OCE	Sartorius, Göttingen
Waage PM 4800 Delta Range [®]	Mettler, Gießen

1.2 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Cryo Röhrchen (2 ml)	Roth, Karlsruhe
Elektroporationsküvetten (1 mm)	Biorad, München
Reaktionsgefäß (0,2 ml/1,5 ml / 2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Erlenmeyerkolben	Schott Duran, Mainz
Falcon Tubes (15 ml / 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Mikrotiterplatten 96-well (Flachboden)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen (20, 200 und 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Petrischalen	Greiner bio-one, Solingen
RealTime PCR-Gefäß (0,1 ml)	Corbett Research, Mortlake, AU
Spritze (10 ml)	Braun, Melsungen
Sterilfilter (0,45 µm Celluloseacetat)	Whatmann, Dassel
Strip Tubes (0,1 ml)	Corbett Research, Mortlake, AU
Szintillationsgefäße	Zinsser Analytic, Frankfurt

1.3 Chemikalien, Reagenzien und Lösungen

Chemikalien	Hersteller
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Agarose Typ VII, low melting point	Applichem, Darmstadt
Bacto [®] -Agar	BD, Heidelberg
Bacto [®] -Hefeextrakt	BD, Heidelberg
Bacto [®] -Trypton	BD, Heidelberg
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Chloroform	Fluka, Neu Ulm

Desoxyribonukleotide	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
Dihydrofolat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dikaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dimethylformamid	Roth, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
DMPC	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
EDTA	Roth, Karlsruhe
Ethanol 96% p.a.	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Fluka, Neu-Ulm
Formaldehyd 37%	Merck, Darmstadt
Formamid 99% p.a.	Roth, Karlsruhe
Glukose	Merck, Darmstadt
Glycerin 87 %	Roth, Karlsruhe
Kaliumazetat	Fluka, Neu-Ulm
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat	Roth, Karlsruhe
MOPS	Roth, Karlsruhe
Natriumazetat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
PEG 600	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Phenol	Roth, Karlsruhe
Tri-Natriumcitrat	Roth, Karlsruhe
Tris	Roth, Karlsruhe
Tween 20	Merck, Darmstadt

1.4 Enzyme

Enzym	Hersteller
M-MLV Reverse Transkriptase (<i>RNaseH point mutant</i>)	Promega, Mannheim
<i>Pfu</i> -Polymerase	Promega, Mannheim
Superscript Reverse Transkriptase	Promega, Mannheim

T4-DNA Ligase	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
T4-RNA Ligase	New England Biolab, Frankfurt
Taq PCR Mastermix	Qiagen, Hilden
Taq-Polymerase	Promega, Mannheim
Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
RNAse Inhibitor RNasin	Promega, Mannheim
RQ1 RNAse free DNase	Promega, Mannheim

1.5 Plasmide

Tabelle 3: Generierte und verwendete Plasmide und ihre Funktion

Plasmid	Beschreibung	Referenz/Quelle
pSD1/M2-18	Shuttle Vektor mit Replikationsursprüngen für <i>E. coli</i> und <i>H. volcanii</i> ; <i>dhfr</i> -Gen unter Kontrolle des <i>fdx</i> -Promotors; Selektionsgene Nov ^R und Amp ^R	(Danner & Soppa, 1996)
pMB1	pSD1/M2-18 Derivat; Eliminierung der nativen 3'-UTR der <i>dhfr</i> und zusätzlicher Nukleotide stromaufwärts des Startkodons	Diese Arbeit (Brenneis <i>et al.</i> , 2007)
pMB3	pMB1 Derivat mit 5'-UTR des <i>hlr</i> -Gens	Diese Arbeit (Brenneis <i>et al.</i> , 2007)
pMB4	pMB1 Derivat mit 3'-UTR des <i>hlr</i> -Gens	Diese Arbeit (Brenneis <i>et al.</i> , 2007)
pMB5	pMB1 Derivat mit 5'- und 3'-UTR des <i>hlr</i> -Gens	Diese Arbeit
pMB6	pMB1 Derivat mit 5'-UTR des <i>hp</i> -Gens	Diese Arbeit (Brenneis <i>et al.</i> , 2007)
pMB7	pMB1 Derivat mit 3'-UTR des <i>hp</i> -Gens	Diese Arbeit (Brenneis <i>et al.</i> , 2007)
pMB8	pMB1 Derivat mit 5'- und 3'-UTR des <i>hp</i> -Gens	Diese Arbeit
pMB14- pMB17	pMB1 Derivate mit artifizieller 5'-UTR	Diese Arbeit (Brenneis <i>et al.</i> , 2007)
pMB18	pMB1 Derivat mit stabilisierter 5'-UTR des <i>hp</i> -Gens	Diese Arbeit

pMB19	pMB1 Derivat mit destabilisierter 5'-UTR des <i>hp-Gens</i>	Diese Arbeit
pMB20	pMB1 Derivat mit mutierter 3'-UTR des <i>hlr-Gens</i>	Diese Arbeit
pMB21	pMB1 Derivat mit mutierter 3'-UTR des <i>hp-Gens</i>	Diese Arbeit
pMB22	pMB1 Derivat mit 5'-UTR des <i>hlr-Gens</i> und 3'-UTR des <i>hp-Gens</i>	Diese Arbeit
pMB23	pMB1 Derivat mit 5'-UTR des <i>hp-Gens</i> und 3'-UTR des <i>hlr-Gens</i>	Diese Arbeit
pMB24	pMB1 Derivat mit stabilisierter 5'-UTR des <i>hp-Gens</i> und nativer 3'-UTR des <i>hp-Gens</i>	Diese Arbeit
pMB25	pMB1 Derivat mit destabilisierter 5'-UTR des <i>hp-Gens</i> und nativer 3'-UTR des <i>hp-Gens</i>	Diese Arbeit
pMB1*	pMB1 Derivat; <i>dhfr</i> mit verlängertem N-Terminus	Diese Arbeit, AG Süß
pMB1-1	pMB1* Derivat mit aktivem <i>Hammerhead</i> -Ribozym am Startkodon	Diese Arbeit, AG Süß
pMB1-2	pMB1* Derivat mit inaktivem <i>Hammerhead</i> -Ribozym am Startkodon	Diese Arbeit, AG Süß
pMB1-6	pMB1 Derivat mit Tetracyclin Aptamer stromaufwärts des Startkodons	Diese Arbeit, AG Süß
pMB14-4	pMB1 Derivat mit artifizieller 5'-UTR; Tetracyclin Aptamer direkt stromaufwärts des Startkodons inseriert	Diese Arbeit, AG Süß
pMB14-5	pMB1 Derivat mit artifizieller 5'-UTR; Tetracyclin Aptamer am 5'-Ende der 5'-UTR inseriert	Diese Arbeit, AG Süß
pNP10	<i>neuromedin K</i> Rezeptor Gen	(Patenge & Soppa, 1999)
pWHE601-AN32SH	Shuttle Vektor für <i>E. coli</i> und <i>S. cerevisiae</i> ; kodiert für Tetracyclin Aptamer	(Suess <i>et al.</i> , 2003)
pWHE601-Actin+HH-aktiv	Shuttle Vektor für <i>E. coli</i> und <i>S. cerevisiae</i> ; kodiert für aktive <i>Hammerhead</i> -Variante	AG Süß

pWHE601-Actin+HH-inaktiv	Shuttle Vektor für <i>E. coli</i> und <i>S. cerevisiae</i> ; kodiert für inaktive <i>Hammerhead</i> -Variante	AG Süß
pSKII	Phagemid Vektor mit MCS und flankierenden T3 und T7 Promotoren; Phagen f1(+)/(-) Replikationsursprünge; pUC Replikationsursprung für <i>E. coli</i> ; <i>lacZ</i> zur Blau-/Weiß-Selektion; Amp ^R	Stratagene

1.6 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide (Tabelle 4-6) wurden von der Firma Biomers, Ulm bezogen.

Tabelle 4: Oligonukleotide zur Bestimmung der untranslatierten Regionen von mRNAs

Die reverse Transkription fand mit Hilfe der genspezifischen RT Oligonukleotide statt, die darauffolgende PCR unter Verwendung der genspezifischen PCR1/PCR2 Oligonukleotid-Paare und die zweite verschachtelte PCR-Reaktion mit den genspezifischen Oligonukleotiden NES1/NES2. Die Gene sind analog zu Tabelle 7 des Ergebnisteils nummeriert. **(A)** RT Oligonukleotide **(B)** PCR und **(C)** Nested Oligonukleotid-Paare.

A

Gen Nr.	RT 5'→3'
1	GGTCAGCAGGTTTCATGTCCGTCTC
2	ATAACCGAGAGCGCCTCCTCACC
3	AGGTCGTCGTCGGAGAATCG
4	GTCTCGGTCGTCGATTCGGTCTC
5	GTGAGCGTGGACGGTGCTCTTC
6	AGTCGTCTTCGTCGTCGGGTTC
7	GCGTCGAGGGAACGAACAC
8	ACGAGCGGTCGCTCGATG
9	GCCGTGCTGCTCGTCGTAG
10	TACTGCCGTCTTCGGTCGTCTGC
11	ATGCTCGGCCACGGGAGTTC
12	GAGCGTCCACGGGAAGTTGC
13	CCGTCCCGATGAACAGGAGGAG
14	CGAAGAACCGTCGCGAGAGG
15	GGACCGCCAACATCTTCCATGTG
16	AGCCGCCAGTGTCGTTGAAGAAG
17	TCGCCTCGTCGTCGGTCGTC

B

Gen Nr.	PCR1 5'→3'	PCR2 5'→3'
1	GCGAGTTCCTGCGGGAGTACGTC	GATGGTCTCGGGCTCGACGAACG
2	GACGCCGTGAACACGAGGGATAC	TGCGGTTTCGACCTCGCAGTAGC
3	CCGGCGTCTCCCACGGGTTC	ACGAAGTGCGGGCGGTAGAC
4	GCGCCAAGCAGTTCTATCCCGAG	GAACCGCCCTCTCCGGTACAGCC
5	TGAGCGGTCCCGCCTACGTCATC	TCGCCTCGACCAGTTCGCCCATC
6	ACGCCGACTTCGACTCGTGGGTG	GTGCCGCTCGCACC GGTCAC
7	CGGCCTCAGCGTCGTCATGAGC	GCGCACGTCTCGGTCTGTAACCC
8	CGGACGACGGTCACGACCACAG	GTCCTCGGCGTCCGCCAGAAG
9	CGCTCCTCGCCGACGAGGAACTG	ATTCGGTCTCGGCCTCGCCCTCG
10	GGGACACGCAGGACTTCTC	TGCCCGAACTATCGAAGCAGCC
11	CCGCCGAGTGGGAACTCGAC	CGGCCGATGACGCGGTTCTC
12	CACTCCTACGAGCTGGGCTGGTG	TTCGCCGTCACGCCATCGTCTC
13	ACGAGGTGTCGGTGC GGAGTTC	GGACGCGGTAGAACAGAATCCAGC
14	CGGGCTCCAGCTCGCTGAACTC	CACGTTGCGACGCCGGAGCTTC
15	CTCGAAGAGGGTCAGGAAGTG	AACACGTCGTCGTCCGCGTCGTCAG
16	GACGACGACGTGTTCTTCC	CGCCATTGCCTTTGAAACCAACG
17	GGTTAGTCGTCGAGCCGGTCCAG	GCCGAACCGCGAGGAGGTACGTC

C

Gen Nr.	NES1 5'→3'	NES2 5'→3'
1	ACGTCCGCGATCACGGCATTCTG	GAGATGTCGTCGCGCTCTCGCAG
2	GCCGGACGACAGCATTCTCGACC	GCTACTTCCCGCTCGTCGTCCAC
3	GTTCCGCCACCTCGGCTACG	CGTCGATGCCGCGGGCTTTC
4	CCGAAATCCCGGAAGACGAACAG	CCGCGCCGCCGTA CTTCACGTAG
5	TTCGAACAGGGCGTCGCGGAAC	TGTGGTGCAGAGCGCCAAGGAG
6	CGTCCTCGCGCTCTGTTCCG	CCGGTCACGAGAGCGACGGTTCC
7	CGGCTGGAGCGTCTGGTTCGTC	TCGTGAACCCGCGTCGTCCGAG
8	ACCACGACCACACGGACGAACAC	CGTCAAGCGTTCCGGTCGT CAGTG
9	ACCGCTACCGGAACTCC	GACTGTGCGGGCTTCGGGTCC
10	ATGCCGACGGGCGACGACTACG	ATCGAAGCAGCCGGCCAGTCCAG

11	AACTCGACGCCGAGACCGACCAC	GCGGCGACAGAGACGAGTTCCATC
12	CCTCGGCGTGACGCTGGACATGG	CTCCGCCGACAGCTCTCGCATCGTG
13	GTACGCCTTCGGCGCGGACTCG	CCGACGACGGCGAGAACGACCAC
14	CGAGAAGCAACTGCTCGCCATCG	CGGTGCTTCGGCCGCAGAGTTC
15	GGGTCAGGAAGTGGAGTTCGACATC	CGTCCGCGTCGTCAGTAGAGATG
16	ACCTCGAAGAGGGTCAGGAAATC	CGACCTCACGCTGATAAGTCTTC
17	GGAACGGAAGATGCTCAAAGG	GTACGTCCCGACGACGCCGATTCC

Tabelle 5: Oligonukleotide zur Klonierung

Oligonukleotid	Sequenz 5'→3'	Beschreibung
MZ-psd-MCS_f	CGTTCGGAAGCCGAACT CT	Amplifikation des <i>fdx</i> -Promotors aus pSD1/M2-18
MB-Prom_r	ACTGCAGAGTTCGGCTTC GTTG	Amplifikation des <i>fdx</i> -Promotors aus pSD1/M2-18
MB-Prom-DHFR_r	GACAGAGACGAGTTCCAT ACTGCAGAGTTCGGCTTC GTTG	Amplifikation des <i>fdx</i> -Promotors aus pSD1/M2-18 zur Fusion mit der <i>dhfr</i>
MB-dhfr_f	ATGGAAGCTCGTCTCTGTC GCCG	Amplifikation der <i>dhfr</i> aus pSD1/M2-18
DHFR-3'	CTATCTGGACGACGCCG ACCGG	Amplifikation der <i>dhfr</i> aus pSD1/M2-18
MB-dhfr-Term_r	GGGGTACCAAAAAAAAAA ACTATCTGGACGACGCC GACCGG	Amplifikation der <i>dhfr</i> aus pSD1/M2-18, Anfügen der Restriktionsschnittstelle <i>KpnI</i> und des Terminators
MB-Prom-5'hoxA_r	CTGTCTCGCTATCTACTG CAGAGTTCGGCTTCGTTG	Amplifikation des <i>fdx</i> -Promotors aus pSD1/M2-18, Anfügen der 5'-UTR des <i>hlf</i> -Gens
MB-dhfr-5'HoxA_f	AGATAGCGAGACAGATG GAACTCGTCTCTGTCGCC G	Amplifikation der <i>dhfr</i> aus pSD1/M2-18, Anfügen der 5'-UTR des <i>hlf</i> -Gens
MB-dhfr3'-hoxa3'_r	GGGGTACCTGAGGGGCT CCGCGGGAACAGACGAG TGCTATCTGGACGACGCC GACCGG	Amplifikation der <i>dhfr</i> aus pSD1/M2-18, Anfügen der Restriktionsschnittstelle <i>KpnI</i> und der 3'-UTR des <i>hlf</i> -Gens
MB-est5'-Prom_r	ATCGACCCGCGTCGTCG TGGTCACTGCAGAGTTCG GC	Amplifikation des <i>fdx</i> -Promotors aus pSD1/M2-18, Anfügen der 5'-UTR des <i>hp</i> -Gens
MB-dhfr-5'estA_f	GACGACGCGGGTTCGATA TGGAAGCTCGTCTCTGTCG CCG	Amplifikation der <i>dhfr</i> aus pSD1/M2-18, Anfügen der 5'-UTR des <i>hp</i> -Gens

MB-est3'_f	CGGCGTCGTCCAGATAG TTCGCAACATATCTTCG	Amplifikation der 3'-UTR des <i>hp-Gens</i> und der überlappenden <i>dhfr</i> Region
MB-est3'_r	GGGGTACCGCCGCAACG CTGGCGCGGTC	Amplifikation der 3'-UTR des <i>hp-Gens</i> , Anfügen der Restriktionsschnittstelle <i>KpnI</i>
MB-dhfr-est5'stab_f	GACCCGCCGACGCGGGT CGATATGGAACCTCGTCTC TGTCGCCG	Amplifikation der <i>dhfr</i> aus pSD1/M2-18, Anfügen der stabilisierten 5'-UTR des <i>hp-Gens</i>
MB-Prom-est5'stab_r	ATCGACCCGCGTCGGCG GGTCACTGCAGAGTTTCG GCTTCGTTG	Amplifikation des <i>fdx</i> -Promotors aus pSD1/M2-18, Anfügen der stabilisierten 5'-UTR des <i>hp-Gens</i>
MB-dhfr-est5'destab_f	GACCACGACGACGAACC AGGATATGGAACCTCGTCTC CTGTCGCCG	Amplifikation der <i>dhfr</i> aus pSD1/M2-18, Anfügen der destabilisierten 5'-UTR des <i>hp-Gens</i>
MB-Prom-est5'destab_r	ATCCTGGTTCGTCGTCGT GGTCACTGCAGAGTTTCG GCTTCGTTG	Amplifikation des <i>fdx</i> -Promotors aus pSD1/M2-18, Anfügen der destabilisierten 5'-UTR des <i>hp-Gens</i>
MB-Prom-hoxA3'mut_r	GGTACCTGAGGGGCTCC GCGTTCTTATTGGAGTG	Amplifikation der <i>dhfr</i> aus pSD1/M2-18, Anfügen der Restriktionsschnittstelle <i>KpnI</i> und der mutierten 3'-UTR des <i>hhr-Gens</i>
MB-Prom-est3'mut_r	GGTACCGCCGCAACGCT GGCGCGGTCGGGTAATT AGGAA	Amplifikation der mutierten 3'-UTR des <i>hp-Gens</i> , Anfügen der Restriktionsschnittstelle <i>KpnI</i>
MB-Prom-5'UTR1_r	ATCTTGCCTGAAATGTGG TAACTGCAGAGTTCGGCT TCGTTG	Amplifikation des <i>fdx</i> -Promotors aus pSD1/M2-18, Anfügen der artifiziellen 5'-UTR1
MB-dhfr-5'UTR1_f	TACCACATTTTCAGGCAAG ATATGGAACCTCGTCTCTG TCGCCG	Amplifikation der <i>dhfr</i> aus pSD1/M2-18, Anfügen der artifiziellen 5'-UTR1
MB-Prom-5'UTR2_r	TGAAGTCCAGTTGTGAGT CGACTGCAGAGTTCGGC TTCGTTG	Amplifikation des <i>fdx</i> -Promotors aus pSD1/M2-18, Anfügen der artifiziellen 5'-UTR2
MB-dhfr-5'UTR2_f	CGACTCACAACCTGGACTT CAATGGAACCTCGTCTCTG TCGCCG	Amplifikation der <i>dhfr</i> aus pSD1/M2-18, Anfügen der artifiziellen 5'-UTR2
MB-Prom-5'UTR3_r	TGGTATCGAGAGGCCGTT GTACTGCAGAGTTCGGCT TCGTTG	Amplifikation des <i>fdx</i> -Promotors aus pSD1/M2-18, Anfügen der artifiziellen 5'-UTR3
MB-dhfr-5'UTR3_f	ACAACGGCCTCTCGATAC CAATGGAACCTCGTCTCTG TCGCCG	Amplifikation der <i>dhfr</i> aus pSD1/M2-18, Anfügen der artifiziellen 5'-UTR3
MB-Prom-5'UTR4_r	GCCAAGTTCTCTGCTGCA GCACTGCAGAGTTCGGC TTCGTTG	Amplifikation des <i>fdx</i> -Promotors aus pSD1/M2-18, Anfügen der artifiziellen 5'-UTR4
MB-dhfr-5'UTR4_f	GCTGCAGCAGAGAACTT GGCATGGAACCTCGTCTCT GTCGCCG	Amplifikation der <i>dhfr</i> aus pSD1/M2-18, Anfügen der artifiziellen 5'-UTR4

Tabelle 6: Oligonukleotide für RealTime-PCR Analysen

Oligonukleotid	Sequenz 5'→3'	Beschreibung
RibL-3f	CCGACGCGAGTACATCACGGGTATC	Amplifikation des <i>ribL10</i> als <i>Housekeeping</i> Gen (ribosomales Protein)
RibL-3r	GATGACGTGGTGCGGGAAGTTGC	Amplifikation des <i>ribL10</i> als <i>Housekeeping</i> Gen (ribosomales Protein)
hpy-2f	TATCCGGCAGAACGCAGGTGAG	Amplifikation des <i>hpyA</i> als <i>Housekeeping</i> Gen (Histon)
hpy-2r	ATATCGGCCAGGGCGATTGAG	Amplifikation des <i>hpyA</i> als <i>Housekeeping</i> Gen (Histon)
DHFR RT3_f	GGCCGGACGACGTTTCGAGTCGATG	Amplifikation der <i>dhfr</i>
DHFR RT3_r	GATGGCGGCACCACCGATGACGTAGG	Amplifikation der <i>dhfr</i>

1.7 Kit-Systeme

Kit-System	Hersteller
BCA Protein Assay Kit	Pierce, Rockfort, USA
Big Dye Terminator RR Mix	Applied Biosystems, Weiterstadt
DyNAmo SYBR Green qPCR Master Mix	Finnzymes Oy, Espoo, FL
PCR Purification Kit	Promega, Mannheim
PureYield™ Plasmid Midiprep Systems	Qiagen, Hilden
Rneasy Mini Kit	Pierce, Rockfort, USA

1.8 Größenstandards

Größenstandard	Hersteller
GeneRuler™ 100 bp DNA-Leiter plus	Fermentas, St. Leon-Rot

1.9 Computerprogramme und Datenbanken

Identifizierung konservierter DNA und RNA Motive

Mit Hilfe des Programms *RNA structure logos* können konservierte Motive visualisiert werden, die einen fixen Abstand zu einem bestimmten Punkt haben

(Gorodkin *et al.*, 1997; Schneider & Stephens, 1990). Dazu werden Sequenzen mit einer definierten Länge stromaufwärts und stromabwärts des *Alignment* Punktes aus Datenbanken extrahiert. Die Logos wurden unter <http://www.cbs.dtu.dk/~gorodkin/appl/slogo.html> generiert.

Das Programm *MEME* erlaubt die Identifizierung konservierter Sequenzmotive (Bailey & Elkan, 1994). Dabei können die Motive variable Lokalisierungen in den Sequenzen einnehmen, in allen oder nur einzelnen Sequenzen vorhanden sein und mehr als einmal innerhalb einer Sequenz auftreten. Die Analyse erfolgte unter <http://meme.sdsc.edu./meme/meme.html>.

Vorhersage sekundärer mRNA Strukturen

Mit Hilfe verschiedener Programme wurden putative RNA-Sekundärstrukturen vorhergesagt. Das Programm *mfold* 3.2 wurde unter <http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/rna/form1.cgi> verwendet (Mathews *et al.*, 1999; Zuker, 2003) und das Programm *RNA-shapes* wurde unter <http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnashapes> verwendet (Reeder & Giegerich, 2005; Steffen *et al.*, 2006). Dirk Metzeler (Bioinformatik, Universität Frankfurt) war so freundlich die RNAs unter Verwendung eines selbst entwickelten Programms zu falten, welches *Pseudoknots* berücksichtigt (Metzeler, unveröffentlicht).

Datenbanken

Die Genomsequenz von *H. volcanii* wurde aus dem UCSC Genome Browser der *Genome Bioinformatics Group of UC Santa Cruz* unter <http://archaea.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway?db=haloVolc1> (Schneider *et al.*, 2006) und der *H. volcanii Genome Website* (Umbi/Comb) <http://zdna2.umbi.umd.edu/~haloweb/hvo.html> extrahiert.

Kodonpräferenz Plots

Zur Qualitätssicherung korrekt annotierter Gene aus *H. volcanii* wurden Kodonpräferenz Plots unter <http://genius.embnet.dkfz-heidelberg.de/menu/w2h/w2hdkfz/> durchgeführt (Soppa, 1994).

2. Organismen und Zellzucht

2.1 Organismen

E. coli XL1 blue MRF'

(Stratagene, Leiden; Bullock *et al.*, 1987)

D(mcrA)183 D(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F'proAB lacI^fZDM15 Tn10 (Tet^R)]

H. volcanii WR340

(erhalten von M. Mevarech, Tel Aviv university; Charlebois *et al.*, 1987)

Histidin-auxotrophe Mutante von *H. volcanii* WFD11, die durch Entfernen des Plasmids pHV2 aus *H. volcanii* DS2 hervorging

2.2 Antibiotika

Antibiotikum	Hersteller
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Novobiocin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tetracyclin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

2.3 Medien und Zellkultivierung

Die Sterilisation der Medien für haloarchaeale und bakterielle Kulturen erfolgte durch Autoklavieren (20 min, 121°C). Hitzeempfindliche Medienkomponenten und Zusätze wurden gegebenenfalls sterilfiltriert und zum autoklavierten Medium hinzugefügt. Die Herstellung der Agarplatten erfolgte durch Zusatz von 12-14 g/l Bacto-Agar zum Kulturmedium vor dem Autoklavieren.

E. coli

Die Zellzucht von *E. coli* erfolgte aerob in SOB⁺- Medium bei 37°C und 250 Upm. Festmedien wurden über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Selektivmedien wurden durch Zugabe von 100 µg/ml Ampicillin hergestellt.

SOB⁺-Medium (Hanahan, 1983)

Komponente	Endkonzentration	Menge
Trypton	2%	20 g
Hefeextrakt	0,5%	5 g
NaCl	10 mM	0,6 g
KCl	2,5 mM	0,187g
1 M MgCl ₂ /MgSO ₄	10 mM	10 ml

ad 1000 ml VE-H₂O und autoklavieren

H. volcanii

Die Zellkultivierung von *H. volcanii* erfolgte aerob im 20 ml Volumen bei 250 Upm und 42°C Alternativ erfolgte die Zellzucht im 10 ml Volumen in Reagenzgläsern bei 42°C auf dem Roller. Die Kultivierung auf festem Medium fand im Brutschrank bei 42°C statt.

Zunächst wurden alle Lösungen getrennt hergestellt, autoklaviert bzw. sterilfiltriert, und anschließend zusammengegeben.

Support-Medium (Cline *et al.*, 1989)

a) Salzlösung

Komponente	Endkonzentration	Menge
NaCl	2,9 M	170,0 g
MgSO ₄ x7H ₂ O	150 mM	38,5 g
KCl	60 mM	4,5 g
CaCl	4 mM	0,6 g
1M Tris/HCl, pH 7,2	50 mM	50,0 ml

ad 800 ml VE-H₂O und autoklavieren

b) Nährlösung

Komponente	Endkonzentration	Menge
Hefeextrakt	0,45%	4,5 g
Trypton	0,28%	2,8 g

ad 200 ml VE- H₂O und autoklavieren

c) Spurenelementlösung

Komponente	Endkonzentration	Menge
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	3,5 µM	0,1 g
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	1,5 µM	30 mg
H ₃ BO ₃	50,0 µM	0,3 g
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	8,5 µM	0,2 g
CuCl ₂ x 2 H ₂ O	0,5 µM	10 mg
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	1,0 µM	2 mg
Na ₂ MoO ₄ x H ₂ O	1,0 µM	30 mg

pH mit HCl auf 3-4 einstellen, ad 100 ml VE- H₂O, sterilfiltrieren

d) FeSO₄-Stammlösung

Komponente	Endkonzentration	Menge
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	8,0 µM	230 mg

pH mit HCl auf 3-4 einstellen, ad 100 ml VE- H₂O, sterilfiltrieren

Nach dem Abkühlen der Lösungen wurden zu 800 ml Salzlösung 200 ml Nährlösung, 1 ml Spurenelementlösung und 1 ml FeSO₄-Lösung gegeben. Zur Herstellung selektiver Medien wurden 0,35 µg/ml Novobiocin oder Tetracyclin in den angegebenen Konzentrationen zugegeben.

2.4 Stammhaltung

E. coli

Zur Herstellung von Stammkulturen wurden 200 µl Bakterienkultur mit 800 µl 87%igem Glycerin versetzt und bei -80 °C gelagert.

H. volcanii

Basalsalz-Lösung

Komponente	Endkonzentration	Menge
NaCl	2,9 M	170,0 g
MgSO ₄ x7H ₂ O	150 mM	38,5 g
KCl	60 mM	4,5 g
CaCl	4 mM	0,6 g
1M Tris/HCl, pH 7,2	50 mM	50,0 ml

ad 1000 ml VE-H₂O und autoklavieren

Zur Herstellung von Stammkulturen wurden 10 ml einer stationären Kultur nach 12 minütiger Zentrifugation bei 3200 x g (Eppendorf Zentrifuge) mit 20 ml Basalsalz gewaschen, in 10 ml Support-Medium aufgenommen und in einem Szintillationsgefäß bei Raumtemperatur gelagert.

2.5 Bestimmung der Zelldichte

Die Bestimmung der Zellzahl von *H. volcanii* Kulturen erfolgte in einem Klett-Photometer mit dem Filter #54 (Transmission von 520 nm bis 580 nm). Hierbei erfolgte die Kultivierung in einem Klettkolben. Alternativ wurde die Zelldichte in einer Zählkammer nach Neubauer bestimmt.

3. Molekularbiologische Methoden**3.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli***

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte durch alkalische Lyse nach Birnboim und Doly (Birnboim & Doly, 1979).

a) Lösung 1

Komponente	Endkonzentration	Menge
1M Tris/HCl; pH 8,0	50 mM	50,0 ml
EDTA	10 mM	3,7 g
RNaseA	100 mg/l	0,1 g

ad 1000 ml H₂O bidest., vor RNaseA Zugabe autoklaviert, Lagerung bei 4°C

b) Lösung 2

Komponente	Endkonzentration	Menge
NaOH	200 mM	8,0 g
SDS	1% (w/v)	10,0 g

ad 1000 ml H₂O bidest., Autoklavieren, Lagerung bei Raumtemperatur

c) Lösung 3

Komponente	Endkonzentration	Menge
CH ₃ COOK	3,2 M	314,0 g

ad 1000 ml H₂O bidest., pH 5,5 (Essigsäure), Autoklavieren, Lagerung bei 4°C

Zur Plasmidisolierung aus *E. coli* wurden 1,5 ml einer über Nacht in SOB⁺-Medium mit Ampicillin gezogenen *E. coli* Kultur 30 Sek bei 18000 x g sedimentiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Sediment in 150 µl Lösung 1 resuspendiert, zur Lyse mit 150 µl Lösung 2 versetzt und durch mehrfaches Invertieren des Reaktionsgefäßes gemischt. Durch Zugabe von 150 µl Lösung 3 wurde die Suspension neutralisiert. Anschließend wurde 10 Min bei 18000 x g zentrifugiert, der Überstand in ein frisches 2 ml Reaktionsgefäß überführt und zur Fällung der Plasmid-DNA mit 2,5 Volumen 96%igem Ethanol versetzt. Es folgte eine 15 minütige Zentrifugation bei 18000 x g. Das Sediment wurde dann mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen, 5 Min bei 18000 x g zentrifugiert und in 50 µl H₂O bidest. resuspendiert.

Alternativ erfolgte die Plasmidisolierung aus *E. coli* mit Hilfe des PureYield™ Plasmid Midiprep Systems der Firma Promega nach Angaben des Herstellers.

3.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus *H. volcanii*

Die Isolierung von RNA erfolgte modifiziert nach Chomczynski und Sacchi (Chomczynski & Sacchi, 1987).

a) Aufschlußlösung

Komponente	Endkonzentration	Menge
Guanidiniumthiocyanat	4,0 M	100,0 g
750 mM Natriumcitrat-Lösung, pH 7,0	25 mM	7,0 ml
10% Natriumlauroylsarcosinat	0,5 % (v/v)	10,6 ml
β-Mercaptoethanol	0,1 M	1,0 ml

ad 210 ml DMPC-H₂O

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus *H. volcanii* wurden 2 ml Kultur für 40 Sek bei 10000 x g geerntet und der Überstand dekantiert. Das Sediment wurde in 400 µl Aufschlußlösung resuspendiert und anschließend mit 50 µl 2 M Natriumacetat, 400 µl Phenol und 100 µl Chloroform/Isoamylalkohol vermischt. Nach einer 30 minütigen Inkubation bei -20°C wurden die Phasen durch Zentrifugation bei 10000 x g für 15 Min vollständig getrennt. Die wässrige Phase wurde mit dem 2,5 fachen Volumen 96% Ethanol vermischt, 30 Min bei -20°C inkubiert und 30 Min bei 10000 x g zentrifugiert. Das Sediment wurde mit 700 µl 70% Ethanol gewaschen, für 15 Min bei 10000 x g zentrifugiert und in DMPC behandeltem H₂O gelöst.

Alternativ wurde die Gesamt-RNA aus *H. volcanii* mit Hilfe des Rneasy Mini-Kits der Firma Qiagen isoliert. Dazu wurden 1×10^9 Zellen durch 1 minütige Zentrifugation bei 20000 x g geerntet und in 100 µl DMPC behandeltem H₂O aufgenommen. Die weitere Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Die Kontrolle der Qualität und der Quantität der RNA erfolgte über UV Spektroskopie und denaturierender Formaldehyd Gelelektrophorese.

3.3 Reinigung von Nukleinsäuren

Reinigung von DNA

Zur Reinigung von DNA wurde die Nukleinsäure-Lösung mit 1/10 Volumen einer 3 M Kaliumacetat-Lösung pH 5,5 und 2,5 Volumen 96% Ethanol versetzt, gemischt und für 20 Min bei -80°C inkubiert. Die DNA wurde durch 30 minütige Zentrifugation bei 20000 x g sedimentiert, der Überstand dekantiert und das Präzipitat mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen. Nach 30 minütiger Zentrifugation bei 20000 x g wurde das Präzipitat in einem geeigneten Volumen H₂O bidest. aufgenommen.

Alternativ erfolgte Aufreinigung mit dem PCR Purification Kit der Firma Seqlab nach Angaben des Herstellers.

Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Die Extraktion von DNA aus Agarosegelen erfolgte mit dem PCR Purification Kit der Firma Seqlab nach Angaben des Herstellers.

Reinigung von RNA aus Lösungen

Die Reinigung von RNA Lösungen erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers.

Extraktion von RNA aus Lösungen

Nach Auffüllen des Probenvolumens auf 500 µl mit DMPC behandeltem H₂O wurden dem Ansatz 400 µl Phenol und 100 µl Chloroform/Isoamylalkohol zugefügt. Nach einer 5 minütigen Zentrifugation bei 18000 x g wurde die wässrige Phase abgenommen und mit 1/10 Volumen 3 M Natriumazetat pH 4,8 versetzt. Nach der Zugabe des 2,5 fachen Volumen 96% Ethanol wurde der Ansatz mindestens 60 Min bei -20°C inkubiert. Nach 30 minütiger Zentrifugation bei 18000 x g und 4°C wurde das Sediment mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen. Nach erneuter 15 minütiger Zentrifugation bei 18000 x g und 4°C wurde das Sediment zunächst getrocknet und anschließend in einem geeigneten Volumen DEMPC behandeltem H₂O gelöst.

3.4 Photometrische Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen

Die Konzentration von Nukleinsäurelösungen wurde mit Hilfe eines Spektralphotometers bestimmt. Dabei entspricht eine Extinktion_{260nm} von 1 einer doppelsträngigen DNA Konzentration von 50 ng/µl und einer RNA Konzentration von 40 ng/µl (Sambrook *et al.*, 1989). Das Verhältnis der Extinktionen 260/280 nm und 260/230 nm gibt den Reinheitsgrad der DNA bzw. RNA Lösung an und sollte zwischen 1,8 und 2,2 liegen.

3.5 Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

Agarose Gelelektrophorese von DNA

Die Auftrennung von DNA erfolgte in 0,7% – 1,8% Agarosegelen mit 1x TBE-Puffer als Laufpuffer bei einer Spannung von 2-8 V/cm. Dazu wurden die DNA-Lösungen mit 1/6 Volumen DNA Probenpuffer versetzt. Nach der Auftrennung wurde die DNA mittels Ethidiumbromid angefärbt, unter UV-Licht visualisiert und mit Hilfe einer Geldokumentationsanlage ausgewertet.

a) 10x TBE-Puffer

Komponente	Endkonzentration	Menge
Tris	890 mM	107,8 g
Borsäure	890 mM	55,0 g
Na ₂ EDTA	20 mM	7,5 g

ad 1000 ml H₂O bidest., Autoklavieren

b) 6x DNA Probenpuffer

Komponente	Endkonzentration	Menge
1 M Tris/HCl, pH 7,5	20 mM	0,8 ml
87% Glycerin (v/v)	50% (v/v)	23,0 ml
Bromphenolblau (ges. Lsg.)	0,25% (v/v)	0,8 ml
Xylencyanol (ges. Lsg.)	0,25% (v/v)	0,8 ml

ad 40 ml H₂O bidest.

Agarose Gelelektrophorese von RNA

a) MOPS-Puffer

Komponente	Endkonzentration	Menge
MOPS	500 mM	104,7 g
EDTA	10 mM	3,7 g

ad 1000 ml H₂O bidest., pH 7 mit NaOH einstellen

b) RNA Probenpuffer

Komponente	Endkonzentration	Menge
10x MOPS-Puffer	1x	100,0 ml
Formamid	50% (v/v)	5,0 ml
37% Formaldehyd (v/v)	6,8% (v/v)	1,8 ml
87% Glycerin (v/v)	15% (v/v)	1,3 ml
Bromphenol (ges. Lsg.)	0,1% (v/v)	10 µl
Xylencyanol (ges. Lsg.)	1% (v/v)	100 µl
Ethidiumbromid (0,1 mg/ml)	0,5 µg /ml	50 µl

ad 10 ml H₂O bidest.

Alle Arbeiten mit RNA erfolgten mit DMPC behandelten Lösungen. Dazu werden die Lösungen mit 0,1% (v/v) DMPC versetzt, über Nacht inkubiert und anschließend autoklaviert.

Die Auftrennung von RNA erfolgte in 1%igen Agarosegelen. Dazu wurden 1,1 g Agarose in Wasser durch Erhitzen gelöst und anschließend mit 7 ml 10x

MOPS und 2,5 ml 37%igem Formaldehyd versetzt. Die RNA-Proben wurden in dem 4-fachen Volumen Probenpuffer aufgenommen, 10 Min bei 65°C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Die Auftrennung der RNA erfolgte bei 2-8 V/cm mit 1x MOPS-Puffer als Laufpuffer. Nach der Auftrennung wurde die RNA unter UV-Licht visualisiert und dokumentiert.

3.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Anlagerungstemperatur der Oligonukleotide liegt in der Regel 5-10°C unter der Schmelztemperatur der Oligonukleotide ($T_M^{\circ}\text{C} = 4x(\text{G+C})+2x(\text{A+T})$) und die Elongationszeit richtet sich nach der Fragmentgröße und der verwendeten Polymerase ($T_{E\text{Taq}} = 1 \text{ kb/min}$; $T_{E\text{Pfu}} = 0,5 \text{ kb/min}$). Für Plasmide wurden 200 ng, für genomische DNA 250 ng und für PCR-Fragmente 10-20 ng als Vorlage eingesetzt. Die Oligonukleotide wurden mit 50 pmol/μl in TE-Puffer gelöst. Als Gebrauchslösung wurden die Stammlösungen mit einer Endkonzentration von 20 pmol/μl in H₂O bidest. verdünnt.

Präparative und analytische Amplifikation von DNA

a) PCR-Ansatz

Komponente	Menge
DNA-Vorlage	x μl
20 pmol/μl Oligonukleotid 1	1,25 μl
20 pmol/μl Oligonukleotid 2	1,25 μl
dNTPs (1,0 mM dATP+dTTP; 1,5 mM dCTP+dGTP)	8 μl
10x Puffer	5 μl
Taq- bzw. Pfu-Polymerase	1 μl
ad H ₂ O bidest. 50 μl	

Für analytische Zwecke wurde die Taq-Polymerase verwendet. Für den präparativen Ansatz wurde die Pfu-Polymerase mit *Proof-reading* Aktivität verwendet.

b) Temperaturprofil

Schritt	Dauer	Temperatur	Zyklen
Initiale Denaturierung	7 min	96°C	1
Denaturierung	30 s	96°C	30
Annealing	30 s	x °C	
Elongation	x s	72°C	
Finale Elongation	7 min	72°C	1

Kolonie-PCR

Bei der Kolonie-PCR für *E. coli* wird als Matrize keine aufgereinigte DNA, sondern Zellen verwendet. Dazu wurde mit einem sterilen Zahnstocher etwas Material einer Bakterien-Kolonie von einer Agarplatte abgenommen und die Zellen in den Reaktionsansatz überführt. Die Bedingungen der PCR wurden analog zur präparativen Amplifikation von DNA gewählt.

Bei der Kolonie-PCR für *H. volcanii* wurde mit einem sterilen Zahnstocher etwas Material einer Bakterien-Kolonie von einer Agarplatte abgenommen und die Zellen in 100 µl H₂O bidest. überführt. Davon wurden 2 µl in den Reaktionsansatz überführt. Die Reaktion wurde mit dem *Taq* PCR Master Mix der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Fusions-PCR

Durch Fusions-PCR können verschiedene DNA-Abschnitte mit überlappenden Regionen ohne Ligation zu einem DNA-Stück zusammengesetzt werden. Dazu werden die zu fusionierenden Abschnitte in äquimolaren Konzentrationen (ca. 200 ng) zunächst ohne Oligonukleotide in die PCR-Reaktion eingesetzt. Die Anlagerungstemperatur liegt 5-10°C unter der T_M des überlappenden Bereiches. Die Dauer der Anlagerung beträgt 1 Min. Nach 5 Zyklen wurden Oligonukleotide zur weiteren Amplifikation hinzugegeben und 20 Zyklen das Temperaturprofil analog zur präparativen Amplifikation durchgeführt. Für diesen Ansatz wurde der PCR Mastermix der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers verwendet.

3.7 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Zur Spaltung von Plasmid DNA wurden 5-10 µg DNA mit 5-10 U Enzym versetzt und die Bedingungen nach Angaben des Herstellers gewählt. Restriktionsreaktionen wurden durch Hitzeinaktivierung bei 70°C für 10 Min beendet.

3.8 Ligation von DNA

Die Ligation erfolgte mit 100-250 ng Vektor und einem molaren Vektor/Insert Verhältnis von 1/3 in einem Gesamtvolumen von 10 µl nach Angaben des

Herstellers.

3.9 Transformation von Mikroorganismen

Transformation von *E. coli*

Zur Vorbereitung der *E. coli* Zellen für die Elektroporation wurden 500 ml einer SOB⁺-Hauptkultur mit 10 ml einer *E. coli* XL1 Blue MRF' Vorkultur inokuliert. Nach Inkubation bei 37°C und 250 Upm wurden die Zellen bei einer OD₆₀₀=0,5 durch 20 minütige Zentrifugation bei 4000 x g und 4°C geerntet. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Bakterienzellen wurden nacheinander mit 250 ml, 125 ml und 25 ml kaltem 10%igem Glycerin gewaschen. Nach der letzten Zentrifugation wurden die Zellen in je 150 µl 10%igem Glycerin resuspendiert, in 70 µl Portionen aliquotiert und in flüssigem Stickstoff Schockgefroren. Die Lagerung der *E. coli* Zellen erfolgte bei -80°C.

Zur Transformation von DNA in *E. coli* wurden zunächst die Zellen auf Eis aufgetaut. Zu den Zellen wurden 2 µl des Ligationsansatzes oder 5 ng Plasmid gegeben und die Zellsuspension in vorgekühlte Elektroporationsküvetten überführt.

Nach der Elektroporation (Einstellungen: 800 Ω; 1500 V; 25 µFarad) wurde 1 ml SOB⁺-Medium hinzugegeben. Zur Regeneration und Ausprägung der Antibiotikaresistenz wurde der Ansatz für 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurden 10 µl und 100 µl der Bakterienkultur auf ein selektives Nährmedium ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Transformation von *H. volcanii*

Für die PEG vermittelte Transformation wurden 2 ml einer exponentiellen *H. volcanii* Kultur durch 2 minütige Zentrifugation bei 6000 x g geerntet. Das Zellsediment wurde in 180 µl SBL/EDTA (10/1 SBL/EDTA-Lösung) resuspendiert und die Sphäroblastenbildung mikroskopisch kontrolliert. Nach Zugabe von 20 µl DNA-Lösung (2-5 µg Plasmid-DNA in 0,8 M NaCl) wurden die Reaktionsgefäße 20-mal vorsichtig invertiert und für 5 Min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Suspension wurde mit 210 µl PEG-Lösung versetzt. Nach 20 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Aggregatbildung der Zellen mikroskopisch kontrolliert. Der Ansatz wurde mit 1800 µl SVL versetzt, 100 µl

der Zellsuspension auf Selektivmedium ausgespatelt und bei 42°C inkubiert.

a) Sphäroblastenbildungslösung (SBL)

Komponente	Endkonzentration	Menge
NaCl	800 mM	23,4 g
KCl	27 mM	1,0 g
1 M Tris/HCl pH 8,2	50 mM	25,0 ml
Saccharose	15% (w/v)	75,0 g
ad 500 ml H ₂ O bidest., sterilfiltrieren		

b) Sphäroblastenverdünnungslösung (SVL)

Komponente	Endkonzentration	Menge
NaCl	3,4 M	100,0 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	175 mM	21,6 g
KCl	34 mM	1,3 g
1 M Tris/HCl; pH 7,2	50 mM	25,0 ml
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	5 mM	0,4 g
Saccharose	15% (w/v)	75,0 g
ad 500 ml H ₂ O bidest., sterilfiltrieren		

c) EDTA-Lösung

Komponente	Endkonzentration	Menge
EDTA	500 mM	18,5 g
ad 100 ml SBL, pH 8,2 einstellen, steril filtrieren		

d) PEG-Lösung

Komponente	Endkonzentration	Menge
PEG 600	60% (v/v)	6,0 ml
SBL	40% (v/v)	4,0 ml

3.10 DNA Sequenzierung nach Sanger

Die Sequenzierung von Plasmiden und PCR-Produkten wurde mit der Kettenabbruchreaktion nach Sanger durchgeführt (Sanger *et al.*, 1977). Zur Sequenzierung von Plasmid DNA wurden 150 ng als Vorlage eingesetzt. Die Menge der eingesetzten DNA bei PCR-Produkten hing von der Größe der Fragmente ab und betrug 3-25 ng. Nach der Amplifikation wurde der PCR-Ansatz zur Fällung der DNA mit 10 µl H₂O bidest., 2 µl 3 M Natriumacetat-Lösung pH 4,6 sowie 250 µl 96% EtOH versetzt und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde für 15 Minuten bei 18000 x g

zentrifugiert. Der Überstand mit überschüssigen Oligonukleotiden, dNTPs und fluoreszenzmarkierten ddNTPs wurde verworfen, die DNA mit 250 µl 70% EtOH gewaschen und für 5 Min bei 18000 x g zentrifugiert. Nach Abnehmen des Überstandes wurde die DNA getrocknet und die Sequenz Analyse durch die Firma SRD, Frankfurt durchgeführt.

a) Reaktionsansatz

Komponente	Menge
DNA	x ng
Big Dye Terminator RR Mix	1,0 µl
Reaktionspuffer	1,5 µl
Oligonukleotid	5 pmol
ad 10 µl H ₂ O bidest.	

b) Temperaturprofil

Schritt	Dauer	Temperatur	Zyklen
Denaturierung	10 Sek	96°C	25
Anlagerung	5 Sek	50°C	
Elongation	4 Min	60°C	

3.11 DNase-Behandlung von RNA

Zur Entfernung von genomischer DNA wurde Gesamt RNA aus *H. volcanii* mit RQ1 RNase freier DNase der Firma Promega behandelt.

Komponente	Endkonzentration	Menge
Gesamt RNA	6 µg	x µl
DNase	6 U	6 µl
10x Puffer	1x	6 µl
ad 60 µl DMPC H ₂ O		

Es folgte eine einstündige Inkubation bei 37°C. Die Reaktion wurde anschließend durch die Zugabe von 6 µl Stopp Lösung und 10 minütige Inkubation bei 65°C beendet. Zur Reinigung der RNA folgte eine Behandlung nach dem Clean up Protokoll des RNeasy Mini Kits der Firma Qiagen.

3.12 cDNA-Synthese

a) Reaktionsansatz

Komponente	Menge
Zufallshexamere (1mg/ml)	0,6 µl
dNTPs (1,0 mM dATP+dTTP; 1,5 mM dCTP+dGTP)	8,0 µl
Reverse Transkriptase	3,0 µl
RNA	x µl
5x Puffer	8,0 µl
ad 40 µl DMPC H ₂ O	

Zur Synthese der cDNA wurde die RNA zunächst 10 Min bei 65°C denaturiert. Die Anlagerung der Zufallshexamere erfolgte für 5 Min auf Eis. Nach Zugabe von 2 µl Reverser Transkriptase wurden die Ansätze 60 Min bei 42°C inkubiert. Nach erneuter Zugabe von 1 µl Reverser Transkriptase wurde wieder für 60 Min bei 42°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch 5 minütiges Erhitzen der Ansätze bei 80°C inaktiviert.

3.13 RealTime-PCR Analyse

Zur Quantifizierung von Transkript-Mengen wurde DNA-freie cDNA als Matrize für die RealTime-PCR Analyse eingesetzt.

a) Reaktionsansatz

Komponente	Endkonzentration/Menge
cDNA	1 µl
Oligonukleotid 1	0,8 µM
Oligonukleotid 2	0,8 µM
DyNAmo SYBR Green qPCR Master Mix	12,5 µl
ad 25 µl H ₂ O bidest.	

b) Temperaturprofil

Schritt	Dauer	Temperatur	Zyklen
Initiale Denaturierung	10 Min	94°C	60
Denaturierung	30 Sek	94°C	
Annealing	45 Sek	65 °C	
Elongation	60 Sek	72°C	
Finale Elongation	5 Min	72°C	

Nach Beendigung der PCR-Reaktion wurden die Proben auf 99°C erhitzt und der Schmelzpunkt jeder Probe bestimmt.

Für jede Probe wurde der Schnittpunkt mit dem Schwellenwert kalkuliert (C_T -Wert) und die Daten wurden mit Hilfe der $\Delta\Delta C_T$ -Methode ausgewertet (Livak & Schmittgen, 2001). Die C_T -Werte des Kontrolltranskripts *ribL10* bzw. *hpyA* wurden zur Normalisierung der *dhfr* Transkript-Mengen genutzt. Die Transkript-Mengen der endogenen *dhfr* wurden durch die Analyse eines Stammes ohne Plasmidkodierte *dhfr* bestimmt (pNP10). Der Anteil der endogenen *dhfr* Transkript-Mengen wurde von allen analysierten Proben subtrahiert. Die Transkript-Menge des Stammes mit dem Kontrollplasmid pMB1, der für eine *dhfr* ohne 5'- und 3'-UTR kodiert, wurde gleich 1 gesetzt. Zur Qualitätssicherung der Analyse wurden Kontrollen mit Wasser als Matrize mitgeführt, und die synthetisierten Produkte anhand der Schmelzkurven kontrolliert.

3.14 crRT-PCR Analyse zur Bestimmung untranslatierter Regionen von mRNAs

Zur Bestimmung der UTRs von mRNAs wurde zunächst Gesamt RNA aus *H. volcanii* 10 Min bei 65°C denaturiert und anschließend zirkularisiert. Dazu wurde die Reaktion wie folgt zusammen gesetzt:

Komponente	Endkonzentration	Menge
Gesamt RNA	5-10 µg	x µl
T4 RNA Ligase	40 U	2,0 µl
RNase Inhibitor	10 U	0,5 µl
10x Puffer	1x	2,5 µl
ad 25 µl DMPC H ₂ O		

Die Inkubation erfolgte für 60 Min bei 37°C. Anschließend wurden die Proben auf 500 µl aufgefüllt und mit Phenol/Chloroform extrahiert. 5-10 µg ligierte RNA wurden anschließend mit 0,5 pmol genspezifischer Oligonukleotide in cDNA umgeschrieben. Die cDNA der 5'-3'-ligierten RNA wurde dann in Anwesenheit der PCR1/PCR2 Oligonukleotide mittels PCR und dem Mastermix der Firma

Qiagen amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und aus dem Gel extrahiert. In einer zweiten PCR-Reaktion wurden 10-20 ng der extrahierten DNA mit den verschachtelten Oligonukleotiden NES1/NES2 und dem Mastermix der Firma Qiagen reamplifiziert. Die zweite PCR-Reaktion verstärkt die Spezifität der PCR-Produkte und eliminierte falsch positive Fragmente der ersten PCR-Reaktion. Die PCR-Produkte der 5'-3'-ligierten RNA wurden anschließend durch Sequenzierung analysiert.

Zur Analyse multipler Terminationsstellen wurden die Nested PCR-Produkte mit glatten Enden über eine *EcoRV* Schnittstelle in den Vektor pSKII integriert und zehn Klone durch Sequenzierung analysiert.

4. Biochemische Methoden

4.1 DHFR-Aktivitätstest und Bestimmung der Translationseffizienz

Aerobe *H. volcanii* Kulturen wurden in Komplexmedium mit 0,35 µg/ml Novobiocin kultiviert. Zum Aufschluss der Zellen wurden 10 ml *H. volcanii*-Kultur 20 Min bei 3200 x g und 4°C sedimentiert, mit 5 ml Basalsalz gewaschen und in 1 ml Basalsalz resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte im Ultraschallgerät durch 2 x 30 Sek Beschallung (*output control*: Stufe 5; *duty cycle*: 50 %), während die Zellsuspension auf Eis gehalten wurde. Die Zelltrümmer wurden durch 30 minütige Zentrifugation bei 4°C und 18000 x g abgetrennt. Der Überstand wurde für die Proteinbestimmung und die Aktivitätstests eingesetzt.

Im ml-Format erfolgte die Messung der Oxidation des NADPH bei 340 nm in UV-Quartz-Küvetten in einem auf 25°C temperierten Photometer. Der Puffer wurde ebenfalls auf 25°C temperiert.

Die Messung im Mikrotiterplatten-Format erfolgte ebenfalls bei 340 nm in einem auf 25°C temperierten SPECTRAmax 340PC₃₈₄ Photometer. Die Schichtdicke wurde automatisch vom Photometer ermittelt und mit der Extinktionsänderung verrechnet.

a) Phosphat/Citrat-Puffer

Komponente	Endkonzentration	Menge
Kaliumphosphat	25 mM	
$K_2HPO_4 \cdot 3 H_2O$		5,7 g
KH_2PO_4		3,4 g
Citrat	25 mM	4,8 g
KCl	3 M	111,8 g
ad 1000 ml H_2O bidest., pH 6,0 mit KOH einstellen		

b) Reaktionsansatz im ml-Format

Komponente	Endkonzentration	Menge
Zelllysate		100 μ l
0,5 mM DHF	50 μ M	100 μ l
1 mM NADPH	0,1 mM	100 μ l
3 M KCl in Phosphat/Citrat-Puffer	2,1 M	700 μ l

c) Reaktionsansatz im Mikrotiterplatten-Format

Komponente	Endkonzentration	Menge
Zelllysate		50,0 μ l
1 mM DHF	50 μ M	12,5 μ l
1 mM NADPH	80 μ M	20,0 μ l
3 M KCl in Phosphat/Citrat-Puffer	2 M	167,5 μ l

Im ml-Format erfolgte die Messung der Oxidation des NADPH bei 340 nm in UV-Quartz-Küvetten in einem auf 25°C temperierten Photometer. Der Puffer wurde ebenfalls auf 25°C temperiert.

Die Messung im Mikrotiterplatten-Format erfolgte ebenfalls bei 340 nm in einem auf 25°C temperierten SPECTRAMax 340PC384 Photometer. Die Schichtdicke wurde automatisch vom Photometer ermittelt und mit der Extinktionsänderung verrechnet.

Die NADPH-Lösung wurde vor jeder Messreihe frisch mit H_2O bidest. angesetzt und auf Eis gelagert. Die DHF-Lösung wurde aus einer 10 mM-Stammlösung (Lagerung bei -20°C) hergestellt, die Verdünnung erfolgte in Phosphat/Citrat-Puffer. Die Extinktionsabnahme war bei allen Messungen mindestens 3 Min linear.

Die Enzymatische Aktivität wurde mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten von $6,22 \text{ l} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ kalkuliert. Nach der Proteinbestimmung konnte die spezifische Enzymaktivität in nkat/mg Gesamt-Protein berechnet werden. Die endogene DHFR-Aktivität wurde durch die Analyse eines Stammes ohne

Plasmidkodierte DHFR (pNP10) ermittelt. Zur Korrektur wurde die endogene DHFR-Aktivität von allen Proben subtrahiert.

Die Translationseffizienzen wurden durch Division der spezifischen Enzymaktivitäten durch die entsprechenden Transkript-Mengen. Drei unabhängige Experimente wurden durchgeführt und die Mittelwerte mit Standardabweichung berechnet.

4.2 Proteinbestimmung (BCA-Assay)

Zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen nach der BCA-Methode (Smith *et al.*, 1985) wurde das BCA Protein Assay Kit der Firma Pierce eingesetzt. Die Methode beruht auf der Biuret-Reaktion von Proteinen mit Cu^{2+} zu Cu^+ im alkalischen Milieu. Das gebildete Cu^+ wird von BCA komplexiert. Die farbigen Komplexe zeigen eine starke Absorption bei 562 nm.

Zur Proteinbestimmung wurden in einer Mikrotiterplatte jeweils 10 μl Proteinlösung mit 200 μl Nachweisreagenz versetzt und für 30 Min bei 37°C inkubiert. Die Konzentrationen der Proteinlösungen wurden in Doppelbestimmung und geeigneten Verdünnungen bestimmt. Als Standard dienten BSA-Lösungen bekannter Konzentrationen (0-2 mg/ml). Nach Abkühlen der Proben auf Raumtemperatur wurde die Absorption bei 562 nm im Photometer bestimmt.

IV. ERGEBNISSE

1. Identifizierung der 5'- und 3'-UTRs haloarchaealer Transkripte mittels crRT-PCR

Für Eukaryoten ist allgemein bekannt, dass UTRs wichtige biologische Funktionen, wie die Regulation der Translation, kontrollieren können (Chabanon *et al.*, 2004; de Moor *et al.*, 2005; Mazumder *et al.*, 2003; Mignone *et al.*, 2002; Pesole *et al.*, 2000; Wilkie *et al.*, 2003). Für Archaea dagegen ist die einzige bisher charakterisierte Funktion der Selenocysteineinbau am Stopkodon in einigen methanogenen Archaea (Rother *et al.*, 2001). Allerdings enthalten die meisten Archaea kein Selenocystein. Daher stellt der Selenocysteineinbau eine eher spezifische Funktion dar. Es kann angenommen werden, dass archaeale UTRs durchaus Funktionen ähnlich zu eukaryotischen UTRs besitzen können. Zur Charakterisierung der Funktionen haloarchaealer UTRs wurden zunächst die UTRs ausgewählter Transkripte aus *H. volcanii* bestimmt.

Zur Bestimmung der 5'- und 3'-UTRs von Transkripten aus *H. volcanii* wurde eine kürzlich entwickelte Methode (Abbildung 5A) nach Kuhn und Binder angewendet (Kuhn & Binder, 2002). Dazu wurde zelluläre RNA isoliert und mittels T4-RNA-Ligase zirkularisiert. Die RNA ausgewählter Gene wurde mittels genspezifischer Oligonukleotide in cDNA umgeschrieben. Durch zwei aufeinanderfolgende verschachtelte PCR-Reaktionen konnte ein PCR-Fragment amplifiziert werden, welches sowohl die bereits bekannten 5'- und 3'-Regionen des ORF enthält, als auch die unbekanntes 5'- und 3'-UTRs des Transkripts. Sequenzierung des PCR-Produkts und ein Abgleich mit der genomischen Sequenz erlaubte die Identifizierung der 5'- und 3'-Enden der ausgewählten RNA. Ein repräsentatives Beispiel ist in Abbildung 5B gezeigt. In einigen Fällen variierte die Signalintensität der Sequenz über die gesamte Länge des PCR-Produkts und ein oder mehrere Abstufungen der Signalintensität konnten beobachtet werden (Abbildung 5C).

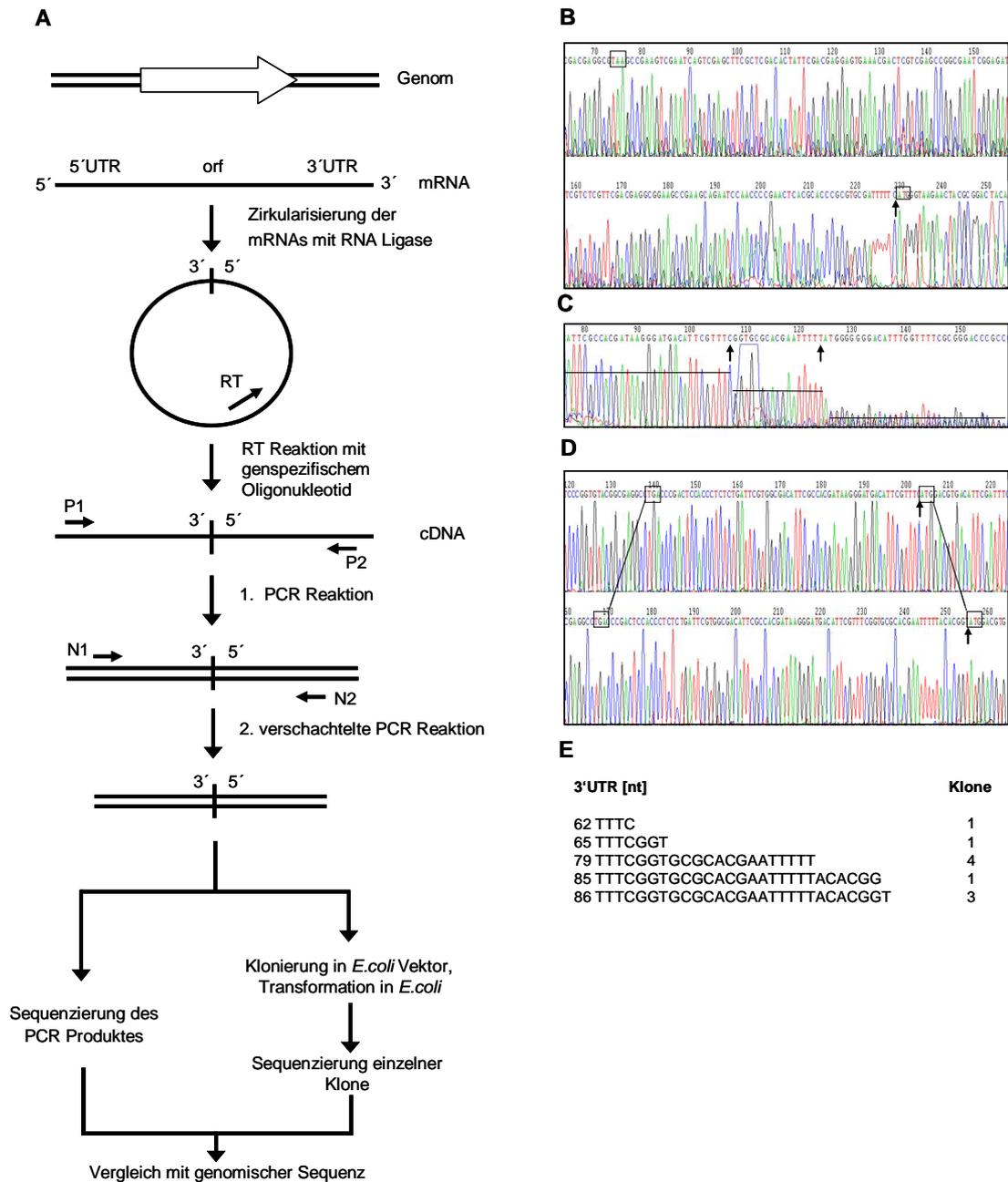


Abbildung 5: Bestimmung der 5'- und 3'-Enden haloarchaealer Transkripte

(A) Schematische Übersicht der crRT-PCR. Die Übersicht zeigt die verschiedenen Schritte des crRT-PCR-Protokolls zur Bestimmung der 5'- und 3'-Enden der haloarchaealen Transkripte. (B) Sequenz eines PCR-Produkts mit einem spezifischen 3'-Ende (Nr. 12 in Tabelle 7). Das Start- und das Stopkodon sind markiert und die Lignationsstelle von 5'- und 3'-UTR ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. (C) Sequenz eines PCR-Produkts mit multiplen 3'-Enden. (Nr. 7 in Tabelle 7). Unterschiedliche Signalintensitäten sind durch Linien markiert und die Lignationsstelle von 5'- und 3'-UTR ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. (D) Sequenzen zweier Klone nach der Klonierung des PCR-Produkts (Nr. 7 in Tabelle 7). Die Ergebnisse der Sequenzierungen zweier unterschiedlicher *E. coli* Klone ist gezeigt. In beiden Beispielen sind das Start- und das Stopkodon markiert und die Lignationsstelle von 5'- und 3'-UTR ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. (E) Ergebnis der Sequenzierung von zehn *E. coli* Klonen. Die Sequenzen fünf verschiedener 3'-Enden und deren Häufigkeit sind dargestellt. Bei allen Klonen war das 5'-Ende identisch.

Diese Beobachtung legte die Vermutung nahe, dass entweder das 3'- oder das 5'-Ende des jeweiligen Transkripts oder beide nicht einheitlich vorlagen. Das PCR-Produkt wurde in einen *E. coli* Vektor integriert und zehn Klone analysiert. Es stellte sich heraus, dass in allen Fällen das 5'-Ende identisch war, aber das 3'-Ende des Transkripts variierte (Abbildung 5D-E). Die Variabilität einiger 3'-Enden könnte einerseits durch RNA-Degradation am 3'-Ende oder durch verschiedene Transkriptionsstops verursacht worden sein.

Zirkularisierung von Transkripten mit T4-RNA-Ligase ist nur möglich, wenn die 5'-Enden monophosphoryliert vorliegen. Dies führte zunächst zu der Annahme, dass nur prozessierte Transkripte mit Hilfe dieser Methode analysiert werden können (Kuhn & Binder, 2002), aber es stellte sich heraus, dass auch die Untersuchung von Primärtranskripten möglich ist. Celesnik *et al.* konnten zeigen, dass ca. 20 % der Transkripte in *E. coli* monophosphoryliert vorliegen und die erste Abbaustufe zur RNA-Degradation darstellen (Celesnik *et al.*, 2007). In einigen Fällen führte die hier beschriebene Methode nicht zur Identifizierung von 3'- und 5'-Enden. In diesen Fällen könnte die Behandlung mit einer Pyrophosphatase helfen (Zhang & Liu, 2006).

Mittels crRT-PCR wurden 17 Transkripte aus *H. volcanii* analysiert (Tabelle 7). Bei der Auswahl der Gene wurden möglichst viele funktionelle Kategorien wie z.B. Katabolismus, Anabolismus, Genregulation und Translation abgedeckt. Ein weiteres Kriterium war die Einordnung nach translationaler Regulation (Lange *et al.*, 2007). Gene mit der Nr. 1-4 (Tabelle 7) konnten in einer früheren Studie als Wachstumsphasen-abhängig translationsreguliert identifiziert werden (Lange *et al.*, 2007). Gene mit der Nr. 5-17 zeigten in derselben Studie keine Regulation der Translation. Das Ergebnis der 17 untersuchten Transkripte ist in Tabelle 7 dargestellt. Die EMBL Nukleotid-Datenbank (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>) und die NCBI Literatur-Datenbank (<http://www.pubmed.de/data/nlm.link.html>) wurden nach bereits bestimmten 5'- und 3'-Enden von Transkripten aus *H. volcanii* durchsucht und alle publizierten Beispiele wurden in Tabelle 7 dargestellt.

Die Mehrzahl der haloarchaealen Transkripte besitzt keine 5'-UTR. Im Gegensatz dazu besitzen alle RNAs eine 3'-UTR (siehe auch Kapitel 5).

Tabelle 7: 5'-UTRs und 3'-UTRs von Transkripten aus *H. volcanii*

Gene mit der Nr. 1-4 konnten in einer früheren Studie als Wachstumsphasen-abhängig translationsreguliert identifiziert werden (Lange *et al.*, 2007). Gene mit der Nr. 5-17 zeigten in derselben Studie keine Regulation der Translation.

Nr.	Kennzeichen ^{*1}	Funktion	5'-UTR [nt]	3'-UTR [nt]
Transkripte aus dieser Studie				
1	FS 451E8	Ribonuklease HIII <i>rnhB</i>	0	95
2	FS 437B8	Transkriptionsregulator <i>hoxA</i>	14	30
3	FS 448H7	Konserviertes hypothetisches Protein	22	45
4	FS 452E1	Ferrichrom-binde Protein	0	22
5	FS 436G6	Rieske 2Fe-2S Protein	1	78
6	FS 433H6	Transkriptionsregulator <i>arcR</i>	1	73
7	FS 459C6	Glukose-1-Dehydrogenase	0	79
8	FS431G8	Cdc Zellteilungsprotein <i>ftsH</i>	1	76
9	FS 458C1	Transkriptionsfaktor B (unterschiedlich zu Nr.18)	5	53
10	FS 431F1	Bakterielles extrazelluläres Solut-binde Protein	5	47
11	FS 451C1	Dihydrofolatreduktase <i>folA</i>	1	101
12	FS 436F5	Mandelatracemase	0	153
13	FS 434E1	Signal Peptid Peptidase	16	34
14	FS 441B9	Konserviertes hypothetisches Protein	1	122
15	FS 456E3	Kälteschock Transkriptionsregulator	3	49
16	FS 456E4	Konserviertes Protein	30	55
17	FS 456E5	Konserviertes hypothetisches Protein	14	33
Transkripte aus früheren Studien				
18	(Thompson <i>et al.</i> , 1999)	Transkriptionsfaktor B (unterschiedlich zu Nr. 9)	79	n.b.
19	M97486	Superoxiddismutase 1 <i>sod1</i>	15	140
20	M97487	Superoxiddismutase 2 <i>sod2</i>	19	18
21	X58924	Ribosomales Protein L1e	63	41-55
22	X58924	Ribosomales Protein L11e	0-1	24-66
23	(Kuo <i>et al.</i> , 1997)	Hitzeschock Protein <i>cct1</i>	4-5	n.b.
24	(Kuo <i>et al.</i> , 1997)	Hitzeschock Protein <i>cct2</i>	5	n.b.

Das Kennzeichen der Transkripte aus dieser Studie ist die Bezeichnung von Genen einer Bibliothek (Zaigler *et al.*, 2003); das Kennzeichen von Transkripten früherer Studien ist entweder die Zugangs-Nr. (www.ebi.ac.uk/embl/) oder die Referenz zur Publikation; n. b. nicht bestimmt.

2. Identifizierung kleiner nichtkodierender RNAs in *H. volcanii* mittels crRT-PCR

Mit Hilfe der crRT-PCR nach Kuhn und Binder (Kuhn & Binder, 2002) ist neben der UTR-Bestimmung von mRNAs auch die Bestimmung der 3'- und 5'-Enden kleiner nichtkodierender RNAs (ncRNAs) aus *H. volcanii* möglich. Als repräsentatives Beispiel ist die Analyse der ncRNA₄₅ dargestellt (Abbildung 6). Diese ncRNA aus *H. volcanii* wurde im Rahmen eines Kooperationsprojektes von der AG Marchfelder, Universität Ulm, identifiziert.

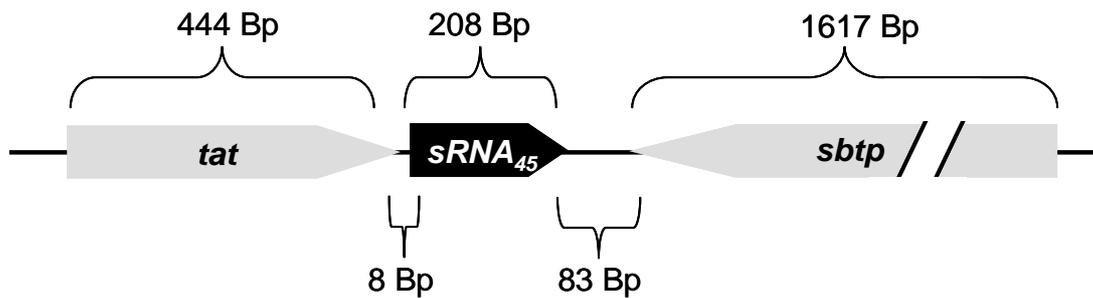


Abbildung 6: Genomischer Kontext der sRNA₄₅ im Genom von *H. volcanii*

tat "Tat twin-arginine translocation pathway signal sequence domain protein"; *sbtp* "Succinoglycan biosynthesis transport protein"

In Abbildung 7 dargestellt ist die Amplifikation der erzeugten cDNA. Die Analyse der ncRNA erfolgte durch Sequenzierung. Wie in Abbildung 7A zu erkennen, wurden zwei Fragmente bei der ersten PCR-Reaktion amplifiziert. Beide Fragmente wurden separat aus dem Agarosegel extrahiert und ergaben nach anschließender Reamplifikation dasselbe PCR-Fragment (Abbildung 7B).

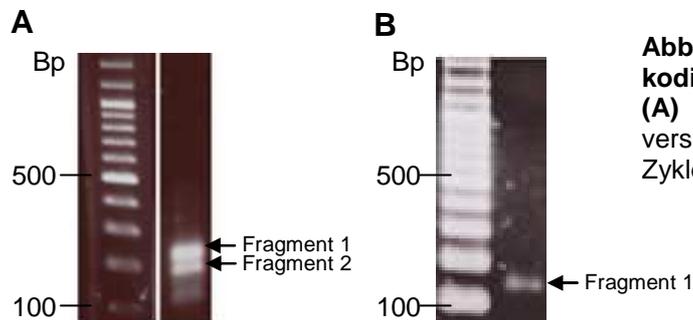


Abbildung 7: crRT-PCR der kleinen nicht kodierenden RNA₄₅ aus *H. volcanii*

(A) 1. PCR nach cDNA-Synthese (B) 2. verschachtelte PCR; PCR-Produkt nach 10 Zyklen Amplifikation.

Nach Sequenzierung des PCR-Fragmentes der verschachtelten PCR der crRT-PCR-Analyse konnte das PCR-Fragment sequenziert und nach Abgleich mit der genomischen Sequenz somit die 5'- und 3'-Enden der ncRNA identifiziert werden. Die mittels crRT-PCR ermittelte Sequenz unterschied sich in drei am 3'-Ende zusätzlichen Nukleotiden von der in Ulm ermittelten Sequenz (Abbildung 8).

```

sRNA45 (Ulm) 5' - GCGTACCTCAAGTCCCCGGCCGAGTGTTCCCGCTTCGGGAGCGATGACAG
sRNA45 (crRT-PCR) 5' - GCGTACCTCAAGTCCCCGGCCGAGTGTTCCCGCTTCGGGAGCGATGACAG

CACGGCGAACCCGGGTGCGCAATAGCTACTGGCCGGCTGACGCCGGCGTA
CACGGCGAACCCGGGTGCGCAATAGCTACTGGCCGGCTGACGCCGGCGTA

CTTCGGAACGTCTGCGCCCGAAAGACGGACCGCCCGGCACGAGGGTTTCC
CTTCGGAACGTCTGCGCCCGAAAGACGGACCGCCCGGCACGAGGGTTTCC

CGGTCGACGCGGCACGCCGCTCGGGATGAGACCGGCCGTTAGTGTTCTG
CGGTCGACGCGGCACGCCGCTCGGGATGAGACCGGCCGTTAGTGTTCTG

GGCGACAC -3'
GGCGACACCTT -3'

```

Abbildung 8: Sequenz-Analyse der sRNA₄₅ aus *H. volcanii*

Dargestellt ist die von der AG Marchfelder ermittelte Sequenz (rot) und die durch crRT-PCR im Rahmen dieser Arbeit ermittelte Sequenz (grün).

3. Promotorstruktur in *H. volcanii*

Zur Charakterisierung basaler haloarchaealer Promotorelemente wurden Sequenzabschnitte von -130 bis +20 Nukleotide relativ zum experimentell bestimmten Transkriptionsstart aus der partiellen Genom-Datenbank (<http://www.tigr.org>) von *H. volcanii* extrahiert. Zur Identifizierung potenziell funktionaler DNA Motive mit einem fixierten Abstand zum Transkriptionsstart wurde ein Sequenz-Logo (Gorodkin *et al.*, 1997; Schneider & Stephens, 1990) für alle Gene aus *H. volcanii* mit bekanntem 5'-Ende generiert (Abbildung 9).

Die TATA-Box ist das prominenteste Promotorelement, zentriert um Position -27/-28 mit der Konsensussequenz „TTWT“. Stromaufwärts der TATA-Box ist das „Transkriptionsfaktor B Recognition Element“ (BRE) konserviert. Die Konsensussequenz des BRE-Elementes ist im Vergleich zum „AA“ Motiv, welches in früheren Studien entdeckt wurde, (Slupska *et al.*, 2001; Soppa, 1999) auf „CnAA“ erweitert. Die Promotoranalyse führte zusätzlich zu der Entdeckung eines „WW“ Elements an der Position -10/-11. Der konservierte Abstand zur TATA-Box, zum BRE und dem Transkriptionsstart weist darauf hin, dass es sich bei diesem neuen Element um ein *bona fide* Promotor-Element handelt. Es bleibt

noch zu ermitteln, welches DNA-bindende Protein Interaktionen mit diesem Element eingeht. Kandidaten sind TFB und die RNA-Polymerase.

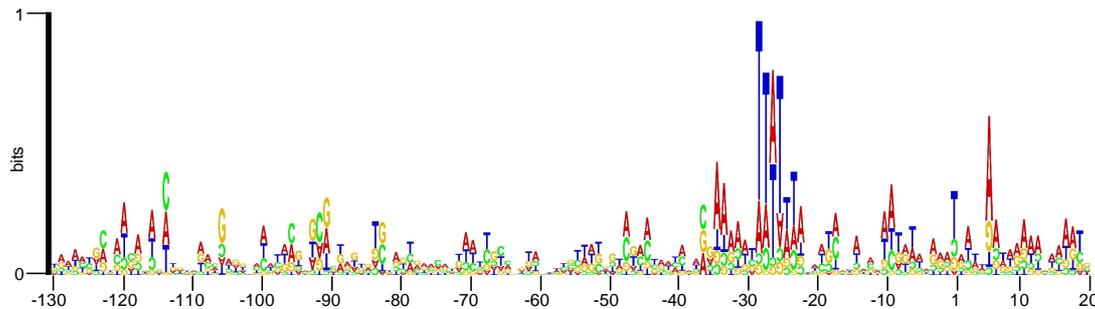


Abbildung 9: Identifizierung basaler Promotor-Elemente stromaufwärts von Genen aus *H. volcanii*

Sequenzen von -130 bis +20 relativ zu allen experimentell bestimmten Transkriptionsstarts von Genen aus *H. volcanii* (Tabelle 7) wurden zur Generierung eines Sequenz-Logos verglichen. Das Sequenz-Logo wurde mit Hilfe des Programms „RNA Structure Logo“ (Gorodkin *et al.*, 1997) konstruiert. Die Höhe der aufrecht abgebildeten Buchstaben entspricht dem Konservierungsgrad der Nukleotide an dieser Position, gemessen in „bits“. Umgekehrte Buchstaben repräsentieren Nukleotide, deren Auftreten an dieser Position geringer ist, als bei willkürlichen Sequenzen desselben GC-Gehalts, wobei die Höhe dem Grad der Unterrepräsentation entspricht.

4. Termination der Transkription in *H. volcanii*

Zur Identifizierung von Sequenz-Motiven, die für die Termination der Transkription in *H. volcanii* von Bedeutung sein könnten, wurden die letzten 80 Nukleotide der transkribierten DNA und 50 Nukleotide stromabwärts des Transkriptionsstops für alle Gene mit experimentell bestimmten 3'-Enden zu einem Sequenz-Logo zusammen gesetzt (Abbildung 10A). Ein penta-U Motiv ist am 3'-Ende der Transkripte hoch konserviert. Außer diesem Element konnten weder stromaufwärts, noch stromabwärts des Transkriptionsstops konservierte Motive identifiziert werden. Zur Identifizierung strukturell konservierter Elemente wurden alle 3'-UTRs *in silico* unter Verwendung des „mfold web servers 3.2“ (Zuker, 2003) gefaltet. 12 von 17 3'-UTRs zeigten eine Haarnadelstruktur, welche dem penta-U Motiv vorausging oder einige der Us enthielt. (Tabelle 7: Transkripte 1-17; außer 6-9, 14). Aus Abbildung 10B wird anhand der minimalen freien Energien (ΔG) ersichtlich, dass die Struktur der Haarnadeln nicht uniform ist,

diese aber aus einer oder mehreren Ausbuchtungen bestehen, und unterschiedlich viele Nukleotide im Stamm enthalten können. Drei typische Beispiele sind in Abbildung 10C gezeigt.

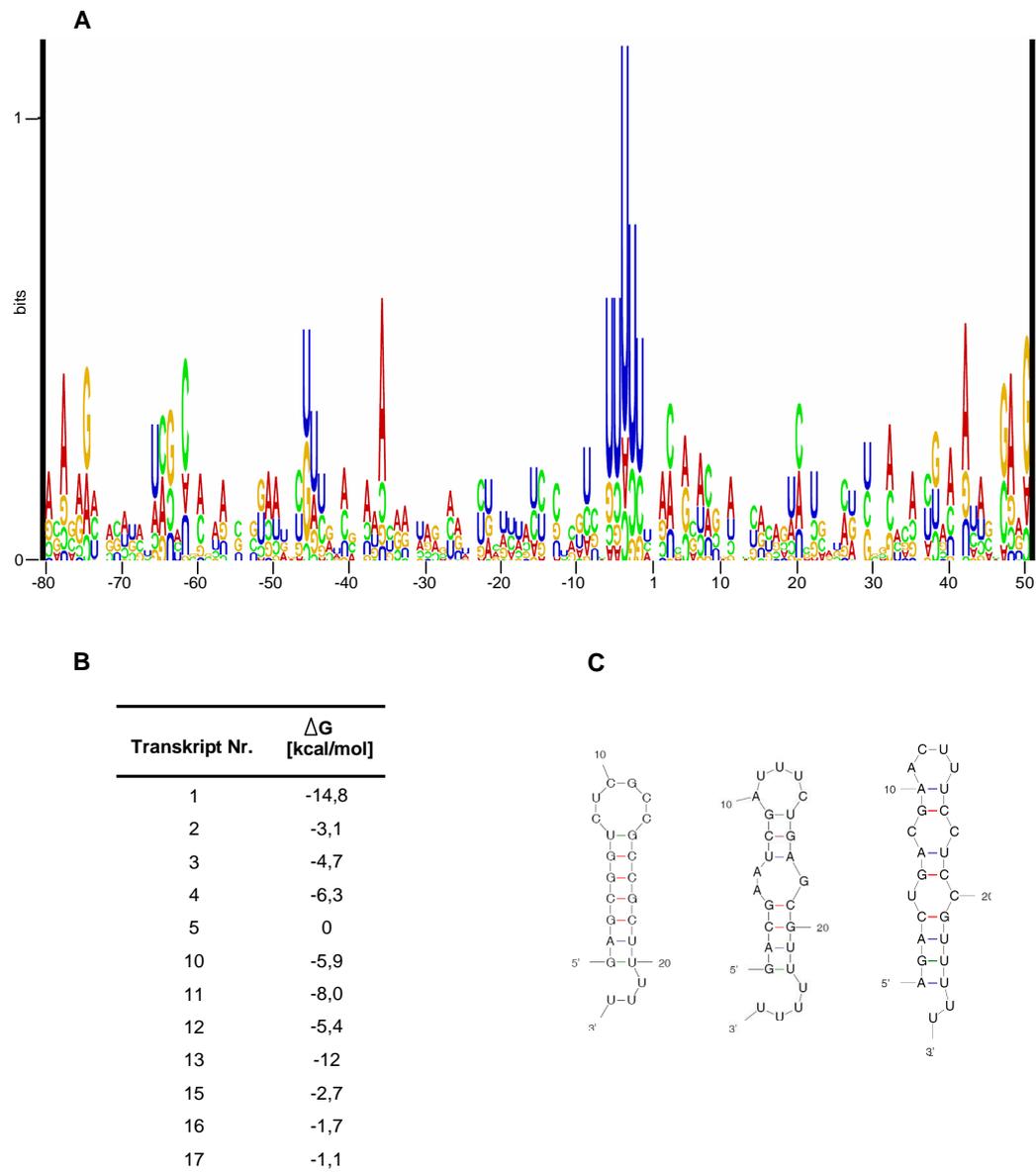


Abbildung 10: Termination der Transkription in *H. volcanii*

(A) Sequenzen von -80 bis +50 relativ zum experimentell bestimmten Transkriptionsstop aller in Tabelle 7 dargestellten Gene aus *H. volcanii* wurden aus Datenbanken extrahiert. Ein Sequenz-Logo wurde unter Verwendung des Programms „RNA Structure Logos“ (Gorodkin *et al.*, 1997) generiert. (B) Minimale freie Energien putativer Haarnadelstrukturen am 3'-Ende der Transkripte aus Tabelle 7 nach Faltung mit Hilfe des Programms mfold (Zuker, 2003) (C) Drei typische Beispiele von putativen Sekundärstrukturen am 3'-Ende von Transkripten aus *H. volcanii*. Die Strukturen wurden mit Hilfe des Programms mfold vorhergesagt (Zuker, 2003). Von links nach rechts sind die Transkripte Nr. 4, 15 und 16 aus Tabelle 7 gezeigt.

Zusammen mit der Entdeckung der variablen 3'-Enden (Kapitel 1.1 der Ergebnisse) lassen diese Beobachtungen den Schluss zu, dass die Termination der Transkription in *H. volcanii* an einer oder mehreren Positionen stromabwärts des penta-U Motivs, welches häufig Haarnadelstrukturen nachgestellt ist, stattfinden kann.

5. Strukturelle Eigenschaften von UTR-Sequenzen

5.1 Transkripte mit und ohne 5'-UTR in *H. volcanii*

Transkripte ohne 5'-UTR besitzen keine oder nur wenige Nukleotide stromaufwärts des translationalen Startkodons. Falls vorhanden, muss die 5'-UTR lang genug sein, um eine Shine-Dalgarno-Sequenz enthalten zu können. Es konnte gezeigt werden, dass mindestens 3-7 Nukleotide zwischen Startkodon und dem 3'-Ende der SD-Sequenz vorhanden sein müssen (Sartorius-Neef & Pfeifer, 2004; Shultzaberger *et al.*, 2001), und dass eine SD-Sequenz aus mindestens fünf Nukleotiden besteht (Brenneis *et al.*, 2007). Daher wurden in dieser Arbeit erst Sequenzabschnitte mit mehr als 10 Nukleotiden als 5'-UTR betrachtet.

In *H. volcanii* besitzen 15 von 23 Transkripten keine 5'-UTR, also mehr als 2/3 aller analysierten Transkripte (Tabelle 7). Ist eine 5'-UTR vorhanden, dann beträgt die durchschnittliche Länge 19 Nukleotide. Die 5'-UTRs sind insgesamt also kürzer als in Eukaryoten, wo sie eine durchschnittliche Länge von ca. 100 Nukleotide aufweisen (Mazumder *et al.*, 2003). Die Sequenzen der 5'- und 3'-UTRs verschiedener Taxa wie Mensch, Vogel, Nager oder Affe zeigen unterschiedliche Basenzusammensetzungen. In diesen Organismen besitzt die 5'-UTR einen höheren GC-Gehalt (60%) als die 3'-UTR (45%; Abbildung 11; Pesole *et al.*, 2000). In *H. volcanii* entspricht der GC-Gehalt der 5'-UTRs dem der kodierenden Regionen und der 3'-UTRs (Abbildung 11). Unterschiede in der Basenkomposition wie bei den o.g. Vertebraten konnten nicht festgestellt werden.

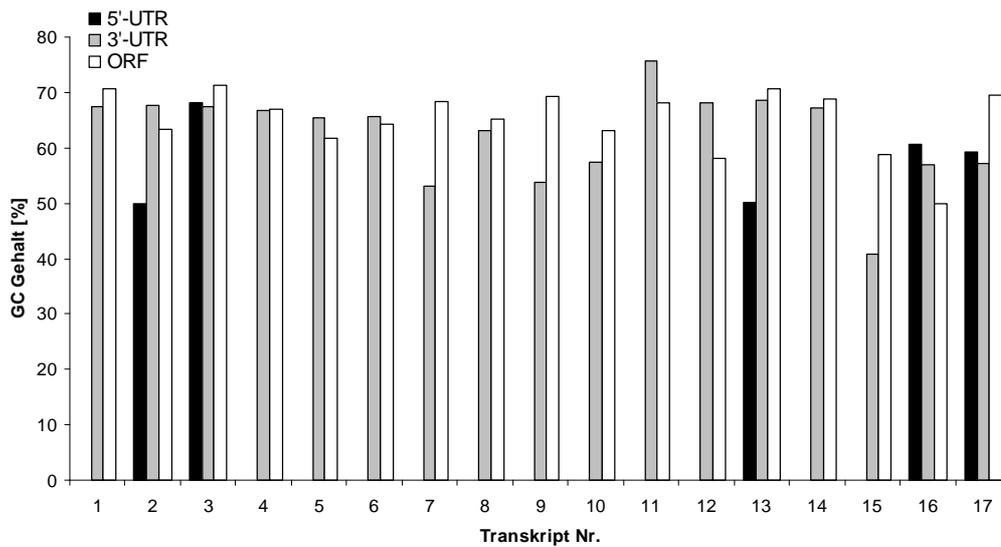


Abbildung 11: GC-Gehalt der untranslatierten Regionen und der ORFs von Transkripten aus *H. volcanii*

GC-Gehalt der 5'- und 3'-UTRs und des ORF der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Transkripte aus Tabelle 7.

Bisher wurde angenommen, dass die Initiation der Translation bei haloarchaealen Transkripten mit 5'-UTR dem konventionellen Mechanismus folgt. Demnach wurde in allen 5'-UTRs eine SD-Sequenz vermutet. Überraschenderweise ist nur in wenigen haloarchaealen 5'-UTRs eine SD-Sequenz konserviert und nur zwei von acht Transkripten mit 5'-UTR besitzen eine putative SD-Sequenz (Abbildung 12). Bisher ist unklar, wie die Translation bei Transkripten mit 5'-UTR und ohne SD-Sequenz initiiert wird. Der Mechanismus, der spezifisch für Transkripte ohne 5'-UTR ist, kann von Transkripten mit 5'-UTR nicht genutzt werden. Bisher wurde angenommen, dass die Translation von Transkripten mit 5'-UTR in Archaea über eine Interaktion der SD-Sequenz mit der 16S rRNA initiiert wird. Daher war die experimentelle Charakterisierung der Translationsinitiation bei Transkripten mit 5'-UTR ohne SD-Sequenz *in vivo* wichtig (siehe Kapitel 6 der Ergebnisse).

GGAGGUGA

Nr. 2, Transkriptionsregulator *hoxA*
AGAUAGCGAGACAGAUG

Nr. 3, Konserviertes hypothetisches Protein
 GACCACGAC**GACCGGG**UUCGAUAUG

Nr. 13, Signal Peptid Peptidase
 CCAUGA**GUGA**UUCACCGUG

Nr.16, Konserviertes Protein
 ACGCAAUACGAACGACGCG**GAAUCUGGG**CGGUG

Nr. 17, Konserviertes hypothetisches Protein
 GAAC**GGUGA**AGGCAAUG

Nr. 18, Transkriptionsfaktor B
 41nt- CUUCCCGGCCGAGACGUAUCCG**GCCUUCCACCC**ACCAUG

Nr. 20, Superoxid Dismutase *sod1*
 GCG**AACAC**CUUACCAUG

Nr.21, Superoxid Dismutase *sod2*
 GAUAC**GGAGGUAC**ACAUUAUG

Abbildung 12: 5'-UTRs von Transkripten aus *H. volcanii*

Gezeigt sind die 5'-UTRs aller analysierten Transkripte aus *H. volcanii* inklusive Translationsinitiationskodons (siehe auch Tabelle 7). Die Konsensussequenz der haloarchaealen SD-Sequenz (Sartorius-Neef & Pfeifer, 2004) ist oben gezeigt. In *E. coli* beträgt der optimale Abstand des 3'-Endes der SD-Sequenz vom Startkodon fünf Nukleotide und 85% aller Gene haben einen Abstand von drei bis sieben Nukleotiden (Shultzaberger *et al.*, 2001). Der optimale Abstand der SD-Sequenz zum Startkodon in Haloarchaea ist nicht bekannt. Die der SD-Sequenz ähnlichste Region innerhalb der 5'-UTRs ist durch eine graue Box hinterlegt und konservierte Nukleotide sind fett gedruckt und unterstrichen. Die translationalen Startkodons sind fett gedruckt.

5.2 Charakterisierung der 3'-UTRs von Transkripten aus *H. volcanii*

Alle analysierten Transkripte aus *H. volcanii* besitzen eine 3'-UTR (Tabelle 7). Die Länge der 3'-UTRs in *H. volcanii* variiert zwischen 24 Nukleotide und 153 Nukleotide, mit einem Durchschnitt von 45 Nukleotiden. 13 von 17 der haloarchaealen 3'-UTRs haben eine Länge von 20 bis 80 Nukleotiden und nur vier 3'-UTRs sind länger als 100 Nukleotide. Damit sind die 3'-UTRs durchschnittlich länger als die 5'-UTRs.

Die Analyse der 3'-UTRs zeigte außerdem, dass diese identisch zur genomischen Sequenz sind und keine zusätzlichen Nukleotide im Rahmen einer Prozessierung an die Transkripte von *H. volcanii* angehängt werden. Diese Daten

bestätigen eine aktuelle Studie, die keinen Hinweis auf Polyadenylierung von RNAs in *H. volcanii* finden konnte (Portnoy *et al.*, 2005). Der GC-Gehalt der 3'-UTRs entspricht dem der kodierenden Regionen und der 5'-UTRs (Abbildung 11). Mit Hilfe des Computerprogramms MEME (Bailey & Elkan, 1994) wurden die 3'-UTRs auf konservierte Sequenzmotive untersucht. In allen Fällen war das penta-U Motiv in die Termination der Transkription involviert (Abbildung 10), aber zusätzliche Sequenzmotive konnten nicht identifiziert werden. Drei unterschiedliche *Software*-Programme (mfold, RNAshapes und ein Faltungsprogramm von Dirk Metzler der Universität Frankfurt) wurden verwendet, um putative Sekundärstrukturen der 3'-UTRs vorherzusagen, allerdings konnten keine konservierten Struktur Motive identifiziert werden.

6. Initiation der Translation in *H. volcanii*

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Mehrzahl aller haloarchaealen 5'-UTRs keine SD-Sequenz besitzt (Brenneis *et al.*, 2007). Bisher ist nicht bekannt wie die Translation bei Transkripten mit 5'-UTR ohne SD-Sequenz in Prokaryoten initiiert wird. Daher wurde untersucht, wie die Translation bei diesen Transkripten initiiert wird und ob Transkripte mit 5'-UTR ohne SD-Sequenz effizient in *H. volcanii* translatiert werden.

6.1 Ein Reporter-gen-System zur Bestimmung der Translationseffizienzen in *H. volcanii*

Zur experimentellen Untersuchung der Translationseffizienzen müssen die Transkripte und deren kodierte Genprodukte quantifiziert werden. Dazu wurde für *H. volcanii* ein Reporter-gen-System mit der Dihydrofolatreduktase (DHFR) als Reporter etabliert. Die *dhfr* wurde bereits für Promotorstudien erfolgreich als Reporter-gen *in vivo* eingesetzt (Danner & Soppa, 1996). Der Aktivitätstest beruht auf der von der DHFR katalysierten Reduktion von Dihydrofolat zu Tetrahydrofolat. Dabei wird NADPH zu NADP⁺ oxidiert. Da NADPH Licht mit einer Wellenlänge von 340 nm absorbiert, NADP⁺ hier jedoch keine Absorption zeigt,

kann die Extinktionsabnahme ($\Delta E/\text{Min.}$) im Photometer verfolgt und aufgezeichnet werden.

Als *Shuttle*-Vektor diente das Plasmid pSD1/M2-18 (Danner & Soppa, 1996). Das Plasmid enthält je einen Replikationsursprung und Selektionsmarker für *E. coli* (colE1, Amp^R) und für Halobakterien (*H. Phenon K* Isolat Aa 2.2 pHK2, Nov^R). Der Vektor kodiert für die *dhfr* aus *H. volcanii* (Nr. 11 aus Tabelle 7). Das native *dhfr* Transkript besitzt keine 5'-UTR. Die native 3'-UTR des Gens wurde entfernt. Dem Reporter gen vorangestellt ist ein synthetischer, konstitutiver Promotor von mittlerer Stärke (Danner & Soppa, 1996). In Abbildung 13 ist das verwendete *Shuttle*-Plasmid schematisch dargestellt. Die zu untersuchenden UTR-Abschnitte ausgewählter Gene wurden an den *dhfr*-ORF fusioniert, das Plasmid in *E. coli* MRF' vervielfältigt und zur Untersuchung der Translationseffizienzen in *H. volcanii* WR340 transformiert.

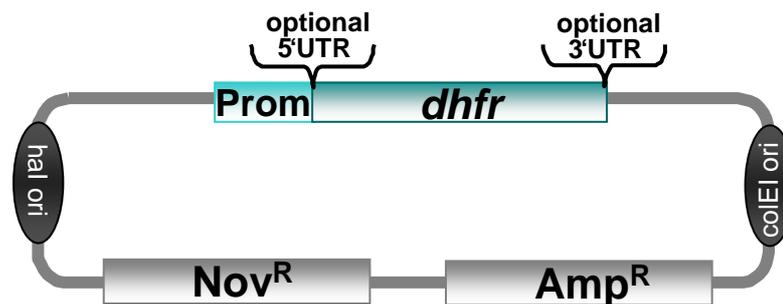


Abbildung 13: Reporter-Gen-Plasmid

Prom: konstitutiver Promotor; *dhfr*: Dihydrofolatreduktase; colE1 *ori*: bakterieller Replikationsursprung; Amp^R: Ampicillin Resistenzmarker; Nov^R: Novobiocin Resistenzmarker; hal *ori*: haloarchaealer Replikationsursprung.

Zur Kalkulation der Translationseffizienzen wurden die Protein-Mengen mit Hilfe des Reporter-Gen-Systems quantifiziert und die Transkript-Mengen durch RealTime-PCR Analysen bestimmt.

6.2 Experimentelle Charakterisierung der *in vivo* Funktion ausgewählter nativer 5'- und 3'-UTRs in *H. volcanii*

Zur experimentellen Untersuchung der Initiation der Translation von Transkripten mit 5'-UTR ohne SD-Sequenz wurde das Reporter-Gen-System mit der *dhfr* als Reporter angewendet. Zwei Gene, ein „*hoxA like transcriptional regulator*“ (*hlr*)

und ein „*conserved hypothetical protein*“ (*hp*) wurden für die Untersuchung der *in vivo* Funktion von UTRs ausgewählt (Nr. 2 und Nr. 3. in Tabelle 7). Die nativen Transkripte beider Gene besitzen eine 5'-UTR ohne SD-Sequenz.

Fünf Plasmide wurden konstruiert, die entweder die 5'-UTR oder die 3'-UTR fusioniert an die *dhfr* enthielten. Als Kontrolle diente eine Variante der *dhfr* ohne UTRs. Zur Generierung des Kontrollplasmids (Nr. 1 in Abbildung 14) wurden die *fdx*-Promotor-Region und der ORF der *dhfr* separat durch PCR amplifiziert und in einer dritten PCR-Reaktion durch überlappende Bereiche fusioniert. Ein künstlicher Terminator war Teil des stromabwärts gelegenen Oligonukleotids zur Amplifikation des ORF der *dhfr*. Das so generierte Plasmid pMB1 ist dem ursprünglichen Vektor pSD1/M2-18 sehr ähnlich. Allerdings wurde in dem neuen Plasmid pMB1 die native 3'-UTR der *dhfr* entfernt und zusätzliche Nukleotide, welche wichtig für Klonierungen vorheriger Studien waren, stromaufwärts des translationalen Startkodons der *dhfr* eliminiert. Das Zusammenfügen von Fragmenten mittels Fusions-PCR hat den Vorteil, dass auf das Einführen zusätzlicher Nukleotide verzichtet werden kann. Die Plasmide pMB3 und pMB6 (Nr. 2 und Nr. 4 in Abbildung 14) wurden auf ähnliche Art konstruiert. Das Promotor-Fragment und der *dhfr* ORF wurden als separate PCR-Fragmente amplifiziert und mittels Fusions-PCR zusammengefügt. Die 5'-UTRs waren Teile der Oligonukleotide, die zur Amplifikation der Promotor-Region und der *dhfr* dienten. Ein künstlicher Terminator war Teil des stromabwärts gelegenen Oligonukleotids zur Amplifikation des ORF der *dhfr*. Das Plasmid pMB4 (Nr. 3 in Abbildung 14) wurde auf ähnliche Art konstruiert. Die 3'-UTR war Teil des Oligonukleotids zur Amplifikation des ORF der *dhfr*. Zur Konstruktion des Plasmids pMB7 (Nr. 5 in Abbildung 14) wurden drei PCR-Fragmente generiert, welche das Promotor-Fragment, den *dhfr* ORF und die 3'-UTR enthielten. Die drei Fragmente wurden durch zwei aufeinanderfolgende Fusions-PCRs zusammengefügt. Alle Fusionsfragmente wurden anschließend über die Schnittstellen *ApaI* und *KpnI* in den Vektor pSD1/M2-18 integriert und in *E. coli* MRF' vermehrt.

H. volcanii Kulturen, transformiert mit den entsprechenden Plasmiden, wurden in der exponentiellen Wachstumsphase (2×10^8 Zellen/ml) geerntet und sowohl die spezifischen DHFR Enzymaktivitäten, als auch die Transkript-Mengen

quantifiziert (Abbildung 14). Die Messung der spezifischen Enzymaktivitäten und der Transkript-Mengen erfolgte in drei biologisch unabhängigen Replikaten. Aus den Ergebnissen wurde der Mittelwert mit Standardabweichung errechnet. Die spezifischen Aktivitäten und die Transkript -Mengen der chromosomal kodierten DHFR von *H. volcanii* wurde durch Kulturen mit Leerplasmid pNP10 (Patenge & Soppa, 1999) korrigiert. Die Quantifizierung der Transkript-Mengen erfolgte mit Hilfe der RealTime-PCR. Mittels Division der spezifischen DHFR-Aktivitäten durch die Transkript-Mengen wurde die Translationseffizienz kalkuliert (Abbildung 14).

Die Analyse der relativen Transkript-Mengen zeigte, dass die Fusion der 5'-UTRs an das Kontrolltranskript keinen Einfluss auf die Transkriptstabilität hatte (Abbildung 14C). Die Fusion der 3'-UTRs hingegen verstärkte die Transkriptstabilität um den Faktor 1,4 bzw. 2 (Nr. 3 und Nr. 5 in Abbildung 14A). Unterschiedliche Transkriptionsraten können in diesem Fall ausgeschlossen werden, da die 5'-Enden der 3'-UTR-Fusionen und des Kontrolltranskripts identisch sind. Abgesehen von der Entdeckung, dass 3'-UTRs in den Einbau von Selenocystein in einigen methanogenen Archaea beteiligt sind (Rother *et al.*, 2001), ist die verstärkte Transkriptstabilität die zweite experimentell bestätigte Funktion von 3'-UTRs in Archaea. Mit Hilfe der DHFR-Aktivitäten und der entsprechenden Transkript-Mengen wurden die Translationseffizienzen kalkuliert. Die Ergebnisse wurden auf die Translationseffizienz des Kontrolltranskripts (Nr. 1 in Abbildung 14A) normiert und sind in Abbildung 14D zusammengefasst dargestellt. In beiden Fällen führte die Fusion einer 5'-UTR an das Kontrolltranskript zu einer Reduktion der Translationseffizienz um 50% (Nr. 2 und Nr. 4 in Abbildung 14D). Die Fusion der 3'-UTRs hatten verglichen zur Kontrollvariante keinen signifikanten Einfluss auf die Translationseffizienz.

Die Ergebnisse zeigen, dass Transkripte ohne 5'-UTR nicht nur die Mehrheit der Transkripte in *H. volcanii* darstellen, sondern dass diese Transkripte im Gegensatz zu denen in *E. coli* auch sehr effizient translatiert werden (Grill *et al.*, 2002). Im Rahmen dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass auch Transkripte mit 5'-UTR ohne SD-Sequenz in *H. volcanii* translatiert werden können. Die Fusion der 3'-UTR an das *dhfr* Transkript hatte keinen Einfluss auf die Translationseffizienz (Nr. 3 und Nr. 5 in Abbildung 14D).

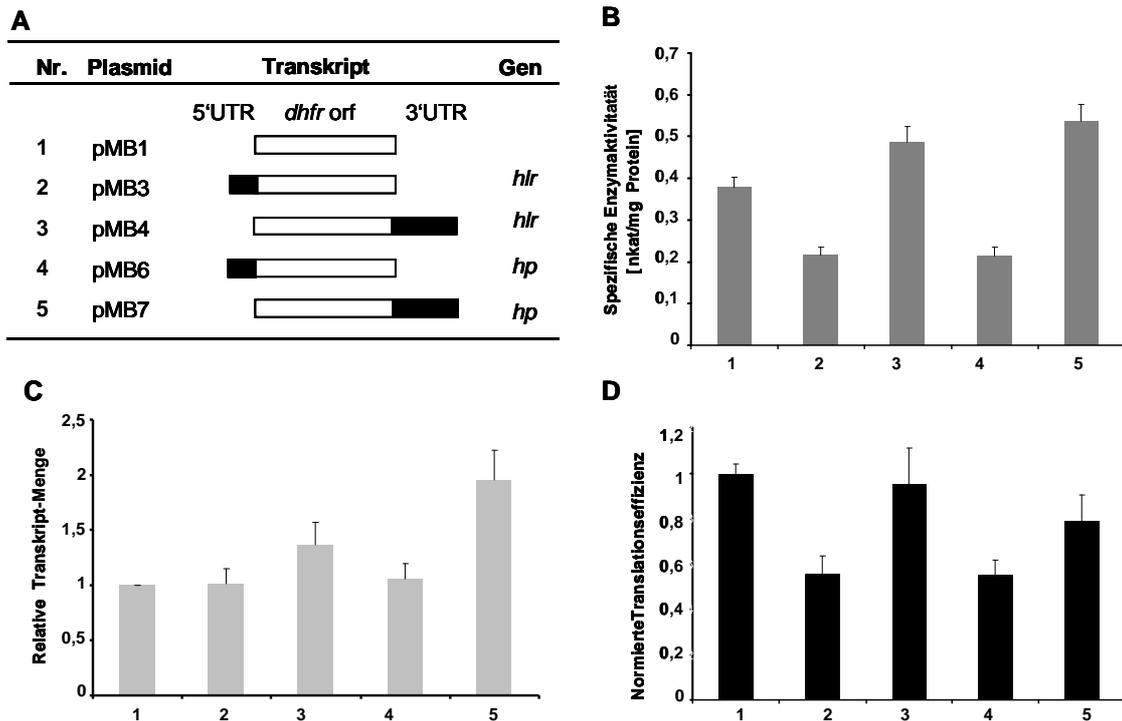


Abbildung 14: Charakterisierung der *in vivo* Funktion haloarchaealer 5'- und 3'-UTRs

(A) Das *dhfr*-Reporterogen und die Genfusionen mit jeweils der 5'-UTR oder der 3'-UTR der Gene Nr. 2 und 3 aus Tabelle 7 sind schematisch gezeigt. Die Gene kodieren für einen „*hoxA like transcriptional regulator*“ (*hlr*, Nr. 2 in Tabelle 7) und ein „*conserved hypothetical protein*“ (*hp*, Nr. 3 in Tabelle 7). Die Translationseffizienzen wurden für Zellen aus der exponentiellen Wachstumsphase (2×10^8 Zellen/ml) kalkuliert. (B) Spezifische Enzymaktivitäten. Drei unabhängige biologische Replikate wurden durchgeführt und die Mittelwerte mit Standardabweichungen berechnet. (C) Relative mRNA-Mengen. Drei unabhängige biologische Replikate wurden durchgeführt, die Mittelwerte mit Standardabweichungen berechnet und auf das Kontrollplasmid pMB1 normiert. (D) Translationseffizienz nach Normierung auf das Kontrollplasmid pMB1. Die Translationseffizienzen wurden durch das Dividieren der DHFR-Aktivitäten durch die Transkript-Menge kalkuliert.

6.3 Translationseffizienzen von Transkripten mit artifizialen 5'-UTRs zufälliger Sequenz in *H. volcanii*

Bioinformatische Analysen der 5'-UTRs ohne SD-Sequenz führten weder zu der Identifizierung von Konsensussequenzen, noch zur Bestimmung konservierter Strukturelemente, welche möglicherweise in die Initiation der Translation involviert sein könnten (Daten nicht gezeigt). Daher wurde untersucht, ob künstliche 5'-UTRs bestehend aus einer zufälligen Sequenz die Fähigkeit zur Initiation der Translation in *H. volcanii* besitzen.

Vier Zufalls-UTRs von 20 Nukleotiden Länge (äquivalent zu der durchschnittlichen Länge nativer 5'-UTRs in *H. volcanii*) wurden an das *dhfr*-Reporter gen fusioniert und die Translationseffizienzen bestimmt. Die Generierung der Reporter gen-Plasmide erfolgte wie für pMB3 und pMB6 in Kapitel 6.2 der Ergebnisse. Die Zufalls-Sequenzen sind in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8: Artificielle UTRs zufälliger Sequenz

Plasmid	Sequenz
pMB14	TACCACATTTTCAGGCAAGAT
pMB15	CGACTCACA ACTGGACTTCA
pMB16	ACAACGGCCTCTCGATACCA
pMB17	GCTGCAGCAGAGAACTTGGC

Die Ergebnisse sind in Abbildung 15 gezeigt. In zwei Fällen setzte die Fusion der artifizialen 5'-UTRs die Transkriptstabilität um den Faktor zwei bis drei herab (Nr. 2 und Nr. 3 aus Abbildung 15C). Überraschenderweise war die Translationseffizienz aller Transkripte mindestens genauso hoch, wie die des Kontrolltranskripts ohne 5'-UTR. Die Effizienzen zweier Transkripte (Nr. 2 und Nr. 3 aus Abbildung 15D) waren sogar vier- bis achtfach höher. Dieses Ergebnis unterstützt die Annahme, dass die Translation bei Transkripten mit 5'-UTR ohne SD-Sequenz in *H. volcanii* effizient initiiert werden kann.

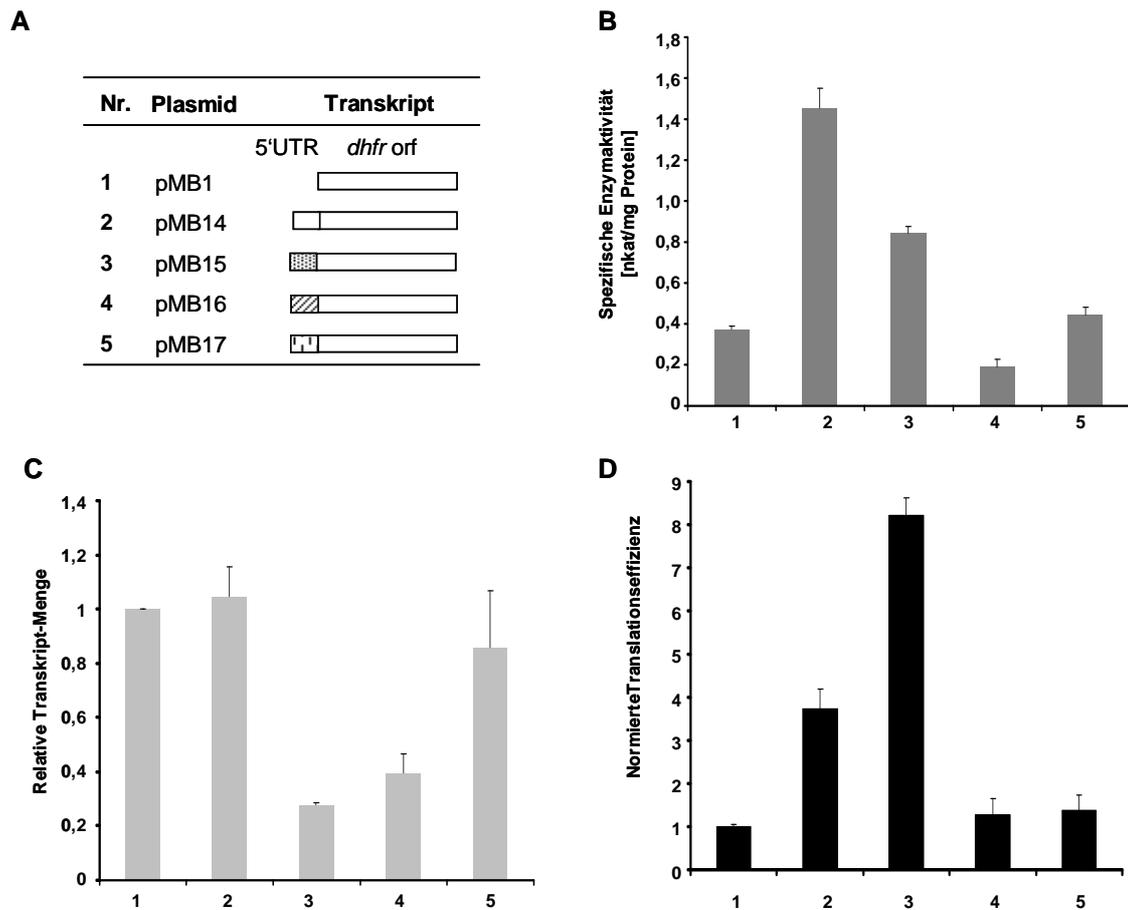


Abbildung 15: Translationseffizienzen künstlicher 5'-UTRs mit Zufalls-Sequenz in *H. volcanii*

Vier 5'-UTRs mit Zufalls-Sequenz wurden generiert und an das *dhfr*-Reporter gen fusioniert. **(A)** Das *dhfr*-Reporter gen und die Genfusionen mit jeweils einer zufälligen 5'-UTR sind schematisch gezeigt. Die Translationseffizienzen wurden für Zellen aus der exponentiellen Wachstumsphase (2×10^8 Zellen/ml) kalkuliert. **(B)** Spezifische Enzymaktivitäten. Drei unabhängige biologische Replikate wurden durchgeführt und die Mittelwerte mit Standardabweichungen berechnet. **(C)** Relative mRNA-Mengen. Drei unabhängige biologische Replikate wurden durchgeführt, die Mittelwerte mit Standardabweichungen berechnet und auf das Kontrollplasmid pMB1 normiert. **(D)** Translationseffizienz nach Normierung auf das Kontrollplasmid pMB1. Die Translationseffizienzen wurden durch das Dividieren der DHFR-Aktivitäten durch die Transkript-Menge kalkuliert.

6.4 Einfluss der Struktur von 5'-UTRs auf die Effizienz der Initiation der Translation in *H. volcanii*

Um herauszufinden, ob die Sekundärstruktur einen Einfluss auf die Translationseffizienz hat, wurde eine native 5'-UTR ausgewählt (Nr. 3 in Tabelle 7), die eine *in silico* vorhergesagte Haarnadelstruktur besitzt (Abbildung 16), und zwei mutierte Varianten mit stabilisierter oder destabilisierter Haarnadelstruktur wurden ähnlich zu pMB6 (Kapitel 6.2 der Ergebnisse) generiert.

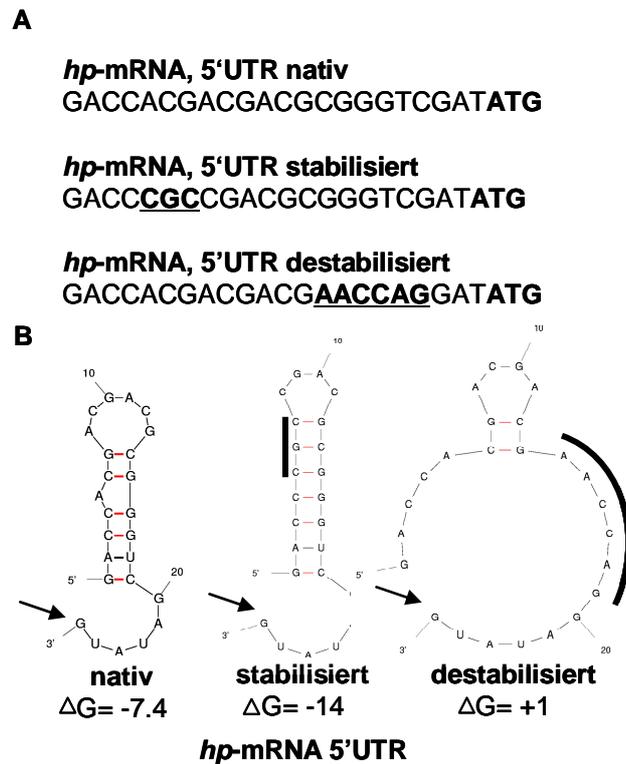


Abbildung 16: *In vitro* Mutagenese einer nativen 5'-UTR aus *H. volcanii*

(A) Nukleotidsequenzen der nativen, stabilisierten und destabilisierten 5'-UTR aus *H. volcanii* (Nr. 3 aus Tabelle 7). Mutierte Nucleotide sind unterstrichen und in grau dargestellt. **(B)** *In silico* Strukturanalysen der nativen, stabilisierten und destabilisierten 5'-UTRs. Die Strukturanalysen wurden mit dem Programm „mfold 3.2“ (Mathews *et al.*, 1999; Zuker, 2003) durchgeführt. Mutierte Nucleotide sind durch einen grauen Balken markiert. Der Translationsstart ist durch einen Pfeil markiert. Die freie Enthalpie ΔG ist in kcal/mol angegeben.

Die mutierten als auch die native 5'-UTR wurden an das *dhfr*-Reportergen fusioniert und die Translationseffizienzen wie in Kapitel 6.2 der Ergebnisse ermittelt (Abbildung 17). Als Kontrolltranskript diente eine Variante des Reportergens ohne 5'-UTR. Eine inverse Korrelation zwischen der Stabilität der Haarnadelstruktur und der spezifischen Enzymaktivität zeigte, dass die Struktur der 5'-UTR die Initiation der Translation beeinflussen kann (Abbildung 17B). Die Analyse der Transkript-Mengen zeigte allerdings, dass bei stabilisierter Haarnadelstruktur keine mRNA nachweisbar war (Abbildung 17C). Die stabilisierte 5'-UTR könnte eine Destabilisierung des Transkripts hervorrufen. Die Fusion der 5'-UTR mit destabilisierter 5'-UTR an das Reportergen hatte ebenfalls eine Destabilisierung des Transkriptes um den Faktor zwei zur Folge.

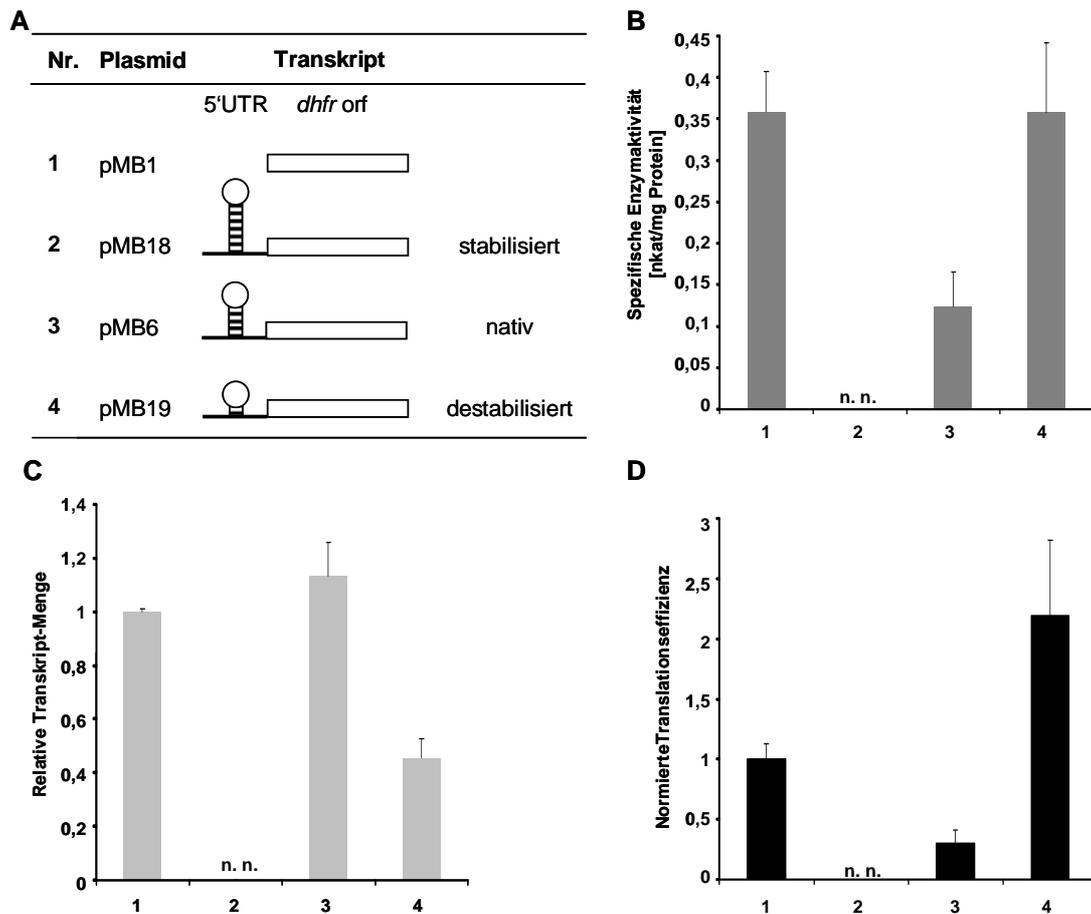


Abbildung 17: Einfluss von Sekundärstrukturen der 5'-UTR auf die Translationseffizienz

Spezifische Strukturelemente einer nativen 5'-UTR aus *H. volcanii* (Nr.3 in Tabelle 7) wurden stabilisiert und destabilisiert und an das *dhfr*-Reportergen fusioniert. Die Translationseffizienzen wurden für Zellen aus der exponentiellen Wachstumsphase (2×10^8 Zellen/ml) kalkuliert. **(A)** Das *dhfr*-Reportergen und die Genfusionen mit jeweils einer 5'-UTR sind schematisch gezeigt. Als Kontrolltranskript diente eine Reportergen-Variante ohne 5'-UTR. **(B)** Spezifische Enzymaktivitäten. Drei unabhängige biologische Replikate wurden durchgeführt und die Mittelwerte mit Standardabweichungen berechnet. **(C)** Relative mRNA-Mengen. Drei unabhängige biologische Replikate wurden durchgeführt, die Mittelwerte mit Standardabweichungen berechnet und auf das Kontrollplasmid pMB1 normiert. **(D)** Translationseffizienz nach Normierung auf das Kontrollplasmid pMB1. Die Translationseffizienzen wurden durch das Dividieren der DHFR-Aktivitäten durch die Transkript-Menge kalkuliert. n.n. Nicht nachweisbar.

Die Fusion der nativen 5'-UTR an das *dhfr*-Reportergen hatte im Vergleich zum Kontrolltranskript ohne 5'-UTR keinen Einfluss auf die Transkriptstabilität, während die Translationseffizienz bei nativer 5'-UTR im Vergleich zum Kontrolltranskript um den Faktor zwei geringer war. Eine Destabilisierung der nativen Haarnadelstruktur hatte verglichen zur nativen Variante eine um den Faktor sieben erhöhte Translationseffizienz zur Folge. Damit war die Translation

der Variante mit destabilisierter 5'-UTR um den Faktor zwei effizienter als die Translation der Variante ohne 5'-UTR. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine SD-Sequenz für die Initiation der Translation in *H. volcanii* nicht essentiell ist, die Effizienz allerdings erheblich durch die Struktur der 5'-UTR beeinflusst werden kann.

6.5 Einfluss der Position von Strukturelementen auf die Initiation der Translation in *H. volcanii*

Riboswitches sind regulatorische Elemente, die Liganden-induziert definierte Strukturen einnehmen können. Diese Liganden-abhängigen Konformationsänderungen können die Genexpression beeinflussen (Serganov & Patel, 2007).

In *S. cerevisiae* konnte durch Insertion eines Aptamers in die 5' UTR eines Reportergens die Translation und somit die Genexpression Tetracyclin-abhängig reprimiert werden (Suess *et al.*, 2003). Dabei verhindert das durch Tetracyclin stabilisierte Aptamer die Ribosomanlagerung oder das *Scanning* der kleinen Ribosomuntereinheit. Der Mechanismus und die Effizienz der Repression ist dabei abhängig von der Positionierung des Aptamers (Hanson *et al.*, 2003; Suess *et al.*, 2003). Es konnte bereits gezeigt werden, dass Aptamere in Bakterien und Hefe angewendet werden können. Um zu testen ob diese Riboswitches auch in der dritten Domäne des Lebens, den Archaea, anwendbar ist, wurde ein Tetracyclin-Aptamer an verschiedenen Positionen in eine 5'-UTR mit zufälliger Sequenz (Nr.1 in Tabelle 8) inseriert. In Vorversuchen wurde zunächst sichergestellt, dass Tetracyclin keinen toxischen Effekt auf archaeale Zellen ausübt. Dazu wurde das Wachstum von *H. volcanii* WR340 Zellen in Komplexmedium bei steigenden Tetracyclin Konzentrationen untersucht. Die Wachstumsversuche wurden in drei biologisch unabhängigen Replikaten durchgeführt und die Mittelwerte mit Standardabweichungen in Abbildung 18 dargestellt. Für *S. cerevisiae* konnte schon mit 100 μ M Tetracyclin die maximale Regulierbarkeit des Aptamers erzielt werden (Suess *et al.*, 2003). Ein Effekt in diesem Konzentrationsbereich auf das Wachstum haloarchaealer Zellen konnte nicht beobachtet werden, wie aufgrund der Selektivität für Bakterien zu erwarten war.

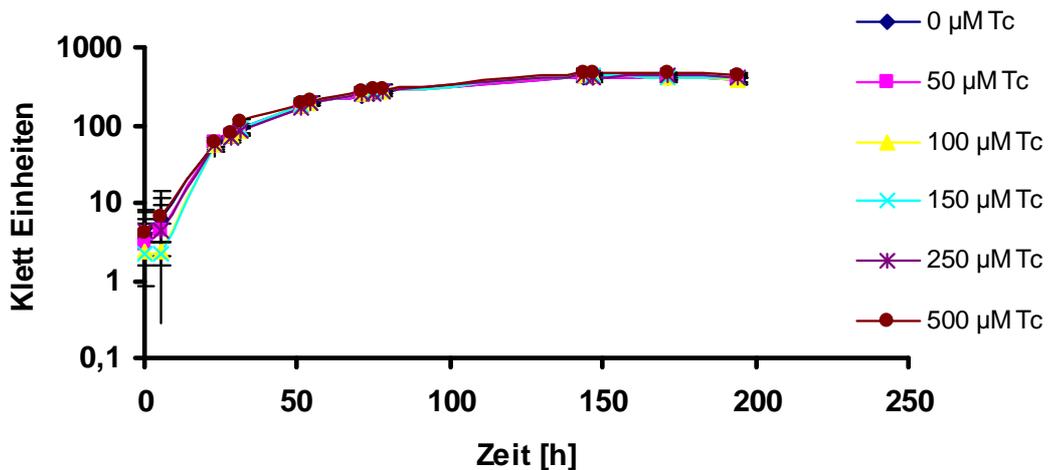


Abbildung 18: Wachstum haloarchaealer Zellen nach Applikation von Tetracyclin

H. volcanii Zellen des Stammes WR340 wurden in Komplexmedium mit den angegebenen Tetracyclin Konzentrationen bei 42°C kultiviert und die Wachstumsrate dreier unabhängiger Replikate mit einem Klett-Photometer bestimmt.

Die Planung und Konstruktion der Plasmide wurde freundlicherweise von Julia Weigand und Jürgen Beer aus der AG Süß durchgeführt. Zur Generierung der *dhfr*-Aptamer Fusion wurden zunächst die Promotor-Region mit randomisierter UTR, das Aptamer und das *dhfr*-Reporter gen separat amplifiziert und anschließend über homologe Regionen in zwei aufeinander folgenden PCR-Reaktionen fusioniert. Als DNA-Vorlage für die Promotor-Region mit randomisierter UTR und das *dhfr*-Reporter gen diente das im Rahmen dieser Arbeit beschriebene Plasmid pMB14. Als Vorlage für die Amplifikation des Aptamers diente das Plasmid pWHE601-AN32SH. Vor das ATG-Startkodon des *dhfr*-Reporter gens wurden zusätzlich drei Adenosinnukleotide eingefügt. Diese entsprechen einer optimierten Kozaksequenz für *S. cerevisiae*. Die Adenosinnukleotide waren Teil des stromabwärts gelegenen Oligonukleotids, das zur Amplifikation des Aptamers diente. Das Fragment wurde über die Schnittstellen *Xho*I und *Acc*65I in den Vektor pMB1 integriert und in *E. coli* DH5α vervielfältigt. Anschließend wurde *H. volcanii* WR340 mit den Reporter gen-Plasmiden transformiert. Zellen wurden in An- und Abwesenheit von 250 μM Tetracyclin inkubiert, in der exponentiellen Wachstumsphase (2×10^8 Zellen/ml) geerntet, und die Translationseffizienzen kalkuliert (Abbildung 19).

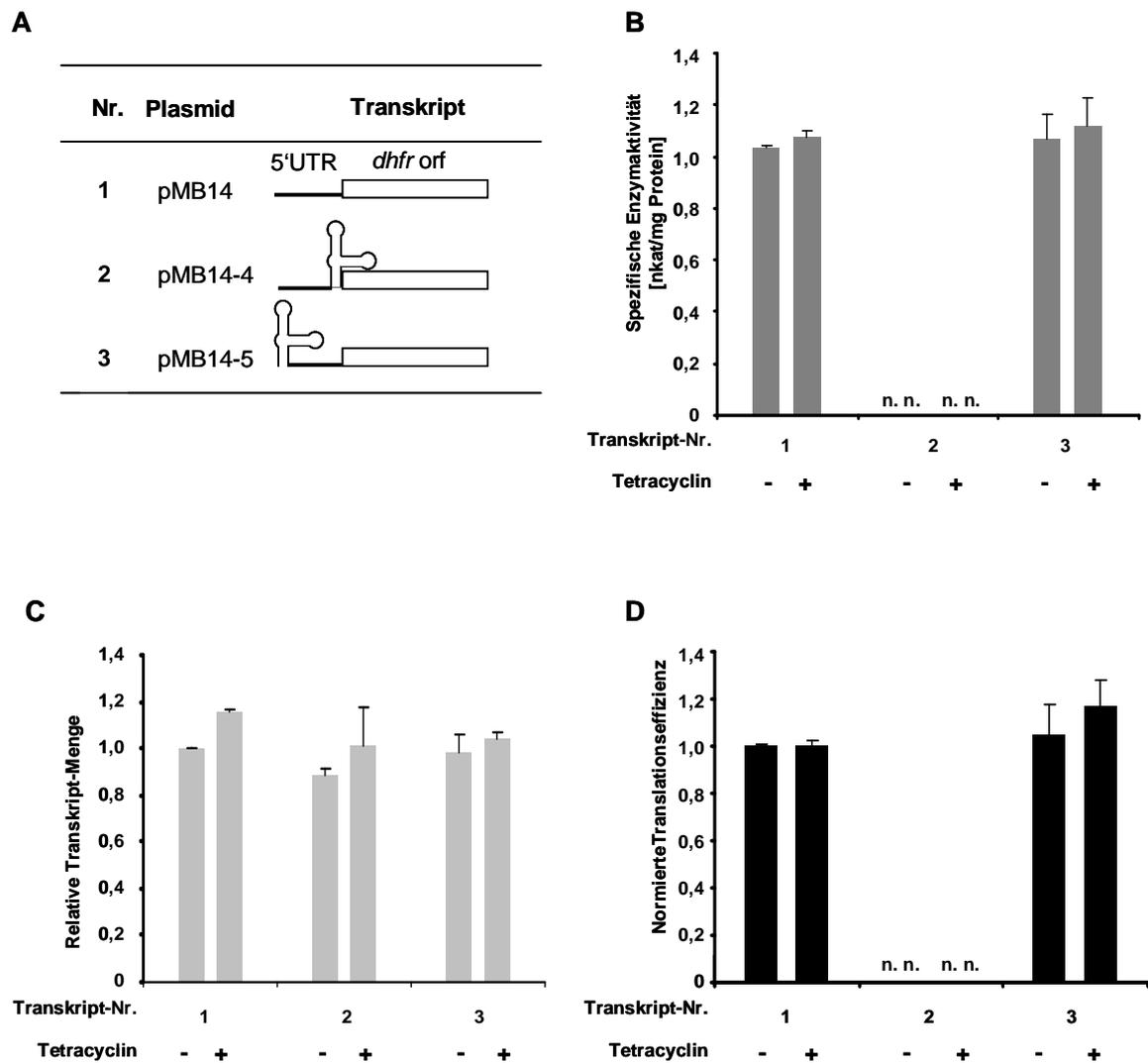


Abbildung 19: Einfluss der Position von Sekundärstrukturen der 5'-UTR auf die Translationseffizienz

Insertion eines Tetracyclin-Aptamers an verschiedenen Positionen einer 5'-UTR mit zufälliger Sequenz (Nr.1 in Tabelle 8). Die modifizierten 5'-UTRs wurden an das *dhfr*-Reportergen fusioniert. Die Translationseffizienzen wurden für Zellen aus der exponentiellen Wachstumsphase (2×10^8 Zellen/ml) kalkuliert. **(A)** Das *dhfr*-Reportergen und die Genfusionen mit den verschiedenen 5'-UTR-Varianten sind schematisch gezeigt. Als Kontrolltranskript diente das Reportergen mit artifizierlicher 5'-UTR. **(B)** Spezifische Enzymaktivitäten. Drei unabhängige biologische Replikate wurden durchgeführt und die Mittelwerte mit Standardabweichungen berechnet. **(C)** Relative mRNA-Mengen. Drei unabhängige biologische Replikate wurden durchgeführt, die Mittelwerte mit Standardabweichungen berechnet und auf das Kontrollplasmid pMB1 normiert. **(D)** Translationseffizienz nach Normierung auf das Kontrollplasmid pMB1. Die Translationseffizienzen wurden durch das Dividieren der DHFR-Aktivitäten durch die Transkript-Menge kalkuliert. n.n. nicht nachweisbar.

Als Kontrollvariante diente das *dhfr*-Reportergen mit artifizieller 5'-UTR ohne Aptamer (Nr. 1 in Abbildung 19).

Die Insertion des Aptamers an verschiedene Positionen innerhalb der 5'-UTR, sowie die Applikation von Tetracyclin hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Transkriptstabilität. In keinem Fall konnte eine Tetracyclin-abhängige Reduktion der Translationseffizienz beobachtet werden. Die Ergebnisse implizieren, dass unter Hochsalzbedingungen die gefaltete Sekundärstruktur des Aptamers trotz Abwesenheit von Tetracyclin bereits vorhanden und stabil genug ist, die Translation zu verhindern. Eine Insertion des Tetracyclin-abhängigen Aptamers an das 5'-Ende der 5'-UTR hatte keinen Einfluss auf die Translationseffizienz verglichen mit dem Kontrolltranskript. Die Insertion des Aptamers nahe des Translationsstarts bewirkte eine dramatische Reduktion der Translationseffizienz. Diese Entdeckung lässt den Schluss zu, dass die Translation bei Transkripten mit 5'-UTR und ohne SD-Sequenz nicht durch einen *Scanning*-Mechanismus wie bei Eukaryoten initiiert wird. Die Ergebnisse zeigen, dass die Initiation der Translation bei Transkripten mit 5'-UTR und ohne SD-Sequenz durch eine direkte Anlagerung des Ribosoms an das Startkodon initiiert wird.

7. Regulation der Translation in *H. volcanii*

In einer aktuellen globalen Analyse zur Regulation der Translation konnte gezeigt werden, dass die Regulation der Translation eine wichtige Rolle für die Regulation der Genexpression in Haloarchaea spielt. Der Anteil der differentiell translatierten Gene in Haloarchaea ist genauso groß wie in Eukaryoten (Lange *et al.*, 2007).

Die mRNA spezifische Regulation der Translation bei Eu- und Prokaryoten beruht meist auf Regulator-Proteinen oder kleinen nicht kodierenden RNAs, die an die UTRs binden (Chu & Rana, 2007; Wallander *et al.*, 2006). Für Archaea ist über die Funktion der UTRs bei der Regulation der Translation bisher noch nichts bekannt.

Im Folgenden sollten die Funktionen haloarchaealer UTRs bei der Translationskontrolle untersucht werden. Dazu wurden willkürlich zwei Gene

ausgewählt, die in der globalen Analyse zur Wachstumsphasen-abhängigen Regulation der Translation (Lange *et al.*, 2007) als translationsreguliert identifiziert wurden (Abbildung 20). Die Translation des „*conserved hypothetical protein*“ (*hp*) Transkripts (Nr. 3 in Tabelle 7) ist in der exponentiellen Wachstumsphase von *H. volcanii* induziert, während das „*hoxA like transcriptional regulator*“ (*hlr*) Transkript (Nr. 2 in Tabelle 7) verstärkt in der stationären Wachstumsphase translatiert wird (Abbildung 20C).

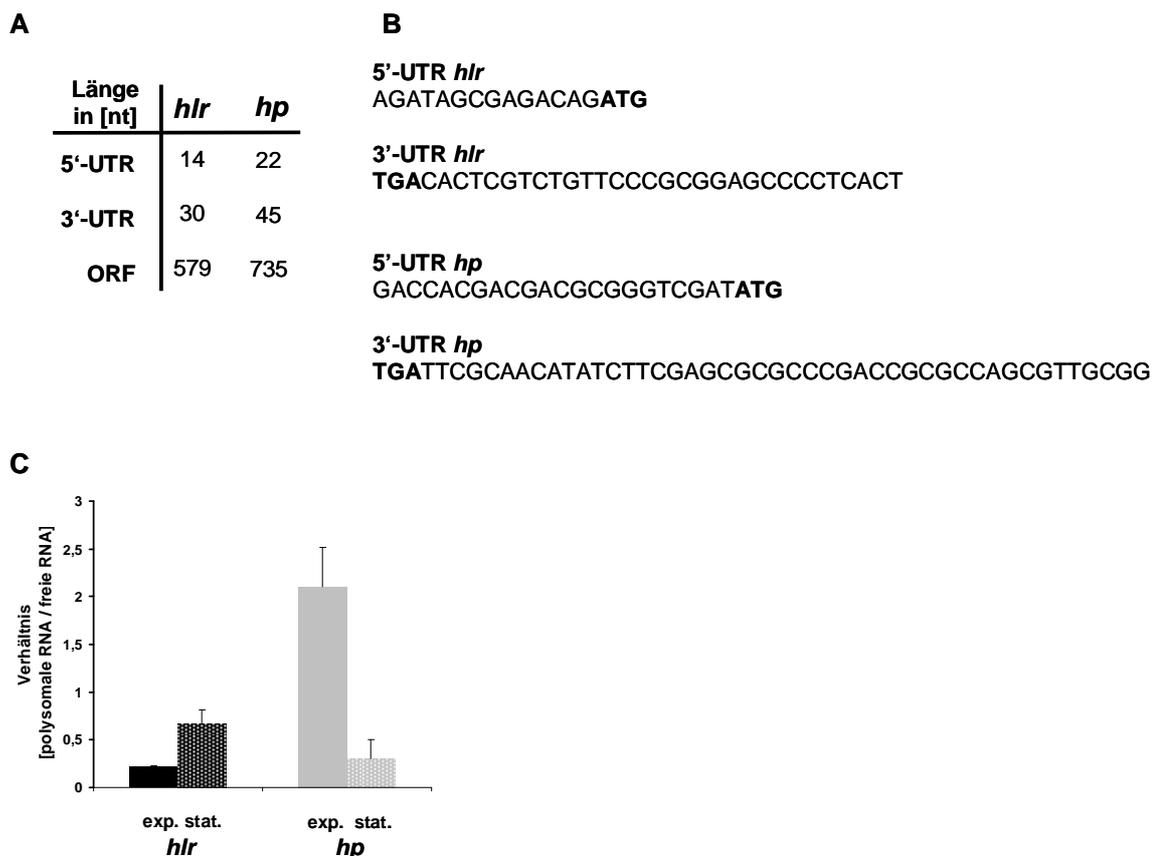


Abbildung 20: Differenziell translatierte Gene in *H. volcanii*

Dargestellt sind die Wachstumsphasen-abhängig differenziell translatierten Gene *hlr* und *hp* (Nr. 2 und Nr. 3 aus Tabelle 7) von *H. volcanii*. Die Gene wurden in einer globalen Analyse als translationskontrolliert identifiziert (Lange *et al.*, 2007). **(A)** Tabellarische Darstellung der UTR- und ORF-Längen der Gene *hlr* und *hp*. **(B)** Sequenzen der 5'- und 3'-UTR der Transkripte *hlr* und *hp*. Start- bzw. Stopkodons sind fett gedruckt. **(C)** Microarray-Analyse der Wachstumsphasen-abhängigen Regulation der Translation der Gene *hlr* und *hp*. Dargestellt ist das Verhältnis von Polysomen-gebundener zu freier RNA in der exponentiellen (exp.) und stationären (stat.) Wachstumsphase von *H. volcanii* (Lange *et al.*, 2007).

7.1 5'-UTR und 3'-UTR sind notwendig und hinreichend für die Regulation der Translation in *H. volcanii*

Um die Funktion von UTRs bei der Wachstumsphasen-abhängigen Regulation der Translation in *H. volcanii* zu untersuchen, wurden die 5'-UTRs und 3'-UTRs

des *hlr* und des *hp* sowohl separat, als auch gemeinsam an das *dhfr*-Reporterergen fusioniert (Abbildung 21A).

Die Konstruktion der Plasmide pMB5 und pMB8 erfolgte ähnlich wie pMB7 (Kapitel 6.2 der Ergebnisse). Es wurden drei separate PCR-Fragmente generiert, welche das Promotor-Fragment, den *dhfr*-ORF und die 3'-UTR enthielten. Die drei Fragmente wurden durch zwei aufeinanderfolgende Fusions-PCRs und überlappende Bereiche zusammengefügt. Die 5'-UTRs waren Teil des Oligonukleotids, das zur Amplifikation der Promotor-Region diente. Zellen aus der exponentiellen (2×10^8 Zellen/ml) und stationären Wachstumsphase (2×10^9 Zellen/ml) wurden geerntet und die Translationseffizienzen kalkuliert (Abbildung 21).

Für beide Gene konnte gezeigt werden, dass die Fusion der 5'-UTR keinen Einfluss auf die Transkriptstabilität hatte, die Translationseffizienz aber um den Faktor zwei herabsetzte (Nr. 2 und Nr. 5 in Abbildung 21C-D). Die Fusion der 3'-UTRs führte zu einer verstärkten Stabilität des Reporterergen-Transkripts, hatte aber keinen Einfluss auf die Effizienz der Translation. In keinem Fall konnte eine Wachstumsphasen-abhängige Regulation der Translation nachgewiesen werden. Die Fusion von beiden, 5'- und 3'-UTR, an das Reporterergen bewirkte eine Wachstumsphasen-abhängige Regulation der Translation. Das *hlr*-Transkript zeigte in der stationären Wachstumsphase eine um den Faktor zwei verstärkte Translationseffizienz. Die Translation des *hp*-Transkripts war in der exponentiellen Wachstumsphase fünffach induziert. Mit diesen Daten konnte erstmals für Prokaryoten gezeigt werden, dass die Interaktion von 5'- und 3'-UTR für die Wachstumsphasen-abhängige Regulation der Translation in *H. volcanii* notwendig und ausreichend ist. Ähnliche Ergebnisse konnten für Eukaryoten bereits bestätigt werden (de Moor *et al.*, 2005; Sonenberg, 1994; Wilkie *et al.*, 2003).

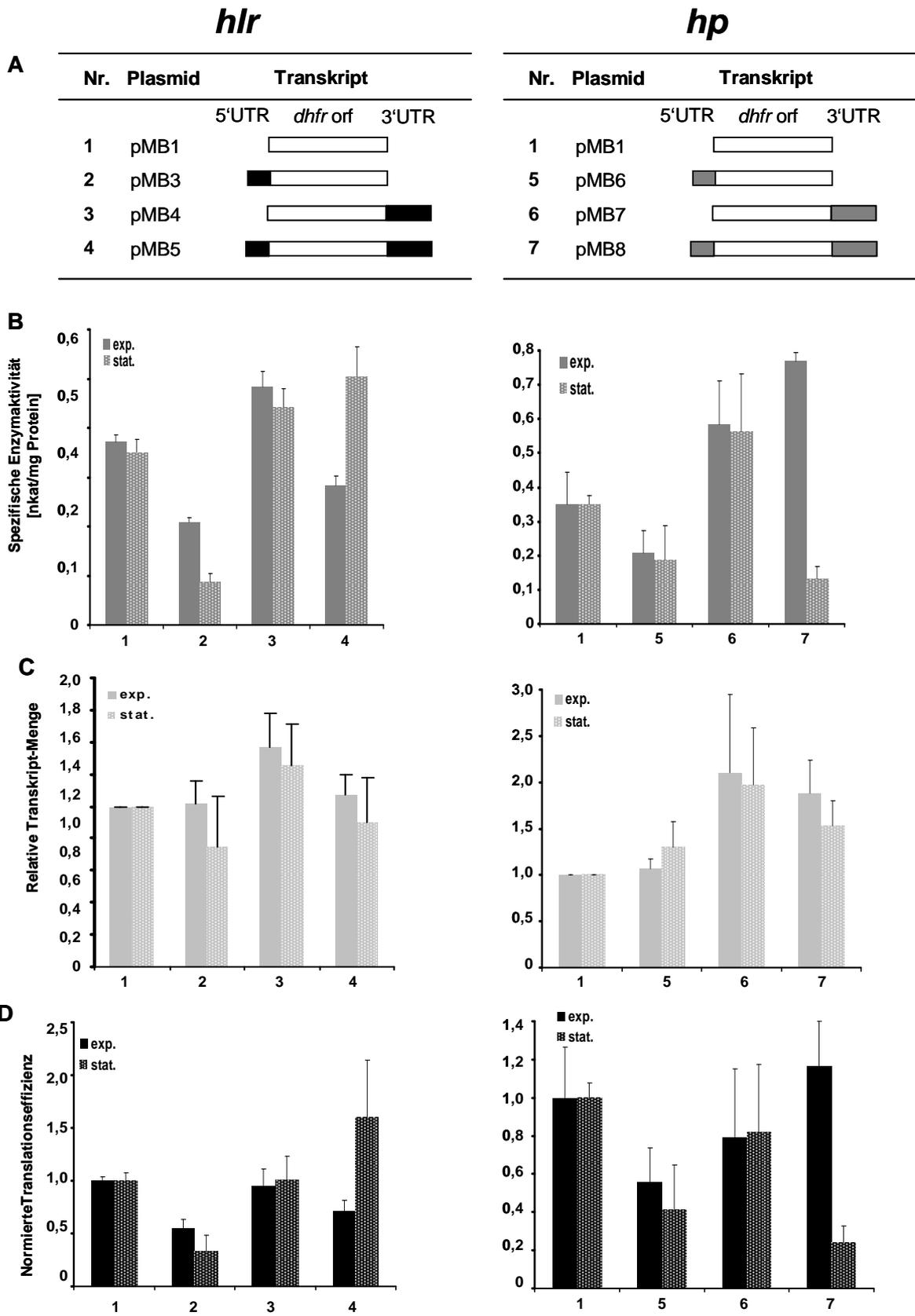


Abbildung 21: Wachstumsphasen-abhängige Regulation der Translation in *H. volcanii*

Die 5'-UTRs und 3'-UTRs des „hoxA like transcriptional regulator“ (*hlr*) und des „conserved hypothetical protein“ (*hp*) wurden separat oder kombiniert an das *dhfr*-Reporter gen fusioniert. Die Translationseffizienzen wurden für Zellen aus der exponentiellen (exp., 2×10^8 Zellen/ml) und stationären (stat., 2×10^9 Zellen/ml) Wachstumsphase kalkuliert. **(A)** Das *dhfr*-Reporter gen und die Genfusionen mit den verschiedenen UTR-Varianten sind schematisch gezeigt. Als Kontrolltranskript diente das Reporter gen ohne UTRs. **(B)** Spezifische Enzymaktivitäten. Drei unabhängige biologische Replikate wurden durchgeführt und die Mittelwerte mit Standardabweichungen berechnet. **(C)** Relative mRNA-Mengen. Drei unabhängige biologische Replikate wurden durchgeführt, die Mittelwerte mit Standardabweichungen berechnet und auf das Kontrollplasmid pMB1 normiert. **(D)** Translationseffizienz nach Normierung auf das Kontrollplasmid pMB1. Die Translationseffizienzen wurden durch das Dividieren der DHFR-Aktivitäten durch die Transkript-Menge kalkuliert.

7.2 Die 3'-UTRs bestimmen die Richtung der Wachstumsphasen-abhängigen Regulation der Translation

Um die Funktion der UTRs im Rahmen der Wachstumsphasen-abhängigen Regulation der Translation präziser zu definieren, wurden 5'- und 3'-UTR des *hlr*- und *hp*-Gens gegeneinander ausgetauscht. Die Konstruktion der Plasmide pMB22 und pMB23 (Nr. 3 und Nr. 4 in Abbildung 22) erfolgte ähnlich zu pMB5 und pMB8 aus Kapitel 6.2 der Ergebnisse. Zellen aus der exponentiellen (2×10^8 Zellen/ml) und stationären Wachstumsphase (2×10^9 Zellen/ml) wurden geerntet und die Translationseffizienzen kalkuliert (Abbildung 22).

Die Fusion der nativen 5'-UTR und der nativen 3'-UTR des *hlr*-Transkripts an das Reporter gen resultierte in eine Wachstumsphasen-abhängige Regulation der Translation (Nr. 2 in Abbildung 22D). Ein Austausch der 5'-UTR des *hlr*-Transkripts gegen die 5'-UTR des *hp*-Transkripts erhielt die Wachstumsphasen-abhängige Regulation der Translation (Nr. 3 in Abbildung 22D). Der Austausch der 3'-UTR des *hlr*-Transkripts gegen die 3'-UTR des *hp*-Transkripts dagegen änderte die Richtung der Translationsregulation (Nr. 4 in Abbildung 22D). Dieselbe Richtung der Wachstumsphasen-abhängigen Regulation der Translation zeigte die Reporter gen-Fusion mit der nativen 5'- und 3'-UTR des *hp*-Transkripts. Diese Ergebnisse zeigen, dass die 3'-UTR verantwortlich für die Richtung der Translationsregulation ist. Möglicherweise kodieren die 3'-UTRs für Bindestellen regulatorischer Proteine, die für die Regulation der Translation verantwortlich sind.

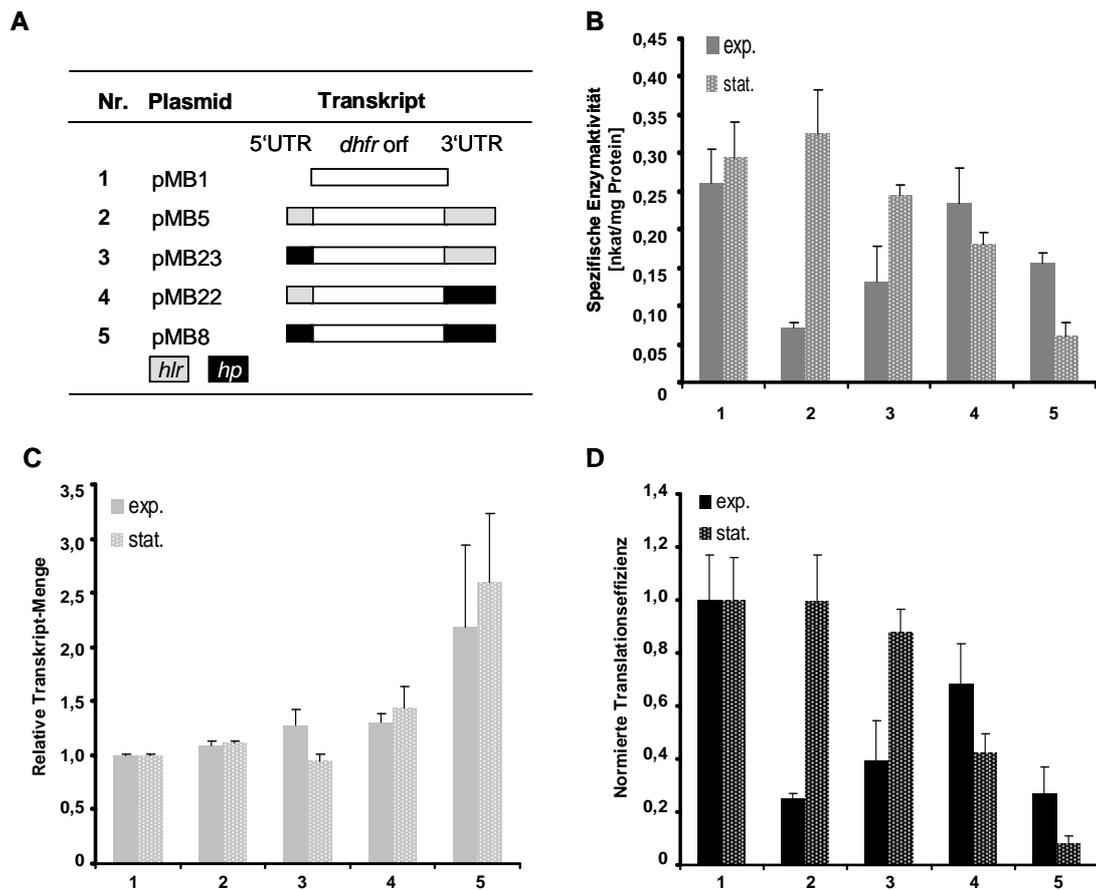


Abbildung 22: Die 3'UTRs bestimmen die Richtung der Translation in *H. volcanii*

Die 5'-UTRs und 3'-UTRs des „*hoxA* like transcriptional regulator“ (*hlr*) und des „conserved hypothetical protein“ (*hp*) wurden kombiniert an das *dhfr*-Reporter gen fusioniert. Die Translationseffizienzen wurden für Zellen aus der exponentiellen (exp., 2×10^8 Zellen/ml) und stationären (stat., 2×10^9 Zellen/ml) Wachstumsphase kalkuliert. **(A)** Das *dhfr*-Reporter gen und die Genfusionen mit den verschiedenen UTR-Varianten sind schematisch gezeigt. Als Kontrolltranskript diente das Reporter gen ohne UTRs. **(B)** Spezifische Enzymaktivitäten. Drei unabhängige biologische Replikate wurden durchgeführt und die Mittelwerte mit Standardabweichungen berechnet. **(C)** Relative mRNA-Mengen. Drei unabhängige biologische Replikate wurden durchgeführt, die Mittelwerte mit Standardabweichungen berechnet und auf das Kontrollplasmid pMB1 normiert. **(D)** Translationseffizienz nach Normierung auf das Kontrollplasmid pMB1. Die Translationseffizienzen wurden durch das Dividieren der DHFR-Aktivitäten durch die Transkript-Menge kalkuliert.

7.3 Einfluss der 3'-UTRs auf die Wachstumsphasen-abhängige Regulation der Translation

Um zu prüfen, ob die 3'-UTRs des *hp*- und des *hlr*-Transkripts putative cis-regulatorische Elemente enthalten, wurden *in silico* vorhergesagte Strukturen innerhalb der 3'-UTRs durch Mutagenese zerstört (Abbildung 23).

A

***hlp*-mRNA, native 3'UTR**

UGACACUCGUCUGUUCCCGCGGAGCCCCUCA

***hlp*-mRNA, mutierte 3'UTR**

UGACACUCCAAUAAGAACCGCGGAGCCCCUCA

***hp*-mRNA, native 3'UTR**

UGAUUCGCAACAUAUCUUCGAGCGCGCC - 40 nt

***hp*-mRNA, mutierte 3'UTR**

UGAUUCGCAACAUAUCUUCCUAAUUACC - 20 nt

B

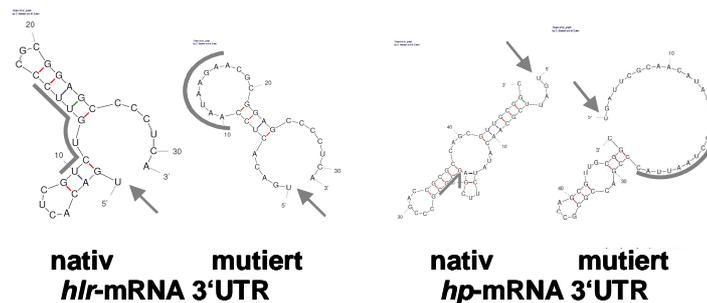


Abbildung 23: *In vitro* Mutagenese von nativen 3'-UTRs aus *H. volcanii*

(A) Nukleotidsequenzen der nativen und mutierten 3'-UTR des *hlr*-Gens (Nr. 2 aus Tabelle 7) und des *hp*-Gens (Nr. 3 aus Tabelle 7) aus *H. volcanii*. Mutierte Nucleotide sind unterstrichen und in grau dargestellt. (B) *In silico* Strukturanalysen der nativen und mutierten 3'-UTRs. Das Stopkodon ist durch einen Pfeil markiert. Veränderte Regionen sind durch einen grauen Balken hinterlegt. Die Strukturanalysen wurden mit dem Programm „mfold 3.2“ (Mathews *et al.*, 1999; Zuker, 2003) durchgeführt.

Die Konstruktion der Plasmide pMB20 und pMB21 aus Abbildung 24A erfolgte wie die Konstruktion von pMB5 und pMB8 aus Kapitel 6.2 der Ergebnisse. Die Transkripte enthalten jeweils die native 5'-UTR des *hlr*- bzw. *hp*-Gens in Kombination mit der mutierten 3'-UTR aus Abbildung 23. Zellen aus der exponentiellen (2×10^8 Zellen/ml) und stationären (2×10^9 Zellen/ml) Wachstumsphase wurden geerntet und die Translationseffizienzen analog zu Kapitel 6.2 bestimmt der Ergebnisse (Abbildung 24).

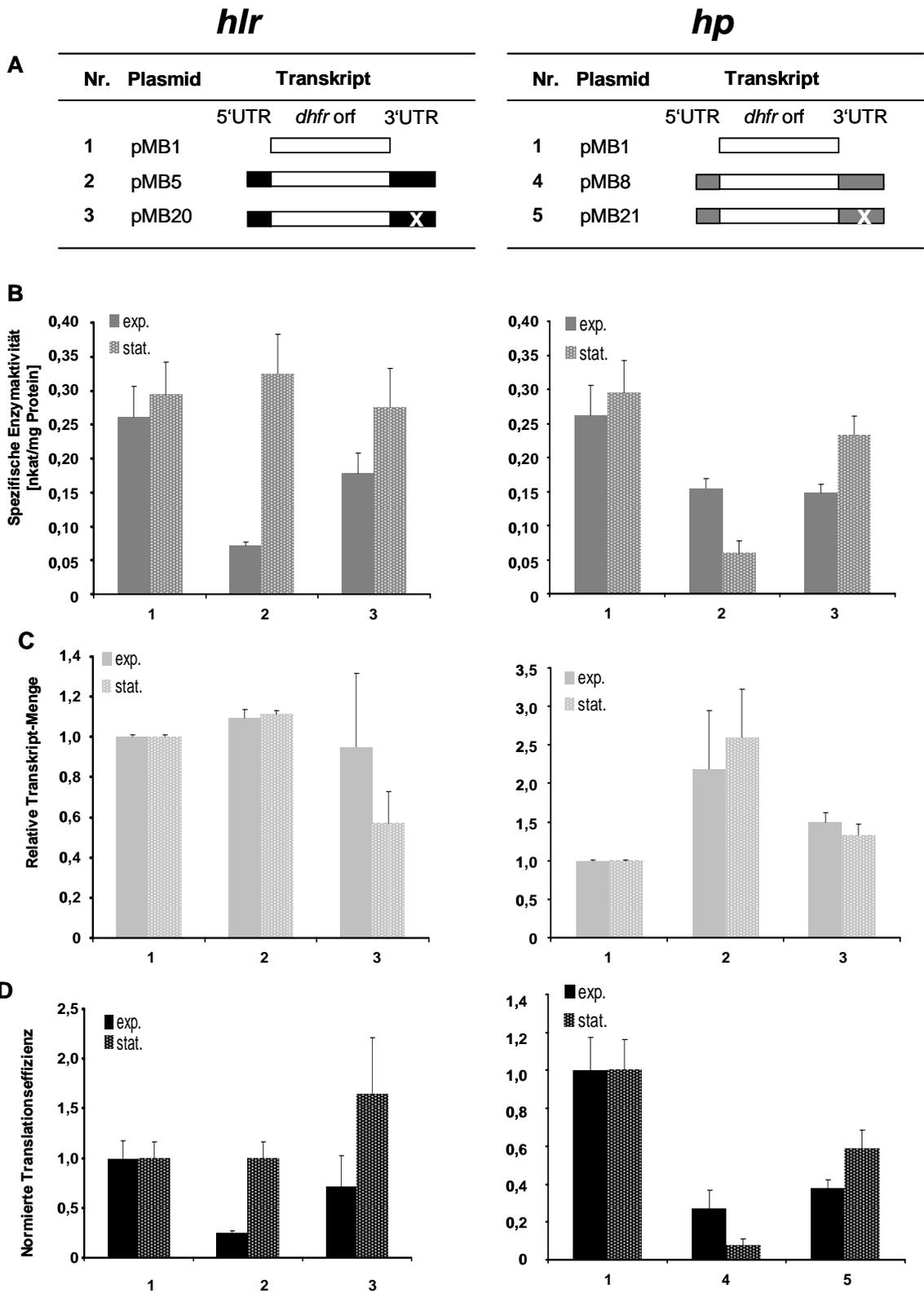


Abbildung 24: Die Struktur der 3'-UTRs ist essentiell für die Regulation der Translation in *H. volcanii*

Die 3'-UTRs des „hoxA like transcriptional regulator“ (*hlr*) und des „conserved hypothetical protein“ (*hp*) wurden mutiert und an das *dhfr*-Reporter gen fusioniert. Die Translationseffizienzen wurden für Zellen aus der exponentiellen (exp., 2×10^8 Zellen/ml) und stationären (stat., 2×10^9 Zellen/ml) Wachstumsphase kalkuliert. **(A)** Das *dhfr*-Reporter gen und die Genfusionen mit nativer und mutierter 3'-UTR sind schematisch gezeigt. Die Mutation in der 3'-UTR ist durch ein „x“ dargestellt. Als Kontrolltranskript diente das Reporter gen ohne UTRs. **(B)** Spezifische Enzymaktivitäten. Drei unabhängige biologische Replikate wurden durchgeführt und die Mittelwerte mit Standardabweichungen berechnet. **(C)** Relative mRNA-Mengen. Drei unabhängige biologische Replikate wurden durchgeführt, die Mittelwerte mit Standardabweichungen berechnet und auf das Kontrollplasmid pMB1 normiert. **(D)** Translationseffizienz nach Normierung auf das Kontrollplasmid pMB1. Die Translationseffizienzen wurden durch das Dividieren der DHFR-Aktivitäten durch die Transkript-Menge kalkuliert.

Die Fusion der mutierten 3'-UTR des *hlr*-Gens hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Transkriptstabilität im Vergleich zur nativen 3'-UTR (Abbildung 24C). Im Gegensatz dazu setzte die Fusion der mutierten 3'-UTR des *hp*-Gens die Transkriptstabilität im Vergleich zur nativen Variante um den Faktor 1,5 herab.

Für das *hlr* Transkript wurde durch die Mutagenese putativer Sekundärstrukturen in der 3'-UTR der Regulationsgrad der Translation herabgesetzt (Abbildung 24D). Für das *hp*-Transkript konnte durch die Mutagenese putativer Sekundärstrukturen in der 3'-UTR die Regulation der Translation vollständig aufgehoben werden (Abbildung 24D). Diese Ergebnisse bekräftigen die These von trans-agierenden Regulatoren, die an cis-regulatorische Sequenzen in der 3'-UTR binden und durch ihre Interaktion mit der RNA eine Regulation der Translation hervorrufen.

7.4 Einfluss der 5'-UTR auf die Wachstumsphasen-abhängige Regulation der Translation in *H. volcanii*

Um die Rolle der 5'-UTRs bei der Regulation der Translation zu charakterisieren, wurde eine *in silico* vorhergesagte Haarnadelstruktur der 5'-UTR des „conserved hypothetical protein“ (*hp*; Nr. 3 in Tabelle 7) durch Mutagenese stabilisiert und destabilisiert (Abbildung 16). Die native und die mutierten 5'-UTRs wurden separat (Nr. 2-4 in Abbildung 25A) oder in Kombination mit der nativen 3'-UTR des *hp*-Transkripts (Nr. 5-7 in Abbildung 25A) an das *dhfr*-Reporter gen fusioniert. Die Konstruktion der Plasmide pMB24 und pMB25 (Nr. 5 und Nr. 7 in Abbildung 25) erfolgte ähnlich zu pMB8 aus Kapitel 6.2 der Ergebnisse.

Zellen aus der exponentiellen (2×10^8 Zellen/ml) und stationären Wachstumsphase (2×10^9 Zellen/ml) wurden geerntet und die Translationseffizienzen wie in Kapitel 6.2 der Ergebnisse kalkuliert (Abbildung 25).

Bei Fusionen der stabilisierten Haarnadelstruktur separat an das Reportergeren konnte keine mRNA nachgewiesen werden (Nr. 2 in Abbildung 25C, siehe auch Kapitel 6.4). Fusionen der stabilisierten und nativen 5'-UTR in Kombination mit der nativen 3'-UTR des *hp*-Gens verstärkten die Transkriptstabilität im Vergleich zur Kontrollvariante um den Faktor 1,6 (Nr.5 in Abbildung 25C) bzw. 2,2 (Nr. 6 in Abbildung 25C). Die Stabilisierung der *in silico* vorhergesagten 5'-UTR des *hp*-Gens in Kombination mit der nativen 3'-UTR resultierte in eine vollständigen Inhibierung der Translation (Nr. 5 in Abbildung 25D). Die Destabilisierung der 5'-UTR in Kombination mit der 3'-UTR hingegen führte zu einer um den Faktor 1,5 verstärkten Translation (Nr. 4 in Abbildung 25D) verglichen zur Variante mit nativer 5'-UTR.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine Mutation der 5'-UTR in allen Fällen zu einem Verlust der Wachstumsphasen-abhängigen Regulation der Translation führte. Nur in Anwesenheit der nativen 5'- und 3'-UTR des *hp*-Transkripts konnte eine Wachstumsphasen-abhängige Regulation der Translation nachgewiesen werden (Nr. 6 in Abbildung 25D).

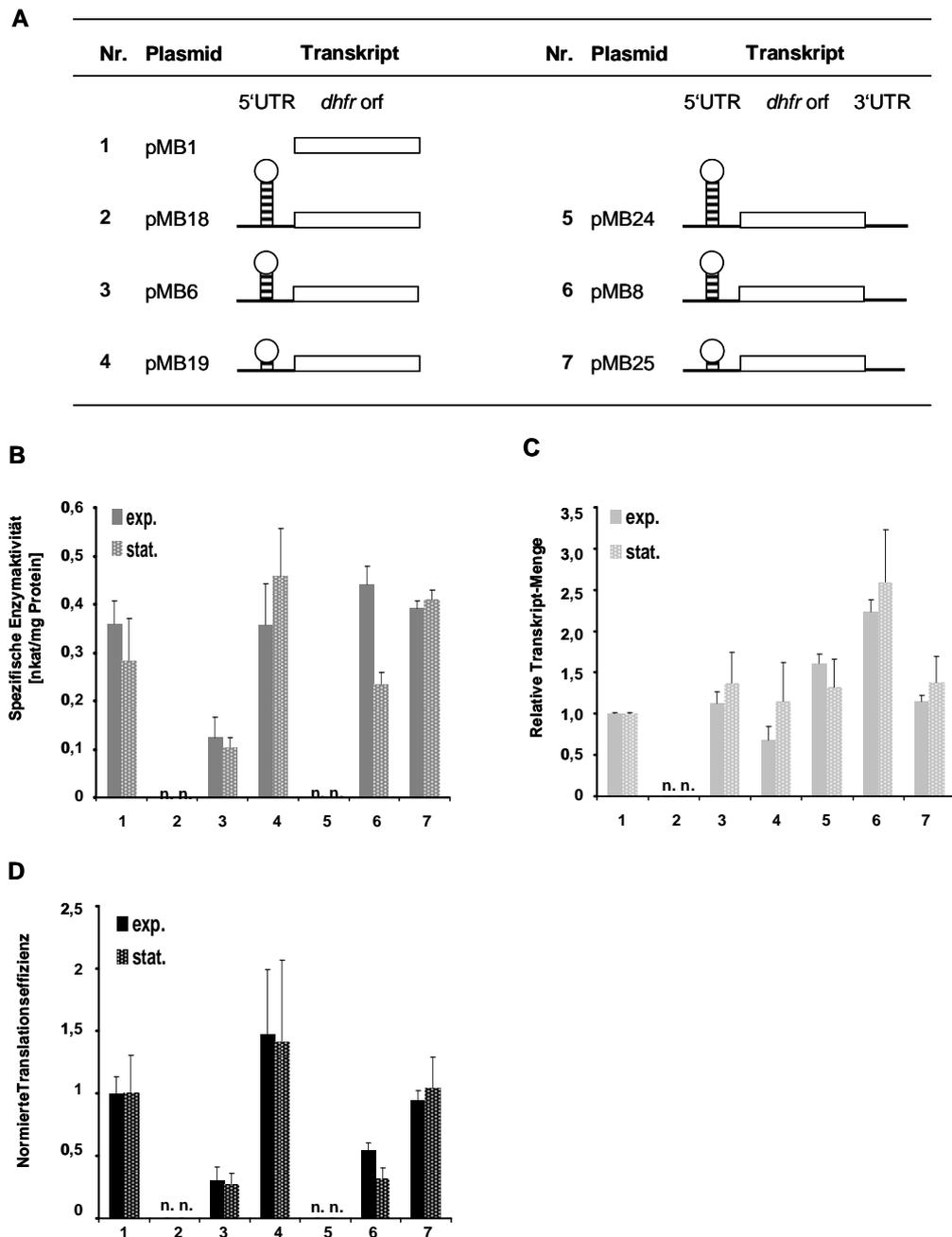


Abbildung 25: Die Struktur der 5'-UTRs ist essentiell für die Regulation der Translation in *H. volcanii*

Spezifische Strukturelemente einer nativen 5'-UTR aus *H. volcanii* (Nr.3 in Tabelle 7) wurden stabilisiert und destabilisiert und separat oder in Kombination mit der nativen 3'-UTR an das *dhfr*-Reportergen fusioniert. Die Translationseffizienzen wurden für Zellen aus der exponentiellen (exp.; 2×10^8 Zellen/ml) und stationären (stat.; 2×10^9 Zellen/ml) Wachstumsphase kalkuliert. **(A)** Das *dhfr*-Reportergen und die Genfusionen mit nativer und mutierter 5'-UTR sind schematisch gezeigt. Als Kontrolltranskript diente das Reportergen ohne UTRs. **(B)** Spezifische Enzymaktivitäten. Drei unabhängige biologische Replikate wurden durchgeführt und die Mittelwerte mit Standardabweichungen berechnet. **(C)** Relative mRNA-Mengen. Drei unabhängige biologische Replikate wurden durchgeführt, die Mittelwerte mit Standardabweichungen berechnet und auf das Kontrollplasmid pMB1 normiert. **(D)** Translationseffizienz nach Normierung auf das Kontrollplasmid pMB1. Die Translationseffizienzen wurden durch das Dividieren der DHFR-Aktivitäten durch die Transkript-Menge kalkuliert. n.n. nicht nachweisbar.

8. Ansätze zur konditionalen Genexpression in *H. volcanii*

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in *H. volcanii* die Struktur der 5'-UTR einen entscheidenden Einfluss auf die Effizienz der Translationsinitiation hat (Kapitel 6 der Ergebnisse). Dies kann als Werkzeug zur kontrollierten konditionalen Genexpression in *H. volcanii* genutzt werden.

Die AG Süß (Institut für Molekulare Biowissenschaften, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt) hat erfolgreich ein artifizielles Aptamer für Hefe entwickelt, das hocheffizient Tetracyclin-abhängig die Translation reprimiert (Hanson *et al.*, 2003; Hanson *et al.*, 2005; Muller *et al.*, 2006; Suess *et al.*, 2003; Weigand & Suess, 2007). Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Anwendbarkeit dieses Aptamers zur konditionalen Genexpression mit Hilfe des in Kapitel 6 der Ergebnisse beschriebenen Reporter-Gen-Systems in *H. volcanii* getestet werden.

Als Alternative sollte die Regulation der Genexpression über allosterische Ribozyme in *H. volcanii* untersucht werden. Dazu wurde zunächst die Anwendbarkeit des selbstspaltenden *Hammerhead*-Ribozyms (Link *et al.*, 2007) in *H. volcanii* analysiert.

8.1 Anwendung eines Tetracyclin-induzierbaren Aptamers zur konditionalen Genexpression in *H. volcanii*

In Kapitel 6.5 der Ergebnisse konnte bereits gezeigt werden, dass die Applikation von Tetracyclin im μM Bereich keinen Einfluss auf die Überlebensrate von *H. volcanii* (Abbildung 18) hat. Im Folgenden wurde zunächst ein artifizielles Tetracyclin-abhängiges Aptamer direkt stromaufwärts an den ORF des *dhfr*-Reporter-Genes gefügt.

Planung und Konstruktion der Plasmide wurden freundlicherweise von Julia Weigand und Jürgen Beer aus der AG Süß, Institut für Molekulare Biowissenschaften, Universität Frankfurt, durchgeführt. Zur Generierung der *dhfr*-Aptamer Fusion wurden zunächst die Promotor-Region, das Aptamer und das *dhfr*-Reporter-Gen separat amplifiziert und anschließend über homologe Regionen in zwei aufeinander folgenden PCR-Reaktionen fusioniert. Als DNA-Vorlage für die Promotor-Region und das *dhfr*-Reporter-Gen diente das im Rahmen dieser Arbeit beschriebene Plasmid pMB1. Als Vorlage für die Amplifikation des

Aptamers diente das Plasmid pWHE601-AN32SH. Vor das ATG-Startkodon des *dhfr*-Reportergens wurden zusätzlich drei Adenosinnukleotide eingefügt. Diese entsprechen einer optimierten Kozaksequenz für *S. cerevisiae*. Die Adenosinnukleotide waren Teil des stromabwärts gelegenen Oligonukleotids, das zur Amplifikation des Aptamers diente. Das Fragment wurde über die Schnittstellen *Xho*I und *Acc*65I in den Vektor pMB1 integriert und in *E. coli* DH5 α vervielfältigt. Anschließend wurde *H. volcanii* WR340 mit den Reportergen-Plasmiden transformiert. Zellen wurden in An- und Abwesenheit von 250 μ M Tetracyclin inkubiert, in der exponentiellen Wachstumsphase (2×10^8 Zellen/ml) geerntet, und die Translationseffizienzen kalkuliert (Abbildung 26). Als Kontrollvariante diente das *dhfr*-Reportergen ohne 5'- und 3'-UTR (Nr. 1 in Abbildung 26).

Die Fusion des Aptamers erhöhte die Transkriptstabilität um den Faktor 1,5 (Nr. 2 in Abbildung 26C). Die Applikation von Tetracyclin hingegen hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Transkript-Halbwertszeit. Auf die Translationseffizienzen sowohl der Kontrollvariante als auch der Aptamerfusionen hatte die Applikation von Tetracyclin ebenfalls keinen Einfluss (Abbildung 26D). Die Ergebnisse implizieren, dass unter Hochsalzbedingungen die gefaltete Sekundärstruktur des Aptamers trotz Abwesenheit von Tetracyclin bereits vorhanden ist, da keine Enzymaktivität für die Aptamerfusionen nachgewiesen werden konnte (Nr.2 in Abbildung 26B). Somit wurde gezeigt, dass die Initiation der Translation bei Transkripten ohne 5'-UTR durch das Anfügen einer starken Sekundärstruktur direkt stromaufwärts des Translationsstartes verhindert werden kann.

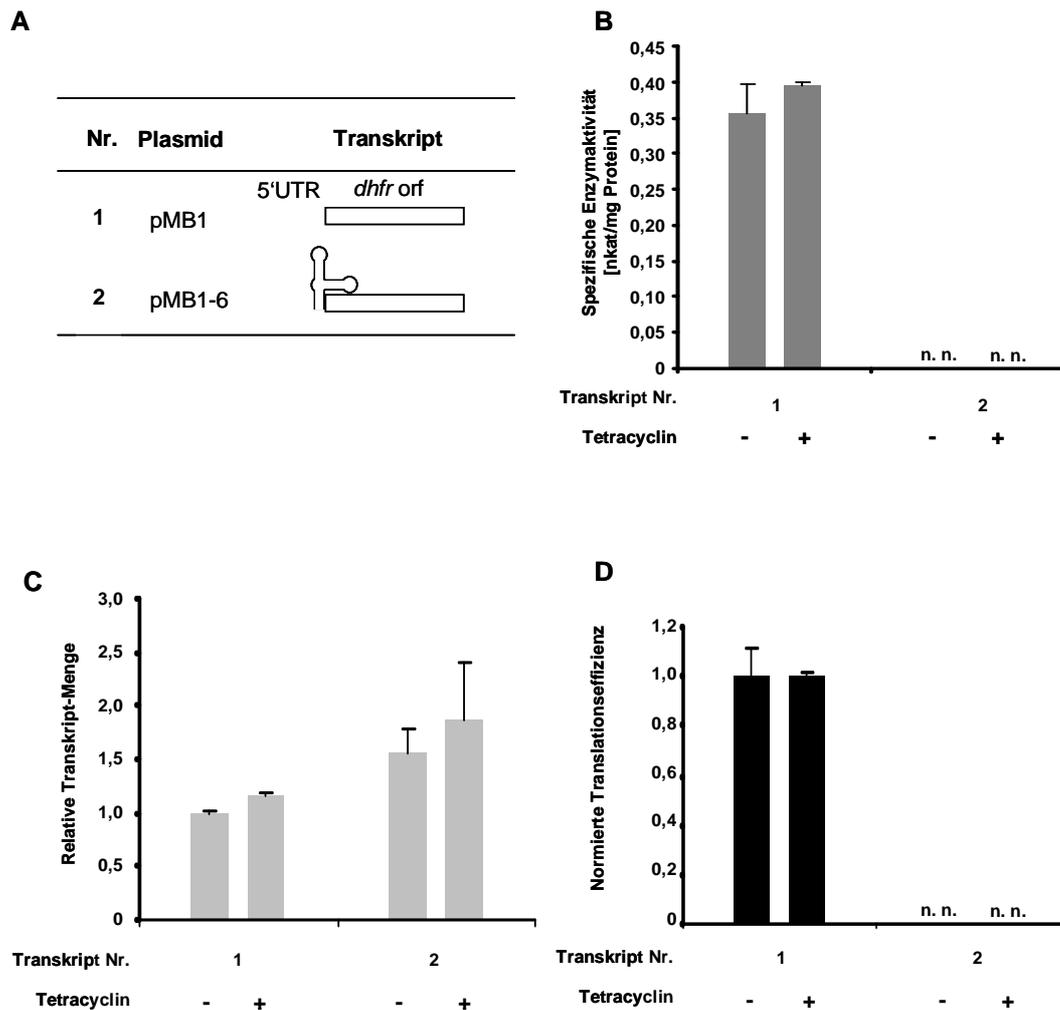


Abbildung 26: Anwendung eines artifiziellen Tetracyclin-induzierbaren Aptamers in *H. volcanii*

Insertion eines Tetracyclin-induzierbaren Aptamers vor den ORF des *dhfr*-Reportergens. **(A)** Das *dhfr*-Reportergen und die Aptamer-Genfusion sind schematisch gezeigt. Als Kontrolltranskript diene das Reportergen ohne UTRs. Die Translationseffizienzen wurden für Zellen aus der exponentiellen Wachstumsphase (2×10^8 Zellen/ml) kalkuliert. **(B)** Spezifische Enzymaktivitäten. Drei unabhängige biologische Replikate wurden durchgeführt und die Mittelwerte mit Standardabweichungen berechnet. **(C)** Relative mRNA-Mengen. Drei unabhängige biologische Replikate wurden durchgeführt, die Mittelwerte mit Standardabweichungen berechnet und auf das Kontrollplasmid pMB1 normiert. **(D)** Translationseffizienz nach Normierung auf das Kontrollplasmid pMB1. Die Translationseffizienzen wurden durch das Dividieren der DHFR-Aktivitäten durch die Transkript-Menge kalkuliert.

Für weitere Experimente wurde das hier beschriebene Aptamer an verschiedenen Positionen in eine 5'-UTR mit zufälliger Sequenz inseriert (Abbildung 19 Kapitel 6.5).

Allerdings konnte wieder in keinem Fall eine Tetracyclin-abhängige Reduktion der Translationseffizienz beobachtet werden. Die Ergebnisse bestätigen die These,

dass unter Hochsalzbedingungen die gefaltete Sekundärstruktur des Aptamers trotz Abwesenheit von Tetracyclin bereits vorhanden und stabil genug ist, die Translation zu verhindern. Ein Einfluss der Position auf die Funktionalität des Aptamers konnte mit diesem Versuch gezeigt werden. Die Insertion des Aptamers nahe des Translationsstartes resultierte in einer vollständigen Inhibierung der Translation, während die Fusion des Aptamers an das 5'-Ende der 5'-UTR keinen Einfluss auf die Translationseffizienz verglichen mit dem Kontrolltranskript hat.

8.2 Anwendung eines autokatalytischen *Hammerhead*-Ribozyms in *H. volcanii*

Zur „exogen“ kontrollierten Genexpression können konditionale *Hammerhead*-Ribozyme eingesetzt werden. Ziel ist es, dabei die RNA durch die Insertion eines selbstspaltenden RNA-Motivs zu degradieren oder die Initiation der Translation durch das Vorhandensein einer stark ausgeprägten Sekundärstruktur zu verhindern (Ogawa & Maeda, 2008; Wieland & Hartig, 2008). Da bereits im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass die Sekundärstruktur der 5'-UTR die Effizienz der Translationsinitiation stark beeinflussen kann, wurde eine Strategie zur Blockierung der Initiation getestet.

Dazu wurde zunächst ein konstitutiv selbstspaltendes *Hammerhead*-Ribozym stromaufwärts an den ORF des *dhfr*-Reportergens fusioniert (Link *et al.*, 2007; Yen *et al.*, 2004). In den Stamm I des *Hammerhead*-Ribozyms wurde durch einen Basenaustausch (C→A) ein *in frame* Startkodon für das *dhfr*-Reportergen eingefügt (Abbildung 27). Es konnte bereits gezeigt werden, dass dieser Austausch keinen Einfluss auf die autokatalytische Aktivität des *Hammerhead*-Ribozyms hat (Tuschl *et al.*, 1995). Dadurch wurden drei zusätzliche Aminosäuren (Asp, Ser, Thr) an den N-Terminus des *dhfr*-Reportergens gefügt. Als Kontrolle diente eine Variante der *dhfr* mit den zusätzlichen o.g. Aminosäuren am N-Terminus und ohne *Hammerhead* im 5'-UTR. Als weitere Kontrolle wurde eine inaktive Variante des *Hammerhead*-Ribozyms generiert und an den ORF des *dhfr*-Reportergens fusioniert.

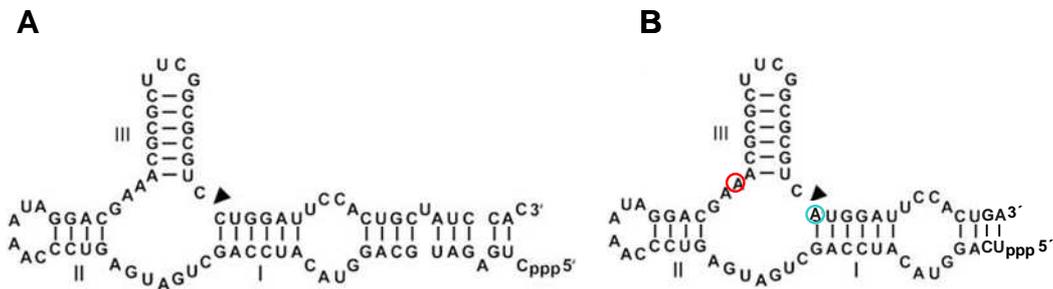


Abbildung 27: Hammerhead-Strukturen

Sequenz und Strukturmodell des *Hammerhead*-Ribozyms N79 aus *S. mansoni*. Die drei Stämme des *Hammerhead*-Ribozyms sind als I, II und III gekennzeichnet. Die Spaltstelle ist durch einen Pfeil markiert (Link *et al.*, 2007). **(A)** Ursprüngliches Ribozym N79 aus *S. mansoni* **(B)** Modifizierte *Hammerhead*-Variante. Der Basenaustausch (C→A) zur Generierung eines *in frame* Startkodons für das *dhfr*-Reportergen ist blau markiert. Das rot markierte Adenosinnukleotid ist bei der inaktiven *Hammerhead*-Variante gegen ein Guanosinnukleotid ausgetauscht und verhindert die Selbstspaltung des *Hammerhead*-Ribozyms.

Die Planung und Konstruktion der Plasmide wurde freundlicherweise von Julia Weigand und Jürgen Beer aus der AG Süß durchgeführt und zur Verfügung gestellt. Die Generierung der Reportergen-Plasmide erfolgte analog zu den Aptameren aus Kapitel 6.5 der Ergebnisse. Zur Generierung der *dhfr*-*Hammerhead*-Fusionen (Nr. 2 und Nr. 3 in Abbildung 28) wurden zunächst die Promotor-Region, das *Hammerhead* und das *dhfr*-Reportergen separat amplifiziert und anschließend über homologe Regionen in zwei aufeinander folgenden PCR-Reaktionen fusioniert. Als Vorlage für das aktive *Hammerhead*-Ribozym diente das Plasmid pWHE601-Actin+HH-aktiv. Als Vorlage für die inaktive *Hammerhead*-Variante diente das Plasmid pWHE601-Actin+HH-inaktiv. Dabei wurde nicht der komplette P1-Stamm, sondern nur 14 der ursprünglich 20 Nukleotide amplifiziert. Das Adenosinnukleotid zur Generierung eines Startkodons im Stamm des *Hammerhead*-Ribozyms wurde mit Hilfe des stromabwärts gelegenen Oligonukleotids eingefügt. Zur Konstruktion der Kontrollvariante pMB1* (Nr.1 in Abbildung 28) ohne *Hammerhead*-Ribozym und mit verlängertem N-Terminus des DHFR-Reporterenzyms wurde zunächst die Promotor-Region separat amplifiziert. Mit Hilfe des stromabwärts gelegenen Oligonukleotids wurde das native Startkodon der *dhfr* entfernt und die zusätzlichen Nukleotide mit Startkodon eingefügt. Das erzeugte Fragment diente in einer zweiten PCR-Reaktion als Oligonukleotid zur Amplifikation der *dhfr* aus

pMB1. Die Fusionsfragmente wurden über die Schnittstellen *XhoI* und *Acc65I* in den Vektor pMB1 integriert und in *E. coli* DH5 α vervielfältigt. Anschließend wurde *H. volcanii* WR340 mit den Reporter-gen-Plasmiden transformiert. Zellen wurden in der exponentiellen Wachstumsphase (2×10^8 Zellen/ml) geerntet, und die Translationseffizienzen kalkuliert (Abbildung 28).

Es konnte zunächst gezeigt werden, dass sich die Fusion der zusätzlichen Aminosäuren an den N-Terminus der DHFR im Vergleich zur ursprünglichen Variante pMB1 positiv auf die enzymatische Aktivität auswirkte (Nr.1 in Abbildung 28B). Die DHFR-Variante mit verlängertem N-Terminus (Nr. 1 in Abbildung 28) zeigte eine spezifische Enzymaktivität von 0,66 nkat/mg, während das ursprüngliche Reporterenzym (Nr. 1 in Abbildung 14) eine spezifische Aktivität von ca. 0,38 nkat/mg besaß. Bisher ist unklar ob diese Beobachtung auf eine erhöhte Wechselzahl, auf eine verstärkte Transkriptstabilität oder auf eine erhöhte Proteinstabilität zurückzuführen ist .

Das Startkodon der *dhfr* ist durch seine Lokalisierung im P1 Stamm des *Hammerhead*-Ribozyms für das Ribosom nicht zugänglich. Erst nach autokatalytischer Spaltung des *Hammerheads* kann der Translationsstart durch das Ribosom erkannt werden. Die Fusion der *Hammerhead*-Varianten reduzierte die Transkriptstabilität um den Faktor zwei, verglichen zur Kontrollvariante ohne fusioniertes *Hammerhead*-Ribozym. Die Fusion des aktiven *Hammerhead*-Ribozyms reduzierte die Genexpression der *dhfr* im Vergleich zur Kontrollvariante um den Faktor 2,5 (Nr. 2 in Abbildung 28). Die reduzierte Enzymaktivität kann entweder auf ineffiziente Spaltung des *Hammerhead*-Ribozyms aufgrund der hohen ionischen Bedingungen zurückgeführt werden, oder auf eine spontane Wiederanlagerung des gespaltenen *Hammerhead*. Wie zu erwarten war bei der Fusion des inaktiven *Hammerheads* mit dem Reporter-gen keine Enzymaktivität messbar.

Daher ist gezeigt, dass in *H. volcanii* die autokatalytische Spaltung des *Hammerhead*-Ribozyms möglich ist, und allosterische Ribozyme durchaus als Werkzeuge zur konditionalen Genexpression in halophilen Archaea in Betracht gezogen werden können.

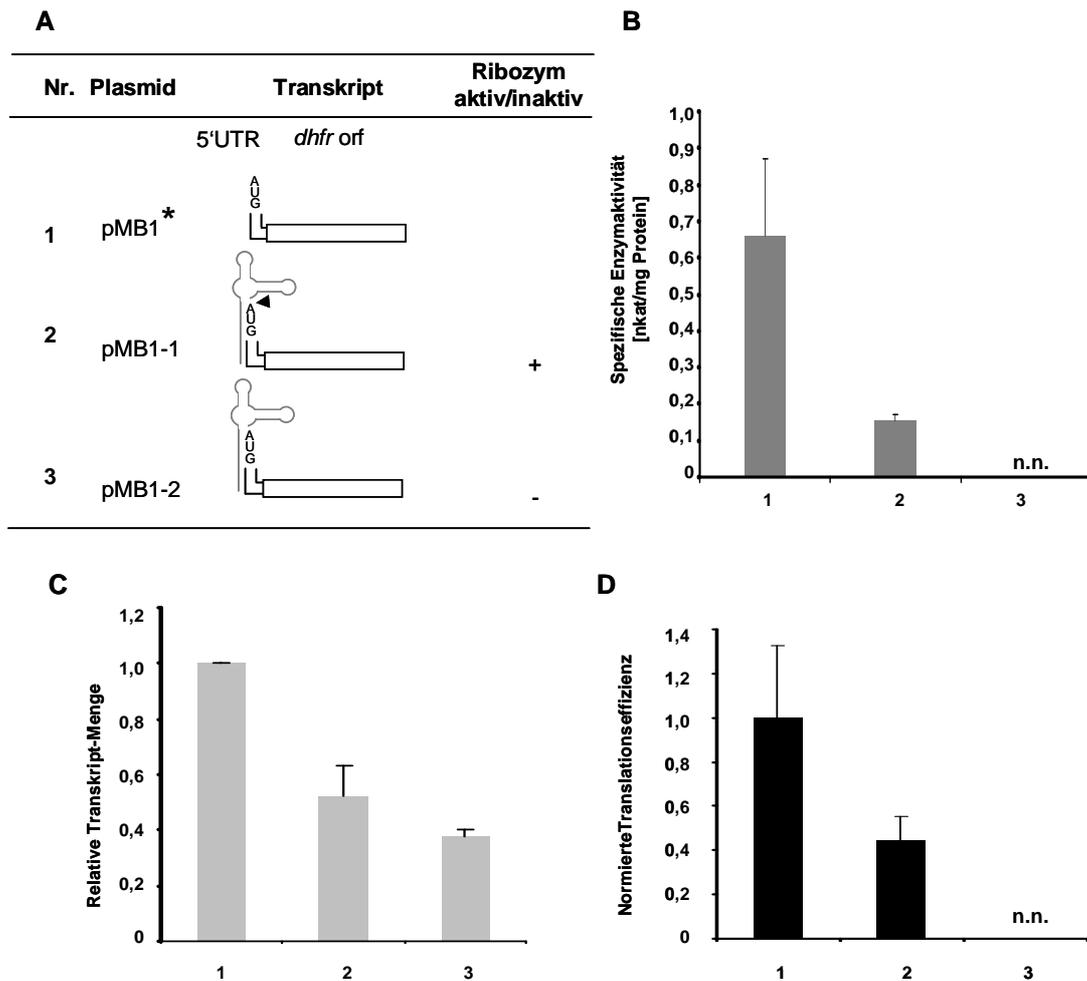


Abbildung 28: Anwendung eines konstitutiven *Hammerhead*-Ribozyms in *H. volcanii*

Aktive und inaktive Varianten des *Hammerhead*-Ribozyms wurden an das *dhfr*-Reporter gen fusioniert. Die Translationseffizienzen wurden für Zellen aus der exponentiellen (2×10^8 Zellen/ml) Wachstumsphase kalkuliert. **(A)** Das *dhfr*-Reporter gen und die Genfusion sind schematisch gezeigt. Als Kontrolltranskript diente das Reporter gen ohne UTRs. **(B)** Spezifische Enzymaktivitäten. Drei unabhängige biologische Replikate wurden durchgeführt und die Mittelwerte mit Standardabweichungen berechnet. **(C)** Relative mRNA-Mengen. Drei unabhängige biologische Replikate wurden durchgeführt, die Mittelwerte mit Standardabweichungen berechnet und auf das Kontrollplasmid pMB1* normiert. **(D)** Translationseffizienz nach Normierung auf das Kontrollplasmid pMB1*. Die Translationseffizienzen wurden durch das Dividieren der DHFR-Aktivitäten durch die Transkript-Menge kalkuliert. n.n. nicht nachweisbar.

V. DISKUSSION

1. crRT-PCR: Eine effiziente Methode zur Bestimmung der untranslatierten Regionen von mRNAs

In der vorliegenden Arbeit wurden die 5'- und 3'-UTRs verschiedener Transkripte aus *H. volcanii* mit Hilfe der crRT-PCR bestimmt (Kuhn & Binder, 2002). Kuhn und Binder kamen zu dem Schluss, dass nur prozessierte, aber keine primären 5'-Enden von RNAs mit der crRT-PCR bestimmt werden können (Kuhn & Binder, 2002). Grund für diese Annahme war die Identifizierung von 5'-Enden eines Transkriptes, welche einige Nukleotide kürzer waren, als die 5'-Enden, welche mittels *Primer extension* für dasselbe Transkript ermittelt wurden. Die theoretische Erklärung war, dass Primär-Transkripte an ihrem 5'-Ende Triphosphate tragen, welche wahrscheinlich nicht durch RNA Ligase ligiert werden können. Daher schien zur Bestimmung der 5'-Enden von Primärtranskripten zunächst eine Konvertierung der Triphosphate zu Monophosphaten durch eine Pyrophosphatase notwendig zu sein (Zhang & Liu, 2006). Es stellte sich heraus, dass dies für haloarchaeale Transkripte unnötig ist. Die durch crRT-PCR identifizierte 5'-UTR des „*bacterioopsin linked protein*“ (*blp*) aus *H. salinarum* (Brenneis *et al.*, 2007) war identisch mit der 5'-UTR des *blp*, welche in einer vorangegangenen Analyse mittels *Primer extension* identifiziert wurde (Accession No. L22007, www.ebi.ac.uk/embl/). Weitere Beweise, die für die Bestimmung von Primärtranskripten sprechen, sind: (1) Es konnten zwar verschiedene 3'-Enden, nicht aber multiple 5'-Enden eines Transkripts identifiziert werden und (2) die basalen Promotorelemente (TATA-Box und BRE) besaßen exakt den bekannten Abstand zu den experimentell bestimmten 5'-Enden. Dies trifft nur zu, wenn die tatsächlichen Primärtranskripte bestimmt wurden.

Die überzeugendste Erklärung für den Erfolg dieser Methode zur UTR-Bestimmung haloarchaealer Transkripte ist, dass ein Anteil der Transkripte *in vivo* von Tri- zu Monophosphaten dephosphoryliert wurde. In *E. coli* konnte gezeigt werden, dass die Umwandlung von Tri- zu Monophosphaten den ersten Schritt zur RNA-Degradation darstellt. Der Anteil zellulärer monophosphorylierter

Transkripte wurden für zwei Gene bestimmt und betrug 18%-35% (Celesnik *et al.*, 2007). Falls dies für Haloarchaea ebenfalls zutrifft, würde das den Erfolg der crRT-PCR zur UTR-Bestimmung von Transkripten erklären. Allerdings konnten die Enden einiger Transkripte mit dieser Methode nicht bestimmt werden. Möglicherweise hätte für diese Fälle die Behandlung mit einer Pyrophosphatase geholfen (Zhang & Liu, 2006). Die crRT-PCR stellt daher eine effiziente und hilfreiche Methode zur Bestimmung von transkriptionalen und translationalen Signalen in verschiedenen archaealen, bakteriellen und eukaryotischen Spezies dar.

2. Transkription in *H. volcanii*

2.1 Promotorstrukturen

Es ist allgemein bekannt, dass der archaeale Transkriptionsapparat eher dem eukaryotischen Polymerase II und III Systemen ähnelt, als dem bakteriellen Apparat. Allerdings besitzen Archaea wie Bakterien nur eine RNA Polymerase zur Transkription aller Gene. In Eukaryoten wird die Transkription von verschiedenen Polymerasen übernommen, die verschiedene Gen-Gruppen transkribieren. Die Zusammensetzung der archaealen Polymerase besitzt wiederum eukaryotischen Charakter. Zur Rekrutierung der archaealen RNA Polymerase sind die Transkriptionsfaktoren TBP und TFB notwendig und hinreichend für die initiation der basalen Transkription (Geiduschek & Ouhammouch, 2005). TBP erkennt die archaeale TATA-Box und bindet TFB (Bell & Jackson, 2001; Ouhammouch *et al.*, 2004). TFB erkennt das BRE-Element, welches unmittelbar stromaufwärts der TATA-Box lokalisiert ist (Bell *et al.*, 1999b; Qureshi & Jackson, 1998). Die Regionen stromaufwärts der im Rahmen dieser Arbeit experimentell bestimmten Transkriptionsstarts ergaben Konsensussequenzen für drei basale Promotor-Elemente: die TATA-Box, das BRE-Element und ein neues an Position -10/-11 lokalisiertes Element. Dieselben basalen Promotor-Elemente konnten bei einer genomweiten Analyse von mehr als 2000 Genen aus *H. salinarum* identifiziert werden, die monocistronisch oder als erste Gene in Operons vorlagen (Brenneis *et al.*, 2007).

Die konservierte haloarchaeale TATA-Box besteht aus nur vier Nukleotiden. Dies ist entscheidend kürzer, als TATA-Boxen mit acht Nukleotiden, die durch Strukturanalysen von TBP/DNA-Komplexen aus verschiedenen Spezies bestimmt wurden (Kim *et al.*, 1993; Kosa *et al.*, 1997; Nikolov *et al.*, 1996). Bisher wurde angenommen, dass diese Promotoren in Eukaryoten und Archaea universell konserviert sind. Zwei aktuelle Studien zeigten jedoch schon, dass die haloarchaeale Konsensussequenz der TATA-Box kürzer als acht Nukleotide ist. Ein Vergleich der Regionen stromaufwärts der experimentell bestimmten 5'-Enden von Transkripten, die 1999 verfügbar waren, zeigte, dass die konservierten Regionen in Haloarchaea kürzer als in methanogenen und thermophilen Archaea waren (Soppa, 1999). Eine *in vivo* Selektion von TATA-Boxen aus einer Zufalls-Bibliothek ergab eine Konsensussequenz von sechs Nukleotiden (Danner & Soppa, 1996). Die wahrscheinlichste Erklärung basiert auf der Tatsache, dass Haloarchaea im Gegensatz zu allen anderen Spezies multiple TBP-Isoformen besitzen (Baliga *et al.*, 2000). Es ist allgemein bekannt, dass in Bakterien σ -Faktoren als globale Antwort auf spezifische Stimuli die Transkription bestimmter Zielgene verändern. In Eukaryoten dagegen übernehmen aus mehreren Untereinheiten bestehende Transkriptionskomplexe diese Aufgabe. Für Archaea dagegen ist über die Funktion solcher „Master“-Regulatoren der Transkription zur Anpassung an die zum Teil extremen Umweltbedingungen nur wenig bekannt (Robertson *et al.*, 2005). In Archaea existieren Orthologe zu den eukaryotischen generellen TFB und TBP (Geiduschek & Ouhammouch, 2005). Diese Transkriptionsfaktoren sind in Haloarchaea in multiplen Kopien vorhanden (Facciotti *et al.*, 2007). *Halobacterium* sp. NRC-1 beispielsweise kodiert für sechs TBPs und sieben TFBs (Baliga *et al.*, 2000), wobei TbpE die stärkste Expression zeigt (Teufel *et al.*, 2008). Da zur Rekrutierung der RNA-Polymerase die Paarung von TFB und TBP notwendig ist (Bell *et al.*, 1999a), können diese multiplen TBP und TFB Kopien aus *Halobacterium* sp. NRC-1 insgesamt 42 mögliche TFB/TBP-Paare bilden. Diese könnten dann von verschiedenen Promotoren die Transkription steuern. Vor Kurzem konnte gezeigt werden, dass die verschiedenen multiplen TBPs und TFBs in Archaea tatsächlich ähnlich zu σ -Faktoren aus Bakterien und verschiedener Polymerasen und Transkriptionsfaktoren in Eukaryoten eine differentielle Regulation der

Transkription hervorrufen können (Coker & DasSarma, 2007; Facciotti *et al.*, 2007; Teufel *et al.*, 2008). Für Eukaryoten konnte bereits gezeigt werden, dass TBP und TFB Homologe die Transkription Entwicklungs- und Gewebs-spezifisch steuern können (Chen *et al.*, 2005; Hansen *et al.*, 1997). Die TATA-Box Konsensussequenz aus vier Nukleotiden stellt daher möglicherweise eine allgemeine Grundsequenz dar, die von allen möglichen haloarchaealen TBPs erkannt wird, während die restlichen vier Nukleotide möglicherweise differentiell durch verschiedene TBP-Isoformen erkannt werden. Daher könnten haloarchaeale TBPs, ähnlich zu bakteriellen Sigmafaktoren, als globale Regulatoren der Transkriptionsinitiation wirken (Baliga *et al.*, 2000; Thompson *et al.*, 1999). Möglicherweise stellt die archaeale Verwendung multipler TFB/TBP-Paare ein Beispiel der Evolution dar, bei der die Erweiterung von Familien aus Transkriptionsfaktoren zur kombinatorischen selektiven Regulation der Transkription genutzt wurde (Facciotti *et al.*, 2007).

2.2 Termination der Transkription

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein pentaU-Motiv und möglicherweise eine Haarnadelstruktur am 3'-Ende der Transkripte in die haloarchaeale Termination der Transkription involviert sind. Die putativen Haarnadelstrukturen der verschiedenen Transkripte sind weder in ihrer Sequenz, noch in ihrer Struktur konserviert. Daher ist unklar, inwiefern diese in einen generellen Mechanismus der Transkriptionstermination involviert sein könnten.

Ein Vergleich mit früheren Studien ist schwierig, da die Termination der Transkription in Archaea nur wenig untersucht wurde. Trotzdem kann angenommen werden, dass der Mechanismus der Termination eher dem eukaryotischen Polymerase III System ähnelt, da die eukaryotische Polymerase II zur Termination verschiedene Faktoren benötigt. Bisher konnten dazu keine Homologe in Archaea identifiziert werden (Santangelo & Reeve, 2006). Die Termination der Polymerase III hingegen kann einzig durch spezifische Sequenzabschnitte eingeleitet werden (Cozzarelli *et al.*, 1983; Hamada *et al.*, 2000), was mit Studien zur Termination der archaealen Transkription übereinstimmt (Kuo *et al.*, 1997; Muller *et al.*, 1985; Santangelo & Reeve, 2006; Spitalny & Thomm, 2008; Thomm *et al.*, 1994). Oligo-U Abschnitte wurden schon

früh als archaeale Terminatoren identifiziert (Reiter *et al.*, 1988b; Thomm *et al.*, 1994). Die einzige Studie für ein Haloarchaeon zeigte, dass die Sequenz „UUAUUCUUU“ als Terminator wirkt, während die mutierte Sequenz „UUAUUCGGU“ keinen Terminator darstellt, was die Wichtigkeit der Us bestätigt (Thompson *et al.*, 1999). Einige Studien mit thermophilen Archaea ergaben, dass die Termination nach oligo-U oder oligo-Pyrimidin Abschnitten von mehr als zehn Nukleotiden auftritt (Muller *et al.*, 1985; Reiter *et al.*, 1988b; Spitalny & Thomm, 2008; Thomm *et al.*, 1994; Wich *et al.*, 1986). Untersuchungen mit dem thermophilen Archaeon *Pyrococcus furiosus* zeigten, dass mindestens fünf Us für eine effiziente Termination der Transkription notwendig sind, und der Mechanismus der Transkriptionstermination der Pol III Termination des *Xenopus* 5S Gens ähnelt (Spitalny & Thomm, 2008). Eine *in vitro* Studie zur Termination der Transkription in *Methanobacter thermoautotrophicus* demonstrierte, dass native und synthetische U-Abschnitte die Fähigkeit zur Termination der Transkription besitzen, und essentiell für diesen Prozess sind. Haarnadelstrukturen beeinflussten dabei die Termination (Santangelo & Reeve, 2006). Im Gegensatz zum bakteriellen Terminationssystem kann die archaeale Transkription auch an synthetischen oder natürlichen oligo-U Sequenzen terminiert werden, denen keine Haarnadelstruktur vorangestellt ist (Santangelo & Reeve, 2006). Überraschenderweise hatten außerdem die Topologie des Substrates und Sequenzen 200 Nukleotide stromaufwärts der Terminationsstelle einen Einfluss auf die Termination.

Da Archaea zu den Prokaryoten gehören, ist die Möglichkeit zu einer gekoppelten Transkription/Translation gegeben. Für *T. kodakarensis* konnte dies durch elektronenmikroskopische Aufnahmen bereits demonstriert werden (French *et al.*, 2007). Eine Kopplung von Transkription und Translation bildet die Möglichkeit zur rho-abhängigen Termination ähnlich der bakteriellen Transkription (Richardson, 2002). Polymerase II aber nicht Polymerase I oder Polymerase III Komplexe sind *in vitro* sensitiv für die rho-abhängige Termination (Lang *et al.*, 1998). Für das Archaeon *Methanobacter thermoautotrophicus* konnte ein rho-abhängige Termination der Transkription demonstriert werden (Santangelo & Reeve, 2006). Archaeale Genome kodieren keine Homologe zur rho-abhängigen Termination, allerdings kann aufgrund der rho-sensitiven Termination in *M.*

thermoautotrophicus ein analoger Mechanismus für Archaea angenommen werden.

Die Termination der Transkription in Archaea scheint somit keinen einheitlichen Mechanismus zu besitzen und ist noch weitestgehend unverstanden. Die Bestimmung der 3'-Enden von Transkripten aus *H. volcanii* im Rahmen dieser Arbeit und *H. salinarum* (Brenneis *et al.*, 2007) führten zu der Identifizierung einer weitaus größeren Anzahl *in vivo* funktioneller Terminatoren, als in jeder anderen archaealen Spezies.

3. mRNAs und ihre Untranslatierten Regionen in *H. volcanii*

3.1 5'-UTRs und ihre biologische Funktion in Haloarchaea

Die experimentelle Analyse der 5'-Enden von Transkripten aus *H. volcanii* ergab, dass nur 5 von 17 der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Transkripte eine 5'-UTR besaßen. Mit durchschnittlich 15 Nukleotiden sind die haloarchaealen 5'-UTRs entscheidend kürzer als die eukaryotischen. Da Transkripte mit 5'-UTR zumindest in Haloarchaea die Minderheit darstellen, ist anzunehmen, dass die 5'-UTRs möglicherweise neben der Initiation der Translation weitere Funktionen einnehmen. Möglicherweise liegt die Aufgabe nativer haloarchaealer 5'-UTRs in einem Herabsetzen der Translationseffizienz im Vergleich zu Transkripten ohne 5'-UTR. Dies würde eine Feinregulation der Genexpression erlauben, und eine differentielle Regulation der Translation mit positiven Regulatoren ermöglichen, die Transkript-spezifisch die Translationseffizienz verstärken.

Außerdem könnten 5'-UTRs ebenfalls eine Rolle bei der Regulation von Transkript-Halbwertszeiten spielen. Celesnik *et al.* konnten zeigen, dass ungepaarte Basen am 5'-Ende von Transkripten den RNA-Abbau durch RNase E in *E. coli* erleichtern, wohingegen die Insertion einer stabilen Haarnadelstruktur am 5'-Ende zu einer Stabilisierung des Transkripts führt (Celesnik *et al.*, 2007). Die Fusion artifizierlicher UTRs an das Reporter-gen führte zu starken Schwankungen der Transkriptmengen. Demnach ist der Einfluss von 5'-UTRs auf die RNA-Halbwertszeit die erste experimentell bestätigte Funktion von 5'-UTRs in Archaea.

Für den Menschen ergab eine bioinformatische Studie, dass 10% bis 18% aller Gene durch die Nutzung multipler Promotoren alternative 5'-UTRs exprimieren (Trinklein *et al.*, 2003). Für die Transkripte aus *H. volcanii* konnte dies nicht bestätigt werden.

Der GC-Gehalt von 5'- und 3'-UTRs kann variieren. Im Allgemeinen ist der GC-Gehalt von 5'-UTRs aus verschiedenen Taxa höher als in den 3'-UTRs. Dieser Unterschied ist besonders in den warmblütigen Vertebraten ausgeprägt. Hier beträgt der GC-Gehalt der 5'-UTRs 60%, während der GC-Gehalt der 3'-UTRs bei 45% liegt (Pesole *et al.*, 2000). Es ist anzunehmen, dass dies auf die Anwesenheit von CpG-Inseln in den 5'-UTRs verschiedener Gene der Vertebraten zurückzuführen ist (Pesole *et al.*, 2000). In *H. volcanii*, dessen GC-Gehalt bei ca. 66% liegt, treten zwischen 5'- und 3'-UTR, sowie der kodierenden Region keine Unterschiede im GC-Gehalt auf.

In den meisten eukaryotischen mRNAs sind die flankierenden Nukleotide um das Startkodon nicht willkürlich sondern besitzen eine Konsensussequenz. In Säugetieren ist diese Konsensussequenz „GCCRCCaug**G**“, und die am höchsten konservierten Nukleotide dabei sind die Purine (R) an Position -3 und das Guanin an Position +4. Dabei beeinflusst besonders der in der 5'-UTR lokalisierte Abschnitt die effiziente Erkennung des korrekten Startkodons. In *H. volcanii* konnten keine Konsensussequenzen um das Startkodon detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

3.3 3'-UTRs und ihre biologische Funktion in Haloarchaea

Die experimentelle Bestimmung der 3'-Enden von haloarchaealen Transkripten im Rahmen dieser Arbeit ergab, dass alle analysierten Gene eine 3'-UTR mit einer durchschnittlichen Länge von 45 Nukleotide besaßen. In Eukaryoten sind die 3'-UTRs länger und ihre Länge nahm im Laufe der Evolution zu. 3'-UTRs von Hefe und Menschen haben durchschnittliche Längen von 200 Nukleotide und 500 Nukleotide (Mazumder *et al.*, 2003). 3'-UTRs von Eukaryoten besitzen weitgefächerte Funktionen (de Moor *et al.*, 2005; Mazumder *et al.*, 2003; Wilkie *et al.*, 2003). In Archaea war vor dieser Arbeit die einzige bekannte Funktion der Selenocysteineinbau an Stopkodons einiger Gene von methanogenen Archaea (Rother *et al.*, 2001). Haloarchaea besitzen jedoch kein Selenocystein. Daher ist

anzunehmen, dass hier die 3'-UTRs eine andere Funktion besitzen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Fusionen von 3'-UTRs das *dhfr* Transkript stabilisierten. Demnach ist die Stabilisierung die zweite experimentell bestätigte Funktion von 3'-UTRs in Archaea. Dies stellt möglicherweise eine generellere Funktion von 3'-UTRs dar. Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine dritte Funktion der archaealen 3'-UTRs geklärt werden. Es konnte gezeigt werden, dass archaeale 3'-UTRs eine bestimmende Rolle bei der Regulation der Translation einnehmen (siehe Kapitel 5 der Diskussion).

Die Sequenzen der 3'-UTRs entsprechen exakt der genomischen Sequenz und posttranskriptionale Modifizierungen konnten in keinem der analysierten haloarchaealen Transkripte gefunden werden. Für Exosom enthaltende Archaea wurde ein posttranskriptionales Anhängen von A-reichen Sequenzen an das 3'-Ende gezeigt. Diese A-reichen Sequenzen besitzen eine wichtige Funktion bei der RNA-Degradation (Portnoy *et al.*, 2005; Portnoy & Schuster, 2006). Haloarchaea besitzen allerdings kein Exosom und müssen daher einen anderen, bisher unbekanntem Mechanismus zur RNA-Degradation besitzen.

4. Initiation der Translation in *H. volcanii*

4.1 Initiation der Transkription bei Transkripten ohne 5'-UTR

Die Ergebnisse der experimentellen Bestimmung der 5'-UTRs von Transkripten aus *H. volcanii* zeigten, dass die Mehrheit der Transkripte keine 5'-UTR besitzt. Daher ist anzunehmen, dass dies der generelle Mechanismus der Translationsinitiation ist. Die Tatsache, ob ein Transkript keine 5'-UTR besitzt, hängt von der korrekten Bestimmung des Translationsstartes ab. Daher wurden für *H. volcanii* Kodonpräferenz-Plots durchgeführt, um die Qualität zur Annotation der korrekten Translationsstarts zu verstärken (Soppa, 1994).

Der Mechanismus zur Initiation der Translation bei Transkripten ohne 5'-UTR ist klar von dem für Transkripte mit 5'-UTR zu unterscheiden. Für zwei Archaea konnte gezeigt werden, dass die Mutation einer SD-Sequenz die Translation inhibierte, während die komplette Deletion der nativen 5'-UTR die Fähigkeit zur

Translation wieder herstellte (Condo *et al.*, 1999; Sartorius-Neef & Pfeifer, 2004). Für Bakterien konnte gezeigt werden, dass sich die Initiation der Translation bei Transkripten ohne 5'-UTR von Transkripten mit 5'-UTR in Hinblick auf den Bedarf der Initiator-tRNA und Translationsinitiationsfaktoren, als auch der Interaktion mit ribosomalen Untereinheiten und der Resistenz gegenüber Kasugamycin unterscheiden. Während die Translation bei Transkripten mit 5'-UTR durch eine Interaktion der kleinen ribosomalen Untereinheit und SD-Sequenz initiiert wird, binden bakterielle und eukaryotische Transkripte ohne 5'-UTR undissoziierte Ribosomen und die Initiator tRNA zur Initiation der Translation (Andreev *et al.*, 2006; Grill *et al.*, 2000; Moll *et al.*, 2002; Moll *et al.*, 2004; O'Donnell & Janssen, 2002; Udagawa *et al.*, 2004). Archaeale, bakterielle und eukaryotische *in vitro* Translationssysteme sind zur Translation von Transkripten ohne 5'-UTR fähig. Daher kann angenommen werden, dass die Translation von mRNAs ohne 5'-UTR einen sehr alten und konservierten Mechanismus darstellt (Grill *et al.*, 2000; Moll *et al.*, 2002).

4.2 Ein neuer Mechanismus zur Initiation der Translation in Archaea

Es wird allgemein angenommen, dass zwei Mechanismen zur Initiation der Translation existieren, die für Pro- und Eukaryoten verschieden sind. Prokaryotische Transkripte benötigen die Interaktion der SD-Sequenz mit dem 3'-Ende der 16S rRNA. In Eukaryoten wird die Translation durch einen *Scanning*-Mechanismus initiiert, falls keine IRES, uORFs oder Transkripte ohne 5'-UTR vorliegen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass diese Annahme für Haloarchaea nicht gilt. Nur für wenige haloarchaeale Gene wird die Translation über eine Interaktion mit der SD-Sequenz initiiert. Dafür spricht: (1) sowohl die Mehrzahl aller im Rahmen dieser Arbeit analysierten Transkripte aus *H. volcanii*, als auch die in einer parallelen Studie untersuchten Transkripte aus *H. salinarum* (Brenneis *et al.*, 2007) besaßen keine SD-Sequenz in ihrer 5'-UTR, (2) sechs im Rahmen dieser Arbeit experimentell charakterisierte 5'-UTRs ohne SD-Sequenz konnten dennoch *in vivo* effizient translatiert werden, und (3) bioinformatische Genom-Analysen für *H. salinarum* zeigten, dass SD-Sequenzen auch für distale Gene in Operons nicht typisch sind (Brenneis *et al.*, 2007).

Die Definition der SD-Sequenz ist kritisch, um festzustellen, ob in einer 5'-UTR eine SD-Sequenz lokalisiert ist. In *E. coli* können Teile oder die gesamte Sequenz „UAAGGAGGU“ mit dem 3'-Ende der 16S rRNA hybridisieren. Eine bioinformatische Studie aller *E. coli* Gene ergab die Konsensussequenz „AAGGA“ (Shultzaberger *et al.*, 2001). In den meisten experimentellen Studien wurden als SD-Sequenz vier bis sechs Nukleotide genutzt (Chen *et al.*, 1994). Der Abstand vom 3'-Ende der SD-Sequenz zum Startkodon beträgt dabei fünf Nukleotide (Chen *et al.*, 1994; Shultzaberger *et al.*, 2001). Im Gegensatz zu zahlreichen Untersuchungen in Bakterien gibt es nur zwei experimentelle Studien zu archaealen SD-Sequenzen. Unter Verwendung eines *in vitro* Translationssystems von *S. solfataricus* konnte gezeigt werden, dass die Mutation der nativen SD-Sequenz „GAGGUGA“ zu „GACGUCA“ zu einem völligen Verlust der Fähigkeit zur Translation führte (Condo *et al.*, 1999). Die inaktive SD-Sequenz bestand dennoch aus fünf Nukleotiden, die mit dem 3'-Ende der 16S rRNA hybridisieren konnten. Für *H. volcanii* zeigten *in vivo* Studien, dass die Mutation der nativen SD-Sequenz „GGAGGUCA“ zu „UUAGGUCA“ die Effizienz der Translation um mehr als 90% herabsetzten, obwohl in der mutierten Version fünf wildtypische Nukleotide erhalten blieben (Sartorius-Neef & Pfeifer, 2004). Diese Daten stimmen mit bioinformatischen Analysen aus *H. salinarum* überein. Die Untersuchung zeigte, dass vier konsekutive und fünf nicht konsekutive Nukleotide putativer SD-Sequenzen hauptsächlich in falschen Distanzen zu translationalen Startkodons lokalisiert sind. Nimmt man eine SD-Sequenz bestehend aus fünf konsekutiven Nukleotiden an, wenden nur 10% aller *H. salinarum* Gene den SD-Mechanismus zur Initiation der Translation an, während 90% der Gene entweder keine 5'-UTR, oder eine 5'-UTR ohne SD-Sequenz besitzen (Brenneis *et al.*, 2007). Zusammengefasst implizieren sowohl bioinformatische als auch experimentelle Analysen eine intensivere Basenpaarung haloarchaealer SD-Sequenzen zur 16S rRNA als in *E. coli*.

Es ist möglich, dass sich das seltene Auftreten von SD-Sequenzen und die Anwendung SD-Sequenz unabhängiger Mechanismen zur Initiation der Translation nicht nur auf Haloarchaea beschränkt. Eine umfassende bioinformatische Analyse ergab, dass 50% aller archaealen und bakteriellen Gene ohne SD-Sequenz vorliegen (Chang *et al.*, 2006). Dies würde bedeuten,

dass ein großer Teil der prokaryotischen Transkripte entweder keine 5'-UTR oder eine 5'-UTR ohne SD-Sequenz besitzt, was nicht der heutigen allgemeinen Annahme entspricht.

Es gilt zu untersuchen (1) wie weit verbreitet Transkripte ohne 5'-UTRs in Archaea und Bakterien sind, (2) wie weit verbreitet Transkripte mit 5'-UTRs ohne SD-Sequenzen sind, (3) wie der neue Mechanismus zur Initiation der Translation an Transkripten ohne SD-Sequenz agiert und (4) wie die Initiation an Transkripten ohne SD-Sequenz mechanisch funktioniert und welche Moleküle an diesem Prozess beteiligt sind.

4.3 Einfluss strukturierter 5'-UTRs auf die Translationseffizienz

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Insertion eines Tetracyclin-induzierbaren Aptamers direkt stromaufwärts des Startkodons die Initiation der Translation in *H. volcanii* vollständig inhibierte. Die An- bzw. Abwesenheit einer 5'-UTR hatte dabei keinen Einfluss. Die Integration des Aptamers direkt an das 5'-Ende einer artifiziellen 5'-UTR hingegen hatte keinen Einfluss auf die Translationseffizienz im Vergleich zur einer Kontrollvariante ohne Aptamer. Auffällig ist außerdem, dass die Effizienz der Translationsinitiation mit zunehmend strukturierter 5'-UTR abnimmt. So zeigten artifizielle UTRs höhere oder gleiche Translationseffizienzen im Vergleich zu Varianten ohne 5'-UTRs. Derselbe Effekt konnte bei Fusionen mit destabilisierter nativer 5'-UTR beobachtet werden. Native 5'-UTRs werden mit bis zu 50% geringerer Effizienz im Vergleich zur Variante ohne 5'-UTR translatiert. Für Eukaryoten konnte bereits ein direkter Zusammenhang zwischen der Stabilität sekundärer Strukturen und ihrer Fähigkeit zur Repression der Translation demonstriert werden. Dabei inhibierte die Insertion einer Haarnadelstruktur direkt stromaufwärts des Startkodons die Translation, wobei die Stärke der Repression von der Stabilität und der Position der Haarnadelstruktur abhing (Baim & Sherman, 1988). Die Stabilisierung des Tetracyclin-abhängigen Aptamers in der 5'-UTR eines Reportergens in *S. cerevisiae* führte zu einer geringeren Expression, während die Destabilisierung des Elementes eine verstärkte Expression zur Folge hatte (Suess *et al.*, 2003). Für *S. cerevisiae* konnte ausserdem gezeigt werden, dass die CAP-nahe Insertion des Tetracyclin-induzierbaren Aptamers in Abwesenheit

von Tetracyclin keinen Einfluss auf die Genexpression hatte, während die Integration nahe des Startkodons zu einer reduzierten Genexpression führte (Hanson *et al.*, 2003). Bisher ist nicht klar, ob der inhibitorische Effekt des Aptamers nahe des Startkodons in *S. cerevisiae* auf die Interaktion der umgebenden Nukleotide zurückzuführen ist, die zu einer Stabilisierung inhibitorischer Strukturen führen. In Säugetier-Systemen hingegen sind Strukturen in CAP-naher Umgebung stark inhibitorisch (Kozak, 1986), und Haarnadelstrukturen mit einer freien Energie von -30 kcal/mol nahe der CAP-Struktur können die Anlagerung des 43S Präinitiationskomplexes verhindern (Kozak, 1989c). Gebundene 30S Untereinheiten oder 70S Ribosomen können Regionen von 40 bis 54 Nukleotiden der mRNA bei *footprinting* Analysen schützen. Dabei liegt das 5'-Ende der geschützten Region bei Position -35 relativ zum Startkodon. Das 3'-Ende der geschützten Region verschiebt sich je nach An- oder Abwesenheit der Initiator-tRNA (Huttenhofer & Noller, 1994).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Sekundärstrukturen nahe am 5'-Ende der 20 Nukleotide langen 5'-UTR eine Bindung des Präinitiationskomplexes nicht verhindern, während Haarnadelstrukturen nahe des Startkodons die Anlagerung des Präinitiationskomplexes in Haloarchaea blockieren. Für die mutierte Variante mit stabilisierter nativer 5'-UTR konnte keine mRNA nachgewiesen werden. Eine Inhibition der Transkription durch die starke Sekundärstruktur in der 5'-UTR kann ausgeschlossen werden, da für das Transkript mit derselben 5'-UTR und zusätzlicher nativer 3'-UTR durchschnittliche mRNA Konzentrationen nachgewiesen werden konnten. Ebenso konnte die erfolgreiche Transformation des Reporter-Gen-Plasmids in *H. volcanii* mittels PCR und Sequenzierung nachgewiesen werden. Möglicherweise ist die Abwesenheit der RNA auf RNA-Abbau zurückzuführen. Das Anhängen einer 3'-UTR hingegen führte zu einer Stabilisierung des Transkripts.

Zusammenfassend lassen die Ergebnisse dieser Arbeit einen neuen Mechanismus zur Initiation der Translation in Haloarchaea vermuten. Ein *Scanning*-Mechanismus ähnlich zu Eukaryoten zur Initiation der Translation bei haloarchaealen Transkripten mit 5'-UTR ohne SD-Sequenz kann ausgeschlossen werden. Wahrscheinlicher ist eine interne Erkennung des translationalen

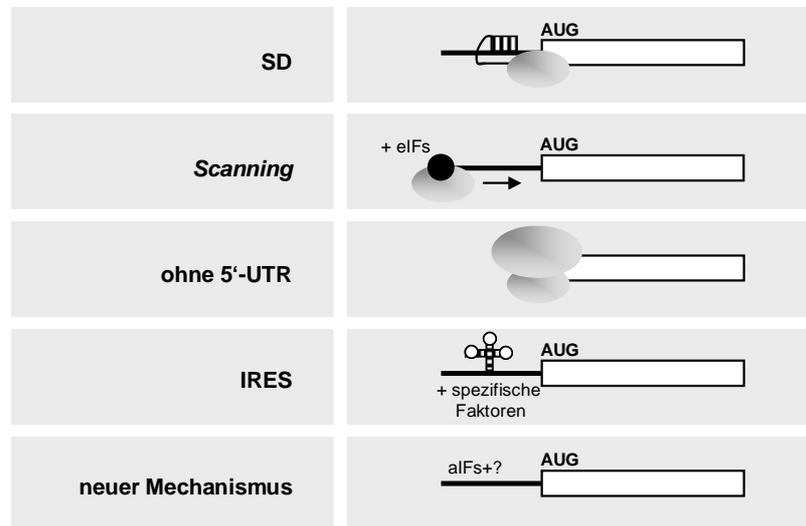
Startkodons und die direkte Interaktion des ribosomalen Komplexes. Der genaue Mechanismus muss noch untersucht werden.

4.4 Initiation der Translation – ein Fazit

Bis heute konnten insgesamt fünf verschiedene Mechanismen zur Initiation der Translation identifiziert werden (Abbildung 28). Die bakterielle Initiation der Translation erfolgt durch eine Wechselwirkung der SD-Sequenz mit dem 3'-Ende der 16S rRNA der kleinen ribosomalen Untereinheit und der Interaktion des Startkodons der fMet-tRNA_i. Dieser Prozess wird durch die drei Initiationsfaktoren IF1, IF2 und IF3 kontrolliert (Gualerzi & Pon, 1990). Ähnlich zu Bakterien besitzen einige Archaea polycistronische mRNAs mit klar identifizierbaren SD-Motiven (Torarinsson *et al.*, 2005). *In vitro* Studien mit *S. solfataricus* als Modellorganismus demonstrierten, dass SD-Sequenzen (falls vorhanden) essentiell zur Initiation der Translation sind (Condo *et al.*, 1999). *In vivo* Studien in *H. volcanii* jedoch zeigten, dass Mutationen der SD-Sequenz in Haloarchaea die Translation nicht vollständig wie in *S. solfataricus* inhibierten (Sartorius-Neef & Pfeifer, 2004). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte sogar demonstriert werden, dass trotz Abwesenheit einer SD-Sequenz Transkripte mit 5'-UTRs effizient translatiert werden können. Ein *Scanning*-Mechanismus ähnlich zu Eukaryoten zur Initiation kann für diese Transkripte aufgrund der hier ermittelten Daten ausgeschlossen werden. Ebenso ist das Vorhandensein von IRES in der 5'-UTR der Transkripte auszuschließen, da (1) die Translation auch an Transkripten mit artifizieller 5'-UTR effizient initiiert werden konnte und (2) die Länge der untersuchten 5'-UTRs ca. 20 Nukleotide betrug. IRES besitzen in der Regel sehr komplexe Strukturen und sind somit länger als 20 Nukleotide. Der genaue Mechanismus und involvierte Faktoren bleiben zu identifizieren. IRESes ermöglichen in Eukaryoten die CAP-unabhängige Regulation der Translation. IRESes sind in der Regel in den 5'-UTRs bestimmter Transkripte lokalisiert. Ähnlich zur CAP-abhängigen Initiation, werden zur IRES-vermittelten Translation verschiedene Faktoren benötigt (ITAFs). Diese sind für die Rekrutierung des Ribosoms und zur Initiation der Proteinbiosynthese notwendig (Spriggs *et al.*, 2005). Wie ITAFs die IRES-abhängige Translation ermöglichen und wie die Aktivität dieser Proteine reguliert wird ist noch unbekannt. Es kann angenommen

werden, das die Aktivität der ITAFs über ihre subzelluläre Lokalisierung reguliert wird (Lewis *et al.*, 2007).

A



B

Mechanismus der Initiation	Vorkommen	Wichtige Merkmale	beteiligte ribosomale Untereinheit (UE)
SD	Bakterien; (Archaea)	Wechselwirkung von SD-Sequenz und 3'-Ende der 16S rRNA	kleine UE
Scanning	Eukaryoten	CAP-Struktur und Scanning der 5'-UTR	kleine UE
ohne 5'-UTR	Archaea; (Bakterien); (Eukaryoten)	direkte Bindung undissoziierter Ribosomen und tRNA _i	undissoziiertes Ribosom
IRES	eukaryotische Viren; Eukaryoten	IRES-vermittelte direkte Bindung des Ribosom am Startkodon	kleine UE
neuer Mechanismus	Haloarchaea; ?	direkte Erkennung des Startkodons	?

Abbildung 28: Mechanismen zur Initiation der Translation

(A) Die verschiedenen Initiationsmechanismen sind schematisch dargestellt. (B) Tabelle zur Übersicht der bisher identifizierten Mechanismen zur Initiation der Translation.

Im Gegensatz zu Bakterien und Archaea benötigen Eukaryoten zur Initiation der Translation zahlreiche Faktoren. Diese tragen zur Rekrutierung des ternären 43S Komplexes (eIF2•GTP•Met-tRNA_i) am CAP der mRNA bei. Durch Unterstützung weiterer Faktoren ist dieser Komplex in der Lage die mRNA zu *scannen* (Pestova & Kolupaeva, 2002), bis die Met-tRNA_i mit dem AUG-Startkoden an der P-Bindestelle basenpaaren kann. Für Archaea ist kein *Scanning*-Prozess zur Initiation der Translation bekannt, obwohl diese mehrere Homologe zu eukaryotischen Initiationsfaktoren besitzen (Londei, 2005).

mRNAs ohne 5'-UTRs wurden in Archaea, Bakterien und Eukaryoten identifiziert (Brenneis *et al.*, 2007; Jones *et al.*, 2008; Mowatt *et al.*, 1991; Weiner *et al.*, 2000) und werden universell von pro- und eukaryotischen Ribosomen translatiert (Grill *et al.*, 2000). *Sulfolobus* 30S Ribosomen konnten zusammen mit der tRNA_i und Transkripten ohne 5'-UTR binäre Komplexe bilden (Benelli *et al.*, 2003). Es kann angenommen werden, dass die Initiation dieser mRNAs durch die direkte Bindung undissoziierter Ribosomen und der Initiator-tRNA erfolgt (Andreev *et al.*, 2006; Moll *et al.*, 2004).

Diese Arbeit und vorherige Studien zeigen, dass in Archaea drei verschiedene Mechanismen zur Initiation der Translation existieren: (1) einer des bakteriellen Typs mit SD-Motiven, (2) ein für alle Domänen des Lebens universeller Mechanismus der die Bindung undissoziierter Ribosomen an das 5'-Ende von Transkripten ohne 5'-UTR beinhaltet, und (3) ein bisher unbekannter Mechanismus, der die Initiation der Translation bei Transkripten mit 5'-UTR ohne SD-Sequenz erlaubt.

5. Regulation der Translation in *H. volcanii*

Globale Analysen der Translationsregulation mit den Spezies *H. salinarum* und *H. volcanii* ergaben, dass mehr als 20% aller Gene aus *H. salinarum* und 16% aller Gene aus *H. volcanii* mit verschiedenen Effizienzen Wachstumsphasen-abhängig im Vergleich zum Durchschnitt aller Gene translatiert werden (Lange *et al.*, 2007). Ähnliche Ergebnisse konnten bereits für Eukaryoten ermittelt werden (Preiss *et al.*, 2003). Allerdings konnten keine konservierten translationsregulierten Gene

zwischen den haloarchaealen Organismen *H. volcanii* und *H. salinarum* identifiziert werden (Lange *et al.*, 2007). Es ist anzunehmen, dass zumindest in Haloarchaea die differentielle Regulation der Translation eine wichtige Rolle bei der kontrollierten Genexpression spielt. Bis heute ist allerdings ungeklärt, ob dies auch für andere Archaea und Bakterien angenommen werden kann.

Zur Studie der Wachstumsphasen-abhängigen Regulation der Translation in *H. volcanii* wurden zwei Gene, ein „*hoxA like transcriptional regulator*“ (*hlr*) und ein „*conserved hypothetical protein*“ (*hp*), untersucht. Globale Translatom Analysen zeigten bereits eine Wachstumsphasen-abhängige Regulation der Translation für beide Gene (Lange *et al.*, 2007). Das *hlr-Gen* zeigte eine Repression der Translation in der exponentiellen Wachstumsphase, während das *hp-Gen* in der stationären Wachstumsphase reprimiert war.

Für beide Beispiele war die Fusion der nativen 5'-UTR oder 3'-UTR separat an das Reporter-gen nicht ausreichend, um eine Wachstumsphasen-abhängige Regulation der Translation hervorzurufen. Erst die Fusion von beiden, 5'- und 3'-UTR, führte zu einer Wachstumsphasen-abhängigen Regulation der Translation. Dies impliziert eine Kommunikation der 5'- und 3'-UTR. Durch den Austausch der 5'- und 3'-UTRs des *hlr-Gens* und des *hp-Gens* stellte sich heraus, dass die 3'-UTR für die Regulation der Translation verantwortlich ist. Dies könnte durch 3'-UTR bindende regulatorische Proteine oder kleine nichtkodierende RNAs (ncRNAs) geschehen, die die Richtung und die Effizienz der Translation bestimmen. Die 5'-UTR spielt ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Regulation der Translation. Die Kombination von 5'-UTRs mit Haarnadelstrukturen verschiedener Stabilität und einer nativen 3'-UTR implizierte, dass die 5'-UTR für ein generelles Herabsetzen der Translationseffizienz notwendig ist. Durch 3'-UTR bindende Faktoren könnte dann die Effizienz der Translation selektiv aktiviert werden. Eine Destabilisierung der nativen Haarnadelstruktur in der 5'-UTR führte zwar zu einer effizienteren Initiation der Translation, hob aber so den reprimierenden Effekt zur Regulation der Translation auf. Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass sowohl 5'- als auch 3'-UTR essentiell für die Wachstumsphasen-abhängige Regulation der Translation in *H. volcanii* sind. Dies legt eine Interaktion beider UTRs nahe. Die Richtung der Wachstumsphasen-abhängigen Regulation der Translation wird dabei durch die 3'-UTRs festgelegt. Daher ist anzunehmen, dass

die 3'-UTRs Erkennungselemente für regulatorische Proteine oder ncRNAs enthalten müssen. Ein Modell zur Wachstumsphasen-abhängigen Regulation der Translation ist in Abbildung 29 dargestellt.

Die Bindung putativer Regulatoren könnte die Initiation der Translation am 5'-Ende stimulieren. Die Regulation der Translation über 3'-UTR bindende Faktoren ist in Eukaryoten bereits gut untersucht und es existieren zahlreiche Beispiele (de Moor *et al.*, 2005; Sonenberg, 1994; Wilkie *et al.*, 2003). Voraussetzung für dieses Modell zur Regulation der Translation ist eine Zirkularisierung des Transkripts durch die Interaktion von regulatorischen Proteinen am 3'-Ende mit Translationsinitiationsfaktoren am 5'-Ende der mRNA (Abbildung 29).

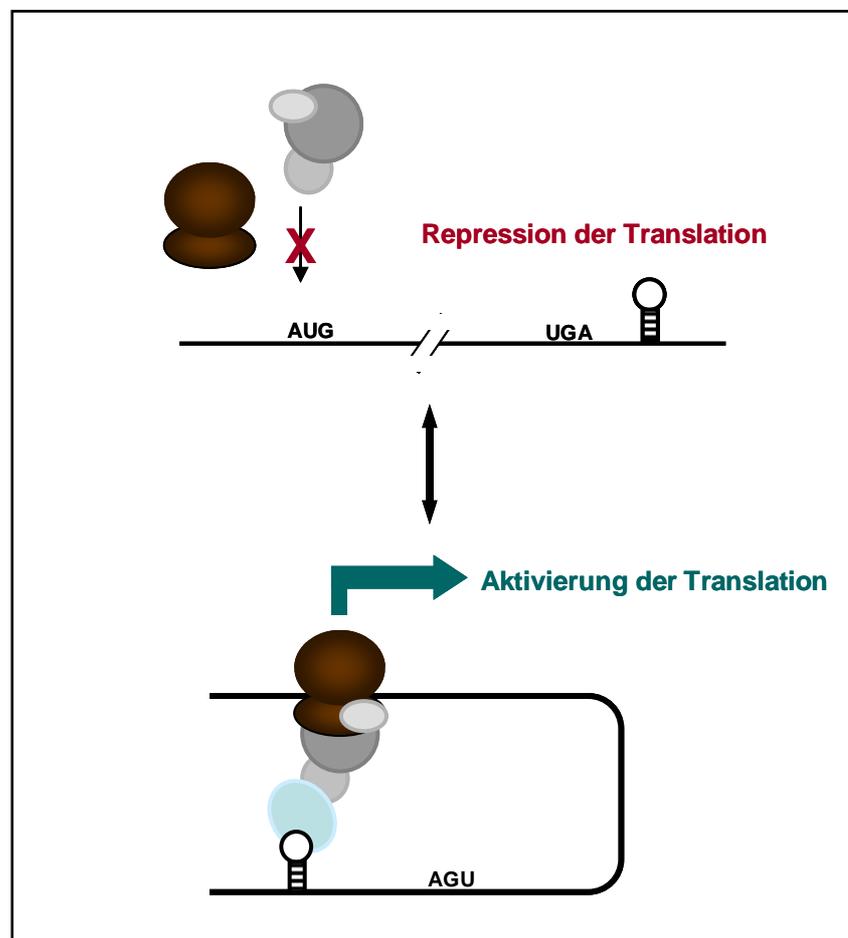


Abbildung 29: Modell zur haloarchaealen Regulation der Translation

Für die Wachstumsphasen-abhängige Regulation der Translation in *H. volcanii* sind beide, 5'-UTR und 3'-UTR, notwendig, was eine Interaktion beider UTRs voraussetzt. Diese Interaktion könnte durch *trans*-agierende Faktoren, die an spezifische Sequenz- oder Strukturelemente in der 3'-UTR binden, erfolgen. Die Bindung regulatorischer Proteine könnte so die Anlagerung des Ribosoms zur Initiation der Translation stimulieren.

Man nimmt an, dass in Eukaryoten zur Initiation der Translation die Interaktion des „poly(A) binding protein“ (PABP) und der 5'-CAP Struktur essentiell ist und daher die mRNA zirkulär vorliegen muss (Sonenberg & Hinnebusch, 2007). Die physikalische Zirkularisierung von mRNA/PABP-Komplexen konnte bereits durch Rasterkraftmikroskopie (*atomic force microscopy*; AFM) dargestellt werden (Wells *et al.*, 1998). Da für eine effektive Reinitiation der Translation eine räumliche Nähe der 5'- (Initiationsstelle) und 3'-Enden (Terminationsstelle) der mRNA von Vorteil wäre, könnte sich eine Zirkularisierung der mRNA positiv auf die Effizienz der Translation auswirken. Das in dieser Arbeit beschriebene Regulationsmodell ist der erste Hinweis auf eine direkte bzw. indirekte Interaktion der 5'- und 3'-Enden von Transkripten zur Regulation der Translation in Prokaryoten.

Die Translation wird meistens auf Ebene der Translationsinitiation blockiert. Dabei verhindern Sekundärstrukturen, kleine regulatorische RNAs oder transgierende Proteinfaktoren den Zugang zur Initiationsstelle (Kozak, 2005). Das phylogenetisch konservierte bakterielle RNA-Chaperon Hfq vermittelt die Interaktion mit nichtkodierenden regulatorischen RNAs und der Ziel-mRNAs (Valentin-Hansen *et al.*, 2004). Hfq bindet dabei an die 5'-UTR der *hfq*-mRNA und verhindert die Bindung des Initiationskomplexes (Vecerek *et al.*, 2005). Das SM-ähnliche Hfq-Protein ist neben der Thymidylatsynthase 1 einer der wenigen putativen Regulatoren der Translation, die in Archaea identifiziert werden konnten (Kanai *et al.*, 2006; Nielsen *et al.*, 2007). Weitere Analysen ergaben, dass *E. coli* Hfq und *M. jannaschii* Hfq sehr ähnliche biochemische und biologische Eigenschaften besitzen, und funktionell austauschbar sind (Nielsen *et al.*, 2007). In *H. volcanii* konnte ein Sm-Protein durch bioinformatische Analysen identifiziert werden (A. Marchfelder, Ulm, unveröffentlicht; Straub *et al.*, in Vorbereitung), das hohe Sequenzähnlichkeiten mit eukaryotischen, bakteriellen und archaealen LSM-Proteinen aufweist. Eine Rolle der Sm- bzw. Hfq-Proteine bei der Regulation der Translation in Archaea ist daher anzunehmen. Außerdem ist die Regulation der Translation durch kleine ncRNAs in Archaea seit der Identifizierung von ncRNAs in verschiedenen Spezies nicht mehr auszuschließen (Gaspin *et al.*, 2000; Klein *et al.*, 2002; Omer *et al.*, 2000; Tang *et al.*, 2002; Tang *et al.*, 2005). So konnte in *S. solfataricus* konnten ncRNAs identifiziert werden, die ähnlich zu den eukaryotischen miRNAs an

Zielsequenzen in den 3'-UTRs von mRNAs binden können (Tang *et al.*, 2005). In *H. volcanii* konnten bislang 21 intergenische kleine RNAs, 49 mit ORFs überlappende und 18 zu ORFs komplementäre kleine RNAs identifiziert werden (A. Marchfelder, Ulm, unveröffentlicht; Straub *et al.*, in Vorbereitung). Die Funktion archaealer ncRNAs muss noch untersucht werden. Es ist aber anzunehmen, dass archaeale ncRNAs eine Rolle bei der Regulation der Translation spielen.

Inwiefern RNA bindende Faktoren oder kleine ncRNAs eine Rolle bei der Regulation der Translation der in dieser Arbeit untersuchten Gene spielen, bleibt zu analysieren. Eine bioinformatische Studie wurde im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt, um konservierte eukaryotische 3'-UTR bindende Faktoren in *H. volcanii* zu identifizieren. Für Proteine unterschiedlicher Proteinfamilien und Spezies (*S. cerevisiae*, *S. pombe*, *A. thaliana*, *C. elegans*, *H. sapiens*) konnten keine Homologe in *H. volcanii* identifiziert werden (Daten nicht gezeigt).

Weiterhin unbekannt sind die cis-agierenden Elemente, die in die Wachstumsphasen-abhängige Regulation der Translation involviert sind. Strukturanalysen essentieller UTR-Regionen könnten neue Erkenntnisse über die haloarchaeale Regulation der Translation bringen.

Globale Analysen der Translationsregulation mit *H. salinarum* und *H. volcanii* als erste Prokaryoten ergaben, dass der Anteil regulierter Gene weitaus größer ist, als zuvor angenommen (Lange *et al.*, 2007). Um ganze Netzwerke translationsregulierter Gene, sogenannte „RNA Regulons“ zu identifizieren, sollten die Analysen auf globale haloarchaeale Stressantworten wie Hitzeschock, Kälteschock, osmotischer Schock und oxidativer Stress erweitert werden. Die Existenz „translationaler Regulons“ könnte auf globale Regulatoren der Translation hinweisen, deren Charakterisierung interessante Einblicke in die globale Regulation der Translation erlauben würde.

Im Rahmen dieser Arbeit stellte sich das *dhfr*-Reporter-gen-System als effiziente Methode zur Studie der *in vivo* Funktion haloarchaealer UTRs heraus. Da die Mehrzahl der haloarchaealen Transkripte keine 5'-UTR besitzt, wäre es interessant zu untersuchen, ob die 3'-UTRs translationsregulierter Transkripte ohne 5'-UTR allein ausreichend sind, um eine differentielle Regulation der

Translation zu vermitteln, oder ob bei Transkripten ohne 5'-UTR zusätzlich Regionen am 5'-Ende des ORFs notwendig für diesen Prozess sind.

6. Konditionale Genexpression in *H. volcanii*

Ein System, dass durch die simple Änderung der Wachstumsbedingungen die Kontrolle der archaealen Genexpression erlaubt, würde die Konstruktion konditional letaler Mutanten und die regulierte Überexpression von Proteinen in ihrem nativen Wirt erlauben. Bisher wurden verschiedene Promotoren für Expressions- und Transkriptionsstudien in halophilen Archaea verwendet (Danner & Soppa, 1996; Gregor & Pfeifer, 2005). Jedoch waren bis vor Kurzem keine Beispiele von Promotoren vorhanden, die einfach durch Medienzusätze an- oder abgeschaltet werden konnten, und deren basale Aktivität effektiv „Null“ beträgt. Large *et al.* identifizierten 2007 den ersten und bisher einzigen induzierbaren Promotor für *H. volcanii* (Large *et al.*, 2007).

Artifizielle konditionale Aptamere und Ribozyme können zur Regulation der Genexpression in Bakterien und Eukaryoten herangezogen werden (Suess & Weigand, 2008). Bisher wurde die Anwendbarkeit dieser induzierbaren Elemente zur konditionalen Genexpression nicht in Archaea getestet. In einer Zusammenarbeit mit der AG Süß, Universität Frankfurt, wurden erste Studien zur Anwendbarkeit artifizieller Aptamere und Ribozyme in Haloarchaea gestartet.

6.1 Konditionale Genexpression durch ein Tetracyclin-abhängiges Aptamer

Die Arbeitsgruppe von Prof. B. Süß hat erfolgreich ein artifizielles Aptamer entwickelt, das Tetracyclin-abhängig die Translation bzw. das Spleißen verhindern kann (Muller *et al.*, 2006; Suess *et al.*, 2003; Weigand & Suess, 2007). Das Aptamer bindet Tetracyclin *in vitro* mit einer sehr hohen Affinität von 770 pM (Muller *et al.*, 2006). Dies ist für artifizielle Aptamere und kleine Ligandenmoleküle ungewöhnlich stark. In *S. cerevisiae* wurde das Aptamer schon erfolgreich als regulatorisches Werkzeug zur konditionalen Genexpression eingesetzt (Suess *et al.*, 2003; Weigand & Suess, 2007).

In Zusammenarbeit sollte getestet werden, ob die konditionalen Aptamere auch in Archaea anwendbar sind. Da Archaea nicht sensitiv auf Tetracyclin reagieren, scheinen sie die idealen Wirtsorganismen für Tetracyclin-abhängige Prozesse darzustellen. Das Tetracyclin-induzierbare Aptamer und eine artifizielle 5'-UTR mit hoher Translationseffizienz wurden kombiniert vor das *dhfr*-Reportergen inseriert. Alternativ wurde das Aptamer ohne zusätzliche 5'-UTR direkt an das 5'-Ende der *dhfr* fusioniert und die Translationseffizienzen mit und ohne Tetracyclin kalkuliert.

Die Ergebnisse zeigten, dass die Aptamerstrukturen in *H. volcanii* unabhängig von der An- bzw. Abwesenheit des Tetracyclins ausgebildet werden. Zur Faltung von Nukleinsäuren in kompakte, stabile Strukturen ist die Neutralisierung des negativ geladenen Phosphatrückgrates durch Kationen notwendig. Dies geschieht durch die spezifische Assoziation mono- und divalenter Kationen (Shiman & Draper, 2000). Dabei ist die Fähigkeit von Alkalimetallkationen zur Stabilisierung tertiärer tRNA Strukturen unterschiedlich ($\text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Cs}^+$; Heerschap *et al.*, 1985; Urbanke *et al.*, 1975). K^+ ist für die spezifische Bindung an G-Tetraplex Strukturen bekannt (Phillips *et al.*, 1997). Da bekannt ist, dass halophile Archaea bis zu 1M NaCl und 4 M KCl in ihrem Zellinneren anreichern, ist anzunehmen, dass diese hohen Ionenkonzentrationen zu einer erheblichen Stabilisierung von Nukleinsäurestrukturen beitragen (Christian & Waltho, 1962). Dies könnte die Ausbildung struktureller Elemente des artifiziellen Aptamers *H. volcanii* auch ohne Stabilisierung durch Tetracyclin bewirken. Zur Anwendbarkeit des Tetracyclin-induzierbaren Aptamers in *H. volcanii* muss das Aptamer daher speziell auf den halophilen Organismus und die salzhaltige Umgebung angepasst werden. Eine Destabilisierung des P1 Stammes könnte eine Tetracyclin-abhängige Induktion des inhibitorischen Strukturelementes erlauben. Für *S. cerevisiae* konnte gezeigt werden, dass eine Destabilisierung des P1 Stammes mit einer Erhöhung der Gesamtexpression einherging. Dabei wurde der Regulationsgrad allerdings reduziert (Suess *et al.*, 2003).

Die Fusion des Aptamers direkt stromaufwärts des Startkodons hatte sowohl bei Kombination mit der artifiziellen 5'-UTR, als auch ohne 5'-UTR eine totale Repression der Translation zur Folge. Die Insertion des Tetracyclin-abhängigen Aptamers an das 5'-Ende der 5'-UTR hatte dagegen im Vergleich zum

Kontrolltranskript mit 5'-UTR ohne Aptamer, keinen Einfluss auf die Translationseffizienz. In *S. cerevisiae* konnte für das Tetracyclin-Aptamer ebenfalls eine positionsabhängige Veränderung der Expressionsstärke nachgewiesen werden (Suess *et al.*, 2003). *In vivo* Studien in *S. cerevisiae* zeigten, dass die AUG-nahe Insertion des Aptamers die basale Expression um den Faktor zwei reprimierte verglichen zur CAP-nahen Insertion des Aptamers (Hanson *et al.*, 2003; Suess *et al.*, 2003). *In vitro* Studien hingegen zeigten eine erhöhte Expression bei AUG-naher Insertion verglichen mit der CAP-nahen Insertion des Aptamers (Hanson *et al.*, 2003). In höheren Eukaryoten sind Haarnadelstrukturen dagegen inhibitorischer wenn diese CAP-nahe positioniert sind (Kozak, 1989c), wo sie die Anlagerung der 40S ribosomalen Untereinheit verhindern der Insertion von Haarnadelstrukturen an der CAP-Struktur. Es kann angenommen werden, dass Strukturen an dieser Position die Anlagerung der 40S ribosomalen Untereinheit verhindern (Kozak, 1989a). Koloteva *et al.* postulieren, dass Unterschiede der Translatierbarkeit strukturierter mRNAs zwischen höheren und niederen Eukaryoten Unterschiede des Translationsapparates reflektieren (Koloteva *et al.*, 1997). Archaeale mRNAs besitzen keine CAP-Struktur. Archaeale Initiationsfaktoren die homolog zu eukaryotischen CAP-bindenden Initiationsfaktoren sind konnten in Archaea ebenfalls nicht identifiziert werden (Londei, 2005). Ein eukaryotischer *Scanning*-Mechanismus ist somit unwahrscheinlich für Archaea. Zusammengefasst kann daher für *H. volcanii* ein für Archaea bisher unbekannter Mechanismus zur Initiation der Translation angenommen werden (siehe auch Kapitel 4.3 der Diskussion).

Die Integration des Aptamers direkt am Startkodon und die damit verbundene vollständige Repression der Translation können als Ansatzpunkt zur Optimierung des Systems zur konditionalen Genexpression dienen. Durch Destabilisierung des P1 Stammes des Aptamers könnte die Stabilisierung des Aptamers durch Tetracyclin eingeführt werden, was die Grundlage für ein konditionales System zur Regulation der Genexpression bildet.

6.2 Anwendung von *Hammerhead*-Ribozymen

Um die *in vivo* Funktion allosterischer Ribozyme, sogenannter Aptazyme, als konditionales System zur regulierten Genexpression in Archaea zu testen, wurde zunächst die *in vivo* Aktivität eines nativen *Hammerhead*-Ribozyms in *H. volcanii* untersucht. Das selbstspaltende *Hammerhead*-Ribozym N79 aus *S. mansoni* wurde als Vorlage gewählt, da die Funktion dieses Ribozyms bereits *in vivo* für verschiedene tierische Zelltypen bestätigt werden konnte (Yen *et al.*, 2004). Im Rahmen dieser Arbeit wurde das translationale Startkodon direkt stromabwärts der Spaltstelle in den Stamm I des *Hammerhead*-Ribozyms eingefügt. Zum Einfügen des Startkodons in den Stamm I des *Hammerhead* war das Anfügen zusätzlicher Nukleotide an den N-Terminus des *dhfr*-Reportergens notwendig. Als Kontrollen dienten Varianten ohne *Hammerhead*-Struktur und mit inaktivem Ribozym.

Die ursprüngliche Strategie zur Kontrolle der Genexpression durch das selbstspaltende Ribozym beruht auf einer Degradation der Ziel-RNA oder dem Verdecken funktionaler RNA Elemente. (Ogawa & Maeda, 2008; Wieland & Hartig, 2008; Yen *et al.*, 2004). In *H. volcanii* sollte das translationale Startkodon durch die Insertion des *Hammerhead*-Ribozyms verdeckt, und so Initiation der Translation verhindert werden. Durch die Spaltung des *Hammerhead* käme es zur Freilegung des Startkodons, was die Initiation der Translation erlaubt.

Die *Hammerhead*-Kontrollvariante mit zusätzlichen Aminosäuren am N-Terminus zeigte eine hohe Enzymaktivität verglichen mit der ursprünglichen Kontrollvariante ohne 5'-UTR. Dies kann mehrere mögliche Ursachen haben: (1) Es ist bekannt, dass die Beschaffenheit des N-Terminus die Stabilität von Proteinen entscheidend beeinflussen kann (Mogk *et al.*, 2007), (2) die hohe Enzymaktivität kann durch eine bessere Translatierbarkeit verursacht werden oder (3) die Wechselzahl des Reporterenzym ist durch die Fusion zusätzlicher Aminosäuren erhöht.

Die Transkriptstabilität nahm durch die Fusion der *Hammerhead* Ribozym Varianten im Vergleich zur Kontrollvariante ohne 5'-UTR um den Faktor zwei ab. Dies bestätigt erneut die Annahme, dass 5'-UTRs einen Einfluss auf die Transkriptstabilität in *H. volcanii* haben (siehe Kapitel 3.2 der Diskussion). Für die Variante mit aktivem *Hammerhead*-Ribozym konnte eine um den Faktor 2,5

verschlechterte Translationseffizienz im Vergleich zur Kontrollvariante ohne *Hammerhead* nachgewiesen werden. Dennoch demonstrierte dieser Versuchsansatz zum ersten Mal die *in vivo* Aktivität eines *Hammerhead*-Ribozyms in Archaea, da für die inaktive Variante keine Genexpression detektiert werden konnte. Es ist daher anzunehmen, dass das Startkodon durch die Lokalisierung in Stamm I des *Hammerheads* nicht mehr frei zugänglich für den ribosomalen Komplex ist. Bei Spaltung des *Hammerheads* direkt stromaufwärts des Startkodons wird dieses freigelegt und so zugänglich für den Präinitiationskomplex, was die nachfolgende Translation erlaubt. Da die Translationseffizienz für die aktive *Hammerhead*-Variante verglichen mit der Kontrollvariante ohne *Hammerhead* signifikant schlechter ist, ist anzunehmen, dass die Spaltung des Ribozyms nur uneffektiv erfolgt. Es ist anzunehmen, dass die Basenpaarungen in Stamm I des *Hammerhead*-Ribozyms aufgrund der stabilisierenden hohen ionischen Konzentrationen ausreichend sind, um die Abdiffusion des gespaltenen *Hammerhead*-Fragments zu verhindern, was die Freigabe des Startkodons verhindern könnte.

Yen *et al.* konnten bereits zeigen, dass spezifische Modifizierungen im Stamm I nahe des katalytischen Kerns und nahe der Spaltstelle die Spalteffizienz des Ribozyms verstärken (Yen *et al.*, 2004). Ein Verkürzen des Stammes I wäre für die Anwendung des Ribozyms in *H. volcanii* sinnvoll, da der destabilisierte Stamm I möglicherweise ein schnelleres Lösen des Spaltproduktes erlauben würde. Allerdings konnte bereits gezeigt werden, dass ein Verkürzen des Stammes I auch mit einer Reduktion der Spaltaktivität des Ribozyms einhergeht (Yen *et al.*, 2004). Dies kann auf stabilisierende tertiäre Interaktionen zwischen Stamm I und III zurück geführt werden (Wieland & Hartig, 2008).

Auf *Hammerhead*-Ribozymen basierende selbstspaltende RNA wird im Allgemeinen als katalytische Domäne zur Konstruktion allosterischer Ribozyme, sogenannter Aptazyme verwendet (Breaker, 2002). Aptazyme sind chimäre Moleküle, die aus einer Aptamer Domäne und einem Ribozym Modul bestehen. Wie allosterische Enzyme kann die katalytische Aktivität durch die Bindung kleiner Liganden, Proteine oder Oligonukleotiden die allosterische Aptamer-Domäne des Aptazyms reguliert werden. Durch die Insertion von Aptazymen in eine mRNA kann die Genexpression durch RNA-Degradation oder durch die

Freilegung funktionaler Elemente gesteuert werden (Ogawa & Maeda, 2007; Yen *et al.*, 2004). Aufgrund der im Rahmen dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse ist gezeigt, dass *Hammerhead*-Ribozyme einen neuen potentiellen RNA-basierenden Mechanismus zur Kontrolle der Genexpression in halophilen Archaea darstellen.

VI. Literaturverzeichnis

Ainger, K., Avossa, D., Diana, A. S., Barry, C., Barbarese, E. & Carson, J. H. (1997). Transport and localization elements in myelin basic protein mRNA. *J Cell Biol* **138**, 1077-1087.

Allers, T. & Mevarech, M. (2005). Archaeal genetics - the third way. *Nat Rev Genet* **6**, 58-73.

Amend, J. P. & Shock, E. L. (2001). Energetics of overall metabolic reactions of thermophilic and hyperthermophilic Archaea and bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **25**, 175-243.

Andreev, D. E., Terenin, I. M., Dunaevsky, Y. E., Dmitriev, S. E. & Shatsky, I. N. (2006). A leaderless mRNA can bind to mammalian 80S ribosomes and direct polypeptide synthesis in the absence of translation initiation factors. *Mol Cell Biol* **26**, 3164-3169.

Aravind, L. & Koonin, E. V. (1999). DNA-binding proteins and evolution of transcription regulation in the archaea. *Nucleic Acids Res* **27**, 4658-4670.

Bailey, T. L. & Elkan, C. (1994). Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol* **2**, 28-36.

Baim, S. B. & Sherman, F. (1988). mRNA structures influencing translation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **8**, 1591-1601.

Baird, S. D., Turcotte, M., Korneluk, R. G. & Holcik, M. (2006). Searching for IRES. *Rna* **12**, 1755-1785.

Baker, C. S., Eory, L. A., Yakhnin, H., Mercante, J., Romeo, T. & Babitzke, P. (2007). CsrA inhibits translation initiation of *Escherichia coli* hfq by binding to a single site overlapping the Shine-Dalgarno sequence. *J Bacteriol* **189**, 5472-5481.

Baliga, N. S., Goo, Y. A., Ng, W. V., Hood, L., Daniels, C. J. & DasSarma, S. (2000). Is gene expression in *Halobacterium* NRC-1 regulated by multiple TBP and TFB transcription factors? *Mol Microbiol* **36**, 1184-1185.

Barns, S. M., Delwiche, C. F., Palmer, J. D. & Pace, N. R. (1996). Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 9188-9193.

Bartlett, M. S. (2005). Determinants of transcription initiation by archaeal RNA polymerase. *Curr Opin Microbiol* **8**, 677-684.

- Bashirullah, A., Cooperstock, R. L. & Lipshitz, H. D. (2001).** Spatial and temporal control of RNA stability. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 7025-7028.
- Bell, S. D. & Jackson, S. P. (1998).** Transcription and translation in Archaea: a mosaic of eukaryal and bacterial features. *Trends Microbiol* **6**, 222-228.
- Bell, S. D., Cairns, S. S., Robson, R. L. & Jackson, S. P. (1999a).** Transcriptional regulation of an archaeal operon in vivo and in vitro. *Mol Cell* **4**, 971-982.
- Bell, S. D., Kosa, P. L., Sigler, P. B. & Jackson, S. P. (1999b).** Orientation of the transcription preinitiation complex in archaea. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 13662-13667.
- Bell, S. D. & Jackson, S. P. (2001).** Mechanism and regulation of transcription in archaea. *Curr Opin Microbiol* **4**, 208-213.
- Bell, S. D., Magill, C. P. & Jackson, S. P. (2001).** Basal and regulated transcription in Archaea. *Biochem Soc Trans* **29**, 392-395.
- Benelli, D., Maone, E. & Londei, P. (2003).** Two different mechanisms for ribosome/mRNA interaction in archaeal translation initiation. *Mol Microbiol* **50**, 635-643.
- Betlach, M., Friedman, J., Boyer, H. W. & Pfeifer, F. (1984).** Characterization of a halobacterial gene affecting bacterio-opsin gene expression. *Nucleic Acids Res* **12**, 7949-7959.
- Bilanges, B. & Stokoe, D. (2007).** Mechanisms of translational deregulation in human tumors and therapeutic intervention strategies. *Oncogene* **26**, 5973-5990.
- Birnboim, H. C. & Doly, J. (1979).** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513-1523.
- Bitan-Banin, G., Ortenberg, R. & Mevarech, M. (2003).** Development of a gene knockout system for the halophilic archaeon *Haloferax volcanii* by use of the *pyrE* gene. *J Bacteriol* **185**, 772-778.
- Blanck, A. & Oesterhelt, D. (1987).** The halo-opsin gene. II. Sequence, primary structure of halorhodopsin and comparison with bacteriorhodopsin. *Embo J* **6**, 265-273.
- Boileau, G., Butler, P., Hershey, J. W. & Traut, R. R. (1983).** Direct cross-links between initiation factors 1, 2, and 3 and ribosomal proteins promoted by 2-iminothiolane. *Biochemistry* **22**, 3162-3170.
- Breaker, R. R. (2002).** Engineered allosteric ribozymes as biosensor components. *Curr Opin Biotechnol* **13**, 31-39.

- Brenneis, M., Hering, O., Lange, C. & Soppa, J. (2007).** Experimental Characterization of Cis-Acting Elements Important for Translation and Transcription in Halophilic Archaea. *PLoS Genet* **3**, e229.
- Bullock, W. O., Fernandez, J. M. & short, J. M. (1987).** XL1-blue a high efficiency plasmid transforming recA Escherichia coli strain with beta galactosidase selection. *BioTechniques* **5**, 376-377.
- Burke, D. H. & Gold, L. (1997).** RNA aptamers to the adenosine moiety of S-adenosyl methionine: structural inferences from variations on a theme and the reproducibility of SELEX. *Nucleic Acids Res* **25**, 2020-2024.
- Celesnik, H., Deana, A. & Belasco, J. G. (2007).** Initiation of RNA decay in Escherichia coli by 5' pyrophosphate removal. *Mol Cell* **27**, 79-90.
- Chabanon, H., Mickleburgh, I. & Hesketh, J. (2004).** Zipcodes and postage stamps: mRNA localisation signals and their trans-acting binding proteins. *Brief Funct Genomic Proteomic* **3**, 240-256.
- Chan, A. P., Kloc, M. & Etkin, L. D. (1999).** fatvg encodes a new localized RNA that uses a 25-nucleotide element (FVLE1) to localize to the vegetal cortex of Xenopus oocytes. *Development* **126**, 4943-4953.
- Chang, B., Halgamuge, S. & Tang, S. L. (2006).** Analysis of SD sequences in completed microbial genomes: non-SD-led genes are as common as SD-led genes. *Gene* **373**, 90-99.
- Chappell, S. A., LeQuesne, J. P., Paulin, F. E., deSchoolmeester, M. L., Stoneley, M., Soutar, R. L., Ralston, S. H., Helfrich, M. H. & Willis, A. E. (2000).** A mutation in the c-myc-IRES leads to enhanced internal ribosome entry in multiple myeloma: a novel mechanism of oncogene de-regulation. *Oncogene* **19**, 4437-4440.
- Charlebois, R. L., Lam, W. L., Cline, S. W. & Doolittle, W. F. (1987).** Characterization of pHV2 from Halobacterium volcanii and its use in demonstrating transformation of an archaebacterium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 8530-8534.
- Chartrand, P., Meng, X. H., Huttelmaier, S., Donato, D. & Singer, R. H. (2002).** Asymmetric sorting of ash1p in yeast results from inhibition of translation by localization elements in the mRNA. *Mol Cell* **10**, 1319-1330.
- Chaudhuri, J., Si, K. & Maitra, U. (1997).** Function of eukaryotic translation initiation factor 1A (eIF1A) (formerly called eIF-4C) in initiation of protein synthesis. *J Biol Chem* **272**, 7883-7891.
- Cheah, M. T., Wachter, A., Sudarsan, N. & Breaker, R. R. (2007).** Control of alternative RNA splicing and gene expression by eukaryotic riboswitches. *Nature* **447**, 497-500.

- Chen, H., Bjerknes, M., Kumar, R. & Jay, E. (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**, 4953-4957.
- Chen, X., Hiller, M., Sancak, Y. & Fuller, M. T. (2005).** Tissue-specific TAFs counteract Polycomb to turn on terminal differentiation. *Science* **310**, 869-872.
- Choi, S. K., Olsen, D. S., Roll-Mecak, A., Martung, A., Remo, K. L., Burley, S. K., Hinnebusch, A. G. & Dever, T. E. (2000).** Physical and functional interaction between the eukaryotic orthologs of prokaryotic translation initiation factors IF1 and IF2. *Mol Cell Biol* **20**, 7183-7191.
- Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987).** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**, 156-159.
- Chowdhury, S., Maris, C., Allain, F. H. & Narberhaus, F. (2006).** Molecular basis for temperature sensing by an RNA thermometer. *Embo J* **25**, 2487-2497.
- Christian, J. H. & Waltho, J. A. (1962).** Solute concentrations within cells of halophilic and non-halophilic bacteria. *Biochim Biophys Acta* **65**, 506-508.
- Chu, C. Y. & Rana, T. M. (2007).** Small RNAs: regulators and guardians of the genome. *J Cell Physiol* **213**, 412-419.
- Cline, S. W., Lam, W. L., Charlebois, R. L., Schalkwyk, L. C. & Doolittle, W. F. (1989).** Transformation methods for halophilic archaeobacteria. *Can J Microbiol* **35**, 148-152.
- Cobucci-Ponzano, B., Conte, F., Benelli, D., Londei, P., Flagiello, A., Monti, M., Pucci, P., Rossi, M. & Moracci, M. (2006).** The gene of an archaeal alpha-L-fucosidase is expressed by translational frameshifting. *Nucleic Acids Res* **34**, 4258-4268.
- Cohen-Kupiec, R., Blank, C. & Leigh, J. A. (1997).** Transcriptional regulation in Archaea: in vivo demonstration of a repressor binding site in a methanogen. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 1316-1320.
- Coker, J. A. & DasSarma, S. (2007).** Genetic and transcriptomic analysis of transcription factor genes in the model halophilic Archaeon: coordinate action of TbpD and TfbA. *BMC Genet* **8**, 61.
- Condo, I., Ciammaruconi, A., Benelli, D., Ruggero, D. & Londei, P. (1999).** Cis-acting signals controlling translational initiation in the thermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Mol Microbiol* **34**, 377-384.

- Conne, B., Stutz, A. & Vassalli, J. D. (2000).** The 3' untranslated region of messenger RNA: A molecular 'hotspot' for pathology? *Nat Med* **6**, 637-641.
- Cozzarelli, N. R., Gerrard, S. P., Schlissel, M., Brown, D. D. & Bogenhagen, D. F. (1983).** Purified RNA polymerase III accurately and efficiently terminates transcription of 5S RNA genes. *Cell* **34**, 829-835.
- Danner, S. & Soppa, J. (1996).** Characterization of the distal promoter element of halobacteria in vivo using saturation mutagenesis and selection. *Mol Microbiol* **19**, 1265-1276.
- de Moor, C. H., Meijer, H. & Lissenden, S. (2005).** Mechanisms of translational control by the 3' UTR in development and differentiation. *Semin Cell Dev Biol* **16**, 49-58.
- De Rosa, M., Gambacorta, A. & Gliozzi, A. (1986).** Structure, biosynthesis, and physicochemical properties of archaeobacterial lipids. *Microbiol Rev* **50**, 70-80.
- DeLong, E. F. & Pace, N. R. (2001).** Environmental diversity of bacteria and archaea. *Syst Biol* **50**, 470-478.
- Dennis, P. P. (1997).** Ancient ciphers: translation in Archaea. *Cell* **89**, 1007-1010.
- Dennis, P. P. & Omer, A. (2005).** Small non-coding RNAs in Archaea. *Curr Opin Microbiol* **8**, 685-694.
- Dunn, R., McCoy, J., Simsek, M., Majumdar, A., Chang, S. H., Rajbhandary, U. L. & Khorana, H. G. (1981).** The bacteriorhodopsin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 6744-6748.
- Elevi Bardavid, R., Khristo, P. & Oren, A. (2008).** Interrelationships between Dunaliella and halophilic prokaryotes in saltern crystallizer ponds. *Extremophiles* **12**, 5-14.
- Ellington, A. D. & Szostak, J. W. (1990).** In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* **346**, 818-822.
- Facciotti, M. T., Reiss, D. J., Pan, M. & other authors (2007).** General transcription factor specified global gene regulation in archaea. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 4630-4635.
- French, S. L., Santangelo, T. J., Beyer, A. L. & Reeve, J. N. (2007).** Transcription and translation are coupled in Archaea. *Mol Biol Evol* **24**, 893-895.
- Gaspin, C., Cavaille, J., Erauso, G. & Bachellerie, J. P. (2000).** Archaeal homologs of eukaryotic methylation guide small nucleolar RNAs: lessons from the Pyrococcus genomes. *J Mol Biol* **297**, 895-906.

Geiduschek, E. P. & Ouhammouch, M. (2005). Archaeal transcription and its regulators. *Mol Microbiol* **56**, 1397-1407.

Gerber, A. P., Herschlag, D. & Brown, P. O. (2004). Extensive association of functionally and cytologically related mRNAs with Puf family RNA-binding proteins in yeast. *PLoS Biol* **2**, E79.

Gorodkin, J., Heyer, L. J., Brunak, S. & Stormo, G. D. (1997). Displaying the information contents of structural RNA alignments: the structure logos. *Comput Appl Biosci* **13**, 583-586.

Gottesman, S. (2005). Micros for microbes: non-coding regulatory RNAs in bacteria. *Trends Genet* **21**, 399-404.

Graber, T. E., Lewis, S. M. & Holcik, M. (2006). An approach to whole-genome identification of IRES elements. *Curr Genomics* **7**, 205-215.

Graber, T. E. & Holcik, M. (2007). Cap-independent regulation of gene expression in apoptosis. *Mol Biosyst* **3**, 825-834.

Grabowski, B. & Kelman, Z. (2003). Archeal DNA replication: eukaryal proteins in a bacterial context. *Annu Rev Microbiol* **57**, 487-516.

Gregor, D. & Pfeifer, F. (2005). In vivo analyses of constitutive and regulated promoters in halophilic archaea. *Microbiology* **151**, 25-33.

Grill, S., Gualerzi, C. O., Londei, P. & Blasi, U. (2000). Selective stimulation of translation of leaderless mRNA by initiation factor 2: evolutionary implications for translation. *Embo J* **19**, 4101-4110.

Grill, S., Moll, I., Giuliadori, A. M., Gualerzi, C. O. & Blasi, U. (2002). Temperature-dependent translation of leaderless and canonical mRNAs in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* **211**, 161-167.

Gualerzi, C. O. & Pon, C. L. (1990). Initiation of mRNA translation in prokaryotes. *Biochemistry* **29**, 5881-5889.

Hamada, M., Sakulich, A. L., Koduru, S. B. & Maraia, R. J. (2000). Transcription termination by RNA polymerase III in fission yeast. A genetic and biochemically tractable model system. *J Biol Chem* **275**, 29076-29081.

Hammann, C. & Lilley, D. M. (2002). Folding and activity of the hammerhead ribozyme. *ChemBiochem* **3**, 690-700.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-580.

- Hansen, S. K., Takada, S., Jacobson, R. H., Lis, J. T. & Tjian, R. (1997).** Transcription properties of a cell type-specific TATA-binding protein, TRF. *Cell* **91**, 71-83.
- Hanson, S., Berthelot, K., Fink, B., McCarthy, J. E. & Suess, B. (2003).** Tetracycline-aptamer-mediated translational regulation in yeast. *Mol Microbiol* **49**, 1627-1637.
- Hanson, S., Bauer, G., Fink, B. & Suess, B. (2005).** Molecular analysis of a synthetic tetracycline-binding riboswitch. *Rna* **11**, 503-511.
- Heerschap, A., Walters, J. A. & Hilbers, C. W. (1985).** Interactions of some naturally occurring cations with phenylalanine and initiator tRNA from yeast as reflected by their thermal stability. *Biophys Chem* **22**, 205-217.
- Hellen, C. U. & Sarnow, P. (2001).** Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules. *Genes Dev* **15**, 1593-1612.
- Hermann, T. & Patel, D. J. (2000).** Adaptive recognition by nucleic acid aptamers. *Science* **287**, 820-825.
- Hofacker, A., Schmitz, K. M., Cichonczyk, A., Sartorius-Neef, S. & Pfeifer, F. (2004).** GvpE- and GvpD-mediated transcription regulation of the p-gvp genes encoding gas vesicles in *Halobacterium salinarum*. *Microbiology* **150**, 1829-1838.
- Hudder, A. & Werner, R. (2000).** Analysis of a Charcot-Marie-Tooth disease mutation reveals an essential internal ribosome entry site element in the connexin-32 gene. *J Biol Chem* **275**, 34586-34591.
- Huet, J., Schnabel, R., Sentenac, A. & Zillig, W. (1983).** Archaeobacteria and eukaryotes possess DNA-dependent RNA polymerases of a common type. *Embo J* **2**, 1291-1294.
- Huttenhofer, A. & Noller, H. F. (1994).** Footprinting mRNA-ribosome complexes with chemical probes. *Embo J* **13**, 3892-3901.
- Jackson, R. J. (2005).** Alternative mechanisms of initiating translation of mammalian mRNAs. *Biochem Soc Trans* **33**, 1231-1241.
- Jones, C. N., Wilkinson, K. A., Hung, K. T., Weeks, K. M. & Spremulli, L. L. (2008).** Lack of secondary structure characterizes the 5' ends of mammalian mitochondrial mRNAs. *Rna* **14**, 862-871.
- Kanai, A., Sato, A., Imoto, J. & Tomita, M. (2006).** Archaeal *Pyrococcus furiosus* thymidylate synthase 1 is an RNA-binding protein. *Biochem J* **393**, 373-379.
- Kandler, O. & Konig, H. (1998).** Cell wall polymers in Archaea (Archaeobacteria). *Cell Mol Life Sci* **54**, 305-308.

Karadzic, I. M. & Maupin-Furlow, J. A. (2005). Improvement of two-dimensional gel electrophoresis proteome maps of the haloarchaeon *Haloferax volcanii*. *Proteomics* **5**, 354-359.

Kawaguchi, R., Girke, T., Bray, E. A. & Bailey-Serres, J. (2004). Differential mRNA translation contributes to gene regulation under non-stress and dehydration stress conditions in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **38**, 823-839.

Kawaguchi, R. & Bailey-Serres, J. (2005). mRNA sequence features that contribute to translational regulation in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Res* **33**, 955-965.

Keene, J. D. (2007). RNA regulons: coordination of post-transcriptional events. *Nat Rev Genet* **8**, 533-543.

Khvorova, A., Lescoute, A., Westhof, E. & Jayasena, S. D. (2003). Sequence elements outside the hammerhead ribozyme catalytic core enable intracellular activity. *Nat Struct Biol* **10**, 708-712.

Kim, Y., Geiger, J. H., Hahn, S. & Sigler, P. B. (1993). Crystal structure of a yeast TBP/TATA-box complex. *Nature* **365**, 512-520.

Klein, R. J., Misulovin, Z. & Eddy, S. R. (2002). Noncoding RNA genes identified in AT-rich hyperthermophiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 7542-7547.

Koloteva, N., Muller, P. P. & McCarthy, J. E. (1997). The position dependence of translational regulation via RNA-RNA and RNA-protein interactions in the 5'-untranslated region of eukaryotic mRNA is a function of the thermodynamic competence of 40 S ribosomes in translational initiation. *J Biol Chem* **272**, 16531-16539.

Kosa, P. F., Ghosh, G., DeDecker, B. S. & Sigler, P. B. (1997). The 2.1-Å crystal structure of an archaeal preinitiation complex: TATA-box-binding protein/transcription factor (II)B core/TATA-box. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 6042-6047.

Kozak, M. (1983). Comparison of initiation of protein synthesis in procaryotes, eucaryotes, and organelles. *Microbiol Rev* **47**, 1-45.

Kozak, M. (1986). Influences of mRNA secondary structure on initiation by eukaryotic ribosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 2850-2854.

Kozak, M. (1989a). Context effects and inefficient initiation at non-AUG codons in eucaryotic cell-free translation systems. *Mol Cell Biol* **9**, 5073-5080.

Kozak, M. (1989b). The scanning model for translation: an update. *J Cell Biol* **108**, 229-241.

Kozak, M. (1989c). Circumstances and mechanisms of inhibition of translation by secondary structure in eucaryotic mRNAs. *Mol Cell Biol* **9**, 5134-5142.

Kozak, M. (1999). Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. *Gene* **234**, 187-208.

Kozak, M. (2002). Pushing the limits of the scanning mechanism for initiation of translation. *Gene* **299**, 1-34.

Kozak, M. (2005). Regulation of translation via mRNA structure in prokaryotes and eukaryotes. *Gene* **361**, 13-37.

Kuhn, J. & Binder, S. (2002). RT-PCR analysis of 5' to 3'-end-ligated mRNAs identifies the extremities of cox2 transcripts in pea mitochondria. *Nucleic Acids Res* **30**, 439-446.

Kuo, Y. P., Thompson, D. K., St Jean, A., Charlebois, R. L. & Daniels, C. J. (1997). Characterization of two heat shock genes from *Haloferax volcanii*: a model system for transcription regulation in the Archaea. *J Bacteriol* **179**, 6318-6324.

Lang, W. H., Platt, T. & Reeder, R. H. (1998). *Escherichia coli* rho factor induces release of yeast RNA polymerase II but not polymerase I or III. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 4900-4905.

Lange, C., Zaigler, A., Hammelmann, M., Twellmeyer, J., Raddatz, G., Schuster, S. C., Oesterhelt, D. & Soppa, J. (2007). Genome-wide analysis of growth phase-dependent translational and transcriptional regulation in halophilic archaea. *BMC Genomics* **8**, 415.

Large, A., Stamme, C., Lange, C., Duan, Z., Allers, T., Soppa, J. & Lund, P. A. (2007). Characterization of a tightly controlled promoter of the halophilic archaeon *Haloferax volcanii* and its use in the analysis of the essential *cct1* gene. *Mol Microbiol* **66**, 1092-1106.

Lewis, S. M., Veyrier, A., Hosszu Ungureanu, N., Bonnal, S., Vagner, S. & Holcik, M. (2007). Subcellular relocalization of a trans-acting factor regulates XIAP IRES-dependent translation. *Mol Biol Cell* **18**, 1302-1311.

Link, K. H., Guo, L., Ames, T. D., Yen, L., Mulligan, R. C. & Breaker, R. R. (2007). Engineering high-speed allosteric hammerhead ribozymes. *Biol Chem* **388**, 779-786.

Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods* **25**, 402-408.

- Lomakin, I. B., Shirokikh, N. E., Yusupov, M. M., Hellen, C. U. & Pestova, T. V. (2006).** The fidelity of translation initiation: reciprocal activities of eIF1, IF3 and YciH. *Embo J* **25**, 196-210.
- Londei, P. (2005).** Evolution of translational initiation: new insights from the archaea. *FEMS Microbiol Rev* **29**, 185-200.
- Macdonald, P. M., Kerr, K., Smith, J. L. & Leask, A. (1993).** RNA regulatory element BLE1 directs the early steps of bicoid mRNA localization. *Development* **118**, 1233-1243.
- Madigan, M. T. & Oren, A. (1999).** Thermophilic and halophilic extremophiles. *Curr Opin Microbiol* **2**, 265-269.
- Makarova, K. S. & Koonin, E. V. (2003).** Comparative genomics of Archaea: how much have we learned in six years, and what's next? *Genome Biol* **4**, 115.
- Marintchev, A., Kolupaeva, V. G., Pestova, T. V. & Wagner, G. (2003).** Mapping the binding interface between human eukaryotic initiation factors 1A and 5B: a new interaction between old partners. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 1535-1540.
- Mathews, D. H., Sabina, J., Zuker, M. & Turner, D. H. (1999).** Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure. *J Mol Biol* **288**, 911-940.
- Matsunaga, F., Forterre, P., Ishino, Y. & Myllykallio, H. (2001).** In vivo interactions of archaeal Cdc6/Orc1 and minichromosome maintenance proteins with the replication origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 11152-11157.
- Mazumder, B., Seshadri, V. & Fox, P. L. (2003).** Translational control by the 3'-UTR: the ends specify the means. *Trends Biochem Sci* **28**, 91-98.
- Mignone, F., Gissi, C., Liuni, S. & Pesole, G. (2002).** Untranslated regions of mRNAs. *Genome Biol* **3**, REVIEWS0004.
- Mikulits, W., Pradet-Balade, B., Habermann, B., Beug, H., Garcia-Sanz, J. A. & Mullner, E. W. (2000).** Isolation of translationally controlled mRNAs by differential screening. *Faseb J* **14**, 1641-1652.
- Mogk, A., Schmidt, R. & Bukau, B. (2007).** The N-end rule pathway for regulated proteolysis: prokaryotic and eukaryotic strategies. *Trends Cell Biol* **17**, 165-172.
- Moll, I., Grill, S., Gualerzi, C. O. & Blasi, U. (2002).** Leaderless mRNAs in bacteria: surprises in ribosomal recruitment and translational control. *Mol Microbiol* **43**, 239-246.

- Moll, I., Hirokawa, G., Kiel, M. C., Kaji, A. & Blasi, U. (2004).** Translation initiation with 70S ribosomes: an alternative pathway for leaderless mRNAs. *Nucleic Acids Res* **32**, 3354-3363.
- Mowatt, M. R., Aggarwal, A. & Nash, T. E. (1991).** Carboxy-terminal sequence conservation among variant-specific surface proteins of *Giardia lamblia*. *Mol Biochem Parasitol* **49**, 215-227.
- Muckenthaler, M., Gray, N. K. & Hentze, M. W. (1998).** IRP-1 binding to ferritin mRNA prevents the recruitment of the small ribosomal subunit by the cap-binding complex eIF4F. *Mol Cell* **2**, 383-388.
- Muller, B., Allmansberger, R. & Klein, A. (1985).** Termination of a transcription unit comprising highly expressed genes in the archaeobacterium *Methanococcus voltae*. *Nucleic Acids Res* **13**, 6439-6445.
- Muller, M., Weigand, J. E., Weichenrieder, O. & Suess, B. (2006).** Thermodynamic characterization of an engineered tetracycline-binding riboswitch. *Nucleic Acids Res* **34**, 2607-2617.
- Narberhaus, F. & Vogel, J. (2007).** Sensory and regulatory RNAs in prokaryotes: a new German research focus. *RNA Biol* **4**, 160-164.
- Nicolai, M., Roncato, M. A., Canoy, A. S., Rouquie, D., Sarda, X., Freyssinet, G. & Robaglia, C. (2006).** Large-scale analysis of mRNA translation states during sucrose starvation in arabidopsis cells identifies cell proliferation and chromatin structure as targets of translational control. *Plant Physiol* **141**, 663-673.
- Nielsen, J. S., Boggild, A., Andersen, C. B., Nielsen, G., Boysen, A., Brodersen, D. E. & Valentin-Hansen, P. (2007).** An Hfq-like protein in archaea: crystal structure and functional characterization of the Sm protein from *Methanococcus jannaschii*. *Rna* **13**, 2213-2223.
- Nikolov, D. B., Chen, H., Halay, E. D., Hoffman, A., Roeder, R. G. & Burley, S. K. (1996).** Crystal structure of a human TATA box-binding protein/TATA element complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 4862-4867.
- O'Donnell, S. M. & Janssen, G. R. (2002).** Leaderless mRNAs bind 70S ribosomes more strongly than 30S ribosomal subunits in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **184**, 6730-6733.
- Ogawa, A. & Maeda, M. (2007).** Aptazyme-based riboswitches as label-free and detector-free sensors for cofactors. *Bioorg Med Chem Lett* **17**, 3156-3160.
- Ogawa, A. & Maeda, M. (2008).** An artificial aptazyme-based riboswitch and its cascading system in *E. coli*. *Chembiochem* **9**, 206-209.
- Omer, A. D., Lowe, T. M., Russell, A. G., Ebhardt, H., Eddy, S. R. & Dennis, P. P. (2000).** Homologs of small nucleolar RNAs in Archaea. *Science* **288**, 517-522.

- Ouhammouch, M., Werner, F., Weinzierl, R. O. & Geiduschek, E. P. (2004).** A fully recombinant system for activator-dependent archaeal transcription. *J Biol Chem* **279**, 51719-51721.
- Patenge, N. & Soppa, J. (1999).** Extensive proteolysis inhibits high-level production of eukaryal G protein-coupled receptors in the archaeon *Haloferax volcanii*. *FEMS Microbiol Lett* **171**, 27-35.
- Peng, S. S., Chen, C. Y. & Shyu, A. B. (1996).** Functional characterization of a non-AUUUA AU-rich element from the c-jun proto-oncogene mRNA: evidence for a novel class of AU-rich elements. *Mol Cell Biol* **16**, 1490-1499.
- Pesole, G., Grillo, G., Larizza, A. & Liuni, S. (2000).** The untranslated regions of eukaryotic mRNAs: structure, function, evolution and bioinformatic tools for their analysis. *Brief Bioinform* **1**, 236-249.
- Pestova, T. V., Borukhov, S. I. & Hellen, C. U. (1998).** Eukaryotic ribosomes require initiation factors 1 and 1A to locate initiation codons. *Nature* **394**, 854-859.
- Pestova, T. V. & Kolupaeva, V. G. (2002).** The roles of individual eukaryotic translation initiation factors in ribosomal scanning and initiation codon selection. *Genes Dev* **16**, 2906-2922.
- Phillips, K., Dauter, Z., Murchie, A. I., Lilley, D. M. & Luisi, B. (1997).** The crystal structure of a parallel-stranded guanine tetraplex at 0.95 Å resolution. *J Mol Biol* **273**, 171-182.
- Pickering, B. M. & Willis, A. E. (2005).** The implications of structured 5' untranslated regions on translation and disease. *Semin Cell Dev Biol* **16**, 39-47.
- Portnoy, V., Evguenieva-Hackenberg, E., Klein, F., Walter, P., Lorentzen, E., Klug, G. & Schuster, G. (2005).** RNA polyadenylation in Archaea: not observed in *Haloferax* while the exosome polynucleotidylates RNA in *Sulfolobus*. *EMBO Rep* **6**, 1188-1193.
- Portnoy, V. & Schuster, G. (2006).** RNA polyadenylation and degradation in different Archaea; roles of the exosome and RNase R. *Nucleic Acids Res* **34**, 5923-5931.
- Preiss, T., Baron-Benhamou, J., Ansorge, W. & Hentze, M. W. (2003).** Homodirectional changes in transcriptome composition and mRNA translation induced by rapamycin and heat shock. *Nat Struct Biol* **10**, 1039-1047.
- Qureshi, S. A. & Jackson, S. P. (1998).** Sequence-specific DNA binding by the *S. shibatae* TFIIB homolog, TFB, and its effect on promoter strength. *Mol Cell* **1**, 389-400.

- Racine, T., Barry, C., Roy, K., Dawe, S. J., Shmulevitz, M. & Duncan, R. (2007).** Leaky scanning and scanning-independent ribosome migration on the tricistronic S1 mRNA of avian reovirus. *J Biol Chem* **282**, 25613-25622.
- Reeder, J. & Giegerich, R. (2005).** Consensus shapes: an alternative to the Sankoff algorithm for RNA consensus structure prediction. *Bioinformatics* **21**, 3516-3523.
- Reiter, W. D., Palm, P. & Zillig, W. (1988a).** Analysis of transcription in the archaeobacterium *Sulfolobus* indicates that archaeobacterial promoters are homologous to eukaryotic pol II promoters. *Nucleic Acids Res* **16**, 1-19.
- Reiter, W. D., Palm, P. & Zillig, W. (1988b).** Transcription termination in the archaeobacterium *Sulfolobus*: signal structures and linkage to transcription initiation. *Nucleic Acids Res* **16**, 2445-2459.
- Reysenbach, A. L., Longnecker, K. & Kirshtein, J. (2000).** Novel bacterial and archaeal lineages from an in situ growth chamber deployed at a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent. *Appl Environ Microbiol* **66**, 3798-3806.
- Richardson, J. P. (2002).** Rho-dependent termination and ATPases in transcript termination. *Biochim Biophys Acta* **1577**, 251-260.
- Rivera, M. C., Jain, R., Moore, J. E. & Lake, J. A. (1998).** Genomic evidence for two functionally distinct gene classes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 6239-6244.
- Robertson, C. E., Harris, J. K., Spear, J. R. & Pace, N. R. (2005).** Phylogenetic diversity and ecology of environmental Archaea. *Curr Opin Microbiol* **8**, 638-642.
- Roesser, M. & Muller, V. (2001).** Osmoadaptation in bacteria and archaea: common principles and differences. *Environ Microbiol* **3**, 743-754.
- Roll-Mecak, A., Shin, B. S., Dever, T. E. & Burley, S. K. (2001).** Engaging the ribosome: universal IFs of translation. *Trends Biochem Sci* **26**, 705-709.
- Rother, M., Resch, A., Wilting, R. & Bock, A. (2001).** Selenoprotein synthesis in archaea. *Biofactors* **14**, 75-83.
- Sambrook, J., Fritsch, E. G. & Maniatis, T. (1989).** Molecular cloning: A laboratory manual. *Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York*.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-5467.
- Santangelo, T. J. & Reeve, J. N. (2006).** Archaeal RNA polymerase is sensitive to intrinsic termination directed by transcribed and remote sequences. *J Mol Biol* **355**, 196-210.

- Sartorius-Neef, S. & Pfeifer, F. (2004).** In vivo studies on putative Shine-Dalgarno sequences of the halophilic archaeon *Halobacterium salinarum*. *Mol Microbiol* **51**, 579-588.
- Schafer, G., Engelhard, M. & Muller, V. (1999).** Bioenergetics of the Archaea. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**, 570-620.
- Schneider, K. L., Pollard, K. S., Baertsch, R., Pohl, A. & Lowe, T. M. (2006).** The UCSC Archaeal Genome Browser. *Nucleic Acids Res* **34**, D407-410.
- Schneider, T. D. & Stephens, R. M. (1990).** Sequence logos: a new way to display consensus sequences. *Nucleic Acids Res* **18**, 6097-6100.
- Serganov, A. & Patel, D. J. (2007).** Ribozymes, riboswitches and beyond: regulation of gene expression without proteins. *Nat Rev Genet* **8**, 776-790.
- Shiman, R. & Draper, D. E. (2000).** Stabilization of RNA tertiary structure by monovalent cations. *J Mol Biol* **302**, 79-91.
- Shine, J. & Dalgarno, L. (1974).** 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**, 1342-1346.
- Shultzaberger, R. K., Bucheimer, R. E., Rudd, K. E. & Schneider, T. D. (2001).** Anatomy of *Escherichia coli* ribosome binding sites. *J Mol Biol* **313**, 215-228.
- Signori, E., Bagni, C., Papa, S., Primerano, B., Rinaldi, M., Amaldi, F. & Fazio, V. M. (2001).** A somatic mutation in the 5'UTR of BRCA1 gene in sporadic breast cancer causes down-modulation of translation efficiency. *Oncogene* **20**, 4596-4600.
- Slupska, M. M., King, A. G., Fitz-Gibbon, S., Besemer, J., Borodovsky, M. & Miller, J. H. (2001).** Leaderless transcripts of the crenarchaeal hyperthermophile *Pyrobaculum aerophilum*. *J Mol Biol* **309**, 347-360.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T. & other authors (1985).** Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**, 76-85.
- Sonenberg, N. (1994).** mRNA translation: influence of the 5' and 3' untranslated regions. *Curr Opin Genet Dev* **4**, 310-315.
- Sonenberg, N. & Hinnebusch, A. G. (2007).** New modes of translational control in development, behavior, and disease. *Mol Cell* **28**, 721-729.
- Soppa, J. (1994).** Compilation of halobacterial protein-coding genes, the halobacterial codon usage table and its use. *Syt Appl microbiol* **16**, 725-733.

- Soppa, J. (1999).** Normalized nucleotide frequencies allow the definition of archaeal promoter elements for different archaeal groups and reveal base-specific TFB contacts upstream of the TATA box. *Mol Microbiol* **31**, 1589-1592.
- Soppa, J. (2001).** Basal and regulated transcription in archaea. *Adv Appl Microbiol* **50**, 171-217.
- Soukup, G. A., Emilsson, G. A. & Breaker, R. R. (2000).** Altering molecular recognition of RNA aptamers by allosteric selection. *J Mol Biol* **298**, 623-632.
- Spitalny, P. & Thomm, M. (2008).** A polymerase III-like reinitiation mechanism is operating in regulation of histone expression in archaea. *Mol Microbiol* **67**, 958-970.
- Spriggs, K. A., Bushell, M., Mitchell, S. A. & Willis, A. E. (2005).** Internal ribosome entry segment-mediated translation during apoptosis: the role of IRES-trans-acting factors. *Cell Death Differ* **12**, 585-591.
- St Johnston, D., Beuchle, D. & Nusslein-Volhard, C. (1991).** Staufen, a gene required to localize maternal RNAs in the Drosophila egg. *Cell* **66**, 51-63.
- Stebbins-Boaz, B., Cao, Q., de Moor, C. H., Mendez, R. & Richter, J. D. (1999).** Maskin is a CPEB-associated factor that transiently interacts with eIF-4E. *Mol Cell* **4**, 1017-1027.
- Steffen, P., Voss, B., Rehmsmeier, M., Reeder, J. & Giegerich, R. (2006).** RNASHAPES: an integrated RNA analysis package based on abstract shapes. *Bioinformatics* **22**, 500-503.
- Sudarsan, N., Barrick, J. E. & Breaker, R. R. (2003).** Metabolite-binding RNA domains are present in the genes of eukaryotes. *Rna* **9**, 644-647.
- Suess, B., Hanson, S., Berens, C., Fink, B., Schroeder, R. & Hillen, W. (2003).** Conditional gene expression by controlling translation with tetracycline-binding aptamers. *Nucleic Acids Res* **31**, 1853-1858.
- Suess, B. & Weigand, J. E. (2008).** Engineered riboswitches - Overview, Problems and Trends. *RNA Biol* **5**.
- Tahara, M., Ohsawa, A., Saito, S. & Kimura, M. (2004).** In vitro phosphorylation of initiation factor 2 alpha (aIF2 alpha) from hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii* OT3. *J Biochem* **135**, 479-485.
- Tang, T. H., Bachellerie, J. P., Rozhdestvensky, T., Bortolin, M. L., Huber, H., Drungowski, M., Elge, T., Brosius, J. & Huttenhofer, A. (2002).** Identification of 86 candidates for small non-messenger RNAs from the archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 7536-7541.

- Tang, T. H., Polacek, N., Zywicki, M., Huber, H., Brugger, K., Garrett, R., Bachellerie, J. P. & Huttenhofer, A. (2005).** Identification of novel non-coding RNAs as potential antisense regulators in the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Mol Microbiol* **55**, 469-481.
- Teufel, K., Bleiholder, A., Griesbach, T. & Pfeifer, F. (2008).** Variations in the multiple *tbp* genes in different *Halobacterium salinarum* strains and their expression during growth. *Arch Microbiol*.
- Thomm, M., Hausner, W. & Hethke, C. (1994).** Transcription factors and termination of transcription in *Methanococcus*. *Syst Appl Microbiol* **16**, 648-655.
- Thompson, D. K., Palmer, J. R. & Daniels, C. J. (1999).** Expression and heat-responsive regulation of a TFIIB homologue from the archaeon *Haloferax volcanii*. *Mol Microbiol* **33**, 1081-1092.
- Tolstrup, N., Sensen, C. W., Garrett, R. A. & Clausen, I. G. (2000).** Two different and highly organized mechanisms of translation initiation in the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Extremophiles* **4**, 175-179.
- Torarinsson, E., Klenk, H. P. & Garrett, R. A. (2005).** Divergent transcriptional and translational signals in Archaea. *Environ Microbiol* **7**, 47-54.
- Trinklein, N. D., Aldred, S. J., Saldanha, A. J. & Myers, R. M. (2003).** Identification and functional analysis of human transcriptional promoters. *Genome Res* **13**, 308-312.
- Tuschl, T., Thomson, J. B. & Eckstein, F. (1995).** RNA cleavage by small catalytic RNAs. *Curr Opin Struct Biol* **5**, 296-302.
- Udagawa, T., Shimizu, Y. & Ueda, T. (2004).** Evidence for the translation initiation of leaderless mRNAs by the intact 70 S ribosome without its dissociation into subunits in eubacteria. *J Biol Chem* **279**, 8539-8546.
- Uhlenbeck, O. C. (2003).** Less isn't always more. *Rna* **9**, 1415-1417.
- Urbanke, C., Romer, R. & Maass, G. (1975).** Tertiary structure of tRNAPhe (yeast): kinetics and electrostatic repulsion. *Eur J Biochem* **55**, 439-444.
- Valentin-Hansen, P., Eriksen, M. & Udesen, C. (2004).** The bacterial Sm-like protein Hfq: a key player in RNA transactions. *Mol Microbiol* **51**, 1525-1533.
- van de Vossenberg, J. L., Driessen, A. J. & Konings, W. N. (1998).** The essence of being extremophilic: the role of the unique archaeal membrane lipids. *Extremophiles* **2**, 163-170.
- Vasudevan, S., Tong, Y. & Steitz, J. A. (2007).** Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* **318**, 1931-1934.

- Vazquez-Pianzola, P., Hernandez, G., Suter, B. & Rivera-Pomar, R. (2007).** Different modes of translation for hid, grim and sickle mRNAs in *Drosophila*. *Cell Death Differ* **14**, 286-295.
- Vecerek, B., Moll, I. & Blasi, U. (2005).** Translational autocontrol of the *Escherichia coli* hfq RNA chaperone gene. *Rna* **11**, 976-984.
- Wagner, E. G., Altuvia, S. & Romby, P. (2002).** Antisense RNAs in bacteria and their genetic elements. *Adv Genet* **46**, 361-398.
- Wallander, M. L., Leibold, E. A. & Eisenstein, R. S. (2006).** Molecular control of vertebrate iron homeostasis by iron regulatory proteins. *Biochim Biophys Acta* **1763**, 668-689.
- Weigand, J. E. & Suess, B. (2007).** Tetracycline aptamer-controlled regulation of pre-mRNA splicing in yeast. *Nucleic Acids Res* **35**, 4179-4185.
- Weiner, J., 3rd, Herrmann, R. & Browning, G. F. (2000).** Transcription in *Mycoplasma pneumoniae*. *Nucleic Acids Res* **28**, 4488-4496.
- Wells, S. E., Hillner, P. E., Vale, R. D. & Sachs, A. B. (1998).** Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors. *Mol Cell* **2**, 135-140.
- Werstuck, G. & Green, M. R. (1998).** Controlling gene expression in living cells through small molecule-RNA interactions. *Science* **282**, 296-298.
- Wich, G., Hummel, H., Jarsch, M., Bar, U. & Bock, A. (1986).** Transcription signals for stable RNA genes in *Methanococcus*. *Nucleic Acids Res* **14**, 2459-2479.
- Wieland, M. & Hartig, J. S. (2008).** Improved aptazyme design and in vivo screening enable riboswitching in bacteria. *Angew Chem Int Ed Engl* **47**, 2604-2607.
- Wilkie, G. S., Dickson, K. S. & Gray, N. K. (2003).** Regulation of mRNA translation by 5'- and 3'-UTR-binding factors. *Trends Biochem Sci* **28**, 182-188.
- Winkler, W. C. (2005).** Metabolic monitoring by bacterial mRNAs. *Arch Microbiol* **183**, 151-159.
- Winkler, W. C. & Breaker, R. R. (2005).** Regulation of bacterial gene expression by riboswitches. *Annu Rev Microbiol* **59**, 487-517.
- Woese, C. R. & Fox, G. E. (1977).** Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5088-5090.
- Wright, D. B., Banks, D. D., Lohman, J. R., Hilsenbeck, J. L. & Gloss, L. M. (2002).** The effect of salts on the activity and stability of *Escherichia coli* and *Haloferax volcanii* dihydrofolate reductases. *J Mol Biol* **323**, 327-344.

Yen, L., Svendsen, J., Lee, J. S., Gray, J. T., Magnier, M., Baba, T., D'Amato, R. J. & Mulligan, R. C. (2004). Exogenous control of mammalian gene expression through modulation of RNA self-cleavage. *Nature* **431**, 471-476.

Zaigler, A., Schuster, S. C. & Soppa, J. (2003). Construction and usage of a onefold-coverage shotgun DNA microarray to characterize the metabolism of the archaeon *Haloferax volcanii*. *Mol Microbiol* **48**, 1089-1105.

Zalfa, F., Achsel, T. & Bagni, C. (2006). mRNPs, polysomes or granules: FMRP in neuronal protein synthesis. *Curr Opin Neurobiol* **16**, 265-269.

Zhang, A., Wassarman, K. M., Ortega, J., Steven, A. C. & Storz, G. (2002). The Sm-like Hfq protein increases OxyS RNA interaction with target mRNAs. *Mol Cell* **9**, 11-22.

Zhang, Q.-Y. & Liu, Y.-G. (2006). Rice Mitochondrial Genes Are Transcribed by Multiple Promoters That Are Highly Diverged. *Journal of Integrative Plant Biology* **48**, 1473-1477.

Zuker, M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* **31**, 3406-3415.

VII. Anhang

1. Abkürzungsverzeichnis

	°C	Grad Celsius
	µF	Mikrofarad
	µg	Mikrogramm
	µl	Mikroliter
	µM	Mikrometer
	Ω	Ohm
A	A	Adenosin
	Amp	Ampicillin
	Asp	Aspartat
B	BCA	Bicinchoninic acid
	bidest.	Bidestilliert
	Bp	Basenpaar
C	C	Cytosin
D	dATP	Desoxyadenosintriphosphat
	dCTP	Desoxycytosintriphosphat
	cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
	dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
	DHF	Dihydrofolat
	DHFR	Dihydrofolatreduktase
	DMPC	Dimethylpyrocarbonat
	DNA	Desoxyribonukleinsäure
	dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
	dTTP	Desoxythymidintriphosphat
	dUTP	Desoxyuridintriphosphat
E	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
	ETOH	Ethanol
G	G	Guanosin
	ges.	Gesättigt
I	IRES	<i>Internal ribosome entry site</i>

L	Lsg.	Lösung
	M	Molar
	mA	Milliampere
	MCS	<i>Multiple cloning site</i>
	mg	Milligramm
	miRNA	<i>microRNA</i>
	Min.	Minute
	mM	Millimolar
	MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
	mRNA	<i>Messenger RNA</i>
N	NADP ⁺	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (oxidierte Form)
	NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (reduzierte Form)
	n.b.	nicht bestimmt
	ncRNA	<i>Noncoding RNA</i>
	ng	Nanogramm
	nkat	Nanokatal
	nm	Nanometer
	nM	Nanomolar
	n.n.	nicht nachweisbar
	Novo	Novobiocin
O	OD	Optische Dichte
	o.g.	oben genannt
	ORF	<i>Open reading frame</i>
	Ori	Replikationsursprung
P	p.a.	Per analysis
	PCR	Polymerase Chain Reaction
	PEG	Polyethylenglykol
	pmol	Picomol
R	RBS	Ribosombindestelle
	RNA	Ribonukleinsäure
	RNase	Ribonuklease
	rRNA	Ribosomale RNA
S	SD	Shine-Dalgarno

	Sek.	Sekunde
	Ser	Serin
	sRNA	<i>Small RNA</i>
T	T	Thymin
	TBE	Tris-Borat-EDTA
	TE	Tris-EDTA
	Thr	Threonin
	TPP	Thiamin Pyrophosphat
	Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
	tRNA	Transfer-RNA
U	U	Unit
	uORF	<i>Upstream open reading frame</i>
	Upm	Umdrehungen pro Minute
	UTR	Untranslatierte Region
	UV	Ultraviolett
V	V	Volt
	v/v	Volumen pro Volumen
W	w/v	Gewicht pro Volumen
Z	z.B.	Zum Beispiel

2. Publikationen

2.1 Publikationen in wissenschaftlichen Journalen

M. Brenneis, O. Hering, C. Lange, J. Soppa (2007)

Experimental characterization of cis-acting elements important for translation and transcription in halophilic Archaea. *PLoS Genetics*, e229

J. Soppa, A. Baumann, M. Brenneis, M. Dambeck, O. Hering, C. Lange (2008)

Genomics and functional genomics with haloarchaea.

Arch Microbiol. DOI=10.1007/s00203-008-0376-4

J. Straub, M. Brenneis, A. Jellen-Ritter, R. Heyer, B. Tjaden, J. Soppa, A. Marchfelder (2008)

Small noncoding RNAs from the halophilic Archaeon *Haloferax volcanii*.
[eingereicht]

M. Brenneis and J. Soppa (2008)

Regulation of translation in haloarchaea: 5'- and 3'-UTRs are essential and have to interact *in vivo*. [in Vorbereitung]

O. Hering, M. Brenneis, J. Beer, B. Suess, J. Soppa (2008)

Translation of leadered haloarchaeal transcripts is neither initiated via an eukaryotic-like scanning mechanism nor using a Shine Dalgarno Sequence. [in Vorbereitung]

2.2 Publikationen auf wissenschaftlichen Kongressen

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden regelmäßig auf wissenschaftlichen Kongressen präsentiert:

- Tagung der „Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie“ (VAAM) in Osnabrück, 1.-4.4.2007 (Posterpräsentation)
- Gordon Conference “Archaea: Ecology, Metabolism and Molecular Biology” in New Hampshire, USA, 19.-24.8.2007 (Posterpräsentation)
- Tagung des Schwerpunktprogrammes „SPP 1258: Sensory and regulatory RNAs in Prokaryotes“ in Bochum, 3.-4.9.2007 (Posterpräsentation)
- Internationale Konferenz des SFB 579 „RNA-Liganden-Wechselwirkungen“ in Frankfurt am Main, 27.-29.9.2007 (Posterpräsentation)
- Jahrestagung des Schwerpunktprogrammes „SPP1112: Genomfunktion und Genregulation in Archaea“ in Schmitten, 1.-3.10.2007 (Vortrag)
- Tagung der „Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie“ (VAAM) in Frankfurt, 9.-11.3.2008 (Posterpräsentation)

3. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Molekulare Biowissenschaften der Johann Wolfgang Goethe-Universität unter der Anleitung von Prof. Dr. Jörg Soppa durchgeführt.

Zuerst möchte ich Prof. Dr. Jörg Soppa herzlich für die Möglichkeit zur Durchführung der Promotion, seine umfassende Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit und sein stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit danken.

Ebenso bedanke ich mich bei Prof. Dr. Beatrix Süß für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Ich danke dem SFB 579 „RNA-Liganden-Wechselwirkungen“ für die Finanzierung.

Ein weiterer Dank gilt Julia Weigand und Jürgen Beer aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Beatrix Süß für die kooperative und hilfreiche Zusammenarbeit beim „Aptamer/Ribozym“-Projekt.

Allen derzeitigen und ehemaligen MitarbeiterInnen der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jörg Soppa möchte ich für das angenehme Arbeitsklima und die freundschaftliche Zusammenarbeit danken. Insbesondere danke ich Anke Baumann für ihre konstruktive und freundschaftliche Unterstützung, Christian Lange für seine immerwährende Diskussions- und Hilfsbereitschaft, Oliver Hering für die angenehme und fruchtbare Zusammenarbeit und Julia Straub für ihr unermüdliches Engagement und die schöne gemeinsame Zeit.

Für viel Verständnis und Unterstützung danke ich meinem Ehemann Christian Brenneis.

4. Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name	Mariam Christina Brenneis, geb. Zaman
Geburtsdatum	22.07.1979
Geburtsort	Kabul, Afghanistan
Wohnort	Frankfurt am Main
Familienstand	verheiratet
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung

1986 – 1990	Grundschule Worthstraße, Goslar
1990 – 1992	Orientierungsstufe Innenstadt, Goslar
1992 – 1999	Christian-von-Dom Gymnasium, Goslar
1999	Abschluss: Abitur

Hochschulausbildung

1999 – 2004	Studium der Biologie an der Technischen Universität Braunschweig
2003 – 2004	Anfertigung der Diplomarbeit am Institut für Biotechnologie, Abschluss: Diplom-Biologie

Promotion

2004 – 2008	Naturwissenschaftliche Dissertation am Institut für Molekulare Biowissenschaften der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt a.M. unter der Anleitung von Prof. Dr. Jörg Soppa
-------------	---

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

Frankfurt am Main, den