

Kleine Zinkfinger-Proteine in *Haloferax volcanii*

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

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

von

Sebastian Zahn

aus Lichtenfels

Frankfurt am Main 2021

(D 30)



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

Dekan: Prof. Dr. Sven Klimpel

Gutachter: Prof. Dr. Jörg Soppa
Prof. Dr. Eckhard Boles

Datum der Disputation: 24.06.2021

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	I
Tabellenverzeichnis.....	III
Abkürzungsverzeichnis.....	V
1 Zusammenfassung.....	1
2 Einleitung.....	3
2.1 Die Domänen des Lebens.....	3
2.2 Der haloarchaeale Modellorganismus <i>Haloferax volcanii</i>	5
2.3 Kleine Proteine.....	6
2.4 Zinkfinger-Proteine.....	10
2.5 Zielsetzung dieser Arbeit.....	16
3 Material und Methoden	18
3.1 Organismen	18
3.1.1 <i>Haloferax volcanii</i>	18
3.1.2 <i>Escherichia coli</i>	19
3.2 Materialien	19
3.2.1 Chemikalien	19
3.2.2 Verbrauchsmaterialien.....	22
3.2.3 Geräte.....	22
3.2.4 Molekularbiologische und biochemische Kit-Systeme	24
3.2.5 Enzyme und Ähnliches.....	25
3.2.6 Größenstandards	25
3.2.7 Oligonukleotide.....	26
3.2.8 Plasmide.....	27
3.2.9 Software und Datenbanken.....	28
3.3 Mikrobiologische Methoden.....	29
3.3.1 Medien und Kultivierung von <i>Haloferax volcanii</i>	29
3.3.2 Medien und Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	31
3.3.3 Erstellung von Dauerkulturen	32
3.3.4 Wachstum in Mikrotiterplatten	32
3.3.5 Zelldichtebestimmung.....	33
3.3.6 Schwärmversuche.....	33
3.3.7 Biofilm-Assay.....	33
3.4 Molekularbiologische Methoden	34
3.4.1 DNA-basierte Methoden	34
3.4.1.1 Isolierung plasmidischer DNA aus <i>E. coli</i>	34

3.4.1.2	Isolierung genomischer DNA aus <i>H. volcanii</i>	34
3.4.1.3	Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA.....	35
3.4.1.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	36
3.4.1.5	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA.....	42
3.4.1.6	Spaltung von DNA mittels Restriktionsenzymen.....	43
3.4.1.7	Ligation von DNA-Fragmenten.....	43
3.4.1.8	Sequenzierung.....	44
3.4.2	Transformationen von Mikroorganismen.....	44
3.4.2.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i>	44
3.4.2.2	Transformation von <i>E. coli</i>	45
3.4.2.3	Transformation von <i>H. volcanii</i>	45
3.4.3	Erzeugung von Deletionsmutanten mittels Pop-In/Pop-Out-Methode.....	47
3.4.4	RNA-basierte Methoden.....	48
3.4.4.1	Isolierung und Reinigung von RNA.....	48
3.4.4.2	Photometrische Konzentrationsbestimmung von RNA.....	50
3.4.4.3	Gelelektrophoretische Auftrennung von RNA.....	51
3.4.4.4	Northern Blot.....	52
3.4.4.5	DNA-Adapter-Ligation und cDNA-Synthese.....	55
3.4.5	Protein-basierte Methoden.....	58
3.4.5.1	Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen.....	58
3.4.5.2	Western Blot.....	59
3.4.5.3	Produktion spezifischer polyklonaler Antikörper.....	60
3.5	Biochemische Methoden.....	60
3.5.1	Aufreinigung von Proteinen.....	60
3.5.1.1	Homologe Überproduktion von HVO_2753.....	60
3.5.1.2	<i>In vivo</i> Crosslink.....	60
3.5.1.3	Zellaufschluss mittels Sonifikation.....	61
3.5.1.4	Native Affinitätsaufreinigung von HVO_2753n.....	61
3.5.1.5	Größenausschlusschromatographie.....	62
3.5.2	Konzentrationsbestimmungen von Proteinen.....	63
3.5.2.1	Photometrische Konzentrationsbestimmung.....	63
3.5.2.2	BC-Assay.....	63
3.5.3	Dichtegradienten-Zentrifugation.....	63
3.5.4	Fluorimetrischer Zink-Assay.....	64
3.6	Bioinformatische Methoden.....	65
3.6.1	Multiple Sequence Alignment.....	65
3.6.2	Phylogenetische Stammbäume.....	65
3.6.3	RNA und dRNA-Sequenzvergleiche.....	66
4	Ergebnisse.....	67

4.1	Bioinformatische Analyse von HVO_2753	67
4.1.1	Charakteristika von HVO_2753	67
4.1.2	Homologie von HVO_2753	69
4.2	Funktionsanalyse von HVO_2753 <i>in vivo</i>	72
4.2.1	Herstellung der Deletionsmutante	72
4.2.2	Phänotypische Charakterisierung der Deletionsmutante	72
4.2.2.1	Wachstum unter verschiedenen Bedingungen	72
4.2.2.2	Biofilmbildung und Schwärmverhalten	73
4.2.3	Komplementationsversuche	74
4.2.3.1	Herstellung der Komplementationsmutanten	75
4.2.3.2	Phänotypische Charakterisierung	76
4.2.3.3	Herstellung und Untersuchung von Punktmutanten	80
4.2.4	Analyse der Genexpression	83
4.2.5	Ribosomenprofil durch Dichtegradientenzentrifugation	84
4.2.6	Die homologe Überproduktion von HVO_2753 zur Erzeugung von spezifischen Antikörpern	86
4.3	Struktur- und Funktionsanalyse von HVO_2753 <i>in vitro</i>	87
4.3.1	Die homologe Überexpression von HVO_2753	88
4.3.2	Die Aufreinigung von HVO_2753	89
4.3.2.1	Affinitätsaufreinigung mittels Nickel-Chelat-Sepharose	89
4.3.2.2	Aufreinigung mittels Größenausschlusschromatographie	90
4.3.3	Massenspektrometrische Analyse von HVO_2753	91
4.3.4	Quantitative Analyse von gebundenem Zink	91
4.3.5	Bindepartnersuche mittels Co-Affinitätsaufreinigung	93
4.3.5.1	Suche nach potenziellen RNA-Bindepartnern	93
4.3.5.2	Suche nach potenziellen Protein-Bindepartnern	96
4.4	Transkriptomanalyse mittels RNA-Sequenzierung	99
5	Diskussion	106
5.1	Die Strukturelemente des Eindomänen-Zinkfinger-Proteins HVO_2753	107
5.2	Interaktionen von HVO_2753 mit RNA und Proteinen	112
5.3	Das Zinkfinger- μ -Protein HVO_2753 als Regulator für Schwärmen, Adhäsion und mehr	117
	Literaturverzeichnis	127
	Publikationen	I
	Anhang	III

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Phylogenetischer Stammbaum	4
Abbildung 2: Übersicht und Klassifizierung der Funktionen der in <i>Halobacterium salinarum</i> identifizierten kleinen Proteine.....	10
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Pop-In/Pop-Out-Methode.....	48
Abbildung 4: Aminosäuresequenz von HVO_2753.....	68
Abbildung 5: Übersicht über den genomischen Bereich von HVO_2753.....	69
Abbildung 6: <i>Multiple Sequence Alignment</i> von HVO_2753 und 20 weiteren Orthologen ausgewählter halophiler und methanogener Gattungen und Spezies.....	70
Abbildung 7: Phylogenetische Stammbäume von HVO_2753 und seinen Orthologen.....	71
Abbildung 8: Wachstumskurven des Wildtyps H26 und der Deletionsmutante Δ HVO_2753.....	73
Abbildung 9: Biofilm-Assay des Wildtyps H26 und der Deletionsmutante Δ HVO_2753.....	74
Abbildung 10: Wachstumskurven der Komplementationsmutanten und der Kontrollstämme.....	77
Abbildung 11: Schwärmverhalten der Komplementationsmutanten und der Kontrollstämme.....	78
Abbildung 12: Schwärmplatte der Komplementationsmutanten und der Kontrollstämme.....	79
Abbildung 13: Biofilm-Assay der Komplementationsmutanten und der Kontrollstämme.....	80
Abbildung 14: Aminosäuresequenz von HVO_2753 mit eingeführten Punktmutationen.....	81
Abbildung 15: Schwärmplatte der Punktmutanten	82
Abbildung 16: Genexpressionsanalyse mittels Northern Blot	84
Abbildung 17: Ribosomenprofil nach der Dichtegradientenzentrifugation.....	85
Abbildung 18: Denaturierende RNA-Gelelektrophorese ausgewählter Fraktionen nach der Dichtegradientenzentrifugation.....	86
Abbildung 19: Western Blot-Analyse zur Spezifität des Antikörpers α HVO_2753n.....	87
Abbildung 20: Tricin-SDS-PAGE ausgewählter Fraktionen der beiden Aufreinigungsschritte von HVO_2753n.....	90
Abbildung 21: Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie von HVO_2753n.....	91
Abbildung 22: Quantifizierung von Zink-Ionen mittels fluorimetrischem Zink-Assay	93
Abbildung 23: Chromatogramme der Größenausschlusschromatographie von HVO_2753n mit und ohne <i>in vivo</i> Crosslink.....	97
Abbildung 24: 3D-Struktur von HVO_2753.....	110

Abbildung 25: Regulatorische Funktionen des kleinen Zinkfinger- μ -Proteins	
HVO_2753.....	125

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über alle verwendeten <i>H. volcanii</i> Stämme.....	18
Tabelle 2: Chemikalienliste.....	19
Tabelle 3: Verbrauchsmaterialienliste.....	22
Tabelle 4: Geräteliste.....	22
Tabelle 5: Liste molekularbiologischer und biochemischer Kit-Systeme.....	24
Tabelle 6: Enzymliste.....	25
Tabelle 7: Liste der Größenstandards.....	25
Tabelle 8: Liste der Oligonukleotide.....	26
Tabelle 9: Liste der Plasmide.....	27
Tabelle 10: Tabelle der Software und der Datenbanken.....	28
Tabelle 11: Zusammensetzung der Bestandteile des Komplexmediums für <i>H. volcanii</i>	29
Tabelle 12: Zusammensetzung des synthetischen Mediums für <i>H. volcanii</i>	31
Tabelle 13: Zusammensetzung des SOB Mediums für <i>E. coli</i>	32
Tabelle 14: Zusammensetzung der Lösungen für die Isolierung genomischer DNA aus <i>H. volcanii</i>	35
Tabelle 15: Zusammensetzung des Taq-Polymerase-Puffers und des Standard- dNTP-Mixes für <i>H. volcanii</i> -PCRs.....	37
Tabelle 16: Zusammensetzung eines Standard-PCR-Ansatzes.....	37
Tabelle 17: PCR Cyclyer-Programm für eine Standard-PCR.....	38
Tabelle 18: PCR Cyclyer-Programm für eine Zweischnitt-Fusions-PCR.....	39
Tabelle 19: PCR Cyclyer-Programm für eine dsDNA-Sonden-PCR.....	40
Tabelle 20: PCR Cyclyer-Programm für eine ssDNA-Sonden-PCR.....	40
Tabelle 21: Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes für die Ortsspezifische Mutagenese.....	41
Tabelle 22: PCR Cyclyer-Programm für die Ortsspezifische Mutagenese.....	42
Tabelle 23: Zusammensetzungen der Puffer für die DNA-Gelelektrophorese.....	43
Tabelle 24: Zusammensetzung eines Ansatzes einer <i>Blunt-end</i> -Ligation in Anwesenheit des entsprechenden Restriktionsenzym.....	43
Tabelle 25: Zusammensetzung des TB-Puffers für die Herstellung kompetenter <i>E. coli</i>	45
Tabelle 26: Zusammensetzung aller benötigten Lösungen für die Transformation von <i>H. volcanii</i>	46
Tabelle 27: Zusammensetzung der Aufschlusslösung für die RNA-Isolierung aus <i>H. volcanii</i>	50
Tabelle 28: Zusammensetzungen der für die RNA-Gelelektrophorese benötigten Puffer.....	51
Tabelle 29: Zusammensetzung der benötigten Lösungen und Puffer für den Northern-Blot.....	52

Tabelle 30: Zusammensetzung der benötigten Lösungen und Puffer für die Hybridisierung beim Northern-Blot.	53
Tabelle 31: Schritte der Entwicklung während dem Chemolumineszenz-Nachweis beim Northern-Blot	54
Tabelle 32: Zusammensetzung der Puffer und Lösungen für den Chemolumineszenz-Nachweis beim Southern-Blot.....	54
Tabelle 33: Ablauf der DNA-Adapter-Ligation und cDNA-Synthese zur Identifikation von RNA-Bindepartnern. Die Protokollnummern beziehen sich auf die jeweiligen Pipettierschemata in Tabelle 34.	56
Tabelle 34: Pipettierschemata der verschiedenen Reaktionsansätze während der DNA-Adapter-Ligation und cDNA-Synthese.	56
Tabelle 35: Zusammensetzung der Lösungen für die Visualisierung von Tricin-SDS-Gelen.	59
Tabelle 36: Lösungen und Puffer für die Affinitätsaufreinigung von HVO_2753n....	62
Tabelle 37: Zusammensetzung der Gradientenpuffers für die Dichtegradienten-Zentrifugation.	64
Tabelle 38: Zusammensetzungen der Lösungen und Puffer für den Zink-Assay.....	65
Tabelle 39: Aminosäurezusammensetzung von HVO_2753 im Vergleich zum <i>H. volcanii</i> Proteom	68
Tabelle 40: Ergebnisse der RNA-Bindepartner-Suche von HVO_2753	95
Tabelle 41: Auswahl an Genen, die in Abwesenheit von HVO_2753 herunterreguliert vorliegen	102
Tabelle 42: Auswahl an Genen, die für Transportproteine codieren und in Abwesenheit von HVO_2753 reguliert vorliegen	103

Abkürzungsverzeichnis

AA	Aminosäuremetabolismus
ABC	ATP-bindende Kasette
ad	auffüllen auf
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar(e)
BR	Biologisches Replikat
BSA	Kälber-Serumalbumin
CHM	Kohlenhydratmetabolismus
CHP	Chaperone
CHY	Konserviertes hypothetisches Protein
CIM	Zentraler intermediärer Metabolismus
COM	Koenzymmetabolismus
CP	Zelluläre Prozesse
CPSF	<i>Cleavage and polyadenylation specificity factor</i>
DEPC-H₂O	DEPC-behandeltes, RNase-freies Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DPANN	Superphylum der Archaea benannt nach seinen ersten fünf Stämmen <u>D</u> iapherotriten, <u>P</u> arvarchaeota, <u>A</u> enigmarchaeota, <u>N</u> anoarchaeota und <u>N</u> anohaloarchaeota
dRNA-Seq	differenzielle RNA-Sequenzierung
EM	Energiemetabolismus
evc	Leervektorkontrolle (<i>empty vector control</i>)
FC	Funktionsklasse
gDNA	genomische DNA
GEN	Generelle enzymatische Funktion
GFP	grün-fluoreszierendes Protein
H₂O	Wasser
H ₂ O _{bidest}	bidestilliertes Wasser
Htrs	halobakterielle Transducer für Sensor-Rhodopsin
HY	Hypothetisches Protein
kbp	Kilobasenpaare
LIP	Lipidmetabolismus
M	Molar
Mbp	Megabasenpaare
MCP	Methyl-akzeptierende Chemotaxis Proteine

MCS	Multiple Klonierungsstelle
MIS	Verschiedenes
MOT	Motilität
mRNA	<i>messenger</i> -RNA
MSA	Multipler Sequenzabgleich
NGS	<i>Next Generation</i> -Sequenzierung
nt	Nukleotid
NUM	Nukleotidmetabolismus
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
ORF	offener Leserahmen
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PSM	<i>Peptide Spectrum Matches</i>
RBF	Ribosomen-gebundene Fragmente
REG	Genregulation
RMT	RNA Maturation
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNA-Seq	RNA-Sequenzierung
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
rRNA	ribosomale RNA
RRR	Replikation, Reparatur, Rekombination
RT	Raumtemperatur
SIG	Signaltransduktion
sORF	kleiner offener Leserahmen
TACK	Superphylum der Archaea benannt nach seinen ersten vier Sämen <u>T</u> haumarchaeota, <u>A</u> igarchaeota, <u>C</u> renarchaeota und <u>K</u> orarchaeota
TC	Transkription
TL	Translation
TP	Transport
tRNA	<i>transfer</i> -RNA
UTR	untranslatierte Region
v/v	Volumen pro Volumen
VE-H ₂ O	vollentionisiertes Wasser
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp
ZBP	Zinkbindetasche

1 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde das Zinkfinger- μ -Protein HVO_2753 des halophilen Archaeons *Haloferax volcanii* hinsichtlich seiner biologischen Funktion und seiner Struktur charakterisiert.

Zinkfinger- μ -Proteine wurden bisher nur sehr wenig untersucht, während ihnen jedoch in den letzten Jahren steigendes Interesse entgegengebracht wird. Im Genom von *H. volcanii* sind mehr als 40 solcher Zinkfinger- μ -Proteine codiert. Von diesen besitzt mit HVO_2753 lediglich eines nicht nur zwei, sondern vier der charakteristischen C(P)XCG-Muster, was für die Anwesenheit von zwei Zinkfinger-Motiven spricht. Während Homologe von HVO_2753 in vielen Euryarchaeota vorkommen und manche davon als Zink-Ribbon RNA-Bindeproteine annotiert sind, ist über ihre Funktion jedoch nichts bekannt. Zur Charakterisierung des Proteins wurde zunächst eine *in frame*-Deletionsmutante seines Gens erstellt und diese einer phänotypischen Charakterisierung unterzogen. Die Mutante wies, verglichen mit dem Wildtyp, keine Unterschiede im Wachstum in Komplexmedium oder in synthetischem Medium mit Glukose als Kohlenstoffquelle auf. Ein schweres Defizit konnte jedoch sowohl bei der Adhäsion und Biofilmbildung als auch der Schwärmfähigkeit der Deletionsmutante festgestellt werden. Während die Schwärmfähigkeit des Wildtyps durch plasmidische Expression von HVO_2753 in der Deletionsmutante teilweise wiederhergestellt werden konnte, war eine solche Komplementation bei der Biofilmbildung nicht möglich. Die Analyse der Relevanz ausgewählter Aminosäuren, wie beispielsweise das jeweils erste Cystein in jedem C(P)XCG-Muster zeigte, dass die Substitution jeder einzelnen der getesteten Aminosäuren einen Funktionsverlust des Proteins nach sich zieht. Die Untersuchung des HVO_2753-Transkripts mittels Northern Blot-Analyse bestätigte erste Hinweise aus vorangegangenen dRNA- und RNA-Seq-Studien, die eine Co-Transkription von HVO_2753 mit dem Nachbarn HVO_2752, das für den Translations-Elongationsfaktor aEF-1 beta codiert, aufzeigten. Daraufhin erfolgte eine Untersuchung des Ribosomenprofils, bei der keine Unterschiede zwischen der Deletionsmutante und der Überexpressionsmutante von HVO_2753 festgestellt werden konnten.

Eine Variante von HVO_2753 mit N-terminalem Hexahistidin-Tag wurde homolog überproduziert und aufgereinigt. Die Überproduktion und Aufreinigung wurden

im Zuge dieser Arbeit weiter, speziell für HVO_2753, optimiert. So konnten große Mengen von HVO_2753n überproduziert und bei nativen Salzbedingungen mittels Nickel-Affinitätschromatographie und anschließender Größenausschlusschromatographie aufgereinigt werden. Eine massenspektrometrische Analyse bestätigte sowohl das Molekulargewicht als auch die Abwesenheit posttranslativeller Modifikationen. Die Untersuchung der Menge an gebundenem Zink im Protein erfolgte beim Zink-Assay mit Hilfe des hochsensitiven und hochspezifischen Fluorophors ZnAF-2F. Dabei konnte gezeigt werden, dass überraschenderweise lediglich ein Zink-Ion in HVO_2753 gebunden vorliegt.

Zur weiteren Funktionsaufklärung erfolgte eine Interaktionspartnersuche. Hierfür wurde HVO_2753 überproduziert, ein *in vivo*-Crosslink und anschließend eine native Aufreinigung durchgeführt. Die massenspektrometrische Analyse ausgewählter Fraktionen nach der Größenausschlusschromatographie ergaben eine Vielzahl an möglichen Bindepartnern. Besonders häufig wurde hier die GalE *family* Epimerase/Dehydratase gefunden. Eine weitere Methode zur Suche nach Interaktionspartnern richtete sich auf RNAs. Hier konnten mittels eines eigens entwickelten Protokolls neben RNAs des Translationsapparates auch mehrfach die tRNA(Glu) gefunden werden.

Zusätzlich sollte die Transkriptomanalyse mittels RNA-Sequenzierung Unterschiede zwischen Wildtyp, Deletionsmutante und Komplementationsmutante aufzeigen. Hier wurden weitreichende Auswirkungen der Deletion von HVO_2753 gefunden. Zahlreiche Gene in mehreren Operons zur Motilität und Chemotaxis lagen in der Deletionsmutante stark herunterreguliert vor, während die Gene einiger Metallionen-Transporter und der Eisen(III)-Siderophor-Biosynthese hochreguliert vorlagen. In der Komplementationsmutante konnten nur von den letzteren Genen Transkriptlevel vergleichbar mit denen des Wildtyps wiedergefunden werden.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das kleine Zinkfinger-Protein HVO_2753 eine essenzielle Rolle in der positiven Regulation der Motilität, Chemotaxis und der Adhäsion bzw. Biofilmbildung spielt. Gleichzeitig übt HVO_2753 eine negative Regulation auf den Metallionen-Transport und die Biosynthese des Eisen(III)-Siderophors aus.

2 Einleitung

2.1 Die Domänen des Lebens

Erste Einteilungen allen zellulären Lebens in Evolutionslinien basierten auf dem Reich der „Monera“, dem prokaryotische Zellen angehörten, dem Reich der „Protista“ mit eukaryotischen Einzellern und weiteren Reichen, die multizelluläre Eukaryoten abbildeten (Whittaker, 1969). Hier waren Archaea und Bacteria noch in derselben Gruppe dargestellt, da die Einteilung hauptsächlich auf der Morphologie der Zellen basierte. Erst die Entwicklung von Nukleinsäure-basierten, vergleichenden und phylogenetischen Analysen und die Pionierarbeit von Carl Woese führte zu Einblicken in das evolutionäre Verwandtschaftsverhältnis von Mikroorganismen (Woese *et al.*, 1975). Diese Analysen führten zunächst zur Einteilung in die drei Domänen Eukarya, Eubacteria und Archaeobacteria, die, nach späterem Umbenennen, die noch heute bekannten Domänen Eukarya, Bacteria und Archaea darstellen (Woese & Fox, 1977; Woese *et al.*, 1978). Auch in den folgenden Jahren erhärtete sich die Meinung, dass die prokaryotischen Archaea mit den Eukarya näher verwandt sind als mit den Bacteria (Doolittle & Logsdon, 1998). So besitzen die meisten Archaea, wie alle Eukarya, Histone, die die Rolle der Organisation der DNA übernehmen (Henneman *et al.*, 2018). Außerdem ist die RNA-Polymerase der Archaea, eine Schlüsselkomponente allen zellulären Lebens, nah verwandt mit der der Eukarya (Huet *et al.*, 1983; Zillig *et al.*, 1989). Die Weiterentwicklung wissenschaftlicher Methoden zur DNA-Sequenzierung und die Entwicklung neuer Herangehensweisen in der Informationstechnologie trieben nachfolgend den Fortschritt in der Evolutionsbiologie voran. So führten neue Erkenntnisse im letzten Jahrzehnt zu der aktuellen Ansicht, dass Bacteria und Archaea jeweils monophyletisch sind und einen gemeinsamen Vorfahren besitzen, während Eukarya einen Teil des archaealen Zweigs darstellen (Cox *et al.*, 2008; Williams *et al.*, 2013; Adam *et al.*, 2017; Eme *et al.*, 2017; Baker *et al.*, 2020). Somit konnten nicht nur bekannte Organismen besser eingeordnet, sondern mittels metagenomischer Herangehensweisen auch viele neue Organismen identifiziert und zugeordnet werden. Nach aktuellem Stand der Wissenschaft sind innerhalb der Archaea drei sogenannte Superphyla bekannt: Asgard, DPANN (Diapherotriten, Parvarchaeota, Aenigmarchaeota, Nanoarchaeota und Nanohaloarchaeota)

und TACK (Thaumarchaeota, Aigarchaeota, Crenarchaeota und Korarchaeota). Die Euryarchaeota hingegen sind ein eigenständiges Phylum innerhalb der Archaea und nicht in eines der aktuell anerkannten Superphyla gegliedert. Die Entdeckungen der Lokiarchaeota und nachfolgenden, zu Phyla zusammengefassten und nah verwandten Archaea, zunächst meist aus Meeressedimenten isoliert, konnten im Superphylum der Asgard-Archaea zusammengefasst werden. Neueste Untersuchungen deuten an, dass ein Vorfahr dieser Asgard-Archaea den Wirt für die endosymbiontische Interaktion mit einem Proteobakterium dargestellt hat. Dieses Ereignis führte später zur Entwicklung von Mitochondrien und der Entstehung erster Eukarya (Baker *et al.*, 2020). Eine schematische Übersicht über den phylogenetischen Stammbaum zeigt Abbildung 1.

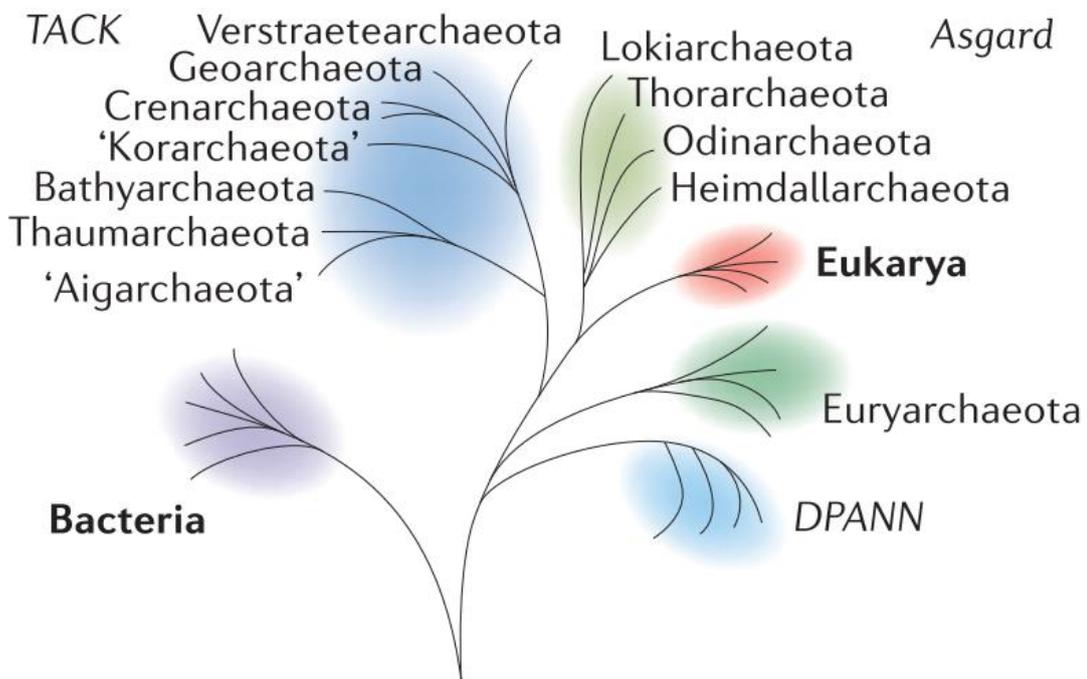


Abbildung 1: Phylogenetischer Stammbaum. Gezeigt ist eine schematische Darstellung der Verwandtschaft der Domänen des Lebens. Bacteria sind in violett, Eukarya in rot dargestellt. Letztere besitzen nach aktuellem Stand zusammen mit den Asgard Archaea einen gemeinsamen Vorfahren. Archaeale Phyla und Superphyla sind in grün und blau dargestellt. Abbildung entnommen und modifiziert aus Eme *et al.*, 2017.

Während Archaea ursprünglich als Extremophile galten, da sie aus vielen Nischen extremer Lebensbedingungen isoliert werden konnten, hat sich diese Ansicht in den letzten Jahren geändert. Waren zunächst viele halophile, acidophile, alkaliphile, psychrophile und thermophile Vertreter bekannt, sind durch die Vielzahl

an neu entdeckten Archaea auch viele Mesophile entdeckt worden. Sie bilden somit eine vielfältige und sehr weit verbreitete Gruppe von Mikroorganismen (Baker *et al.*, 2020) und stellen 20 % aller planktonischen Zellen in den Weltmeeren dar (DeLong & Pace, 2001; Karner *et al.*, 2001). Des Weiteren scheinen sie einen noch größeren Anteil im marinen Sediment auszumachen (Lipp *et al.*, 2008). Archaea wurden außerdem in Böden, Pflanzen, Wiederkäuern und im Menschen gefunden (Conway de Macario & Macario, 2009; Frey *et al.*, 2010; Chroňáková *et al.*, 2012; Taffner *et al.*, 2018). Dem aktuellen Wissensstand nach lässt sich zusammenfassen, dass Archaea vielfältige und ubiquitär vorkommende Mikroorganismen sind, die aktive Komponenten zahlreicher Mikrobiome darstellen und einen wesentlichen Einfluss auf ihren Wirt oder auf andere Mitglieder des Mikrobioms ausüben (Borrel *et al.*, 2020).

2.2 Der haloarchaeale Modellorganismus *Haloferax volcanii*

Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Modellorganismus wurde erstmals im Jahre 1975 aus dem Toten Meer isoliert und nach dem Entdecker extrem halophiler Mikroorganismen Benjamin E. Volcani zunächst *Halobacterium volcanii* genannt (Mullakhanbhai & Larsen, 1975). Neue Erkenntnisse in der systematischen Mikrobiologie führten später zur Umbenennung in *Haloferax volcanii* (Torreblanca *et al.*, 1986). Es ist ein halophiles Archaeon der Abteilung Euryarchaeota. Das Genom des Stammes DS2 ist seit dem Jahre 2010 vollständig sequenziert (Hartman *et al.*, 2010) und setzt sich aus fünf zirkulären genetischen Elementen zusammen: dem Hauptchromosom (2,8 Mb), drei kleineren Chromosomen (dem 636 kb pHV4, dem 438 kb pHV3 und dem 85,1 kb pHV1) sowie einem Plasmid (dem 6,35 kb pHV2). Der durchschnittliche GC-Gehalt liegt bei 65 %. Die Anpassung an die optimale Salzkonzentration von 1,7 – 2,5 M Natriumchlorid erfolgt durch die intrazelluläre Anreicherung von Kaliumchlorid (Pérez-Fillol & Rodríguez-Valera, 1986; Mojica *et al.*, 1997). Dies führt zu vielen Besonderheiten in der Zelle. So sind halophile Proteine durch eine hochfunktionalisierte Aminosäurekomposition gekennzeichnet. Es kommen Asparaginsäure, Glutaminsäure, Valin und Threonin signifikant häufiger vor, während Lysin, Methionin, Leucin, Isoleucin und Cystein seltener in halophilen als in nicht-halophilen Proteinen vorkommen (Paul *et al.*, 2008).

H. volcanii eignet sich aufgrund der moderaten Bedingungen für seine Kultivierung, seiner geringen Generationszeit, seines extrem flexiblen Metabolismus und seiner genetischen Zugänglichkeit ideal als ein Modellorganismus für halophile Archaea. So sind seine optimalen Wachstumsbedingungen 2,1 M NaCl und 42 °C und führen in Vollmedium zu einer Generationszeit von lediglich 3 h. *H. volcanii* kann eine Vielzahl von möglichen Kohlenstoffquellen verstoffwechseln und sowohl aerob als auch anaerob wachsen. Es existieren molekularbiologische Methoden zur effizienten Transformation und zur Deletion und Repression von Genen (Soppa, 2006, 2011; Hammelmann & Soppa, 2008; Stachler *et al.*, 2020). *H. volcanii* kann außerdem für ein hochparallelisiertes Phänotypen-Screening in Mikrotiterplatten kultiviert werden (Jantzer *et al.*, 2011).

Der *H. volcanii*-Stamm H26 wurde in der vorliegenden Arbeit als Wildtyp verwendet und auf ihm basieren ebenso alle weiteren verwendeten Stämme. H26 selbst ist eine Uracil-auxotrophe Variante des DS70 Stamms. Letzterer stellt einen optimierten Laborstamm von DS2 dar, dem das Plasmid pHV2 fehlt, während pHV4 ins Hauptchromosom integriert vorliegt (Wendoloski *et al.*, 2001; Hawkins *et al.*, 2013). Zur Erzeugung eines Selektionsmarkers wurde in diesem Stamm wiederum das Orotat-Phosphoribosyltransferase-Gen (*pyrE2*) deletiert, was in dem Stamm H26 resultierte (Allers *et al.*, 2004).

2.3 Kleine Proteine

Während in den letzten Jahrzehnten hunderttausende von Proteinen im Detail untersucht, dabei deren Strukturen aufgeklärt und deren Aktivitäten analysiert wurden, fielen kleine Proteine in vielen wissenschaftlichen Bereichen durch das Raster und ihnen kam keine Aufmerksamkeit zuteil. Hier gilt es zu beachten, dass der Begriff „kleine Proteine“ noch keiner einheitlichen Definition unterliegt. So werden in der Literatur für „kleine Proteine“ auch Begriffe wie Peptide, sORF-codierte Peptide (*small open reading frame*, kleiner offener Leserahmen), sORF-codierte Proteine, Mikropeptide, Mikroproteine oder μ -Proteine verwendet. Dabei kommen teilweise gleiche, aber auch verschiedene Definitionen zum Einsatz. So muss hierfür ein Protein manchmal von einem sORF codiert und ribosomal translatiert sein, kann es jedoch auch Ribosom-unabhängig synthetisiert sein oder durch proteolytische Prozesse aus einem größeren *Precursor*-Protein erzeugt werden. Dar-

über hinaus ist auch die Größe eines „kleinen Proteins“ noch nicht einheitlich definiert. So kamen historisch bedingt häufig 100 Codons als Grenze für ORFs zum Einsatz, die gesetzt wurde, um bei der Annotation neuer Genome falsch-positive Annotationen und einen damit einhergehenden hohen Hintergrund zu vermeiden. Im Zuge des Aufkommens größeren Interesses an kleinen Proteinen wurden diese dann so definiert, dass sie zuvor gesetzte Grenzen nicht berücksichtigt wurden. Zusätzlich zum beschriebenen bioinformatischen Problem bei der Annotation kleiner ORFs, bereiten kleine Proteine in nahezu allen Bereichen experimenteller Arbeit Schwierigkeiten, da die verwendeten Methoden ursprünglich für mittlere und große Proteine entwickelt und optimiert wurden. So sind beispielsweise klassische Polyacrylamid-Gelelektrophoresen zur Detektion kleiner Proteine ungeeignet, da diese während der Auftrennung oder der Färbung verloren gehen.

Jedoch gibt es seit wenigen Jahren ein steigendes Interesse an kleinen Proteinen. Dies liegt daran, dass erkannt wurde, dass ihre Existenz in der Zelle nicht etwa eine Ausnahme, sondern die Regel darstellt. Es existiert eine Vielzahl an kleinen Proteinen und sie übernehmen wichtige funktionelle oder strukturelle Rollen in der Zelle. Ein wichtiger Aspekt für diesen Wandel ist die Entwicklung neuer Methoden. Diese führten im letzten Jahrzehnt zu neuen Möglichkeiten der experimentellen Identifizierung kleiner Proteine. So erlaubt das *Ribosomal Profiling* das Identifizieren der Gesamtheit an Ribosomen-gebundener Fragmente (RBFs). Hierbei werden die kurzen, meist ca. 30 Nukleotid-langen, mRNA-Fragmente, die sogenannten *footprints*, isoliert, die während der Translation zu einem Zeitpunkt von einem Ribosom umschlossen und so vor einem Nuklease-Abbau geschützt sind (Mumtaz & Couso, 2015; Ingolia *et al.*, 2019). Aus den isolierten mRNA-Fragmenten werden cDNA-Bibliotheken erstellt und diese mittels *Next Generation Sequencing* (NGS) analysiert. Auf diese Weise erhält man die Gesamtheit aller Ribosomenpositionen auf allen mRNAs einer Zelle zu einem bestimmten Zeitpunkt. Es können Aussagen darüber getroffen werden, welche Transkripte und wie häufig diese gerade abgelesen werden und an welcher Stelle genau das Ribosom sich zum Zeitpunkt der Zellyse befunden hat. Eine weitere Methodik, die durch Weiterentwicklung einzelner Schritte und Innovationen immer mehr an Bedeutung gewann und sich auch für die Identifikation kleiner Proteine qualifizierte, ist die Massenspektrometrie. Hier wurden essenzielle Schritte der Probenvorbereitung,

wie die Aufreinigung mittels Flüssigchromatographie, soweit verbessert, dass dies einen enorm positiven Einfluss auf die Möglichkeiten anschließender Analysemethoden hatte (Issaq *et al.*, 2009; Finoulst *et al.*, 2011). Aber auch die Weiterentwicklung von Ionisierungs- und Detektionsmethoden der Massenspektrometrie sowie Fortschritte in der bioinformatischen Verarbeitung der erzielten Daten führten zur Einführung eines ganz neuen Forschungsgebietes, den „*peptidomics*“ (Schrader, 2018; Karunratanakul *et al.*, 2019).

Einen Überblick geben und gleichzeitig den enormen Anstieg des Interesses am Forschungsgebiet kleiner Proteine zeigen aktuelle Reviews. Sowohl auf dem Gebiet der Prokaryoten (Storz *et al.*, 2014; Baumgartner *et al.*, 2016; Duval & Cossart, 2017) als auch bei Eukaryoten (Cabrera-Quio *et al.*, 2016; Plaza *et al.*, 2017; Delcourt *et al.*, 2018) sind Fortschritte zu verzeichnen und Schwerpunkte neu gesetzt worden. Inzwischen sind bereits Funktionen von einigen kleinen Proteinen bekannt. So konnte für eukaryotische kleine Proteine gezeigt werden, dass diese viele regulatorische Funktionen übernehmen. Sie können beispielsweise nachweislich in der Hefe, in Pflanzen oder Säugetieren als „*peptoswitch*“ auftreten und hier durch Binden an kleine Signalmoleküle ihre Funktion der internen Translationsregulation aufnehmen, indem sie während der eigenen Translation mit dem Ribosom interagieren, so seine Translokation stoppen und dadurch die Translation von *downstream* ORFs auf dem Transkript verhindern (Andrews & Rothnagel, 2014). Darüber hinaus wurde von kleinen Proteinen in der Hefe berichtet, welche die Rolle von Pheromonen oder Ionen-Chelatoren übernehmen, im Energiemetabolismus involviert, Stressproteine oder Transkriptionsregulatoren sind (Su *et al.*, 2013). Auch als Membran-Mikroproteine treten sie auf, werden hier gehäuft in Mitochondrien gefunden und übernehmen beispielsweise die Regulation von Ionen-Transportern (Makarewich, 2020). Im Menschen wurden viele von kleinen ORFs codierte, kleine Proteine gefunden, die hier ins 5'-mRNA *decapping* involviert sind oder die Apoptose verhindern (Guo *et al.*, 2003; D'Lima *et al.*, 2017). Prokaryotische kleine Proteine treten ebenso vielseitig auf. Wenn auch häufiger enzymatisch gespaltene Peptide nach ihrer Sekretion als Signalproteine wirken, können auch sORF-codierte kleine Proteine diese Aufgabe übernehmen (Liu *et al.*, 2010; Hobbs *et al.*, 2011). Darüber hinaus treten sie als Toxine oder Stabilisa-

tionsfaktoren größerer Proteine auf. Wie bei eukaryotischen sind auch prokaryotische kleine Proteine häufig Regulatoren, Metallionen-Chaperone oder Membrankomponenten (Hobbs *et al.*, 2011; Hartford & Lal, 2020).

Während das Wissen über kleine Proteine in Bakterien und Eukaryoten inzwischen bereits seit einigen Jahren steigt, ist über archaeale Vertreter weniger bekannt. Und dies obwohl bereits im Jahre 2007 ein Vorstoß in diese Richtung gemacht wurde, indem das „*Low Molecular Weight Proteome*“ von *Halobacterium salinarum* untersucht wurde (Klein *et al.*, 2007). Hier wurden zunächst diverse Protokolle für kleine Proteine optimiert und diese dann massenspektrometrisch untersucht. Dabei konnten 380 Proteine von weniger als 20 kDa identifiziert werden. Während knapp 12 % ribosomale Proteine waren und 26 % anderen Funktionen zugeordnet werden konnten, war von über 62 % der Proteine keine Funktion bekannt. Innerhalb dieses Großteils der identifizierten Proteine ohne Funktion gab es 20 mit einem bestimmten Motiv. So ein später als putatives Zinkfingermotiv identifiziertes Motiv bestand aus zwei oder in Ausnahmen vier C(P)XCG-ähnlichen Mustern. Innerhalb dieser spezifischen Aminosäuresequenz befinden sich jeweils zwei Cysteine, denen die Eigenschaft der koordinativen Komplexierung eines Zink-Ions zugesprochen wird. In einem der beiden Muster ist das erste Cystein häufig von einem Prolin gefolgt (daher P angedeutet in Klammern), während sich hier im zweiten Muster meist eine beliebige andere Aminosäure befindet. Einen Überblick über die Ergebnisse, die im Zuge dieser Pionierarbeit auf dem Gebiet haloarchaealer kleiner Proteine erhalten wurden, zeigt Abbildung 2. Betrachtet man die Größenordnung von fast zwei Dritteln der identifizierten Proteine unter 20 kDa ohne annotierte Funktion, stellt man erneut fest, dass noch viele Unbekannte einer ganzen Molekülklasse existieren. Dies zeigt, dass es innerhalb der ganzen Sparte kleiner Proteine noch an viel Forschungsaufwand bedarf, um die komplexen Zusammenhänge regulatorischer Netzwerke innerhalb der Zelle, aber auch vieler weiterer Funktionen, aufzuklären.

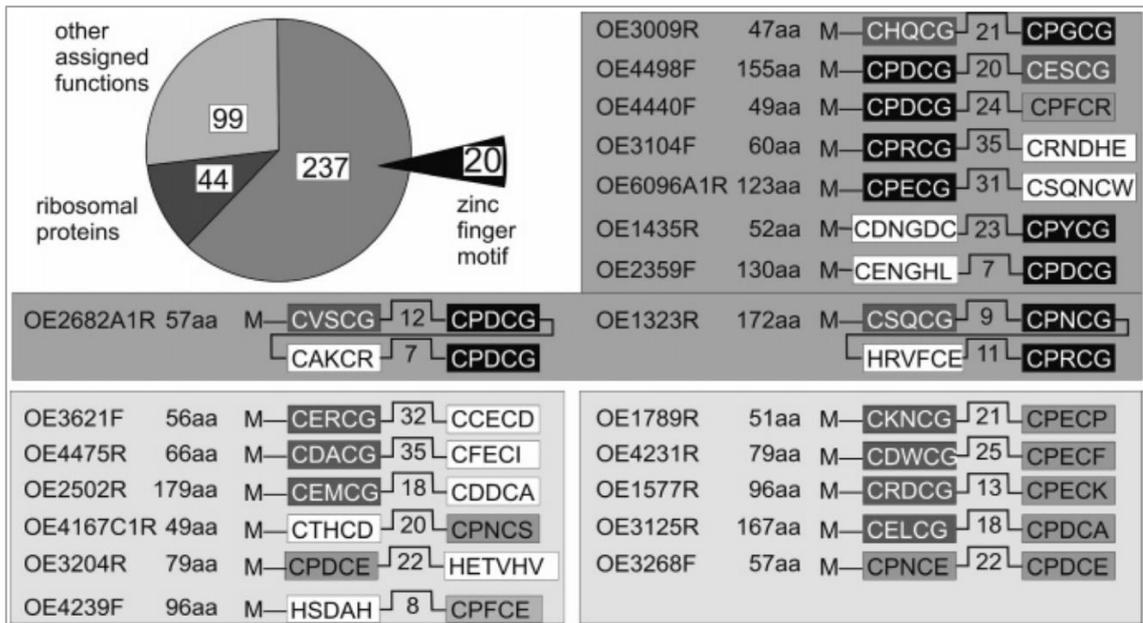


Abbildung 2: Übersicht und Klassifizierung der Funktionen der in *Halobacterium salinarum* identifizierten kleinen Proteine. Knapp zwölf Prozent der gefundenen Proteine sind ribosomale Proteine (44). 26 % sind Proteine mit anderer bekannter Funktion (99), während mit über 62 % vom Großteil der gefundenen Proteine keine Funktion bekannt ist. Fast 10 % dieser Proteine (20) besitzen ein CPXCG-Muster (schwarze Kästen) und/oder relaxierte Formen eines solchen Musters (verschiedene Grautöne) bzw. verwandte Muster (weiße Kästen). Diese Muster treten in Paaren auf und sind von *Linkern* unterschiedlicher Länge getrennt. Abbildung entnommen und modifiziert aus Klein *et al.* (2007).

In der vorliegenden Arbeit werden nachfolgend die Begriffe μ -Proteine und kleine Proteine synonym benutzt. Es handelt sich dabei immer um von kleinen ORFs codierte, ribosomal translatierte Proteine. Die hier bearbeiteten Proteine besitzen maximal 70 Aminosäuren. Dies ist die von der DFG im Rahmen des Schwerpunktprogrammes 2002 „Small Proteins in Prokaryotes, an Unexplored World“, innerhalb dessen diese Arbeit durchgeführt wurde, festgelegte Grenze.

2.4 Zinkfinger-Proteine

Zinkfinger sind in der Regel kleine Protein-Domänen, bei denen Zink eine strukturelle Rolle spielt und erheblich zur Stabilität beiträgt. Dabei sind Zinkfinger strukturell sehr vielfältig und in vielen verschiedenen Proteinen vorhanden, die in sehr unterschiedlichen zellulären Prozessen beteiligt sind. Zinkfinger selbst können mit einer Vielzahl an Molekülen interagieren und so Zinkfinger-Proteinen ihre

vielen verschiedenen Funktionen ermöglichen. Noch lange bevor der Begriff „Zinkfinger“ geprägt und etwas über eine solche spezielle Bindedomäne bekannt war, wusste man bereits, dass Zink-Ionen eine zentrale Rolle in vielen Enzymen spielen und hierbei auch an der katalytischen Funktion beteiligt sind (Argos *et al.*, 1978). Später wurde bei der Untersuchung eines Transkriptionsfaktors in Oozyten des Krallenfrosches *Xenopus laevis* entdeckt, dass dieser Transkriptionsfaktor A (TFIIIA) nicht nur Zink bindet, sondern dieses auch benötigt, um an das Gen der 5S RNA binden und so seine regulatorische Funktion ausüben zu können (Hanas *et al.*, 1983). Dies war die erste Beobachtung eines Zink-abhängigen DNA-Bindeproteins. Bereits damals wurde berichtet, dass auffällig viele Cysteine in dem Protein vorhanden sind, obwohl noch keine Aminosäuresequenz des Transkriptionsfaktors bekannt war, die Aminosäurezusammensetzung jedoch schon. Darüber hinaus war bekannt, dass TFIIIA auch an die 5S RNA selbst bindet (Picard & Wegnez, 1979). Dieses Protein, welches spezifisch sowohl an DNA aber auch an RNA bindet, war Gegenstand intensiver Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen und die erste Beschreibung des Beispiels einer Art Proteine, die später Zinkfinger-Proteine genannt wurden (Frankel *et al.*, 1987). So wurde im Zuge der Analysen bekannt, dass TFIIIA eine Anzahl an konsekutiven Wiederholungen mit einer Länge von circa 30 Aminosäuren in seiner Sequenz besitzt, bei der immer Paare von Cysteinen und Histidinen auftreten (Brown *et al.*, 1985; Miller *et al.*, 1985). Aufgrund der häufigen Assoziation von Cystein- und Histidinseitenketten mit Zink, wurden diese Wiederholungen bereits damals als Zinkbindedomänen identifiziert. Diese wiederum sollen wie die Finger einer Hand angeordnet sein und so die Interaktion mit der DNA bzw. RNA ermöglichen. Die Entdeckung des „klassischen Zinkfingers“ hatte damals das Interesse an der Art der simplen, spezifischen Interaktion mit DNA geweckt. Diese kleine Proteindomäne kann vereinfacht als zurückgefaltetes Peptid, wessen simple Struktur durch koordinative Bindung eines Zink-Ions stabilisiert wird, beschrieben werden (Rhodes & Klug, 1993). Genauer gesagt wird dabei das Zink-Ion tetraedrisch von den vier Aminosäureseitenketten (Cys₂His₂) koordiniert, die sich durch die ββ α -Struktur der Proteindomäne um dieses Ion herum falten. Zinkfinger-Proteine wurden demnach nicht nur zuerst in Eukaryoten gefunden, man ging zunächst auch davon aus, dass sie dieser Domäne auch exklusiv vorbehalten sind.

Das erste prokaryotische Zinkfinger-Protein, der Transkriptionsregulator Ros, wurde in *Agrobacterium tumefaciens*, einem Pflanzenpathogen, entdeckt. Ros reguliert dabei Virulenzgene auf der sogenannten T-DNA, welche vom Bakterium auf den pflanzlichen Wirt übertragen und in dessen Genom integriert wird. Diese Entdeckung warf zunächst große Fragen auf und es wurde spekuliert, ob das dafür codierende Gen möglicherweise durch horizontalen Retrotransfer von der Pflanze auf das Bakterium übertragen wurde (Chou *et al.*, 1998; Bouhouche *et al.*, 2000; Moreira & Rodríguez-Valera, 2000). Weitere Untersuchungen zeigten jedoch, dass dieses Zinkfinger-Protein kein Einzelfall ist und Zinkfinger auch in Prokaryoten eine große Rolle spielen (Malgieri *et al.*, 2015). Denn es wurden immer mehr prokaryotische Homologe zum Ros Protein, Mitglieder der Ros/MucR-Familie, gefunden. Zunächst nur in Pflanzenpathogenen, was die ursprüngliche Theorie bestärkte, später aber auch in vielen anderen Bakterien sowie Archaeen, was vermuten ließ, dass auch innerhalb der Prokaryoten Zinkfinger weit verbreitet sind. Dieser zunächst im Ros Protein identifizierte Zinkfinger zeigt sowohl strukturelle als auch funktionale Unterschiede zum eukaryotischen klassischen Zinkfinger. Seine Zink-bindende globuläre Domäne ist mit 58 Aminosäuren signifikant größer als der klassische eukaryotische Zinkfinger und in einer $\beta\beta\beta\alpha$ -Topologie angeordnet, während das Zink-Ion gleichbleibend von zwei Cysteinen und zwei Histidinen koordiniert wird (Malgieri *et al.*, 2007).

Im Laufe der Jahre wurden zunehmend mehr Zinkfinger-Proteine identifiziert und charakterisiert. Bereits im Jahre 2003 wurden die verschiedenen Ausprägungen von Zinkfingern in acht strukturelle Klassen gegliedert (Krishna *et al.*, 2003). Bei diesen Klassen werden zum Beispiel C_2H_2 -Ähnliche, dem auch der „klassische Zinkfinger“ angehört, in einer Klasse zusammengefasst. Bei diesen wird das Zink-Ion von zwei Cysteinen eines antiparallelen β -Faltblatts und zwei Histidinen des C-terminalen Endes einer α -Helix komplexiert. Des Weiteren gibt es Gruppen wie den „Gag knuckle“. Bei diesem sind für die Koordination des Zink-Ions zwei Aminosäureseitenketten eines *knuckles* (oder *zinc knuckle*; der *linker/turn*, der zwei Stränge eines β -Faltblatts verbindet) und zwei Aminosäureseitenketten einer kurzen Helix oder eines kurzen *loops* verantwortlich. Oder das „*Zinc ribbon*“, bei dem jeweils zwei Seitenketten von einem *knuckle* kommen. Diese Gruppen enthalten teilweise noch weitere Untergruppen und zeigen dabei die Komplexität und den

Umfang dieser Proteinklasse/-domäne sehr gut auf. Dabei wird der Begriff „Zinkfinger“ als allgemeiner, übergeordneter Begriff verwendet.

In der Literatur sind zahlreiche Beispiele von bereits charakterisierten Zinkfinger-Proteinen beschrieben. Für die Taufliege *Drosophila melanogaster* ist beispielsweise für das Protein CLP gezeigt, dass es am C-Terminus zwei CCHC-*zinc knuckles* besitzt und dadurch seine Bindeaffinität zu G- und/oder C-reichen RNA-Clustern erhält. CLP ist ein Homolog der Endonuklease CPSF (*cleavage and polyadenylation specificity factor*), die RNA-*hairpins* spaltet. Für ein weiteres Protein der Taufliege, dem GAGA-Faktor, der für die normale Expression mehrerer homeotischen Gene benötigt wird, konnte gezeigt werden, dass dieser nur eine einzige Zinkfinger-Domäne besitzt (Granok *et al.*, 1995). Seine spezifische DNA-Bindeaktivität mit der Consensus-Sequenz GAGAG erhält er durch Kombination des Zinkfingers, der die ersten drei Basen der Consensus-Sequenz bindet, mit zwei basischen Regionen in der Sequenz. Hierbei bildet eine Region eine Helix aus, interagiert so mit der großen Furche der DNA und erkennt dabei das letzte G der Consensus-Sequenz, während sich die andere Region um die DNA im Bereich der kleinen Furche wickelt und das A an der vierten Position der Consensus-Sequenz bindet (Omichinski *et al.*, 1997). Auch für das humane HMD2 Protein, einem Onkogen, das an das Tumorsuppressorgen p53 bindet und dieses dabei inaktiviert, konnte gezeigt werden, dass es neben seiner Proteinbinde-Domäne eine Zinkfinger-Domäne besitzt, die ihm die Fähigkeit zur spezifischen Bindung an RNA vermittelt (Lai *et al.*, 1998). Interessanterweise konnte dabei gezeigt werden, dass hier *in vitro* Zink nicht unbedingt nötig für die Faltung und Funktion der RNA-Bindedomäne ist. In Mäusen konnte gezeigt werden, dass das Protein Ikaros, ein Regulator der Lymphozyten-Differenzierung, Homodimere mittels Interaktion jeweils seiner zwei C-terminalen C₂H₂-Zinkfinger-motive formt (Sun *et al.*, 1996). Darüber hinaus formt Aiolos, ein Ikaros-ähnliches Protein, mit seiner Zwei-Zinkfinger-Domäne sowohl Homodimere als auch Heterodimere mit Ikaros (Morgan *et al.*, 1997). Für die FYVE-Domäne, die in vielen eukaryotischen Proteinen und Organismen vorkommt, konnte gezeigt werden, dass sie für die spezifische Erkennung des Phospholipids Phosphatidylinositol-3-Phosphat verantwortlich ist. Die FYVE-Domäne ist benannt nach den ersten vier Proteinen, in denen sie gefunden wurde (Fab 1, YOTB, Vac 1 und EEA1) und konnte dabei als Zinkfinger-Domäne identifiziert werden (Misra & Hurley, 1999).

In *E. coli*, dem am intensivsten untersuchten Modellorganismus gramnegativer Bakterien, existiert ein gründlich charakterisierter Chemosensor Ada. Dieser repariert Methyl-Phosphotriester-Läsionen in der DNA, indem er die aberrante Methylgruppe spezifisch auf die Seitenkette eines eigenen Cysteins überträgt. Diese Methylierung wiederum verstärkt seine eigene DNA-Bindeaktivität, mit der es ein Methylierungs-Resistenz Regulon aktiviert. Beide Aktivitäten des Proteins sind Zink-abhängig und werden durch einen Methylierungs-abhängigen elektrostatischen Schalter gesteuert (He *et al.*, 2005). Zinkfinger-Proteine können eine Rolle bei der Regulation der Zink-Homöostase spielen, indem ihre Transkriptionsregulatorfunktion durch Binden von freiem Zink aktiviert wird, wie für das Beispiel des YJAI (ZRAP) in *E. coli* (Noll *et al.*, 1998), aber auch für Proteine in Säugetierzellen, Hefe und Pflanzen gezeigt werden konnte (Chen *et al.*, 1999).

Zusammenfassend lässt sich für eukaryotische Zinkfinger-Proteine sagen, dass hier immer zwei oder mehr Zinkfinger benötigt werden, um eine spezifische Interaktion mit DNA einzugehen. Eine Ausnahme bildet hier der GAGA-Faktor, bei dem ein einzelner Zinkfinger zusammen mit zwei weiteren Regionen des Proteins für eine spezifische Bindung sorgen. Dabei ist entscheidend, dass in der Regel jede Zinkfinger-Domäne in einer große Furche der DNA bindet und dort eine spezifische Interaktion mit drei Basen der DNA eingeht (Elrod-Erickson *et al.*, 1996; Eom *et al.*, 2016). Die größte Klasse an eukaryotischen Zinkfingern bilden die Cys₂His₂-, C₂H₂- oder „klassischen“ Zinkfinger. Dabei ist das häufigste Muster Cys-X₄-Cys-X₁₂-His-X₃-His, bei dem die beiden Cysteine durch vier beliebige, die beiden Histidine durch drei beliebige Aminosäuren verbunden sind, während diese beiden Muster wiederum ein Linker von zwölf beliebigen Aminosäuren trennt (Eom *et al.*, 2016). Es konnte für eukaryotische Zinkfinger gezeigt werden, dass diese für spezifische DNA-, RNA- und Proteininteraktionen verantwortlich sind und dabei in der Transkriptions- und Translationsregulation eine Rolle spielen, aber auch für die Homöostase von Zink selbst wichtig sein können. Sie können in der Protein-Degradation, in der Signaltransduktion und weiteren Prozessen involviert sein (Cassandri *et al.*, 2017).

Die strukturelle Evolution vom prokaryotischen zum eukaryotischen Zinkfinger muss in mehreren Schritten passiert sein und ein Szenario der Vererbung von Prokaryoten zu Eukaryoten mittels mitochondrieller Endosymbiose ist wahrscheinlich (Malgieri *et al.*, 2015). Für prokaryotische Zinkfinger konnte gezeigt

werden, dass der Zink-koordinierende Kern ähnlich dem eukaryotischen Zinkfinger ist, er aber um zusätzliche Elemente erweitert vorliegt und sich somit signifikant von den eukaryotischen Zinkfingern unterscheiden (Kluska *et al.*, 2018). Zinkfinger in Prokaryoten können ebenfalls für spezifische DNA- und RNA-Interaktionen verantwortlich und dabei in der Transkriptions- und Translationsregulation eine Rolle spielen, aber auch für die Homöostase von Zink selbst wichtig sein. Darüber hinaus wurde von prokaryotischen Zinkfingern berichtet, die kein Zink mehr benötigen, da intramolekulare polare und hydrophobe Interaktionen die Rolle des Zink ersetzen (Malgieri *et al.*, 2015).

Wie zuvor beschrieben, wurde bei der Untersuchung des „Low Molecular Weight Proteom“ im Archaeon *H. salinarum* eine Vielzahl an Proteinen experimentell identifiziert, denen keinerlei Funktion zugeordnet werden konnte (Klein *et al.*, 2007). Unter diesen 237 Proteinen befanden sich 20 potenzielle Zinkfinger-Proteine, von denen eines nachfolgend im Detail charakterisiert werden konnte. Es konnte gezeigt werden, dass dieses Zinkfinger-Protein mit dem C(P)XCG-Zinkfinger-Motiv an der Regulation der Expression des Bakteriorhodopsins maßgeblich beteiligt ist (Tarasov *et al.*, 2008). Darüber hinaus wurde bei der statistischen Analyse von 32 komplett sequenzierten Genomen gezeigt, dass 8 % aller archaealen Proteine mit weniger als 100 Aminosäuren solche C(P)XCG-ähnlichen Zinkfinger-Motive enthalten. Dem gegenüber stehen lediglich 1,5 % der bakteriellen Proteine mit weniger als 100 Aminosäuren, die ein solches Motiv enthalten, wie die Untersuchung von 24 bakteriellen Genomen ergab (Tarasov *et al.*, 2008). Diese Erkenntnisse wurden herangezogen um auch im Genom von *H. volcanii* Gene, die für solche C(P)XCG-Zinkfinger-Proteine codieren, zu annotieren. In *H. volcanii* existieren 281 μ -Proteine (maximal 70 Aminosäuren), davon ist von lediglich 30 Proteinen eine Funktion bekannt. Von diesen 281 μ -Proteinen besitzen 43 solche Zinkfinger-Motive und von keinem dieser Zinkfinger- μ -Proteine ist bisher die genaue Funktion bekannt. Allerdings wurden bereits 16 der 43 Zinkfinger-Proteincodierenden Gene ausgewählt, Deletionsmutanten erstellt und so Charakterisierungen durchgeführt (Nagel *et al.*, 2019). Dabei wurden die Phänotypen der Deletionsmutanten mit dem des Wildtyps unter acht verschiedenen Bedingungen verglichen, wie zum Beispiel dem Wachstum mit Glycerin als Kohlenstoffquelle, den Einfluss von Gallensäuren auf das Wachstum oder die Fähigkeit Biofilme zu bilden oder zu Schwärmen. Es konnten hierbei Unterschiede zum Wildtyp in 12

der 16 Deletionsmutanten bei jeweils mindestens einer Bedingung gefunden werden, was unterstreicht, dass viele dieser Proteine wichtige Rollen innerhalb der Zelle einnehmen.

2.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Die letzten beiden Kapitel zeigen auf, welche wichtige Rolle kleine Proteine spielen können, die lange Zeit nicht die Aufmerksamkeit in der Forschung erhalten haben, die ihnen gebührt, aber auch wie vielseitig Zinkfinger-Proteine sein können. *H. volcanii* besitzt 43 Proteine, die in beide Kategorien von Proteinen gleichzeitig einzuordnen sind. Sie besitzen alle ein spezielles Zinkfinger-Motiv, ohne die maximale Länge von 70 Aminosäuren zu überschreiten. Während bereits 16 dieser 43 Proteine einer Charakterisierung unterzogen wurden, indem Deletionsmutanten ihrer Gene erstellt wurden, sollte im Zuge der vorliegenden Arbeit ein Ausgewähltes der 43 Zinkfinger-Proteine und damit das zweite archaeale Zinkfinger- μ -Protein überhaupt, einer tiefgreifenden Charakterisierung unterzogen werden.

Die Auswahl des zu charakterisierenden Proteins HVO_2753 wurde aufgrund einer Auffälligkeit in seiner Aminosäuresequenz getroffen. HVO_2753 stellt das einzige Zinkfinger- μ -Protein in *H. volcanii* dar, welches vier der spezifischen C(P)XCG-ähnlichen Muster aufweist, während die übrigen 42 lediglich zwei dieser Muster enthalten. Die Charakterisierung des Proteins sollte bioinformatische Analysen umfassen, mit denen Homologe in anderen Spezies identifiziert und Gemeinsamkeiten und Unterschiede in der Aminosäuresequenz untersucht werden können. Des Weiteren sollten *in vivo*-Funktionsanalysen durchgeführt werden. Dabei sollte eine phänotypische Charakterisierung der erstellten Deletionsmutante des HVO_2753-Gens die Auswirkungen der Abwesenheit des kleinen Zinkfinger-Proteins zeigen. Weitere *in vivo*-Untersuchungen sollten auf den Ergebnissen dieser Analysen aufbauen und die Funktionsaufklärung weiter vorantreiben. Mithilfe einer RNA-Sequenzierung sollten die Auswirkungen der Abwesenheit von HVO_2753 auch auf Transkriptomebene untersucht werden.

Außerdem sollte die Überproduktion von HVO_2753 im homologen System etabliert und ein Aufreinigungsprotokoll erstellt und optimiert werden. Das dabei nativ aufgereinigte HVO_2753 sollte anschließend einer massenspektrometrischen Analyse und einer fluorimetrischen Untersuchung zum Zinkgehalt unterzogen

werden. Zusätzlich sollten mittels Co-Affinitätsreinigung und anschließender massenspektrometrischer Analyse Interaktionspartner von HVO_2753 identifiziert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Organismen

3.1.1 *Haloferax volcanii*

Der Elternstamm *Haloferax volcanii* H26, der im Folgenden als Wildtyp (WT) bezeichnet wird, liegt allen anderen verwendeten Stämmen zugrunde. Dieser basiert auf dem Stamm DS70 (Allers *et al.*, 2004). Alle in dieser Arbeit erstellten oder verwendeten Stämme sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Übersicht über alle verwendeten *H. volcanii* Stämme. Alle verwendeten Stämme basieren auf dem Ausgangsstamm H26 (Allers *et al.*, 2004) und wurden in dieser Arbeit erstellt. Leervektorkontrollen (evc, *empty vector control*) besitzen den entsprechenden Vektor ohne inseriertes Gen in der MCS (*multiple cloning site*).

Stamm	Genotyp	Plasmid
H26	$\Delta pyrE2$	N/A
H26 evc	$\Delta pyrE2$	pTA929
ΔHVO_2753	$\Delta pyrE2 \Delta HVO_2753$	N/A
ΔHVO_2753 evc	$\Delta pyrE2 \Delta HVO_2753$	pTA929
ΔHVO_2753 +2753n	$\Delta pyrE2 \Delta HVO_2753$ { <i>p.tnaA::6×His tag::HVO_2753</i> }	pTA929_HVO_2753_NHis
ΔHVO_2753 +2753c	$\Delta pyrE2 \Delta HVO_2753$ { <i>p.tnaA::HVO_2753::6×His tag</i> }	pTA929_HVO_2753_CHis
ΔHVO_2753 +2753c_C12A	$\Delta pyrE2 \Delta HVO_2753$ { <i>p.tnaA::HVO_2753⁻::6×His tag</i> }	pTA929_HVO_2753_C12A_CHis
ΔHVO_2753 +2753c_C29A	$\Delta pyrE2 \Delta HVO_2753$ { <i>p.tnaA::HVO_2753⁻::6×His tag</i> }	pTA929_HVO_2753_C29A_CHis
ΔHVO_2753 +2753c_C39A	$\Delta pyrE2 \Delta HVO_2753$ { <i>p.tnaA::HVO_2753⁻::6×His tag</i> }	pTA929_HVO_2753_C39A_CHis
ΔHVO_2753 +2753c_C51A	$\Delta pyrE2 \Delta HVO_2753$	pTA929_HVO_2753_C51A_CHis

	<i>{p.tnaA::HVO_2753⁻::6×His tag}</i>	
ΔHVO_2753 +2753c_Q34A	ΔpyrE2 ΔHVO_2753 <i>{p.tnaA::HVO_2753⁻::6×His tag}</i>	pTA929_HVO_2753_Q34A_CHis
ΔHVO_2753 +2753c_Y49F	ΔpyrE2 ΔHVO_2753 <i>{p.tnaA::HVO_2753⁻::6×His tag}</i>	pTA929_HVO_2753_Y49F_CHis
OE_2753n	ΔpyrE2 ΔHVO_2753 <i>{p.fdx⁻::6×His tag::HVO_2753}</i>	pSD1_R1/6_HVO_2753_NHis

3.1.2 *Escherichia coli*

Für Klonierungsarbeiten wurde der *E. coli*-Stamm XL1 blue MRF´ von der Firma Agilent Technologies (Santa Clara, USA) verwendet. Der Genotyp dieses Stammes lautet Δ(mcrA)183; Δ(mcrCB-´ hsdSMR-mrr)173; recA1; endA1; gyrA96; thi-1; hsdR17; supE44; relA1 lac [F´proAB+lacIΔM15 Tn10 (TetR)].

3.2 Materialien

3.2.1 Chemikalien

Tabelle 2: Chemikalienliste

Bezeichnung	Hersteller
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
5-Fluor-Orotsäure	Roth, Karlsruhe
Acetanhydrid	Roth, Karlsruhe
Acrylamid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Agarose LE	Biozym, Hessisch Oldendorf
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
ATP (10 mM)	New England Biolabs, Ipswich, MA (USA)
BactoTM-Agar	BD, Heidelberg
BactoTM-Hefeextrakt	BD, Heidelberg
BactoTM-Trypton	BD, Heidelberg
BME-Vitaminlösung	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Blocking-Reagenz	Merck, Darmstadt

Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Calciumdichlorid Dihydrat	VWR, Darmstadt
Casaminosäuren	BD, Heidelberg
Chelating Sepharose™ Fast Flow	GE Healthcare, Little Chalfont (UK)
Coomassie Blue R-250	Roth, Karlsruhe
Cy3 / Cy5 dUTP	GE Healthcare, Little Chalfont (UK)
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	Fermentas, St. Leon-Rot
Dichlorethan	Roth, Karlsruhe
Diethylether	VWR, Darmstadt
Digoxygenin-Deoxyuridin-triphosphat	Roche, Mannheim
Dikaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid, für die Spektroskopie	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Entwickler Kodak GBX	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Essigsäure ≥ 98 % (v/v)	Roth, Karlsruhe
Ethanol (EtOH) 99 % p. a. (v/v)	VWR, Darmstadt
Ethidiumbromid	Fluka, Neu-Ulm
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Formaldehydlösung 37 % (w/v)	Roth, Karlsruhe
Glukose-Monohydrat	Merck, Darmstadt
Glycerin 87 % p. a. (v/v)	VWR, Darmstadt
Glycin	Amresco, Ohio Solon (USA)
Guanidiniumthiocyanat	Roth, Karlsruhe
Harnstoff	VWR, Darmstadt
Hefe-tRNA	Boehringer Ingelheim, Ingelheim
Hexaammincobalt(III)-chlorid	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA (USA)
Imidazol	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	VWR, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Kanamycin	Roth, Karlsruhe
Kobaltchlorid Hexahydrat	Merck, Darmstadt
Kupferchlorid Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Magermilchpulver	VWR, Darmstadt
Magnesiumdichlorid Hexahydrat	VWR, Darmstadt
Magnesiumsulfat Heptahydrat	VWR, Darmstadt

Manganchlorid Tetrahydrat	Merck, Darmstadt
Methanol	VWR, Darmstadt
MOPS	Roth, Karlsruhe
N,N' -Methylenbisacrylamid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
N-Lauroylsarcosinat 30 % (w/v)	Applichem, Darmstadt
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid, ultra trocken	Alfa Aesar, Ward Hill, MA (USA)
tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
Natriummolybdat Monohydrat	Roth, Karlsruhe
Natriumnitrat	Roth, Karlsruhe
NEXTERION® Oligo Hyb	SCHOTT AG, Mainz
Nickelchlorid Hexahydrat	Merck, Darmstadt
PEG 8000	New England Biolabs, Ipswich, MA (USA)
Phusion GC Puffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA (USA)
Polyethylen Glycol (PEG) 600	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
R inderserumalbumin BSA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
ROTI® Aqua-P/C/I	Roth, Karlsruhe
S alzsäure 37 % (w/w)	Roth, Karlsruhe
Silbernitrat	Roth, Karlsruhe
T etramethylethylenediamine (TEMED)	Serva, Heidelberg
Tricin Puffer	VWR, Darmstadt
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Tween® 20	Roth, Karlsruhe
U racil	Applichem, Darmstadt
Z inkchlorid, ultra trocken	Alfa Aesar, Ward Hill, MA (USA)
Zinksulfat Heptahydrat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

3.2.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Verbrauchsmaterialienliste

Bezeichnung	Hersteller
Eppendorf-Reaktionsgefäß (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Erlenmeyerkolben	Duran Group, Wertheim
Feuchtigkeitskammer	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Framed Dialysis Membrane (MW cutoff 3000 Dalton)	Pierce, Rockford, IL (USA)
Gel-Blotting-Papier (0,37 mm, 1,4 mm)	Roth, Karlsruhe
Kodak® BioMax® light film	Carestream Health, Stuttgart
Küvetten 10*4*45 mm	Sarstedt, Nümbrecht
Nitrocellulosemembran Whatman® Protran® BA85	GE Healthcare, Little Chalfont (UK)
Nylonmembran Roti® -Nylon plus	Roth, Karlsruhe
Membranfilterscheiben (0,025 µm, 13 mm, hydrophil, Zellulosemischester)	Merck, Darmstadt
Mikrotiterplatten 96-well, Flachboden	Sarstedt, Nümbrecht
Mikrotiterplatten 96-well, Flachboden, schwarz, Microfluor® 1	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA (USA)
Multiply® Pro Gefäß	Sarstedt, Nümbrecht
Pasteurpipetten	Hirschmann, Eberstadt
Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen (2, 200 und 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Schraubröhre 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturplatte TC-Platte 6 Well, Cell+, F	Sarstedt, Nümbrecht

3.2.3 Geräte

Tabelle 4: Geräteliste

Bezeichnung	Gerät/Modell	Hersteller
Autoklav	FVS/2	Fedegari Autoclavi, Albuzzano (Italien)
	SANOclav LaM-201	Maschinenbau Wolf, Bad Überkingen

ÄKTA™ FPLC	Mit Säule Superdex™ 75 Increase 10/300 GL und Säule Superose™ 6 10/300 GL	GE Healthcare, Little Chalfont (UK)
Dichtegradienten-Fraktioniersystem		Teledyne ISCO, Lincoln (USA)
Elektroblotting-Apparatur	Fastblot B43	Biometra, Göttingen
Einkanalpipette	Research 0,01-2,5 µl Discovery Comfort 2-20 µl Discovery Comfort 20-200 µl Discovery Comfort 200-1000 µl	Eppendorf, Hamburg HTL Lab Solution, Warschau (Polen) HTL Lab Solution, Warschau (Polen) HTL Lab Solution, Warschau (Polen)
Geldokumentationsstation	High Resolution System E.A.S.Y 440K	Herolab, Wiesloch
Gel-Elektrophoresekammer	SE 250 SE 600 Biometra Minigel Twin	Hoefer, Holliston (USA) Hoefer, Holliston (USA) Analytik Jena, Jena
Gradient Master	107	BioComp Instruments, Frederickton (Kanada)
Heizblock	EPT-130-36-1,5	Liebisch, Bielefeld
Heizrührer	MR 3000	Heidolph Instruments, Schwabach
Hybridisierungssofen	HB-1000	UVP, Upland (USA)
Hybridisierungsstation	HS 400™ Pro Hybridization Station	Tecan Trading, Männedorf, CHE
Inkubator	B6060 kelvitron t T257	Heraeus Instruments, Hanau Heraeus Instruments, Hanau Rubarth Apparate, Laatzen
Mehrkanalpipette	Discovery Comfort 5-50 µl Discovery Comfort 20-200 µl	HTL Lab Solution, Warschau (Polen) HTL Lab Solution, Warschau (Polen)
Mikroskop	Axiostar Plus	Carl Zeiss, Göttingen
Mikrotiterplattenphotometer	SPECTRAmax ® 340PC CLARIOstar	Molecular Devices, Sunnyvale (USA) BMG LABTECH, Ortenberg
PCR-Cycler	Gene Amp PCR-System 9700	Applied Biosystems, Foster City (USA)

	Veriti 96-well Thermal Cycler	Applied Biosystems, Foster City (USA)
pH-Meter	CG 825	Schott, Mainz
Pipettierhilfe	Accurpette	VWR International, Radnor (USA)
Schüttelinkubator	innova 4300	New Brunswick Scientific, New York (USA)
	SI 20 (K30-300)	Axon Labortechnik, Kaiserslautern
Spektralphotometer	Specord S 600	Analytik Jena, Jena
	Nanodrop 2000c	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA (USA)
Ultraschall Homogenisator	Ultrasonics Converter	Branson, Danbury, USA
	Sonifier 250	Branson, Danbury, USA
UV-Stratalinker™	1800	Stratagene, La Jolla (USA)
Waage	PB300	Mettler, Gießen
	PM 4800 Delta Range®	Mettler, Gießen
	TE1245OCE	Sartorius, Göttingen
Zentrifuge	BioFuge Pico	Heraeus Instruments, Hanau
	Centrifuge 5810 R mit Rotor A-4-62	Eppendorf, Hamburg
	Kühlzentrifuge Sorvall RC6+ mit Rotor SS-34 (16.000 rpm)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA (USA)
	mit Rotor SH3000 (4.700 rpm)	
	mit Rotor F10S-6x500Y (16.000 rpm)	
	Ultrazentrifuge Optima XPN-80 mit Rotor SW 41 Ti	Beckman Coulter, Brea, CA (USA)

3.2.4 Molekularbiologische und biochemische Kit-Systeme

Tabelle 5: Liste molekularbiologischer und biochemischer Kit-Systeme

Bezeichnung	Hersteller
BC Assay : Protein Assay Kit	Montlucon Cedex, Frankreich
CDP Star	Roche, Mannheim
E.Z.N.A. Gel Extraction Kit	VWR International, Radnor (USA)
E.Z.N.A. Cycle Pure Kit	VWR International, Radnor (USA)
GenElute™ Plasmid Midiprep Kit	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Monarch RNA Cleanup Kit	New England Biolabs, Ipswich, MA (USA)

Monarch PCR & DNA Cleanup Kit	New England Biolabs, Ipswich, MA (USA)
Nucleospin® Plasmid Kit	MACHEREY-NAGEL, Düren
NucleoSpin® miRNA-Kit	MACHEREY-NAGEL, Düren
Roti® -Lumin	Roth, Karlsruhe
QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies, Santa Clara (USA)

3.2.5 Enzyme und Ähnliches

Tabelle 6: Enzymliste

Bezeichnung	Hersteller
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA (USA)
Lysozym	AppliChem, Darmstadt
RNase (DNase frei)	AppliChem, Darmstadt
T4 DNA-Ligase	New England Biolabs, Ipswich, MA (USA)
Taq-DNA-Polymerase	Eigenisolat
DNase I	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA (USA)
SUPERase-In™ RNase Inhibitor	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA (USA)
GoScript™ Reverse Transcriptase	Promega, Walldorf
RNase H	New England Biolabs, Ipswich, MA (USA)
T4 RNA Ligase 1	New England Biolabs, Ipswich, MA (USA)

3.2.6 Größenstandards

Tabelle 7: Liste der Größenstandards

Bezeichnung	Hersteller
GeneRuler™ 100 bp Plus	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA (USA)
GeneRuler™ 1 kb Plus	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA (USA)
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA (USA)
PageRuler™ Unstained Low Range Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA (USA)
RiboRuler™ RNA Ladder High Range	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA (USA)
RiboRuler™ RNA Ladder Low Range	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA (USA)
Color Marker Ultra-low Range	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
GeneRuler™ 1 kb Plus	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA (USA)

3.2.7 Oligonukleotide

Tabelle 8: Liste der Oligonukleotide. Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen.

Bezeichnung	Sequenz (5' – 3')	Verwendungszweck / Anmerkung
HVO_2753_for_NHis	GACTAGCATATGCACCACCACCACCA-CAGCGAGTCCGAACAGCGACAC	Klonierung von <i>HVO_2753</i> mit N-terminalem His-Tag in pTA929
HVO_2753_rev_NHis	GACTAGAAGCTTTTATGGACCCAT-GAAGCCGCAGTCG	
HVO_2753_for_CHis	GACTAGCATAT-GAGCGAGTCCGAACAGCGACAC	Klonierung von <i>HVO_2753</i> mit C-terminalem His-Tag in pTA929
HVO_2753_rev_CHis	GACTAGAAGCTTT-TAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGACCCAT-GAAGCCGCAGTCG	
HVO_2753_C1A_for	GACACGCGCACCAGGCTGTGTCCTGTGGCA	Einführung der Punktmutation C12A
HVO_2753_C1A_rev	TGCCACAGGACACAGCCTGGTGC GCGTGTC	
HVO_2753_C3A_for	GGCGACGTTCAAGGCCCCGACTGCGGC	Einführung der Punktmutation C29A
HVO_2753_C3A_rev	GCCGCAGTCGGGGCCTGAACGTCGCC	
HVO_2753_C5A_for	CCAGGAGATTCGCGTGCTT-CCAAGTGCCGCAAG	Einführung der Punktmutation C39A
HVO_2753_C5A_rev	CTTGCGGCACTTG-GAAGCACGCGAAATCTCCTGG	
HVO_2753_C7A_for	GCAACCTCTACGAGGCTCCCGACTGCGGCT	Einführung der Punktmutation C51A
HVO_2753_C7A_rev	AGCCGCAGTCGGGAGCCTCGTAGAGGTTGC	
HVO_2753_Q34A_for	CCCCGACTGCGGCGCGGAGATTCGCGT	Einführung der Punktmutation Q34A
HVO_2753_Q34A_rev	ACGCGAAATCTCCGCGCCGAGTCGGGG	
HVO_2753_Y49F_for	CAAGCAGAGCAACCTCTTCGAGTGTCCCG	Einführung der Punktmutation Y49F
HVO_2753_Y49F_rev	CGGGACACTCGAAGAGGTTGCTCTGCTTG	
HVO_2752_for_NB	AATCAAGGTCATGCCGAACAGCCC	Sondengenerierung gegen <i>HVO_2753</i> für den Northernblot
HVO_2752_rev_NB	CAGATACGGCCGACGTTCTCGAC	

HVO_2753_PstI_NdeI_NHis_fw	GACTAGCTGCAGGACTAGGACCATATGCACCA- CCACCACCACCA- CAGCGAGTCCGAACAGCGACAC	Klonierung von HVO_2753 mit N-terminalem His-Tag in pSD1-R1/6
HVO_2753_KpnI_rev	GACTAGGGTACCTTATGGACCCAT- GAAGCCGCAGTCG	
HVO_2753_PstI_NdeI_fw	GACTAGCTGCAGGACTAGGACCATAT- GAGCGAGTCCGAACAGCGACAC	Klonierung von HVO_2753 mit C-terminalem His-Tag in pSD1-R1/6
HVO_2753_KpnI_CHis_rev	GACTAGGGTACCT- TAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGACCCAT- GAAGCCGCAGTCG	
KolExpr_for	CACACACCAGTCCACGAGCGCC	Plasmidspezifische Anwendungen pTA929
KolExpr_rev	CTGGAGCTCCACCGCGCCG	
M13-20_for	GTAAAACGACGGCCAGTG	Plasmidspezifische Anwendungen pBluescriptSK+
T3_rev	AATTAACCCTCACTAAAGGG	
pSD1-R1/6_for	AGCGTCGTGATGGCGGTCACACCC	Plasmidspezifische Anwendungen pSD1-R1/6
pSD1-R1/6_rev	TGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCC	
DNA-Adapter	GGTCGACCGATCCGGATCGATATCGCCTGG	DNA-Adapter-Ligation / mit 5'-Phosphat und 3'-Amino-Modifizier-C3-CPG
DNA-Adapter Primer rev	CCAGGCGATATCGATCCGGATCGG	

3.2.8 Plasmide

Tabelle 9: Liste der Plasmide. Wenn nicht anders angegeben, wurde das Plasmid im Rahmen dieser Arbeit generiert.

Bezeichnung	Verwendungszweck und Referenz
pBluescriptSK(+)	Klonierungsarbeiten und ortsspezifische Mutagenese (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)
pQE60_HVO_2753_NHis	Heterologe Überexpression des Gens HVO_2753 mit N-terminalem His ₆ -Tag. Basierend auf pQE60 (Qiagen, Hilden)
pMH101_ΔHVO_2753	<i>in frame</i> Deletion des Gens HVO_2753. Basierend auf pMH101 (Hammelmann & Soppa, 2008)
pTA929_HVO_2753_NHis	Komplementation. Basierend auf pTA929 (Allers <i>et al.</i> , 2010)
pTA929_HVO_2753_CHis	Komplementation. Basierend auf pTA929 (Allers <i>et al.</i> , 2010)
pTA929_HVO_2753_C12A_CHis	Komplementation. Basierend auf pTA929 (Allers <i>et al.</i> , 2010)

pTA929_HVO_2753_C29A_CHis	Komplementation. Basierend auf pTA929 (Allers <i>et al.</i> , 2010)
pTA929_HVO_2753_C39A_CHis	Komplementation. Basierend auf pTA929 (Allers <i>et al.</i> , 2010)
pTA929_HVO_2753_C51A_CHis	Komplementation. Basierend auf pTA929 (Allers <i>et al.</i> , 2010)
pTA929_HVO_2753_Q34A_CHis	Komplementation. Basierend auf pTA929 (Allers <i>et al.</i> , 2010)
pTA929_HVO_2753_Y49F_CHis	Komplementation. Basierend auf pTA929 (Allers <i>et al.</i> , 2010)
pSD1_R1/6_HVO_2753_NHis	Homologe Überexpression des Gens HVO_2753 mit N-terminalem His ₆ -Tag. Basierend auf pSD1/R1-6 (Danner & Soppa, 1996)

3.2.9 Software und Datenbanken

Tabelle 10: Tabelle der Software und der Datenbanken

Bezeichnung	Hersteller/Referenz
Clone Manager 8	Scientific & Educational Software, Denver (USA)
Mendeley	Mendeley, London (UK)
E.A.S.Y Win 32-Software	Herolab, Wiesloch
Softmax® Pro Software	Molecular Devices, San José (USA)
MEGA X	Kumar <i>et al.</i> (2018)
Jalview Version 2	Waterhouse <i>et al.</i> (2009)
Microsoft Office 365, Version 2002 (Build 12527.20278)	Microsoft Corporation, Redmond, USA
NanoDrop 3.5.1	Coleman Technologies, Rockland, USA
BLAST	Altschul <i>et al.</i> (1990)
HaloLex (nicht öffentliche Datenbank)	Pfeiffer <i>et al.</i> (2008)
SnapGene Viewer 5.0.8	GSL Biotech, Chicago (USA)
Integrated Genome Browser	Freese <i>et al.</i> (2016)
CLARIOstar V5.70 Edition 3	BMG LABTECH, Ortenberg

3.3 Mikrobiologische Methoden

Alle Medien, Lösungen und Puffer wurden, insofern erforderlich, durch Autoklavieren bei 121 °C und 1 bar Überdruck für 25 min oder durch Sterilfiltrieren (0,4 µm Porengröße) sterilisiert. Wenn nicht anders angegeben, erfolgte die Lagerung bei Raumtemperatur (RT). Festmedienplatten wurden bei 4 °C gelagert.

3.3.1 Medien und Kultivierung von *Haloferax volcanii*

H. volcanii wurde, insofern nicht anders angegeben, in Volumina von 30 ml in 100 ml Erlenmeyerkolben bei 42 °C und 250 rpm kultiviert. Für Uracil-auxotrophe Stämme wurde dem entsprechenden Medium Uracil in einer Endkonzentration von 50 µg/ml zugegeben. Fand eine Selektion mittels Novobiocin statt, wurde dies in einer Endkonzentration von 0,4 µg/ml Medium hinzugefügt.

Für die Anzucht auf festem Medium wurde der Salzlösung des entsprechenden Mediums vor dem Autoklavieren 1,4 % (w/v) Agar hinzugefügt. Die Kultivierung erfolgte ebenfalls bei 42 °C.

In den folgenden Tabellen sind die Zusammensetzungen der verschiedenen Medienbestandteile und Medien für *H. volcanii* dargestellt (siehe Tabelle 11 und Tabelle 12, modifiziert nach Nieuwlandt & Daniels (1990)).

Tabelle 11: Zusammensetzung der Bestandteile des Komplexmediums für *H. volcanii*. Dargestellt sind alle Komponenten des jeweiligen Bestandteils, die entsprechende Einwaage und die Endkonzentration im fertigen Medium.

Bestandteil	Komponente	Menge	Endkonzentration
Salzlösung ¹⁾ 900 ml/l	NaCl	125 g	2,1 M
	MgCl ₂ × 6 H ₂ O	45 g	220 mM
	MgSO ₄ × 7 H ₂ O	10 g	41 mM
	KCl	10 g	13 mM

	CaCl ₂ × 2 H ₂ O	1,34 g	9 mM
	1 M Tris/HCl pH 7,2	50 ml	50 mM
	<u>VE-H₂O</u>	<u>ad 900 ml</u>	
Nährstofflösung ¹⁾ 100 ml/l	Hefeextrakt	3 g	0,3 % (w/v)
	Trypton	5 g	0,5 % (w/v)
	<u>VE-H₂O</u>	<u>ad 100 ml</u>	
Spurensalzstammlösung ²⁾³⁾ 1 ml/l	ZnSO ₄ × 7 H ₂ O	0,1 g	3,5 µM
	MnCl ₂ × 4 H ₂ O	0,03 g	1,5 µM
	H ₃ BO ₃	0,3 g	50 µM
	CoCl ₂ × 6 H ₂ O	0,2 g	8,5 µM
	CuCl ₂ × 2 H ₂ O	0,01 g	0,5 µM
	NiCl ₂ × 6 H ₂ O	0,02 g	1 µM
	Na ₂ MoO ₄ × H ₂ O	0,03 g	1 µM
	<u>H₂O_{bidest}</u>	<u>ad 100 ml</u>	
Eisensulfatstammlösung ²⁾³⁾ 1 ml/l	FeSO ₄ × 7 H ₂ O	0,23 g	8 µM
	<u>H₂O_{bidest}</u>	<u>ad 100 ml</u>	
Uracilstammlösung 1 ml/l	Uracil	0,5 g	50 µg/ml
	<u>DMSO</u>	<u>ad 10 ml</u>	

Diese Lösung wurde autoklaviert¹⁾, sterilfiltriert²⁾ oder ihr pH-Wert auf 3-4 eingestellt³⁾

War es erforderlich *H. volcanii* unter definierten Bedingungen anzuziehen, wurde synthetisches Medium gewählt. Diesem lag als Hauptbestandteil ebenfalls die Salzlösung (siehe Tabelle 11) zu Grunde. Die weiteren Bestandteile sind in Tabelle 12 aufgeführt.

Zum Waschen von Zellen zum Beispiel beim Wechseln des Mediums oder um ein Inokulum zu erstellen, wurde Basalsalz verwendet. Diesem wiederum lag 900 ml Salzlösung zu Grunde, welche mit sterilem VE-H₂O auf 1 l aufgefüllt wurde.

Tabelle 12: Zusammensetzung des synthetischen Mediums für *H. volcanii*. Dargestellt sind alle Bestandteile, die entsprechende Einwaage und die Endkonzentration im fertigen Medium.

Bestandteil	Komponente	Menge	Endkonzentration
Salzlösung ¹⁾		900 ml	
Spurensalzstammlösung ¹⁾		1 ml	
Eisensulfatstammlösung ¹⁾		1 ml	
Phosphatstammlösung ²⁾	100 mM K ₂ HPO ₄	10 ml	1 mM
Ammoniumstammlösung ²⁾	1 M NH ₄ Cl	10 ml	10 mM
Kohlenstoffquelle ²⁾	20 % (w/v) Glukose	25 ml	0,5 % (w/v)
Puffer ²⁾	2 M MOPS pH 7,2	50 ml	100 mM
Vitaminlösung ³⁾		1 ml	1 ml/l
	<u>steriles VE-H₂O</u>	<u>ad 1000 ml</u>	

Für diese Lösung¹⁾ siehe Tabelle 1. Diese Lösung wurde autoklaviert²⁾, oder kommerziell erworben³⁾.

3.3.2 Medien und Kultivierung von *Escherichia coli*

E. coli wurde, insofern nicht anders angegeben, in Volumina von 5 ml in Reagenzgläsern oder 50 ml in 100 ml Erlenmeyerkolben bei 37 °C und 250 rpm kultiviert. Für eine Selektion mittels Ampicillin und/oder Kanamycin wurden diese in Endkonzentrationen von 100 µg/ml bzw. 50 µg/ml Medium hinzugefügt.

Für die Anzucht auf festem Medium wurde dem entsprechenden Medium vor dem Autoklavieren 1,2 % (w/v) Agar hinzugefügt. Die Kultivierung erfolgte ebenfalls bei 37 °C.

In Tabelle 13 ist die Zusammensetzung des SOB Mediums nach Hanahan (1983) für *E. coli* dargestellt.

Tabelle 13: Zusammensetzung des SOB Mediums für *E. coli*. Die Zugabe von sterilfiltriertem 1 M MgCl₂/1 M MgSO₄ erfolgte nach dem Autoklavieren der anderen Komponenten.

Komponente	Menge	Endkonzentration
Trypton	20 g	2 % (w/v)
Hefextrakt	5 g	0,5 % (w/v)
NaCl	0,6 g	10 mM
KCl	0,187 g	2,5 mM
1 M MgCl ₂ /1 M MgSO ₄	10 ml	10 mM/10mM
<u>VE H₂O</u>	<u>ad 1000 ml</u>	

3.3.3 Erstellung von Dauerkulturen

Für die dauerhafte Lagerung von *H. volcanii* wurden 25 ml einer stationären Kultur des jeweiligen Stamms in Szintillationsgefäße überführt und diese fest verschlossen. Diese Dauerkulturen wurden bei Raumtemperatur gelagert.

Für die dauerhafte Lagerung von *E. coli* wurde 1 ml einer Übernachtskultur zu 1 ml einer autoklavierten 67%igen Glycerinlösung gegeben, gemischt und bei -80 °C gelagert.

3.3.4 Wachstum in Mikrotiterplatten

Die Wachstumsversuche wurden in Mikrotiterplatten mit Rundboden nach Jantzer *et al.* (2011) durchgeführt. Während der äußere Ring an Vertiefungen einer Mikrotiterplatte, um Verdunstungen der Kulturen zu minimieren, mit jeweils 200 µl einer sterilen 1 M NaCl Lösung befüllt wurde, befanden sich in den Test-Vertiefungen 150 µl Kultur. Diese bestanden zu 130 µl aus vorgelegtem Medium, welches anschließend mit 20 µl Inokulum so beimpft wurde, dass eine Optische Dichte (OD₆₀₀) von 0,05 zu Beginn des Versuchs entstand. Das Inokulum ist eine Suspension von Zellen in Basalsalz, die zuvor mit Basalsalz gewaschen wurden, mit einer OD₆₀₀ von 0,375. Die Inkubation der Zellen erfolgte bei 1050 rpm und 42 °C. Ein Wasserreservoir im Brutschrank sorgte für eine humide Umgebung. Die

optische Dichte der Kulturen in den Vertiefungen wurde in regelmäßigen Abständen mittels Mikrotiterplattenphotometer bestimmt.

3.3.5 Zelldichtebestimmung

Die Bestimmung der Zelldichte einer Kultur bzw. Zellsuspension erfolgte in Küvetten mittels Spektralphotometer bei 600 nm. Die Zellzahlbestimmung erfolgte mittels Neubauer-Zählkammer. Hierbei wurden 4 Großquadrate mit je 16 Kleinquadraten am Mikroskop ausgezählt und die Zellzahl pro Milliliter wie folgt berechnet:

$$\text{Zellen/ml} = \frac{\text{gezählte Zellen} \times \text{Verdünnungsstufe}}{4 \times 16} \times 2 \times 10^7$$

3.3.6 Schwärmversuche

Zur Analyse des Schwärmverhaltens verschiedener *H. volcanii* Stämme wurden Schwärmversuche durchgeführt. Hierfür wurde halbfestes Medium in Petrischalen oder Zellkulturplatten mit 6 Vertiefungen verwendet und definierte Volumina (30 ml in der Petrischale bzw 5 ml pro Vertiefung) synthetischen Mediums mit 0,3 % (w/v) Agar und Glukose als Kohlenstoffquelle eingesetzt. Zur Inokulation der Platten wurde in die Mitte des abgekühlten Halbfestmediums mit einer sterilen Pipettenspitze eingestochen und 2 µl eines Inokulums in das halbfeste Medium pipettiert. Die Inokula wurden zuvor aus exponentiellen Vorkulturen erstellt. Dabei wurden die sedimentierten Zellen in entsprechenden Volumina Basalsalz aufgenommen, sodass alle Suspensionen eine einheitliche OD₆₀₀ von 20 aufwiesen. Zum Schutz vor Austrocknung erfolgte die Inkubation zusammen mit einem Wasserreservoir in einer Styroporbox im Brutschrank bei 42 °C.

3.3.7 Biofilm-Assay

Um die Biofilmbildung verschiedener *H. volcanii* Stämme vergleichen zu können, wurden Biofilm-Assays, modifiziert nach Legerme *et al.* (2016), durchgeführt. Die Herstellung der Inokula und die Anzuchtbedingungen waren hierbei identisch zu denen der Wachstumsversuche in Mikrotiterplatten (siehe 3.3.4). Die Inkubation erfolgte ebenfalls bei 1050 rpm und 42 °C. Jedoch wurden hier Mikrotiterplatten mit Flachboden verwendet und es fand in jedem 20-minütigen Inkubationsintervall eine 4-minütige statische Inkubationsphase, ohne Schütteln der Platten, statt.

Nach 32 h dieser Inkubationsintervalle fand eine abschließende statische Inkubation von 8 h statt. Bei vorläufigen Versuchen zur Biofilmbildung fand eine abweichende Inkubationsperiode der Zellen in den Mikrotiterplatten statt. Hier fand nach Inokulation der Medien in den Vertiefungen lediglich eine Inkubation bei 42 °C ohne Schütteln für 6 h statt.

Anschließend wurde der Biofilm-Assay wie folgt durchgeführt: Das Medium inklusive der planktonischen Zellen wurde vorsichtig abgenommen und die verbleibenden, adhären Zellen wurden mit 200 µl Fixierlösung (2 % (v/v) Essigsäure in 1 M NaCl) pro Vertiefung für 10 min fixiert. Die Fixierlösung wurde anschließend vorsichtig abgenommen und die Mikrotiterplatte für 30 min bei 37 °C getrocknet. Nachfolgend fand die Färbung der Zellen mittels Färbelösung (0,1 % (w/v) Kristallviolett) für 10 min bei RT statt, bevor die Zellen dreimal mit jeweils 200 µl H₂O_{bidest} gewaschen wurden. Danach wurden die Zellen in jeder Vertiefung mit 200 µl Entfärbelösung (10 % (v/v) Essigsäure, 30 % (v/v) Methanol) für 10 min bei RT entfärbt und die Lösung in eine neue Mikrotiterplatte überführt. Die Detektion fand im Mikrotiterplattenphotometer bei OD₆₀₀ statt.

3.4 Molekularbiologische Methoden

3.4.1 DNA-basierte Methoden

3.4.1.1 Isolierung plasmidischer DNA aus *E. coli*

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* im kleinen Maßstab erfolgte mittels Nucleospin® Plasmid Kit von Macherey-Nagel. Hierfür wurden 2-4 ml einer Übernachtskultur verwendet und nach Angaben des Herstellers verfahren.

Für die Isolierung im größeren Maßstab wurde das GenElute™ Plasmid Midiprep Kit von Sigma-Aldrich eingesetzt. Hierfür wurde eine 50 ml Übernachtskultur verwendet und nach Angaben des Herstellers verfahren.

3.4.1.2 Isolierung genomischer DNA aus *H. volcanii*

Die Isolation genomischer DNA (gDNA) aus *H. volcanii* erfolgte mittels Ethanol-Fällung. Zunächst wurden die Zellen aus 10 ml einer exponentiellen Kultur bei 4000 rpm für 15 min bei RT sedimentiert (Centrifuge 5810 R mit Rotor A-4-62; Eppendorf, Hamburg). Das Sediment wurde in 300 µl Basalsalz resuspendiert, die

Suspension mit 2,5 ml Lysepuffer versetzt und das Gefäß bis zur vollständigen Zellyse geschwenkt. Die vorhandene wässrige Phase wurde anschließend mit 5 ml Ethanol überschichtet und die dabei an der Phasengrenze ausfallende genomische DNA um eine Glaskapillare gewickelt. Die beiden Phasen wurden nach und nach mit der Glaskapillare vermischt und diese zur partiellen Dehydrierung der gDNA im Gefäß belassen. Die gebundene DNA konnte anschließend zweimal in Ethanol gewaschen und dieses danach durch zweimaliges Waschen in Diäthyl-ether entfernt werden. Nach 15-30 min Trocknen an der Luft wurde die Kapillare in 1 ml TE-Puffer inkubiert, um die DNA vollständig zu lösen. Die Lagerung der gDNA erfolgte bei 4 °C. Die benötigten Lösungen sind in Tabelle 14 dargestellt.

Tabelle 14: Zusammensetzung der Lösungen für die Isolierung genomischer DNA aus *H. volcanii*

Bezeichnung	Komponente	Menge	Endkonzentration
Lyse-Puffer	NaCl	5,844 g	100 mM
	1 M Tris/HCl-Stammlösung pH 8	10 ml	10 mM
	Na ₂ EDTA	0,372 g	1 mM
	SDS	0,5 g	0,05 % (w/v)
	<u>VE-H₂O</u>	<u>ad 1000 ml</u>	
TE-Puffer	1 M Tris/HCl-Stammlösung pH 8	10 ml	10 mM
	Na ₂ EDTA	0,372 g	1 mM
	<u>VE-H₂O</u>	<u>ad 1000 ml</u>	

3.4.1.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Die photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA erfolgte mittels Nano-drop 2000c (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Hierbei wurden jeweils 1 µl der zu analysierenden Probe als auch einer geeigneten Referenz eingesetzt. Bei der photometrischen Messung geben die Verhältnisse der Extinktion bei 260 nm und 280 nm (A₂₆₀/A₂₈₀) als auch bei 260 nm und 230 nm (A₂₆₀/A₂₃₀)

Aufschluss über die Reinheit der DNA. Für nachfolgende Arbeiten mit der jeweiligen DNA-Probe wurde auf eine geeignete hohe Reinheit der DNA und entsprechende Verhältnisse von $\sim 1,8$ (A260/A280) bzw. $1,8-2,2$ (A260/A230) geachtet.

3.4.1.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die gezielte Amplifikation gewünschter DNA-Sequenzen erfolgte mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Das Prinzip der PCR basiert auf der Hitzedenaturierung einer doppelsträngigen DNA, die als Template dient, welches dabei in zwei Einzelstränge gespalten wird (Denaturierung). Am 5'- und 3'-Ende des zu amplifizierenden Bereichs lagern sich spezifische Oligonukleotidmoleküle an (Annealing), welche durch eine DNA-abhängige Polymerase in Anwesenheit freier dNTPs in 3'-Richtung verlängert werden (Elongation). Dieser Amplifikationszyklus wird anschließend wiederholt, wobei im vorangegangenen Zyklus erstellte Amplikons ebenfalls als Template dienen. Diese Amplifikation ist annähernd exponentiell, sodass am Ende einer PCR eine sehr stark vervielfältigte Template-DNA vorliegt.

Auf diese Weise wurden DNA-Inserts für Klonierungen und DNA-Sonden für Northern-Blots (siehe 3.4.4.4) erstellt, ortsspezifische Punktmutationen eingebracht oder Transformanden mittels Kolonie-PCR überprüft. Da in dieser Arbeit mit dem Haloarchaeon *H. volcanii* gearbeitet wurde, der evolutionär bedingt aufgrund des hohen intrazellulären Salzgehaltes auch einen höheren GC-Gehalt in seiner DNA besitzt, wurde hier ein entsprechend angepasster GC-Gehalt im Desoxynukleosidtriphosphat-Mix (dNTP-Mix) verwendet. Des Weiteren kamen je nach Bedarf zwei verschiedene DNA-Polymerasen zum Einsatz. Die kommerziell erhältliche Phusion-Polymerase wurde verwendet, wenn eine hohe Präzision erforderlich war, da diese eine Korrekturlesefähigkeit (3'-5'-Exonukleaseaktivität) aufweist. Sie hat eine Syntheserate von circa 2000 bp pro Minute. Im Gegenzug dazu besitzt die Taq-Polymerase, welche in einer laborinternen Eigenisolation hergestellt wurde, keine Korrekturlesefähigkeit und eine Syntheserate von ca. 1000 bp pro Minute. Die Zusammensetzung des Taq-Polymerase-Puffers und der dNTP-Mix-Stammlösung befindet sich in Tabelle 15.

Tabelle 15: Zusammensetzung des Taq-Polymerase-Puffers und des Standard-dNTP-Mixes für *H. volcanii*-PCRs

Bezeichnung	Komponente	Menge	Endkonzentration
dNTP-Mix	100 mM dATP	100 µl	1 mM
	100 mM dTTP	100 µl	1 mM
	100 mM dGTP	150 µl	1,5 mM
	100 mM dCTP	150 µl	1,5 mM
	<u>H₂O_{bidest}</u>	<u>ad 10 ml</u>	
10×Taq-Polymerase-Puffer	KCl	3,75 g	500 mM
	Tris/HCl pH 9	1,2 g	100 mM
	Triton X-100	1 g	1 % (w/v)
	<u>H₂O_{bidest}</u>	<u>ad 100 ml</u>	

Standard-PCR

In der Standard-PCR wurden Inserts erstellt, die anschließend in einen geeigneten Vektor kloniert werden konnten. Der PCR-Ansatz, der für die Standard-PCR eingesetzt wurde, ist in Tabelle 16 gezeigt. Hier wurde die Taq-DNA-Polymerase aus laborinterner Eigenisolation verwendet.

Tabelle 16: Zusammensetzung eines Standard-PCR-Ansatzes. Dargestellt sind alle Komponenten, die entsprechende Menge für drei verschiedene Reaktionsvolumina und die Endkonzentration im fertigen Reaktionsansatz.

Komponente	Menge				Endkonzentration
25 mM MgCl ₂	1,2	3	6	µl	1,5 mM
10×Taq-Polymerase-Puffer	2	5	10	µl	1×
dNTP-Mix	3,2	8	16	µl	160/240 µM
10 µM Oligonukleotid-Primer forward	1	2,5	5	µl	0,5 µM
10 µM Oligonukleotid-Primer reverse	1	2,5	5	µl	0,5 µM

DMSO	1,2	3	6	μl	6 % (v/v)
Taq-Polymerase	0,2	0,5	1	μl	-
Template-DNA	x	x	x	μl	1-5 ng/μl
H ₂ O _{bidest}	ad 20	ad 50	ad 100	μl	

Eine solche Standard-PCR wurde nach dem PCR-Cycler-Programm durchgeführt, das in Tabelle 17 beschrieben ist.

Tabelle 17: PCR Cycler-Programm für eine Standard-PCR

Initiale Denaturierung	96 °C	5 min	
Denaturierung	96 °C	30 sec	} 25x
Annealing	3-7 °C unter T _m der Oligonukleotid-Primer	30 sec	
Elongation	72 °C	1 min/kb	
Lagerung	4 °C		

Fusions-PCR

Für die Erstellung von Deletionsplasmiden für die Pop-In/Pop-Out-Methode (siehe 3.4.3) war es zunächst nötig, ein jeweils circa 500 bp großes *upstream*- und ein *downstream*-Fragment vom zu deletierenden Bereich mittels PCR zu amplifizieren. Nach der Aufreinigung der beiden Fragmente mittels E.Z.N.A. Cycle Pure Kit von VWR International wurden diese in einer Fusions-PCR miteinander fusioniert, sodass ein Bereich entstand, der gegenüber dem wildtypischen Bereich die entsprechende *in frame*-Deletion aufwies. Für die Fusions-PCR wurden zunächst 200 ng jedes Fragments in einen PCR-Ansatz ohne Oligonukleotid-Primer eingesetzt und ein erster Fusionsschritt mit 5 Zyklen durchgeführt, bei dem sich die beiden Fragmente aufgrund komplementärer Überhänge an den Oligonukleotid-Primern der einander zugewandten Seiten anlagerten und mittels Polymerase die komplementären Stränge synthetisiert wurden. Die anschließende Zugabe des 5'- und 3'-terminalen Oligonukleotid-Primers des Fusionsfragmentes und der zweite Fusionsschritt ermöglichten die exponentielle Amplifikation des gesamten Fusi-

onsfragmentes. Der Ablauf der Zweischritt-Fusions-PCR ist in Tabelle 18 dargestellt. Für die hier eingesetzten PCRs wurde die Phusion™ High-Fidelity DNA-Polymerase nach Angaben des Herstellers verwendet.

Tabelle 18: PCR Cycler-Programm für eine Zweischritt-Fusions-PCR

Initiale Denaturierung	98 °C	5 min	
Denaturierung	98 °C	30 sec	} 5×
Annealing	68 °C	1 min	
Elongation	72 °C	1 min/kb	
Zugabe der Oligonukleotide	72 °C	5 min	
Denaturierung	98 °C	15 sec	} 25×
Annealing	3-7 °C unter T_m der Oligonukleotid-Primer	30 sec	
Elongation	72 °C	1 min/kb	
Lagerung	4 °C		

Sonden-PCR

Die Sonden-PCR diente der Herstellung von spezifischen Digoxigenin-11-dUTP (DIG-dUTP)-markierten Doppelstrang- und Einzelstrang-DNA-Sonden (dsDNA-/ssDNA-Sonden). Mithilfe dieser lassen sich im Northern-Blot spezifisch Zielfragmente nachweisen, an welche die Sonden hybridisieren (siehe 3.4.4.4). Diese PCR setzt dTTP-limitierende Bedingungen voraus, weshalb hierbei ein dNTP-Mix verwendet wird, der im Vergleich zum Standard-dNTP-Mix (siehe Tabelle 15) nur 0,2 mM dTTP enthält. Die Taq-Polymerase verwendet nun anteilig DIG-dUTP anstelle von dTTPs bei der Synthese. Diese Synthese ist jedoch verlangsamt, weshalb die Elongationszeit entsprechend verlängert wurde. Als Template-DNA diente bei einer Sonden-PCR immer *H. volcanii* Wildtyp gDNA und wurde in einer Menge von 250 ng pro 100 µl Reaktion eingesetzt. Für die Generierung jeder Sonde wurde zunächst ein Standard-PCR-Ansatz (siehe Tabelle 16), mit dem veränderten dNTP-Mix, angesetzt, jedoch nur auf 99 µl aufgefüllt. Dieser wurde anschließend auf zwei gleiche Teile aufgeteilt und zum einen Teil, dem Kontroll-Ansatz, 0,5 µl H₂O gegeben, während dem Sonden-Ansatz 0,5 µl DIG-dUTP zugefügt wurde.

Nach der PCR wurden 5 μ l des Sonden-Ansatzes und 5 μ l des Kontroll-Ansatzes zusammen mit Ladepuffer mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und analysiert (siehe 3.4.1.5). Durch das DIG-dUTP in der Sonde, muss diese in der Elektrophorese ein verzögertes Laufverhalten zeigen. Tabelle 19 zeigt das PCR-Cycler-Programm für eine dsDNA-Sonde.

Tabelle 19: PCR Cycler-Programm für eine dsDNA-Sonden-PCR

Initiale Denaturierung	96 °C	5 min	
Denaturierung	96 °C	30 sec	} 25x
Annealing	3-7 °C unter T_m der Oligonukleotid-Primer	30 sec	
Elongation	72 °C	4 min/kb	
Lagerung	4 °C		

Die Erstellung einer ssDNA-Sonde erforderte ein doppelsträngiges Template, das genau dem Bereich der künftigen Sonde entspricht. Hierzu wurde eine 100 μ l-Standard-PCR mit den *Forward*- und *Reverse*-Oligonukleotid-Primern durchgeführt und das doppelsträngige PCR-Produkt zunächst mit dem E.Z.N.A. Cycle Pure Kit von VWR International aufgereinigt. Für die Generierung der eigentlichen ssDNA-Sonde wurde nun eine PCR-Reaktion ähnlich zur dsDNA-Sonden-PCR durchgeführt, bei der jedoch nur der Oligonukleotid-Primer eingesetzt wurde, der für die Synthese des Strangs benötigt wurde, der komplementär zum *sense* Strang liegt. Auch das PCR-Cycler-Programm für die ssDNA-Sonde weicht von dem der dsDNA-Sonde ab, da durch die Verwendung nur eines Primers keine exponentielle Amplifikation, sondern nur eine lineare Amplifikation erreicht wird. Das entsprechende Programm ist in Tabelle 20 zu sehen.

Tabelle 20: PCR Cycler-Programm für eine ssDNA-Sonden-PCR

Initiale Denaturierung	96 °C	5 min	
Denaturierung	96 °C	30 sec	} 100x
Annealing	3-7 °C unter T_m der Oligonukleotid-Primer	30 sec	
Elongation	72 °C	4 min/kb	
Lagerung	4 °C		

Ortsspezifische Mutagenese

Zur Einbringung ortsspezifischer Mutationen wurde eine *site-directed mutagenesis* durchgeführt. Dabei wurden Oligonukleotid-Primer nach Vorgaben des Quik-Change® Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene (San Diego, USA) designt. Der PCR-Ansatz und das PCR-Cycler-Programm für die ortsspezifische Mutagenese sind in Tabelle 21 und Tabelle 22 dargestellt.

Tabelle 21: Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes für die ortsspezifische Mutagenese. Dargestellt sind alle Komponenten, die entsprechende Menge und die Endkonzentration im fertigen Reaktionsansatz.

Komponente	Menge	Endkonzentration
5×GC-Puffer	10 µl	1×
dNTP-Mix	8 µl	160/240 µM
10 µM Oligonukleotid-Primer forward	x	125 ng/Ansatz
10 µM Oligonukleotid-Primer reverse	x	125 ng/Ansatz
DMSO	1,5 µl	3 % (v/v)
Phusion-Polymerase	1 µl	-
Template-Plasmid-DNA	x	50 ng/Ansatz
H ₂ O _{bidest}	ad 50 µl	

Bei der Ortsspezifischen Mutagenese wird das Klonierungsplasmid pBluescriptSK(+) verwendet, in das zuvor das entsprechende Gen, in das die Mutation eingeführt werden soll, kloniert wurde. Während eines Zyklus der PCR wird jeweils das ganze Plasmid amplifiziert, weshalb eine DNA-Polymerase mit Korrekturlesefunktion eingesetzt werden musste und die Dauer des Elongationschrittes dementsprechend lange war. Nach Abschluss der PCR wurde die Template-Plasmid-DNA mit dem Restriktionsenzym DpnI gespalten, indem dieses im Überschuss (2 µl) direkt in den 50 µl Reaktionsansatz gegeben wurde und eine 60-minütige Inkubation bei 37 °C erfolgte. Die enzymatische Reaktion wurde anschließend für 7 min bei 80 °C gestoppt.

Tabelle 22: PCR Cycler-Programm für die Ortsspezifische Mutagenese

Initiale Denaturierung	98 °C	5 min	
Denaturierung	98 °C	30 sec	} 16x
Annealing	55 °C	30 sec	
Elongation	72 °C	4 min	
Lagerung	4 °C		

Kolonie-PCR

Die Kontrolle einer Vielzahl an Transformanten erfolgte mittels Kolonie-PCR. Hierbei wurden Einzelkolonien von *E. coli* oder *H. volcanii* von der Selektivagarplatte mit einer sterilen Pipettenspitze auf eine Sicherungsagarplatte und anschließend, im Falle von *E. coli*, direkt weiter als Template in den entsprechenden Reaktionsansatz überführt. Bei *H. volcanii* erfolgte nach der Sicherungsplatte die Überführung zunächst in 50 µl H₂O_{bidest.} um zu vermeiden, dass die hohen intrazellulären Salzkonzentrationen die Effizienz der PCR mindern oder diese gar behindern. Als Template für die PCR wurde in diesem Fall 1 µl der 50 µl Lösung eingesetzt. Der Zellaufschluss erfolgte bei der Kolonie-PCR automatisch durch den initialen Denaturierungsschritt bzw. die Lyse in H₂O_{bidest.} Es wurden hierbei plasmidspezifische Oligonukleotid-Primer verwendet. Die restlichen Komponenten und das PCR-Cycler-Programm waren analog zur Standard-PCR. Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Die Auftrennung von DNA fand mittels Agarose-Gelelektrophorese statt. Hierfür wurden Agarosekonzentrationen von 0,7 % bis 1,8 % (w/v) eingesetzt. Tris-Borat-EDTA diente hierbei als Puffersystem. Je nach Größe und Agarosekonzentration wurde eine Spannung von 80-180 V angelegt, bis die gewünschte Auftrennung erreicht war. Aufschluss hierfür gab die Bromphenolblau-Laufbande aus dem Ladepuffer. Die Zusammensetzung der Stammlösungen der verwendeten Puffer sind in Tabelle 23 dargestellt. Nach der Elektrophorese fand eine Inkubation für 15 min im Ethidiumbromidfärbebad (2 µl/ml) statt, bevor die Ergebnisse unter UV-Licht dokumentiert werden konnten.

Tabelle 23: Zusammensetzungen der Puffer für die DNA-Gelelektrophorese

Bezeichnung	Komponente	Menge	Endkonzentration
10× TBE-Puffer	Tris	107,82 g	0,89 M
	H ₃ BO ₃	55,03 g	0,89 M
	Na ₂ EDTA	7,45 g	0,02 M
	<u>VE-H₂O</u>	<u>ad 1000 ml</u>	
6×Ladepuffer	Tris	121 mg	10 mM
	Harnstoff	42 g	7 M
	EDTA	813 mg	28 mM
	87 % Glycerin	40 ml	34,8 % (v/v)
	Bromphenolblau	100 mg	0,1 % (w/v)
	<u>VE-H₂O</u>	<u>ad 100 ml</u>	

3.4.1.6 Spaltung von DNA mittels Restriktionsenzymen

Die Spaltung von DNA fand mittels Restriktionsenzymen von Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) nach Herstellerangaben statt. Hierbei wurden sowohl die gewöhnlichen als auch die modifizierten FastDigest Enzyme verwendet.

3.4.1.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation von DNA-Fragmenten wurde zunächst für das molare Verhältnis 1:3 von Vektor zu Insert die Menge an Insert berechnet, die eingesetzt werden musste. Die *sticky end*-Ligationen wurden nach Herstellerangaben durchgeführt. Für *blunt end*-Ligationen fand das Schema in Tabelle 24 Anwendung. Hierfür wurde eine Inkubation bei einem Temperaturgradienten über Nacht, mittels Eisbades bei 37 °C, verwendet.

Tabelle 24: Zusammensetzung eines Ansatzes einer *Blunt-end*-Ligation in Anwesenheit des entsprechenden Restriktionsenzym

Komponente	Menge
Plasmid (50 ng)	variabel
Insert	variabel
T4 DNA-Ligase	1 µl

10x Puffer des jew. Restriktionsenzym	2 µl
Restriktionsenzym	1 µl
10 mM ATP	2 µl
<u>H₂O_{bidest}</u>	<u>ad 20 µl</u>

3.4.1.8 Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA-Bereichen in Plasmiden oder von PCR-Produkten wurde von Eurofins GATC (Köln) durchgeführt. Die Probenvorbereitung und – zusammensetzung erfolgte nach Vorgaben des Dienstleisters.

3.4.2 Transformationen von Mikroorganismen

3.4.2.1 Herstellung kompetenter *E. coli*

Für die Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen nach Inoue *et al.* (1990) für nachfolgende Hitzeschock-Transformationen wurden zunächst 250 ml SOB-Medium mit einer Übernachtskultur auf eine Start-OD₆₀₀ von 0,05 angeimpft. Die Kultur wurde bei 37 °C unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 angezogen und anschließend zunächst für 10 min auf Eis abgekühlt und danach für 10 min bei 2.500 ×g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment in 80 ml eiskaltem TB-Puffer (siehe Tabelle 25) resuspendiert, für 10 min auf Eis inkubiert und erneut für 10 min bei 2.500 ×g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder verworfen und das Sediment in 20 ml TB-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 1,4 ml DMSO zu einer Endkonzentration von 7 % (v/v) und vorsichtigem Schwenken, erfolgte eine erneute Inkubation auf Eis für 10 min. Abschließend wurden 200 µl Aliquots hergestellt, diese in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C bis zur Verwendung für eine Hitzeschock-Transformation gelagert.

Tabelle 25: Zusammensetzung des TB-Puffers für die Herstellung kompetenter *E. coli*

Komponente	Menge	Endkonzentration
MOPS	0,21 g	10 mM
CaCl ₂	0,22 g	15 mM
KCl	1,86 g	250 mM
<u>H₂O_{bidest}</u> <u>pH 6,8 mit KOH</u>	<u>ad 90 ml</u>	
MnCl ₂	0,89 g	55 mM
<u>H₂O_{bidest}</u>	<u>ad 100 ml</u>	

3.4.2.2 Transformation von *E. coli*

Die Transformation von *E. coli* erfolgte mittels Hitzeschock. Hierfür wurde zunächst ein Aliquot kompetenter Zellen auf Eis aufgetaut und anschließend pro Transformations-Ansatz 100 µl Zellen mit 50 ng Plasmid-DNA oder 5 µl Ligationsansatz versetzt und zunächst für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock bei 42 °C für 60 sec. Nach dem anschließenden Abkühlen auf Eis für mindestens 2 min wurde sowohl eine 1:100 Verdünnung als auch der verbleibende gesamte Ansatz auf jeweils eine SOB-Festmediumplatte, die das entsprechende Antibiotikum enthielt, ausplattiert und diese über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.4.2.3 Transformation von *H. volcanii*

Für die Transformation von *H. volcanii* wurden 2 ml einer Kultur in der exponentiellen Wachstumsphase bei 8.000 rpm für 2 min abzentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 180 µl SBL/EDTA-Lösung vorsichtig resuspendiert und mit 20 µl DNA-Lösung versetzt. Vor einer 5-minütigen Inkubation erfolgte das Mischen durch 20-maliges Umdrehen der Reaktionsgefäße. Nun wurden 210 µl PEG-Lösung in den Deckel des Reaktionsgefäßes pipettiert, dieses geschlossen und durch rasches Schwenken beide Lösungen miteinander vermischt, bis keine Schlieren mehr vorhanden waren. Nach einer Inkubation bei RT für 20 min erfolgte die Zugabe von 1600 µl SVL. Abschließend konnten 100 µl des Ansatzes

und von geeigneten Verdünnungen auf entsprechende Selektivfestmedienplatten ausplattiert und bei 42 °C für mehrere Tage inkubiert werden. Die Zusammensetzung aller benötigten Lösungen ist Tabelle 26 dargestellt.

Tabelle 26: Zusammensetzung aller benötigten Lösungen für die Transformation von *H. volcanii*

Bezeichnung	Komponente	Menge	Endkonzentration
Sphäroblastenbildungslösung (SBL)	NaCl	23,37 g	0,8 M
	KCl	1 g	27 mM
	1 M Tris/HCl pH 8,2	25 ml	50 mM
	Saccharose	75 g	15 % (w/v)
	<u>H₂O_{bidest}</u>	<u>ad 500 ml</u>	
Sphäroblastenverdünnungslösung (SVL)	NaCl	100 g	3,4 M
	MgSO ₄ × 7 H ₂ O	21,6 g	175 mM
	KCl	1,25 g	34 mM
	1 M Tris/HCl pH 7,2	25 ml	50 mM
	CaCl ₂ × 2 H ₂ O	0,36 g	5 mM
	Saccharose	75 g	15 % (w/v)
	<u>H₂O_{bidest}</u>	<u>ad 500 ml</u>	
EDTA-Lösung pH 8	EDTA	18,5 g	0,5 M
	<u>H₂O_{bidest}</u>	<u>ad 100 ml</u>	
SBL/EDTA-Lösung	SBL	900 µl	90 % (v/v)
	EDTA-Lösung	100 µl	10 % (v/v)
PEG-Lösung	PEG 600	6 ml	60 % (v/v)
	SBL	4 ml	40 % (v/v)
DNA-Lösung	Plasmid-DNA	3 µg	
	4 M NaCl	4 µl	0,8 M
	<u>H₂O_{bidest}</u>	<u>ad 20 µl</u>	

3.4.3 Erzeugung von Deletionsmutanten mittels Pop-In/Pop-Out-Methode

Die Pop-In/Pop-Out-Methode nach Bitan-banin *et al.* (2003) erlaubt eine markerlose und basengenaue Deletion von chromosomalen Genen und Genabschnitten in *H. volcanii*. Eine Weiterentwicklung dieser Methode erfolgte durch Hammelmann & Soppa (2008).

Für die Deletion des Zielbereichs müssen zunächst seine beiden miteinander fusionierten flankierenden Bereiche in den, in *H. volcanii* nicht-replikativen Ausgangsvektor pMH101, eingebracht werden. Die Fusionierung der flankierenden Bereiche fand zuvor in einer Fusions-PCR statt (siehe 3.4.1.4, Abschnitt „Fusions-PCR“). Der so generierte Deletionsvektor wird dann für eine Transformation mit dem entsprechenden Uracil-auxotrophen Elternstamm, zumeist *H. volcanii* H26, verwendet. Der Deletionsvektor trägt das *pyrE2*-Gen, welches in dem Elternstamm deletiert vorliegt. Nach der Transformation des nicht-replikativen Vektors muss dieser über ein homologes Rekombinationsereignis ins Genom an die Stelle der zukünftigen Deletion eingebracht werden. Die Selektion erfolgt anschließend über ein Uracil-freies Festmedium, sodass nur Zellen erhalten werden, die den Deletionsvektor ins Genom integriert haben, den sogenannten Pop-In-Mutanten. Diese wurden anschließend durch Umsetzen auf Festmedienplatten, welche sowohl Uracil als auch 5-Fluororotsäure (5-FOA) enthielten, selektiert. Nur durch ein zweites homologes Rekombinationsereignis, bei dem der Vektor wieder aus dem Genom entfernt wird, waren die Zellen überlebensfähig. Denn das Umsetzen von 5-FOA durch das *pyrE2*-codierte Enzym resultiert in dem toxischen 5-Fluoruracil. So wurden nach der Selektion nur die sogenannten Pop-Out-Methoden erhalten. Die homologen Rekombinationsereignisse konnten jeweils über den ersten oder den zweiten komplementären Bereich stattfinden, was beim ersten Mal nur zu unterschiedlichen Anordnungen des Wildtyp-Gens und der Deletionskassette führte, beim zweiten Ereignis jedoch wiederum zum Entstehen des Wildtyps (zu 50 %) oder der gewünschten Deletionsmutante (zu 50 %). Eine schematische Darstellung der Pop-In-/Pop-Out-Methode ist in Abbildung 3 dargestellt. Die per Kolonie-PCR (siehe 3.4.1.4, Abschnitt „Kolonie-PCR“) identifizierten Deletionsmutanten wurden anschließend 5-mal in Komplexmedium überimpft, bevor eine abschließende Analyse mittels 40-Zyklen-Test-PCR durchgeführt wurde. In dieser PCR wurde der Bereich amplifiziert, der die Deletion überspannt, sodass zwischen

Wildtyp, Pop-In-Mutante und Deletionsmutante hochsensitiv unterschieden und eine homozygote Deletionsmutante nachgewiesen werden kann.

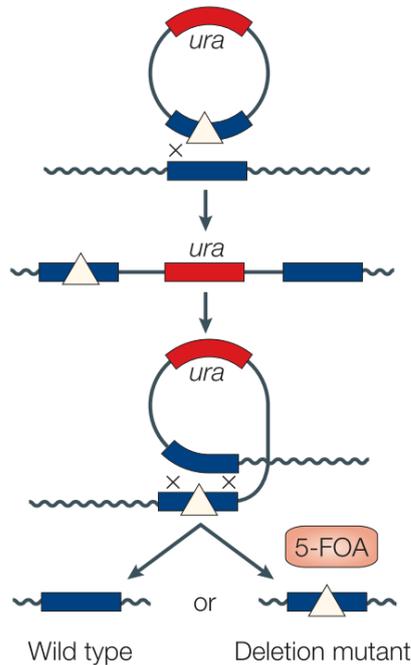


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Pop-In/Pop-Out-Methode. Zwei homologe Rekombinationsereignisse führen zunächst zum chromosomalen Einbau des Deletionsvektors und später zum Verlust dessen. Am Ende entstehen mit gleicher Wahrscheinlichkeit Wildtyp oder Deletionsmutante. Abbildung entnommen und modifiziert aus Allers & Mevarech (2005).

3.4.4 RNA-basierte Methoden

3.4.4.1 Isolierung und Reinigung von RNA

Alle RNA-basierten Arbeiten wurden in einer RNase-freien Umgebung durchgeführt. Für die Herstellung aller Lösungen und Puffer wurde DEPC-behandeltes Wasser verwendet. Hierfür wurde $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ mit 0,1 % (v/v) DEPC versetzt, über Nacht gerührt und anschließend für 45 min autoklaviert.

Für die Isolierung von RNA aus *H. volcanii* mittels Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion wurden zunächst 2 ml einer exponentiellen Kultur bei 13.000 rpm für 1 min zentrifugiert und das Sediment in 400 μl Aufschlusslösung (siehe Tabelle 27) resuspendiert. Nach Zugabe von 50 μl 2 M Natriumacetat (pH 4) wurde das 2 ml Reaktionsgefäß verschlossen und für 15 s geschüttelt. Nach der Zugabe von 500 μl ROTI® Aqua-P/C/I wurde erneut 15 s geschüttelt. Jetzt erfolgte eine Inkubation bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ für mindestens 30 min und anschließend eine

Zentrifugation bei 4 °C und 13.000 rpm für 15 min. Die hierbei entstandene obere, wässrige Phase wurde nun abgenommen und in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Für alle nachfolgenden Schritte wurde die RNA auf Eis gehalten. Die Fällung der RNA erfolgte anschließend durch Zugabe von 1 ml eiskaltem, 96 %igem (v/v) Ethanol und einer Inkubation bei -20 °C für mindestens 30 min. Sollte besonders die Isolation von kleinen RNAs sichergestellt werden, wurde hier über Nacht inkubiert. Es erfolgte eine Zentrifugation bei 4 °C und 13.000 rpm für 30 min. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment mit 1 ml eiskaltem, 70 %igem (v/v) Ethanol gewaschen – es erfolgte hier keine Resuspension. Nach der Wiederholung des eben erfolgten Zentrifugationsschrittes, wurde der Überstand erneut verworfen und das RNA-Sediment nach Lufttrocknung in 30 µl DEPC-H₂O für 10 min bei 60 °C gelöst. Die erhaltene RNA wurde einer photometrischen Konzentrationsbestimmung (siehe 3.4.4.2) und einer Integritätskontrolle mittels RNA-Gelelektrophorese (siehe 3.4.4.3) unterzogen. Wurde der Qualitätsstandard erreicht, war die so erhaltene RNA verfügbar für analytische RNA-Gelelektrophorese und Northern Blots.

Für Anwendungen wie RNA-Sequenzierung oder DNA-Adapter-Ligationen und cDNA-Synthese war eine höhere Reinheit der RNA und vollständige Abwesenheit von DNA erforderlich. Hierfür erfolgten im Anschluss an die zuvor beschriebene RNA-Isolierung folgende weitere Schritte, in Anlehnung an Heidrich *et al.* (2015): Das entsprechende Volumen für ca. 20 µg RNA wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit DEPC-H₂O auf 39,5 µl aufgefüllt. Nach einer Denaturierung bei 65 °C für 5 min, wurde die Probe für 5 min auf Eis abgekühlt. Um DNA-Verunreinigungen in der Probe zu beseitigen erfolgte ein DNase I-Verdau. Hierfür wurden 5 µl DNase I-Puffer (inkl. MgCl₂), 0,5 µl SUPERase-In™ RNase Inhibitor (20 U/µl) und 5 µl DNase I (1 U/µl) zugegeben und der Ansatz für 30 min bei 37 °C inkubiert. Um die nun enthaltene DNase zu entfernen erfolgte wieder eine Phenol-Chloroform-Extraktion. Zunächst wurde die Probe mit DEPC-H₂O auf ein Volumen von 100 µl aufgefüllt und diese anschließend zu 100 µl ROTI® Aqua-P/C/I, vorgelegt in einem frischen 2 ml-Reaktionsgefäß, gegeben. Das verschlossene Gefäß wurde 15 s geschüttelt und anschließend für 15 min bei 4 °C und 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die RNA-Fällung erfolgte durch Zugabe von 2,5 Volumina eines 30:1

RNA-Präzipitations-Mixes (Ethanol: 3 M Natriumacetat, pH 6,5) und einer Inkubation bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ über Nacht. Jetzt konnte durch eine 30-minütige Zentrifugation bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 13.000 rpm die RNA gefällt und der Überstand anschließend verworfen werden. Das Sediment wurde mit 1 ml eiskaltem, 70 %igem (v/v) Ethanol gewaschen – es erfolgte insbesondere keine Resuspension. Nach der Wiederholung des eben erfolgten Zentrifugationsschrittes, wurde der Überstand erneut verworfen und das RNA-Sediment nach Lufttrocknung in 20 μl DEPC-H₂O für 10 min bei $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelöst. Die erhaltene RNA wurde hier erneut einer photometrischen Konzentrationsbestimmung (siehe 3.4.4.2) und einer Integritätskontrolle mittels RNA-Gelelektrophorese (siehe 3.4.4.3) unterzogen. Zusätzlich wurde die Abwesenheit von genomischer DNA mittels 40 Zyklen-Test-PCR überprüft, bei der Oligonukleotide gegen das kleine, beliebig ausgewählte Gen *HVO_2983A* verwendet wurden. Wurde der Qualitätsstandard erreicht, war die so erhaltene RNA verfügbar für RNA-Sequenzierung oder DNA-Adapter-Ligationen und cDNA-Synthese (siehe 3.4.4.5).

Tabelle 27: Zusammensetzung der Aufschlusslösung für die RNA-Isolierung aus *H. volcanii*

Komponente	Menge	Endkonzentration
750 mM Natriumcitrat (pH 7)	7 ml	25 mM
30 % (w/v) N-Lauroylsarcosinat	3,5 ml	0,5 % (w/v)
β -Mercaptoethanol	1 ml	0,48 % (v/v)
Guanidiniumthiocyanat	100 g	4 M
H ₂ O _{bidest}	ad 210 ml	

3.4.4.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von RNA

Die photometrische Konzentrationsbestimmung von RNA erfolgte analog zu der von DNA (siehe 3.4.1.3). Für nachfolgende Arbeiten mit der jeweiligen RNA-Probe wurde auf eine geeignete hohe Reinheit der RNA und entsprechende Verhältnisse von $\sim 2,0$ (A₂₆₀/A₂₈₀) bzw. 1,8-2,2 (A₂₆₀/A₂₃₀) geachtet.

3.4.4.3 Gelelektrophoretische Auftrennung von RNA

Für die Kontrolle der Integrität isolierter RNA oder zur gezielten Transkriptanalyse mittels nachfolgendem Northern Blot wurde eine analytische, denaturierende RNA-Gelelektrophorese durchgeführt. Hierfür wurden zwischen 100 und 500 ng bzw. 2 bis 10 µg RNA pro Spur eingesetzt.

Das Agarosegel wurde immer frisch hergestellt. Dabei wurde zunächst die entsprechende Menge an Agarose für ein 1-1,6 %iges Gel mit dem Endvolumen von ca. 80 ml in 68,6 ml DEPC-H₂O aufgekocht und unter Rühren 8 ml 10-fach MOPS-Puffer (siehe Tabelle 28) zugegeben. Nachdem die Lösung auf ca. 60 °C abgekühlt war, wurden 2,86 ml 37 %-ige (w/v) Formaldehydlösung zugegeben. Nach weiterem Rühren konnte das Gel gegossen werden. Die RNA-Proben und 1 µl pro Spur der Größenstandards RiboRuler™ RNA Ladder High Range bzw. RiboRuler™ RNA Ladder High Range wurden mit dem 3-fachen an RNA-Probenpuffer versetzt und für 10 min bei 60 °C inkubiert, bevor sie auf Eis abgekühlt wurden. Die Gelelektrophorese wurde bei 120 V, unter Verwendung von 1-fach MOPS-Puffer als Laufpuffer, durchgeführt, bis die gewünschte Auftrennung erreicht war. Die Ergebnisse konnten unter UV-Licht dokumentiert werden.

Tabelle 28: Zusammensetzungen der für die RNA-Gelelektrophorese benötigten Puffer

Bezeichnung	Komponente	Menge	Endkonzentration
10-fach MOPS-Puffer pH 7	MOPS	104,7 g	500 mM
	EDTA	3,7 g	10 mM
	<u>DEPC-H₂O</u>	<u>ad 1000 ml</u>	
RNA-Probenpuffer	10-fach MOPS-Puffer	1 ml	1-fach
	100 % Formamid	5 ml	50 % (v/v)
	37 % Formaldehyd	1,84 ml	6,8 % (v/v)
	87 % Glycerin	1,34 ml	11,7 % (v/v)
	3 % (w/v) Bromphenolblau	100 µl	0,03 % (w/v)
	Ethidiumbromid (0,1 mg/ml)	150 µl	1,5 µg/ml
	<u>DEPC-H₂O</u>	<u>570 µl</u>	

3.4.4.4 Northern Blot

Die Northern-Blot Analyse stellt eine hochempfindliche Methode zur Untersuchung von Transkripten dar. Hierbei kann eine relative, quantitative Transkriptlevelbestimmung erfolgen und eine Aussage über die Transkriptlänge getroffen werden. Für einen Northern Blot werden RNA-Gele nach der Elektrophorese verwendet, wie sie unter 3.4.4.3 erstellt werden.

Auf 15 Blatt Blottingpapier der Stärke 1,4 mm wurden 3 Blatt Blottingpapier der Stärke 0,37 mm gestapelt. Darauf wurde eine positiv geladene Nylonmembran, das Gel und erneut 3 Blatt Blottingpapier der Stärke 0,37 mm gelegt. Die Nylonmembran wurde zuvor in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ vorgequollen und ebenso wie die 6 dünnen Blatt Blottingpapier in $20\times$ SSC-Puffer äquilibriert. Auf den Stapel wurde nun eine Pufferbrücke aus Blottingpapier der Stärke 0,37 mm gelegt, die den Blottstapel mit zwei Reservoirs an $20\times$ SSC-Puffer links und rechts davon verband. Der so entstandene Stapel wurde mit dem Gelschlitten und einem Gewicht darauf beschwert und über Nacht stehen gelassen. Alle benötigten Lösungen sind in Tabelle 29 dargestellt.

Tabelle 29: Zusammensetzung der benötigten Lösungen und Puffer für den Northern-Blot

Bezeichnung	Komponente	Menge	Endkonzentration
Methylenblaulösung pH 5	Methylenblau	0,04 g	0,04 % (w/v)
	Natriumacetat	4,1 g	0,5 M
	<u>DEPC-H₂O</u>	<u>ad 100 ml</u>	
20× SSC-Puffer pH 7	NaCl	175,3 g	3 M
	<i>tri</i> -Natriumcitrat ×2 H ₂ O	88,2 g	300 mM
	<u>VE-H₂O</u>	<u>ad 1000 ml</u>	

Nach ca. 18 h Kapillarblotting wurde der Blot abgebaut, die Geltaschen mit einem Bleistift auf der Membran angezeichnet und diese im UV-Stratalinker bei 120 mJ/cm^2 mit der DNA quervernetzt.

Die Hybridisierung der Membran mit der Sonde erfolgte in einem Hybridisierungsröhrchen im Hybridisierungsofen. Zunächst wurde die Membran mit 10 ml Hybridisierungspuffer mit $180 \mu\text{g/ml}$ Hefe-tRNA für 1 h unter langsamem Drehen

bei 50 °C vorhybridisiert. Die verbleibenden 45 µl des Sonden-Ansatzes (siehe 3.4.1.4, Abschnitt „Sonden-PCR“) wurden für 10 min bei 95 C denaturiert und zu frischen 10 ml Hybridisierungspuffer mit 180 µg/ml Hefe-tRNA gegeben. Nach der Vorhybridisierung wurden die 10 ml verworfen und die Sonde im Hybridisierungspuffer zugegeben. Die Hybridisierung erfolgte ebenfalls bei 50 °C unter langsamem Drehen über Nacht. Die benötigten Lösungen sind in Tabelle 30 dargestellt.

Tabelle 30: Zusammensetzung der benötigten Lösungen und Puffer für die Hybridisierung beim Northern-Blot

Bezeichnung	Komponente	Menge	Endkonzentration
100× Denhardt-Lösung ¹⁾	Rinderserumalbumin	10 g	2 % (w/v)
	Ficoll 400	10 g	2 % (w/v)
	Polyvinylpyrolidon	10 g	2 % (w/v)
	<u>VE-H₂O</u>	<u>ad 500 ml</u>	
Hybridisierungspuffer ²⁾	20× SSC-Puffer	250 ml	5×
	100× Denhardt-Lösung ¹⁾	30 ml	3×
	SDS	5 g	0,5 % (w/v)
	30 % (w/v) <i>N</i> -Laroylsarcosin	6,7 ml	0,2 % (w/v)
	Dextransulfat	50 g	5 % (w/v)
	<u>VE-H₂O</u>	<u>ad 500 ml</u>	
	Formamid	500 ml	50 % (v/v)

Zunächst durch Faltenfilter filtriert und anschließend bei -20 °C gelagert¹⁾. Lösung vor der Zugabe von Formamid autoklaviert²⁾.

Für den abschließenden Chemolumineszenz-Nachweis wurde die Hybridisierungslösung mit der Sonde nach der Inkubation über Nacht entfernt, die Membran gewaschen und anschließend entwickelt. Alle dafür nötigen Schritte zeigt Tabelle 31 und die verwendeten Puffer und Lösungen zeigt Tabelle 32.

Tabelle 31: Schritte der Entwicklung während dem Chemolumineszenz-Nachweis beim Northern-Blot

Dauer	Temperatur	Komponente	Anzahl	Drehgeschwindigkeit
5 min	50 °C	2× SSC-Puffer, 0,1 % SDS (w/v)	2×	schnell
15 min	50 °C	1× SSC-Puffer, 0,1 % SDS (w/v)	2×	schnell
10 sec	RT	Waschpuffer	1×	schnell
30 min	RT	20 ml Blockingpuffer	1×	langsam
30 min	RT	Antikörperlösung	1×	langsam
15 min	RT	Waschpuffer	2×	schnell
5 min	RT	Detektionspuffer	1×	langsam
5 min	RT	CDP-Star-Lösung	1×	langsam

Tabelle 32: Zusammensetzung der Puffer und Lösungen für den Chemolumineszenz-Nachweis beim Northern-Blot

Bezeichnung	Komponente	Menge	Endkonzentration
Maleinsäurepuffer pH 7,5	Maleinsäure	11,6 g	100 mM
	NaCl	8,77 g	150 mM
	<u>H₂O_{bidest}</u>	<u>ad 1000 ml</u>	
Waschpuffer	Tween®20	1,5 ml	0,3 % (v/v)
	<u>Maleinsäurepuffer</u>	<u>ad 500 ml</u>	
Blockingpuffer	Blocking Reagenz	10 g	1 % (w/v)
	<u>Maleinsäurepuffer</u>	<u>ad 1000 ml</u>	
Antikörperlösung	Anti-DIG-AP	1 µl	1:20.000
	<u>Blockingpuffer</u>	<u>ad 20 ml</u>	

Detektionspuffer pH 9,5	Tris/HCl	12,11 g	100 mM
	NaCl	5,84 g	100 mM
	MgCl ₂ ×6 H ₂ O	10,17 g	50 mM
	<u>H₂O_{bidest}</u>	<u>ad 1000 ml</u>	
CDP-Star-Lösung	CDP-Star	10 µl	1:1.500
	<u>Detektionspuffer</u>	<u>ad 15 ml</u>	

3.4.4.5 DNA-Adapter-Ligation und cDNA-Synthese

Zur Identifikation von möglichen RNA-Bindepartnern des Zielproteins wurde nachfolgendes Protokoll etabliert. Hierfür wurde zunächst das Zielprotein homolog überproduziert und aus Elutionsfraktionen der Affinitätsaufreinigung (siehe 3.5.1.1) RNA isoliert (siehe 3.4.4.1). Diese konnte dann im nachfolgenden Ablauf, wie in Tabelle 33 zu sehen ist, verwendet werden.

Tabelle 33: Ablauf der DNA-Adapter-Ligation und cDNA-Synthese zur Identifikation von RNA-Bindepartnern. Die Protokollnummern beziehen sich auf die jeweiligen Pipettierschemata in Tabelle 34.

Nr.	Bezeichnung	Temperatur	Dauer	Protokoll-Nummer
1	DNA-Adapter Ligation ans 3'-Ende der RNA	25 °C	2 h	(1)
2	Aufreinigung mittels Monarch RNA Cleanup Kit (Elution in 20 µl)	-	-	-
3.1	First-Strand cDNA-Synthese	70 °C auf Eis	5 min 5 min	(2)
3.2	First-Strand cDNA-Synthese	25 °C 42 °C 70 °C	5 min 1 h 15 min	(3)
4	RNase H-Verdau der RNA im RNA:DNA-Hybrid	37 °C	30 min	(4)
5	Aufreinigung mittels Monarch PCR & DNA Cleanup Kit (Elution in 10 µl)	-	-	-
6	DNA-Adapter Ligation ans 3'-Ende der cDNA	25 °C	>16 h	(5)
7	Aufreinigung mittels Monarch PCR & DNA Cleanup Kit (Elution in 10 µl)	-	-	-
8	Second-Strand cDNA-Synthese wie Standard-PCR, jedoch 5 min Elongation und 40 Zyklen			(6)
9	Aufreinigung mittels Monarch PCR & DNA Cleanup Kit (Elution in 20 µl)	-	-	-

Tabelle 34: Pipettierschemata der verschiedenen Reaktionsansätze während der DNA-Adapter-Ligation und cDNA-Synthese

Nr.	Komponente	Menge
(1)	10× T4 RNA Ligase 1 Puffer	2,5 µl
	10 mM ATP	2,5 µl
	50 % PEG 8000	9,5 µl
	DMSO	2,0 µl

	SUPERase-In™ RNase Inhibitor	0,5 µl
	T4 RNA Ligase 1	2,5 µl
	RNA (1 – 5 µg)	4,0 µl
	DNA-Adapter (100 µM)	1,5 µl
	gesamt	25,0 µl
(2)	Adapter-ligierte RNA nach „3.2“, siehe Tabelle 33	4 µl
	10 µM DNA-Adapter Primer rev	1 µl
(3)	Ansatz (2) nach „3.1“, siehe Tabelle 33	5 µl
	GoScript™ 5X Reaction Buffer	4 µl
	25 mM MgCl ₂	2 µl
	dNTP-Mix	3 µl
	SUPERase-In™ RNase Inhibitor	0,5 µl
	GoScript™ Reverse Transcriptase	1 µl
	H ₂ O	4,5 µl
	gesamt	20 µl
(4)	Ansatz (3) nach „3.2“, siehe Tabelle 33	20 µl
	RNase H	1 µl
(5)	10× T4 RNA Ligase 1 Puffer	3,0 µl
	10 mM ATP	3,0 µl
	50 % PEG 8000	15,0 µl
	T4 RNA Ligase 1	2,0 µl
	einzelsträngige cDNA nach „5“, siehe Tabelle 33	4,0 µl
	DNA-Adapter (100 µM)	1,5 µl
	20 mM Hexaammincobalt(III)-chlorid	1,5 µl
	gesamt	30 µl
(6)	25 mM MgCl ₂	1,2 µl
	10×Taq-Polymerase-Puffer	2 µl
	dNTP-Mix	3,2 µl
	100 µM DNA-Adapter Primer rev	1 µl
	DMSO	0,6 µl
	Taq-Polymerase	0,4 µl
	Adapter-ligierte einzelsträngige cDNA nach „7“, siehe Tabelle 33	1 µl
	H ₂ O	10,6 µl

Die mittels dieses Protokolls erhaltene doppelsträngige cDNA von unbekanntem RNAs konnte nachfolgend mit dem *blunt end*-Restriktionsenzym „EcoRV“ behandelt werden, da über die DNA-Adapter eine entsprechende Schnittstelle eingebracht wurde. Zeitgleich wurde das Klonierungsplasmid pBluescriptSK(+) mit einem anderen *blunt end*-Restriktionsenzym linearisiert. Nach anschließender Ligation und der Transformation von *E. coli* konnten positive Transformanten identifiziert und von entsprechenden Kulturen Plasmide isoliert werden. Jedes Plasmid, das aus der Kultur isoliert wurde, die aus einer Einzelkolonie entstand, sollte so einen unbekanntem RNA-Bindepartner des Zielproteins enthalten. Mit einem plasmidspezifischen Oligonukleotid als Primer konnte abschließend eine Sequenzierung die DNA-Sequenz identifizieren. Alle hier abschließend verwendeten Klonierungstechniken sind in den Abschnitten 3.4.1 und 3.4.2 beschrieben.

3.4.5 Protein-basierte Methoden

3.4.5.1 Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte mit einer Tricin-Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Tricin-SDS-PAGE). Der entscheidende Unterschied zur herkömmlichen SDS-PAGE besteht in der Verwendung von Tricin anstelle von Glycin als Leit-Ion im Laufpuffer. Die Tricin-SDS-PAGE besitzt bessere Auftrennungskapazitäten bei kleineren Molmassen und wird bevorzugt für Proteine im Bereich von 1 kDa bis 20 kDa verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurden Tricin-SDS-Gele nach Schägger (2006) hergestellt und verwendet. Dafür wurde der in der Literatur aufgeführte Probenpuffer „Buffer A“ und die Acrylamid-Bisacrylamid-Stocklösung „AB-6“ verwendet.

Wenn das Gel nach der Elektrophorese nicht geblottet werden sollte, sondern eine direkte Visualisierung erwünscht war, wurde eine Coomassie-Färbung durchgeführt. Hierfür wurde das Gel mit der Coomassie-Färbelösung für 30 min langsam schüttelnd bei RT inkubiert und anschließend unter Verwendung und mehrfachem Wechsel von Entfärbelösung entfärbt. Die Zusammensetzung der beiden verwendeten Lösungen sind in Tabelle 35 aufgeführt.

Tabelle 35: Zusammensetzung der Lösungen für die Visualisierung von Tricin-SDS-Gelen

Bezeichnung	Komponente	Menge	Endkonzentration
Coomassie-Färbelösung	Coomassie Blue R-250	0,5 g	0,05 % (w/v)
	Methanol	545 ml	54,5 % (v/v)
	≥ 98 % (v/v) Essigsäure	92 ml	9,2 % (v/v)
	<u>H₂O_{bidest}</u>	<u>ad 1000 ml</u>	
Entfärbelösung	Methanol	500 ml	25 % (v/v)
	≥ 98 % (v/v) Essigsäure	100 ml	5 % (v/v)
	<u>H₂O_{bidest}</u>	<u>ad 2000 ml</u>	

3.4.5.2 Western Blot

Für eine spätere spezifische Immundetektion von Zielproteinen, wurden mittels Western Blot die Proteine nach der gelelektrophoretischen Auftrennung auf eine Nitrocellulosemembran übertragen.

Hierfür wurde das Trenngel direkt nach der Tricin-SDS-PAGE verwendet. In der Elektroblotting-Apparatur (Fastblot B43 Blotting Apparatur; Biometra, Göttingen) wurden zunächst 5 Blatt 0,37 mm starkes Blotting-Papier, die Nitrocellulosemembran, das Trenngel und abschließend weitere 5 Blatt 0,37 mm starkes Blotting-Papier mittig platziert. Die Blotting-Papiere wurden zuvor in Transferpuffer equilibriert. Der elektrophoretische Transfer erfolgte bei 3 mA/cm² für 1 h. Der erfolgreiche Transfer wurde anschließend mittels Coomassie-Färbung des Gels und einer Tintenfärbung der Membran überprüft.

Anschließend wurde die Membran mittels Inkubation entweder für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C in 5 % (w/v) Magermilchpulver in PBS geblockt. Anschließend konnte zuerst eine Hybridisierung mit dem Primär-Antikörper, danach mit dem Sekundär-Antikörper, jeweils in 5 % (w/v) Magermilchpulver in PBS für jeweils 1 h bei RT stattfinden. Nach jedem Hybridisierungsschritt wurde die Membran dreimal für je 10 min in PBS-T gewaschen und abschließend einmal mit PBS gespült. Danach konnte die Membran unter Verwendung von Roti®-Lumin und Autoradiographiefilmen entwickelt und die Ergebnisse visualisiert werden.

3.4.5.3 Produktion spezifischer polyklonaler Antikörper

Für die Herstellung von polyklonalen Antikörpern für die Immundetektion von HVO_2753 wurde zunächst das Protein in reiner Form benötigt. Hierfür wurde aus methodischen Gründen die Variante mit His-Tag ausgewählt und selbige homolog überproduziert und mittels Affinitäts- und anschließend Größenausschlusschromatographie, wie unter 4.3.1 und 4.3.2 beschrieben, aufgereinigt. Die erhaltene Proteinlösung wurde dann mittels Dialyse umgepuffert, um den Anforderungen des Dienstleisters Davids Biotechnologie GmbH (Regensburg), die den Antikörper herstellten, zu entsprechen. Anschließend wurde die Proteinlösung mit einer Konzentration von 1 mg/ml und einem Volumen von 1 ml zum Dienstleister versandt.

3.5 Biochemische Methoden

3.5.1 Aufreinigung von Proteinen

3.5.1.1 Homologe Überproduktion von HVO_2753

Für die homologe Überproduktion des Zielproteins wurde die Überexpressionsmutante OE_2753n verwendet. Diese enthält das Plasmid pSD1_R1/6_HVO_2753_NHis, mit welchem eine Variante mit *n*-terminalem Hexahistidin-Tag produziert wird. Das Plasmid basiert auf dem pSD1/R1-6, welchem neben der Sequenz für HVO_2753n eine *NdeI*-Schnittstelle eingefügt wurde. Dabei steht das Gen unter einem starken, konstitutiven Promotor, der vom Ferredoxin-Promotor abgeleitet wurde (Danner & Soppa, 1996).

Es wurde hierfür immer aus einer frischen stationären Kultur von OE_2753n eine Vorkultur angeimpft und diese über Nacht inkubiert. Nach 20 h Inkubation konnte mit 2 ml dieser Vorkultur in der exponentiellen Wachstumsphase die 500 ml-Hauptkultur angeimpft werden. Diese wurde wiederum für 24 h inkubiert. Für alle hier verwendeten Kulturen kam Komplexmedium mit Novobiocin zum Einsatz.

3.5.1.2 *In vivo* Crosslink

Für die Suche nach einem Protein-Bindepertner von HVO_2753 wurde ein *in vivo*-Crosslink durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen nach der Zellsedimentation bei

6.500 \times g und 4 °C für 30 min (Sorvall RC6+ mit mit Rotor F10S-6x500Y) zunächst mit 20 ml Basalsalz gewaschen und erneut sedimentiert (15 min, 4 °C, 4000 rpm, Centrifuge 5810 R mit Rotor A-4-62).

Nach Resuspension der Zellen in 5 ml Basalsalz wurde der Crosslink durch Zugabe von Formaldehyd in 5 ml Basalsalz gestartet. Die Menge an Formaldehyd wurde ebenso variiert wie die Dauer der nachgeschalteten Inkubation rotierend bei RT, während die Formaldehyd-Basalsalzlösung immer frisch angesetzt wurde. Der Crosslink wurde durch Zugabe von 0,75 M Glycin in 5 ml Basalsalz (0,25 M Glycin-Endkonzentration) gestoppt und die Inkubation rotierend bei RT für 10 min fortgeführt. Abschließend fand eine erneute Sedimentation der Zellen statt, bevor diese mit 15 ml Bindepuffer (siehe Tabelle 36) gewaschen und danach in 5 ml Bindepuffer resuspendiert wurden.

3.5.1.3 Zellaufschluss mittels Sonifikation

Für den Zellaufschluss konnten die Zellen nach dem *in vivo* Crosslink eingesetzt werden. Sollte kein Crosslink erfolgen, wurden die Zellen der Hauptkultur analog bei 6.500 \times g und 4 °C für 30 min (Sorvall RC6+ mit mit Rotor F10S-6x500Y) sedimentiert, zunächst mit 20 ml Basalsalz gewaschen und erneut sedimentiert (15 min, 4 °C, 4000 rpm, Centrifuge 5810 R mit Rotor A-4-62). Hier erfolgte die Resuspension direkt in 5 ml Bindepuffer.

Der Aufschluss der Zellen konnte nun mittels Ultraschalles für 3 \times 30 s (duty cycle 50 %, output ctrl. 3; Sonifier 250 und Ultrasonics Converter, Branson, Danbury, USA) auf Eis erfolgen. Das Abscheiden der Zelltrümmer erfolgte durch Zentrifugation für 60 min bei 16.000 \times g und 4 °C. Der Überstand stellte das geklärte Gesamtzellextrakt dar und konnte für die Affinitätsaufreinigung weiterverwendet werden.

3.5.1.4 Native Affinitätsaufreinigung von HVO_2753n

Für die native Affinitätsaufreinigung wurde das geklärte Zelllysate auf eine Nickel-Chelat-Sepharose-Matrix in einer Schwerkraftsäule gegeben. Zuvor wurden zur Herstellung der Affinitätsmatrix 500 μ l Chelating Sepharose™ Fast Flow in die Schwerkraftsäule gegeben, diese mit 10 ml H₂O_{bidest} gewaschen, mittels 4 ml einer 0,2 molaren NiCl-Lösung mit Nickel-Ionen beladen und anschließend mit Bindepuffer equilibriert. Nach dem Durchfließen des Zelllysats wurde die Matrix mit

20 ml Bindepuffer gewaschen und die spezifisch gebundenen Proteine mit 4 ml Elutionspuffer eluiert. Alle benötigten Puffer sind in Tabelle 36 dargestellt.

Tabelle 36: Lösungen und Puffer für die Affinitätsaufreinigung von HVO_2753n

Bezeichnung	Komponente	Menge	Endkonzentration
Bindepuffer pH 7,5	HEPES	4,77 g	20 mM
	NaCl	122,7 g	2,1 M
	Imidazol	1,36 g	20 mM
	PMSF-Lösung ¹⁾	5 ml	1 mM
	<u>H₂O_{bidest}</u>	<u>ad 1000 ml</u>	
Elutionspuffer pH 7,5	HEPES	4,77 g	20 mM
	NaCl	122,7 g	2,1 M
	Imidazol	20,42 g	300 mM
	PMSF-Lösung ¹⁾		1 mM
	<u>H₂O_{bidest}</u>	<u>ad 1000 ml</u>	
PMSF-Lösung	PMSF	523 mg	200 mM
	<u>Ethanol</u>	<u>ad 15 ml</u>	

Wurde immer frisch und nur in entsprechend benötigte Aliquots zugegeben¹⁾.

3.5.1.5 Größenausschlusschromatographie

Für die Größenausschlusschromatographie wurde eine ÄKTA™ FPLC mit den Größenausschlusschromatographie-Säulen Superdex™ 75 Increase 10/300 GL und Superose™ 6 10/300 GL verwendet. Die entsprechenden *Flow Rates* waren 0,5 ml/min bzw. 0,3 ml/min und die verwendete Mobile Phase 2,1 M NaCl, 20 mM HEPES pH 7,5. Die Standardkurven wurde mit den Proteinen Conalbumin (76 kDa), Ovalbumin (44 kDa), RNase A (13,7 kDa) und Aprotinin (6,5 kDa) für die Superdex™ 75-Säule und Thyroglobulin (670 kDa), Gamma-Globulin (150 kDa), Ovalbumin (44,3 kDa), RNase A (13,7 kDa) und Aprotinin (6,5 kDa) für die Superose™ 6-Säule erstellt.

3.5.2 Konzentrationsbestimmungen von Proteinen

3.5.2.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Die photometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinen erfolgte mittels Nanodrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Hierbei wurden jeweils 1 µl der zu analysierenden Probe als auch einer geeigneten Referenz eingesetzt. Der jeweilige Extinktionskoeffizient wurde entweder zuvor mittels ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) und der entsprechenden Aminosäuresequenz berechnet oder es wurde bei einer Proteinmischung der Extinktionskoeffizient von BSA (Bovines Serum Albumin) als Standard verwendet. Die photometrische Messung erfolgte bei 280 nm.

3.5.2.2 BC-Assay

Da bei Proteinen mit geringer Anzahl an Tryptophan und Tyrosin eine photometrische Konzentrationsbestimmung bei 280 nm eine hohe Ungenauigkeit aufweist, wurde gegebenenfalls die Konzentration mittels BC-Assay (Interchim, Montluçon Cedex, Frankreich) bestimmt. Hierbei wurde nach Herstellerangaben vorgefahren. Die hier durchgeführte photometrische Messung erfolgte am SPECTRA-max® 340PC Photometer.

3.5.3 Dichtegradienten-Zentrifugation

Zur Erstellung von Ribosomenprofilen wurden die Bestandteile des Zelllysats von *H. volcanii*-Stämmen mittels Dichtegradienten-Zentrifugation der Größe nach aufgetrennt und photometrisch analysiert.

Zur Herstellung eines Saccharosegradienten wurden Zentrifugenröhrchen zur Hälfte mit einer 10 %igen (w/v) Saccharoselösung (in Gradientenpuffer, siehe Tabelle 37) befüllt und diese anschließend mit einer 30 %igen (w/v) Saccharoselösung (in Gradientenpuffer) mittels einer Spritze unterschichtet. Mit einem Gradientenmischer (Gradient Master 107) wurden nun 10-30 %ige Gradienten durch Rotieren erzeugt. Auf diesen Gradienten wurde nun geklärtetes *H. volcanii*-Zelllysat gegeben und die Zelllysatzbestandteile mittels Zentrifugation bei 19.000 rpm und 4 °C für 19 h ihrer Größe nach aufgetrennt (Ultrazentrifuge Optima XPN-80 mit Rotor SW 41 Ti). Nach der Zentrifugation wurde mittels Dichtegradienten-Fraktionier-System (Teledyne ISCO, Lincoln, USA) der Gradient durch Unterschichten

mit 60 % (w/v) Saccharose abgenommen, photometrisch bei 260 nm untersucht und anschließend fraktioniert. Die Fraktionen konnten anschließend noch, nach RNA-Isolierung, mittels analytischer, denaturierender RNA-Gelelektrophorese untersucht werden.

Tabelle 37: Zusammensetzung des Gradientenpuffers für die Dichtegradienten-Zentrifugation

Bezeichnung	Komponente	Menge	Endkonzentration
Gradientenpuffer	HEPES	11,9 g	50 mM
pH 7,5 (KOH)	NaCl	122,7 g	2,1 M
	NH ₄ Cl	5,35 g	100 mM
	DEPC-H ₂ O	ad 1000 ml	

3.5.4 Fluorimetrischer Zink-Assay

Um den Zinkgehalt von HVO_2753 zu bestimmen, wurde eine Quantifizierung unter Verwendung des Fluorophors ZnAF-2F durchgeführt. ZnAF-2F ist hochspezifisch für Zink-Ionen und kann diese gegen alle anderen zweiwertigen Metallionen diskriminieren (Hirano *et al.*, 2002).

Zum Einsatz kam hochreines HVO_2753 nach der zweistufigen Aufreinigung (siehe 3.5.1.4 und 3.5.1.5). Dieses wurde in einer Endkonzentration von 1 μ M in den Zink-Assay eingesetzt und zunächst gegen 25 mM NaCl, 20 mM HEPES bei pH 7,5 dialysiert. Die anschließende Behandlung mit 100 μ g/ml Proteinase K über Nacht bei 37 °C sollte die restlose Freigabe von gebundenem Zink sicherstellen. Die Messungen fanden mit 3 μ M ZnAF-2F in Fluoreszenz-Mikrotiterplatten statt. Als Anregungswellenlänge wurde 492 nm und als Detektionswellenlänge 517 nm gewählt. Als Standardreihe diente eine Zinkchlorid-Verdünnungsreihe. Alle verwendeten Lösungen und Puffer sind in Tabelle 38 zu sehen.

Tabelle 38: Zusammensetzungen der Lösungen und Puffer für den Zink-Assay

Bezeichnung	Komponente	Menge	Endkonzentration
Zink-Assay Puffer pH 7,5	HEPES	4,77 g	20 mM
	Natriumchlorid, ultra trocken ≥99,998%	1,46 g	25 mM
	<u>H₂O_{bidest}</u>	<u>ad 1000 ml</u>	
ZnCl ₂ - Stammlösung	Zinkchlorid, ultra trocken ≥99,99%	2,73 g	2 M
	<u>H₂O_{bidest}</u>	<u>ad 10 ml</u>	
Zinc Standard Stock	ZnCl ₂ - Stammlösung	0,5 ml	10 mM
	<u>Zink-Assay Puffer</u>	<u>ad 100 ml</u>	
ZnAF-2F - Stammlösung ¹⁾	ZnAF-2F	1 mg	3 mM
	<u>DMSO (für die Spektroskopie)</u>	<u>ad 547,7 µl</u>	

In 10 µl Aliquots im Dunkeln bei -20 °C gelagert¹⁾.

3.6 Bioinformatische Methoden

Die für die nachfolgenden *in silico* Analysen verwendeten Sequenzen von Orthologen von HVO_2753 stammen aus der nicht-redundanten Protein-Sequenz Datenbank des NCBI (National Center for Biotechnology Information, USA) und wurden mittels Standard Protein BLAST analysiert.

3.6.1 Multiple Sequence Alignment

Es wurden *Multiple Sequence Alignments* (Multipler Sequenz Abgleich, MSA) von ausgewählten Orthologen von HVO_2753 durchgeführt. Hierfür wurde das Tool „MEGA-X“ und der Algorithmus „MUSCLE“ verwendet (Kumar *et al.*, 2018). Das MSA wurde anschließend unter Zuhilfenahme des Tools „Jalview“ visualisiert.

3.6.2 Phylogenetische Stammbäume

Phylogenetische Stammbäume wurden ebenfalls mit „MEGA-X“ und den Methoden „Maximum Parsimony“ bzw. „Maximum-Likelihood“ berechnet. Dafür wurden

jeweils 1000 *bootstrap* Wiederholungen berechnet und die Anteile der jeweiligen Verzweigungspunkte in den Stammbäumen vermerkt.

3.6.3 RNA und dRNA-Sequenzvergleiche

Für den Vergleich von in dieser Arbeit erhaltenen RNA-Sequenzierungsergebnissen mit Daten aus vorangegangenen RNA- und dRNA-Sequenzierungsdaten und die Visualisierung kam der „Integrated Genome Browser“ zum Einsatz (Freese *et al.*, 2016).

4 Ergebnisse

Umfassende Ergebnisse auf dem Gebiet kleiner Proteine in Archaeen wurden bereits vor über 10 Jahren erzielt. Hierbei wurden erstmalig experimentelle Nachweise über die Häufigkeit kleiner Proteine in einem Archaeum erhalten (Klein *et al.*, 2007). Bestimmte Erkenntnisse konnten nun auf verwandte Organismen angewandt werden. Die sogenannten C(P)XCG-Muster, zunächst identifiziert im Haloarchaeon *H. salinarum*, wurden auch in *H. volcanii* gefunden. Im Zuge dessen, konnten 43 Proteine, nicht größer als 70 Aminosäuren, mit Paaren solcher C(P)XCG-Muster in *H. volcanii* annotiert werden. Die Buchstaben dieser Muster stellen den Einbuchstaben-Code von Aminosäuren dar. Während Prolin (P) meist nur in einem der beiden Muster eines Paares vorkommt, steht „X“ für eine beliebige Aminosäure. Ein Paar solcher Muster stellt ersten Erkenntnissen nach ein Zinkfinger-Motiv dar, in dem die vier enthaltenen Cysteine ein Zink-Ion komplexieren können und somit für die Ausbildung einer speziellen Tertiärstruktur verantwortlich sind. Im Gegensatz zu allen anderen 42 dieser Proteine, die jeweils ein Zinkfinger-Motiv besitzen, besitzt eines dieser Proteine, HVO_2753, trotz seiner geringen Größe von 59 Aminosäuren, vier C(P)xCG-Muster und kann, so wurde vermutet, zwei Zinkfinger ausbilden und zwei Zink-Ionen komplexieren. Dieses Protein sollte nun genaueren Analysen unterzogen werden.

4.1 Bioinformatische Analyse von HVO_2753

4.1.1 Charakteristika von HVO_2753

Die in der 59 Aminosäuren langen Sequenz von HVO_2753 enthaltenen C(P)XCG- oder C(P)XCG-ähnlichen Muster sind ungefähr gleichmäßig verteilt und machen 34 % des gesamten Proteins aus (siehe Abbildung 4). Verglichen mit dem Proteom von *H. volcanii* ist der Anteil an geladenen und hydrophilen Aminosäuren hoch (siehe Tabelle 39).

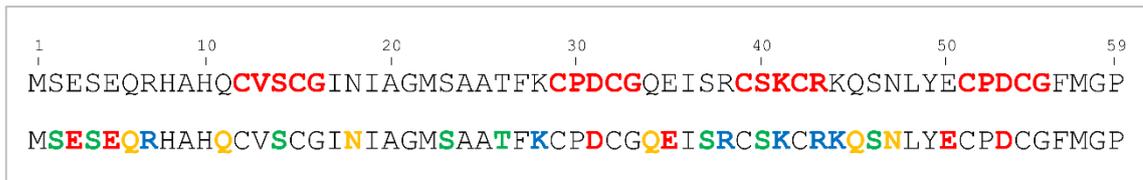


Abbildung 4: Aminosäuresequenz von HVO_2753. In der oberen Sequenz sind die vier C(P)XCG Motive rot hervorgehoben. Die untere Sequenz zeigt saure Aminosäuren in rot, Basische in blau, Aminosäuren mit Amid-Seitenkette in gelb und mit Hydroxygruppen in der Seitenkette in grün. Abbildung entnommen aus Zahn *et al.* (2020).

Mindestens zweifach erhöht ist hier Lysin und Cystein, aber auch Methionin, Glutamin und Serin. Im Gegenzug dazu ist der Anteil an aliphatischen Aminosäuren niedriger als im Proteom. Zweifach verringert sind Alanin, Leucin, Valin und Threonin, aber auch Asparaginsäure. HVO_2753 enthält kein Tryptophan. In der Aminosäuresequenz ebenfalls auffällig ist der N-Terminus, welcher einen sehr hohen Anteil an funktionellen Aminosäuren enthält.

Tabelle 39: Aminosäurezusammensetzung von HVO_2753 im Vergleich zum *H. volcanii* Proteom. Rot oder blau markiert sind Anteile, die in HVO_2753 mehr als zweifach höher bzw. niedriger sind als im Proteom. Die Anzahl an Aminosäuren, auf der die Berechnungen beruhen, sind 1.168.832 im Proteom und 59 bei HVO_2753. Tabelle entnommen und modifiziert aus Zahn *et al.* (2020).

Aminosäure	Proteom Anteil [%]	HVO_2753 Anteil [%]	Aminosäure	Proteom Anteil [%]	HVO_2753 Anteil [%]
A	11,0	5	M	1,8	5
C	0,7	14	N	2,4	3
D	8,4	3	P	4,6	5
E	8,0	7	Q	2,4	7
F	3,5	3	R	6,7	5
G	8,5	8	S	5,9	12
H	2,0	3	T	6,2	2
I	3,8	5	V	9,2	2
K	2,0	5	W	1,1	0
L	9,1	2	Y	2,7	2

Zusätzlich zur Aminosäuresequenz wurde auch der genomische Bereich von HVO_2753 untersucht. Das Gen *HVO_2753* ist auf dem reversen Strang des

Hauptchromosoms lokalisiert. Es besitzt lediglich einen Abstand von zwei Nukleotiden zum nachfolgenden Gen *HVO_2752*, was auf eine Co-Transkription schließen lässt. *HVO_2752* ist als Translations-Elongationsfaktor annotiert.

Vorangegangene Studien, bei denen eine dRNA-Sequenzierung und eine RNA-Sequenzierung von *H. volcanii* durchgeführt wurden, ließen bereits Einblicke in das Transkriptom zu und zeigten potenzielle Transkriptionsstartstellen auf (Babski *et al.*, 2016; Laass *et al.*, 2019). Die Visualisierung dieser Daten mittels Genome Browser zeigten lediglich eine Transkriptionsstartstelle vor dem ersten Gen *HVO_2753* (grün, dRNA-Seq) und ein bicistronisches Transkript der beiden Gene mit kurzer 3'-UTR (*untranslated region*; rot, RNA-Seq), wie Abbildung 5 zeigt.

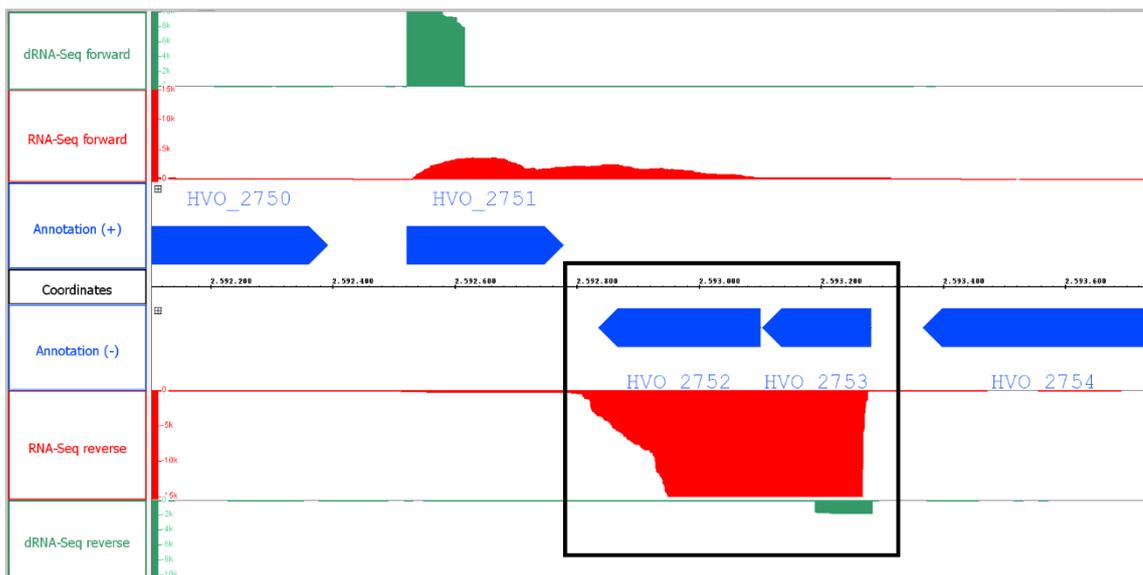


Abbildung 5: Übersicht über den genomischen Bereich von *HVO_2753*. Visualisiert mit dem Genome Browser sind in blau die annotierten protein-codierenden Gene, in rot die Ergebnisse einer RNA-Seq Studie (Laass *et al.*, 2019) und in grün die Ergebnisse einer dRNA-Seq Studie (Babski *et al.*, 2016). Abbildung entnommen aus Zahn *et al.* (2020).

4.1.2 Homologie von *HVO_2753*

Mittels Protein-BLAST Suchen (NCBI, Bethesda, USA) konnte untersucht werden, wie verbreitet *HVO_2753* innerhalb der eigenen Domäne ist, aber auch darüber hinaus. Es konnte gezeigt werden, dass innerhalb der Euryarchaeota eine Vielzahl an nah verwandten Orthologen zu finden sind. Von keinem dieser Orthologen ist jedoch die Funktion bekannt, wenige davon sind jedoch als putatives Zink-Ribbon RNA-Bindeprotein annotiert. Sehr wenige weiter entfernte Orthologe konnten in Bakterien, jedoch keine in Eukaryoten identifiziert werden.

HVO_2753 wurde mit einer Auswahl an Orthologen aus 20 Spezies indes genauer untersucht und in einem MSA miteinander verglichen (siehe Abbildung 6). Die oberen 14 Sequenzen stammen von Orthologen aus halophilen Gattungen bzw. Spezies, die unteren 7 Sequenzen von Methanogenen. Der Grad an Konservierung ist besonders hoch in den Bereichen der C(P)xCG-Mustern. Während viele Aminosäuren darüber hinaus in allen gezeigten Proteinen konserviert sind, zeigt sich dennoch innerhalb der halophilen bzw. methanogenen Spezies ein jeweils spezifisch noch höherer Grad an Konservierung. Besonders auffällig ist der N-Terminus. Was bereits allein beim Betrachten von HVO_2753 (siehe 4.1.1) durch die hohe Anzahl an funktionellen Aminosäuren auffiel, zeigt sich hier erneut. Alle halophilen Varianten besitzen einen hochfunktionellen N-Terminus, der in den Orthologen der Methanogenen verkürzt vorliegt.

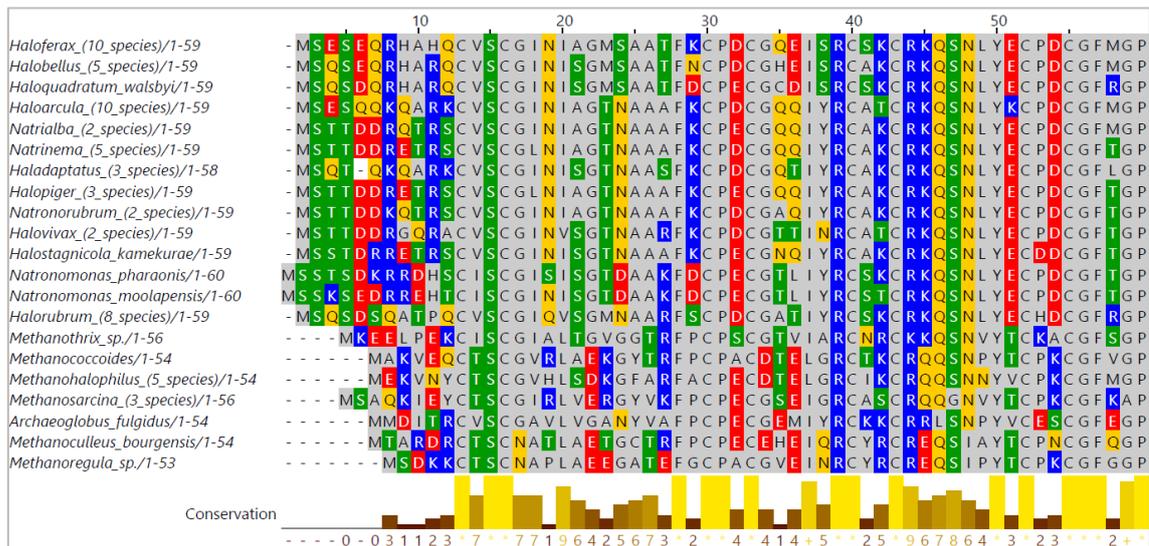


Abbildung 6: Multiple Sequence Alignment von HVO_2753 und 20 weiteren Orthologen ausgewählter halophiler und methanogener Gattungen und Spezies. Saure Aminosäuren sind in rot, Basische in blau, Aminosäuren mit Amid-Seitenkette in gelb und mit Hydroxygruppen in der Seitenkette in grün dargestellt. Der Grad an Konservierung ist unter dem MSA dargestellt. Abbildung entnommen aus Zahn *et al.* (2020).

Die Sequenzen, die auch im MSA Anwendung fanden, wurden abschließend für die Berechnung von phylogenetischen Stammbäumen herangezogen. Dabei kamen die Methoden der Maximum Parsimony und der Maximum-Likelihood mit jeweils 1000 *bootstrap* Wiederholungen zum Einsatz. Die Ergebnisse sind in Abbildung 7 gezeigt. Beide Stammbäume zeigen ein ähnliches Bild der Verwandtschaft, wie es auch das MSA bereits vermuten ließ. Darüber hinaus stimmen diese

Ergebnisse gut mit der anerkannten Taxonomie überein, die mittels 16S rRNA-Sequenzierungen ermittelt wurde.

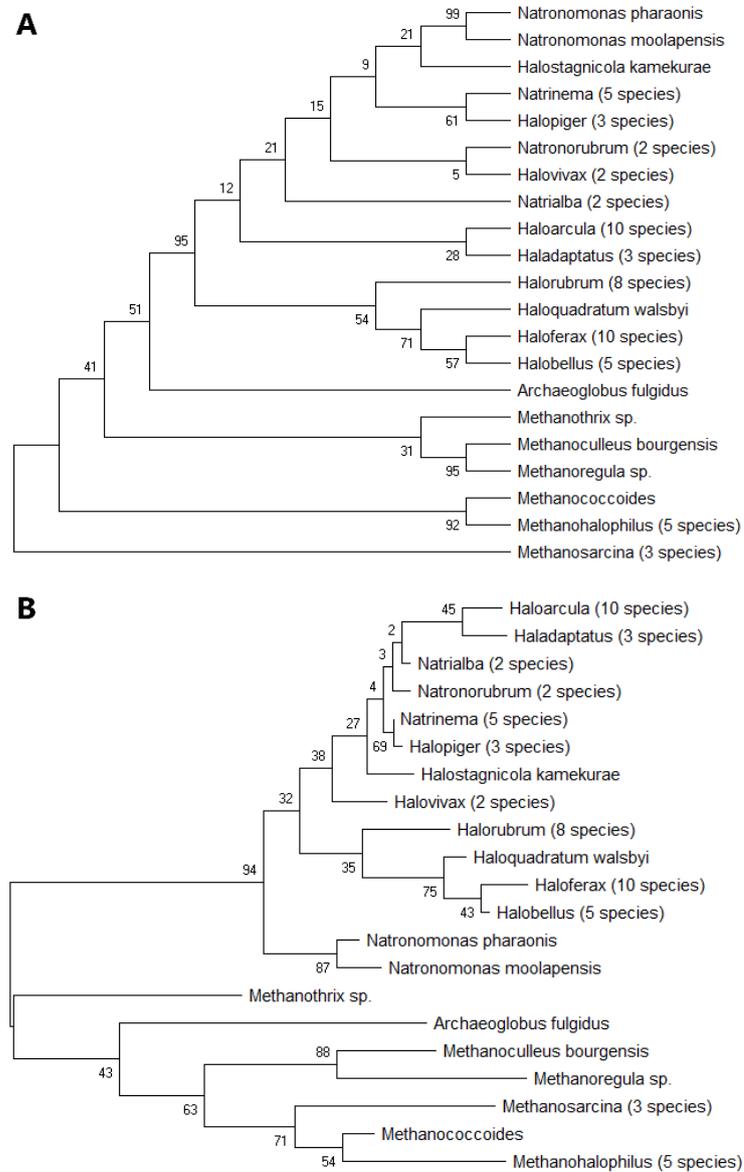


Abbildung 7: Phylogenetische Stammbäume von HVO_2753 und seinen Orthologen. Für die Berechnung der Stammbäume wurden die Sequenzen der Proteine aus Abbildung 6 verwendet. Gezeigt sind die Berechnungen mit 1000 *bootstrap replications* der Methoden Maximum Parsimony (A) und Maximum Likelihood (B). Angaben der Anteile der jeweiligen Verzweigungspunkte in Prozent (%). Abbildung entnommen und modifiziert aus Zahn *et al.* (2020).

4.2 Funktionsanalyse von HVO_2753 *in vivo*

4.2.1 Herstellung der Deletionsmutante

Als erster Schritt zur Aufklärung möglicher biologischer Funktionen von HVO_2753 wurde eine *in frame*-Deletionsmutante des Gens erstellt. Auf diese Weise konnten anschließend mögliche phänotypische Abweichungen zum Wildtyp H26 gesucht werden. Die eingeführte Deletion erfolgte mittels Pop-In/Pop-Out-Methode (siehe 3.4.3) und umfasste eine Länge von 153 bp, wobei die ersten 3 Codons und die letzten 6 Codons, inklusive des Stopp-Codons, nicht deletiert wurden. Dies resultierte in einer Verkürzung des Genprodukts von 59 Aminosäuren auf 8 Aminosäuren. Da das Gen allen Annahmen nach mit dem nachfolgenden Gen HVO_2752 co-transkribiert wird, sollte eine Beeinflussung dessen möglichst ausgeschlossen werden. Die erfolgreiche Deletion des Genabschnitts in allen Chromosomen des polyploiden Organismus wurde mittels 40-Zyklus-Test-PCR bestätigt.

4.2.2 Phänotypische Charakterisierung der Deletionsmutante

Um eine mögliche biologische Funktion von HVO_2753 identifizieren zu können, wurde die erstellte *in frame* Deletionsmutante unter verschiedenen Bedingungen mit dem Wildtyp verglichen.

4.2.2.1 Wachstum unter verschiedenen Bedingungen

In den durchgeführten Versuchen, bei denen das Wachstum in Flüssigkulturen miteinander verglichen wurde, war kein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp und Deletionsmutante festzustellen. Abbildung 8 zeigt die Wachstumskurven der beiden Stämme in Komplexmedium (K) und in synthetischem Medium mit Glukose als Kohlenstoffquelle (S).

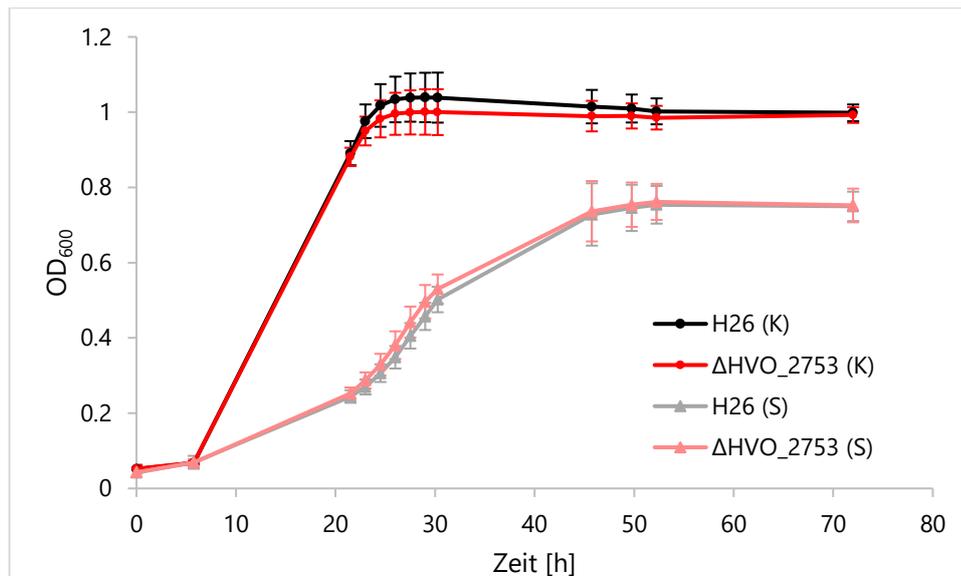


Abbildung 8: Wachstumskurven des Wildtyps H26 und der Deletionsmutante ΔHVO_2753. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils 18 biologischen Replikaten der Stämme in Komplexmedium (K) und synthetischem Medium mit Glukose als Kohlenstoffquelle (S).

4.2.2.2 Biofilmbildung und Schwärmverhalten

Weitere Untersuchungsparameter, die der Suche nach einer möglichen biologischen Funktion von HVO_2753 beitragen können, ist die Fähigkeit der Zellen zur Bildung von Biofilmen auf der einen Seite und die Fähigkeit zur Motilität auf der Anderen.

Um Unterschiede in der Befähigung zur Motilität analysieren zu können, wurden Schwärmversuche durchgeführt. Hierbei wird Chemotaxis und Motilität gekoppelt untersucht. *H. volcanii* schwärmt in mikroaerober Umgebung und halbfestem Medium ringförmig um eine Inokulationseinstichstelle einem Nährstoffgradienten entgegen. Hierbei kann leicht zwischen Stämmen unterschieden werden, die in unterschiedlichen Geschwindigkeiten schwärmen bzw. die Fähigkeit des Schwärmens nicht besitzen oder besitzen. Vorläufige Untersuchungen zum Schwärmen der Deletionsmutante ΔHVO_2753 verglichen mit dem Wildtyp H26 zeigten leichte Unterschiede im Schwärmverhalten. Die Deletionsmutante wies ein verlangsamtes Schwärmverhalten dem Wildtyp gegenüber auf. Sie bildete auf der Oberfläche des halbfesten Mediums jedoch schneller einen Zellrasen als der Wildtyp.

Bei der Untersuchung der Biofilmbildung wurde ein Biofilm-Assay durchgeführt. Hierbei werden Zellen in Flüssigkulturen angezogen und Medien in Vertiefungen von Mikrotiterplatten mit Flachboden mit diesen Zellen inokuliert. Nach einer Inkubation können die planktonischen Zellen abgenommen und der verbleibende Biofilm fixiert und gefärbt werden. Die optische Dichte der Entfärbelösung stellt dann ein Maß für die Menge an Zellen im Biofilm dar. Hier wurden Zellen des Wildtyps und der Deletionsmutante zunächst bis zur exponentiellen Wachstumsphase bzw. bis zur stationären Wachstumsphase angezogen und mit diesen Zellen der Biofilmversuch durchgeführt. Hier zeigte sich ein hochsignifikanter Unterschied zwischen Wildtyp und Deletionsmutante bei Zellen beider Wachstumsphasen (siehe Abbildung 9). Die Deletionsmutante zeigte eine um 63 % verringerte Biofilmbildung bei Zellen, die aus der exponentiellen Wachstumsphase stammen und eine um 50 % verringerte Biofilmbildung bei Zellen aus der stationären Wachstumsphase.

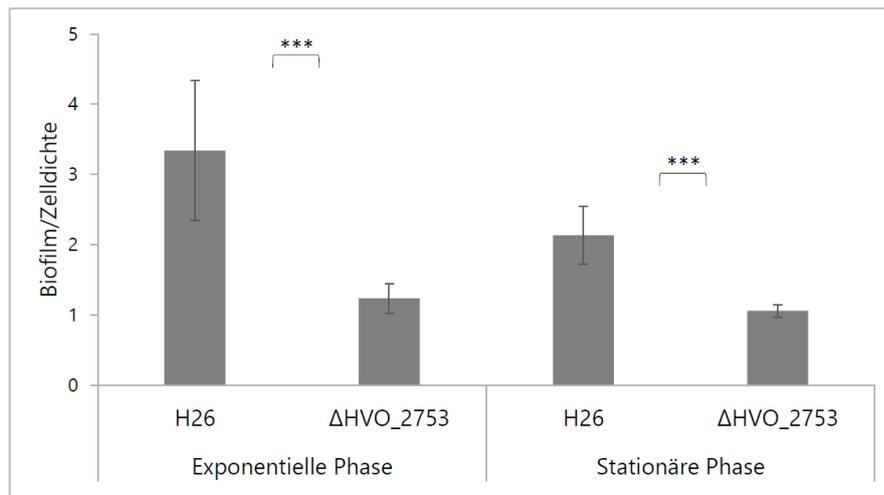


Abbildung 9: Biofilm-Assay des Wildtyps H26 und der Deletionsmutante ΔHVO_2753. Gezeigt ist das Verhältnis von OD₆₀₀ des Biofilms und der entsprechenden eingesetzten Zellsuspension. Die Zellen stammten aus einer Kultur in exponentieller bzw. stationärer Wachstumsphase in synthetischem Medium mit Glukose als Kohlenstoffquelle. Die Inkubationsdauer für die Biofilmbildung betrug 6 h. Statistische Signifikanzen wurden mittels ungepaartem, zweiseitigen t-Test ermittelt: *** - p-Wert < 0,001. Herangezogen wurden jeweils 10 unabhängige biologische Replikate.

4.2.3 Komplementationsversuche

Um Ursachen von phänotypischen Abweichungen einer Deletionsmutante vom Wildtyp sicher auf die Deletion zurückführen und artifizielle Einflüsse ausschließen

zu können, wird standardmäßig eine Komplementation durchgeführt. Dabei wird das deletierte Gen plasmidisch, meist unter Kontrolle eines induzierbaren Promotors, in die Zelle eingebracht und anschließend unter entsprechenden Bedingungen überprüft, ob durch plasmidische Expression des Gens der wildtypische Phänotyp wiederhergestellt werden kann.

4.2.3.1 Herstellung der Komplementationsmutanten

Im Zuge dieser Arbeit wurde für die Komplementation als Ausgangsplasmid pTA929 verwendet (Allers *et al.*, 2010). Dieses besitzt den *origin of replication* des pHV2-Plasmides, welcher beim Wildtyp H26 fehlt und so die gezielte Verwendung des Origins ermöglicht. Transformanden können mittels des *pyrE2*-Gens auf dem Plasmid, welches im Uracil-auxotrophen Wildtyp H26 deletiert vorliegt, selektiert werden. Das Gen *pyrE2* codiert für die Orotat-Phosphoribosyltransferase, ein Enzym des Uracilbiosynthese-Stoffwechsels, und befähigt die Transformanden wieder zur Synthese von Uracil. In dem Ausgangsplasmid wurde die bereits vorhandene Sequenz für einen Hexahistidin-Tag (His-Tag) entfernt, da hier zusätzliche Codons für einen *linker* zwischen His-Tag und ORF vorgesehen waren, und durch Genvarianten von *HVO_2753* ersetzt. Dabei wurden Genvarianten mit Sequenzen für einen N-terminalen bzw. C-terminalen His-Tag ohne *linker* gewählt, um das Genprodukt nicht unnötig zu vergrößern. Der His-Tag wurde jedoch eingebracht um später, zusätzlich zu Komplementationsversuchen, das Protein überproduzieren und leicht mittels Affinitätschromatographie für weitere Versuche aufzureinigen zu können. Die Gene *HVO_2753n* bzw. *HVO_2753c* stehen dann hier unter der Kontrolle des Tryptophan-induzierbaren Promotors *p.tnaA*.

Als Kontrolle zu den Komplementationsmutanten $\Delta HVO_2753 + 2753n$ (mit pTA929_HVO_2753_NHis) und $\Delta HVO_2753 + 2753c$ (mit pTA929_HVO_2753_CHis) wurden ab hier immer Kontrollstämme mit Leervektoren (empty vector control, *evc*) mitgeführt. Somit unterschieden sich die Komplementationsmutanten und der Kontrollstamm $\Delta HVO_2753 \text{ evc}$ lediglich in der An- bzw. Abwesenheit der plasmidisch codierten Sequenz für *HVO_2753*. Auch der Wildtyp lag ab hier mit dem Levektor transformiert vor: H26 *evc*. Des Weiteren konnten die Stämme auch im identischen Medium kultiviert werden und es musste für keinen Stamm Uracil supplementiert werden.

4.2.3.2 Phänotypische Charakterisierung

Zunächst wurden erneut Wachstumsversuche durchgeführt und die Komplementationsstämme mit den Kontrollstämmen verglichen. Dabei wurde getestet ob und wie sehr die Induktion des Tryptophanase-Promotors (*p.tnaA*) und die damit verbundene plasmidische Expression, aber auch die Anwesenheit verschiedener Konzentrationen an Tryptophan im Kulturmedium einen Einfluss auf die Wachstumsgeschwindigkeiten der verschiedenen Stämme hat. Abbildung 10 zeigt die Wachstumskurven der 4 Stämme bei den Tryptophan-Konzentrationen 0 mM, 0,3 mM, 1 mM und 4 mM. Diese spiegeln verschiedene Induktionslevel des Promotors wider. In Abwesenheit von Tryptophan ist lediglich eine sehr geringe, basale Transkription vorhanden, während diese mit der Konzentration von Tryptophan ansteigt. Zwischen den Stämmen zeigte sich hier bei keiner der Tryptophan-Konzentrationen ein signifikanter Unterschied. Der Wildtyp H26 evc wies lediglich eine gering verlängerte Anlauf- (*lag*-)Phase auf, während die Wachstumsgeschwindigkeiten in der exponentiellen Phase annähernd identisch waren. Auch zwischen den verschiedenen Trp-Konzentrationen gibt es keine signifikanten Unterschiede im Wachstum. Generell ist eine sehr leicht erhöhte Zelldichte bei höheren Trp-Konzentrationen messbar.

Dies zeigt deutlich, dass die Tryptophan-Konzentration bis 4 mM im Medium und die damit verbundene Induktionsstärke des plasmidischen *p.tnaA*-Promotors keinen Einfluss auf die Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen haben. Darüber hinaus ist sichergestellt, dass keiner der getesteten Stämme ein Wachstumsdefizit durch das jeweilige Plasmid aufweist.

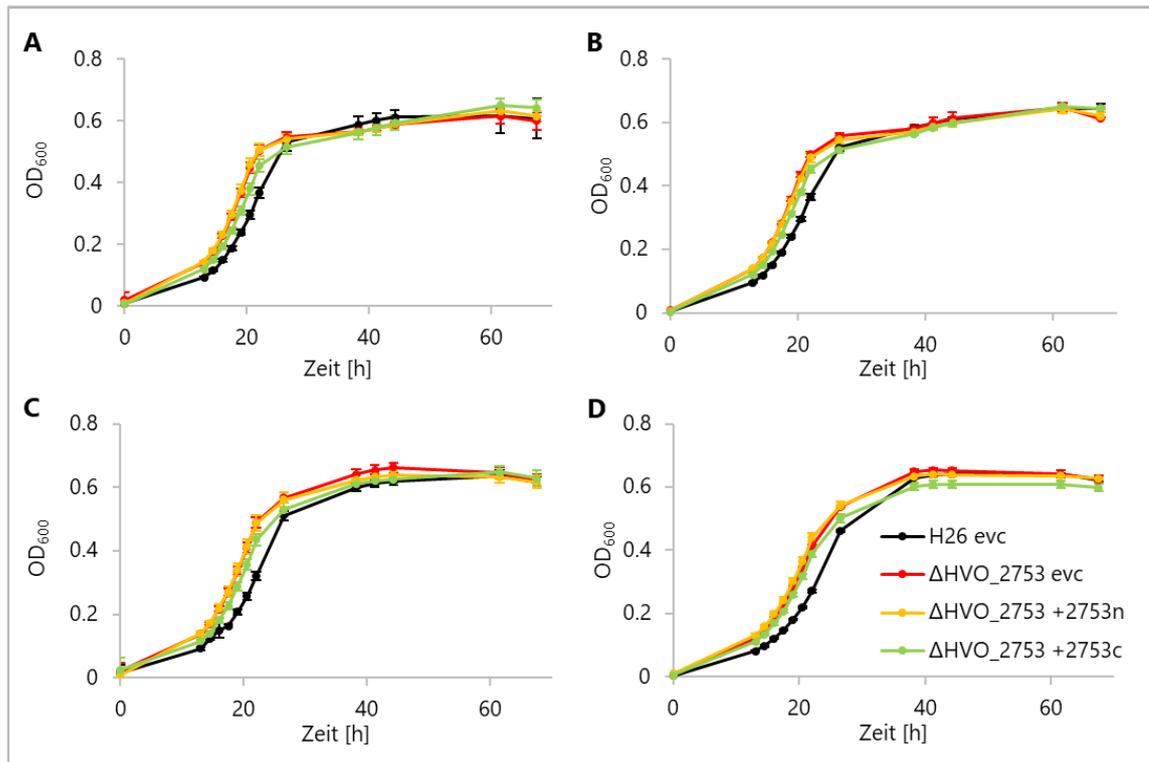


Abbildung 10: Wachstumskurven der Komplementationsmutanten und der Kontrollstämme. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils drei biologischen Replikaten des Wildtyps mit Leervektor (H26 evc), der Deletionsmutante mit Leervektor (ΔHVO_{2753} evc) und der beiden Komplementationsmutanten ($\Delta HVO_{2753} +2753n$ bzw. $\Delta HVO_{2753} +2753c$) in synthetischem Medium mit Glukose als Kohlenstoffquelle. Das Medium wurde supplementiert mit (A) 0 mM, (B) 0,3 mM, (C) 1 mM oder (D) 4 mM L-Tryptophan.

Anschließend wurden mit den Stämmen Schwärmversuche durchgeführt. Da hier zuvor eine leichte Abweichung des Phänotyps zum Wildtyp gefunden wurde, sollte nun untersucht werden, ob diese Abweichung komplementiert werden kann. Die Schwärmversuche wurden wie die zuvor beschriebenen Wachstumsversuche bei verschiedenen Konzentrationen an L-Tryptophan im halbfesten Schwärmmedium durchgeführt. Abbildung 11 zeigt die gemessenen Schwärmdurchmesser der 4 Stämme über einen zeitlichen Verlauf von 144 h. Besonders auffällig ist hierbei zunächst das absolute Schwärmdefizit von ΔHVO_{2753} evc. Während die Deletionsmutante ohne Leervektor nur ein leichtes Defizit aufwies, besitzt ΔHVO_{2753} evc keine Fähigkeit mehr zu Schwärmen. Während der Leervektor hier einen negativen Einfluss auf das Schwärmen zu haben scheint, ist der Wildtyp H26 nach Transformation mit dem Leervektor nicht negativ im

Schwärmen beeinflusst. H26 evc besitzt überdies eine leicht erhöhte Schwärmgeschwindigkeit im Vergleich zu H26 (Daten nicht gezeigt). Die Komplementationsstämme besaßen bei den Schwärmversuchen im Gegensatz zu dem Kontrollstamm Δ HVO_2753 evc die Fähigkeit zu schwärmen. Auch wenn durch die plasmidische Expression des deletierten Gens hier keine vollständige Komplementation des hervorgerufenen Schwärmdefizits herbeigeführt wird, kann ein verzögertes Schwärmen beobachtet werden. Dieses setzt nahezu unabhängig von der Tryptophankonzentration bzw. Induktionsstärke ca. 48 h später ein als beim wildtypischen Kontrollstamm, erreicht jedoch ebenso den maximalen Durchmesser von 33 mm. Der verwendete Tryptophan-induzierbare Promotor besitzt auch in Abwesenheit von Tryptophan eine basale Aktivität, was die Komplementierbarkeit ab bereits 0 mM Tryptophan zur Folge hat. Zwischen den beiden Komplementationsstämmen konnte hier kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Die hohe Induktionsstärke scheint auch hier keinen entscheidenden Einfluss auf die Komplementationsfähigkeit der Mutanten zu haben. Eine Tryptophankonzentration von 4 mM zeigt in allen schwärmenden Stämmen eine leichte Reduktion der Schwärmgeschwindigkeit.

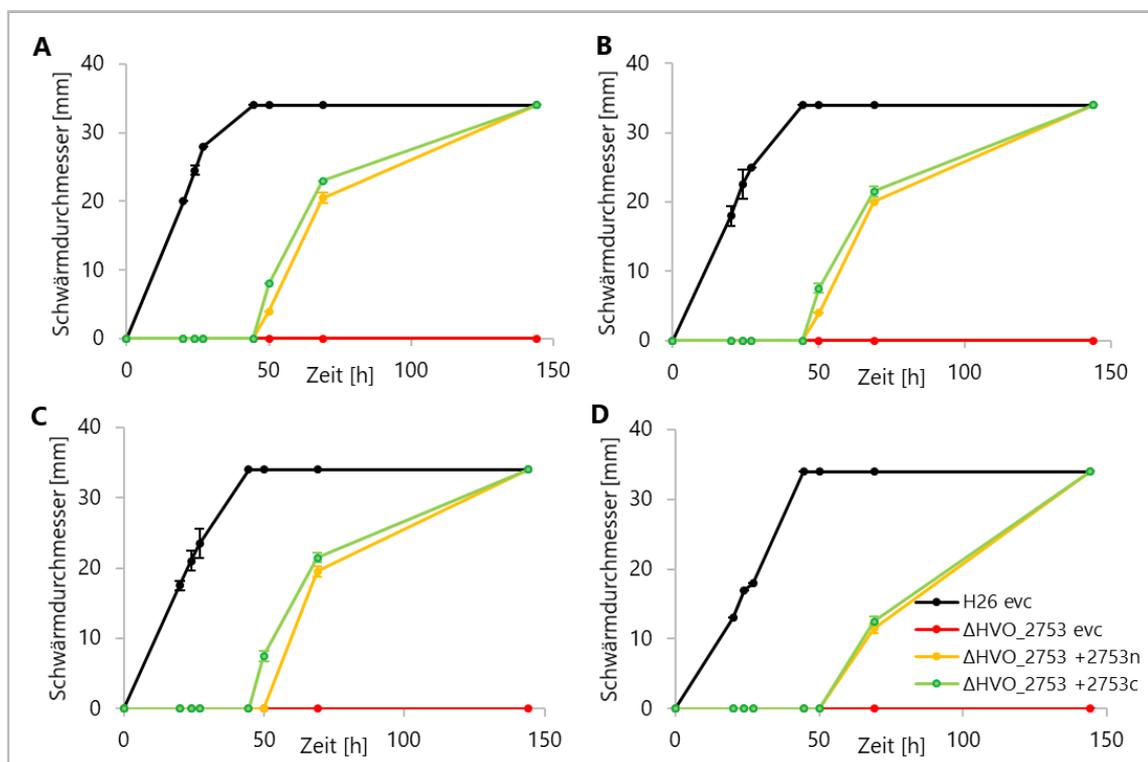


Abbildung 11: Schwärmverhalten der Komplementationsmutanten und der Kontrollstämme. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils vier biologischen Replikaten des Wildtyps mit Leervektor (H26 evc), der Deletionsmutante mit

Leervektor (Δ HVO_2753 evc) und der beiden Komplementationsmutanten (Δ HVO_2753 +2753n bzw. Δ HVO_2753 +2753c) in halbfestem synthetischen Medium mit Glukose als Kohlenstoffquelle und 0,3 % (w/v) Agar. Das Medium wurde supplementiert mit (A) 0 mM, (B) 0,3 mM, (C) 1 mM oder (D) 4 mM Tryptophan.

Abbildung 12 zeigt eine Schwärmplatte nach 144 h Inkubation am Ende des Schwärmversuchs. Zu sehen sind H26 evc (1), Δ HVO_2753 evc (2), Δ HVO_2753 +2753n (3) und Δ HVO_2753 +2753c (4). Die beiden Komplementationsstämme sind jeweils doppelt vorhanden. Zu diesem Zeitpunkt sind die Zellen aller schwärmenden Stämme bis an den Rand der Vertiefungen geschwärmt und haben die stationäre Wachstumsphase erreicht. Dies ist leicht an der Trübung und der purpurnen Farbe zu erkennen. Der Stamm Δ HVO_2753 evc weist keinerlei Fähigkeit zu Schwärmen auf. Man sieht lediglich eine große Kolonie rund um die Inokulationsstelle in der Mitte der Vertiefung. Diese Kolonie sitzt auf dem halbfesten Schwärmmedium auf. In einem weiterführenden Versuch zeigte Δ HVO_2753 evc auch nach 312 h Inkubation keinerlei Schwärmring (Daten nicht gezeigt).

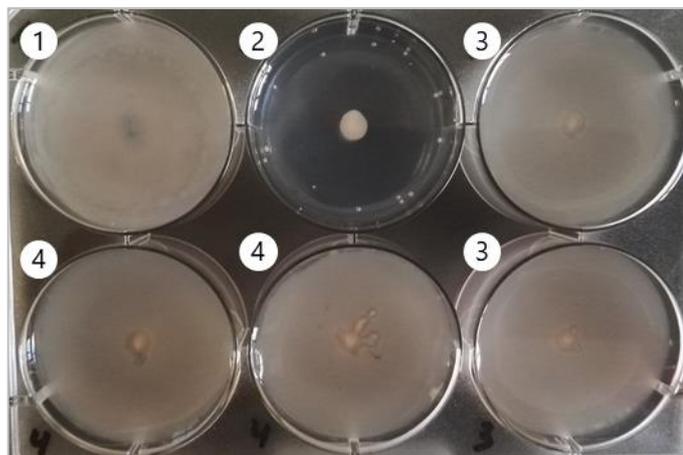


Abbildung 12: Schwärmplatte der Komplementationsmutanten und der Kontrollstämme. Gezeigt ist eine 6-Well Platte mit halbfestem synthetischem Medium mit Glukose als Kohlenstoffquelle und 0,3 % Agar nach 144 h Inkubation. (1) Wildtyp mit Leervektor (H26 evc), (2) Deletionsmutante mit Leervektor (Δ HVO_2753 evc), (3) Komplementationsmutante Δ HVO_2753 +2753n und (4) Komplementationsmutante Δ HVO_2753 +2753c. Abbildung entnommen und modifiziert aus Zahn *et al.* (2020).

Neben dem Schwärmphänotyp der Deletionsmutante, wies diese ebenso eine verminderte Biofilmbildung auf. Analog zu den Schwärmversuchen wurden auch hier mit den vier Stämmen Komplementationsversuche durchgeführt und über-

prüft, ob eine plasmidische Expression einer Genvariante von *HVO_2753* die Abweichung im Phänotyp komplementieren kann. Hierfür wurden Biofilm-Assays durchgeführt. Diese zeigten für die mit dem Leervektor transformierten Stämme H26 evc und Δ HVO_2753 evc das gleiche Bild wie für den Wildtyp H26 und die Deletionsmutante Δ HVO_2753 zuvor, eine über 60 % reduzierte Biofilmbildung von Δ HVO_2753 evc dem Wildtyp H26 evc gegenüber (siehe Abbildung 13). Hier konnte in keiner der beiden Komplementationsmutanten weder das wildtypische Level an Biofilmbildung wieder erreicht noch eine Änderung zur Deletionsmutante hervorgerufen werden. In den Biofilm-Assays wurde somit keine Komplementation der Verminderung der Biofilmbildung erreicht.

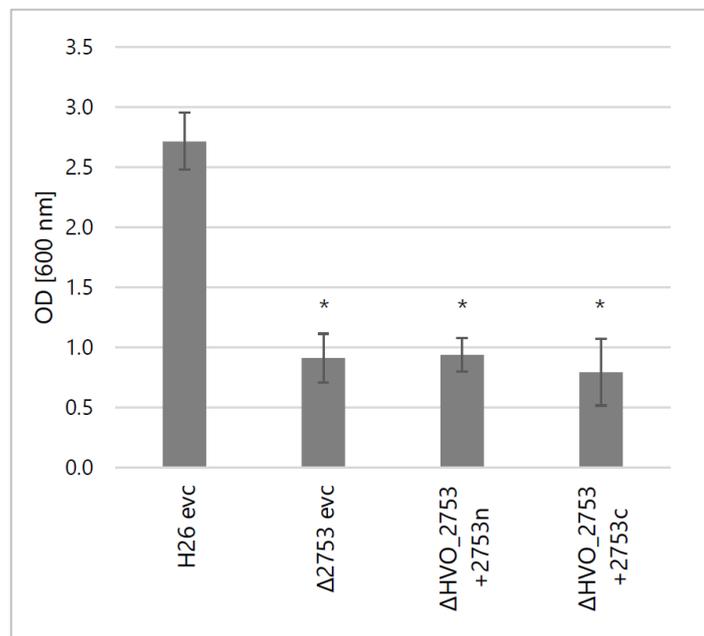


Abbildung 13: Biofilm-Assay der Komplementationsmutanten und der Kontrollstämme. Die in den Assay eingesetzten Zellen stammten aus einer Kultur in exponentieller Wachstumsphase in Synthetischem Medium mit Glukose als Kohlenstoffquelle. Statistische Signifikanzen beziehen sich auf den Vergleich des Stammes zum Wildtyp H26 evc und wurden mittels ungepaartem, zweiseitigen t-Test ermittelt: * - p-Wert < 0,05. Herangezogen wurden jeweils drei unabhängige biologische Replikate. Abbildung entnommen und modifiziert aus Zahn *et al.* (2020).

4.2.3.3 Herstellung und Untersuchung von Punktmutanten

In vorangegangenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Deletion des Gens *HVO_2753* in Anwesenheit des Leerplasmids zum Totalverlust der Schwärmfähigkeit der Zelle führt, während eine plasmidische Expression einer Genvariante

von *HVO_2753* diesen Verlust teilweise komplementieren kann. Deshalb sollte nachfolgend, der Funktionsaufklärung wegen, eine Untersuchung durchgeführt werden, bei der bestimmte, ausgewählte Aminosäuren auf ihre Wichtigkeit hin überprüft werden. Hierfür wurden mittels ortsspezifischer Mutagenese (siehe 3.4.1.4, Abschnitt Ortsspezifische Mutagenese) Punktmutationen in das Gen eingebracht. Diese hatten Aminosäuresubstitutionen an den gewünschten Stellen zur Folge. Die mutierten Genvarianten basierten alle auf der Variante mit einer Sequenz für einen C-terminalen His-Tag und wurden nach der Mutagenese analog zu den Komplementationsplasmiden in das Ausgangsplasmid pTA929 eingebracht. Eine Übersicht über die 6 Aminosäuresubstitutionen, die einzeln vorlagen und zu 6 Punktmutanten führten, zeigt Abbildung 14. Für die Untersuchung wurde jeweils das erste Cystein eines jeden C(P)XCG-Musters, also das erste, dritte, fünfte und siebte Cystein im Protein (C12, C29, C39 und C51) für eine Substitution ausgewählt. Standardmäßig wurde gegen ein Alanin ausgetauscht. Hierbei sollte untersucht werden, ob alle vier Muster und somit beide potenzielle Zinkfinger-Motive für die Funktion essenziell sind. Fehlt ein Cystein im Muster, ist die Bindung eines Zink-Ions gestört und die für die Funktion wichtige Tertiärstruktur kann nicht korrekt ausgebildet werden. Zusätzlich zu den vier Cysteinen wurden zwei weitere Aminosäuren für eine Substitution ausgewählt. Glutamin 34 wurde ebenfalls durch Alanin substituiert. Da Q34 innerhalb der Halobacteriaceae nicht konserviert vorliegt, war zunächst nicht zu erwarten, dass diese Aminosäure eine essenzielle Funktion einnimmt. Tyrosin 49 hingegen liegt hochkonserviert, auch in den Orthologen der Methanomicrobia, vor. Zur Substitution von Y49 wurde die strukturell ähnliche Aminosäure Phenylalanin (F) gewählt. Da zu erwarten war, dass diese Aminosäure eine essenzielle Funktion trägt, blieb es zunächst offen, ob die Änderung zu Phenylalanin bereits zu einem Funktionsverlust des Proteins führen wird.

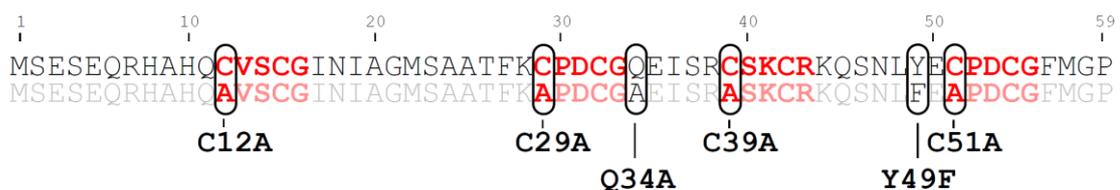


Abbildung 14: Aminosäuresequenz von *HVO_2753* mit eingeführten Punktmutationen. Gezeigt sind alle substituierten Aminosäuren und deren Position.

Die erstellten Punktmutanten, basierend auf der Deletionsmutante Δ HVO_2753, unterschieden sich zu der Komplementationsmutante Δ HVO_2753 +2753c in lediglich der einen jeweils substituierten Aminosäure in dem plasmidisch exprimierten Genprodukt von *HVO_2753c*. Die Mutanten zeigten bei der Zellkulturzucht keine signifikanten Abweichungen zu den bisherigen Stämmen (Daten nicht gezeigt.) Um nun die Wichtigkeit der jeweils substituierten Aminosäuren untersuchen zu können, wurde der Phänotyp gewählt, in dem sich Wildtyp und Deletionsmutante unterschieden, bei dem die Abweichung in der Deletionsmutante jedoch durch plasmidische Expression von Genvarianten teilweise komplementiert werden konnte. Die dafür durchgeführten Schwärmversuche zeigten, dass jede der getesteten Aminosäuren eine essenzielle Funktion trägt, wie Abbildung 15 zeigt. Keine der Mutanten zeigte eine Befähigung zum Schwärmen. Analog zum Kontrollstamm Δ HVO_2753 *evc*, waren zu keinem Zeitpunkt des Versuchs schwärmende Zellen zu beobachten. Es bildete sich lediglich auf der Oberfläche des halbfesten Schwärmmediums eine Kolonie rund um die Inokulationseinstichstelle. Dieser Versuch wurde indes mit jeweils drei biologischen Replikaten durchgeführt.

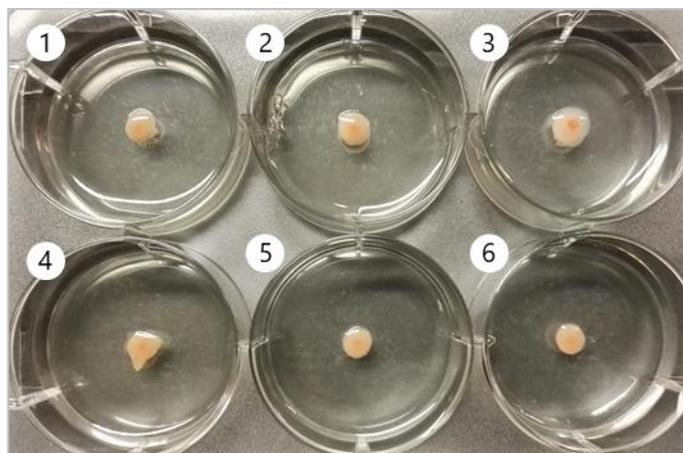


Abbildung 15: Schwärmplatte der Punktmutanten. Gezeigt ist eine 6-Well Platte mit halbfestem synthetischem Medium mit Glukose als Kohlenstoffquelle und 0,3 % Agar nach 192 h Inkubation. (1) Δ HVO_2753 +2753c_C12A, (2) Δ HVO_2753 +2753c_C29A, (3) Δ HVO_2753 +2753c_C39A, (4) Δ HVO_2753 +2753c_C51A, (5) Δ HVO_2753 +2753c_Q34A und (6) Δ HVO_2753 +2753c_Y49F. Abbildung entnommen und modifiziert aus Zahn *et al.* (2020).

4.2.4 Analyse der Genexpression

Zum Erkenntnisgewinn auf Transkriptebeine von *HVO_2753* und für die tiefergehende Untersuchung zu den Informationen aus vorangegangenen bioinformatischen Untersuchungen wurden Genexpressionsanalysen mittels Northern Blot durchgeführt. Daten aus vorausgegangenen Studien (Babski *et al.*, 2016; Laass *et al.*, 2019), in denen dRNA- und RNA-Sequenzierungen durchgeführt wurden, gaben bereits Hinweise auf eine Co-Transkription von *HVO_2753* und dem Translationsfaktor *HVO_2752* (siehe 4.1.1). Um dies experimentell bestätigen zu können, wurde aus Zellen der Stämme H26, Δ HVO_2753, H26 *evc*, Δ HVO_2753 *evc*, Δ HVO_2753 +2753n und Δ HVO_2753 +2753c in der exponentiellen Wachstumsphase RNA isoliert. Diese Gesamt-RNA wurde mittels denaturierender RNA-Gel-Elektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt, mittels Northern Blot auf eine Nylonmembran übertragen und diese Membran anschließend mit spezifischen Sonden gegen die beiden Transkripte hybridisiert. Nach weiterer Prozessierung der Membran wurde eine Immundetektion durchgeführt und so die entsprechenden Transkripte identifiziert.

Da auf dem *forward*-Strang, den beiden Genen gegenüber, potenziell eine lange 3'-UTR des Gens *HVO_2751* codiert liegt (siehe Abbildung 5), kam hier für diese Genexpressionsanalysen spezifische einzelsträngige DNA-Sonden gegen das jeweilige Transkript zum Einsatz. Dies war nötig, um ausschließen zu können, dass eben diese, gegenüber codierte, 3'-UTR zusätzlich detektiert wird und keine eindeutige Zuordnung der Fragmente geschehen kann. Abbildung 16 zeigt die entwickelten Filme der Genexpressionsanalyse (oben) und die entsprechende Gel-Ladekontrolle (unten). Auf der linken Seite der Abbildung wurde der Wildtyp H26 (1) und die Deletionsmutante Δ HVO_2753 (2) mit den Einzelstrang-Sonden α HVO_2752 und α HVO_2753 untersucht. Dabei zeigte sich eindeutig, dass im Wildtyp mit beiden Sonden das gleiche Transkript detektiert werden konnte. Die Transkriptlänge stimmt mit der erwarteten Länge einer bicistronischen mRNA von *HVO_2753_HVO_2752* inkl. kurzer 3'-UTR überein (ca. 480 nt). In der Deletionsmutante kann die verkürzte Variante des Transkripts (ca. 330 nt), wie erwartet, nur mit der Sonde gegen *HVO_2752* detektiert werden. Auf der rechten Seite der Abbildung wurden neben dem Wildtyp H26 (1) und der Deletionsmutante Δ HVO_2753 (2) noch die Kontrollstämme mit Leervektor H26 *evc* (3) und Δ HVO_2753 *evc* (4) und die Komplementationsmutanten Δ HVO_2753 +2753n (5)

und $\Delta HVO_2753 +2753c$ (6) mit der Sonde gegen *HVO_2752* untersucht. Hier zeigte sich ebenfalls ein erwartetes Ergebnis und der Genotyp der verschiedenen Stämme sowie die Ergebnisse der ersten Genexpressionsanalyse konnten bestätigt werden. Die Northern Blot-Analyse der Komplementationsmutanten mit der Sonde gegen *HVO_2753* war aufgrund plasmidspezifischer Kreuzhybridisierungen nicht auswertbar (Daten nicht gezeigt).

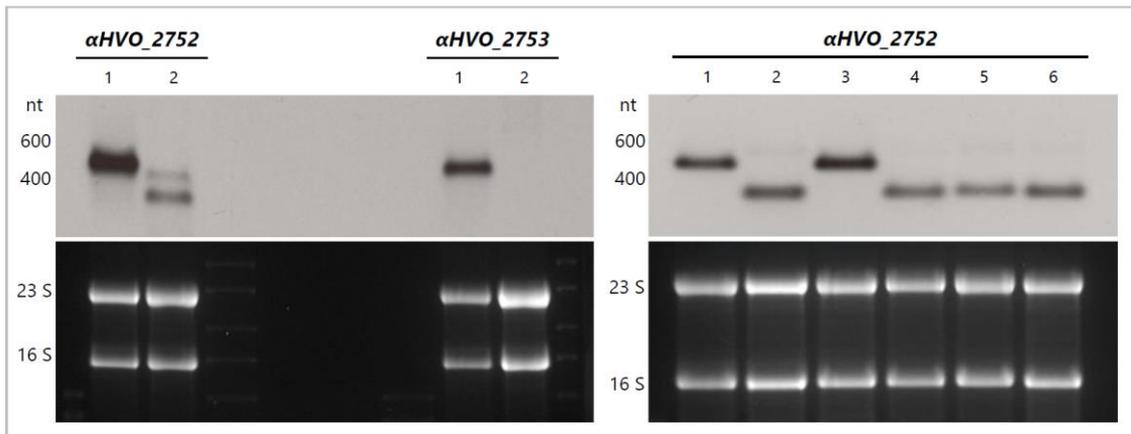


Abbildung 16: Genexpressionsanalyse mittels Northern Blot. Die Hybridisierung erfolgte mit einer Sonde gegen *HVO_2752* bzw. *HVO_2753* wie angedeutet. Die Spuren entsprechen (1) H26, (2) ΔHVO_2753 , (3) H26 *etc*, (4) ΔHVO_2753 *etc*, (5) $\Delta HVO_2753 +2753n$ und (6) $\Delta HVO_2753 +2753c$. Als Ladekontrolle sind die 16S und 23S rRNA gezeigt. Abbildung teilweise entnommen und modifiziert aus Zahn *et al.* (2020).

4.2.5 Ribosomenprofil durch Dichtegradientenzentrifugation

Da *HVO_2753* mit dem Translationsfaktor *HVO_2752* co-transkribiert wird, wurde untersucht, ob zwischen der Mutante mit der Deletion von *HVO_2753* und der Überexpression ein signifikanter Unterschied im Ribosomenprofil besteht. Hierfür wurde geklärtes Zelllysate von Zellen aus der exponentiellen Wachstumsphase verwendet und mittels Dichtegradientenzentrifugation im 10-30 %igen Saccharose-Gradienten zentrifugiert (siehe 3.5.1.3 und 3.5.3). Die anschließende spektrometrische Analyse des Gradienten, der hierfür aus dem Zentrifugationsröhrchen von oben nach unten abgepumpt wurde, ergab das Ribosomenprofil, welches in Abbildung 17 dargestellt ist. Hierbei ist zu erkennen, dass die beiden getesteten Stämme keine signifikanten Unterschiede im Ribosomenprofil zueinander aufwiesen. Das Signalrauschen bis 1,5 min ist auf Luftblasen im System zurückzuführen, während die drei Peaks ab ca. 1,5 min bis 4 min der kleinen ribosomalen Unterein-

heit, der großen ribosomalen Untereinheit und dem Gesamtribosom zugeschrieben werden kann. Um dies abschließend zu bestätigen, wurde von den hierbei gesammelten Fraktionen RNA isoliert und diese in einer denaturierenden RNA-Gelelektrophorese analysiert.

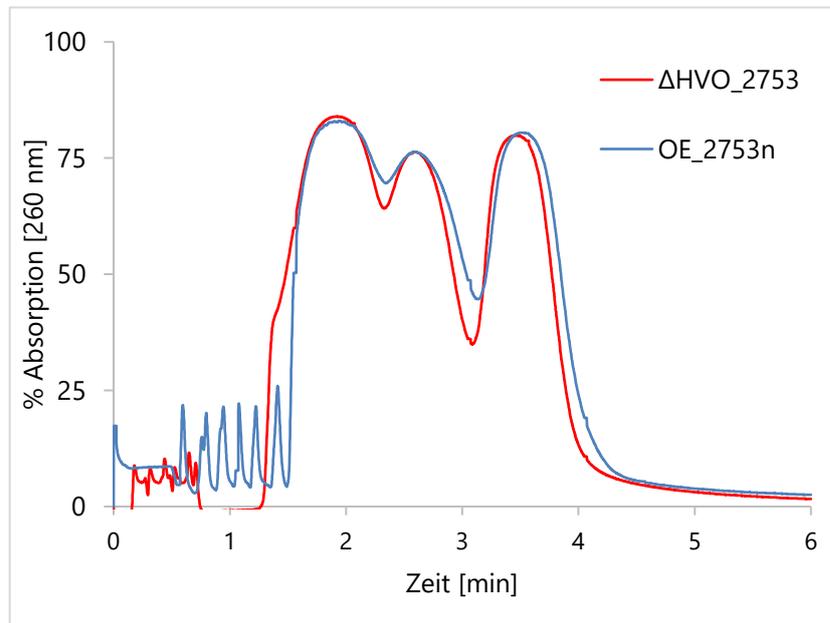


Abbildung 17: Ribosomenprofil nach der Dichtegradientenzentrifugation. Zelllysate von Δ HVO_2753 und OE_2753n wurden in einem 10-30 % Saccharose-Gradienten zentrifugiert und die Zellbestandteile ihrer Größe nach aufgetrennt. Die anschließende spektrometrische Analyse des Gradienten bei 260 nm von oben nach unten wird als Ribosomenprofil dargestellt.

Für die denaturierende RNA-Gelelektrophorese der Ribosomenprofilfraktionen wurden nach der RNA-Isolierung gleiche Mengen aufgetragen. Die in Abbildung 18 gezeigten Fraktionen entsprechen jeweils einer 30-sekündigen Fraktion zwischen 1,4 min und 4,4 min des entsprechenden Dichtegradienten. Die hier identifizierten ribosomalen RNAs sprechen mit den in den Ribosomenprofilen zugeordneten Ribosomeneinheiten überein. So ist in der ersten Fraktion die 5S rRNA zu sehen, in der zweiten und dritten Fraktion hauptsächlich die 16S rRNA, in der vierten Fraktion hauptsächlich 23S rRNA, während in den Fraktionen 5 und 6 die 16S und 23S rRNA zu sehen sind, welche vor der RNA-Isolierung noch innerhalb von vollständigen Ribosomen vorlagen. Die Erstellung von Ribosomenprofilen konnte aus zeitlichen Gründen in der vorliegenden Arbeit nur einmal mit den beiden gezeigten Stämmen durchgeführt werden. Dennoch konnte bei der vergleichenden Untersuchung der Ribosomenprofile der Deletionsmutante Δ HVO_2753

und der Überexpressionsmutante OE_2753n gezeigt werden, dass kein signifikanter Unterschied zwischen den Stämmen vorlag.

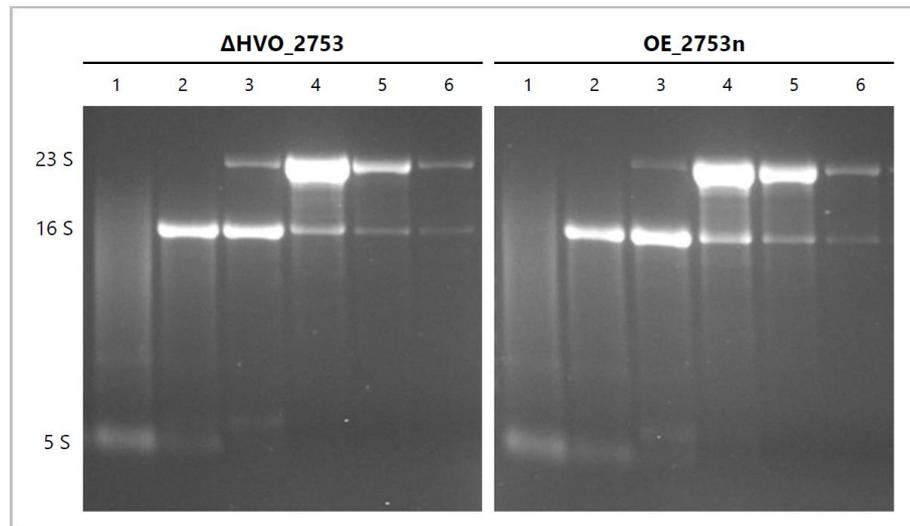


Abbildung 18: Denaturierende RNA-Gelelektrophorese ausgewählter Fraktionen nach der Dichtegradientenzentrifugation. Aufgetragen wurden gleiche Mengen nach einer RNA-Isolierung aus den entsprechenden Fraktionen der Dichtegradientenzentrifugation.

4.2.6 Die homologe Überproduktion von HVO_2753 zur Erzeugung von spezifischen Antikörpern

Um in nachfolgenden Experimenten das Protein HVO_2753 in verschiedenen Proben spezifisch mittels Immundetektion nach einem Western Blot nachweisen zu können, sollte ein polyklonaler Antikörper gegen HVO_2753 erzeugt werden. Hierfür wurde die Variante mit N-terminalem His-Tag im homologen System *H. volcanii* plasmidisch überproduziert und mittels Affinitätschromatographie und anschließender Größenausschlusschromatographie aufgereinigt. Die Fraktionen, die HVO_2753n enthielten, wurden gesammelt, dialysiert und dem Dienstleister Davids Biotechnologie GmbH übergeben, um polyklonale Antikörper im Kaninchen herstellen zu lassen.

Nach Erhalt der Antikörper α HVO_2753n wurden diese zunächst mit verschiedenen Elutionsfraktionen nach der Affinitätschromatographie von überproduziertem HVO_2753n in Western Blot-Analysen getestet (Daten nicht gezeigt). Dabei zeigte sich eine große Anzahl an unspezifischen Signalen. Daher wurde anschließend eine Untersuchung von Gesamtzellextrakten vom Wildtyp H26, der Deletionsmutante Δ HVO_2753 und der Komplementationsmutante Δ HVO_2753

+2753n durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde HVO_2753n nach der zweistufigen Aufreinigung mittels Affinitäts- und Größenausschlusschromatographie und anschließender Dialyse mitgeführt. Der entwickelte Film ist in Abbildung 19 zu sehen. Während die hochreine Positivkontrolle ein spezifisches, einzelnes Signal auf der erwarteten Höhe zeigt, konnte in keinem der Zellextrakte ein spezifisches Signal von HVO_2753 detektiert werden. Darüber hinaus zeigte sich eine Reihe unspezifischer Signale bei höheren Molekulargewichten. Aufgrund der Unspezifität und der mangelnden Sensitivität des Antikörpers α HVO_2753n wurde dieser für keine weiteren Versuche eingesetzt.

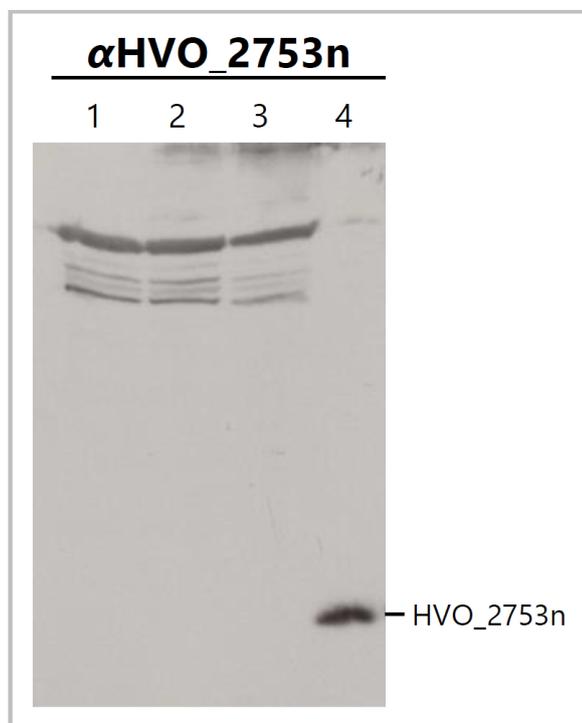


Abbildung 19: Western Blot-Analyse zur Spezifität des Antikörpers α HVO_2753n. *Haloferax volcanii*-Zelllysate wurden mittels einer Tricin-SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel anschließend geblottet. Die Hybridisierung fand mittels α HVO_2753n-Antikörper statt. Zu sehen sind Zelllysate von (1) H26, (2) Δ HVO_2753 und (3) Δ HVO_2753 +2753n. In (4) wurden 4 μ g HVO_2753n als Positivkontrolle aufgetragen.

4.3 Struktur- und Funktionsanalyse von HVO_2753 *in vitro*

Neben den vorangegangenen *in vivo* Untersuchungen, die bereits zahlreiche Hinweise für eine Funktion des Proteins gegeben haben und unabdingbar für eine vollständige Charakterisierung von HVO_2753 sind, können *in vitro* Untersuchun-

gen in vielen Bereichen daran anknüpfen und bereits erhaltene Erkenntnisse ausbauen. Voraussetzung aller nachfolgenden Versuche war es, das Protein in einer ausreichend reinen Form vorliegen zu haben. Zu diesem Zwecke wurde in der vorliegenden Arbeit die Überproduktion von HVO_2753 im homologen System entwickelt und optimiert. Viele der nachfolgend beschriebenen Methoden zunächst mussten für die Analyse des kleinen Proteins angepasst und weiterentwickelt werden.

4.3.1 Die homologe Überexpression von HVO_2753

Um das reine Protein für nachfolgende Untersuchungen vorliegen zu haben, sollte zunächst mittels einer der für die Komplementationsversuche erstellten Stämme eine Überproduktion durchgeführt werden. Es galt zu ermitteln, welche Lokalisierung des His-Tags besser geeignet ist, das Protein in großer Menge aufzureinigen zu können. Hierfür wurden verschiedene Induktionsstärken, mittels verschiedener Tryptophan-Konzentrationen im Kulturmedium, getestet sowie verschiedene Inkubationsperioden. Da zwischen den Protein-Varianten HVO_2753n und HVO_2753c keine signifikanten Unterschiede in der Ausbeute festzustellen waren, diese jedoch insgesamt sehr gering ausfiel, wurde nach einem alternativen Überexpressionsplasmid gesucht. In einer früheren Studie zur Untersuchung des archaealen „*distal promoter elements*“, wurde eine randomisierte Promotorbibliothek, basierend auf dem Ferredoxin(fdx)-Promotor erstellt (Danner & Soppa, 1996). Im Zuge dieser Studie konnten mittels Selektionsdruck Promotorvarianten identifiziert werden, die eine höhere Aktivität aufwiesen, da sie den entsprechenden Zellen eine höhere Resistenz verliehen, wenn das Resistenzgen unter Kontrolle des jeweiligen Promotors stand. Das Plasmid pSD1_R1/6 dieser Bibliothek, das einen sehr starken Promotor trägt, wurde ausgewählt und so modifiziert, dass es eine zusätzliche *NdeI*-Schnittstelle nach dem Promotor aufweist. Die Genvariante HVO_2753n mit dem N-terminalen His-Tag wurde ebenso in dieses modifizierte Plasmid kloniert. Durch Transformation der Deletionsmutante Δ HVO_2753 mit diesem Plasmid pSD1_R1/6_HVO_2753_NHis wurde die Überexpressions(*overexpression, oe*)-Mutante OE_2753n erstellt. Diese wies nun keinen induzierbaren, sondern einen starken konstitutiven Promotor auf und wurde zunächst in vorläufigen Versuchen getestet. Die Ausbeute von HVO_2753n war sehr stark

erhöht und es konnte nach einer Inkubationszeit der Überexpressionshauptkulturen von 24 h kein Abbau des Proteins festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

4.3.2 Die Aufreinigung von HVO_2753

4.3.2.1 Affinitätsaufreinigung mittels Nickel-Chelat-Sepharose

Nach der Überproduktion von HVO_2753n im homologen System *H. volcanii* und erfolgtem Zellaufschluss mittels Sonifikation, wurde durch Sedimentation der Zellfragmente ein geklärtes Zelllysate erzeugt (siehe 3.5.1.1 und 3.5.1.3). Dieses konnte nachfolgend verwendet werden, um das überproduzierte Protein mit His-Tag aufzureinigen. Dieser erste Schritt der Aufreinigung, die Nickel-Affinitätsaufreinigung, wurde in einer Gravitationssäule durchgeführt (siehe 3.5.1.4). Entscheidend war hier, dass alle Puffer einen hohen Salzgehalt aufwiesen, um zu gewährleisten, dass die Proteine, die im halophilen Organismus an hohe Ionenkonzentrationen angepasst sind, ihre Faltung beibehalten und so eine native Aufreinigung gewährleistet ist. Ein Aufreinigungsgel der Affinitätsaufreinigung, bei der bei jedem Schritt Proben genommen wurden, ist in Abbildung 20 auf der linken Seite zu sehen. Hier sieht man das geklärte Lysat (L) nach der Zellfragmentsedimentation, den Lysatdurchfluss (FT) nach dem Binden an die Matrix, die erste und eine weitere Waschfraktion (W1, W5) und die Elutionsfraktionen (E1-E5). Alle Proben mussten gegen 25 mM Tris/HCl pH 7,5 dialysiert werden, bevor sie in die Tricin-SDS-PAGE eingesetzt werden konnten. Die Dialyse von jeweils 40 µl wurde mittels Membranfilterscheiben (Merck, Darmstadt) für 30 min schwimmend auf dem Puffer in Petrischalen durchgeführt. Von den Proben L, FT und W1 konnte aufgrund der sehr hohen Proteinkonzentration nur eine 1:10-Verdünnung aufgetragen werden, daher ist auf Höhe von 10-12 kDa keine Fraktion eindeutig zu erkennen, die HVO_2753n zugeordnet werden kann. Bei dem Fortschreiten des Waschvorgangs wurden nach und nach viele der unspezifisch gebundenen Proteine gewaschen und sind in späteren Waschfraktionen, wie W5, nicht mehr vorhanden. Ab E2 ist HVO_2753n in den Elutionsfraktionen zunächst in sehr großer, dann absteigender Menge vorhanden. Das Protein läuft, wie viele halophile Proteine, aufgrund seiner physikochemischen Eigenschaften in der Tricin-SDS-PAGE bei signifikant höheren Molekülmassen (Tokunaga *et al.*, 1999; Madern *et al.*, 2000).

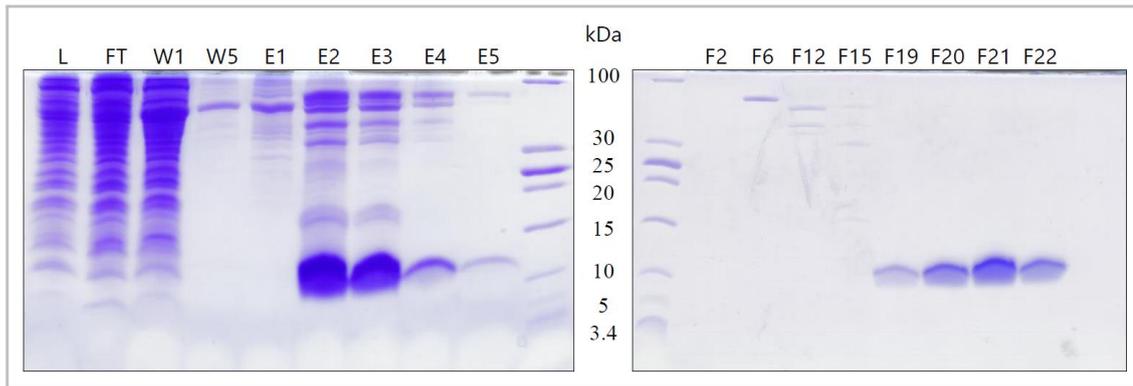


Abbildung 20: Tricin-SDS-PAGE ausgewählter Fraktionen der beiden Aufreinigungsschritte von HVO_2753n. Links sind Fraktionen der Affinitätsaufreinigung mittels Nickel-Chelat-Sepharose und rechts der Größenausschlusschromatographie zu sehen. (L) Lysat, (FT) Durchfluss, (W1, W5) Waschfraktionen, (E1-E5) Elutionsfraktionen, (F2-F22) ausgewählte Fraktionen der Größenausschlusschromatographie. Die Gele sind Coomassie gefärbt, als Größenstandard kam PageRuler™ Unstained Low Range Protein Ladder zum Einsatz. Abbildung entnommen und modifiziert aus Zahn *et al.* (2020).

4.3.2.2 Aufreinigung mittels Größenausschlusschromatographie

Aufgrund der Anzahl an unspezifischen Proteinen in den Elutionsfraktionen der vorangegangenen Affinitätschromatographie, wurde mit der Größenausschlusschromatographie ein zweiter Aufreinigungsschritt angehängt. Bei dieser läuft die Probe über eine poröse Matrix und kleine Moleküle werden proportional länger retentiert als Große. Ein Chromatogramm einer Größenausschlusschromatographie ist beispielhaft in Abbildung 21 gezeigt. Hier wurde eine Elutionsfraktion nach der Nickel-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Neben den Kontaminanten im Bereich 7 ml bis 17 ml eluiert das später als HVO_2753n identifizierte Protein bei knapp 20 ml. Im Chromatogramm sind die gesammelten Fraktionen, die einem Peak zugeordnet wurden, entsprechend vermerkt. Diese wurden zusammen mit weiteren Fraktionen rund um den HVO_2753n-Peak mittels einer Tricin-SDS-PAGE aufgetrennt. Das zugehörige Coomassie-gefärbte Gel ist in Abbildung 20 auf der rechten Seite zu sehen. Hier ist zu erkennen, dass sich die Kontaminanten höherer Molekülmassen in den ersten Fraktionen befinden, während ab Fraktion F19 bis Fraktion 22 das überproduzierte Protein zu finden ist.

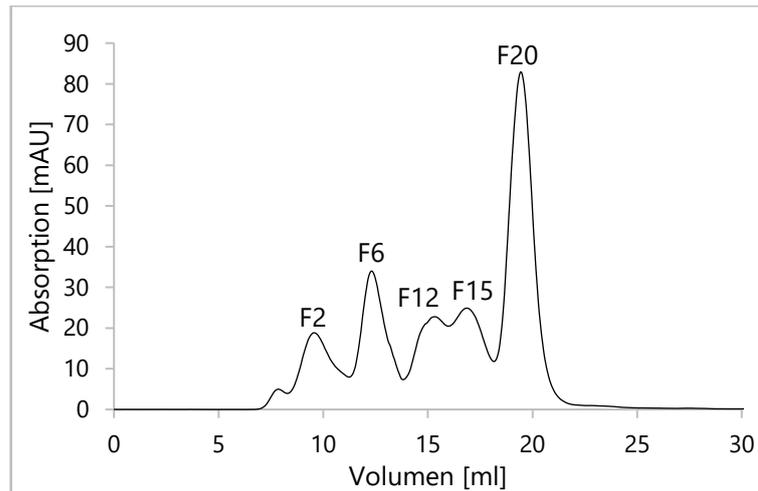


Abbildung 21: Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie von HVO_2753n. Eingesetzt wurde hier Elutionsfraktion 2 aus der Affinitätsaufreinigung (siehe Abbildung 20). Die angedeuteten Fraktionen (F2-F20) entsprechen den jeweiligen Peaks und den jeweiligen Spuren in Abbildung 20. Als Säule kam hier die Superose™ 6 10/300 GL zum Einsatz.

4.3.3 Massenspektrometrische Analyse von HVO_2753

Um zunächst die monoisotopische Masse des überproduzierten Proteins mit His-Tag und mögliche posttranslationale Modifikationen zu identifizieren, wurde HVO_2753n nach der Zwei-Schritt-Aufreinigung mittels Nickel-Affinitäts- und Größenausschlusschromatographie massenspektrometrisch analysiert. Diese *Top-down* und *bottom-up* MS-Analyse wurde innerhalb des Z1-Projekts des Schwerpunktprogramms 2002 von Liam Cassidy (Arbeitsgruppe Tholey) der Universität zu Kiel durchgeführt. Dabei konnte eine monoisotopische Masse von 7250.02 Da festgestellt werden, welche in starker Übereinkunft mit der theoretischen Masse von 7250.10 Da (Δmass : -0.083 Da) steht. Abbildung A1 im Anhang zeigt beispielhaft eine Messung intakten Proteins. Darüber hinaus gaben diese Experimente keinen Hinweis auf Proteoformen, die für posttranslationale Modifikationen sprechen, obwohl HVO_2753 eine hohe Anzahl an Aminosäuren trägt, die potenziell modifiziert werden können.

4.3.4 Quantitative Analyse von gebundenem Zink

HVO_2753 ist das einzige der 43 Zinkfinger-Proteine kleiner 70 Aminosäuren von *H. volcanii*, das zwei Zinkfinger-Motive beinhaltet. Die Annahme, dass es daher zwei Zink-Ionen bindet, sollte zunächst bestätigt werden. Zu diesem Zwecke

wurde eine quantitative Analyse mittels fluorimetrischem Zink-Assay durchgeführt. Bei diesem Assay wird das hochsensitive, für Zink hochspezifische, Fluorophor ZnAF-2F verwendet, um die Menge an gelösten Zink-Ionen relativ zu einer Standardreihe messen zu können (Hirano *et al.*, 2002). Hierfür wurde HVO_2753n verwendet, welches homolog überproduziert und unter nativen Bedingungen im zweistufigen Aufreinigungsprozess hochrein erhalten wurde. In Vorversuchen wurde bereits herausgefunden, dass HVO_2753n, nicht wie erwartet, bei niedrigen Salzkonzentrationen wie 25 mM NaCl nicht völlig unlöslich vorliegt und ausfällt. Daher musste, um das Protein zu denaturieren bzw. zu zerstören, eine Protease-Behandlung mit Proteinase K herangezogen werden. Dies war nötig, da die Zink-Ionen für die Quantifizierung gelöst vorliegen müssen. Anschließend konnte mittels 3 μM ZnAF-2F im Überschuss die Menge an Zink-Ionen aus 1 μM HVO_2753 im Vergleich zu einer Standardreihe von ZnCl_2 gemessen werden. Abbildung 22 zeigt das Ergebnis von sieben unabhängigen biologischen Replikaten. Während ohne Proteasebehandlung bei den für den Assay benötigten Niedrigsalz-Bedingungen mit 0,2 äquimolar Zn^{2+} zu HVO_2753 nur ein geringer Teil an Zink-Ionen gelöst vorliegt, kann bei vollständigem Proteaseverdau eine etwa 0,7 äquimolare Menge an Zink-Ionen zu Protein gemessen werden. Dies spricht für ein Vorhandensein von lediglich einem Zink-Ion pro HVO_2753-Molekül.

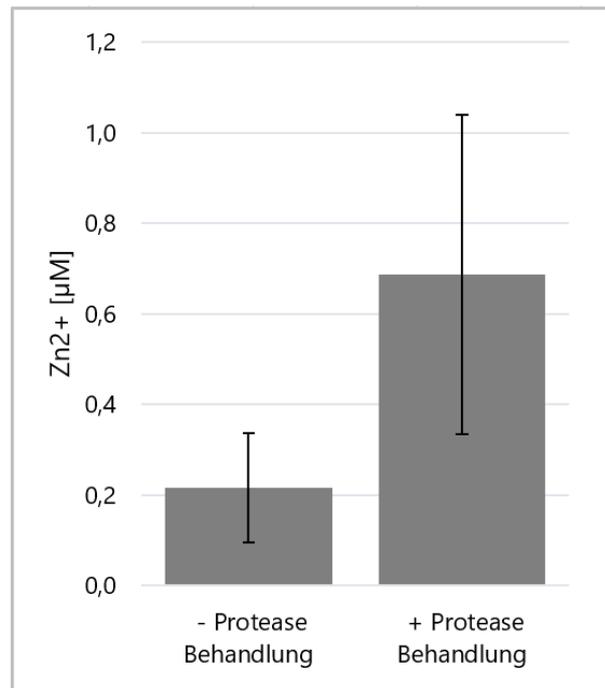


Abbildung 22: Quantifizierung von Zink-Ionen mittels fluorimetrischem Zink-Assay. HVO_2753n wurde homolog überproduziert, mittels Zwei-Schritt Aufreinigung gereinigt und gegen Zink-Assay Puffer dialysiert. Es wurde jeweils 1 µM Protein mit (+) oder ohne vorheriger (-) Protease-Behandlung für die hochsensitive und hochspezifische Quantifizierung mittels ZnAF-2F eingesetzt. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von sieben unabhängigen biologischen Replikaten. Abbildung entnommen und modifiziert aus Zahn *et al.* (2020).

4.3.5 Bindepartnersuche mittels Co-Affinitätsaufreinigung

Eine Möglichkeit der Funktionsaufklärung von Proteinen liegt darin deren Bindepartner zu identifizieren. Wenn die Funktion der Bindepartner oder Orthologen davon in verwandten Organismen bekannt ist, können möglicherweise auch für das Protein Funktionen abgeleitet werden.

4.3.5.1 Suche nach potenziellen RNA-Bindepartnern

Da manche Orthologe von HVO_2753 als putative *Zink-Ribbon* RNA-Bindeproteine annotiert sind, lag es nahe, zu überprüfen, ob man einen potenziellen RNA-Bindepartner von HVO_2753 identifizieren kann. Hierzu wurde eine Co-Affinitätsaufreinigung durchgeführt, indem HVO_2753n homolog überproduziert und nativ mittels Nickel-Affinitätschromatographie aufgereinigt wurde. Von ausgewählten Elutionsfraktionen, die das überproduzierte Protein in großer Menge enthalten, wurde RNA mittels Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Methode isoliert. Im

Nachgang erfolgte eine komplexe Prozessierung der hierbei erhaltenen RNA (siehe 3.4.4.5). Es wurde zunächst ein DNA-Adapter an das 3'-Ende der unbekannt-ten RNAs ligiert. Der Adapter besaß ein 5'-Phosphat und war am 3'-Ende mit einem Amino-Modifier-C3-CPG blockiert. Anschließend konnte von den unbekannt-ten Adapter-ligierten RNAs eine einzelsträngige cDNA synthetisiert werden. Nach Abbau der RNA im nun vorliegenden DNA:RNA-Hybrid konnte wiederum ans 3'-Ende der cDNA der DNA-Adapter ligiert werden. Jetzt konnten abschließend mittels PCR doppelsträngige cDNAs hergestellt werden, die unbekannte, potenzielle RNA-Bindepartner und an beiden Enden den DNA-Adapter umfassten. Über den DNA-Adapter wurde eine Erkennungssequenz für ein Restriktionsenzym eingebracht, mithilfe dessen die cDNAs in Plasmide kloniert werden konnten. Anschließend fand eine Transformation von *E. coli* statt und mittels Kolonie-PCR wurden Transformanten ausgewählt. Diese wurde in Mini-Kulturen angezogen, die Plasmide isoliert und sequenziert. Der gesamte Prozess wurde ebenso mit einer Überproduktion eines Kontroll-Proteins, der Dihydrofolat-Reduktase, durchgeführt. Hiermit sollten unter anderem unspezifisch gebundene RNAs identifiziert werden können.

Nach Etablierung und Optimierung dieser Methode konnte aus zeitlichen Gründen im Zuge dieser Arbeit der Versuch nur einmal komplett durchgeführt werden. Nach der Transformation von *E. coli* wurden sowohl 48 Klone mit Konstrukten basierend auf HVO_2753-Bindepartnern als auch 45 Klone der Kontrollgruppe mittels Kolonie-PCR getestet. Die PCR-Bedingungen waren hierbei so gewählt, dass mit den plasmidspezifischen Oligonukletid-Primern theoretisch Inserts bis zu einer Länge von 6000 bp amplifiziert werden können. Von 48 getesteten Klonen wiesen vier Klone die PCR-Fragmentgröße des Leerplasmids auf und 22 wiesen Doppel- oder Mehrfachbanden in der Kontrollgelelektrophorese der Kolonie-PCR auf. Die restlichen 22 Klone wurden für die weitere Identifizierung ausgewählt. Die Kontrollen zeigten nach der Kolonie-PCR viele Fragmente der Größe des Leerplasmids oder geringfügig Größere. Diese wurden in Vorversuchen bereits identifiziert und waren auf einzelne oder mehrfach aneinander ligierte, klonierte DNA-Adapter Inserts zurückzuführen (Daten nicht gezeigt). Darüber hinaus gab es auch in der Kontrolle 23 Transformanten, die Doppel- oder Mehrfachbanden im Kontrollgel aufwiesen. Von der Kontrolle wurden fünf Klone ausgewählt,

die in der Kolonie-PCR Einzelfragmente größer der Leerplasmid-Kontrolle aufwiesen. Die durch die Sequenzierung der Plasmide erhaltenen Sequenzen wurden mittels Nukleotid-BLAST (NCBI, Bethesda, USA) mit dem *H. volcanii*-Genom abgeglichen. Die Sequenzen wiesen Längen von 78 bis 397 bp (\emptyset 187 bp) auf. Die jeweils zugeordneten Elemente und Häufigkeiten sind in Tabelle 40 gezeigt. Es zeigte sich, dass sowohl mit HVO_2753 als auch mit der Kontrolle ribosomale RNA co-aufgereinigt wurde. Während 23S rRNA mit beiden Proteinen, war die 16S rRNA nur mit der DHFR und die 5S rRNA nur mit HVO_2753 co-isoliert worden. Die 7S Signal Recognition Particle RNA wurde einmal mit HVO_2753 gefunden. Neun Sequenzen der HVO_2753- und 2 Sequenzen der DHFR-Aufreinigung erzielten keine Treffer in der Nukleotid-BLAST Suche. Mit HVO_2753 konnte ein 155 bp-langes Element co-isoliert werden, das dem 3'-Bereich von HVO_0598 und HVO_0599 auf dem Gegenstrang zugeordnet werden konnte. Jedoch ist von keinem der Gene eine Funktion bekannt. Des Weiteren wurde die tRNA (Glu) viermal mit HVO_2753 co-isoliert. Alle vier Sequenzen wiesen hier eine Identität über eine Länge von 63 bp zueinander und noch mehr zur tRNA (Glu) auf. Mithilfe dieses Protokolls konnten mit verschiedenen ribosomalen RNAs und der tRNA (Glu) potenzielle RNA-Interaktionspartner von HVO_2753 identifiziert werden. Jedoch müssen diese in weiteren Versuchen als solche zunächst bestätigt werden.

Tabelle 40: Ergebnisse der RNA-Bindepartner-Suche von HVO_2753. Gezeigt sind die jeweils gefundenen Elemente und deren Häufigkeit bei Konstrukten basierend auf Bindepartnern von HVO_2753 und der Kontrolle DHFR.

Gefundenes Element	HVO_2753	DHFR
5S rRNA	4x	-
16S rRNA	-	1x
23S rRNA	3x	1x
7S Signal Recognition Particle RNA	1x	-
tRNA (Glu)	4x	-
ATP-abhängige Protease Lon	-	1x
unbekannte Sequenz	9x	2x
3'-Bereich von HVO_0598	1x	-

4.3.5.2 Suche nach potenziellen Protein-Bindepartnern

Von Zinkfinger-Proteinen ist bekannt, dass diese verschiedenste Bindepartner besitzen können (Krishna et al 2003). So gibt es neben Zinkfinger-Proteinen, die an RNA binden, auch welche die Proteine als Bindepartner besitzen. Die Möglichkeit, dass auch HVO_2753 mit anderen Proteinen interagieren kann, sollte näher untersucht werden. Hierfür wurde eine Crosslink-Methode zu Hilfe genommen, mit der man Proteine und andere Moleküle bereits *in vivo* miteinander vernetzen kann. Dieser Crosslink mittels Formaldehyd ist unspezifisch, setzt jedoch eine unmittelbare räumliche Nähe der beiden zu vernetzenden Moleküle voraus.

Für diesen Versuch wurden Zellen des Überexpressionsstamms OE_2753n aus der exponentiellen Wachstumsphase verwendet. Diese wurden sedimentiert und mit Basalsalz gewaschen und anschließend in Basalsalz resuspendiert. Hier fand nun der *in vivo* Crosslink statt, indem Formaldehyd in einer Endkonzentration von 0,75 % zugegeben und das Gemisch für 10 min bei RT rotierend inkubiert wurde. Die optimale Konzentration an Formaldehyd und die Dauer der Inkubation für den Crosslink wurde in Vorversuchen ermittelt und anhand der dadurch erhaltenen Daten festgelegt (Daten nicht gezeigt). Nach Abstoppen des Crosslinks, weiteren Waschschritten und der Zellyse mittels Sonifikation, fand unter nativen Bedingungen eine Nickel-Affinitätschromatographie statt. Mit ausgewählten Elutionsfraktionen wurde eine Größenausschlusschromatographie durchgeführt. Abbildung 23 zeigt die Chromatogramme von drei unabhängigen biologischen Replikaten einer solchen Co-Affinitätsaufreinigung und einer Kontrolle, die identisch behandelt, bei der jedoch kein Formaldehyd-Crosslink durchgeführt wurde. Es zeigte sich zunächst eine sehr gute Reproduzierbarkeit innerhalb der biologischen Replikate. Bei ca. 16 ml ist das Signal von HVO_2753n zu sehen, welches in der Kontrolle erwartet hoch ausfällt, in den Proben mit Crosslink jedoch stark vermindert vorliegt. Die Zuordnung des Signals zu HVO_2753n ist durch Tricin-SDS-PAGE und durch massenspektrometrische Analysen erfolgt (Daten nicht gezeigt). Des Weiteren ist im Bereich zwischen 12 und 13 ml durch *in vivo* Crosslinking ein weiterer Peak entstanden. Der Bereich 7 bis 11 ml ist in den Crosslink-Proben durch ein sehr starkes Signal gekennzeichnet. Dieser Bereich konnte in vorangegangenen Untersuchungen in Proben ohne Crosslinking bereits ribosomalen Untereinheiten zugeordnet werden (Daten nicht gezeigt).

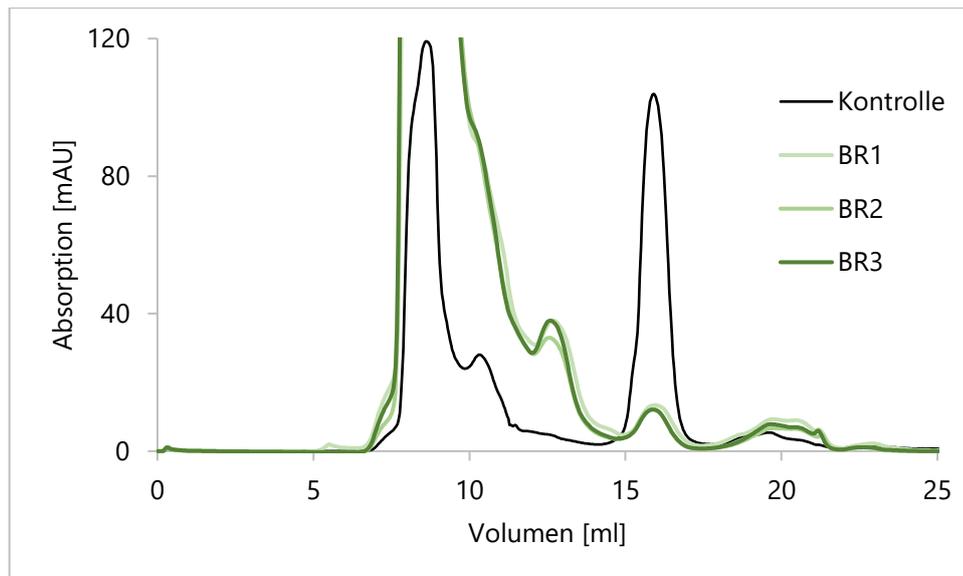


Abbildung 23: Chromatogramme der Größenausschlusschromatographie von HVO_2753n mit und ohne *in vivo* Crosslink. Eingesetzt wurden hier jeweils Elutionsfraktionen aus vorangegangenen Affinitätsaufreinigungen. Gezeigt sind die Chromatogramme dreier unabhängiger biologischer Replikate (BR1-3) nach *in vivo* Crosslink und einer Kontrolle ohne Crosslink. Als Säule kam hier die Superdex™ 75 Increase 10/300 GL zum Einsatz.

Dieser starke Unterschied zwischen der Menge von HVO_2753n-Monomeren in Proben mit Crosslink und Proben ohne Crosslink und das Entstehen eines weiteren Signals bei höheren Molekulargewichten nach dem Crosslink sollte anschließend mittels massenspektrometrischer Analyse weiter untersucht werden. Hierfür wurden Fraktionen nach der nativen Größenausschlusschromatographie ausgewählt, über Nacht bei 4 °C gegen 25 mM Tris (pH 7,2) dialysiert und ans Gerätezentrum für Massenspektrometrie und Elementanalytik (Arbeitskreis Prof. Uwe Linne) geschickt. Dort erfolgte eine Untersuchung mittels Orbitrap Velos Pro – nanoRSLC.

Ausgewählt wurden jeweils drei 1 ml-Fractionen jedes biologischen Replikats aus dem Bereich 10,5 ml bis 13,5 ml des Chromatogramms (siehe Abbildung 23). Als Kontrolle dienten zusammengeführte Fraktionen der Kontrolle aus dem Bereich nach 10 ml, sodass insgesamt zehn Proben für die Analyse vorlagen. Eine genauere Aufzeichnung der jeweiligen Fraktionen befindet sich im Anhang in Abbildung A2. Die Rohdaten der MS-Analyseergebnisse wurden für die Auswertung prozessiert. Hier erfolgte neben einer Auswahl relevanter Werte auch die Kuration der Daten. Die Annotation aus der HaloLex-Datenbank und die Funktionsklassen der

jeweiligen Proteine wurde hinzugefügt. Die Werte zueinandergehörender Fraktionen der verschiedenen biologischen Replikate (BR1-3) wurden zusammengeführt. Alle potenziell identifizierten Proteine, die nicht in mindestens zwei der drei Replikate gefunden wurden, wurden gelöscht. Das entscheidende Kriterium hierfür waren die PSM-Werte (Peptide Spectrum Matches). Alle potenziell identifizierten Proteine, die mit mindestens 10 % des PSM-Durchschnitts der drei biologischen Replikate auch in der Kontrolle gefunden wurden, wurden gelöscht. Der Bereich kleiner 10 % PSM im PSM-Durchschnitt der drei biologischen Replikate und größer als 0 PSM in der Kontrolle enthielt keine Ergebnisse, weshalb alle in den Ergebnistabellen enthaltenen, identifizierten Proteine genau 0-mal in der Kontrolle gefunden wurden. Nach Anwendung all dieser Kriterien lagen für jede der drei Proben (BR1-3) eine Ergebnistabelle vor (siehe Tabelle A1 bis A3 im Anhang). Hier waren alle Proteine die potenziell mit HVO_2753n nach einem *in vivo* Crosslink zusammen aufgereinigt werden konnten, aus einem ausgewählten Molekülmassenbereich des Größenausschlusschromatogramms, aufgelistet. In den Ergebnistabellen sind für Fraktion 1 (ca. 10,5-11,5 ml) 131 potenziell identifizierte Proteine, für Fraktion 2 (ca. 11,5-12,5 ml) sind 78 und für Fraktion 3 (ca. 12,5-13,5 ml) sind 134 potenziell identifizierte Proteine vorhanden. Aufgrund zugrundeliegender Standardreihen der Größenausschlusschromatographie mit Proteinen verschiedener, bekannter Größen, lässt sich den entsprechenden Fraktionen ein ungefähres, entsprechendes Molekulargewicht der enthaltenen Proteine/Proteinkomplexe zuordnen (Daten nicht gezeigt). Fraktion 1 entspräche einem Molekulargewicht von 42-30,5 kDa, Fraktion 2 dementsprechend 30,5-22 kDa und Fraktion 3 einem Molekulargewicht von 22-16 kDa. Wenn in den Fraktionen nun Proteine vorliegen, die mit HVO_2753n kovalent verbunden sind, reduziert sich das entsprechende Molekulargewicht der gefundenen Bindepartner um das von HVO_2753n, also um 7,2 kDa. Im Folgenden wird nun davon ausgegangen, dass HVO_2753n mit jeweils nur einem Bindepartner vernetzt wurde und dieser mit keinem Weiteren. Der Mittelwert der Molekulargewichte aller identifizierten Proteine in den drei Ergebnistabellen beträgt 27,8 kDa (F1), 19,3 kDa (F2) und 13,9 kDa. Addiert man nun jeweils die 7,2 kDa von HVO_2753n erhält man ca. 35 kDa, 26,5 kDa und 21,2 kDa für die drei Fraktionen. Diese Werte liegen innerhalb der erwarteten Bereiche. Jedoch ließ die große Anzahl an potenziellen Bin-

departnern keine eindeutige Zuordnung oder gar eine Identifizierung der Funktion von HVO_2753 zu. Potenzielle Bindepartner mit hohen durchschnittlichen PSM-Werten der drei biologischen Replikate stellen mit der höchsten Wahrscheinlichkeit einen wirklichen Bindepartner dar. Neben vielen uncharakterisierten Proteinen und Proteinen ohne bekannte Funktion befindet sich unter diesen Proteinen mit den höchsten PSM-Werten HVO_2040, eine GalE family Epimerase/Dehydratase. Eine tiefergehende Untersuchung und Validierung dieser potenziellen Bindepartner konnten in dieser Arbeit jedoch aus zeitlichen Gründen nicht stattfinden.

4.4 Transkriptomanalyse mittels RNA-Sequenzierung

Eine weitere Herangehensweise der Funktionsaufklärung besteht in der Suche nach Unterschieden zwischen Wildtyp und Deletionsmutante und zwischen Deletionsmutante und Komplementationsmutante auf transkriptionaler Ebene. Die Untersuchung des gesamten Transkriptoms erfolgte hier mittels RNA-Sequenzierung. Auch hier können theoretisch sowohl direkte als auch indirekte Regulationen von HVO_2753 identifiziert werden.

Für die RNA-Sequenzierung wurden zunächst Zellen der Stämme H26 evc, Δ HVO_2753 evc und Δ HVO_2753 +2753c in synthetischem Medium mit Glukose als Kohlenstoffquelle bis zur exponentiellen Wachstumsphase kultiviert. Anschließend wurde mittels Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Methode die Gesamt-RNA der Zellen isoliert. Nach einer Behandlung mit DNase I wurde eine weitere RNA-Isolierung durchgeführt, bei der DNase-freie Gesamt-RNA erhalten wurde. Abschließend wurde die RNA-Integrität und die Abwesenheit genomischer DNA überprüft (siehe 3.4.4.1). Diese Gesamt-RNA der drei Stämme, wiederum in jeweils zwei biologischen Replikaten, wurde an den Arbeitskreis Prof. Sharma der Universität Würzburg versandt, die weitere Prozessierungsschritte und die RNA-Sequenzierung im Rahmen des Z2-Projektes des Schwerpunktprogramms 2002 durchführte. Diese weitere Prozessierung umfasste vor allem eine Depletion der ribosomalen RNA, die störend für die nachfolgende Erstellung der cDNA *library* wäre. Im Anschluss erfolgte die Adapter-Ligation, eine Amplifikation mittels PCR und die Sequenzierung mittels NextSeq500 Sequenziergerät (Illumina, CA, USA). Die in der RNA-Sequenzierung erhaltenen Daten wurden anschließend innerhalb

des Z2-Projektes im Arbeitskreis Prof. Backofen bioinformatisch mittels der Galaxy Web Platform (<http://galaxyproject.org/>) prozessiert und ausgewertet. Die Prozessierung umfasste die üblichen Abläufe wie Primer-Entfernung, Qualitätscheck und *mappen* auf das Genom. Die RNA-Sequenzierung resultierte in mehr als 1 Million *unique reads* und 10 Millionen inklusive *duplicated reads*. 64-70 % der *reads* konnten einzigen Stellen zugeordnet werden, 18-25 % wurden auf mehrere Stellen *gemapped*, während 9-12 % der *reads* zu kurz für das *Mappen* waren. Neben fortlaufenden Sequenzierungs-Daten, die mittels Integrated Genome Browser visualisiert werden können, wurden Tabellen mit *Feature counts* erhalten. Dies sind quantitative Daten, die die Menge an Transkripten für jedes proteincodierende Gen, darstellen.

Mit diesen zuvor beschriebenen Daten wurde dann im Zuge dieser Arbeit weitergearbeitet. Zunächst wurde innerhalb jeder der 6 *feature counts*-Datensätze (drei Stämme in je zwei unabhängigen biologischen Replikaten) eine Normierung der Werte durchgeführt. Hierfür wurde der *feature count* eines jeden proteincodierenden Gens durch die Gesamtanzahl der *feature counts* innerhalb des Replikats geteilt und das Ergebnis mit einer Million multipliziert. Dies hatte eine höhere Vergleichbarkeit der jeweiligen beiden biologischen Replikate und der Stämme untereinander zur Folge, da allgemeine Trends in der Gesamttranskriptmenge so herausgerechnet wurden. Nun wurden die Mittelwerte der normierten *counts* der beiden biologischen Replikate berechnet und alle Gene herausgefiltert, bei denen in nicht mindestens einem der drei Stämme der Mittelwert der normierten *counts* über 30 lag. Hiermit wurden nur noch Gene, für die eine relevante Menge an Transkripten vorhanden war und gleichzeitig aber dennoch Gene, bei denen eine starke Regulation stattgefunden hatte, betrachtet. Abschließend wurden die Verhältnisse der *feature counts* berechnet, die widerspiegeln, ob ein Gen hoch- bzw. herunterreguliert in einem der Stämme vorlag. Verglichen wurden hier Wildtyp H26 *evc* mit der Deletionsmutante Δ HVO_2753 *evc* und die Deletionsmutante wiederum mit der Komplementationsmutante Δ HVO_2753 +2753c. Tabelle A4 und Tabelle A5 im Anhang zeigen die Gene mit Funktionsklassen und entsprechenden Proteinamen, *feature counts* in den drei Stämmen mit den Graden an Regulation. Gezeigt sind nur Gene, die eine Regulation von mehr als zweifach hoch oder zweifach herunter aufwiesen.

Für die Funktionsaufklärung wurden nun vorrangig die Gene betrachtet, die in Abwesenheit von HVO_2753 signifikant hoch- oder herunterreguliert vorlagen. Diese sind im Anhang in Tabelle A4 aufgelistet. Es konnten 57 Gene identifiziert werden, die in der Deletionsmutante signifikant herunterreguliert vorlagen (Regulation $\leq 0,5$), während 109 Gene signifikant hochreguliert waren (Regulation ≥ 2). 46 dieser regulierten Gene codieren für hypothetische oder konservierte hypothetische Proteine und spielen in der Funktionsaufklärung von HVO_2753 zum aktuellen Stand der Forschung keine Rolle. Jedoch konnten zwei stark regulierte Cluster identifiziert werden. Eines dieser Cluster umfasst 30 Gene, die für Proteine des Bewegungsapparates oder der Chemotaxis-Signaltransduktion codieren. Diese sind in der Deletionsmutante sehr stark herunterreguliert und in Tabelle 41 aufgelistet. Während die ersten 25 der aufgelisteten Gene einen gemeinsamen Locus auf dem Chromosom besitzen (HVO_1201 bis HVO_1225), sind die fünf weiteren Gene an anderer Stelle lokalisiert. Diese 30 Gene codieren für Proteine wie das Achaellin A1 und A2, Achaellum Cluster Proteine (ArlCE, ArlD etc.; früher FlaCE, FlaD etc.), Chemotaxis Response Regulatoren, Chemotaxis Cluster Proteine etc. Dieses Ergebnis stimmt sehr gut mit dem zuvor identifizierten Schwärmdefizit der Deletionsmutante überein (siehe 4.2.3.2). Die zuvor beschriebene unzureichende Komplementierbarkeit des Unterschieds im Phänotyp Schwärmen spiegelt sich auch in den Graden der Regulation in der Komplementationsmutante (gegenüber der Deletionsmutante), siehe letzte Spalte in Tabelle 41, wider. Über alle beschriebenen Gene hinweg kann durch plasmidische Expression von HVO_2753 keine wildtypische Expression wiederhergestellt werden.

Tabelle 41: Auswahl an Genen, die in Abwesenheit von HVO_2753 herunterreguliert vorliegen. Gezeigt ist eine Auswahl der Ergebnisse der RNA-Sequenzierung. Die Tabelle umfasst die Gene mit ihrer Funktionsklasse (FC, siehe Abkürzungsverzeichnis), dem Namen des Genprodukts (Protein Name) und den *feature counts* in den drei Stämmen Wildtyp H26 *evc*, Deletionsmutante Δ HVO_2753 *evc* und Komplementationsmutante Δ HVO_2753 +2753c. Die letzten beiden Spalten zeigen den Grad der Regulation des jeweiligen Gens in der Deletionsmutante (im Vergleich zum Wildtyp) und in der Komplementationsmutante (im Vergleich zur Deletionsmutante). Gezeigt sind nur Gene, die mindestens 2-fach herunterreguliert vorliegen und den biologischen Prozessen Chemotaxis bzw. Motilität zugeordnet werden können.

Gene ID	FC	Protein Name	H26 <i>evc</i>	Δ HVO_2753 <i>evc</i>	Δ HVO_2753 +2753c	Regulation in Deletionsmut.	Regulation in Komp.-Mut.
HVO_1201	SIG	sensor box histidine kinase	2801	392	336	0,14	0,86
HVO_1202	CHY	conserved hypothetical protein	249	54	56	0,22	1,03
HVO_1203	MIS	arl cluster protein ArlD	1829	469	403	0,26	0,86
HVO_1204	HY	hypothetical protein	1681	439	343	0,26	0,78
HVO_1205	SIG	taxis cluster protein CheD	254	10	7	0,04	0,69
HVO_1206	SIG	taxis cluster protein CheC	465	0	1	0,00	2,85
HVO_1207	SIG	response regulator CheY	414	0	0	0,00	-
HVO_1208	CHY	conserved hypothetical protein	433	0	0	0,00	-
HVO_1209	GEN	HTH domain protein	296	0	0	0,00	1,00
HVO_1210	MOT	archaellin A1	1929	0	0	0,00	0,43
HVO_1211	MOT	archaellin A2	6840	2	1	0,00	0,63
HVO_1212	MIS	KaiC-type circadian clock protein CirA	224	0	0	0,00	1,14
HVO_1213	MIS	arl cluster protein ArlCE	631	0	1	0,00	2,85
HVO_1214	MIS	arl cluster protein ArlF	195	0	0	0,00	-
HVO_1215	MIS	arl cluster protein ArlG	257	0	0	0,00	0,00
HVO_1216	MIS	arl cluster protein ArlH	288	2	1	0,01	0,55
HVO_1217	MOT	archaellar motor/biogenesis protein ArlI	645	0	0	0,00	0,51
HVO_1218	MOT	archaellar motor/biogenesis protein ArlJ	565	1	1	0,00	1,02
HVO_1219	SIG	taxis protein CheF2	469	1	0	0,00	0,62
HVO_1220	CHY	conserved hypothetical protein	108	0	0	0,00	-
HVO_1221	SIG	taxis protein CheF1	317	4	2	0,01	0,57
HVO_1222	SIG	protein-glutamate O-methyltransferase CheR	328	0	1	0,00	-
HVO_1223	SIG	taxis sensor histidine kinase CheA	411	111	98	0,27	0,88
HVO_1224	SIG	protein-glutamate methylesterase / protein-glutamine glutaminase CheB	133	27	24	0,20	0,89
HVO_1225	SIG	purine-binding taxis protein CheW	1271	180	143	0,14	0,79
HVO_1999	SIG	transducer protein Htr7	140	45	54	0,33	1,18
HVO_0555	SIG	transducer protein Htr15	287	38	31	0,13	0,81

HVO_3005	SIG	transducer protein Htr15	387	99	103	0,26	1,04
HVO_2220	SIG	transducer protein Htr38	61	29	33	0,48	1,12
HVO_1126	SIG	transducer protein HemAT	272	41	41	0,15	1,00

Das zweite interessante Cluster, dessen Gene in Abwesenheit von HVO_2753 signifikant hoch- bzw. herunterreguliert vorlagen, umfasst 25 Gene, die für Transportproteine codieren. Diese Auswahl an Genen ist in Tabelle 42 dargestellt. Während die Gene von zwei SNF *family* Transportproteinen herunterreguliert vorlagen, sind 23 Transportproteine in der Deletionsmutante signifikant hochreguliert. Diese Transportproteine umfassen zahlreiche putative Metallionen-Transporter. Daran anknüpfend konnten unter den stark hochregulierten Genen fünf Gene (HVO_B0042-46, siehe Tabelle A4 im Anhang) identifiziert werden, die für Enzyme der Eisen(III)-Siderophor-Biosynthese codieren. Der Großteil der hochregulierten Gene, die nicht für Transportproteine oder Enzyme der Siderophor-Biosynthese codieren, sind Gene hypothetischer Proteine, von denen man nicht ausschließen kann, dass sie ebenfalls in den Metallionentransport involviert sind.

Tabelle 42: Auswahl an Genen, die für Transportproteine codieren und in Abwesenheit von HVO_2753 reguliert vorliegen. Gezeigt ist eine Auswahl der Ergebnisse der RNA-Sequenzierung. Die Tabelle umfasst die Gene mit ihrer Funktionsklasse (FC, siehe Abkürzungsverzeichnis), dem Namen des Genprodukts (Protein Name) und den *feature counts* in den drei Stämmen Wildtyp H26 *evc*, Deletionsmutante Δ HVO_2753 *evc* und Komplementationsmutante Δ HVO_2753 +2753c. Die letzten beiden Spalten zeigen den Grad der Regulation des jeweiligen Gens in der Deletionsmutante (im Vergleich zum Wildtyp) und in der Komplementationsmutante (im Vergleich zur Deletionsmutante). Gezeigt sind nur Gene, die in der Deletionsmutante mindestens 2-fach herunter- oder hochreguliert vorliegen und für Transportproteine codieren. Gene, deren Regulation hier nicht komplementiert werden konnte, sind in grau dargestellt.

Gene ID	FC	Protein Name	H26 <i>evc</i>	Δ HVO_2753 <i>evc</i>	Δ HVO_2753 +2753c	Regulation in Deletionsmut.	Regulation in Komp.-Mut.
HVO_2469	TP	SNF family transport protein	610	227	413	0,37	1,82
HVO_2470	TP	SNF family transport protein	152	60	122	0,40	2,03
HVO_1991	TP	ABC-type transport system periplasmic substrate-binding protein	337	715	261	2,12	0,36
HVO_1707	TP	ABC-type transport system ATP-binding protein	52	112	66	2,14	0,59
HVO_2032	TP	ABC-type transport system ATP-binding protein (probable substrate sugar)	73	184	177	2,52	0,96

HVO_1706	TP	ABC-type transport system permease protein	105	264	122	2,52	0,46
HVO_2031	TP	ABC-type transport system periplasmic substrate-binding protein (probable substrate sugar)	82	235	234	2,87	0,99
HVO_1705	TP	ABC-type transport system periplasmic substrate-binding protein	94	307	82	3,27	0,27
HVO_1586	TP	SDF family transport protein (probable substrate glutamate/aspartate)	30	102	44	3,36	0,43
HVO_2033	TP	ABC-type transport system permease protein (probable substrate sugar)	18	71	71	3,86	1,00
HVO_1696	TP	LctP family transport protein	90	372	436	4,15	1,17
HVO_B0144	TP	ABC-type transport system periplasmic substrate-binding protein	90	394	92	4,40	0,23
HVO_1760	TP	ABC-type transport system ATP-binding protein	89	430	90	4,85	0,21
HVO_2034	TP	ABC-type transport system permease protein (probable substrate sugar)	21	110	124	5,22	1,13
HVO_1464	TP	ABC-type transport system periplasmic substrate-binding protein	20	117	22	5,90	0,19
HVO_2093	TP	probable NhaC-type sodium/proton antiporter	26	159	27	6,06	0,17
HVO_1759	TP	ABC-type transport system permease protein	29	183	32	6,20	0,17
HVO_A0558	TP	ABC-type transport system periplasmic substrate-binding protein	30	202	31	6,71	0,15
HVO_A0541	TP	ABC-type transport system periplasmic substrate-binding protein	122	852	150	6,97	0,18
HVO_B0150	TP	ABC-type transport system periplasmic substrate-binding protein	23	176	23	7,71	0,13
HVO_B0197	TP	ABC-type transport system permease protein	58	539	53	9,24	0,10
HVO_1230	TP	mechanosensitive channel protein MscS (nonfunctional)	83	838	74	10,05	0,09
HVO_B0198	TP	ABC-type transport system periplasmic substrate-binding protein	60	601	60	10,06	0,10
HVO_B0047	TP	ABC-type transport system periplasmic substrate-binding protein	28	438	40	15,84	0,09
HVO_2038	TP	ABC-type transport system periplasmic substrate-binding protein	14	390	51	28,04	0,13

Gene, die durch plasmidische Expression von HVO_2753 in der Komplementationsmutante, verglichen mit der Deletionsmutante signifikant hoch- oder herunterreguliert vorlagen, sind in Tabelle A5 im Anhang dargestellt. Hierbei zeigte sich, dass durch plasmidische Expression von HVO_2753 nur bei einem der beiden in der Deletionsmutante differenziell regulierten Cluster wildtypische Transkriptlevel wiederhergestellt werden konnten. Während bei den Genen der Chemotaxis und Motilität, keine Wiederherstellung des Transkriptlevels des Wildtyps zu sehen ist, trifft dies beim Großteil an Genen von Transportproteinen nicht zu. Hier sind von den 23 Genen von Transportproteinen, die in der Deletionsmutante signifikant hochreguliert waren, wiederum 18 signifikant herunterreguliert und annähernd

auf dem Niveau des Wildtyps. Auch die Transkriptlevel der Siderophor-Biosyntheseenzyme entsprachen wieder denen des Wildtyps. Die Gene von Transportproteinen, auf die dies nicht zutrifft, sind in Tabelle 42 in grau dargestellt. Auch bei den beiden Genen HVO_2469 und HVO_2470, die in der Deletionsmutante nicht hoch- sondern herunterreguliert vorlagen, waren in der Komplementationsmutante Transkriptlevel vorhanden, die wiederum näher an denen des Wildtyps lagen.

5 Diskussion

Seit mehreren Jahren steigt das Interesse an kleinen Proteinen. Denn es wurde erkannt, mit welcher Häufigkeit sie auftreten und welche wichtige Rolle sie zu spielen scheinen. Die Anzahl an Reviews innerhalb der letzten Jahre, die sich speziell mit kleinen Proteinen beschäftigen, zeigt auf, mit welchem Interesse dieser neuen Klasse an Molekülen nachgegangen wird (Storz *et al.*, 2014; Baumgartner *et al.*, 2016; Cabrera-Quio *et al.*, 2016; Duval & Cossart, 2017; Plaza *et al.*, 2017; Delcourt *et al.*, 2018). In Bakterien und Eukaryoten konnte bereits an vielen Beispielen gezeigt werden, welche biologische Funktionen kleine Proteine übernehmen können. In Archaeen hingegen sind weniger Beispiele bekannt. Jedoch wurde bereits im Jahre 2007 das „Low Molecular Weight Proteom“ des Haloarchaeons *H. salinarum* untersucht und publiziert (Klein *et al.*, 2007). Diese Ergebnisse zeigten das Ausmaß der bislang übersehenen kleinen Proteine, lenkten den Fokus aber auch auf dabei identifizierte kleine Zinkfinger-Proteine.

In allen drei Domänen des Lebens wurden bisher nur sehr wenige kleine Zinkfinger-Proteine untersucht. In Eukaryoten wurde beispielsweise bereits gezeigt, dass dort kleine Zinkfinger-Proteine RNA-assoziiert vorliegen und an der Zelldifferenzierung und Morphogenese beteiligt sind (Caro *et al.*, 2005), an Proteine des Photosystems binden und dort an der Instandhaltung beteiligt sind (Lu *et al.*, 2011) oder potenziell an DNA binden und in die Zellproliferation involviert zu sein scheinen (Fernandez-Pol *et al.*, 1993). Für ein bakterielles kleines putatives Zinkfinger-Protein konnte eine Zink-abhängige Induktion der Expression nachgewiesen werden (Noll *et al.*, 1998). Auch für das Gen *com* des Bakteriophagen Mu konnte gezeigt werden, dass es für ein kleines Zinkfinger-Protein codiert. Für dieses konnte nachgewiesen werden, dass es an seine bicistronische mRNA bindet und so die Translation des *downstream*-Gens aktiviert (Nowacka *et al.*, 2019). In Archaeen wurde mit Brz bis dato lediglich ein einziges Zinkfinger- μ -Protein intensiv untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Brz eine wichtige Rolle in der Regulation der Transkription des Bakterioopsin-Gens spielt (Tarasov *et al.*, 2008).

Die in *H. salinarum* identifizierten kleinen Zinkfinger-Proteine enthielten charakteristische Zinkfinger-motive bestehend aus C(P)XCG- und/oder C(P)XCG-ähnlichen Mustern. Die Entdeckung dieser Zinkfinger-Proteine in *H. salinarum* führte zur Suche und Annotation von Homologen in anderen Haloarchaea, wie auch

H. volcanii. Dort konnten 43 dieser kleinen Zinkfingerproteine einer maximalen Länge von 70 Aminosäuren annotiert werden, von denen bereits 16 einer Charakterisierung unterzogen wurden (Nagel *et al.*, 2019). Während dabei ein paralleles Screening der Deletionsmutanten der kleinen Zinkfinger-Proteine bei mehreren Bedingungen durchgeführt wurde, konnte in der vorliegenden Arbeit mit HVO_2753 ein weiteres kleines Zinkfinger-Protein einer tiefergehenden Untersuchung unterzogen werden.

5.1 Die Strukturelemente des Eindomänen-Zinkfinger-Proteins HVO_2753

Das Protein HVO_2753 besitzt mit einer Länge von lediglich 59 Aminosäuren vier C(P)XCG- bzw. C(P)XCG-ähnliche Muster und damit zwei putative Zinkfinger-Motive. Der ersten Annahme der Bindung von zwei Zink-Ionen pro Protein wurde mittels fluorimetrischem Zink-Assay nachgegangen. Dieser konnte zeigen, dass lediglich ca. 0,7 Äquivalente Zink pro Protein vorhanden sind. Innerhalb einer Zusammenarbeit wurde eine Vielzahl an Experimenten zur Strukturaufklärung von HVO_2753 mittels NMR-(*nuclear magnetic resonance*, Kernspinresonanz)-Spektroskopie durchgeführt (Zahn *et al.*, 2020). In diesem Zusammenhang wurde ebenfalls der Frage der Zinkbindung nachgegangen. Dabei wurde dem heterolog in *E. coli* überproduzierten HVO_2753 mittels EDTA-Behandlung zunächst gebundenes Zink entzogen, das Protein dabei denaturiert und anschließend in 0,25-äquimolaren Schritten wieder Zink zutitriert und die Rückfaltung bzw. Struktur mittels NMR analysiert. Bereits die Zugabe von 0,25 Äquivalenten an Zn^{2+} hat die Rückfaltung der Proteine induziert und die native Struktur der Proteine war bereits bei 0,75 Äquivalenten an Zink wiederhergestellt (Zahn *et al.*, 2020). Vergleicht man nun die Ergebnisse der NMR-Analyse des heterolog überproduzierten Proteins mit denen der fluorimetrischen Untersuchung des homolog überproduzierten Proteins, stellt man überzeugende Übereinstimmungen fest, die den Schluss zulassen, es sei trotz Vorhandenseins zweier Zinkfinger-Motive nur ein Zink gebunden und für die korrekte Faltung des Proteins nötig. Die Zugabe von weiterem Zink hat keine weitere Veränderung in der Faltung hervorgerufen (Zahn *et al.*, 2020). HVO_2753 enthält nun ein zweites putatives Zinkfinger-Motiv, das kein Zink bindet und dieses nicht für seine Faltung benötigt. In der Literatur ist bereits

ein Zinkfinger-Protein beschrieben, bei dem beispielsweise *in vitro* gezeigt werden konnte, dass dieses das Zink, das *in vivo* gebunden vorliegt, nicht benötigt, um seine Funktion auszuüben oder gar, um seine Struktur auszubilden. In dem beschriebenen Fall war die Funktion die spezifische Bindung an RNA bei dem humanen Onkogen Hdm2 (Lai *et al.*, 1998). Darüber hinaus sind Fälle beschrieben, bei denen die Faltung und Struktur des Proteins nicht mehr durch Komplexierung eines Zink-Ions, sondern durch intramolekulare polare und hydrophobe Wechselwirkungen von Aminosäureseitenketten gewährleistet wird (Malgieri *et al.*, 2015). Im Zuge der NMR-Analyse von HVO_2753, wie in Zahn *et al.* (2020) beschrieben, konnte die Struktur des haloarchaealen Proteins bestimmt werden. Bei der Untersuchung der Relevanz der C(P)XCG-Muster wurde durch Aminosäuresubstitution das jeweils erste Cystein eines jeden C(P)XCG-Musters durch Alanin ersetzt und mittels NMR-Analyse die Strukturen der mutierten Spezies von HVO_2753 mit der des nativen Proteins verglichen. Hier konnte gezeigt werden, dass jede einzelne Aminosäuresubstitution zu einem schweren Verlust in Struktur und Stabilität führte. Darüber hinaus wurden diese mutierten Spezies von HVO_2753 auch im homologen System für Komplementationsversuche in der Deletionsmutante Δ HVO_2753 verwendet, wie in 4.2.3.3 beschrieben. Dabei konnte gezeigt werden, dass keine der Mutanten die Funktion des nativen HVO_2753 aufweist. Hier konnte durch Kombination von *in vivo* Experimenten in *H. volcanii* und der NMR-spektroskopischen Strukturanalyse von heterolog überexprimiertem HVO_2753 die Notwendigkeit der vier C(P)XCG-Muster für Struktur und Funktion gezeigt werden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die homologe Überexpression der Aminosäure-substituierten Spezies von HVO_2753, zu lediglich sehr geringen Proteinleveln führten, was vermutlich auf eine falsche Faltung und einen damit verbundenen schnellen Abbau der Proteine zurückzuführen ist (Daten nicht gezeigt). Des Weiteren wurden für die Komplementationsversuche in *H. volcanii* zwei weitere Mutanten mit jeweils einer Aminosäuresubstitution erstellt und getestet. Die beiden Substitutionen Q34A und Y49F führten ebenfalls zu einem Funktionsverlust des Proteins und sind somit entweder für eine spezifische Funktion, die Ausbildung der Struktur oder für beides notwendig. Die Cysteine in HVO_2753 sind nicht nur essenziell für Funktion und Faltung, sondern liegen auch innerhalb der *Haloarchaea* und vieler methanogener *Archaea* hochkonserviert vor. Die hohe Konservierung der Cysteine spricht dagegen, dass hier

lediglich intramolekulare polare und/oder hydrophobe Wechselwirkungen anderer Aminosäureseitenketten als Ersatz für ein Zink-Ion dienen. Dies konnte beispielsweise zuvor für seltene Fälle von prokaryotischen Zinkfinger-Proteinen beschrieben werden (Baglivo *et al.*, 2014). Denn sollte dies der Fall sein, wäre zu erwarten, dass die Zink-koordinierenden Aminosäuren nicht mehr vollständig sind. Dies konnte für die Ros Homologe MI4 und MI5 gezeigt werden, welche kein Zink mehr binden. Dort sind die Zink-koordinierenden Aminosäuren teilweise ersetzt, während die dreidimensionale Struktur den Zink-bindenden Ros Homologen entspricht (Baglivo *et al.*, 2014). Konkret heißt das für MI4 und MI5, dass im Vergleich zum strukturell nahezu übereinstimmenden Ros87, ohne Verlust der spezifischen DNA-Bindeeigenschaft, die beiden Cysteine und eines der beiden Histidine in der Aminosäuresequenz durch andere Aminosäuren ersetzt sind, während die Sequenzen grundsätzlich eine hohe Identität aufweisen. Dennoch kann hier nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass der intramolekulare Zusammenhalt in HVO_2753 an Stelle des Zinkfinger-Motivs ohne Zink durch Wechselwirkungen anderer Aminosäureseitenketten übernommen wird und die nachweislich essenziellen Cysteine entweder darin involviert sind oder eine andere wichtige Rolle im Protein übernehmen. Die Aufklärung der Struktur, die in Abbildung 24 dargestellt ist, zeigte außerdem, dass die Zinkbindetaschen (ZBP, *zinc binding pockets*), überraschenderweise nicht von den C(P)XCG-Mustern 1 + 2 und 3 + 4 gebildet werden, sondern von den Mustern 1 + 3 (ZBP1) und 2 + 4 (ZBP2). Berechnungen konnten zeigen, dass ZBP2 die Zink-bindende Tasche im Protein darstellt (Zahn *et al.*, 2020). Die Cysteine der Muster 2 (CPDCG) und 4 (CPDCG) ZBP2 sind so angeordnet, dass sie ein Zink-Ion in symmetrisch tetrahedrischer Weise binden können. Die zunächst unerwartete verschachtelte Art der Bildung zweier potenzieller Zinkfinger (Muster 1 + 3 und 2 + 4) konnte jedoch bereits für die RING-finger Domäne, beispielsweise in Hdm2, dem humanen Onkogen, gezeigt werden (Lai *et al.*, 1998). Die RING-finger Domäne, hier die kleine C-terminale Domäne des sehr viel größeren Hdm2, unterscheidet sich jedoch strukturell von HVO_2753 und bindet nachweislich zwei Zink-Ionen gleichzeitig mit einem C₄- und einem C₂H₂-Muster (Kostic *et al.*, 2006).

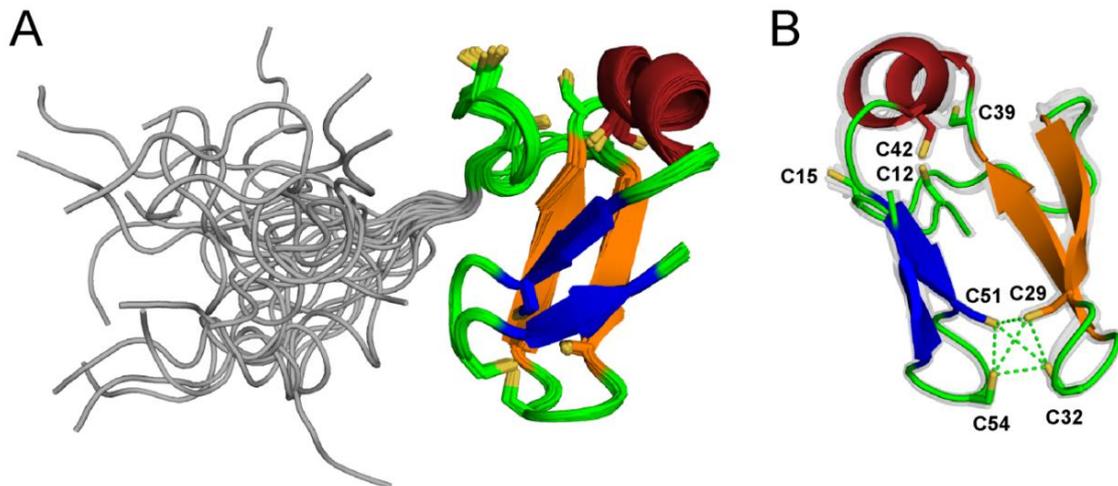


Abbildung 24: 3D-Struktur von HVO_2753. Gezeigt ist die mittels NMR-Spektroskopie aufgeklärte Struktur des Proteins. (A) *Ribbon*-Struktur der 20 besten volllängigen Strukturen. (B) *Ribbon*-Struktur des Proteinkerns der niedrigsten Energiestruktur des um 90° gedrehten Proteins. Der flexible N-Terminus ist in grau, β -Faltblätter in orange und blau, die α -Helix in rot und die Schwefelatome der Cysteine in gelb dargestellt. Die manuell definierte Zinkbinde-Tasche ist mit grünen, unterbrochenen Linien dargestellt. Abbildung entnommen und modifiziert aus Zahn *et al.* (2020).

Die Zinkbindetasche 1, bestehend aus Muster 1 (CVSCG) und Muster 3 (CSKCR), konnte in den NMR-spektroskopischen Untersuchungen als die Zink-freie Tasche identifiziert werden. Eine Erklärung für die dennoch vorhandenen und essenziellen Cysteine dieses Motivs besteht darin, dass diese eine andere unbekannte Funktion erfüllen. Darüber hinaus ist vorstellbar, dass dennoch ein Zink bindet, jedoch erst nach Bindung von HVO_2753 an seinen unbekanntes Bindepartner.

Der starre Kern von HVO_2753, der die beiden Zinkbindetaschen enthält, setzt sich aus zwei verdrehten antiparallelen β -Faltblättern und einer α -Helix zusammen. Die Zinkbindetasche 2, in der Zink gebunden vorliegt, wird von den *knuckles* der beiden β -*hairpins* gebildet. Diese Konstellation entspricht der des sogenannten *zinc ribbons*, welche die größte strukturelle Gruppe von Zinkfingern darstellen und in diversen Gruppen von Proteinen vertreten sind (Krishna *et al.*, 2003). Die putative Zinkbindetasche 1, bei der kein gebundenes Zink-Ion nachgewiesen werden konnte, kann keiner der von Krishna *et al.* beschriebenen Gruppen eindeutig zugeordnet werden. Hier stellt ein *loop* die ersten beiden Cysteine für die Bindung des Zinks bereit, während der N-Terminus einer α -Helix die anderen beiden Cysteine präsentiert. Die strukturelle Konstellation entspricht am ehesten der des

Zn₂/Cys₆ Zinkfingers, jedoch sind bei dem Motiv in HVO_2753 keine 6 Cysteine und nur höchstens ein Zink-Ion involviert.

Ein weiteres interessantes strukturelles Merkmal von HVO_2753 ist der N-Terminus. Dieser liegt in methanogenen Archaea verkürzt vor, während der Rest des Proteins darüber hinaus konserviert ist. Dieser stark hydrophile N-Terminus könnte ein Element darstellen, welches für die Löslichkeit des Proteins bei den intrazellulären Hochsalz-Bedingungen der Haloarchaea essenziell ist. Für das haloarchaeale Ferredoxin von *H. salinarum* konnte beispielsweise gezeigt werden, dass es im Vergleich zu pflanzlichen Homologen eine hydrophile extra Domäne enthält und diese für die Löslichkeit des Proteins bei seinen gegebenen Bedingungen essenziell ist (Marg *et al.*, 2005). Unterstützt wird diese Theorie dadurch, dass der N-Terminus durch die NMR-Analyse als nicht strukturiert vorliegend identifiziert wurde. Diesen flexiblen Bereich des Proteins zeigt Abbildung 24 A. Für ihn sind mehrere Funktionen denkbar. So scheint er im Falle des monomeren HVO_2753 flexibel und die Löslichkeit vermittelnd vorzuliegen. Er könnte aber im Falle einer Bindung an einen Bindepartner an eben jener Bindung beteiligt sein. Bei eukaryotischen Zinkfinger-Domänen konnte gezeigt werden, dass im Falle der Cys₂His₂-Zinkfinger in der Regel mehrere dieser Motive als Tandem in der Aminosäuresequenz vorliegen und nur dadurch eine spezifische Bindung vermitteln können (Malgieri *et al.*, 2015). Während prokaryotische Cys₂His₂-Zinkfinger häufig einzeln vorliegen und ihre Spezifität durch Kombination mit einem verlängerten C-Terminus erhalten, der für weitere Wechselwirkungen mit dem Bindepartner verantwortlich ist (Omichinski *et al.*, 1997). So könnte der N-Terminus von HVO_2753 in ähnlicher Weise durch Wechselwirkungen mit dem Bindepartner die Spezifität der Bindung erhöhen, da im gebundenen Zustand seine Löslichkeitsvermittelnde Rolle überflüssig sein kann. Eine spezifische Interaktion mit einem Bindepartner ist jedoch auch ohne Beteiligung des N-Terminus vorstellbar. Denn für andere prokaryotische Cys₂His₂-Zinkfinger oder eukaryotische Cys₃His/Cys₄-Zinkfinger, wie die der LIM Domäne, konnte gezeigt werden, dass sie ihre Spezifität durch Dimerisierung deutlich erhöhen können (Gill, 1995; Fumeaux *et al.*, 2014). Eine weitere Besonderheit bezüglich der Löslichkeit war die Stabilität und Löslichkeit bei niedrigen Salzkonzentrationen. Gelten halophile Proteine generell als sehr instabil bei niedrigen Salzkonzentrationen (Eisenberg *et al.*, 1992), war dies bei HVO_2753 nicht zu beobachten. Das heterolog überproduzierte Protein

lag sehr stabil vor, was die NMR-Analysen überhaupt in dem durchgeführten Ausmaß ermöglichte, da hier niedrige Natriumchloridkonzentrationen bevorzugt werden. Es wurden strukturelle Unterschiede des Proteins bei 200 μ M und 1 M NaCl gesucht, jedoch konnte kein Einfluss der Konzentration auf die Struktur gefunden werden. Auch das homolog überproduzierte Protein, welches nach nativer Aufreinigung bei hohen Salzbedingungen gegen niedrigere Salzkonzentrationen dialysiert wurde, wies hier eine hohe Stabilität auf. Die Analyse der Menge an gebundenem Zink mittels fluorimetrischem Zink-Assay konnte beispielsweise nur in Kombination mit einer Proteasebehandlung erfolgen, da die Entfernung des Natriumchlorids zu keiner Freigabe des Zinks führte, was bedeuten muss, dass das Protein nach wie vor gefaltet vorlag. Dass das Zink-Ion mit einer hohen Affinität gebunden vorliegt, zeigte auch die Quantifizierung mittels NMR-Spektrometrie. Bei dieser musste, um das Zink-Ion aus dem Protein zu entfernen und dieses zu entfalten, ein dreifacher Überschuss an EDTA und eine 3-stündige Inkubation bei 65 °C erfolgen (Zahn *et al.*, 2020). Die Affinität von Zinkfinger-Motiven zu Zink können jedoch innerhalb einer größeren Bandbreite variieren. In der Literatur sind sowohl höhere als auch niedrigere Dissoziationskonstanten von Zinkbinde-Motiv und Zink, verglichen mit EDTA, beschrieben (Kluska *et al.*, 2018). Dass Proteine von *H. volcanii* bei niedrigen Salzbedingungen stabil vorliegen, ist auch von wenigen weiteren Proteinen bekannt. Beispielsweise von der tRNase Z, deren optimale Reaktionsbedingungen darüber hinaus bei niedrigen Salzbedingungen *in vitro* liegen (Hölzle *et al.*, 2008). Ebenfalls stabil bei niedrigeren Salzbedingungen ist das μ -Protein HVO_2922 und wenige weitere μ -Proteine (Kubatova, Jonker, *et al.*, 2020; Kubatova, Pyper, *et al.*, 2020).

5.2 Interaktionen von HVO_2753 mit RNA und Proteinen

Eine zusätzliche Möglichkeit der Funktionsaufklärung besteht darin, Interaktionspartner von HVO_2753 zu identifizieren. Wenn die Funktion eines nachgewiesenen Interaktionspartners oder von einem Homolog in einem anderen Organismus bekannt ist, können so anschließend zielgerichtete Studien folgen. Erste Hinweise auf potenzielle Interaktionspartner ergab die bioinformatische Analyse von HVO_2753. Homologe innerhalb der Euryarchaeota sind teilweise als putative Zink-Ribbon RNA-Bindeproteine annotiert. Jedoch wurde keines davon bisher

charakterisiert und es sind keine Funktionen bekannt. Um diesen Hinweisen nachzugehen wurde in der vorliegenden Arbeit ein Protokoll entwickelt, mit dem potenziell an HVO_2753 gebundene RNA co-isoliert, aufgereinigt, in cDNA umgeschrieben, anschließend in einen Vektor kloniert und abschließend sequenziert werden konnte. Auf diese Weise konnten verschiedene gebundene RNAs gefunden werden. Es konnten ribosomale RNAs identifiziert werden, die jedoch teilweise auch in der Kontrolle, für die die Dihydrofolatreduktase (DHFR) überproduziert und identisch behandelt wurde, gefunden wurden. Es konnte hier nicht ausgeschlossen werden, dass eine unspezifische Bindung der rRNA an die Nickel-Sepharose-Matrix oder eine Interaktion mit den überproduzierten Proteinen im Zuge der eigenen Translation dafür verantwortlich ist. Die Identifikation einiger unbekannter Sequenzen und unspezifischer Interaktionen zeigt, dass die Methode weiteren Optimierungsschritten unterzogen werden muss. Dennoch konnte spezifisch mit HVO_2753 mehrfach die tRNA für Glutaminsäure co-isoliert und identifiziert werden. Es konnte nicht gezeigt werden, zu welchem Zweck diese Interaktion stattfindet. Möglicherweise besteht eine Korrelation zu tRNA-abgeleiteten Fragmenten, welche regulatorische Funktionen in der Zelle übernehmen. Die Anwesenheit und Funktion solcher Fragmente konnte bereits für *H. volcanii* gezeigt werden (Gebetsberger *et al.*, 2012, 2017). Wenn dies für *H. volcanii* auch bisher für keine Fragmente der Glutaminsäure-tRNA gezeigt werden konnte (Heyer *et al.*, 2012) und die in dieser Arbeit identifizierten Bereiche der tRNA mit jeweils über 63 nt nahezu die gesamte tRNA abdecken. Für ein tRNA(Glu)-abgeleitetes Fragment konnte in Säugetieren allerdings eine regulatorische Rolle nachgewiesen werden, jedoch wies dieses auch hier mit lediglich 32 nt nur einen Bruchteil der tRNA auf (Falconi *et al.*, 2019).

Darüber hinaus wurde auch nach potenziellen Protein-Bindepartnern gesucht. Denn bei einer Analyse des RNA-Metabolismus und der Suche nach Interaktionspartnern des Lsm-Proteins in *H. volcanii*, dessen bakterielle und eukaryotische Homologe Schlüsselrollen im RNA-Metabolismus übernehmen, konnten neben RNA-Bindepartnern auch Protein-Bindepartner identifiziert werden (Fischer *et al.*, 2010). Für die Protein-Bindepartnersuche wurde ebenfalls HVO_2753 homolog überproduziert. Bevor anschließend eine zweistufige Aufreinigung folgte, wurde ein *in vivo* Crosslink mittels Formaldehyd durchgeführt. Dieses erzeugt kovalente Bindungen unter anderem zwischen Proteinen in unmittelbarer Nähe zueinander.

Für diesen Zweck wird Formaldehyd seit langer Zeit intensiv eingesetzt (Sutherland *et al.*, 2008; Srinivasa *et al.*, 2015). Auf diese Weise waren potenzielle Interaktionspartner über den gesamten nativen Aufreinigungsprozess mit HVO_2753 verbunden und konnten anschließend durch eine massenspektroskopische Analyse identifiziert werden. Der *in vivo* Crosslink wurde bei HVO_2753 verwendet, da hier ohne Crosslink keine Bindepartner identifiziert werden konnten. Ein *in vivo* Crosslink war bei anderen kleinen haloarchaealen Zinkfinger-Proteinen (A. Essig und N. Kassner, persönliche Kommunikation, 06.12.2019) oder größeren Proteinen des archaealen Translationsapparates (F. Schramm, persönliche Kommunikation, 30.04.2019) nicht nötig, um Bindepartner co-isolieren zu können. Auf diese Weise wurden dann jedoch zahlreiche potenzielle Bindepartner von HVO_2753 identifiziert. Aufgrund der großen Anzahl an identifizierten Proteinen stellte es sich als schwierig heraus eine klare Funktion abzuleiten. Neben verschiedenen Regulatoren und Proteinen, die in diverse zelluläre metabolische Prozesse involviert sind, konnte jedoch eine große Anzahl an Proteinen des Translationsapparats identifiziert werden. So wurden 16 30S ribosomale und 21 50S ribosomale Proteine gefunden. Jedoch wiesen diese Proteine sehr unterschiedliche und auch teilweise sehr niedrige PSM-Werte auf, was eine eindeutige Identifikation als Interaktionspartner ohne weitere Untersuchungen nicht zulässt. Außerdem wurden die Translations-Initiationsfaktoren 1A, 5A, 2-beta und der Translations-Elongationsfaktor 1-beta (HVO_2752). Das Gen des Letzteren wird zusammen mit HVO_2753 co-transkribiert und aEF1-beta wurde in allen drei Fraktionen gefunden, die mittels MS-Analyse untersucht wurden. Zukünftig sollte die Interaktion von HVO_2753 mit aEF1-beta genauer untersucht werden, da hier eine der potenziellen Funktionen von HVO_2753 liegen könnte. Eine weitere Analyse dieses potenziellen Interaktionspartners konnte in der vorliegenden Arbeit aus zeitlichen Gründen nicht stattfinden.

Eine Erklärung für die große Menge an gefundenen Interaktionspartnern des Translationsapparates kann in der indirekten Interaktion liegen. Interagiert das spezifisch aufgereinigte HVO_2753 mit aEF1-beta und dieses wiederum mit weiteren ribosomalen Proteinen, kann das Formaldehyd-Crosslinking auch zur Vernetzung dieser Interaktionspartner führen. Diese indirekt gebundenen Proteine können ebenfalls in der massenspektrometrischen Analyse gefunden werden. Dabei ist zu berücksichtigen, dass in den untersuchten Fraktionen aufgrund ihres

Molekulargewichts keine großen Proteinkomplexe enthalten sein können, sondern nur maximal Teile davon. Des Weiteren wird bei der Überproduktion HVO_2753 in sehr großen Mengen synthetisiert, während potenzielle Bindepartner nicht überproduziert werden und möglicherweise nur in geringen Mengen in der Zelle vorliegen. Proteine des Translationsapparates hingegen liegen auch ohne artifizielle Überproduktion in großer Menge in der Zelle vor und können im Falle einer Interaktion mit HVO_2753 sehr leicht identifiziert werden. Besitzt HVO_2753 nun weitere Protein-Interaktionspartner und liegen diese nativ nur in geringer Menge in der Zelle vor, werden diese leicht übersehen bzw. sind schwer von potenziell unspezifisch gebundenen Proteinen zu unterscheiden. Darüber hinaus kann nicht völlig ausgeschlossen werden, dass manche der identifizierten Interaktionen mit ribosomalen Proteinen auf die eigene Translation von HVO_2753 während der Überproduktion zurückzuführen sind.

Mit den jeweils höchsten PSM-Werten in zwei der drei untersuchten Fraktionen wurde HVO_2040 identifiziert. HVO_2040 ist als GalE *family* Epimerase/Dehydratase annotiert. Sieben weitere Gene im Genom von *H. volcanii* sind als GalE *family* Epimerase/Dehydratase-Gene annotiert. In den meisten Organismen wird Galaktose über den Leloir-*Pathway* metabolisiert. Dabei katalysiert den vierten und letzten Schritt die UDP-Galaktose-4-Epimerase (GalE), bei dem UDP-Galaktose zu UDP-Glukose umgelagert wird (Holden *et al.*, 2003). Für den Galaktose-Abbau ist mit dem DeLey-Doudoroff-*Pathway* jedoch noch ein zweiter Stoffwechselweg bekannt, der GalE nicht involviert (De Ley & Doudoroff, 1957). In *Halobacterium sp.* NRC-1 konnten die Enzyme beider Wege identifiziert werden (Hochstein *et al.*, 1976; Reshma *et al.*, 2015). Welcher Stoffwechselweg in *Halobacterium sp.* für den Abbau von Galaktose verantwortlich ist, wurde jedoch bisher nicht gezeigt. Für *H. volcanii* hingegen konnte kürzlich gezeigt werden, dass Galaktose über den DeLey-Doudoroff-*Pathway* abgebaut wird, welcher GalE nicht benötigt (Tästensen *et al.*, 2020). Die von GalE katalysierte Umlagerung von UDP-Galaktose zu UDP-Glukose und umgekehrt ist jedoch, wie für *E. coli* gezeigt werden konnte, dort auch im Biosyntheseweg von extrazellulären Polysacchariden relevant (Hua & Markovitz, 1972). Ähnlich könnte GalE auch bei *H. volcanii* in die Synthese extrazellulärer Moleküle involviert sein. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass das Oberflächenglykoprotein von *H. volcanii* neben Glukose- auch Galaktose-Reste enthält (Sumper *et al.*, 1990).

Eine Interaktion mit seinem Bindepartner ist mit mehreren Bereichen von HVO_2753 möglich, denn das Protein liegt hochfunktionalisiert vor. Es besitzt im Vergleich zum *H. volcanii* Proteom neben einer überdurchschnittlichen Anzahl an Cysteinen auch überdurchschnittlich viele Serine, Glutamine und Lysine, während Aminosäuren mit aliphatischen Seitenketten unterdurchschnittlich häufig vertreten sind. Sobald ein Interaktionspartner von HVO_2753 identifiziert ist, kann mittels NMR-Spektroskopie der Komplex beider Partner untersucht werden. Auf diese Weise können die Aminosäureseitenketten, die für die Interaktion mit dem Bindepartner verantwortlich sind, identifiziert werden. Für den Fall der Protein-Protein-Interaktion einer Zinkfinger-Domäne eines größeren Proteins konnte dies bereits detailreich gezeigt werden (Kostic *et al.*, 2006). Innerhalb der vielen Aminosäureseitenketten, die potenziell an einer Interaktion beteiligt sein können, fällt bei näherer Betrachtung der Struktur und Aminosäuresequenz von HVO_2753 auf, dass im Bereich der Helix, gebildet von den Aminosäuren C42 bis S46, drei Aminosäureseitenketten nach außen gerichtet sind (siehe Abbildung 24). Diese Aminosäuren Lysin (K41), Arginin (R43) und Lysin (K44), die sich teilweise im C(P)XCG-ähnlichen Muster 3 befinden, können potenziell für eine Interaktion verantwortlich sein. Wenn auch für diese Aminosäuren bereits gezeigt werden konnte, dass sie in C₂H₂-Zinkfingern für eine spezifische Bindung an DNA verantwortlich sind (Wolfe *et al.*, 2000), so lässt sich hier nicht ausschließen, dass sie für die Bindung an andere Moleküle zuständig sind. ZBP1 besteht aus Muster 1 und 3, von denen keines ein Prolin an zweiter Stelle besitzt. Darüber hinaus besitzt Muster 3 auch das hochkonservierte Glycin an fünfter Stelle nicht. Hier weist es hingegen das bereits beschriebene, mit seiner Seitenkette nach außen ragende, Arginin R43 auf. Künftige Untersuchungen werden Klarheit darüber schaffen, mit welchen Bindepartnern HVO_2753 interagiert und welche Aminosäuren für die spezifische Bindung verantwortlich sind.

Darüber hinaus könnte man Lokalisationsstudien mittels fluoreszierenden Fusions-Tags durchführen. Das grün-fluoreszierende Protein (GFP) wurde bereits für den halophilen Organismus optimiert und es existiert eine Split-GFP Methode, mit der *in vivo* Interaktionsstudien durchgeführt werden können (Winter *et al.*, 2018; Born & Pfeifer, 2019). Hier wird an beide Bindepartner jeweils ein Teil des GFPs fusioniert. Dieses erhält seine fluoreszierende Eigenschaft erst durch die

räumliche Nähe, welche durch Bindung der beiden Bindepartner aneinander hervorgerufen wird. Lediglich die geringe Größe von HVO_2753 könnte ein Hindernis darstellen, da durch Fusion mit einem deutlich größeren GFP Probleme in seiner Funktion hervorgerufen werden können.

5.3 Das Zinkfinger- μ -Protein HVO_2753 als Regulator für Schwärmen, Adhäsion und mehr

Vor einigen Jahren konnte bereits der *workflow* der Erstellung und Charakterisierung von Deletionsmutanten von Interesse so optimiert werden, dass eine hohe Parallelisierung der einzelnen Abschnitte möglich ist und diverse Schritte von PCRs zur Generierung benötigter Fragmente über PCRs zur Klonierung und zur Kontrolle über Wachstumsversuche der phänotypischen Charakterisierung in Mikrotiterplatten durchgeführt werden können (Jaschinski *et al.*, 2014). Dem Vorbild dieser Optimierungen nach wurden auch Untersuchungen zu Zinkfinger- μ -Proteinen durchgeführt und es konnten viele Einsichten zu ihren putativen Funktionen bzw. zu Stoffwechselwegen oder regulatorischen Netzwerken, in denen sie eine Rolle spielen können, gewonnen werden (Nagel *et al.*, 2019). In der vorliegenden Arbeit lag der Fokus auf dem einen Zinkfinger- μ -Protein, welches in viel größerer Detailstufe untersucht wurde. Dennoch bestanden die initialen Ansätze der Untersuchung zur Funktion darin, zunächst eine Deletionsmutante herzustellen und phänotypische Charakterisierungen durchzuführen. Die *in frame* Deletion des Gens HVO_2753 führte zu keiner Einschränkung im Wachstum der Mutante in Komplexmedium oder synthetischem Medium mit Glukose als Kohlenstoffquelle. Da HVO_2753 mit nur 2 Nukleotiden Abstand *upstream* von HVO_2752, der *beta*-Untereinheit des Translations-Elongationsfaktors 1, liegt und mit diesem co-transkribiert wird, war dies zunächst unerwartet und lässt eine tragende Rolle innerhalb des Translationsapparats oder in seiner Regulation ausschließen. Darüber hinaus konnte zwischen der Deletionsmutante und der Überproduktionsmutante im Ribosomenprofil kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Unter den getesteten normalen Wachstumsbedingungen konnte somit kein signifikanter Unterschied zwischen Deletionsmutante, Wildtyp und Überexpressionsmutante festgestellt werden. Die Co-Transkription der beiden Gene konnte bereits in vorangegangenen Studien, bei denen dRNA- bzw. RNA-Sequenzierungen von *H. volcanii* durchgeführt wurden, gezeigt werden (Babski *et al.*, 2016; Laass *et*

al., 2019). Diese Ergebnisse konnten hier mittels Northern Blot-Analyse bestätigt werden. Dabei wurden die Transkripte von *HVO_2752* und *HVO_2753* mittels einzelsträngiger DNA-Sonden in verschiedenen Stämmen untersucht. Mit den beiden Sonden gegen jeweils eines der Gene konnten die gleichen Transkripte detektiert werden. Lag *HVO_2753* deletiert vor, konnte ein verkürztes Transkript mit der Sonde gegen *HVO_2752* detektiert werden. Unterschiede im Transkriptlevel von *HVO_2752* zwischen Wildtyp und Deletionsmutante fielen hingegen gering aus. Unterschiede im Proteinlevel von *HVO_2752* und *HVO_2753* hingegen konnten in einer quantitativen Proteomanalyse von *H. volcanii* gezeigt werden, bei der ein Wildtyp unter verschiedenen Stressbedingungen getestet wurde (Jevtić *et al.*, 2019). Dabei wurde festgestellt, dass das Zinkfinger- μ -Protein *HVO_2753* unter getesteten Stressbedingungen wie Niedrig- und Hochsalz und niedrigen und hohen Temperaturen, eines der beiden Proteine ist, die in der Untersuchung am stärksten herunterreguliert vorlagen. Im Gegenzug dazu, lag *HVO_2752* bei niedrigen und hohen Temperaturen stark hochreguliert, bei Niedrigsalzbedingungen jedoch herunterreguliert vor. Unabhängig von der Co-Transkription ihrer Gene, werden *HVO_2752* und *HVO_2753* demnach, auf der Ebene der Translation oder der Proteinstabilität, differenziell reguliert.

Die weitere phänotypische Charakterisierung zeigte, dass die Deletionsmutante eine um über 60 % verringerte Bildung von Biofilm im Vergleich zum Wildtyp aufweist. Neben dem Biofilm-Assay, der die Befähigung zur sessilen Lebensweise der Zellen überprüft, wurden Schwärmversuche durchgeführt, mit welchen die Motilität und Chemotaxis der Zellen überprüft werden kann. Diese zeigten ein verlangsamtes Schwärmverhalten bei der Deletionsmutante auf. Die Regulation der Motilität und Chemotaxis, also einer planktonischen Lebensweise der Zellen ist grundsätzlich stark mit der Regulation einer sessilen Lebensweise verknüpft, da beide Lebensweisen gegensätzliche Ziele verfolgen. So kann man zunächst davon ausgehen, dass wenn eine negative Regulation auf die Motilität erfolgt, auch eine positive Regulation auf die Adhäsion bzw. Biofilmbildung ausgeübt wird. Dies konnte bereits für fünf Beispiele von Zinkfinger- μ -Proteinen gezeigt werden (Nagel *et al.*, 2019). Hier wurden bei der Untersuchung von 16 Deletionsmutanten von Genen von Zinkfinger- μ -Proteinen sechs Mutanten mit einem Schwärmdefizit gefunden, von denen fünf gleichzeitig eine erhöhte Biofilmbildung aufwiesen. Nur bei einer der sechs Mutanten war die Biofilmbildung nicht beeinflusst. Auch

im Bakterium *Vibrio parahaemolyticus* sind mit ScrABC Beispiele bekannt, die gleichzeitig gegensätzliche Regulationen auf die Motilität und die Adhäsion an Oberflächen ausüben (Boles & McCarter, 2002; Ferreira *et al.*, 2008). Außerdem ist in *E. coli* ein globaler Regulator CsrA sehr gut untersucht, der unter anderem auch die Motilität positiv reguliert, während er auf die Biofilmbildung eine negative Regulation ausübt (Romeo & Babitzke, 2018). Im Falle der Deletion von HVO_2753 ist nun jedoch eine negative Regulation beider Mechanismen geschehen. Die Regulation dieser beiden gegensätzlichen Lebensweisen, sessil oder planktonisch, findet bei *H. volcanii* nicht nur auf transkriptioneller Ebene gekoppelt statt, sondern ebenfalls auf einer sehr schnellen post-translationalen Ebene (Esquivel & Pohlschroder, 2014). Das Vorhandensein eines so komplexen Systems bringt eine Vielzahl an regulatorischen Einheiten mit sich und es gibt potenziell zahlreiche Stellen, an denen die Deletion eines beteiligten Proteins keine gegenteilige Wirkung in den beiden Lebensweisen hervorruft, sondern beide Mechanismen in gleicher Weise beeinflusst werden.

Zum Beispiel konnte für die Regulation des Wechsels zwischen planktonischer und sessiler Lebensweise in Bakterien zyklisches di-GMP (c-di-GMP) als Schlüssel-molekül identifiziert werden. Dieses bindet dort an eine Vielzahl an Effektor-komponenten und kontrolliert so diverse Ziele wie die Transkription, die Aktivitäten von Enzymen und größeren zellulären Strukturen (Hengge, 2009). Während in Bakterien solche *second messenger* bereits gut beschrieben und untersucht sind, ist in Archaeen nur sehr wenig darüber bekannt. Erst kürzlich wurde von der Anwesenheit von c-di-AMP in *H. volcanii* berichtet (Braun *et al.*, 2019), welches ebenfalls in Bakterien gut untersucht ist, aber keinen direkten Bezug zur Motilität oder der Adhäsion und Biofilmbildung besitzt. Möglicherweise existiert auch in Archaeen c-di-GMP als *second messenger* und erfüllt hier ähnliche Zwecke wie in Bakterien. HVO_2753 könnte hier in durch Bindung von c-di-GMP eine seiner regulatorischen Rollen erhalten und so vielleicht die Transkription des Archaeellums steuern. In Bakterien existieren sogenannte Umo(upregulator of the master operon flhDC)-Proteine, welche dort mit der Zellhülle assoziiert sind. Von diesen wird vermutet, dass sie an der Erkennung von Oberflächen beteiligt sind (Partridge & Harshey, 2013). Auch eine Beteiligung von HVO_2753 an der Regulation oder der Funktion von archaealen Proteinen, die Funktionen solcher Umo-Proteine übernehmen, ist vorstellbar. Sie regulieren mit FlhDC einen Hauptregulator, der die

fundamentale Entscheidung zur Produktion von Flagellen reguliert, wie für *Salmonella typhimurium* gezeigt werden konnte (Chevance & Hughes, 2008). In *E. coli* wiederum reguliert FlhDC zusätzlich die Zellteilung. Es wird vermutet, dass um FlhDC ein breiteres regulatorisches Netzwerk existiert, indem auch die Umo-Proteine ihre Rolle spielen. Dieses Netzwerk ist potenziell mit der Chemotaxis und weiteren Bereichen wie der Synthese von extrazellulären Polysacchariden und der Virulenz verknüpft (Fraser & Hughes, 1999).

In nachfolgenden Versuchen wurden verschiedene Varianten von *HVO_2753* plasmidisch exprimiert und dabei überprüft, ob auf diese Weise eine Komplementation der dokumentierten Phänotypen erreicht werden kann. Damit einhergehend wurden zur besseren Vergleichbarkeit Kontrollstämme erstellt, für die der Wildtyp und die Deletionsmutante mit dem Leervektor transformiert wurden. Während die alleinige Anwesenheit des Leervektors im Biofilm-Assay zu keinen Unterschieden führte, konnten in den Schwärmversuchen Unterschiede festgestellt werden. So wies der Wildtyp mit Leervektor (H26 evc) eine geringfügig erhöhte Schwärmgeschwindigkeit im Vergleich zum Wildtyp ohne Leervektor auf (Daten nicht gezeigt). In der Deletionsmutante führte die Anwesenheit des Leervektors zu einem Totalverlust der Schwärmfähigkeit, während ohne Leervektor das Schwärmen vermindert vorlag. Befand sich anstelle des Leervektors der Vektor mit einer Genvariante von *HVO_2753* in der Zelle, konnte der Verlust der Schwärmfähigkeit durch plasmidische Expression teilweise kompensiert werden. So konnte eine verzögerte Form des Schwärmens der Komplementationsmutanten in halbfestem Medium dokumentiert werden. Beim Biofilm-Assay konnte für keine der Genvarianten eine Komplementation festgestellt werden. Die Unterschiede in der Komplementierbarkeit mittels der verwendeten Methode kann der Stärke des verwendeten plasmidischen Promotors geschuldet sein. So wird *HVO_2753* auf diese Weise nicht in nativer Menge und nicht in der nativen chromosomalen Umgebung exprimiert. Die Transkriptmenge bzw. die daraus resultierende Menge des Genprodukts kann also beispielsweise für die regulatorische Funktion bezüglich des Schwärmens teilweise ausreichen, während für die Regulation der Adhäsion bzw. Biofilmbildung eine größere oder aber geringere Menge an *HVO_2753* benötigt wird. Da jedoch innerhalb der Schwärmversuche durch Variation der Induktionsstärke des Promotors mittels unterschiedlicher Konzent-

rationen des Induktors keine Veränderungen in der Komplementierbarkeit erreicht werden konnte, ist die wahrscheinlichere Erklärung für die Unterschiede in den beiden Regulationen die Existenz verschiedener Interaktionspartner von HVO_2753. Für die Komplementation des Schwärmdéfizits reichte bereits die basale Promotoraktivität ohne Induktion. Im Gegenzug dazu konnte auch bei hoher Induktionsstärke mittels 4 mM Tryptophan (Large *et al.*, 2007; Allers *et al.*, 2010) im Biofilm-Assay keine Komplementation des Biofilmdefizits erreicht werden (Daten nicht gezeigt).

Einen tieferen Einblick in die Hintergründe der Auswirkungen der Deletion von HVO_2753 auf transkriptionaler Ebene konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine RNA-Sequenzierung des Wildtyps, der Deletions- und Komplementationsmutante bieten. Dafür kamen Zellen der exponentiellen Wachstumsphase aus synthetischem Medium mit Glukose als Kohlenstoffquelle zum Einsatz. Nach dem *mappen* der bei der RNA-Sequenzierung erhaltenen *reads* auf das Genom von *H. volcanii* konnten, unter Zuhilfenahme der Annotationen, die *counts* aller Protein-codierenden Gene ermittelt werden. Die *counts* stellen ein Maß für die Menge an Transkripten für jedes Gen dar. Die Mittelwerte der *counts* der biologischen Duplikate wurden berechnet und die Ergebnisse der verschiedenen Stämme wurden nach einer Normierung miteinander verglichen. Dabei war besonders auffällig und in Übereinstimmung mit den bereits identifizierten Funktionsverlusten, dass eine Vielzahl an Genen mit Genprodukten, die in Chemotaxis oder Motilität involviert sind, herunterreguliert vorlagen. Hierbei war ein Locus besonders betroffen, bei dem sich auf dem *forward* und *reverse* Strang mehrere Operons befinden. Diese enthalten die Gene codierend für Archaellin A1 und A2, die Archaellin-Cluster-Proteine ArlD, ArlCE, ArlF, ArlG und ArlH, die Archaellum-Motorproteine ArlI und ArlJ, darüber hinaus mehrere Taxis-Cluster-Proteine wie CheC, CheD, CheF1 und CheF2, Sensor-Histidinkinase CheA und weitere Chemotaxis-assoziierte Proteine sowie auch hypothetische und konservierte hypothetische Proteine. Von diesen waren teilweise keine Transkripte in der Deletionsmutante vorhanden oder signifikant weniger als im Wildtyp. Die hier gezeigte umfangreiche Regulation solcher Chemotaxis- und Motilitätsgene spricht erneut für eine Beteiligung von HVO_2753 an einem hauptregulatorischen Prozess, wie von FlhDC in Bakterien. Wie zuvor beschrieben, reguliert dieser die fundamentale Entscheidung zur Produktion von Flagellen. Darüber hinaus konnten fünf weitere

signifikant herunterregulierte Gene außerhalb dieses Lokus identifiziert werden, die für den Häm-basierten Aerotaxis-Transducer HemAT und die Transducer-Proteine Htr7, Htr38 und zwei Paraloge von Htr15 codieren. Halobakterielle Transducer-Proteine (Htps) wurden in *H. salinarum* genauer untersucht und stellen Homologe zu bakteriellen Methyl-akzeptierenden Chemotaxis-Proteinen (MCPs) dar (Rudolph *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1996). Einige von ihnen konnten Signaltransduktionsketten zugeordnet werden (Kokoeva & Oesterhelt, 2000; Koch & Oesterhelt, 2005). Dabei wurden einige Transducer-Proteine untersucht und identifiziert, die in die Phototaxis involviert sind und dementsprechend benannt wurden (Kokoeva *et al.*, 2002). In *H. salinarum* dienen Sensor-Rhodopsin I und II als Photorezeptoren und die involvierten Transducer-Proteine, die für die Weiterleitung des Signals verantwortlich sind wurden halobakterielle Transducer für Sensor-Rhodopsin (Htrs) genannt (Kokoeva & Oesterhelt, 2000). Homologe dieser in *H. salinarum* identifizierten Htrs wurden auch im Genom von *H. volcanii* annotiert. Da *H. volcanii* keine Retinalproteine enthält ist von seinen Htrs jedoch keine genaue Funktion bekannt. Eine Beteiligung an der Taxis ist dennoch naheliegend.

Neben einer Vielzahl an weiteren Genen, die differenziell reguliert vorlagen und denen keine gemeinsame übergeordnete Rolle zugeschrieben werden kann, lag noch ein zweites entgegengesetzt reguliertes Cluster vor. Dieses umfasste die Gene verschiedener Transportproteine und einer Vielzahl an Untereinheiten von ABC-Transportern. Darüber hinaus die Gene von zwei SNF-Transportproteinen und von fünf Enzymen der Eisen(III)-Siderophor-Biosynthese. Abgesehen von den beiden SNF-Transportproteinen, wessen Gene herunterreguliert vorlagen, lagen die anderen Gene mit der 2-fachen bis hin zur über 28-fachen Transkriptmenge signifikant hochreguliert vor. ABC-Transporter stellen eine wichtige Klasse von Transportproteinen dar und kommen in allen Domänen des Lebens vor. Sie besitzen eine ATP-bindende Kasete (ABC, *ATP binding cassette*) und stellen somit eine Klasse aktiver Transporter dar. Dabei sind sie in vielen verschiedenen Prozessen, wie dem Substratimport oder -export, dem Osmosensing oder der Osmoregulation beteiligt (Holland & A. Blight, 1999). Viele Transporter sind in *H. volcanii* noch nicht charakterisiert. Bisherige Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass in *H. volcanii* ein ABC-Transporter spezifisch für Glukose unter anaeroben Bedingungen existiert (Wanner & Soppa, 1999), während eine generelle Glukose-Auf-

nahme vermutlich mittels Symporter stattfindet und über ein Na^+ -elektrochemisches Potenzial angetrieben wird (Tawara & Kamo, 1991). Auch die Aufnahme von D-Xylose und L-Arabinose involviert einen ABC-Transporter (Johnsen *et al.*, 2019). Außerdem sind Phosphat-spezifische ABC-Transporter (Kliemt *et al.*, 2019) und ATP-getriebene Efflux-Transporter beschrieben (Kaidoh *et al.*, 1996; Miyauchi *et al.*, 1997). Bakterielle und archaeale ABC-Aufnahmesysteme besitzen interessanterweise mit dem extrazellulären Substratbindeprotein eine fünfte Komponente, welche das jeweilige Substrat bindet und der Permeasedomäne übergibt (Albers *et al.*, 2004). Die Gene von elf solchen putativen Substratbindeproteinen befinden sich interessanterweise unter denjenigen, die in Abwesenheit von *HVO_2753* stark hochreguliert wurden. Außerdem konnten dabei Gene identifiziert werden, die für Proteine codieren, von denen Homologe mit annotierter Funktion existieren oder die Domänen enthalten, welche in anderen Organismen einer Funktion zugeordnet werden konnten. Zum Beispiel ein Ferrichrom-Bindeprotein (*HVO_1464*), das im Transport von Metallionen beteiligt ist. Des Weiteren lag *HVO_1705* zusammen mit dem zugehörigen putativen Permease-Protein (*HVO_1706*) und dem putativen ATP-Bindeprotein (*HVO_1707*) hochreguliert vor. *HVO_1705* weist Homologien zum Gen des Eisen(III)-Substrat-Bindeproteins PBP2_Fbp auf. Mit *HVO_1759*, *HVO_1760*, *HVO_1991*, *HVO_2038*, *HVO_A0541*, *HVO_A0558*, *HVO_B0047*, *HVO_B0144*, *HVO_B0150*, *HVO_B0197* und *HVO_B0198* sind elf weitere Gene hochreguliert, von denen homologe Gene in anderen Organismen für Eisenionen-Transporter oder Metallionen-Transporter codieren. Der Eisentransport ist in Bakterien, z.B. in *E. coli* (Braun & Braun, 2002) und in Eukaryoten, von Phytoplankton (Sutak *et al.*, 2020) bis hin zum Menschen (Carver, 2017), sehr gut untersucht. In Archaea hingegen ist weniger über den Eisentransport bekannt, jedoch wurden in *H. salinarum* bereits Untersuchungen durchgeführt. Hier konnten Hinweise auf einen energieabhängigen Eisenaufnahmeprozess gefunden werden (Hubmacher *et al.*, 2007). Eisen stellt dabei ein essenzielles Spurenelement für alle Lebewesen dar und wird in Form von Eisen(III) in einer Vielzahl von essenziellen Enzymen benötigt. Aufgrund der sehr geringen Löslichkeit von Eisen(III) steht freies Eisen(III) nur in sehr geringen Konzentrationen zur Verfügung, was die Notwendigkeit eines effizienten Eisen-Aufnahmesystems unterstreicht. Daher existiert in einer Vielzahl von Mikroorganismen ein Biosyntheseapparat für Eisen-komplexierende Biomoleküle, die sogenannten Siderophore (Barry &

Challis, 2009). Diese werden nach der Synthese von der Zelle sekretiert und fangen extrazelluläres Eisen(III) ab, das anschließend von der Zelle aufgenommen werden kann. In *H. volcanii* konnte kürzlich gezeigt werden, dass hier ein Operon existiert, dessen 6 Gene für die Enzyme zur Herstellung des einzigen Eisen(III)-Siderophors von *H. volcanii* codieren (Niessen & Soppa, 2020). Überraschenderweise befanden sich diese 6 Gene (*HVO_B0041 bis HVO_B0046*) ebenfalls unter den in Abwesenheit von *HVO_2753* signifikant hochregulierten Genen (siehe Tabelle A4).

Durch die Deletion von *HVO_2753* entstanden demnach erhöhte Transkriptlevel vieler Gene, die für putative Metallionen-, insbesondere Eisenionen-Transporter und Enzymen der Eisen-Siderophor-Biosynthese codieren. Dies ist generell bei sehr geringen extrazellulären Konzentrationen der Ionen zu erwarten, was man hier ausschließen kann. Darüber hinaus wird Eisen(III) für viele Redox-Enzyme benötigt und ist hierbei wichtig für die Eisenkatalyse (Camprubi *et al.*, 2017). In Eisen-Schwefel-Proteinen, einer sehr häufigen Proteinklasse, die viele verschiedene Funktionen, wie z.B. Elektronentransfer, übernehmen können, stellt Eisen einen essenziellen Bestandteil dar (Beinert, 2000). Ist Eisen jedoch in großem Übermaß vorhanden, entstehen durch ungewollte Redoxvorgänge toxische reaktive Sauerstoffspezies, weshalb die Eisen-Homöostase in der Zelle streng reguliert wird. Untersuchungen zur Regulation der Eisen-Homöostase in *H. salinarum* führten zur Identifikation eines entsprechenden Transkriptionsnetzwerks (Martinez-Pastor *et al.*, 2017). Hierbei konnte gezeigt werden, dass in einem *feedback loop*-Netzwerk die intrazelluläre Eisenkonzentration reguliert wird, bei dem Bakterien-ähnliche Transkriptionsfaktoren gekoppelt in einer Topologie, wie sie aus Eukaryoten bekannt ist, für die strenge Kontrolle verantwortlich sind. Sollte *H. volcanii* ein ähnlich komplexes Regulationsnetzwerk zur Eisenhomöostase besitzen, könnte *HVO_2753* eine direkte Rolle darin spielen oder durch einen indirekten Effekt entsprechende Auswirkungen auf ein ganzes Netzwerk haben. Die starke Verknüpfung von Transportern für viele verschiedene Metallionen auf regulatorischer Ebene können die identifizierten weitreichenden Auswirkungen auch auf andere Transporter erklären.

Während bei den Genen von Motilitäts- und Chemotaxisproteinen keine Komplementation der Regulation durch plasmidische Expression von *HVO_2753* erreicht werden konnte, sind bei dem Großteil der Gene von Transportproteinen nahezu

wildtypische Expressionslevel in der Komplementation mutant zu finden (siehe Tabelle A4 im Anhang). Der enorme Umfang der Auswirkungen auf das Transkriptom, die die Deletion von *HVO_2753* bewirkt, sprechen dafür, dass *HVO_2753* in mindestens einem übergeordneten Regulationsprozess involviert ist. Es konnte durch die Transkriptomanalyse gezeigt werden, dass durch die Deletion von *HVO_2753* die Expression von 30 Genen signifikant herunterreguliert vorlag. Diese codieren für Proteine des Bewegungsapparates oder der Chemotaxis-Signaltransduktion. Des Weiteren wurden durch die Deletion des Gens des kleinen Zinkfinger-Proteins zahlreiche Gene hochreguliert. Deren Genprodukte wiederum sind in der Metallionen- insbesondere der Eisen(III)-Aufnahme beteiligt. Diese Erkenntnisse sprechen dafür, dass *HVO_2753* einen positiven Regulator für das Schwärmen und die Zelladhäsion bzw. Biofilmbildung darstellt, der dafür besonders unter mikroaeroben Bedingungen eine wichtige Rolle spielt. Diese Funktion konnte sowohl mittels RNA-Sequenzierung als auch mittels Schwärmversuchen bzw. Biofilm-Assays gezeigt werden. Gleichzeitig übt *HVO_2753* einen negativen regulatorischen Effekt auf die Eisen(III)-Siderophor-Biosynthese und den Eisen(III)-Transport aus, der besonders unter aeroben Bedingungen eine Rolle spielt. Eine Übersicht über die regulatorischen Funktionen gibt Abbildung 25.

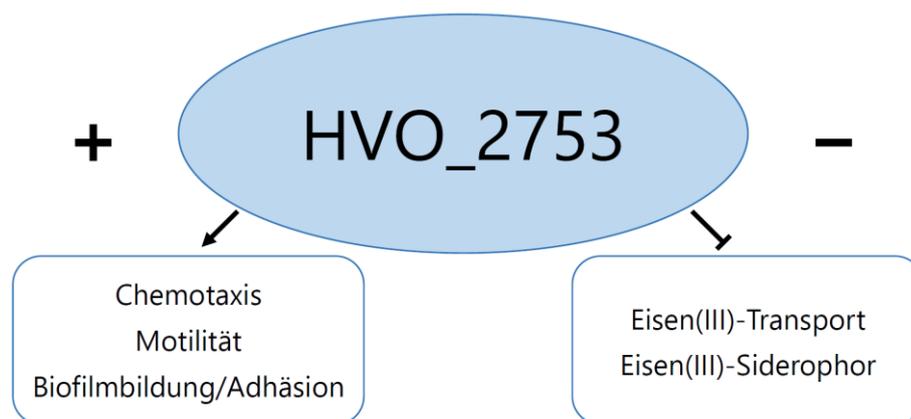


Abbildung 25: Regulatorische Funktionen des kleinen Zinkfinger- μ -Proteins *HVO_2753*. *HVO_2753* übt sowohl positive regulatorische Funktionen (linke Seite) als auch negative regulatorische Funktionen (rechte Seite) aus.

Die Durchführung von *in vivo* Studien auf Proteinebene könnte in Zukunft interessant sein. Mittels Antikörper gegen *HVO_2753* und *HVO_2752* könnten die Proteinlevel im Wildtyp und in Mutanten überprüft werden. Der Versuch hochspezifische, polyklonale Antikörper gegen *HVO_2753* in der vorliegenden Arbeit

herzustellen, brachte jedoch Antikörper ohne die benötigte hohe Spezifität hervor. Ein Grund hierfür kann eine Verunreinigung in der Antigen-Lösung sein. Der erhaltene α HVO_2753 wies Kreuzreaktionen mit anderen Proteinen von *H. volcanii* auf und wurde deshalb für keine weiteren Untersuchungen verwendet. Aus zeitlichen Gründen wurde in dieser Arbeit keine erneute Antikörper-Produktion durchgeführt. Durch die neuen Kenntnisse bezüglich der Struktur von HVO_2753 könnte jedoch für eine künftige Antikörper-Produktion ein Teil des Proteins, der exponiert vorliegt, chemisch synthetisiert und gekoppelt an ein Trägermolekül als Antigen verwendet werden.

In dieser Arbeit konnte hingegen gezeigt werden, dass mit HVO_2753 ein Zinkfinger- μ -Protein essenziell für die Bildung von Biofilm bzw. die Adhäsion an eine Oberfläche und für das Schwärmen in einem halbfesten Medium ist. Die Deletion des Gens des kleinen Zinkfinger-Proteins hatte weitreichende Auswirkungen auf das Transkriptom der Zelle. Um die regulatorische Rolle von HVO_2753 weiter aufzuklären, werden jedoch weitere Untersuchungen benötigt. Es müssen Zusammenhänge verschiedener regulatorischer Netzwerke identifiziert werden, die durch die Deletion des Gens eines einzigen kleinen Zinkfinger-Proteins umfangreich beeinflusst wurden.

Literaturverzeichnis

- Adam, P. S., Borrel, G., Brochier-Armanet, C. & Gribaldo, S. (2017)** 'The growing tree of Archaea: New perspectives on their diversity, evolution and ecology', *ISME J.*, 11(11), pp. 2407–2425.
- Albers, S. V., Koning, S. M., Konings, W. N. & Driessen, A. J. M. (2004)** 'Insights into ABC Transport in Archaea', *J. Bioenerg. Biomembr.*, 36(1), pp. 5–15.
- Allers, T., Barak, S., Liddell, S., Wardell, K. & Mevarech, M. (2010)** 'Improved strains and plasmid vectors for conditional overexpression of His-tagged proteins in *Haloferax volcanii*.' *Appl. Environ. Microbiol.*, 76(6), pp. 1759–69.
- Allers, T. & Mevarech, M. (2005)** 'Archaeal genetics - the third way', *Nat. Rev. Genet.*, 6(1), pp. 58–73.
- Allers, T., Ngo, H. P., Mevarech, M. & Lloyd, R. G. (2004)** 'Development of Additional Selectable Markers for the Halophilic Archaeon *Haloferax volcanii* Based on the *leuB* and *trpA* Genes', *Applied and Environmental Microbiology*, 70(2), pp. 943–953.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990)** 'Basic local alignment search tool', *J. Mol. Biol.*, 215(3), pp. 403–410.
- Andrews, S. J. & Rothnagel, J. A. (2014)** 'Emerging evidence for functional peptides encoded by short open reading frames', *Nat. Rev. Genet.*, 15(3), pp. 193–204.
- Argos, P., Garavito, R. M., Eventoff, W., Rossmann, M. G. & Brändén, C. I. (1978)** 'Similarities in active center geometries of zinc-containing enzymes, proteases and dehydrogenases', *J. Mol. Biol.*, 126(2), pp. 141–158.
- Babski, J., Haas, K. A., Näther-Schindler, D., Pfeiffer, F., Förstner, K. U., Hammelmann, M., Hilker, R., Becker, A., *et al.* (2016)** 'Genome-wide identification of transcriptional start sites in the haloarchaeon *Haloferax volcanii* based on differential RNA-Seq (dRNA-Seq).', *BMC Genom.*, 17(629).
- Baglivo, I., Palmieri, M., Rivellino, A., Netti, F., Russo, L., Esposito, S., Iacovino, R., Farina, B., *et al.* (2014)** 'Molecular strategies to replace the structural metal site in the prokaryotic zinc finger domain', *BBA-Proteins Proteom.*, 1844(3), pp. 497–504.
- Baker, B. J., De Anda, V., Seitz, K. W., Dombrowski, N., Santoro, A. E. & Lloyd, K. G. (2020)** 'Diversity, ecology and evolution of Archaea', *Nat. Microbiol.*, 5(7), pp. 887–900.
- Barry, S. M. & Challis, G. L. (2009)** 'Recent advances in siderophore biosynthesis', *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 13(2), pp. 205–215.
- Baumgartner, D., Kopf, M., Klähn, S., Steglich, C. & Hess, W. R. (2016)** 'Small proteins in cyanobacteria provide a paradigm for the functional analysis of the bacterial micro-proteome', *BMC Microbiol.*, 16(1), pp. 1–15.

- Beinert, H. (2000)** 'Iron-sulfur proteins: Ancient structures, still full of surprises', *J. Biol. Inorg. Chem.*, 5(1), pp. 2–15.
- 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(3), pp. 772–778.
- Boles, B. R. & McCarter, L. L. (2002)** 'Vibrio parahaemolyticus scrABC, a novel operon affecting swarming and capsular polysaccharide regulation', *J. Bacteriol.*, 184(21), pp. 5946–5954.
- Born, J. & Pfeifer, F. (2019)** 'Improved GFP variants to study gene expression in Haloarchaea', *Front. Microbiol.*, 10(1200).
- Borrel, G., Brugère, J. F., Gribaldo, S., Schmitz, R. A. & Moissl-Eichinger, C. (2020)** 'The host-associated archaeome', *Nat. Rev. Microbiol.*, 18(11), pp. 622–636.
- Bouhouche, N., Syvanen, M. & Kado, C. I. (2000)** 'The origin of prokaryotic C2H2 zinc finger regulators', *Trends Microbiol.*, 8(2), pp. 77–81.
- Braun, F., Thomalla, L., van der Does, C., Quax, T. E. F., Allers, T., Kaefer, V. & Albers, S. V. (2019)** 'Cyclic nucleotides in archaea: Cyclic di-AMP in the archaeon *Haloferax volcanii* and its putative role', *MicrobiologyOpen*, 8(9), p. e00829.
- Braun, V. & Braun, M. (2002)** 'Iron transport and signaling in *Escherichia coli*', *FEBS Lett.*, 529(1), pp. 78–85.
- Brown, R. S., Sander, C. & Argos, P. (1985)** 'The primary structure of transcription factor TFIIIA has 12 consecutive repeats', *FEBS Lett.*, 186(2), pp. 271–274.
- Cabrera-Quio, L. E., Herberg, S. & Pauli, A. (2016)** 'Decoding sORF translation – from small proteins to gene regulation', *RNA Biol.*, 13(11), pp. 1051–1059.
- Camprubi, E., Jordan, S. F., Vasiliadou, R. & Lane, N. (2017)** 'Iron catalysis at the origin of life', *IUBMB Life*, 69(6), pp. 373–381.
- Caro, F., Bercovich, N., Atorrasagasti, C., Levin, M. J. & Vázquez, M. P. (2005)** 'Protein interactions within the TcZFP zinc finger family members of *Trypanosoma cruzi*: Implications for their functions', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 333(3), pp. 1017–1025.
- Carver, P. L. (2017)** 'The Battle for Iron between Humans and Microbes', *Curr. Med. Chem.*, 25(1), pp. 85–96.
- Cassandri, M., Smirnov, A., Novelli, F., Pitolli, C., Agostini, M., Malewicz, M., Melino, G. & Raschellà, G. (2017)** 'Zinc-finger proteins in health and disease', *Cell Death Differ.*, 3(17071).
- Chen, X., Chu, M. & Giedroc, D. P. (1999)** 'MRE-binding transcription factor-1: Weak zinc-binding finger domains 5 and 6 modulate the structure, affinity, and specificity of the metal-response element complex', *Biochemistry*, 38(39), pp.

12915–12925.

Chevance, F. F. V. & Hughes, K. T. (2008) 'Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine', *Nat. Rev. Microbiol.*, 6(6), pp. 455–465.

Chou, A. Y., Archdeacon, J. & Kado, C. I. (1998) 'Agrobacterium transcriptional regulator Ros is a prokaryotic zinc finger protein that regulates the plant oncogene ipt.', *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 95(9), pp. 5293–5298.

Chroňáková, A., Ascher, J., Jirout, J., Ceccherini, M. T., Elhottová, D., Pietramellara, G. & Šimek, M. (2012) 'Cattle impact on composition of archaeal, bacterial, and fungal communities by comparative fingerprinting of total and extracellular DNA', *Biol. Fert. Soils*, 49(3), pp. 351–361.

Conway de Macario, E. & Macario, A. J. L. (2009) 'Methanogenic archaea in health and disease: A novel paradigm of microbial pathogenesis', *Int. J. Med. Microbiol.*, 299(2), pp. 99–108.

Cox, C. J., Foster, P. G., Hirt, R. P., Harris, S. R. & Embley, T. M. (2008) 'The archaeobacterial origin of eukaryotes', *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 105(51), pp. 20356–20361.

D'Lima, N. G., Ma, J., Winkler, L., Chu, Q., Loh, K. H., Corpuz, E. O., Budnik, B. A., Lykke-Andersen, J., et al. (2017) 'A human microprotein that interacts with the mRNA decapping complex', *Nat. Chem. Biol.*, 13(2), pp. 174–180.

Danner, S. & Soppa, J. (1996) 'Characterization of the distal promoter element of halobacteria in vivo using saturation mutagenesis and selection', *Mol. Microbiol.*, 19(6), pp. 1265–1276.

Delcourt, V., Staskevicius, A., Salzert, M., Fournier, I. & Roucou, X. (2018) 'Small Proteins Encoded by Unannotated ORFs are Rising Stars of the Proteome, Confirming Shortcomings in Genome Annotations and Current Vision of an mRNA', *Proteomics*, 18(10).

DeLong, E. F. & Pace, N. R. (2001) 'Environmental Diversity of Bacteria and Archaea', *Systematic Biol.* Edited by M. Kane, 50(4), pp. 470–478.

Doolittle, W. F. & Logsdon, J. M. (1998) 'Archaeal genomics: Do archaea have a mixed heritage?', *Curr. Biol.*, 8(6).

Duval, M. & Cossart, P. (2017) 'Small bacterial and phagic proteins: an updated view on a rapidly moving field', *Curr. Opin. Microbiol.*, 39, pp. 81–88.

Eisenberg, H., Mevarech, M. & Zaccai, G. (1992) 'Biochemical, structural, and molecular genetic aspects of halophilism', *Adv. Protein Chem.*, 43, pp. 1–62.

Elrod-Erickson, M., Rould, M. A., Nekludova, L. & Pabo, C. O. (1996) 'Zif268 protein-DNA complex refined at 1.6 Å: A model system for understanding zinc finger-DNA interactions', *Structure*, 4(10), pp. 1171–1180.

Eme, L., Spang, A., Lombard, J., Stairs, C. W. & Ettema, T. J. G. (2017) 'Archaea and the origin of eukaryotes', *Nat. Rev. Microbiol.*, 15(12), pp. 711–723.

- Eom, K. S., Cheong, J. S. & Lee, S. J. (2016)** 'Structural analyses of zinc finger domains for specific interactions with DNA', *J. Microbiol. Biotechnol.*, 26(12), pp. 2019–2029.
- Esquivel, R. N. & Pohlschroder, M. (2014)** 'A conserved type IV pilin signal peptide H-domain is critical for the post-translational regulation of flagella-dependent motility', *Mol. Microbiol.*, 93(3), pp. 494–504.
- Falconi, M., Giangrossi, M., Zabaleta, M. E., Wang, J., Gambini, V., Tilio, M., Bencardino, D., Occhipinti, S., et al. (2019)** 'A novel 3'-tRNAGlu-derived fragment acts as a tumor suppressor in breast cancer by targeting nucleolin', *FASEB J.*, 33(12), pp. 13228–13240.
- Fernandez-Pol, J. A., Klos, D. J. & Hamilton, P. D. (1993)** 'A growth factor-inducible gene encodes a novel nuclear protein with zinc finger structure', *J. Biol. Chem.*, 268(28), pp. 21198–21204.
- Ferreira, R. B. R., Antunes, L. C. M., Greenberg, E. P. & McCarter, L. L. (2008)** 'Vibrio parahaemolyticus ScrC modulates cyclic dimeric GMP regulation of gene expression relevant to growth on surfaces', *J. Bacteriol.*, 190(3), pp. 851–860.
- Finoulst, I., Pinkse, M., Van Dongen, W. & Verhaert, P. (2011)** 'Sample preparation techniques for the untargeted LC-MS-based discovery of peptides in complex biological matrices', *J. Biomed. Biotechnol.*, 2011(245291).
- Fischer, S., Benz, J., Späth, B., Maier, L. K., Straub, J., Granzow, M., Raabe, M., Urlaub, H., et al. (2010)** 'The archaeal lsm protein binds to small RNAs', *J. Biol. Chem.*, 285(45), pp. 34429–34438.
- Frankel, A. D., Berg, J. M. & Pabo, C. O. (1987)** 'Metal-dependent folding of a single zinc finger from transcription factor IIIA.', *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 84(14), pp. 4841–4845.
- Fraser, G. M. & Hughes, C. (1999)** 'Swarming motility', *Curr. Opin. Microbiol.*, 2(6), pp. 630–635.
- Freese, N. H., Norris, D. C. & Loraine, A. E. (2016)** 'Integrated genome browser: Visual analytics platform for genomics', *Bioinformatics*, 32(14), pp. 2089–2095.
- Frey, J. C., Pell, A. N., Berthiaume, R., Lapierre, H., Lee, S., Ha, J. K., Mendell, J. E. & Angert, E. R. (2010)** 'Comparative studies of microbial populations in the rumen, duodenum, ileum and faeces of lactating dairy cows', *J. Appl. Microbiol.*, 108(6), pp. 1982–1993.
- Fumeaux, C., Radhakrishnan, S. K., Ardisson, S., Théraulaz, L., Frandi, A., Martins, D., Nesper, J., Abel, S., et al. (2014)** 'Cell cycle transition from S-phase to G1 in *Caulobacter* is mediated by ancestral virulence regulators', *Nat. Commun.*, 5(4081).
- Gebetsberger, J., Wyss, L., Mleczko, A. M., Reuther, J. & Polacek, N. (2017)** 'A tRNA-derived fragment competes with mRNA for ribosome binding and regulates translation during stress', *RNA Biol.*, 14(10), pp. 1364–1373.

- Gebetsberger, J., Zywicki, M., Künzi, A. & Polacek, N. (2012)** 'TRNA-derived fragments target the ribosome and function as regulatory non-coding RNA in *Haloferax volcanii*', *Archaea*, 2012(260909).
- Gill, G. N. (1995)** 'The enigma of LIM domains', *Structure*, 3(12), pp. 1285–1289.
- Granok, H., Leibovitch, B. A., Shaffer, C. D. & Elgin, S. C. R. (1995)** 'Chromatin: Ga-ga over GAGA factor', *Curr. Biol.*, 5(3), pp. 238–241.
- Guo, B., Zhai, D., Cabezas, E., Welsh, K., Nouraini, S., Satterthwait, A. C. & Reed, J. C. (2003)** 'Humanin peptide suppresses apoptosis by interfering with Bax activation', *Nature*, 423(6938), pp. 456–461.
- Hammelmann, M. & Soppa, J. (2008)** 'Optimized generation of vectors for the construction of *Haloferax volcanii* deletion mutants.', *J. Microbiol. Methods*, 75(2), pp. 201–204.
- Hanahan, D. (1983)** 'Studies on Transformation of *Escherichia coli* with Plasmids', *J. Mol. Biol.*, 166(4), pp. 557–580.
- Hanas, J. S., Hazuda, D. J., Bogenhagen, D. F., Wu, F. Y. & Wu, C. W. (1983)** 'Xenopus transcription factor A requires zinc for binding to the 5 S RNA gene.', *J. Biol. Chem.*, 258(23), pp. 14120–14125.
- Hartford, C. C. R. & Lal, A. (2020)** 'When Long Noncoding Becomes Protein Coding', *Mol. Cell. Biol.*, 40(6), pp. e00528-19.
- Hartman, A. L., Norais, C., Badger, J. H., Delmas, S., Haldenby, S., Madupu, R., Robinson, J., Khouri, H., *et al.* (2010)** 'The complete genome sequence of *Haloferax volcanii* DS2, a model archaeon', *PLOS ONE*, 5(3), p. e9605.
- Hawkins, M., Malla, S., Blythe, M. J., Nieduszynski, C. A. & Allers, T. (2013)** 'Accelerated growth in the absence of DNA replication origins', *Nature*, 503(7477), pp. 544–547.
- He, C., Hus, J. C., Li, J. S., Zhou, P., Norman, D. P. G., Dötsch, V., Wei, H., Gross, J. D., *et al.* (2005)** 'A methylation-dependent electrostatic switch controls DNA repair and transcriptional activation by *E. coli* Ada', *Mol. Cell*, 20(1), pp. 117–129.
- Heidrich, N., Dugar, G., Vogel, J. & Sharma, C. M. (2015)** 'Investigating CRISPR RNA biogenesis and function using RNA-seq', *Methods Mol. Biol.*, 1311, pp. 1–21.
- Hengge, R. (2009)** 'Principles of c-di-GMP signalling in bacteria', *Nat. Rev. Microbiol.*, 7(4), pp. 263–273.
- Henneman, B., van Emmerik, C., van Ingen, H. & Dame, R. T. (2018)** 'Structure and function of archaeal histones', *PLOS Genet.*, 14(9).
- Heyer, R., Dörr, M., Jellen-Ritter, A., Späth, B., Babski, J., Jaschinski, K., Soppa, J. & Marchfelder, A. (2012)** 'High throughput sequencing reveals a plethora of small RNAs including tRNA derived fragments in *Haloferax volcanii*', *RNA Biol.*, 9(7), pp. 1011–1018.

- Hirano, T., Kikuchi, K., Urano, Y. & Nagano, T. (2002)** 'Improvement and biological applications of fluorescent probes for zinc, ZnAFs', *J. Am. Chem. Soc.*, 124(23), pp. 6555–6562.
- Hobbs, E. C., Fontaine, F., Yin, X. & Storz, G. (2011)** 'An expanding universe of small proteins', *Curr. Opin. Microbiol.*, 14(2), pp. 167–173.
- Hochstein, L. I., Dalton, B. P. & Pollock, G. (1976)** 'The metabolism of carbohydrates by extremely halophilic bacteria: identification of galactonic acid as a product of galactose metabolism', *Can. J. Microbiol.*, 22(8), pp. 1191–1196.
- Holden, H. M., Rayment, I. & Thoden, J. B. (2003)** 'Structure and Function of Enzymes of the Leloir Pathway for Galactose Metabolism', *J. Biol. Chem.*, 278(45), pp. 43885–43888.
- Holland, I. B. & A. Blight, M. (1999)** 'ABC-ATPases, adaptable energy generators fuelling transmembrane movement of a variety of molecules in organisms from bacteria to humans', *J. Mol. Biol.*, 293(2), pp. 381–399.
- Hölzle, A., Fischer, S., Heyer, R., Schütz, S., Zacharias, M., Walther, P., Allers, T. & Marchfelder, A. (2008)** 'Maturation of the 5S rRNA 5' end is catalyzed in vitro by the endonuclease tRNase Z in the archaeon *H. volcanii*', *RNA*, 14(5), pp. 928–937.
- Hua, S. S. & Markovitz, A. (1972)** 'Multiple regulator gene control of the galactose operon in *Escherichia coli* K-12.', *J. Bacteriol.*, 110(3), pp. 1089–1099.
- Hubmacher, D., Matzanke, B. F. & Anemüller, S. (2007)** 'Iron-uptake in the Euryarchaeon *Halobacterium salinarum*', *BioMetals*, 20(3–4), pp. 539–547.
- Huet, J., Schnabel, R., Sentenac, A. & Zillig, W. (1983)** 'Archaeobacteria and eukaryotes possess DNA-dependent RNA polymerases of a common type.', *EMBO J.*, 2(8), pp. 1291–1294.
- Ingolia, N. T., Hussmann, J. A. & Weissman, J. S. (2019)** 'Ribosome profiling: Global views of translation', *CSH Perspect. Biol.*, 11(5).
- Inoue, H., Nojima, H. & Okayama, H. (1990)** 'High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids', *Gene*, 96(1), pp. 23–28.
- Issaq, H. J., Chan, K. C., Blonder, J., Ye, X. & Veenstra, T. D. (2009)** 'Separation, detection and quantitation of peptides by liquid chromatography and capillary electrochromatography', *J. Chromatogr. A*, 1216(10), pp. 1825–1837.
- Jantzer, K., Zerulla, K. & Soppa, J. (2011)** 'Phenotyping in the archaea: optimization of growth parameters and analysis of mutants of *Haloferax volcanii*', *FEMS Microbiol. Lett.*, 322(2), pp. 123–130.
- Jaschinski, K., Babski, J., Lehr, M., Burmester, A., Benz, J., Heyer, R., Dörr, M., Marchfelder, A., et al. (2014)** 'Generation and Phenotyping of a Collection of sRNA Gene Deletion Mutants of the Haloarchaeon *Haloferax volcanii*', *PLOS ONE*. Edited by D. Zhou, 9(3), p. e90763.

- Jevtić, Ž., Stoll, B., Pfeiffer, F., Sharma, K., Urlaub, H., Marchfelder, A. & Lenz, C. (2019)** 'The Response of *Haloferax volcanii* to Salt and Temperature Stress: A Proteome Study by Label-Free Mass Spectrometry', *Proteomics*, 19(20), p. 1800491.
- Johnsen, U., Ortjohann, M., Sutter, J. M., Geweke, S. & Schönheit, P. (2019)** 'Uptake of D-xylose and L-arabinose in *Haloferax volcanii* involves an ABC transporter of the CUT1 subfamily', *FEMS Microbiol. Lett.*, 366(8).
- Kaidoh, K., Miyauchi, S., Abe, A., Tanabu, S., Nara, T. & Kamo, N. (1996)** 'Rhodamine 123 efflux transporter in *Haloferax volcanii* is induced when cultured under "metabolic stress" by amino acids: The efflux system resembles that in a doxorubicin-resistant mutant', *Biochem. J.*, 314(1), pp. 355–359.
- Karner, M. B., DeLong, E. F. & Karl, D. M. (2001)** 'Archaeal dominance in the mesopelagic zone of the Pacific Ocean', *Nature*, 409(6819), pp. 507–510.
- Karunratanakul, K., Tang, H. Y., Speicher, D. W., Chuangsuwanich, E. & Sriswasdi, S. (2019)** 'Uncovering thousands of new peptides with sequence-mask-search hybrid de novo peptide sequencing framework', *Mol. Cell. Proteomics*, 18(12), pp. 2478–2491.
- Klein, C., Aivaliotis, M., Olsen, J. V., Falb, M., Besir, H., Scheffer, B., Bisle, B., Tebbe, A., et al. (2007)** 'The low molecular weight proteome of *Halobacterium salinarum*', *J. Proteome Res.*, 6, pp. 1510–1518.
- Kliemt, J., Jaschinski, K. & Soppa, J. (2019)** 'A haloarchaeal small regulatory RNA (sRNA) is essential for rapid adaptation to phosphate starvation conditions', *Front. Microbiol.*, 10(1219).
- Kluska, K., Adamczyk, J. & Krężel, A. (2018)** 'Metal binding properties, stability and reactivity of zinc fingers', *Coordin. Chem. Rev.*, 367, pp. 18–64.
- Koch, M. K. & Oesterhelt, D. (2005)** 'MpcT is the transducer for membrane potential changes in *Halobacterium salinarum*', *Mol. Microbiol.*, 55(6), pp. 1681–1694.
- Kokoeva, M. V. & Oesterhelt, D. (2000)** 'BasT, a membrane-bound transducer protein for amino acid detection in *Halobacterium salinarum*', *Mol. Microbiol.*, 35(3), pp. 647–656.
- Kokoeva, M. V., Storch, K. F., Klein, C. & Oesterhelt, D. (2002)** 'A novel mode of sensory transduction in archaea: Binding protein-mediated chemotaxis towards osmoprotectants and amino acids', *EMBO J.*, 21(10), pp. 2312–2322.
- Kostic, M., Matt, T., Martinez-Yamout, M. A., Dyson, H. J. & Wright, P. E. (2006)** 'Solution Structure of the Hdm2 C₂H₂C₄ RING, a Domain Critical for Ubiquitination of p53', *J. Mol. Biol.*, 363(2), pp. 433–450.
- Krishna, S. S., Majumdar, I. & Grishin, N. V. (2003)** 'Structural classification of zinc fingers', *Nucleic Acids Res.*, 31(2), pp. 532–550.

- Kubatova, N., Jonker, H. R. A., Saxena, K., Richter, C., Vogel, V., Schreiber, S., Marchfelder, A. & Schwalbe, H. (2020)** 'Solution Structure and Dynamics of the Small Protein HVO_2922 from *Haloferax volcanii*', *ChemBioChem*, 21(1–2), pp. 149–156.
- Kubatova, N., Pyper, D. J., Jonker, H. R. A., Saxena, K., Rimmel, L., Richter, C., Brantl, S., Evguenieva-Hackenberg, E., et al. (2020)** 'Rapid Biophysical Characterization and NMR Spectroscopy Structural Analysis of Small Proteins from Bacteria and Archaea', *ChemBioChem*, 21(8), pp. 1178–1187.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. & Tamura, K. (2018)** 'MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms.', *Mol. Biol. Evol.*, 35(6), pp. 1547–1549.
- Laass, S., Monzon, V. A., Kliemt, J., Hammelmann, M., Pfeiffer, F., Förstner, K. U. & Soppa, J. (2019)** 'Characterization of the transcriptome of *Haloferax volcanii*, grown under four different conditions, with mixed RNA-Seq', *PLOS ONE*. Edited by A. Kanai, 14(4), p. e0215986.
- Lai, Z., Freedman, D. A., Levine, A. J. & McLendon, G. L. (1998)** 'Metal and RNA Binding Properties of the hdm2 RING Finger Domain', *Biochemistry*, 37(48), pp. 17005–17015.
- 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(5), pp. 1092–1106.
- Legerme, G., Yang, E., Esquivel, R., Kiljunen, S., Savilahti, H. & Pohlschroder, M. (2016)** 'Screening of a *Haloferax volcanii* Transposon Library Reveals Novel Motility and Adhesion Mutants', *Life*, 6(4), p. 41.
- De Ley, J. & Doudoroff, M. (1957)** 'The metabolism of D-galactose in *Pseudomonas saccharophila*', *J. Biol. Chem.*, 227(2), pp. 745–757.
- Lipp, J. S., Morono, Y., Inagaki, F. & Hinrichs, K. U. (2008)** 'Significant contribution of Archaea to extant biomass in marine subsurface sediments', *Nature*, 454(7207), pp. 991–994.
- Liu, W. T., Yang, Y. L., Xu, Y., Lamsa, A., Haste, N. M., Yang, J. Y., Ng, J., Gonzalez, D., et al. (2010)** 'Imaging mass spectrometry of intraspecies metabolic exchange revealed the cannibalistic factors of *Bacillus subtilis*', *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 107(37), pp. 16286–16290.
- Lu, Y., Hall, D. A. & Last, R. L. (2011)** 'A small zinc finger thylakoid protein plays a role in maintenance of photosystem II in *Arabidopsis thaliana*.', *Plant Cell*, 23(5), pp. 1861–1875.
- Madern, D., Ebel, C. & Zaccai, G. (2000)** 'Halophilic adaptation of enzymes', *Extremophiles*, 4(2), pp. 91–98.
- Makarewich, C. A. (2020)** 'The hidden world of membrane microproteins', *Exp.*

Cell. Res., 388(2).

Malgieri, G., Palmieri, M., Russo, L., Fattorusso, R., Pedone, P. V. & Isernia, C. (2015) 'The prokaryotic zinc-finger: structure, function and comparison with the eukaryotic counterpart', *FEBS J.*, 282(23), pp. 4480–4496.

Malgieri, G., Russo, L., Esposito, S., Baglivo, I., Zaccaro, L., Pedone, E. M., Di Blasio, B., Isernia, C., et al. (2007) 'The prokaryotic Cys2His2 zinc-finger adopts a novel fold as revealed by the NMR structure of *Agrobacterium tumefaciens* Ros DNA-binding domain', *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 104(44), pp. 17341–17346.

Marg, B. L., Schweimer, K., Sticht, H. & Oesterhelt, D. (2005) 'A two- α -helix extra domain mediates the halophilic character of a plant-type ferredoxin from Halophilic Archaea', *Biochemistry*, 44(1), pp. 29–39.

Martinez-Pastor, M., Lancaster, W. A., Tonner, P. D., Adams, M. W. W. & Schmid, A. K. (2017) 'A transcription network of interlocking positive feedback loops maintains intracellular Iron balance in archaea', *Nucleic Acids Res.*, 45(17), pp. 9990–10001.

Miller, J., McLachlan, A. D. & Klug, A. (1985) 'Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes.', *EMBO J.*, 4(6), pp. 1609–1614.

Misra, S. & Hurley, J. H. (1999) 'Crystal structure of a phosphatidylinositol 3-phosphate-specific membrane-targeting motif, the FYVE domain of Vps27p', *Cell*, 97(5), pp. 657–666.

Miyauchi, S., Tanabu, S., Abe, A., Okumura, R. & Kamo, N. (1997) 'Culture in the presence of sugars increases activity of multi-drug efflux transporter on *Haloferax volcanii*', *Microb. Drug Resist.*, 3(4), pp. 359–363.

Mojica, F. J. M., Cisneros, E., Ferrer, C., Rodríguez-Valera, F. & Juez, G. (1997) 'Osmotically induced response in representatives of halophilic prokaryotes: The bacterium *Halomonas elongata* and the archaeon *Haloferax volcanii*', *J. Bacteriol.*, 179(17), pp. 5471–5481.

Moreira, D. & Rodríguez-Valera, F. (2000) 'A mitochondrial origin for eukaryotic C₂H₂ zinc finger regulators? (multiple letters) [2]', *Trends Microbiol.*, 8(10), pp. 448–449.

Morgan, B., Sun, L., Avitahl, N., Andrikopoulos, K., Ikeda, T., Gonzales, E., Wu, P., Neben, S., et al. (1997) 'Aiolos, a lymphoid restricted transcription factor that interacts with Ikaros to regulate lymphocyte differentiation', *EMBO J.*, 16(8), pp. 2004–2013.

Mullakhanbhai, M. F. & Larsen, H. (1975) '*Halobacterium volcanii* spec. nov., a Dead Sea halobacterium with a moderate salt requirement', *Arch. Microbiol.*, 104(1), pp. 207–214.

Mumtaz, M. A. S. & Couso, J. P. (2015) 'Ribosomal profiling adds new coding sequences to the proteome', *Biochem. Soc. Trans.*, 43(6), pp. 1271–1276.

- Nagel, C., Machulla, A., Zahn, S. & Soppa, J. (2019)** 'Several One-Domain Zinc Finger μ -Proteins of *Haloferax Volcanii* Are Important for Stress Adaptation, Biofilm Formation, and Swarming', *Genes*, 10(5), p. 361.
- Niessen, N. & Soppa, J. (2020)** 'Regulated iron siderophore production of the halophilic archaeon *haloferax volcanii*', *Biomolecules*, 10(7), pp. 1–17.
- Nieuwlandt, D. T. & Daniels, C. J. (1990)** 'An expression vector for the archaeobacterium *Haloferax volcanii*', *J. Bacteriol.*, 172(12), pp. 7104–7110.
- Noll, M., Petrukhin, K. & Lutsenko, S. (1998)** 'Identification of a novel transcription regulator from *Proteus mirabilis*, PMTR, revealed a possible role of YJAI protein in balancing zinc in *Escherichia coli*', *J. Biol. Chem.*, 273(33), pp. 21393–21401.
- Nowacka, M., Fernandes, H., Kiliszek, A., Bernat, A., Lach, G. & Bujnicki, J. M. (2019)** 'Specific interaction of zinc finger protein Com with RNA and the crystal structure of a self-complementary RNA duplex recognized by Com', *PLOS ONE*, 14(4).
- Omichinski, J. G., Pedone, P. V., Felsenfeld, G., Gronenborn, A. M. & Clore, G. M. (1997)** 'The solution structure of a specific GAGA factor-DNA complex reveals a modular binding mode', *Nat. Struct. Biol.*, 4(2), pp. 122–132.
- Partridge, J. D. & Harshey, R. M. (2013)** 'Swarming: Flexible roaming plans', *J. Bacteriol.*, 195(5), pp. 909–918.
- Paul, S., Bag, S. K., Das, S., Harvill, E. T. & Dutta, C. (2008)** 'Molecular signature of hypersaline adaptation: Insights from genome and proteome composition of halophilic prokaryotes', *Genome Biol.*, 9(4).
- Pérez-Fillol, M. & Rodríguez-Valera, F. (1986)** 'Potassium ion accumulation in cells of different halobacteria.', *Microbiologia SEM*, 2(2), pp. 73–80.
- Pfeiffer, F., Broicher, A., Gillich, T., Klee, K., Mejía, J., Rampp, M. & Oesterhelt, D. (2008)** 'Genome information management and integrated data analysis with HaloLex', *Arch. Microbiol.*, 190(3), pp. 281–299.
- Picard, B. & Wegnez, M. (1979)** 'Isolation of a 7S particle from *Xenopus laevis* oocytes: A 5S RNA-protein complex', *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 76(1), pp. 241–245.
- Plaza, S., Menschaert, G. & Payre, F. (2017)** 'In search of lost small peptides', *Annu. Rev. Cell Dev. Bi.*, 33, pp. 391–416.
- Reshma, S. V., Sathyanarayanan, N. & Nagendra, H. G. (2015)** 'Characterization of hypothetical protein VNG0128C from *Halobacterium* NRC-1 reveals GALE like activity and its involvement in Leloir pathway of galactose metabolism', *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 33(8), pp. 1743–1755.
- Rhodes, D. & Klug, A. (1993)** 'Zinc fingers', *Sci. Am.*, 268(2), pp. 597–604.
- Romeo, T. & Babitzke, P. (2018)** 'Global Regulation by CsrA and Its RNA

Antagonists', *Microbiol. Spectr.*, 6(2), p. RWR-0009-2017.

Rudolph, J., Nordmann, B., Storch, K.-F., Gruenberg, H., Rodewald, K. & Oesterhelt, D. (1996) 'A family of halobacterial transducer proteins', *FEMS Microbiol. Lett.*, 139(2–3), pp. 161–168.

Schägger, H. (2006) 'Tricine–SDS–PAGE', *Nat. Protoc.*, 1(1), pp. 16–22.

Schrader, M. (2018) 'Origins, technological development, and applications of peptidomics', *Methods Mol. Biol.*, 1719, pp. 3–39.

Soppa, J. (2006) 'From genomes to function: Haloarchaea as model organisms', *Microbiology (Reading)*, 152(3), pp. 585–590.

Soppa, J. (2011) 'Functional genomic and advanced genetic studies reveal novel insights into the metabolism, regulation, and biology of *Haloferax volcanii*.', *Archaea*, 2011(602408).

Srinivasa, S., Ding, X. & Kast, J. (2015) 'Formaldehyde cross-linking and structural proteomics: Bridging the gap', *Methods*, 89, pp. 91–98.

Stachler, A. E., Schwarz, T. S., Schreiber, S. & Marchfelder, A. (2020) 'CRISPRi as an efficient tool for gene repression in archaea', *Methods*, 172, pp. 76–85.

Storz, G., Wolf, Y. I. & Ramamurthi, K. S. (2014) 'Small proteins can no longer be ignored.', *Annu. Rev. Biochem.*, 83, pp. 753–77.

Su, M., Ling, Y., Yu, J., Wu, J. & Xiao, J. (2013) 'Small proteins: untapped area of potential biological importance', *Front. Genet.*, 4(286).

Sumper, M., Berg, E., Mengele, R. & Strobel, I. (1990) 'Primary structure and glycosylation of the S-layer protein of *Haloferax volcanii*', *J. Bacteriol.*, 172(12), pp. 7111–7118.

Sun, L., Liu, A. & Georgopoulos, K. (1996) 'Zinc finger-mediated protein interactions modulate Ikaros activity, a molecular control of lymphocyte development', *EMBO J.*, 15(19), pp. 5358–5369.

Sutak, R., Camadro, J. M. & Lesuisse, E. (2020) 'Iron Uptake Mechanisms in Marine Phytoplankton', *Front. Microbiol.*, 11(566691).

Sutherland, B. W., Toews, J. & Kast, J. (2008) 'Utility of formaldehyde cross-linking and mass spectrometry in the study of protein-protein interactions', *J. Mass Spectrom.*, 43(6), pp. 699–715.

Taffner, J., Erlacher, A., Bragina, A., Berg, C., Moissl-Eichinger, C. & Berg, G. (2018) 'What Is the Role of Archaea in Plants? New Insights from the Vegetation of Alpine Bogs', *mSphere*, 3(3), pp. 122–140.

Tarasov, V. Y., Besir, H., Schwaiger, R., Klee, K., Furtwängler, K., Pfeiffer, F. & Oesterhelt, D. (2008) 'A small protein from the bop-brp intergenic region of *Halobacterium salinarum* contains a zinc finger motif and regulates bop and crtB1 transcription.', *Mol. Microbiol.*, 67(4), pp. 772–80.

- Tästensen, J. B., Johnsen, U., Reinhardt, A., Orthjohann, M. & Schönheit, P. (2020)** 'D-galactose catabolism in archaea: Operation of the DeLey-Doudoroff pathway in *Haloferax volcanii*', *FEMS Microbiol. Lett.*, 367(1).
- Tawara, E. & Kamo, N. (1991)** 'Glucose transport of *Haloferax volcanii* requires the Na⁺-electrochemical potential gradient and inhibitors for the mammalian glucose transporter inhibit the transport', *BBA-Biomembranes*, 1070(2), pp. 293–299.
- Tokunaga, H., Hara, S., Arakawa, T., Ishibashi, M., Gupta, R. S. & Tokunaga, M. (1999)** 'Identification and partial purification of DnaK homologue from extremely halophilic archaeobacteria, *Halobacterium cutirubrum*', *J. Prot. Chem.*, 18(8), pp. 837–844.
- Torreblanca, M., Rodriguez-Valera, F., Juez, G., Ventosa, A., Kamekura, M. & Kates, M. (1986)** 'Classification of Non-alkaliphilic Halobacteria Based on Numerical Taxonomy and Polar Lipid Composition, and Description of *Haloarcula* gen. nov. and *Haloferax* gen. nov.', *Syst. Appl. Microbiol.*, 8(1–2), pp. 89–99.
- Wanner, C. & Soppa, J. (1999)** 'Genetic identification of three ABC transporters as essential elements for nitrate respiration in *Haloferax volcanii*', *Genetics*, 152(4), pp. 1417–1428.
- Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M. A., Clamp, M. & Barton, G. J. (2009)** 'Jalview Version 2-A multiple sequence alignment editor and analysis workbench', *Bioinformatics*, 25(9), pp. 1189–1191.
- Wendoloski, D., Ferrer, C. & Dyall-Smith, M. L. (2001)** 'A new simvastatin (mevinolin)-resistance marker from *Haloarcula hispanica* and a new *Haloferax volcanii* strain cured of plasmid pHV2', *Microbiology (Reading)*, 147(4), pp. 959–964.
- Whittaker, R. H. (1969)** 'New concepts of kingdoms of organisms', *Science*, 163(3863), pp. 150–160.
- Williams, T. A., Foster, P. G., Cox, C. J. & Embley, T. M. (2013)** 'An archaeal origin of eukaryotes supports only two primary domains of life', *Nature*, 504(7479), pp. 231–236.
- Winter, K., Born, J. & Pfeifer, F. (2018)** 'Interaction of haloarchaeal gas vesicle proteins determined by split-GFP', *Front. Microbiol.*, 9(1897).
- Woese, C. R. & Fox, G. E. (1977)** 'Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms', *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 74(11), pp. 5088–5090.
- Woese, C. R., Fox, G. E., Zablen, L., Uchida, T., Bonen, L., Pechman, K., Lewis, B. J. & Stahl, D. (1975)** 'Conservation of primary structure in 16S ribosomal RNA', *Nature*, 254(5495), pp. 83–86.
- Woese, C. R., Magrum, L. J. & Fox, G. E. (1978)** 'Archaeobacteria', *J. Mol. Evol.*, 11(3), pp. 245–252.

Wolfe, S. A., Nekludova, L. & Pabo, C. O. (2000) 'DNA Recognition by Cys 2 His 2 Zinc Finger Proteins', *Annu. Rev. Biophys.*, 29(1), pp. 183–212.

Zahn, S., Kubatova, N., Pyper, D. J., Cassidy, L., Saxena, K., Tholey, A., Schwalbe, H. & Soppa, J. (2020) 'Biological functions, genetic and biochemical characterization, and NMR structure determination of the small zinc finger protein HVO_2753 from *Haloferax volcanii*', *FEBS J.*, Epub(Ahead of print).

Zhang, W., Brooun, A., Mueller, M. M. & Alam, M. (1996) 'The primary structures of the Archaeon *Halobacterium salinarium* blue light receptor sensory rhodopsin II and its transducer, a methyl-accepting protein', *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 93(16), pp. 8230–8235.

Zillig, W., Klenk, H. P., Palm, P., Puhler, G. & Gropp, F. (1989) 'The phylogenetic relations of DNA-dependent RNA polymerases of archaeobacteria, eukaryotes, and eubacteria', *Can. J. Microbiol.*, 35(1), pp. 73–80.

Publikationen

Publikationen in wissenschaftlichen Fachzeitschriften

Zahn, S., Kubatova, N., Pyper, D. J., Cassidy, L., Saxena, K., Tholey, A., Schwalbe, H. & Soppa, J. (2020) 'Biological functions, genetic and biochemical characterization, and NMR structure determination of the small zinc finger protein HVO_2753 from *Haloferax volcanii*', *FEBS J.*, Epub(Ahead of print).

Nagel, C., Machulla, A., Zahn, S. & Soppa, J. (2019) 'Several One-Domain Zinc Finger μ -Proteins of *Haloferax Volcanii* Are Important for Stress Adaptation, Bio-film Formation, and Swarming', *Genes*, 10(5), p. 361.

Vorträge auf wissenschaftlichen Kongressen

Zahn, S., Nagel, C., Machulla, A. & Soppa, J. (2019) 'Characterization of zinc finger μ -proteins in *Haloferax volcanii*', Vortrag auf dem *20th Frankfurt Meeting on ,Genome Function and Gene Regulation in Archaea'* in Schmitten.

Zahn, S., Nagel, C., Machulla, A. & Soppa, J. (2019) 'Single-domain zinc finger μ -proteins in *Haloferax volcanii*', Vortrag auf dem *Progress Report-Meeting* des Schwerpunktprogramms SPP2002 auf Sylt.

Zahn, S., Nagel, C., Machulla, A. & Soppa, J. (2018) 'Characterization of zinc finger μ -proteins in *Haloferax volcanii*', Vortrag auf dem *19th Frankfurt Meeting on ,Genome Function and Gene Regulation in Archaea'* in Schmitten.

Zahn, S., Nagel, C., Machulla, A. & Soppa, J. (2018) 'Single-domain zinc finger μ -proteins in *Haloferax volcanii*', Vortrag auf dem *Kick-Off-Meeting* des Schwerpunktprogramms SPP2002 in Kiel.

Zahn, S., Machulla, A. & Soppa, J. (2017) 'Characterization of zinc finger μ -proteins in *Haloferax volcanii*', Vortrag auf dem *18th Frankfurt Meeting on ,Genome Function and Gene Regulation in Archaea'* in Schmitten.

Posterpräsentationen auf wissenschaftlichen Kongressen

Zahn, S., Nagel, C., Machulla, A. & Soppa, J. (2020) 'Single-domain zinc finger μ -proteins in *Haloferax volcanii*', Posterpräsentation auf der Jahrestagung der „Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie“ (VAAM) in Leipzig.

Zahn, S., Nagel, C., Machulla, A. & Soppa, J. (2019) 'Single-domain zinc finger μ -proteins in *Haloferax volcanii*', Posterpräsentation auf der *Gordon Research Conference on Archaea: Ecology, Metabolism and Molecular Biology* in Les Diablerets, Schweiz.

Zahn, S., Nagel, C., Machulla, A. & Soppa, J. (2019) 'Single-domain zinc finger μ -proteins in *Haloferax volcanii*', Posterpräsentation auf der Jahrestagung der „Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie“ (VAAM) in Mainz.

Zahn, S., Nagel, C., Machulla, A. & Soppa, J. (2018) 'Single-domain zinc finger μ -proteins in *Haloferax volcanii*', Posterpräsentation auf der Jahrestagung der „Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie“ (VAAM) in Wolfsburg.

Anhang

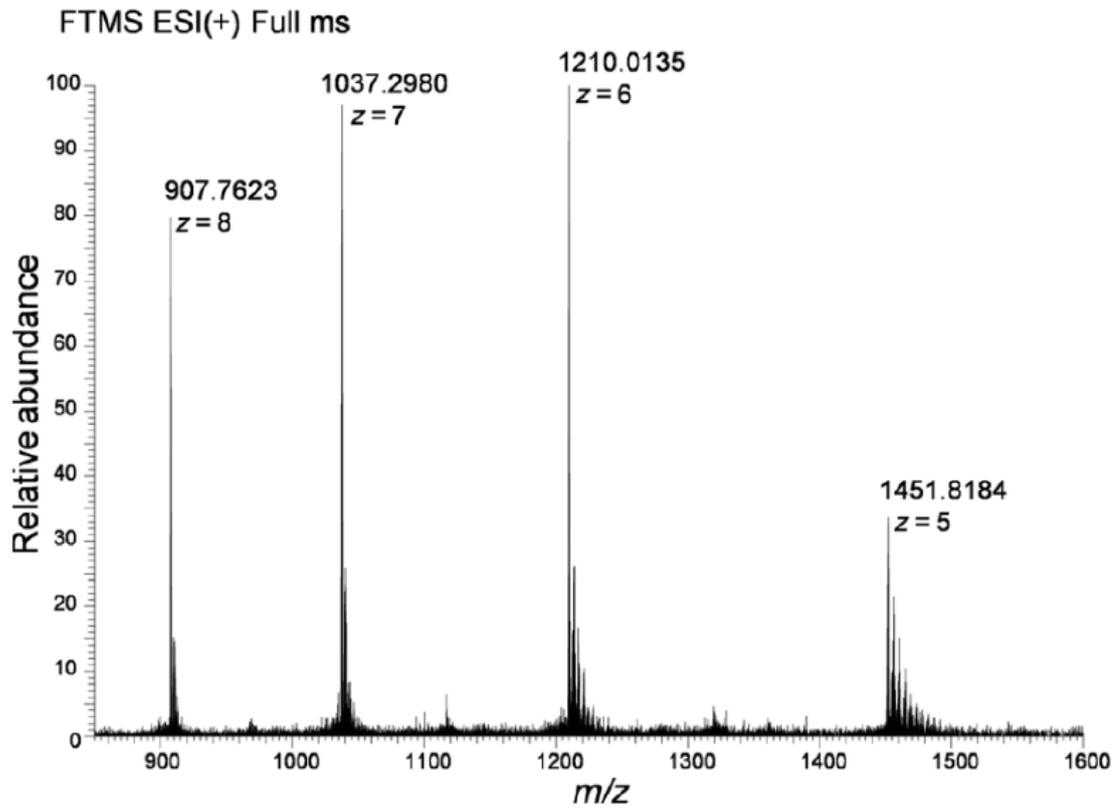


Abbildung A1: Massenspektrometrische Analyse von HVO_2753. Gezeigt ist die Messung des intakten Proteins mittels *direct infusion* in eine LTQ Orbitrap Velos. Die Masse des häufigsten Peaks und der zugehörigen Ladung sind am jeweiligen Peak vermerkt. Abbildung entnommen und modifiziert aus Zahn *et al.* (2020).

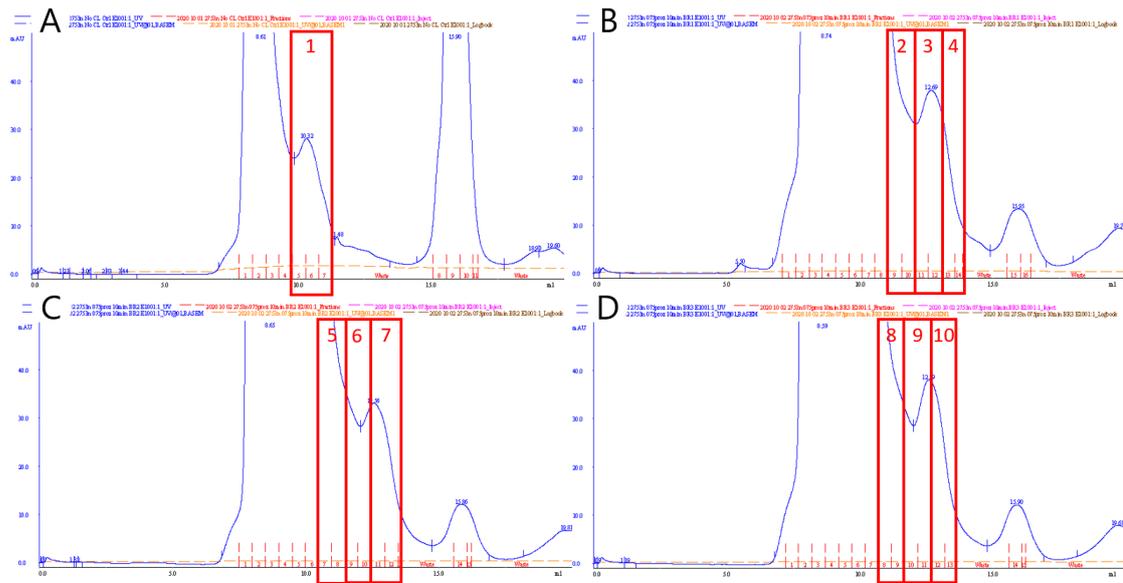


Abbildung A2: Chromatogramme der Größenausschlusschromatographie von HVO_2753n mit und ohne in vivo Crosslink. Eingesetzt wurden hier jeweils Elutionsfraktionen aus vorangegangenen Affinitätsaufreinigungen. Gezeigt sind die Chromatogramme einer Kontrolle ohne Crosslink (A) und von drei unabhängigen biologischen Replikaten BR1-3 (B-D) nach in vivo Crosslink. Als Säule kam hier die Superdex™ 75 Increase 10/300 GL zum Einsatz. Mit roten Kästen sind die Bereiche markiert, die der Fraktion mit der entsprechenden Nummer entspricht. Die Ergebnisse der MS-Analyse der Fraktionen 2, 5 und 8; 3, 6 und 9; 4, 7 und 10 wurden jeweils für die Auswertung vereinigt.

Tabelle A1: Ergebnistabelle der massenspektrometrischen Analyse von Fraktion 1. Gezeigt sind die Gene IDs der identifizierten Proteine mit ihrer Funktionsklasse (FC, siehe Abkürzungsverzeichnis), dem Namen des Proteins, der Coverage von BR1 in Prozent, der Anzahl gefundener Peptide von BR1 (# Peptides), der Anzahl an PSMs der drei unabhängigen biologischen Replikate (# PSMs (1-3)), dem Mittelwert der PSMs der biologischen Replikate (PSMs (mean)), der Anzahl an einzigartigen Peptiden (# Unique Peptides), der Anzahl an Aminosäuren (# AAs), das entsprechende Molekulargewicht (MW) in Kilodalton und der berechnete pI-Wert (calc. pI). In dunklerem Blau hinterlegt sind alle Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 23 und 35 kDa.

Gene ID	FC	Protein Name	Coverage [%]	# Peptides	# PSMs (1)	# PSMs (2)	# PSMs (3)	PSMs (mean)	# Unique Peptides	# AAs	MW [kDa]	calc. pI
HVO_2040	GEN	GalE family epimerase/dehydratase	80	45	66	13	18	32	34	306	33,8	4,51
HVO_2413	TL	Elongation factor 1-alpha	55	22	28	27	17	24	10	420	45,6	4,75

HVO_B0049	COM	Cobalt-precorrin-8 methylmutase	50	9	15	22	15	17	9	226	23,8	5
HVO_0743	GEN	Sulfatase	33	10	14	20	16	17	10	449	50,5	4,56
HVO_1545	CIM	Dihydroxyacetone kinase subunit DhaL	54	15	20	16	13	16	15	232	24,8	4,48
HVO_1727	TC	TATA-box-binding protein	62	11	12	17	16	15	10	186	19,9	4,36
HVO_2862	AA	Serine hydroxymethyltransferase	39	9	9	21	13	14	9	415	44,3	4,53
HVO_0321	TL	Peptide chain release factor subunit 1	23	6	6	21	15	14	6	414	46,6	4,83
HVO_0158	TC	TATA-box-binding protein 1	49	7	10	23	8	14	6	189	20,3	4,22
HVO_0388	MIS	Ribonuclease R	16	4	4	23	14	14	4	439	50,3	4,73
HVO_0240	REG	Lrp/AsnC family transcription regulator	65	14	16	12	12	13	12	152	16,9	4,39
HVO_0400	CHY	Uncharacterized protein	79	14	14	14	11	13	14	126	13,9	4,68
HVO_0009	AA	Tryptophanase	19	6	8	15	14	12	6	448	48,5	4,83
HVO_0104	RRR	DNA repair and recombination protein Rada	39	10	12	15	9	12	10	343	37,3	4,64
HVO_2204	MIS	Tubulin-like protein CetZ1	21	7	8	16	11	12	7	395	42	4,68
HVO_2029	REG	AsnC family transcriptional regulator	63	9	12	10	12	11	7	153	16,9	4,21
HVO_2561	TL	50S ribosomal protein L2	42	7	9	11	13	11	7	241	25,6	10,4
HVO_0859	MIS	Fe-S cluster assembly ATPase SufC	38	11	12	8	13	11	11	301	33,4	4,35
HVO_1631	MIS	S-adenosyl-L-methionine:L-histidine 3-amino-3-carboxypropyltransferase	31	8	11	10	12	11	8	344	39,1	4,73
HVO_0581	MIS	Cell division protein FtsZ 2	27	6	7	17	9	11	6	400	42,5	4,75
HVO_1133	GEN	HTH domain protein	67	10	13	7	12	11	10	101	11,7	4,58
HVO_2588	CIM	Isocitrate dehydrogenase [NADP]	15	5	5	17	10	11	5	419	45,8	4,59
HVO_0292	RRR	Replication factor A	26	6	6	13	12	10	6	311	34,6	4,31
HVO_A0507	AA	1,2-phenylacetyl-CoA epoxidase subunit A	33	8	10	10	11	10	8	314	35,9	5,19
HVO_1572	RRR	DNA gyrase subunit B	16	6	6	14	11	10	6	639	71,2	4,83
HVO_2564	TL	50S ribosomal protein L3	25	8	9	10	10	10	8	338	37,2	6,68
HVO_1314	MIS	5'-nucleotidase SurE	19	4	6	10	12	9	4	263	27,8	4,48
HVO_0083	MIS	Nitrogen regulatory protein P-II	80	8	9	9	8	9	8	123	12,9	5,01
HVO_1299	REG	Cro/C1 family transcription regulator	36	6	9	9	8	9	6	173	18,9	4,84
HVO_0880	CHY	Phosphoserine phosphatase	27	4	4	15	7	9	4	307	36,3	4,74
HVO_0433	MIS	F420H2:NADP oxidoreductase	43	7	7	8	10	8	7	222	23,3	4,72
HVO_2748	TC	DNA-directed RNA polymerase subunit F	44	5	6	8	9	8	5	118	13,6	4,49
HVO_1145	TL	30S ribosomal protein S3Ae	54	10	11	7	5	8	10	220	24,8	4,86
HVO_2563	TL	50S ribosomal protein L4	56	11	11	4	8	8	11	248	27	6,44
HVO_1925	GEN	GTP-binding protein	26	5	5	10	8	8	5	325	36,5	4,72
HVO_2724	RMT	Ribonuclease J	23	5	5	11	6	7	5	450	50,1	5,4
HVO_0019	GEN	Putative S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase (Homolog to 24-sterol C-methyltransferase)	23	5	7	10	4	7	5	226	25,6	4,64
HVO_B0040	REG	ArcR family transcription regulator	35	8	8	7	6	7	8	251	27,2	5,3
HVO_0476	GEN	UCP015877 family protein	28	7	9	6	4	6	7	218	23,8	4,6
HVO_1454	NUM	Aspartate carbamoyltransferase	63	10	11	5	3	6	10	304	33,7	4,92
HVO_0911	GEN	GTP-binding protein Drg	25	5	5	8	6	6	5	369	40,5	4,81
HVO_0392	GEN	Putative SepF protein	55	6	6	7	5	6	6	118	12,6	4,56
HVO_2542	TL	50S ribosomal protein L15	44	9	9	4	5	6	9	165	17,8	4,93
HVO_2419	LIP	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase	9	3	3	6	9	6	3	445	50,1	4,64
HVO_1082	GEN	PyrE-like protein	27	6	6	6	5	6	6	210	22,3	4,42
HVO_2496	NUM	Adenylate kinase	37	8	9	3	5	6	8	208	23,1	4,25
HVO_1004	CHY	Uncharacterized protein	49	10	11	3	2	5	10	94	10	4,03
HVO_1560	GEN	UPF0212 protein HVO_1560	30	3	4	6	6	5	3	119	12,9	4,37

HVO_1473	GEN	UPF0058 family protein	43	2	3	7	5	5	2	92	10,3	5,26
HVO_1344	MIS	RNA-associated protein	27	5	6	5	4	5	5	238	26,5	4,51
HVO_1660	MIS	Diadenylate cyclase	11	2	2	8	5	5	2	269	28,9	4,73
HVO_1140	LIP	Acyl-CoA dehydrogenase	16	5	5	4	6	5	5	380	41,2	4,55
HVO_2650	GEN	4-hydroxybenzoate 3-monooxygenase	7	2	2	6	7	5	2	461	50,7	4,73
HVO_0580	RMT	N-type ATP pyrophosphatase superfamily protein	17	4	4	7	3	5	4	321	36,1	5,01
HVO_2313	COM	Heme biosynthesis protein NirGH	15	2	2	4	8	5	2	353	39,6	4,64
HVO_A0509	AA	1,2-phenylacetyl-CoA epoxidase subunit C	21	6	6	3	4	4	6	272	31,3	4,4
HVO_2345	GEN	NADH oxidase	11	2	2	5	6	4	2	413	45,8	4,45
HVO_0874	TC	Beta-lactamase domain protein	19	10	0	10	3	4	10	640	71,9	5,14
HVO_1633	GEN	UPF0342 family protein	40	4	4	5	3	4	4	124	13,7	4,16
HVO_2559	TL	50S ribosomal protein L22	44	4	4	4	4	4	4	153	16,9	5,6
HVO_0354	TL	30S ribosomal protein S7	47	8	8	2	2	4	8	204	22,6	5,14
HVO_0309	COM	Membrane protein	36	4	4	3	5	4	4	207	23,7	4,97
HVO_1507	AA	Acetolactate synthase small subunit	19	2	3	7	2	4	2	218	23,7	4,94
HVO_0044	AA	Acetylglutamate/acetylaminoadipate kinase	13	3	3	4	5	4	3	327	33,2	4,49
HVO_1076	CHM	Sugar nucleotidyltransferase	17	4	4	4	4	4	4	322	35,8	4,2
HVO_2932	GEN	Translation-associated GTPase	16	3	3	6	3	4	3	396	43,5	4,51
HVO_0861	GEN	SufB domain protein	36	9	0	9	3	4	9	402	44,7	4,23
HVO_B0382	TC	TATA-box-binding protein	18	4	5	3	3	4	3	188	20,1	4,12
HVO_2242	TL	Translation initiation factor IF-2 subunit beta	28	3	3	2	6	4	3	202	22,2	5,11
HVO_1444	LIP	3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase	12	3	3	5	3	4	3	286	30,8	4,46
HVO_0717	MIS	Cell division protein FtsZ	10	2	2	6	3	4	2	379	39,8	4,4
HVO_B0062	COM	Probable cobalt-precorrin-6B C(15)-methyltransferase (decarboxylating)	41	5	0	5	5	3	5	184	19,8	5,3
HVO_1899	TC	DNA-directed RNA polymerase subunit E	18	3	5	2	3	3	3	190	21	4,74
HVO_0180	RMT	Ribosomal RNA large subunit methyltransferase E	25	4	5	2	3	3	4	259	28,3	4,7
HVO_B0114	REG	IcIR family transcription regulator	15	3	3	3	4	3	3	252	28,4	5,44
HVO_B0059	COM	Cobalt-precorrin-5A hydrolase	21	6	0	7	3	3	6	326	34,5	4,51
HVO_1478	TC	Transcription initiation factor IIB	11	2	2	3	5	3	2	317	35,7	5,47
HVO_0478	CIM	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	8	2	2	4	4	3	2	355	38,2	4,68
HVO_0860	GEN	FeS assembly protein SufB	24	7	0	7	3	3	7	476	53,2	4,69
HVO_1946	TL	Protein translation factor SUI1 homolog	47	3	3	4	2	3	3	97	10,8	4,53
HVO_1857	GEN	DNA-binding protein C498_04555	32	2	2	5	2	3	2	120	13,8	8,44
HVO_0769	GEN	Uncharacterized protein	21	3	0	3	6	3	3	134	14,8	4,32
HVO_0889	GEN	FAD-dependent oxidoreductase	23	3	4	2	3	3	3	214	21,8	3,89
HVO_0867	GEN	HD family hydrolase	17	3	0	3	6	3	3	230	26,2	4,78
HVO_B0058	COM	Cobalt-factor-III C17-methyltransferase	7	1	2	4	3	3	1	294	31,8	4,4
HVO_0665	COM	Thiamine thiazole synthase	14	3	3	4	2	3	3	307	32,4	4,55
HVO_0720	GEN	Small CPxCG-related zinc finger protein	46	5	0	5	3	3	5	100	11,3	5,03
HVO_1303	REG	Lrp/AsnC family transcription regulator	20	2	3	3	2	3	2	142	15,4	4,7
HVO_2784	TL	30S ribosomal protein S13	20	3	3	0	5	3	3	167	18,9	5,17
HVO_2558	TL	30S ribosomal protein S3	26	5	0	6	2	3	5	304	33,4	4,06
HVO_2256	GEN	Uncharacterized protein	16	6	0	6	2	3	6	462	54,9	4,89
HVO_1131	MIS	UPF0434 family protein	25	1	2	2	3	2	1	61	6,9	3,99
HVO_B0016	CHY	Uncharacterized protein	47	2	2	3	2	2	2	76	8,6	5,48

HVO_1042	TC	DNA-directed RNA polymerase subunit L	21	1	1	4	2	2	1	96	10,4	4,28
HVO_2869	REG	PadR family transcription regulator	27	3	4	0	3	2	3	95	11,4	5,16
HVO_0213	GEN	Ferritin / Dps domain protein	34	2	2	2	3	2	2	150	16,9	4,28
HVO_2546	TL	50S ribosomal protein L19e	23	3	3	2	2	2	3	151	17,3	9,98
HVO_2873	RRR	Flap endonuclease 1	14	3	3	2	2	2	3	326	36,4	4,4
HVO_0317	EM	V-type ATP synthase beta chain	5	2	2	3	2	2	2	468	51,9	4,25
HVO_0407	CHY	Uncharacterized protein	37	4	0	4	2	2	4	124	13,4	4,44
HVO_1792	REG	Lrp/AsnC family transcription regulator	20	3	0	3	3	2	3	162	18,1	4,34
HVO_0536	MIS	Ferritin	23	2	2	2	2	2	2	176	19,9	4,5
HVO_2552	TL	30S ribosomal protein S4e	17	3	3	0	3	2	3	247	26,6	4,58
HVO_3007	CIM	Malate dehydrogenase	11	2	2	2	2	2	2	304	32,6	4,4
HVO_0239	AA	Glutamine synthetase	18	4	0	4	2	2	4	456	50,5	4,56
HVO_0346	TC	DNA-directed RNA polymerase subunit H	23	1	1	3	1	2	1	75	8,5	5,03
HVO_1964	GEN	PRC domain protein	14	1	1	2	2	2	1	81	9	5,08
HVO_1691	GEN	PRC domain protein	13	1	1	1	3	2	1	97	10,8	4,28
HVO_1965	RMT	rRNA maturation endonuclease Nob1	38	2	0	2	3	2	2	152	16,8	4,7
HVO_2981	NUM	Uracil phosphoribosyltransferase	11	2	2	0	3	2	2	226	24,5	4,49
HVO_2861	CHY	Uncharacterized protein	18	2	2	3	0	2	2	275	29,1	4,27
HVO_2625	NUM	GMP synthase [glutamine-hydrolyzing] subunit B	21	3	0	3	2	2	3	305	33,8	4,74
HVO_0999	GEN	DRTGG domain protein	17	3	0	3	2	2	3	378	39,8	4,44
HVO_0455	CHP	Thermosome subunit 2	6	3	0	3	2	2	3	557	59,3	4,37
HVO_0196	CHY	Uncharacterized protein	31	2	2	1	1	1	2	55	6,2	4,81
HVO_2257	CHY	Uncharacterized protein	32	1	2	1	1	1	1	56	6,6	5,03
HVO_2682	MIS	Dodecin	17	1	1	1	2	1	1	70	7,7	4,22
HVO_A0508	AA	PacF protein	49	2	2	2	0	1	2	106	11,9	4,89
HVO_1090	TC	Putative transcription factor (Homolog to RNA polymerase III subunit RPC34)	13	2	0	2	2	1	2	117	13,1	4,41
HVO_2300	TL	Translation initiation factor 5A	7	2	2	2	0	1	2	124	14,2	5,22
HVO_0313	EM	V-type ATP synthase subunit E	24	2	0	2	2	1	2	194	22	4,31
HVO_2916	GEN	Short-chain family oxidoreductase	15	2	0	2	2	1	2	252	26	4,39
HVO_0511	CIM	NAD-dependent glucose-6-phosphate dehydrogenase	11	2	2	2	0	1	2	262	29,3	4,78
HVO_2057	CHM	Low-salt glycan biosynthesis nucleotidyltransferase Agl11	11	2	0	2	2	1	2	357	37,8	4,44
HVO_A0522	LIP	Acetyl-CoA C-acyltransferase	7	2	0	2	2	1	2	387	39,2	4,77
HVO_2350	GEN	YyaL family protein	10	2	0	2	2	1	2	552	58,8	4,59
HVO_0758	GEN	Uncharacterized protein	29	1	1	1	1	1	1	56	6,5	7,75
HVO_2557	TL	50S ribosomal protein L29	27	1	1	2	0	1	1	70	7,7	4,36
HVO_2752	TL	Elongation factor 1-beta	30	1	1	1	1	1	1	88	9,2	4,16
HVO_A0138	CHY	Uncharacterized protein	26	1	1	1	0	1	1	61	6,9	4,96
HVO_2942	CHY	Uncharacterized protein	15	1	0	1	1	1	1	65	7,4	5,4

Tabelle A2: Ergebnistabelle der massenspektrometrischen Analyse von Fraktion 2.

Gezeigt sind die Gene IDs der identifizierten Proteine mit ihrer Funktionsklasse (FC, siehe Abkürzungsverzeichnis), dem Namen des Proteins, der Coverage von BR1 in Prozent, der Anzahl gefundener Peptide von BR1 (# Peptides), der Anzahl an PSMs der drei unabhängigen biologischen Replikate (# PSMs (1-3)), dem Mittelwert der PSMs der biologischen Replikate (PSMs (mean)), der Anzahl an einzigartigen Peptiden (# Unique Peptides), der Anzahl an Aminosäuren (# AAs), das entsprechende Molekulargewicht (MW) in Kilodalton und der berechnete pI-Wert (calc. pI). In dunklerem Blau hinterlegt sind alle Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 15 und 23 kDa.

Gene ID	FC	Protein Name	Coverage [%]	# Peptides	# PSMs (1)	# PSMs (2)	# PSMs (3)	PSMs (mean)	# Unique Peptides	# AAs	MW [kDa]	calc. pI
HVO_2040	GEN	GalE family epimerase/dehydratase	58	25	42	34	37	38	18	306	33,8	4,51
HVO_1133	GEN	HTH domain protein	73	15	23	29	24	25	15	101	11,7	4,58
HVO_1004	CHY	Uncharacterized protein	49	20	35	14	18	22	20	94	10	4,03
HVO_1545	CIM	Dihydroxyacetone kinase subunit DhaL	47	7	12	25	22	20	7	232	24,8	4,48
HVO_0354	TL	30S ribosomal protein S7	35	7	8	11	11	10	7	204	22,6	5,14
HVO_1454	NUM	Aspartate carbamoyltransferase	22	5	6	11	13	10	5	304	33,7	4,92
HVO_0476	GEN	UCP015877 family protein	45	8	10	8	9	9	8	218	23,8	4,6
HVO_2542	TL	50S ribosomal protein L15	47	10	11	7	8	9	10	165	17,8	4,93
HVO_0400	CHY	Uncharacterized protein	52	10	10	10	5	8	10	126	13,9	4,68
HVO_1576	GEN	UDP-glucose 4-epimerase	19	8	9	7	9	8	1	306	33,9	4,51
HVO_2748	TC	DNA-directed RNA polymerase subunit F	55	5	7	8	8	8	5	118	13,6	4,49
HVO_1727	TC	TATA-box-binding protein	39	5	7	6	10	8	5	186	19,9	4,36
HVO_2496	NUM	Adenylate kinase	25	4	6	9	8	8	4	208	23,1	4,25
HVO_2561	TL	50S ribosomal protein L2	19	3	3	11	8	7	3	241	25,6	10,4
HVO_1857	GEN	DNA-binding protein C498_04555	54	6	9	5	6	7	6	120	13,8	8,44
HVO_0889	GEN	FAD-dependent oxidoreductase	20	3	6	8	6	7	3	214	21,8	3,89
HVO_0240	REG	Lrp/AsnC family transcription regulator	21	3	3	8	8	6	3	152	16,9	4,39
HVO_1473	GEN	UPF0058 family protein	58	3	3	9	6	6	3	92	10,3	5,26
HVO_2242	TL	Translation initiation factor IF-2 subunit beta	35	6	7	3	8	6	6	202	22,2	5,11
HVO_1560	GEN	UPF0212 protein HVO_1560	38	3	3	7	7	6	3	119	12,9	4,37
HVO_0291	RRR	Rpa-associated protein	44	6	6	5	6	6	6	196	22	4,42
HVO_1145	TL	30S ribosomal protein S3Ae	29	5	5	5	7	6	5	220	24,8	4,86
HVO_0158	TC	TATA-box-binding protein 1	22	3	4	5	7	5	3	189	20,3	4,22
HVO_2563	TL	50S ribosomal protein L4	30	4	4	6	6	5	4	248	27	6,44
HVO_2029	REG	AsnC family transcriptional regulator	21	2	2	5	8	5	2	153	16,9	4,21
HVO_1148	TL	30S ribosomal protein S15	32	4	7	3	5	5	4	155	17,5	4,91
HVO_0180	RMT	Ribosomal RNA large subunit methyltransferase E	11	2	3	7	5	5	2	259	28,3	4,7
HVO_2564	TL	50S ribosomal protein L3	11	2	3	6	6	5	2	338	37,2	6,68
HVO_2992	AA	Phosphoribosyl-AMP cyclohydrolase	25	6	6	3	5	5	6	122	13,6	4,5
HVO_2546	TL	50S ribosomal protein L19e	26	5	6	3	5	5	5	151	17,3	9,98
HVO_0392	GEN	Putative SepF protein	53	5	5	5	3	4	5	118	12,6	4,56
HVO_2553	TL	50S ribosomal protein L24	47	7	7	0	6	4	7	118	13,4	4,73

HVO_1827	TL	30S ribosomal protein S6e	36	4	7	2	4	4	4	133	13,9	4,32
HVO_0719	TC	Transcription elongation factor Spt5	24	3	4	4	5	4	3	150	16,3	4,5
HVO_0491	GEN	FMN-binding domain protein	29	4	4	4	5	4	4	153	17,3	4,67
HVO_0536	MIS	Ferritin	44	3	5	4	4	4	3	176	19,9	4,5
HVO_0309	COM	Membrane protein	10	2	2	5	6	4	2	207	23,7	4,97
HVO_0859	MIS	Fe-S cluster assembly ATPase SufC	8	2	2	8	3	4	2	301	33,4	4,35
HVO_0196	CHY	Uncharacterized protein	31	4	5	3	4	4	4	55	6,2	4,81
HVO_1946	TL	Protein translation factor SUI1 homolog	35	3	3	5	4	4	3	97	10,8	4,53
HVO_2559	TL	50S ribosomal protein L22	37	3	3	5	4	4	3	153	16,9	5,6
HVO_2784	TL	30S ribosomal protein S13	17	2	2	6	4	4	2	167	18,9	5,17
HVO_1082	GEN	PyrE-like protein	20	3	3	4	5	4	3	210	22,3	4,42
HVO_2551	TL	50S ribosomal protein L5	18	2	3	3	5	4	2	172	19,1	4,78
HVO_1344	MIS	RNA-associated protein	12	3	3	3	5	4	3	238	26,5	4,51
HVO_B0114	REG	IcIR family transcription regulator	9	2	2	3	6	4	2	252	28,4	5,44
HVO_2783	TL	30S ribosomal protein S4	21	3	4	3	3	3	3	175	20,1	5,24
HVO_1572	RRR	DNA gyrase subunit B	4	2	2	3	5	3	2	639	71,2	4,83
HVO_A0206	MIS	CRISPR-associated protein Cas8b	5	3	3	2	5	3	3	717	79,3	4,6
HVO_0651	CP	Prefoldin subunit beta	22	2	3	3	3	3	2	127	14	4,07
HVO_2548	TL	50S ribosomal protein L6	66	7	7	0	2	3	7	178	19,6	4,68
HVO_0579	CHY	Uncharacterized protein	20	3	3	2	4	3	3	214	23,4	4,63
HVO_1303	REG	Lrp/AsnC family transcription regulator	20	2	2	3	3	3	2	142	15,4	4,7
HVO_2758	TL	50S ribosomal protein L11	23	3	3	2	3	3	3	159	16,8	4,04
HVO_2413	TL	Elongation factor 1-alpha	11	5	5	0	3	3	1	420	45,6	4,75
HVO_2922	GEN	Uncharacterized protein	50	2	2	2	3	2	2	60	6,7	6,54
HVO_1964	GEN	PRC domain protein	47	3	3	2	2	2	3	81	9	5,08
HVO_0213	GEN	Ferritin / Dps domain protein	25	2	2	3	2	2	2	150	16,9	4,28
HVO_0484	TL	50S ribosomal protein L10e	22	3	3	2	2	2	3	176	19,8	8,72
HVO_0027	GEN	Transcription anti-termination factor	22	2	3	2	2	2	2	199	21	4,16
HVO_B0016	CHY	Uncharacterized protein	39	2	2	2	2	2	2	76	8,6	5,48
HVO_1691	GEN	PRC domain protein	28	3	3	1	2	2	3	97	10,8	4,28
HVO_0360	TL	30S ribosomal protein S10	24	2	2	2	2	2	2	102	11,5	4,88
HVO_2373	TL	30S ribosomal protein S8e	30	4	4	0	2	2	4	125	13,6	10,4 8
HVO_1444	LIP	3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase	7	2	2	2	2	2	2	286	30,8	4,46
HVO_0758	GEN	Uncharacterized protein	29	1	1	2	2	2	1	56	6,5	7,75
HVO_2869	REG	PadR family transcription regulator	36	3	3	0	2	2	3	95	11,4	5,16
HVO_0070	GEN	NifU-like domain-containing protein	19	3	3	0	2	2	3	125	13,2	4,45
HVO_2557	TL	50S ribosomal protein L29	29	1	1	2	1	1	1	70	7,7	4,36
HVO_0387	CHY	Uncharacterized protein	13	1	1	1	2	1	1	79	8,9	4,06
HVO_1087	GEN	UspA domain protein	13	2	2	0	2	1	2	141	15,2	4,98
HVO_2475	TL	30S ribosomal protein S17e	19	1	1	1	1	1	1	62	7	9,63
HVO_2942	CHY	Uncharacterized protein	15	1	1	1	1	1	1	65	7,4	5,4
HVO_1611	CHY	Uncharacterized protein	18	1	1	1	1	1	1	67	7,5	4,59
HVO_1515	GEN	CopG domain protein	14	1	1	1	1	1	1	70	7,8	4,49
HVO_2752	TL	Elongation factor 1-beta	11	1	1	2	0	1	1	88	9,2	4,16 10,9
HVO_2749	TL	50S ribosomal protein L21e	22	2	2	0	1	1	2	96	10,6	5
HVO_1075	GEN	Putative transcriptional regulator containing an HTH domain fused to a Zn-ribbon	10	1	1	1	0	1	1	99	10,7	4,91

Tabelle A3: Ergebnistabelle der massenspektrometrischen Analyse von Fraktion 3.

Gezeigt sind die Gene IDs der identifizierten Proteine mit ihrer Funktionsklasse (FC, siehe Abkürzungsverzeichnis), dem Namen des Proteins, der Coverage von BR1 in Prozent, der Anzahl gefundener Peptide von BR1 (# Peptides), der Anzahl an PSMs der drei unabhängigen biologischen Replikate (# PSMs (1-3)), dem Mittelwert der PSMs der biologischen Replikate (PSMs (mean)), der Anzahl an einzigartigen Peptiden (# Unique Peptides), der Anzahl an Aminosäuren (# AAs), das entsprechende Molekulargewicht (MW) in Kilodalton und der berechnete pI-Wert (calc. pI). In dunklerem Blau hinterlegt sind alle Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 9 und 15 kDa.

Gene ID	FC	Protein Name	Coverage [%]	# Peptides	# PSMs (1)	# PSMs (2)	# PSMs (3)	PSMs (mean)	# Unique Peptides	# AAs	MW [kDa]	calc. pI
HVO_1004	CHY	Uncharacterized protein	51	39	74	21	40	45	39	94	10	4,03
HVO_1858	TL	30S ribosomal protein S19e	96	39	52	7	50	36	39	151	16,7	4,84
HVO_1473	GEN	UPF0058 family protein	93	26	48	9	36	31	26	92	10,3	5,26
HVO_2560	TL	30S ribosomal protein S19P	76	45	52	0	22	25	45	140	16	5,57
HVO_2559	TL	50S ribosomal protein L22	68	22	31	6	21	19	22	153	16,9	5,6
HVO_0400	CHY	Uncharacterized protein	85	25	28	5	22	18	25	126	13,9	4,68
HVO_1133	GEN	HTH domain protein	67	13	16	9	22	16	13	101	11,7	4,58
HVO_1965	RMT	rRNA maturation endonuclease Nob1	79	18	25	5	10	13	18	152	16,8	4,7
HVO_1827	TL	30S ribosomal protein S6e	76	12	21	6	11	13	12	133	13,9	4,32
HVO_2553	TL	50S ribosomal protein L24	49	12	14	11	11	12	12	118	13,4	4,73
HVO_2737	TL	50S ribosomal protein L7Ae	88	25	28	0	7	12	25	120	12,6	4,16
HVO_2548	TL	50S ribosomal protein L6	86	16	22	0	12	11	16	178	19,6	4,68
HVO_2040	GEN	GalE family epimerase/dehydratase	52	16	18	4	12	11	16	306	33,8	4,51
HVO_2869	REG	PadR family transcription regulator	81	12	13	4	11	9	12	95	11,4	5,16
HVO_1857	GEN	DNA-binding protein C498_04555	62	9	11	6	11	9	9	120	13,8	8,44
HVO_2749	TL	50S ribosomal protein L21e	65	11	14	2	10	9	11	96	10,6	10,9
HVO_0438	EM	Thioredoxin	96	12	16	0	9	8	12	89	10	5
HVO_2992	AA	Phosphoribosyl-AMP cyclohydrolase	39	10	15	2	8	8	10	122	13,6	4,5
HVO_0476	GEN	UCP015877 family protein	40	6	9	5	10	8	6	218	23,8	4,6
HVO_2300	TL	Translation initiation factor 5A	60	12	15	0	8	8	12	124	14,2	5,22
HVO_0353	TL	30S ribosomal protein S12	58	12	14	0	9	8	12	142	15,5	9,91
HVO_2758	TL	50S ribosomal protein L11	58	11	11	3	9	8	11	159	16,8	4,04
HVO_0491	GEN	FMN-binding domain protein	67	8	9	5	9	8	8	153	17,3	4,67
HVO_0720	GEN	Small CPxCG-related zinc finger protein	92	12	15	0	7	7	12	100	11,3	5,03
HVO_2373	TL	30S ribosomal protein S8e	54	10	14	3	5	7	10	125	13,6	10,4
HVO_2543	TL	50S ribosomal protein L30	42	10	15	0	7	7	10	154	17,1	8
HVO_1545	CIM	Dihydroxyacetone kinase subunit DhaL	35	6	6	5	11	7	6	232	24,8	4,48
HVO_1896	TL	30S ribosomal protein S24e	89	11	13	0	8	7	11	101	11,6	4,68
HVO_2545	TL	50S ribosomal protein L18	48	12	13	0	8	7	12	184	20,2	5,6
HVO_2542	TL	50S ribosomal protein L15	41	6	7	5	7	6	6	165	17,8	4,93
HVO_2752	TL	Elongation factor 1-beta	60	10	10	2	6	6	10	88	9,2	4,16

HVO_2899	GEN	Uncharacterized protein	#	10	16	0	2	6	10	87	9,8	4,45
HVO_1691	GEN	PRC domain protein	71	8	10	2	6	6	8	97	10,8	4,28
HVO_1946	TL	Protein translation factor SUI1 homolog	61	5	9	2	7	6	5	97	10,8	4,53
HVO_1148	TL	30S ribosomal protein S15	32	6	7	0	10	6	6	155	17,5	4,91
HVO_1087	GEN	UspA domain protein	37	6	6	2	8	5	6	141	15,2	4,98
HVO_2778	TL	50S ribosomal protein L13	43	6	7	3	6	5	6	145	16	5,43
HVO_0027	GEN	Transcription anti-termination factor	69	7	8	0	8	5	7	199	21	4,16
HVO_1377	GEN	UPF0145 protein C498_11858	64	6	7	0	8	5	6	124	12,8	4,37
HVO_0070	GEN	NifU-like domain-containing protein	42	5	6	4	5	5	5	125	13,2	4,45
HVO_0196	CHY	Uncharacterized protein	31	4	6	1	7	5	4	55	6,2	4,81
HVO_0654	TL	50S ribosomal protein L43e	56	5	7	1	6	5	5	89	9,9	9,98
HVO_A0508	AA	PacF protein	64	6	7	0	7	5	6	106	11,9	4,89
HVO_2783	TL	30S ribosomal protein S4	15	4	4	4	6	5	4	175	20,1	5,24
HVO_0889	GEN	FAD-dependent oxidoreductase	32	4	4	5	5	5	4	214	21,8	3,89
HVO_2557	TL	50S ribosomal protein L29	90	6	7	1	5	4	6	70	7,7	4,36
HVO_2748	TC	DNA-directed RNA polymerase subunit F	47	4	5	2	6	4	4	118	13,6	4,49
HVO_0354	TL	30S ribosomal protein S7	30	4	4	2	7	4	4	204	22,6	5,14
HVO_0392	GEN	Putative SepF protein	53	6	7	0	5	4	6	118	12,6	4,56
HVO_2779	TL	50S ribosomal protein L18e	59	4	5	0	7	4	4	116	12,7	8,5
HVO_1574	GEN	MutT/nudix family protein	72	8	8	0	4	4	8	156	17,6	4,98
HVO_B0066	REG	Lrp/AsnC family transcription regulator	58	8	8	0	4	4	8	164	18,5	4,41
HVO_0653	TC	DNA-directed RNA polymerase subunit P	50	3	5	1	5	4	3	44	5,1	8,19
HVO_0360	TL	30S ribosomal protein S10	63	5	5	2	4	4	5	102	11,5	4,88
HVO_2941	MIS	Nonhistone chromosomal protein	53	7	8	0	3	4	7	104	11,6	5,6
HVO_2995	EM	Ferredoxin (2Fe-2S)	43	6	8	0	3	4	6	129	14,4	3,98
HVO_2029	REG	AsnC family transcriptional regulator	46	5	5	0	6	4	3	153	16,9	4,21
HVO_2551	TL	50S ribosomal protein L5	38	4	4	2	5	4	4	172	19,1	4,78
HVO_0536	MIS	Ferritin	23	2	4	3	4	4	2	176	19,9	4,5
HVO_B0016	CHY	Uncharacterized protein	67	4	4	2	4	3	4	76	8,6	5,48
HVO_0659	TL	Peptidyl-tRNA hydrolase	48	5	7	0	3	3	5	112	11,9	6,32
HVO_A0631	CHY	Uncharacterized protein	43	5	6	0	4	3	5	122	13,7	6,16
HVO_2546	TL	50S ribosomal protein L19e	39	5	5	0	5	3	5	151	17,3	9,98
HVO_2922	GEN	Uncharacterized protein	73	4	4	2	3	3	4	60	6,7	6,54
HVO_2010	GEN	Uncharacterized protein	34	3	3	0	6	3	3	102	11,4	4,92
HVO_1342	EM	Thioredoxin	43	4	4	0	5	3	4	111	12,1	4,27
HVO_1560	GEN	UPF0212 protein HVO_1560	30	2	3	2	4	3	2	119	12,9	4,37
HVO_0719	TC	Transcription elongation factor Spt5	37	3	3	2	4	3	3	150	16,3	4,5
HVO_2222	MIS	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	37	5	5	0	4	3	5	172	18,7	4,44
HVO_1727	TC	TATA-box-binding protein	23	3	4	0	5	3	3	186	19,9	4,36
HVO_0291	RRR	Rpa-associated protein	15	2	2	0	7	3	2	196	22	4,42
HVO_0448	AA	Imidazole glycerol phosphate synthase subunit HisH	27	4	5	0	4	3	4	219	23,4	4,23
HVO_2942	CHY	Uncharacterized protein	80	4	5	1	2	3	4	65	7,4	5,4
HVO_1964	GEN	PRC domain protein	63	4	4	2	2	3	4	81	9	5,08
HVO_1075	GEN	Putative transcriptional regulator containing an HTH domain fused to a Zn-ribbon	47	3	3	1	4	3	3	99	10,7	4,91
HVO_2782	TL	30S ribosomal protein S11	43	5	6	0	2	3	5	130	13,4	8,56
HVO_0651	CP	Prefoldin subunit beta	24	2	2	3	3	3	2	127	14	4,07
HVO_0184	GEN	Uncharacterized protein	74	3	3	0	4	2	3	58	6,7	4,67
HVO_1131	MIS	UPF0434 family protein	25	3	3	0	4	2	3	61	6,9	3,99
HVO_0435	AA	Phosphoribosyl-ATP pyrophosphatase	31	2	2	1	4	2	2	100	11,3	4,22

HVO_2403	AA	Probable glycine cleavage system H protein	7	2	2	2	3	2	2	126	13,9	3,75
HVO_0107	MIS	FeS assembly protein SufA	31	3	3	0	4	2	3	142	15,5	4,56
HVO_1455	NUM	Aspartate carbamoyltransferase regulatory chain	49	5	5	0	2	2	5	155	16,7	4,88
HVO_A0636	GEN	YbaK/epsC protein	22	3	3	0	4	2	3	158	16,7	4,54
HVO_0158	TC	TATA-box-binding protein 1	20	2	2	0	5	2	2	189	20,3	4,22
HVO_2242	TL	Translation initiation factor IF-2 subunit beta	20	2	2	2	3	2	2	202	22,2	5,11
HVO_0827	GEN	MTH865 family protein	44	3	3	0	3	2	3	85	9,3	4,26
HVO_1042	TC	DNA-directed RNA polymerase subunit L	36	3	3	0	3	2	3	96	10,4	4,28
HVO_2796	CHY	Uncharacterized protein	23	3	3	0	3	2	3	106	12	4,56
HVO_2632	TC	DNA-directed RNA polymerase subunit M2	35	4	4	0	2	2	4	109	12,2	4,34
HVO_1081	MIS	Glutaredoxin	48	3	3	0	3	2	3	114	12,8	4,23
HVO_0830	CIM	Methylmalonyl-CoA mutase subunit B	42	4	4	0	2	2	4	139	14,9	4,65
HVO_0450	CHP	Hsp20-type molecular chaperone	25	3	3	0	3	2	3	135	15,2	4,34
HVO_2699	MIS	Peroxiredoxin	30	4	4	0	2	2	4	152	16,7	4,09
HVO_0390	GEN	RNA-binding protein	35	4	4	0	2	2	4	159	16,7	4,3
HVO_0484	TL	50S ribosomal protein L10e	40	4	4	0	2	2	4	176	19,8	8,72
HVO_0134	MIS	KH domain protein	19	3	3	0	3	2	3	180	19,9	4,94
HVO_3014	MIS	Origin-associated GTP-binding protein OapA	12	2	2	0	4	2	2	213	24	5,01
HVO_0602	AA	3-dehydroquinate dehydratase	11	2	2	0	4	2	2	247	27,3	4,51
HVO_C0032	HY	Uncharacterized protein	33	4	4	0	1	2	4	57	6,5	3,93
HVO_0758	GEN	Uncharacterized protein	30	1	1	0	4	2	1	56	6,5	7,75
HVO_2562	TL	50S ribosomal protein L23	45	3	3	0	2	2	3	83	9,4	5,48
HVO_A0444	CHY	Uncharacterized protein	35	3	3	0	2	2	3	119	12,9	4,45
HVO_0083	MIS	Nitrogen regulatory protein P-II	32	2	2	0	3	2	2	123	12,9	5,01
HVO_3013	MIS	Origin-associated GTP-binding protein OapB	21	2	2	0	3	2	2	130	14,3	4,56
HVO_1825	CHY	Uncharacterized protein	47	3	3	0	2	2	3	142	15,3	4,17
HVO_1303	REG	Lrp/AsnC family transcription regulator	20	2	2	0	3	2	2	142	15,4	4,7
HVO_1072	NUM	HGPRTase-like protein	12	2	2	0	3	2	2	188	20,5	4,6
HVO_2449	GEN	DUF1684 family protein	23	2	2	0	3	2	2	186	21,3	4,22
HVO_0346	TC	DNA-directed RNA polymerase subunit H	23	1	1	1	2	1	1	75	8,5	5,03
HVO_2866	CHY	Uncharacterized protein	14	1	1	1	2	1	1	77	8,7	5,2
HVO_2677	CHY	Uncharacterized protein	24	1	1	0	3	1	1	82	9,2	4,48
HVO_0136	TL	Translation initiation factor 1A	47	3	3	0	1	1	3	96	11,5	5,06
HVO_2366	GEN	UspA domain-containing protein	22	2	2	0	2	1	2	144	15,7	4,89
HVO_1391	GEN	NUDIX family hydrolase	19	2	2	0	2	1	2	151	17,4	5,01
HVO_0429	MIS	Archaeometzincin	10	2	2	0	2	1	2	173	19,3	6,54
HVO_2561	TL	50S ribosomal protein L2	10	1	2	0	2	1	1	241	25,6	10,4
HVO_2475	TL	30S ribosomal protein S17e	15	1	1	1	1	1	1	62	7	9,63
HVO_1611	CHY	Uncharacterized protein	18	1	1	0	2	1	1	67	7,5	4,59
HVO_1515	GEN	CopG domain protein	14	1	1	1	1	1	1	70	7,8	4,49
HVO_0387	CHY	Uncharacterized protein	13	1	1	2	0	1	1	79	8,9	4,06
HVO_0090	CHY	Uncharacterized protein	28	1	1	0	1	1	1	54	6,4	6,76
HVO_1753	GEN	CopA N-terminal domain-containing protein	32	1	1	0	1	1	1	65	6,6	4,13
HVO_A0138	CHY	Uncharacterized protein	26	1	1	0	1	1	1	61	6,9	4,96
HVO_2776	TC	DNA-directed RNA polymerase subunit N	27	1	1	0	1	1	1	64	7,3	5,08
HVO_2739	TL	50S ribosomal protein L24e	30	1	1	0	1	1	1	66	7,5	5,17
HVO_1359	GEN	Small CPxCG-related zinc finger protein	26	1	1	0	1	1	1	68	8	8,87
HVO_2971	CHY	Uncharacterized protein	27	1	1	0	1	1	1	78	8,7	5,02

HVO_2189	NUM	Phosphoribosylformyl-glycinamide synthase subunit PurS	11	1	1	0	1	1	1	83	9,3	4,5
HVO_2104	TP	Phosphotransferase system component IIB	15	1	1	0	1	1	1	98	10,2	4,81
HVO_1480	CHY	Uncharacterized protein	12	1	1	0	1	1	1	95	10,3	4,04
HVO_2309	COM	Pterin-4-alpha-carbinolamine dehydratase	13	1	1	0	1	1	1	91	10,4	4,07
HVO_3003	CHY	Uncharacterized protein	25	1	1	0	1	1	1	91	10,5	4,37
HVO_A0637	TL	Translation initiation factor 1A	26	1	1	0	1	1	1	94	11,2	6,32

Tabelle A4: Ergebnistabelle 1 der RNA-Sequenzierung. Gezeigt sind Gene mit ihrer Funktionsklasse (FC, siehe Abkürzungsverzeichnis), dem Namen des Genprodukts (Protein Name) und den *feature counts* in den drei Stämmen Wildtyp H26 evc, Deletionsmutante Δ HVO_2753 evc und Komplementationsmutante Δ HVO_2753 +2753c. Die letzten beiden Spalten zeigen den Grad der Regulation des jeweiligen Gens in der Deletionsmutante (im Vergleich zum Wildtyp) und in der Komplementationsmutante (im Vergleich zur Deletionsmutante). Gezeigt sind nur Gene mit einer mindestens 2-fachen Herunter- bzw. Hochregulation in der Deletionsmutante.

Gene ID	FC	Protein Name	H26 evc	Δ HVO_2753 evc	Δ HVO_2753 +2753c	Regulation in Deletionsmut.	Regulation in Komp.-Mut.
HVO_1207	SIG	response regulator CheY	414	0	0	0,00	-
HVO_1208	CHY	conserved hypothetical protein	433	0	0	0,00	-
HVO_1214	MIS	arl cluster protein ArlF	195	0	0	0,00	-
HVO_1220	CHY	conserved hypothetical protein	108	0	0	0,00	-
HVO_1222	SIG	protein-glutamate O-methyltransferase CheR	328	0	1	0,00	-
HVO_1210	MOT	archaellin A1	1929	0	0	0,00	0,43
HVO_1211	MOT	archaellin A2	6840	2	1	0,00	0,63
HVO_1213	MIS	arl cluster protein ArlCE	631	0	1	0,00	2,85
HVO_1206	SIG	taxis cluster protein CheC	465	0	1	0,00	2,85
HVO_1217	MOT	archaellar motor/biogenesis protein ArlI	645	0	0	0,00	0,51
HVO_1212	MIS	KaiC-type circadian clock protein CirA	224	0	0	0,00	1,14
HVO_1215	MIS	arl cluster protein ArlG	257	0	0	0,00	0,00
HVO_1209	GEN	HTH domain protein	296	0	0	0,00	1,00
HVO_1219	SIG	taxis protein CheF2	469	1	0	0,00	0,62
HVO_1218	MOT	archaellar motor/biogenesis protein ArlJ	565	1	1	0,00	1,02
HVO_2753	GEN	small CPxCG-related zinc finger protein	1097	5	220	0,00	40,88
HVO_1216	MIS	arl cluster protein ArlH	288	2	1	0,01	0,55
HVO_1221	SIG	taxis protein CheF1	317	4	2	0,01	0,57
HVO_2649	CHY	conserved hypothetical protein	828	27	25	0,03	0,92
HVO_1205	SIG	taxis cluster protein CheD	254	10	7	0,04	0,69
HVO_0471	CHY	conserved hypothetical protein	327	29	33	0,09	1,14

HVO_2461	GEN	CBS domain protein	121	13	15	0,11	1,12
HVO_0555	SIG	transducer protein Htr15	287	38	31	0,13	0,81
HVO_1201	SIG	sensor box histidine kinase	2801	392	336	0,14	0,86
HVO_1225	SIG	purine-binding taxis protein CheW	1271	180	143	0,14	0,79
HVO_1126	SIG	transducer protein HemAT	272	41	41	0,15	1,00
HVO_A0590	CHY	conserved hypothetical protein	101	17	15	0,17	0,89
HVO_3004	GEN	DUF125 family protein (nonfunctional)	350	61	71	0,18	1,16
HVO_2301	CHY	conserved hypothetical protein	419	74	62	0,18	0,84
HVO_1224	SIG	protein-glutamate methylesterase / protein-glutamine glutaminase CheB	133	27	24	0,20	0,89
HVO_1713	SIG	receiver/sensor box histidine kinase	684	140	114	0,20	0,81
HVO_1202	CHY	conserved hypothetical protein	249	54	56	0,22	1,03
HVO_1863	CHY	conserved hypothetical protein	134	30	27	0,22	0,89
HVO_1902	CHY	conserved hypothetical protein	292	67	58	0,23	0,87
HVO_B0193	REG	ArsR family transcription regulator	180	43	36	0,24	0,84
HVO_1203	MIS	arl cluster protein ArlD	1829	469	403	0,26	0,86
HVO_3005	SIG	transducer protein Htr15	387	99	103	0,26	1,04
HVO_1204	HY	hypothetical protein	1681	439	343	0,26	0,78
HVO_1223	SIG	taxis sensor histidine kinase CheA	411	111	98	0,27	0,88
HVO_3003	CHY	conserved hypothetical protein	228	64	75	0,28	1,16
HVO_1999	SIG	transducer protein Htr7	140	45	54	0,33	1,18
HVO_2294	CHY	conserved hypothetical protein	38	13	12	0,34	0,96
HVO_1125	TL	cysteine--tRNA ligase	847	312	297	0,37	0,95
HVO_2469	TP	SNF family transport protein	610	227	413	0,37	1,82
HVO_2648	GEN	probable D-2-hydroxyacid dehydrogenase	207	80	96	0,39	1,20
HVO_2470	TP	SNF family transport protein	152	60	122	0,40	2,03
HVO_0470	AA	threonine synthase	42	17	15	0,40	0,89
HVO_2174	CHY	conserved hypothetical protein	3713	1493	1390	0,40	0,93
HVO_0553	SIG	chemotactic signal transduction system periplasmic substrate-binding protein BasB	39	16	14	0,41	0,89
HVO_2074	GEN	probable secreted glycoprotein	432	178	170	0,41	0,96
HVO_1556	CHY	conserved hypothetical protein	91	39	38	0,42	0,99
HVO_2000	CHY	conserved hypothetical protein	53	24	20	0,45	0,85
HVO_2512	CHY	conserved hypothetical protein	54	25	18	0,46	0,72
HVO_A0402	CHY	conserved hypothetical protein	49	23	15	0,47	0,66
HVO_0227	CHY	conserved hypothetical protein	13731	6457	6293	0,47	0,97
HVO_1316	CHY	conserved hypothetical protein	47	22	23	0,47	1,05
HVO_2220	SIG	transducer protein Htr38	61	29	33	0,48	1,12
HVO_1756	GEN	GNAT family acetyltransferase Pat1	120	240	287	2,00	1,20
HVO_2917	GEN	beta-lactamase domain protein	431	864	1681	2,01	1,95
HVO_A0542	HY	hypothetical protein	52	105	107	2,02	1,02
HVO_1386	CHY	conserved hypothetical protein	40	81	55	2,04	0,68
HVO_2020	GEN	DUF502 family protein	59	120	88	2,05	0,73
HVO_0613	GEN	beta-lactamase domain protein	11	22	30	2,07	1,39

HVO_1122	CHY	conserved hypothetical protein	206	428	538	2,08	1,26
HVO_1481	GEN	UspA domain protein	415	866	1361	2,08	1,57
HVO_A0547	GEN	DUF1028 family protein	79	164	236	2,09	1,44
HVO_0133	CHP	thermosome subunit 1	363	762	553	2,10	0,72
HVO_2057	CHM	glucose-1-phosphate thymidyltransferase Agl11	161	337	279	2,10	0,83
HVO_1991	TP	ABC-type transport system periplasmic substrate-binding protein	337	715	261	2,12	0,36
HVO_1197	GEN	RIO-type protein kinase domain protein	471	1006	1385	2,13	1,38
HVO_2027	GEN	DoxX domain protein	31	67	78	2,14	1,16
HVO_1707	TP	ABC-type transport system ATP-binding protein	52	112	66	2,14	0,59
HVO_0401	GEN	UspA domain protein	648	1427	1773	2,20	1,24
HVO_A0334	CHY	conserved hypothetical protein	329	727	855	2,21	1,18
HVO_2030	SIG	receiver/sensor box histidine kinase (nonfunctional)	503	1116	1173	2,22	1,05
HVO_2238	CHY	conserved hypothetical protein	32	71	119	2,25	1,66
HVO_0598	CHY	conserved hypothetical protein	50	114	125	2,26	1,10
HVO_0932	GEN	UspA domain protein	27	61	46	2,27	0,77
HVO_1697	GEN	FAD-dependent oxidoreductase (GlcD/DLD_GlcF/GlpC domain fusion protein)	186	426	492	2,28	1,16
HVO_1462	COM	1,4-dihydroxy-2-naphthoate polyprenyltransferase	52	118	50	2,29	0,43
HVO_2018	CHY	conserved hypothetical protein	180	415	462	2,31	1,11
HVO_2384	GEN	CBS domain protein	1748	4053	5232	2,32	1,29
HVO_2150	EM	halocyanin	133	315	426	2,36	1,35
HVO_2155	GEN	homolog to sodium/calcium antiporter	80	193	313	2,41	1,62
HVO_2044	MIS	intein-related probable LAGLIDADG endonuclease I-EndH	22	54	52	2,42	0,97
HVO_1961	CHY	conserved hypothetical protein	318	776	945	2,44	1,22
HVO_2025	GEN	receiver/sensor box protein	55	134	128	2,45	0,96
HVO_2022	CHY	conserved hypothetical protein	66	163	166	2,46	1,02
HVO_2040	GEN	GalE family epimerase/dehydratase	110	271	235	2,46	0,87
HVO_0450	CHP	Hsp20-type molecular chaperone	249	614	964	2,47	1,57
HVO_2059	CHM	dTDP-glucose 4,6-dehydratase	62	155	130	2,51	0,84
HVO_2032	TP	ABC-type transport system ATP-binding protein (probable substrate sugar)	73	184	177	2,52	0,96
HVO_1706	TP	ABC-type transport system permease protein	105	264	122	2,52	0,46
HVO_1763	GEN	UPF0104 family protein	21	55	27	2,56	0,50
HVO_2239	GEN	UspA domain protein	897	2341	2696	2,61	1,15
HVO_2037	GEN	DUF2078 family protein	1029	2688	2886	2,61	1,07
HVO_B0361	REG	HTH-10 family transcription regulator DmsR	66	173	218	2,61	1,26
HVO_1198	GEN	UspA domain protein	216	569	715	2,63	1,26
HVO_2156	GEN	UspA domain protein	116	306	383	2,64	1,25

HVO_1087	GEN	UspA domain protein	318	848	1189	2,67	1,40
HVO_1764	CHY	conserved hypothetical protein	162	431	198	2,67	0,46
HVO_2241	CHY	conserved hypothetical protein	243	650	772	2,68	1,19
HVO_2015	CHY	conserved hypothetical protein	175	474	429	2,70	0,91
HVO_1587	CHY	conserved hypothetical protein	39	109	52	2,75	0,48
HVO_2754	GEN	DUF112 family protein	6	16	35	2,84	2,13
HVO_2035	REG	TrmB family transcription regulator	50	144	136	2,86	0,95
HVO_2031	TP	ABC-type transport system periplasmic substrate-binding protein (probable substrate sugar)	82	235	234	2,87	0,99
HVO_2159	CHY	conserved hypothetical protein	147	429	496	2,91	1,16
HVO_2060	MIS	low-salt glycan biosynthesis protein Agl8	87	256	247	2,94	0,97
HVO_2058	CHM	dTDP-4-dehydrorhamnose reductase	76	226	170	2,97	0,76
HVO_2014	GEN	small CPxCG-related zinc finger protein	17	50	36	3,03	0,71
HVO_2019	GEN	PRC domain protein	135	409	418	3,03	1,02
HVO_2039	CHY	conserved hypothetical protein	66	206	229	3,14	1,12
HVO_2036	CHY	conserved hypothetical protein	15	46	46	3,16	1,00
HVO_1705	TP	ABC-type transport system periplasmic substrate-binding protein	94	307	82	3,27	0,27
HVO_0763	GEN	DoxX domain protein	1361	4535	5298	3,33	1,17
HVO_2041	CHY	conserved hypothetical protein	23	78	70	3,33	0,90
HVO_B0359	GEN	YidE family protein	65	218	260	3,36	1,19
HVO_1586	TP	SDF family transport protein (probable substrate glutamate/aspartate)	30	102	44	3,36	0,43
HVO_2026	HY	hypothetical protein	10	33	31	3,39	0,94
HVO_2009	CHY	conserved hypothetical protein	69	234	189	3,39	0,81
HVO_2160	GEN	probable secreted glycoprotein	881	2993	3144	3,40	1,05
HVO_1704	GEN	homolog to arabinopyranose mutase	41	142	27	3,47	0,19
HVO_B0041	MIS	siderophore biosynthesis protein lucC	188	682	180	3,63	0,26
HVO_2066	CHY	conserved hypothetical protein	339	1275	390	3,76	0,31
HVO_2033	TP	ABC-type transport system permease protein (probable substrate sugar)	18	71	71	3,86	1,00
HVO_1757	GEN	DoxX domain protein	492	1978	2016	4,02	1,02
HVO_2037_A	CHY	conserved hypothetical protein	22	91	28	4,09	0,31
HVO_1797	GEN	beta-lactamase domain protein	60	246	57	4,10	0,23
HVO_0597	GEN	OsmC domain protein	106	437	395	4,13	0,90
HVO_1696	TP	LctP family transport protein	90	372	436	4,15	1,17
HVO_A0548	GEN	DoxX domain protein	932	4038	4339	4,33	1,07
HVO_1229	CHY	conserved hypothetical protein	46	201	42	4,36	0,21
HVO_B0144	TP	ABC-type transport system periplasmic substrate-binding protein	90	394	92	4,40	0,23
HVO_2016	CHY	conserved hypothetical protein	68	307	315	4,55	1,03
HVO_1760	TP	ABC-type transport system ATP-binding protein	89	430	90	4,85	0,21
HVO_0105	GEN	FAD-dependent oxidoreductase	608	2974	2980	4,89	1,00
HVO_0537	CHY	conserved hypothetical protein	246	1233	199	5,01	0,16

HVO_1758	GEN	oxidoreductase (homolog to thioredoxin-disulfide reductase)	45	227	51	5,10	0,22
HVO_2034	TP	ABC-type transport system permease protein (probable substrate sugar)	21	110	124	5,22	1,13
HVO_2061	MIS	low-salt glycan biosynthesis hexosyltransferase Agl6	119	638	565	5,37	0,89
HVO_1463	GEN	oxidoreductase (homolog to thioredoxin-disulfide reductase)	9	48	8	5,51	0,16
HVO_1464	TP	ABC-type transport system periplasmic substrate-binding protein	20	117	22	5,90	0,19
HVO_2093	TP	probable NhaC-type sodium/proton antiporter	26	159	27	6,06	0,17
HVO_B0196	SIG	histidine kinase	67	413	52	6,19	0,13
HVO_1759	TP	ABC-type transport system permease protein	29	183	32	6,20	0,17
HVO_2012	SIG	receiver box response regulator	149	966	1005	6,49	1,04
HVO_A0558	TP	ABC-type transport system periplasmic substrate-binding protein	30	202	31	6,71	0,15
HVO_A0541	TP	ABC-type transport system periplasmic substrate-binding protein	122	852	150	6,97	0,18
HVO_0539	CHY	conserved hypothetical protein	17	125	29	7,25	0,23
HVO_2065	CHY	conserved hypothetical protein	25	192	58	7,69	0,30
HVO_B0150	TP	ABC-type transport system periplasmic substrate-binding protein	23	176	23	7,71	0,13
HVO_B0043	MIS	probable N4-hydroxy-1-aminopropane O-acetyltransferase	7	68	9	9,24	0,14
HVO_B0197	TP	ABC-type transport system permease protein	58	539	53	9,24	0,10
HVO_1230	TP	mechanosensitive channel protein MscS (nonfunctional)	83	838	74	10,05	0,09
HVO_B0198	TP	ABC-type transport system periplasmic substrate-binding protein	60	601	60	10,06	0,10
HVO_A0559	AA	histidine ammonia-lyase	9	118	11	13,13	0,09
HVO_B0044	MIS	siderophore biosynthesis protein lucA	20	289	17	14,11	0,06
HVO_0538	REG	SirR/DtxR family transcription regulator Idr2	8	119	12	14,52	0,10
HVO_1796	CHY	conserved hypothetical protein	26	387	35	15,02	0,09
HVO_B0046	MIS	diaminobutyrate--2-oxoglutarate aminotransferase	25	388	28	15,28	0,07
HVO_B0047	TP	ABC-type transport system periplasmic substrate-binding protein	28	438	40	15,84	0,09
HVO_2038	TP	ABC-type transport system periplasmic substrate-binding protein	14	390	51	28,04	0,13
HVO_1228	GEN	DUF5059 domain / halocyanin domain protein	31	1022	27	32,85	0,03
HVO_B0045	MIS	diaminobutyrate decarboxylase	4	191	4	44,46	0,02
HVO_B0042	MIS	probable 1,3-diaminopropane N-3-monooxygenase	5	220	4	46,83	0,02

Tabelle A5: Ergebnistabelle 2 der RNA-Sequenzierung. Gezeigt sind Gene mit ihrer Funktionsklasse (FC, siehe Abkürzungsverzeichnis), dem Namen des Genprodukts (Protein Name) und den *feature counts* in den drei Stämmen Wildtyp H26 evc, Deletionsmutante Δ HVO_2753 evc und Komplementationsmutante Δ HVO_2753 +2753c. Die letzten beiden Spalten zeigen den Grad der Regulation des jeweiligen Gens in der Deletionsmutante (im Vergleich zum Wildtyp) und in der Komplementationsmutante (im Vergleich zur Deletionsmutante). Gezeigt sind nur Gene mit einer mindestens 2-fachen Herunter- bzw. Hochregulation in der Komplementationsmutante.

Gene ID	FC	Protein Name	H26 evc	Δ HVO_2753 evc	Δ HVO_2753 +2753c	Regulation in Deletionsmut.	Regulation in Komp.-Mut.
HVO_1215	MIS	arl cluster protein ArlG	257	0	0	0,00	0,00
HVO_B0042	MIS	probable 1,3-diaminopropane N-3-monooxygenase	5	220	4	46,83	0,02
HVO_B0045	MIS	diaminobutyrate decarboxylase	4	191	4	44,46	0,02
HVO_1228	GEN	DUF5059 domain / halocyanin domain protein	31	1022	27	32,85	0,03
HVO_B0044	MIS	siderophore biosynthesis protein lucA	20	289	17	14,11	0,06
HVO_B0046	MIS	diaminobutyrate--2-oxoglutarate aminotransferase	25	388	28	15,28	0,07
HVO_1230	TP	mechanosensitive channel protein MscS (nonfunctional)	83	838	74	10,05	0,09
HVO_1796	CHY	conserved hypothetical protein	26	387	35	15,02	0,09
HVO_A0559	AA	histidine ammonia-lyase	9	118	11	13,13	0,09
HVO_B0047	TP	ABC-type transport system periplasmic substrate-binding protein	28	438	40	15,84	0,09
HVO_B0197	TP	ABC-type transport system permease protein	58	539	53	9,24	0,10
HVO_B0198	TP	ABC-type transport system periplasmic substrate-binding protein	60	601	60	10,06	0,10
HVO_0538	REG	SirR/DtxR family transcription regulator Idr2	8	119	12	14,52	0,10
HVO_B0196	SIG	histidine kinase	67	413	52	6,19	0,13
HVO_2038	TP	ABC-type transport system periplasmic substrate-binding protein	14	390	51	28,04	0,13
HVO_B0150	TP	ABC-type transport system periplasmic substrate-binding protein	23	176	23	7,71	0,13
HVO_B0043	MIS	probable N4-hydroxy-1-aminopropane O-acetyltransferase	7	68	9	9,24	0,14
HVO_A0558	TP	ABC-type transport system periplasmic substrate-binding protein	30	202	31	6,71	0,15
HVO_1463	GEN	oxidoreductase (homolog to thioredoxin-disulfide reductase)	9	48	8	5,51	0,16
HVO_0537	CHY	conserved hypothetical protein	246	1233	199	5,01	0,16
HVO_2093	TP	probable NhaC-type sodium/proton antiporter	26	159	27	6,06	0,17
HVO_1759	TP	ABC-type transport system permease protein	29	183	32	6,20	0,17

HVO_A0541	TP	ABC-type transport system periplasmic substrate-binding protein	122	852	150	6,97	0,18
HVO_1464	TP	ABC-type transport system periplasmic substrate-binding protein	20	117	22	5,90	0,19
HVO_1704	GEN	homolog to arabinopyranose mutase	41	142	27	3,47	0,19
HVO_1760	TP	ABC-type transport system ATP-binding protein	89	430	90	4,85	0,21
HVO_1229	CHY	conserved hypothetical protein	46	201	42	4,36	0,21
HVO_1758	GEN	oxidoreductase (homolog to thioredoxin-disulfide reductase)	45	227	51	5,10	0,22
HVO_0539	CHY	conserved hypothetical protein	17	125	29	7,25	0,23
HVO_B0144	TP	ABC-type transport system periplasmic substrate-binding protein	90	394	92	4,40	0,23
HVO_1797	GEN	beta-lactamase domain protein	60	246	57	4,10	0,23
HVO_B0041	MIS	siderophore biosynthesis protein lucC	188	682	180	3,63	0,26
HVO_1705	TP	ABC-type transport system periplasmic substrate-binding protein	94	307	82	3,27	0,27
HVO_2065	CHY	conserved hypothetical protein	25	192	58	7,69	0,30
HVO_2066	CHY	conserved hypothetical protein	339	1275	390	3,76	0,31
HVO_2037_A	CHY	conserved hypothetical protein	22	91	28	4,09	0,31
HVO_1991	TP	ABC-type transport system periplasmic substrate-binding protein	337	715	261	2,12	0,36
HVO_2392	CHY	conserved hypothetical protein	73	58	23	0,79	0,40
HVO_1462	COM	1,4-dihydroxy-2-naphthoate poly-prenyltransferase	52	118	50	2,29	0,43
HVO_1210	MOT	archaellin A1	1929	0	0	0,00	0,43
HVO_1586	TP	SDF family transport protein (probable substrate glutamate/aspartate)	30	102	44	3,36	0,43
HVO_1764	CHY	conserved hypothetical protein	162	431	198	2,67	0,46
HVO_1706	TP	ABC-type transport system permease protein	105	264	122	2,52	0,46
HVO_1587	CHY	conserved hypothetical protein	39	109	52	2,75	0,48
HVO_1763	GEN	UPF0104 family protein	21	55	27	2,56	0,50
HVO_2739	TL	50S ribosomal protein L24e	141	80	161	0,57	2,01
HVO_2470	TP	SNF family transport protein	152	60	122	0,40	2,03
HVO_0958	CHY	conserved hypothetical protein	51	31	64	0,60	2,08
HVO_0917	GEN	DoxX domain protein	139	180	378	1,30	2,09
HVO_0540	CHY	conserved hypothetical protein	63	93	196	1,46	2,11
HVO_2754	GEN	DUF112 family protein	6	16	35	2,84	2,13
HVO_2918	NUM	thymidylate synthase	35	56	121	1,58	2,17
HVO_0438	EM	thioredoxin	1121	809	1923	0,72	2,38
HVO_1213	MIS	arl cluster protein ArICE	631	0	1	0,00	2,85
HVO_1206	SIG	taxis cluster protein CheC	465	0	1	0,00	2,85
HVO_0177	MIS	arsenate reductase (glutaredoxin)	204	113	370	0,56	3,27
HVO_2753	GEN	small CPxCG-related zinc finger protein	1097	5	220	0,00	40,88