

# Translationsinitiationsfaktoren in *Haloferax volcanii*

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

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

von

Franziska Verena Schramm  
aus Ludwigsburg

Frankfurt am Main 2021

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

*Für meine Großeltern*

*The puzzle is never ready!*

P. Menth

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Die entsprechend verwendeten Literaturquellen sind im Literaturverzeichnis vollständig zitiert.

Frankfurt am Main, den 10. Januar 2021

---

Franziska Verena Schramm

## Zusammenfassung

In allen drei Domänen des Lebens ist in der Translation die Initiation der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Die Effizienz der Translationsinitiation und ihre unterschiedliche Regulation ist von Translationsinitiationsfaktoren (IFs) abhängig. Bakterien enthalten nur drei IFs, während die Anzahl bei Archaeen (aIFs) und Eukaryoten (eIFs) deutlich höher ist.

Das Archaeon *Haloferax volcanii* beispielsweise besitzt 14 Gene, die für aIFs bzw. deren Untereinheiten kodieren. Eine Deletionsanalyse ergab, dass fünf aIFs essenziell und neun aIFs nicht essenziell sind. Um einen Einblick in die Funktions- und Interaktionsbereiche der aIFs in *H. volcanii* zu erhalten, wurden die aIFs mit einem His-Tag versehen und überexprimiert. Die Überexpression erfolgte in der jeweiligen Deletionsmutante. Für essenzielle aIFs fand sie im Wildtyp statt. Durch Affinitätsaufreinigungen wurden die aIFs und ihre Bindungspartner isoliert und mittels Massenspektrometrie (MS) identifiziert. Für den Ausschluss unspezifischer Proteine dienten zwei stringente Kontrollen als Referenz, das Reporterogen Dihydrofolatreduktase (HVO\_1279) mit His-Tag und das Expressionsplasmid ohne Gen.

Die ersten Arbeiten konzentrierten sich auf den heterotrimeren Faktor aIF2. Er bindet die Initiator-tRNA und ist damit für die Bildung des Präinitiationskomplexes von zentraler Bedeutung. Der Faktor aIF2 besteht aus jeweils einer  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit. In *H. volcanii* existieren zwei Orthologe für aIF2 $\beta$ . Die Überexpressionen der  $\alpha$ -,  $\beta$ 1-,  $\beta$ 2- und  $\gamma$ -Untereinheiten führten zur Co-Isolation der jeweils anderen Untereinheiten des aIF2 ( $\alpha$ ,  $\beta$ 1/  $\beta$ 2,  $\gamma$ ).

Die Strategie der Co-Affinitätsaufreinigung und MS wurde auf alle weiteren annotierten aIFs ausgedehnt, um mögliche Funktionen zu identifizieren und ein potenzielles Interaktionsnetzwerk der aIFs zu erstellen. Für alle aIFs konnte ein unterschiedliches Muster an co-gereinigten Proteinen festgestellt werden. Mitgereinigte Proteine waren aIFs, Proteine der Translation, Transkription, Replikation und ribosomale Proteine. Auch RNA-Polymerase-Untereinheiten (RNAPUs) konnten co-isoliert werden. Mit 13 der 14 aIFs konnten andere Initiationsfaktoren co-gereinigt werden. Sechs aIFs konnten zu Beginn bei keinem weiteren Initiationsfaktor mitgereinigt werden. Einer dieser Faktoren war aIF2 $\beta$ -1, der jedoch in den Affinitätsaufreinigungen mit nachfolgender FPLC von aIF2 $\beta$ -2 identifiziert werden konnte. Der Faktor aIF1 konnte nur in der stationären Phase von aIF2 $\alpha$  mitgereinigt werden.

Die am häufigsten co-gereinigten Proteine waren aIF2B $\delta$ -1 und aIF5B. Für aIF2B $\delta$ -1 kam dies überraschend, da er bereits als Translationsinitiationsfaktor ausgeschlossen wurde. Mit dem Faktor aIF2B $\delta$ -1 selbst konnten fünf aIFs co-gereinigt werden.

Da mit den aIFs auch RNAPUs co-gereinigt werden konnten, wurden sieben RNAPUs ebenfalls mit einem His-Tag versehen und überexprimiert. Auch mit den RNAPUs konnten aIFs, sowie weitere Proteine der Translation mitgereinigt werden.

Diese Umstände legen nahe, dass es möglicherweise eine engere Verbindung der Transkription und Translation in *H. volcanii* geben könnte, als bisher angenommen.

## **Aus der Arbeit hervorgegangene Veröffentlichung**

Franziska Verena Schramm, Andreas Borst and Jörg Soppa (2021): Characterization of the translation initiation factor interaction network of the halophilic archaeon *Haloferax volcanii*.  
Frontiers of Microbiology; in preparation

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis.....	VI
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Diversität in den drei Domänen des Lebens.....	2
1.2 Translation, ein universeller Mechanismus.....	4
1.3 Translationsinitiation in den drei Domänen des Lebens .....	5
1.3.1 Leaderlose Translationsinitiation.....	6
1.3.2 5'-UTR ohne SD-Sequenz.....	8
1.3.3 SD-Sequenz .....	8
1.3.4 Scanning .....	9
1.3.5 IRES.....	10
1.4 Translationsinitiationsfaktoren in den drei Domänen des Lebens .....	12
1.4.1 IFs in der Translationsinitiation von Bakterien.....	12
1.4.2 eIFs in der Translationsinitiation von Eukaryonten .....	14
1.4.3 aIFs in der Translationsinitiation von Archaeen.....	17
1.5 Translationsinitiationsfaktoren in <i>H. volcanii</i> .....	19
1.6 Zielsetzung der Arbeit.....	20
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>21</b>
2.1 Verwendete Materialien.....	21
2.1.1 Verbrauchs- und Gebrauchsmaterialien.....	21
2.1.2 Verwendete Chemikalien .....	22
2.1.3 Antikörper .....	24
2.1.4 Verwendete Kits .....	24
2.1.5 Verwendete Geräte.....	24
2.1.6 Enzyme .....	26
2.1.7 Größenstandards.....	26
2.1.8 Primer.....	27
2.1.9 Plasmide.....	30
2.1.10 Mikroorganismen .....	32
2.1.11 Datenbanken und Software .....	32
2.2 Mikrobiologische Methoden.....	33
2.2.1 Medien und Zusätze für die Kultivierung von <i>E. coli</i> .....	33
2.2.2 Herstellung von chemisch kompetenten <i>E. coli</i> .....	33
2.2.3 Transformation von <i>E. coli</i> .....	34
2.2.4 Medien und Zusätze für die Kultivierung von <i>H. volcanii</i> .....	34
2.2.5 Transformation von <i>H. volcanii</i> .....	36
2.2.6 Bestimmung Zelldichte und Zellzahl.....	37
2.2.7 Wachstumsversuche in Mikrotiterplatten.....	37

2.3	Molekularbiologische Methoden .....	38
2.3.1	Isolierung genomischer DNA aus <i>H. volcanii</i> .....	38
2.3.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	38
2.3.3	Generierung von in-frame-Deletionsmutanten (PopIn-PopOut-Methode) .....	38
2.3.4	Aufreinigung von DNA-Fragmenten .....	39
2.3.5	Polymerase Kettenreaktion (PCR) .....	39
2.3.6	Spaltung von DNA .....	43
2.3.7	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA .....	43
2.3.8	Ligation von DNA .....	44
2.3.9	Sequenzierung von DNA .....	44
2.3.10	Southern Blot Analyse .....	45
2.4	Biochemische Methoden .....	48
2.4.1	Erstellen eines Gesamtzellextraktes .....	48
2.4.2	Methanol-Chloroform-Extraktion von Proteinen .....	48
2.4.3	Affinitätsaufreinigung .....	49
2.4.4	<i>Crosslinking</i> von Proteinen in der Zellkultur .....	51
2.4.5	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	51
2.4.6	Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen .....	53
2.4.7	Tricin-Polyacrylamidgelelektrophorese .....	53
2.4.8	Western Blot .....	55
2.4.9	Proteinbestimmung nach Pierce .....	56
2.4.10	Silberfärbung von SDS-Gelen .....	57
2.4.11	Proteinanalyse in der MS-MS .....	57
2.4.12	FPLC .....	58
3	Ergebnisse .....	59
3.1	Überexpression von aIFs im Stamm H26Δ1279 und Deletionsmutanten .....	59
3.1.1	Erstellung von aIF-Deletionsmutanten .....	59
3.1.2	Wahl des Affinitäts-Tags für die Aufreinigung .....	60
3.1.3	Etablierung der Co-Affinitätsaufreinigung .....	62
3.1.4	Etablierung der Identifizierung von Proteinen durch <i>Peptide mass fingerprinting</i> .....	63
3.1.5	Erstellung der Überexpressionsmutanten .....	65
3.2	Co-Affinitätsaufreinigung und MS-Analyse .....	66
3.2.1	aIF1 .....	66
3.2.2	aIF1A-1 und aIF1A-2 .....	69
3.2.3	aIF2 – der trimere Initiationsfaktor .....	72
3.2.4	aIF2B und seine Untereinheiten .....	100
3.2.5	eIF4A-homolog .....	105
3.2.6	aIF5A .....	107
3.2.7	aIF5B .....	108
3.2.8	aIF6 .....	110
3.3	Interaktionsnetzwerk von aIFs-aIFs .....	112
3.4	Interaktion aIFs mit RNAPUs .....	113
3.5	Untersuchung der Interaktion zwischen RNAPUs und aIFs .....	115
3.5.1	Überexpression der RNAPUs .....	115
3.5.2	Affinitätsaufreinigungen der RNAPUs .....	116
3.5.3	MS-Analyse der RNAPUs .....	117



3.5.4	Interaktionen von RNAPUs-RNAPUs.....	118
3.5.5	RNAPUS und Proteine der Translation.....	119
3.5.6	Interaktionen zwischen RNAPUs und aIFs kombiniert.....	120
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>122</b>
4.1	Affinitätsaufreinigung und MS-Analyse.....	122
4.2	Auswahl des Tags für die Affinitätsaufreinigung.....	125
4.3	Experimentelles Design zur Identifizierung von Bindungspartnern.....	125
4.4	Vergleich aIF-aIF-Interaktionen.....	126
4.4.1	aIF1.....	126
4.4.2	aIF1A-1 und aIF1A-2.....	129
4.4.3	aIF2.....	133
4.4.4	aIF2B.....	148
4.4.5	eIF4A-homolog.....	153
4.4.6	aIF5A.....	154
4.4.7	aIF5B.....	157
4.4.8	aIF6.....	162
4.5	RNAPUs in der MS-Analyse.....	164
4.5.1	rpoA1, rpoA2, rpoB1, rpoB2 und rpoH.....	166
4.5.2	rpoL.....	167
4.5.3	rpoD.....	167
4.5.4	rpoN und rpoK.....	168
4.5.5	rpoF und rpoE.....	168
4.5.6	rpoP.....	169
4.6	Vergleich eIF-aIF und mögliche Funktion in Archaeen.....	170
4.7	Elongationsfaktoren und aIFs.....	170
4.8	Kopplung von Transkription und Translation.....	171
4.9	Kopplung von Translation und Replikation.....	176
4.10	Fazit und Ausblick.....	177
<b>5</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>178</b>
<b>6</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>194</b>
6.1	Abkürzungsverzeichnis.....	194
6.2	Sequenz-Alignment.....	196
6.3	Zusammenfassung MS-Daten aIFs.....	201
6.4	Zusammenfassung MS-Daten RNAPUs.....	205

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Phyla der Archaeen modifiziert (Eme and Doolittle, 2015; Pohlschroder and Schulze, 2019).....	1
Abbildung 2: Strukturen von RNAPs in den drei Domänen des Lebens modifiziert nach (Jun <i>et al.</i> , 2011) .....	3
Abbildung 3: Ablauf einer Translation.....	4
Abbildung 4: Initiationswege der Translation an leaderlosen Transkripten in den drei Domänen des Lebens .....	6
Abbildung 5: Translationsinitiation an Transkripten mit 5'-UTR ohne SD-Sequenz.....	8
Abbildung 6: Translationsinitiation an Transkripten mit SD-Sequenz .....	9
Abbildung 7: Translationsinitiation mittels Scanning Mechanismus in Eukaryonten (Shatsky <i>et al.</i> , 2010) .....	9
Abbildung 8: IRES-abhängige Translationsinitiation in Eukaryonten modifiziert nach (Fitzgerald and Semler, 2009; Martinez-Salas <i>et al.</i> , 2018).....	10
Abbildung 9: Translationsinitiation in Bakterien und die Funktionen der einzelnen IFs .....	13
Abbildung 10: Die eukaryontische Translationsinitiation nach (Dever, Kinzy and Pavitt, 2016) .....	15
Abbildung 11: Translationsinitiation in Archaeen.....	17
Abbildung 12: Schema für die Generierung von PopIn-PopOut-Mutanten (modifiziert nach Allers et al 2004) .....	39
Abbildung 13: Überprüfung der vorhandenen Deletionsmutanten und Generierung neuer Deletionsmutanten .....	59
Abbildung 14: Testung von CBD, BBP und 6xHis-Tag anhand der DHFR (HVO_1279).....	61
Abbildung 15: Western Blot mittels Antikörper gegen die DHFR (HVO_1279).....	61
Abbildung 16: Schema für die Affinitätsaufreinigung über einen pull-down-Assay .....	62
Abbildung 17: Affinitätsaufreinigung der DHFR aus exponentieller Kultur.....	62
Abbildung 18: Überexpression der DHFR (HVO_1279) und des Leerplasmids (pSD+P).....	63
Abbildung 19: Auswertung der MS-Daten .....	66
Abbildung 20: Charakterisierung des essenziellen aIF1 (HVO_1946).....	67
Abbildung 21: DNA- und RNA-Seq-Daten des <i>aIF1A-1</i> (HVO_0136).....	69
Abbildung 22: Charakterisierung des <i>aIF1A-1</i> (HVO_0136) ohne und mit nativer 3'-UTR.....	70
Abbildung 23: Charakterisierung des <i>aIF1A-2</i> (HVO_A0637) .....	71
Abbildung 24: Charakterisierung des <i>aIF2<math>\alpha</math></i> (HVO_0699) .....	74
Abbildung 25: FPLC der Elutionsfraktion nach der Affinitätsaufreinigung von <i>aIF2<math>\alpha</math></i> .....	78
Abbildung 26: <i>Crosslinking</i> von <i>aIF2<math>\alpha</math></i> .....	82
Abbildung 27: Translationsregulation mittels eIFs in Eukaryonten .....	83
Abbildung 28: Multiple-Sequence-Alignment für die Wahl der Phosphorylierungsstelle in <i>aIF2<math>\alpha</math></i> .....	84
Abbildung 29: Charakterisierung des <i>aIF2<math>\alpha</math></i> (HVO_0699) mit der Ser46 mutiert zu Ala46 .....	85
Abbildung 30: Charakterisierung des <i>aIF2<math>\alpha</math></i> (HVO_0699) mit der Ser46 mutiert zu Asp46 .....	85
Abbildung 31: Charakterisierung des <i>aIF2<math>\beta</math>-1</i> (HVO_1678) .....	86
Abbildung 32: FPLC der Elutionsfraktion nach der Affinitätsaufreinigung von <i>aIF2<math>\beta</math>-1</i> .....	87
Abbildung 33: Charakterisierung des <i>aIF2<math>\beta</math>-2</i> (HVO_2242) .....	89
Abbildung 34: FPLC-Analyse des Eluats nach der Affinitätsaufreinigung von <i>aIF2<math>\beta</math>-2</i> .....	91
Abbildung 35: Charakterisierung des <i>aIF2<math>\gamma</math></i> (HVO_1901).....	94
Abbildung 36: FPLC-Analyse des Eluats nach der Affinitätsaufreinigung von <i>aIF2<math>\gamma</math></i> .....	95
Abbildung 37: Charakterisierung des <i>aIF2<math>\beta\alpha</math></i> (HVO_1934).....	100
Abbildung 38: Charakterisierung des <i>aIF2<math>\beta\delta</math>-1</i> (HVO_0966).....	101
Abbildung 39: Charakterisierung des <i>aIF2<math>\delta</math>-2</i> (HVO_2706) .....	104
Abbildung 40: Charakterisierung des eIF4A-homologes (HVO_1333) .....	105
Abbildung 41: Charakterisierung des <i>aIF5A</i> (HVO_2300).....	107
Abbildung 42: Charakterisierung des <i>aIF5B</i> (HVO_1963).....	108
Abbildung 43: Charakterisierung des <i>aIF6</i> (HVO_0117) .....	110

Abbildung 44: Interaktionsnetzwerk der aIFs, die weitere aIFs mitreinigen konnten .....	113
Abbildung 45: Netzwerk der aIFs, die RNAPUs mitreinigen konnten .....	114
Abbildung 46: Wachstum der Überexpressionsmutanten von RNAPUs .....	116
Abbildung 47: Affinitätsaufreinigung der überexprimierten RNAPUs .....	116
Abbildung 48: Interaktionsnetzwerk der RNAPUs .....	118
Abbildung 49: Interaktionsnetzwerk zwischen den RNAPUs und aIFs .....	121
Abbildung 50: Statistische Auswertung der MS-Daten .....	124
Abbildung 51: Sequenz-Alignment aIF1/eIF1/SUI1/YciH (modifiziert nach (Gogoi and Kanaujia, 2018)).....	128
Abbildung 52: Sequenz-Alignment IF1/eIF1A/aIF1A modifiziert (Li and Hoffmann, 2001; Luna <i>et al.</i> , 2013).....	130
Abbildung 53: DNA- und RNA-Seq-Daten des <i>aIF1A-2</i> (HVO_A0637) .....	131
Abbildung 54: DNA- und RNA-Seq-Daten des <i>aIF2<math>\alpha</math></i> (HVO_0699) .....	133
Abbildung 55: Sequenz-Alignment des N-Terminus von aIF2 $\alpha$ /eIF2 $\alpha$ .....	138
Abbildung 56: Analyse des aIF2 $\beta$ -1 (HVO_1678) und aIF2 $\beta$ -2 (HVO_2242) .....	139
Abbildung 57: DNA- und RNA-Seq-Daten von aIF2 $\gamma$ (HVO_1901) .....	142
Abbildung 58: Sequenz-Alignment von aIF2 $\gamma$ /eIF2 $\gamma$ .....	143
Abbildung 59: Sequenz-Alignment aIF2B $\delta$ mit RBPIs .....	151
Abbildung 60: Sequenz-Alignment aIF2B $\delta$ mit aIF2Bs.....	152
Abbildung 61: DNA- und RNA-Seq-Daten zu <i>aIF5A</i> (HVO_2300).....	155
Abbildung 62: Sequenz-Alignment aIF5A/eIF5A .....	156
Abbildung 63: Sequenz-Alignment aIF5B/eIF5B/IF2, modifiziert nach (Roll-Mecak <i>et al.</i> , 2000) .....	160
Abbildung 64: Sequenz-Alignment von aIF6/eIF6 .....	162
Abbildung 65: DNA- und RNA-Seq-Daten des <i>aIF6</i> (HVO_0117) .....	164
Abbildung 66: Transkriptions-Translations-Expressom modifiziert nach (Kohler <i>et al.</i> , 2017) .....	172
Abbildung 67: Sequenz-Alignment von aIF1A-1 und aIF1A-2 im Haloferax-Genus.....	196
Abbildung 68: Sequenz-Alignment von aIF2 $\beta$ -1 (D4GZP2) und aIF2 $\beta$ -2 (D4GVV8) aus <i>H. volcanii</i> .....	197
Abbildung 69: Sequenz-Alignment von aIF2 $\gamma$ (D4GTD4) aus <i>H. volcanii</i> .....	198
Abbildung 70: Sequenz-Alignment von aIF2B $\alpha$ und Abgleich Nudix-Domäne.....	198
Abbildung 71: Sequenz-Alignment von aIF2B $\delta$ -1 und aIF2B $\delta$ -2 .....	199
Abbildung 72: Sequenz-Alignment von aIF5A aus <i>H. volcanii</i> .....	199
Abbildung 73: Sequenz-Alignment von aIF5B aus <i>H. volcanii</i> .....	199
Abbildung 74: Sequenz-Alignment von rpoD aus <i>H. volcanii</i> .....	200

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: RNAPUs in den drei Domänen des Lebens (Grohmann, Hirtreiter and Werner, 2009) .....	3
Tabelle 2: Komponenten und Mechanismen der Translation .....	5
Tabelle 3: Translationsinitiationsfaktoren in den drei Domänen des Lebens nach (Londei, 2005).....	12
Tabelle 4: Eukaryontische Translationsinitiationsfaktoren und deren bisher bekannte Funktionen.....	16
Tabelle 5: Translationsinitiationsfaktoren in <i>H. volcanii</i> essenziell und nicht essenziell .....	19
Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Materialien .....	21
Tabelle 7: Verwendete Chemikalien und Lösungen .....	22
Tabelle 8: Auflistung verwendeter Antikörper .....	24
Tabelle 9: Verwendete Kits.....	24
Tabelle 10: Verwendete Geräte mit Herstellerangabe.....	24
Tabelle 11: Verwendete Polymerasen und Ligase .....	26
Tabelle 12: Verwendete Größenstandards.....	26
Tabelle 13: Verwendete Primer für die Erstellung der Plasmide.....	27
Tabelle 14: Primer zur Erstellung und Überprüfung von Deletionen.....	29
Tabelle 15: Plasmide für die Überexpression und Deletion einzelner Gene .....	30
Tabelle 16: Verwendete Mikroorganismen .....	32
Tabelle 17: Datenbanken und Software .....	32
Tabelle 18: Zusammensetzung des SOB <sup>+</sup> -Mediums für die Kultivierung von <i>E. coli</i> .....	33
Tabelle 19: Herstellung des TB-Puffers.....	33
Tabelle 20: Verwendete Selektionsmarker für <i>E. coli</i> bzw. für <i>H. volcanii</i> .....	34
Tabelle 21: Zusammensetzung Komplexmedium für die Kultivierung von <i>H. volcanii</i> .....	35
Tabelle 22: Zusammensetzung des synthetischen Medium .....	35
Tabelle 23: Kohlenstoffquellen für das synthetische Medium.....	36
Tabelle 24: Lösungen für die Transformation von <i>H. volcanii</i> .....	36
Tabelle 25: Komponenten zur Herstellung des Lysepuffers .....	38
Tabelle 26: Ansatz für den 66-dNTP-Mix.....	39
Tabelle 27: PCR-Ansatz zur Erstellung von DNA-Fragmenten für die Klonierungen.....	40
Tabelle 28: Ansatz für den 10xTaq-Puffer .....	40
Tabelle 29: PCR-Ansatz für eine Kolonie-PCR mit der laboreigenen Taq-DNA-Polymerase .....	41
Tabelle 30: PCR-Ansatz für eine Kolonie-PCR mit der Biozym-Taq.....	41
Tabelle 31: Ablauf Fusions-PCR nach Generierung der einzelnen Fragmente .....	41
Tabelle 32: PCR-Ansatz und Programm für die ortsspezifische Mutagenese .....	42
Tabelle 33: Ansatz für die Herstellung von lowT-dNTP-Mix .....	42
Tabelle 34: Ansatz für die Spaltung von genomischer DNA.....	43
Tabelle 35: Herstellung des TBE-Puffers und des 6xDNA-Probenpuffers.....	43
Tabelle 36: Ligations-Ansatz für DNA-Fragmente mit Überhängen und blunt-end DNA-Fragmente.....	44
Tabelle 37: Lösungen zur Vorbereitung des DNA-Transfers .....	45
Tabelle 38: Lösungen für die Hybridisierung und Chemilumineszenz .....	46
Tabelle 39: Puffer für die Proteinfällung .....	48
Tabelle 40: Komponenten für den pull-down Assay .....	49
Tabelle 41: Puffer und Lösungen für die SDS-PAGE .....	51
Tabelle 42: Komponenten für ein SDS-Polyacrylamidgel mit 1 mm Stärke .....	52
Tabelle 43: Lösungen für die Coomassie-Färbung.....	53
Tabelle 44: Puffer und Lösungen für die Tricin-SDS-PAGE .....	53
Tabelle 45: Komponenten zur Herstellung eines Tricin-SDS-Polyacrylamidgel .....	54

Tabelle 46: Puffer und Lösungen für den Western-Transfer.....	55
Tabelle 47: Antikörper für Penta-His und DHFR.....	56
Tabelle 48: Puffer und Lösungen für die Silberfärbung von SDS-Gelen.....	57
Tabelle 49: Laufpuffer für die FPLC.....	58
Tabelle 50: MS-Analyse des pSD+P (n=3).....	64
Tabelle 51: MS-Analyse der DHFR (n=3).....	64
Tabelle 52: Überexpression der einzelnen Initiationsfaktoren in der Deletion oder im Wildtyp.....	65
Tabelle 53: Einteilung der mitgereinigten Proteine von aIF1 (n=3).....	67
Tabelle 54: Einteilung der mitgereinigten Proteine von aIF1A-1 (n=3).....	70
Tabelle 55: Einteilung der mitgereinigten Proteine von aIF1A-2 (n=3).....	72
Tabelle 56: Ausschnitt der Diversität des aIF2/eIF2 in Archaea und Eukarya.....	72
Tabelle 57: Mitgereinigte Proteine von aIF2 $\alpha$ aus exponentieller und stationärer Kultur (n=3).....	75
Tabelle 58: MS-Analyse der Fraktionen zu Beginn der Schulter von aIF2 $\alpha$ (n=3).....	79
Tabelle 59: MS-Analyse der der Fraktionen vor der Spitze des Hauptpeaks von aIF2 $\alpha$ (n=2).....	80
Tabelle 60: MS-Analyse der Fraktionen nach der Spitze des Hauptpeaks von aIF2 $\alpha$ (n=3).....	81
Tabelle 61: MS-Analyse der Fraktionen zu Beginn der Schulter des Hauptpeaks von aIF2 $\beta$ -1 (n=3).....	88
Tabelle 62: MS-Analyse der Fraktionen in der Spitze des Hauptpeaks von aIF2 $\beta$ -1 (n=3).....	88
Tabelle 63: MS-Analyse der Fraktionen nach der Spitze des Hauptpeaks von aIF2 $\beta$ -1 (n=3).....	89
Tabelle 64: Einteilung der mitgereinigten Proteine von aIF2 $\beta$ -2.....	90
Tabelle 65: MS-Analyse der Fraktionen in der Schulter des Hauptpeaks von aIF2 $\beta$ -2 (n=3).....	92
Tabelle 66: MS-Analyse der Spitze des Hauptpeaks von aIF2 $\beta$ -2 (n=3).....	93
Tabelle 67: MS-Analyse der Fraktionen nach der Spitze des Hauptpeaks aIF2 $\beta$ -2 (n=3).....	93
Tabelle 68: Einteilung der mitgereinigten Proteine von aIF2 $\gamma$ .....	95
Tabelle 69: MS-Analyse der FPLC-Fraktionen zu Beginn des Hauptpeaks von aIF2 $\gamma$ (n=3).....	96
Tabelle 70: MS-Analyse der FPLC-Fraktionen in der Spitze des Hauptpeaks von aIF2 $\gamma$ (n=3).....	97
Tabelle 71: MS-Analyse der FPLC-Fraktionen nach der Spitze des Hauptpeaks von aIF2 $\gamma$ (n=3).....	99
Tabelle 72: Einteilung der mitgereinigten Proteine von aIF2B $\alpha$ .....	101
Tabelle 73: Einteilung der mitgereinigten Proteine von aIF2B $\delta$ -1.....	102
Tabelle 74: Einteilung der mitgereinigten Proteine von aIF2 $\delta$ -2.....	104
Tabelle 75: Einteilung der mitgereinigten Proteine von eIF4A-homolog.....	105
Tabelle 76: Einteilung der mitgereinigten Proteine von aIF5A.....	107
Tabelle 77: Einteilung der mitgereinigten Proteine von aIF5B in molekularbiologische Prozesse.....	109
Tabelle 78: Einteilung der mitgereinigten Proteine von aIF6 (n=2).....	111
Tabelle 79: Zusammenfassung der MS-Daten für die Interaktion zwischen den aIFs.....	112
Tabelle 80: Zusammenfassung der MS-Daten für die Interaktion zwischen aIFs und RNAPUs.....	114
Tabelle 81: RNA-Polymerase-Untereinheiten der RNA-Polymerase in <i>H. volcanii</i> .....	115
Tabelle 82: Mit den sieben RNAPUs mitgereinigte RNAPUs.....	117
Tabelle 83: Mit den sieben RNAPUs mitgereinigte Proteine der Translation.....	119
Tabelle 84: Mit den 14 aIFs und aIF-Untereinheiten mitgereinigte RNAPUs.....	120
Tabelle 85: Mit den sieben RNAPUs mitgereinigte aIFs und aIF-Untereinheiten.....	120
Tabelle 86: Interaktion aIF2 mit aIFs (Affinitätsaufreinigung-MS).....	147
Tabelle 87: Interaktion aIF2 mit aIFs (Affinitätsaufreinigung-FPLC-MS).....	147
Tabelle 88: MNT-P, RBPI- und aIF2B-like Motive nach (Dev <i>et al.</i> , 2009).....	151
Tabelle 89: Identifikation von rpS2, rpS3, rpS5, rpS10 in den MS-Daten von aIFs und RNAPUs.....	172
Tabelle 90: aIFs-MS-Daten Translation.....	201
Tabelle 91: aIFs-MS-Daten Transcription.....	202
Tabelle 92: aIFs-MS-Daten Protein folding.....	203

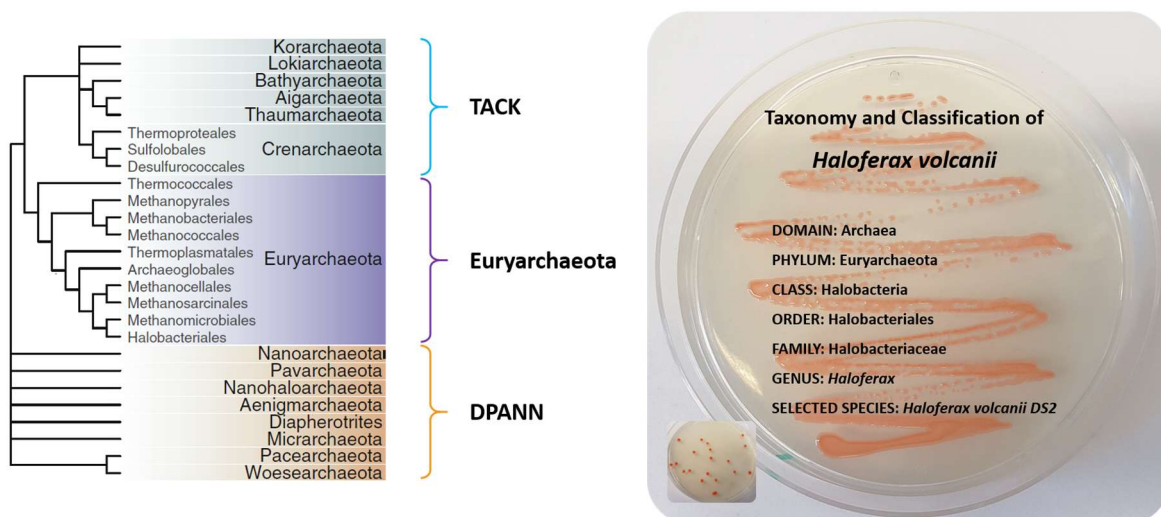
Tabelle 93: aIFs-MS-Daten Replication and Repair .....	203
Tabelle 94 aIFs-MS-Daten RNA turnover .....	204
Tabelle 95: aIFs-MS-Daten Protein turnover .....	204
Tabelle 96: RNAPU-MS-Daten Transcription .....	205
Tabelle 97: RNAPU-MS-Daten Translation .....	206
Tabelle 98: RNAPU-MS-Daten RNA turnover .....	206
Tabelle 99: RNAPU-MS-Daten Replication and Repair .....	207
Tabelle 100: RNAPU-MS-Daten Protein folding .....	207
Tabelle 101: RNAPU-MS-Daten Protein turnover.....	207

# 1 Einleitung

Das Leben wird in die drei Domänen Bacteria, Eukarya und Archaea eingeteilt (Woese, Kandler and Wheelis, 1990). Sie definieren sich durch die systematische Einteilung aller Lebewesen.

Der in dieser Arbeit verwendete Organismus *Haloferax volcanii* (*H. volcanii*) zählt zu den Archaeen (Abbildung 1). Diese Domäne gliedert sich in TACK, Euryarchaeota und DPANN. TACK steht hier für das Thaumarchaeota-Aigarchaeota-Crenarchaeota-Korarchaeota-Superphylum (Guy and Ettema, 2011).

Das Phylum der Euryarchaeota unterteilt sich in weitere Klassen, darunter die Halobacteria, die wiederum die Familie der Halobacteriaceae enthält, zu denen *H. volcanii* zählt (Nunoura *et al.*, 2011).



**Abbildung 1: Phyla der Archaeen modifiziert (Eme and Doolittle, 2015; Pohlschroder and Schulze, 2019)**  
Einteilung der Archaea in TACK, Euryarchaeota und DPANN. Taxonomie und Klassifizierung des in dieser Arbeit verwendeten Stammes *Haloferax volcanii* DS2.

*H. volcanii* wurde 1975 aus dem toten Meer isoliert, ist halophil und fakultativ anaerob (Mullakhanbhai and Larsen, 1975; Jantzer and Zerulla, 2011). Benannt wurde das Archaeon nach Benjamin Elazari Volcani, der erstmals den Beweis für mikrobielles Leben im Toten Meer lieferte (Oren and Ventosa, 1999).

Das Genom von *H. volcanii* besteht aus fünf Replikons: einem Hauptchromosom (2,9 Mb), drei kleineren Chromosomen pHV4 (636 kb), pHV3 (438 kb), pHV1 (85,1 kb) und einem Plasmid pHV2 (6,35 kb). Das Genom wurde 2010 vollständig sequenziert. Es beinhaltet 3996 Gene und sechs Replikationsursprünge. Die codierende genomische DNA von *H. volcanii* hat einen GC-Gehalt von 65 % (Hartman *et al.*, 2010). Für optimales Wachstum benötigt das Archaeon eine Salzkonzentration von etwa 2,1 M Natriumchlorid und besitzt eine Konzentrationstoleranz von 0,7-5 M Natriumchlorid. Es gibt zwei Möglichkeiten wie halophile Organismen mit diesem breiten Spektrum an Osmolarität umgehen und sich anpassen. Die eine beinhaltet die Akkumulation von organisch verträglichen gelösten Stoffen (z.B. Glycin, Betain, Ektoin), wie im

Beispiel von *Halomonas*. Die andere Möglichkeit wird auch „salt-in“-Strategie genannt, wie z.B. in der Klasse der Halobacteriaceae. Hier geschieht die Anpassung an die salinen Bedingungen durch hohe Kalium-Konzentrationen im Zellinneren (Christian and Waltho, 1962; Bayley, Morton and Lanyi, 1978; Mojica *et al.*, 1997; Santos and da Costa, 2002).

Die Anpassung der Organismen an diesen speziellen Lebensraum wirkt sich bei der salt-in Strategie auf den Aufbau ihrer Proteine aus. Die Aminosäurekomposition beinhaltet einen erhöhten Anteil an sauren Aminosäuren wie Aspartat und Glutamat. Diese Aminosäuren haben hauptsächlich einen Einfluss auf die Löslichkeit der Proteine. Sie erhalten auf der Oberfläche von Proteinen sowohl die Struktur, als auch die biologische Funktion bei hoher Ionenstärke. Dies führt auch dazu, dass halophile Proteine einen niedrigen isoelektrischen Punkt besitzen (Jaenicke, 1991; Ortega, Diercks and Millet, 2015; Bringer *et al.*, 2018).

*H. volcanii* kann in Komplexmedium und in synthetischem Medium kultiviert werden. In synthetischem Medium wird eine alternative Kohlenstoffquelle benötigt. Es gibt eine Vielzahl an alternativen Kohlenstoffquellen beispielsweise verschiedene Zucker, Aminosäuren, Glycerin, Acetat oder Pyruvat. Unter optimalen Bedingungen beträgt die Verdopplungszeit von *H. volcanii* etwa drei Stunden. Zusätzlich zum aeroben Wachstum kann *H. volcanii* auch anaerob, unter Verwendung von Nitrat, Trimethylaminoxid (TMAO) oder Dimethylsulfoxid (DMSO) als Elektronenakzeptor kultiviert werden (Soppa, 2011).

Als Modellorganismus in Archaeen eignet sich *H. volcanii* durch die kurze Generationszeit, die einfachen Kultivierungsbedingungen und das umfangreiche und stetig wachsende Repertoire an molekularbiologischen, genetischen und biochemischen Methoden (Allers and Ngo, 2003; MacNeill, 2011; Pohlschroder and Schulze, 2019).

### 1.1 Diversität in den drei Domänen des Lebens

Zu Beginn wurden zwei Domänen des Lebens definiert, da Archaeen aufgrund ihres Zellaufbaus und ihrer Morphologie bis 1977 noch als Bakterien definiert wurden. Mittels 16S- und 18S-rRNA-Analyse konnten Woese und Fox die Archaeen als die dritte Domäne des Lebens etablieren (Woese and Fox, 1977). Evolutionsbedingt gibt es viele Arten, die gleichzeitig zu zwei Domänen gehören. Gemeinsamkeiten bei Bacteria und Archaea betrifft unter anderem ein fehlender Zellkern, Flagellen für die Fortbewegung, das zirkuläre Chromosom und die Organisation ihrer Operons (Kuzminov, 2014; Samson and Bell, 2014).

Auch zwischen Archaeen und Eukaryonten gibt es Gemeinsamkeiten (Pluchon *et al.*, 2013; Adam *et al.*, 2017; Eme *et al.*, 2017). Viele molekularbiologische Prozesse von Archaeen ähneln Prozessen in Eukaryonten. Hinzu kommen viele homologe Proteine. Ein Bereich ist die Replikation, am Beispiel von Orc1 und Cdc6 (Li *et al.*, 2010; MacNeill, 2011). In Eukaryonten bindet der *origin recognition complex* (ORC), bestehend aus den Proteinen Orc1-6, an die Replikationsursprünge. Daraufhin rekrutieren ORCs viele Proteine zum Replikationsursprung,



darunter auch Cdc6 (Duncker, Chesnokov and McConkey, 2009). Im Vergleich hierzu besitzen Archaeen, bis auf Methanogene, homologe Gene für Orc1 oder/und Cdc6, mindestens jedoch für eines der beiden Proteine (Barry and Bell, 2006; Samson, Abeyrathne and Bell, 2016; Ludt and Soppa, 2018).

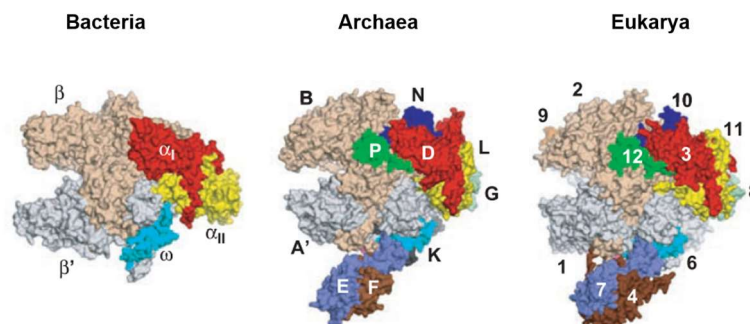
In der Transkription konnten strukturelle und funktionelle Homologien des Transkriptionsapparates zwischen Archaeen und Eukaryonten gezeigt werden. Hierzu zählen die RNA-Polymerase mit ihren Untereinheiten, Transkriptionsfaktoren wie TBP, TFB und E (Qureshi *et al.*, 1995; Richard, Bell and White, 2004; Jun *et al.*, 2011; Pluchon *et al.*, 2013; Gehring, Walker and Santangelo, 2016). Die Tabelle 1 zeigt, dass für Archaeen und Eukaryonten 13 RNAPUs (RNA-Polymerase-Untereinheiten) und für Bakterien 6 RNAPUs bekannt sind (Werner and Weinzierl, 2002; Grohmann, Hirtreiter and Werner, 2009).

**Tabelle 1: RNAPUs in den drei Domänen des Lebens (Grohmann, Hirtreiter and Werner, 2009)**

	Archaea	Eukarya	Bacteria
shared in all 3 domains	A'+A''	rpb1	β'
	B(1+2)	rpb2	β
	D	rpb3	αI
	K	rpb6	ω
	L	rpb11	αII
archaeal and eukaryotic subunits	F	rpb4	
	H	rpb5	
	E	rpb7	
	G	rpb8	
	N	rpb10	
	P	rpb12	
only found in eukaryotes		rpb9	
found in certain species	rpo13*	Gdown1*	δ*

\*these subunits are not orthologues

Fünf Untereinheiten der RNAP sind in allen drei Domänen des Lebens vertreten, die eine Art Krabberschere formen (Abbildung 2) (Langer *et al.*, 1995; Jun *et al.*, 2011).



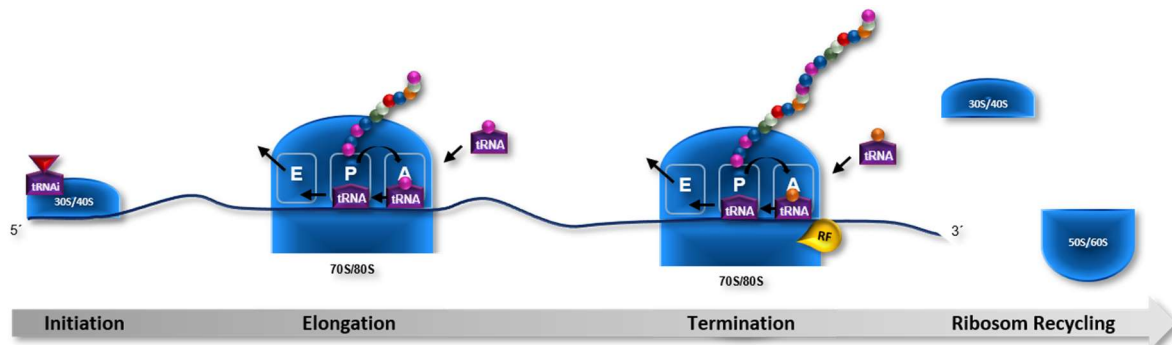
**Abbildung 2: Strukturen von RNAPs in den drei Domänen des Lebens modifiziert nach (Jun *et al.*, 2011)**  
 In Bakterien (*Thermus aquaticus*), Archaeen (*Sulfolobus solfataricus*) und Eukaryonten (*Saccharomyces cerevisiae* Polymerase II). Orthologe Untereinheiten besitzen denselben Farbcode.

Diese sind für die Trennung der DNA-Stränge zuständig und bilden den RNAP-Kern. Der Kern beherbergt das katalytische Zentrum in Bakterien an der Schnittstelle der Untereinheiten  $\beta/\beta'$ , in Archaeen an der Schnittstelle von rpoA/B und in Eukaryonten an den Untereinheiten rpb1/2 (Jun *et al.*, 2011; Griesenbeck, Tschochner and Grohmann, 2017).

Trotz der geringen Sequenzidentität zwischen den Untereinheiten gibt es in der Struktur der Kernuntereinheiten einen hohen Grad an Konservierung (Hirata and Murakami, 2009). Sechs weitere Untereinheiten sind nur in Archaeen und Eukaryonten vertreten. Sie bilden eine hervorstechende, stielartige Struktur, die bei bakteriellen RNAPs nicht vorhanden ist. Diese Struktur wird von E und F gebildet und ist durch K an das RNAP-Zentrum gebunden. Dieser Komplex ist an einer Vielzahl von Funktionen beteiligt, unter anderem an der Stabilisierung des Initiationskomplexes und der Bindung des entstehenden RNA-Transkripts. (Hirata and Murakami, 2009; Jun *et al.*, 2011; Griesenbeck, Tschochner and Grohmann, 2017)

## 1.2 Translation, ein universeller Mechanismus

Die Translation findet in allen drei Domänen des Lebens als ein hochkonservierter Prozess statt und gliedert sich in die vier Abschnitte: Initiation, Elongation, Termination und anschließendem Recycling der Ribosomen (Abbildung 3).



**Abbildung 3: Ablauf einer Translation**

Die Translation gliedert sich in Initiation, Elongation, Termination und Ribosomen Recycling. Die Initiation beginnt mit der Assemblierung der Start-tRNA und des Ribosoms an die mRNA. Bei der Elongation wird die mRNA abgelesen und die Aminosäuren zu einer wachsenden Peptidkette verknüpft. Bei der Termination wurde das Stoppcodon erreicht. Mit Hilfe von Release Faktoren (RF) wird die Polypeptidkette freigesetzt und die Translation geht über zum Ribosomen Recycling, bei dem die ribosomalen Untereinheiten von der mRNA dissoziieren.

Bei der Translation wird die in der Transkription erstellte mRNA benötigt. An diese mRNA bindet während der Initiation das Ribosom. Die mRNA wird während der Elongation in die Aminosäuresequenz überführt und somit das Protein synthetisiert. Bei Erreichen des Stoppcodons wird mit Hilfe von Release-Faktoren die Translation beendet und die Ribosomen recycelt. Bemerkenswert ist hierbei, dass die Initiation der Translation gleichzeitig der limitierende und determinierende Schritt der Translation ist. Diese Komplexität wird von Translationsinitiationsfaktoren und verschiedenen Initiationsmechanismen beeinflusst (Benelli and Londei, 2009).

### 1.3 Translationsinitiation in den drei Domänen des Lebens

Die Translationsinitiation beschreibt den Start der Translation. Diese beginnt zumeist mit der Verbindung der kleinen ribosomalen Untereinheit mit der mRNA und der Initiator t-RNA. Von besonderer Bedeutung ist die korrekte Positionierung für das Leseraster und die erfolgreiche Decodierung der mRNA. Erst dann stößt die große ribosomale Untereinheit in der Translationsinitiation hinzu, sodass die Elongation der Translation beginnen kann.

Trotz des universellen Mechanismus der Translation, die in allen drei Domänen des Lebens vertreten ist, gibt es Unterschiede bei den Komponenten und Mechanismen, die in Tabelle 2 zusammengefasst sind.

**Tabelle 2: Komponenten und Mechanismen der Translation**

	Bacteria	Eukarya	Archaea
<b>mRNA</b>	mono- and polycistronic	monocistronic	mono- and polycistronic
<b>Initiator-tRNA</b>	Formylmethionine	Methionine	Methionine
<b>Ribosom subunit</b>	70S (30S/50S)	80S (40S/60S)	70S (30S/50S)
<b>Ribosom rRNA</b>	16S; 23S, 5S	18S; 28S, 5,8S, 5S	16S; 23S, 5S
<b>translation initiation factors</b>	3-5	>10	>10
<b>Spatial organization transcription/translation</b>	temporally and spatially coupled	temporally and spatially separated	temporally and spatially coupled
<b>initiation mechanisms</b>	leaderless 5'-UTR without SD SD-Sequence	leaderless  Scanning IRES	leaderless 5'-UTR without SD SD-Sequence

Diese Unterschiede beginnen bereits bei der Start-tRNA. In Bakterien handelt es sich um formylmethionyl-tRNA (fMet-tRNA), in Archaeen und Eukaryonten hingegen um methionyl-tRNA (Met-tRNA) (Hussain *et al.*, 2016).

In Eukaryonten besitzt die mRNA eine 5'-Cap und eine Polyadenylierung am 3'-Ende, was bei Bakterien und Eukaryonten nicht der Fall ist (Schmitt *et al.*, 1998). Bei Prokaryonten ist die mRNA mono- oder polycistronisch, in Eukaryonten monocistronisch (Kozak, 2005b).

Eukaryonten haben meist eine kleine 40S ribosomale Untereinheit und eine große 60S ribosomale Untereinheit. Archaeen und Bakterien besitzen eine kleine 30S und eine große 50S ribosomale Untereinheit (Pestova *et al.*, 2000; Londei, 2005; Gualerzi and Pon, 2015). Bemerkenswert ist, dass das eukaryontische Ribosom keine evolutionäre Mischung aus archaealer und bakterieller Ribosomenelemente ist. Eukaryonten und Archaeen teilen sich 33 homologe, ribosomale Proteine, die nicht in Bakterien vertreten sind. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass diese ribosomalen Proteine für die Stabilität von Strukturen der rRNA wichtig sind (Wool, Chan and Glück, 1995; Ben-Shem *et al.*, 2010). Jedoch teilen sich alle drei Domänen Homologien in 34 ribosomale Proteinen, darunter 15 Proteine der kleinen ribosomalen Untereinheit und 19 Proteine der großen ribosomalen Untereinheit (Lecompte *et al.*,

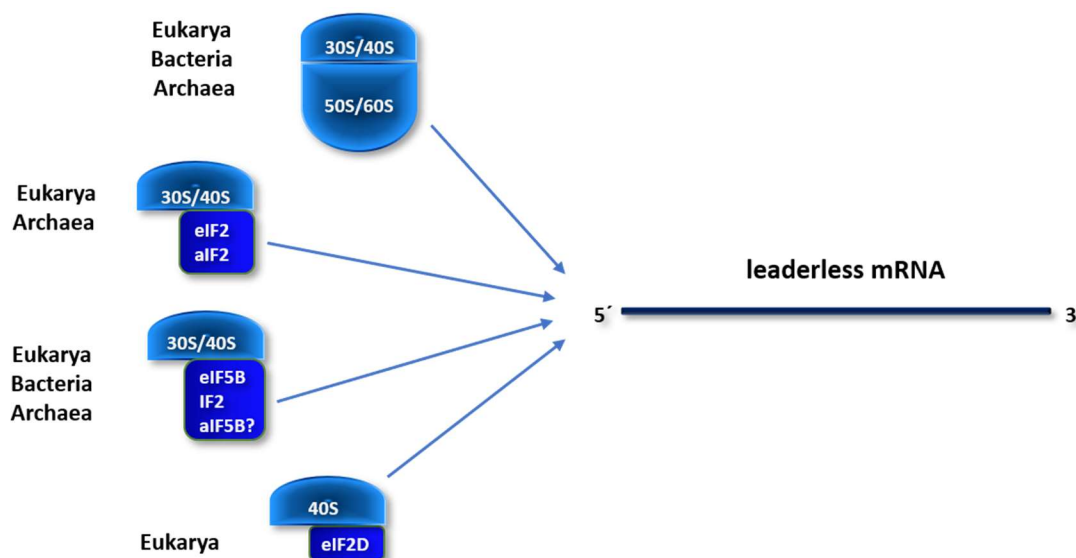
2002; Simonetti *et al.*, 2009; Korobeinikova, Garber and Gongadze, 2012; Armache *et al.*, 2013; Forterre, 2015).

Trotz der Homologien zeigen die ribosomalen Proteine verschiedene Aminosäurereste, die Proteinsegmente formen und nur in Bakterien, Eukaryonten oder Archaeen zu finden sind. Dies führt zu einer hohen Diversität in den Strukturen der universellen ribosomalen Proteinen (Melnikov, Manakongtreecheep and Söll, 2018).

Auch bei den Initiationsmechanismen der Translation gibt es Unterschiede in den drei Domänen des Lebens. In Bakterien ist die Initiation der Translation über die SD-Sequenz, eine 5'-UTR ohne SD-Sequenz, als auch über den leaderlosen Mechanismus möglich. In Eukaryonten geschieht dies über den Scanning-Mechanismus, IRES (*internal ribosom entry site*) und die leaderlose Translation. In Archaeen ist bisher die leaderlose Translationsinitiation, die Initiation mit 5'UTR ohne SD-Sequenz und die Initiation ohne SD-Sequenz bekannt.

### 1.3.1 Leaderlose Translationsinitiation

In allen drei Domänen des Lebens vertreten und somit der evolutionär älteste Mechanismus, ist der leaderlose Mechanismus der Translationsinitiation (Andreev *et al.*, 2006; Zheng *et al.*, 2011; Gäbel *et al.*, 2013). Bei diesem Mechanismus liegt die mRNA ohne 5'-UTR und ohne Shine-Dalgarno-Sequenz (SD-Sequenz) vor. In Abbildung 4 sind verschiedene Initiationswege für leaderlose mRNA in den drei Domänen des Lebens dargestellt.



**Abbildung 4: Initiationswege der Translation an leaderlosen Transkripten in den drei Domänen des Lebens** Hierbei sind das Ribosom und verschiedene Translationsinitiationsfaktoren involviert.

In allen drei Domänen ist die Initiation über ein undissoziiertes Ribosomen möglich (70S bzw. 80S). Des Weiteren wird die leaderlose mRNA sowie eine Initiator-tRNA benötigt (Moll *et al.*, 2002, 2004; O'Donnell and Janssen, 2002).

In *H. volcanii* sind 72 % der proteinkodierenden Transkripte leaderlos (Babski *et al.*, 2016). In *Sulfolobus solfataricus* (*S. solfataricus*) betrifft dies 69 % aller Transkripte (Wurtzel *et al.*, 2010). Es gibt aber auch Archaeen, bei denen bedeutend weniger Transkripte leaderlos sind. Bei den methanogenen Archaeen ist dies zum Beispiel *Methanobus psychrophilus* mit 16 % und *Methanosarcina mazei* mit 11 % leaderlosen Transkripten (Jäger *et al.*, 2009). Bei den Thermococcales sind unter anderem in *Thermococcus kodakarensis* 14 % der Transkripte leaderlos (Jäger *et al.*, 2014).

In *S. solfataricus* wurde beschrieben, dass die leaderlose Translationsinitiation für monocistronische Gene als auch am Start von Genen polycistronischer mRNA involviert ist (Benelli, Maone and Londei, 2003). Für *H. volcanii* wurde von Hering und Kollegen 2009 gezeigt, dass unter leaderlosen Bedingungen als Startcodon AUG vor GUG und UUG bevorzugt wird (Hering *et al.*, 2009).

In *Escherichia coli* (*E. coli*) konnte als Variante der leaderlosen Translation von Grill und Kollegen im Jahr 2000 gezeigt werden, dass bei einer erhöhten IF2-Konzentration, die 30S ribosomale Untereinheit und die leaderlose mRNA effizient um die Translation mit einer mRNA, die eine kanonische Ribosomenbindestelle enthält, konkurrieren kann (Grill *et al.*, 2000; Moll *et al.*, 2002).

Unter anderem wurde bewiesen, dass Translationsinitiationsfaktoren in der leaderlosen Translation eine Rolle spielen: IF3 beeinflusst die Translation über 70S Ribosomen, da es die Dissoziation von 70S Ribosomen unterstützt. Unter anderem inhibiert IF3 die Bindung der 30S ribosomalen Untereinheit an die leaderlose mRNA (Tedin *et al.*, 1999; Grill *et al.*, 2001; Moll *et al.*, 2004). IF2 dagegen unterstützt die Assoziation von 30S- und 50S-ribosomalen Untereinheiten. Im Kontrast hierzu stabilisiert IF2 den Präinitiationskomplex mit der 30S ribosomalen Untereinheit (Moll *et al.*, 2002; O'Donnell and Janssen, 2002; Antoun *et al.*, 2003).

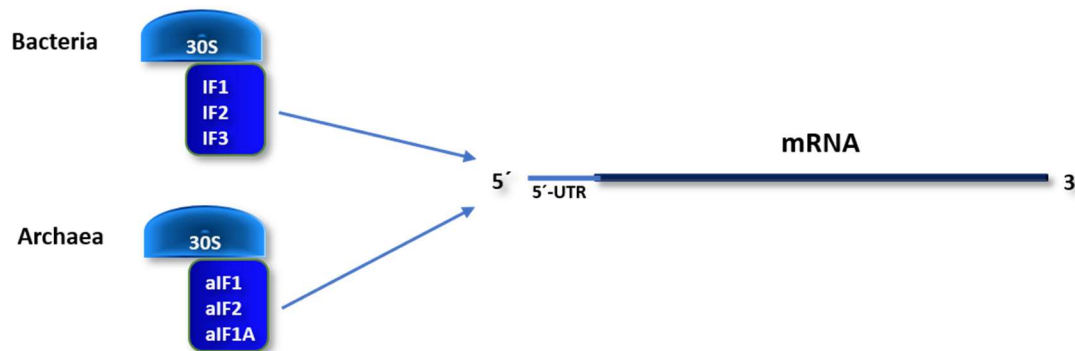
In Eukaryonten sind verschiedene Varianten der leaderlosen Translationsinitiation bekannt (Abbildung 4). Davon hauptsächlich die oben beschriebene Variante, bei der die mRNA und Initiator-tRNA an das 80S Ribosom bindet (Andreev *et al.*, 2006; Akulich *et al.*, 2016).

Die zweite Variante ist mittels eIF2D und 48S Ribosomen-Bildung möglich und wurde in Säugetierzellen von Dmitriev und Kollegen 2010 nachgewiesen. Das zuständige Gen ist in allen Eukaryonten vertreten und enthält eine SUI1 Domäne, die auch in eIF1 vertreten ist (Dmitriev *et al.*, 2010).

Die dritte Variante ist die eIF2-unabhängige Translationsinitiation durch eIF5B. Dieser eIF2 unabhängige Mechanismus tritt auf, wenn eIF2 durch Stressbedingungen phosphoryliert und somit inaktiviert wurde. Mittels eIF3 und Initiator-tRNA ist eIF5B in der Lage, mit der kleinen ribosomalen Untereinheit den 48S Präinitiationskomplex zu bilden. Unter anderem ist eIF5B ein Analog zum bakteriellen IF2 (Pestova *et al.*, 2008; Terenin *et al.*, 2008).

### 1.3.2 5'-UTR ohne SD-Sequenz

Dieser Translationsinitiationsmechanismus tritt in Archaeen und Bakterien auf. Die Struktur der mRNA beinhaltet dabei eine Verlängerung des 5'-Bereiches, der nicht translatiert wird. Bekannt ist, dass bei diesem Mechanismus eine 5'-UTR verwendet wird, die keine SD-Sequenz beinhaltet (Abbildung 5).



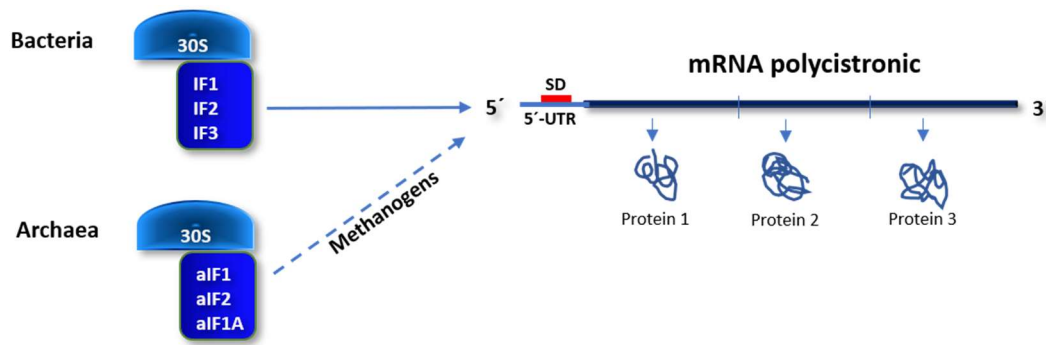
**Abbildung 5: Translationsinitiation an Transkripten mit 5'-UTR ohne SD-Sequenz**

Schema für die Initiation an einer mRNA mit 5'-UTR. Dabei werden die kleine ribosomale Untereinheit und Translationsinitiationsfaktoren benötigt.

In *H. volcanii* konnte nachgewiesen werden, dass die meisten Transkripte mit einer 5'-UTR keine SD-Sequenz aufweisen (Brenneis *et al.*, 2007). Damit grenzt sich die Translationsinitiation in diesem Mechanismus von dem bakteriellen SD-abhängigen Mechanismus, als auch vom eukaryotischen Scanning-Mechanismus ab. Hering *et al.* zeigte 2009 in *H. volcanii*, dass Mutationen die das Scannen inhibieren (z.B. ein AUG vor dem eigentlichen Startcodon, ein Aptamer, oder ein *stem-loop*) keinen Einfluss auf die Translationsinitiation ausübten (Hering *et al.*, 2009). Im Vergleich zur leaderlosen Translationsinitiation findet in *H. volcanii* mit gleicher 5'-UTR und unterschiedlichen Startcodons (AUG, GUG, UUG) an allein drei Startcodons eine Translationsinitiation statt (Hering *et al.*, 2009).

### 1.3.3 SD-Sequenz

Die Translationsinitiation an SD-Sequenzen in einer 5'-UTR tritt in Archaeen und Bakterien auf. Die SD-Sequenz ist auf der 5'-UTR vor dem offenen Leserahmen positioniert. Dabei fungiert die SD-Sequenz als Bindestelle der 30S ribosomalen Untereinheit, die eine anti-SD-Sequenz an der 16S ribosomalen RNA enthält (Abbildung 6). Diese Sequenz ist komplementär zur SD-Sequenz, liegt 4-7 Nukleotide stromaufwärts des Startcodons und ist 4-8 Nukleotide lang (Shine and Dalgarno, 1974; Kozak, 1999; Osada, Saito and Tomita, 1999).



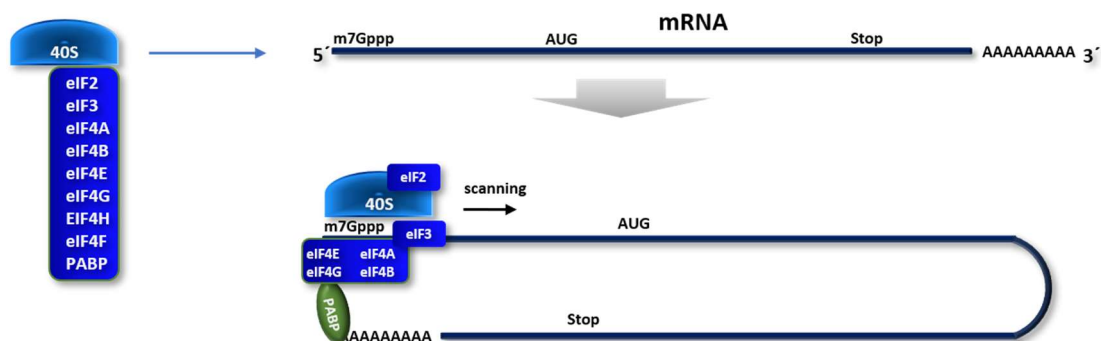
**Abbildung 6: Translationsinitiation an Transkripten mit SD-Sequenz**

Schema der Translationsinitiation an Transkripten mit SD-Sequenz im 5'-UTR-Bereich.

In *S. solfataricus* finden sich SD-Motive hauptsächlich in Operons von polycistronischen mRNAs (Benelli, Maone and Londei, 2003). Eine Genomanalyse ergab, dass SD-Motive (5'-GGAGGUGA-3') selten in *H. volcanii* vorkommen. Ihr Anteil ist im offenen Leserahmen jedoch sehr hoch. Sie liegen teilweise am Ende des offenen Leserahmens, im Abstand von  $5 \pm 2$  nt zum nächstfolgenden Gen und können so bei der Initiation der Translation des nachfolgenden Gens im Operon beteiligt sein. Dabei handelt es sich um eine Reinitiation (Kramer *et al.*, 2014).

### 1.3.4 Scanning

Die Translationsinitiation mit Hilfe des Scanning-Mechanismus (Abbildung 7) tritt lediglich in Eukaryonten auf.



**Abbildung 7: Translationsinitiation mittels Scanning Mechanismus in Eukaryonten (Shatsky *et al.*, 2010)**

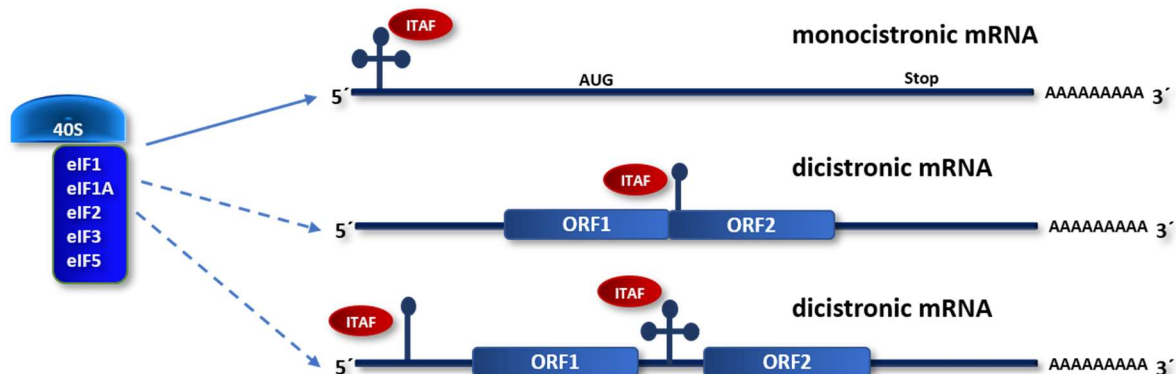
Schema der Translationsinitiation und den involvierten Translationsinitiationsfaktoren für den Ringschluss der mRNA und das Scanning.

Dabei bindet die kleine ribosomale Untereinheit Met-tRNA mit Hilfe von Translationsinitiationsfaktoren. Dieser sogenannte 43S-Initiationskomplex bindet an das 5'-Ende der mRNA, die eine m<sup>7</sup>G-Cap (7-Methylguanylate-Cap) besitzt (Kozak, 1999, 2002). Die m<sup>7</sup>G-Cap besteht aus einem modifizierten Guanin-Nukleotid, dass über eine 5'-5'-Phosphodiesterbindung an das 5'-Ende der mRNA geknüpft wird. Dies führt zu einer erhöhten Stabilität der mRNA und dient als Ribosom-Bindestelle (Furuichi and Shatkin, 2000; Hinnebusch, 2014; Ramanathan,

Robb and Chan, 2016). Der Scanning-Mechanismus wird unterstützt durch das Binden des eIF4F Komplexes an das 5'-Cap. Er besteht aus den Translationsinitiationsfaktoren eIF4E, eIF4G und die RNA-Helikase eIF4A (Dever, Kinzy and Pavitt, 2016). Sie ermöglichen mit PABP (*poly-A-binding protein*) einen Ringschluss der mRNA (*closed loop*). Des Weiteren ermöglicht eIF4A das lokale Aufwinden der mRNA und eine einfachere Bindung des 43S Initiationskomplexes. Der 5'-untranslatierte Bereich (5'-UTR) wird bis zum Erreichen des komplementären Anticodons zur Met-tRNA gescannt. Wenn dieser erreicht wurde, bindet das Triplet in der P-Site der 43S ribosomalen Untereinheit und bildet den 48S Initiationskomplex, an den die 60S große ribosomale Untereinheit bindet (Hinnebusch, 2011; Korostelev, 2014; Schmitt *et al.*, 2019).

### 1.3.5 IRES

Ein weiterer Translationsinitiationsmechanismus fungiert über interne Ribosomenbindestellen (IRES), die das Ribosomen selbst rekrutieren können und die Translation der mRNA starten. Der Initiationsmechanismus ist unabhängig von der 5' Cap-Variante (Scanning) und kann dann agieren, wenn dieser inhibiert ist (Jan, 2006). Die IRES liegen meist in der 5'-UTR der mRNA und bilden komplexe Strukturen (Abbildung 8).



**Abbildung 8: IRES-abhängige Translationsinitiation in Eukaryonten modifiziert nach (Fitzgerald and Semler, 2009; Martinez-Salas *et al.*, 2018)**

IRES bilden komplexe Strukturen und können sowohl an monocistronischer als auch an dicistronischer mRNA auftreten. Hierfür werden IRES-transaktivierende Faktoren (ITAFs) benötigt, die an die mRNA binden.

Diese Strukturen ermöglichen durch IRES-transaktivierende Faktoren (ITAFs) einer mRNA, an die 40S ribosomale Untereinheit in der Nähe des AUG-Codons zu binden. Dabei werden viele AUG-Codons, die stromaufwärts auf der 5'-UTR der mRNA liegen, vernachlässigt. Im Jahr 1988 wurde als erstes von Pelletier und Sonenberg die Translationsinitiation von picornaviralen mRNAs beschrieben, die es Ribosomen ermöglicht, die Translation an strukturell komplexen Regionen in der 5'-UTR zu initiieren.



Diese Strukturen sind in Viren und Eukaryonten zu finden (Pelletier and Sonenberg, 1988; Hellen and Sarnow, 2001; Seino *et al.*, 2005).

Der IRES-Mechanismus und die Aktivität wird bis heute kontrovers diskutiert, da es viele verschiedene Varianten für die Translationsinitiation über IRES-Elemente an zellulären und viralen IRES gibt (Kozak, 2005a; Pestova *et al.*, 2008; Shatsky *et al.*, 2010).

Die Rekrutierung des ribosomalen Komplexes mittels IRES wird unabhängig vom 5'-Cap verwendet und findet hauptsächlich unter Zellstress, wie zum Beispiel bei Nährstoffmangel oder Apoptose statt (Fitzgerald and Semler, 2009). Charakteristisch für IRES-Elemente sind lange, komplex strukturierte RNA-Sequenzen. Es gibt viele verschiedene IRES-Elemente, deren Funktionen noch nicht geklärt sind und die unterschiedliche Methoden für die Translationsinitiation verwenden. Zum Beispiel beim Vertreter der Dicistroviridae, dem Cricket-Lähmungsvirus (CrPV) wird eine *intergenic region* (IGR) verwendet, die zwischen zwei ORFs liegt und an eine IRES gekoppelt ist. Diese kann direkt mit dem Ribosom interagieren. Es werden keine eIFs benötigt. Bei CrPV werden für IGR-IRES die Elongationsfaktoren eEF1A und eEF2 benötigt. Bei dieser mRNA liegt die funktionale Struktur am Ende der 5'-UTR. Das erste GCU-Codon ist mit einer tRNA in der A-Site verbunden (Jan and Sarnow, 2002).

Bei anderen IRES werden zumindest eine Teilmenge der eIFs sowie der RNA-Bindeproteine für die Translationsinitiation benötigt. Am Beispiel des Hepatitis-C-Virus (HCV) konnte gezeigt werden, dass für den HCV IRES die Translationsinitiationsfaktoren eIF2, eIF3, eIF5 und eIF5B benötigt werden (Johnson *et al.*, 2017). Die RNA-Bindeproteine werden auch als IRES-transaktivierende Faktoren (ITAFs) bezeichnet und dienen der Stabilisierung der IRES-Struktur (Jackson, Hellen and Pestova, 2010). Die funktionale Struktur liegt hierbei direkt am Anfang der 5'-UTR. Das Startcodon AUG ist mit einer Initiator-tRNA in der P-Stelle gekoppelt (Gilbert, 2010; Komar, Mazumder and Merrick, 2012; Johnson *et al.*, 2017).

## 1.4 Translationsinitiationsfaktoren in den drei Domänen des Lebens

In allen drei Domänen des Lebens werden Translationsinitiationsfaktoren benötigt, die eine wichtige Rolle spielen. In Bakterien sind es die drei Initiationsfaktoren IF1, IF2 und IF3. Bei Eukaryonten sind es sehr viel mehr Initiationsfaktoren. Sie besitzen mehr als 14 eIFs. Es gibt IFs, die in allen drei Domänen des Lebens vertreten sind. Sie sind universell. Des Weiteren teilen Archaeen homologe bzw. orthologe Gene für IFs mit Eukaryonten, die in Bakterien nicht vertreten sind (Tabelle 3).

**Tabelle 3: Translationsinitiationsfaktoren in den drei Domänen des Lebens nach (Londei, 2005)**

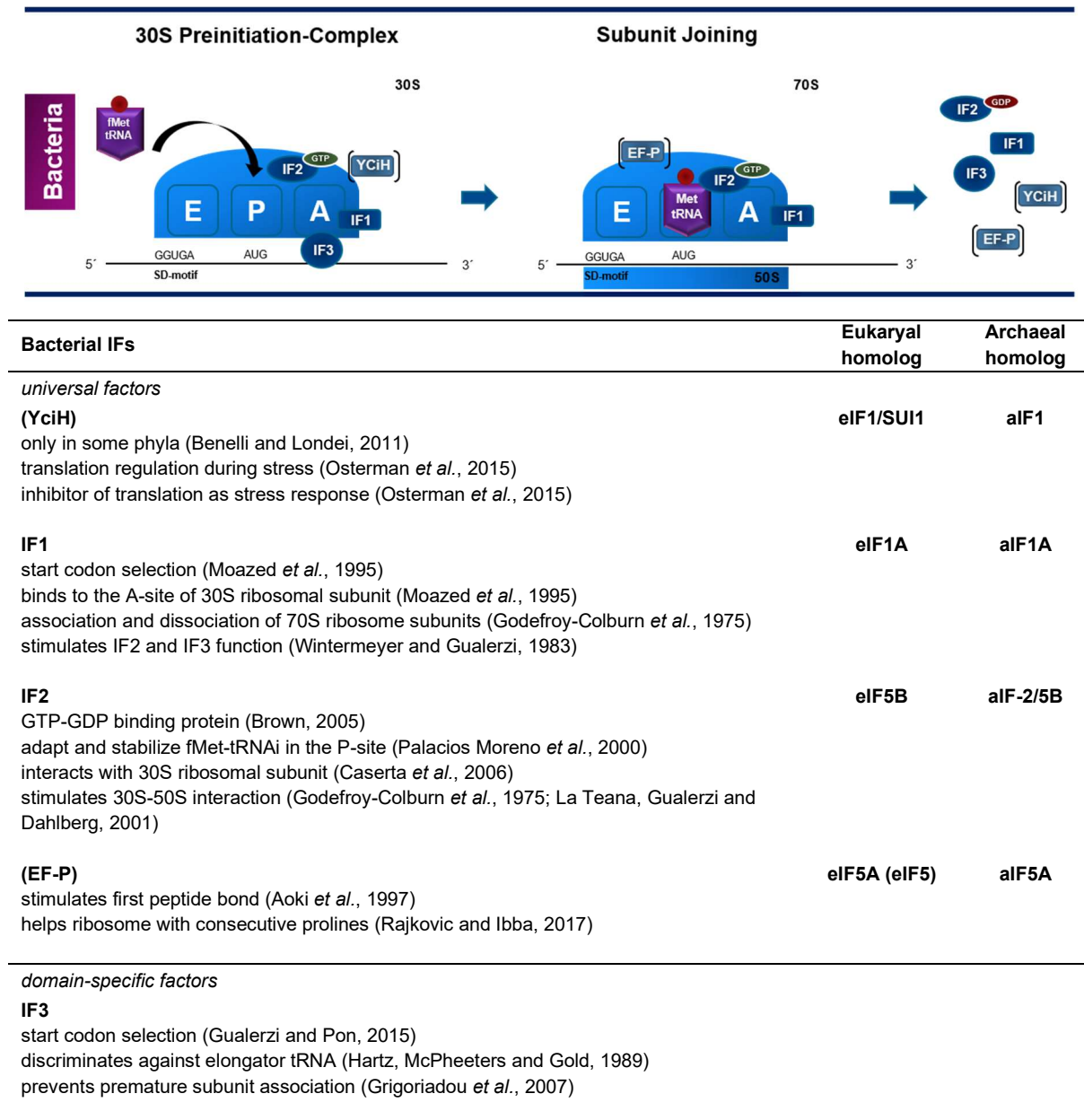
	Archaea	Bacterial homologue	Eukaryal homologue
<b>universal factors</b>	aIF1	(YCiH)	eIF1/SUI1
	aIF1A	IF1	eIF1A
	aIF-2/5B	IF2	eIF5B
	aIF5A	(EF-P)	eIF5A
<b>archaeal and eukaryotic subunits</b>	aIF2		eIF2
	aIF2B		eIF2B
	eIF4A-homolog		eIF4A
	aIF6		eIF6
<b>domainspecific subunits</b>			eIF3
			eIF5
		IF3	

In *H. volcanii* sind zum Beispiel 14 Gene als Translationsinitiationsfaktoren (aIFs) und deren Untereinheiten annotiert. Vier Initiationsfaktoren sind universell in allen drei Domänen des Lebens zu finden (Kyripides and Woese, 1998b). Vier weitere Initiationsfaktoren teilen sich Archaeen und Eukaryonten (Dev *et al.*, 2009; Miluzio *et al.*, 2009; Dmitriev *et al.*, 2011). Alle drei Domänen bilden mit Hilfe der Initiationsfaktoren einen Präinitiationskomplex, der essenziell für den Start der Translation und die Wahl des Startcodons ist (Londei, 2005; Benelli and Londei, 2009; Hasenöhrl *et al.*, 2009; Simonetti *et al.*, 2009).

### 1.4.1 IFs in der Translationsinitiation von Bakterien

Bei der Translationsinitiation in Bakterien bilden die IFs einen Präinitiationskomplex (Hussain *et al.*, 2016). Zu diesem Komplex gehören die kleine ribosomale Untereinheit zusammen mit der mRNA, die Initiationsfaktoren IF1, IF2-GTP, IF3 und formylierte Methionyl-tRNA (fMet-tRNA) (Simonetti *et al.*, 2009). Die fMet-tRNA tritt dabei in die P-Stelle ein, während die A-Stelle durch IF1 blockiert wird. IF1 ist eine der wesentlichen Komponenten für die Einleitung der Translation und der Auswahl des Startcodons. Sie bindet in der Nähe der A-Stelle auf der kleinen ribosomalen Untereinheit (Godefroy-Colburn *et al.*, 1975; Moazed *et al.*, 1995; Gualerzi *et al.*, 2001). Unter anderem bildet er für IF2 und IF3 einen Ankerpunkt und verbessert deren Aktivitäten (Hussain *et al.*, 2016).

In Abbildung 9 wird die Translationsinitiation in Bakterien dargestellt. Darüber hinaus werden die bekannten Funktionen der IFs beschrieben.



**Abbildung 9: Translationsinitiation in Bakterien und die Funktionen der einzelnen IFs**

Ablauf der Translationsinitiation mit den involvierten Initiationsfaktoren in Bakterien. In der Tabelle sind die bekannten Funktionen der IFs beschrieben.

IF2 ist ein GTP-GDP-Bindeprotein (Caserta *et al.*, 2006; Fabbretti *et al.*, 2012). Milon *et al.* beschrieb 2006 den IF2 als metabolischen Sensor (Milon *et al.*, 2006). Dies geschieht unter Stressbedingungen durch die Konkurrenz zwischen GTP und ppGpp (Guanosin-3',5'-bispyrophosphat). Das ppGpp wird vermehrt unter Stressbedingungen gebildet. GTP und ppGpp agieren als alternative physiologische IF2-Liganden. Der Ligand ppGpp inhibiert dabei die Translation, indem es an die gleiche Nukleotidbindestelle wie GTP bindet (Legault, Jeantet and Gros, 1972; Milon *et al.*, 2006; Steinchen and Bange, 2016). IF2 bindet im Präinitiationskomplex an die kleine ribosomale Untereinheit und ist unter anderem für die richtige Positionierung

der fMet-tRNA<sub>i</sub> in der P-Stelle zuständig (Palacios Moreno *et al.*, 2000; Caserta *et al.*, 2006). Anschließend stimuliert IF2 die Interaktion zwischen der 30S und 50S ribosomalen Untereinheit (Godefroy-Colburn *et al.*, 1975; La Teana, Gualerzi and Dahlberg, 2001).

Das Homolog von eIF1 in Bakterien ist YciH. Es ist nur in manchen Phyla vertreten und reguliert die Translation unter Zellstress (Benelli and Londei, 2011; Osterman *et al.*, 2015).

Die Funktion von EF-P in der Translationsinitiation ist umstritten, da sowohl gezeigt werden konnte, dass er für die Verknüpfung des ersten Peptides zuständig ist, aber auch in manchen Phyla nicht essenziell zu sein scheint (Aoki *et al.*, 1997). Unter anderem wurde 2017 von Rajkovic und Kollegen gezeigt, dass EF-P bei der Synthese von Peptiden mit Polyprolinen wichtig ist, um ein Hängen bleiben des Ribosom zu verhindern (Rajkovic and Ibba, 2017).

In Bakterien wirkt IF3 als Anti-Assoziationsfaktor und verhindert die vorzeitige Bindung der 50S ribosomalen Untereinheit (Dallas and Noller, 2001; Grigoriadou *et al.*, 2007). Ferner ist er an der Auswahl des Startcodons beteiligt und diskriminiert tRNAs, die für die Elongation und nicht für den Start der Translation bestimmt sind (Hartz, McPheeters and Gold, 1989; Gualerzi and Pon, 2015).

Nach Erkennung des Startcodons wird GTP zu GDP, die große ribosomale Untereinheit bindet und die IFs dissoziieren (Gualerzi *et al.*, 2001; Simonetti *et al.*, 2009). Die Elongation der Translation kann beginnen.

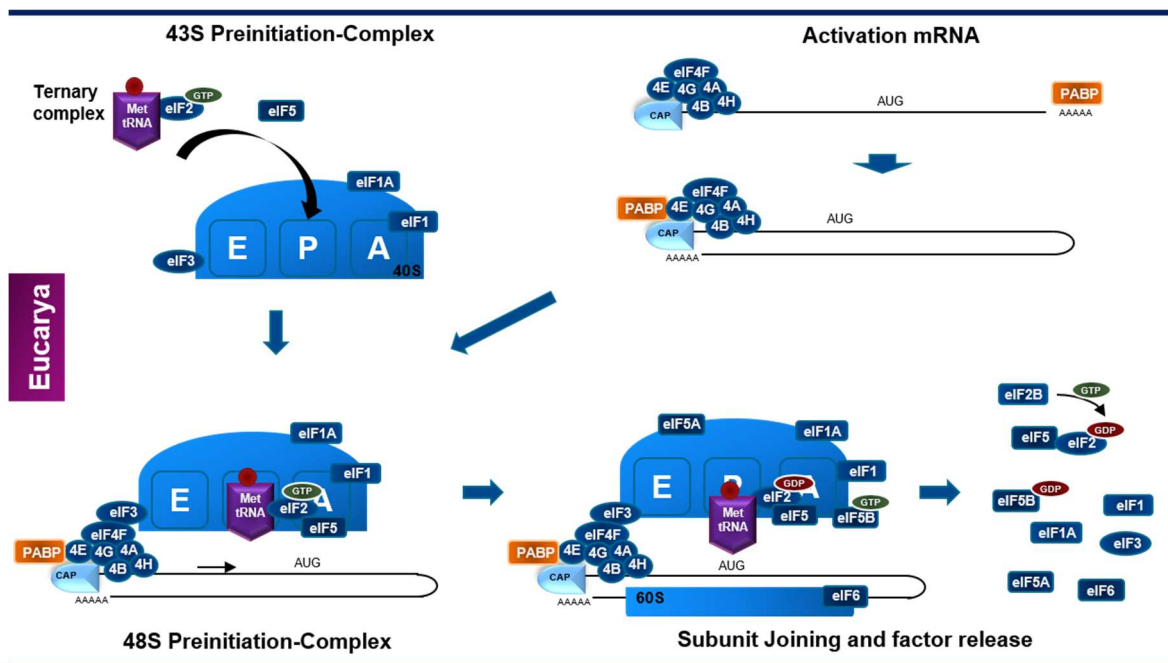
### 1.4.2 eIFs in der Translationsinitiation von Eukaryonten

In Eukaryonten wird ebenfalls ein Präinitiationskomplex gebildet. eIF2 bildet einen ternären Komplex mit GTP und der Methionyl-tRNA (Richter and Lipmann, 1970). Dieser ternäre Komplex bildet mit der 40S ribosomalen Untereinheit, eIF1, eIF1A, eIF3 und eIF5 den sogenannten 43S-Präinitiationskomplex, der an die mRNA bindet (Asano *et al.*, 2000; Olsen *et al.*, 2003). Dabei sind eIF1 und eIF1A für die offene Konformation der 40S ribosomalen Untereinheit und die Bindung des ternären Komplexes zuständig. Dies ermöglicht der Met-tRNA in die P-Stelle zu gelangen und diese auf die Komplementarität mit dem Anticodon-Triplett zu überprüfen.

Der Initiationsfaktor eIF5 agiert als GTPase aktivierendes Protein und stimuliert die Hydrolyse von GTP im ternären Komplex (Saini *et al.*, 2014). Die vorzeitige Hydrolyse wird im scannenden Präinitiationskomplex von eIF1 unterbunden. Der Präinitiationskomplex wird anschließend durch eIF4E und weitere verwandte eIFs an das 5'-Ende der mRNA rekrutiert.

Das Schema zum allgemeinen Ablauf der Translation in Eukaryonten und die Funktion der einzelnen eIFs sind in Abbildung 10 dargestellt.

eIF4A agiert hierbei als Helikase und windet die 5'-UTR auf. Von diesen verwandten eIFs fungiert eIF4G als Brücke zwischen eIF4E und dem *Poly(A)tail*-Bindungsprotein (PABP). Es verbindet so die 3'- und 5'-Enden der mRNA zu einem *closed loop*.



**Abbildung 10: Die eukaryontische Translationsinitiation nach (Dever, Kinzy and Pavitt, 2016)**

Der 43S-Präinitiationskomplex besteht aus der 40S ribosomalen Untereinheit, EIF1, EIF1A, EIF3 und dem ternären Komplex, bestehend aus EIF2-GTP-Met-tRNAi. Dieser bindet an die aktivierte mRNA und scannt in 3'-Richtung. Bei Erkennen des Startcodons bindet die 60S ribosomale Untereinheit den Initiationskomplex. Anschließend verlässt der größte Teil der Initiationsfaktoren den Initiationskomplex.

Dieser Komplex bewegt sich dann in 3' Richtung, das sogenannte Ribosomenscanning. Erfolgt die Basenpaarung der Met-tRNA mit dem Initiator-Codon AUG, findet eine Neuordnung der Translationsinitiationsfaktoren im Präinitiationskomplex statt (Luna *et al.*, 2013; Zeman *et al.*, 2019). EIF1 wird verdrängt. Das C-terminale Ende von EIF1A verändert seine Position von der Nähe zur P-Site, in die Nähe der GTPase aktivierenden Proteindomäne von EIF5 (Fekete *et al.*, 2007; Reibarkh *et al.*, 2008).

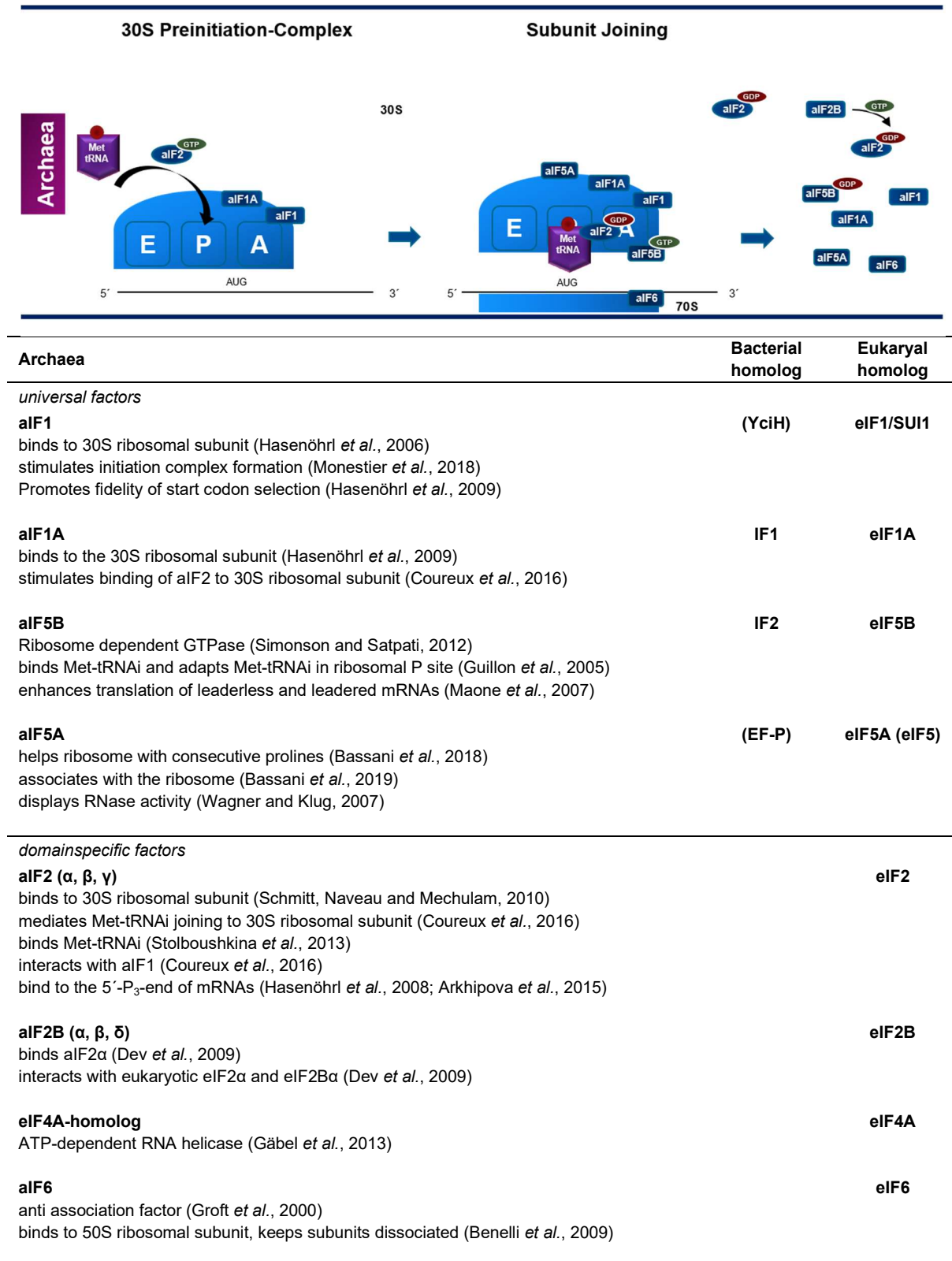
Diese Neuordnung ermöglicht, dass sich EIF1 von der ribosomalen 40S Untereinheit löst und sich eine geschlossene Konformation der 40S ribosomalen Untereinheit bildet (Lomakin *et al.*, 2003; Cheung *et al.*, 2007). Das EIF2-gebundene GTP wird hydrolysiert und resultiert in einer festeren Bindung der Met-tRNA in der P-Site (Nanda *et al.*, 2013). Der Faktor EIF6 bindet an die 60S große ribosomale Untereinheit, um so die frühzeitige Bindung der großen Untereinheit an den Präinitiationskomplex zu verhindern. EIF6 wird durch die *elongation factor-like GTPase*, in *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) Efl1p dissoziiert. Jetzt kann die 60S ribosomale Untereinheit an den Präinitiationskomplex binden (Graindorge *et al.*, 2005; Gandin *et al.*, 2008; Gartmann *et al.*, 2010). Die Bindung der ribosomalen 60S-Untereinheit wird dann durch die GTPase EIF5B erleichtert, die die korrekte Positionierung der Methionyl-tRNA gewährleistet. Die Erkennung der Methionyl-tRNA initiiert die Hydrolyse des gebundenen GTP, gefolgt von der Dissoziation von EIF5B. Die Elongation der Translation kann beginnen (Pestova *et al.*, 2000; Benelli and Londei, 2009). In Tabelle 4 werden die bekannten Funktionen der einzelnen EIFs näher beschrieben.

**Tabelle 4: Eukaryontische Translationsinitiationsfaktoren und deren bisher bekannte Funktionen**

Eukaryal	Archaeal homolog	Bacterial homolog
<i>universal factors</i>		
<p><b>eIF1</b> promotes fidelity of start codon selection and ribosomal scanning (Cheung <i>et al.</i>, 2007) interacts with 40S ribosomal subunit (Passmore <i>et al.</i>, 2007) prevents premature eIF5-induced hydrolysis of eIF2-bound GTP (Reibarkh <i>et al.</i>, 2008) eIF1 interacts with eIF2 (Thakur, Marler and Hinnebusch, 2019)</p>	<b>aIF1</b>	<b>(YciH)</b>
<p><b>eIF1A</b> supports binding of eIF2-GTP-Met-tRNA<sub>i</sub> to 40S ribosomal subunit (Saini <i>et al.</i>, 2009) involved in start codon selection (Fekete <i>et al.</i>, 2007) interacts with the 40S ribosomal subunit (Fekete <i>et al.</i>, 2005) dynamic interaction with eIF5B (Nag <i>et al.</i>, 2016)</p>	<b>aIF1A</b>	<b>IF1</b>
<p><b>eIF5B</b> Ribosome dependent GTPase (Shin <i>et al.</i>, 2002) mediates ribosomal subunit joining; eIF1, eIF1A, eIF2-GDP release (Pestova <i>et al.</i>, 2000) dynamic interaction with eIF1A (Nag <i>et al.</i>, 2016)</p>	<b>aIF-2/5B</b>	<b>IF2</b>
<p><b>eIF5A</b> stimulates first peptide bond (Dias <i>et al.</i>, 2012) helps ribosome with consecutive prolines (Gutierrez <i>et al.</i>, 2013)</p>	<b>aIF5A</b>	<b>(EF-P)</b>
<i>domain-specific factors</i>		
<p><b>eIF2 (α, β, γ)</b> eIF2-GTP high affinity for Met-tRNA<sub>i</sub> (Kimball, 1999) forms eIF2-GTP-Met-tRNA<sub>i</sub> ternary complex (Thakur, Marler and Hinnebusch, 2019) bind to 40S ribosomal subunit, delivers Met-tRNA<sub>i</sub> to the P-site (Naveau <i>et al.</i>, 2013) involved in start codon selection (Algire, Maag and Lorsch, 2005)</p>	<b>aIF2</b>	
<p><b>eIF2B (α, β, γ, δ, ε)</b> guanosine nucleotide exchange factor (Bogorad, Lin and Marintchev, 2017) Recycling of eIF2: displace eIF5 from eIF2-GDP, promotes GDP-GTP exchange of eIF2 (Gordiyenko <i>et al.</i>, 2014)</p>	<b>aIF2B</b>	
<p><b>eIF3 (a, b, c, g, i, j)</b> binds the 40S ribosomal subunit, eIF1, eIF4G and eIF5 (Asano <i>et al.</i>, 2000) stimulates binding of eIF2-GTP-Met-tRNA<sub>i</sub> to 40S subunit (Zeman <i>et al.</i>, 2019) promotes attachment of 43S complex to mRNA and subsequent scanning (Pisarev <i>et al.</i>, 2008) ribosome dissociation and anti-association (Unbehaun <i>et al.</i>, 2004)</p>		
<p><b>eIF4A</b> DEAD-box ATPase and ATP-dependent RNA helicase (Linder and Jankowsky, 2011) RNA binding, unwinding (Linder and Fuller-Pace, 2015)</p>	<b>eIF4A-homolog</b>	
<p><b>eIF4E</b> cap-binding protein of mRNA (O'Leary <i>et al.</i>, 2013)</p>		
<p><b>eIF4F</b> enhance the helicase activity of eIF4A (Rogers <i>et al.</i>, 2001)</p>		
<p><b>eIF4G</b> enhances helicase activity of eIF4A (Andreou and Klostermeier, 2014) binds eIF4A, eIF4E, eIF3, PABP and mRNA (Dever, Kinzy and Pavitt, 2016)</p>		
<p><b>eIF4B and eIF4H</b> enhance the helicase activity of eIF4A (Rogers <i>et al.</i>, 2001)</p>		
<p><b>eIF5</b> binds eIF2-GTP, stimulates GTPase activity of eIF2 (Valášek <i>et al.</i>, 2003) interacts with 40S ribosomal subunit, eIF3 and eIF2β (Asano <i>et al.</i>, 2000)</p>		
<p><b>eIF6</b> binds 60S and prevents premature joining of 40S (Gartmann <i>et al.</i>, 2010)</p>	<b>aIF6</b>	

### 1.4.3 aIFs in der Translationsinitiation von Archaeen

Im Gegensatz zu Eukaryonten und Bakterien sind in Archaeen die Translationsinitiation und die Funktion der Translationsinitiationsfaktoren bislang noch nicht vollständig aufgeklärt. Ein möglicher Ablauf der Translationsinitiation in Archaeen wird in Abbildung 11 dargestellt.



**Abbildung 11: Translationsinitiation in Archaeen**

Möglicher Ablauf der Translationsinitiation in Archaeen mit den beteiligten Translationsinitiationsfaktoren. Die Funktion der einzelnen Translationsinitiationsfaktoren ist in der Tabelle aufgelistet.

Für die Bindung der Met-tRNAi sind in Archaeen zwei mögliche Wege beschrieben. Bei der ersten Variante bindet aIF2, wie bei Bakterien IF2, zuerst an die kleine ribosomale Untereinheit und bindet dann die Met-tRNAi (La Teana *et al.*, 2013). Die zweite Variante verläuft wie bei Eukaryonten, bei der die Met-tRNAi an den GTP gebundenen eIF2/aIF2 bindet, einen ternären Komplex bildet und dann an die 30S ribosomale Untereinheit bindet (Schmitt *et al.*, 2012).

Der Präinitiationskomplex besteht in Archaeen aus einer 30S ribosomalen Untereinheit, den Faktoren aIF1, aIF1A und aIF2-gebundenem GTP mit der Met-tRNAi (Allen and Frank, 2007). Wie in Eukaryonten (eIF1) und Bakterien (IF1) beschrieben, verhindert auch aIF1 das vorzeitige Binden der großen ribosomalen Untereinheit und beschleunigt so die Bindung der Initiator-tRNA und der mRNA an das Ribosomen (Hasenöhrle *et al.*, 2006). aIF1A ist unter anderem an der Startcodonwahl und Positionierung der aIF2 gebundenen Met-tRNAi zuständig (Coureux *et al.*, 2016). Bei der Codon-Anticodon-Erkennung wird das IF2-gebundene GTP hydrolysiert und aIF2 verlässt das Ribosom. Dies geschieht wahrscheinlich zusammen mit aIF1 und aIF1A. aIF5B mit gebundenem GTP stabilisiert die Met-tRNAi in der P-Stelle und fördert die Bindung der 50S ribosomalen Untereinheit (Maone *et al.*, 2007). Für aIF2B konnte gezeigt werden, dass er mit aIF2, eIF2 $\alpha$  und eIF2B interagieren kann. Die genaue Funktion in Archaeen ist hingegen noch nicht geklärt (Dev *et al.*, 2009).

aIF6 verhindert, wie in Eukaryonten, das frühzeitige Binden der großen ribosomalen Untereinheit an den Präinitiationskomplex (Groft *et al.*, 2000; Benelli *et al.*, 2009).



## 1.5 Translationsinitiationsfaktoren in *H. volcanii*

In *H. volcanii* sind 14 Gene für aIFs und ihre Untereinheiten annotiert. Katrin Gäbel, die zuvor an diesem Projekt arbeitete, charakterisierte sie durch die Erzeugung von Deletionsmutanten und der Erstellung von bedingten Depletionsmutanten (Gäbel *et al.*, 2013). Neun dieser 14 Gene konnten deletiert werden. Für die anderen fünf Gene gab es keine Möglichkeit Deletionsmutanten zu erzeugen. Daher wurden sie als essenziell eingestuft (Tabelle 5).

**Tabelle 5: Translationsinitiationsfaktoren in *H. volcanii* essenziell und nicht essenziell**

Factor	Subunits	Deletion	Depletion	Conclusion
aIF1A	<i>aIF1A-1</i>	√	-	Orthologous genes: essential (no double-deletion mutant)
	<i>aIF1A-2</i>	√	-	
aIF1	<i>aIF1</i>	-	√	essential
	<i>aIF1 homolog</i>	√	-	non-essential
aIF2	<i>aIF2α</i>	√	-	non-essential
	<i>aIF2β-1</i>	√	-	Orthologous genes: essential (no double-deletion mutant)
	<i>aIF2β-2</i>	√	-	
	<i>aIF2γ</i>	-	√	essential
aIF2B	<i>aIF2Bα (aIF2/5Bα)</i>	√	-	non-essential
	<i>aIF2Bδ</i>	√	-	non-essential
	<i>eIF4A homolog</i>	√	-	non-essential
aIF5A	<i>aIF5A</i>	-	√	essential
aIF5B	<i>aIF5B</i>	-	√	essential
aIF6	<i>aIF6</i>	-	√	essential

In *H. volcanii* sind zwei orthologe Gene für aIF1A und aIF-2β annotiert. Diese aIF-Orthologen sind in der Lage, die Funktion des jeweils anderen Gens in einer Deletionsmutante teilweise zu ersetzen. In beiden Fällen konnte jeweils nur ein Gen deletiert werden. Doppel-Deletionsmutanten konnten nicht erstellt werden. Dies deutet darauf hin, dass auch aIF-1A und aIF-2β essenziell sind (Gäbel *et al.*, 2013).

## 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die in *H. volcanii* annotierten Translationsinitiationsfaktoren und deren Untereinheiten sind Teil eines breiten, wissenschaftlichen Forschungsfeldes. Dies betrifft insbesondere deren Funktion und Zusammenspiel. Bisher konnte anhand von Deletion und konditionaler Depletion festgestellt werden, welche Initiationsfaktoren essenziell sind. Darüber hinaus wurden sie in Wachstumsversuchen phänotypisch charakterisiert.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Rolle der Initiationsfaktoren in der Translation von *H. volcanii* weiter aufzuklären und deren Funktionsbereiche näher einzugrenzen. Hierbei soll die Identifizierung von Proteinen, die spezifisch mit aIFs interagieren als Methode dienen. Besonderes Augenmerk liegt hierbei auf den Interaktionen zwischen den einzelnen aIFs.

Als geeignetes Verfahren wurde die Überexpression und die native Co-Affinitätsaufreinigung der aIFs in *H. volcanii* etabliert. Dies erlaubte mit anschließender MS mögliche Interaktionspartner zu identifizieren und damit korrespondierende Netzwerke zu entwickeln.

Als weiterer Punkt wurde die Charakterisierung des aIF2 in *H. volcanii* weiter vorangetrieben. Es handelt sich hierbei um einen heterotrimeren Initiationsfaktor, der die Initiator-tRNA bindet und damit wesentlich für die Translationsinitiation ist. Trotz gleicher Funktion unterscheiden sich die aIF2-Untereinheiten in *H. volcanii*, die in direktem Kontakt mit der Initiator-tRNA sind, zu den Untereinheiten in Eukaryonten und dem Crenarchaeon *Sulfolobus*.

Die aIF2 $\alpha$ -Deletionsmutante zeigte in den vorangegangenen Untersuchungen (Gäbel *et al.*, 2013) unter allen getesteten Wachstumsbedingungen einen Phänotyp. Um die Regulation des aIF2 $\alpha$  genauer untersuchen zu können, wurde deshalb ein Aminosäure-Mimikry durchgeführt.

## 2 Material und Methoden

Die verwendeten Materialien und Methoden sind in diesem Kapitel aufgeführt.

### 2.1 Verwendete Materialien

In diesem Abschnitt sind alle verwendeten Materialien, Geräte, Software, Primer, Plasmide und Organismen aufgelistet.

#### 2.1.1 Verbrauchs- und Gebrauchsmaterialien

In der folgenden Tabelle sind die verwendeten Materialien aufgelistet.

**Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Materialien**

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Firmensitz</b>
Amersham Hyperfilm™ MP	GE Healthcare	München (D)
Deckgläser 18x18 mm	Knittel Glas	Braunschweig (D)
Objektträger	Diagonal	Münster (D)
Gel-Blotting-Papier (0,37 mm/1,4mm)	Carl Roth	Karlsruhe (D)
Mikrotiterplatten 96 well, Flachboden	Sarstedt	Nümbrecht (D)
Mikrotiterplatten 96 well, Rundboden	Sarstedt	Nümbrecht (D)
Dialyseschlauch MEMBRA-CEL® 3,5 kDa	Serva	Heidelberg (D)
Multiply® PCR-Plate 96 well	Sarstedt	Nümbrecht (D)
Multiply® Pro Gefäße 0,2 mL	Sarstedt	Nümbrecht (D)
Multiply® µStripPro 8er Kette	Sarstedt	Nümbrecht (D)
Roti®-Nylon plus, 0,45 µm (Southern Blot)	Carl Roth	Karlsruhe (D)
Pasteurpipetten	WU	Mainz (D)
PCR-Film adhäsive	Thermo Fisher Scientific	Wilmington (USA)
Petrischalen	Sarstedt	Nümbrecht (D)
Pipettenspitzen (2, 5, 20, 200 und 1000 µL)	Sarstedt	Nümbrecht (D)
Glaspipetten (5, 10 und 20 mL)	Brand	Wertheim (D)
Reagenzgläser	Assistent	Sondheim/Rhön (D)
Reaktionsgefäße (1,5; 2; 15 und 50 mL)	Sarstedt	Nümbrecht (D)
Sterifilter Filtropur S 0,45 µm PAT	Sarstedt	Nümbrecht (D)
Spritzen (1, 5 und 20 mL)	B. Braun	Melsungen (D)
Dialyseplättchen 13 mm	Merck	Darmstadt (D)
Faltenfilter 24 cm	Machery-Nagel	Düren (D)
Küvetten	Sarstedt	Nümbrecht (D)
Filtropur BT25 0.2; 250 mL Bottle Top Filter	Sarstedt	Nümbrecht (D)
Gel-Blotting-Papier, whatman® 3MM	Carl Roth	Karlsruhe (D)
Immobilon-P Membran, PVDF 0,45 µm (Western Blot)	Merck Millipore	Billerica (USA)
Parafilm	Bemis Flexible Packaging	Neenah (USA)
Steristopfen®	Heinz Herenz Medizinalbedarf	Hamburg (D)
Handschuhe Nitrile	VWR	Radnor (USA)
Handschuhe Nitrile light	VWR	Radnor (USA)
Hybridisierungsröhrchen	VWR	Radnor (USA)

**2.1.2 Verwendete Chemikalien**

In folgender Tabelle wurden alle verwendeten Chemikalien und Lösungen aufgeführt.

**Tabelle 7: Verwendete Chemikalien und Lösungen**

<b>Chemikalien und Lösungen</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Firmensitz</b>
2-Mercaptoethanol	Merck	Darmstadt (D)
3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS)	Merck	Darmstadt (D)
30 % (w/v) N-Lauroylsarcosinat	Appllichem	Darmstadt (D)
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Carl Roth	Karlsruhe (D)
2'-Deoxythymidin	AppliChem	Darmstadt (D)
2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat (dATP)	Thermo Fisher Scientific	Wilmington (USA)
2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat (dCTP)	Thermo Fisher Scientific	Wilmington (USA)
2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat (dGTP)	Thermo Fisher Scientific	Wilmington (USA)
2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat (dTTP)	Thermo Fisher Scientific	Wilmington (USA)
2-Propanol (Isopropanol)	VWR	Radnor (USA)
5-Fluorotsäure (5'FOA)	Thermo Fisher Scientific	Wilmington (USA)
Acrylamid/Bis-acrylamid (30 %)	Merck	Darmstadt (D)
Agarose	Genaxxon	Ulm (D)
Ammoniumchlorid	VWR	Radnor (USA)
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Carl Roth	Karlsruhe (D)
Ampicillin Natriumsalz	AppliChem	Darmstadt (D)
Bacto™-Agar	Becton Dickinson	Franklin Lakes (USA)
Bacto™-Casaminosäuren (CAS)	Becton Dickinson	Franklin Lakes (USA)
Bacto™-Trypton	Becton Dickinson	Franklin Lakes (USA)
Bacto™-Hefeextrakt	Becton Dickinson	Franklin Lakes (USA)
Betain	Merck	Darmstadt (D)
Blocking-Reagenz	Roche Diagnostics	Rotkreuz (CHE)
Ortho-Borsäure	VWR	Radnor (USA)
Bromphenolblau	Carl-Roth	Karlsruhe (D)
CDP-Star	Roche Diagnostics	Rotkreuz (CHE)
Calciumchlorid	VWR	Radnor (USA)
Chelating Fast Flow Sepharose	GE Healthcare	München (D)
Chloroform	Carl Roth	Karlsruhe (D)
Cobalt(II)-Chlorid	Merck	Darmstadt (D)
Coomassie® Brilliantblau Blue R-250	AppliChem	Darmstadt (D)
D-Glucose-Monohydrat	Merck	Darmstadt (D)
Dextransulfat	VWR	Radnor (USA)
Diethylether	VWR	Radnor (USA)
Digoxygenin Desoxyuridintriphosphat (Dig-dUTP)	Roche Diagnostics	Rotkreuz (D)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth	Karlsruhe (D)
Eisen(III)-chlorid-Hexahydrat	Carl Roth	Karlsruhe (D)
Eisen(II)-sulfat-Heptahydrat	Carl Roth	Karlsruhe (D)
Eisessigsäure	VWR	Radnor (USA)
Entwickler	Carestream dental	Atlanta (USA)
Ethanol absolut	VWR	Radnor (USA)
Ethidiumbromidlösung 0,5 %	Carl Roth	Darmstadt (D)
Ethylendiamin-tetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat (Na <sub>2</sub> EDTA)	Carl Roth	Karlsruhe (D)
Ethylenglykol	Carl Roth	Karlsruhe (D)
Fixierer	Eastman Kodak Company	Rochester (USA)
Formaldehyd 37 %	Carl Roth	Karlsruhe (D)

<b>Chemikalien und Lösungen</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Firmensitz</b>
Glycerin 87 %	VWR	Radnor (USA)
Glycin	AMRESCO	Solon (USA)
Guanidinthiocyanat	Carl Roth	Karlsruhe (D)
Harnstoff	VWR	Radnor (USA)
Imidazol	Carl Roth	Karlsruhe (D)
Kaliumacetat	VWR	Radnor (USA)
Kaliumchlorid	VWR	Radnor (USA)
Kaliumhydrogenphosphat	Merck	Darmstadt (D)
di-Kaliumhydrogenphosphat Trihydrat	Carl-Roth	Karlsruhe (D)
Kaliumhydroxid	Merck	Darmstadt (D)
Kresolrot	Merck	Darmstadt (D)
Kupfer(II)-chlorid-Dihydrat	Carl Roth	Karlsruhe (D)
N-Lauroylsarcosin 30 %	AppliChem	Darmstadt (D)
Maleinsäure	Carl-Roth	Karlsruhe (D)
Magermilchpulver	VWR	Radnor (USA)
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	VWR	Radnor (USA)
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	VWR	Radnor (USA)
Mangan(II)-chlorid-Tetrahydrat	Merck	Darmstadt (D)
Methanol	VWR	Radnor (USA)
Methylenblau	Merck	Darmstadt (D)
Molybdänsäure	Merck	Darmstadt (D)
Natriumacetat	VWR	Radnor (USA)
Natriumchlorid	Carl Roth	Karlsruhe (D)
tri-Natriumcitrat-Dihydrat	VWR	Radnor (USA)
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck	Darmstadt (D)
Natriumhydroxid	VWR	Radnor (USA)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth	Karlsruhe (D)
Natriummolybdat-Dihydrat	Carl Roth	Karlsruhe (D)
Nickel(II)-chlorid-Hexahydrat	Merck	Darmstadt (D)
Novobiocin Natriumsalz	Merck	Darmstadt (D)
Orange G	AppliChem	Darmstadt (D)
Pepton	Oxoid	Basingstoke (GBR)
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Carl Roth	Karlsruhe (D)
Polyethylenglykol 600	AppliChem	Darmstadt (D)
Polyethylenglykol 3350	Carl Roth	Karlsruhe (D)
Polyethylenglykol 8000	Merck	Darmstadt (D)
Rinderserumalbumin (BSA)	Carl Roth	Karlsruhe (D)
Salzsäure 25 %	Carl Roth	Karlsruhe (D)
TE-gesättigtes Phenol	Carl Roth	Karlsruhe (D)
Tetramethylethylen-diamin (TEMED)	Carl Roth	Karlsruhe (D)
Tinte	Pelikan	Feusisberg (CHE)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	AppliChem	Darmstadt (D)
Triton X100	Carl Roth	Karlsruhe (D)
Tween® 20	AppliChem	Darmstadt (D)
Uracil	AppliChem	Darmstadt (D)
Vitaminlösung	Merck	Darmstadt (D)
Xylencyanolblau	AppliChem	Darmstadt (D)
Zinksulfat-Heptahydrat	Merck	Darmstadt (D)

### 2.1.3 Antikörper

In folgender Tabelle sind alle verwendeten Antikörper aufgeführt.

**Tabelle 8: Auflistung verwendeter Antikörper**

Antikörper und Fluorophore	Verwendung	Hersteller
Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments	2.AK (1:1000)	Roche Diagnostics, Rotkreuz (CHE)
Penta-His™-Antibody BSA-free	1.AK (1:4000)	QIAGEN GmbH, Hilden (D)
Anti-Mouse IgG Peroxidase	2.AK (1:5000)	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)
Anti-GAB-DNFR2 (DHFR-AK aus Kaninchen)	1.AK (1:4000)	Davids Biotechnologie, Regensburg (D)
Anti-Rabbit IgG Peroxidase	2.AK (1:10000)	Merck, Darmstadt (D)
Anti-Digoxigenin alkalische Phosphatase	2.AK (1:5000)	Roche, Mannheim (D)

### 2.1.4 Verwendete Kits

In nachfolgender Tabelle sind die verwendeten Kits aufgelistet.

**Tabelle 9: Verwendete Kits**

Assay-Kit	Hersteller	Firmensitz
E.Z.N.A. Gel Extraction Kit	VWR	Radnor (USA)
E.Z.N.A. Cycle Pure Kit	VWR	Radnor (USA)
GenElute™ HP Plasmid Midiprep Kit	Sigma Aldrich/Merck	Darmstadt (D)
Pierce™ BCA-Assay Kit	Thermo Fisher Scientific	Wilmington (USA)
Roti®-Lumin	Carl Roth	Karlsruhe (D)
Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare	München (D)

### 2.1.5 Verwendete Geräte

Die verwendeten Geräte sind in der folgenden Tabelle mit Herstellerangabe aufgeführt.

**Tabelle 10: Verwendete Geräte mit Herstellerangabe**

Geräte	Hersteller	Firmensitz
Analysewaage TE124S	Sartorius	Göttingen (D)
Autoklav FVS/2	Fedegari	Albuzzano (ITA)
Autoklav SANOclav LaM-201	Maschinenbau Wolf	Bad Überkingen (D)
Elektroblottingapparatur Fastblot B43	Biometra	Göttingen (D)
Einkanalpipette discovery comfort 0,01-2,5 µL	HTL	Warszawa (P)
Einkanalpipette discovery comfort 2-20 µL	HTL	Warszawa (P)
Einkanalpipette discovery comfort 20-200 µL	HTL	Warszawa (P)
Einkanalpipette discovery comfort 100-1000 µL	HTL	Warszawa (P)
Heizblock EPT-130-36-1.5	Liebisch	Bielefeld (D)
Heizblock HCL-BT-1302	HLC Biotech	Bovenden (D)
Heizblock BT3	Grant Instruments	Royston (GBR)
Magnetrührer Combimag RCT	IKA®-Werke	Staufen (D)
Magnetrührer Ikamag® RCT	IKA®-Werke	Staufen (D)
Magnetrührer RET basic	IKA®-Werke	Staufen (D)
Magnetrührer MAG HS 7	IKA®-Werke	Staufen (D)

<b>Geräte</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Firmensitz</b>
Taumelschüttler REAX 3	Heidolph Instruments	Schwabach (D)
Horizontalschüttler G10 Gyratory	New Brunswick	New York (USA)
Hybridisierungsöfen HB-1000 Hybridizer	UVP LLC	Upland (USA)
Hybridisierungsöfen Mini Oven MK II	Hybaid	Ashford (GBR)
Hybridisierungsöfen OV1000	Analytic Jena	Jena (D)
Inkubator kelvitron®	Heraeus	Hanau (D)
Kühlbrüter T257	Rubarth Apparate	Laatzen (D)
Kühlbrüter T165	Rubarth Apparate	Laatzen (D)
Mikrowelle R-7180	Sharp	Osaka (JPN)
Mikroskop Axiostar Plus	Carl Zeiss	Göttingen (D)
Mikrotiterplattenphotometer Spectramax® 340PC	Molecular Devices	Sunnyvale (USA)
Mikrotiterplattenschüttler Titramax 1000	Heidolph Instruments	Schwabach (D)
Mehrkanalpipette Discovery Comfort 5-50 µL	HTL Lab Solution	Warschau (PL)
Mehrkanalpipette Discovery Comfort 20-200 µL	HTL Lab Solution	Warschau (PL)
Minitischzentrifuge NG002R	Nippom Genetics Europe	Düren (D)
Minitischzentrifuge SD220VAC	Carl Roth	Karlsruhe (D)
PAGE-Gelsystem Minigel Twin (010-130)	Biometra	Göttingen (D)
Pipettierhilfe pipetus®	Hirschmann	Eberstadt (D)
pH-Meter CG 825	Schott	Mainz (D)
Photometer Specord S600	Analytik Jena	Jena (D)
Rollinkubator RSM 7-12V	Ratek Instruments	Boronia (AUS)
Schüttelinkubator innova4300	New Brunswick	New York (USA)
Schüttelinkubator SI 20 (K30-300)	Axon Labortechnik	Kaiserslautern (D)
Spannungsgeber Power PAC 300	Bio-Rad	Hercules (USA)
Spannungsgeber E835	Consort Instruments	Tumhout (BEL)
Thermocycler GenAmp® PCR-System 2400	Applied Biosystems	Foster City (USA)
Thermocycler GenAmp® PCR-System 2720	Applied Biosystems	Foster City (USA)
Thermocycler GenAmp® PCR-System 9700	Applied Biosystems	Foster City (USA)
Thermocycler Mastercycler gradient	Eppendorf AG	Hamburg (D)
Thermocycler Veriti™ 96-Well Thermal Cycler	Applied Biosystems	Foster City (USA)
Tischwaage PM4800 DeltaRange®	Mettler-Toledo	Columbus (USA)
Tischwaage PB300	Mettler-Toledo	Columbus (USA)
Tischzentrifuge 5424	Eppendorf	Hamburg (D)
Tischzentrifuge Biofuge 13	Heraeus	Hanau (D)
Röntgenkassette Rotilabo®	Carl Roth	Karlsruhe (D)
UV-Stratalinker™1800	Stratagene	La Jolla (USA)
UV-Tisch UVT-28 ME	Herolab	Wiesloch (D)
UV-Tisch Darkroom Hood RH-5.1	Herolab	Wiesloch (D)
UV-Vis Spektralphotometer Specord S 600	Analytik Jena	Jena (D)
UV-Vis Spektralphotometer Nanodrop 2000c	Thermo Fisher Scientific	Wilmington (USA)
Vortexer VF2	IKA®-Werke	Staufen (D)
Wasserbad EM/3	Julabo Labortechnik	Seelbach (D)
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf	Hamburg (D)
Zentrifuge Sorvall™ RC 6 Plus	Thermo Fisher Scientific	Wilmington (USA)

### 2.1.6 Enzyme

Für diese Arbeit wurden verschiedene Enzyme verwendet. Sie sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt.

**Tabelle 11: Verwendete Polymerasen und Ligase**

<b>Enzyme</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Firmensitz</b>
Phusion high-Fidelity DNA-Polymerase	Thermo Fisher Scientific	Wilmington (USA)
Restriktionsenzyme	Thermo Fisher Scientific	Wilmington (USA)
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs	Ipswich (USA)
Taq-DNA-Polymerase	Eigenisolat	
Taq-DNA-Polymerase	New England Biolabs	Ipswich (USA)
Velocity DNA-Polymerase	Bioline	London (UK)

### 2.1.7 Größenstandards

In nachfolgender Tabelle sind die Größenstandards für Agarosegele und SDS-Gele aufgelistet.

**Tabelle 12: Verwendete Größenstandards**

<b>Größenstandards</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Firmensitz</b>
GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (SM0321)	Thermo Fisher Scientific	Wilmington (USA)
GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (SM0312)	Thermo Fisher Scientific	Wilmington (USA)
GeneRuler™ 1kb plus DNA Ladder (10787018)	Thermo Fisher Scientific	Wilmington (USA)
PageRuler™ Unstained Low Range Protein Ladder (26632)	Thermo Fisher Scientific	Wilmington (USA)
PageRuler™ Prestained Protein Ladder (26616)	Thermo Fisher Scientific	Wilmington (USA)



### 2.1.8 Primer

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden von der Firma Merck (Sigma-Aldrich) bezogen und sind in folgender Tabelle aufgelistet. Die lyophilisierten Primer wurden zu einer Stammlösung mit Bidest von 100 µM gelöst und für die 20 µM Arbeitslösung mit Bidest verdünnt. Die Lagerung der Primer erfolgte bei -20 °C.

**Tabelle 13: Verwendete Primer für die Erstellung der Plasmide**

Name	5´-3´
Oligo-His-Tag_for	CATGGGCCACCACCACCACCACCACGC
Oligo-His-Tag_rev	CATGGCGTGGTGGTGGTGGTGGCC
Primer-CBD-for	GCATCCATGGCAAATACACCGGTATCAGGCAATTTG
Primer-CBD-rev	GCATCCATGGCTACTACACTGCCACCGGTTCTTTACCC
Oligo-BBP-for	CATGGGGCGCCTCGTTCGAGGTGATGAAGAACTTCAACGAGATCACTGCTGC
Oligo-BBP-rev	CATGGCAGCAGTGATCTCGTTGAAGTTCTTCATCACCTCGACGAGGCCGCC
pSD-Seq-dhfr-for	GTGATGGCGGTCACACCC
rev-Oligo-pSD	TGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCC
neu-pSD-MB-OH-for	AGATTAGTATTGACAATATCTAGTTGTAATGGCATCCGAA
pOHMB-for	ACAGCAGGCCTCGACCGAC
pSD-MB-OH-for	GTTCGACGTGGACGAGCCGG
M13-20 for	GTAAAACGACGGCCAGTG
T3 rev	AATTAACCTCACTAAAGGG
pSD_empty_for	GCCGACCACGTACTGCACGT
HVO_0699_His_NheI_for	GATGCCCATGGGCCACCACCACCACCACCACGCTAGCGGCATGAAGTACAGCGGATGGCCT
HVO_0699_KpnI_rev	CGAATTGGGTACCGTTACTCTTCGTCGCCGCTGC
HVO_0136_His_NheI_for	GATGCCCATGGGCCACCACCACCACCACCACGCTAGCGGCATGAGCGACGACGAGAACGAG
HVO_0136_KpnI_rev	CGAATTGGGTACCGTTACTGGATGTGACCTTCG
HVO_1678_His_NheI_for	GATGCCCATGGGCCACCACCACCACCACCACGCTAGCGGCATGGACTACGACGACCAACTG
HVO_1678_KpnI_rev	CGAATTGGGTACCGTTACAGATCGGGAATCGCTG
HVO_2242_His_NheI_for	GATGCCCATGGGCCACCACCACCACCACCACGCTAGCGAGTATCAGACTGCGCTCGACCGA
HVO_2242_KpnI_rev	CGAATTGGGTACCTCAGCGAGTCGCGGAACGC
NheI_HVO_0569_for	CCACCACGCTAGCATGGTACGGAAAC
KpnI_HVO_0569_rev	CGAATTGGGTACCTCAGACGGCGAA
NheI_HVO_0359_for	CCACCACGCTAGCATGAGCGACAAA
KpnI_HVO_0359_rev	CGAATTGGGTACCTTATCGCTCGTT
NheI_HVO_B0053_for	CCACCACGCTAGCATGGCTGCGCA
KpnI_HVO_B0053_rev	CGAATTGGGTACCTCAGTCCTCGAC
NcoIHis_A0637_KpnI_for	GATGCCCATGGGCCACCACCACCACCACCACGCCAGTGAAAATCAAGGGCGCTCG
NcoIHis_A0637_KpnI_rev	CGAATTGGGTACCTTACTGAATGTGGCTTCGCGCCGAA
NcoIH0136ohne3UTRKpnI_for	GATGCCCATGGGCCACCACCACCACCACCACGCCAGCGACGACGAGAACGAGAG
NcoIH0136ohne3UTRKpnI_rev	GAATTGGGTACCTTACTGGATGTGACCTTCGCGG
NcoIH0136mit3UTRKpnI_for	GATGCCCATGGGCCACCACCACCACCACCACGCCAGCGACGACGAGAACGAGAG
NcoIH0136mit3UTRKpnI_rev	GAATTGGGTACCGGCGAGATGAAAAGGGCACAGG
NcoI_N_H1677_for	CAGTGATGCCCATGGGCCACCACCACCACCACCACGTTGAAGCGTTCGTC
KpnI_1677_rev	GAATTGGGTACCTACTCGAACTGCTTGAGCGTC
NcoIH_0359_for	CAGTGATGCCCATGGGCCACCACCACCACCACCACAGCGACAAAACCCAC
HVO_0359_rev	TTATCGCTCGTTGACTTCGAGCAC
NcoI_1677_for	TGATGCCCATGGCAAATGGTTGAAGCGTTCG
KpnI_C_H1677_rev	GAATTGGGTACCTCTTAGTGGTGGTGGTGGTGGCTAGCCTCGAACTGCTTG
NcoI_His_0117_for	TGATGCCCATGGGCCACCACCACCACCACCACGCCACTTCGCGCTCCTT
KpnI_0117_rev	GAATTGGGTACCTCAGTCGATGTAATCGAG

<b>Name</b>	<b>5' - 3'</b>
His_1901_for KpnI_1901_rev	GCCACCACCACCACCACCACGCGTGACGAAAAACCCACAACAACC GAATTGGGTACCTCACTTGAGCGTCCCGAT
H1677_template_for H1677_template_rev	CAAGCCCCCGACCCCCGAGCA CGCGCTCCCCGGATGTCGCGG
His_0359_NcoI_new_for HVO_0359_NcoI_rev	GTGATGCCCATGGGCCACCACCACCACCACCACAGCGACAAACCCACCA TAGGGCGAATTGGGTACCCCATGGTTATCGCTCGTTGACT
NdeI_His_1901_for 1901_KpnI_rev	ACTAGGACCATATGCACCACCACCACCACCACGTGACGAAAAACCCACAA GGCGAATTGGGTACCTCACTTGAGCGTCCC
NcoI_His_1946_KpnI_for NcoI_His_1946_KpnI_rev	TGATGCCCATGGGCCACCACCACCACCACCACGCTAGCGGCATGTCGGAAGTCTGCTCGA CGAATTGGGTACCGTCACGCGACGTTGAACCCC
NcoI_His_1934_KpnI_for NcoI_His_1934_KpnI_rev	GATGCCCATGGGCCACCACCACCACCACCACGCTAGCGGCATGCCACACGTCGCCACCGT CGAATTGGGTACCGTCAGTCGTCACCGCCG
NcoI_His_2706_KpnI_for NcoI_His_2706_KpnI_rev	GATGCCCATGGGCCACCACCACCACCACCACGCTAGCGGCATGATAGACGAGACCATCGA CGAATTGGGTACCGTCAGAACTCGATGACGCC
NcoI_His_2300_KpnI_for NcoI_His_2300_KpnI_rev	GATGCCCATGGGCCACCACCACCACCACCACGCTAGCGGCATGGCGAAAGAGCAGAAGCA CGAATTGGGTACCGTTAGACGATCTTTTCGCTGG
NheI_1963_KpnI_for NheI_1963_KpnI_rev	ACCACCACGCTAGCGGCATGTCCGACACTGATT CGAATTGGGTACCGCTATTTGCCCCAGAGGGG
NcoI_1333_KpnI_for NcoI_1333_KpnI_rev	GATGCCCATGGGCCACCACCACCACCACCACGCTAGCGGCATGCCAGACGGCGAGGCCGC CGAATTGGGTACCGTCAGTCCCAGAACGACTGG
NheI_1901_KpnI_for NheI_1901_KpnI_rev	ACCACCACGCTAGCGGCATGGTGACGAAAAACC CGAATTGGGTACCGTCACTTGAGCGTCCCGATA
NcoI_His_0966_KpnI_for NcoI_His_0966_KpnI_rev	GATGCCCATGGGCCACCACCACCACCACCACGCTAGCGGCATGGACGACCGCGTA CGAATTGGGTACCGTCACGTTCCGCCCGCGG
NcoI_His_2724_KpnI_for NcoI_His_2724_KpnI_rev	GATGCCCATGGGCCACCACCACCACCACCACGCTAGCGGCATGGAAATCGAAATC CGAATTGGGTACCGTCACCTCCACCAGCTGAATC
NcoI_His_0350_KpnI_for NcoI_His_0350_KpnI_rev	GATGCCCATGGGCCACCACCACCACCACCACGCTAGCGGCATGACTGATACCGAC CGAATTGGGTACCGTCAGTCGTCGGACGGTTCCG
NcoI_His_0349_KpnI_for NcoI_His_0349_KpnI_rev	GATGCCCATGGGCCACCACCACCACCACCACGCTAGCGGCATGCAATGCAGACA CGAATTGGGTACCGTCAGTCATCGGATTCGACC
NcoI_His_0347_KpnI_for NcoI_His_0347_KpnI_rev	GATGCCCATGGGCCACCACCACCACCACCACGCTAGCGGCATGAACCGACAAGCG CGAATTGGGTACCGTTAGTCGTCGCGGGTTCG
NcoI_His_0874_KpnI_for NcoI_His_0874_KpnI_rev	GATGCCCATGGGCCACCACCACCACCACCACGCTAGCGGCATGAGCTCCGTAGAT CGAATTGGGTACCGTTACTTGAAGCGGAACGTT
NcoI_H0349_KpnI_for NcoI_H0349_KpnI_rev	TGATGCCCATGGGCCACCACCACCACCACCACGCTCAATGCAGACACCCAAAGAAA GAATTGGGTACCGTCAGTCATCGGATTCGACCCCCG
NcoI_H1042_KpnI_for NcoI_H1042_KpnI_rev	GATGCCCATGGGCCACCACCACCACCACCACGCTAGCGGCGAAGTGCGGGTTCATCGA CGAATTGGGTACCGTTACGCGTCGATACCGGCGCGG
SDM_Ser46Ala_mitte_for SDM_Ser46Ala_mitte_rev	CACATCAGCGAGGTCGCCGCCGGATGGATCAAGAACGT ACGTTCTTGATCCATCCGCGCGGACCTCGCTGATGTG
SDM_Ser46Asp_mitte_for SDM_Ser46Asp_mitte_rev	CACATCAGCGAGGTCGCCGACGGATGGATCAAGAACGT ACGTTCTTGATCCATCCGTCGCGGACCTCGCTGATGTG
NcoI_H0348_KpnI_for NcoI_H0348_KpnI_rev	GATGCCCATGGGCCACCACCACCACCACCACGCTAGCGGCGCTCAGGCACAGCGAGA CGAATTGGGTACCGTTAGACCGCTCCTTCAGTTCG
NcoI_H2781_KpnI_for NcoI_H2781_KpnI_rev	GATGCCCATGGGCCACCACCACCACCACCACGCTAGCGGCGTAAACGACTTCCAGGTCTGA CGAATTGGGTACCGTTTAAACTTACAGTGCACCTTCTCTTC
NcoI0699MssIKpnI_for NcoI0699MssIKpnI_rev	GATGCCCATGGATGAAGTACAGCGGATGGCCTGACCCCG CGAATTGGGTACCGTTTAAACTTACTCTTCGTCGCCGCT
NcoI_H0346_KpnI_for NcoI_H0346_KpnI_rev	GATGCCCATGGGCCACCACCACCACCACCACGCTAGCGGCGTAGACGTAAGCCAACACAA CGAATTGGGTACCGTCATCAATCACCAGTCGGTATACGACT

Die Primer der verwendeten Deletionsmutanten und Sonden sind in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet.

**Tabelle 14: Primer zur Erstellung und Überprüfung von Deletionen**

Name	5´-3´
0136_Primer 1 for	CCGACGCGCCGCCGACGCTGT
0136_Primer 2 rev	GCGGAGCTGGTCGGCAAGGTCTCGGCGGCTCTCGTT
0136_Primer 3 for	AGCCGCCGAGACCTTGCCGACCAGCTCCGCCGCGAA
0136_Primer 4 rev	GACGACCTGTCCCTTGTCTGTG
0699_Primer 1 for	ACACCAAAACCCACCACAAGGTCGATATCTATG
0699_Primer 2 rev	TTCGCGGTGGTACTCGAGTTCGCCGGGGTCAGGCCA
0699_Primer 3 for	GACCCCGCGCAACTCGAGTACCACCGCAACGCAGC
0699_Primer 4 rev	GGGTCAGCTCGGCGACGCC
1678_Primer 1 for	TTCTCGGTTTCAGTCGGCTTGCGG
1678_Primer 2 rev	GAGCGCGCCGCACGCCGAGAGCGCGCGGTCCAGTTG
1678_Primer 3 for	GACCGCGCCTCTCGGCGTTCGGCGCGCTCTCAGCG
1678_Primer 4 rev	CGGTCGGCCTCGCCGCCGCCG
2242_Primer 1 for	CGTGATTTTCGTTCCGGCAGCCCC
2242_Primer 2 rev	GAGCGACCCGCTCGTGTGAGCGCTCGGTCGAGCGC
2242_Primer 3 for	GACCGAGCGCTCAACACGAGCGGGTCGCTCGCGTTC
2242_Primer 4 rev	CGGCTACAAGGCGCTCGACTCC
A0637_Primer 1 for	GTCCGCTGTCTCTGGGAGACGACGGTAACCG
A0637_Primer 2 rev	CCGAAGCTGGTCCGCCATTCGAAGGTTTCGACGCC
A0637_Primer 3 for	CGAAACCTTCGAATGGCGGACCAGCTTCGGCGCGAA
A0637_Primer 4 rev	GGGAACCAAGACGGCCGACGACGC
1678_Primer neu 2 rev	TCGTTTTTACAGGTAGTCCATGCGCGGCAGTACG
1678_Primer neu 3 for	GCGCATGGACTACCTGTAAAAACGAACGTCCGGCGG
2242_Primer neu 2 rev	GACCGATTCAGGCCATAGGGGTTTCGAGTGTCTGGC
2242_Primer neu 3 for	CGAACCCTATGGCCTGAATCGGTCGCACGCGTCG
A0637_Primer neu 2 rev	TTACTGAATGTGGCCTTCATTTGACGAGGTCATCCACGATTCGCCCTACAACAC
A0637_Primer neu 3 for	ATGACCTCGTCAAATGAAGGCCACATTTCAGTAATCATTCTCCGAAAGGAGAG
P5 HVO_2242_for	CAGTCGCCCCGGCTCAGTTCAG
P6 HVO_2242_rev	TATTTCGGGCATGATCCGAGCC
P5 HVO_1678_for	CATCGCTCCGGTGATTCCTTTC
P6 HVO_1678_rev	GAGAAGGTAACCCAAAGCGAGGTCT
Primer Sonde A0637_for	ACCCAACGACGAACCGGCGA
Primer Sonde A0637_rev	CACGTGCGGTACTTCATGCG
Primer Sonde 2242_for	GGACGCGCTCTCGCGGACGC
Primer Sonde 2242_rev	CTGCGCGCCGGGCACGAAGA
Primer Sonde B0053_for	TGAACATCACCGGAACGACC
Primer Sonde B0053_rev	CTCCGAGGTCGTCGAGCAGC
Primer Sonde 0569_for	CGTTCGCCCAGCGAGACACC
Primer Sonde 0569_rev	GCCGCGTAGGCGTCGGCCAT
Primer Sonde 0359_for	TCAACAAGATGGACGTCGTC
Primer Sonde 0359_rev	ACTTCTCGTGGTGCATCTC
P1 HVO_B0053	GACGCTGGCCGACCGCTATC
P2 HVO_B0053	GGCGTCGTGAAGCGTTCGGAGCGCTTCGAGTTCTGC
P3 HVO_B0053	CTCGAAGCGCTCCGAACGCTTCACGACGCTTCCC
P4 HVO_B0053	ACGACGCTCCGCCAGACTC
P1 HVO0569	CAGCCGCTCAGTGGATGTGC
P2 HVO0570	GACGGCGAACTCGTCGGCGACGTTCCGTACCATGC
P3 HVO0571	GTACGGAACGTCGCCGACGAGTTCGCCGCTCTGAGC
P4 HVO0572	CGTCCCGGCGATGTACCAC
P1 HVO_0359	GGTTGAGGGAATCCGCAACG
P2 HVO_0359	GCATCGTTATCGTCTCGTTCATTGGTGTGGTCACGC
P3 HVO_0359	ACCACACCAATGAGCGAGCGATAACGATGCAACAGGC
P4 HVO_0359	GTCCGTCGGGCGATTCTG

Name	5' - 3'
2706_Primer1	CCCATCTGCGAGGCGGGCCAGC
2706_Primer2	TCAGAACTCGATGACGGTCTCGTCTATCATAACGAGAACGTGCGCGTATCG
2706_Primer3	ATGATAGACGAGACC GTCATCGAGTTCTGAGCGGGCGGGC
2706_Primer4	TCGGTTCCTCGTCAGTGACCGCGCC
HVO_1333 Primer up1 for	ACGCGGGCGAGTCGCTGCC
HVO_1333 Primer 2 rev	GTCAGTCCCAGAAGCCGTCTGGCATCGCCGAGGTTACG
HVO_1333 Primer 3 for	ATGCCAGACGGCTTCTGGGACTGACGGGGTGGATTCCGGTT
HVO_1333 Primer down4 rev	GTCGCTCGGCTCCGACATCCTCG
1934_Primer1	CAGCTGCGAGACAGCGCGACGACG
1934_Primer2	GTCGTCCCACGCGCGACGTGTGGCATATCGTGACTTACGGC
1934_Primer3	GCCACACGTCCGCGCTGGGACGACTGAGTCGGGAGTGC
1934_Primer4	CGGTTTCGGGGCTCCGGTTCGAGG
Sonde 1333 for	ACCC TTCACCCGCTCTCGAACGGCGTAGC
Sonde 1333 rev	GCCGTCTGGCATCGCCGAGGTACG
Sonde 0966 for	CACGAACGGGGCGCACCGGTC
Sonde 0966 rev	GCGGTCGTCCATCGGAGAACTACGGG
Sonde 2706 for	CCCATCTGCGAGGCGGGCCAGC
Sonde 2706 rev	ATACGAGAACGTCCCGTATCG
Sonde 1934 for	GCGTGGGACGACTGAGTCGGGAGTGC
Sonde 1934 rev	CGGTTTCGGGGCTCCGGTTCGAGG

### 2.1.9 Plasmide

Die *in-silico* Planung der Plasmide erfolgte mittels Clone Manager. In nachfolgender Tabelle sind die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide aufgelistet.

**Tabelle 15: Plasmide für die Überexpression und Deletion einzelner Gene**

Konstrukt	Gen	Beschreibung und Quelle
pSD1/R1-6		Shuttle-Vektor mit synthetischem, konstitutiven Promotor PrP16, Selektionsgene für <i>Novobiocin</i> und <i>Ampicillin</i> , Replikationsursprung für <i>E. coli</i> sowie für <i>H. volcanii</i> , Gen <i>HVO_1279</i> mit nativer 3'-UTR (Stefan Danner)
pWL-CBD-Hq1489		Shuttle-Vektor mit Cellulosebindedomäne aus <i>Clostridium thermocellum</i> (Plavner and Eichler, 2008)
pSDBBP1279	<i>DHFR</i>	Plasmid mit starkem, konstitutiven Promotor, BBP-Tag und Gen <i>HVO_1279</i> (diese Arbeit)
pSDH1946	<i>aIF1</i>	Plasmid mit starkem, konstitutiven Promotor, 6xHis-Tag und Gen <i>HVO_1946</i> (diese Arbeit)
pSDH0136-3'-UTR	<i>aIF1A-1</i>	Plasmid mit starkem, konstitutiven Promotor, 6xHis-Tag und Gen <i>HVO_0136</i> mit 3'-UTR (diese Arbeit)
pSDHA0637	<i>aIF1A-2</i>	Plasmid mit starkem, konstitutiven Promotor, 6xHis-Tag und Gen <i>HVO_A0637</i> (diese Arbeit)
pSDH0699	<i>aIF2α</i>	Plasmid mit starkem, konstitutiven Promotor, 6xHis-Tag und Gen <i>HVO_0699</i> (diese Arbeit)
pSDH1678	<i>aIF2β-1</i>	Plasmid mit starkem, konstitutiven Promotor, 6xHis-Tag und Gen <i>HVO_1678</i> (diese Arbeit)
pSDH2242	<i>aIF2β-2</i>	Plasmid mit starkem, konstitutiven Promotor, 6xHis-Tag und Gen <i>HVO_2242</i> (diese Arbeit)
pSDH1901	<i>aIF2γ</i>	Plasmid mit starkem, konstitutiven Promotor, 6xHis-Tag und Gen <i>HVO_1901</i> (diese Arbeit)
pSDH0966	<i>aIF2B</i>	Plasmid mit starkem, konstitutiven Promotor, 6xHis-Tag und Gen <i>HVO_0966</i> (diese Arbeit)
pSDH1934	<i>aIF2Ba (aIF2/5Ba)</i>	Plasmid mit starkem, konstitutiven Promotor, 6xHis-Tag und Gen <i>HVO_1934</i> (diese Arbeit)

## Material und Methoden

pSDH2706	<i>aIF2B5</i>	Plasmid mit starkem, konstitutiven Promotor, 6xHis-Tag und Gen <i>HVO_2706</i> (diese Arbeit)
pSDH1333	<i>eIF4A homolog</i>	Plasmid mit starkem, konstitutiven Promotor, 6xHis-Tag und Gen <i>HVO_1333</i> (diese Arbeit)
pSDH2300	<i>aIF5A</i>	Plasmid mit starkem, konstitutiven Promotor, 6xHis-Tag und Gen <i>HVO_2300</i> (diese Arbeit)
pSDH1963	<i>aIF5B</i>	Plasmid mit starkem, konstitutiven Promotor, 6xHis-Tag und Gen <i>HVO_1963</i> (diese Arbeit)
pSDH0117	<i>aIF6</i>	Plasmid mit starkem, konstitutiven Promotor, 6xHis-Tag und Gen <i>HVO_0117</i> (diese Arbeit)
pSDH1677	<i>Zinkfinger</i>	Plasmid mit starkem, konstitutiven Promotor, 6xHis-Tag und Gen <i>HVO_1677</i> (diese Arbeit)
pSDH0569	<i>Rio2</i>	Plasmid mit starkem, konstitutiven Promotor, 6xHis-Tag und Gen <i>HVO_0569</i> (diese Arbeit)
pSD-P	<i>Leerplasmid ohne Promotor</i>	pSD1/R1-6 ohne Promotor und ohne Gen <i>HVO_1279</i> mit nativer 3'-UTR (diese Arbeit)
pSD+P	<i>Leerplasmid mit Promotor</i>	pSD1/R1-6 ohne Gen <i>HVO_1279</i> mit nativer 3'-UTR (diese Arbeit)
pSDH1279	<i>DHFR</i>	Plasmid mit starkem, konstitutiven Promotor, 6xHis-Tag und Gen <i>HVO_1279</i> (diese Arbeit)
pSDH0349	<i>rpoA1</i>	Plasmid mit starkem, konstitutiven Promotor, 6xHis-Tag und Gen <i>HVO_0349</i> (diese Arbeit)
pSDH0350	<i>rpoA2</i>	Plasmid mit starkem, konstitutiven Promotor, 6xHis-Tag und Gen <i>HVO_0350</i> (diese Arbeit)
pSDH0348	<i>rpoB1</i>	Plasmid mit starkem, konstitutiven Promotor, 6xHis-Tag und Gen <i>HVO_0348</i> (diese Arbeit)
pSDH0347	<i>rpoB2</i>	Plasmid mit starkem, konstitutiven Promotor, 6xHis-Tag und Gen <i>HVO_0347</i> (diese Arbeit)
pSDH1042	<i>rpoL</i>	Plasmid mit starkem, konstitutiven Promotor, 6xHis-Tag und Gen <i>HVO_1042</i> (diese Arbeit)
pSDH2781	<i>rpoD</i>	Plasmid mit starkem, konstitutiven Promotor, 6xHis-Tag und Gen <i>HVO_2781</i> (diese Arbeit)
pSDH0346	<i>rpoH</i>	Plasmid mit starkem, konstitutiven Promotor, 6xHis-Tag und Gen <i>HVO_0346</i> (diese Arbeit)
pSDH0699Ala46	<i>1.SDM aIF2α</i>	Plasmid mit starkem, konstitutiven Promotor, 6xHis-Tag und Gen <i>HVO_0699</i> , mit Punktmutation für Aminosäureaustausch an Position 46 Serin zu Alanin (diese Arbeit)
pSDH0699Asp46	<i>2.SDM aIF2α</i>	Plasmid mit starkem, konstitutiven Promotor, 6xHis-Tag und Gen <i>HVO_0699</i> , mit Punktmutation für Aminosäureaustausch an Position 46 Serin zu Asparaginsäure (diese Arbeit)
pMH101		Vektor mit <i>Multiple Cloning Site</i> zur Integration von Deletionskassetten mit <i>pyrE</i> -Gen zur Selektion im H26 und Ampicillin Selektionsgen für <i>E. coli</i> (Hammelmann and Soppa, 2008)
pMH101_Δ1678	<i>aIF2β-1</i>	Plasmid zur Deletion von <i>HVO_1678</i> (Katrin Gäbel)
pMH101_Δ2242	<i>aIF2β-2</i>	Plasmid zur Deletion von <i>HVO_2242</i> (Katrin Gäbel)
pMH101_ΔA0637	<i>aIF1-A1</i>	Plasmid zur Deletion von <i>HVO_A0637</i> (Katrin Gäbel)

### 2.1.10 Mikroorganismen

Alle Klonierungsarbeiten für die Erstellung der Plasmide erfolgten im *E. coli* Stamm XL1blueMRF'. Die Konstrukte wurden anschließend sequenziert und mit entsprechendem Selektionsmarker in *H. volcanii* transformiert. Die verwendeten Mikroorganismen sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

**Tabelle 16: Verwendete Mikroorganismen**

Name	Genotyp	Quelle
<i>Escherichia coli</i> : XL1 blue	$\Delta(mcrA)183$ ; $\Delta(mcrCB'-hsdSMR-mrr)173$ ; <i>recA1</i> ; <i>endA1</i> ; <i>gyrA96</i> ; <i>thi-1</i> ; <i>hsdR17</i> ; <i>supE44</i> ; <i>relA1 lac</i> [ <i>F'</i> proAB+lacZ $\Delta$ M15 Tn10 (TetR)]	Stratagene Europe, Amsterdam (NLD)
<i>Haloferax volcanii</i> : H26	$\Delta$ pyrE2	Allers et al. 2004
H26 $\Delta$ 1279	$\Delta$ pyrE2 $\Delta$ dhfr	Gäbel et al. 2013
H26 $\Delta$ 1279 $\Delta$ 0136	$\Delta$ pyrE2 $\Delta$ dhfr $\Delta$ 0136	Gäbel et al. 2013
H26 $\Delta$ 1279 $\Delta$ 0699	$\Delta$ pyrE2 $\Delta$ dhfr $\Delta$ 0699	Gäbel et al. 2013
H26 $\Delta$ 1279 $\Delta$ 1333	$\Delta$ pyrE2 $\Delta$ dhfr $\Delta$ 1333	Gäbel et al. 2013
H26 $\Delta$ 1279 $\Delta$ 1678	$\Delta$ pyrE2 $\Delta$ dhfr $\Delta$ 1678	diese Arbeit
H26 $\Delta$ 1279 $\Delta$ 1934	$\Delta$ pyrE2 $\Delta$ dhfr $\Delta$ 1934	Gäbel et al. 2013
H26 $\Delta$ 1279 $\Delta$ 2242	$\Delta$ pyrE2 $\Delta$ dhfr $\Delta$ 2242	diese Arbeit
H26 $\Delta$ 1279 $\Delta$ 2706	$\Delta$ pyrE2 $\Delta$ dhfr $\Delta$ 2706	Gäbel et al. 2013
H26 $\Delta$ 1279 $\Delta$ A06347	$\Delta$ pyrE2 $\Delta$ dhfr $\Delta$ A06347	diese Arbeit
H26 $\Delta$ 1677	$\Delta$ pyrE2 $\Delta$ 1677	Vanessa Mijic

### 2.1.11 Datenbanken und Software

Die verwendete Software und Datenbanken wurden in der folgenden Tabelle aufgelistet.

**Tabelle 17: Datenbanken und Software**

Name	Entwickler
BioEdit 7.2.6.1	Tom Hall, Ibis Therapeutics, Carlsbad (USA)
<a href="https://www.clker.com">https://www.clker.com</a>	Rolera LLC, 2270 Route 30, Oswego, IL 60543 (USA)
Clone Manager 9 Professional Edition	Scientific & Educational Software, Denver (USA)
Geldoku Software Easy Win 32	Herolab GmbH, Wiesloch
Gimp 2.8	Spencer Kimball, Peter Mattis und das GIMP-Team
HaloLex: <a href="https://www.halolex.mpg.de/public/">https://www.halolex.mpg.de/public/</a>	Max-Planck Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e. V., München
Jalview 2.11.0	development managed by The Barton Group, University of Dundee, Scotland, UK
<a href="http://www.compbio.dundee.ac.uk/jpred4">http://www.compbio.dundee.ac.uk/jpred4</a>	(Drozdetskiy et al., 2015)
Microsoft Office 2016	Microsoft Corporation, Redmond (USA)
NanoDrop 3.5.1	Coleman Technologies Inc., Rockland, USA
<a href="https://www.bioinformatics.org/sms/index.html">https://www.bioinformatics.org/sms/index.html</a>	Stothard, P. 2000. The sequence manipulation suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. BioTechniques 28: 1102-1104
SnapGene Viewer	GSL Biotech LLC, Chicago (USA)
String Database Version 11.0	Swiss Institute of Bioinformatics; EMBL Heidelberg; University of Zurich; Novo Nordisk Foundation CPR
Softmax® Pro Software	Molecular Devices LLC, San José (USA)
WinASPECT	Analytik Jena AG, Jena

## 2.2 Mikrobiologische Methoden

Alle sterilen Arbeiten fanden am Bunsenbrenner statt. Generell wurden die verwendeten Medien und Zusätze bei 121 °C für 25 min autoklaviert. Hitzeempfindliche Lösungen wurden sterilfiltriert.

### 2.2.1 Medien und Zusätze für die Kultivierung von *E. coli*

Für *E. coli* erfolgte die Kultivierung aerob in 30-50 mL SOB<sup>+</sup>-Medium in 100 mL Erlenmeyerkolben, bei 37 °C und 220 rpm auf dem Schüttler (Tabelle 18). Als Selektionsmarker diente Ampicillin, welches dem SOB<sup>+</sup>-Medium direkt vor Verwendung hinzugefügt wurde.

**Tabelle 18: Zusammensetzung des SOB<sup>+</sup>-Mediums für die Kultivierung von *E. coli***

Bezeichnung	Menge	Endkonzentration
<b>SOB<sup>+</sup>-Medium</b>		
Trypton	20 g	2 % (w/v)
Hefeextrakt	5 g	0,5 % (w/v)
NaCl	0,6 g	10 mM
KCl	0,187 g	2,5 mM
1M MgCl <sub>2</sub> /MgSO <sub>4</sub> (aus 1M Stammlösung, autoklaviert)	10 mL	10 mM
ad. 1 L VE; autoklavieren		
Selektionsmarker: Ampicillin Stammlösung 1mg/mL	1 mg in 1 mL VE, sterilfiltrieren	100 µg/mL
ad 1 mL H <sub>2</sub> O-bidest; sterilfiltrieren		

Zum Bereiten von SOB<sup>+</sup>-Festmedien wurde vor dem Autoklavieren 1,2 % Agar, was 12 g Agar entspricht, hinzugegeben. Die Agarplatten wurden bei 4 °C im Kühlraum gelagert, das Flüssigmedium bei Raumtemperatur (RT).

### 2.2.2 Herstellung von chemisch kompetenten *E. coli*

Chemisch kompetente *E. coli* Zellen wurden für die Hitzeschock-Transformation benötigt. Mittels einer Übernacht-Kultur des Stammes XL1-blue wurden 250 mL SOB<sup>+</sup>-Medium auf eine OD<sub>600</sub> von 0,05 inokuliert. Die Zellen wurden unter Schütteln bei 37 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 inkubiert, anschließend für 10 min auf Eis gestellt und für 10 min bei 4 °C und 2.500 xg abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 80 mL eiskaltem TB-Puffer (Tabelle 19) suspendiert.

**Tabelle 19: Herstellung des TB-Puffers**

Bezeichnung	Menge	Endkonzentration
<b>TB-Puffer</b>		
MOPS	0,21 g	10 mM
CaCl <sub>2</sub> · H <sub>2</sub> O	0,22 g	15 mM
KCl	1,86 g	250 mM
-----		
MnCl <sub>2</sub> · H <sub>2</sub> O	0,89 g	55 mM
Ad 100 mL H <sub>2</sub> O-Bidest; sterilfiltriert; bei 4 °C gelagert		

Nach 10 min Inkubation auf Eis wurde die Zellsuspension erneut für 10 min bei 4 °C und 2.500 xg abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 20 mL TB-Puffer resuspendiert und 1,4 mL DMSO durch vorsichtiges Schwenken beigemischt. Nach weiteren 10 min auf Eis, wurde die Zellsuspension in sterile 1,5 mL Reaktionsgefäße in je 200 µL Ansätzen aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der chemisch kompetenten Zellen erfolgte bei -80 °C.

### 2.2.3 Transformation von *E. coli*

Für die Transformation von *E. coli* wurden 100 µL chemisch-kompetente Zellen des Stammes XL1 blue verwendet (siehe Kapitel 2.2.2). Sie wurden 30 min auf Eis aufgetaut und mit 10 µL Ligationsansatz oder 50 ng Plasmid-DNA gemischt. Es folgte eine Inkubation von 60 sec bei 42 °C auf dem Heizblock und 2 min auf Eis, bevor 50-100 µL der Zellen auf SOB<sup>+</sup>-Platten, mit Ampicillin und 1,2 % Agar (Tabelle 18), ausplattiert wurden.

### 2.2.4 Medien und Zusätze für die Kultivierung von *H. volcanii*

Die Kultivierung von *H. volcanii* erfolgte in Komplexmedium oder synthetischem Medium aerob, bei 42 °C und 250 rpm auf dem Schüttler.

In Tabelle 20 sind die verwendeten Selektionsmarker für *E. coli* und *H. volcanii* aufgelistet. Die Stammlösungen wurden bis auf Uracil bei -20 °C gelagert.

**Tabelle 20: Verwendete Selektionsmarker für *E. coli* bzw. für *H. volcanii***

Selektionsmarker	Stammlösung	Endkonzentration
Novobiocin	1 mg/mL in H <sub>2</sub> O-bidest, sterilfiltriert	0,47 µg/mL
Ampicillin	100 mg/mL in H <sub>2</sub> O-bidest, sterilfiltriert	100 µg/mL
Uracil	0,1 g/mL in DMSO	50 µg/mL
5-FOA	150 mg/mL in DMSO	150 µg/mL

Die benötigten Lösungen und Chemikalien für das Komplexmedium sind in Tabelle 21 aufgeführt. Die Lösungen wurden einzeln hergestellt und autoklaviert. Die Spurensalze und die Eisensulfat-Lösung wurden bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Nach dem Autoklavieren wurde die Nährstofflösung in die Salzlösung gegeben. Die Spurensalze, Eisensulfat-Lösung und Uracil wurden hinzugefügt.

Als Selektionsmarker für die Stämme mit Überexpressionsplasmid diente Novobiocin, welches direkt vor Verwendung dem Medium hinzugefügt wurde.

Für Festmedien erfolgte die Zugabe von 1,4 % Agar in die Salzlösung vor dem Autoklavieren, was einer Menge von 14 g Agar für 1 L Medium entspricht. Komplexmedium mit unterschiedlichen Salzkonzentrationen wie 0,9 M NaCl und 4 M NaCl, wurde für die Testung unterschiedlicher Wachstumsbedingungen verwendet. Die Salzlösung, die Nährstofflösung und das Uracil wurden bei 4 °C gelagert.



**Tabelle 21: Zusammensetzung Komplexmedium für die Kultivierung von *H. volcanii***

Bezeichnung (Menge für 1 L Medium)	Menge	Endkonzentration
<b>Salzlösung (900 mL)</b>		
NaCl	125 g	2,1 M
MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	45 g	220 mM
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	10 g	41 mM
KCl	10 g	13 mM
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	1,34 g	9 mM
1M Tris/HCl pH 7,2 (aus 1M Stammlösung, autoklaviert)	50 mL	50 mM
ad 900 mL VE; autoklavieren		
<b>Nährstofflösung (100 mL)</b>		
Hefeextrakt	3 g	0,3 % (w/v)
Trypton	5 g	0,5 % (w/v)
ad 100 mL VE; autoklavieren		
<b>Spurensalze (1 mL)</b>		
ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,1 g	3,5 µM
MnCl <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	0,03 g	1,5 µM
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,3 g	50 µM
CoCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0,2 g	8,5 µM
CuCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,01 g	0,5 µM
NiCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0,02 g	1 µM
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	0,03 g	1 µM
ad 100 mL H <sub>2</sub> O-bidest; pH 3-4 mit HCl einstellen; sterilfiltrieren		
<b>Eisensulfat-Lösung (1 mL)</b>		
FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,23 g	8 µM
ad 100 mL H <sub>2</sub> O-bidest; pH 3-4 mit HCl einstellen; sterilfiltrieren		
<b>Uracil (1 mL)</b>		
Uracil	0,5 g	50 µg/mL
ad 10 mL DMSO		

In Tabelle 22 sind die Lösungen zur Herstellung des synthetischen Medium aufgeführt. Zusätzlich wurde eine Kohlenstoffquelle hinzugegeben (Tabelle 23). Synthetisches Medium diente sowohl den Wachstumsversuchen, als auch der Selektion von PopIn-Klonen, bei der Erstellung von Deletionsmutanten. Für Stämme mit Deletionsplasmid wurde das synthetische Medium wie in Tabelle 22 hergestellt, jedoch kein Uracil hinzugegeben. Als Kohlenstoffquelle dienten Casaminsäuren (Tabelle 23). Anschließend folgte eine weitere Selektion in Komplexmedium mit 5-FOA nach Popout-Klonen.

**Tabelle 22: Zusammensetzung des synthetischen Medium**

Bezeichnung	Menge	Endkonzentration
<b>Salzlösung</b>		
1 M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 mL	1 mM
1 M NH <sub>4</sub> Cl	10 mL	10 mM
Spurensalze	1 mL	
Eisensulfat-Lösung	1 mL	8 µM
Uracil	1 mL	50 µg/mL
2 M MOPS pH 7,2	50 mL	50 mM
BME-Vitaminlösung	1 mL	
ad 1 L VE		

In Tabelle 23 sind weitere Kohlenstoffquellen für das synthetische Medium von *H. volcanii* aufgeführt.

**Tabelle 23: Kohlenstoffquellen für das synthetische Medium**

Bezeichnung	Menge	Endkonzentration
20 % Casaminsäuren (sterilfiltriert)	12,5 mL	0,25 % (w/v)
20 % Glucose (autoklaviert)	25 mL	0,5 % (w/v)
20 % Saccharose (autoklaviert)	25 mL	0,5 % (w/v)
800 mM Acetat (sterilfiltriert)	50 mL	40 mM
800 mM Pyruvat (sterilfiltriert)	25 mL	20 mM
86 % Glycerin (autoklaviert)	1,74 mL	20 mM

### 2.2.5 Transformation von *H. volcanii*

Für die Transformation von *H. volcanii* wurden 2 mL einer exponentiellen Kultur für 2 min bei 8000 rpm abzentrifugiert (Puffer und Lösungen siehe Tabelle 24). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet vorsichtig in 180 µL SBL/EDTA-Lösung resuspendiert. Die DNA-Lösung von 2-5 µg Plasmid in 0,8 M NaCl wurde wie folgt hergestellt: 16 µL Plasmid und 4 µL 4 M NaCl wurden gemischt. 20 µL dieser DNA-Lösung wurde in die Zellsuspension pipettiert, durch 10-maliges invertieren des Reaktionsgefäßes gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 230 µL SBL/PEG-Lösung in den Deckel der Reaktionsgefäße pipettiert und diese erneut invertiert, bis keine Schlieren mehr sichtbar waren. Es folgte eine Inkubation von 20 min bei RT. Danach wurden 1,5 mL SVL-Lösung hinzu pipettiert und erneut 10x invertiert. 100 µL der Zellsuspension wurden auf entsprechenden Agarplatten mit Selektivmedium ausplattiert und 200 µL der Zellsuspension in 30 mL Flüssigselektivmedium überimpft.

**Tabelle 24: Lösungen für die Transformation von *H. volcanii***

Bezeichnung	Menge	Endkonzentration
<b>Sphäroblastenbildungslösung (SBL)</b>		
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)
Ad 500 mL H <sub>2</sub> O-bidest; sterilfiltrieren		
<b>Sphäroblastenverdünnungslösung (SVL)</b>		
NaCl	100 g	3,4 M
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	21,6 g	175 mM
KCl	1,25 g	34 mM
1 M Tris/HCl pH 7,2	25 mL	50 mM
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,36 g	5 mM
Ad 500 mL H <sub>2</sub> O-bidest; sterilfiltrieren		
<b>SBL/EDTA-Lösung</b>		
EDTA	18,5 g	0,5 M
SBL	100 mL	
pH 8,2; sterilfiltrieren		
<b>SBL/PEG-Lösung</b>		
PEG	6 mL	60 % (v/v)
SBL	4 mL	40 % (v/v)

**2.2.6 Bestimmung Zelldichte und Zellzahl**

Für die Bestimmung der Zelldichte wurden die Zellen 1:2 in Medium verdünnt und je in Küvetten bei einer optischen Dichte (OD) von 600 nm am Photometer Specord S 600 gemessen. Die Zellzahl wurde mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Hierfür wurden die Zellen entsprechend in Basalsalz verdünnt, diagonal 4 Großquadrate (64 Kleinquadrate) ausgezählt und die Zellzahl pro mL berechnet (F1).

$$\mathbf{F1) Zellzahl\ pro\ mL} = \frac{\text{Zellzahl}}{64} \cdot \text{Verdünnung} \cdot 2 \cdot 10^7$$

**2.2.7 Wachstumsversuche in Mikrotiterplatten**

Zur phänotypischen Charakterisierung der *H. volcanii* Stämme, erfolgten Wachstumsversuche in 96-well Mikrotiterplatten mit Rundboden. Hierfür wurden die Stämme von einer Platte in 30 mL Komplexmedium 3 Tage bei 42 °C kultiviert. Dieser Ansatz diente als Inokulum. Anschließend wurde von diesem Inokulum in 30 mL frisches Medium überimpft und die Zellen am nächsten Tag in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet. Zunächst wurde als Verdunstungsbarriere je 200 µL sterile, 1M Natriumchloridlösung in die äußeren Vertiefungen der Platten pipettiert. 140 µL entsprechendes Medium wurde in die inneren Vertiefungen vorgelegt. Die OD der Zellkulturen wurde bei 600 nm bestimmt und auf eine OD von 0,75 eingestellt, um eine gewünschte Start-OD von 0,05 in der Mikrotiterplatte zu erreichen (F2).

$$\mathbf{F2) OD_{600\ nm}\ pro\ Well} = \text{Verdünnungsfaktor} \cdot \text{gewünschte OD} = 15 \cdot 0,05 = 0,75$$

$$\mathbf{F3) Erntevolumen} = \frac{\text{OD}_{600\ nm\ pro\ Well}}{\text{OD}_{600\ nm\ exp.Kultur}} \cdot \text{Volumen Basalsalz}$$

Das berechnete Erntevolumen (F3) wurde abgenommen und 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert, in 1 mL Basalsalz gewaschen und für 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Erneut wurde das Zellpellet in Basalsalz resuspendiert und je 10 µL in das vorgelegte Medium pipettiert. Die Inkubation erfolgte bei 1.050 rpm, 42 °C und regelmäßigen Bestimmung der optischen Dichte bei 600nm bis zur stationären Phase.

## 2.3 Molekularbiologische Methoden

### 2.3.1 Isolierung genomischer DNA aus *H. volcanii*

Zur Isolierung von genomischer DNA wurden 15 mL Zellkultur für 15 min bei 4000 rpm zentrifugiert und das Zellpellet in 300 µL Basalsalz resuspendiert. Durch Zugabe von 2,5 mL Lysepuffer (Tabelle 25) wurden die Zellen für 5 min lysiert und anschließend die wässrige Phase mit 5 mL 99 % Ethanol überschichtet. Mittels einer Glaskapillare mit Häkchen wurde die an der Phasengrenze ausgefallene DNA aufgewickelt. Es folgte zweimaliges Waschen der aufgewickelten DNA in 99 % Ethanol für 5 min und anschließend zweimaliges Waschen in Diethylether. Die DNA wurde in 1 mL H<sub>2</sub>O-Bidest überführt, bei 60 °C auf dem Heizblock gelöst und anschließend bei 4 °C gelagert. Die Konzentration der genomischen DNA wurde am UV-Vis Spektralphotometer Nanodrop 2000c, mit H<sub>2</sub>O-Bidest als Referenz, bestimmt.

**Tabelle 25: Komponenten zur Herstellung des Lysepuffers**

Bezeichnung	Menge	Endkonzentration
NaCl	2,9 g	100 mM
1 M Tris/HCl pH 8,0	50 mL	10 mM
EDTA	0,146 g	1 mM
SDS	0,25 g	0,05 %
Ad 500 mL VE		

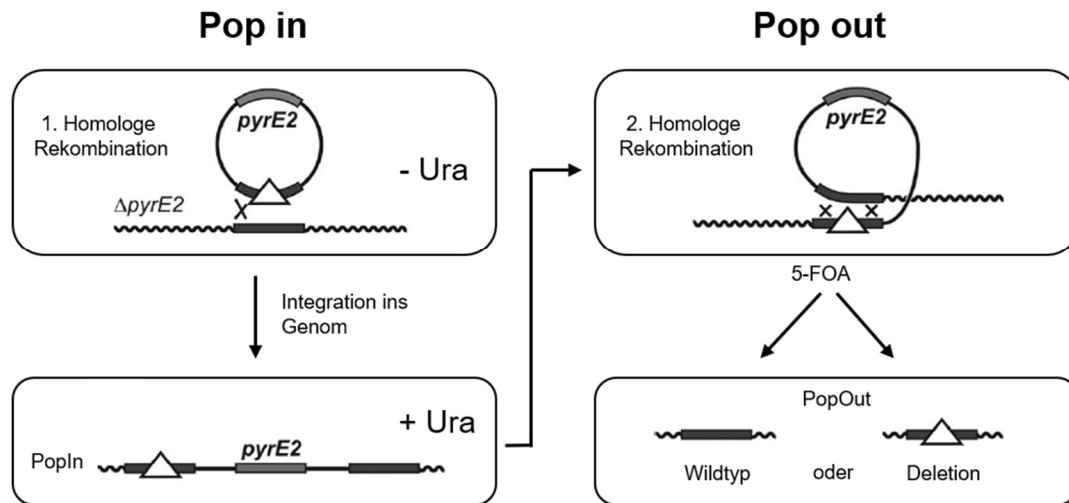
### 2.3.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde mittels des GenElute™ HP Plasmid Midiprep Kit (Sigma-Aldrich) nach Herstellerangaben isoliert.

### 2.3.3 Generierung von in-frame-Deletionsmutanten (PopIn-PopOut-Methode)

Für die Erstellung von Deletionsmutanten wurde die PopIn-PopOut-Methode angewandt. Dieses System hat sich bewährt, um erfolgreich Deletionen in *H. volcanii* zu erstellen (Bitan-Banin et al 2003; Allers et al 2004; Hammelmann und Soppa 2008). Eine in-frame-Deletion entspricht einem Gen, dass durch eine Gen-Version ersetzt wird, bei der ein Teil im Gen entfernt wurde, dessen Nukleotidanzahl durch 3 teilbar ist. Als Deletionsplasmid wurde der pMH101 verwendet. Dieser enthält das für die Uracilbiosynthese essenzielle Gen *pyrE2* und keinen Replikationsursprung für *H. volcanii*. Ein entsprechendes Insert für die Deletion des gewünschten Gens wurde in diesen Vektor kloniert. Um das Insert zu generieren wurden mittels PCR zwei Fragmente von ca. 500 bp generiert, die einen Teil des 5'- und 3'-Bereiches, des zu deletierenden Gens flankieren. Diese beiden Fragmente wurden über PCR fusioniert und in den pMH101 kloniert. Der Uracil-auxotrophe Stamm ( $\Delta pyrE2$ ) H26 wurde mit dem Deletionsplasmid transformiert und auf synthetischem Medium ohne Uracil selektiert. Da das Plasmid kein Replikationsursprung für *H. volcanii* besitzt, musste das Plasmid, durch homologe

Rekombination in das Genom integriert werden, so dass zwei mögliche PopIn-Varianten entstanden. Die zweite Selektion erfolgte in Komplexmedium mit Uracil und 5-FOA (Abbildung 12). In Kombination mit dem von *pyrE2* kodierenden Enzym (Orotate Phosphoribosyltransferase) und 5-FOA entsteht 5-Fluoruracil, das toxisch auf die Zellen wirkt.



**Abbildung 12: Schema für die Generierung von PopIn-PopOut-Mutanten (modifiziert nach Allers et al 2004)**  
 Erste homologe Rekombination findet in Medium ohne Uracil (-Ura) statt. Es entsteht die PopIn-Mutante. Die zweite homologe Rekombination erfolgt mit Uracil und 5-FOA, welche sowohl im Wildtyp als auch in der Deletionsmutante resultieren kann.

### 2.3.4 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Für die Aufreinigung von PCR-Produkten wurde das „E.Z.N.A. Cycle Pure Kit“ nach Anleitung des Herstellers verwendet. Eluiert wurde mit H<sub>2</sub>O-Bidest. Zur Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das „E.Z.N.A. Gel Extraction Kit“ nach Angaben des Herstellers verwendet. Eluiert wurde ebenfalls mit H<sub>2</sub>O-Bidest.

### 2.3.5 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde für verschiedene Anwendungen in der Klonierung und für die Sondengenerierung verwendet. In den meisten PCR-Ansätzen wurde ein dNTP-Mix mit einem erhöhten Anteil von Guanin und Cytosin verwendet, da die DNA von *H. volcanii* einen erhöhten GC-Gehalt aufweist. In Tabelle 26 ist der Ansatz für die Herstellung des 66-dNTPs-Mix aufgeführt.

**Tabelle 26: Ansatz für den 66-dNTP-Mix**

Komponente	Menge	Endkonzentration
<b>66-dNTP-Mix</b>		
100 mM dATP	100 $\mu$ L	1 mM
100 mM dTTP	100 $\mu$ L	1 mM
100 mM dGTP	150 $\mu$ L	1,5 mM
100 mM dCTP	150 $\mu$ L	1,5 mM

Ad 10 mL H<sub>2</sub>O-Bidest; je 1 mL Aliquotes bei -20 °C lagern

**2.3.5.1 Generierung eines DNA-Fragments für die Klonierung**

In Tabelle 27 ist der PCR-Ansatz für die Generierung eines DNA-Fragments für die Klonierung aufgelistet. Diese PCR erfolgte mittels Velocity.

**Tabelle 27: PCR-Ansatz zur Erstellung von DNA-Fragmenten für die Klonierungen**

Komponente	Menge	Endkonzentration
5X Hi-Fi-Puffer	10 µL	1x
1 mM/1,5 mM 66-dNTPs-Mix	12,5 µL	250 µM
20 µM 1. Oligonukleotid	1 µL	0,4 µM
20 µM 2. Oligonukleotid	1 µL	0,4 µM
Velocity Polymerase	0,5 µL	1 U
Template	X µL	10 ng Plasmid oder 50 ng gen.DNA
Ad 50 µL H <sub>2</sub> O-Bidest		

Die initiale Denaturierung erfolgte bei 98 °C für 30 sec. 40 Zyklen á 3 Schritte folgten mit 98 °C für 10 sec, T<sub>m</sub> -5 °C für 30 sec und 72 °C für X min. Die Velocity-Polymerase hat eine Aktivität von 1 kb pro 15 sec. Die abschließende Elongation wurde bei 72 °C für 1 min durchgeführt und anschließend der PCR-Ansatz auf 4 °C heruntergekühlt.

**2.3.5.2 Kolonie-PCR**

Für die Überprüfung putativ positiver Klone nach einer Transformation wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Hierfür wurde ein Klon mit einer sterilen Pipettenspitze von der Ausstrichplatte gepickt, auf die Sicherungsplatte übertragen und anschließend in den PCR-Ansatz getaucht. Zur Durchmischung wurde mehrfach auf und ab pipettiert.

Zur Durchführung von Kolonie-PCRs wurde unter anderem die laboreigene Taq-Polymerase und die Taq-Polymerase von Biozym verwendet.

Für die laboreigene Taq-Polymerase wurde der 10xTaq-Puffer selbst hergestellt (Tabelle 28).

**Tabelle 28: Ansatz für den 10xTaq-Puffer**

Komponente	Menge	Endkonzentration
<b>10xTaq-Puffer</b>		
3 M KCl	8,33 mL	500 mM
1,5 M Tris/HCl pH 9,0	3,33 mL	100 mM
Triton X	500 µL	1 % (v/v)
Ad 50 mL H <sub>2</sub> O-Bidest; 2 mL Aliquotes bei -20 °C lagern		

Das Pipettierschema sowie der Ablauf des PCR-Programms für die laboreigene Taq-Polymerase sind in Tabelle 29 aufgeführt. Im Schnitt wurde 1 min pro kb als Elongationszeit für die Taq-Polymerase angesetzt.

**Tabelle 29: PCR-Ansatz für eine Kolonie-PCR mit der laboreigenen Taq-DNA-Polymerase**

Komponente	Menge	Endkonzentration	PCR-Programm		
10xTaq-Puffer	2 µL	1x			
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1,2 µL	1,5 mM	96 °C	5 min	
1/1,5 mM 66-dNTPs-Mix	3,2 µL	200/300 µM	96 °C	1 min	
20 µM 1. Oligonukleotid	0,5 µL	0,5 µM	30 Zyklen	X °C	30 sec
20 µM 2. Oligonukleotid	0,5 µL	0,5 µM		72 °C	1 min/kb
Taq-DNA-Polymerase	0,2 µL		4 °C	∞	
Wasser	Ad 20 µL H <sub>2</sub> O-Bidest				
Template	1 Klon				

Für die Biozym-Taq war vom Hersteller eine Elongationszeit von 15 sec pro kb angegeben.

In Tabelle 30 ist das Pipettierschema sowie der Ablauf des PCR-Programmes für die Biozym-Taq dargestellt. Zusätzlich wurde bei dieser Polymerase DMSO verwendet.

**Tabelle 30: PCR-Ansatz für eine Kolonie-PCR mit der Biozym-Taq**

Komponente	Menge	Endkonzentration	PCR-Programm		
5xTaq-Reaktionspuffer	2 µL	1x			
1/1,5 mM 66-dNTPs-Mix	0,2 µL	12,5/19 µM	98 °C	1 min	
20 µM 1. Oligonukleotid	0,8 µL	0,8 µM	30 Zyklen	96 °C	30 sec
20 µM 2. Oligonukleotid	0,8 µL	0,8 µM		X °C	30 sec
Taq-DNA-Polymerase	0,1 µL	0,5 U	72 °C	15 sec/kb	
DMSO	0,6 µL	3 % (v/v)	4 °C	∞	
Wasser	Ad 20 µL H <sub>2</sub> O-Bidest				
Template	1 Klon				

### 2.3.5.3 Fusions-PCR

Für die Verbindung von zwei PCR-Fragmenten ohne Ligation wurde die Fusions-PCR verwendet. Die hier verwendeten Primer wurden bereits mit einem komplementären Überhang von 15 bp geplant. Zunächst wurden die beiden einzelnen Fragmente in einer PCR generiert (siehe Kapitel 2.3.5.1) und über das „E.Z.N.A-Cycle-Pure Kit“ aufgereinigt (Kapitel 2.1.4). Je 150 ng beider Fragmente wurden in einen neuen PCR-Ansatz eingesetzt, die Annealing-Temperatur des überlappenden Bereichs um 5 °C niedriger angesetzt und die Dauer des Annealings auf 1 min verlängert. Die Zugabe der Oligonukleotide (Fragment 1 5'-Oligonukleotid; Fragment 2 3'-Oligonukleotid) erfolgte erst nach 5 Zyklen mit einer weiteren Amplifikation von 30 Zyklen (Tabelle 31).

**Tabelle 31: Ablauf Fusions-PCR nach Generierung der einzelnen Fragmente**

PCR-Programm A ohne Oligonukleotide			PCR-Programm B mit Oligonukleotiden		
5 Zyklen	98 °C	10 sec	30 Zyklen	98 °C	10 sec
	96 °C	30 sec		96 °C	30 sec
	Tm-5 °C	1 min		Tm-5 °C	1 min
	72 °C	15 sec/kb		72 °C	15 sec/kb
Zugabe von je 1 µL Oligonukleotide und Start PCR-Programm B			4 °C	∞	

**2.3.5.4 Site-Directed-Mutagenesis-PCR**

Für die Erzeugung einer ortsspezifischen Mutagenese z.B. einer Punktmutation wurde die *Site-Directed-Mutagenesis-PCR* verwendet. Hierfür wurde zuerst das zu verändernde Gen in den pSK+ kloniert. Zwei Oligonukleotide wurden so geplant, dass die Mutation von jeweils 15 Basen stromaufwärts und stromabwärts flankiert wurden. Für die ortsspezifische Mutagenese wurde die Phusion-Polymerase verwendet. Der PCR-Ansatz und der Ablauf des PCR-Programmes sind in Tabelle 32 aufgeführt. Die Elongationszeit wurde auf die Größe des Plasmides angepasst. Anschließend wurden 2 µL des Restriktionsenzymes DpnI und 2 µL 10xTango Puffer zum PCR-Ansatz gegeben und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Sie zerstört das methylierte Template, sodass das Amplifikat übrigbleibt. Der Verdau wurde für 10 min bei 90 °C abgestoppt, auf 4 °C gekühlt und direkt 2,5 µL des PCR-Ansatzes und somit das Plasmid in *E. coli* transformiert (Kapitel 2.2.3).

**Tabelle 32: PCR-Ansatz und Programm für die ortsspezifische Mutagenese**

Komponente	Menge	Endkonzentration	PCR-Programm	
5xGC-Reaktionspuffer	10 µL	1x		
1/1,5 mM 66-dNTPs-Mix	8 µL	160 µM	98 °C	1 min
20 µM 1. Oligonukleotid	0,6 µL	0,24 µM	18 Zyklen	98 °C 30 sec
20 µM 2. Oligonukleotid	0,6 µL	0,24 µM		Tm-5 °C 1 min
Phusion-Polymerase	0,3 µL	0,5 U		72 °C 15-30sec/kb
DMSO	1,5 µL	3 % (v/v)		4 °C ∞
Template	X µL	50 ng Plasmid		
Wasser	Ad 50 µL H <sub>2</sub> O-Bidest			

**2.3.5.5 Sonden-PCR**

Für die Southern-Blot-Analyse wurden Digoxigenin-markierte Sonden hergestellt. Hierfür wurde die laboreigene Taq-Polymerase (Tabelle 29) in einem 100 µL Ansatz verwendet. Jedoch wurde der in Tabelle 33 beschriebene lowT-dNTP-Mix anstatt des 66-dNTP-Mix eingesetzt. Der PCR-Ansatz wurde auf je 50 µL in zwei 0,2 mL Reaktionsgefäße aufgeteilt. In ein PCR-Ansatz wurde zusätzlich 0,5 µL Dig-UTP hinzugefügt. Der Einbau von Dig-UTP in das Amplifikat führt zu einem langsameren Laufverhalten des Fragments bei der gelelektrophoretischen Auftrennung. Der zweite PCR-Ansatz diente als Kontrolle. Da die Taq-DNA-Polymerase mehr Zeit für den Einbau von Dig-UTP benötigt, wurde die Elongationszeit verdoppelt. Die Anzahl der Zyklen wurde auf 40 hochgesetzt.

**Tabelle 33: Ansatz für die Herstellung von lowT-dNTP-Mix**

Komponente	Menge	Endkonzentration
<b>lowT-dNTP-Mix</b>		
100 mM dATP	100 µL	1 mM
100 mM dTTP	20 µL	0,2 mM
100 mM dGTP	150 µL	1,5 mM
100 mM dCTP	150 µL	1,5 mM
Ad 10 mL H <sub>2</sub> O-Bidest; je 1 mL Aliquotes bei -20 °C lagern		



### 2.3.6 Spaltung von DNA

Für die Spaltung von Plasmiden und DNA-Fragmenten wurden sowohl Restriktionsenzyme als auch Fast-Digest-Restriktionsenzyme nach Anleitung des Herstellers (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Der Ansatz für die Spaltung von genomischer DNA wich von der Anleitung des Herstellers ab (Tabelle 34). Die Inkubation und Inaktivierung erfolgte für alle Restriktionsansätze nach Herstellerangaben.

**Tabelle 34: Ansatz für die Spaltung von genomischer DNA**

Komponente	Menge
10x Puffer	3 µL
Restriktionsenzym	1,5 µL
Gen. DNA	3 µg
ad 30 µL H <sub>2</sub> O-Bidest	

### 2.3.7 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Um DNA elektrophoretisch aufzutrennen wurden Agarosegele mit einer Konzentration von 0,7 % - 1,8 % verwendet. TBE-Puffer wurde sowohl als Laufpuffer, als auch für die Herstellung der Agarosegele verwendet. Hierfür wurde die entsprechende Menge an Agarose eingewogen und mit TBE-Puffer aufgefüllt. Nach dem Aufkochen in der Mikrowelle für 2 x 1,5 min wurde die Agarosegel-Lösung auf einem Magnetrührer auf 65 °C herunter gekühlt und anschließend in einen Gelschlitten gegossen. Anschließend wurde das Agarosegel in eine Laufkammer mit TBE-Puffer gelegt. Vor dem Auftragen der Proben wurde diese mit 6x Probenpuffer 1:6 versetzt (5 µL Probe mit 1 µL 6x Probenpuffer). Die Laufhöhe der mit Probenpuffer versetzten Proben bei einem 1 % Agarosegel betrug für Xylencyanolblau 4000 bp, Kresolrot 1500 bp, Bromphenolblau 400 bp und Orange G 50 bp. Der entsprechende Größenstandard wurde mit je 5 µL aufgetragen (Tabelle 35).

**Tabelle 35: Herstellung des TBE-Puffers und des 6xDNA-Probenpuffers**

Komponente	Menge	Endkonzentration
<b>10xTBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA)</b>		
Tris	107,82 g	0,89 M
Borsäure	55,03 g	0,89 M
Na <sub>2</sub> -EDTA	7,45 g	0,02 M
Ad 1L H <sub>2</sub> O-Bidest		
Zur Verwendung 10xTBE-Puffer 1:10 in VE verdünnt		
<b>6x DNA-Probenpuffer</b>		
87 % Glycerol	3,3 mL	28,7 % (v/v)
Bromphenolblau	0,025 g	3,7 mM
Xylencyanolblau	0,025 g	4,6 mM
Orange G	0,025 g	5,5 mM
Kresolrot	0,025 g	6,2 mM
Ad 10 mL H <sub>2</sub> O-Bidest; je 1 mL Aliquotes bei -20 °C lagern		

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte für große Gele bei 100-160 V, für mittlere und kleine Gele bei 80-120 V. Zur Analyse wurden die Agarosegele anschließend für 10-15 min in ein Ethidiumbromidbad (2 µg/mL) gelegt und mittels UV-Licht visualisiert (Easy Win 32 Software).

### 2.3.8 Ligation von DNA

Zur Ligation von DNA wurde die T4 DNA Ligase von Thermo Fisher Scientific und New England Biolabs verwendet. Zur Ligation eines Inserts in ein Plasmid wurde ein Verhältnis von 3:1 und 10:1 verwendet. Generell wurden 50 ng des geschnittenen Plasmids in die Ligation eingesetzt. In F4 ist die Formel für die Berechnung der benötigten Insert-Menge für ein Verhältnis von 1:1 dargestellt. Entsprechend für 3:1 und 10:1 wurde die 3-fache bzw. die 10-fache Menge des Inserts in den Ligations-Ansatz eingesetzt.

$$\text{F4) Verhältnis 1:1} \quad \text{Insert [ng]} = \frac{\text{Menge Plasmid [ng]} \cdot \text{Länge Insert [bp]}}{\text{Länge Plasmid [bp]}}$$

In folgender Tabelle ist ein Ansatz für die Ligation mit Überhängen, sowie ein Ansatz für die *blunt-end* Ligation dargestellt.

**Tabelle 36: Ligations-Ansatz für DNA-Fragmente mit Überhängen und blunt-end DNA-Fragmente**

Komponente	Ligation mit Überhang	blunt-end Ligation
10x T4 DNA Ligase-Puffer	2 µL	2 µL
50 ng Plasmid	X µL	X µL
Insert Verhältnis 3:1/10:1	X µL	X µL
T4 DNA Ligase	1 µL	2 µL
Optional Restriktionsenzym	-	(1 µL)
	Ad 20 µL H <sub>2</sub> O-Bidest	Ad 20 µL H <sub>2</sub> O-Bidest

Zur Optimierung der blunt-end Ligation konnte Restriktionsenzym hinzugegeben werden. Die Ligation erfolgte für 10-90 min bei RT oder als Gradient auf Eis über Nacht bei 37 °C. Durch das Schmelzen des Eises wurde die Temperatur Schritt für Schritt erhöht. Die Hitzeinaktivierung der Ligation erfolgte bei 75 °C für 10 min im Heizblock. Anschließend wurden 10 µL des Ligations-Ansatzes für die Transformation von *E. coli* eingesetzt.

### 2.3.9 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung Plasmid-DNA sowie von PCR-Produkten erfolgte durch GATC Biotech AG, die Proben wurden nach Firmenangaben vorbereitet.

### 2.3.10 Southern Blot Analyse

Die Southern Blot Analyse erfolgte, um bereits vorhandene und neu erstellte *H. volcanii* Deletionsmutanten zu überprüfen. Als Kontrolle wurde genomische DNA aus dem Wildtypstamm mitgeführt. Hierfür wurde wie in [Kapitel 2.3.1](#) genomische DNA isoliert und wie in [Kapitel 2.3.6](#) beschrieben wurden, 3 µg der genomischen DNA verdaut. Die Restriktionsansätze wurden nach Herstellerangaben hitzeinaktiviert, mit 6x Probenpuffer versetzt und auf ein mittleres 1-1,5 % Agarosegel aufgetragen. Zusätzlich wurden 5 µL entsprechender Größenstandard aufgetragen und die Proben bei 80-120 V für 2-5 h elektrophoretisch aufgetrennt.

Nachfolgend wurde das Gel 10 min im Ethidiumbromidbad (2µg/mL) inkubiert und die Dokumentation mittels UV-Lichttisch durchgeführt (Easy Win 32 Software). Anschließend folgten Bäder: für 10 min in SB1-Lösung, 20 min in SB2-Lösung und 30 min in der SB3-Lösung, jeweils auf dem Wipp-Schüttler. Diese Schritte dienten zuerst der partiellen Depurinierung der DNA mittels SB1-Lösung, zur Denaturierung in der SB2-Lösung und zur Neutralisierung in der SB3-Lösung (Tabelle 37). Abschließend wurde das Agarosegel für 10 min in 20x SSC-Puffer äquilibriert, bevor der Blot aufgebaut wurde.

**Tabelle 37: Lösungen zur Vorbereitung des DNA-Transfers**

Komponente	Menge	Endkonzentration
<b>SB1-Lösung</b>		
VE	900 mL	
25 % HCl	32,5 mL	0,25 M
ad 1 L VE		
<b>SB2-Lösung</b>		
NaCl	87,6 g	1,5 M
NaOH	20 g	0,5 M
ad 1 L VE		
<b>SB3-Lösung</b>		
NaCl	87,6 g	1,5 M
Tris	60,57 g	0,5 M
ad 1 L VE; pH 8 wurde mit HCl eingestellt		
<b>20x SSC-Puffer</b>		
NaCl	175,3 g	3 M
tri-Natriumcitrat · 2 H <sub>2</sub> O	88,2 g	0,3 M
ad 1 L VE; pH 7; autoklaviert		

#### 2.3.10.1 Transfer der DNA

Für den Aufbau des Blots wurden 20 Blatt eines 1,4 mm dicken Blottingpapiers gestapelt. Darauf wurden 3 Blatt, 0,37 mm dickes Blottingpapier, in 20x SSC-Puffer äquilibriert und auf den Stapel gelegt. Die positiv-geladene Nylonmembran wurde für 10 min in H<sub>2</sub>O-Bidest vorgequollen und ebenfalls in 20x SSC-Puffer äquilibriert, bevor sie auf den Stapel des Blottingpapiers gelegt wurde. Es folgte das Agarosegel, das luftblasenfrei auf die Nylonmembran gelegt und mit einem Glasröhrchen gewalzt wurde. 3 weitere Blätter, in 20x SSC-Puffer äquilibriertes 0,37 mm dickes Blottingpapier, wurden auf das Agarosegel gelegt. Abschließend folgte eine

Pufferbrücke aus 0,37 mm dickem Blottingpapier, die rechts und links des Blottingstapels in ein 20x SSC-Puffer-Reservoir eintauchte. Zur Fixierung der Pufferbrücke wurde der Gelschlitten abschließend auf den Blottingstapel gelegt und mit einer 500 mL Schottflasche beschwert. Das Blotten erfolgte über Nacht, jedoch mindestens für 20 h. Anschließend erfolgte der Abbau des Blottes bis zum Agarosegel: die Taschen wurden mit einem Bleistift auf die Membran durchgezeichnet und am UV-Lichttisch das Gel, als auch die Membran dokumentiert. Die Membran wurde dann im Stratalinker bei 120 mJ UV-quervernetzt und bei RT getrocknet oder direkt mittels Sonde hybridisiert.

### 2.3.10.2 Hybridisierung der Membran mittels Sonde und Nachweisreaktion

Die Membran wurde in ein Hybridisierungsröhrchen überführt und mit 10 mL Hybridisierungspuffer für 1h bei 55 °C im Hybridisierungsofen unter langsamen Drehen vorhybridisiert. Gleichzeitig wurde die in Kapitel 2.3.5.5 hergestellte Sonde 5 min bei 95 °C denaturiert und in 10 mL Hybridisierungspuffer überführt. Die verwendeten Lösungen sind in Tabelle 38 aufgelistet.

**Tabelle 38: Lösungen für die Hybridisierung und Chemilumineszenz**

Komponente	Menge	Endkonzentration
<b>100x Denhardt-Lösung</b>		
Rinderserumalbumin	10 g	2 % (w/v)
Ficoll 400	10 g	2 % (w/v)
Polyvinylpyrrolidon	10 g	2 % (w/v)
ad 500 mL VE, Filtration durch Faltenfilter, bei -20 °C gelagert		
<b>Hybridisierungspuffer</b>		
20x SSC-Puffer	250 mL	5x
100x Denhardt-Lösung	30 mL	3x
SDS	5 g	0,5 % (w/v)
30 % (w/v) N-Lauroylsarcosin	6,7 mL	0,2 % (v/v)
Dextransulfat	50 g	5 % (w/v)
ad 500 mL VE, autoklaviert; anschließend 500 mL Formamid (50 % (v/v)) hinzugefügt		
<b>Maleinsäurepuffer</b>		
Maleinsäure	11,6 g	100 mM
NaCl	8,77 g	150 mM
ad 1 L H <sub>2</sub> O-Bidest; pH 7,5 eingestellt; autoklaviert		
<b>Blocking-Lösung</b>		
Blocking-Reagenz	10 g	1 % (w/v)
ad 1 L Maleinsäurepuffer; autoklaviert; gelagert bei 4 °C		
<b>Waschpuffer</b>		
Tween 20	900 µL	0,3 % (v/v)
ad 300 mL Maleinsäurepuffer		
<b>Detektionspuffer</b>		
MgCl <sub>2</sub>	4,77 g	50 mM
NaCl	5,84 g	100 mM
Tris	12,11 g	100 mM
ad 1 L H <sub>2</sub> O-Bidest; pH auf 9,5 eingestellt		

Der Puffer der Vorhybridisierung wurde verworfen und die vorbereitete Sonde im Hybridisierungspuffer hinzugegeben. Die Membran wurde bei 55 °C, unter langsamen Drehen über Nacht hybridisiert. Die Sonde in Hybridisierungspuffer wurde mehrfach verwendet und jeweils vor Gebrauch bei 95 °C im Heizblock 10 min denaturiert. Gelagert wurde sie bei -20 °C. Nach der Hybridisierung wurde die Membran unter schnellem Drehen 2 x 5 min in 50 mL 2x SSC-Puffer mit 0,5 % (w/v) SDS bei 55 °C gewaschen. Die nächsten Waschschriffe folgten für 2 x 15 min bei 55 °C in 50 mL 1x SSC-Puffer mit 0,5 % (w/v) SDS.

Die Membran wurde kurz in Waschpuffer geschwenkt und anschließend für 30 min in 25 mL Blocking-Lösung unter langsamen Drehen bei RT inkubiert. Als nächster Schritt folgte 1 µL Anti-Digoxigenin-Antikörper in 25 mL Blocking-Lösung für 30 min bei RT unter langsamen Drehen. 2-maliges Waschen in 100 mL Waschpuffer für 5 min unter schnellem Drehen folgte. Die Membran wurde in 20 mL Detektionspuffer 5 min unter langsamen Drehen inkubiert. Abschließend wurde die Membran für 5 min mit 10 µL CDP-Star in 15 mL Detektionspuffer inkubiert und in eine Röntgenkassette gelegt. Die Detektion erfolgte in der Dunkelkammer mittels Röntgenfilmen (GE Healthcare), die je nach Sonde für 15 sec bis 2 h aufgelegt wurden. Die exponierten Filme wurden 2 min in Entwicklerlösung geschwenkt, durch ein Wasserbad geführt und für 2 min in Fixierlösung gelegt. Zuletzt wurde der Röntgenfilm unter Wasser abgespült und getrocknet.

## **2.4 Biochemische Methoden**

### **2.4.1 Erstellen eines Gesamtzellextraktes**

Beim Erstellen des Gesamtzellextraktes zur Untersuchung mittels Western Blot wurden 2x 1,5 mL exponentielle Zellen von *H. volcanii* bei 13.000 rpm für 2 min bei RT pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen bei -20 °C für 24h eingefroren. Anschließend wurde das Pellet aufgetaut und in 50 µL 1x Probenpuffer gelöst, für 10 min bei 95 °C auf dem Heizblock erhitzt und kurz auf Eis gestellt. Nach einer erneuten Zentrifugation von 13.000 rpm für 30 sec bei RT wurde der Überstand abgenommen und auf ein vorbereitetes SDS-Gel (12 % Acrylamid) mittels einer Hamiltonspritze geladen.

### **2.4.2 Methanol-Chloroform-Extraktion von Proteinen**

Die Zellernte und Proteinfällung wurde nach Wessel und Flügge mittels Methanol und Chloroform durchgeführt. Die verwendeten Puffer sind in Tabelle 39 aufgelistet. Hierfür wurden 15 mL Zellen in exponentiellem Wachstum bei RT, 4000 rpm für 15 min geerntet. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 1 mL MCE-Lysepuffer resuspendiert und 30 min bei RT inkubiert. 4 mL Methanol, 1 mL Chloroform und 3 mL H<sub>2</sub>O-Bidest wurden hinzugegeben und zwischen jeder Zugabe gevortext.

**Tabelle 39: Puffer für die Proteinfällung**

<b>Komponente</b>	<b>Menge</b>	<b>Endkonzentration</b>
<b>MCE-Lysepuffer</b>		
DNase (1mg/mL)	10 µL	
Proteinase-Inhibitor-Mix	10 µL	
	ad 1 mL H <sub>2</sub> O-Bidest; immer frisch angesetzt	
<b>Rücklösungspuffer</b>		
Tris	3,03 g	25 mM
	ad 1 L H <sub>2</sub> O-Bidest; pH 7,2 mit HCl eingestellt; immer frisch angesetzt	

Es folgte eine Zentrifugation bei 4000 rpm für 15 min bei RT. Die obere Phase wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. 3 mL Methanol wurden hinzugegeben, gevortext und 5 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Proteinpräzipitat für einige Minuten an der Luft getrocknet. 200-400 µL Rücklösungspuffer wurden hinzugegeben und die Proteine durch Erwärmen auf 65 °C gelöst.

### 2.4.3 Affinitätsaufreinigung

Die Affinitätsaufreinigung erfolgte in Form einem pull-down-Assays, bei der das Zellysate einer *H. volcanii* Kultur auf nickelbeladene Chelat-Sepharose-Beads gegeben wurde. Die Chelat-Sepharose-Beads wurden mehrfach in Waschpuffer gewaschen und letztendlich die Proteine mit Elutionspuffer eluiert. Die verwendeten Puffer und Lösungen sind in Tabelle 40 aufgelistet.

**Tabelle 40: Komponenten für den pull-down Assay**

Komponente	Menge	Endkonzentration
<b>NiCl<sub>2</sub>-Lösung</b>		
NiCl <sub>2</sub>	12,96 g	0,2 M
	ad 500 mL H <sub>2</sub> O-Bidest	
<b>20 %-ig Ethanol</b>		
99 % reinst Ethanol	20,2 mL	20 % (v/v)
H <sub>2</sub> O-Bidest	79,8 mL	
<b>PMSF-Lösung</b>		
PMSF	0,174 g	200 mM
	ad 5 mL 99 %-ig Ethanol; in je 1 mL Aliquotes bei 4 °C dunkel lagern	
<b>Grundlagenpuffer</b>		
NaCl	187,5 g	2,1 M
HEPES	7,2 g	20 mM
	ad 1,5 L H <sub>2</sub> O-Bidest	
<b>Bindepuffer</b>		
Imidazol	0,68 g	20 mM
	ad 500 mL Grundlagenpuffer; gelagert bei 4 °C	
<b>His-Waschpuffer</b>		
Imidazol	1,02 g	30 mM
	ad 500 mL Grundlagenpuffer	
<b>Elutionspuffer</b>		
Imidazol	2,38 g	700 mM
	ad 50 mL Grundlagenpuffer	
<b>Dialysepuffer</b>		
Tris	3,03 g	25 mM
	ad 1 L H <sub>2</sub> O-Bidest; pH 7,2 mit HCl eingestellt; immer frisch angesetzt	

#### 2.4.3.1 Die Zellernte

Für die Affinitätsaufreinigung wurden 400 mL exponentielle Kultur von *H. volcanii* bei 4700 rpm für 30 min bei 4 °C pelletiert. Das Pellet wurde in 4 mL eiskaltem Bindepuffer suspendiert, in 2 mL Reaktionsgefäße überführt und auf Eis gestellt. Der Aufschluss der Zellen erfolgte auf Eiswasser mittels Ultraschalltauchsonde für 3x 30 sec, Tastgrad 50 (*duty cycle*), Leistungsregelung 3 (*output control*). Das Zellysate wurde für 30 min, mit 13.000 rpm bei 4 °C zentrifugiert und auf Eis gestellt. Zur Kontrolle der Aufreinigung für das spätere SDS-Polyacrylamidgel wurden 30 µL des Zellysates in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführt und auf Eis gestellt.

**2.4.3.2 Beladung der Nickel-Chelat-Sepharose-Beads (NCS)**

500 µL 50 %-ige NCS-Beads wurden in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführt und mit 1 mL H<sub>2</sub>O-Bidest durch vortexen gewaschen, für 30 sec bei RT mit 13.000 rpm abzentrifugiert.

Der Überstand wurde verworfen und die NCS-Beads mit 1 mL 0,2 M NiCl-Lösung beladen. Die Mischung wurde am Rotor für 5 min inkubiert und 30 sec bei RT und 13.000 rpm abzentrifugiert. Dieser Schritt wurde nochmals wiederholt. Anschließend wurden die NCS-Beads 2x mit H<sub>2</sub>O-Bidest gewaschen, am Rotor für 2 min inkubiert und für 30 sec bei RT mit 13.000 rpm abzentrifugiert. Für die Lagerung wurden die NCS-Beads 2x in 500 µL 20 % Ethanol gewaschen und bei 4 °C gelagert. Für sofortige Verwendung erfolgte 2-maliges Waschen in 500 µL Bindepuffer, 2 min Inkubation am Rotor und die Zentrifugation bei 13.000 rpm für 30 sec bei RT. Anschließend wurde die Mischung in 500 µL frischen Bindepuffer gegeben, gevortext und mit einer an der Spitze abgeschnittenen 1000 µL Pipettenspitze je 250 µL dieser Mischung auf vier 2 mL Reaktionsgefäße verteilt. Jeweils eines dieser Aliquotes wurde für eine Aufreinigung verwendet.

**2.4.3.3 Der Pull-down Assay**

250 µL der vorbereiteten bzw. beladenen NCS-Beads wurden nochmals bei 13.000 rpm für 30 sec bei RT abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde direkt 1,6 mL Zelllysat auf die beladenen NCS-Beads pipettiert und am Rotor für 1 min bei RT unter Drehen inkubiert. Nach einer Zentrifugation von 13.000 rpm, 30 sec bei RT wurde der Überstand abgenommen und die NCS-Beads erneut mit Zelllysat beladen. Diese Schritte wiederholten sich, bis das komplette Zelllysat aufgetragen wurde.

Die NCS-Beads wurden in 1,6 mL His-Waschpuffer gewaschen, am Rotor für 30 sec bei RT inkubiert und mit 13.000 rpm für 30 sec bei RT abzentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde viermal wiederholt.

Für die Elution wurden 100 µL Elutionspuffer zu den NCS-Beads gegeben und für 1 min am Rotor bei RT inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei RT, mit 13.000 rpm für 30 sec wurde der komplette Überstand in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß pipettiert. Der Elutionsschritt wurde für die zweite Elutionsfraktion nochmals wiederholt.

**2.4.3.4 Dialyse der Proben**

Je 35 µL der Eluate wurden für je 30 min über Dialyseplättchen in Petrischalen dialysiert. Dieser Schritt wurde wiederholt, bis die kompletten Eluate dialysiert waren.



**2.4.4 Crosslinking von Proteinen in der Zellkultur**

Das *Crosslinking* von Proteinen in der Zellkultur erfolgte mittels Formaldehyd nach modifizierter Anleitung von Hoffman 2015 (Hoffman *et al.*, 2015).

Hierfür wurde 1 L exponentielle *H. volcanii* Kultur bei 4 °C für 30 min bei 4700 rpm pelletiert, anschließend in 20 mL Basalsalz resuspendiert und in je 10 mL in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen überführt. Die beiden Zellsuspensionen wurde bei 4 °C, mit 4000 rpm für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Volumen mit Basalsalz auf je 5 mL aufgefüllt und die Pellets gleichzeitig resuspendiert. Anschließend wurden je 54 µL 37 %-iges Formaldehyd hinzu pipettiert und beide Ansätze am Rotor bei RT für 10 min inkubiert. Das *Crosslinking* wurde mit je 420 µL 3 M Glycin gestoppt (0,25 M Endkonzentration) und die Zellsuspension nochmals 15 min am Rotor bei RT inkubiert. Die Zellsuspensionen wurden mit 4000 rpm für 10 min bei 4 °C abzentrifugiert und in 10 mL Basalsalz resuspendiert. Nach 2 min waschen am Rotor bei RT wurden die Ansätze erneut für 10 min mit 4000 rpm bei 4 °C zentrifugiert und die beiden Pellets anschließend in je 4,5 mL Bindepuffer suspendiert. Es folgte die Zugabe der PMSF-Lösung (Tabelle 40). Die Zellsuspension wurde in 1,8 mL Aliquoten in 2 mL Reaktionsgefäße für den Zellaufschluss pipettiert und auf Eis gestellt. Der Zellaufschluss erfolgte wie bereits beschrieben mittels Ultraschallsonde (siehe Kapitel 2.4.3.1). Anschließend erfolgte die Affinitätsaufreinigung wie in Kapitel 2.4.3.3 beschrieben.

**2.4.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Es wurden 8 %-ige, 12 %-ige und 15 %-ige Polyacrylamidgele mit einer Stärke von 1 mm verwendet. In Tabelle 41 sind die verwendeten Puffer und Lösungen aufgeführt.

**Tabelle 41: Puffer und Lösungen für die SDS-PAGE**

Komponente	Menge	Endkonzentration
<b>Trenngelpuffer</b>		
Tris	181,65 g	1,5 M
SDS	3,84 g	0,38 % (w/v)
ad 1 L H <sub>2</sub> O-Bidest; pH 8,8 eingestellt		
<b>Sammelgelpuffer</b>		
Tris	60,55 g	0,5 M
SDS	4 g	0,4 % (w/v)
ad 1 L H <sub>2</sub> O-Bidest; pH 6,8 eingestellt		
<b>APS</b>	100 mg	10 % (w/v)
ad 1 mL H <sub>2</sub> O-Bidest		
<b>4x SDS-Probenpuffer</b>		
1 M Tris/HCl pH 6,8	2,5 mL	250 mM
SDS	1 g	10 % (w/v)
87 % Glycerin	5,7 mL	50 % (v/v)
Bromphenolblau	80 mg	0,8 % (w/v)
ad 10 mL H <sub>2</sub> O-Bidest; Aliquote 1 mL		
β-Mercaptoethanol	0,25 fach vor Verwendung hinzu gegeben	

**10x SDS-Laufpuffer**

Tris	30,3 g	0,25 M
Glycin	144 g	1,92 M
SDS	10 g	1 % (w/v)
ad 1 L VE-Wasser; zur Verwendung 1:10 in VE-Wasser verdünnt		

**2.4.5.1 Herstellung der SDS-Polyacrylamidgelle**

Zuerst wurde das Trenngel wie in Tabelle 42 beschrieben angesetzt, direkt 5 mL (etwa 4/5 der Laufstrecke) mittels einer Glaspipette in die Gelgießvorrichtung pipettiert und mit 200 µL Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde das Isopropanol auf ein Papiertuch abgegossen. Anschließend wurde das Sammelgel wie in Tabelle 42 zusammen pipettiert, auf das Trenngel gegossen und der Kamm für die Taschen hineingesteckt. Nach der Polymerisation wurde das SDS-Gel in mit H<sub>2</sub>O-Bidest getränkte Tücher gewickelt und bei 4 °C über Nacht im Kühlschrank gelagert.

**Tabelle 42: Komponenten für ein SDS-Polyacrylamidgel mit 1 mm Stärke**

<b>Komponente</b>			
<b>Trenngel</b>	<b>12 %</b>	<b>8 %</b>	<b>15 %</b>
H <sub>2</sub> O-Bidest	2,2 mL	3,1 mL	1,5 mL
Trenngelpuffer	1,8 mL	1,8 mL	1,8 mL
30 % Acrylamid	2,7 mL	1,8	3,4 mL
10 % APS	100 µL	100 µL	100 µL
TEMED	10 µL	10 µL	10 µL
gesamt	6,81 mL	6,81 mL	6,81 mL
<b>Sammelgel</b>			
H <sub>2</sub> O Bidest	1,8 mL		
Sammelgelpuffer	0,8 mL		
30 % Acrylamid	0,5 mL		
10 % APS	50 µL		
TEMED	5 µL		
gesamt	3,155 mL		

**2.4.5.2 Beladen der Gele**

Zum Beladen der Gele wurde der 4x Probenpuffer wie in Tabelle 41 beschrieben mit β-Mercaptoethanol versetzt und 5 µL Probenpuffer zu je 15 µL Probe hinzugegeben. Im Heizblock wurden die Proben bei 95 °C für 10 min erhitzt, 25 sec auf Eis abgekühlt und für 30 sec bei RT mit 13.000 rpm zentrifugiert. Nach dem Auftragen der Proben wurde die SDS-PAGE mit 100 V durchgeführt, bis die blaue Farbbande des Probenpuffers den unteren Gelrand erreicht hatte.

### 2.4.6 Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen

In Tabelle 43 sind die Lösungen für die Coomassie-Färbung aufgelistet. Die Gele wurden von den Glasplatten gelöst und in 20 mL Coomassie-Färbelösung gelegt. Danach wurden sie für 20 sec bei 300 Watt in der Mikrowelle erhitzt und 2 min auf dem Wippschüttler zum Schwenken gestellt. Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt.

Anschließend wurde das Gel in Entfärbe-Lösung für 20 sec bei 300 Watt in der Mikrowelle erhitzt, 5 min auf dem Wippschüttler geschwenkt und die gebrauchte Entfärbe-Lösung verworfen. Dieser Entfärbeschritt wurde nochmals wiederholt und das Gel mit frischer Entfärbe-Lösung und zusätzlichem Schwämmchen über Nacht vollständig entfärbt. Für die Dokumentation wurde das Gel in eine Plastikfolie gelegt und eingescannt.

**Tabelle 43: Lösungen für die Coomassie-Färbung**

Komponente	Menge	Endkonzentration
<b>Coomassie-Färbelösung</b>		
H <sub>2</sub> O-Bidest	454 mL	
Coomassie Blue R-250	0,5 g	0,05 % (w/v)
Methanol	545 mL	55 % (v/v)
Eisessig	92 mL	9,2 % (v/v)
<b>Entfärbe-Lösung</b>		
H <sub>2</sub> O-Bidest	1,4 L	
Methanol	500 mL	25 % (w/v)
Eisessig	100 mL	5 % (w/v)

### 2.4.7 Tricin-Polyacrylamidgelelektrophorese

Diese SDS-Page wurde für die gelelektrophoretische Auftrennung von kleinen Proteinen mit einer Molekülmasse von 1-10 kDa verwendet (Jiang *et al.*, 2016).

Die verwendeten Puffer und Lösungen sind in Tabelle 44 dargestellt. Der 10x Kathoden- und 10x Anodenpuffer wurde 1:10 in VE-Wasser verdünnt und bei 4 °C gelagert.

**Tabelle 44: Puffer und Lösungen für die Tricin-SDS-PAGE**

Komponente	Menge	Endkonzentration
<b>10x Tricin-Anodenpuffer</b>		
Tris	121,14 g	1 M
7,7 M HCl	29,7 mL	0,225 M
ad 1 L VE-Wasser; pH 8,9		
<b>10x Tricin-Kathodenpuffer</b>		
Tris	121,14 g	1 M
Tricin	179,2 g	1 M
SDS	10 g	1 % (w/v)
ad 1 L VE-Wasser; pH 8,2		
<b>AB-3-Lösung</b>		
Acrylamid	48 g	48 % (w/v)
Bisacrylamid	1,5 g	1,5 % (w/v)
ad 100 mL H <sub>2</sub> O-Bidest		

**3x Tricin-Gelpuffer**

Tris	181,7 g	3 M
SDS	1,5 g	0,3 % (w/v)
ad 500 mL H <sub>2</sub> O-Bidest; pH 8,4		

**4x Tricin-Probenpuffer**

SDS	1,2 g	12 % (w/v)
87 % Glycerin	3,24 mL	30 %
Coomassie blue R250	50 mg	0,05 % (w/v)
Tris	0,18 g	150 mM
ad 10 mL H <sub>2</sub> O-Bidest; 1 mL Aliquotes		
β-Mercaptoethanol	0,25 fach vor Verwendung hinzu gegeben	

Zur Herstellung des Tricin-SDS-Gels wurden die Komponenten für das Trenngel gemischt (Tabelle 45), direkt in die Gel-Gießapparatur gegossen und mit 200 µL Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde das Isopropanol abgekippt. Die Komponenten für das Sammelgel wurden gemischt, auf das Trenngel gegossen und der Kamm für die Taschen hineingesteckt. Nach dem Erstarren des Sammelgels wurde das Gel in mit H<sub>2</sub>O-Bidest getränkte Papiertücher gewickelt und im Kühlschrank bei 4 °C über Nacht gelagert.

**Tabelle 45: Komponenten zur Herstellung eines Tricin-SDS-Polyacrylamidgel**

Komponente	Trenngel (16 % T, 3 % C)	Sammelgel (4 %)
H <sub>2</sub> O-Bidest	1,9 mL	4 mL
3x Tricin-Gelpuffer	2,5 mL	1,5 mL
AB-3-Lösung	2,5 mL	0,5 mL
87 % Glycerin	0,6 mL	-
10 % APS	45 µL	45 µL
TEMED	8 µL	7,5 µL
gesamt	7,55 mL	6,05 mL

**2.4.7.1 Beladen der Gele**

Zur Probenvorbereitung wurde der 4x Tricin-Probenpuffer wie in Tabelle 44 mit β-Mercaptoethanol versetzt. Zu drei Teilen Probe wurde ein Teil Probenpuffer hinzu pipettiert und im Heizblock bei 95 °C für 10 min erhitzt. Anschließend wurden die Proben 20 sec auf Eis gestellt und für 30 sec mit 13.000 rpm bei RT zentrifugiert. Es folgte das Auftragen der Proben und des entsprechenden Marker (Tabelle 12) auf das Gel. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in drei Stufen. Begonnen wurde mit 40 V, bis die Proben ins Sammelgel eingelaufen waren. Danach wurde auf 3 W für 1,5 h umgestellt. Anschließend wurde auf 5 W erhöht und bei Erreichen der blauen Pufferbande des unteren Gelrandes (ca. 1,5 h) wurde die Elektrophorese gestoppt.

**2.4.8 Western Blot**

Für einen Western Blot wurde zuvor eine SDS-PAGE, die in Kapitel 2.4.5 beschrieben wurde, durchgeführt. Anschließend wurde das Sammelgel des SDS-Gels vom Trenngel entfernt und das Trenngel in den Transferpuffer für den Western Blot gelegt.

**2.4.8.1 Transfer der Proteine**

Der Transfer der Proteine erfolgte mittels Elektrobloiting-Apparatur der Firma Biometra (Fast-blot B43 Bloiting Apparatur). Die verwendeten Puffer und Lösungen sind in Tabelle 46 dargestellt.

**Tabelle 46: Puffer und Lösungen für den Western-Transfer**

<b>Komponente</b>	<b>Menge</b>	<b>Endkonzentration</b>
<b>Transferpuffer</b>		
Glycin	11,3 g	150 mM
15 % Methanol	100 mL	15 % (v/v)
Tris	3 g	25 mM
ad 1L H <sub>2</sub> O-Bidest; pH 8,5 mit HCl eingestellt		
<b>Tintenfärbelösung</b>		
Tween 20	0,5 mL	0,05 % (v/v)
Essigsäure	10 mL	1 % (v/v)
Tinte	1 mL	0,1 % (v/v)
ad 1L 1x PBS		
<b>10x PBS</b>		
NaCl	80 g	1,38 M
KCl	2 g	26 µM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	11,5 g	81 µM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 g	15 µM
ad 1L H <sub>2</sub> O-Bidest; pH 7,4		
<b>1x PBS</b>		
10x PBS	100 mL	
ad 1L H <sub>2</sub> O-Bidest		
<b>1x PBST</b>		
10xPBS	100 mL	
Tween 20	1 mL	0,1 % (v/v)
ad 1L H <sub>2</sub> O-Bidest		
<b>Blocking-Lösung</b>		
Magermilchpulver	5 g	
ad 100 mL 1x PBS		

10 Blätter 0,37 mm dickes Bloitingpapier und eine Bloitingmembran (Polyvinylidendifluorid: PVDF-Membran) wurden auf 6 x 9 cm zugeschnitten. Das Bloitingpapier wurde 10 min in Transferpuffer äquilibriert und 5 Blätter auf die Platte der Elektrobloiting-Apparatur gelegt. Die Bloitingmembran wurde für 10 min in H<sub>2</sub>O-Bidest vorgequollen, für 10 min in Transferpuffer äquilibriert und auf den Bloitingpapierstapel gelegt. Das zuvor in Transferpuffer äquilibrierte SDS-Gel wurde luftblasenfrei auf die Membran gelegt, weitere 5 Blätter des äquilibrierten Bloitingpapiers folgten. Die Luftblasen wurden mittels Glasröhrchen heraus gewalzt und das Gel

für 1,5 h bei 4 mA/cm<sup>2</sup> geblottet. Das Gel wurde wie in Kapitel 2.4.6 beschrieben in Coomassie gefärbt.

Zur Kontrolle wurde die Membran in Tintenfärbelösung 15 min gefärbt, das Bandenmuster dokumentiert und anschließend 10 min in H<sub>2</sub>O-Bidest entfärbt. Die Membran wurde dann in Blocking-Lösung gelegt und über Nacht bei 4 °C unter Schwenken inkubiert.

#### 2.4.8.2 Immundetektion und Nachweisreaktion

Der Western Blot wurde sowohl für die DHFR als auch für Proteine mit His-Tag durchgeführt. In Tabelle 47 sind die Antikörper und deren Verdünnung für die Immundetektion aufgeführt. Die über Nacht geblockte Membran wurde kurz in 1x PBS gespült und für 1,5 h bei RT in 15 mL Erstantikörperlösung inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit je 30 mL 1x PBST für 10 min wurde die Membran für 1,5 h bei RT in 15 mL Zweitantikörper inkubiert. Die Membran wurde erneut dreimal in 30 mL 1x PBST gewaschen.

Für die Nachweisreaktion wurde Roti® Lumin nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Detektion erfolgte in der Dunkelkammer mittels Röntgenfilmen (GE Healthcare), die für 15 sec bis 2 h aufgelegt wurden. Die exponierten Filme wurden 2 min in Entwicklerlösung geschwenkt, durch ein Wasserbad geführt und für 2 min in Fixierlösung gelegt. Zuletzt wurde der Röntgenfilm unter Wasser abgespült und getrocknet.

**Tabelle 47: Antikörper für Penta-His und DHFR**

Antikörper	Konzentration	Puffer
<b>Nachweis Penta-His</b>		
1. AK Penta-His™-Antibody BSA-free (QIAGEN GmbH, Hilden)	1:4000	Blocking-Lösung mit 0,1 % (v/v) Tween 20
2. AK Anti-Mouse IgG Peroxidase (Sigma-Aldrich, Steinheim)	1:5000	Blocking-Lösung
<b>Nachweis DHFR</b>		
1. AK Anti-GAB-DNF2, DHFR-AK (Davids Biotechnologie, Regensburg)	1:4000	Blocking-Lösung mit 0,1 % (v/v) Tween 20
2. AK Anti-Rabbit IgG Peroxidase (Sigma-Aldrich, Steinheim)	1:10000	Blocking-Lösung

#### 2.4.9 **Proteinbestimmung nach Pierce**

Der Bicinchoninsäure-Test erfolgte mittels Pierce™ BCA Protein Assay Kit der Firma Thermo Fisher Scientific. Hierfür wurde eine BSA-Reihe (0-2 mg/mL BSA) für die spätere Berechnung der Konzentration in Doppelbestimmung in eine 96 well-Mikrotiterplatte mit flachem Boden pipettiert. 10 µL Proteinproben in Doppelbestimmung wurden in einer Verdünnung von 1:2, sowie 1:5 vorgelegt und anschließend mit je 200 µL BCA-Reaktionslösung versetzt. Nach 20-25 min bei 37 °C wurde die Platte bei einer OD von 562 nm gemessen.

### 2.4.10 Silberfärbung von SDS-Gelen

Die Silberfärbung nach Blum wurde für die Visualisierung von Proteinen und Nukleinsäuren in SDS-Gelen verwendet (Blum H., Beier H., 1987). Die verwendeten Puffer und Lösungen für die Silberfärbung sind in Tabelle 48 aufgeführt.

Das SDS-Gel wurde hierfür 15 min in Fixierlösung und anschließend für 30 min in Sensitivierungslösung gelegt. Es folgte dreimaliges Waschen für je 5 min in H<sub>2</sub>O-Bidest und 20 min Inkubation in Silbernitratlösung. Anschließend wurde das Gel für 5-10 min in Entwicklerlösung gelegt und die Färbereaktion mittels Stopplösung abgestoppt. Im Anschluss wurde das Gel 3x 5 min in H<sub>2</sub>O-Bidest gewaschen und mittels Scanner dokumentiert.

**Tabelle 48: Puffer und Lösungen für die Silberfärbung von SDS-Gelen**

Komponente	Menge	Endkonzentration
<b>Fixierlösung</b>		
Ethanol	400 mL	40 % (v/v)
Eisessig	100 mL	10 % (v/v)
ad 1 L H <sub>2</sub> O-Bidest		
<b>Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Lösung</b>		
Natriumthiosulfat	5 g	5 % (w/v)
ad 100 mL H <sub>2</sub> O-Bidest		
<b>Sensitivierungslösung</b>		
Ethanol	30 mL	6 % (v/v)
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -Lösung	20 mL	
Natriumacetat	34 g	1,2 M
ad 500 mL H <sub>2</sub> O-Bidest		
<b>Silbernitratlösung</b>		
AgNO <sub>3</sub>	1,25 g	0,25 % (w/v)
ad 500 mL H <sub>2</sub> O-Bidest		
<b>Entwicklerlösung</b>		
Natriumcarbonat	12,5 g	2,5 % (w/v)
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -Lösung	10 µL	
37 % Formaldehydlösung	200 µL	
ad 500 mL H <sub>2</sub> O-Bidest		
<b>Stopplösung</b>		
Na <sub>2</sub> -EDTA · 2H <sub>2</sub> O	7,3 g	
ad 250 mL H <sub>2</sub> O-Bidest		

### 2.4.11 Proteinanalyse in der MS-MS

Für die Analyse von Polyacrylamidgelfragmenten und Proteinen in Lösung wurden die Proben an der Philipps Universität in Marburg mittels MS-MS analysiert.

Jeweils 75 µL des ersten oder zweiten Eluats wurden nach Dialyse und Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Proteinbestimmung nach Pierce (Kapitel 2.4.9) auf Eis verschickt. Banden aus Polyacrylamidgelen wurden ausgeschnitten und ebenfalls auf Eis verschickt.

Die aus Marburg erhaltenen MS-Daten in Excel-Form enthielt Gruppierungen zu Peptiden und eventuellen Modifikationen. Für statistische Auswertungen wurden diese, sowie deren

Untergruppen entfernt. Anschließend wurden alle als Kontamination identifizierten Proteine entfernt. Darunter fallen humane Verunreinigungen wie Keratin oder, das für den Verdau der Proteine verwendete Enzym, Trypsin. Danach wurde die Excel-Tabelle nach *Unique Peptides* sortiert und alle Proteine mit einem Wert von unter 2 *Unique Peptides* entfernt. Die daraus resultierende Excel-Tabelle wurde mit den MS-Daten der DHFR und des Leerplasmids abgeglichen und die Proteine, die in den Kontrollen vorhanden waren, ebenfalls abgezogen. Zur einfacheren Auswertung der Daten wurden die ausgewerteten Tabellen mit Hilfe der Accession-Nummern mit den HVO-Nummern für die Orientierung erweitert. Für die weitere Auswertung wurden dann drei unabhängige Proben zusammengefasst und die Proteine, die als Triplikate identifiziert werden konnten, als co-gereinigte Proteine gewertet (<https://www.uni-marburg.de/de/fb15/fachbereich/infrastruktur/servicelabors/massenspektrometrie-und-elementaranalytik/bioanalytik/hinweise-zur-dateninterpretation>).

#### **2.4.12 FPLC**

Die *fast protein liquid chromatography* (FPLC) wurde für die analytische Gelfiltration nach der Affinitätsaufreinigung verwendet. Mittels FPLC sollte ein möglicher Komplex, der in der Affinitätsaufreinigung eluiert wurde, sichtbar gemacht werden. Die FPLC erfolgte mit den Eluaten der drei Untereinheiten von aIF2: aIF2 $\alpha$ ,  $\beta$ -1,  $\beta$ -2 und  $\gamma$ . Hierfür wurde in der Aufreinigung das doppelte Volumen an Zellsuspension eingesetzt. 200  $\mu$ L des zweiten Eluates wurde direkt nach der Aufreinigung für die FPLC verwendet. Die analytische Gelfiltration erfolgte auf einer Superose® 6HR 10/30 Säule (Amersham Pharmacia Biotech; Säulenvolumen 24 mL, Ausschlusslimit  $4 \cdot 10^7$  Mr). Die Fraktionierung erfolgte in je 500  $\mu$ L Volumen bei einer Flussrate von 0,3 mL/min. Die Zusammensetzung des FPLC-Laufpuffers ist in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt. Ein Teil der Fraktionen wurden anschließend dialysiert, auf ein SDS-Gel aufgetragen und in der MS-MS analysiert.

**Tabelle 49: Laufpuffer für die FPLC**

Komponente	Menge	Endkonzentration
<b>Laufpuffer</b>		
NaCl	125 g	2,1 M
HEPES	4,77 g	20 mM
ad 1 L H <sub>2</sub> O-Bidest; pH 7,2		



### 3 Ergebnisse

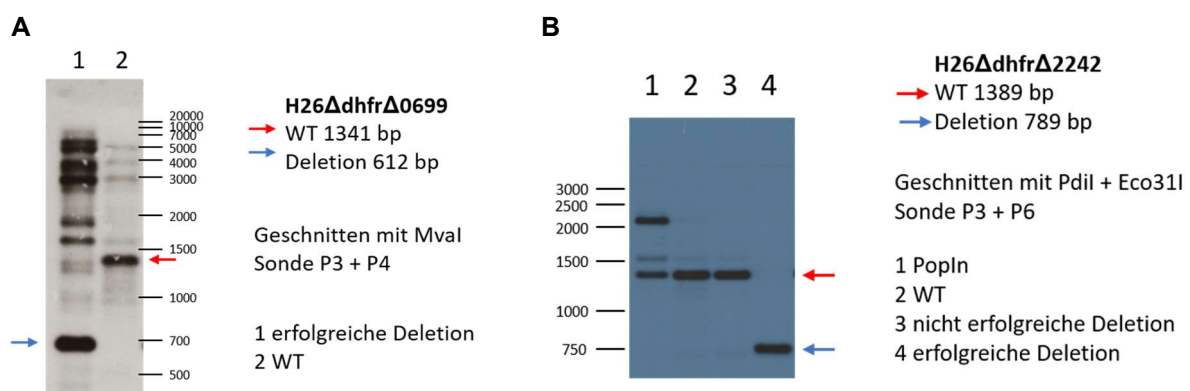
Translationsinitiationsfaktoren sind in allen drei Domänen des Lebens essenziell für die Translation. Bislang konnte für *H. volcanii* gezeigt werden, dass fünf der 14 im Genom annotierten aIFs und deren Untereinheiten sind. Die anderen neun aIFs konnten deletiert werden. Sie wurden daher als nicht essenziell eingestuft. Zur Untersuchung und vertiefenden Charakterisierung der Translationsinitiationsfaktoren wurden alle in *H. volcanii* bekannten aIFs überexprimiert, affinitätsgereinigt und mittels MS-MS analysiert.

#### 3.1 Überexpression von aIFs im Stamm H26Δ1279 und Deletionsmutanten

Zu Beginn der Arbeit erfolgte die Überprüfung von vorhandenen Deletionsmutanten über den Southern Blot. Wenn keine Deletion mehr nachgewiesen werden konnte, wurden die Mutanten im Stamm H26Δ1279 neu erstellt. Dieser Stamm wurde zudem als Wildtyp für diese Arbeit verwendet. Des Weiteren folgte die Wahl des Affinitäts-Tags für die Affinitätsaufreinigung mit Hilfe des Reportergens DHFR.

##### 3.1.1 Erstellung von aIF-Deletionsmutanten

Ein Teil der Deletionsmutanten wurden bereits von Katrin Gäbel erstellt (Gäbel *et al.*, 2013). Die vorhandenen Mutanten wurden mittels Southern Blot überprüft. Für die Überprüfung wurden die Mutanten in 30 mL Komplexmedium angezogen und für die Isolation der genomischen DNA in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet. Die genomische DNA wurde dann mit einem geeigneten Enzym verdaut und auf ein Agarosegel aufgetragen. Für die Deletionsmutante von aIF2α wurde genomische DNA mit *MvaI* verdaut. Der Southern Blot wurde mit der Sonde aus den Oligonukleotiden P3 und P4 für aIF2α (siehe auch [Kapitel 2.3.10](#)) durchgeführt ([Abbildung 13A](#)).



**Abbildung 13: Überprüfung der vorhandenen Deletionsmutanten und Generierung neuer Deletionsmutanten**  
**A.** Southern Blot als Nachweis für die vorhandene aIF2α-Deletionsmutante (blauer Pfeil, Bande Deletion) im Vergleich zum Wildtyp (roter Pfeil, Bande Wildtyp). **B.** Erstellung der neuen aIF2β2-Deletionsmutante und Überprüfung anhand eines Southern Blots. Aufgetragen wurden die PopIn-Mutante, der Wildtyp (roter Pfeil, Bande Wildtyp), die negative Deletionsmutante und die positive/erfolgreiche Deletionsmutante (blauer Pfeil, Bande Deletion).

Die Deletion von *alF1A-2*, *alF2 $\beta$ 1* und *alF2 $\beta$ 2* konnte in den vorhandenen Deletionsmutanten im Southern Blot nicht bestätigt werden. Daher wurden neue Deletionsmutanten erstellt. Dies erfolgte mit der PopIn-PopOut-Methode im Stamm H26 $\Delta$ 1279, die in [Kapitel 2.3.3](#) beschrieben wurde ([Abbildung 12](#)). Dieser Stamm wurde bereits für die vorhandenen Deletionsmutanten verwendet. Auf dem Locus HVO\_1279 codiert das Gen *hdrA* für die Dihydrofolatreduktase (HVO\_1279), das als Reportergen in *H. volcanii* verwendet wird.

Die Selektion auf PopIn- und PopOut-Medium erfolgte wie in [Kapitel 2.3.3](#) beschrieben. Zur Kontrolle der Deletionsstämme wurde ein Southern Blot durchgeführt ([Kapitel 2.3.10](#)).

In [Abbildung 13B](#) sind der Southern Blot der Deletion von *alF2 $\beta$ 2* mit PopIn, WT, sowie der erfolgreichen Deletion abgebildet. Mit den Enzymen PdiI und Eco31I wurde die genomische DNA verdaut. Die Sonde wurde mittels Oligonukleotid P3 und P6 für *alF2 $\beta$ 2* amplifiziert.

Auch *alF1A-2* und *alF2 $\beta$ 1* konnten mittels in-frame-Deletion erfolgreich deletiert werden (Daten nicht gezeigt).

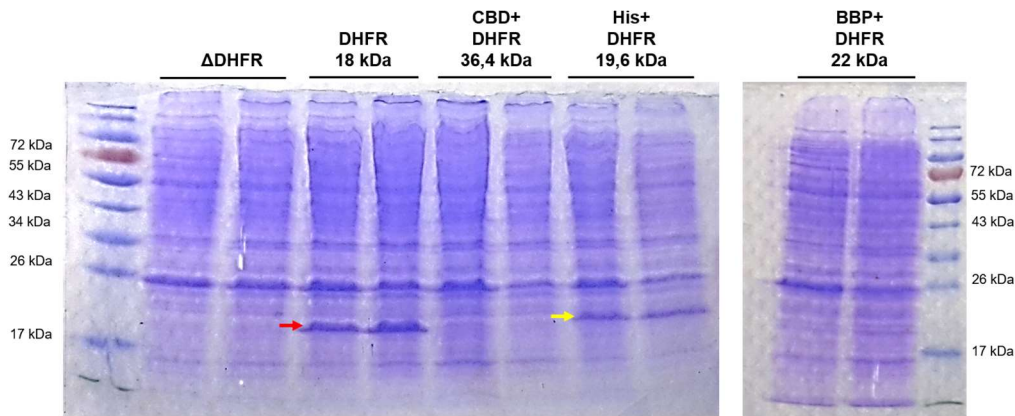
In Anlehnung an (Gäbel *et al.*, 2013) wurden die Deletionsmutanten anhand ihres Wachstums unter verschiedenen Bedingungen getestet und mit den vorhandenen Daten verglichen (Daten nicht gezeigt).

### 3.1.2 Wahl des Affinitäts-Tags für die Aufreinigung

Für die optimale Aufreinigung der Initiationsfaktoren wurden drei verschiedene Tags anhand des Reportergens DHFR getestet. Diese umfassten die Zellulosebindedomäne (CBD), Streptavidin (BBP) und ein Polyhistidin-Tag (6xHis). Sowohl der 6xHis- als auch der BBP-Tag wurde mittels Fusion von jeweils zwei Oligonukleotiden hergestellt. Die DNA-Sequenz für die CBD wurde aus dem Plasmid pWL-CBD-Hq1489 amplifiziert. Das Plasmid wurde von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Jerry Eichler (Ben-Gurion University of the Negev, Israel) zur Verfügung gestellt. Die Zellulosebindedomäne stammte aus *Clostridium thermocellum* (Morag *et al.*, 1995). Die Tags wurden jeweils N-terminal an die DHFR in den pSD1R16 kloniert und in H26 $\Delta$ 1279 transformiert. Mittels Methanol-Chloroform-Extraktion ([Kapitel 2.4.2](#)) wurden die Proteine aus je zwei exponentiellen Zellkulturen extrahiert, dialysiert und jeweils 75  $\mu$ g auf ein SDS-Gel aufgetragen ([Kapitel 2.4.5](#)).

Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die SDS-Gele mittels Coomassie gefärbt ([Abbildung 14](#)).

Als Positivkontrolle diente der Deletionsstamm H26 $\Delta$ 1279 mit dem Gen der DHFR im pSD1R16 ohne jeweiligen Affinitäts-Tag. Bei der Positivkontrolle und der Variante mit 6xHis-Tag wurde im Vergleich zum Deletionsstamm eine zusätzliche Bande nachgewiesen.

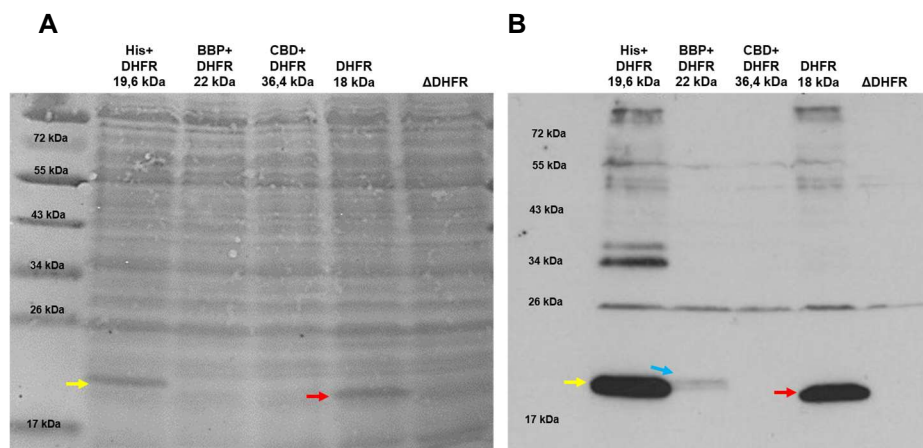


**Abbildung 14: Testung von CBD, BBP und 6xHis-Tag anhand der DHFR (HVO\_1279)**

Auf einem 12 % SDS-Polyacrylamidgel wurden je 75 µg Proteinextrakt aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Coomassie gefärbt. Aus den Proteinextrakten konnte eine Bande entsprechender Größe für die Überexpression der DHFR ohne Tag (roter Pfeil) sowie für die Variante mit 6xHis-Tag (gelber Pfeil) nachgewiesen werden. Für den Tag mit der CBD und den Tag mit der BBP konnte keine Bande mit entsprechender Größe detektiert werden.

Zur weiteren Untersuchung wurde ein Western Blot mit einem Antikörper gegen die DHFR durchgeführt (Abbildung 15).

Im Western blot wurde die DHFR für die Positivkontrolle und 6xHis-DHFR nachgewiesen. Auch bei der DHFR mit dem BBP-Tag konnte die DHFR nachgewiesen werden, wenn auch in einer geringeren Menge. Für die Kombination DHFR mit dem CBD-Tag konnte kein Protein mit entsprechender Größe mittels Western Blot detektiert werden. Da sich der 6xHis-Tag als der am effizienteste der drei Protein-Tags erwies, wurde er für alle Aufreinigungen in dieser Arbeit verwendet.

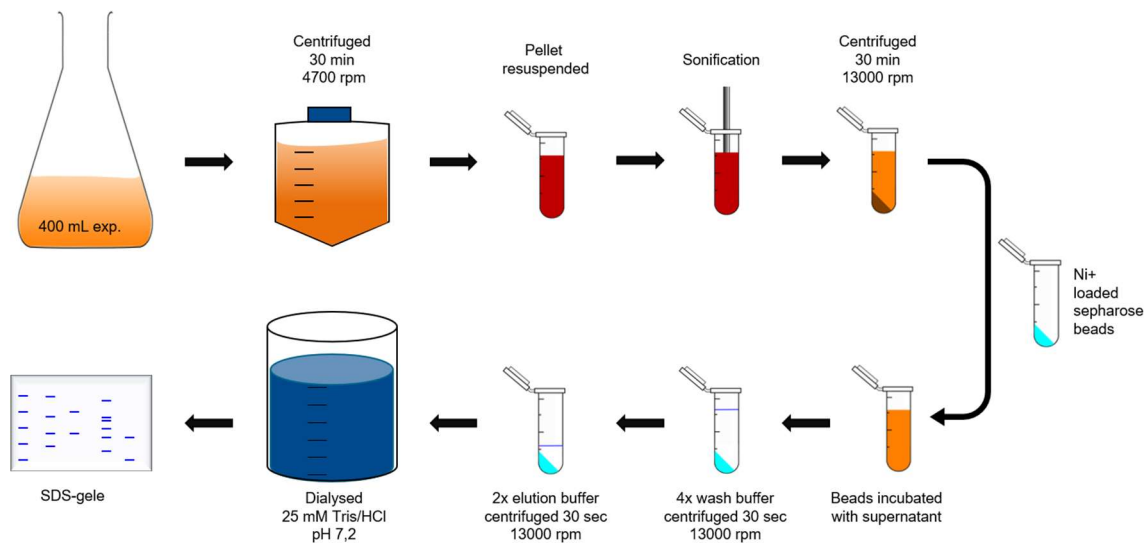


**Abbildung 15: Western Blot mittels Antikörper gegen die DHFR (HVO\_1279)**

**A.** Bereits auf der geblotteten Membran konnte die His-getaggte DHFR (gelber Pfeil), als auch die nicht-getaggte Variante (roter Pfeil) visualisiert werden. **B.** Sowohl für His-DHFR (gelber Pfeil), als auch für BBP-DHFR (blauer Pfeil) konnten im Western Blot die Fusionsproteine nachgewiesen werden. Als Kontrolle diente die DHFR (roter Pfeil) ohne Tag.

### 3.1.3 Etablierung der Co-Affinitätsaufreinigung

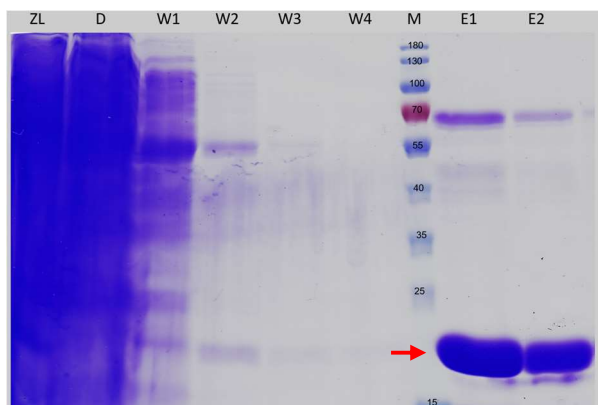
Da die Überexpression mit N-terminalem 6xHis-Tag erfolgreich war, wurde die Aufreinigung über Sepharose-Beads in einem pull-down-Assay etabliert (Abbildung 16).



**Abbildung 16: Schema für die Affinitätsaufreinigung über einen pull-down-Assay**

Die Zellen wurden geerntet und abzentrifugiert. Das Pellet wurde in Bindepuffer resuspendiert, mittels Ultraschallsonde aufgeschlossen und die Zelltrümmer pelletiert. Der Überstand wurde auf Nickel-beladene Sepharose-Beads pipettiert. Anschließend folgten vier Waschschrte sowie zwei Elutionsschritte. Da die Aufreinigungen nativ stattfanden, wurden die Eluate dialysiert.

Hierfür wurden 400 mL Zellkultur im exponentiellen Wachstumsstadium, wie in Kapitel 2.4.3 beschrieben, geerntet und abzentrifugiert. Da die Aufreinigungen unter nativen Bedingungen stattfanden, wurden die gesammelten Proben gegen 25 mM Tris/HCl pH 7,2 dialysiert und auf ein SDS-Gel aufgetragen. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die SDS-Gele mittels Coomassie gefärbt. In Abbildung 17 ist die erfolgreiche Affinitätsaufreinigung der DHFR (20 kDa) dargestellt.



**Abbildung 17: Affinitätsaufreinigung der DHFR aus exponentieller Kultur**

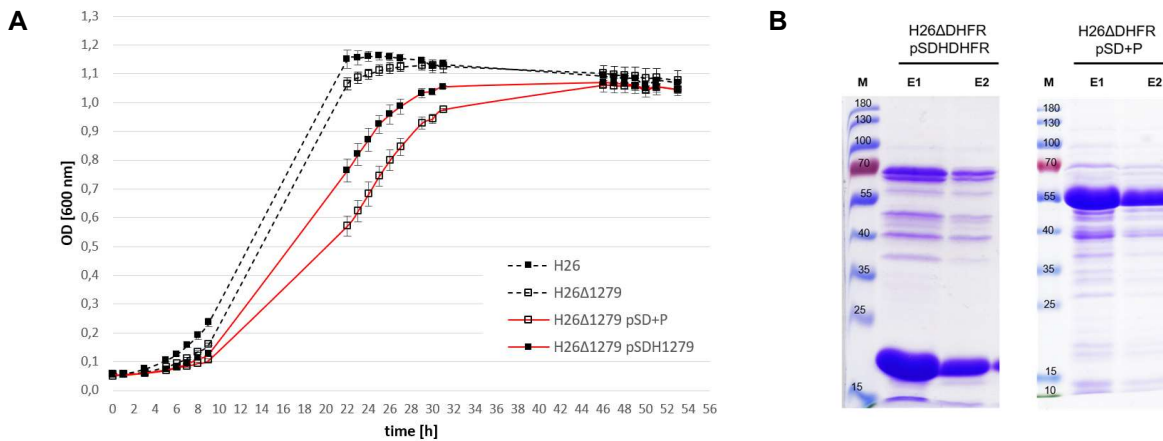
Die verschiedenen Teilschritte der Affinitätsaufreinigung wurden gesammelt und gegen 0,25 mM Tris/HCl pH 7,2 dialysiert. Auf einem 12 % SDS-Gel wurde von links nach rechts das Zelllysate (ZL), der Durchlauf (D), die Waschschrte (W1-W4) und die Elutionsfraktionen (E1-E2) aufgetragen. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurde das SDS-Gel mit Coomassie gefärbt. Die DHFR liegt bei 20 kDa (roter Pfeil).

Die Probe des Zelllysats (ZL) wurde direkt vor dem Auftragen des Zelllysats auf die Sepharose-Beads abgenommen. Der Durchlauf (D) beschreibt das Zelllysate nach dem es von den beladenen Sepharose-Beads wieder abgenommen wurde. Die vier Waschschrte (W1-W4), und die Elutionsfraktionen (E1-E2) wurden jeweils nach dem Waschen bzw. der Elution

abgenommen. Bei der Affinitätsaufreinigung konnte ein hoher Reinigungseffekt erzielt werden. Neben der DHFR konnten nur wenige zusätzliche Banden auf dem Gel nachgewiesen werden.

Für die weitere Charakterisierung wurden Wachstumsversuche in Komplexmedium durchgeführt. Um die Auswirkungen des Novobiocin und der Überexpression besser einschätzen zu können wurde als Kontrolle in der Deletionsmutante ein Leerplasmid (pSD+P) mitgeführt. Dieses repräsentiert den pSD1R16 jedoch ohne funktionales Gen. In Abbildung 18A sind im Vergleich der Stamm H26Δ1279 mit pSD+P und die Überexpression der DHFR im Stamm H26Δ1279 dargestellt. Wobei letztere im Vergleich ein besseres Wachstumsverhalten zeigt.

Die erfolgreiche Aufreinigung der His-getaggtgen DHFR mit einer Größe von 19,6 kDa ist in Abbildung 18B gezeigt. Sowohl die Überexpressionsmutante der DHFR (H26Δ1279 mit pSDH1279) als auch die Deletionsmutante mit dem Leerplasmid (H26Δ1279 mit pSDH1279) wurden in der MS analysiert (siehe nächstes Kapitel).



**Abbildung 18: Überexpression der DHFR (HVO\_1279) und des Leerplasmids (pSD+P)**

**A.** Die Überexpressionsmutante wurde unter optimalen Bedingungen bei 42 °C in Komplexmedium mit dem Wildtyp und der Deletionsmutante verglichen. Als weitere Kontrolle diente das Leerplasmid im Deletionsstamm. **B.** Eluat eins und zwei der 6xHis-DHFR (pSDH1279) und der Kontrolle des Leerplasmids pSD+P im Deletionsstamm H26Δ1279 aus der Affinitätsaufreinigung. Nach der Dialyse auf ein 12 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und anschließend Coomassie gefärbt.

### 3.1.4 Etablierung der Identifizierung von Proteinen durch *Peptide mass fingerprinting*

Für die Überprüfung der erfolgreichen Aufreinigung und den Ausschluss von unspezifischen, gebundenen Proteinen wurden die Überexpressionsmutante der 6xHis-DHFR und des Leerplasmides in H26Δ1279 herangezogen. Beide dienen in ihrer Funktion als Negativkontrollen für die weiteren Analysen. Mit der 6xHis-DHFR wurden spezifische Proteine, die durch die Überexpression hoch reguliert wurden und an das Säulenmaterial binden, ausgeschlossen. Um spezifisch bindende Proteine, die selbst Polyhistidine enthalten und die an das Säulenmaterial binden, ausschließen zu können, wurde sowohl die 6xHis-DHFR, als auch der pSD+P verwendet. Der pSD+P diente auch zusätzlich als Kontrolle für die Wachstumsversuche und die Antibiotikaresistenz. Dieses Leerplasmid entspricht dem Überexpressionsplasmid pSD1R16 mit der Ausnahme, dass es kein zu überexprimierendes Gen enthält.

Zur MS-Analyse wurden die Proben versendet. Die Ergebnisse der Analyse wurden in Form einer Excel-Tabelle mit allen Hits erhalten. Zur Auswertung wurde sich an den *peptide-spectrum-matches* (PSM) orientiert und nur Peptide mit mindestens zwei und mehr *Unique Peptides* für die Auswertung verwendet. Des Weiteren wurden die als Kontamination identifizierten Proteine aus der Liste entfernt.

Für das in H26Δ1279 pSD+P ergaben sich nach der Auswertung der Daten, sieben identifizierte Proteine (Tabelle 50), darunter auch *cdc48d* (*AAA-type ATPase core domain protein* bzw. *ArNOG05511 family protein*, HVO\_1907).

**Tabelle 50: MS-Analyse des pSD+P (n=3)**

Gene ID	Accession	Description	MW [kDa]
HVO_0359	D4GZY6	Elongation factor 1-alpha	45,7
HVO_0454	D4GRZ5	Alanine dehydrogenase	35,6
HVO_1577	L9VF61	TR	19,4
HVO_1907	D4GTE0	ArNOG05511 family protein	53,4
HVO_2384	L9V766	Uncharacterized protein	42,5
HVO_2663	D4GV33	Putative oxidoreductase (Aldo-keto reductase family protein)	32,5
HVO_2783	L9V7N1	30S rpS4	20,1

Für die Überexpression der DHFR ergaben sich nach der Auswertung 30 identifizierte Proteine, die in allen drei Aufreinigungen in der MS-Analyse identifiziert wurden (Tabelle 51).

**Tabelle 51: MS-Analyse der DHFR (n=3)**

Gene ID	Accession	Description	MW [kDa]
<b>HVO_1279</b>	<b>L9UT07</b>	<b>Dihydrofolate reductase</b>	<b>18</b>
HVO_0019	D4GYL4	Putative S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase	25,6
HVO_0133	O30561	Thermosome subunit 1	58,9
HVO_0359	D4GZY6	Elongation factor 1-alpha	45,7
HVO_0536	D4GS68	Ferritin	19,9
HVO_0831	D4GUG7	YgfD family GTPase	39,6
HVO_1572	D4GZ01	DNA gyrase subunit B	71,2
HVO_1575	D4GZ04	Arginase	31
HVO_1576	L9VEX5	UDP-glucose 4-epimerase	33,9
HVO_1758	L9VDG7	Thioredoxin reductase	36,3
HVO_1871	D4GSX4	Heme-binding protein HemQ	56,1
HVO_1907	D4GTE0	AAA-type ATPase core domain protein	53,4
HVO_1950	D4GTH9	Uncharacterized protein	18,6
HVO_2040	D4GU54	GalE family epimerase/dehydratase	33,8
HVO_2297	D4GWW0	Deoxyhypusine synthase	38,6
HVO_2381	D4GWM9	UPF0272 protein HVO_2381	52,3
HVO_2514	L9V6R5	ArsR family TR	24,1
HVO_2536	D4GTW8	TIGR00300 family protein	44,8
HVO_2542	L9V7W8	50S rpL15	17,8
HVO_2645	D4GUY1	Molybdopterin adenylyltransferase	20,7
HVO_2663	D4GV33	Putative oxidoreductase (Aldo-keto reductase family protein)	32,5
HVO_2979	L9UI09	Cobalamin synthesis protein/P47K	46,8
HVO_A0388	L9V129	Transcriptional regulator, AsnC family protein	20,1
HVO_A0418	D4GQE6	HTH domain protein	17,9
HVO_A0487	D4GRF0	Cobyrinate a,c-diamide synthase	46,9
HVO_B0053	D4GP55	DUF3209 family protein	13,9
HVO_B0054	D4GP56	Sirohydrochlorin cobaltochelatase	44,1
HVO_B0071	O34179	Dehydrogenase	41,4
HVO_B0115	L9VKB0	Fumarylacetoacetate hydrolase domain containing 2A	30,3
HVO_B0151	D4GPF2	Putative nickel-responsive regulator	16,1

Darunter waren vor allem Proteine, die in ihrer Aminosäuresequenz Poly-Histidin aufwiesen, wie z.B. HemQ (pitA, HVO\_1871) und cdc48d. Die Co-Reinigung der beiden Proteine wurde bereits im Jahr 2010 von Allers und 2012 von Stroud beschrieben (Allers *et al.*, 2010; Stroud, Liddell and Allers, 2012).

Es wurden in den MS-Daten viele Proteine des Zentralstoffwechsels und des Zellstoffwechsels identifiziert. Sie werden in dieser Arbeit nicht diskutiert, da nicht klar ist, ob sie die Translation beeinflussen. Sie konnten damit in dieser Arbeit nicht definiert werden. Ein Beispiel hierfür ist die Moonlight Enolase, die im Zentralstoffwechsel und dem DNA-Turnover beteiligt ist (Jia, Cheong and Zhang, 2013; Jeffery, 2016).

Die ausgewerteten MS-Daten der DHFR und des Leerplasmids wurden als Grundlage für den Ausschluss mitgereinigter Proteine verwendet und als Kontrolle von allen weiteren MS-Daten abgezogen.

### 3.1.5 Erstellung der Überexpressionsmutanten

Für die essenziell eingestuft Initiationfaktoren aIF1, aIF2 $\gamma$ , aIF5A, aIF5B und aIF6 fand die Überexpression im Stamm H26 $\Delta$ dhfr statt. Deshalb wurde er als Wildtyp bezeichnet. Für die nicht essenziell eingestuft aIFs, mit Ausnahme von aIF2B $\delta$ -1, erfolgte die Überexpression in der entsprechenden Deletionsmutante. Dieser Faktor wurde auch im Wildtyp überexprimiert.

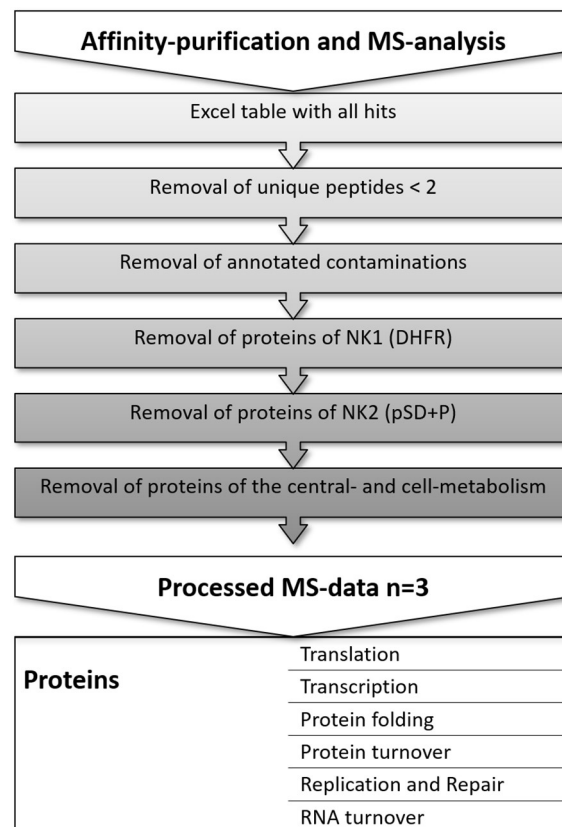
In [Tabelle 52](#) sind die Initiationfaktoren und deren Untereinheiten mit Genname, verwendetem Stamm für die Überexpression, die Protein-ID (Accession) von UniProt sowie das Molekulargewicht aufgelistet. Alle 14 annotierten Faktoren wurden mit einem N-terminalen His-Tag in das Plasmid pSD1R16 kloniert, das den konstitutiven fdx-Promotor enthält. Alle Überexpressionsmutanten wurden jeweils in dreifach-Bestimmung in der exponentiellen Wachstumsphase aufgereinigt.

**Tabelle 52: Überexpression der einzelnen Initiationfaktoren in der Deletion oder im Wildtyp**

Gene	Gene ID	Strain	Accession	MW [kDa]
<i>dhfr</i>	HVO_1279	H26 $\Delta$ 1279	L9UT07	18,0
<i>aIF1</i>	HVO_1946	H26 $\Delta$ 1279	D4GTH5	11,0
<i>aIF1A-1</i>	HVO_0136	H26 $\Delta$ 1279 $\Delta$ 0136	D4GZ79	11,5
<i>aIF1A-2</i>	HVO_A0637	H26 $\Delta$ 1279 $\Delta$ A0637	D4GRU5	11,2
<i>aIF2<math>\alpha</math></i>	HVO_0699	H26 $\Delta$ 1279 $\Delta$ 0699	D4GT46	29,5
<i>aIF2<math>\beta</math>-1</i>	HVO_1678	H26 $\Delta$ 1279 $\Delta$ 1678	D4GZP2	15,0
<i>aIF2<math>\beta</math>-2</i>	HVO_2242	H26 $\Delta$ 1279 $\Delta$ 2242	D4GVV8	22,2
<i>aIF2<math>\gamma</math></i>	HVO_1901	H26 $\Delta$ 1279	D4GTD4	44,0
<i>aIF2B<math>\alpha</math></i>	HVO_1934	H26 $\Delta$ 1279 $\Delta$ 1934	D4GTG3	43,2
<i>aIF2B<math>\delta</math>-1</i>	HVO_0966	H26 $\Delta$ 1279	L9USK7	35,0
<i>aIF2B<math>\delta</math>-2</i>	HVO_2706	H26 $\Delta$ 1279 $\Delta$ 2706	D4GW08	30,8
<i>eIF4A-homolog</i>	HVO_1333	H26 $\Delta$ 1279 $\Delta$ 1333	D4GXX1	104,5
<i>aIF5A</i>	HVO_2300	H26 $\Delta$ 1279	D4GWG6	14,2
<i>aIF5B</i>	HVO_1963	H26 $\Delta$ 1279	D4GTJ2	65,4
<i>aIF6</i>	HVO_0117	H26 $\Delta$ 1279	D4GYW3	23,0

### 3.2 Co-Affinitätsaufreinigung und MS-Analyse

Mittels 6xHis-DHFR wurde die Affinitätsaufreinigung und die MS-Analyse für *H. volcanii* in dieser Arbeit etabliert. Die Methode wurde dann für die Untersuchung der Translationsinitiationsfaktoren übernommen. Die Faktoren wurden in dreifach-Bestimmung affinitätsgereinigt, die Elutionsfraktionen zur MS-Analyse geschickt und die erhaltenen Daten, wie in [Abbildung 19](#) beschrieben, ausgewertet. Entsprechend dieses Schemas wurde für alle MS-Daten des Netzwerks vorgegangen.



**Abbildung 19: Auswertung der MS-Daten**

Vorgehensweise für alle MS-Daten zur Erstellung der Netzwerke.

Die nach der Auswertung übrig gebliebenen Proteine konnten der Translation, Transkription, Proteinfaltung, dem RNA- und Protein-Turnover sowie der DNA-Replikation und -Reparatur zugeordnet werden.

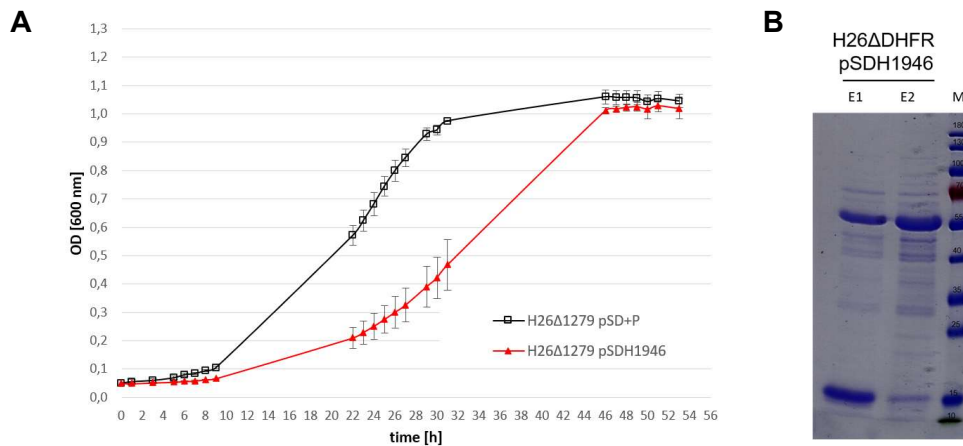
#### 3.2.1 aIF1

Der Translationsinitiationsfaktor aIF1 ist ein essenzieller Initiationsfaktor, der in allen drei Domänen des Lebens vertreten ist (Hasenöhrl *et al.*, 2009). In *H. volcanii* liegt er auf dem Hauptchromosom mit Locus HVO\_1946. Das Gen umfasst 294 nt und das Protein ist ca. 11 kDa schwer. Der Faktor aIF1 wird auch als „*protein translation factor SUI1 homolog*“ bezeichnet.

Da aIF1 in *H. volcanii* als essenziell eingestuft wurde (Gäbel *et al.*, 2013), erfolgte die Überexpression im Wildtyp H26Δ1279 mit dem Plasmid pSDH1946. Die Wachstumsversuche bei



42 °C in Komplexmedium zeigten ein sehr viel schlechteres Wachstum der Überexpressionsmutante im Vergleich zur Kontrolle H26Δ1279 mit dem Leerplasmid (Abbildung 20A).



**Abbildung 20: Charakterisierung des essenziellen aIF1 (HVO\_1946)**

**A.** Vergleich des Wachstums der Überexpression von aIF1 in H26Δ1279 mit pSDH1946 mit der Kontrolle (H26Δ1279 pSD+P) unter optimalen Wachstumsbedingungen bei 42 °C in Komplexmedium. **B.** Affinitätsaufreinigung von aIF1 auf einem 12 % SDS-Gel, Coomassie-gefärbt mit Eluat 1-2. aIF1 befindet sich bei 11 kDa.

Der Faktor aIF1 wurde dreimal mittels pull-down-Assay aufgereinigt, die Proben dialysiert und auf einem SDS-Polyacrylamid mittels Coomassie-Färbung visualisiert (Abbildung 20B). Bereits auf dem Gel konnten in den Elutionsfraktionen viele mitgereinigte Proteine nachgewiesen werden. Die Elutionsfraktionen wurden anschließend zur MS-Analyse geschickt und die erhaltenen Daten wie im Kapitel zuvor beschrieben aufbereitet (Tabelle 53).

Mit dem aIF1 konnten drei weitere aIFs mitgereinigt werden: aIF1A-2, aIF2Bδ-1 und aIF5B. Des Weiteren konnten sieben ribosomale Proteine der 30S Untereinheit und zehn ribosomale Proteine der 50S Untereinheit zugeordnet werden. Unerwarteterweise konnten sechs Untereinheiten der RNA-Polymerase, sowie 20 Transkriptionsregulatoren und drei Translationselongationsfaktoren identifiziert werden.

**Tabelle 53: Einteilung der mitgereinigten Proteine von aIF1 (n=3)**

Group	Specification	Description	Genloci	Accession
Translation	aIFs	<b>aIF1</b>	<b>HVO_1946</b>	<b>D4GTH5</b>
		aIF1A-2	HVO_A0637	D4GRU5
		aIF2Bδ-1	HVO_0966	L9USK7
		aIF5B	HVO_1963	D4GTJ2
	aEFs	aEF1α	HVO_2413	L9V6J4
		aEF1α-like protein	HVO_2575	L9V605
		aEF2	HVO_0356	L9UK07
	30S rpS	30S rpS3	HVO_2558	D4GTZ0
		30S rpS4e	HVO_2552	L9V7Y2
		30S rpS7	HVO_0354	L9UJR0
30S rpS10		HVO_0360	L9ULL7	
30S rpS13		HVO_2784	L9V5M6	
30S rpS19P		HVO_2560	L9V659	
30S rpS24e		HVO_1896	D4GTC9	
50S rpL	50S rpL1	HVO_2757	P41199	

		50S rpL2	HVO_2561	D4GTZ3
		50S rpL3	HVO_2564	L9V5K9
		50S rpL4	HVO_2563	D4GTZ5
		50S rpL10	HVO_2756	P41198
		50S rpL13	HVO_2778	D4GWY1
		50S rpL18e	HVO_2779	D4GWY3
		50S rpL22	HVO_2559	L9V5K3
		50S rpL30	HVO_2543	L9V5X1
		50S rpL32e	HVO_2547	D4GTX9
	transferase	tRNA(Met) cytidine acetyltransferase TmcA	HVO_2736	D4GW73
<b>Transcription</b>	RNAP-subunits	rpoA1	HVO_0349	D4GZX6
		rpoA2	HVO_0350	D4GZX7
		rpoB1	HVO_0348	L9UJM2
		rpoB2	HVO_0347	L9UK99
		rpoD	HVO_2781	L9V5W2
		rpoL	HVO_1042	D4GVL8
		regulator	HTH domain protein	HVO_A0135
	HTH domain protein		HVO_1133	D4GW85
	HTH domain protein		HVO_1695	D4H040
	HTH-10 family transcription regulator		HVO_A0121	D4GQF3
	HTH-type transcriptional regulator GlpR		HVO_1501	D4GYE7
	IclR family transcription regulator		HVO_B0114	D4GPB5
	IclR family transcription regulator		HVO_A0583	D4GRP3
	IclR family transcription regulator		HVO_2108	D4GUQ5
	Lrp/AsnC family transcription regulator		HVO_B0066	D4GP68
	Lrp/AsnC family transcription regulator		HVO_1792	D4GSB6
	PadR family transcription regulator		HVO_2869	D4GXH6
	RNA-binding protein Lsm		HVO_2723	D4GW47
	SirR/DtxR family transcription regulator SirR		HVO_0819	D4GUE2
	TATA-box-binding protein		HVO_1727	L9VGC6
	TetR family transcription regulator		HVO_2067	D4GU80
	TetR family transcriptional regulator		HVO_A0161	L9V4Z6
	Transcriptional regulator	HVO_0163	L9UFW5	
Transcriptional regulator	HVO_0179	L9UGU5		
Transcriptional regulator	HVO_2928	L9UK32		
Transcriptional regulator	HVO_0568	L9UN99		
TrmB family transcription regulator	HVO_1360	D4GXQ1		
factor	Transcription factor E	HVO_1174	L9UT88	
<b>Protein folding</b>	chaperone	Chaperone protein DnaK	HVO_1590	L9VEI0
	release factor	Peptide chain release factor subunit 1	HVO_0321	D4GZV0
<b>Protein turnover</b>	peptidase	Peptidase S9 family protein	HVO_0829	D4GUG3
	thermosome	Thermosome subunit 2	HVO_0455	O30560
		Thermosome subunit 3	HVO_0778	Q9HHA2
<b>Replication and Repair</b>	repair	DNA double-strand break repair protein Mre11	HVO_0853	D4GUK0
		DNA double-strand break repair Rad50 ATPase	HVO_0854	D4GUK1
		DNA mismatch repair protein MutL	HVO_0551	L9UMB1
		DNA mismatch repair protein MutS	HVO_0552	D4GSE9
		DNA repair and recombination protein RadA	HVO_0104	Q48328
		DNA repair and recombination protein RadB	HVO_2383	L9V6G6
		Putative DNA helicase Rad25	HVO_1723	L9VE99
	replication	DNA gyrase subunit A	HVO_1573	D4GZ02

		DNA polymerase B1	HVO_0858	L9US19
		Orc1-type DNA replication protein	HVO_1537	D4GY11
		ORC1-type DNA replication protein	HVO_0194	L9UGW2
		Origin-associated GTP-binding protein	HVO_3014	D4GYC9
		Type 2 DNA topoisomerase 6 subunit A	HVO_1570	L9VEU6
RNA turnover	ribonuclease	Ribonuclease J	HVO_2724	L9V5P6
		Ribonuclease P protein component 3	HVO_1094	D4GW15
		Ribonuclease R	HVO_0388	L9UJ19
		Ribonuclease Z	HVO_0144	L9UHJ9

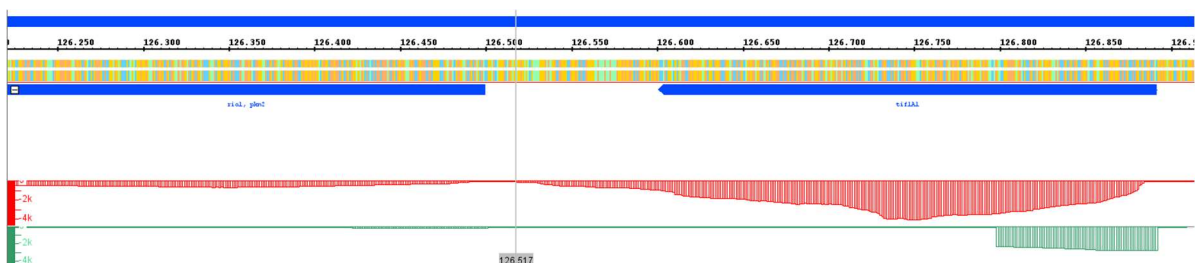
### 3.2.2 aIF1A-1 und aIF1A-2

Der Translationsinitiationsfaktor aIF1A ist in allen drei Domänen des Lebens vertreten und umfasst in *H. volcanii* zwei orthologe Gene: *aIF1A-1* (HVO\_0136) und *aIF1A-2* (HVO\_A0637). Diese konnten unabhängig voneinander einzeln deletiert werden, allerdings nicht gleichzeitig. Sie wurden daher gemeinsam als essenzielle Translationsinitiationsfaktoren eingestuft (Gäbel *et al.*, 2013).

#### 3.2.2.1 *aIF1A-1*

Das Gen des Faktor aIF1A-1 (HVO\_0136) ist 291 nt lang und das Molekulargewicht des Proteins beträgt 11,5 kDa. Da aIF1A-1 deletiert werden konnte, fand die Überexpression in H26Δ1279Δ0136 statt. Das Protein *aIF1A-1* konnte zu Beginn nicht im Western Blot nach der Proteinextraktion nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Nach Überprüfung des Gens in den DNA- und RNA-Seq-Daten deutete alles auf eine mögliche 3'-UTR *downstream* bzw. ein verlängertes Transkript des *aIF1A-1* hin. Die DNA- und RNA-Seq-Daten in [Abbildung 21](#) zeigen *aIF1A-1* (HVO\_0136) bzw. *tif1A1*, das Nachbarn *rio1* auf dem Hauptchromosom. In blau sind die Gene, das Transkriptionslevel in rot und der Transkriptionsstart in grün dargestellt. Anhand des Transkriptionslevels wurde eine 3'-UTR von 83 nt festgelegt, welche mit dem Gen *aIF1A-1* für die Klonierung mitamplifiziert und für die Erstellung des Konstruktes pSDH0136-3'-UTR verwendet wurde.

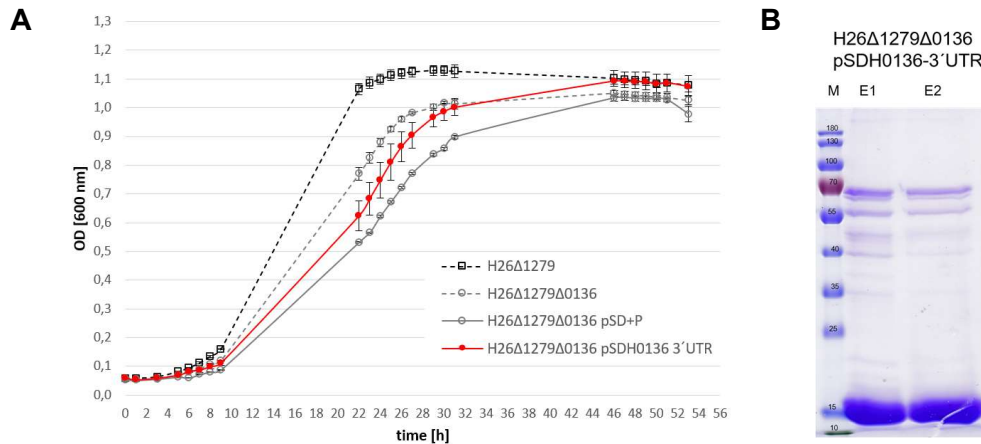


**Abbildung 21: DNA- und RNA-Seq-Daten des *aIF1A-1* (HVO\_0136)**

*aIF1A-1* bzw. *tif1A1* und das Nachbarn *rio1* in blau, das Transkriptionslevel in rot und der Transkriptionsstart in grün auf dem Hauptchromosom. Anhand des Transkriptionslevel wurde eine 3'-UTR von 83 Nukleotiden mit dem Gen *aIF1A-1* für die Klonierung verwendet.

Die Überexpression des Gens mit der 3'-UTR wurde im Deletionsstamm H26Δ1279Δ0136 mit dem Plasmid pSDH0136-3'-UTR durchgeführt. Es wurden Wachstumskurven unter optimalen Bedingungen bei 42 °C in Komplexmedium erstellt (Abbildung 22A).

Der Deletionsstamm wuchs im Vergleich schlechter als der Wildtyp H26Δ1279. Die Deletionsmutante mit der Überexpression des aIF1A-1 mit 3'-UTR wuchs im Vergleich besser als die Deletionsmutante mit dem Leerplasmid.



**Abbildung 22: Charakterisierung des aIF1A-1 (HVO\_0136) ohne und mit nativer 3'-UTR**

**A.** Im Vergleich das Wachstum der Überexpression von aIF1A-1 mit 3'-UTR (pSDH0136-3'-UTR) mit der Kontrolle H26Δ1279Δ0136 mit pSD+P, der Deletionsmutante (H26Δ1279Δ0136) und dem Wildtyp (H26Δ1279). **B.** Die beiden Elutionsfraktionen der Affinitätsaufreinigung auf einem 12 % SDS-Polyacrylamidgel Coomassie-gefärbt. Bei 11,5 kDa ist aIF1A-1 zu sehen.

Durch das verlängerte Gen bzw. die 3'-UTR konnte aIF1A-1 überproduziert werden (Abbildung 22B). Dies spricht für eine große Bedeutung der 3'-UTR.

Die Elutionsfraktionen von drei Affinitätsaufreinigungen wurden zur Identifizierung der Proteine zur MS-Analyse geschickt. Nach der bereits beschriebenen Auswertung konnten mit aIF1A-1 Proteine der Translation, Transkription, Replikation und Repair sowie dem DNA- und RNA-turnover co-gereinigt werden.

Zur Translation gehörten unter anderem die zwei Translationsinitiationsfaktoren aIF2Bδ-1 und aIF5B. Ferner konnten ein 30S ribosomales Protein, vier 40S ribosomale Proteine, eine RNA-Polymerase-Untereinheit, zwei Translationselongationsfaktoren und fünf Transkriptionsregulatoren mitgereinigt werden (Tabelle 54).

**Tabelle 54: Einteilung der mitgereinigten Proteine von aIF1A-1 (n=3)**

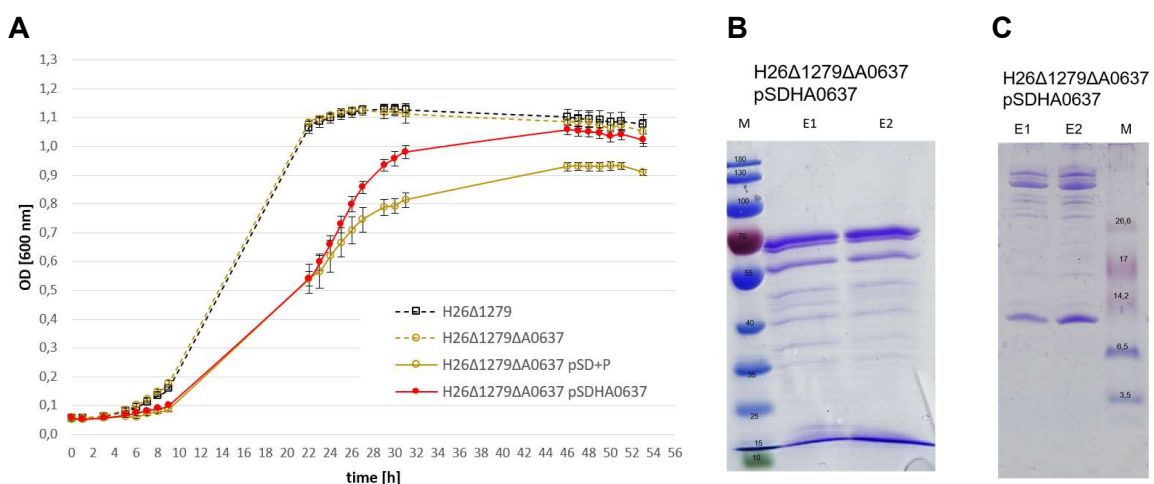
Group	Specification	Description	Genloci	Accession
Translation	aIFs	<b>aIF1A-1</b>	<b>HVO_0136</b>	<b>D4GZ79</b>
		aIF2Bδ-1	HVO_0966	L9USK7
		aIF5B	HVO_1963	D4GTJ2
aEFs		aEF1α	HVO_2413	L9V6J4
		aEF2	HVO_0356	L9UK07
30S rpS		30S rpS19P	HVO_2560	L9V659
50S rpL		50S rpL2	HVO_2561	D4GTZ3
		50S rpL4	HVO_2563	D4GTZ5

		50S rpL24	HVO_2553	L9V5Y5
		50S rpL30	HVO_2543	L9V5X1
<b>Transcription</b>	RNAP-subunits	rpoA1	HVO_0349	D4GZX6
	regulator	AsnC family transcriptional regulator	HVO_2029	L9VBJ7
		HTH domain protein	HVO_1133	D4GW85
		HTH domain protein	HVO_1695	D4H040
		IclR family transcription regulator	HVO_2108	D4GUQ5
		Transcriptional regulator	HVO_2928	L9UK32
<b>Replication and Repair</b>	repair	DNA repair and recombination protein RadB	HVO_2383	L9V6G6
<b>RNA turnover</b>	ribonuclease	Ribonuclease J	HVO_2724	L9V5P6
<b>Protein turnover</b>	thermosome	Thermosome subunit 2	HVO_0455	O30560

### 3.2.2.2 *alF1A-2*

Bei *alF1A-2* hat das Gen (HVO\_A0637) eine Länge von 285 nt und das Protein ist 11,2 kDa schwer. Da das Gen deletiert werden konnte, wurde die Überexpression im Deletionsstamm H26Δ1279ΔA0637 mit dem Plasmid pSDHA0637 durchgeführt.

In den Wachstumsversuchen verhielt sich die Deletionsmutante von *alF1A-2* unter optimalen Bedingungen bei 42 °C in Komplexmedium wie der Wildtyp. Die Deletionsmutante mit Leerplasmid und die Deletionsmutante mit Überexpression verhielten sich im Wachstum zu Beginn ähnlich, jedoch zeigte die Überexpression in der spätexponentiellen Phase ab 24 h ein besseres Wachstum (Abbildung 23A). Da *alF1A-2* sich aufgrund seiner Größe auf einem 12 % SDS-Polyacrylamidgel nicht visualisieren ließ, wurde zusätzlich ein Tricin-Gel erstellt (Abbildung 23B-C). Auf beiden Gelvarianten ließen sich mehrere mitgereinigte Proteine nachweisen. Jeweils von drei Aufreinigungen wurden die Elutionsfraktionen für die Identifizierung der Proteine zur MS geschickt.



**Abbildung 23: Charakterisierung des *alF1A-2* (HVO\_A0637)**

**A.** Wachstumsversuch bei 42 °C in Komplexmedium. Die Deletionsmutante (H26Δ1279Δ0637) wuchs wie der Wildtyp (H26Δ1279). Im Vergleich dazu wuchs die Überexpressionsmutante (pSDHA0637) ab der spätexponentiellen Phase besser als die Kontrolle mit dem Leerplasmid (ΔA0637 pSD+P). **B.-C.** Die Elutionsschritte (E1, E2) der Überexpression von *alF1A-2* (11,2 kDa) nach der Affinitätsaufreinigung auf einem 12 % SDS-Polyacrylamidgel (B) und einem Tricin-Gel (C), jeweils Coomassie-gefärbt.

Nach der Aufbereitung der Daten konnten neun Proteine zugeordnet werden. Darunter zwei weitere aIFs, aIF2B $\delta$ -1 und aIF5B, wie bereits bei aIF1A-1. Des Weiteren wurde ein Translationselongationsfaktor sowie vier Transkriptionsregulatoren mitgereinigt (Tabelle 55).

**Tabelle 55: Einteilung der mitgereinigten Proteine von aIF1A-2 (n=3)**

Group	Specification	Description	Genloci	Accession
Translation	aIFs	aIF1A-2	HVO_A0637	D4GRU5
		aIF2B $\delta$ -1	HVO_0966	L9USK7
		aIF5B	HVO_1963	D4GTJ2
	aEFs	aEF1 $\alpha$	HVO_2413	L9V6J4
Transcription	regulator	lclR family transcription regulator	HVO_2108	D4GUQ5
		Lrp/AsnC family transcription regulator	HVO_1792	D4GSB6
		Transcriptional regulator	HVO_0163	L9UFW5
		Transcriptional regulator	HVO_2928	L9UK32
RNA turnover	ribonuclease	Ribonuclease Z	HVO_0144	L9UHH9

### 3.2.3 aIF2 – der trimere Initiationsfaktor

aIF2 ist ein Faktor, der in der Domäne der Archaeen und Eukaryoten als eIF2 vertreten ist. Er besteht aus drei Untereinheiten: einer  $\alpha$ -,  $\beta$ - und einer  $\gamma$ -Untereinheit. Das gilt auch für *H. volcanii*. Allerdings kommt hinzu, dass für die  $\beta$ -Untereinheit zwei orthologe Gene vorhanden sind. Diese sind das Gen HVO\_1678, das für aIF2 $\beta$ -1 codiert und HVO\_2242, das für aIF2 $\beta$ -2 codiert. Die beiden Untereinheiten können sich teilweise in ihrer Funktion ersetzen. In *H. volcanii* wurden sie als essenziell eingestuft, da sie zwar einzeln aber nicht gleichzeitig deletiert werden konnten (Gäbel *et al.*, 2013). Dies ist ein signifikanter Unterschied in der Gruppe der Archaeen, da viele Archaeen nur ein Gen besitzen, das für die  $\beta$ -Untereinheit codiert. Hinzu kommt, dass aIF2 $\beta$ -2 in *S. solfataricus* nicht essenziell ist (Tabelle 56).

**Tabelle 56: Ausschnitt der Diversität des aIF2/eIF2 in Archaea und Eukarya**

TIF	Archaea		Eukarya
	Crenarchaeota ( <i>Sulfolobus solfataricus</i> )	Euryarchaeota ( <i>Haloferax volcanii</i> )	Yeast ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )
$\alpha$	essential	non-essential	essential
$\beta$	non-essential	essential	essential
$\gamma$	essential	essential	essential

In Eukaryonten sind alle drei Untereinheiten essenziell. Wie für Eukaryonten als auch für Archaeen beschrieben, ist auch in *H. volcanii* aIF2 $\gamma$  (HVO\_1901) ein essenzieller Faktor.

Der Faktor aIF2 $\alpha$ /eIF2 $\alpha$  ist in Eukaryonten und Archaeen essenziell. In *H. volcanii* jedoch konnte die Untereinheit aIF2 $\alpha$  (HVO\_0699) deletiert werden. Damit unterscheidet sich die  $\alpha$ -Untereinheit in *H. volcanii* innerhalb der Archaeen und den Eukaryonten. Die Deletionsmutante wies aber unter allen getesteten Kultivierungsbedingungen einen Phänotyp in Form eines

starken Wachstumsdefizits auf. (Schmitt, Blanquet and Mechulam, 2002; Pedullà *et al.*, 2005; Yatime *et al.*, 2007; Gäbel *et al.*, 2013).

### 3.2.3.1 *alF2α*

Das Gen des *alF2α* in *H. volcanii* ist 801 nt lang. Das resultierende Protein ist 29,5 kDa schwer. Da *alF2α* als nicht essenziell eingestuft wurde, fand die Überexpression in der Deletionsmutante H26Δ1279Δ0699 mit dem Plasmid pSDH0699 statt. Bei Wachstumsuntersuchungen unter optimalen Bedingungen wuchs die Deletionsmutante des *alF2α* sehr viel schlechter als der Wildtyp. Im Vergleich hierzu, wuchs die Überexpression im Deletionsstamm ähnlich zur Deletionsmutante mit Leerplasmid, jedoch zeigte sie ein besseres spätexponentielles Wachstum als die Kontrolle mit Leerplasmid (Abbildung 24A).

Um diese Beobachtung weiter zu untersuchen, wurden die Aufreinigungen des *alF2α* nicht nur im exponentiellen, sondern auch in der stationären Phase untersucht (Abbildung 24BC). Die Elutionsfraktionen der beiden unterschiedlichen Wachstumsphasen des *alF2α*, zeigten beide die Überexpression des *alF2α* und Proteine, die in beiden Wachstumsphasen erschienen. Im Vergleich dazu konnten bei der stationären Phase sehr viel mehr Proteine mitgereinigt werden als in der exponentiellen Phase. Hier konnten auch mehr Proteine visualisiert werden, die größer als 70 kDa sind.

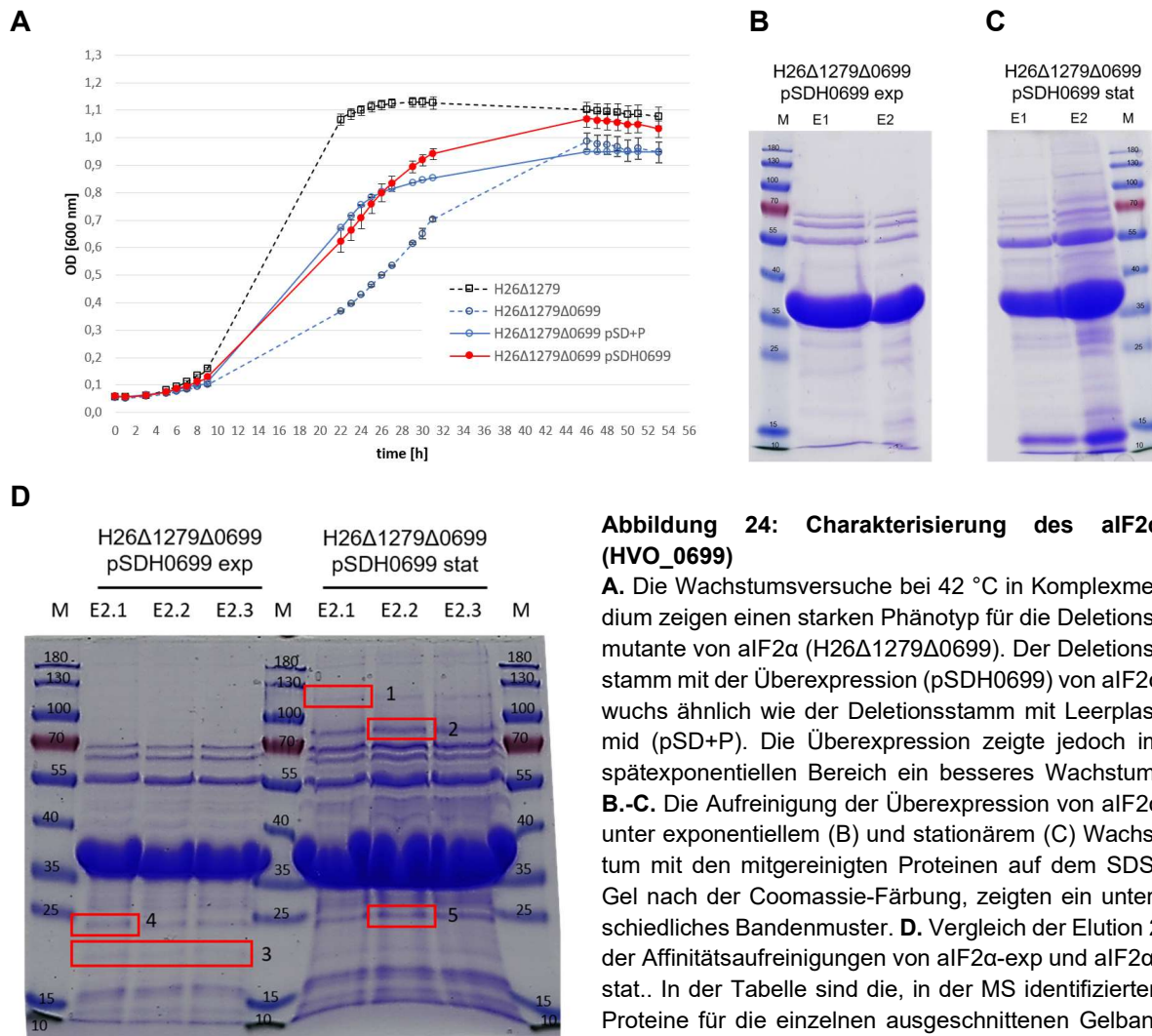
Von je drei Affinitätsaufreinigungen von *alF2α*-exp und *alF2α*-stat wurde jeweils die zweite Elutionsfraktion auf einem gemeinsamen 12 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen (Abbildung 24D). Aus diesem Gel wurden einzelne Banden ausgeschnitten, die nur für *alF2α*-stat erschienen (Bande 1, 2), in beiden Ansätzen auftauchten (Bande 4, 5) und eine Bande, die nur bei *alF2α*-exp präsent war (Bande 3). Die ausgeschnittenen Banden wurden in der MS analysiert und anschließend Anhand des PSM-Wertes und der Abundanz ausgewertet. Ferner wurden die Elutionsfraktionen der Affinitätsaufreinigungen in der MS analysiert.

Für die Bande 1 konnte ein *ABC-type transport system periplasmic substrate-binding protein* (HVO\_0062) identifiziert werden. Anders als es auf dem SDS-Gel schien, konnte in den analysierten Elutionsfraktionen für *alF2α*-exp und *alF2α*-stat das Protein nachgewiesen werden.

Für die Bande 2 konnten *alF2α* mit dem höchsten PSM-Wert identifiziert werden. Mit der höchsten Abundanz konnte jedoch ein *Beta-lactamase domain protein* (HVO\_0874) nachgewiesen werden. Auch hier konnte das Protein für beide Ansätze in den Elutionsfraktionen nachgewiesen werden.

Für Bande 3 konnte überraschenderweise *alF2β-2* (HVO\_2242) nachgewiesen werden, die ebenfalls in beiden Ansätzen in den Elutionsfraktionen nachgewiesen werden konnte.

Für die beiden Banden 4-5 konnte sowohl *alF2α* als auch die *Molydopterin adenylyltransferase* (HVO\_2645) nachgewiesen werden, was vermutlich an der Überladung des Gels lag. Auch in den Elutionsfraktionen beider Ansätze konnte das Protein nachgewiesen werden.



**Abbildung 24: Charakterisierung des aIF2α (HVO\_0699)**

**A.** Die Wachstumsversuche bei 42 °C in Komplexmedium zeigen einen starken Phänotyp für die Deletionsmutante von aIF2α (H26Δ1279Δ0699). Der Deletionsstamm mit der Überexpression (pSDH0699) von aIF2α wuchs ähnlich wie der Deletionsstamm mit Leerplasmid (pSD+P). Die Überexpression zeigte jedoch im spätexponentiellen Bereich ein besseres Wachstum. **B.-C.** Die Aufreinigung der Überexpression von aIF2α unter exponentiellem (B) und stationärem (C) Wachstum mit den mitgereinigten Proteinen auf dem SDS-Gel nach der Coomassie-Färbung, zeigten ein unterschiedliches Bandenmuster. **D.** Vergleich der Elution 2 der Affinitätsaufreinigungen von aIF2α-exp und aIF2α-stat.. In der Tabelle sind die, in der MS identifizierten Proteine für die einzelnen ausgeschnittenen Gelbanden aufgelistet. Berücksichtigt wurden die Proteine mit dem größten PSM-Wert und der größten Abundanz.

Cut	Description		Accession	Genloci	MW [kDa]	PSM	Abundance
1.	ABC-type transport system peripl. substrate-binding protein	stat	D4GYQ7	HVO_0062	67,3	Highest	Highest
2.	aIF2α Beta-lactamase domain protein	stat	D4GT46 D4GUM1	HVO_0699 HVO_0874	29,5 71,9	Highest 2.	2. Highest
3.	aIF2β-2	exp	L9VAS4	HVO_2242	22,2	Highest	Highest
4.	Molybdopterin adenyltransferase aIF2α	both	D4GUY1 D4GT46	HVO_2645 HVO_0699	20,7 29,5	Highest 2.	Highest 2.
5.	aIF2α Molybdopterin adenyltransferase	both	D4GT46 D4GUY1	HVO_0699 HVO_2645	29,5 20,7	Highest 2.	Highest 2.

Dieses Protein wurde allerdings auch bei der Kontrolle der 6x-His-DHFR co-gereinigt (Tabelle 51) und deshalb als unspezifisches Protein ausgeschlossen.

In Tabelle 57 sind für aIF2α-exp und aIF2α-stat die ausgewerteten MS-Daten für die Elutionsfraktionen aufgelistet. Die nur in der exponentiellen Phase identifizierten Proteine sind dunkelgrau hinterlegt. Die nur in der stationären Phase identifizierten Proteine sind hellgrau hinterlegt.



Mit aIF2 $\alpha$  konnten die beiden anderen Untereinheiten aIF2 $\beta$ -2 und aIF2 $\gamma$  des aIF2 mitgereinigt werden, jedoch nicht die Untereinheit aIF2 $\beta$ -1. Des Weiteren konnte aIF2B $\delta$ -1 und aIF5B nachgewiesen werden.

Bei den stationären Kulturen konnten, wie es sich in [Abbildung 24C](#) mit der Coomassie-Färbung auf dem SDS-Gel schon zeigte, mehr Proteine mitgereinigt werden.

Auch in der stationären Phase konnten mit aIF2 $\alpha$  die Untereinheiten aIF2 $\beta$ -2 und aIF2 $\gamma$  nachgewiesen werden. Ebenso unter stationären Bedingungen konnte aIF2B $\delta$ -1 und aIF5B als weitere Translationsinitiationsfaktoren identifiziert werden. Bis auf das 50S ribosomale Protein rpL10 (HVO\_2756) konnten nach der Auswertung der MS-Daten, alle Proteine, die in der exponentiellen Phase identifiziert wurden, auch in der stationären Phase nachgewiesen werden. In der exponentiellen Phase wurde nur ein 30S und fünf 50S ribosomale Proteine identifiziert. Dagegen konnten in der exponentiellen Phase sechs 30S und sieben 50S ribosomale Proteine identifiziert werden.

Im Vergleich von aIF2 $\alpha$ -exp und -stat konnten weitere Proteine für die Translation und die Transkription in den stationären Kulturen nachgewiesen werden. Unter anderem aIF1 (HVO\_1946) für die Translation sowie TIFIIB (HVO\_1478) und Nob1 (HVO\_1965) für die Transkription. Diese drei Proteine konnten mit keinem weiteren Initiationsfaktor co-gereinigt werden.

**Tabelle 57: Mitgereinigte Proteine von aIF2 $\alpha$  aus exponentieller und stationärer Kultur (n=3)**

Group	Description	Accession	Genloci	exp	stat	
Translation	aIFs	aIF2 $\alpha$	D4GT46	HVO_0699	+	+
		aIF1	D4GTH5	HVO_1946		+
		aIF2 $\beta$ -2	L9VAS4	HVO_2242	+	+
		aIF2 $\gamma$	D4GTD4	HVO_1901	+	+
		aIF2B $\delta$ -1	L9USK7	HVO_0966	+	+
		aIF5B	D4GTJ2	HVO_1963	+	+
	aEFs	aEF1 $\alpha$	L9V6J4	HVO_2413	+	+
		aEF1 $\alpha$ -like protein	L9V605	HVO_2575	+	+
		aEF2	L9UK07	HVO_0356	+	+
	30S rpS	30S rpS3	D4GTZ0	HVO_2558		+
		30S rpS3Ae	D4GWA5	HVO_1145		+
		30S rpS5	D4GTX6	HVO_2544	+	+
		30S rpS8	D4GTY1	HVO_2549		+
		30S rpS11	L9V5R1	HVO_2782		+
		30S rpS19P	L9V659	HVO_2560		+
		50S rpL	50S rpL1	P41199	HVO_2757	+
	50S rpL2		D4GTZ3	HVO_2561		+
	50S rpL3		L9V5K9	HVO_2564		+
	50S rpL6		L9V5X7	HVO_2548		+
50S rpL10	P41198		HVO_2756	+		
50S rpL10e	D4GS24		HVO_0484	+	+	
50S rpL15e	L9UPT6		HVO_0561	+	+	
50S rpL30	L9V5X1		HVO_2543	+	+	

Group		Description	Accession	Genloci	exp	stat
	transferase	tRNA(Met) cytidine acetyltransferase TmcA	D4GW73	HVO_2736	+	+
<b>Transcription</b>	RNAP-subunits	RpoA1	D4GZX6	HVO_0349	+	+
		RpoA2	D4GZX7	HVO_0350	+	+
		RpoB2	L9UK99	HVO_0347	+	+
	factor	<b>Transcription initiation factor IIB</b>	<b>D4GYB5</b>	<b>HVO_1478</b>		+
	endonuclease	<b>rRNA maturation endonuclease Nob1</b>	<b>D4GTJ4</b>	<b>HVO_1965</b>		+
	regulator	ArcR family TR	L9UXN3	HVO_A0093		+
		ArcR family TR	L9V9M0	HVO_2110		+
		ArcR family TR	L9VI32	HVO_B0101		+
		ArcR family TR	L9VI90	HVO_B0040		+
		Cro/C1 family TR	D4GQZ0	HVO_A0313		+
		HTH-10 family TR	D4GQF3	HVO_A0121	+	+
		HTH-type TRGlpR	D4GYE7	HVO_1501		+
		IclR family TR	D4GPB5	HVO_B0114		+
		IclR family TR	D4GPK2	HVO_B0201		+
		IclR family TR	D4GQB4	HVO_A0082		+
		IclR family TR	D4GQV7	HVO_A0280		+
		IclR family TR	D4GRP3	HVO_A0583		+
		IclR family TR	D4GUQ5	HVO_2108	+	+
		Lrp/AsnC family TR	D4GSB6	HVO_1792	+	+
		SirR/DtxR family TRSirR	D4GUE2	HVO_0819		+
		TR	L9VNN6	HVO_A0465		+
		TR	L9UFW5	HVO_0163	+	+
		TR	L9UGU5	HVO_0179		+
		TR	L9UK32	HVO_2928	+	+
		TR	L9V758	HVO_2374	+	+
		TR	L9V878	HVO_2636		+
		TrmB family TR	D4GXQ1	HVO_1360		+
		PadR family TR	D4GXH6	HVO_2869		+
		RNA-binding protein AU-1	D4GRU7	HVO_0406		+
		RNA-binding protein Lsm	D4GW47	HVO_2723	+	+
		TATA-box-binding protein	D4GQZ8	HVO_B0382		+
		TATA-box-binding protein	L9VGC6	HVO_1727	+	+
		TATA-box-binding protein 1	D4GZA2	HVO_0158		+
<b>Protein folding</b>	chaperone	Chaperone protein DnaK	L9VEI0	HVO_1590		+
	chaperone	Hsp20-type molecular chaperone	D4GRZ1	HVO_0450	+	+
	factor	Peptide chain release factor subunit 1	D4GZV0	HVO_0321		+
<b>Protein turnover</b>	thermosome	Thermosome subunit 2	O30560	HVO_0455	+	+
		Thermosome subunit 3	Q9HHA2	HVO_0778	+	+
	peptidase	Peptidase S9 family protein	D4GUG3	HVO_0829		+
<b>Replication and Repair</b>	repair	DNA double-strand break repair Rad50 ATPase	D4GUK1	HVO_0854		+
		Putative DNA helicase Rad25	L9VE99	HVO_1723		+
		DNA mismatch repair protein MutS	D4GSE9	HVO_0552		+
		DNA repair and recombination protein RadA	Q48328	HVO_0104	+	+
		DNA repair and recombination protein RadB	L9V6G6	HVO_2383	+	+
		Helicase domain protein	D4H0D0	HVO_C0042		+
		Repair helicase UvrD	D4GRV6	HVO_0415	+	+
		replication	ORC1-type DNA replication protein	A0A1U8QPN7	HVO_C0057	
		Orc1-type DNA replication protein	D4GYI1	HVO_1537		+

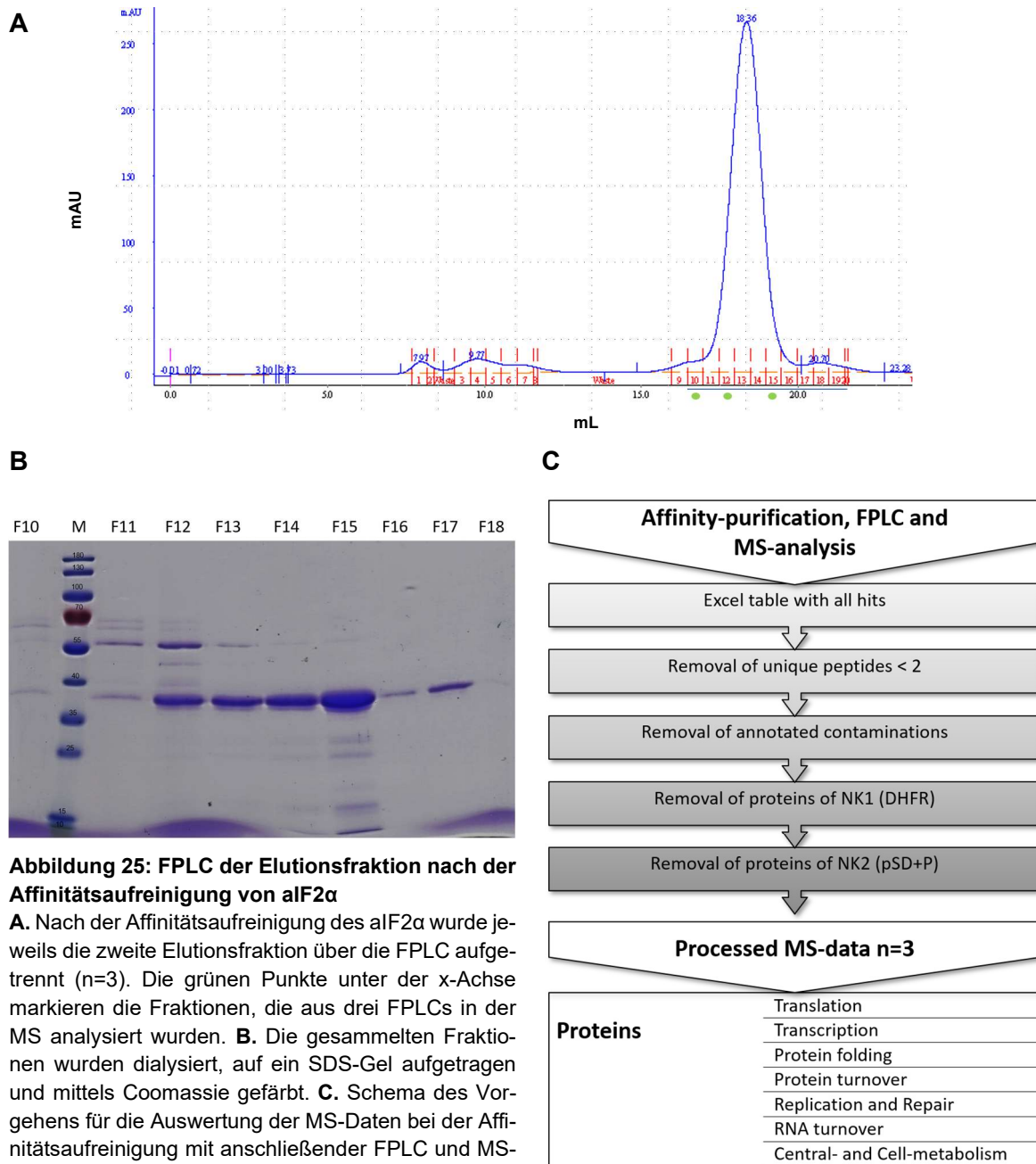
Group	Description	Accession	Genloci	exp	stat
	ORC1-type DNA replication protein	L9UGW2	HVO_0194		+
	Replication factor A	L9UJU8	HVO_0292	+	+
	Type 2 DNA topoisomerase 6 subunit B	L9VEG4	HVO_1571	+	+
<b>RNA turnover</b>	ribonuclease				
	Ribonuclease H I	L9V6L9	HVO_2438	+	+
	Ribonuclease J	L9V5P6	HVO_2724		+
	Ribonuclease R	L9UJI9	HVO_0388		+
	Ribonuclease Z	L9UHL9	HVO_0144		+
Vorkommen exp und stat		Vorkommen nur in exp		Vorkommen nur in stat	

### 3.2.3.1.1 FPLC von *alF2 $\alpha$*

Um die Komplexbildung von *alF2* und seinen Untereinheiten genauer zu untersuchen, wurde nach der Aufreinigung der einzelnen His-getaggen Faktoren FPLCs durchgeführt. Hierfür wurde die Affinitätsaufreinigung, wie zuvor beschrieben, durchgeführt. Anschließend wurde jeweils die zweite Elutionsfraktion direkt in der FPLC aufgetrennt. Das Spektrum für *alF2 $\alpha$*  ist in [Abbildung 25A](#) dargestellt. Die gesammelten Fraktionen sind in rot dargestellt.

Die Fraktionen wurden gesammelt, dialysiert und entsprechend auf einem SDS-Gel aufgetragen. Nach der Coomassie-Färbung konnten verschiedene Proteinmuster, der Größe nach absteigend, in den einzelnen Fraktionen identifiziert werden ([Abbildung 25B](#)). Für Fraktion 1-9 konnten keine Proteinbanden im SDS-Gel nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Von drei unabhängigen Aufreinigungen, die das gleiche Spektrum aufwiesen, wurden jeweils die Fraktionen zu Beginn der Schulter (F10; I) des Hauptpeaks und nach der Spitze des Hauptpeaks (F15; III) mittels MS analysiert. Vor der Peak-Spitze (F12;II) wurde eine weitere Fraktion, jedoch nur aus zwei Aufreinigungen, untersucht. In der [Abbildung 25A](#) entsprechen die verwendeten Fraktionen den Fraktionen, mit den grünen Punkten.

In der Auswertung wurden die identifizierten Proteine mit einem Wert unter 2 *Unique Peptides* ausgenommen ([Abbildung 25C](#)). Anschließend wurde die Menge der Peptide Spectrum Matches (PSM) absteigend sortiert. Die Proteine, die in allen drei FPLCs auftauchten, wurden zusammengefasst. Die MS-Daten des Leerplasmids und der DHFR wurden auch bei diesen MS-Auswertungen als Kontrolle abgezogen. Dieses Vorgehen wurde für die MS-Daten aller Affinitätsaufreinigungen mit gekoppelter FPLC durchgeführt.



**Abbildung 25: FPLC der Elutionsfraktion nach der Affinitätsaufreinigung von aIF2 $\alpha$**

**A.** Nach der Affinitätsaufreinigung des aIF2 $\alpha$  wurde jeweils die zweite Elutionsfraktion über die FPLC aufgetrennt (n=3). Die grünen Punkte unter der x-Achse markieren die Fraktionen, die aus drei FPLCs in der MS analysiert wurden. **B.** Die gesammelten Fraktionen wurden dialysiert, auf ein SDS-Gel aufgetragen und mittels Coomassie gefärbt. **C.** Schema des Vorgehens für die Auswertung der MS-Daten bei der Affinitätsaufreinigung mit anschließender FPLC und MS-Analyse der Fraktionen.

## I. Zu Beginn der Schulter: 29 Proteine in drei FPLC-Läufen identifiziert

Die Verteilung der Proteine anhand ihrer PSM-Werte von drei unabhängigen Aufreinigungen und anschließender FPLC ist in Tabelle 58 absteigend dargestellt. Analyse der PSM-Werte von drei unabhängigen Messungen der Fraktionen zu Beginn der Schulter in der FPLC. Die PSM-Werte wurden auf aIF2 $\alpha$  normiert.

**Tabelle 58: MS-Analyse der Fraktionen zu Beginn der Schulter von aIF2 $\alpha$  (n=3)**

Description	Accession	Genloci	MW [kDa]	PSM [%] n=3	PSM [%] std.
1. aIF2 $\alpha$	D4GT46	HVO_0699	29,5	100,0	0,0
2. aIF2 $\gamma$	D4GTD4	HVO_1901	43,9	38,3	29,9
3. Succinate dehydrogenase or fumarate reductase	L9V5C0	HVO_2808	67,6	16,1	14,5
4. aIF2 $\beta$ -2	L9VAS4	HVO_2242	22,2	15,4	7,0
5. aIF2B $\delta$ -1	D4GTJ2	HVO_1963	65,3	14,3	14,9
6. aEF2	L9UK07	HVO_0356	80,4	11,4	9,2
7. Uncharacterized protein	D4H0D4	HVO_C0046	20,1	7,7	10,3
8. Chaperone protein DnaK	L9VEI0	HVO_1590	67,2	6,0	5,5
9. Serine O-acetyltransferase	D4GTN2	HVO_2004	31,9	5,8	3,0
10. Uncharacterized protein	D4GQG3	HVO_A0133	30,8	5,7	5,2
11. RNA-binding protein Lsm	D4GW47	HVO_2723	8,3	4,9	3,0
12. Putative glutamate--argW ligase	D4GYP1	HVO_0046	31,9	4,9	5,3
13. SufB domain protein	D4GUK8	HVO_0861	44,7	4,8	3,2
14. N-methylhydantoinase (ATP-hydrolyzing) B	L9V119	HVO_A0378	64,2	3,9	3,8
15. PhoU domain protein	D4GWT4	HVO_1181	38,4	3,9	3,1
16. rpoB2	L9UK99	HVO_0347	58,9	3,2	3,2
17. NADH dehydrogenase-like complex subunit CD	L9URY6	HVO_0980	63,4	3,1	3,3
18. Uncharacterized protein	L9VBX9	HVO_2024	41,8	3,1	2,4
19. Aspartate carbamoyltransferase	D4GY71	HVO_1454	33,7	3,1	2,8
20. 50S rpL22	L9V5K3	HVO_2559	16,9	3,0	2,4
21. Asparaginase	L9V841	HVO_2589	34,6	2,9	1,7
22. Thermosome subunit 2	O30560	HVO_0455	59,3	2,4	1,7
23. DNA repair and recombination protein RadB	L9V6G6	HVO_2383	24,6	2,2	1,6
24. ABC-type transport system ATP-binding protein	D4GS85	HVO_1760	32,4	1,7	2,0
25. Aldehyde dehydrogenase	D4GWU7	HVO_1189	56,1	1,6	1,2
26. Ferredoxin--nitrite reductase	L9VDY4	HVO_1788	66,6	1,4	0,9
27. rpoA2	D4GZX7	HVO_0350	46,1	1,4	1,2
28. Nucleoside diphosphate kinase	D4GW84	HVO_2740	17,5	1,4	0,8
29. 50S rpL11	P41200	HVO_2758	16,8	0,9	0,5
Translation			Transcription		

Die Proteine wurden nach dem größten PSM-Wert abwärts sortiert. Der PSM-Wert von Protein 1-6 fiel stark ab. Zu den ersten vier Proteinen mit den höchsten PSM-Werten gehörten aIF2 $\alpha$ , - $\beta$ -2 und - $\gamma$ . Als weiterer Initiationsfaktor folgte aIF2B $\delta$ -1 an fünfter Stelle. Insgesamt konnten 29 Proteine nach der Auswertung identifiziert werden. Davon vier Initiationsfaktoren, zwei 50S ribosomale Proteine, sowie der Elongationsfaktor aEF2. Des Weiteren konnten zwei RNAP-Untereinheiten mitgereinigt werden, rpoB2 und rpoA2.

## II. Vor der Spitze des Hauptpeaks: 41 Proteine in zwei FPLC-Läufen identifiziert

Die Verteilung der Proteine anhand ihrer PSM-Werte, von zwei unabhängigen Aufreinigungen und anschließender FPLC, ist in Tabelle 59 absteigend dargestellt.

**Tabelle 59: MS-Analyse der der Fraktionen vor der Spitze des Hauptpeaks von aIF2 $\alpha$  (n=2)**

	Description	Accession	Genloci	MW [kDa]	PSM [%] n=2	PSM [%] std.
1.	aIF2 $\alpha$	D4GT46	HVO_0699	29,5	100	0,0
2.	aIF2 $\beta$ -2	L9VAS4	HVO_2242	22,2	15,0	18,2
3.	aEF1 $\alpha$	L9V6J4	HVO_2413	45,6	14,0	18,5
4.	Succinate dehydrogenase or fumarate reductase	L9V5C0	HVO_2808	67,6	8,8	11,8
5.	aIF2 $\gamma$	D4GTD4	HVO_1901	43,9	8,6	11,2
6.	tRNA (pseudouridine(54)-N(1))-methyltransferase	L9VBV1	HVO_1989	21,9	5,8	4,3
7.	HAD superfamily hydrolase	D4GWL8	HVO_2370	23,4	2,0	2,2
8.	Aspartate carbamoyltransferase	D4GY71	HVO_1454	33,7	1,9	2,2
9.	Uncharacterized protein	L9V5N6	HVO_2796	12	1,9	1,9
10.	Serine O-acetyltransferase	D4GTN2	HVO_2004	31,9	1,7	2,0
11.	HGPRTase-like protein	L9URM2	HVO_1072	20,5	1,7	0,2
12.	SufB domain protein	D4GUK8	HVO_0861	44,7	1,5	1,8
13.	Lrp/AsnC family transcription regulator	D4GSB6	HVO_1792	18,1	1,4	0,6
14.	50S rpL22	L9V5K3	HVO_2559	16,9	1,4	1,0
15.	Putative nickel-responsive regulator	D4GWQ6	HVO_2409	15,2	1,3	1,2
16.	Hydantoin racemase	D4GR45	HVO_A0377	28,5	1,3	1,5
17.	Uncharacterized protein	D4GQG3	HVO_A0133	30,8	1,2	1,2
18.	Uncharacterized protein	L9VDX5	HVO_2009	10,1	1,1	1,1
19.	Uncharacterized protein	D4GXF9	HVO_2861	29,1	1,0	0,9
20.	Transcriptional regulator	L9UGU5	HVO_0179	28	0,9	0,9
21.	Oxidoreductase	L9UQK4	HVO_0960	30,6	0,9	1,1
22.	Uncharacterized protein	D4GVI1	HVO_1004	10	0,9	0,1
23.	Transcriptional regulator	L9UK32	HVO_2928	27,5	0,8	0,6
24.	L-lactate dehydrogenase	D4GZF9	HVO_0214	34,5	0,8	0,7
25.	30S rpS13	L9V5M6	HVO_2784	18,9	0,7	0,8
26.	30S rpS2	L9V5L7	HVO_2773	28,3	0,6	0,7
27.	HTH domain protein	D4GW85	HVO_1133	11,7	0,6	0,4
28.	CRISPR-associated protein Cas7	D4GQN6	HVO_A0207	38,2	0,5	0,5
29.	Succinate--CoA ligase [ADP-forming] subunit beta	L9V6P3	HVO_2465	41	0,5	0,1
30.	Uncharacterized protein	D4GRR0	HVO_A0600	14,1	0,5	0,6
31.	rpoH	D4GZX3	HVO_0346	8,5	0,5	0,0
32.	TrmB family transcriptional regulator	D4GXQ1	HVO_1360	15,2	0,5	0,3
33.	Hsp20-type molecular chaperone	D4GRZ1	HVO_0450	15,2	0,4	0,2
34.	Transcriptional regulator	L9ULE5	HVO_2858	17,6	0,4	0,5
35.	5'-nucleotidase SurE	L9V6Z6	HVO_A0228	32	0,4	0,1
36.	Uncharacterized protein	L9URL9	HVO_1077	26	0,4	0,2
37.	Uncharacterized protein	D4GQG0	HVO_A0129	11,7	0,3	0,1
38.	Uncharacterized protein	L9UTQ4	HVO_1209	13,1	0,3	0,1
39.	V-type ATP synthase subunit C	Q48330	HVO_0314	38,7	0,3	0,1
40.	50S rpL11	P41200	HVO_2758	16,8	0,3	0,0
41.	UCP015877 family protein	D4GS16	HVO_0476	23,8	0,2	0,1
	Translation			Transcription		

Analyse der PSM-Werte zweier unabhängiger Messungen der Fraktionen vor der Peak-Spitze in der FPLC. Die PSM-Werte wurden auf aIF2 $\alpha$  normiert.

Die Proteine wurden nach dem größten PSM-Wert abwärts sortiert. Es konnten 41 Proteine identifiziert werden. Davon sind drei Proteine Initiationsfaktoren, zwei 30S ribosomale Proteine und zwei 50S ribosomale Proteine. Unter den ersten fünf Proteinen konnten die drei aIF2-Untereinheiten nachgewiesen werden, jedoch nicht aIF2 $\beta$ -1. Auch bei dieser Messung fiel der PSM-Wert von Protein 1-6 stark ab.

Die Translation betreffend konnte eine RNAPU sowie mehrere Transkriptionsregulatoren identifiziert werden.

### III. Nach der Spitze des Hauptpeaks: fünf Proteine in drei FPLC-Läufen identifiziert

Die Verteilung der Proteine anhand ihrer PSM-Werte von drei unabhängigen Aufreinigungen und anschließender FPLC ist in Tabelle 60 absteigend dargestellt. Analyse der PSM-Werte dreier unabhängiger Messungen der Fraktionen nach der Peak-Spitze in der FPLC. Die PSM-Werte wurden auf aIF2 $\alpha$  normiert.

**Tabelle 60: MS-Analyse der Fraktionen nach der Spitze des Hauptpeaks von aIF2 $\alpha$  (n=3)**

	Description	Accession	Genloci	MW [kDa]	PSM [%] n=3	PSM [%] std.
1.	aIF2 $\alpha$	D4GT46	HVO_0699	29,5	100,0	0,0
2.	aEF1 $\alpha$	L9V6J4	HVO_2413	45,6	6,5	4,9
3.	aIF2 $\gamma$	D4GTD4	HVO_1901	43,9	5,6	5,5
4.	Uncharacterized protein	D4GXF9	HVO_2861	29,1	1,5	1,7
5.	HGPRTase-like protein	L9URM2	HVO_1072	20,5	1,1	1,1
	Translation					

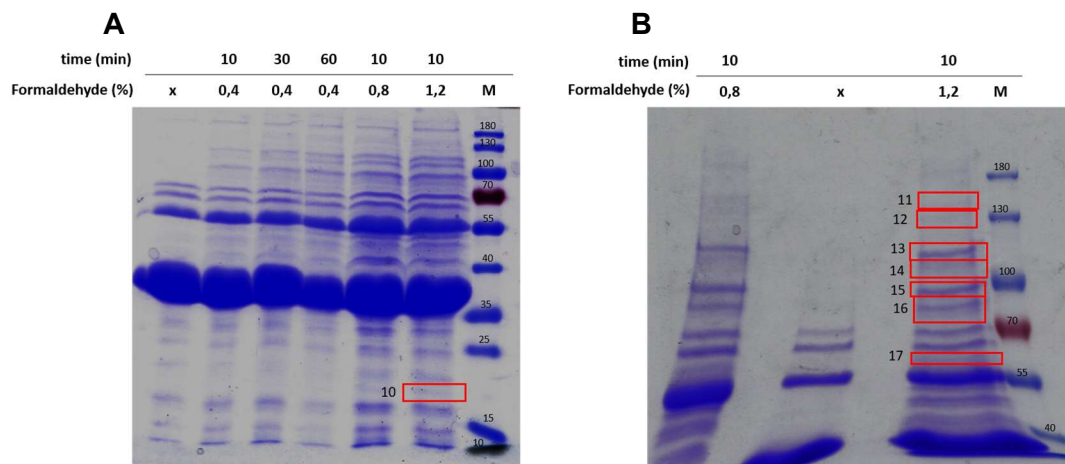
Ausgehend vom größten PSM-Wert wurden die Proteine abwärts sortiert. In allen drei Fraktionen konnten fünf Proteine nachgewiesen werden. Davon waren zwei aIFs (aIF2 $\alpha$  und aIF2 $\gamma$ ) sowie ein Elongationsfaktor. Es konnte keine  $\beta$ -Untereinheit identifiziert werden. Auch in diesen Messungen fielen die PSM-Werte stark ab.

#### 3.2.3.1.2 Crosslinking von aIF2 $\alpha$

Das *Crosslinking* wurde als erweiterter Ansatz für die Affinitätsaufreinigung mit Formaldehyd durchgeführt (Kapitel 2.4.4). Unterschiedliche Formaldehyd-Konzentrationen wurden getestet. Anschließend erfolgte die Affinitätsaufreinigung wie oben beschrieben und die jeweils zweite Elutionsfraktion wurde auf ein SDS-Gel aufgetragen (Abbildung 26A).

Beim *Crosslinking* mit Formaldehyd zeigten die Ansätze mit 0,8 % und 1,2 % Formaldehyd für 10 min die meisten Proteine. Um die Proteinbanden in der oberen Hälfte des Gels weiter aufzutrennen, wurden diese Ansätze erneut auf ein 8 % SDS-Gel aufgetragen und die Laufzeit

verlängert (Abbildung 26B). Von beiden Gelen wurden Banden ausgeschnitten und in der MS analysiert. Bei dem 12% SDS-Gel handelte es sich um eine Bande (Bande 10), die im Ansatz ohne *Crosslinking* (x) nicht zu erkennen war (Abbildung 26AB). Von dem 8 % SDS-Gel wurden Banden des Ansatzes mit 12 % Formaldehyd ausgeschnitten, die in der Affinitätsaufreinigung ohne *Crosslinking* nicht zu erkennen waren (Banden 11-17). Für die Bestimmung der Proteine wurde bei den MS-Daten die höchsten PSM-Werte sowie die Abundanz als Maßstab herangezogen.



Cut	Description	Accession	Genloci	MW [kDa]	PSM	Abundance
10.	Transcriptional regulator	L9UFW5	HVO_0163	19,8	Highest	Highest
11.	Vitamin B12-dependent ribonucleotide reductase	L9V939	HVO_2452	114,3	Highest	Highest
12.	rpoA1	D4GZX6	HVO_0349	108,8	2.	Highest
	Vitamin B12-dependent ribonucleotide reductase	L9V939	HVO_2452	114,3	Highest	3.
13.	aEF2	L9UK07	HVO_0356	80,4	Highest	Highest
14.	Aconitate hydratase	L9VCX4	HVO_1955	70,4	Highest	Highest
15.	DNA gyrase subunit B	D4GZ01	HVO_1572	71,2	Highest	Highest
16.	aIF5B	D4GTJ2	HVO_1963	65,3	Highest	2.
	CTP synthase	D4GUG6	HVO_2624	60,8	3.	Highest
17.	Succinate dehydrogenase or fumarate reductase	L9V5C0	HVO_2808	67,6	Highest	2.
	YgfD family GTPase	D4GUG7	HVO_0831	39,6	2.	Highest

**Abbildung 26: Crosslinking von aIF2 $\alpha$**

**A.-B.** Nach *Crosslinking* und Affinitätsaufreinigung von aIF2 $\alpha$  mit verschiedenen Formaldehyd-Konzentrationen auf einem 12% SDS-Gel (A) und einem 8 % SDS-Gel (B). In der Tabelle sind die in der MS identifizierten Proteine für die einzelnen ausgeschnittenen Gelbanden aufgelistet. Berücksichtigt wurden die Proteine mit dem größten PSM-Wert und der größten Abundanz.

Für Bande 10 handelte es sich um einen Transkriptionsregulator (HVO\_0163), der auch in der MS ohne *Crosslinking* nachgewiesen werden konnte.

Für Bande 11 wurde eine *Vitamin B12-dependent ribonucleotide reductase* (HVO\_2452) identifiziert, die ebenfalls bereits für aIF2 $\alpha$  nachgewiesen werden konnte.



In Bande 12 konnte dieses Protein erneut mit dem höchsten PSM-Wert nachgewiesen werden. Die RNAPU rpoA1 (HVO\_0349) zeigte jedoch die höchste Abundanz.

Für Bande 13 konnte der Elongationsfaktor  $\alpha$ EF2 (HVO\_0356) mit der höchsten Abundanz bestimmt werden. Dieser Elongationsfaktor konnte mit Ausnahme von drei  $\alpha$ IFs- bzw. Untereinheiten mit allen  $\alpha$ IFs mitgereinigt werden.

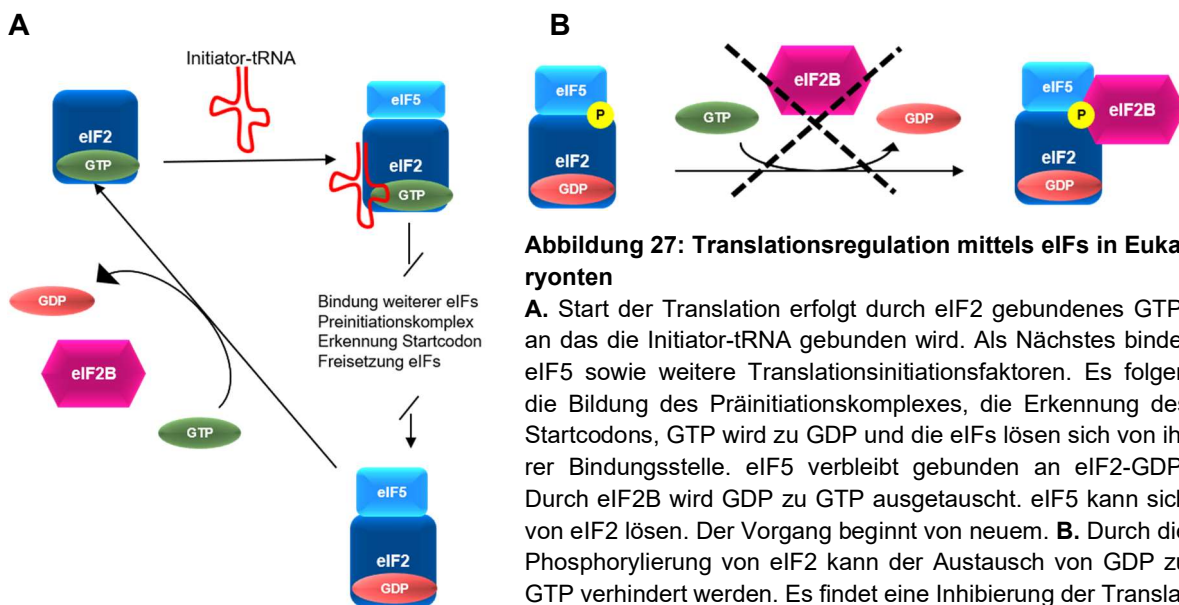
In Bande 14 konnte die *Aconitate hydratase* (HVO\_1955) identifiziert werden und in Bande 15 die DNA-Gyrase B (HVO\_1572).

In Bande 16 konnte sowohl  $\alpha$ IF5B (HVO\_1963) mit dem höchsten PSM-Wert, als auch eine *CTP synthase* (HVO\_2624) mit der höchsten Abundanz identifiziert werden.

In Bande 17 konnte Succinate *dehydrogenase or fumarate reductase* (HVO\_2808) mit dem höchsten PSM-Wert nachgewiesen werden. Als Protein mit der höchsten Abundanz wurde die *YgfD family GTPase* (HVO\_0831) in Bande 17 nachgewiesen. Dieses Protein erschien ebenfalls in der Kontrolle 6xHis-DHFR und wurde deshalb als Interaktionspartner ausgeschlossen.

### 3.2.3.1.3 Aminosäure-Mimikry für die Untersuchung der Interaktion von $\alpha$ IF2 $\alpha$

In Eukaryonten kann die Affinität von  $\alpha$ IF2 durch eine reversible Phosphorylierung von  $\alpha$ IF2 $\alpha$  reguliert werden ([Abbildung 27](#)).



**Abbildung 27: Translationsregulation mittels eIFs in Eukaryonten**

**A.** Start der Translation erfolgt durch  $\alpha$ IF2 gebundenes GTP, an das die Initiator-tRNA gebunden wird. Als Nächstes bindet  $\alpha$ IF5 sowie weitere Translationsinitiationsfaktoren. Es folgen die Bildung des Präinitiationskomplexes, die Erkennung des Startcodons, GTP wird zu GDP und die  $\alpha$ IFs lösen sich von ihrer Bindungsstelle.  $\alpha$ IF5 verbleibt gebunden an  $\alpha$ IF2-GDP. Durch  $\alpha$ IF2B wird GDP zu GTP ausgetauscht.  $\alpha$ IF5 kann sich von  $\alpha$ IF2 lösen. Der Vorgang beginnt von neuem. **B.** Durch die Phosphorylierung von  $\alpha$ IF2 kann der Austausch von GDP zu GTP verhindert werden. Es findet eine Inhibition der Translation statt. Als Komplex verbleiben  $\alpha$ IF2-GDP,  $\alpha$ IF2B und  $\alpha$ IF5 (Jennings *et al.*, 2016).

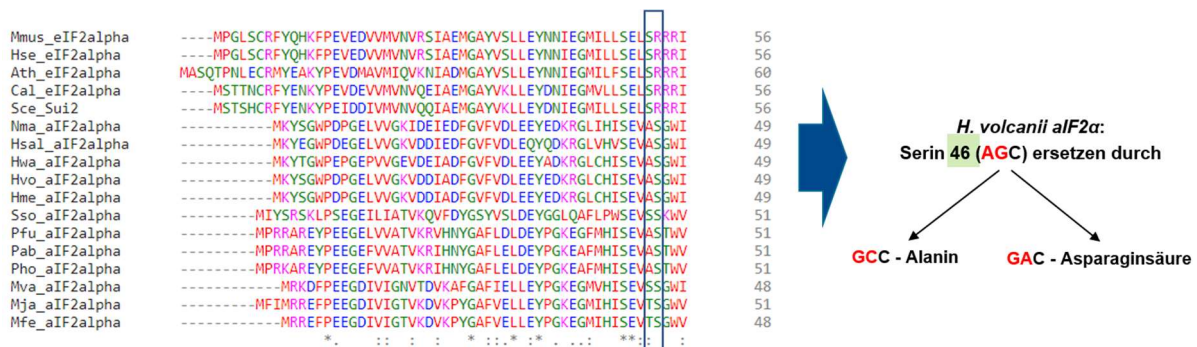
$\alpha$ IF2-GTP besitzt eine starke Affinität für die Initiator-tRNA. Er bringt diese an die kleine ribosomale Untereinheit und ist somit an der Bildung des Präinitiationskomplexes beteiligt (Krishnamoorthy and Pavitt, 2001). Dieser Vorgang kann in Eukaryonten für die Regulation der Translation durch eine reversible Phosphorylierung inhibiert werden. Dabei verbleiben  $\alpha$ IF2 gebundenes GDP sowie  $\alpha$ IF5 und  $\alpha$ IF2B als Komplex. In Eukaryonten wird hierfür das Serin an Position 46 phosphoryliert (Sudhakar *et al.*, 1999; Schmidt, Beilsten-Edmands and

Robinson, 2016). Dies findet zum Beispiel in *S. cerevisiae* bei bestimmtem Aminosäuremangel mittels Gcn2-Kinase statt (Dever *et al.*, 1992; Dever and Hinnebusch, 2005).

Trotz des Fehlens eines homologen Faktors für eIF5 in Archaeen wurde bereits in *Pyrococcus horikoshii* (*P. horikoshii*) an Serin 44 und Serin 48 ein erfolgreicher Aminosäureaustausch für eine *in vitro*-Phosphorylierung an aIF2 $\alpha$  durchgeführt (Tahara *et al.*, 2004).

In dieser Arbeit wurde die Möglichkeit der Phosphorylierung von aIF2 $\alpha$  in *H. volcanii* *in vitro* mittels Aminosäure-Mimikry untersucht. Nach einem Abgleich multipler Aminosäuresequenzen von eIF2 $\alpha$ /aIF2 $\alpha$  aus verschiedenen Organismen wurde Serin 46 für den Aminosäureaustausch an aIF2 $\alpha$  in *H. volcanii* festgelegt (Abbildung 28).

#### Multiple Sequenz-Alignment:



**Abbildung 28: Multiple-Sequence-Alignment für die Wahl der Phosphorylierungsstelle in aIF2 $\alpha$**

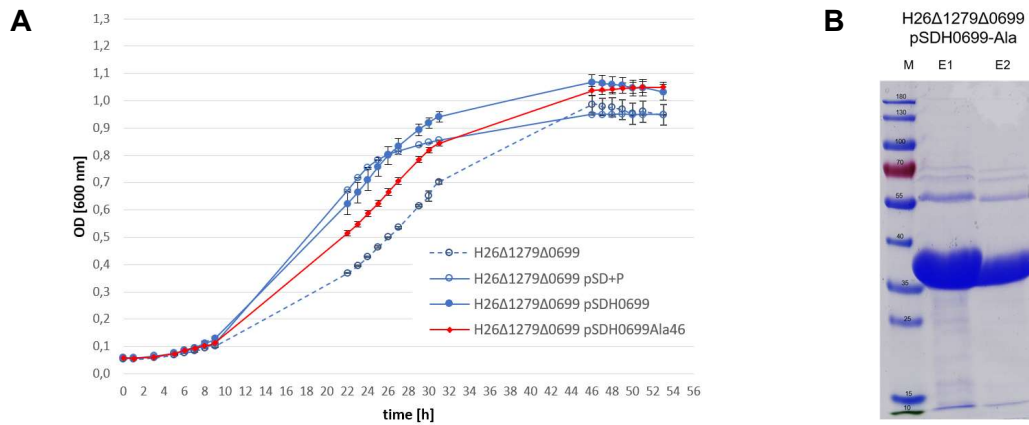
Das Sequenz-Alignment wurde mittels Clustal erstellt. In *H. volcanii* wurde in der Aminosäuresequenz von aIF2 $\alpha$  das Serin an Position 46 gewählt (blauer Kasten). Je zwei Basen wurden ausgetauscht. Die Änderung der Aminosäure erfolgte für Serin zu Alanin und Serin zu Asparaginsäure. Proteinsequenzen für das Multiple-Sequenz-Alignment von eIF2 $\alpha$ /aIF2 $\alpha$  stammen von *H. volcanii* (Hvo; D4GT46), *H. mediterranei* (Hme; I3R2C2), *H. walsbyi* (Hwa; Q18KR0), *H. salinarum* (Hsa1; A0A510N505), *N. magadii* (Nma; D3SY91), *M. fervens* (Mfe; C7P7V4), *M. vanniellii* (Mva; A6UQZ0), *P. abyssi* (Pab; Q9V0E4), *P. horikoshii* (Pho; O58655), *S. solfataricus* (Sso; Q97Z79), *S. cerevisiae* (Sce; P20459), *C. albicans* (Cal; Q5AAU7), *H. sapiens* (Hsa; P05198), *M. musculus* (Mmus; Q6ZWX6) und *A. thaliana* (Ath; Q9SIZ2).

Hierfür wurde das Gen von aIF2 $\alpha$  mit N-terminalem His-Tag in den pSK+ kloniert und mittels Site-Directed-Mutagenesis (Kapitel 2.3.5.4) mutiert. Aus AGC für Serin 46 (Ser46) entstand GCC für Alanin und GAC für Asparaginsäure. Hierbei simuliert Alanin den nicht-phosphorylierten Zustand und Asparaginsäure den phosphorylierten Zustand.

Nach der erfolgreichen Mutation wurden beide modifizierte Gene jeweils in den pSD1R16 kloniert und in den H26 $\Delta$ 1279 $\Delta$ 0699 transformiert. Zur weiteren Untersuchung wurden Wachstumsversuche durchgeführt sowie Aufreinigungen über den His-Tag, wie bisher beschrieben. Anschließend wurden die Elutionsfraktionen auf ein SDS-Gel aufgetragen und zur MS-Analyse geschickt.

Bei den Wachstumsversuchen in Komplexmedium bei 42 °C zeigte die Mutante mit dem Austausch von Serin zu Alanin (pSDH0699Ala46) ein schlechteres Wachstum als die Kontrolle mit Leerplasmid. Außerdem wuchs die pSDH0699Ala46-Mutante schlechter als die Überexpression von aIF2 $\alpha$  (pSDH0699) ohne Mutation an Ser46 (Abbildung 29A). Mittels Aufreinigung über den N-terminalen His-Tag konnte die erfolgreiche Überexpression von aIF2 $\alpha$ -Ala46

nachgewiesen werden. Wie im Gel zu sehen ist, wurden im Vergleich zur Aufreinigung von aIF2 $\alpha$  ohne Mutation ([Abbildung 29B](#)) weniger Proteine mitgereinigt. Dies bestätigte auch die MS-Analyse der drei unabhängigen Elutionsfraktionen. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass aIF2 $\gamma$  und aIF2 $\beta$ -2 mitgereinigt wurden, allerdings keine weiteren Interaktionspartner (Daten nicht gezeigt).

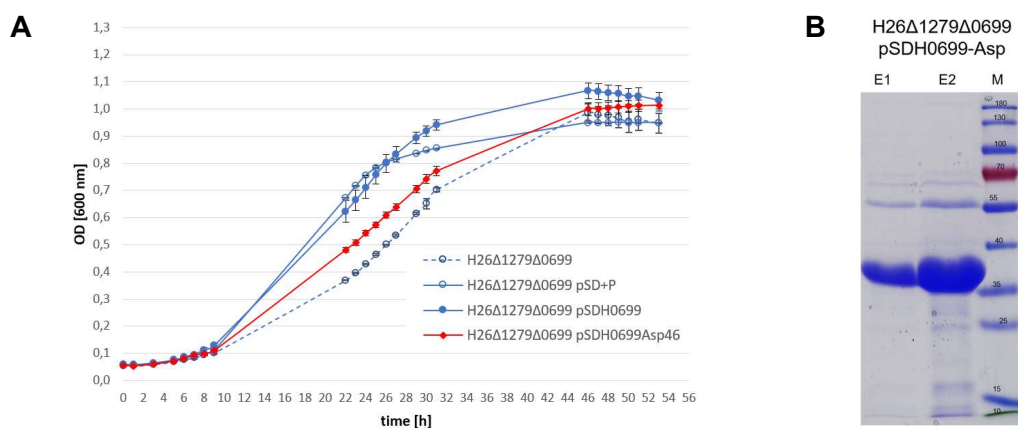


**Abbildung 29: Charakterisierung des aIF2 $\alpha$  (HVO\_0699) mit der Ser46 mutiert zu Ala46**

**A.** Unter optimalen Wachstumsbedingungen bei 42 °C in Komplexmedium zeigte die Mutante pSDH0699Ala46 ein schlechteres Wachstum im Vergleich zur Überexpression des Gens ohne Mutation (pSDH0699) und dem Leerplasmid ( $\Delta$ 0699 pSD+P). **B.** Die Elutionsfraktionen der Affinitätsaufreinigung auf einem SDS-Polyacrylamidgel, Coomassie-gefärbt.

Die Mutante mit dem Austausch von Serin zu Asparaginsäure (pSDH0699-Asp46) wuchs ebenfalls schlechter als die Kontrolle mit dem Leerplasmid ([Abbildung 30A](#)).

Auch hier konnten im SDS-Gel nach der Affinitätsaufreinigung nur wenige Proteine visualisiert werden ([Abbildung 30B](#)). In der MS-Analyse konnte nach der Auswertung von drei unabhängigen Elutionsfraktionen nur aIF2 $\alpha$  selbst, jedoch keine weiteren Interaktionspartner nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass in *H. volcanii* Ser46 in aIF2 $\alpha$  nicht an der Regulation von aIF2 beteiligt ist.



**Abbildung 30: Charakterisierung des aIF2 $\alpha$  (HVO\_0699) mit der Ser46 mutiert zu Asp46**

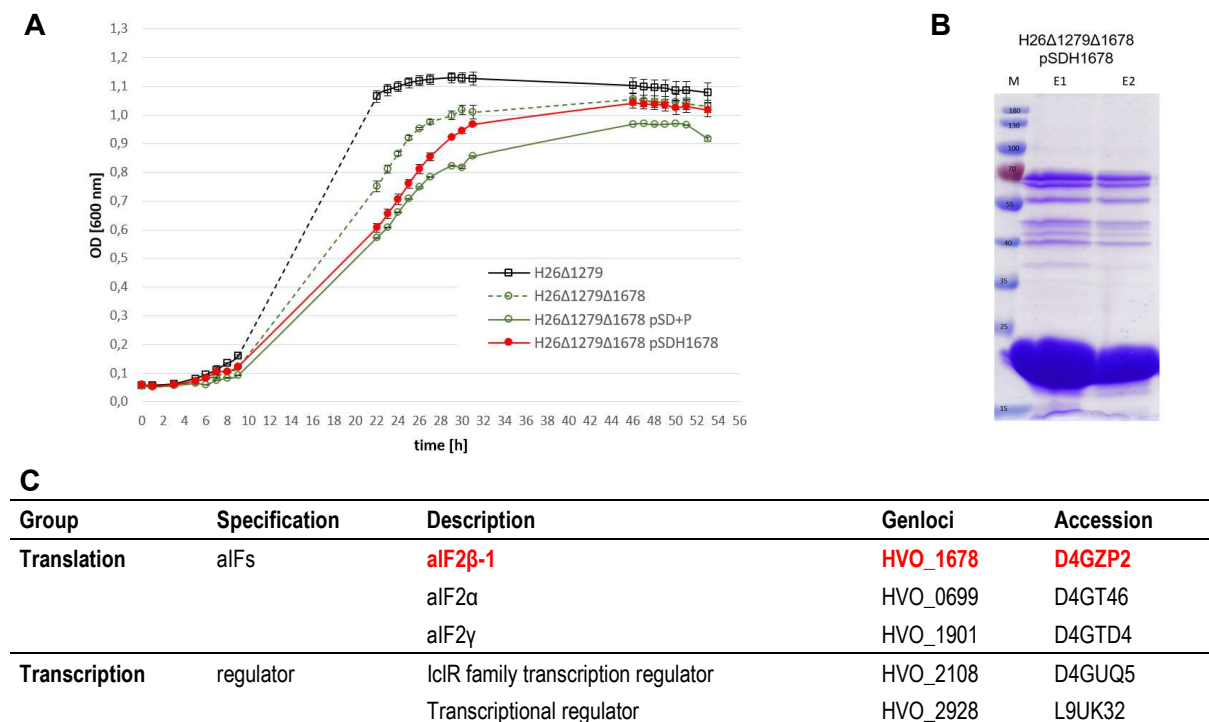
**A.** Unter optimalen Wachstumsbedingungen bei 42 °C in Komplexmedium zeigte die Mutante pSDH0699Asp46 ein schlechteres Wachstum im Vergleich zur Überexpression des Gens ohne Mutation (pSDH0699) und dem Leerplasmid ( $\Delta$ 0699 pSD+P). **B.** Die Elutionsfraktionen der Affinitätsaufreinigung auf einem SDS-Polyacrylamidgel, Coomassie-gefärbt.

### 3.2.3.2 *alF2 $\beta$ -1*

*alF2 $\beta$ -1* (HVO\_1678) ist neben HVO\_2242/*alF2 $\beta$ -2* eines der orthologen Gene, das für *alF2 $\beta$*  in *H. volcanii* codiert. *alF2 $\beta$ -1* konnte deletiert werden und wurde damit als nicht essenziell eingestuft. In der Deletionsmutante von *alF2 $\beta$ -2* (HVO\_2242) konnte gezeigt werden, dass *alF2 $\beta$ -1* um das zehnfache hochreguliert wird, was für eine Übernahme der Funktion von *alF2 $\beta$ -2* spricht (Gäbel *et al.*, 2013). Um diesen Umstand weiter zu untersuchen wurde *alF2 $\beta$ -1* N-terminal mit einem His-Tag versehen und im neu erstellten Stamm H26 $\Delta$ 1279 $\Delta$ 1678 mittels pSDH1678 überexprimiert.

Während den Wachstumsversuchen wuchs die Deletionsmutante mit dem Überexpressionsplasmid (pSDH1678) in Komplexmedium ähnlich der Kontrolle mit dem Leerplasmid (Abbildung 31A). Jedoch zeigte die Überexpressionsmutante in der spätexponentiellen Phase ein besseres Wachstum.

In der Affinitätsaufreinigung konnte *alF2 $\beta$ -1* bei 15 kDa nachgewiesen werden. Zusätzlich zeigten sich auf dem Coomassie gefärbten SDS-Gel noch weitere Banden (Abbildung 31B). In der MS-Analyse der Elutionsfraktionen konnten 14 Proteine in allen drei Aufreinigungen nachgewiesen werden (Abbildung 31C). Für die *alFs* konnte zusätzlich zu *alF2 $\beta$ -1* die beiden weiteren Untereinheiten des *alF2* mitgereinigt werden. Diese waren *alF2 $\alpha$*  und *alF2 $\gamma$* . Im Bereich der Transkription konnten zwei Transkriptionsregulatoren identifiziert werden.

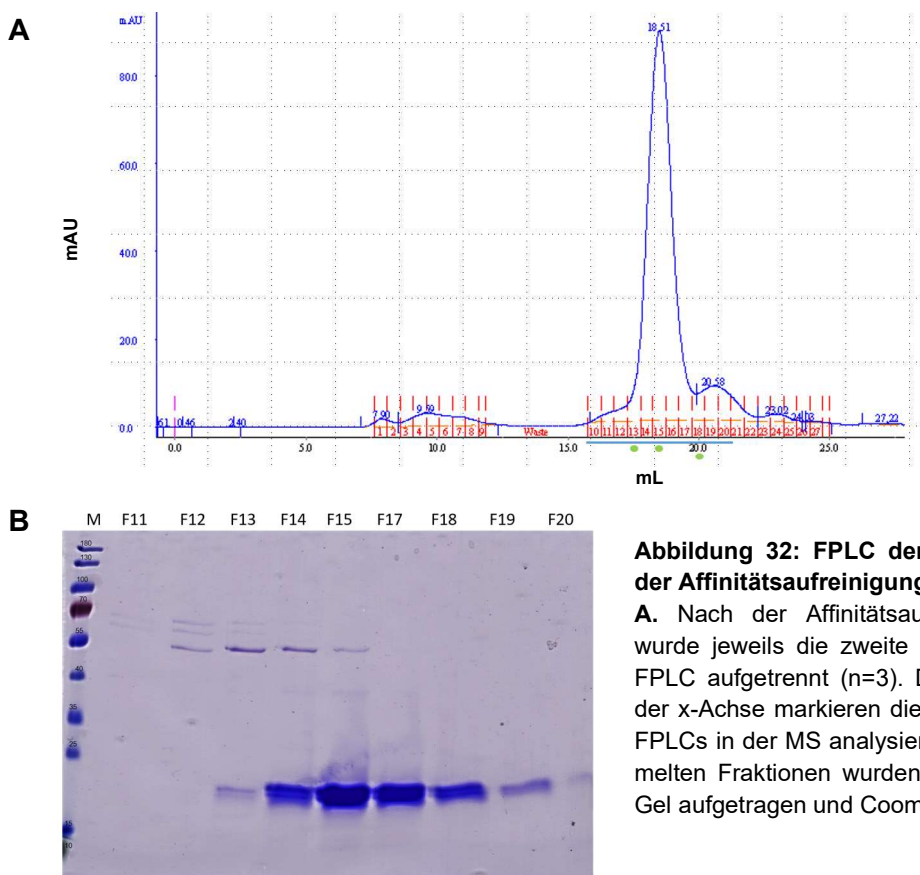


#### Abbildung 31: Charakterisierung des *alF2 $\beta$ -1* (HVO\_1678)

**A.** Im Wachstumsversuch bei 42 °C in Komplexmedium wuchs die Deletionsmutante (H26 $\Delta$ 1279 $\Delta$ 1678) schlechter als der Wildtyp (H26 $\Delta$ 1279). Im Vergleich dazu wuchs die Überexpressionsmutante (pSDH1678) besser als die Kontrolle mit dem Leerplasmid (pSD+P). **B.** Elutionsschritte der Überexpression von *alF2 $\beta$ -1* (15 kDa) nach der Affinitätsaufreinigung auf einem 12 % SDS-Polyacrylamidgel. **C.** Auflistung der Proteine der MS-Analyse nach der Auswertung.

### 3.2.3.2.1 FPLC von $\alpha$ IF2 $\beta$ -1

Für die FPLCs von  $\alpha$ IF2 $\beta$ -1 wurden drei unabhängige exponentielle Kulturen aufgeschlossen und die Affinitätsaufreinigung, wie zuvor beschrieben, durchgeführt. Anschließend wurde jeweils die zweite Elutionsfraktion direkt in der FPLC aufgetrennt. Die Spektren sahen sehr ähnlich aus, weshalb hier eines exemplarisch in [Abbildung 32A](#) gezeigt ist. Während des FPLC-Laufs wurden die nach Größe aufgetrennten Proteinkomplexe bzw. Proteine in Fraktionen gesammelt und anschließend dialysiert, bevor sie auf ein SDS-Gel aufgetragen wurden. Für die ersten 10 Fraktionen (Daten nicht gezeigt) konnte kein Nachweis von Proteinen im SDS-Gel mittels Coomassie-Färbung erbracht werden, jedoch von Fraktion 11-20 wie in [Abbildung 32B](#) gezeigt.



**Abbildung 32: FPLC der Elutionsfraktion nach der Affinitätsaufreinigung von  $\alpha$ IF2 $\beta$ -1**

**A.** Nach der Affinitätsaufreinigung des  $\alpha$ IF2 $\beta$ -1 wurde jeweils die zweite Elutionsfraktion über die FPLC aufgetrennt ( $n=3$ ). Die grünen Punkte unter der x-Achse markieren die Fraktionen, die aus drei FPLCs in der MS analysiert wurden. **B.** Die gesammelten Fraktionen wurden dialysiert, auf ein SDS-Gel aufgetragen und Coomassie gefärbt.

Nach der Coomassie-Färbung zeigte sich auf dem SDS-Gel eine Bande auf Höhe des  $\alpha$ IF2 $\beta$ -1 Proteins zwischen der 15-25 kDa Markerbande (Fraktion F13-20). Des Weiteren waren zwei schwache Banden unterhalb des  $\alpha$ IF2 $\beta$ -1 zwischen 10-15 kDa zu sehen (Fraktion F15, F17). Über  $\alpha$ IF2 $\beta$ -1 tauchten in Fraktion F11-15 vier weitere Banden auf.

Fraktion 13, 15 und 18 wurden mittels MS analysiert. Sie entsprechen den Fraktionen mit den grünen Punkten in [Abbildung 32A](#). Dies erfolgte ebenfalls in den zwei weiteren FPLC-Läufen, die ähnlich zu dem hier gezeigten Spektrum verliefen. Die Fraktionen wurden nach der MS-Auswertung zusammengefasst. Die Proben stammten vom Beginn der Schulter des Hauptpeaks (I; F13), von der Spitze des Hauptpeaks (II; F15) sowie vom Abschwung nach

dem Hauptpeak (III; F18). Die Auswertung der MS-Daten erfolgte wie im [Kapitel 3.2.3.1.1](#) FPLC von aIF2 $\alpha$  beschrieben.

### I. Zu Beginn der Schulter: zwei Proteine in drei FPLC-Läufen identifiziert

Die Verteilung der Proteine anhand ihrer PSM-Werte von drei unabhängigen Aufreinigungen und anschließender FPLC ist in [Tabelle 61](#) absteigend dargestellt. Analyse der PSM-Werte von drei unabhängigen Messungen der Fraktionen zur Beginn der Schulter des Hauptpeaks in der FPLC. Die PSM-Werte wurden auf aIF2 $\beta$ -1 normiert. Die Proteine wurden nach dem größten PSM-Wert abwärts sortiert. Mit aIF2 $\beta$ -1 konnte nur aIF2 $\alpha$  als weiteres Protein in allen drei Fraktionen nachgewiesen werden.

**Tabelle 61: MS-Analyse der Fraktionen zu Beginn der Schulter des Hauptpeaks von aIF2 $\beta$ -1 (n=3)**

Description	Accession	Genloci	MW [kDa]	PSM [%] n=3	PSM [%] std.
1.aIF2 $\beta$ -1	D4GZP2	HVO_1678	14,9	100	0,0
2.aIF2 $\alpha$	D4GT46	HVO_0699	29,5	43,4	33,0
Translation					

### II. In der Spitze des Hauptpeaks: fünf Proteine in drei FPLC-Läufen identifiziert

Die Verteilung der Proteine anhand ihres PSM-Werts von drei unabhängigen Aufreinigungen und anschließender FPLC ist in [Tabelle 62](#) absteigend dargestellt. Analyse der PSM-Werte dreier unabhängiger Messungen der Fraktionen von der Spitze des Hauptpeaks in der FPLC. Die PSM-Werte wurden auf aIF2 $\beta$ -1 normiert. Die Proteine wurden nach dem größten PSM-Wert abwärts sortiert.

**Tabelle 62: MS-Analyse der Fraktionen in der Spitze des Hauptpeaks von aIF2 $\beta$ -1 (n=3)**

Description	Accession	Genloci	MW [kDa]	PSM [%] n=3	PSM [%] std.
1.aIF2 $\beta$ -1	D4GZP2	HVO_1678	14,9	100,0	0,0
2.aIF2 $\alpha$	D4GT46	HVO_0699	29,5	4,8	6,5
3.aIF2 $\beta$ -2	L9VAS4	HVO_2242	22,2	3,5	4,5
4.Transcriptional regulator	L9UK32	HVO_2928	27,5	1,4	1,4
5.UPF0145 protein	L9UT93	HVO_1377	12,8	0,5	0,7
Translation				Transcription	

Mit aIF2 $\beta$ -1 konnten weitere Untereinheiten des aIF2 mitgereinigt werden. Hierbei handelte es sich um aIF2 $\alpha$  und die aIF $\beta$ -2. Die aIF2 $\gamma$ -Untereinheit konnte nicht mitgereinigt werden. Zu den weiteren mitgereinigten Proteinen gehörte ein Transkriptionsregulator, der bereits in der Elutionsfraktion nach der Affinitätsaufreinigung nachgewiesen werden konnte ([Abbildung 31](#)).

III. Nach der Spitze des Hauptpeaks: zwei Proteine in drei FPLC-Läufen identifiziert

Die Verteilung der Proteine anhand ihrer PSM-Werte von drei unabhängigen Aufreinigungen und anschließender FPLC ist in Tabelle 63 absteigend dargestellt. Analyse der PSM-Werte der drei unabhängigen Messungen der Fraktionen nach der Spitze des Hauptpeaks in der FPLC. Die PSM-Werte wurden auf aIF2 $\beta$ -1 normiert.

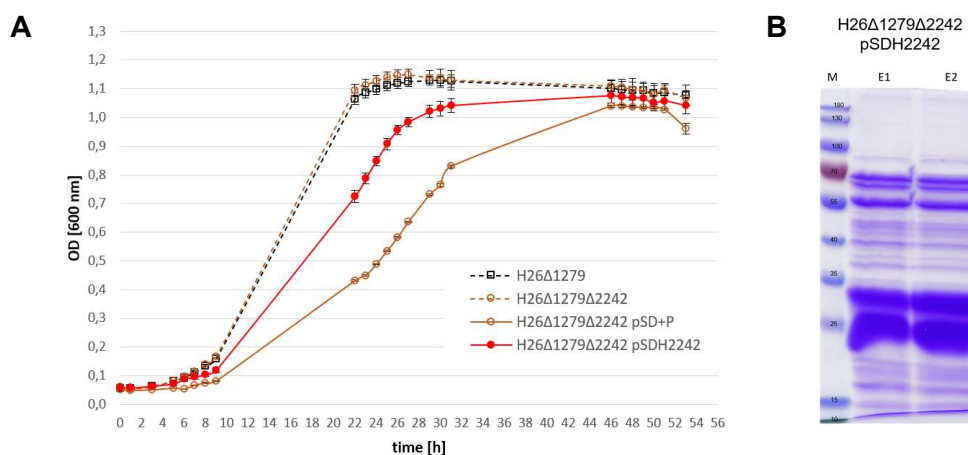
**Tabelle 63: MS-Analyse der Fraktionen nach der Spitze des Hauptpeaks von aIF2 $\beta$ -1 (n=3)**

Description	Accession	Genloci	MW [kDa]	PSM [%] n=3	PSM [%] std.
1.aIF2 $\beta$ -1	D4GZP2	HVO_1678	14,9	100,0	0,0
2.aIF2 $\alpha$	D4GT46	HVO_0699	29,5	14,2	12,4
Translation					

Die Proteine wurden nach dem größten PSM-Wert abwärts sortiert. Mit aIF2 $\beta$ -1 konnte auch hier nur aIF2 $\alpha$  als weiteres Protein in allen drei Fraktionen nachgewiesen werden.

3.2.3.3 aIF2 $\beta$ -2

Das zweite orthologe Gen von aIF2 $\beta$  ist 201 nt länger als aIF2 $\beta$ -1 und damit 609 nt lang. Die Sequenzidentität zwischen aIF2 $\beta$ -1 und aIF2 $\beta$ -2 beläuft sich auf 39,3 %. Da dieser Faktor deletiert werden konnte, wurde er als nicht essenziell eingestuft. Die Überexpression von aIF2 $\beta$ -2 fand in der Deletionsmutante H26 $\Delta$ 1279 $\Delta$ 2242 mit dem Plasmid pSDH2242 statt. Bei den Wachstumsversuchen zeigte sich, dass sich die Deletionsmutante von aIF2 $\beta$ -2 unter optimalen Wachstumsbedingungen wie der Wildtyp verhielt. Hingegen wuchs die Überexpressionsmutante besser als die Deletionsmutante mit Leerplasmid (Abbildung 33A).



**Abbildung 33: Charakterisierung des aIF2 $\beta$ -2 (HVO\_2242)**

**A.** Im Wachstumsversuch bei 42 °C in Komplexmedium wuchs die Deletionsmutante ( $\Delta$ 2242) ähnlich zum Wildtyp ( $\Delta$ 1279). Im Vergleich dazu wuchs die Überexpressionsmutante (pSDH2242) besser als die Kontrolle mit dem Leerplasmid ( $\Delta$ 2242 pSD+P). **B.** Die Elutionsschritte der Überexpression von aIF2 $\beta$ -2 (22,2 kDa) nach der Affinitätsaufreinigung auf einem 12 % SDS-Polyacrylamidgel, Coomassie-gefärbt.

In Abbildung 33B sind die Elutionsschritte der Überexpression von aIF2 $\beta$ -2 auf einem Polyacrylamidgel, Coomassie-gefärbt, dargestellt. Nach der Aufreinigung der Überexpression von aIF2 $\beta$ -2 zeigten sich zwei starke Banden zwischen 25 und 30 kDa in den Elutionsfraktionen. Diese Banden wurden aus dem SDS-Gel einzeln ausgeschnitten und in der MS analysiert. Beide Banden wurden als aIF2 $\beta$ -2 identifiziert (Daten nicht gezeigt). Von drei Affinitätsaufreinigungen wurde jeweils die zweite Elutionsfraktion in der MS analysiert.

In der MS-Analyse von aIF2 $\beta$ -2 konnten 29 Proteine in drei Elutionsfraktionen nachgewiesen werden (Tabelle 64). Davon waren zwei Proteine nicht charakterisiert und 19 Proteine konnten molekularbiologischen Prozessen zugeordnet werden. Unter anderem war dies die Translation, Transkription und ribosomale Proteine. Bei der Translation konnten mit aIF2 $\beta$ -2 die beiden anderen Untereinheiten aIF2 $\alpha$  und aIF2 $\gamma$  des trimeren Faktors aIF2 mitgereinigt werden. Zusätzlich konnte aIF5B und zwei Elongationsfaktoren mitgereinigt werden.

Für die Transkription konnte ein Transkriptionsregulator identifiziert werden. Zu den mitgereinigten ribosomalen Proteinen gehören zwei Proteine der kleinen 30S ribosomalen Untereinheit sowie sieben Proteine der großen 50S ribosomalen Untereinheit.

**Tabelle 64: Einteilung der mitgereinigten Proteine von aIF2 $\beta$ -2**

Group	Specification	Description	Genloci	Accession
Translation	aIFs	<b>aIF2<math>\beta</math>-2</b>	<b>HVO_2242</b>	<b>L9VAS4</b>
		aIF2 $\alpha$	HVO_0699	D4GT46
		aIF2 $\gamma$	HVO_1901	D4GTD4
		aIF5B	HVO_1963	D4GTJ2
	aEFs	aEF1 $\alpha$	HVO_2413	L9V6J4
		aEF2	HVO_0356	L9UK07
	30S rpS	30S rpS3Ae	HVO_1145	D4GWA5
		30S rpS11	HVO_2782	L9V5R1
	50S rpL	50S rpL2	HVO_2561	D4GTZ3
		50S rpL3	HVO_2564	L9V5K9
		50S rpL4	HVO_2563	D4GTZ5
		50S rpL18	HVO_2545	P50563
		50S rpL18e	HVO_2779	D4GWY3
		50S rpL22	HVO_2559	L9V5K3
		50S rpL30	HVO_2543	L9V5X1
Transcription	regulator	IcIR family transcription regulator	HVO_2108	D4GUQ5
RNA turnover	ribonuclease	Ribonuclease J	HVO_2724	L9V5P6
Protein turnover	thermosome	Thermosome subunit 2	HVO_0455	O30560
		Thermosome subunit 3	HVO_0778	Q9HHA2

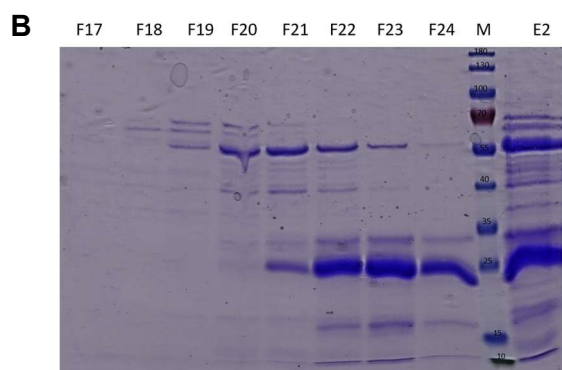
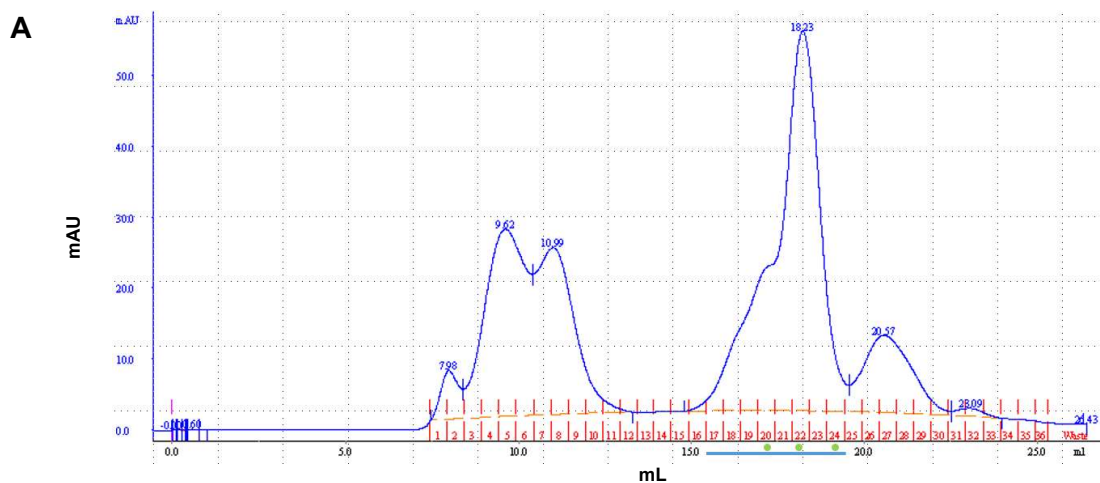


### 3.2.3.3.1 FPLC von *alF2 $\beta$ -2*

Für die FPLCs von *alF2 $\beta$ -2* wurden drei unabhängige exponentielle Kulturen aufgeschlossen und die Affinitätsaufreinigung, wie zuvor beschrieben, durchgeführt. Anschließend wurde jeweils die zweite Elutionsfraktion direkt in der FPLC aufgetrennt. Die Spektren der FPLC sahen für *alF2 $\beta$ -2* sehr ähnlich aus, weshalb hier eines exemplarisch (Abbildung 34A) gezeigt wird. Während des FPLC-Laufes wurden die nach Größe aufgetrennten Proteinkomplexe bzw. Proteine in Fraktionen gesammelt und anschließend dialysiert, bevor sie auf ein SDS-Gel aufgetragen wurden. Auch hier ließ sich die Doppelbande anschließend auf dem SDS-Gel nachweisen (Abbildung 34B).

Im Spektrum zeigten sich drei große und drei kleine Peaks (Abbildung 34A). Proteine konnten nur im Hauptpeak nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Die Fraktion 20, 22 und 24 wurden mittels MS analysiert. Dies erfolgte ebenfalls in den zwei weiteren FPLC-Läufen, die ähnlich zu dem hier gezeigten Spektrum verliefen. Die Fraktionen wurden zusammengefasst: MS-Analyse der Proteine in der Schulter des Hauptpeaks (I; F20), die Spitze des Hauptpeaks (II; F22) sowie nach der Spitze des Hauptpeaks (III; F24). Die Auswertung der MS-Daten erfolgte wie im Kapitel 3.2.3.1.1 FPLC von *alF2 $\alpha$*  beschrieben.



**Abbildung 34: FPLC-Analyse des Eluats nach der Affinitätsaufreinigung von *alF2 $\beta$ -2***

**A.** Das Diagramm der FPLC mit der Auftrennung und den Fraktionen. Die grünen Punkte markieren die Fraktionen, die aus drei FPLCs in der MS analysiert wurden.  
**B.** Die Fraktionen 17-24 der nativen FPLC, dialysiert, auf einem 12 %-SDS-Polyacrylamidgel Coomassie gefärbt, im Vergleich zum Eluat.

I. In der Schulter des Hauptpeaks: 28 Proteine in drei FPLC-Läufen identifiziert

Die Verteilung der Proteine anhand ihrer PSM-Werte von drei unabhängigen Aufreinigungen und anschließender FPLC ist in Tabelle 65 absteigend dargestellt. Analyse der PSM-Werte dreier unabhängiger Messungen der Fraktionen aus der Schulter des Hauptpeaks in der FPLC. Die PSM-Werte wurden auf aIF2 $\beta$ -2 normiert. Die Proteine wurden nach dem größten PSM-Wert abwärts sortiert.

**Tabelle 65: MS-Analyse der Fraktionen in der Schulter des Hauptpeaks von aIF2 $\beta$ -2 (n=3)**

	Description	Accession	Genloci	MW [kDa]	PSM [%] n=3	PSM [%] std.
1.	aIF2 $\beta$ -1	D4GZP2	HVO_1678	14,9	504,5	640,8
2.	aEF1 $\alpha$	L9V6J4	HVO_2413	45,6	164,1	110,5
3.	Succinate dehydrogenase	L9V5C0	HVO_2808	67,6	132,8	140,1
4.	<b>aIF2<math>\beta</math>-2</b>	<b>L9VAS4</b>	<b>HVO_2242</b>	<b>22,2</b>	<b>100,0</b>	<b>0,0</b>
5.	aIF2 $\alpha$	D4GT46	HVO_0699	29,5	71,3	5,8
6.	Putative phosphoribosyltransferase	D4GVU2	HVO_2226	39,6	67,8	54,4
7.	aIF2 $\gamma$	D4GTD4	HVO_1901	43,9	61,0	23,4
8.	Aspartate carbamoyltransferase	D4GY71	HVO_1454	33,7	50,9	34,1
9.	PhoJ domain protein	D4GWT4	HVO_1181	38,4	47,1	38,1
10.	F420H2:NADP oxidoreductase	D4GRX4	HVO_0433	23,3	40,3	21,0
11.	NAD-dependent glucose-6-phosphate dehydrogenase	D4GS48	HVO_0511	29,3	40,1	30,7
12.	Serine hydroxymethyltransferase	D4GXG2	HVO_2862	44,3	35,7	46,5
13.	Thermosome subunit 3	Q9HHA2	HVO_0778	55,2	33,0	35,7
14.	Thermosome subunit 2	O30560	HVO_0455	59,3	28,4	18,8
15.	RNA-binding protein Lsm	D4GW47	HVO_2723	8,3	21,4	20,2
16.	Cobalt-precorrin-5A hydrolase	D4GP61	HVO_B0059	34,5	19,7	13,1
17.	Chaperone protein DnaK	L9VEI0	HVO_1590	67,2	18,9	14,0
18.	Biotin carboxylase	L9V6D6	HVO_2486	65,3	18,8	9,8
19.	Siderophore biosynthesis protein lucC	D4GP43	HVO_B0041	70,1	17,7	15,8
20.	IcIR family transcription regulator	D4GUQ5	HVO_2108	28	17,3	8,8
21.	Thiamine thiazole synthase	D4GSS5	HVO_0665	32,4	14,3	11,7
22.	Uncharacterized protein	L9V5N6	HVO_2796	12	11,5	6,9
23.	DNA repair and recombination protein RadA	Q48328	HVO_0104	37,3	11,1	7,6
24.	DRTGG domain protein	D4GVH6	HVO_0999	39,8	10,0	6,6
25.	SufB domain protein	D4GUK8	HVO_0861	44,7	9,9	6,0
26.	M20 family amidohydrolase	D4GXW6	HVO_1395	45,4	8,0	7,7
27.	Ferredoxin--nitrite reductase	L9VDY4	HVO_1788	66,6	5,8	4,7
28.	Aldehyde dehydrogenase	D4GWU7	HVO_1189	56,1	5,2	5,1

Translation

Transcription

Insgesamt konnten 28 Proteine in allen drei Fraktionen identifiziert werden. Darunter vier aIFs und der Elongationsfaktor aEF1 $\alpha$ .

Unerwartet war aIF2 $\beta$ -1, das am häufigsten identifizierte Protein, mit dem höchsten PSM-Wert. Der Anteil war im Schnitt um das fünffache höher.

Die aIF2 $\beta$ -2-Untereinheit sowie die aIF2 $\gamma$ - und aIF2 $\alpha$ -Untereinheit konnten ebenfalls identifiziert werden und lagen unter den sieben Proteinen mit dem höchsten PSM-Wert.

## II. In der Spitze des Hauptpeaks: acht Proteine in drei FPLC-Läufen identifiziert

Die Verteilung der Proteine anhand ihrer PSM-Werte von drei unabhängigen Aufreinigungen und anschließender FPLC ist in Tabelle 66 absteigend dargestellt. Analyse der PSM-Werte dreier unabhängiger Messungen der Fraktionen aus der Spitze des Hauptpeaks in der FPLC. Die PSM-Werte wurden auf aIF2 $\beta$ -2 normiert. Die Proteine wurden nach dem größten PSM-Wert abwärts sortiert.

**Tabelle 66: MS-Analyse der Spitze des Hauptpeaks von aIF2 $\beta$ -2 (n=3)**

Description	Accession	Genloci	MW [kDa]	PSM [%] n=3	PSM [%] std.
1. aIF2 $\beta$ -2	L9VAS4	HVO_2242	22,2	100,0	0,0
2. aIF2 $\beta$ -1	D4GZP2	HVO_1678	14,9	52,2	64,7
3. aIF2 $\alpha$	D4GT46	HVO_0699	29,5	23,0	37,3
4. HGPRTase-like protein	L9URM2	HVO_1072	20,5	7,8	8,0
5. Aspartate carbamoyltransferase	D4GY71	HVO_1454	33,7	6,8	2,6
6. UPF0058 family protein	D4GYA8	HVO_1473	10,3	4,2	0,7
7. Putative glutamate--argW ligase	D4GYP1	HVO_0046	31,9	2,7	2,2
8. NAD-dependent glucose-6-phosphate dehydrogenase	D4GS48	HVO_0511	29,3	2,3	0,7
Translation					

aIF2 $\beta$ -2 war in diesen Fraktionen das am häufigsten identifizierte Protein mit dem höchsten PSM-Wert. Die aIF2 $\beta$ -1-Untereinheit sowie die aIF2 $\alpha$ -Untereinheit konnten ebenfalls identifiziert werden und lagen unter den drei Proteinen mit den höchsten PSM-Wert. Die Untereinheit aIF2 $\gamma$  konnte nicht nachgewiesen werden.

## III. Nach der Spitze des Hauptpeaks: sechs Proteine in drei FPLC-Läufen identifiziert

Die Verteilung der Proteine anhand ihrer PSM-Werte von drei unabhängigen Aufreinigungen und anschließender FPLC ist in Tabelle 67 absteigend dargestellt. Analyse der PSM-Werte dreier unabhängiger Messungen der Fraktionen nach der Spitze des Hauptpeaks in der FPLC. Die PSM-Werte wurden auf aIF2 $\beta$ -2 normiert. Die Proteine wurden nach dem größten PSM-Wert abwärts sortiert.

**Tabelle 67: MS-Analyse der Fraktionen nach der Spitze des Hauptpeaks aIF2 $\beta$ -2 (n=3)**

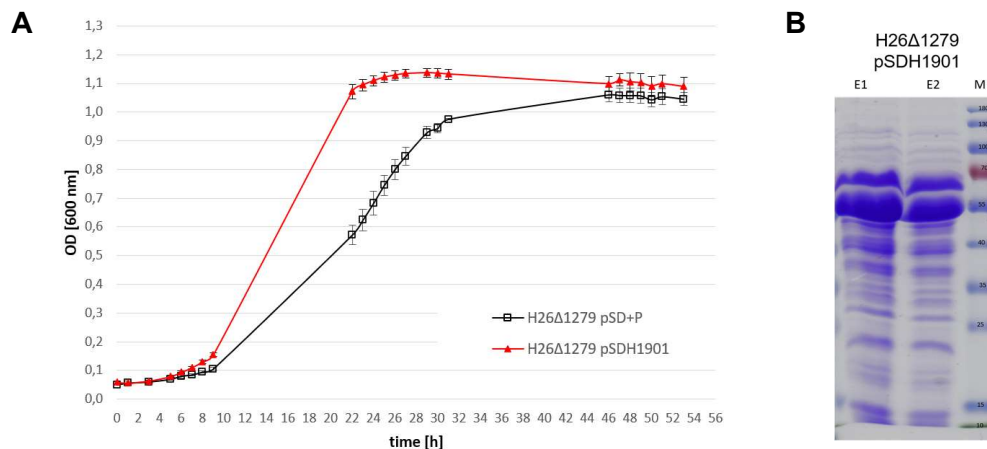
Description	Accession	Genloci	MW [kDa]	PSM [%] n=3	PSM [%] std.
1. aIF2 $\beta$ -2	L9VAS4	HVO_2242	22,2	407,0	427,2
2. aIF2 $\beta$ -1	D4GZP2	HVO_1678	14,9	121,0	69,5
3. aIF2 $\alpha$	D4GT46	HVO_0699	29,5	25,3	9,7
4. HGPRTase-like protein	L9URM2	HVO_1072	20,5	10,7	11,5
5. aEF1 $\alpha$	L9V6J4	HVO_2413	45,6	8,7	4,2
6. 5'-nucleotidase SurE	L9V6Z6	HVO_A0228	32	7,0	6,9
Translation					

Der Faktor  $\alpha F2\beta$ -2 war in diesen Fraktionen das am häufigsten identifizierte Protein mit dem höchsten PSM-Wert. Die  $\alpha F2\beta$ -1-Untereinheit sowie die  $\alpha F2\alpha$ -Untereinheit konnten ebenfalls identifiziert werden und lagen unter den vier Proteinen mit dem höchsten PSM-Wert. Die Untereinheit  $\alpha F2\gamma$  konnte nach der Spitze des Hauptpeaks nicht nachgewiesen werden.

### 3.2.3.4 $\alpha F2\gamma$

$\alpha F2\gamma$  ist die größte Untereinheit des  $\alpha F2$  und sowohl in Archaeen als auch in Eukaryonten essenziell (Gäbel *et al.*, 2013). Der Initiationsfaktor  $\alpha F2\gamma$  wurde im Wildtyp überexprimiert, da eine Deletion nicht möglich war und der Faktor deshalb als essenziell eingestuft wurde. Die Überexpression des N-terminal mit einem His-Tag versehenen  $\alpha F2\gamma$  fand im Stamm H26 $\Delta$ 1279 mit dem Plasmid pSDH1901 statt. In Komplexmedium unter optimalen Bedingungen zeigte die Überexpressionsmutante ein sehr viel besseres Wachstum als die Kontrolle mit dem Leerplasmid (Abbildung 35A).

Nach der Affinitätsaufreinigung der Überexpression des  $\alpha F2\gamma$  konnte auf dem SDS-Gel sowohl  $\alpha F2\gamma$  (44 kDa) sowie viele mitgereinigte Proteine visualisiert werden (Abbildung 35B). Zwei breitere Banden erschienen zwischen 55-75 kDa. Von drei Affinitätsaufreinigungen wurde jeweils die zweite Elutionsfraktion in der MS analysiert.



**Abbildung 35: Charakterisierung des  $\alpha F2\gamma$  (HVO\_1901)**

**A.** Im Wachstumsversuch bei 42 °C in Komplexmedium wuchs die Überexpressionsmutante (pSDH1901) sehr viel besser als die Kontrolle ( $\Delta$ 1279 pSD+P) mit dem Leerplasmid. **B.** Die Elutionsschritte der Überexpression von  $\alpha F2\gamma$  (44 kDa) nach der Affinitätsaufreinigung auf einem 12 % SDS-Polyacrylamidgel, Coomassie-gefärbt.

In drei Messungen konnten in der MS-Analyse 38 Proteine identifiziert werden. Sechs Proteine waren nicht charakterisiert, elf Proteine konnten in die molekularbiologischen Prozesse eingeordnet werden (Tabelle 68).

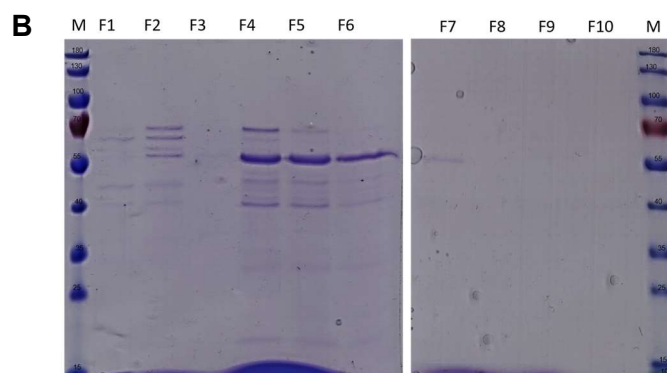
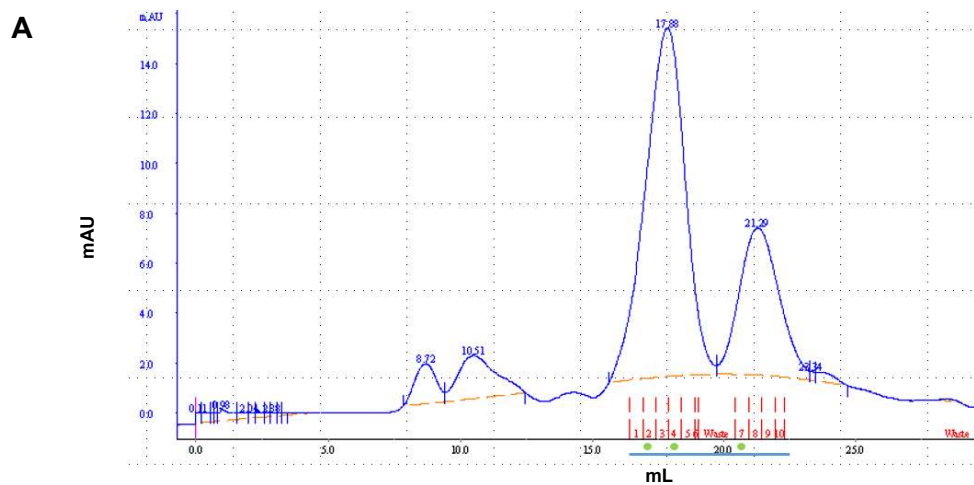
Hierzu zählten in der Translation die beiden weiteren Untereinheiten von  $\alpha F2$ , nämlich  $\alpha F2\alpha$  und  $\alpha F2\beta$ -2. Zusätzlich konnte  $\alpha F2\beta\delta$ -1 sowie  $\alpha F5B$  mitgereinigt werden. Für die Transkription konnte unter anderem eine Untereinheit der RNA-Polymerase nachgewiesen werden. Des Weiteren konnte rpl2 als 50S ribosomales Protein mitgereinigt werden.

Tabelle 68: Einteilung der mitgereinigten Proteine von aIF2 $\gamma$ 

Group	Specification	Description	Genloci	Accession
Translation	aIFs	aIF2 $\gamma$	HVO_1901	D4GTD4
	aIFs	aIF2 $\alpha$	HVO_0699	D4GT46
	aIFs	aIF2 $\beta$ -2	HVO_2242	L9VAS4
	aIFs	aIF2B $\delta$ -1	HVO_0966	L9USK7
	aIFs	aIF5B	HVO_1963	D4GTJ2
	aEFs	aEF1 $\alpha$	HVO_2413	L9V6J4
	aEFs	aEF2	HVO_0356	L9UK07
	50S rpL	50S rpL2	HVO_2561	D4GTZ3
Transcription	RNAP-subunits	rpoB2	HVO_0347	L9UK99
	regulator	HTH domain protein	HVO_1133	D4GW85
	regulator	Transcriptional regulator	HVO_0179	L9UGU5

### 3.2.3.4.1 FPLC von aIF2 $\gamma$

Für die FPLCs von aIF2 $\gamma$  wurden drei unabhängige exponentielle Kulturen aufgeschlossen und die Proteinaufreinigung, wie zuvor beschrieben, durchgeführt. Anschließend wurde jeweils die zweite Elutionsfraktion direkt in der FPLC aufgetrennt. Die Spektren sahen sehr ähnlich aus, weshalb hier eines exemplarisch in [Abbildung 36A](#) gezeigt ist.



### Abbildung 36: FPLC-Analyse des Eluats nach der Affinitätsaufreinigung von aIF2 $\gamma$

**A.** Das Diagramm der FPLC mit der Auftrennung der Elutionsfraktion. Die Fraktionen sind als rote Ziffern auf der x-Achse markiert. Die grünen Punkte unter der x-Achse markieren die Fraktionen, die aus drei FPLCs in der MS analysiert wurden. **B.** Fraktionen der nativen FPLC, nach der Dialyse, auf einem 12 %-SDS-Polyacrylamidgel Coomassie gefärbt.

Während des FPLC-Laufs wurden die nach Größe aufgetrennten Proteinkomplexe bzw. Proteine in Fraktionen gesammelt und anschließend dialysiert, bevor sie auf ein SDS-Gel aufgetragen wurden. Hierbei konnten für Fraktion 1-8 die Proteine mittels Coomassiefärbung auf dem SDS-Gel sichtbar gemacht werden (Abbildung 36B).

In den Spektren der FPLCs von aIF2 $\gamma$  zeigten sich zwei kleine Peaks, gefolgt von zwei großen Peaks. In den kleinen Peaks konnten im SDS-Gel keine Proteine nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Im letzteren der beiden großen Peaks konnte für die Fraktionen 7-8 mehrere Proteine auf dem SDS-Gel visualisiert werden. Für die Fraktionen 9-10 konnten auf dem SDS-Gel keine Proteine mehr sichtbar gemacht werden (Abbildung 36B).

Jeweils drei dieser gesammelten Fraktionen wurden mittels MS analysiert. Diese befanden sich im Hauptpeak vor der Spitze (I; F2), nach der Spitze des Hauptpeaks (II, F4) und zu Beginn des zweithöchsten Peaks (III; F7). In der Abbildung 36A entsprechen die verwendeten Fraktionen den Fraktionen mit den grünen Punkten. Die Analyse erfolgte für drei FPLC-Läufe. Die Auswertung der MS-Daten erfolgte wie im Kapitel 3.2.3.1.1 FPLC von aIF2 $\alpha$  beschrieben.

**I. Zu Beginn des Hauptpeaks: 43 Proteine in drei FPLC-Läufen identifiziert**

Die Verteilung der Proteine anhand ihrer PSM-Werte von drei unabhängigen Aufreinigungen und anschließender FPLC ist in Tabelle 69 absteigend dargestellt. Analyse der PSM-Werte dreier unabhängiger Messungen der Fraktionen zu Beginn des Hauptpeaks in der FPLC. Die PSM-Werte wurden auf aIF2 $\gamma$  normiert. Die Proteine wurden nach dem größten PSM-Wert abwärts sortiert.

**Tabelle 69: MS-Analyse der FPLC-Fraktionen zu Beginn des Hauptpeaks von aIF2 $\gamma$  (n=3)**

	Description	Accession	Genloci	MW [kDa]	PSM [%] n=3	PSM [%] std.
1.	aIF2 $\alpha$	D4GT46	HVO_0699	29,5	1760,1	765,9
2.	Putative phosphoribosyltransferase	D4GVU2	HVO_2226	39,6	649,2	675,6
3.	Succinate dehydrogenase or fumarate reductase	L9V5C0	HVO_2808	67,6	585,1	235,4
4.	aEF2	L9UK07	HVO_0356	80,4	481,3	724,4
5.	Uncharacterized protein	D4H0D4	HVO_C0046	20,1	478,6	172,9
6.	Serine O-acetyltransferase	D4GTN2	HVO_2004	31,9	457,3	60,0
7.	RNA-binding protein Lsm	D4GW47	HVO_2723	8,3	243,7	85,0
8.	PhoU domain protein	D4GWT4	HVO_1181	38,4	231,4	297,9
9.	aIF2B $\delta$ -1	L9USK7	HVO_0966	34,9	225,6	245,4
10.	aIF5B	D4GTJ2	HVO_1963	65,3	210,2	281,5
11.	3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase	L9V660	HVO_2583	41,1	202,6	265,1
12.	NAD-dependent glucose-6-phosphate dehydrogenase	D4GS48	HVO_0511	29,3	180,9	115,9
13.	Uncharacterized protein	D4GUI2	HVO_2629	30,3	172,5	62,8
14.	Probable urocanate hydratase	L9VJP1	HVO_A0562	67,9	172,3	156,0
15.	Putative DNA helicase Rad25	L9VE99	HVO_1723	76,8	171,0	184,9
16.	Aconitate hydratase	L9VCX4	HVO_1955	70,4	161,5	199,3
17.	Uridine phosphorylase	L9VEV3	HVO_1579	29	158,1	167,0

18.	AAA-type ATPase (CDC48 subfamily)	D4GWM8	HVO_2380	81,9	139,8	160,8
19.	Uncharacterized protein	L9V5N6	HVO_2796	12	120,9	60,0
20.	Uncharacterized protein	L9URS0	HVO_1018	69,8	116,7	125,7
21.	Siderophore biosynthesis protein lucC	D4GP43	HVO_B0041	70,1	110,3	64,8
22.	Putative glutamate--argW ligase	D4GYP1	HVO_0046	31,9	109,3	83,1
23.	HGPRTase-like protein	L9URM2	HVO_1072	20,5	107,3	145,8
24.	<b>aIF2<math>\gamma</math></b>	<b>D4GTD4</b>	<b>HVO_1901</b>	<b>43,9</b>	<b>100,0</b>	<b>0,0</b>
25.	rpoB1	L9UJM2	HVO_0348	67,7	90,2	26,8
26.	Serine hydroxymethyltransferase	D4GXG2	HVO_2862	44,3	84,0	94,0
27.	M20 family amidohydrolase	D4GXW6	HVO_1395	45,4	81,4	23,8
28.	Putative nickel-responsive regulator	D4GWQ6	HVO_2409	15,2	75,6	3,1
29.	NADH dehydrogenase-like complex subunit CD	L9URY6	HVO_0980	63,4	75,4	40,0
30.	ABC-type transport system ATP-binding protein	D4GS85	HVO_1760	32,4	64,8	18,0
31.	Chaperone protein DnaK	L9VEI0	HVO_1590	67,2	62,5	32,6
32.	Fructose-bisphosphate aldolase class 2	D4GYE0	HVO_1494	36,3	61,3	76,8
33.	SufB domain protein	D4GUK8	HVO_0861	44,7	59,1	35,8
34.	Isocitrate dehydrogenase [NADP]	D4GU92	HVO_2588	45,8	55,0	31,8
35.	Ribonuclease Z	L9UJH9	HVO_0144	34,1	48,4	16,1
36.	Acetate--CoA ligase (ADP-forming)	D4GVH7	HVO_1000	74,5	44,4	34,4
37.	XerC/D-like integrase	D4GZ49	HVO_1620	39,1	43,8	9,8
38.	DNA repair and recombination protein RadB	L9V6G6	HVO_2383	24,6	41,1	7,7
39.	Branched-chain amino acid aminotransferase	L9UK29	HVO_0329	35	36,8	16,6
40.	Uncharacterized protein	D4GWI1	HVO_2332	19,4	31,8	8,6
41.	tRNA(Met) cytidine acetyltransferase TmcA	D4GW73	HVO_2736	81,2	30,2	15,3
42.	Hydantoin racemase	D4GR45	HVO_A0377	28,5	27,0	17,5
43.	Uncharacterized protein	L9V6R9	HVO_2519	40,7	22,9	11,6
Translation		Transcription				

Insgesamt konnten 43 Proteine in allen drei Fraktionen identifiziert werden. Darunter vier Initiationsfaktoren. Zu Beginn des Hauptpeaks von aIF2 $\gamma$  konnte unerwarteterweise aIF2 $\alpha$  mit dem höchsten PSM-Wert identifiziert werden. Der Faktor aIF2 $\gamma$  folgte erst als 24. Protein. Als weitere Translationsinitiationsfaktoren konnte aIF5B sowie aIF2B $\delta$ -1 identifiziert werden.

## II. In der Spitze des Hauptpeaks: 46 Proteine in drei FPLC-Läufen identifiziert

Die Verteilung der Proteine anhand ihrer PSM-Werte von drei unabhängigen Aufreinigungen und anschließender FPLC ist in [Tabelle 70](#) absteigend dargestellt. Analyse der PSM-Werte dreier unabhängiger Messungen der Fraktionen aus der Spitze des Hauptpeaks in der FPLC. Die PSM-Werte wurden auf aIF2 $\gamma$  normiert. Die Proteine wurden nach dem größten PSM-Wert abwärts sortiert.

**Tabelle 70: MS-Analyse der FPLC-Fraktionen in der Spitze des Hauptpeaks von aIF2 $\gamma$  (n=3)**

	Description	Accession	Genloci	MW [kDa]	PSM [%] n=3	PSM [%] std.
1.	aEF1 $\alpha$	L9V6J4	HVO_2413	45,6	3602,3	3811,5
2.	Succinate dehydrogenase or fumarate reductase	L9V5C0	HVO_2808	67,6	1592,2	1168,4
3.	aIF2 $\alpha$	D4GT46	HVO_0699	29,5	1422,8	1389,5

4.	NAD-dependent glucose-6-phosphate dehydrogenase	D4GS48	HVO_0511	29,3	1291,7	1640,3
5.	PhoU domain protein	D4GWT4	HVO_1181	38,4	887,5	1379,4
6.	Putative phosphoribosyltransferase (Homolog to anthranilate phosphoribosyltransferase)	D4GVU2	HVO_2226	39,6	809,2	837,7
7.	F420H2:NADP oxidoreductase	D4GRX4	HVO_0433	23,3	781,8	920,3
8.	<b>aEF2</b>	<b>L9UK07</b>	<b>HVO_0356</b>	<b>80,4</b>	<b>761,7</b>	<b>1245,8</b>
9.	HGPRTase-like protein	L9URM2	HVO_1072	20,5	492,8	751,0
10.	Aspartate carbamoyltransferase	D4GY71	HVO_1454	33,7	408,8	425,4
11.	Cobalt-precorrin-5A hydrolase	D4GP61	HVO_B0059	34,5	405,5	550,0
12.	Putative glutamate--argW ligase	D4GYP1	HVO_0046	31,9	349,7	443,0
13.	Serine O-acetyltransferase	D4GTN2	HVO_2004	31,9	348,0	158,3
14.	tRNA (pseudouridine(54)-N(1))-methyltransferase	L9VBV1	HVO_1989	21,9	325,3	330,3
15.	DRTGG domain protein	D4GVH6	HVO_0999	39,8	324,3	515,9
16.	IcIR family transcription regulator	D4GUQ5	HVO_2108	28	278,7	194,3
17.	AAA-type ATPase (CDC48 subfamily)	D4GWM8	HVO_2380	81,9	260,7	380,6
18.	Lrp/AsnC family transcription regulator	D4GSB6	HVO_1792	18,1	234,3	183,3
19.	Sensor box protein	D4GPK3	HVO_B0202	33,5	221,3	149,1
20.	Transcriptional regulator	L9URY6	HVO_0980	63,4	220,8	293,9
21.	ABC-type transport system ATP-binding protein	D4GS85	HVO_1760	32,4	214,0	182,6
22.	N-type ATP pyrophosphatase superfamily protein	L9UMR4	HVO_0580	36,1	195,8	248,4
23.	Siderophore biosynthesis protein lucC	D4GP43	HVO_B0041	70,1	192,7	108,1
24.	Serine hydroxymethyltransferase	D4GXG2	HVO_2862	44,3	188,3	169,1
25.	NADH dehydrogenase-like complex subunit CD	L9UGU5	HVO_0179	28	181,0	189,7
26.	Putative nickel-responsive regulator	D4GWQ6	HVO_2409	15,2	172,2	113,5
27.	<b>aEF1<math>\alpha</math>-like protein</b>	<b>L9V605</b>	<b>HVO_2575</b>	<b>57,8</b>	<b>169,5</b>	<b>99,3</b>
28.	DNA repair and recombination protein RadB	L9V6G6	HVO_2383	24,6	147,3	166,9
29.	Transcriptional regulator	L9UK32	HVO_2928	27,5	143,3	60,3
30.	Uncharacterized protein	D4GUI2	HVO_2629	30,3	136,7	158,9
31.	5'-nucleotidase SurE	L9V6Z6	HVO_A0228	32	117,8	158,1
32.	RNA-binding protein Lsm	D4GW47	HVO_2723	8,3	117,2	71,8
33.	Ribonuclease P protein component 3	D4GW15	HVO_1094	25,6	113,3	75,7
34.	<b>aIF2<math>\gamma</math></b>	<b>D4GTD4</b>	<b>HVO_1901</b>	<b>43,9</b>	<b>100,0</b>	<b>0,0</b>
35.	Thiamine thiazole synthase	D4GSS5	HVO_0665	32,4	91,8	46,2
36.	Hydantoin racemase	D4GR45	HVO_A0377	28,5	90,7	54,6
37.	Uncharacterized protein	D4GWI1	HVO_2332	19,4	82,0	67,9
38.	Dihydroxyacetone kinase subunit DhaK	L9VFD8	HVO_1546	34,8	81,5	43,3
39.	Uncharacterized protein	L9V5N6	HVO_2796	12	79,7	38,2
40.	Ferredoxin--nitrite reductase	D4GQG0	HVO_A0129	11,7	74,0	76,9
41.	Xaa-Pro aminopeptidase, M24 family protein	L9V167	HVO_A0376	39,8	64,7	49,7
42.	Uncharacterized protein	L9VDY4	HVO_1788	66,6	58,3	33,3
43.	Fructose-bisphosphate aldolase class 2	D4GYE0	HVO_1494	36,3	52,8	33,1
44.	<b>30S rpS2</b>	<b>L9V5L7</b>	<b>HVO_2773</b>	<b>28,3</b>	<b>49,8</b>	<b>45,3</b>
45.	Ribonuclease Z	L9UHH9	HVO_0144	34,1	49,0	22,9
46.	Uncharacterized protein	L9UTZ7	HVO_1128	32,3	48,3	44,8
Translation		Transcription				

Insgesamt konnten 46. Proteine in drei Fraktionen identifiziert werden, darunter zwei aIFs. Die aIF2 $\gamma$ -Untereinheit konnte nur als 34. Protein identifiziert werden. Der Elongationsfaktor aEF1 $\alpha$  konnte mit dem höchsten PSM-Wert identifiziert werden. Die Untereinheit aIF2 $\alpha$  konnte als dritthäufigstes Protein identifiziert werden.



### III. Nach der Spitze des Hauptpeaks: 24 Proteine in drei FPLC-Läufen identifiziert

Die Verteilung der Proteine anhand ihrer PSM-Werte von drei unabhängigen Aufreinigungen und anschließender FPLC ist in Tabelle 71 absteigend dargestellt. Analyse der PSM-Werte dreier unabhängiger Messungen der Fraktionen nach der Spitze des Hauptpeaks in der FPLC. Die PSM-Werte wurden auf aIF2 $\alpha$  normiert. Die Proteine wurden nach dem größten PSM-Wert abwärts sortiert.

**Tabelle 71: MS-Analyse der FPLC-Fraktionen nach der Spitze des Hauptpeaks von aIF2 $\gamma$  (n=3)**

	Description	Accession	Genloci	MW [kDa]	PSM [%] n=3	PSM [%] std.
1.	aEF1 $\alpha$	L9V6J4	HVO_2413	45,6	141,0	192,1
2.	<b>aIF2<math>\alpha</math></b>	<b>D4GT46</b>	<b>HVO_0699</b>	<b>29,5</b>	<b>100,0</b>	<b>0,0</b>
3.	HGPRTase-like protein	L9URM2	HVO_1072	20,5	64,5	105,5
4.	Aspartate carbamoyltransferase	D4GY71	HVO_1454	33,7	60,0	87,5
5.	Uncharacterized protein	L9UIP5	HVO_2899	9,8	55,6	74,2
6.	Succinate dehydrogenase or fumarate reductase	L9V5C0	HVO_2808	67,6	43,1	64,5
7.	UPF0058 family protein	D4GYA8	HVO_1473	10,3	39,6	54,2
8.	Uncharacterized protein	L9V5N6	HVO_2796	12	30,8	44,7
9.	Serine O-acetyltransferase	D4GTN2	HVO_2004	31,9	27,7	32,4
10.	F420H2:NADP oxidoreductase	D4GRX4	HVO_0433	23,3	25,2	35,9
11.	NAD-dependent glucose-6-phosphate dehydrogenase	D4GS48	HVO_0511	29,3	23,3	32,4
12.	Lrp/AsnC family transcription regulator	D4GSB6	HVO_1792	18,1	22,5	26,3
13.	Transcriptional regulator	L9UK32	HVO_2928	27,5	18,6	20,2
14.	Transcriptional regulator	L9UGU5	HVO_0179	28	17,0	22,6
15.	UCP015877 family protein	D4GS16	HVO_0476	23,8	16,4	24,9
16.	DNA repair and recombination protein RadB	L9V6G6	HVO_2383	24,6	11,6	15,5
17.	ABC-type transport system ATP-binding protein	D4GS85	HVO_1760	32,4	10,6	14,6
18.	Uncharacterized protein	D4H0D4	HVO_C0046	20,1	9,3	10,6
19.	Putative phosphoribosyltransferase	D4GVU2	HVO_2226	39,6	7,8	10,2
20.	Aspartate carbamoyltransferase regulatory chain	D4GY73	HVO_1455	16,7	7,5	8,9
21.	Ribonuclease Z	L9UJH9	HVO_0144	34,1	5,1	5,8
22.	Nascent polypeptide-associated complex protein	D4GXU3	HVO_1382	13,7	4,8	6,0
23.	50S rpL24	L9V5Y5	HVO_2553	13,4	4,6	6,2
24.	HTH domain protein	D4GW55	HVO_1116	12,6	4,6	4,6
	Translation			Transcription		

Insgesamt konnten 24. Proteine in drei Fraktionen identifiziert werden. Darunter ein aIF, ein aEF sowie ein 50S ribosomales Protein. Der Faktor aIF2 $\gamma$  konnte nur noch in einer Messung nachgewiesen werden, weshalb die Untereinheit in der Zusammenfassung der drei Fraktionen nicht vertreten ist. Normiert wurde für die Spitze des Hauptpeaks auf aIF2 $\alpha$ . aEF1 $\alpha$  war in diesen Fraktionen das am häufigsten identifizierte Protein, mit dem höchsten PSM-Wert. aIF2 $\alpha$  konnte als zweithäufigstes Protein identifiziert werden.

### 3.2.4 aIF2B und seine Untereinheiten

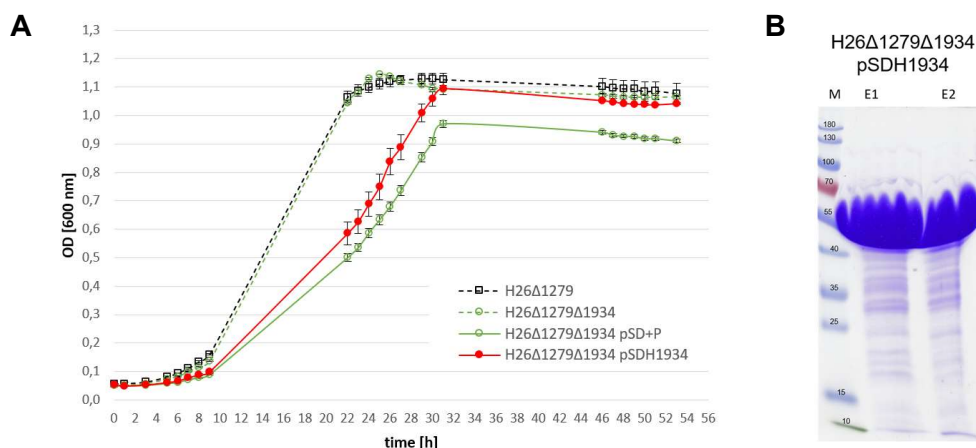
Der Initiationsfaktor aIF2B/eIF2B ist sowohl in Archaeen als auch in Eukaryonten vertreten. In Eukaryonten besteht eIF2B aus fünf Untereinheiten (Bogorad, Lin and Marintchev, 2017). In Archaeen sind es meist drei Untereinheiten. In *H. volcanii* sind zwei Untereinheiten annotiert. Diese sind aIF2B $\alpha$  (HVO\_1934) sowie zwei orthologe  $\delta$ -Untereinheiten (aIF2B $\delta$ -1 HVO\_0966; aIF2B $\delta$ -2 HVO\_2706). Von diesen drei Untereinheiten konnten aIF2B $\alpha$  und aIF2B $\delta$ -2 sowohl einzeln als auch gleichzeitig in einer Doppeldeletionsmutante ausgeschaltet werden (Gäbel et al., 2013).

#### 3.2.4.1 aIF2B $\alpha$

Das Gen des aIF2B $\alpha$  in *H. volcanii* ist 1242 nt lang und das daraus resultierende Protein ist 43,2 kDa schwer. Da das Gen von aIF2B $\alpha$  deletiert werden konnte, wurde die Überexpression in der Deletionsmutante H26 $\Delta$ dhfr $\Delta$ 1934 mit dem Plasmid pSDH1934 durchgeführt.

Die Deletionsmutante des aIF2B $\alpha$  wuchs unter optimalen Bedingungen in Komplexmedium wie der Wildtyp (Abbildung 37A). Im Vergleich hierzu wuchs die Überexpression in der Deletionsmutante besser als die Deletionsmutante mit Leerplasmid.

Nach der Affinitätsaufreinigung konnte auf dem SDS-Gel (Abbildung 37B) eine sehr starke Bande auf Höhe von aIF2B $\alpha$  (43,2 kDa), sowie viele weitere Proteinbanden nachgewiesen werden. Von drei Aufreinigungen wurde jeweils die zweite Elutionsfraktion in der MS analysiert.



**Abbildung 37: Charakterisierung des aIF2B $\alpha$  (HVO\_1934)**

**A.** Vergleich des Wachstums der Überexpression von aIF2B $\alpha$  (pSDH1934) mit der Kontrolle ( $\Delta$ 1934 pSD+P) unter optimalen Wachstumsbedingungen bei 42 °C in Komplexmedium. Die Deletionsmutante von aIF2B $\alpha$  ( $\Delta$ 1934) wuchs wie der Wildtyp ( $\Delta$ 1279). **B.** Die zwei Elutionsfraktionen von aIF2B $\alpha$  nach der Affinitätsaufreinigung auf einem 12 % SDS-Polyacrylamidgel, Coomassie-gefärbt. Das Gel zeigt die stärkste Bande für aIF2B $\alpha$  mit 43,2 kDa.

In der MS-Analyse konnten nach der Auswertung 23 Proteine in allen drei Eluat von aIF2B $\alpha$  identifiziert werden (Tabelle 72).

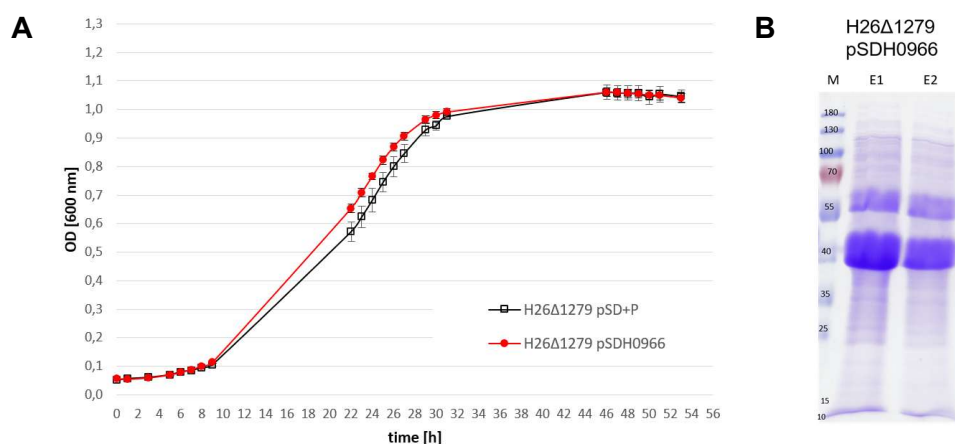
Mit aIF2B $\alpha$  konnten aIF2B $\delta$ -1 sowie aIF5B mitgereinigt werden. Die Untereinheit aIF2B $\delta$ -2 konnte nicht mitgereinigt werden. Unter anderem konnten vier 50S ribosomale Proteine sowie sechs Transkriptionsregulatoren identifiziert werden.

Tabelle 72: Einteilung der mitgereinigten Proteine von aIF2B $\alpha$ 

Group	Specification	Description	Genloci	Accession	
Translation	aIFs	aIF2B $\alpha$	HVO_1934	D4GTG3	
		aIF2B $\delta$ -1	HVO_0966	L9USK7	
		aIF5B	HVO_1963	D4GTJ2	
	aEFs	aEF1 $\alpha$	HVO_2413	L9V6J4	
		aEF1 $\alpha$ -like protein	HVO_2575	L9V605	
		aEF2	HVO_0356	L9UK07	
	50S rpl	50S rpl1	HVO_2757	P41199	
		50S rpl2	HVO_2561	D4GTZ3	
		50S rpl22	HVO_2559	L9V5K3	
		50S rpl30	HVO_2543	L9V5X1	
	Transcription	regulator	HTH domain protein	HVO_1133	D4GW85
			IcIR family transcription regulator	HVO_2108	D4GUQ5
Lrp/AsnC family transcription regulator			HVO_1792	D4GSB6	
PadR family transcription regulator			HVO_2869	D4GXH6	
Transcriptional regulator			HVO_0163	L9UFW5	
Transcriptional regulator			HVO_0179	L9UGU5	
Transcriptional regulator			HVO_2928	L9UK32	
Replication and Repair	repair	DNA repair and recombination protein RadA	HVO_0104	Q48328	
		DNA repair and recombination protein RadB	HVO_2383	L9V6G6	
	replication	ORC1-type DNA replication protein	HVO_0194	L9UGW2	
RNA turnover	ribonuclease	Ribonuclease R	HVO_0388	L9UJI9	
Protein turnover	thermosome	Thermosome subunit 2	HVO_0455	O30560	
		Thermosome subunit 3	HVO_0778	Q9HHA2	

### 3.2.4.2 aIF2B $\delta$ -1

In *H. volcanii* codiert das Gen HVO\_0966 für aIF2B $\delta$ -1 mit einer Länge von 972 nt. Das daraus resultierende Protein für aIF2B $\delta$ -1 ist 35 kDa schwer. Die vorhandene Deletionsmutante von aIF2B $\delta$ -1 konnte im Southern Blot nicht bestätigt werden, weshalb aIF2B $\delta$ -1 im Wildtyp überexprimiert wurde (Abbildung 38).



**Abbildung 38: Charakterisierung des aIF2B $\delta$ -1 (HVO\_0966)**

**A.** Vergleich des Wachstums der Überexpression von aIF2B $\delta$ -1 in H26 $\Delta$ 1279 mit der Kontrolle H26 $\Delta$ 1279 pSD+P unter optimalen Wachstumsbedingungen bei 42 °C in Komplexmedium. **B.** Affinitätsaufreinigung von aIF2B $\delta$ -1 auf einem 12 % SDS-Polyacrylamidgel, Coomassie-gefärbt mit Eluat 1 und 2.

In den Wachstumsversuchen bei 42 °C in Komplexmedium wuchs die Mutante mit der Überexpression (pSDH0966) geringfügig besser als H26Δ1279 mit dem Leerplasmid pSD+P (Abbildung 38A).

Nach der Affinitätsaufreinigung des aIF2Bδ-1 konnten auf dem SDS-Gel viele mitgereinigte Proteine nachgewiesen werden (Abbildung 38B). Darunter zwei stärkere Banden zwischen 35-70 kDa. Von drei Aufreinigungen wurde jeweils die zweite Elutionsfraktion zur MS geschickt.

Bei der Auswertung der MS-Analyse konnten 79 Proteine identifiziert werden. Mit aIF2Bδ-1 konnten fünf weitere Translationsinitiationsfaktoren mitgereinigt werden. Darunter aIF2 mit den drei Untereinheiten aIF2α aIF2β-2 aIF2γ, die zweite aIF2Bδ-2-Untereinheit sowie aIF5B. Für die Transkription konnten sieben RNAPUs mitgereinigt werden (Tabelle 73).

**Tabelle 73: Einteilung der mitgereinigten Proteine von aIF2Bδ-1**

Group	Specification	Description	Genloci	Accession	
Translation	aIFs	<b>aIF2Bδ-1</b>	<b>HVO_0966</b>	<b>L9USK7</b>	
		aIF2α	HVO_0699	D4GT46	
		aIF2β-2	HVO_2242	L9VAS4	
		aIF2γ	HVO_1901	D4GTD4	
		aIF2Bδ-2	HVO_2706	L9V7F9	
		aIF5B	HVO_1963	D4GTJ2	
	aEFs	aEF1α	HVO_2413	L9V6J4	
		aEF2	HVO_0356	L9UK07	
	30S rpS	30S rpS	30S rpS2	HVO_2773	L9V5L7
			30S rpS3	HVO_2558	D4GTZ0
			30S rpS3Ae	HVO_1145	D4GWA5
			30S rpS4e	HVO_2552	L9V7Y2
			30S rpS7	HVO_0354	L9UJR0
			30S rpS11	HVO_2782	L9V5R1
			30S rpS13	HVO_2784	L9V5M6
			30S rpS15	HVO_1148	L9UVI2
			30S rpS17	HVO_2555	D4GTY7
			30S rpS19P	HVO_2560	L9V659
	50S rpL	50S rpL	50S rpL1	HVO_2757	P41199
			50S rpL2	HVO_2561	D4GTZ3
			50S rpL3	HVO_2564	L9V5K9
			50S rpL4	HVO_2563	D4GTZ5
			50S rpL6	HVO_2548	L9V5X7
			50S rpL10	HVO_2756	P41198
			50S rpL18	HVO_2545	P50563
			50S rpL18e	HVO_2779	D4GWY3
			50S rpL22	HVO_2559	L9V5K3
			50S rpL30	HVO_2543	L9V5X1
	GTP-binding	GTP-binding protein Drg	HVO_0911	D4GUZ0	
	Transcription	RNAP-subunits	rpoA1	HVO_0349	D4GZX6
			rpoA2	HVO_0350	D4GZX7
			rpoB2	HVO_0347	L9UK99
			rpoD	HVO_2781	L9V5W2

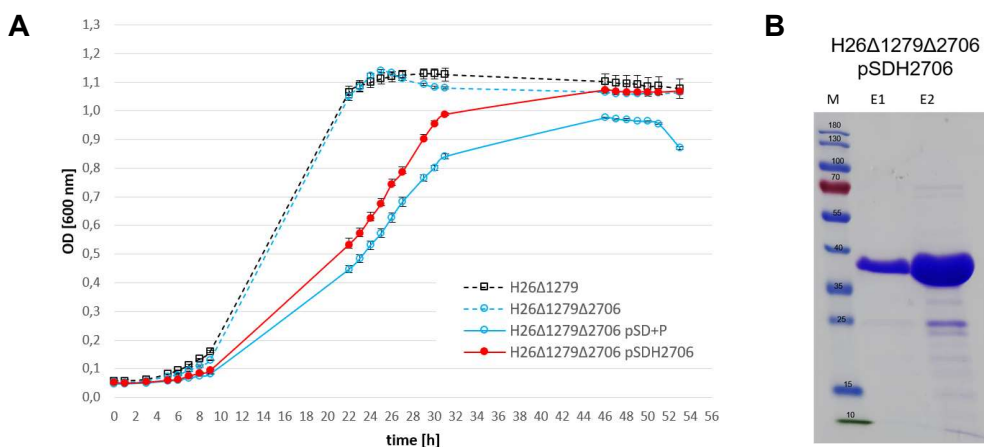
		rpoF	HVO_2748	D4GWA3
		rpoH	HVO_0346	D4GZX3
	regulator	AsnC family transcriptional regulator	HVO_2029	L9VBJ7
		HTH domain protein	HVO_1133	D4GW85
		IclR family transcription regulator	HVO_B0114	D4GPB5
		IclR family transcription regulator	HVO_2108	D4GUQ5
		Lrp/AsnC family transcription regulator	HVO_1792	D4GSB6
		Lrp/AsnC family transcription regulator	HVO_0240	D4GZI5
		PadR family transcription regulator RosR	HVO_0730	D4GT98
		Putative transcription factor	HVO_1090	D4GW09
		RNA-binding protein Lsm	HVO_2723	D4GW47
		TATA-box-binding protein	HVO_1727	L9VGC6
		TATA-box-binding protein 1	HVO_0158	D4GZA2
		Transcriptional regulator	HVO_0163	L9UFW5
		Transcriptional regulator	HVO_0179	L9UGU5
		Transcriptional regulator	HVO_2928	L9UK32
		TrmB family transcription regulator TrmB	HVO_2688	D4GVQ2
	factor	Transcription factor E	HVO_1174	L9UT88
<b>Protein folding</b>	transferase	Branched-chain amino acid aminotransferase	HVO_0329	L9UK29
	release factor	Peptide chain release factor subunit 1	HVO_0321	D4GZV0
<b>Replication and Repair</b>	repair	DNA mismatch repair protein MutL	HVO_0551	L9UMB1
	repair	DNA mismatch repair protein MutS	HVO_0552	D4GSE9
	repair	DNA repair and recombination protein RadA	HVO_0104	Q48328
	repair	DNA repair and recombination protein RadB	HVO_2383	L9V6G6
	repair	Putative DNA helicase Rad25	HVO_1723	L9VE99
	replication	DNA gyrase subunit A	HVO_1573	D4GZ02
	replication	DNA polymerase B1	HVO_0858	L9US19
	replication	DNA polymerase sliding clamp	HVO_0175	D0VWY8
	replication	Excinuclease ABC subunit A	HVO_0393	L9UJI6
	replication	Helicase AshA	HVO_0283	L9UK77
	replication	ORC1-type DNA replication protein	HVO_0194	L9UGW2
	replication	Origin-associated GTP-binding protein	HVO_3014	D4GYC9
	replication	Repair helicase UvrD	HVO_0415	D4GRV6
	replication	Replication factor A	HVO_0292	L9UJU8
	replication	Replication factor C large subunit	HVO_2427	D4GSN1
	replication	Replication factor C small subunit	HVO_0203	L9UG08
	replication	Replication protein A	HVO_0519	D4GS55
	replication	Type 2 DNA topoisomerase 6 subunit A	HVO_1570	L9VEU6
	replication	Type 2 DNA topoisomerase 6 subunit B	HVO_1571	L9VEG4
<b>RNA turnover</b>	ribonuclease	Ribonuclease J	HVO_2724	L9V5P6
		Ribonuclease R	HVO_0388	L9UJI9
<b>Protein turnover</b>	peptidase	Peptidase S9 family protein	HVO_0829	D4GUG3
	proteasome	Proteasome subunit alpha 1	HVO_1091	Q9V2V6
		Proteasome subunit alpha 2	HVO_2923	Q9V2V5
	thermosome	Thermosome subunit 2	HVO_0455	O30560
		Thermosome subunit 3	HVO_0778	Q9HHA2

### 3.2.4.3 *alF2Bδ-2*

Das Gen HVO\_2706 ist 849 nt lang. Das resultierende Protein *alF2Bδ-2* ist 30,8 kDa schwer. Das codierende Gen von *alF2δ-2* konnte deletiert werden, weshalb die Überexpression in der Deletionsmutante H26Δ*dhfr*Δ2706 mit dem Plasmid pSDH2706 stattfand.

In den Wachstumsversuchen wuchs die Deletionsmutante des *alF2Bδ-2* unter optimalen Bedingungen in Komplexmedium wie der Wildtyp (Abbildung 39A). Im Vergleich hierzu wuchs die Überexpression (pSDH2706) in der Deletionsmutante H26Δ*dhfr*Δ2706 besser als die Deletionsmutante H26Δ*dhfr*Δ2706 mit Leerplasmid pSD+P.

Nach der Affinitätsaufreinigung konnte auf dem SDS-Gel in den Elutionsfraktionen eine starke, sowie weitere, schwächere Proteinbanden nachgewiesen werden (Abbildung 39B).



**Abbildung 39: Charakterisierung des *alF2δ-2* (HVO\_2706)**

**A.** Im Wachstumsversuch bei 42 °C in Komplexmedium wuchs die Deletionsmutante wie der Wildtyp. Im Vergleich dazu wuchs die Überexpressionsmutante besser als die Kontrolle mit dem Leerplasmid. **B.** Die Elutionsschritte der Überexpression von *alF2δ-2* (30,8 kDa) nach der Affinitätsaufreinigung auf einem 12 % SDS-Polyacrylamidgel.

Von drei Affinitätsaufreinigungen wurden jeweils die zweite Elutionsfraktion zur MS geschickt. Im Vergleich der beiden *alF2δ*-Untereinheiten konnten bei *alF2δ-2* sehr viel weniger Proteine mitgereinigt werden als bei *alF2δ-1*. Das war bereits an den SDS-Gelen deutlich ersichtlich und wurde durch die MS-Analyse bestätigt. Mit *alF2Bδ-2* konnten nach der MS-Datenauswertung sechs Proteine co-gereinigt werden. Darunter fiel das 50S ribosomale Protein L1 und ein Transkriptionsregulator. Es konnten keine weiteren Translationsinitiationsfaktoren bzw. Untereinheiten mitgereinigt werden (Tabelle 74).

**Tabelle 74: Einteilung der mitgereinigten Proteine von *alF2δ-2***

Group	Specification	Description	Genloci	Accession
Translation	<i>alFs</i>	<b><i>alF2Bδ-2</i></b>	<b>HVO_2706</b>	<b>L9V7F9</b>
	50S rpL	50S rpL1	HVO_2757	P41199
Transcription	regulator	Transcriptional regulator	HVO_2928	L9UK32
Protein turnover	proteasome	Proteasome subunit beta	HVO_1562	L9VFN7
	thermosome	Thermosome subunit 2	HVO_0455	O30560
	thermosome	Thermosome subunit 3	HVO_0778	Q9HHA2

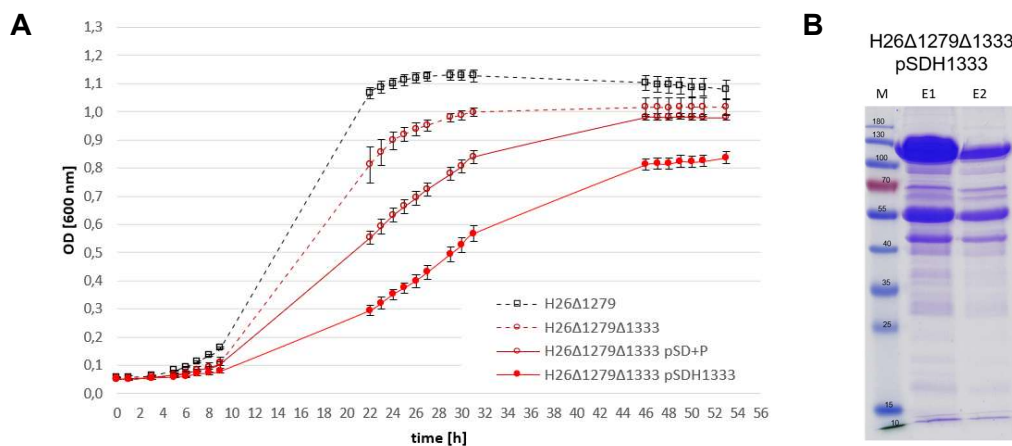
### 3.2.5 eIF4A-homolog

Das Gen HVO\_1333 codiert mit 2841 nt für das Protein eIF4A-homolog (104,5 kDa). Dieser Initiationsfaktor gehört zu den nicht-essenziellen Initiationsfaktoren, da das Gen in der vorherigen Arbeit deletiert werden konnte (Gäbel *et al.*, 2013). Die Überexpression fand deshalb in der Deletionsmutante H26 $\Delta$ 1279 $\Delta$ 1333 mit dem Plasmid pSDH1333 statt.

Ein Phänotyp der Deletionsmutante H26 $\Delta$ 1279 $\Delta$ 1333 konnte in Form von sehr viel schlechterem Wachstum im Vergleich zum Wildtyp H26 $\Delta$ 1279 gezeigt werden (Abbildung 40A).

Die Deletionsmutante H26 $\Delta$ 1279 $\Delta$ 1333 mit dem Überexpressionsplasmid pSDH1333 des eIF4A-homolog wuchs im Vergleich zur Deletionsmutante H26 $\Delta$ 1279 $\Delta$ 1333 mit Leerplasmid pSD+P sehr viel schlechter.

Mit 104,5 kDa ist eIF4A-homolog der größte annotierte Translationsinitiationsfaktor in *H. volcanii*. Dieser konnte auch nach der Affinitätsaufreinigung auf dem SDS-Polyacrylamidgel in den Elutionsfraktionen nachgewiesen werden (Abbildung 40B). Zusätzlich konnten weitere Proteine im Gel visualisiert werden.



**Abbildung 40: Charakterisierung des eIF4A-homologes (HVO\_1333)**

**A.** Im Wachstumsversuch bei 42 °C in Komplexmedium wuchs die Deletionsmutante ( $\Delta$ 1333) schlechter als der Wildtyp ( $\Delta$ 1279). Im Vergleich dazu wuchs die Überexpressionsmutante des eIF4A-homologes (pSDH1333) schlechter als die Deletionsmutante mit dem Leerplasmid ( $\Delta$ 1333 pSD+P). **B.** Elutionsschritte der Überexpression des eIF4A-homologes (104,5 kDa) nach der Affinitätsaufreinigung auf einem 12 % SDS-Polyacrylamidgel, Coomassie-gefärbt.

Von drei Aufreinigungen wurde jeweils die zweite Elutionsfraktion zur MS-Analyse geschickt. In der MS-Analyse konnten nach der Auswertung 50 Proteine identifiziert werden. aIF2 $\delta$ -1 sowie aIF5B konnten mit dem eIF4A-homolog mitgereinigt werden (Tabelle 75).

**Tabelle 75: Einteilung der mitgereinigten Proteine von eIF4A-homolog**

Group	Specification	Description	Genloci	Accession
Translation	aIFs	eIF4A-hom.	HVO_1333	D4GXX1
		aIF2B $\delta$ -1	HVO_0966	L9USK7
		aIF5B	HVO_1963	D4GTJ2
	aEFs	aEF1 $\alpha$	HVO_2413	L9V6J4
		aEF1 $\alpha$ -like protein	HVO_2575	L9V605
		aEF2	HVO_0356	L9UK07

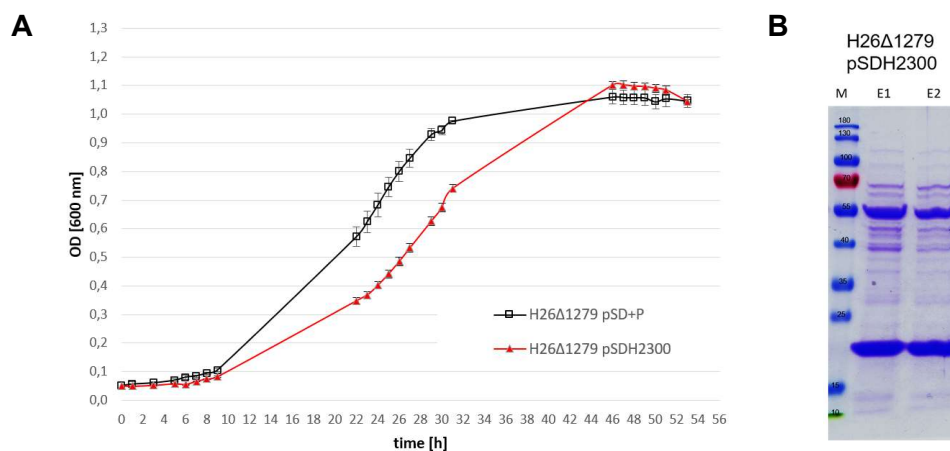
	30S rpS	30S rpS3	HVO_2558	D4GTZ0
		30S rpS4e	HVO_2552	L9V7Y2
		30S rpS5	HVO_2544	D4GTX6
		30S rpS7	HVO_0354	L9UJR0
	50S rpL	50S rpL1	HVO_2757	P41199
		50S rpL2	HVO_2561	D4GTZ3
		50S rpL3	HVO_2564	L9V5K9
		50S rpL4	HVO_2563	D4GTZ5
		50S rpL6	HVO_2548	L9V5X7
		50S rpL10	HVO_2756	P41198
		50S rpL22	HVO_2559	L9V5K3
		50S rpL30	HVO_2543	L9V5X1
	transferase	tRNA(Met) cytidine acetyltransferase TmcA	HVO_2736	D4GW73
<b>Transcription</b>	RNAP-subunits	rpoA1	HVO_0349	D4GZX6
		rpoA2	HVO_0350	D4GZX7
		rpoB2	HVO_0347	L9UK99
	regulator	HTH domain protein	HVO_1133	D4GW85
		HTH domain protein	HVO_1695	D4H040
		HTH-10 family transcription regulator	HVO_A0121	D4GQF3
		IclR family transcription regulator	HVO_B0114	D4GPB5
		IclR family transcription regulator	HVO_A0583	D4GRP3
		IclR family transcription regulator	HVO_2108	D4GUQ5
		Lrp/AsnC family transcription regulator	HVO_1792	D4GSB6
		PadR family transcription regulator	HVO_2869	D4GXH6
		SirR/DtxR family transcription regulator SirR	HVO_0819	D4GUE2
		TATA-box-binding protein	HVO_1727	L9VGC6
		Transcriptional regulator	HVO_0163	L9UFW5
		Transcriptional regulator	HVO_0179	L9UGU5
Transcriptional regulator	HVO_2928	L9UK32		
<b>Protein folding</b>	chaperone	Chaperone protein DnaK	HVO_1590	L9VEI0
	release factor	Peptide chain release factor subunit 1	HVO_0321	D4GZV0
<b>Replication and Repair</b>	repair	DNA double-strand break repair Rad50 ATPase	HVO_0854	D4GUK1
		DNA mismatch repair protein MutS	HVO_0552	D4GSE9
		DNA repair and recombination protein RadA	HVO_0104	Q48328
		DNA repair and recombination protein RadB	HVO_2383	L9V6G6
		Putative DNA helicase Rad25	HVO_1723	L9VE99
	replication	DNA gyrase subunit A	HVO_1573	D4GZ02
		ORC1-type DNA replication protein	HVO_0194	L9UGW2
		Type 2 DNA topoisomerase 6 subunit B	HVO_1571	L9VEG4
<b>RNA turnover</b>	protease	ATP-dependent protease Lon	HVO_0783	L9UNA4
	ribonuclease	Ribonuclease P protein component 3	HVO_1094	D4GW15
		Ribonuclease R	HVO_0388	L9UJI9
Ribonuclease Z		HVO_0144	L9UJH9	
<b>Protein turnover</b>	proteasome	Proteasome-activating nucleotidase		L9UQ37
	thermosome	Thermosome subunit 2	HVO_0455	O30560
		Thermosome subunit 3	HVO_0778	Q9HHA2



### 3.2.6 aIF5A

Da der Translationsinitiationsfaktor aIF5A in *H. volcanii* nicht deletiert werden konnte, wurde er als essenziell eingestuft (Gäbel *et al.*, 2013). Das Gen HVO\_2300 codiert mit einer Länge von 375 nt für aIF5A. Das daraus resultierende Protein hat ein Gewicht von 14,2 kDa.

Die Überexpression des HVO\_2300 fand im H26Δ1279 mit dem Plasmid pSDH2300 statt. In den Wachstumsversuchen unter optimalen Bedingungen bei 42 °C in Komplexmedium wuchs die Überexpression des aIF5A schlechter als die Kontrolle mit dem Leerplasmid pSD+P (Abbildung 41A). Nach der Affinitätsaufreinigung konnten auf den SDS-Gelen neben den zwei markanten Banden weitere schwächere Banden nachgewiesen werden (Abbildung 41B). Von drei Aufreinigungen wurde jeweils die zweite Elutionsfraktionen zur MS geschickt.



**Abbildung 41: Charakterisierung des aIF5A (HVO\_2300)**

**A.** Vergleich des Wachstums der Überexpression von aIF5A (pSDH2300) und der Kontrolle (Δ1279 pSD+P) mit dem Leerplasmid unter optimalen Wachstumsbedingungen bei 42 °C in Komplexmedium. **B.** Affinitätsaufreinigung von aIF5A auf einem 12 % SDS-Polyacrylamidgel, Coomassie-gefärbt mit Eluat 1 und 2.

Die MS-Analyse zeigte nach der Auswertung 23 Proteine, die in allen drei Elutionsfraktionen identifiziert werden konnten (Tabelle 76). Mit aIF5A konnte aIF2α, aIF-2Bδ-1 und aIF-5B mitgereinigt werden. Des Weiteren konnten mit aIF5A ein 30S und zwei 50S ribosomale Proteine sowie zwei RNAPUs co-gereinigt werden.

**Tabelle 76: Einteilung der mitgereinigten Proteine von aIF5A**

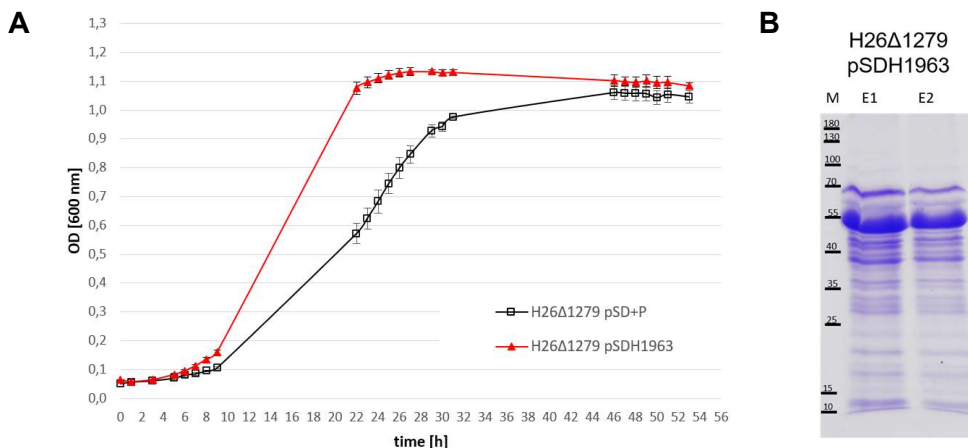
Group	Specification	Description	Genloci	Accession
Translation	aIFs	<b>aIF5A</b>	<b>HVO_2300</b>	<b>L9V7A1</b>
		aIF2α	HVO_0699	D4GT46
		aIF2Bδ-1	HVO_0966	L9USK7
		aIF5B	HVO_1963	D4GTJ2
	aEFs	aEF1α	HVO_2413	L9V6J4
		aEF1α-like protein	HVO_2575	L9V605
		aEF2	HVO_0356	L9UK07
	30S rpS	30S rpS4e	HVO_2552	L9V7Y2
	50S rpL	50S rpL1	HVO_2757	P41199
		50S rpL3	HVO_2564	L9V5K9
Transcription	RNAP-subunits	rpoA1	HVO_0349	D4GZX6

		rpoB2	HVO_0347	L9UK99
	regulator	IcIR family transcription regulator	HVO_2108	D4GUQ5
		SirR/DtxR family transcription regulator SirR	HVO_0819	D4GUE2
		Transcriptional regulator	HVO_0163	L9UFW5
		Transcriptional regulator	HVO_0179	L9UGU5
<b>Replication and Repair</b>	repair	DNA double-strand break repair protein Mre11	HVO_0853	D4GUK0
		DNA double-strand break repair Rad50 ATPase	HVO_0854	D4GUK1
		DNA mismatch repair protein MutS	HVO_0552	D4GSE9
		DNA repair and recombination protein RadA	HVO_0104	Q48328
		DNA repair and recombination protein RadB	HVO_2383	L9V6G6
		Putative DNA helicase Rad25	HVO_1723	L9VE99
<b>RNA turnover</b>	ribonuclease	Ribonuclease R	HVO_0388	L9UJI9

### 3.2.7 aIF5B

Der Faktor aIF5B konnte in *H. volcanii* nicht deletiert werden und wurde deshalb als essenziell eingestuft (Gäbel *et al.*, 2013). Das Gen HVO\_1963 codiert mit einer Länge von 1803 nt für aIF5B. Das daraus resultierende Protein hat ein Gewicht von 65,4 kDa. Die Überexpression von aIF5B fand im H26Δ1279 mit dem Plasmid pSDH1963 statt. In den Wachstumsversuchen bei 42 °C in Komplexmedium wuchs die Überexpressionsmutante sehr viel besser als die Kontrolle H26Δ1279 mit dem Leerplasmid pSD+P (Abbildung 42A).

In der Affinitätsaufreinigung konnten auf den SDS-Gelen eine markante Bande sowie viele weitere, schwächere Proteinbanden nachgewiesen werden (Abbildung 42B).



**Abbildung 42: Charakterisierung des aIF5B (HVO\_1963)**

**A.** Vergleich des Wachstums der Überexpression von aIF5B (pSDH1963) in H26Δ1279 mit der Kontrolle (H26Δ1279 pSD+P) unter optimalen Wachstumsbedingungen bei 42 °C in Komplexmedium. **B.** Affinitätsaufreinigung von aIF5B auf einem 12 % SDS-Polyacrylamidgel, Coomassie-gefärbt mit Eluat 1 und 2.

Von drei Aufreinigungen wurde jeweils die zweite Elutionsfraktion zur MS geschickt. In der MS-Analyse konnten nach der Auswertung 43 Proteine in allen drei Aufreinigungen identifiziert werden (Tabelle 77). Als Translationsinitiationsfaktor konnte mit aIF5B nur aIF2Bδ-1

mitgereinigt werden. Auch mit aIF5B konnten die beiden RNAPUs rpoA1 und rpoB2 sowie neun Transkriptionsregulatoren co-gereinigt werden.

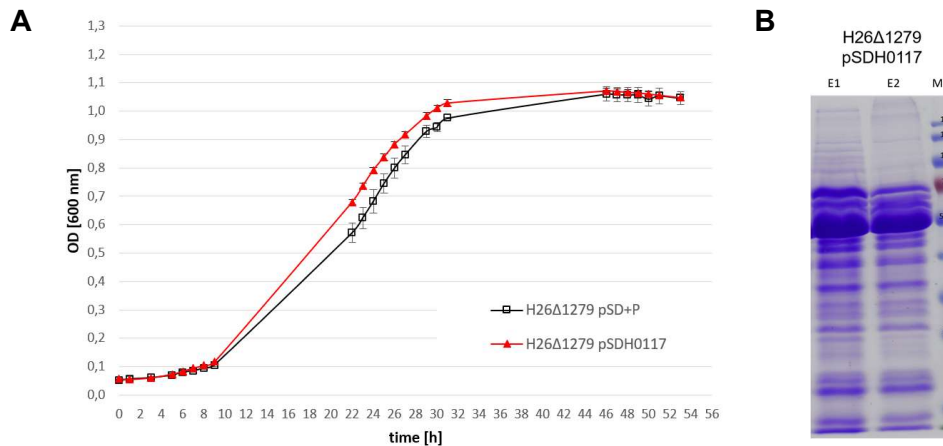
**Tabelle 77: Einteilung der mitgereinigten Proteine von aIF5B in molekularbiologische Prozesse**

Group	Specification	Description	Genloci	Accession	
Translation	aIFs	<b>aIF5B</b>	<b>HVO_1963</b>	<b>D4GTJ2</b>	
		aIF2Bδ-1	HVO_0966	L9USK7	
	aEFs	aEF1α	HVO_2413	L9V6J4	
		aEF1α-like protein	HVO_2575	L9V6O5	
		aEF2	HVO_0356	L9UK07	
	30S rpS	30S rpS10	HVO_0360	L9ULL7	
	50S rpL	50S rpL1	HVO_2757	P41199	
		50S rpL2	HVO_2561	D4GTZ3	
		50S rpL22	HVO_2559	L9V5K3	
		50S rpL30	HVO_2543	L9V5X1	
Transcription	RNAP-subunits	rpoA1	HVO_0349	D4GZX6	
		rpoB2	HVO_0347	L9UK99	
	regulator	HTH domain protein	HVO_1695	D4H040	
		HTH-10 family transcription regulator	HVO_A0121	D4GQF3	
		HTH-type transcriptional regulator GlpR	HVO_1501	D4GYE7	
		IclR family transcription regulator	HVO_B0114	D4GPB5	
		IclR family transcription regulator	HVO_B0201	D4GPK2	
		IclR family transcription regulator	HVO_A0583	D4GRP3	
		IclR family transcription regulator	HVO_2108	D4GUQ5	
		Lrp/AsnC family transcription regulator	HVO_B0066	D4GP68	
		Lrp/AsnC family transcription regulator	HVO_1792	D4GSB6	
		RNA-binding protein Lsm	HVO_2723	D4GW47	
		SirR/DtxR family transcription regulator SirR	HVO_0819	D4GUE2	
		Transcriptional regulator	HVO_0163	L9UFW5	
		Transcriptional regulator	HVO_0179	L9UGU5	
		Transcriptional regulator	HVO_2928	L9UK32	
Replication and Repair	repair	DNA double-strand break repair protein Mre11	HVO_0853	D4GUK0	
		DNA double-strand break repair Rad50 ATPase	HVO_0854	D4GUK1	
		DNA mismatch repair protein MutS	HVO_0552	D4GSE9	
		DNA repair and recombination protein RadA	HVO_0104	Q48328	
		DNA repair and recombination protein RadB	HVO_2383	L9V6G6	
		Putative DNA helicase Rad25	HVO_1723	L9VE99	
	replication	Orc1-type DNA replication protein	HVO_1537	D4GYI1	
		ORC1-type DNA replication protein	HVO_0194	L9UGW2	
	RNA turnover	ribonuclease	Ribonuclease P protein component 3	HVO_1094	D4GW15
			Ribonuclease R	HVO_0388	L9UJI9
			Ribonuclease Z	HVO_0144	L9UJH9
	Protein turnover	peptidase	Peptidase S9 family protein	HVO_0829	D4GUG3
thermosome		Thermosome subunit 2	HVO_0455	O30560	
		Thermosome subunit 3	HVO_0778	Q9HHA2	

### 3.2.8 aIF6

In Eukaryonten und Archaeen ist aIF6 ein essenzieller Translationsinitiationsfaktor (Benelli *et al.*, 2009). Dieser Fall trifft auch für aIF6 in *H. volcanii* zu. Der Faktor konnte nicht deletiert werden und wurde deshalb als essenziell eingestuft (Gäbel *et al.*, 2013). Das Gen von aIF6 ist 666 nt lang. Das daraus resultierende Protein besitzt ein Gewicht von 23 kDa.

Die Überexpression von aIF6 fand im H26Δ1279 mit dem Plasmid pSDH0117 statt. In den Wachstumsversuchen bei 42 °C in Komplexmedium wuchs die Überexpressionsmutante ähnlich zur Kontrolle H26Δ1279 mit dem Leerplasmid pSD+P (Abbildung 43A).



**Abbildung 43: Charakterisierung des aIF6 (HVO\_0117)**

**A.** Vergleich des Wachstums der Überexpression von aIF6 (pSDH0117) in H26Δ1279 mit der Kontrolle H26Δ1279 pSD+P unter optimalen Wachstumsbedingungen bei 42 °C in Komplexmedium. **B.** Affinitätsaufreinigung von aIF6 auf einem 12 % SDS-Polyacrylamidgel, Coomassie-gefärbt mit den beiden Elutionsfraktionen. Der Faktor aIF6 hat ein Gewicht von 23 kDa.

In den Affinitätsaufreinigungen konnte auf den SDS-Gelen eine markante Bande nachgewiesen werden. Jedoch nicht auf der für aIF6 erwarteten Höhe von 23 kDa (Abbildung 43B). Des Weiteren konnten viele schwächere Banden sichtbar gemacht werden. Von drei Aufreinigungen wurde jeweils die zweite Elutionsfraktion zur MS geschickt.

Wie erwartet, ließ sich der Initiationsfaktor aIF6 bei der Überexpression nur mit geringem PSM-Wert in der MS-Analyse nachweisen. Auch die Anzahl der identifizierten Proteine, die mit aIF6 mitgereinigt werden konnten, war gering. Bei einer Aufreinigung lag der *Unique Peptides* Wert von aIF6 unter 1. Bei den anderen beiden Messungen lag der *Unique Peptides* Wert bei 2-3. Deshalb konnten für die MS-Analyse der Überexpression des aIF6 nur zwei Messungen ausgewertet werden.

Insgesamt konnten 19 Proteine in den beiden MS-Analysen nach der Auswertung identifiziert werden (Tabelle 78). Darunter waren drei aIFs, vier 50S ribosomale Proteine sowie sechs Transkriptionsregulatoren. Mit aIF6 konnte sowohl aIF2Bδ-1 als auch aIF5B mitgereinigt werden.

Tabelle 78: Einteilung der mitgereinigten Proteine von aIF6 (n=2)

Group	Specification	Description	Genloci	Accession
Translation	aIFs	<b>aIF6</b>	<b>HVO_0117</b>	<b>L9UI67</b>
		aIF2B5-1	HVO_0966	L9USK7
		aIF5B	HVO_1963	D4GTJ2
	aEFs	aEF1α	HVO_2413	L9V6J4
		aEF2	HVO_0356	L9UK07
	50S rpL	50S rpL1	HVO_2757	P41199
		50S rpL2	HVO_2561	D4GTZ3
		50S rpL3	HVO_2564	L9V5K9
		50S rpL4	HVO_2563	D4GTZ5
	Transcription	regulator	IcIR family transcription regulator	HVO_B0114
IcIR family transcription regulator			HVO_2108	D4GUQ5
Lrp/AsnC family transcription regulator			HVO_1792	D4GSB6
Transcriptional regulator			HVO_0163	L9UFW5
Transcriptional regulator			HVO_0179	L9UGU5
Transcriptional regulator			HVO_2928	L9UK32
Replication and Repair	repair	DNA repair and recombination protein RadA	HVO_0104	Q48328
		DNA repair and recombination protein RadB	HVO_2383	L9V6G6
RNA turnover	ribonuclease	Ribonuclease Z	HVO_0144	L9UHH9
Protein turnover	thermosome	Thermosome subunit 3	HVO_0778	Q9HHA2

### 3.3 Interaktionsnetzwerk von aIFs-aIFs

Um die MS-Daten der einzelnen Initiationsfaktoren besser vergleichen zu können, wurden sie in einer gemeinsamen Tabelle zusammengefasst. Die [Tabelle 79](#) enthält die in dieser Arbeit überproduzierten und in der MS analysierten aIFs aus *H. volcanii*, sowie die Initiationsfaktoren, die in der MS identifiziert werden konnten. *Bait* steht hier für den jeweils überexprimierten Faktor.

Die Affinitätsaufreinigung war, mit der Ausnahme von aIF6, für alle His-getaggten aIFs erfolgreich. Für aIF6 konnte nur eine geringe Überexpression nachgewiesen werden. Des Weiteren konnte lediglich bei zwei Affinitätsaufreinigungen aIF6 und dann auch nur mit einem geringen PSM-Wert nachgewiesen werden. Dennoch konnte bei allen getaggten aIFs Proteine identifiziert werden. Mit jedem getaggten Faktor konnte mindestens ein weiterer Translationsinitiationsfaktor mitgereinigt werden. Die Ausnahme bildet aIF2B $\delta$ -2. Hier konnte kein weiterer Initiationsfaktor mitgereinigt werden. Die Faktoren aIF6 und aIF1A-1 wurden bei keinem weiteren Initiationsfaktor mitgereinigt.

**Tabelle 79: Zusammenfassung der MS-Daten für die Interaktion zwischen den aIFs**

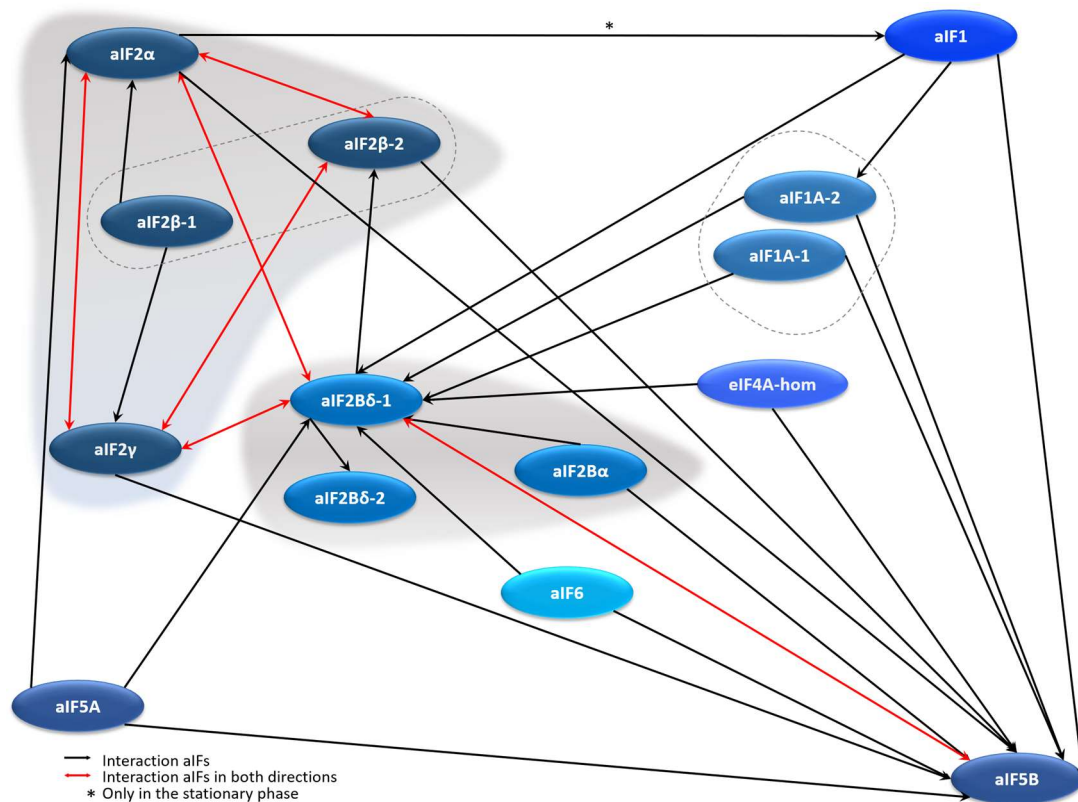
MW [kDa]	Genloci	Accession	Description	Bait protein													
				aIF1	aIF1A-1	aIF1A-2	aIF2 $\alpha$	aIF2 $\beta$ -1	aIF2 $\beta$ -2	aIF2 $\gamma$	aIF2B $\alpha$	aIF2B $\delta$ -1	aIF2B $\delta$ -2	eIF4A-hom.	aIF5A	aIF5B	aIF6
10,8	HVO_1946	D4GTH5	aIF1	bait			*										
11,5	HVO_0136	D4GZ79	aIF1A-1		bait												
11,2	HVO_A0637	D4GRU5	aIF1A-2	+		bait											
29,5	HVO_0699	D4GT46	aIF2 $\alpha$				bait	+	+	+		+				+	
14,9	HVO_1678	D4GZP2	aIF2 $\beta$ -1					bait									
22,2	HVO_2242	L9VAS4	aIF2 $\beta$ -2				+		bait	+		+					
43,9	HVO_1901	D4GTD4	aIF2 $\gamma$				+	+	+	bait		+					
43,2	HVO_1934	D4GTG3	aIF2B $\alpha$								bait						
34,9	HVO_0966	L9USK7	aIF2B $\delta$ -1	+	+	+	+			+	+	bait	+	+	+	+	+
30,7	HVO_2706	L9V7F9	aIF2B $\delta$ -2									+	bait				
104,5	HVO_1333	D4GXX1	eIF4A-hom.										bait				
14,2	HVO_2300	L9V7A1	aIF5A													bait	
65,3	HVO_1963	D4GTJ2	aIF5B	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	bait	+
22,98	HVO_0117	D4GYW3	aIF6														bait

\* Nur in der stationären Phase von aIF2 $\alpha$

Der Initiationsfaktor aIF1 konnte nur in der stationären Phase von aIF2 $\alpha$  identifiziert werden. Der Faktor aIF5B hingegen konnte bei elf weiteren Initiationsfaktoren co-gereinigt werden. Er war somit der am häufigsten identifizierte Initiationsfaktor, dicht gefolgt von aIF2B $\delta$ -1, der bei zehn Initiationsfaktoren mitgereinigt werden konnte.

Aufgrund der MS-Daten der aIFs- bzw. -Untereinheiten konnte ein mögliches Interaktionsnetzwerk der Translationsinitiationsfaktoren erstellt werden ([Abbildung 44](#)). Dies verschafft

einen besseren Überblick über die mitgereinigten Initiationsfaktoren und mögliche Interaktionen zwischen den einzelnen Faktoren und Untereinheiten. Die schwarzen Pfeile stellen dabei die einseitigen Interaktion dar. Dies bedeutet, dass ein Initiationsfaktor einen weiteren Initiationsfaktor mitreinigen konnte.



**Abbildung 44: Interaktionsnetzwerk der aIFs, die weitere aIFs mitreinigen konnten**

Zusammenfassung der MS-Daten für die aIF-aIF-Interaktion. Die schwarzen Pfeile stellen die einseitige Interaktion dar. Die roten Pfeile bei der die aIFs gegenseitig co-gereinigt werden konnten. Das Sternchen steht für die stationäre Phase, bei der aIF1 mit aIF2 $\alpha$  mitgereinigt werden konnte.

Bei den roten Doppelpfeilen handelt es sich um gegenseitige Interaktionen zwischen aIFs. Jeweils ein getaggtter aIF konnte einen anderen aIF mitreinigen und umgekehrt. Dies traf für die Interaktionen zwischen der aIF2 $\alpha$ -, aIF2 $\beta$ -2- als auch für die aIF2 $\gamma$ -Untereinheit des Initiationsfaktors aIF2 zu. Mit aIF2 $\gamma$  konnte zusätzlich aIF2B $\delta$ -1 mitgereinigt werden und umgekehrt. Zusätzlich konnten aIF5B und der Faktor aIF2B $\delta$ -1 gegenseitig co-gereinigt werden.

### 3.4 Interaktion aIFs mit RNAPUs

Bei der Affinitätsaufreinigung der einzelnen Initiationsfaktoren konnten nicht nur Proteine mitgereinigt werden, die in die Translation involviert sind, sondern auch die Proteine, die an der Transkription maßgeblich beteiligt sind. Diese sind z.B. Untereinheiten der RNA-Polymerase (RNAPUs). In *H. volcanii* sind zwölf RNAPUs annotiert. Mit acht aIFs- bzw. -Untereinheiten konnten acht der zwölf RNAPUs, mitgereinigt werden. Diese waren rpoA1, rpoA2, rpoB1, rpoB2, rpoD, rpoH, rpoF und rpoL (Tabelle 80).

Tabelle 80: Zusammenfassung der MS-Daten für die Interaktion zwischen aIFs und RNAPUs

kDa	Genloci	Accession	Description	Bait protein													
				aIF1	aIF1A-1	aIF1A-2	aIF2α	aIF2-β1	aIF2-β2	aIF2-γ	aIF2Bα	aIF2Bδ-1	aIF2Bδ-2	eIF4A-h	aIF5A	aIF5B	aIF6
108,8	HVO_0349	D4GZX6	rpoA1	+	+		+						+		+	+	+
46,1	HVO_0350	D4GZX7	rpoA2	+			+						+		+		
67,7	HVO_0348	L9UJM2	rpoB1	+									+				
58,9	HVO_0347	L9UK99	rpoB2	+			+				+		+		+	+	+
28,1	HVO_2781	L9V5W2	rpoD	+									+				
8,5	HVO_0346	D4GZX3	rpoH										+				
13,7	HVO_2748	D4GWA3	rpoF										+				
10,3	HVO_1042	D4GVL8	rpoL	+													

Aufgrund der MS-Daten der aIFs- bzw. -Untereinheiten konnte ein Netzwerk für Translationsinitiationsfaktoren, die RNAPUs mitreinigen konnten, erstellt werden (Abbildung 45).

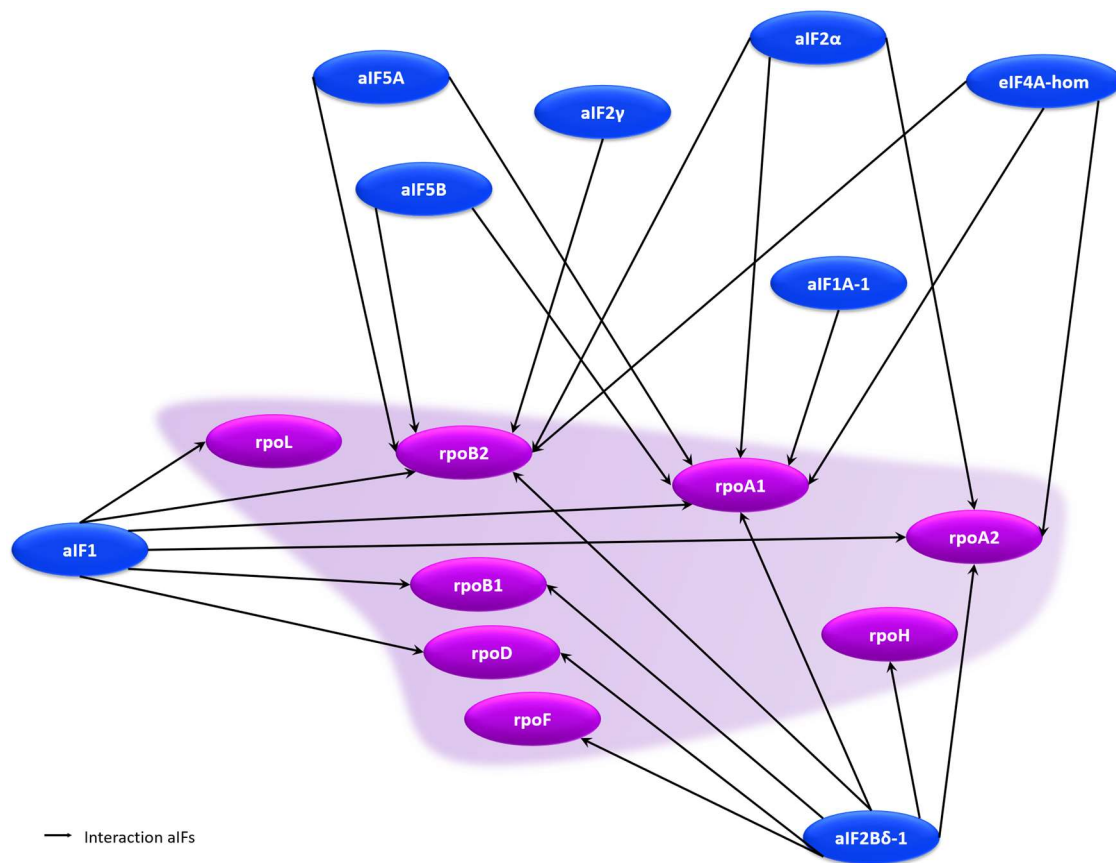


Abbildung 45: Netzwerk der aIFs, die RNAPUs mitreinigen konnten

Zusammenfassung der MS-Daten für die aIFs, die RNAPUs mitreinigen konnten. Die RNAPUs sind in lila dargestellt, die Initiationsfaktoren in blau. Die schwarzen Pfeile stellen die Interaktion ausgehend von den aIFs dar.

Mit aIF2B-δ1 konnten sieben RNAPUs mitgereinigt werden. Mit aIF1 konnten sechs der acht RNAPUs mitgereinigt werden. Mit aIF2α und dem eIF4A-homolog konnte rpoA1, rpoA2 und rpoB2 co-gereinigt werden. Die am häufigsten co-gereinigten Untereinheiten waren rpoA1 und rpoB2. Mit aIF5A und aIF5B konnte rpoA1 und rpoA2 mitgereinigt werden. Bei aIF2γ konnte nur rpoB2 identifiziert werden und bei aIF1A-1 nur rpoA1.



### 3.5 Untersuchung der Interaktion zwischen RNAPUs und aIFs

Die RNA-Polymerase II in *H. volcanii* besteht aus zwölf Untereinheiten. Um die Interaktion zwischen aIFs und RNAPUs zu untersuchen wurden sieben RNAPUs, die mit den Initiationsfaktoren mitgereinigt werden konnten, näher betrachtet. Hierfür wurden die Gene dieser RNAPUs ebenfalls mit einem N-terminalen His-Tag versehen, in den pSD1R16 kloniert und im Stamm H26Δ1279 überexprimiert. Bei den Überexpression handelte es sich um die RNAPUs rpoA1, rpoA2, rpoB1, rpoB2, rpoD, rpoH und rpoL (Tabelle 81). Die Untereinheit rpoF wurde auch mit einem aIF co-gereinigt. Aus Zeitgründen war die Überexpression nicht möglich.

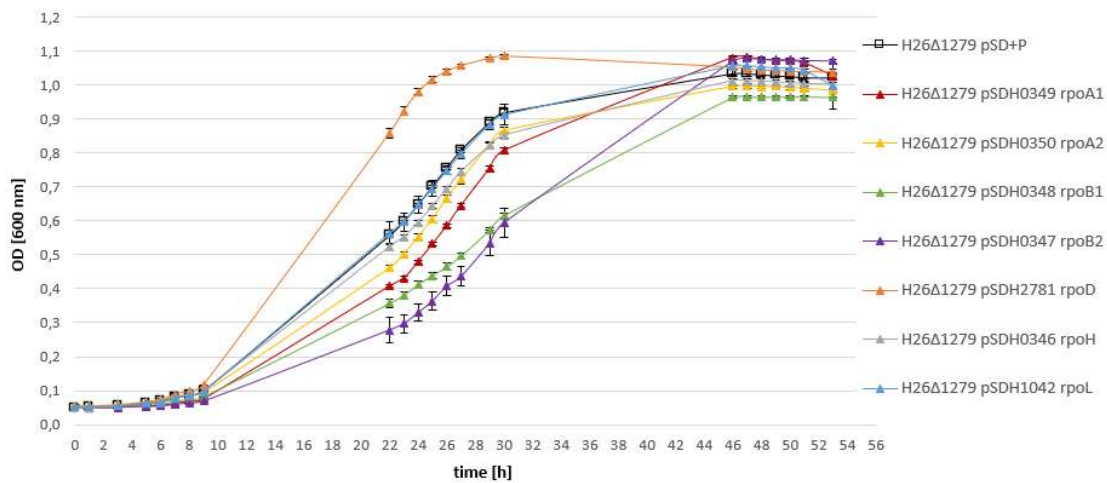
Tabelle 81: RNA-Polymerase-Untereinheiten der RNA-Polymerase in *H. volcanii*

Gene	Gene ID	Accession	Overproduction	Strain	MW [kDa]
<i>rpoA1</i>	HVO_0349	D4GZX6	+	H26Δ1279	109
<i>rpoA2</i>	HVO_0350	D4GZX7	+	H26Δ1279	46,2
<i>rpoB1</i>	HVO_0348	L9UJM2	+	H26Δ1279	67,8
<i>rpoB2</i>	HVO_0347	L9UK99	+	H26Δ1279	58,9
<i>rpoD</i>	HVO_2781	L9V5W2	+	H26Δ1279	28,1
<i>rpoH</i>	HVO_0346	D4GZX3	+	H26Δ1279	8,6
<i>rpoL</i>	HVO_1042	D4GVL8	+	H26Δ1279	10,4
<i>rpoF</i>	HVO_2748	D4GWA3	-	-	13,7
<i>rpoE</i>	HVO_1899	D4GTD2	-	-	21
<i>rpoK</i>	HVO_2775	D4GWX4	-	-	6,6
<i>rpoN</i>	HVO_2776	D4GWX5	-	-	7,3
<i>rpoP</i>	HVO_0653	L9UMK6	-	-	5,1

#### 3.5.1 Überexpression der RNAPUs

Auch mit den Mutanten für die Überexpression der einzelnen RNAPUs wurden Wachstumsversuche bei optimalen Bedingungen von 42 °C in Komplexmedium durchgeführt. Anhand der Wachstumsversuche wurde der Einfluss der Überexpression der einzelnen RNAPUs im Vergleich zum Wildtyp H26Δ1279 mit Leerplasmid pSD+P untersucht (Abbildung 46).

Bei der Überexpressionsmutante von rpoD zeigte sich ein sehr viel besseres Wachstum als bei der Kontrolle H26Δ1279 mit dem Leerplasmid pSD+P. Von allen getaggen RNAPUs zeigte diese Überexpressionsmutante das beste Wachstumsverhalten. Die sechs weiteren Mutanten der RNAPUs wuchsen ähnlich oder schlechter als die Kontrolle mit dem Leerplasmid. Die Untereinheit rpoL zeigte ein ähnliches Wachstum zur Kontrolle. Am schlechtesten wuchs die Mutante mit der Überexpression von rpoB2.

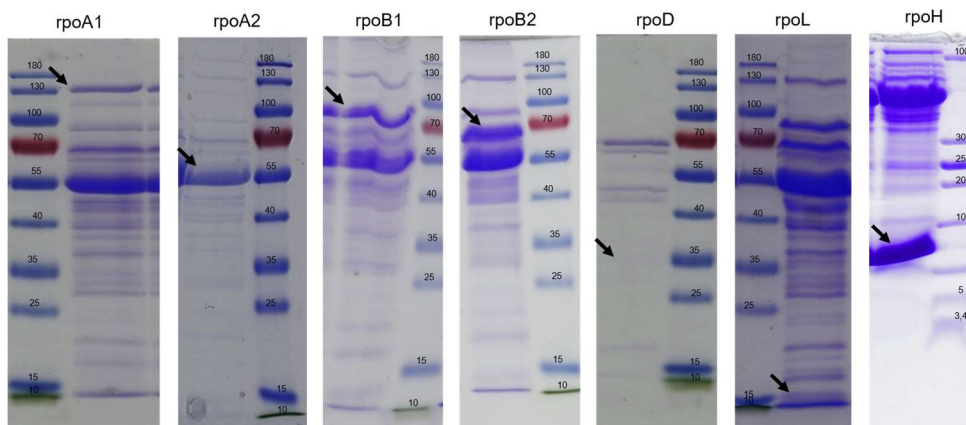


**Abbildung 46: Wachstum der Überexpressionsmutanten von RNAPUs**

Wachstumsversuche wurden für die sieben RNAPUs in H26Δ1279 bei optimalen Bedingungen in Komplexmedium bei 42 °C durchgeführt. H26Δ1279 mit dem Leerplasmid pSD+P diente als Kontrolle.

### 3.5.2 Affinitätsaufreinigungen der RNAPUs

Für die getaggtten RNAPUs wurde jeweils dreimal eine Affinitätsaufreinigung durchgeführt. Die Elutionsfraktionen wurden auf ein SDS-Polyacrylamid aufgetragen und verglichen. Für rpoH wurde aufgrund der Größe des Proteins ein Tricin-Gel verwendet. In [Abbildung 47](#) ist jeweils die zweite Elutionsfraktion der RNAPUs rpoA1, rpoA2, rpoB1, rpoB2, rpoD, rpoL bzw. Tricin-Gel für rpoH im Vergleich dargestellt.



**Abbildung 47: Affinitätsaufreinigung der überexprimierten RNAPUs**

Die zweite Elutionsfraktion nach der Affinitätsaufreinigung der sieben RNAPUs. Die Pfeile zeigen zu der jeweiligen überexprimierten Untereinheit auf den SDS-Gelen bzw. für rpoH auf ein Tricin-Gel, die Coomassie-gefärbt wurden.

Für die MS-Analyse der getaggtten RNAPUs und der Identifizierung der mitgereinigten Proteine wurde von drei Affinitätsaufreinigungen jeweils die zweite Elutionsfraktion verwendet.

Bereits auf dem SDS-Gel konnte für rpoD nur eine schwache Bande nachgewiesen werden. Im Vergleich mit den anderen getaggtten RNAPUs konnte mit rpoD am wenigsten Proteine mitgereinigt werden. Dies spiegelte sich auch in den MS-Daten wider. Bei der Auswertung der MS-Daten konnte nach dem Abgleich der *Unique Peptides* mit einem Wert von 2 oder größer kein rpoD mehr nachgewiesen werden.

### 3.5.3 MS-Analyse der RNAPUs

Mit rpoA1 konnte nach der MS-Auswertung 62 Proteine identifiziert werden. Für rpoA2 waren es 19 Proteine, rpoB1 54 Proteine, rpoB2 56 Proteine, rpoD 30 Proteine, rpoL 49 Proteine und rpoH 62 Proteine.

Die für die Transkription identifizierten Proteine, die mit den RNAPUs mitgereinigt werden konnten, sind in Tabelle 82 aufgeführt. Insgesamt konnten zu den getaggen RNAPUs zusätzlich rpoN, rpoP und rpoF mitgereinigt werden.

**Tabelle 82: Mit den sieben RNAPUs mitgereinigte RNAPUs**

Specification	Genloci	Accession	Description	Bait protein						
				rpoA1	rpoA2	rpoB1	rpoB2	(rpoD)	rpoH	rpoL
<b>RNAP-subunits</b>	HVO_0349	D4GZX6	<b>rpoA1</b>	bait	+	+	+	+	+	+
	HVO_0350	D4GZX7	<b>rpoA2</b>	+	bait	+	+	+	+	+
	HVO_0348	L9UJM2	<b>rpoB1</b>	+	+	bait	+		+	+
	HVO_0347	L9UK99	<b>rpoB2</b>	+	+	+	bait	+	+	+
	HVO_2781	L9V5W2	<b>rpoD</b>	+	+	+	+	(bait)	+	+
	HVO_0346	D4GZX3	<b>rpoH</b>	+	+	+	+		bait	+
	HVO_1042	D4GVL8	<b>rpoL</b>	+	+	+	+		+	bait
	HVO_2776	D4GWX5	rpoN	+	+	+	+		+	+
	HVO_0653	L9UMK6	rpoP	+		+	+		+	+
	HVO_2748	D4GWA3	rpoF						+	
<b>regulator</b>	HVO_2110	L9V9M0	ArcR family TR	+						
	HVO_1116	D4GW55	HTH domain protein			+		+		
	HVO_1133	D4GW85	HTH domain protein	+		+	+	+	+	+
	HVO_0962	D4GV69	HTH domain protein						+	
	HVO_1695	D4H040	HTH domain protein	+		+	+		+	+
	HVO_A0121	D4GQF3	HTH-10 family TR	+						
	HVO_1501	D4GYE7	HTH-type TLR GlpR	+					+	+
	HVO_2108	D4GUQ5	IclR family TR	+	+	+	+	+	+	+
	HVO_A0583	D4GRP3	IclR family TR	+					+	
	HVO_B0114	D4GPB5	IclR family TR	+	+	+	+		+	+
	HVO_B0201	D4GPK2	IclR family TR	+			+	+		
	HVO_1792	D4GSB6	Lrp/AsnC family TR	+		+	+	+	+	+
	HVO_B0066	D4GP68	Lrp/AsnC family TR						+	
	HVO_2869	D4GXH6	PadR family TR	+			+			+
	HVO_0819	D4GUE2	SirR/DtxR family TR SirR	+		+	+		+	+
	HVO_0163	L9UFW5	TLR	+		+	+	+	+	+
	HVO_0179	L9UGU5	TLR	+		+	+		+	+
	HVO_1360	D4GXQ1	TrmB family TR						+	
	HVO_0568	L9UN99	TLR	+						
	HVO_2928	L9UK32	TLR	+		+	+	+	+	+
	HVO_2636	L9V878	TLR						+	
	HVO_2723	D4GW47	RNA-binding protein Lsm	+					+	
	HVO_1727	L9VGC6	TATA-box-binding protein			+	+	+	+	

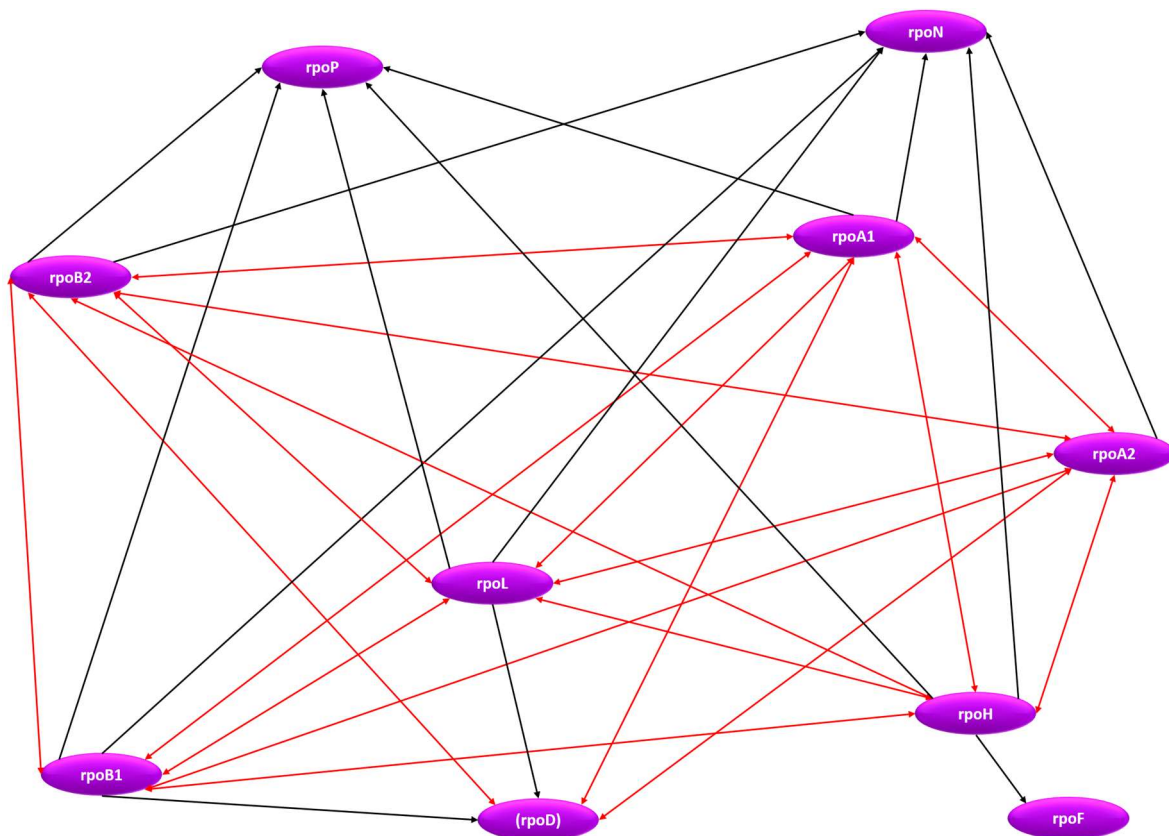
TR = transcription regulator; TLR = transcriptional regulator

Hinzu kamen insgesamt 21 unterschiedliche Transkriptionsregulatoren sowie das RNA-Bindeprotein Lsm und ein TATA-box-Bindeprotein (Tabelle 82).

Mit allen sieben getaggtten RNAPUs konnte sowohl rpoA1, rpoA2 als auch rpoB2 mitgereinigt werden. Die fünf Untereinheiten rpoB1, rpoD, rpoH, rpoL und rpoN konnten mit rpoA1, rpoA2, rpoB1, rpoB2, rpoL und rpoH mitgereinigt werden. RpoP konnte mit rpoA1, rpoB1, rpoB2, rpoL und rpoH mitgereinigt werden. Die Untereinheit rpoF nur mit rpoH. Damit konnte mit den sieben getaggtten RNAPUs fast die gesamte RNA-Polymerase, mit Ausnahme von rpoE und rpoK, co-gereinigt werden.

### 3.5.4 Interaktionen von RNAPUs-RNAPUs

Die Interaktion der RNAPUs mit RNAPUs ist in Abbildung 48 als Netzwerk dargestellt und wurde auf Basis der MS-Daten aus Tabelle 82 erstellt. Aus Zeitgründen konnten nur sieben von zwölf RNAPUs überexprimiert werden. Es konnten zehn der zwölf RNAPUs mitgereinigt werden.



**Abbildung 48: Interaktionsnetzwerk der RNAPUs**

Die RNAPUs sind in lila dargestellt. Die schwarzen Pfeile stellen die einseitige Co-Reinigung und die roten Pfeile die gegenseitige Co-Reinigung dar.

### 3.5.5 RNAPUS und Proteine der Translation

Die Proteine der Translation, die mit den RNAPUs mitgereinigt werden konnten, sind in der nachfolgenden Tabelle 83 aufgelistet. Darunter befinden sich Translationsinitiationsfaktoren, Elongationsfaktoren sowie Proteine der kleinen und großen ribosomalen Untereinheit.

Mit den sieben RNAPUs konnte aIF2B $\delta$ -1 mitgereinigt werden. aIF5B konnte mit Ausnahme von rpoD ebenfalls bei allen RNAPUs co-gereinigt werden. aIF2B $\alpha$  konnte nur mit rpoB2 mitgereinigt werden. aIF2 $\alpha$  konnte nur bei rpoH identifiziert werden.

**Tabelle 83: Mit den sieben RNAPUs mitgereinigte Proteine der Translation**

Specification	Genloci	Accession	Description	Bait protein							
				rpoA1	rpoA2	rpoB1	rpoB2	(rpoD)	rpoH	rpoL	
<b>aIFs</b>	HVO_0699	D4GT46	aIF2 $\alpha$							+	
	HVO_1934	D4GTG3	aIF2B $\alpha$				+				
	HVO_0966	L9USK7	aIF2B $\delta$ -1	+	+	+	+	+		+	+
	HVO_1963	D4GTJ2	aIF5B	+	+	+	+			+	+
<b>aEFs</b>	HVO_2575	L9V605	aEF1 $\alpha$ -like protein	+		+	+			+	+
	HVO_2413	L9V6J4	aEF1 $\alpha$	+	+	+	+			+	+
	HVO_0356	L9UK07	aEF2	+	+	+	+	+		+	+
<b>30S rpS</b>	HVO_2558	D4GTZ0	30S rpS3								+
	HVO_2552	L9V7Y2	30S rpS4e	+	+	+	+				+
	HVO_2544	D4GTX6	30S rpS5				+				
	HVO_2373	D4GWM1	30S rpS8e						+		
	HVO_0360	L9ULL7	30S rpS10	+		+					+
	HVO_2784	L9V5M6	30S rpS13				+				
	HVO_2560	L9V659	30S rpS19P			+	+				+
	HVO_1896	D4GTC9	30S rpS24e						+		
<b>50S rpL</b>	HVO_2757	P41199	50S rpL1	+		+	+	+		+	+
	HVO_2561	D4GTZ3	50S rpL2	+		+	+	+		+	+
	HVO_2564	L9V5K9	50S rpL3	+		+	+	+		+	+
	HVO_2563	D4GTZ5	50S rpL4			+	+				
	HVO_2756	P41198	50S rpL10			+	+				+
	HVO_0484	D4GS24	50S rpL10e			+					
	HVO_2758	P41200	50S rpL11	+		+	+	+			+
	HVO_2542	L9V7W8	50S rpL15			+					
	HVO_0561	L9UPT6	50S rpL15e	+		+	+			+	+
	HVO_2559	L9V5K3	50S rpL22	+	+	+	+			+	+
	HVO_2553	L9V5Y5	50S rpL24						+		
	HVO_2543	L9V5X1	50S rpL30	+		+	+			+	+
	HVO_2547	D4GTX9	50S rpL32e			+	+	+			

### 3.5.6 Interaktionen zwischen RNAPUs und aIFs kombiniert

Mit den Daten der RNAPUs wurde das bestehende Netzwerk der Interaktionen zwischen den Translationsinitiationsfaktoren und den RNAPUs erweitert. Zusammengefasst wurden die Daten aus den Aufreinigungen der aIFs, die RNAPUs mitreinigen konnten (Tabelle 84) und die Daten aus den Aufreinigungen der RNAPUs, die aIFs mitreinigen konnten (Tabelle 85).

**Tabelle 84: Mit den 14 aIFs und aIF-Untereinheiten mitgereinigte RNAPUs**

kDa	Genloci	Accession	Description	Bait protein													
				aIF1	aIF1A-1	aIF1A-2	aIF2 $\alpha$	aIF2- $\beta$ 1	aIF2- $\beta$ 2	aIF2- $\gamma$	aIF2B $\alpha$	aIF2B $\delta$ -1	aIF2B $\delta$ -2	eIF4A-hom	aIF5A	aIF5B	aIF6
108,8	HVO_0349	D4GZX6	rpoA1	+	+		+						+		+	+	+
46,1	HVO_0350	D4GZX7	rpoA2	+			+						+		+		
67,7	HVO_0348	L9UJM2	rpoB1	+									+				
58,9	HVO_0347	L9UK99	rpoB2	+			+				+		+		+	+	+
28,1	HVO_2781	L9V5W2	rpoD	+									+				
8,5	HVO_0346	D4GZX3	rpoH										+				
13,7	HVO_2748	D4GWA3	rpoF										+				
10,3	HVO_1042	D4GVL8	rpoL	+													

Die meisten RNAPUs konnten mit aIF2B $\delta$ -1 co-gereinigt werden. Gleichzeitig konnte aIF2B $\delta$ -1 selbst bei allen sieben getaggtten RNAPUs mitgereinigt werden. Für rpoF, die siebte RNAPU die mit aIF2B $\delta$ -1 co-gereinigt werden konnte, konnte die Frage nicht abschließend geklärt werden, da diese RNAPU nicht überexprimiert wurde.

**Tabelle 85: Mit den sieben RNAPUs mitgereinigte aIFs und aIF-Untereinheiten**

kDa	Genloci	Accession	Description	Bait protein								
				rpoA1	rpoA2	rpoB1	rpoB2	(rpoD)	rpoH	rpoL		
10,8	HVO_1946	D4GTH5	aIF1									
11,5	HVO_0136	D4GZ79	aIF1A-1									
11,2	HVO_A0637	D4GRU5	aIF1A-2									
29,5	HVO_0699	D4GT46	aIF2 $\alpha$								+	
14,9	HVO_1678	D4GZP2	aIF2 $\beta$ -1									
22,2	HVO_2242	L9VAS4	aIF2 $\beta$ -2									
43,9	HVO_1901	D4GTD4	aIF2 $\gamma$									
43,2	HVO_1934	D4GTG3	aIF2B $\alpha$						+			
34,9	HVO_0966	L9USK7	aIF2B $\delta$ -1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
30,7	HVO_2706	L9V7F9	aIF2B $\delta$ -2									
104,5	HVO_1333	D4GXX1	eIF4A-hom.									
14,2	HVO_2300	L9V7A1	aIF5A									
65,3	HVO_1963	D4GTJ2	aIF5B	+	+	+	+				+	+
22,98	HVO_0117	D4GYW3	aIF6									

Der Initiationsfaktor aIF5B wurde von sechs RNAPUs mitgereinigt, konnte aber selbst nur zwei RNAPUs co-reinigen. Im Gegensatz zu aIF1, hier konnten sechs RNAPUs mitgereinigt werden. aIF1 selbst wurde bei keinem RNAPU mitgereinigt.

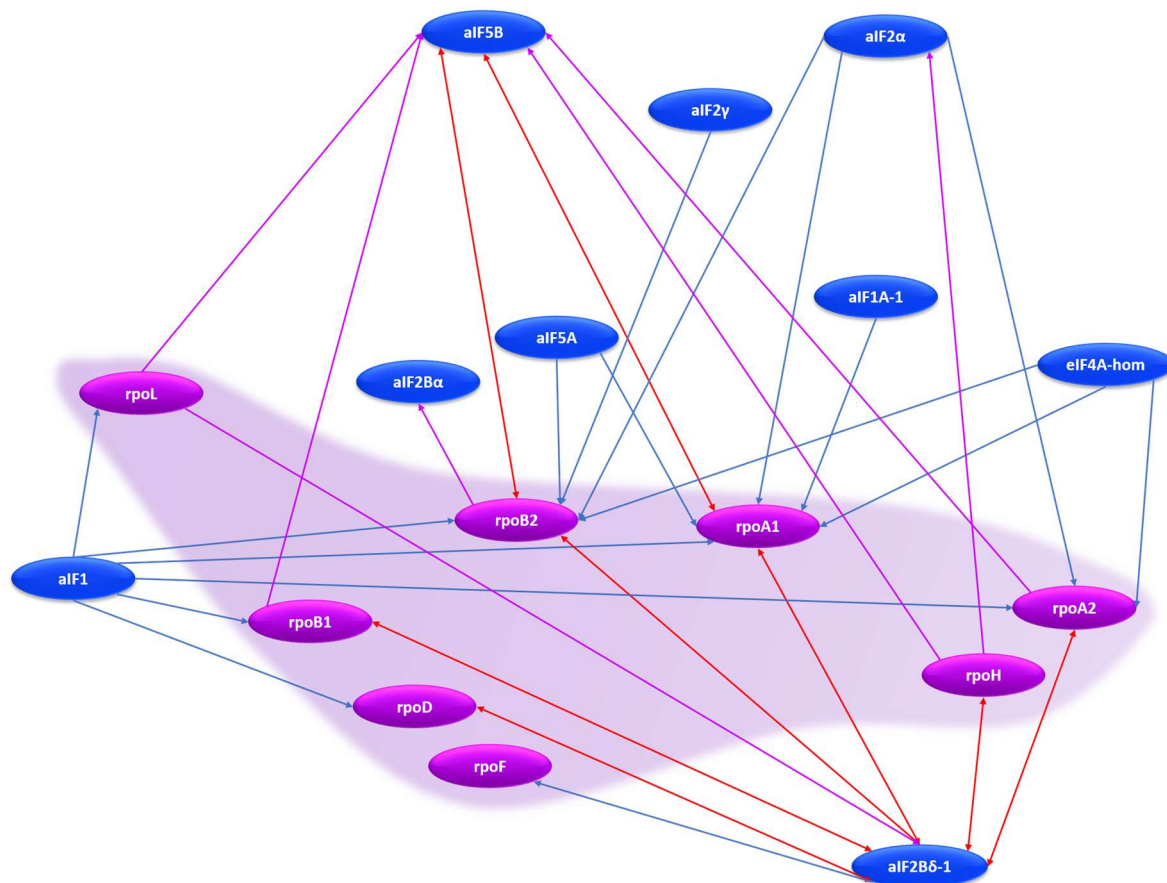
Der Faktor eIF4-homolog konnte 3 RNAPUs mitreinigen, selbst aber bei keinem RNAPU co-gereinigt werden. Dies wurde auch für aIF1-A1, aIF2 $\gamma$  und aIF5A festgestellt, die jeweils RNAPUs mitreinigen konnten. Sie selbst konnten bei RNAPUs in der MS nicht identifiziert werden.

Dafür konnte mit aIF2B $\alpha$  keine RNAPU co-gereinigt werden. Hingegen konnte er bei einem RNAPU mitgereinigt werden.

Bei aIF2 $\alpha$  verhielt es sich anders. Mit aIF2 $\alpha$  konnten drei RNAPUs co-gereinigt werden. aIF2 $\alpha$  selbst konnte mit einem RNAPU co-gereinigt werden.

Sowohl in Tabelle 84 als auch in Tabelle 85 wurden die in Wechselbeziehung stehenden RNAPUs und aIFs rot markiert.

Die Daten der beiden Tabellen wurden herangezogen, um das Interaktionsnetzwerk der aIFs und RNAPUs zu erstellen (Abbildung 49).



**Abbildung 49: Interaktionsnetzwerk zwischen den RNAPUs und aIFs**

In lila sind die RNAPUs dargestellt, in blau die Translationsinitiationsfaktoren. Die lila Pfeile beschreiben die Co-Reinigung ausgehend von einer RNAPU. Die blauen Pfeile zeigen die Co-Reinigung ausgehend von einem Translationsinitiationsfaktor. Die roten Doppelpfeile beschreiben die Co-Reinigung in beide Richtungen.

## 4 Diskussion

Nachdem die Translationsinitiationsfaktoren in allen drei Domänen des Lebens essenziell für die Translation sind, ist die Aufklärung von Protein-Protein-Interaktionen ein wichtiges Verfahren für die Identifizierung von Proteinfunktionen. Die Anwendung von Affinitätsaufreinigung mit anschließender MS ist dabei eine gängige Methode, um solche Protein-Protein-, Protein-RNA- und Protein-DNA-Interaktionen aufzuklären. Aufgrund ihrer Vielseitigkeit findet die Methode in allen drei Domänen des Lebens Anwendung (Li *et al.*, 2010; MacNeill, 2011; Lambert, Pawson and Gingras, 2012; Schlesner *et al.*, 2012; Pluchon *et al.*, 2013; Denis *et al.*, 2018). Sie beinhaltet experimentelle Herausforderungen, die zu beachten sind. Das betrifft insbesondere die effiziente Zellyse, die Wahl des Köderproteins, die Erhaltung der am Köderprotein assoziierten Proteine, das Einfangen von zeitlich begrenzten Interaktionen und die Dynamik innerhalb eines Komplexes (Kaczowka and Maupin-Furlow, 2003; Oeffinger, 2012).

### 4.1 Affinitätsaufreinigung und MS-Analyse

In dieser Arbeit konnte mittels Affinitätsaufreinigung und MS-Analyse ein besserer Überblick über die Funktionen und Interaktionen der in *H. volcanii* annotierten Translationsinitiationsfaktoren erarbeitet werden.

Interaktionen von Proteinen sind essenziell. Um ihre biologische Aktivität in einer Zelle zu erfüllen interagieren Proteine. Die meisten Proteine funktionieren in Verbindung mit anderen Proteinpartnern oder als Teil einer größeren molekularen Assemblierung. Deshalb ist es für das Verständnis der zellulären Funktion entscheidend, das Interaktionsumfeld eines Proteins zu kennen. Für die Erkennung und Identifizierung solcher Interaktionen gibt es verschiedene Werkzeuge, wie zum Beispiel das „*yeast two-hybrid systeme*“ und die Affinitätsaufreinigung, gekoppelt mit einer MS-Analyse (Dunham, Mullin and Gingras, 2012; Koh *et al.*, 2012; Yang, Wagner and Beli, 2015).

Dabei geht es nicht nur um direkte, sondern auch um indirekte Interaktionen. So zum Beispiel RNA gekoppelte oder transiente Interaktionen und die Eingrenzung von Funktionsbereichen. Verschiedene Varianten dieser Methoden wurden bereits erfolgreich für die Erstellung von Protein-Protein-Interaktionsnetzwerken in Archaeen angewandt. Das gilt beispielsweise für die Aufklärung von Protein-Protein-Interaktionen der DNA-Replikation. Einer dieser Ansätze umfasste in *Archaeoglobus fulgidus* das „*yeast two-hybrid systeme*“ (Motz *et al.*, 2002). In einem weiteren Ansatz wurden stabile Komplexe aus *Thermococcus kodakarensis* gereinigt und in vivo zusammengesetzt (Li *et al.*, 2010). Hier wurde die Affinitätsaufreinigung und MS-Analyse verwendet.

In einer weiteren Studie ging es um die genomischen Erhaltungsprozesse. In *P. abyssi* wurde hierfür mittels Affinitätsaufreinigung in vitro mit anschließender MS-Analyse Proteininteraktionspartner identifiziert und ein Protein-Proteininteraktionsnetzwerk erstellt (Pluchon *et al.*,



2013). Auch für die Analyse der Chemotaxis in *Halobacterium salinarum* wurde die Affinitätsaufreinigung mit der MS-Analyse gekoppelt und erfolgreich verwendet (Schlesner *et al.*, 2012).

Die Affinitätsaufreinigung in Verbindung mit der MS-Analyse ist ein hervorragendes Werkzeug, um direkte und indirekte Protein-Protein-Interaktionen sichtbar zu machen. Wie bereits oben beschrieben, wurde es in der Vergangenheit schon mehrfach erfolgreich angewandt. Daher wurde diese Methode in dieser Arbeit auch für die Aufklärung von Protein-Proteininteraktionen während der Translation, im speziellen der Translationsinitiationsfaktoren, verwendet.

In der vorliegenden Arbeit konnten die getaggten Proteine alle erfolgreich überexprimiert und auf einem SDS-Gel sichtbar gemacht werden. Die jeweils zweite Elutionsfraktion von drei unabhängigen Affinitätsaufreinigungen wurde anschließend zur MS-Analyse geschickt. Um falsch positiv identifizierte Proteine auszuschließen wurden mehrere Kontrollschritte verwendet. Nach Erhalt der MS-Daten wurden die markierten Kontaminationen ausgenommen und die Proteine mit *Unique Peptides* unter 2 ausgeschlossen. Die MS-Daten wurden anschließend mit beiden Kontrollen (DHFR und Leerplasmid) verglichen und die Proteinmatches abgezogen. Danach wurden die drei unabhängigen MS-Daten zusammengefasst.

Im Schnitt konnten 103 Proteine zugeordnet werden. Davon waren im Mittelwert 15 uncharakterisierte- und/ oder DUF-Proteine (*domain of unknown function*). Hierbei handelt es sich um noch nicht charakterisierte Proteine oder um eine Domäne mit unbekannter Funktion, die bei der Auswertung nicht berücksichtigt wurden. Ebenso wurden die Proteine des Zentral- und Zellstoffwechsels ausgenommen, da dies den Rahmen der Arbeit gesprengt hätte.

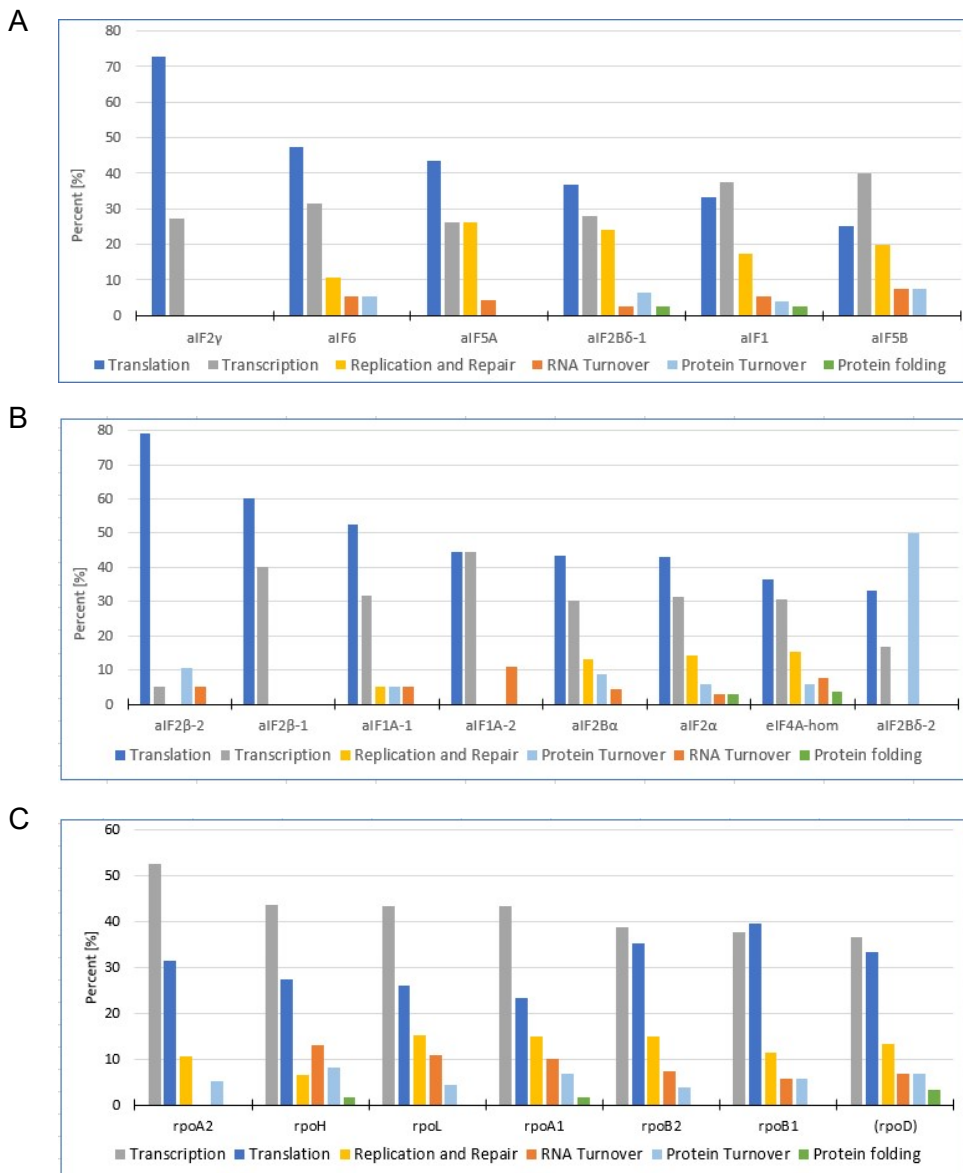
Berücksichtigt wurden verschiedene Proteine der Translation, Transkription, Replikation und Reparatur. Hinzu kamen Proteine des Protein- und RNA-Turnovers sowie der Proteinfaltung. Die prozentuale Verteilung der Bereiche in Abhängigkeit der Translation ist in Abbildung 50A für die essenziell eingestuften aIFs dargestellt und für die nicht essenziell eingestuften aIFs in Abbildung 50B aufgezeigt.

Da der Anteil an co-gereinigten Proteinen, die an der Transkription beteiligt sind, signifikant war, wurden entsprechend Proteine der Transkription ebenfalls mit einem Tag versehen und co-gereinigt. Dabei handelte es sich um sieben RNAPUs und viele Transkriptionsregulatoren. Diese konnten mit mehreren aIFs co-gereinigt werden. Somit wurde die Analyse auf die Transkription ausgeweitet.

Um den Zusammenhang zwischen Translation und Transkription in *H. volcanii* zu untersuchen wurden die sieben RNAPUs ebenfalls mit einem His-Tag versehen und Affinitätsaufreinigungen mit anschließender MS-Analyse durchgeführt. Die Auswertung erfolgte analog wie für die aIFs beschrieben. Berücksichtigt wurden die Proteine der Translation, Transkription, Replikation und Reparatur, Proteine des Protein- und RNA-Turnovers sowie der Proteinfaltung (Abbildung 50C).

Es ist hervorzuheben, dass dank der in der Arbeit verwendeten Methode nicht nur die gesamte RNAP des *H. volcanii* mit den sieben getaggen RNAPUs co-gereinigt wurden, sondern darüber hinaus auch das Verfahren erfolgreich etabliert werden konnte. Zwei Untereinheiten bildeten dabei die Ausnahme.

Prozentual deckte bei den sieben RNAPUs im Vergleich zu den anderen Gruppen die Transkription den größten Bereich ab. Wobei auch der prozentuale Anteil der zur Translation gehörenden Proteine signifikant hoch war. Hinzu kam, dass mit den sieben RNAPUs vier aIFs co-gereinigt werden konnten. Mit den Ergebnissen lässt sich eine enge Verbindung zwischen Transkription und Translation in *H. volcanii* vermuten.



**Abbildung 50: Statistische Auswertung der MS-Daten**

Prozentuale Verteilung der Proteine in die Bereiche Transkription, Translation, Replication and Repair, RNA-Turnover, Protein-Turnover und Protein folding. **A.** Statistische Auswertung der essenziell eingestuft aIFs, prozentual absteigend, anhand der Translation sortiert. **B.** Statistische Auswertung der nicht essenziell eingestuft aIFs, prozentual absteigend, anhand der Translation sortiert. **C.** Statistische Auswertung der RNAPUs, prozentual absteigend, anhand der Transkription sortiert.

## 4.2 Auswahl des Tags für die Affinitätsaufreinigung

Es gibt eine Vielzahl verschiedener Tags, die für die Affinitätsaufreinigung des Köder- bzw. Bait-Proteins verwendet werden können. In dieser Arbeit wurden drei verschiedene Tags ausgewählt, die bereits erfolgreich in Archaeen verwendet wurden. Diese sind die CBD, BBP und der 6xHis (Morag *et al.*, 1995; Allers *et al.*, 2010; Oeffinger, 2012).

Hierfür wurde die CBD, BBP und der 6xHis jeweils N-terminal mit der DHFR unter Kontrolle eines konstitutiven Promotors überproduziert. Für BBP und den His-Tag konnte ein Fusionsprotein im Western Blot nachgewiesen werden. Für die CBD konnte weder im SDS-Gel noch im Western Blot ein Fusionsprotein mit der DHFR nachgewiesen werden. Dies war erstaunlich, da die CBD bereits mehrfach erfolgreich für die Affinitätsaufreinigung in Hochsalz verwendet wurde und hochspezifisch an Cellulose bindet (Irihimovitch *et al.*, 2003; Schlesner *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2014). Ein Grund dafür könnte die Größe des Tags sein, da die CBD allein bereits eine Peptidlänge von 167 AS besitzt und 18,4 kDa schwer ist. Damit ist der CBD-Tag im Vergleich zu den anderen beiden Tags verhältnismäßig groß. Außerdem kann er damit die Faltung des Fusionsproteins beeinflussen.

Auch der BBP-Tag wurde für die Produktion von archaealen Proteinen mehrfach verwendet (Kähler and Antranikian, 2000; Bucher, Evdokimov and Waugh, 2002). Der in dieser Arbeit verwendete BBP-Tag war 14 Aminosäuren lang, aber weniger effizient als der His-Tag mit sechs Aminosäuren. Deshalb wurde der His-Tag für die Aufreinigungen verwendet. Für die Affinitätsaufreinigung in Verbindung mit dem 6xHis-Tag sprach nicht nur die Länge sondern auch die Integrität des Tags. Hinzu kommt die Eigenschaft des His-Tag, der das angehängte Protein meist nur wenig beeinflusst (Carson *et al.*, 2007).

## 4.3 Experimentelles Design zur Identifizierung von Bindungspartnern

Da der 6xHis-Tag anfälliger für die Bindung von nativen Polyhistidinen an das Säulenmaterial ist, wurden verschiedene Kontrollen verwendet. Das bedeutet, dass Proteine die in ihrer natürlichen Aminosäuresequenz mehrfach Histidine besitzen und ebenfalls mitgereinigt werden. Wie beispielsweise in *H. volcanii* pitA (HVO\_1871) und cdc48d (HVO\_1907) (Allers *et al.*, 2010). Um diese falsch positiven Proteine zu identifizieren wurden sehr stringente Negativkontrollen verwendet. Dazu diente sowohl pSDHDHFR als auch pSD+P in H26 $\Delta$ DHFR. Ferner konnte mit diesen Kontrollen der Einfluss der Überexpression und des Novobiocin überprüft werden. Proteine, die mit den beiden Kontrollen in Dreifachbestimmung in der MS identifiziert wurden, wurden aus den Auswertungen ausgeschlossen. Zu diesen Proteinen gehörten auch cdc48d und PitA. PitA konnte für pSDHDHFR in dreifach-Bestimmung nachgewiesen werden, bei pSD+P konnte er nur in zwei von drei Messungen nachgewiesen werden. Das unterstreicht die Wichtigkeit beider Kontrollen. Bei den mitgereinigten Proteinen gab es zwar Überschneidungen, aber auch Proteine, die nur in einer der beiden Kontrollen identifiziert werden konnten.

In dieser Arbeit wurde auf eine heterologe Expression in einem Wirt wie zum Beispiel *E. coli* verzichtet. Durch die Adaption an das Hochsalz und die osmotischen Bedingungen besitzt *H. volcanii* eine hohe Konzentration an Kaliumionen (Danson and Hough, 1997). Zur Anpassung besitzen die Proteine daher einen hohen Anteil an sauren Aminosäuren (Mevarech, Frolow and Gloss, 2000). Unter anderen Bedingungen wie beispielweise in *E. coli* kann es deshalb zu einer falschen Faltung der Proteine kommen. Durch die geringe Ionenstärke können die Proteine aggregieren (Blecher, Goldman and Mevarech, 1993; Connaris *et al.*, 1999). Auch posttranslationale Modifikationen wie Acetylierung und Ubiquitinierung gingen verloren (Altman-Price and Mevarech, 2009; Humbard *et al.*, 2010).

Durch die stringenten Kontrollen und die Mehrfachbestimmung konnten viele falsch positive Proteine ausgeschlossen werden. Das unterstreicht die Tatsache, dass mit 22 verschiedenen affinitätsgereinigten Proteinen sich die Muster der gereinigten Proteinen unterschieden. Damit wird das hier gewählte experimentelle Design bestätigt.

Um die in der Arbeit verwendete Methode zur Affinitätsaufreinigung weiter zu modifizieren, könnte man die Proteine anstatt über einen pull-down-Assay auch über eine Säule aufreinigen (Allers, 2010; Stroud, Liddell and Allers, 2012).

## 4.4 Vergleich aIF-aIF-Interaktionen

### 4.4.1 aIF1

Der Translationsinitiationsfaktor IF1/eIF1/aIF1 ist ein universeller Faktor und ist damit in allen drei Domänen des Lebens vertreten. In Eukaryonten ist er unter anderem als eIF1, in Bakterien als YciH und in Archaeen als aIF1 benannt. Alle drei Faktoren weisen ähnliche Funktionen auf (Kyrpides and Woese, 1998b).

In *H. volcanii* sind zwei Gene (HVO\_1946 und HVO\_B0284) für aIF1 codiert. Sie besitzen jedoch nur zu 49 % eine identische Aminosäuresequenz. Im Gegensatz zu HVO\_1946 konnte HVO\_B0284 deletiert werden (Gäbel *et al.*, 2013). Dies ist ein weiterer Unterschied der beiden Annotationen.

In *Homo sapiens* (*H. sapiens*) codieren ebenfalls zwei Gene für eIF1. Diese sind eIF1 und eIF1B. Die Funktion von eIF1 konnte geklärt werden. Für eIF1B ist sie noch nicht bekannt (Ivanov *et al.*, 2010).

Zu Beginn dieser Arbeit wurde HVO\_B0284 die Funktion als Translationsinitiationsfaktor aberkannt und als falsche Annotation eingestuft. Aus diesem Grund wurde er in dieser Arbeit nicht näher betrachtet (Friedhelm Pfeiffer, Martinsried, persönliche Mitteilung).

Da HVO\_1946 essenziell ist, wurde die Überexpression im Wildtyp durchgeführt. Bei der Überexpression von aIF1 wurde ein starker Phänotyp der Mutante in Form von sehr viel schlechterem Wachstum nachgewiesen. Dieses Phänomen konnte auch von Ivanov und Kollegen im Jahre 2010 bei der Überexpression von eukaryontischem eIF1 aus humanen HEK-

293T Zellen dokumentiert werden. Dabei findet eine autoregulatorische Repression in Form einer negativen Rückkopplung des eIF1 statt. Daraus folgt, dass aufgrund des Überangebotes an eIF1 sich der Translationsinitiationsfaktor selbst hemmt (Ivanov *et al.*, 2010).

In Eukaryonten wird eIF1 als „Gatekeeper“ beschrieben. Bei der Erkennung des AUG-Codons als Startcodon, wird eIF1 freigesetzt. Dies bewirkt die Hydrolyse von eIF2-gebundenem GTP. Es folgt die Freisetzung von Pi von eIF2, die von der Dissoziation des eIF1 abhängig ist (Algire, Maag and Lorsch, 2005).

Für Archaeen wurde in *Pyrococcus abyssi* (*P. abyssi*) mittels Cryo-EM bewiesen, dass aIF1 und aIF2 ebenfalls Kontakte in ihren Strukturen aufweisen. Einer dieser Bereiche umfasst den Nukleotid-Zustand kontrollierenden Switch. Dabei besitzt die Pi-Bindung von e/aIF2 eine stabilisierende Wirkung auf den Kontakt der Switch-Regionen von aIF2 $\gamma$  und der N-terminalen Domäne von e/aIF1. Bei Verlassen des Komplexes von e/aIF1 führt das Freilegen dieses Bereiches zur Destabilisierung des Pi, was in der Freigabe und der Dissoziation von e/aIF2-GDP endet (Coureux *et al.*, 2016).

In *H. volcanii* konnte mit aIF1 keine aIF2-Untereinheit co-gereinigt werden. Allerdings konnte aIF1 mit aIF2 $\alpha$  unter stationären Bindungen mitgereinigt werden. Sonst konnte aIF1 mit keinem weiteren Initiationsfaktor mitgereinigt werden.

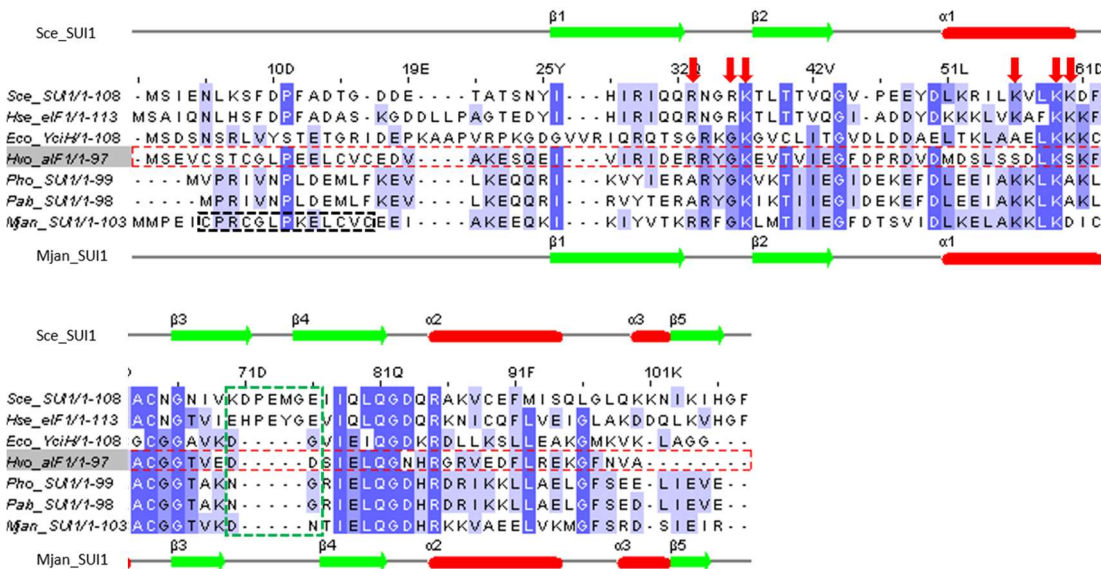
Bis jetzt wurde in mehreren Studien gezeigt, dass eIF1 und aIF1 in ihrer Funktion sehr ähnlich sind. In *S. solfataricus* ist aIF1 für die Bindung des ternären Komplexes an das Ribosomen zuständig. Darüber hinaus diskriminiert es nicht-kanonische Startcodons und erhöht die Translationseffizienz. Im Vergleich zu Eukaryonten existiert in Archaeen kein *long-range-Scanning*. Ein Grund dafür ist, es gibt in Archaeen viele Transkripte ohne bzw. nur mit einer kurzen 5'-UTR (Hasenöhl *et al.*, 2006, 2009; Coureux *et al.*, 2016).

Trotz der ähnlichen Funktionen besitzen aIF1 und eIF1/SUI1 eine geringe Sequenzidentität. Sie sind jedoch in ihrer Struktur sehr ähnlich aufgebaut. Die Aminosäuresequenz von aIF1 in *H. volcanii* und *M. jannaschii* ist zu 52,6 % identisch, wobei der C-terminale Bereich von *H. volcanii* verkürzt ist.

Ein multiples Sequenz-Alignment (Visualisierung in Jalview) und zusätzliche Darstellung der Strukturelemente wurde für den Vergleich der aIF1/eIF1/SUI1/YciH aus den drei Domänen des Lebens angewandt (Abbildung 51).

In eIF1 gibt es sechs basische Reste, die unter anderem für die Interaktion von eIF1 mit der 18S rRNA dienen. Diese sind Arg33, Arg36, Lys37, Lys56, Lys59 und Lys60. In aIF1 von *H. volcanii* sind Arg33, Lys37 und Lys59 vorhanden. Zusätzlich gibt es Arg34. Die Nummerierung orientiert sich hierbei an der Sequenz von SUI1 in *S. cerevisiae*. In *P. horikoshii* ist Lys37, Lys56 und Lys59 von den basischen Resten vertreten. Die für die Interaktion mit der 18S rRNA essenziellen Reste Lys37 und Lys59 sind in allen drei Domänen konserviert. Die anderen drei basischen Reste Arg36, Lys56 und Lys60 sind in *H. volcanii* durch Gly37, Ser58 und Ser62 ersetzt. Die Aminosäurereste (Asp71, Glu73 und Glu76), die in Eukaryonten wie *S. cerevisiae*

den azidischen Loop bilden, sind in aIF1 nicht vorhanden. In Eukaryonten ist er für die Bindung an das Ribosom wichtig (Gogoi and Kanaujia, 2018; Monestier *et al.*, 2018). Dennoch konnte in der Cryo-EM in *P. abyssi* von Monestier und Kollegen 2018 gezeigt werden, dass aIF1 ähnlich wie sein eukaryontisches Homolog an das Ribosom bindet. Dabei sind die Aminosäuren Arg34, Tyr35 und Lys37 involviert (Monestier *et al.*, 2018).



**Abbildung 51: Sequenz-Alignment aIF1/eIF1/SUI1/YciH (modifiziert nach (Gogoi and Kanaujia, 2018))**

Ein multiples Sequenz-Alignment mit Visualisierung in Jalview und zusätzliche Darstellung der Strukturelemente von *S. cerevisiae* (SUI1, P32911), *H. sapiens* (eIF1, P41567), *E. coli* (YciH, P08245), *H. volcanii* (aIF1, D4GTH5), *P. horikoshii* (SUI1, P58193), *P. abyssi* (SUI1, Q9V1U3) und *Methanocaldococcus jannaschii* (SUI1, Q57902). Die schwarze Box umrahmt das Zinkbinde-Modul. Die roten Pfeile markieren die basischen Reste, die an der Interaktion zwischen eIF1 und der 18S rRNA beteiligt sind. Die grüne Box umrahmt die in eIF1 konservierten sauren Reste. Die Struktur von SUI1 aus *S. cerevisiae* und *M. jannaschii* zeigen die  $\beta$ -Strands und  $\alpha$ -Helices.

Monestier und Kollegen konnten 2018 zeigen, dass die aIF1-N-terminale Domäne eine Zinkbinde-Modul in 60% der aIF1-Sequenzen in Archaeen besitzen (Abbildung 51). In Eukaryonten ist das Modul nicht vorhanden (Monestier *et al.*, 2018). Dies könnte den Unterschied zwischen dem Scanning in Archaeen und Eukaryonten erklären. In Eukaryonten findet das Scanning über einen großen Bereich und in Archaeen ein lokales Scanning statt.

In *P. abyssi* und *S. solfataricus* konnte für aIF1 ein stabilisierender Effekt auf einen 30S-mRNA-Komplex nachgewiesen werden (Hasenöhl *et al.*, 2006; Monestier *et al.*, 2018). Dies könnte eine Erklärung für die mit aIF1 co-gereinigten 30S ribosomalen Proteine sein. In dieser Arbeit konnte mit aIF1 auch aIF1A-2 mitgereinigt werden. Hier könnte ein Co-Reinigung durch ribosomale Proteine stattgefunden haben. Beide Faktoren sind in Bakterien, Archaeen und Eukaryonten stark konserviert. Es binden beide Faktoren an die kleine 30S ribosomale Untereinheit. Mit dieser 30S ribosomalen Untereinheit und dem IF2/aIF2/eIF2 bilden sie den Präinitiationskomplex und sind an der Startcodonwahl beteiligt.

#### 4.4.2 aIF1A-1 und aIF1A-2

Generell ist der Initiationsfaktor 1A in allen drei Domänen des Lebens konserviert. In Bakterien ist er als IF1, in Eukaryonten als eIF1A und in Archaeen als aIF1A bekannt (Peter Sørensen, Jakob Hedeg, 2001). In *H. volcanii* gibt es jedoch zwei orthologe Gene, die für aIF1A codieren. Dies tritt auch in weiteren *Haloferax*-Vertretern auf. Beispielsweise in *Haloferax larsenii* oder *Haloferax mucosum* (siehe Anhang [Abbildung 67](#)).

Die Gene HVO\_0136 (aIF1A-1) und HVO\_A0637 (aIF1A-2) in *H. volcanii* codieren beide für den Initiationsfaktor 1A. Beide Gene konnten einzeln aber nicht gleichzeitig deletiert werden. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass sich die beiden Faktoren teilweise in ihrer Funktion ersetzen können (Gäbel *et al.*, 2013). Des Weiteren hat aIF1A-1 ein dreifach höheres Expressionslevel als aIF1A-2, was unter anderem auf dessen Startcodon GUG zurückzuführen ist (Babski *et al.*, 2016). In der Masterarbeit von Pia Fischer konnte mittels Reporter-gen-Assay bewiesen werden, dass beide Orthologe eine Rolle bei der Erkennung und Diskriminierung von Transkripten mit dem Startcodon UUG spielen. Dabei wurde das Reporter-gen DHFR, mit unterschiedlichem Startcodon, sowie mit und ohne 5'-UTR, in den Deletionsmutanten von aIF1A-1 und aIF1A-2 verwendet (Pia Fischer, Masterarbeit 2019).

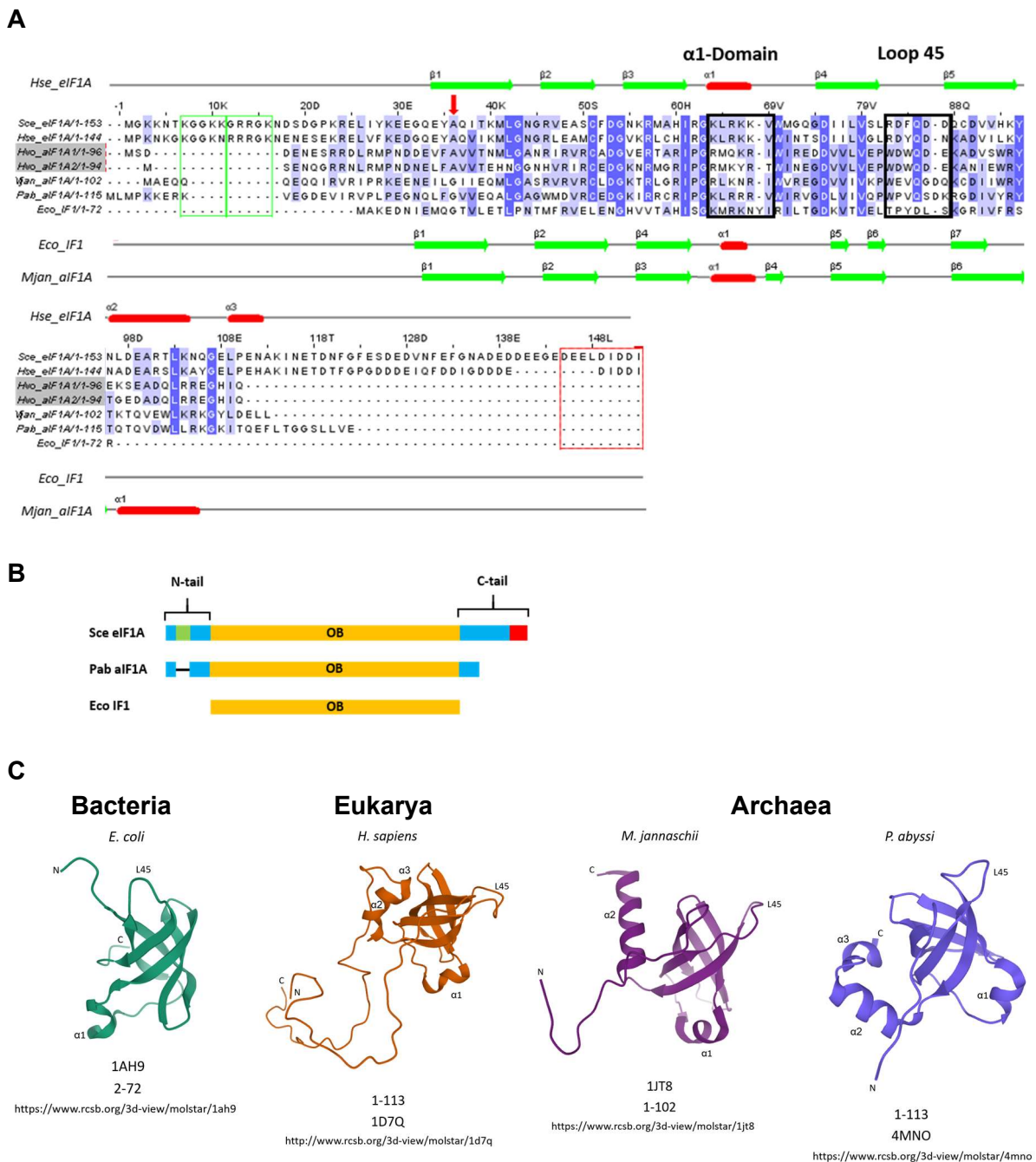
Die beiden Proteine aIF1A-1 und aIF1A-2 besitzen eine zu 67 % identische Aminosäuresequenz. Ein Sequenz-Alignment des IF1/eIF1A/aIF1A in den drei Domänen des Lebens sowie aIF1A-1 und aIF1A-2 von *H. volcanii* ist in [Abbildung 52](#) dargestellt. Die für RNA-Bindeproteine typische Oligonukleotid-Bindungsfaltung (*OB-Fold*) wurde bereits für alle drei Domänen des Lebens in IF1/eIF1A/aIF1A mittels NMR nachgewiesen (Sette, 1997; Battiste *et al.*, 2000; Li and Hoffmann, 2001).

Die Aminosäure Ala36 ist in *M. jannaschii*, *P. abyssi* und *E. coli* durch Gly36 ersetzt. Jedoch bleiben die Eigenschaften der getauschten Aminosäuren gleich ([Abbildung 52](#), rote Pfeil). Die Nummerierung orientiert sich hierbei an der Sequenz von eIF1A von *S. cerevisiae*. Die grüne Box zeigt die in Eukaryonten konservierte N-terminale Sequenz mit mehreren basischen Resten. Sie werden für die Interaktion von eIF1 mit eIF5 benötigt. In Archaeen und Bakterien ist die N-terminale Sequenz sowie der Faktor eIF5 nicht konserviert (Luna *et al.*, 2013). Dennoch besitzen Archaeen im Vergleich zu Bakterien einen verlängerten N-terminalen Bereich. Außerdem konkurriert in Eukaryonten eIF5 mit eIF1A um die Bindung an eIF5B (Luna *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2018).

Eukaryonten und Archaeen besitzen N-terminal einen flexiblen Loop und C-terminal eine  $\alpha$ -Helix. Beide Strukturbereiche existieren im bakteriellen IF1 nicht (Li and Hoffmann, 2001). Dies trifft auch auf *H. volcanii* zu. Der Vergleich der Strukturen von eIF1A/aIF1A/IF1 ist in [Abbildung 52C](#) dargestellt. Eine dritte  $\alpha$ -Helix ist sowohl in eIF1A bei *H. sapiens* als auch bei aIF1A von *P. abyssi* bekannt.

In Eukaryonten interagiert das C-terminale Ende von eIF1A mit eIF5B. Ferner beinhaltet dieser Bereich saure Reste (Allen and Frank, 2007; Lin *et al.*, 2018). Die beiden schwarz

umrahmte Kästen zeigen die Helix 1 $\alpha$  und den Loop L45. Sie sind sowohl für die Interaktion des C-terminalen Endes von eIF1A mit sich selbst, aber auch für die Interaktion von eIF1A mit dem Ribosomen zuständig (Yu *et al.*, 2009; Nag *et al.*, 2016).



**Abbildung 52: Sequenz-Alignment IF1/eIF1A/aIF1A modifiziert (Li and Hoffmann, 2001; Luna *et al.*, 2013)**  
**A.** Strukturbasierendes Sequenz-Alignment mittels Clustal Omega visualisiert in Jalview. Dargestellt sind *S. cerevisiae* (eIF1A, P38912), *H. volcanii* (aIF1A-1, D4GZ79;aIF1A-2, D4GRU5), *M. jannaschii* (aIF1A, Q57887), *P. abyssi* (aIF1A, Q9V138) und *E. coli* (IF1, P69222). Die Struktur wurde annotiert von *E. coli*, *S. cerevisiae* und *M. jannaschii*. Die grüne Box hebt die basischen Reste und die rote Box die azidischen Reste hervor. Beides ist in Eukaryonten konserviert. Die beiden schwarz umrahmten Boxen stehen für die  $\alpha 1$  Domäne und den Loop45. Unter anderem interagieren sie mit dem C-Terminus. **B.** Abgleich des N- und C-Terminus der IF1/eIF1A/aIF1A. **C.** Strukturen des IF1/eIF1A/aIF1A mit Positionen der  $\alpha$ -Helices und L45.

Für die weitere Charakterisierung der beiden aIF1A codierenden Gene in *H. volcanii* wurden diese mit einem N-terminalen His-Tag versehen und überexprimiert. Jedoch konnte das



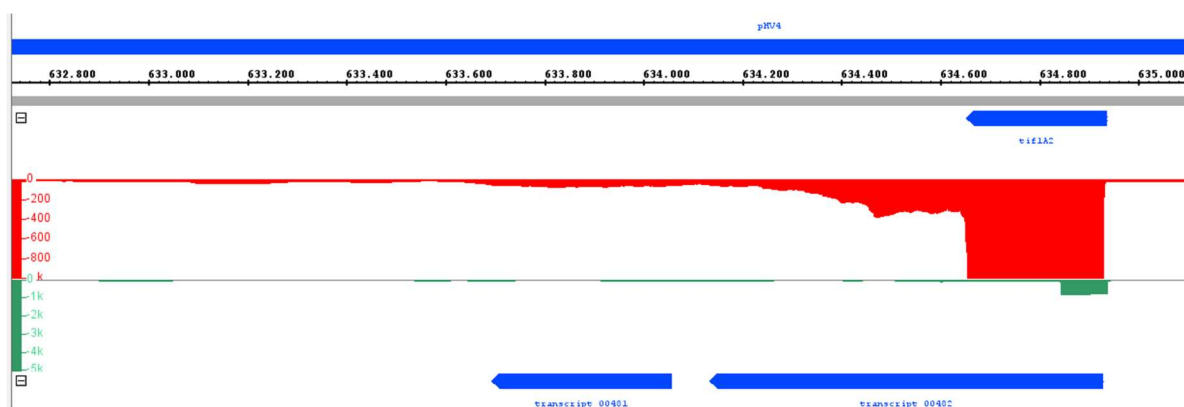
annotierte Gen für *alF1A-1* zunächst weder mit einem N-terminalen noch mit einem C-terminalen His-Tag überexprimiert werden. Nach Überprüfung der RNA-Seq und DNA-Seq-Daten, konnte für *alF1A-1* (HVO\_0136) ein um 83 nt downstream verlängertes Gen festgestellt werden (Abbildung 21). In dieser Arbeit wurde der Abschnitt als 3'-UTR bezeichnet. Mit dieser Sequenz war es letztendlich möglich *alF1A-1* erfolgreich zu exprimieren. Das ist bemerkenswert, da in *S. cerevisiae* eIF1A mit eIF5B unter anderem über den OB-Fold interagieren können (Nag *et al.*, 2016). Diese Interaktion wäre mit der 3'-UTR zwischen *alF1A* und *alF5B* in *H. volcanii* ebenfalls möglich.

In Eukaryonten interagiert eIF1A mit dem N-terminalen Bereich unter anderem mit eIF2 (Olsen *et al.*, 2003; Nag *et al.*, 2016). Jedoch konnte in *H. volcanii* mit *alF1A-1* und *alF1A-2* keine Untereinheit des *alF2* mitgereinigt werden.

Für *alF1A-2* konnte die Überexpression ebenfalls durchgeführt werden. Auf dem Coomassiegefärbten SDS-Gel konnte *alF1A-2* nur schwach visualisiert werden. Aufgrund dessen und des Gewichts von *alF1A-2*-Proteins wurde anschließend ein Tricin-Gel angefertigt. Die Bande auf Höhe des *alF1A-2*-Proteins erschien ebenfalls recht schwach. Dennoch konnte *alF1A-2* in der MS-Analyse identifiziert und *alF2δ-1* und *alF5B*, wie bei *alF1A-1*, mitgereinigt werden. Zwar konnte in dieser Arbeit mit *alF1* der Initiationsfaktor *alF1A-1* mitgereinigt werden, dies konnte umgekehrt aber nicht nachgewiesen werden. Weder mit *alF1A-1* noch mit *alF1A-2* konnte *alF1* co-gereinigt werden.

Bei den Wachstumsversuchen unter optimalen Bedingungen in Komplexmedium bei 42 °C wuchs die Überexpression des *alF1A-1* mit 3'-UTR besser als die Kontrolle mit dem Leerplasmid. Bei der Überexpression von *alF1A-2* konnte erst in der spätexponentiellen Phase ein besseres Wachstum im Vergleich zur Kontrolle mit Leerplasmid ermittelt werden.

Für *alF1A-2* wurde im Rahmen der Auswertung ebenfalls die RNA-Seq- und DNA-Seq-Daten herangezogen. Dabei konnte auch ein verlängertes Transkript in der Transkript-Vorhersage für *alF1A-2* (*tif1A2*) festgestellt werden (Abbildung 53).



**Abbildung 53: DNA- und RNA-Seq-Daten des *alF1A-2* (HVO\_A0637)**

Das Gen *alF1A-2* bzw. *tif1A2* in blau, das Transkriptionslevel in rot und der Transkriptionsstart in grün auf dem Plasmid pHV4. Transkript 00402 ist das Ergebnis der Transkript-Vorhersage für *alF1A-2* (634.651-633.571).

In Eukaryonten wird angenommen, dass das C-terminale Ende von eIF1A an der Rekrutierung und Stabilisierung des ternären Komplexes beteiligt ist. Es wurden Substitutionen in diesem Bereich identifiziert, die die Rate der Bindung des ternären Komplexes an die 40S ribosomale Untereinheit *in vitro* reduziert, ohne jedoch die 40S-Bindung durch die mutierten Faktoren selbst zu beeinflussen (Fekete *et al.*, 2005, 2007; Saini *et al.*, 2009).

Wie von Hasenöhrl und Kollegen in Archaeen für *S. solfataricus* beschrieben, könnte auch in *H. volcanii* aIF1A-1 bei der Bindung des ternären Komplexes an die kleine ribosomale Untereinheit beteiligt sein (Hasenöhrl *et al.*, 2009).

Um die exakte Länge der Transkripte von HVO\_0136 und HVO\_A0637 genau zu bestimmen, könnte als nächster Schritt eine 3'-Enden-Bestimmung stattfinden. Des Weiteren könnte ein Northern Blot der mRNA im Wildtyp mit einer Sonde gegen das Transkript verwendet werden, um die genaue Größe zu bestimmen. Eine andere Möglichkeit auf Proteinebene wäre, einen His-Tag N-terminal in die genomische DNA vor den jeweiligen Initiationsfaktor zu klonieren, anschließend über eine Aufreinigung das native Protein mit His-Tag zu gewinnen und die Länge des Proteins in der MS zu bestimmen.

### 4.4.3 aIF2

In Archaeen und Eukaryonten ist der trimere Translationsinitiationsfaktor aIF2/eIF2 vertreten. Dabei besteht in beiden Domänen des Lebens aus den drei Untereinheiten  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ . In Eukaryonten sind alle drei Untereinheiten unabdingbar, wohingegen in Archaeen einheitlich nur aIF2 $\gamma$  essenziell ist (Tabelle 56).

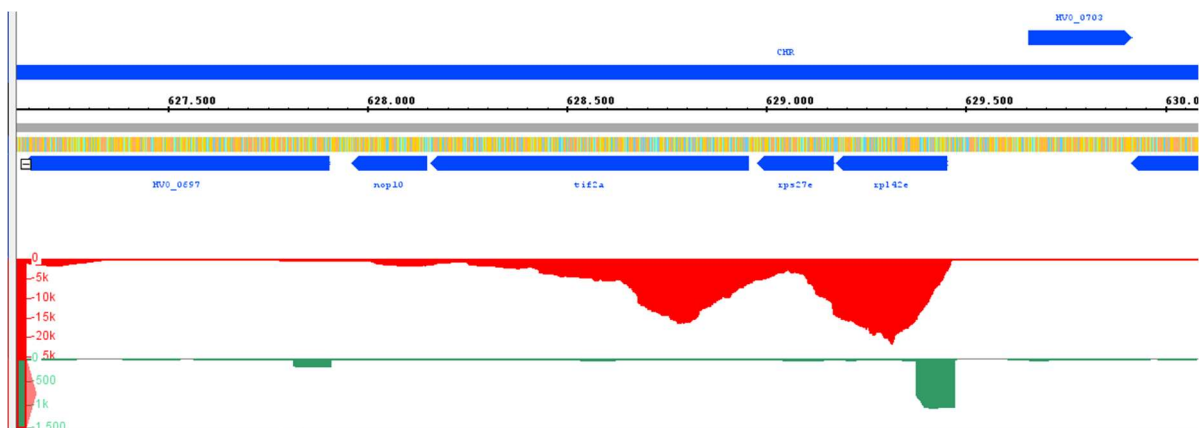
In *H. volcanii* gibt es zwei orthologe Gene (aIF2 $\beta$ -1 und aIF2 $\beta$ -2), die für die  $\beta$ -Untereinheit codieren. Sie konnten einzeln deletiert. Es konnte aber keine Doppeldelentionsmutante erstellt werden. In der Deletion von aIF2 $\beta$ -2 wurde aIF2 $\beta$ -1 um das 10-fache hochreguliert (Gäbel *et al.*, 2013). Des Weiteren besitzt aIF2 $\beta$ -1 ein siebenfach geringeres Expressionslevel als aIF2 $\beta$ -2 (Babski *et al.*, 2016). Im Anhang in Abbildung 68 ist das Sequenz-Alignment der beiden aIF2 $\beta$ -Untereinheiten dargestellt. Die Sequenzen sind nur zu 39 % identisch.

#### 4.4.3.1 aIF2 $\alpha$

In *H. volcanii* konnte aIF2 $\alpha$  deletiert werden und wurde daher als nicht essenziell eingestuft. Er zeigte jedoch unter allen getesteten Wachstumsbedingungen starke Phänotypen, die sich in sehr viel schlechterem Wachstum äußerten (Gäbel *et al.*, 2013).

In dieser Arbeit zeigte die Überexpressionsmutante von aIF2 $\alpha$  zu Beginn ein sehr viel schlechteres Wachstum als die Kontrolle mit dem Leerplasmid. Ab 24 h, in der spätexponentiellen Phase, wuchs die Überexpressionsmutante besser als die Kontrolle mit Leerplasmid.

Im Genom von *H. volcanii* liegt das Gen des aIF2 $\alpha$  (*tif2a*) in einem Operon downstream von rpS27e (HVO\_0700), rpl42e (HVO\_0701) und *upstream* von nop10 (HVO\_0698). Die RNA- und DNA-Seqdaten sind hierfür in Abbildung 54 gezeigt. Dieses Cluster enthält Proteine für die Translation und die Ribosomenbiogenese. Es ist sowohl in Archaeen als auch in Eukaryonten konserviert (Berthon, Cortez and Forterre, 2008).



**Abbildung 54: DNA- und RNA-Seq-Daten des aIF2 $\alpha$  (HVO\_0699)**

Die Gene sind in blau, das Transkriptionslevel in rot und der Transkriptionsstart in grün dargestellt. Das Gen aIF2 $\alpha$  bzw. *tif2a* liegt als drittes Gen im Operon auf dem Reverse-Strang.

#### 4.4.3.1.1 Vergleich der stationären und exponentiellen Kultur von *alF2α*

Bei den Wachstumsuntersuchungen unter optimalen Bedingungen, zeigte die Deletionsmutante des *alF2α* ein sehr viel schlechteres Wachstum im Vergleich zum Wildtyp. Die Überexpression im Deletionsstamm hingegen verhielt sich ähnlich zur Deletionsmutante mit Leerplasmid. Jedoch zeigte die Überexpressionsmutante ein besseres spätexponentielles Wachstum. Um diese Beobachtung weiter zu untersuchen, wurden die Affinitätsaufreinigungen des *alF2α* nicht nur in der exponentiellen, sondern auch in der stationären Phase untersucht.

Unterschiede zwischen den beiden Ansätzen zeigten sich bereits in den Elutionsfraktionen auf den SDS-Gelen. Zusätzlich zur MS-Analyse der Elutionsfraktionen wurden deshalb einzelne Banden ausgeschnitten (Abbildung 24). Für die Bestimmung der enthaltenen Proteine wurden sie anschließend in der MS analysiert. Anhand des höchsten PSM-Wertes und der Abundanz wurden die identifizierten Proteine für die einzelnen Banden eingeordnet. Es war jedoch schwierig ein eindeutiges Protein zu bestimmen. Bei drei der fünf Banden, die nicht auf der kDa-Höhe von *alF2α* lagen, konnte *alF2α* mit den höchsten PSM-Werten und der höchsten Abundanz identifiziert werden. Dies ist unter anderem auf das Überladen des SDS-Gels und der Überexpression zurück zu führen. Wegen dieser beiden Gründe wurden für die Banden vier, sechs und sieben zwei Proteine angegeben. Für die beiden letzteren Banden konnte auf gleicher Höhe das gleiche Protein identifiziert werden. Dabei handelt es sich um die Molybdopterin Adenyltransferase. Dieses Protein wurde allerdings auch bei einer der Kontrollen co-gereinigt (6x-His-DHFR Tabelle 51), weshalb es als unspezifisches Protein ausgeschlossen wurde.

Die in den Banden identifizierten Proteine konnten auch in den MS-Analysen der Elutionsfraktionen für *alF2α*-exp und *alF2α*-stat nachgewiesen werden. Es konnten keine Proteine in den Banden identifiziert werden, die nicht in beiden Ansätzen zugegen waren. Unterschiede zwischen den beiden Ansätzen *alF2α*-exp und *alF2α*-stat gab es dennoch. Sie zeigten sich anhand der MS-Analysen der Elutionsfraktionen im direkten Vergleich (Tabelle 57). Nach der MS-Auswertung konnten für die exponentielle Kultur *alF2α*-exp 35 und für die stationäre Kultur *alF2α*-stat 79 Proteine berücksichtigt werden. Mit Ausnahme von rpL10 (HVO\_2756) konnten die in der exponentiellen Phase identifizierten Proteine auch in der stationären Phase nachgewiesen werden.

Das rpL10 wird wegen seiner Homologie in Eukaryonten auch P0 genannt und ist Bestandteil des P-Stiels. Es ist ein universelles ribosomales Protein, das in allen drei Domänen des Lebens vertreten ist (Mitroshin, Garber and Gabdulkhakov, 2016). Dabei ähnelt der archaeale und eukaryontische P-Stiel dem L12-Stiel in Bakterien. Die beteiligten Proteine sind jedoch Homologe zu Eukaryonten (Uchiumi, Wahba and Traut, 1987; Maki *et al.*, 2007).

In Archaeen besteht der P-Stiel aus den ribosomalen Proteinen rpL11, rpL10/P0, sowie rpL12/P1. Er spielt eine wichtige Rolle in der Interaktion des Ribosom mit GTP-gebundenen

Translationsinitiationsfaktoren. Unter anderem bildet rpL10 mit rpL12 in Archaeen ein starken Komplex und interagiert mit der rRNA (Casiano, Matheson and Traut, 1990).

In *H. volcanii* konnte rpL10/P0 nicht nur mit aIF2 $\alpha$ -exp, sondern auch mit aIF1, aIF2B $\delta$  und dem eIF4A-homolog mitgereinigt werden. Hingegen konnte das Protein rpL12/P1 (HVO\_2755) mit keinem Initiationsfaktor mitgereinigt werden. Der rpL11 (HVO\_2758) wurde nur in den FPLCs von aIF2 $\alpha$  nachgewiesen werden. Dies beschränkte sich auf die Fraktionen in der Schulter und vor der Peak-Spitze.

In *H. volcanii* scheinen HVO\_2755 bis HVO\_2757 in einem Operon und rpL11 (HVO\_2758) in direkter Nachbarschaft zu liegen. In den meisten Archaeen sind ribosomale Proteine, ähnlich wie in Bakterien, in Operons organisiert. Dies gilt auch für rpL1 (Ramírez *et al.*, 1993). Unter anderem konnte bei *Methanococcus vannielii* bei der Synthese der ribosomalen Proteine des rpL1-Operon eine regulatorische Funktion von rpL1 nachgewiesen werden (Kraft *et al.*, 1999).

Unter stationären und exponentiellen Kulturbedingungen konnten nach der Affinitätsaufreinigung und MS-Analyse aIF2 $\beta$ -2 und aIF2 $\gamma$  mitgereinigt werden.

Unter stationären Bedingungen konnte als weiterer Translationsinitiationsfaktor, aIF1 nachgewiesen werden. Coureux und Kollegen beschrieben 2016 für *P. abyssi* die Interaktion zwischen aIF2 und aIF1, anhand der Cryo-EM-Struktur des Präinitiationskomplexes. Jedoch findet die Interaktion zwischen der  $\gamma$ -Untereinheit von aIF2 statt (Coureux *et al.*, 2016). Grund für die Co-Reinigung von aIF1 mit aIF2 $\alpha$  könnte dem zu Folge an der Interaktion mit aIF2 $\gamma$  liegen. In *S. cerevisiae* ist eIF1 an der Startcodonwahl beteiligt und besitzt eine autoregulatorische Funktion in der Translationsinitiation (Cheung *et al.*, 2007; Ivanov *et al.*, 2010).

Insgesamt konnten 45 weitere Proteine in der MS-Analyse der stationären Kultur identifiziert werden. Zum Einen für die Translation aIF1 (HVO\_1946). Zum Anderen für die Transkription TFIIB (*Transcription initiation factor* IIB; HVO\_1478) und Nob1 (HVO\_1965). Die Proteine konnten in keiner weiteren Aufreinigung von Initiationsfaktoren nachgewiesen werden.

TFIIB wird in Archaeen und Eukaryonten für die Transkriptionsinitiation mit RNAP-II benötigt. In Archaeen ist TFIIB ferner an der Bindung eines TATA box Bindeproteins (TBP) an die Promotorbox-A (TATA-box) beteiligt. Des Weiteren ist er für die Rekrutierung der RNAP- II und die Bildung des Transkriptions-Präinitiationskomplexes zuständig. Dieser besteht aus DNA, TBP und TFIIB (Thomm, 1996; Perez-Rueda and Janga, 2010). In *H. volcanii* sind zwölf TFIIB annotiert. Aus dieser TFIIB-Familie konnte nur HVO\_1478 ausschließlich in der stationären Phase von aIF2 $\alpha$  co-gereinigt werden.

Nob1 ist in Eukaryonten sowie in Archaeen vertreten. Unter anderem ist er in Hefe an der Reifung der kleinen ribosomalen Untereinheit beteiligt. Dabei spaltet Nob1 im pre-rRNA-Processing das Intermediat 20S rRNA an der D-Stelle, um die 18S rRNA zu erhalten (Lamanna and Karbstein, 2009). In *P. horikoshii* konnte für Nob1 die effiziente und manganabhängige

Spaltung von RNA-Substraten nachgewiesen werden. Die RNA-Substrate müssen dafür eine D-Stelle der pre-rRNA enthalten (Veith *et al.*, 2012).

In der Halobacteriaceae liegt Nob1 benachbart zu aIF5B. Dabei liegt aIF5B auf dem *Reverse*-Strang. Dies ist auch in *H. volcanii* (Nob1 HVO\_1965; aIF5B HVO\_1963) der Fall. Das Gen HVO\_1964, welches für ein *PRC domain protein* codiert, liegt zwischen den beiden Genen. Genau wie aIF5B konnte das PRC-Domain-Protein ebenfalls im exponentiellen und stationären Ansatz identifiziert werden. Ob hier eine Regulation zwischen den einzelnen Genen vorliegt, konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden.

#### 4.4.3.1.2 *Crosslinking* von aIF2 $\alpha$

Das *Crosslinking* von aIF2 $\alpha$  erfolgte mit verschiedenen Formaldehyd-Konzentrationen. Mit einer Konzentration von 0,8 % und 1,2 % Formaldehyd konnten am meisten Proteine auf dem SDS-Gel mittels Coomassie visualisiert werden. Daher wurden die beiden Ansätze erneut auf ein 8 % SDS-Gel aufgetragen. Dabei sollten die Banden in der oberen Hälfte des Gels besser aufgetrennt werden. Es zeigten sich einzelne Banden, die im optischen Vergleich ohne Formaldehyd nicht auf dem Coomassie-gefärbten SDS-Gel zu erkennen waren. Diese Banden wurden ausgeschnitten und in der MS analysiert.

Der identifizierte Transkriptionsregulator HVO\_0163 konnte bereits in der exponentiellen und stationären Aufreinigung nachgewiesen werden. Das Gleiche gilt für die *Vitamin B12-dependent ribonucleotide reductase* (HVO\_2452).

In einer weiteren Bande konnte der Elongationsfaktor aEF2 (HVO\_0356) mit der höchsten Abundanz bestimmt werden. Dieser Elongationsfaktor konnte mit der Ausnahme von drei aIFs bzw. -Untereinheiten mit allen aIFs mitgereinigt werden.

Die YgfD family GTPase (HVO\_0831) konnte in Bande 17 als Protein mit der höchsten Abundanz nachgewiesen werden. Dieses Protein erschien ebenfalls in der Kontrolle 6xHis-DHFR und wurde deshalb als Interaktionspartner ausgeschlossen.

Mittels *Crosslinking* und Analyse einzelner Banden aus dem SDS-Gel konnten keine weiteren Interaktionspartner von aIF2 $\alpha$  nachgewiesen werden. Zu bemerken ist, dass die gesamten Elutionsfraktionen des *Crosslinkings* nicht in der MS analysiert wurden. Damit wurde nur ein kleiner Teil der co-gereinigten Proteine beim *Crosslinking* betrachtet. Dennoch konnte bei der Analyse der Banden auch im *Crosslinking* aIF5B als möglicher Interaktionspartner bestätigt werden.

#### 4.4.3.1.3 Aminosäuremimikri in $\alpha$ F2

In Eukaryonten stellt die Phosphorylierung von  $\alpha$ F2 an Ser51 eine wichtige Rolle in der Translationsregulation dar. Dabei wird  $\alpha$ F2-GDP zu einem kompetitiven Inhibitor für  $\alpha$ F2B, der an  $\alpha$ F2 bindet und das  $\alpha$ F2-gebundene GDP mit GTP austauscht. Bei einer Phosphorylierung von  $\alpha$ F2 wird  $\alpha$ F2B blockiert,  $\alpha$ F2B bleibt gebunden und es findet kein GDP-GTP Austausch statt. Durch diese Phosphorylierung kann  $\alpha$ F2 weder neue Met-tRNA<sub>i</sub> noch an die 40S ribosomale Untereinheit binden und reguliert somit die Translationsinitiation. Dieser Regulationsmechanismus tritt unter Stress oder bei Mangel an Nährstoffen auf. Dabei wird  $\alpha$ F2 durch spezifische Kinasen phosphoryliert (Ron and Harding, 2007; Donnelly *et al.*, 2013; Wek, 2018).

Um die Interaktion in Archaeen zu untersuchen wurde bereits in *P. horikoshii* von Tahara 2004 eine Phosphorylierung an  $\alpha$ F2 *in vitro* mittels der  $\alpha$ F2 Kinase PKR nachgewiesen (Tahara *et al.*, 2004). Wobei zu bemerken ist, dass die Position Ser51 in Eukaryonten aber nicht in Archaeen konserviert ist (Abbildung 28).

Nach Abgleich der Aminosäuresequenzen wurde in *H. volcanii* Ser46 für die Mutationen im Aminosäuremimikri ausgewählt. Um eine Phosphorylierung an  $\alpha$ F2 zu simulieren wurde diese Aminosäure durch Alanin bzw. Asparaginsäure ausgetauscht. Beide  $\alpha$ F2-Mutanten wurden mit einem His-Tag versehen und im Deletionsstamm von  $\alpha$ F2 überexprimiert. Die Mutante mit Alanin diente dabei als Kontrolle. Beide Varianten wuchsen schlechter als die Variante ohne Mutation. Nach den Affinitätsaufreinigungen und der folgenden MS-Analyse konnte für beide Mutanten  $\alpha$ F2 nachgewiesen werden. Insgesamt konnten nur wenige Proteine auf dem SDS-Gel visualisiert und in der MS identifiziert werden. Bei keiner der beiden Mutanten wurde eine  $\alpha$ F2B-Untereinheit co-gereinigt. Durch die geringe Aussagekraft der Ergebnisse konnte in dieser Arbeit der Austausch von GDP-GTP durch  $\alpha$ F2B an  $\alpha$ F2 und die Phosphorylierung von  $\alpha$ F2, nicht bestätigt werden (Krishnamoorthy and Pavitt, 2001).

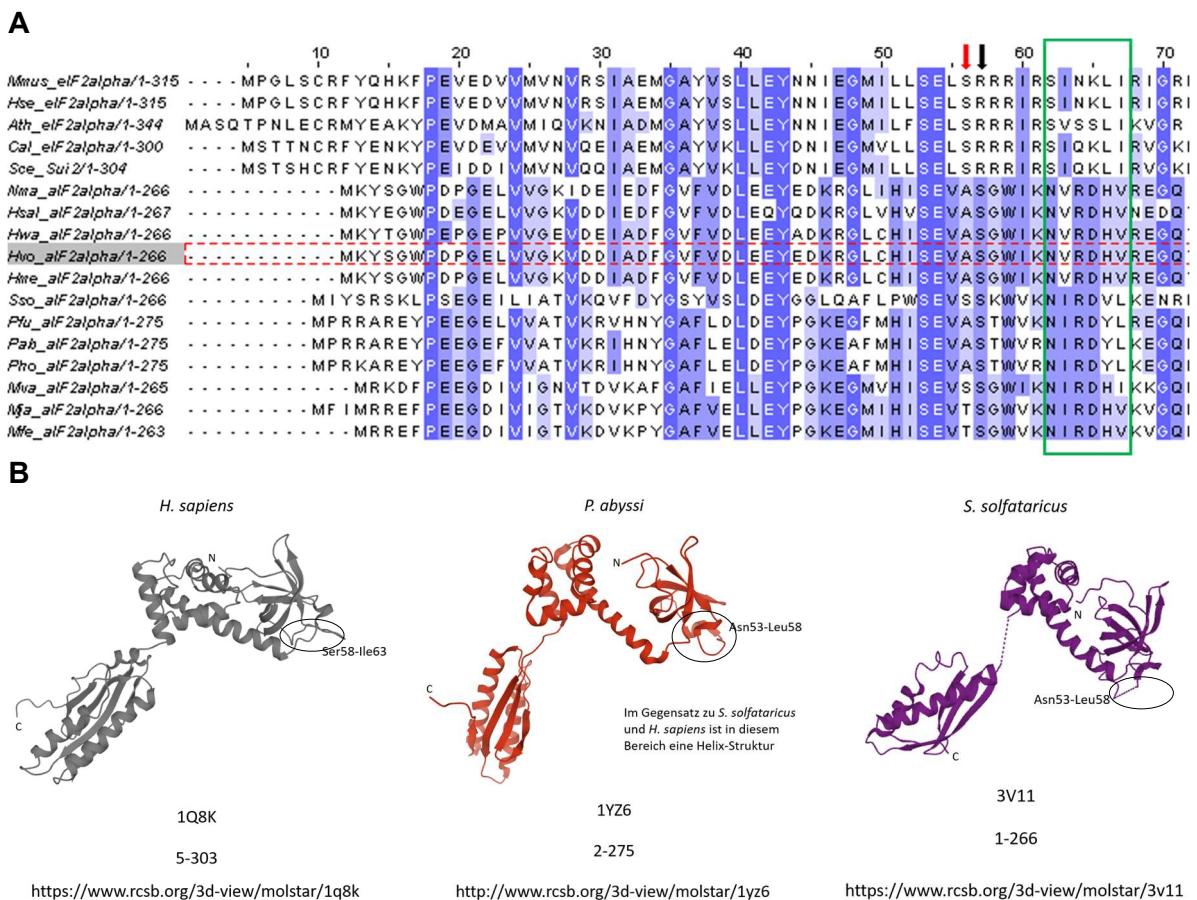
Parallel zur Untersuchung der Phosphorylierung in  $\alpha$ F2 wurde nach einer passenden Kinase in *H. volcanii* gesucht. Hierfür wurde die Sequenz von PH0512 in *P. horikoshii* verwendet. Dabei konnte die Rio2-Kinase (HVO\_0569) in *H. volcanii* identifiziert werden. Sie ist zu 35,5 % identisch mit der  $\alpha$ F2-Kinase in *P. horikoshii*. Auch dieses Protein wurde mit einem His-Tag versehen und überexprimiert, jedoch konnte kein  $\alpha$ F2 mitgereinigt werden (Daten nicht gezeigt). Daher wurde die Rio2-Kinase als Interaktionspartner für  $\alpha$ F2 in *H. volcanii* ausgeschlossen. Da in Eukaryonten mehrere Kinasen existieren die  $\alpha$ F2 phosphorylieren können, besteht auch in *H. volcanii* die Möglichkeit, dass weitere Kinasen in Frage kommen.

In Eukaryonten besitzt  $\alpha$ F2B $\delta$  eine wichtige strukturelle Funktion. Er ist unter anderem an der Regulation der Translation bei vorliegendem  $\alpha$ F2P zuständig. 2019 konnten Gordiyenko und Kollegen bei *S. pombe* *in vitro* die Interaktion von  $\alpha$ F2B $\delta$  und  $\alpha$ F2P in Helix 58-63 mittels Cryo-EM nachweisen (Gordiyenko, Ll acer and Ramakrishnan, 2019). Dies ist ein interessanter Ansatz f ur die weitere Untersuchung des  $\alpha$ F2 in *H. volcanii*.

Wie bereits erwähnt ist Ser51 in Archaeen nicht konserviert. Jedoch konnte in *P. horikoshii* aIF2α an Ser48 nachgewiesen werden (Tahara *et al.*, 2004).

Ein Ausschnitt des Sequenz-Alignments von aIF2α/eIF2α ist in Abbildung 55A dargestellt. Der grüner Kasten umfasst den Bereich in dem eIF2αP (Ser58-Ile63) mit eIF2Bδ in *S. cerevisiae* interagiert (Gordiyenko, Llácer and Ramakrishnan, 2019).

Im Strukturvergleich (Abbildung 55B) des N-terminalen Bereichs in eIF2α/aIF2α zeigt sich bei *P. abyssi* (1YZ6) eine Helix-Struktur. In *H. sapiens* (1Q8K) hingegen ist dieser Abschnitt ungefaltet (Ito, Marintchev and Wagner, 2004; Yatime *et al.*, 2005). Bei *S. solfataricus* (3V11) ist die Struktur in diesem Bereich ebenfalls ungefaltet. Des Weiteren besitzt *S. solfataricus* keine aIF2B-Untereinheiten (Schmitt *et al.*, 2012).



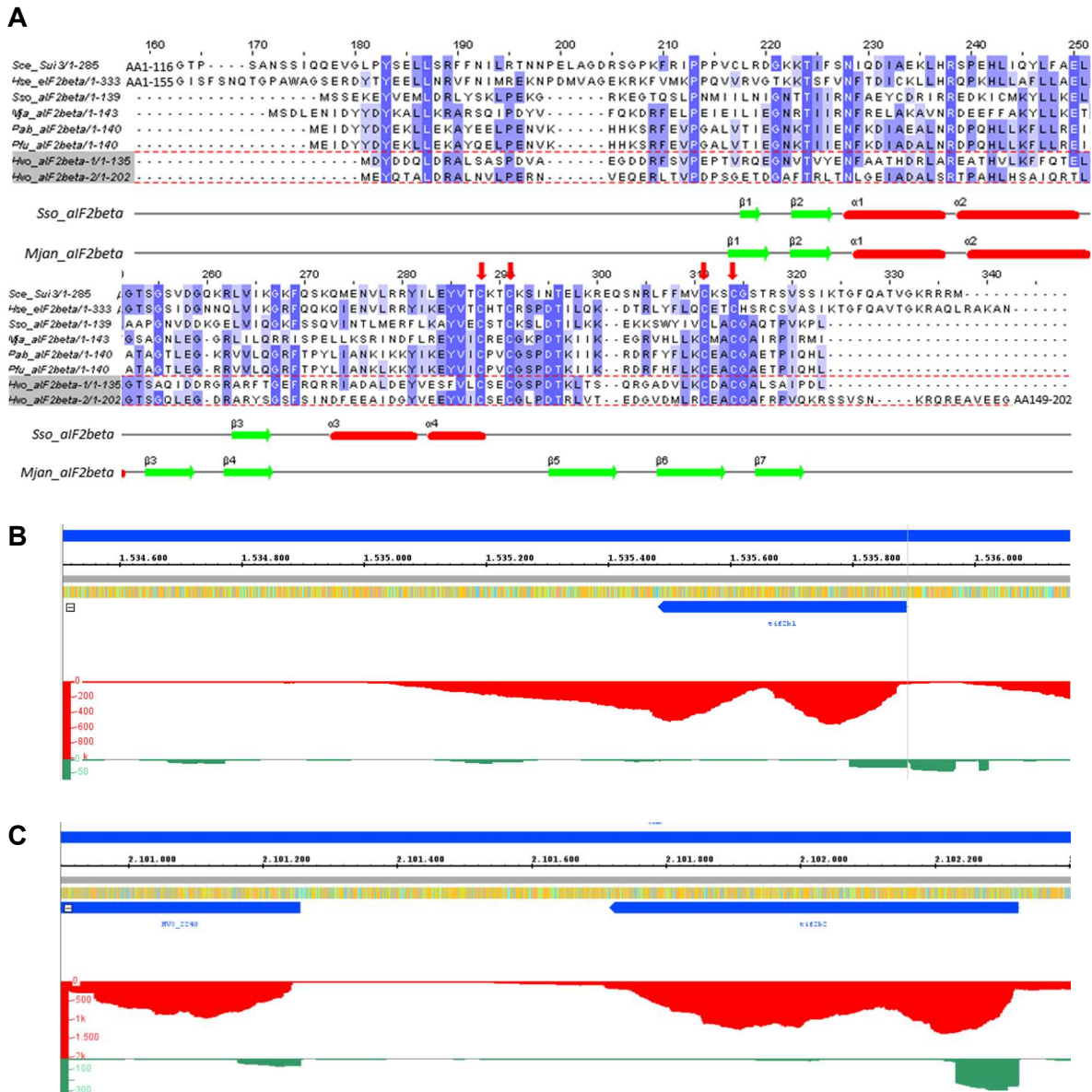
**Abbildung 55: Sequenz-Alignment des N-Terminus von aIF2α/eIF2α**

**A.** Im Vergleich wurde in *H. volcanii* in der Aminosäuresequenz von aIF2α das Serin an Position 46 gewählt (schwarzer Pfeil). Der rote Pfeil steht für Ser51, das in Eukaryonten phosphoryliert wird. Der Helix 58-63 betreffende Sequenzbereich wurde grün eingerahmt. Das Alignment wurde mittels Clustal erstellt und Jalview visualisiert. Verwendete Aminosäuresequenzen von eIF2α/aIF2α stammen von *H. volcanii* (Hvo; D4GT46), *H. mediterranei* (Hme; I3R2C2), *H. walsbyi* (Hwa; Q18KR0), *H. salinarum* (Hsa; A0A510N505), *N. magadii* (Nma; D3SY91), *M. fervens* (Mfe; C7P7V4), *M. vanniellii* (Mva; A6UQZ0), *P. abyssi* (Pab; Q9V0E4), *P. horikoshii* (Pho; O58655), *S. solfataricus* (Sso; Q97Z79), *S. cerevisiae* (Sce; P20459), *C. albicans* (Cal; Q5AAU7), *H. sapiens* (Hsa; P05198), *M. musculus* (Mmus; Q6ZWX6) und *A. thaliana* (Ath; Q9S1Z2). **B.** Strukturen des aIF2α/eIF2α von *H. sapiens*, *P. abyssi* und *S. solfataricus*. Der Helix 58-63-Bereich wurde eingekreist.



### 4.4.3.2 *alF2β1* und *alF2β2*

Zwei Gene codieren für *alF2β* in *H. volcanii*. Sie besitzen eine Größe von 408 nt (HVO\_1678) und 609 nt (HVO\_2242). Damit ist das Protein von *alF2β*-2 um 67 Aminosäuren länger als *alF2β*-1. Dies betrifft den C-terminalen Bereich. *alF2β*-2 unterscheidet sich damit auch von vielen anderen Archaeen (Abbildung 56).



**Abbildung 56: Analyse des *alF2β*-1 (HVO\_1678) und *alF2β*-2 (HVO\_2242)**

**A.** Sequenz-Alignment von *S. cerevisiae* (P09064), *H. sapiens* (P20042), *S. solfataricus* (Q97W59), *M. jannaschii* (Q57562), *P. abyssi* (Q9UYR6), *P. furiosus* (Q8U3I5) und *H. volcanii* (D4GZP2, D4GVV8). Die roten Pfeile markieren die Bereiche der Zinkfingerdomäne. Für *alF2β* von *M. jannaschii* wurde vom N-terminalen und C-terminalen Bereich jeweils eine Struktur analysiert (AA39-89 1k8b; AA 108-143 1k81). **B.** DNA- und RNA-Seq-Daten von *alF2β*-1 (HVO\_1678) und **C.** *alF2β*-2 (HVO\_2242). Die Gene sind in blau, das Transkriptionslevel in rot und der Transkriptionsstart in grün dargestellt. Beide Gene *alF2β*-1 (*tif2b1*) und *alF2β*-2 bzw. (*tif2b2*) liegen auf dem Reverse-Strang.

Beim Vergleich der DNA- und RNA-Seq-Daten zeigte sich für *alF2β*-1 eine mögliche 3'-UTR (Abbildung 56B). Sie wurde in dieser Arbeit für die Überexpression nicht berücksichtigt. Jedoch

könnte sie einen Einfluss auf die Funktion von  $\alpha F2\beta-1$  haben. Deshalb sollte das verlängerte Gen berücksichtigt und bei weiteren Untersuchungen nochmals überexprimiert werden.

In Eukaryonten besitzt das Protein von  $eIF2\beta$  einen N-Terminus, mit drei Lysin-reichen Bereichen (Cho and Hoffman, 2002). Dieser existiert in Archaeen nicht. Unter anderem ist der Bereich in Eukaryonten für die Interaktion mit  $eIF5$  und  $eIFB2\epsilon$  zuständig. Die beiden Faktoren katalysieren den GDP/GTP-Austausch bzw. die Hydrolyse von GTP (Asano *et al.*, 1999). Beide Faktoren ( $eIF5$  und  $eIFB2\epsilon$ ) sind in Archaeen nicht vertreten.

Die eukaryontische  $IF2\beta$ -Untereinheit ist sehr viel größer als die archaeale  $IF2\beta$ -Untereinheit. Der C-terminale Bereich der  $eIF2\beta$ -Untereinheit lässt sich annähernd mit dem gesamten archaealen Initiationsfaktor  $\alpha F2\beta$  vergleichen. In diesem C-terminalen Bereich ist in Eukaryonten und Archaeen eine 4-C-Zinkfingerdomäne konserviert (Abbildung 56A). Hinzu kommt, dass der N-terminale Bereich des archaealen  $IF2\beta$  ebenfalls in beiden Domänen des Lebens konserviert ist (Thompson *et al.*, 2000). In der Strukturanalyse gliedern sich die  $\alpha F2\beta$  in mehrere Bereiche. Diese sind ein ungefalteter N-terminaler Bereich, die Kerndomäne (meist mehrere  $\alpha$ - und  $\beta$ -Domänen) und die C-terminale Zinkfingerdomäne (Gutierrez *et al.*, 2004).

In *H. volcanii* ist für  $\alpha F2\beta-2$  im C-terminalen Bereich von Aminosäure 145-202 eine TRAM-Domäne annotiert. Bei der TRAM-Domäne wird davon ausgegangen, dass sie für die Bindung der tRNA zuständig ist (Anantharaman, Koonin and Aravind, 2001). Unter anderem konnte die Domäne auch in  $\alpha F2\beta$  von *Thermoplasma acidophilum* nachgewiesen werden.  $\alpha F2\beta$  in *T. acidophilum* ist mit 209 Aminosäuren etwas länger als  $\alpha F2\beta-2$  in *H. volcanii*. Sie besitzen eine zu 33,6 % identische Aminosäuresequenz (Abbildung 68).

#### 4.4.3.2.1 $\alpha F2\beta-1$

In *H. volcanii* konnte  $\alpha F2\beta 1$  deletiert werden und wurde deshalb als nicht essenziell eingestuft (Gäbel *et al.*, 2013). Die Deletion in der vorhandenen Mutante konnte mittels Southern Blot nicht mehr nachgewiesen werden. Deshalb wurde die Deletionsmutante neu erstellt. Sie verhielt sich in Komplexmedium wie 2013 von Gäbel und Kollegen beschrieben und wuchs schlechter als der Wildtyp (Gäbel *et al.*, 2013).

Die Überexpressionsmutante wuchs ähnlich wie die Kontrolle in der Deletionsmutante mit dem Leerplasmid. Jedoch zeigte sie im spätexponentiellen Bereich ein besseres Wachstum. Mit  $\alpha F2\beta-1$  konnten nach der Affinitätsaufreinigung nur wenige Proteine auf dem SDS-Gel visualisiert und in der MS-Analyse identifiziert werden. Dennoch konnte mit  $\alpha F2\beta-1$  die  $\alpha F2\alpha$ - sowie die  $\alpha F2\gamma$ -Untereinheit mitgereinigt werden.

Auch für  $\alpha F2\beta-1$  konnte anhand der DNA- und RNA-Seq-Daten eine mögliche 3'-UTR identifiziert werden (Abbildung 56B-C). Auch für  $\alpha F2\beta-1$  sollte in diesem Zusammenhang die Überexpression neu durchgeführt werden.

#### 4.4.3.2.2 *alF2β-2*

Auch *alF2β-2* konnte deletiert werden. Die Deletion in der vorhandenen Mutante konnte mittels Southern Blot nicht mehr nachgewiesen werden. Deshalb wurde die Deletionsmutante neu erstellt. Sie verhielt sich in Komplexmedium wie 2013 von Gäbel und Kollegen beschrieben (Gäbel *et al.*, 2013).

Die Überexpression wurde anschließend in der Deletionsmutante durchgeführt. Dabei zeigte die Mutante ein sehr viel besseres Wachstum gegenüber der Deletionsmutante mit dem Leerplasmid. Damit unterscheidet sich *alF2β-2* von *alF2β-1*.

Mit *alF2β-2* konnten nach der Affinitätsaufreinigung viele mitgereinigte Proteine identifiziert werden. Des Weiteren erschienen zwei sehr starke Banden zwischen 25-30 kDa. Die Banden wurden einzeln ausgeschnitten und in der MS analysiert. Für beide Banden wurde jedoch *alF2β-2* als Protein identifiziert. Das Erscheinen der Doppelbande ließ sich nicht klären, da für beide Banden *alF2β-2* als Protein identifiziert wurde. Bei der Denaturierung der Proben wurde im Probenpuffer β-Mercaptoethanol als Detergens verwendet. Dabei werden die Disulfidbrücken der Proteine aufgebrochen. Da es sich hierbei um eine Gleichgewichtsreaktion handelt, könnte als Alternative ein anderes Detergens, zum Beispiel DTT, verwendet werden.

Mit *alF2β-2* konnte sowohl *alF2α* als auch *alF2γ* mitgereinigt werden. Als weiterer Initiationsfaktor konnte *alF5B* mitgereinigt werden. Zusätzlich konnten zwei ribosomale Proteine der kleinen und sieben Proteine der großen ribosomalen Untereinheit zugeordnet werden. Des Weiteren konnte ein IclR-Transkriptionsregulator (HVO\_2108) identifiziert werden. Dieser Transkriptionsregulator konnte jedoch, mit der Ausnahme von *alF2γ* und *alF2Bδ-2*, auch mit den anderen Initiationsfaktoren mitgereinigt werden.

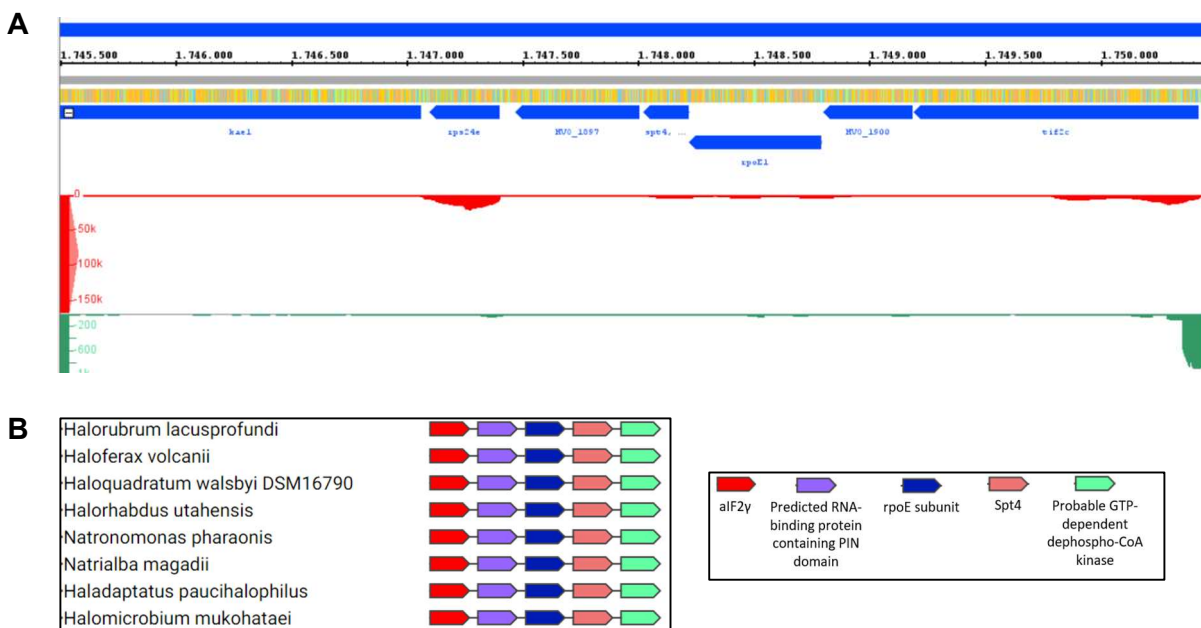
#### 4.4.3.3 *alF2γ*

Die *alF2γ*-Untereinheit bildet den Kern des *alF2*. Sie enthält die GTP-Bindedomäne und bindet die Met-tRNA. Dubiez und Kollegen konnten 2015 zeigen, dass *alF2γ* GTP hydrolysiert (Dubiez *et al.*, 2015). In seiner Struktur ist *eIF2γ/alF2γ* hochkonserviert und eine essenzielle Untereinheit von *alF2/eIF2*. In Archaeen ähnelt *alF2γ* dem Elongationsfaktor *aEF1A* bzw. *EF-Tu* (Schmitt, Blanquet and Mechulam, 2002). In *H. volcanii* sind zwei Untereinheiten für *aEF1A* bzw. *aEF1α* (*aEF1α-1* HVO\_0359; *aEF1α-2* HVO\_2413), sowie ein *aEF1α*-like Protein (HVO\_2575) annotiert. Der Faktor *aEF1α-1* konnte mit den Kontrollen DHFR und Leerplasmid mitgereinigt werden. Deshalb wurde er aus allen weiteren Auswertungen ausgeschlossen. Im Sequenzabgleich des *alF2γ* war die Aminosäuresequenz zu *aEF1α*-like zu 28,8 %, mit *aEF1α-2* zu 25,9 % und mit *aEF1α-1* zu 23,84 % identisch (Anhang Abbildung 69). Als Razor Peptide werden Proteine bezeichnet die gemeinsame Peptidsequenzen besitzen. Dies kann sich auf die MS-Ergebnisse auswirken. In dieser Arbeit konnten in der MS-Analyse nur *aEFs* als Razor Peptide untereinander identifiziert werden. *alF2γ* konnte nicht als Razor Peptid identifiziert

werden. Somit konnte ein Überschneiden der Aminosäuresequenz der aEFs mit aIF2 $\gamma$  ausgeschlossen werden.

In *H. volcanii* ist aIF2 $\gamma$  eine weitere Untereinheit des aIF2, die in einem Operon liegt (Abbildung 57A). Bei den im Operon annotierten Genen handelt es sich um aIF2 $\gamma$  (HVO\_1901), einem putativen RNA-Bindeprotein, das eine PIN-Domäne enthält (HVO\_1900), die RNAPU rpoE1 (HVO\_1899), den Transkriptionselongationsfaktor spt4/rpoE2 (HVO\_1898) sowie einer möglichen GTP-abhängigen Dephospho-CoA-Kinase (HVO\_1897). Die unmittelbare Nähe dieser Gene konnte auch bei acht weiteren Vertretern der Halobacteriaceae nachgewiesen werden (Abbildung 57B).

In den meisten Archaeen befindet sich aIF2 $\gamma$  in direkter Nachbarschaft zu einem putativen RNA-Bindeproteins, die eine PIN-Domäne enthält. Diese PIN-Domänen gehören zur Überfamilie von Nukleasen. Sie sind sehr vielfältig und spalten Phosphodiesterbindungen von Nukleinsäuren. Dabei können sie RNA oder DNA spalten, aber auch als Endo- oder Exonuklease fungieren (Yang, 2011; Matelska, Steczkiewicz and Ginalski, 2017).



**Abbildung 57: DNA- und RNA-Seq-Daten von aIF2 $\gamma$  (HVO\_1901)**

**A.** Die DNA- und RNA-Seq-Daten von aIF2 $\gamma$  (HVO\_1901, *tif2c*). Er liegt im Operon mit vier weiteren Genen. Die Gene sind in blau, das Transkriptionslevel in rot und der Transkriptionsstart in grün dargestellt. Das Gen für aIF2 $\gamma$  liegt auf dem *Reverse*-Strang. **B.** Die Struktur des Operons konnte auch mittels String bei acht weiteren Vertretern der Halobacteriaceae nachgewiesen werden.

Die Untereinheit aIF2 $\gamma$ /eIF2 $\gamma$  bildet den Kern des aIF2/eIF2 und interagiert sowohl mit der  $\alpha$ - als auch mit der  $\beta$ -Untereinheit des aIF2/eIF2 (Thompson *et al.*, 2000; Schmitt, Blanquet and Mechulam, 2002). Generell besitzt aIF2 $\gamma$ /eIF2 $\gamma$  eine GTPase-Aktivität.

Die aIF2 $\gamma$ -Untereinheit besteht aus drei Domänen (Abbildung 58A). Die erste Domäne enthält sieben  $\beta$ -Strands und fünf  $\alpha$ -Helices. In dieser Domäne befindet sich die Nukleotid-Bindetasche. Der Übergang von gebundenem GTP zu GDP und umgekehrt wird von zwei flexiblen Bereichen reguliert. Diese werden Switch1 und Switch2 genannt. Die beiden anderen

Domänen bestehen aus  $\beta$ -Barrels (Domäne zwei und drei) und wirken zusammen als starrer Körper (Schmitt, Blanquet and Mechulam, 2002; Roll-Mecak *et al.*, 2004). Bisher wurde von aIF2 $\gamma$  die Struktur in *P. abyssi* und *S. solfataricus* gelöst. Die Aminosäuresequenz von aIF2 $\gamma$  in *H. volcanii* und *P. abyssi* sind zu 56% identisch. Für *H. volcanii* und *S. solfataricus* beträgt die Sequenzidentität von aIF2 $\gamma$  48% (Abbildung 58B).



**Abbildung 58: Sequenz-Alignment von aIF2 $\gamma$ /eIF2 $\gamma$**

**A.** Strukturbasierendes Sequenz-Alignment mittels Jalview von aIF2 $\gamma$ /eIF2 $\gamma$  aus *S. cerevisiae* (P32481), *H. sapiens* (P41091), *S. solfataricus* (Q980A5), *M. jannaschii* (Q58657), *P. abyssi* (Q9V1G0), *P. furiosus* (Q8U082) und *H. volcanii* (D4GTD4). Die roten Pfeile markieren die konservierten Cs. Die beiden switch-Boxen sind schwarz umrahmt. **B.** Die Struktur von aIF2 $\gamma$  aus *P. abyssi* und *S. solfataricus*.

In *S. solfataricus* wurde für aIF2 eine Moonlight-Funktion identifiziert. Dabei ist aIF2 nicht nur an der Bindung der tRNA<sub>i</sub> an das Ribosom involviert. Als weitere Funktion kann aIF2 an die 5'-Triphosphat-Enden (5'-P<sub>3</sub>-Enden) von mRNAs binden. Damit werden sie in *S. solfataricus* vor der Exoribonuklease RNaseJ geschützt. Die Bindung tritt bevorzugt bei einer hohen Konzentration von aIF2 $\gamma$  oder bei geringen Konzentration von freien 30S ribosomalen Untereinheiten auf (Hasenöhl *et al.*, 2008; Hasenöhl, Konrat and Blasi, 2011). Für den trimeren aIF2

und die aIF2 $\gamma$ -Untereinheit ist *in vitro* die Affinität höher an das 5'-P<sub>3</sub>-Ende anstatt die Met-tRNA<sub>i</sub> zu binden. Wenn aber aIF1, aIF1A und die 30S ribosomale Untereinheiten anwesend sind, besitzt aIF2 eine höhere Affinität für Met-tRNA<sub>i</sub> als für die 5'-P<sub>3</sub>-Enden der mRNAs (Hasenöhl *et al.*, 2009).

Des Weiteren konnte im Jahr 2011 von Hasenöhl und Kollegen nachgewiesen werden, dass die Bindung von aIF2 $\gamma$  an das 5'-P<sub>3</sub>-Ende von mRNA der exoribonukleolytischen Aktivität der RNaseJ in *S. solfataricus* entgegen wirkt (Hasenöhl, Konrat and Blasi, 2011).

Die Charakterisierung von essenziellen aIFs in *H. volcanii* erfolgte durch Katrin Gäbel mittels Depletionsmutanten, so auch für aIF2 $\gamma$ . Für aIF2 $\gamma$  konnte damals die höchste Transkriptstabilität der essenziellen aIFs in *H. volcanii* bestimmt werden. Dies deutet darauf hin, dass in *H. volcanii* eine ähnliche Funktion von aIF2 $\gamma$  vorliegt (Gäbel, 2014).

Bei der Überexpression von aIF2 $\gamma$  in *H. volcanii* wuchs die Mutante sehr viel besser als die Kontrolle mit dem Leerplasmid. Dies ist ein weiterer Hinweis, dass aIF2 $\gamma$  einen positiven Einfluss auf die Translation ausübt. Hinzu kommt, dass im Gegensatz zu den anderen Faktoren mit aIF2 $\gamma$  keine Ribonuklease J (HVO\_2724) mitgereinigt werden konnte.

Bei der Analyse der MS-Daten von fiel auf, dass er in den Affinitätsaufreinigungen, als auch in den Affinitätsaufreinigungen mit FPLC, aIF2 $\gamma$  nicht als Protein mit dem höchsten PSM-Wert identifiziert werden konnte. Auch dies deutet auf eine Regulation von aIF2 $\gamma$  in *H. volcanii* hin und stellt damit einen interessanten Aspekt für zukünftige Untersuchungen dar.

#### 4.4.3.4 FPLC der aIF2-Untereinheiten

Für den aIF2 und seine Untereinheiten wurden zusätzlich nach den Affinitätsaufreinigungen FPLCs durchgeführt (n=3). Anschließend wurden Fraktionen der FPLCs mittels MS analysiert. Ziel war es nicht nur ein Interaktionsfeld, sondern direkte Interaktionspartner zu finden und sich somit auf die direkten Interaktionen der Untereinheiten zu fokussieren.

##### 4.4.3.4.1 FPLC von aIF2 $\alpha$

Von drei unabhängigen FPLCs wurden die Fraktionen analysiert und zusammengefasst. Diese befanden sich für aIF2 $\alpha$  zu Beginn der Schulter (I), sowie vor (II) und nach (III) der Peak-Spitze.

In Abschnitt (I)-(III) konnte mit aIF2 $\alpha$  die aIF2 $\gamma$ -Untereinheit mitgereinigt werden. Die aIF2 $\beta$ -2-Untereinheit (HVO\_2242) konnte in (I)-(II) co-gereinigt werden, jedoch nicht in (III). Da aIF2 $\gamma$  das Ankerzentrum von aIF2 bildet, ist es möglich, dass nur die beiden Untereinheiten aIF2 $\alpha$  und aIF2 $\gamma$  im kleineren Größenverhältnis aneinandergelassen sind.

Zusätzlich konnte aIF2B $\delta$ -1 mit aIF2 $\alpha$  mitgereinigt werden. Dies konnte bereits in den MS-Daten der Affinitätsaufreinigungen der exponentiellen und stationären Kulturen gezeigt werden. Für die Affinitätsaufreinigungen der aIF2-Untereinheiten war es möglich die Interaktion

von aIF2 $\alpha$ , aIF2 $\beta$ -2 und aIF2 $\gamma$  nachzuweisen. Die Untereinheit aIF2 $\beta$ -1 wurde mit aIF2 $\alpha$  nicht co-gereinigt.

In der FPLC von Abschnitt (I)-(II) konnten die ribosomalen Proteine rpL11 (HVO\_2758) und rpL22 (HVO\_2559) nachgewiesen werden. rpL11 wurde sonst bei keinem weiteren Initiationsfaktor in der MS-Analyse identifiziert. Er konnte jedoch bei fünf RNAPUs mitgereinigt werden. Dafür war es möglich rpL22 mit sechs aIFs- bzw. -Untereinheiten (aIF1, aIF2 $\alpha$  nur FPLC (I)-(II), aIF2 $\beta$ -2, aIF2B $\alpha$ , aIF2B $\delta$ -1, eIF4-homolog und aIF5B) und sechs RNAPUs co-zureinigen.

#### 4.4.3.4.2 FPLC von aIF2 $\beta$ -1

Von drei unabhängigen FPLCs wurden die Fraktionen analysiert und zusammengefasst. Diese befanden sich für aIF2 $\beta$ -1 sowohl zu Beginn der Schulter (I), im Hauptpeak (II) und nach (III) dem Hauptpeak.

Wie in der Affinitätsaufreinigung konnten auch der FPLC nur wenige Proteine mitgereinigt werden. Anders als in der Affinitätsaufreinigung konnte nach der FPLC zwei starke Banden auf dem SDS-Gel visualisiert werden.

In allen drei Abschnitten konnte mit aIF2 $\beta$ -1 die aIF2 $\alpha$ -Untereinheit mitgereinigt werden. In (II) konnte zusätzlich aIF2 $\beta$ -2 mit aIF2 $\beta$ -1 co-gereinigt werden. Mit aIF2 $\beta$ -1 konnten nur wenige Proteine in der MS-Analyse identifiziert werden. Dies deckt sich mit den Daten der Affinitätsaufreinigung und der direkten MS-Analyse. Mit beiden Ansätzen konnte der Transkriptionsregulator HVO\_2928 mitgereinigt werden. In welchem Zusammenhang er mit aIF2 $\beta$ -1 steht, konnte nicht geklärt werden. Er konnte auch mit anderen Initiationsfaktoren bzw. Untereinheiten sowie RNAPUs, mit der Ausnahme von aIF2 $\beta$ -2, aIF2 $\gamma$ , aIF5A und rpoA2, mitgereinigt werden.

#### 4.4.3.4.3 FPLC von aIF2 $\beta$ -2

Bei der FPLC nach der Affinitätsaufreinigung ist ein deutlicher Unterschied im Verlauf des Chromatogramms zwischen den beiden Untereinheiten zu erkennen. Beide zeigten zwar eine Peakansammlung zwischen 7-12 mL, in der FPLC von aIF2 $\beta$ -2 war dieser Bereich allerdings um ein Vielfaches höher. Nach dem Auftragen einzelner Fraktionen aus diesem Bereich auf ein SDS-Gel konnten keine Proteine nachgewiesen werden. Erst zu Beginn der Schulter des Hauptpeaks konnten Proteine auf dem SDS-Gel sichtbar gemacht werden.

Bei aIF2 $\beta$ -2 erschien eine doppelte Bande nach der Affinitätsaufreinigung sowie nach der Affinitätsaufreinigung und FPLC auf dem SDS-Gel.

Die Fraktionen, die für die MS-Analyse nach der FPLC verwendet wurden, lagen in der Schulter des Hauptpeaks (I), in der Spitze (II) und nach der Spitze des Hauptpeaks (III).

Im Vergleich zu aIF2 $\beta$ -1 konnten mit aIF2 $\beta$ -2 sehr viel mehr Proteine co-gereinigt und in der MS-Analyse identifiziert werden. Dies traf auch für die FPLCs der Affinitätsaufreinigungen zu.

Des Weiteren konnten Unterschiede in den co-gereinigten Proteinen festgestellt werden. Nach der Affinitätsaufreinigung und anschließender FPLC konnte mit aIF2 $\beta$ -2 in allen drei analysierten Fraktionen von (I)-(III) nicht nur aIF2 $\alpha$ , sondern auch aIF2 $\beta$ -1 identifiziert werden. Die Untereinheit aIF2 $\gamma$  wurde nur in (I) nachgewiesen. In der MS-Analyse direkt nach der Affinitätsaufreinigung von aIF2 $\beta$ -2 konnte jedoch aIF2 $\beta$ -1 nicht identifiziert werden.

In (I) konnte aIF2 $\beta$ -1 sogar mit dem höchsten PSM-Wert identifiziert werden. Es ist bekannt, dass aIF2 $\beta$ -1 bei der Deletion von aIF2 $\beta$ -2 um das zehnfache hochreguliert wird. Deshalb wird bei diesen Orthologen davon ausgegangen, dass die Funktionen teilweise gegenseitig übernommen werden können (Gäbel *et al.*, 2013). Wie dieser Vorgang genau abläuft konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht geklärt werden.

In (II) und (III) von aIF2 $\beta$ -2 konnte wie bei aIF2 $\beta$ -1 ebenfalls kein aIF2 $\gamma$  nachgewiesen werden. Dafür wurde aIF2 $\alpha$  co-gereinigt. Wie bereits erwähnt ist für aIF2 $\alpha$  und aIF2 $\beta$  keine direkte Interaktion bekannt.

Es bestätigte sich in der FPLC, dass bei Proteine die stark überproduziert werden ein Überschuss von Monomeren vorhanden ist, da nicht alle einen Interaktionspartner finden.

#### 4.4.3.4.4 FPLC von aIF2 $\gamma$

In den FPLCs von aIF2 $\gamma$  zeigten sich auf dem Chromatogramm zwei kleinere Peaks zwischen 7,5-12 mL, dahinter der Hauptpeak und ein weiterer kleinerer Peak. Von aIF2 $\gamma$  wurden die Fraktionen im Hauptpeak vor der Peakspitze (I), nach der Peakspitze im Hauptpeak (II) und zu Beginn des zweithöchsten Peaks untersucht (III). In (I) konnte mit aIF2 $\gamma$  nur aIF2 $\alpha$  des aIF2 mitgereinigt werden. Des Weiteren konnte aIF2B- $\delta$ 1 und aIF5B identifiziert werden. Dies war bereits direkt nach der Affinitätsaufreinigung möglich. In (II) konnte nur noch aIF2 $\alpha$  mit aIF2 $\gamma$  mitgereinigt werden. In (III) konnte aIF2 $\gamma$  nichtmehr nachgewiesen werden. Nur noch aIF2 $\alpha$  konnte als Initiationsfaktor co-gereinigt werden. Wie bereits bei der Affinitätsaufreinigung beobachtet konnte auch nach den FPLCs aIF2 $\gamma$  nicht als Protein mit dem größten PSM-Wert identifiziert werden.

#### 4.4.3.5 Interaktionen des aIF2 in *H. volcanii*

Um die gesammelten MS-Daten der aIF2-Untereinheiten besser vergleichen zu können, wurden sie in zwei Tabellen zusammengefasst. Diese umfassen die Interaktion der aIF2-Untereinheiten und die Interaktion mit anderen aIFs. Dabei enthält Tabelle 86 die Daten für die Affinitätsaufreinigung-MS. Tabelle 87 enthält die Daten für die Affinitätsaufreinigung-FPLC-MS.

Bei den Affinitätsaufreinigungen der aIF2-Untereinheiten konnte jeweils ein Set der drei Untereinheiten ( $\alpha\beta\gamma$ ) co-gereinigt werden. Von den beiden  $\beta$ -Untereinheiten konnte nur aIF2 $\beta$ -2 von aIF2 $\alpha$  und aIF2 $\gamma$  mitgereinigt werden. Damit konnte in allen MS-Analysen von aIF2 $\alpha$  die Untereinheit aIF2 $\beta$ -2 identifiziert werden.



Bei der Affinitätsaufreinigung-FPLC konnte die  $\alpha$ 2-Untereinheit bei (I)-(III) jeweils ein Set der drei Untereinheiten co-reinigen. Für die  $\beta$ 2-Untereinheit war dies nur in (I) erfolgreich. Mit  $\alpha$ 2 $\beta$ -1 und  $\alpha$ 2 $\gamma$  war dies in keiner Affinitätsaufreinigung mit FPLC möglich. Dafür konnte mit  $\alpha$ 2 $\beta$ -1 in den FPLC-Läufen (I)-(III) die  $\beta$ 2-Untereinheit mitgereinigt werden. Warum sich diese Ergebnisse, von den Ergebnissen der Affinitätsaufreinigung ohne FPLC unterschieden, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden.

Tabelle 86: Interaktion  $\alpha$ 2 mit  $\alpha$ Fs (Affinitätsaufreinigung-MS)

$\alpha$ 2	methode (n=3)	growth phase	$\alpha$ 2 $\alpha$	$\alpha$ 2 $\beta$ -1	$\alpha$ 2 $\beta$ -2	$\alpha$ 2 $\gamma$	$\alpha$ 2 $\delta$ -1	$\alpha$ F5B	$\alpha$ F1
$\alpha$ 2 $\alpha$	pull-down	exp	bait		+	+	+	+	
	pull-down	stat	bait		+	+	+	+	+
$\alpha$ 2 $\beta$ -1	pull-down	exp	+	bait		+			
$\alpha$ 2 $\beta$ -2	pull-down	exp	+		bait	+		+	
$\alpha$ 2 $\gamma$	pull-down	exp	+		+	bait	+	+	

Für die Funktion des  $\alpha$ 2 scheint  $\alpha$ 2 $\alpha$  eine wichtige Rolle zu spielen. Die  $\alpha$ -Untereinheit konnte bei allen anderen Überexpressionen von  $\alpha$ 2-Untereinheiten mitgereinigt werden. Sowohl bei der Affinitätsaufreinigung als auch bei der Affinitätsaufreinigung gekoppelt mit FPLC. Zusätzlich konnte mit  $\alpha$ 2 $\alpha$  und  $\alpha$ 2 $\gamma$  der Faktor  $\alpha$ 2 $\delta$ -1 mitgereinigt werden. Dies gelang nach der Affinitätsaufreinigung und in (I) der FPLCs. Mit  $\alpha$ 2 $\alpha$ ,  $\alpha$ 2 $\beta$ -2 und  $\alpha$ 2 $\gamma$  konnte  $\alpha$ F5B nach der Affinitätsaufreinigung mitgereinigt werden. Für  $\alpha$ 2 $\gamma$  auch in der I der FPLC-Läufe.

Tabelle 87: Interaktion  $\alpha$ 2 mit  $\alpha$ Fs (Affinitätsaufreinigung-FPLC-MS)

$\alpha$ 2	methode (n=3)	fractions	$\alpha$ 2 $\alpha$	$\alpha$ 2 $\beta$ -1	$\alpha$ 2 $\beta$ -2	$\alpha$ 2 $\gamma$	$\alpha$ 2 $\delta$ -1	$\alpha$ F5B
$\alpha$ 2 $\alpha$	pull-down-FPLC	I	bait		+	+	+	
	pull-down-FPLC	II	bait		+	+		
	pull-down-FPLC	III	bait		+	+		
$\alpha$ 2 $\beta$ -1	pull-down-FPLC	I	+	bait				
	pull-down-FPLC	II	+	bait	+			
	pull-down-FPLC	III	+	bait				
$\alpha$ 2 $\beta$ -2	pull-down-FPLC	I	+	+	bait	+		
	pull-down-FPLC	II	+	+	bait			
	pull-down-FPLC	III	+	+	bait			
$\alpha$ 2 $\gamma$	pull-down-FPLC	I	+			bait	+	+
	pull-down-FPLC	II	+			bait		
	pull-down-FPLC	III	+			(bait)		

Mit diesen Ergebnissen kann die Hypothese bestärkt werden, dass  $\alpha$ 2 $\alpha$  eine wichtige Rolle im  $\alpha$ 2 besitzt. Der Platz des Faktor  $\alpha$ 2 $\beta$ -2 kann von der  $\alpha$ 2 $\beta$ -2 übernommen werden. Warum  $\alpha$ 2 $\beta$ -1 in den FPLCs (I)-(III) mit  $\alpha$ 2 $\beta$ -2 und umgekehrt für  $\alpha$ 2 $\beta$ -1 (II) co-gereinigt wurde, konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden.

Da  $\alpha F2\gamma$  den Kern des  $\alpha F2$  bildet und jeweils  $\alpha F2\alpha$  und  $\alpha F2\beta$  bindet, wäre in diesem Zusammenhang eine Version mit einem C-terminalen His-Tag interessant. Damit kann  $\alpha F2$  und die Interaktion der Untereinheiten weiter zu untersuchen.

#### **4.4.4 $\alpha F2B$**

Der eukaryontische  $eF2B$  ist ein Heteropentamer, der aus den Untereinheiten  $\alpha$ - $\epsilon$  besteht. Dabei bilden  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\delta$  den regulatorischen Subkomplex, während  $\gamma$  und  $\epsilon$  das katalytische Zentrum bilden. In Eukaryonten ist  $eF2B$  als Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor an  $eF2$  zuständig (Bogorad *et al.*, 2014). Für den Austausch von GDP zu GTP bindet  $eF2B$  an  $eF2$ . Dabei interagieren die Untereinheiten  $eF2B\epsilon$  und  $eF2\beta$  (Asano *et al.*, 1999). Bei der regulatorischen Phosphorylierung von  $eF2\alpha$  ( $eF2\alpha P$ ) konnte in *S. cerevisiae in vitro* nachgewiesen werden, dass  $\alpha F2B$  zwei Subkomplexe bilden. Bedingt wird dies durch  $eF2\alpha P$ . Beide Subkomplexe können an  $eF2$  binden. Der erste Subkomplex bestehend aus  $\alpha F2B\alpha$ ,  $-\beta$  und  $-\delta$  bindet bevorzugt an die phosphorylierte Form des  $eF2$ . Er hat keine GDP-GTP-Austauschaktivität. Der zweite Subkomplex, bestehend aus  $\alpha F2B\gamma$  und  $eF2B\epsilon$ , bindet im gleichen Verhältnis an  $eF2$  und  $eF2(\alpha P)$ . Er ist immun gegen die Phosphorylierung und hat eine erhöhte GDP-GTP-Austauschaktivität (Pavitt *et al.*, 1998).

Die meisten Archaeen besitzen für  $\alpha F2B$  nur die Untereinheiten  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\delta$ . Sie besitzen keine  $\gamma$ - und  $\epsilon$ -Untereinheit (Kyrpides and Woese, 1998a; Kakuta *et al.*, 2004). In *S. cerevisiae* besitzt der Subkomplex  $\alpha F2B\alpha\beta\delta$  wie oben beschrieben, eine regulatorische Funktion, bei der er  $eF2(\alpha P)$  in Abhängigkeit der Ser51-Phosphorylierung bindet (Pavitt *et al.*, 1998; Krishnamoorthy and Pavitt, 2001).

Damit fehlen die beiden Untereinheiten des katalytischen Zentrums. Hinzu kommt in Archaeen, das  $\alpha F2\beta$  kleiner ist als das eukaryontische Homolog und nicht die Bindedomäne für  $\alpha F2B$  besitzt. Dennoch konnte in mehreren Archaeen *in vitro* Interaktionen zwischen  $\alpha F2B$  und  $\alpha F2\alpha$  nachgewiesen werden (Dev *et al.*, 2009). Dies könnte unter anderem an der Bildung des in *S. cerevisiae* beschriebenen  $\alpha F2B\alpha\beta\delta$ -Subkomplexes liegen.

In *H. volcanii* verhält es sich jedoch anders mit den  $\alpha F2B$ -Untereinheiten. In diesem Archaeon ist  $\alpha F2B\alpha$  (HVO\_1934) und  $\alpha F2B\delta$  (HVO\_2706) als Untereinheiten annotiert. Sowohl  $\alpha F2B\alpha$  (HVO\_1934) als auch  $\alpha F2B\delta$  (HVO\_2706) konnten jeweils einzeln und in einer Doppeldeletionsmutante deletiert werden, weshalb sie als nicht essenziell eingestuft wurden (Gäbel *et al.*, 2013). Während der Affinitätsaufreinigungen rückte jedoch ein Protein in den Fokus, das bei vielen Initiationsfaktoren mitgereinigt werden konnte, das bereits als Translationsinitiationsfaktor ausgeschlossen wurde. Dabei handelte es sich um eine weitere  $\alpha F2B\delta$ -Untereinheit (HVO\_0966; L9USK7; D4GV73), die als „translation initiation factor IF-2B subunit  $\delta$ “ (L9USK7) aber auch als „ribose-1,5-bisphosphat-isomerase“ (D4GV73) annotiert ist. Zur Vereinfachung wurde in dieser Arbeit HVO\_0966 zu  $\alpha F2B\delta$ -1 und HVO\_2706 zu  $\alpha F2B\delta$ -2 benannt.

#### 4.4.4.1 *alF2B $\alpha$*

In Eukaryonten besitzt eIF2B $\alpha$  keine katalytische Funktion. In *S. cerevisiae* hatte die Deletion von eIF2B $\alpha$  bei optimalen Bedingungen keine Auswirkungen. Jedoch konnte unter Nährstoffmangel die Hemmung von eIF2B-eIF(2 $\alpha$ P) nicht mehr nachgewiesen werden (Fabian *et al.*, 1997; Kimball *et al.*, 1998; Pavitt *et al.*, 1998).

In *H. volcanii* wurde für alF2B $\alpha$  (HVO\_1934) die vorhandene Deletionsmutante im Southern Blot bestätigt. Die Deletionsmutante von alF2B $\alpha$  verhielt sich wie bereits von Gäbel 2013 beschrieben. Sie zeigte unter optimalen Bedingungen bei 42 °C in Komplexmedium keinen Phänotypen. Auch bei der damaligen Testung von verschiedenen Wachstumsbedingungen konnte für die Deletionsmutante kein Phänotyp ermittelt werden (Gäbel, 2014).

Die in der vorliegenden Arbeit angewandte Überexpression des alF2B $\alpha$  aus *H. volcanii* fand in der Deletionsmutante statt. Die Überexpressionsmutante wuchs besser als die Kontrolle mit dem Leerplasmid und näherte sich in der stationären Phase dem Wildtyp an (Abbildung 49).

In den Affinitätsaufreinigungen von alF2B $\alpha$  konnte auf dem SDS-Gel mittels Coomassie eine sehr starke Bande sichtbar gemacht werden. Es war das Protein, das in dieser Arbeit am stärksten überexprimiert werden konnte. Mit alF2B $\alpha$  konnten 80 Proteine in allen drei Eluat von alF2 $\alpha$  identifiziert werden. Davon konnten 23 Proteine in die beschriebenen Prozesse eingeordnet werden. Alle Proteine, die mit alF2B $\alpha$  mitgereinigt werden konnten, konnten auch mit anderen Faktoren mitgereinigt werden. Es gab kein Protein, welches nur mit alF2B $\alpha$  mitgereinigt werden konnte.

Als weitere Initiationsfaktoren konnte mit alF2B $\alpha$  sowohl alF2B $\delta$ -1 als auch alF5B mitgereinigt werden. Auch wenn alF2B $\alpha$  in dieser Arbeit mit keinem anderen Initiationsfaktor mitgereinigt werden konnte, spricht die starke Überexpression und die Co-Reinigung von weiteren Initiationsfaktoren für eine Funktion oder Regulation in der Translation.

Das Protein von alF2B $\alpha$  ist in *H. volcanii* 413 Aminosäuren lang und 43,2 kDa schwer. Unter anderem besitzt es eine N-terminale Nudix-Domäne (AS 1-131) und deshalb eine mögliche Hydrolaseaktivität. Nudix steht für „Nukleosiddiphosphat verbunden mit einer weiteren Einheit X“. Proteine mit dieser Domäne besitzen eine Pyrophosphataseaktivität und sind in allen Organismen vertreten (McLennan, 2006). Sie besitzen verschiedene spezifische Substrate mit der allgemeinen Struktur NDP-X (Nukleosiddiphosphat, verbunden mit anderen X Molekülen). Sie hydrolysieren die Substrate um anschließend das Produkt Nukleosidmonophosphat NMP und Phosphat-X zu erhalten. Die Nudix-Domänen-Proteine werden entsprechend der Substrate NDP-X in verschiedene Familien unterteilt (Yoshimura and Shigeoka, 2015). Einige dieser Substrate sind *capped*-RNA, Nukleotidzucker wie ADP-Ribose, Coenzym A, NAD(P)H, FAD, Diadenosintetraphosphate und -polyphosphate wie Ap4A, und ApnA (n > 4). Diese Substrate sind unter anderem potentiell toxische Moleküle, metabolische Intermediate, Signalmoleküle oder Coenzyme, weshalb Proteine mit Nudix-Domäne als *housekeeping*-Enzyme eingestuft werden (Bessman, Frick and O'Handley, 1996; Tanaka, Kihara and Sugimoto, 2015).

Unter anderem agieren diese Proteine in Pflanzen unter abiotischen Einflüssen, wie z.B. bei erhöhten Salzbedingungen, Kälte- und Hitzeschocks (Bessman, Frick and O'Handley, 1996).

Beim Vergleich der Sequenzen der Nudix-Domäne von aIF2B $\alpha$  konnte sowohl in *Arabidopsis thaliana* (Nudix-Hydrolase 3; Q8L831) als auch in *Hordeum vulgare* (Putatives Protein; F2CSP9) die Nudix Hydrolase 3 identifiziert werden. Im Sequenz-Alignment der Proteine ist die Nudix-Hydrolase 3 in *A. thaliana* zu 27,5 % identisch mit aIF2B $\alpha$  und mit 24,5 % zum putativen Protein in *H. vulgare* (Abbildung 70). In beiden Organismen wurde das Enzym als ApnA Pyrophosphohydrolase eingestuft (Ogawa *et al.*, 2005; Tanaka, Kihara and Sugimoto, 2015). Dies könnte auch für aIF2B $\alpha$  in *H. volcanii* zutreffen.

#### 4.4.4.2 aIF2B $\delta$ -1 und aIF2B $\delta$ -2

In Eukaryonten besitzt eIF2B $\delta$  eine wichtige strukturelle Funktion. Zusätzlich ist er an der Regulation der Translation bei vorliegendem eIF2 $\alpha$ P zuständig. Wie bereits erwähnt konnte Gordiyenko und Kollegen 2019 für *S. pombe*, *in vitro* mittels Cryo-EM, die Interaktion von eIF2B $\alpha\delta$  und eIF2 $\alpha$ P nachweisen.

In *H. volcanii* sind die Proteine der beiden aIF2B $\delta$ -Untereinheiten im Sequenz-Alignment zu 30,2 % identisch (Abbildung 71). Im Vergleich zu eIF2B $\delta$  aus *S. pombe* ist aus *H. volcanii* aIF2B $\delta$ -1 zu 22,9 % und aIF2B $\delta$ -2 zu 21,2 % identisch.

Die Interaktion von eIF2B $\delta$  mit eIF2 $\alpha$ P wurde von Gordiyenko und Kollegen an eIF2B $\delta$ -E377 beschrieben (Gordiyenko, Ll acer and Ramakrishnan, 2019). Dieser Bereich ist jedoch in Archaeen nicht konserviert.

In *H. volcanii* sind zwei  $\delta$ -Untereinheiten annotiert, deren Aminosäuresequenz zu 30 % identisch und zu 65 % ähnlich sind. Jedoch ist aIF2 $\delta$ -1 mit 323 Aminosäuren um 41 Aminosäuren länger als aIF2 $\delta$ -2.

Wie bereits zuvor beschrieben ist eIF2B in Eukaryonten ein wichtiger Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor und mit eIF2 für die Regulation der Translation wichtig. In Archaeen ist die Funktion von aIF2B nicht eindeutig und wird kontrovers diskutiert. Ein Grund dafür ist die Ähnlichkeit von aIF2B zu der *methythioribose-1-phosphate isomerases* (MTNAs) und der *ribose-1,5-bisphosphate isomerases* (RBPI). Wobei in *H. volcanii* keine MTNAs annotiert sind. Dev et al beschrieb 2009 in einem Sequenz-Alignment verschiedene Motive, die zur Unterscheidung von MTNAs, RBPI und aIF2B beitragen kann (Dev *et al.*, 2009). Sie sind in Tabelle 88 aufgelistet.

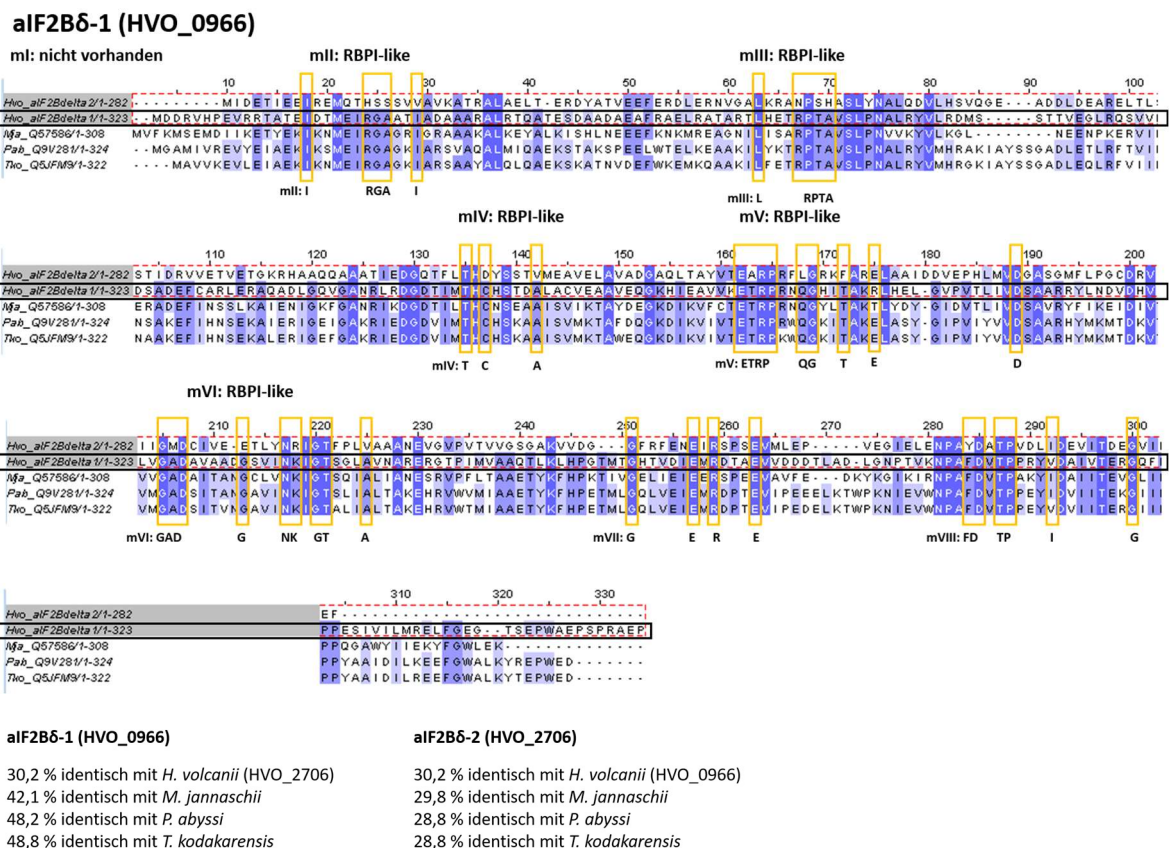
Die von Dev und Kollegen beschriebenen Motive wurden in dieser Arbeit mit den in *H. volcanii* vorhandenen aIF2B $\delta$ -Untereinheiten abgeglichen. Für aIF2B $\delta$ -1 (HVO\_0966) konnte damit eine gr o ere Ähnlichkeit zu RBPI (Abbildung 59) ermittelt werden. Bei aIF2B $\delta$ -2 (HVO\_2706) besteht hingegen eine gr o ere Ähnlichkeit zu aIF2B (Abbildung 60).

Tabelle 88: MNT-P, RBPI- und aIF2B-like Motive nach (Dev et al., 2009)

	Motif I	Motif II	Motif III	Motif IV	Motif V
<b>MTNA-like</b>	QxxLP	VRGAPxI	LxxxRPTA	TxCNxGxxATxxxGTA	ETRPxxQGxxLTxxxE (x) 12D
<b>RBPI-like</b>	-	xRGAxxI	LxxxRPTA	TxCNx-----xxA TxCxx-----xxA	ETRPxxQG-xLTxxx (x) 12D ExRPxxQG-xxTxxx (x) 12D ETRPxxQG-xxTxxxE (x) 12D
<b>aIF2B-like</b>	-	xRGAxxx xxGAxxx xxGxxxx	Lxxxx LxxxxP LxxxxPT xxxxxP	TxxNx-----xTx Txxxx-----xTx Txxxx-----xxx	ExRPxxxG-xxxxx (x) 12D ExxPxxxG-xxxxx (x) 12D
	Motif VI	Motif VII	Motif VIII		
<b>MTNA-like</b>	GADxxxxxGDxANKxGTxxLA (x) 9F	GxxIxxExRxxxE (x) 5G	FDxTPxxLIxxxxxxxG		
<b>RBPI-like</b>	GADxxxxxGxxxNKxGTxxxA (x) 9F GADxxxxxGxxxNKxxxxxxA (x) 9F	GxxIxxExExxxE (x) 6 GxxxxxExExxxE (x) 6	FDxTPxxxIxxxxxxxG FDxTPxxxxxxxG		
<b>aIF2B-like</b>	GADxxxxxGxxxNKxGTxxLA (x) 9F GxDxxxxxxxKxGTxxLA (x) 9F GxDxxxxxxxNxxGTxxLA (x) 9F GxDxxxxxxxNxxGTxxxA ( (x) 9F) GxxxxxxxNxxGTxxLA (x) 10	xxxxxxx (x) 6 GxxxxExxx (x) 6 xxxxxxExxx (x) 6 xxxxxxx (x) 6	FDxTPxxxxxxxG xDxTPxxLxxxxxxxG FxxTPxxxxxxxG FDxTPxxxIxxxxxxxG		

Im direkten Vergleich der Aminosäuresequenzen, konnte für aIF2B $\delta$ -1 eine höhere Identität zu den RBPI nachgewiesen werden. Zwischen den beiden Untereinheiten zeigte jedoch aIF2B $\delta$ -1 zu den RBPI als auch zu den aIF2B eine höhere Identität als aIF2B $\delta$ -2 (Abbildung 59-60).

**RBPI-like Sequences**

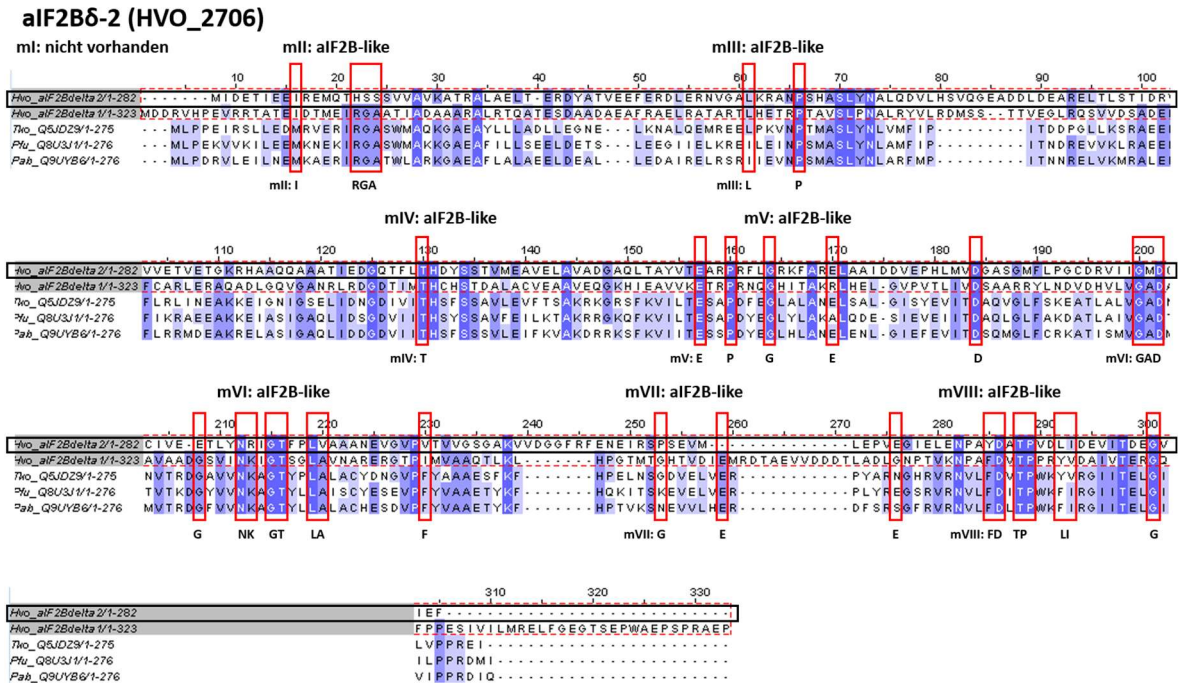


**Abbildung 59: Sequenz-Alignment aIF2B $\delta$  mit RBPIs**

Das Sequenz-Alignment wurde in Clustal O erstellt und mittels Jalview visualisiert. Die definierten RBPI-like Sequenzen von Dev und Kollegen sind gelb umrahmt (Dev et al., 2009). Verglichen wurden die Sequenzen von aIF2B $\delta$ -1 und aIF2B $\delta$ -2 aus *H. volcanii*. Zusätzlich wurden die Sequenzen von RBPI aus *M. jannaschii* (Q57586), *P. abyssi* (Q9V281) und *T. kodakarensis* (Q5JFM9) betrachtet.

Dennoch zeigte sich in dieser Arbeit nach den Affinitätsaufreinigungen und den MS-Analysen ein anderes Ergebnis. Überraschenderweise konnte mit aIF2B $\delta$ -2 (HVO\_2706) kein Initiationsfaktor mitgereinigt werden. Er konnte auch mit keinem weiteren Initiationsfaktor als aIF2B $\delta$ -1 (HVO\_0966) mitgereinigt werden.

### aIF2B-like Sequences



**aIF2B $\delta$ -1 (HVO\_0966)**

- 30,2 % identisch mit *H. volcanii* (HVO\_2706)
- 30,1 % identisch mit *T. kodakarensis*
- 29,6 % identisch mit *P. furiosus*
- 32,0 % identisch mit *P. abyssi*

**aIF2B $\delta$ -2 (HVO\_2706)**

- 30,2 % identisch mit *H. volcanii* (HVO\_0966)
- 24,8 % identisch mit *T. kodakarensis*
- 27,5 % identisch mit *P. furiosus*
- 25,8 % identisch mit *P. abyssi*

**Abbildung 60: Sequenz-Alignment aIF2B $\delta$  mit aIF2Bs**

Das Sequenz-Alignment wurde in Clustal O erstellt und mittels Jalview visualisiert. Die definierten aIF2B-like Sequenzen von Dev und Kollegen sind rot umrahmt (Dev *et al.*, 2009). Verglichen wurden die Sequenzen von aIF2B $\delta$ -1 und aIF2B $\delta$ -2 aus *H. volcanii*. Zusätzlich wurden die Sequenzen von aIF2B aus *T. kodakarensis* (Q5JDZ9), *P. furiosus* (Q8U3J1) und *P. abyssi* (Q9UYB6) betrachtet.

Anders verhielt es sich mit dem Initiationsfaktor aIF2B $\delta$ -1 (HVO\_0966). Mit ihm konnten aIF2B $\delta$ -2, aIF2 $\alpha$ , aIF2 $\beta$ -2 und aIF2 $\gamma$  mitgereinigt werden. Des Weiteren konnte er mit der Ausnahme von aIF2 $\beta$ -1, aIF2 $\beta$ -2 und aIF2B $\delta$ -2 (HVO\_2706) mit allen anderen aIFs mitgereinigt werden.

Für aIF2 $\delta$ -2 konnten nur sechs Proteine nach der MS-Datenauswertung identifiziert werden. Dies war bereits anhand der SDS-Gele nach der Affinitätsaufreinigung ersichtlich, da nur wenige Banden auf dem SDS-Gel mittels Coomassie angefärbt werden konnten. Mit keinem anderen Initiationsfaktor als aIF2 $\delta$ -2 konnte die Proteasom-Untereinheit  $\beta$  (HVO\_1562) mitgereinigt werden. Dies könnte auch mit der Bande bei 25 kDa auf dem SDS-Gel übereinstimmen.

In den Wachstumsversuchen aIF2B $\delta$ -1 nur im Wildtyp überexprimiert werden, da die vorhandene Deletionsmutante nicht bestätigt werden konnte. Die Überexpressionsmutante

von aIF2B $\delta$ -1 verhielt sich ähnlich zum Wildtyp. Eine Neuerstellung war zeitlich nicht mehr möglich. Es sollte erneut überprüft werden, ob das Gen von aIF2B $\delta$ -1 deletiert werden kann. Wenn ja, sollte die Überexpression nochmals in der Deletionsmutante wiederholt werden.

Bei aIF2B $\delta$ -2 konnte die vorhandene Deletionsmutante im Southern Blot bestätigt werden. Sie verhielt sich unter optimalen Wachstumsbedingungen wie der Wildtyp. Dies deckt sich mit den Daten von Gäbel 2014 (Gäbel, 2014). Dennoch wuchs die Überexpressionsmutante besser als die Kontrolle mit Leerplasmid.

Durch die in dieser Arbeit erbrachten Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass aIF2B $\delta$ -1 eher als Initiationsfaktor einzustufen ist als aIF2B $\delta$ -2.

#### **4.4.5 eIF4A-homolog**

Der Translationsinitiationsfaktor eIF4A-homolog (HVO\_1333) in *H. volcanii* gehört zur Familie der DEAD-box- bzw. ATP-abhängigen Helikasen. Er konnte deletiert werden (Gäbel *et al.*, 2013). Das eIF4A-homolog weist eine zu 23 % identische Aminosäuresequenz zu eIF4A in *S. cerevisiae* auf. Dabei ist das eIF4A-homolog um 551 Aminosäuren länger als eIF4A in *S. cerevisiae*. Dieser verlängerte C-terminus könnte regulatorische Domänen enthalten, deren Funktion noch unbekannt sind. Unter anderem wird dieser Bereich auch als DEAD-associated Domäne bezeichnet (Linder and Jankowsky, 2011; Chamieh, Ibrahim and Kozah, 2016).

In Eukaryonten ist eIF4A für den Scanning-Mechanismus wichtig und bildet mit eIF4E und eIF4G einen Komplex, der an die 5'-Cap-Struktur der mRNA bindet. (Schmidt, Beilsten-Edmands and Robinson, 2016). Sie rekrutieren damit die 40S ribosomale Untereinheit zur mRNA. eIF4A agiert dann als ATP-abhängige Helikase, die für das Aufwinden der sekundären/tertiären RNA zuständig ist. Stimuliert wird die Helikase-Aktivität von eIF4B (Fitzgerald and Semler, 2009).

Da Archaeen kein Scanning-Mechanismus für die Translationsinitiation verwenden, sind eIF4B, eIF4E und eIF4G in diesen Organismen nicht vertreten. Anders verhält es sich im Falle des eIF4A-homolog, da ATP-abhängige Helikasen in Archaeen vertreten sind. Das Aufwinden nur mit eIF4A ist möglich, aber sehr viel ineffizienter im Vergleich zum Komplex mit eIF4G und eIF4E (Ray *et al.*, 1985; Linder and Fuller-Pace, 2015; Chamieh, Ibrahim and Kozah, 2016).

Im Vergleich der drei Domänen des Lebens können DEAD-box Helikasen an einem oder mehreren Prozessen beteiligt sein. Ihre Vielfalt ist immens und ihre Funktion in Archaeen noch weitestgehend unbekannt (Tieg and Krebber, 2013; Chamieh, Ibrahim and Kozah, 2016).

In der vorliegenden Arbeit konnte die Deletion in der vorhandenen Deletionsmutante von HVO\_1333 anhand eines Southern Blots bestätigt werden. Die Deletionsmutante zeigte unter optimalen Wachstumsbedingungen bei 42 °C in Komplexmedium ein deutlich schlechteres Wachstum im Vergleich zum Wildtyp. Dieses Ergebnis weicht von den bisherigen Daten ab.

Es wurde von Gäbel 2013 ein ähnlicher Wuchs zum Wildtyp beschrieben und lediglich ein geringerer Wachstumsertrag nachgewiesen (Gäbel *et al.*, 2013).

In dieser Arbeit wurde die Überexpression von HVO\_1333 in der Deletionsmutante durchgeführt. Die Überexpressionsmutante zeigte ein sehr viel schlechteres Wachstum als die Deletionsmutante mit Leerplasmid. Dies kann auf die Funktion als Helikase von HVO\_1333 zurückgeführt werden. Mit dem eIF4A-homolog konnten zwei weitere Translationsinitiationsfaktoren co-gereinigt werden. Dabei handelt es sich um aIF5B und aIF2B $\delta$ -1. Des Weiteren konnte nur für das eIF4A-homolog die Protease Lon (HVO\_0783) nachgewiesen werden.

Die Deletion als auch die Überexpression von HVO\_1333 scheint einen Einfluss auf die Transkription und Translation in *H. volcanii* zu besitzen und damit das Wachstum der Deletions- als auch der Überexpressionsmutante negativ zu beeinflussen.

Inwiefern das eIF4A-homolog in *H. volcanii* als Translationsinitiationsfaktor agiert, konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden.

### 4.4.6 aIF5A

Der Initiationsfaktor aIF5A konnte in *H. volcanii* nicht deletiert werden. Deshalb wurde er als essenziell eingestuft (Gäbel *et al.*, 2013). Er ist sowohl in Archaeen als auch in Eukaryonten (eIF5A) hochkonserviert und essenziell. Bei Vertebraten gibt es sogar zwei Isoformen eIF5A1 und eIF5A2, die in *H. sapiens* zu 84 % identisch sind (Caraglia *et al.*, 2013; Dever, Gutierrez and Shin, 2014). Bakterien besitzen den Elongationsfaktor EF-P als homolog zu eIF5A, der allerdings nicht essenziell ist (Doerfel *et al.*, 2013; Lassak, Wilson and Jung, 2016).

Die Funktionen von eIF5A/aIF5A sind vielfältig. Unter anderem ist er in das Zellwachstum, die Translation und in den Zelltod involviert (Jansson, Malandrin and Johansson, 2000; Dever, Gutierrez and Shin, 2014). aIF5A aus *H. volcanii* hat zu 26,6 % eine identische Aminosäuresequenz zu eIF5A aus *S. cerevisiae* (siehe Anhang [Abbildung 72](#)).

In Archaeen ist die Funktion von aIF5A noch nicht vollständig aufgeklärt. In *S. solfataricus* jedoch konnte nachgewiesen werden, dass aIF5A nicht nur an der Translationselongation, sondern auch an der Spaltung von RNA beteiligt ist (Bassani *et al.*, 2019).

In dieser Arbeit wurde aIF5A aus *H. volcanii* im Wildtyp H26 $\Delta$ 1279 überexprimiert, da er nicht deletiert werden konnte. Bei den Wachstumsversuchen von aIF5A bei 42 °C in Komplexmedium wuchs die Überexpressionsmutante sehr viel schlechter als die Kontrolle mit dem Leerplasmid. Dies kann sowohl auf seine Aufgaben in der Translation als auch an einer RNA-spaltenden Funktion liegen.

In allen drei Domänen des Lebens ist eIF5A/aIF5A/EF-P wichtig für die effektive Translation von Proteinen mit Polyprolin-Sequenzen, um ein Ribosom-*Stalling* zu verhindern (Doerfel *et al.*, 2013; Gutierrez *et al.*, 2013; Ude *et al.*, 2013). Hierfür werden in Eukaryonten, Archaeen und Bakterien Proteinmodifikationen benötigt. Diese Modifikationen sind nur in



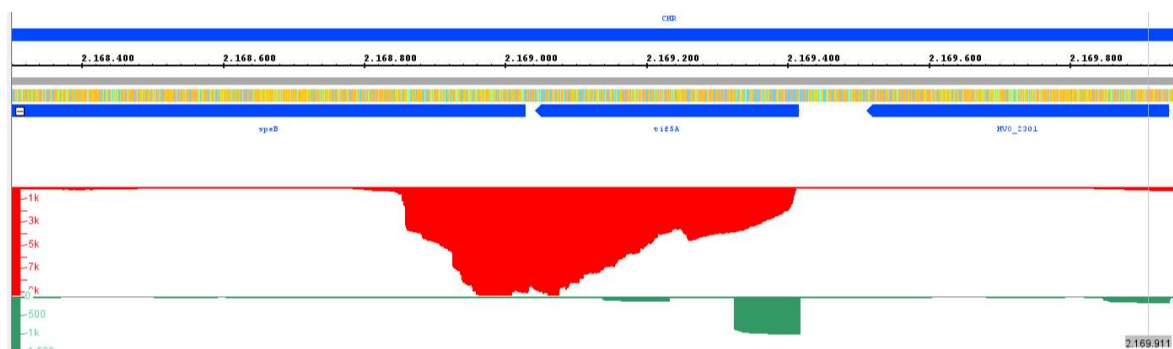
eIF5A/aIF5A/EF-P vorhanden. In Eukaryonten und Archaeen ist die essenzielle, posttranslationale Modifikation die Hypusinylierung (Jansson, Malandrin and Johansson, 2000; Bassani *et al.*, 2018). In Bakterien ist es an EF-P die  $\beta$ -Lysinylierung oder die Rhamnosylierung (Ude *et al.*, 2013; Lassak, Wilson and Jung, 2016).

Die Hypusinylierung läuft in Eukaryonten in zwei Schritten ab. Dabei werden die Enzyme Deoxyhypusin-Synthase (DHS), Deoxyhypusin-Hydroxylase (DOHH) und Polyamine benötigt (Michael, 2016). Im ersten Schritt katalysiert die DHS die Übertragung der 4-Aminobutyl-Gruppe des Polyamines Spermidin auf den Lysin-Zielrest und bildet so das Deoxyhypusin-Intermediat (Wolff *et al.*, 2007). Dieses Zwischenprodukt wird im zweiten Schritt durch DOHH hydroxyliert und bildet die biologisch aktive Form des hypusinylierten Faktors (Park *et al.*, 2010).

In Eukaryonten ist die Deoxyhypusin-/Hypusine-Modifikation essenziell. In Archaeen existieren homologe Enzyme zu DHS. Bisher konnten aber noch keine DOHH auf Genom- oder Proteom-Ebene nachgewiesen werden (Park, 2006; Wolff *et al.*, 2007).

Ein Unterschied zur Verteilung der Aminosäuren Hypusin und Deoxyhypusin zeigt sich in den verschiedenen Arten von Archaeen. In Crenarchaeota, wie zum Beispiel *Sulfolobus acidocaldarius*, konnte Hypusin nachgewiesen werden. Im Kontrast hierzu wurde für Euryarchaeota, darunter Halobacteriales, Thermokokken, Methanogene und Thermoplasmen hohe Konzentrationen von Deoxyhypusin nachgewiesen, aber keine oder nur geringe Mengen an Hypusin (Bartig, Schumann and Klink, 1990). In *H. volcanii* liegt aIF5A deoxyhypusiniert vor (Prunetti *et al.*, 2016).

Die in *H. volcanii* hauptsächlich vertretenen Polyamine sind Agmatin und Cadaverin. In geringen Mengen kommt Putrescin vor (Hamana, Hamana and Itoh, 1995; Prunetti *et al.*, 2016). Des Weiteren liegt aIF5A in einem Operon mit einer Agmatinase (HVO\_2299) (Abbildung 61). Sie ist essenziell. Im Allgemeinen sind Agmatinasen in die Bildung von Putrescin aus Agmatin involviert. Ihre Funktion als Agmatinase und die Interaktion mit aIF5A konnte in *H. volcanii* jedoch noch nicht belegt werden (Prunetti *et al.*, 2016).



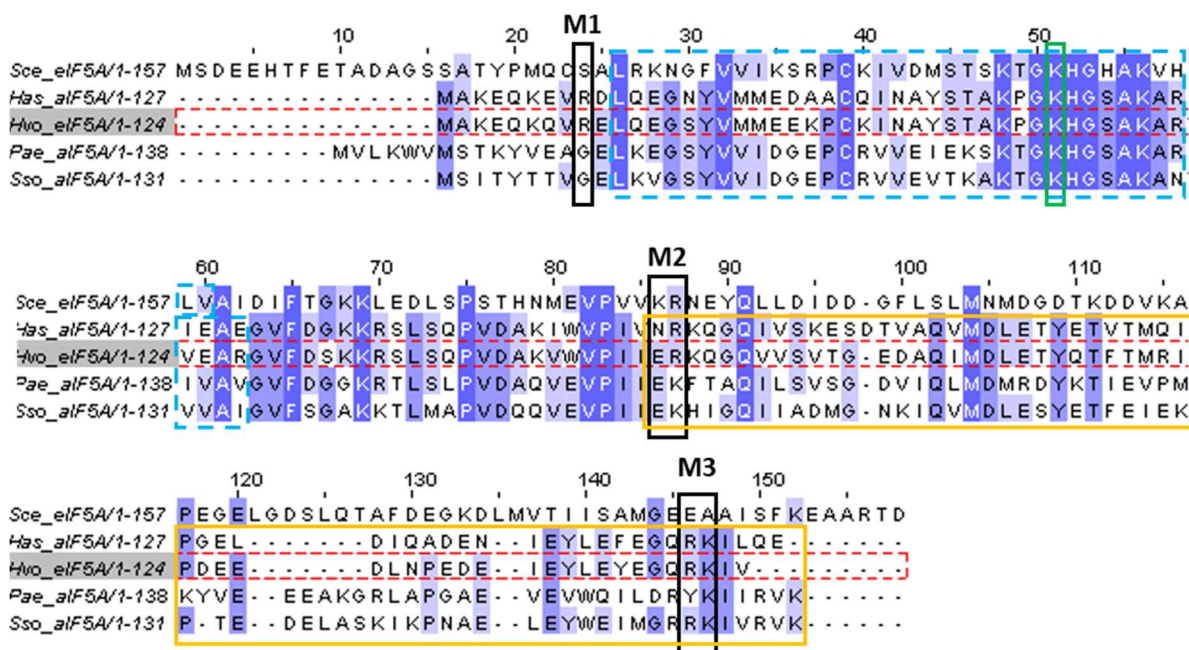
**Abbildung 61: DNA- und RNA-Seq-Daten zu aIF5A (HVO\_2300)**

Die Gene sind in blau, das Transkriptionslevel in rot und der Transkriptionsstart in grün dargestellt. Das Gen aIF5A bzw. tif5A liegt auf dem Reverse-Strang.

In *S. cerevisiae* kann durch die Bindung des Spermidin-Analog GC7 an die DHS, der erste Schritt der Hypusinierung effizient inhibiert werden (Jakus *et al.*, 1993; Lee, Park and Folk, 1995). Eine Inhibierung der Hypusinierung und des Wachstums durch GC7 konnte auch in vier archaealen Organismen nachgewiesen werden (Jansson, Malandrin and Johansson, 2000). Prunetti und Kollegen konnten 2016 in *H. volcanii* keinen negativen Einfluss von GC7 auf das Wachstum nachweisen (Prunetti *et al.*, 2016).

Wie bereits im Abschnitt zuvor erwähnt ist alF5A in *S. solfataricus* sowohl an der Translationselongation, als auch an der Spaltung von RNA beteiligt (Bassani *et al.*, 2019).

Bereits 2007 konnte von Wagner und Kollegen für alF5A aus *H. salinarum* die Spaltung von RNA nachgewiesen werden (Wagner and Klug, 2007). Dabei wurden drei Bereiche in der Aminosäuresequenz in *H. salinarum* identifiziert, die für diese Funktion wichtig sind. Zwei Abschnitte befinden sich im N-Terminus und ein Abschnitt im C-Terminus. Mittels Sequenz-Alignment konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass diese Bereiche auch in alF5A von *H. volcanii* konserviert sind (Abbildung 62).



**Abbildung 62: Sequenz-Alignment alF5A/eIF5A**

Das Sequenz-Alignment wurde mittels Clustal O und Jalview durchgeführt. Die Sequenzen von alF5A/eIF5A aus *S. cerevisiae* (Sce; P23301), *H. salinarum* (Has; Q9HP78) und *H. volcanii* (Hvo; D4GWG6), *P. aerophilum* (Pae; P56635) und *S. solfataricus* (Sso; Q97ZE8) wurden verglichen. Die schwarzen Kästen umrahmen die Bereiche, die für die Funktion von alF5A in *P. aerophilum* wichtig sind. Das für die Hypusinierung verwendete Lysin wurde grün umrahmt. Die KOW-Domäne wurde blau gestrichelt und die CspA-ähnliche Domäne gelb umrahmt.

In Archaeen besteht alF5A generell aus zwei Domänen. Diese Domänen sind über einen kurzen Link verknüpft. Dabei enthält die N-terminale Domäne den modifizierten Hypusinrest, ein Src-homolog3 Motiv (*SH3-β-Barrel-Motif*), sowie ein Kyrpides-Ouzounis-Woese-Motiv (*KOW-Domain*) (Kyrpides, Woese and Ouzounis, 1996). Bei der C-terminalen Domäne im Archaeon *Pyrobaculum aerophilum* wurde für alF5A von Peat und Kollegen 1998 eine strukturelle Ähnlichkeit zu CspA ermittelt (Peat *et al.*, 1998). Dies konnte auf andere Vertreter der Archaeen

übertragen werden. Bei CspA handelt es sich um ein Kälteschock-Protein aus *E. coli*. Es besitzt eine RNA-Bindedomäne und fungiert als RNA-Chaperon (Jiang, Hou and Inouye, 1997). Ähnlich zu CspA weist aIF5A auch diese RNA-Bindedomäne auf (Murzin, 1993).

In aIF5A aus *H. volcanii* sind im Vergleich der Aminosäuresequenz diese Bereiche ebenfalls konserviert. Deshalb besteht die Wahrscheinlichkeit, dass auch dieser aIF5A am RNA-Metabolismus beteiligt ist. Dies ist ein interessanter Aspekt für zukünftige Versuche.

Mit aIF5A konnte in dieser Arbeit in drei Affinitätsaufreinigungen nach der MS-Analyse insgesamt 83 Proteine identifiziert werden. Nach Anwendung der Kontrollen konnten 23 Proteine zusammengefasst werden. Mit aIF5A konnten aIF2 $\alpha$ , aIF2B $\delta$ -1 und aIF5B.

Wie bereits erwähnt ist es ein wichtiger Aspekt, dass mit der in dieser Arbeit angewendeten Methode Funktionsbereiche eingegrenzt und direkte und indirekte Interaktionen betrachtet werden können. Dazu zählen auch Interaktionen im weiteren Sinn wie RNA gekoppelt, transient oder im Komplex. Auch im Hinblick darauf, dass in Eukaryonten eIF5A an der Translationselongation beteiligt ist (Gregio *et al.*, 2009; Patel *et al.*, 2009).

Die Überexpression von aIF5A könnte sich auf das Polyamin-Level in *H. volcanii* auswirken. Die Polyamine werden in Säugetierzellen in der Translation sowohl für die Initiation als auch für die Elongation benötigt. Sie sind nicht nur als Vorläufer bei der Hypusinierung von eIF5A beteiligt, sondern auch an der Phosphorylierung von eIF2 $\alpha$  (Landau *et al.*, 2010). Inwieweit die Überexpression von aIF5A in *H. volcanii* auf die Polyamin-Konzentration auswirkt, muss jedoch noch geklärt werden.

Auf dem SDS-Gel konnte aIF5A mit einer Größe von 14,2 kDa zwischen 15-25 kDa nachgewiesen werden. Zwei kleinere Banden zwischen 10-15 kDa konnten ebenfalls nachgewiesen werden. In den MS-Daten konnte nach der Auswertung zwei kleinere Proteine zwischen 10-15 kDa identifiziert werden. Diese sind eine Peptidyl-tRNA-Hydrolase (HVO\_0659; 11,9 kDa) und ein UPF0058 family protein (HVO\_1473; 10,3 kDa).

In Eukaryonten interagiert eIF5A mit rpL1 und rpL42/rpL44 der großen ribosomalen Untereinheit (Schmidt *et al.*, 2016). Das rpL1 konnte auch in dieser Arbeit mit aIF5A co-gereinigt werden. Dieses ribosomale Protein konnte auch mit acht weiteren aIFs- bzw. -Untereinheiten mitgereinigt werden. In *H. volcanii* liegt rpL1 (HVO\_2757) mit zwei weiteren Genen in einem Operon. Diese sind P0/rpL10 (HVO\_2756) und rpL11 (HVO\_2755).

Unter anderem agiert rpL1 als frühes rRNA-bindendes ribosomales Protein. Es konnte aber auch in *M. vannielii* eine Repressorfunktion von rpL1 nachgewiesen werden. Dabei bindet rpL1 an seine eigene mRNA (Hanner *et al.*, 1994; Tishchenko *et al.*, 2008).

### 4.4.7 aIF5B

aIF5B ist der dritte Translationsinitiationsfaktor, der in allen drei Domänen des Lebens konserviert ist. Unter anderem als eIF5B/IF2/aIF5B bzw. aIF-2/5B benannt, besitzt er die Funktion

einer Guanosine-Triphosphatase (GTPase) und ist ein wichtiger Faktor der Translation (Jackson, Hellen and Pestova, 2010).

In Eukaryonten kann eIF5B in seinem N-terminalen Bereich sowohl mit sich selbst, als auch mit eIF1A interagieren (Nag *et al.*, 2016). Des Weiteren ist er an der Rekrutierung der großen ribosomalen Untereinheit und an der Erkennung der Initiator-tRNA beteiligt. In Eukaryonten bindet eIF5B das GTP, dessen Hydrolyse zur Freisetzung des eIF5B führt (Pestova *et al.*, 2000). Dabei hydrolysiert eIF5B-GTP und die Initiationsfaktoren eIF1, eIF1A, eIF3 und eIF2-GDP dissoziieren von der kleinen ribosomalen Untereinheit (Fernández *et al.*, 2013).

Im Sequenz-Alignment weist der archaeale aIF5B eine größere Ähnlichkeit zum eukaryontischen eIF5B als zum bakteriellen IF2 auf (Maone *et al.*, 2007). Dies ist auch bei aIF5B aus *H. volcanii* der Fall, wie in Abbildung 63 gezeigt.

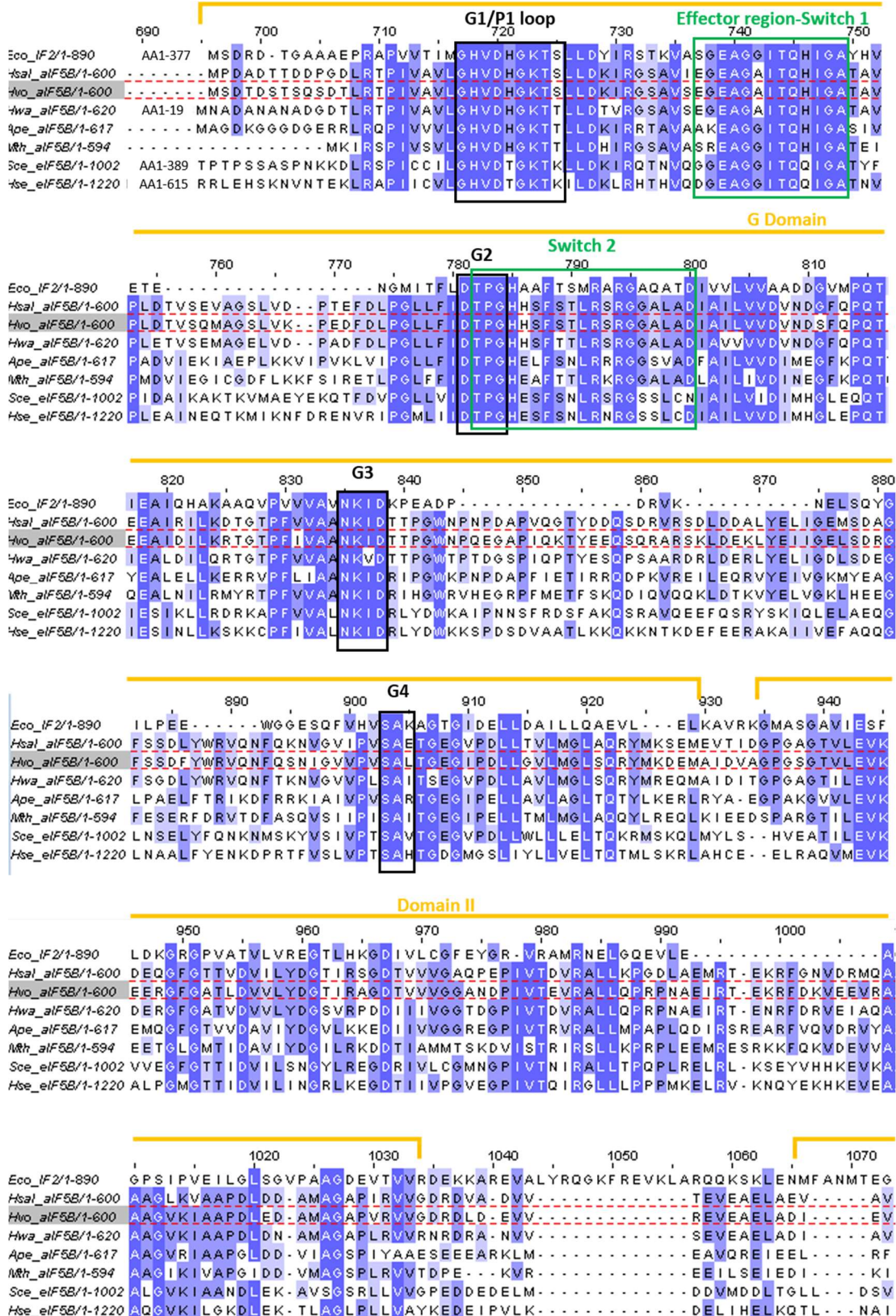
Generell teilt sich aIF5B/eIF5B/IF2 in vier Bereiche. Diese sind die G-Domäne und Domäne II-IV. In der G-Domäne sind unter anderem die für GTP-bindenden Proteine typischen vier Sequenzbereiche (G1/P1-Loop, G2, G3 und G4) sowie die beiden Switch-Regionen konserviert. Die Regionen Switch 1 und Switch 2 unterscheiden sich bei den GTP-Bindeproteinen in ihrer Konformation signifikant im GTP- und GDP-gebundenen Zustand. Dabei ist Switch 1 ein Bestandteil der Effektorregion und Switch 2 enthält zu Beginn das G2-Motiv (Roll-Mecak *et al.*, 2000).

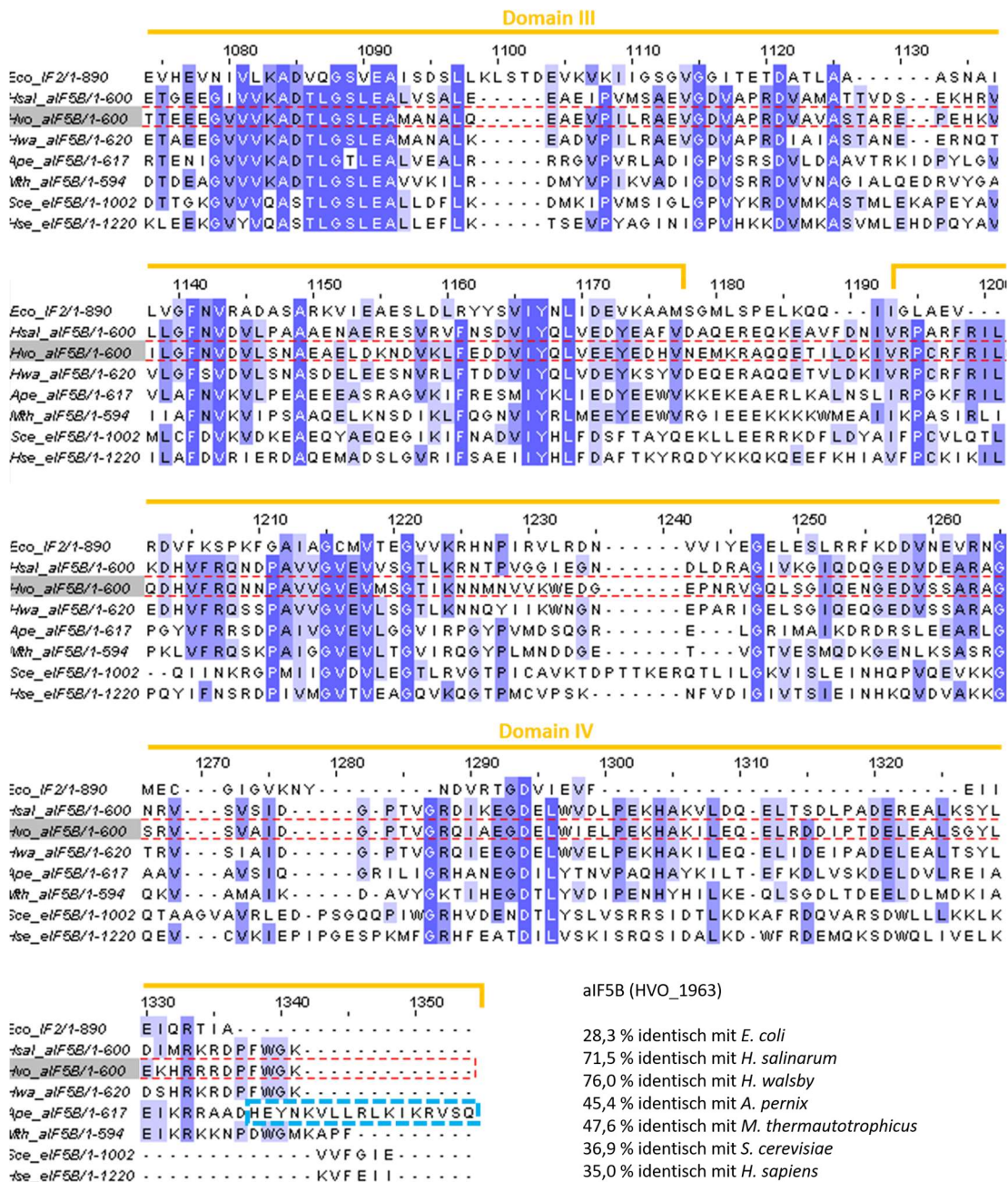
Da aIF5B in *H. volcanii* nicht deletiert werden konnte, wurde er als essenziell eingestuft (Gäbel *et al.*, 2013). Dies ist ein entscheidender Unterschied, da in *S. cerevisiae* eIF5B nicht essenziell ist. Aufgrund der beeinträchtigten Translationsinitiation in *S. cerevisiae* zeigte die Deletionsmutante jedoch ein starkes Wachstumsdefizit (Choi *et al.*, 1998). Durch die Mutation bzw. Deletion von Bereichen, die die Freisetzung von eIF5B bei fehlender Hydrolyse ermöglichen und die GTPase-Aktivität blockieren, wurde das Leaky-Scanning erhöht (Shin *et al.*, 2002). Wie ähnlich sich die Homologen der beiden Domänen des Lebens sind, konnte Lee und Kollegen im Jahre 1999 belegen. Sie bewiesen, dass *in vitro* die Funktion von eIF5B aus *S. cerevisiae* durch aIF5B aus *Methanocaldococcus jannaschii* übernommen werden kann (Lee *et al.*, 1999).

2007 konnte Maone und Kollegen für aIF5B aus *S. solfataricus* *in vitro* nachweisen, dass der Faktor die Bindung der Initiator-tRNA stimuliert, ohne das Vorhandensein von weiteren Faktoren. Des Weiteren konnte der Faktor in einem zellfreien System sowohl die Translation von leaderloser als auch mRNA mit leader erhöhen (Maone *et al.*, 2007).

Unter anderem konnte in Eukaryonten für eIF5B in Kombination mit den HCV-IRES RNA, die Translationsinitiation nachgewiesen werden. Dies konnte bei niedrigen Konzentrationen von eIF2-Met-tRNAi-GTP beobachtet werden, bei der der 48S-ähnliche Komplex, die Met-tRNAi, eIF5B und eIF3 umfasste (Locker, Easton and Lukavsky, 2007; Fernández *et al.*, 2013; Yamamoto *et al.*, 2014).

In der hier vorliegenden Arbeit wurde *alF5B* aufgrund seiner essenziellen Eigenschaft in *H. volcanii* im Wildtyp überexprimiert. Dabei konnte bei der Überexpressionsmutante ein sehr viel besseres Wachstum bei 42 °C in Komplexmedium gegenüber dem Wildtyp mit dem Leerplasmid nachgewiesen werden.





**Abbildung 63: Sequenz-Alignment aIF5B/eIF5B/IF2, modifiziert nach (Roll-Mecak et al., 2000)**

Das Sequenz-Alignment wurde mittels Clustal O und Jalview durchgeführt. Die Sequenzen von aIF5B/eIF5B/IF2 aus *E. coli* (Eco; P0A705), *H. salinarum* (Has; A0A510N889), *H. volcanii* (Hvo; D4GTJ2), *H. walsbyi* (Hwa; G0LMM9), *Aeropyrum pernix* (Ape; Q9Y9B3) und *Methanothermobacter thermautotrophicus* (Mth; O26359) *S. cerevisiae* (Sce; P39730), *H. sapiens* (Hse; O60841) wurden verglichen. Die schwarzen Kästen G1-G4 umrahmen die GTP-Bindemotive. Die Switch1 und Switch2 Regionen sind grün umrahmt. Die vier Domänen sind in gelben Klammern eingefasst. Blau umrahmt ist die C-terminale zusätzliche  $\alpha$ -Helix15 von aIF5B aus *A. pernix*.

Nach der Affinitätsaufreinigung und MS-Analyse konnte in dieser Arbeit bei der Überexpression von aIF5B in *H. volcanii* nur aIF2B $\delta$ -1 von den Initiationsfaktoren mitgereinigt werden. Jedoch konnte aIF5B mit fast allen überexprimierten Initiationsfaktoren mitgereinigt werden.

Die Interaktion zwischen eIF1A und eIF5B konnte in *S. cerevisiae* mittels *pull-down*-Assay gezeigt werden (Choi et al., 2000; Olsen et al., 2003). In Archaeen ist die Interaktion von aIF5B und aIF1A-1 umstritten.

Bisher konnten die Struktur von aIF5B in Euryarchaeota aus *Methanothermobacter thermoautotrophicus* (Roll-Mecak *et al.*, 2000) und in Crenarchaeota aus *Aeropyrum pernix* (Murakami *et al.*, 2016) aufgeklärt werden. Im Vergleich sticht vor allem der Unterschied des C-Terminus hervor. Dieser ist in *A. pernix* verlängert (Abbildung 63, blauer Kasten). Hier konnte von Murakami und Kollegen nachgewiesen werden, dass diese zusätzliche  $\alpha$ -Helix an die Furche der Domäne IV in aIF5B bindet (Murakami *et al.*, 2016). Dieser Bereich wird in Eukaryonten unter anderem für die Interaktion von eIF5B mit eIF1A1 benötigt (Kuhle and Ficner, 2014b, 2014a; Zheng *et al.*, 2014). Aufgrund der Interaktion der einzelnen Bereiche von aIF5B in *A. pernix* wird angenommen, dass es einen anderen Weg der Interaktion zwischen aIF5B und aIF1A-1 in Archaeen gibt. Inwiefern dies auf andere Archaeen übertragbar ist, ist anhand der Sequenzen fraglich, da die C-terminalen Enden meist kürzer als die des *A. pernix* sind (Abbildung 63).

In dieser Arbeit konnte für *H. volcanii* mit aIF5B keine der beiden aIF1A-Orthologen co-gereinigt werden. Jedoch konnte aIF5B mit aIF1A-1 und aIF1A-2 mitgereinigt werden.

Im direkten Sequenz-Alignment von aIF5B aus *H. volcanii* mit *A. pernix* ist keine Übereinstimmung im C-terminalen Bereich vorhanden. Durch das Sequenz-Alignment und die MS-Daten kann davon ausgegangen werden, dass aIF5B mit aIF1A-1 in *H. volcanii* interagieren kann.

Für *S. solfataricus* konnte gezeigt werden, dass aIF5B an das ribosomale Protein L12/P1 bindet und damit eine wichtige Aufgabe in der Assoziation der beiden ribosomalen Untereinheiten besitzt (Nomura *et al.*, 2012; Murakami *et al.*, 2018). In dieser Arbeit konnten bei der Überexpression von aIF5B in *H. volcanii* vier ribosomale Proteine der großen 50S ribosomalen Untereinheit mitgereinigt werden, jedoch nicht L12/P1. Bei den vier ribosomalen Proteinen handelte es sich um die 50S ribosomalen Proteine L1 (HVO\_2757), L2 (HVO\_2561), L22 (HVO\_2559) und L30 (HVO\_2543).

Wie bereits zuvor beschrieben ist L1 in Archaeen in den tRNA-release-Mechanismus involviert und Teil des L1-stalk (Gabdulkhakov, Nikonov and Garber, 2013). L2 ist ein hochkonserviertes ribosomales Protein, welches für die Verbindung der 30S und 50S ribosomalen Untereinheit benötigt wird. Des Weiteren ist L2 an der A- und P-Site in die Bindung der tRNA involviert (Ühlelein *et al.*, 1998; Diedrich *et al.*, 2000). In *E. coli* fungiert L2 als Transkriptionsregulator und fördert die Transkription von Genen mit ribosomalem RNA-Promotor (Rippa *et al.*, 2010). L22 ist in Archaeen unter anderem mit der 23S rRNA, L4, L22 und L39e ein Teil des Exit-Tunnels der Polypeptidkette (Nissen *et al.*, 2000; Moore and Steitz, 2002).

Bei L30 oder auch rpL30p/L7E genannt, handelt es sich um ein ribosomales Protein, das bei der Bindung der 5S rRNA an die große ribosomale Untereinheit beteiligt ist (Scholzen and Arndt, 1991; Hansen *et al.*, 2002; Hansen, Moore and Steitz, 2003; Mitroshin, Garber and Gabdulkhakov, 2016).

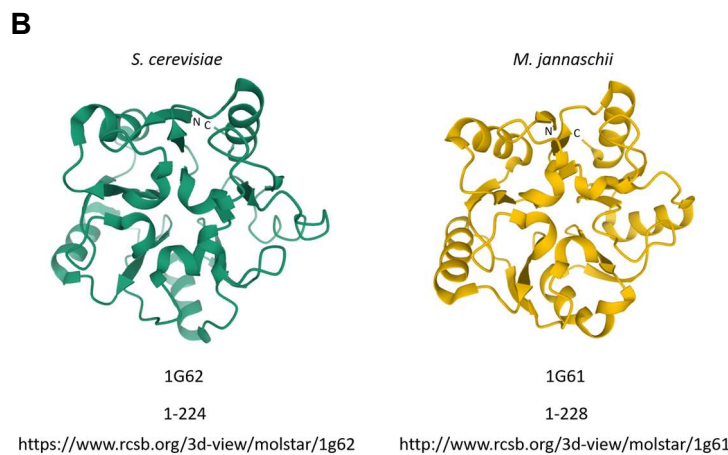
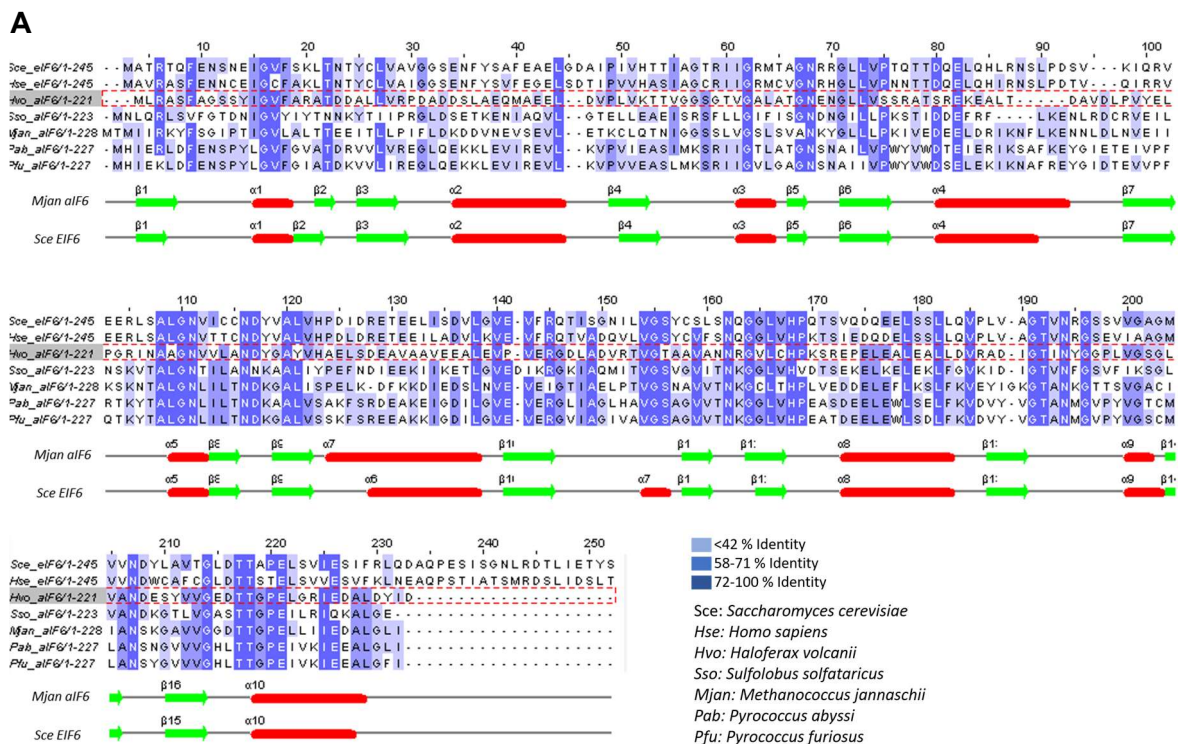
aIF5B konnte in dieser Arbeit bei fast allen Aufreinigungen co-gereinigt werden. Als unspezifisches Protein kann er ausgeschlossen werden, da er nicht in den Kontrollen co-gereinigt

werden konnte und keine Polyhistidine in seiner Aminosäuresequenz enthält (Abbildung 73). Damit kann von einer wichtigen regulatorischen Funktion von aIF5B in *H. volcanii* ausgegangen werden.

#### 4.4.8 aIF6

Der Translationsinitiationsfaktor aIF6 ist ein monomeres Homolog zu eIF6 aus Eukaryonten. In Bakterien ist aIF6 nicht vertreten. Sowohl in Eukaryonten als auch in Archaeen ist dieser Translationsinitiationsfaktor essenziell und scheint mehrere Funktion zu besitzen. Hierzu gehören die Ribosomenbiogenese, die Kontrolle der Translation und die Tumorphprogression in höheren Eukaryonten (Groft *et al.*, 2000; Benelli *et al.*, 2009; Brina *et al.*, 2015).

Ein Sequenzvergleich von eIF6/aIF6 aus verschiedenen Eukaryonten und Archaeen ist in Abbildung 64A dargestellt. Die Ähnlichkeit in den Strukturen wird in Abbildung 64B gezeigt.



**Abbildung 64: Sequenz-Alignment von aIF6/eIF6**

**A.** Strukturbasierendes Sequenz-Alignment mittels Clustal O erstellt und Jalview visualisiert. Verglichen wurden Sequenzen von aIF6/eIF6 aus *S. cerevisiae* (Q12522), *H. sapiens* (P56537), *S. solfataricus* (Q980G0), *M. jannaschii* (Q60357), *P. abyssi* (Q9UY16), *Pyrococcus furiosus* (Q8U3S8) und *H. volcanii* (D4GYW3). **B.** Strukturen von aIF6 aus *S. cerevisiae* und *M. jannaschii* zeigen die β-Strands und α-Helices.



In dieser Arbeit wurde der in *H. volcanii* essenziell eingestufte aIF6 im Wildtyp überexprimiert. Die Mutante wuchs geringfügig besser als der Wildtyp mit Leerplasmid. Nach den Affinitätsaufreinigungen konnte nur eine schwache Bande auf der Höhe des aIF6 mittels Coomassie auf dem SDS-Gel sichtbar gemacht werden. Dies spiegelte sich auch in der MS-Analyse wider. In *H. volcanii* konnte aIF6 nur mit geringen *Unique Peptides* identifiziert werden. In einer Auswertung lag der *Unique Peptides* Wert unter zwei, weshalb nur zwei Messungen ausgewertet werden konnten. Unter anderem könnte dies an seiner Funktion in der Kontrolle der Translation liegen. Dabei fungiert er als *anti-association-factor* zwischen kleiner und großer ribosomaler Untereinheit. Greber und Kollegen konnten 2012 für das Archaeon *Methanothermobacter thermautotrophicus* nachweisen, dass aIF6 an die große 50S ribosomale Untereinheit bindet. Damit verhindert er die vorzeitige Anlagerung an den Präinitiationskomplex bzw. der kleinen ribosomalen Untereinheit (Greber *et al.*, 2012).

Dennoch konnten bei zwei Affinitätsaufreinigungen 57 Proteine identifiziert werden. Mit aIF6 konnten nicht nur Translationsinitiationsfaktoren, sondern auch vier ribosomale Proteine der großen 50S ribosomalen Untereinheit co-gereinigt werden. Diese sind L1 (HVO\_2757), L2 (HVO\_2561), L3 (HVO\_2564) und L4 (HVO\_2563).

Im Vergleich von *S. cerevisiae* und *M. jannaschii* konnte 2000 von Groft und Kollegen gezeigt werden, dass beide Initiationsfaktoren, aIF6 und eIF6, mit der großen ribosomalen Untereinheit interagieren. In der hier vorliegenden Arbeit konnte die Interaktion von aIF6 und L14 nicht gezeigt werden, wie es Benelli und Kollegen 2009 für *S. solfataricus* beschrieben (Groft *et al.*, 2000; Benelli *et al.*, 2009).

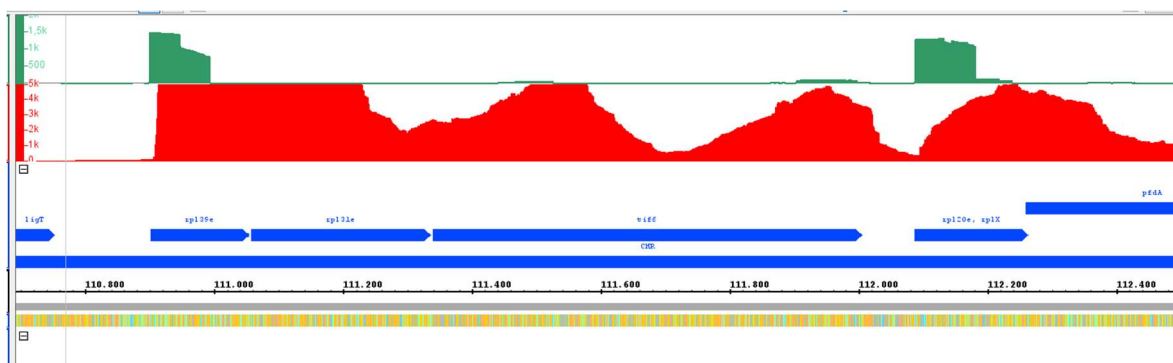
Grebe und Kollegen konnten 2012 für *M. thermautotrophicus* bei der Cryo-Elektronenmikroskopie die Interaktion von aIF6 und der 50S ribosomalen Untereinheit in Komplex weiter aufklären. Sie konnten dabei auch die Bindung von aIF6 und dem ribosomalen Protein L14 (in Eukaryonten L23) bestätigen (Greber *et al.*, 2012). Zusätzlich konnten schwächere Interaktionen mit rpL3, rpL24e und dem Sarcin-Ricin-Loop der 23S rRNA nachgewiesen werden. In der hier vorliegenden Arbeit konnte das ribosomale Protein rpL3 mit aIF6 co-gereinigt werden, was auch auf eine Interaktion der beiden Proteine in *H. volcanii* schließen lässt.

In Eukaryonten wurde mehrfach gezeigt, dass eIF6 eine Rolle bei der Reifung der 60S ribosomalen Untereinheit spielt (Basu *et al.*, 2001; Brina *et al.*, 2015). In *S. cerevisiae* scheint eIF6 eine geringere Rolle in der Translation zu spielen und eher an der Ribosomenbiogenese beteiligt zu sein (Basu *et al.*, 2001). In Eukaryonten gibt es die *elongation factor like 1 GTPase* (*H. sapiens*: EFL1; *S. cerevisiae*: Efl1) und das Shwachman-Diamond-Syndrom-Protein (*H. sapiens*: SBDS; *S. cerevisiae*: Sdo1). Beide sind für die Freisetzung des eIF6 zuständig. Dies ist einer der letzten Schritte der Reifung der großen ribosomalen Untereinheit und ermöglicht die Bildung reifer Ribosomen (Luviano *et al.*, 2019). In Archaeen gibt es zu Efl1 kein Ortholog. Jedoch existiert ein Ortholog für SBDS/Sdo1 (Pech and Nierhaus, 2012). In *H. volcanii* konnte SBDS (HVO\_1344) in keiner der Affinitätsaufreinigungen identifiziert werden.

Mit aIF6 konnten aIF5B als auch aIF2B $\delta$ -1 mitgereinigt werden. Die Interaktion zu diesen Faktoren wurde bisher in der Literatur nicht beschrieben. aIF5B und aIF2B $\delta$ -1 konnten bei fast allen anderen aIFs co-gereinigt werden, was die Funktion der Proteine unterstreicht.

In den RNA- und DNA-Seq-Daten konnte gezeigt werden, dass aIF6 ebenfalls in einem Operon liegt. Dabei ist er downstream von zwei ribosomalen Proteinen der 50S großen ribosomalen Untereinheit positioniert (Abbildung 65). Diese sind rpl39e (HVO\_0115) und rpl31e (HVO\_0116), die in dieser Arbeit mit keinem Faktor mitgereinigt werden konnten. Das beschriebene Operon ist in vielen Archaeen konserviert. In direkter Nachbarschaft zu diesem Operon liegen die beiden Gene rpl20e (HVO\_0118) und pfdA (HVO\_0119). Auch diese Anordnung ist in Archaeen konserviert.

Um die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zu unterstreichen und einen Einfluss des N-Terminals His-Tags auszuschließen, sollten die Versuche mit einem C-Terminals His-Tag für aIF6 wiederholt werden.



**Abbildung 65: DNA- und RNA-Seq-Daten des aIF6 (HVO\_0117)**

Die Gene sind in blau, das Transkriptionslevel in rot und der Transkriptionsstart in grün dargestellt. Das Gen aIF6 bzw. tif6 liegt auf dem Forward-Strang.

#### 4.5 RNAPUs in der MS-Analyse

Der Mechanismus der Transkription in Archaeen ähnelt der Transkription in Eukaryonten. Unter anderem sind in Archaeen TATA-Box-Promotorsequenzen, TATA-Box-Bindeproteine (TBP), der Transkriptionsfaktor TFIIB (Homolog zu Eukaryonten) und die RNA-Polymerase II vertreten (Goede *et al.*, 2006). Wie bereits in Kapitel 1.1 erwähnt, ähnelt die RNA-Polymerase in Archaeen der eukaryontischen RNA-Polymerase II. Im Gegensatz zu Bakterien mit 6 RNAPUs sind in Eukaryoten und Archaeen 13 Untereinheiten bekannt (Grohmann, Hirtreiter and Werner, 2009).

Die mRNA in Archaeen hingegen ähnelt in ihrer Struktur bakterieller mRNA (Tabelle 2). Die Transkriptionsregulatoren sind bis auf wenige Ausnahmen homolog zu bakteriellen Aktivatorn, Repressoren und Stimulatoren (Krüger *et al.*, 1998; Kyripides and Woese, 1998b; Bell and Jackson, 2001; Bell, 2005).

Als Prokaryoten besitzen Archaeen und Bakterien keinen definierten Zellkern. Somit findet die Transkription und Translation im selben Zellraum statt.

Ähnlich zu Bakterien ist auch die Organisation von funktionsverwandten Genen in multicistronischen Operons (Srinivasan, Krebs and RajBhandary, 2006). Bei der Clusterung von Genen kann davon ausgegangen werden, dass ihre Expression co-reguliert ist. Dies ist ein guter Indikator für eine funktionelle oder gar physische Interaktion. Ein Beispiel sind die RNAPUs in Archaeen, die alle in Operons liegen. Das größte Operon bildet *rpoA1*, *rpoA2*, *rpoB1*, *rpoB2* und *rpoH*, das in vielen Archaeen konserviert ist (Werner, 2007).

Bemerkenswert ist, dass die meisten RNAPUs in Archaeen in Clustern mit ribosomalen Proteinen liegen. Darunter auch nicht-universelle archaeale ribosomale Proteine (Wang, Dasgupta and Fox, 2009). Wie beschrieben ist in einem dieser Cluster auch *alf2γ* enthalten (Kapitel 4.4.3.3).

2008 konnte von Hirata und Kollegen die erste Kristallstruktur der RNA-Polymerase aus *S. solfataricus* für Archaeen aufgeklärt werden (Hirata, Klein and Murakami, 2008).

Generell lässt sich die RNA-Polymerase mit ihren Untereinheiten in drei Bereiche einteilen. Diese sind die Kerneinheit mit dem katalytischen Zentrum (*rpoA1*, *rpoA2*, *rpoB1*, *rpoB2*), die Montageplattform (*rpoL*, *rpoN*, *rpoD*, *rpoP*) und die Hilfseinheit (*rpoH*, *rpoK*, *rpoF*, *rpoE*) (Grohmann, Hirtreiter and Werner, 2009).

In *H. volcanii* sind 12 RNAPUs annotiert, während *rpoG* nur in Crenarchaea vertreten ist (Grohmann and Werner, 2010). In dieser Arbeit wurden sieben der zwölf RNAPUs aus *H. volcanii* überexprimiert, aufgereinigt und in der MS analysiert. Damit sollte überprüft werden, ob auch mit den RNAPUs Initiationsfaktoren mitgereinigt werden können. Mit den sieben überexprimierten RNAPUs konnten Proteine der Transkription, Translation, ribosomale Proteine und Proteine der Replikation mitgereinigt werden. Dazu zählen auch Translationsinitiationsfaktoren. Für *alf2Bδ-1* und *alf5B* war die Co-Reinigung von RNAPUs erfolgreich. Auch die Co-Reinigung der beiden Faktoren seitens der RNAPUs war möglich (Tabelle 84 und 85).

Insgesamt konnten mit den sieben RNAPUs bis auf *rpoK* und *rpoE* alle RNAPUs mitgereinigt werden. Dies spricht für die Validität der in dieser Arbeit etablierten Methode: der His-getaggen Aufreinigung und MS-Analyse in *H. volcanii*, um direkte und indirekte Interaktionspartner von Proteinen zu identifizieren. Dabei konnte ein Funktions- bzw. Interaktionsbereich eingegrenzt werden. Jedoch sind weitere Untersuchungen erforderlich, um diese Bereiche eindeutig einzugrenzen.

Für die weitere Aufklärung und Vervollständigung des Interaktionsnetzwerks von RNAPUs wäre es hilfreich, die in dieser Arbeit fehlenden RNAPUs (*rpoF*, *rpoE*, *rpoK*, *rpoN*, *rpoP*) ebenfalls mittels Überexpression, Affinitätsaufreinigung und MS-Analyse zu untersuchen.

#### 4.5.1 rpoA1, rpoA2, rpoB1, rpoB2 und rpoH

Im Genom von *H. volcanii* liegen die fünf RNAPUs rpoA1 (HVO\_0349), rpoA2 (HVO\_0350), rpoB1 (HVO\_0348), rpoB2 (HVO\_0347) und rpoH (HVO\_0346) in einem Operon mit weiteren Proteinen. Dabei sind die ersten vier genannten RNAPUs ein wichtiger Bestandteil des katalytischen Zentrums der RNAP und in allen drei Domänen des Lebens vertreten (Tabelle 1). In Eukaryonten ist rpb1 die größte Untereinheit. In Archaeen ist diese Untereinheit in zwei Polypeptide und somit in zwei Gene rpoA1 und rpoA2 aufgeteilt. Sie liegen gemeinsam in einem Operon (Langer *et al.*, 1995). Auch rpb2 in Eukaryonten ist in manchen Archaeen in zwei Gene (rpoB1 und rpoB2) und damit in zwei Polypeptidketten geteilt (Langer *et al.*, 1995).

rpoH ist in Archaeen und Eukaryonten (rpb5) konserviert. In *S. shibatae* wurde 2009 von Korkhin und Kollegen die Interaktion von rpoH mit rpo13 beschrieben (Korkhin *et al.*, 2009). rpo13 wurde bisher nur in Sulfolobales nachgewiesen (Hirata and Murakami, 2009).

Zu den weiteren annotierten Genen im Operon gehören auch zwei ribosomale Proteine rpS7 (HVO\_0354) und rpS12 (HVO\_0353). Viele ribosomale Proteine in Archaeen befinden sich in Gen-Clustern (Wang, Dasgupta and Fox, 2009). Das oben genannte Operon ist auch in weiteren Archaeen bekannt und konnte bisher in diesen nachgewiesen werden (Klenk, Schwass and Zillig, 1991).

Bemerkenswert ist dabei, dass das Protein rpS12 sich an der Schnittstelle von 30S und 50S ribosomalen Untereinheit befindet. Zusammen mit rpS4 und rpS5 spielt rpS12 eine wichtige Rolle bei der akkuraten Translation.

In dieser Arbeit konnte rpS12 weder mit den aIFs noch mit den RNAPUs co-gereinigt werden. rpS7 konnte ebenfalls nicht mit den RNAPUs mitgereinigt werden. Mit den Initiationsfaktoren aIF1, aIF2B $\delta$ -1 und eIF4A-homolog konnte er co-gereinigt werden. Dieses ribosomale Protein ist eines der primären rRNA-Bindeproteine und bindet direkt an die 16S rRNA. Dort ist es am Aufbau der Kopfdomäne der 30S ribosomalen Untereinheit beteiligt und befindet sich in der Nähe des Dekodierungszentrums an der Schnittstelle der beiden Untereinheiten.

In dieser Arbeit wurden diese fünf RNAPUs unabhängig voneinander überexprimiert, affinitätsgereinigt, in der MS analysiert und ausgewertet. Das Augenmerk lag auf co-gereinigten aIFs.

Die RNAPU rpoA1 konnte mit sieben aIFs co-gereinigt werden. Er selbst konnte bei der Überexpression zwei aIFs mitreinigen. Dabei konnte für rpoA1 und aIF2B $\delta$ -1 sowie rpoA1 und aIF5B eine gegenseitige Co-Reinigung nachgewiesen werden.

rpoA2 konnte mit vier aIFs mitgereinigt werden. Er selbst konnte zwei aIFs co-reinigen. Auch bei rpoA2 konnte mit aIF2B $\delta$ -1 eine gegenseitige Co-Reinigung nachgewiesen werden.

rpoB1 konnte mit zwei aIFs mitgereinigt werden. Darunter aIF1 und aIF2B $\delta$ -1. rpoB1 selbst konnte zwei aIFs mitreinigen, darunter aIF2B $\delta$ -1.

Die RNAPU rpoB2 konnte mit sieben aIFs co-gereinigt werden, unter anderem aIF2B $\delta$ -1 und aIF5B. Mit rpB2 selbst konnten drei aIFs mitgereinigt werden, darunter aIF2B $\delta$ -1 und aIF5B.

Bei rpoH konnte drei aIFs darunter aIF2 $\alpha$ , aIF2B $\delta$ -1 und aIF5B co-gereinigt werden. Aber auch mit aIF2B $\delta$ -1 konnte rpoH mitgereinigt werden.

Auffallend ist dabei das rpoA1, rpoA2, rpoB1, rpoB2 und rpoH jeweils aIF2B $\delta$ -1 co-reinigen und auch diese fünf RNAPUs in den MS-Daten von aIF2B $\delta$ -1 identifiziert werden konnten.

Auch aIF5B sticht hervor, da er die beiden RNAPUs rpoA1 und rpoB2 co-reinigen konnte. Umgekehrt konnte aIF5B auch bei rpoA2, rpoB1 mitgereinigt werden. Zusätzlich konnte rpoH auch aIF5B co-reinigen. Umgekehrt war dies nicht möglich.

#### **4.5.2 rpoL**

rpoL ist in allen drei Domänen des Lebens vertreten (Bacteria:  $\alpha$ ll; Eukarya: rpb11). In *H. volcanii* liegt rpoL (HVO\_1042) mit einem Beta-lactamase domain protein (HVO\_1041) in direkter Nachbarschaft. rpoL und rpoD bilden gemeinsam einen stabiles Heterodimer bzw. einen Unterkomplex. Sie stellen gemeinsam mit rpoN und rpoP eine Plattform für die Assemblierung des aktiven Zentrums dar, welches aus den Untereinheiten rpoA1, rpoA2 und rpoB bzw. rpoB1 und rpoB2 besteht (Werner, Eloranta and Weinzierl, 2000; Goede *et al.*, 2006).

In dieser Arbeit konnte rpoL mit aIF1 co-gereinigt werden. Bei rpoL selbst konnten nach der Überexpression zwei aIFs, aIF2B $\delta$ -1 und aIF5B identifiziert werden. Auffallend war bei rpoL, dass bei ihm als einzige RNAPU die in dieser Arbeit untersucht wurde, keine 30S ribosomale Proteine co-gereinigt werden konnten.

#### **4.5.3 rpoD**

rpoD ist in allen drei Domänen des Lebens konserviert (Bacteria:  $\alpha$ l; Eukarya: rpb3). rpoD (HVO\_2781) liegt in einem Operon. Das Operon umfasst fünf Gene auf dem *Reverse*-Strang. Diese sind rpS13 (HVO\_2784) rpS4 (HVO\_2783) rpS11 (HVO\_2782) und rpoD (HVO\_2781). Des Weiteren befindet sich N-terminal eine tR30-LeuCAG-tRNA (HVO\_2785).

In vielen Archaeen ist die Nachbarschaft der drei ribosomalen Proteine zu rpoD konserviert. Das gilt für viele Bakterien, allerdings nicht für Eukaryonten. Dennoch ist im Sequenzabgleich rpoD aus *H. volcanii* (D4GWY4) mit RPB3 aus *S. cerevisiae* (P16370) zu 24 % identisch, während es zu rpoD aus *E. coli* (P00579) nur zu 17 % identisch ist ([Abbildung 74](#)).

Wie im vorhergehenden Kapitel beschrieben, bildet rpoD mit rpoL ein Heterodimer bzw. Unterkomplex und mit rpoN und rpoP eine Plattform für die Assemblierung des aktiven Zentrums der RNA-Polymerase (Werner, Eloranta and Weinzierl, 2000; Goede *et al.*, 2006). Zu erwähnen ist, dass rpoD (HVO\_2781), rpoK (HVO\_2775) und rpoN (HVO\_2776) im Genom nahe beieinander liegen.

In dieser Arbeit wurde rpoD überexprimiert. Er konnte jedoch selbst nur mit einem *Unique Peptides* Wert von eins identifiziert werden. Dennoch konnte mit rpoD der Faktor aIF2B $\delta$ -1 und umgekehrt co-gereinigt werden. Des Weiteren konnte rpoD mit aIF1 mitgereinigt werden.

Für die Bestätigung der MS-Daten sollte in diesem Fall rpoD mit einem C-terminalen His-Tag erneut überexprimiert und analysiert werden.

#### **4.5.4 rpoN und rpoK**

rpoN ist in Archaeen und Eukaryonten (rpb10) konserviert. rpoK ist sowohl in Archaeen, Eukaryonten (rpb6) und Bakterien ( $\omega$ ) vorhanden. Gemeinsam besitzen sie eine hochkonservierte Faltung im Kern.

rpoL, rpoD, rpoP und rpoN bilden die Montageplattform für das aktive Zentrum der RNA-Polymerase in Archaeen (Werner, Eloranta and Weinzierl, 2000).

Bei Archaeen ist rpoK und rpoE am Schutz des C-Terminus des rpoA1 beteiligt. Diese Anordnung der Untereinheiten ist auch in der eukaryontischen RNAPII konserviert (Hirata, Klein and Murakami, 2008). Zusätzlich ist rpoK ein wichtiger Ankerpunkt für rpoE und rpoF (Ouhammouch *et al.*, 2004).

In *H. marismortui* wurde bereits 1994 die Organisation bestimmter RNAPUs in Operons beschrieben (McKune and Woychik, 1994). Dabei handelte es sich unter anderem um rpoN und rpoK. Dies ist auch für *H. volcanii* der Fall. Die beiden RNAPUs rpoN (HVO\_2776) und rpoK (HVO\_2775) liegen mit mehreren Proteinen, darunter vier ribosomalen Proteine, in einem Operon. Diese sind zwei Proteine der kleinen und zwei Proteine der großen ribosomalen Untereinheit: rpL18e (HVO\_2779), rpL13 (HVO\_2778), rpS9 (HVO\_2777) und rpS2 (HVO\_2773). Des Weiteren ist eine Enolase (HVO\_2774) im Operon enthalten.

In dieser Arbeit konnte rpoN und rpoK aus zeitlichen Gründen nicht überexprimiert werden. rpoN konnte nicht mit aIFs, aber bei sechs RNAPUs (rpoA1, rpoA2, rpoB1, rpoB2, rpoH und rpoL) mitgereinigt werden. rpoK konnte dagegen weder bei den aIFs noch bei den RNAPUs co-gereinigt werden.

#### **4.5.5 rpoF und rpoE**

rpoE bzw. rpoE1 (HVO\_1899) liegt in einem größeren Operon. Bei den im Operon annotierten Genen handelt es sich um aIF2 $\gamma$  (HVO\_1901), einem putativen RNA-Bindeprotein, das eine PIN-Domäne enthält (HVO\_1900), die RNAPU rpoE1 (HVO\_1899), den Transkriptionselongationsfaktor spt4/rpoE2 (HVO\_1898) sowie einer möglichen GTP-abhängigen Dephospho-CoA-Kinase (HVO\_1897). Die unmittelbare Nähe dieser Gene konnte auch bei acht weiteren Vertretern der Halobacteriaceae nachgewiesen werden (Abbildung 57B). In diesem Cluster ist unter anderem auch das ribosomale Protein rpS24e vertreten (Wang, Dasgupta and Fox, 2009).

rpoF (HVO\_2748) liegt mit rpL21e (HVO\_2749) in einem Operon. Beide RNAPUs sind sowohl in Archaeen, als auch in Eukaryonten konserviert (Hirata, Klein and Murakami, 2008).

In der RNA-Polymerase bilden rpoF und rpoE eine stielartige Struktur, die aus dem Kern der RNA-Polymerase hervorragt (Abbildung 2). Dieser Bereich ist an vielen Funktionen beteiligt. Unter anderem stabilisiert er den Initiationskomplex und bindet die naszierende RNA, was sich positiv auf die Elongations- und Terminationseffizienz der RNAP auswirkt.

Als Interaktionspartner dient die stielartige Struktur dem Transkriptionsfaktor E (Naji, Grünberg and Thomm, 2007; Werner, 2007; Griesenbeck, Tschochner and Grohmann, 2017).

Die RNAPUs rpoE und rpoF konnten aus zeitlichen Gründen in dieser Arbeit nicht überexprimiert werden. rpoF konnte aber in dieser Arbeit mit rpoL und aIF2B $\delta$ -1 co-gereinigt werden. rpoE konnte weder bei aIFs noch bei RNAPUs mitgereinigt werden.

Der Transkriptionsfaktor E (TFE, HVO\_1174) konnte mit den RNAPUs nicht mitgereinigt werden, aber bei aIF1 und aIF2B $\delta$ -1. TFE ist in Archaeen nicht essenziell, wirkt sich aber positiv auf die Initiationsrate bei manchen, schwach exprimierten Promotoren aus (Hanzelka, Darcy and Reeve, 2001). Zudem konnte mit TFE eine höhere Effizienz bei der Wiederaufnahme von blockierten Elongationskomplexen gezeigt werden, was auf eine Stabilisierung des Elongationskomplexes während der Transkription hindeutet (Grünberg *et al.*, 2007).

#### **4.5.6 rpoP**

rpoP (HVO\_0653) ist in Archaeen und Eukaryonten (rpb12) konserviert. In *H. volcanii* liegt das Gen des rpoP auf dem Genom in einem Cluster mit dem 50S ribosomalen Protein L37ae (HVO\_0654). Dieses Cluster ist in vielen Archaeen vertreten. Bei L37ae handelt es sich um ein ribosomales Protein, das nur in Archaeen vorkommt (Wang, Dasgupta and Fox, 2009).

rpoP ist die kleinste RNAPU in *H. volcanii*, dessen Protein ein Gewicht von 5,1 kDa besitzt.

In dieser Arbeit konnte aus zeitlichen Gründen rpoP nicht überexprimiert werden. Die RNAPU selbst konnte nicht mit Initiationsfaktoren mitgereinigt werden. Bei der Überexpression der RNAPUs rpoA1, rpoB1, rpoB2, rpoH und rpoL konnte rpoP aber co-gereinigt werden.

Für die Assemblierung der RNAPU in Archaeen wurde 2002 von Werner und Weinzierl rpoP als essenziell beschrieben (Werner and Weinzierl, 2002). Dies könnte ein Grund für die Co-Reinigung von rpoP sein. Des Weiteren wurde von Jun und Kollegen 2011 in *S. solfataricus* beschrieben, dass rpoP mit seinem C-Terminalem Ende, zwischen rpoD und rpoB positioniert ist (Jun *et al.*, 2011).

Aufgrund der Funktion von rpoP und der erfolgreichen Co-Reinigung mit fünf weiteren RNAPUs wäre eine Untersuchung mittels Überexpression, Aufreinigung und MS-Analyse des rpoP für den Ausbau des bestehenden Interaktionsnetzwerks hilfreich.

#### 4.6 Vergleich eIF-aIF und mögliche Funktion in Archaeen

Eukaryonten und Archaeen weisen in der Translationsinitiation einen gemeinsamen strukturellen Komplex, den Präinitiationskomplex, auf. Hierfür sind e/aIF1, e/aIF1A, der ternäre Komplex bestehend aus e/aIF2 beladen mit GTP und der Met-tRNA<sup>i</sup> sowie die mRNA gebunden an die kleine ribosomale Untereinheit zuständig (Hasenöhr *et al.*, 2009; Coureux *et al.*, 2016). Am Präinitiationskomplex sind unter anderem aIF1, aIF1A und aIF2 in Archaeen beteiligt. Diese weisen Homologien zu ihren eukaryontischen Gegenstücken auf, was zu der Annahme führt, dass sie ähnliche Funktionen besitzen.

Im Jahr 2016 konnte von Coureux mittels Kryoelektronenmikroskopie zwei Konformationen des archaealen 30S-Initiationskomplexes von *P. abyssi* identifiziert werden. In der ersten Konformation ist die tRNA nicht in der Peptidyl-Seite, sondern nach außen orientiert. Dabei befindet sie sich in einer Art Standby-Position. aIF2 interagiert währenddessen mit aIF1 und der 30S ribosomalen Untereinheit. In der zweiten Konformation ist die tRNA in der Peptidyl-Seite und führt zur Interaktion mit aIF2. Die Standby-Position geht in die Dekodier-Position über (Coureux *et al.*, 2016). Es ist jedoch fraglich, inwiefern dieser Vorgang aufgrund der Homologie auf *H. volcanii* übertragbar ist. Das kann zutreffen, da es in *P. abyssi* kaum leaderlose Transkripte gibt und dieser Vorgang einen Scanning-Mechanismus von kurzen 5'-UTRs voraussetzt (Toffano-Nioche *et al.*, 2013). In *H. volcanii* sind jedoch 72 % der Transkripte leaderlos (Babski *et al.*, 2016).

In *S. solfataricus* hingegen sind ähnlich wie in *H. volcanii* 69 % der Transkripte leaderlos. Die Anzahl der Transkripte mit 5'-UTR ist sehr gering und beschränkt sich meist auf den Beginn eines Operons (Wurtzel *et al.*, 2010). Es gibt auch zwischen *S. solfataricus* und *H. volcanii* gravierende Unterschiede. aIF2 $\alpha$  ist in *S. solfataricus* essenziell und für die Bindung der tRNA zuständig, wohingegen in *H. volcanii* aIF2 $\alpha$  nicht essenziell ist. Wie bereits erwähnt existieren keine aIF2B-Untereinheit in *S. solfataricus* (Dev *et al.*, 2009). Hinzu kommt, dass aIF2 in *S. solfataricus* zuerst an die 30S ribosomale Untereinheit bindet, bevor die Met-tRNA<sup>i</sup> rekrutiert wird (La Teana *et al.*, 2013).

#### 4.7 Elongationsfaktoren und aIFs

In *H. volcanii* sind vier Elongationsfaktoren (aEFs) annotiert, die alle vier co-gereinigt werden konnten. Zu erwähnen ist, dass aEF1 $\alpha$ 1 (HVO\_0359) in der Affinitätsaufreinigung der DHFR nachgewiesen werden konnte. Die Affinitätsaufreinigungen der DHFR dienten als Kontrolle. Die in den MS-Daten der DHFR identifizierten Proteine wurden als unspezifische Proteine in den MS-Analysen abgezogen.

In Eukaryonten ist eEF1 $\alpha$  sowohl an der Translationselongation, der Termination, als auch der Qualitätskontrolle der Proteinsynthese beteiligt (Saito *et al.*, 2010). Kobayashi und Kollegen beschrieben 2012 die Struktur des aEF1 $\alpha$  mit dem *archaeal release factor* (aRF1) in



*Aeropyrum pernix*. In Verbindung mit aPelota kann hier die Translation beendet werden. aEF1 $\alpha$  ist eine GTPase und transportiert die tRNA zur kleinen ribosomalen Untereinheit. Er ist letztendlich auch am Translationsstopp beteiligt (Kobayashi *et al.*, 2012).

Unter anderem agieren die Elongationsfaktoren mit dem Sarcin-Ricin Loop der 23 S rRNA, welcher eines der aktiven Zentren des Ribosom bildet (Imai *et al.*, 2015).

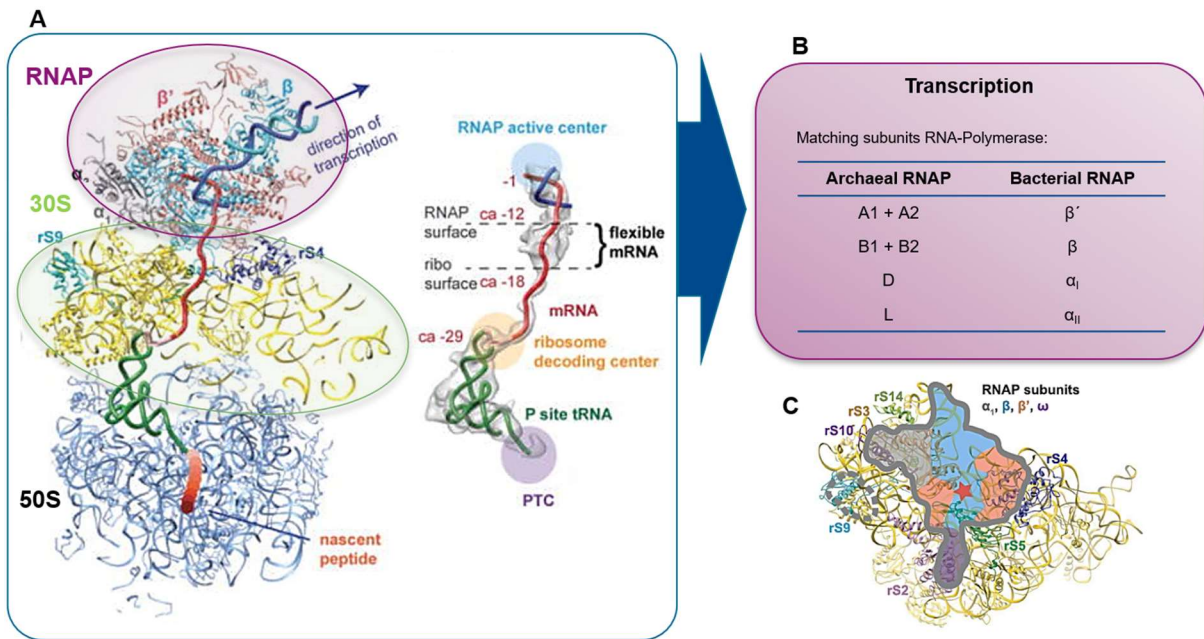
#### **4.8 Kopplung von Transkription und Translation**

In Archaeen und Bakterien gibt es keine physikalische Barriere wie in Eukaryonten, die die Transkription von der Translation abtrennt. Dies ermöglicht den Start der Translation während die DNA noch transkribiert wird (French *et al.*, 2007; McGary and Nudler, 2013). Sowohl in vivo als auch in vitro konnte dies bereits für Bakterien nachgewiesen werden (Proshkin *et al.*, 2010; Castro-Roa and Zenkin, 2012).

Bereits 1964 wurde von Byrne und Kollegen vorausgesagt, dass die Transkription und Translation in Prokaryonten gekoppelt ist (Byrne *et al.*, 1964). Mittels Elektronenmikroskopie konnte 1970 die Nähe von transkribierender RNAP zu Ribosomen in *E. coli* nachgewiesen werden (O. L. Miller, Hamkalo and C. A. Thomas, 1970). Bei der Transkription von DNA zu mRNA, die eine Ribosomen-bindende Sequenz enthält, kann die Translation die Transkriptions-Termination initiieren und verhindern (Adhya and Gottesman, 1978). Die kinetische Kopplung der Transkription und Translation zeigt sich unter anderem bei der Inhibierung der Translation und führt zu einem erhöhten Stocken der RNAP (Landick, Carey and Yanofsky, 1985; Proshkin *et al.*, 2010). So fördert ein an die naszierende mRNA gebundenes Ribosom die Transkription und reguliert die Rate der Genexpression. Es wird angenommen, dass eine Art physikalische Brücke zwischen RNAP und Ribosomen unter anderem von NusG, ribosomalen Proteinen und weiteren Proteinen wie das Paralog RfaH gebildet wird (Burmam *et al.*, 2010, 2012).

In *E. coli* konnte von Kohler und Kollegen 2017 gezeigt werden, dass *E. coli* ein transkribierendes und translatierendes Expressom bilden kann (Abbildung 66).

Mittels Kryoelektronenmikroskopie konnten sie ein Expressom nachweisen, bei dem die RNAP mit dem Ribosom über die mRNA verbunden ist. Zwischen dem aktiven Zentrum der RNAP und dem Ribosom-Dekodierungs-Zentrum zeigte sich ein kontinuierlich geschützter Abschnitt der mRNA von 30 Nukleotiden. Hierbei dockt die RNA-Ausgangsregion der RNAP an die Eingangsseite der ribosomalen RNA-Bindungskanal zwischen S3, S4, und S5 an. Des Weiteren sind die ribosomalen Proteine S2, S9 und S10 involviert (Kohler *et al.*, 2017).



**Abbildung 66: Transkriptions-Translations-Expressom modifiziert nach (Kohler et al., 2017)**

**A.** Kryoelektronische Struktur des Expressoms in *E. coli*. Übergang der RNA vom aktiven Zentrum der RNAP in das Ribosomen-Dekodierungs-Zentrum. **B.** Homologe zu den RNAP-Untereinheiten zwischen Archaeen und Bakterien, die an der Interaktion mit der kleinen ribosomalen Untereinheit beteiligt sind. **C.** Die Interaktionsstelle zwischen RNAP und 30S ribosomaler Untereinheit. Der rote Stern markiert den Eingang zum mRNA-Tunnel.

Teilweise konnten diese ribosomalen Proteine in der vorliegenden Arbeit nach den Affinitätsaufreinigungen in der MS-Analyse der aIFs und den RNAPUs identifiziert werden (Tabelle 89). Die Zusammenfassung der MS-Daten der 14 aIFs und sieben RNAPUs sind in Tabelle 90-101 im Anhang aufgelistet.

**Tabelle 89: Identifikation von rpS2, rpS3, rpS5, rpS10 in den MS-Daten von aIFs und RNAPUs**

aIFs -> Bait			aIF1	aIF2 $\alpha$	aIF2 $\beta$ -2	aIF2B5-1	eIF4A-hom	aIF5A	aIF5B	aIF2 $\alpha$ -stat
Genloci	Accession	Description								
HVO_2773	L9V5L7	30S rpS2				+				
HVO_2558	D4GTZ0	30S rpS3	+			+	+			+
HVO_1145	D4GWA5	30S rpS3Ae			+	+				+
HVO_2552	L9V7Y2	30S rpS4e	+			+	+	+		
HVO_2544	D4GTX6	30S rpS5		+			+			+
HVO_0360	L9ULL7	30S rpS10	+						+	

RNAPUs -> Bait			rpoA1	rpoA2	rpoB1	rpoB2	(rpoD)	rpoL	rpoH
Genloci	Accession	Description							
HVO_2558	D4GTZ0	30S rpS3							+
HVO_2552	L9V7Y2	30S rpS4e	+	+	+	+			+
HVO_2544	D4GTX6	30S rpS5			+				
HVO_0360	L9ULL7	30S rpS10	+		+				+

Ribosomale Proteine spielen nicht nur eine entscheidende Rolle bei der Translation, sondern interagieren auch mit der RNAP und/ oder sind in der Nähe des Transkriptionsstarts lokalisiert. Sie sind dabei Teil des Ribosoms oder können auch als Monomer vorliegen. Dieser Umstand wurde bereits in der Vergangenheit schon mehrfach beschrieben (Warner and McIntosh, 2009; Bhavsar, Makley and Tsonis, 2010; De and Brogna, 2010; Rippa *et al.*, 2010).

Unter anderem beschrieben Fan und Kollegen 2017 in *E. coli* durch chemisches *Crosslinking* und LC-MS/MS eine Kopplung der RNAP mit dem Ribosom, der 30S und 50S ribosomalen Untereinheit (Fan *et al.*, 2017). Hierbei konnten zum Beispiel für RNAP-70S die Proteine  $\beta$ ,  $\beta'$ , S6, S9 und L7/L12 identifiziert werden. Bei RNAP-30S waren es  $\beta'$  S1, S2, S6, S9, S11 und S7. Mit RNAP-50S konnten die Proteine  $\beta$ ,  $\beta'$ , L1, L9, L7/L12 und L19 identifiziert werden. Beim Abgleich der in der MS identifizierten Proteine zu den in dieser Arbeit mit RNAPUs co-gereinigten Proteinen konnte nur L1 bestätigt werden. Dennoch konnten mit den sieben RNAPUs acht 30S ribosomale Proteine und 13 50S ribosomalen Proteine co-gereinigt werden.

Wichtig in diesem Zusammenhang ist, dass ribosomale Proteine auch als Transkriptionsregulatoren fungieren können. So zum Beispiel das 50S ribosomale Protein L2. Wie bereits im vorherigen Kapitel beschrieben fördert dieses Protein die Transkription von Genen mit ribosomalem Promotor (Rippa *et al.*, 2010).

Beim Modell von Kohler und Kollegen ist zu bedenken, dass es eventuell nur einen Komplex zwischen RNAP und dem Ribosom mit einer kurzen naszierenden RNA widerspiegelt. Mögliche Gründe sind, dass ein *Crosslinking* mittels Glutaraldehyd verwendet wurde, um die physikalischen Interaktionen zwischen der RNAP und dem Ribosomen zu stabilisieren (Kohler *et al.*, 2017). Ferner wurde durch die Translation der gesamten entstehenden RNA eines vorgeformten, stabilen RNAP-Komplexes ein Expressom-Komplex hergestellt (Conn *et al.*, 2019).

Eine weitere Untersuchung mittels Cryo-EM erfolgte von Demo und Kollegen ebenfalls 2017 anhand der RNAP und der 30S ribosomalen Untereinheit in *E. coli* (Demo *et al.*, 2017). Hier wurde unter anderem beschrieben, dass die RNAP in *E. coli* mittels rpS1 eine Wand zwischen der RNAP und der kleinen ribosomalen Untereinheit bildet. Im Vergleich zu *H. volcanii* gibt es in diesem Archaeon jedoch kein Homolog zum ribosomalen Protein S1 aus *E. coli*.

Im Vergleich unterscheiden sich die beiden Cryo-EM-Aufnahmen von Kohler und Demo, da sie für die RNAP unterschiedliche Positionen aufweisen. Conn und Kollegen (2019) stellten die Theorie auf, dass beide Modelle einzelne Schritte eines Zyklus darstellen, bei dem die RNAP und das Ribosomen ihre Positionen ändern (Conn *et al.*, 2019).

Für polycistronische Operons wurde in Bakterien bereits mehrfach die Interaktion zwischen RNA Polymerasen und dem Ribosom beschrieben. Jedoch handelt es sich hierbei um die Attenuation, bei der die Transkription vorzeitig abgebrochen wird (Yanofsky and Ito, 1966; Landick, Carey and Yanofsky, 1985; Yanofsky, 2000).

Bisher ist über die Transkriptions- und Translationskopplung in Archaeen nur wenig bekannt. Bereits 2007 konnte von French und Kollegen in *T. kodakarensis* mittels

Elektronenmikroskopie Polysomen nachgewiesen werden. Sie waren direkt an die genomische DNA gebunden (French *et al.*, 2007). Damit konnte in *T. kodakarensis* nachgewiesen werden, dass die Translation am Transkript bereits startet, bevor die Transkription abgeschlossen ist und eine Kopplung besteht.

Conn und Kollegen beschrieben 2019 beim Vergleich der aktuellen Modelle für das Transkriptions-Translationsexpressom, dass ein dynamisches System bestehen könnte. Dies wird durch die Möglichkeit des wiederholten bilden und brechen der Interaktionen zwischen RNAP und Ribosomen vermutet und durch die geringe Affinität von RNAP zum Ribosomen begründet (Demo *et al.*, 2017; Fan *et al.*, 2017; Kohler *et al.*, 2017; Conn *et al.*, 2019).

Von Burmann und Kollegen wurde beschrieben, dass die Kopplung der Transkription und Translation auch faktorabhängig über das Protein NusG bzw. das Paralog, RfaH begünstigt wird (Burmann *et al.*, 2010, 2012). NusG ist in Bakterien sowohl in die Transkription als auch in die Translation involviert.

Er interagiert unter anderem N-terminal mit der RNAP und C-terminal mit rpS10/NusE oder dem Faktor Roh, der an der Termination der Transkription beteiligt ist (Kyrpides, Woese and Ouzounis, 1996; Mooney *et al.*, 2009; Burmann *et al.*, 2010). NusG/Spt5 ist der einzige Transkriptionsfaktor, der in allen drei Domänen des Lebens vertreten ist (Werner, 2012). Sowohl Spt5 in Archaeen als auch NusG in Bakterien besitzen eine NusG N-terminale Domäne (NGN) sowie eine KOW-Domäne am C-terminalen Ende (Knowlton *et al.*, 2003; Mooney *et al.*, 2009). Bisher ist nicht belegt, dass dieser Faktor auch an einer Transkriptions-Translationskopplung in Archaeen beteiligt ist.

Bemerkenswert ist, dass in den beiden Strukturen, von Kohler und Kollegen (2017) sowie von Demo und Kollegen (2017), die jeweilige NusG-Bindestelle auf dem Ribosom und der RNAP räumlich zu weit voneinander entfernt lagen. Da davon ausgegangen wird, dass es sich um eine hochdynamische Struktur handelt, wird hier von weiteren Strukturen bzw. Konformationen ausgegangen, die bisher nicht aufgeklärt wurden (Conn *et al.*, 2019).

In dieser Arbeit konnte Spt5/NusG (HVO\_0719) von *H. volcanii* bei den MS-Auswertungen identifiziert werden. Dies war in der FPLC für aIF2 $\alpha$  und aIF2 $\beta$ -2 und in den Affinitätsaufreinigungen für aIF2 $\alpha$ -stat und rpoD der Fall. Spt5 konnte jeweils nur in 1-2 Messungen identifiziert werden und lag bei einem PSM von 1-2 sowie einem Unique Peptide Wert von 1-2. Deshalb wurde er aus den MS-Ergebnissen herausgenommen. Als nächster Schritt könnte eine Überexpression, Affinitätsaufreinigung und MS-Analyse von Spt5 in *H. volcanii* einen Aufschluss über die Interaktionspartner von Spt5 geben. Da dieses Protein in anderen Organismen sowohl an der Transkription als auch der Translation beteiligt ist. Das ribosomale Protein rpS10, das in *E. coli* NusG als Bindungspartner zwischen dem Ribosom und der RNAP dient, konnte in dieser Arbeit sowohl bei zwei Initiationsfaktoren als auch bei drei RNAPUs mitgereinigt werden.

In der vorliegenden Arbeit konnten bei aIFs und RNAPUs Transkriptionsregulatoren mitgereinigt werden. Bei den aIFs waren es 37 und bei den RNAPUs 22 Proteine. Dazu zählen unter anderem *HTH domain proteins*, *IcIR family transcription regulators*, *Lrp/AsnC family transcription regulators*, *PadR family transcription regulators*, *SirR/DtxR family transcription regulators* und TrmB (Tabelle 91,96).

In *H. volcanii* sind 13 TrmB (transcriptional regulator of mal operon) family transcription regulators annotiert. Im Allgemeinen gehört TrmB zur Familie der Transkriptionsregulatoren, die sowohl als Aktivator als auch als Repressor agieren (Perez-Rueda and Janga, 2010; Gindner, Hausner and Thomm, 2014). Aus der Familie der TrmB konnten in *H. volcanii* zwei TrmBs co-gereinigt werden. TrmB HVO\_1360 konnte mit rpoH, mit aIF1 und in aIF2 $\alpha$ -stat nachgewiesen werden. Des Weiteren konnte mit aIF2B $\delta$ -1 der TrmB HVO\_2688 mitgereinigt werden.

In Archaeen sind TrmB hauptsächlich in Euryarchaeota vertreten. Bei Crenarchaeota kommen sie nur selten vor. In Bakterien sind sie nicht vertreten (Gindner, Hausner and Thomm, 2014). Die bisher in Archaeen untersuchten TrmBs können über ein Helix-Turn-Helix-Motiv (HTH-Motif) an die DNA binden und weisen eine Effektor-Bindedomäne auf (Maruyama *et al.*, 2011; Gindner, Hausner and Thomm, 2014). Die Effektor-Bindedomäne hat unterschiedliche Funktionen wie z.B. Enzymaktivität, Ligandenbindung und Protein-Protein-Wechselwirkungen (Perez-Rueda *et al.*, 2018). TrmBs sind an unterschiedlichen Genregulationen beteiligt, unter anderem den Zucker-Metabolismus betreffend. Interessant ist, dass sie auch an der Regulation von spezifischen Transkriptionsfaktoren beteiligt sind. Für ihre Funktion erkennen TrmB unterschiedliche DNA-Bindemotive, die *upstream* (Aktivierung Promotor) oder *downstream* (Repression Promotor) der TATA-Box liegen (Gindner, Hausner and Thomm, 2014).

Festzuhalten ist, dass die Transkription und die Translation jeweils einen eigenen Prozess darstellen, der dynamisch ist. Sie können sich gegenseitig beeinflussen und sind mit weiteren wichtigen zellulären Prozessen gekoppelt. Für die Transkription ist dies in Bakterien und Archaeen unter anderem die DNA-Reparatur (Spivak, 2016; Stantial *et al.*, 2016). Für die Translation betrifft es unter anderem die Translocation und die Proteinfaltung (Fulle and Gohlke, 2009; Elvekrog and Walter, 2015; Thommen, Holtkamp and Rodnina, 2017). Außerdem wurden die Untersuchungen mittels eines Ansatzes der Überexpression durchgeführt, was ebenfalls eine Auswirkung auf die Genregulation haben kann.

Generell scheint eine Kopplung der Transkription und Translation in *H. volcanii* möglich. Die in dieser Arbeit erbrachten Ergebnisse weisen darauf hin. Ob es einen Translations-Transkriptionsexpressom in *H. volcanii* gibt, sollte in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

#### 4.9 Kopplung von Translation und Replikation

Bei der Untersuchung der Translationsinitiationsfaktoren konnten zusätzlich zu den Proteinen der Translation auch Proteine für die Replikation und DNA-Reparatur mitgereinigt werden. Berthon und Kollegen beschrieben 2008 für Archaeen und Eukaryonten die räumliche Nähe zweier Operons, die auf eine Kopplung der Translation und Replikation hindeuteten. Eines der Operons codiert für Proteine der Ribosomenbiogenese und der Translation (rpS27e, rpL42e/rpL44e, aIF2 $\alpha$ , Nop10). Das andere Operon codiert für Gene, die an der DNA-Replikation beteiligt sind (PcnA, PriS, Gins15). In *H. volcanii* sind priL (HVO\_0173), pcnA (HVO\_0175), priS (HVO\_2697) und ginS (HVO\_2698) co-lokalisiert. Dies konnte auch für andere archaeale Genome nachgewiesen werden (Berthon, Fujikane and Forterre, 2009). In *H. volcanii* verhält sich die Anordnung jedoch anders. Beide Cluster sind vom Operon, das aIF2 $\alpha$  enthält, weiter entfernt. Diese Gene sind mit keinem weiteren annotierten Translationsinitiationsfaktor co-lokalisiert. In dieser Arbeit konnte dennoch in *H. volcanii*, mit aIF2B $\delta$ -1 das pcnA (HVO\_0175) mitgereinigt werden (siehe Anhang, Tabelle 93).

Die meisten Proteine der Replikation konnten mit aIF1 und aIF2B $\delta$ -1 mitgereinigt werden. Inwieweit die Co-Reinigung von Replikationsfaktoren mit dem Überschneiden bzw. der Kopplung von Translation und Replikation zusammenhängen, konnte nicht geklärt werden.

Wichtig ist, dass die Überexpression und damit die Hochregulation von einzelnen aIFs sich auf die Expression anderer Gene auswirken kann. Hinzu kommt, dass auch bei der Co-Affinitätsaufreinigung der RNAPUs Proteine der Replikation mitgereinigt werden konnten (siehe Anhang, Tabelle 99).

#### 4.10 Fazit und Ausblick

Das in dieser Arbeit angewandte Verfahren zur Charakterisierung der Translationsinitiationsfaktoren in *H. volcanii* vertieft das bisherige Verständnis der Translation in Archaeen und zeigt Tendenzen für mögliche Interaktionsfelder auf. Für die Initiationsfaktoren konnte anhand der MS-Analyse gezeigt werden, in welche Richtung die Funktion der einzelnen Initiationsfaktoren einzuordnen ist. Potentielle Interaktionspartner konnten beschrieben werden. Sie müssen aber weiter untersucht werden.

13 der insgesamt 14 untersuchten Initiationsfaktoren konnten andere Initiationsfaktoren co-reinigen. Sechs Initiationsfaktoren konnten in der Affinitätsaufreinigung mit anschließender MS-Analyse bei keinem weiteren Initiationsfaktor mitgereinigt werden. Einer dieser Faktoren war aIF2 $\beta$ -1. Dieser konnte in den Affinitätsaufreinigungen mit nachfolgender FPLC von aIF2 $\beta$ -2 identifiziert werden. Der Faktor aIF1 konnte in der stationären Phase von aIF2 $\alpha$  mitgereinigt werden.

Die am häufigsten co-gereinigten Proteine waren überraschenderweise aIF2B $\delta$ -1, der bereits als Translationsinitiationsfaktor ausgeschlossen wurde, sowie der universelle und in *H. volcanii* essenzielle aIF5B. Mit aIF2B $\delta$ -1 selbst konnten fünf aIFs co-gereinigt werden.

Mit den aIFs war es auch möglich, Proteine co-zureinigen, die für die Transkription wesentlich sind. Darunter auch RNAPUs. Diese wurden ebenfalls überexprimiert und in der MS analysiert.

Auch bei der Überexpression der mit aIFs co-gereinigten RNAPUs konnte aIF2B $\delta$ -1 und aIF5B am häufigsten co-gereinigt werden.

Auf Basis der Affinitätsaufreinigung und MS-Daten besteht die Möglichkeit einer stärkeren Regulation zwischen Transkription und Translation in *H. volcanii*. Hierbei konnten mit den Initiationsfaktoren die RNAPUs co-gereinigt und bei der Überexpression von RNAPUs die aIFs mitgereinigt werden.

Um die Funktionen der Initiationsfaktoren in *H. volcanii* detaillierter aufklären zu können, sind weitere Untersuchungen erforderlich.

## 5 Literatur

- Adam, P. S. *et al.* (2017) 'The growing tree of Archaea: New perspectives on their diversity, evolution and ecology', *ISME Journal*. Nature Publishing Group, pp. 2407–2425. doi: 10.1038/ismej.2017.122.
- Adhya, S. and Gottesman, M. (1978) 'Control of Transcription Termination', *Annual Review of Biochemistry*, 47(1), pp. 967–996. doi: 10.1146/annurev.bi.47.070178.004535.
- Akulich, K. A. *et al.* (2016) 'Four translation initiation pathways employed by the leaderless mRNA in eukaryotes', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 6(June), pp. 1–9. doi: 10.1038/srep37905.
- Algire, M. A., Maag, D. and Lorsch, J. R. (2005) 'Pi Release from eIF2, Not GTP Hydrolysis, Is the Step Controlled by Start-Site Selection during Eukaryotic Translation Initiation', *Molecular Cell*, 20(2), pp. 251–262. doi: 10.1016/j.molcel.2005.09.008.
- Allen, G. S. and Frank, J. (2007) 'Structural insights on the translation initiation complex: ghosts of a universal initiation complex', *Molecular Microbiology*, 63(4), pp. 941–950. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05574.x.
- Allers, T. *et al.* (2010) 'Improved strains and plasmid vectors for conditional overexpression of His-tagged proteins in *Haloferax volcanii*', *Applied and Environmental Microbiology*, 76(6), pp. 1759–1769. doi: 10.1128/AEM.02670-09.
- Allers, T. (2010) 'Overexpression and purification of halophilic proteins in *Haloferax volcanii*.', *Bioengineered bugs*, 1(4), pp. 288–290. doi: 10.4161/bbug.1.4.11794.
- Allers, T. and Ngo, H.-P. (2003) 'Genetic analysis of homologous recombination in Archaea: *Haloferax volcanii* as a model organism', *Biochemical Society Transactions*, 31(3), pp. 706–710. doi: 10.1042/bst0310706.
- Altman-Price, N. and Mevarech, M. (2009) 'Genetic evidence for the importance of protein acetylation and protein deacetylation in the halophilic archaeon *Haloferax volcanii*', *Journal of Bacteriology*, 191(5), pp. 1610–1617. doi: 10.1128/JB.01252-08.
- Anantharaman, V., Koonin, E. V and Aravind, L. (2001) 'TRAM, a predicted RNA-binding domain, common to tRNA uracil methylation and adenine thiolation enzymes', *FEMS Microbiology Letters*, 197(2), pp. 215–221. doi: 10.1016/S0378-1097(01)00112-4.
- Andreev, D. E. *et al.* (2006) 'A Leaderless mRNA Can Bind to Mammalian 80S Ribosomes and Direct Polypeptide Synthesis in the Absence of Translation Initiation Factors', *Molecular and Cellular Biology*, 26(8), pp. 3164–3169. doi: 10.1128/mcb.26.8.3164-3169.2006.
- Andreou, A. Z. and Klostermeier, D. (2014) 'eIF4B and eIF4G Jointly Stimulate eIF4A ATPase and Unwinding Activities by Modulation of the eIF4A Conformational Cycle', *Journal of Molecular Biology*. Elsevier Ltd, 426(1), pp. 51–61. doi: 10.1016/j.jmb.2013.09.027.
- Antoun, A. *et al.* (2003) 'The roles of initiation factor 2 and guanosine triphosphate in initiation of protein synthesis', *EMBO Journal*, 22(20), pp. 5593–5601. doi: 10.1093/emboj/cdg525.
- Aoki, H. *et al.* (1997) 'The gene encoding the elongation factor P protein is essential for viability and is required for protein synthesis', *Journal of Biological Chemistry*, 272(51), pp. 32254–32259. doi: 10.1074/jbc.272.51.32254.
- Arkipova, V. *et al.* (2015) 'Binding of the 5'-Triphosphate End of mRNA to the  $\gamma$ -Subunit of Translation Initiation Factor 2 of the Crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus*', *Journal of Molecular Biology*. Elsevier B.V., 427(19), pp. 3086–3095. doi: 10.1016/j.jmb.2015.07.020.
- Armache, J. P. *et al.* (2013) 'Promiscuous behaviour of archaeal ribosomal proteins: Implications for eukaryotic ribosome evolution', *Nucleic Acids Research*, 41(2), pp. 1284–1293. doi: 10.1093/nar/gks1259.
- Asano, K. *et al.* (1999) 'Conserved bipartite motifs in yeast eIF5 and eIF2Bepsilon, GTPase-activating and GDP-GTP exchange factors in translation initiation, mediate binding to their common substrate eIF2', *The EMBO Journal*, 18(6), pp. 1673–1688. doi: 10.1093/emboj/18.6.1673.
- Asano, K. *et al.* (2000) 'A multifactor complex of eukaryotic initiation factors, eIF1, eIF2, eIF3, eIF5, and initiator tRNA<sup>Met</sup> is an important translation initiation intermediate in vivo', *Genes & Development*, 14(19), pp. 2534–2546. doi: 10.1101/gad.831800.
- Babski, J. *et al.* (2016) 'Genome-wide identification of transcriptional start sites in the haloarchaeon *Haloferax volcanii* based on differential RNA-Seq (dRNA-Seq)', *BMC Genomics*. BMC Genomics, 17(1), p. 629. doi: 10.1186/s12864-016-2920-y.
- Barry, E. R. and Bell, S. D. (2006) 'DNA Replication in the Archaea', *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(4), pp. 876–887. doi: 10.1128/mnbr.00029-06.
- Bartig, D., Schümann, H. and Klink, F. (1990) 'The Unique Posttranslational Modification Leading to Deoxyhypusine or Hypusine is a General Feature of the Archaeobacterial Kingdom', *Systematic and Applied Microbiology*, 13(2), pp. 112–116. doi: 10.1016/S0723-2020(11)80156-6.
- Bassani, F. *et al.* (2018) 'Modification of translation factor aIF5A from *Sulfolobus solfataricus*', *Extremophiles*. Springer Japan, 22(5), pp. 769–780. doi: 10.1007/s00792-018-1037-4.
- Bassani, F. *et al.* (2019) 'Indications for a moonlighting function of translation factor aIF5A in the crenarchaeum *Sulfolobus solfataricus*', *RNA Biology*. Taylor & Francis, 16(5), pp. 675–685. doi: 10.1080/15476286.2019.1582953.



- Basu, U. *et al.* (2001) 'The *Saccharomyces cerevisiae* TIF6 Gene Encoding Translation Initiation Factor 6 Is Required for 60S Ribosomal Subunit Biogenesis', *Molecular and Cellular Biology*, 21(5), pp. 1453–1462. doi: 10.1128/MCB.21.5.1453-1462.2001.
- Battiste, J. L. *et al.* (2000) 'The eIF1A Solution Structure Reveals a Large RNA-Binding Surface Important for Scanning Function', *Molecular Cell*, 5(1), pp. 109–119. doi: 10.1016/S1097-2765(00)80407-4.
- Bayley, S. T., Morton, R. A. and Lanyi, J. K. (1978) 'Recent Developments in the Molecular Biology of Extremely Halophilic Bacteria', *CRC Critical Reviews in Microbiology*, 6(2), pp. 151–206. doi: 10.3109/10408417809090622.
- Bell, S. D. (2005) 'Archaeal transcriptional regulation – variation on a bacterial theme?', *Trends in Microbiology*, 13(6), pp. 262–265. doi: 10.1016/j.tim.2005.03.015.
- Bell, S. D. and Jackson, S. P. (2001) 'Mechanism and regulation of transcription in archaea', *Microbiology*, 4(2), pp. 208–213. Available at: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11282478](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11282478).
- Ben-Shem, A. *et al.* (2010) 'Crystal Structure of the Eukaryotic Ribosome', *Science*, 330(6008), pp. 1203–1209. doi: 10.1126/science.1194294.
- Benelli, D. *et al.* (2009) 'Function and ribosomal localization of aIF6, a translational regulator shared by Archaea and Eukarya', *Nucleic Acids Research*, 37(1), pp. 256–267. doi: 10.1093/nar/gkn959.
- Benelli, D. and Londei, P. (2009) 'Begin at the beginning: evolution of translational initiation', *Research in Microbiology*. Elsevier Masson SAS, 160(7), pp. 493–501. doi: 10.1016/j.resmic.2009.06.003.
- Benelli, D. and Londei, P. (2011) 'Translation initiation in Archaea: conserved and domain-specific features.', *Biochemical Society transactions*, 39(1), pp. 89–93. doi: 10.1042/BST0390089.
- Benelli, D., Maone, E. and Londei, P. (2003) 'Two different mechanisms for ribosome/mRNA interaction in archaeal translation initiation', *Molecular Microbiology*, 50(2), pp. 635–643. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03721.x.
- Berthon, J., Cortez, D. and Forterre, P. (2008) 'Genomic context analysis in Archaea suggests previously unrecognized links between DNA replication and translation', *Genome Biology*, 9(4), pp. 1–16. doi: 10.1186/gb-2008-9-4-r71.
- Berthon, J., Fujikane, R. and Forterre, P. (2009) 'When DNA replication and protein synthesis come together', *Trends in Biochemical Sciences*, 34(9), pp. 429–434. doi: 10.1016/j.tibs.2009.05.004.
- Bessman, M. J., Frick, D. N. and O'Handley, S. F. (1996) 'The MutT Proteins or "Nudix" Hydrolases, a Family of Versatile, Widely Distributed, "Housecleaning" Enzymes', *Journal of Biological Chemistry*, 271(41), pp. 25059–25062. doi: 10.1074/jbc.271.41.25059.
- Bhavsar, R. B., Makley, L. N. and Tsonis, P. A. (2010) 'The other lives of ribosomal proteins', *Human Genomics*, 4(5), p. 327. doi: 10.1186/1479-7364-4-5-327.
- Blecher, O., Goldman, S. and Mevarech, M. (1993) 'High expression in *Escherichia coli* of the gene coding for dihydrofolate reductase of the extremely halophilic archaeobacterium *Haloferax volcanii* Reconstitution of the active enzyme and mutation studies', *European Journal of Biochemistry*, 216(1), pp. 199–203. doi: 10.1111/j.1432-1033.1993.tb18133.x.
- Blum H., Beier H., G. H. J. (1987) 'Improved silver staining of plant protein, RNA & DNA in PAA gels', *Electrophoresis*, 8(2), pp. 93–99.
- Bogorad, A. M. *et al.* (2014) 'Insights into the architecture of the eIF2Ba/β/δ regulatory subcomplex', *Biochemistry*. doi: 10.1021/bi500346u.
- Bogorad, A. M., Lin, K. Y. and Marintchev, A. (2017) 'Novel mechanisms of eIF2B action and regulation by eIF2 phosphorylation', *Nucleic Acids Research*. Oxford University Press, 45(20), pp. 11962–11979. doi: 10.1093/nar/gkx845.
- Brenneis, M. *et al.* (2007) 'Experimental Characterization of Cis-Acting Elements Important for Translation and Transcription in Halophilic Archaea', *PLoS Genetics*, 3(12), p. e229. doi: 10.1371/journal.pgen.0030229.
- Brina, D. *et al.* (2015) 'eIF6 anti-association activity is required for ribosome biogenesis, translational control and tumor progression', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*. Elsevier B.V., 1849(7), pp. 830–835. doi: 10.1016/j.bbagrm.2014.09.010.
- Brininger, C. *et al.* (2018) 'The more adaptive to change, the more likely you are to survive: Protein adaptation in extremophiles', *Seminars in Cell & Developmental Biology*. Elsevier Ltd, 84, pp. 158–169. doi: 10.1016/j.semcd.2017.12.016.
- Brown, E. D. (2005) 'Conserved P-loop GTPases of unknown function in bacteria: an emerging and vital ensemble in bacterial physiology', *Biochemistry and Cell Biology*, 83(6), pp. 738–746. doi: 10.1139/o05-162.
- Bucher, M. H., Evdokimov, A. G. and Waugh, D. S. (2002) 'Differential effects of short affinity tags on the crystallization of *Pyrococcus furiosus* maltodextrin-binding protein', *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. International Union of Crystallography, 58(3), pp. 392–397. doi: 10.1107/S0907444901021187.
- Burmann, B. M. *et al.* (2010) 'A NusE:NusG Complex Links Transcription and Translation', *Science*, 328(5977), pp. 501–504. doi: 10.1126/science.1184953.
- Burmann, B. M. *et al.* (2012) 'An α Helix to β Barrel Domain Switch Transforms the Transcription Factor RfaH into a Translation

Factor', *Cell*, 150(2), pp. 291–303. doi: 10.1016/j.cell.2012.05.042.

Byrne, R. *et al.* (1964) 'THE IN VITRO FORMATION OF A DNA-RIBOSOME COMPLEX', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 52(1), pp. 140–148. doi: 10.1073/pnas.52.1.140.

Caraglia, M. *et al.* (2013) 'eIF5A isoforms and cancer: two brothers for two functions?', *Amino Acids*, 44(1), pp. 103–109. doi: 10.1007/s00726-011-1182-x.

Carson, M. *et al.* (2007) 'His-tag impact on structure', *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 63(3), pp. 295–301. doi: 10.1107/S0907444906052024.

Caserta, E. *et al.* (2006) 'Translation Initiation Factor IF2 Interacts with the 30 S Ribosomal Subunit via Two Separate Binding Sites', *Journal of Molecular Biology*, 362(4), pp. 787–799. doi: 10.1016/j.jmb.2006.07.043.

Casiano, C., Matheson, A. T. and Traut, R. R. (1990) 'Occurrence in the archaeobacterium *Sulfolobus solfataricus* of a ribosomal protein complex corresponding to *Escherichia coli* (L7/L12)4..L10 and eukaryotic (P1)2/(P2)2.P0\*', *The Journal of biological chemistry*, 265(31), pp. 18757–61. Available at: <http://www.jbc.org/content/265/31/18757>.

Castro-Roa, D. and Zenkin, N. (2012) 'In vitro experimental system for analysis of transcription–translation coupling', *Nucleic Acids Research*, 40(6), pp. e45–e45. doi: 10.1093/nar/gkr1262.

Chamieh, H., Ibrahim, H. and Kozah, J. (2016) 'Genome-wide identification of SF1 and SF2 helicases from archaea', *Gene*. Elsevier B.V., 576(1), pp. 214–228. doi: 10.1016/j.gene.2015.10.007.

Cheung, Y.-N. *et al.* (2007) 'Dissociation of eIF1 from the 40S ribosomal subunit is a key step in start codon selection in vivo', *Genes & Development*, 21(10), pp. 1217–1230. doi: 10.1101/gad.1528307.

Cho, S. and Hoffman, D. W. (2002) 'Structure of the beta subunit of translation initiation factor 2 from the Archaeon *Methanococcus jannaschii*: A representative of the eIF2 beta/eIF5 family of proteins', *Biochemistry*, 41(18), pp. 5730–5742. doi: 10.1021/bi011984n.

Choi, S. K. *et al.* (1998) 'Promotion of Met-tRNA(i)(Met) binding to ribosomes by yIF2, a bacterial IF2 homolog in yeast', *Science*, 280(5370), pp. 1757–1760. doi: 10.1126/science.280.5370.1757.

Choi, S. K. *et al.* (2000) 'Physical and Functional Interaction between the Eukaryotic Orthologs of Prokaryotic Translation Initiation Factors IF1 and IF2', *Molecular and Cellular Biology*, 20(19), pp. 7183–7191. doi: 10.1128/MCB.20.19.7183-7191.2000.

Christian, J. H. B. and Waltho, J. A. (1962) 'Solute concentrations within cells of halophilic and non-halophilic bacteria', *Biochimica et Biophysica Acta*, 65(3), pp. 506–508. doi: 10.1016/0006-3002(62)90453-5.

Conn, A. B. *et al.* (2019) 'Two Old Dogs, One New Trick: A Review of RNA Polymerase and Ribosome Interactions during Transcription-Translation Coupling', *International Journal of Molecular Sciences*, 20(10), p. 2595. doi: 10.3390/ijms20102595.

Connaris, H. *et al.* (1999) 'Expression, reactivation, and purification of enzymes from *Haloferax volcanii* in *Escherichia coli*', *Biotechnology and Bioengineering*, 64(1), pp. 38–45. doi: 10.1002/(SICI)1097-0290(19990705)64:1<38::AID-BIT4>3.0.CO;2-7.

Coueux, P.-D. *et al.* (2016) 'Cryo-EM study of start codon selection during archaeal translation initiation', *Nature Communications*, 7(1), p. 13366. doi: 10.1038/ncomms13366.

Dallas, A. and Noller, H. F. (2001) 'Interaction of translation initiation factor 3 with the 30S ribosomal subunit', *Molecular Cell*, 8(4), pp. 855–864. doi: 10.1016/S1097-2765(01)00356-2.

Danson, M. J. and Hough, D. W. (1997) 'The structural basis of protein halophilicity', *Comparative Biochemistry and Physiology - A Physiology*, 117(3), pp. 307–312. doi: 10.1016/S0300-9629(96)00268-X.

De, S. and Brogna, S. (2010) 'Are ribosomal proteins present at transcription sites on or off ribosomal subunits?', *Biochemical Society Transactions*, 38(6), pp. 1543–1547. doi: 10.1042/BST0381543.

Demo, G. *et al.* (2017) 'Structure of RNA polymerase bound to ribosomal 30S subunit.', *eLife*, 6(October), pp. 1–17. doi: 10.7554/eLife.28560.

Denis, A. *et al.* (2018) 'Dissecting the Repertoire of DNA-Binding Transcription Factors of the Archaeon *Pyrococcus furiosus* DSM 3638', *Life*, 8(4), p. 40. doi: 10.3390/life8040040.

Dev, K. *et al.* (2009) 'Archaeal aIF2B Interacts with Eukaryotic Translation Initiation Factors eIF2 $\alpha$  and eIF2B $\alpha$ : Implications for aIF2B Function and eIF2B Regulation', *Journal of Molecular Biology*. Elsevier B.V., 392(3), pp. 701–722. doi: 10.1016/j.jmb.2009.07.030.

Dever, T. E. *et al.* (1992) 'Phosphorylation of initiation factor 2a by protein kinase GCN2 mediates gen-specific translational control of GCN4 in yeast', *Cell*, 68, pp. 585–596.

Dever, T. E., Gutierrez, E. and Shin, B.-S. (2014) 'The hypusine-containing translation factor eIF5A', *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 49(5), pp. 413–425. doi: 10.3109/10409238.2014.939608.

Dever, T. E. and Hinnebusch, A. G. (2005) 'GCN2 whets the appetite for amino acids', *Molecular Cell*, 18(2), pp. 141–142. doi: 10.1016/j.molcel.2005.03.023.

- Dever, T. E., Kinzy, T. G. and Pavitt, G. D. (2016) 'Mechanism and regulation of protein synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*', *Genetics*, 203(1), pp. 65–107. doi: 10.1534/genetics.115.186221.
- Dias, C. A. O. *et al.* (2012) 'eIF5A interacts functionally with eEF2', *Amino Acids*, 42(2–3), pp. 697–702. doi: 10.1007/s00726-011-0985-0.
- Diedrich, G. *et al.* (2000) 'Ribosomal protein L2 is involved in the association of the ribosomal subunits, tRNA binding to A and P sites and peptidyl transfer', *EMBO Journal*, 19(19), pp. 5241–5250. doi: 10.1093/emboj/19.19.5241.
- Dmitriev, S. E. *et al.* (2010) 'GTP-independent tRNA delivery to the ribosomal P-site by a novel eukaryotic translation factor', *Journal of Biological Chemistry*, 285(35), pp. 26779–26787. doi: 10.1074/jbc.M110.119693.
- Dmitriev, S. E. *et al.* (2011) 'Archaeal translation initiation factor aIF2 can substitute for eukaryotic eIF2 in ribosomal scanning during mammalian 48s complex formation', *Journal of Molecular Biology*. Elsevier Ltd, 413(1), pp. 106–114. doi: 10.1016/j.jmb.2011.08.026.
- Doerfel, L. K. *et al.* (2013) 'EF-P Is Essential for Rapid Synthesis of Proteins Containing Consecutive Proline Residues', *Science*, 339(6115), pp. 85–88. doi: 10.1126/science.1229017.
- Donnelly, N. *et al.* (2013) 'The eIF2 $\alpha$  kinases: their structures and functions', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70(19), pp. 3493–3511. doi: 10.1007/s00018-012-1252-6.
- Drozdetskiy, A. *et al.* (2015) 'JPred4: a protein secondary structure prediction server', *Nucleic Acids Research*, 43(W1), pp. W389–W394. doi: 10.1093/nar/gkv332.
- Dubiez, E. *et al.* (2015) 'Identification of a second GTP-bound magnesium ion in archaeal initiation factor 2', *Nucleic Acids Research*, 43(5), pp. 2946–2957. doi: 10.1093/nar/gkv053.
- Duncker, B. P., Chesnokov, I. N. and McConkey, B. J. (2009) 'The origin recognition complex protein family', *Genome Biology*, 10(3), p. 214. doi: 10.1186/gb-2009-10-3-214.
- Dunham, W. H., Mullin, M. and Gingras, A. C. (2012) 'Affinity-purification coupled to mass spectrometry: Basic principles and strategies', *Proteomics*, 12(10), pp. 1576–1590. doi: 10.1002/pmic.201100523.
- Elvekrog, M. M. and Walter, P. (2015) 'Dynamics of co-translational protein targeting', *Current Opinion in Chemical Biology*, 29, pp. 79–86. doi: 10.1016/j.cbpa.2015.09.016.
- Eme, L. *et al.* (2017) 'Archaea and the origin of eukaryotes', *Nature Reviews Microbiology*, 15(12), pp. 711–723. doi: 10.1038/nrmicro.2017.133.
- Eme, L. and Doolittle, W. F. (2015) 'Archaea', *Current Biology*, 25(19), pp. R851–R855. doi: 10.1016/j.cub.2015.05.025.
- Fabbretti, A. *et al.* (2012) 'Translation initiation without IF2-dependent GTP hydrolysis', *Nucleic Acids Research*, 40(16), pp. 7946–7955. doi: 10.1093/nar/gks569.
- Fabian, J. R. *et al.* (1997) 'Subunit Assembly and Guanine Nucleotide Exchange Activity of Eukaryotic Initiation Factor-2B Expressed in Sf9 Cells', *Journal of Biological Chemistry*, 272(19), pp. 12359–12365. doi: 10.1074/jbc.272.19.12359.
- Fan, H. *et al.* (2017) 'Transcription–translation coupling: direct interactions of RNA polymerase with ribosomes and ribosomal subunits', *Nucleic Acids Research*, 45(19), pp. 11043–11055. doi: 10.1093/nar/gkx719.
- Fekete, C. A. *et al.* (2005) 'The eIF1A C-terminal domain promotes initiation complex assembly, scanning and AUG selection in vivo', *EMBO Journal*, 24(20), pp. 3588–3601. doi: 10.1038/sj.emboj.7600821.
- Fekete, C. A. *et al.* (2007) 'N- and C-terminal residues of eIF1A have opposing effects on the fidelity of start codon selection', *EMBO Journal*, 26(6), pp. 1602–1614. doi: 10.1038/sj.emboj.7601613.
- Fernández, I. S. *et al.* (2013) 'Molecular Architecture of a Eukaryotic Translational Initiation Complex', *Science*, 342(6160), pp. 1240585–1240585. doi: 10.1126/science.1240585.
- Fitzgerald, K. D. and Semler, B. L. (2009) 'Bridging IRES elements in mRNAs to the eukaryotic translation apparatus', *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, pp. 518–528. doi: 10.1016/j.bbagr.2009.07.004.
- Forterre, P. (2015) 'The universal tree of life: An update', *Frontiers in Microbiology*, 6(JUN), pp. 1–18. doi: 10.3389/fmicb.2015.00717.
- French, S. L. *et al.* (2007) 'Transcription and Translation are Coupled in Archaea', *Molecular Biology and Evolution*, 24(4), pp. 893–895. doi: 10.1093/molbev/msm007.
- Fulle, S. and Gohlke, H. (2009) 'Statics of the Ribosomal Exit Tunnel: Implications for Cotranslational Peptide Folding, Elongation Regulation, and Antibiotics Binding', *Journal of Molecular Biology*. Elsevier Ltd, 387(2), pp. 502–517. doi: 10.1016/j.jmb.2009.01.037.
- Furuichi, Y. and Shatkin, A. J. (2000) 'Viral and cellular mRNA capping: Past and prospects', *Advances in Virus Research*, 55, pp. 135–184. doi: 10.1016/s0065-3527(00)55003-9.
- Gabdulkhakov, A., Nikonov, S. and Garber, M. (2013) 'Revisiting the Haloarcula marismortui 50S ribosomal subunit model',

- Biological Crystallography*, D69(Acta Crystallographica Section D), pp. 997–1004. doi: 10.1107/S0907444913004745.
- Gäbel, K. *et al.* (2013) 'A Comprehensive Analysis of the Importance of Translation Initiation Factors for *Haloferax volcanii* Applying Deletion and Conditional Depletion Mutants', *PLoS ONE*. Edited by T. Preiss, 8(11), p. e77188. doi: 10.1371/journal.pone.0077188.
- Gäbel, K. (2014) *Molekulare Analyse der Translationsinitiation in halophilen Archaea, Dissertation*.
- Gandin, V. *et al.* (2008) 'Eukaryotic initiation factor 6 is rate-limiting in translation, growth and transformation', *Nature*, 455(7213), pp. 684–688. doi: 10.1038/nature07267.
- Gartmann, M. *et al.* (2010) 'Mechanism of eIF6-mediated inhibition of ribosomal subunit joining', *Journal of Biological Chemistry*, 285(20), pp. 14848–14851. doi: 10.1074/jbc.C109.096057.
- Gehring, A. M., Walker, J. E. and Santangelo, T. J. (2016) 'Transcription regulation in archaea', *Journal of Bacteriology*, 198(14), pp. 1906–1917. doi: 10.1128/JB.00255-16.
- Gilbert, W. V. (2010) 'Alternative ways to think about cellular internal ribosome entry', *Journal of Biological Chemistry*, 285(38), pp. 29033–29038. doi: 10.1074/jbc.R110.150532.
- Gindner, A., Hausner, W. and Thomm, M. (2014) 'The TrmB family: a versatile group of transcriptional regulators in Archaea', *Extremophiles*, 18(5), pp. 925–936. doi: 10.1007/s00792-014-0677-2.
- Godefroy-Colburn, T. *et al.* (1975) 'Light-scattering studies showing the effect of initiation factors on the reversible dissociation of *Escherichia coli* ribosomes', *Journal of Molecular Biology*, 94(3), pp. 461–478. doi: 10.1016/0022-2836(75)90215-6.
- Goede, B. *et al.* (2006) 'Protein-protein interactions in the archaeal transcriptional machinery: Binding studies of isolated RNA polymerase subunits and transcription factors', *Journal of Biological Chemistry*, 281(41), pp. 30581–30592. doi: 10.1074/jbc.M605209200.
- Gogoi, P. and Kanaujia, S. P. (2018) 'Archaeal and eukaryal translation initiation factor 1 differ in their RNA interacting loops', *FEBS Letters*, 592(9), pp. 1602–1610. doi: 10.1002/1873-3468.13044.
- Gordiyenko, Y. *et al.* (2014) 'eIF2B is a decameric guanine nucleotide exchange factor with a  $\gamma_2\epsilon_2$  tetrameric core.', *Nature communications*. Nature Publishing Group, 5(May), p. 3902. doi: 10.1038/ncomms4902.
- Gordiyenko, Y., Llácer, J. L. and Ramakrishnan, V. (2019) 'Structural basis for the inhibition of translation through eIF2 $\alpha$  phosphorylation', *Nature Communications*. Springer US, 10(1), pp. 1–11. doi: 10.1038/s41467-019-10606-1.
- Graindorge, J. S. *et al.* (2005) 'Deletion of EFL1 results in heterogeneity of the 60 S GTPase-associated rRNA conformation', *Journal of Molecular Biology*, 352(2), pp. 355–369. doi: 10.1016/j.jmb.2005.07.037.
- Greber, B. J. *et al.* (2012) 'Cryo-EM structure of the archaeal 50S ribosomal subunit in complex with initiation factor 6 and implications for ribosome evolution', *Journal of Molecular Biology*. Elsevier Ltd, 418(3–4), pp. 145–160. doi: 10.1016/j.jmb.2012.01.018.
- Gregio, A. P. B. *et al.* (2009) 'eIF5A has a function in the elongation step of translation in yeast', *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Elsevier Inc., 380(4), pp. 785–790. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.01.148.
- Griesenbeck, J., Tschochner, H. and Grohmann, D. (2017) 'Structure and Function of RNA Polymerases and the Transcription Machineries', in pp. 225–270. doi: 10.1007/978-3-319-46503-6\_9.
- Grigoriadou, C. *et al.* (2007) 'The Translational Fidelity Function of IF3 During Transition from the 30 S Initiation Complex to the 70 S Initiation Complex', *Journal of Molecular Biology*, 373(3), pp. 551–561. doi: 10.1016/j.jmb.2007.07.031.
- Grill, S. *et al.* (2000) 'Selective stimulation of translation of leaderless mRNA by initiation factor 2: Evolutionary implications for translation', *EMBO Journal*, 19(15), pp. 4101–4110. doi: 10.1093/emboj/19.15.4101.
- Grill, S. *et al.* (2001) 'Modulation of ribosomal recruitment to 5'-terminal start codons by translation initiation factors IF2 and IF3', *FEBS Letters*, 495(3), pp. 167–171. doi: 10.1016/S0014-5793(01)02378-X.
- Groft, C. M. *et al.* (2000) 'Crystal structures of ribosome anti- association factor IF6', *Nature Structural Biology*, 7(December), pp. 1156–1164. doi: <https://doi.org/10.1038/82017>.
- Grohmann, D., Hirtreiter, A. and Werner, F. (2009) 'Molecular mechanisms of archaeal RNA polymerase', *Biochemical Society Transactions*, 37(1), pp. 12–17. doi: 10.1042/BST0370012.
- Grohmann, D. and Werner, F. (2010) 'Hold on! RNA polymerase interactions with the nascent RNA modulate transcription elongation and termination', *RNA Biology*, 7(3). doi: 10.4161/rna.7.3.11912.
- Grünberg, S. *et al.* (2007) 'Transcription factor E is a part of transcription elongation complexes', *Journal of Biological Chemistry*, 282(49), pp. 35482–35490. doi: 10.1074/jbc.M707371200.
- Gualerzi, C. O. *et al.* (2001) 'Initiation factors in the early events of mRNA translation in bacteria', in *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, pp. 363–376. doi: 10.1101/sqb.2001.66.363.
- Gualerzi, C. O. and Pon, C. L. (2015) 'Initiation of mRNA translation in bacteria: Structural and dynamic aspects', *Cellular and*

*Molecular Life Sciences*. Springer Basel, pp. 4341–4367. doi: 10.1007/s00018-015-2010-3.

Guillon, L. *et al.* (2005) 'Initiator tRNA Binding by e/IF5B, the Eukaryotic/Archaeal Homologue of Bacterial Initiation Factor IF2', *Biochemistry*, 44(47), pp. 15594–15601. doi: 10.1021/bi051514j.

Gutierrez, E. *et al.* (2013) 'eIF5A Promotes Translation of Polyproline Motifs', *Molecular Cell*. Elsevier Inc., 51(1), pp. 35–45. doi: 10.1016/j.molcel.2013.04.021.

Gutierrez, P. *et al.* (2004) 'Structure of the archaeal translation initiation factor aIF2beta from Methanobacterium thermoautotrophicum: Implications for translation initiation', *Protein Science*, 13(3), pp. 659–667. doi: 10.1110/ps.03506604.

Guy, L. and Ettema, T. J. G. (2011) 'The archaeal "TACK" superphylum and the origin of eukaryotes', *Trends in Microbiology*. Elsevier Ltd, 19(12), pp. 580–587. doi: 10.1016/j.tim.2011.09.002.

Hamana, K., Hamana, H. and Itoh, T. (1995) 'Ubiquitous occurrence of agmatine as the major polyamine within extremely halophilic archaeobacteria.', *The Journal of General and Applied Microbiology*, 41(2), pp. 153–158. doi: 10.2323/jgam.41.153.

Hammelmann, M. and Soppa, J. (2008) 'Optimized generation of vectors for the construction of Haloferax volcanii deletion mutants', *Journal of Microbiological Methods*, 75(2), pp. 201–204. doi: 10.1016/j.mimet.2008.05.029.

Hanner, M. *et al.* (1994) 'Autogenous translational regulation of the ribosomal MvaL1 operon in the archaeobacterium Methanococcus vannielii.', *Journal of Bacteriology*, 176(2), pp. 409–418. doi: 10.1128/JB.176.2.409-418.1994.

Hansen, J. L. *et al.* (2002) 'The structures of four macrolide antibiotics bound to the large ribosomal subunit', *Molecular Cell*, 10(1), pp. 117–128. doi: 10.1016/S1097-2765(02)00570-1.

Hansen, J. L., Moore, P. B. and Steitz, T. A. (2003) 'Structures of five antibiotics bound at the peptidyl transferase center of the large ribosomal subunit', *Journal of Molecular Biology*, 330(5), pp. 1061–1075. doi: 10.1016/S0022-2836(03)00668-5.

Hanzelka, B. L., Darcy, T. J. and Reeve, J. N. (2001) 'TFE, an Archaeal Transcription Factor in Methanobacterium thermoautotrophicum Related to Eucaryal Transcription Factor TFIIIE', *Journal of Bacteriology*, 183(5), pp. 1813–1818. doi: 10.1128/JB.183.5.1813-1818.2001.

Hartman, A. L. *et al.* (2010) 'The complete genome sequence of Haloferax volcanii DS2, a model archaeon', *PLoS ONE*, 5(3). doi: 10.1371/journal.pone.0009605.

Hartz, D., McPheeters, D. S. and Gold, L. (1989) 'Selection of the initiator tRNA by Escherichia coli initiation factors.', *Genes & Development*, 3(12a), pp. 1899–1912. doi: 10.1101/gad.3.12a.1899.

Hasenöhrl, D. *et al.* (2006) 'Sulfolobus solfataricus translation initiation factor 1 stimulates translation initiation complex formation', *RNA*, 12(4), pp. 674–682. doi: 10.1261/rna.2289306.

Hasenöhrl, D. *et al.* (2008) 'Translation initiation factor a/eIF2(gamma) counteracts 5' to 3' mRNA decay in the archaeon Sulfolobus solfataricus', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(6), pp. 2146–2150. doi: 10.1073/pnas.0708894105.

Hasenöhrl, D. *et al.* (2009) 'Translation initiation complex formation in the crenarchaeon Sulfolobus solfataricus', *RNA*, 15(12), pp. 2288–2298. doi: 10.1261/rna.1662609.

Hasenöhrl, D., Konrat, R. and Blasi, U. (2011) 'Identification of an RNase J ortholog in Sulfolobus solfataricus: Implications for 5'-to-3' directional decay and 5'-end protection of mRNA in Crenarchaeota', *RNA*, 17(1), pp. 99–107. doi: 10.1261/rna.2418211.

Hellen, C. U. T. and Sarnow, P. (2001) 'Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules', *Genes and Development*, 15(13), pp. 1593–1612. doi: 10.1101/gad.891101.

Hering, O. *et al.* (2009) 'A novel mechanism for translation initiation operates in haloarchaea', *Molecular Microbiology*, 71(6), pp. 1451–1463. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06615.x.

Hinnebusch, A. G. (2011) 'Molecular Mechanism of Scanning and Start Codon Selection in Eukaryotes', *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 75(3), pp. 434–467. doi: 10.1128/mmbr.00008-11.

Hinnebusch, A. G. (2014) 'The Scanning Mechanism of Eukaryotic Translation Initiation', *Annual Review of Biochemistry*, 83(1), pp. 779–812. doi: 10.1146/annurev-biochem-060713-035802.

Hirata, A., Klein, B. J. and Murakami, K. S. (2008) 'The X-ray crystal structure of RNA polymerase from Archaea.', *Nature*, 451(7180), pp. 851–4. doi: 10.1038/nature06530.

Hirata, A. and Murakami, K. S. (2009) 'Archaeal RNA polymerase', *Current Opinion in Structural Biology*, 19(6), pp. 724–731. doi: 10.1016/j.sbi.2009.10.006.

Hoffman, E. A. *et al.* (2015) 'Formaldehyde crosslinking: A tool for the study of chromatin complexes', *Journal of Biological Chemistry*, 290(44), pp. 26404–26411. doi: 10.1074/jbc.R115.651679.

Humbard, M. A. *et al.* (2010) 'Phosphorylation and methylation of proteasomal proteins of the haloarchaeon haloferax volcanii', *Archaea*, 2010, pp. 1–10. doi: 10.1155/2010/481725.

Hussain, T. *et al.* (2016) 'Large-Scale Movements of IF3 and tRNA during Bacterial Translation Initiation', *Cell*, 167(1), pp. 133-

144.e13. doi: 10.1016/j.cell.2016.08.074.

Imai, H. *et al.* (2015) 'Functional role of the C-terminal tail of the archaeal ribosomal stalk in recruitment of two elongation factors to the sarcin/ricin loop of 23S rRNA', *Genes to Cells*, 20(7), pp. 613–624. doi: 10.1111/gtc.12256.

Irihimovitch, V. *et al.* (2003) 'Isolation of fusion proteins containing SecY and SecE, components of the protein translocation complex from the halophilic archaeon *Haloferax volcanii*', *Extremophiles*, 7(1), pp. 71–77. doi: 10.1007/s00792-002-0297-0.

Ito, T., Marintchev, A. and Wagner, G. (2004) 'Solution Structure of Human Initiation Factor eIF2 $\alpha$  Reveals Homology to the Elongation Factor eEF1B', *Structure*, 12(9), pp. 1693–1704. doi: 10.1016/j.str.2004.07.010.

Ivanov, I. P. *et al.* (2010) 'Initiation context modulates autoregulation of eukaryotic translation initiation factor 1 (eIF1)', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(42), pp. 18056–18060. doi: 10.1073/pnas.1009269107.

Jackson, R. J., Hellen, C. U. T. and Pestova, T. V. (2010) 'The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group, 11(2), pp. 113–127. doi: 10.1038/nrm2838.

Jaenicke, R. (1991) 'Protein stability and molecular adaptation to extreme conditions', *European Journal of Biochemistry*, 202(3), pp. 715–728. doi: 10.1111/j.1432-1033.1991.tb16426.x.

Jäger, D. *et al.* (2009) 'Deep sequencing analysis of the *Methanosarcina mazei* Gö 1 transcriptome in response to nitrogen availability', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(51), pp. 21878–21882. doi: 10.1073/pnas.0909051106.

Jäger, D. *et al.* (2014) 'Primary transcriptome map of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*', *BMC Genomics*, 15(1), pp. 1–15. doi: 10.1186/1471-2164-15-684.

Jakus, J. *et al.* (1993) 'Features of the spermidine-binding site of deoxyhypusine synthase as derived from inhibition studies. Effective inhibition by bis- and mono-guanylated diamines and polyamines', *Journal of Biological Chemistry*, 268(18), pp. 13151–13159. doi: 10.1016/S0021-9258(19)38631-4.

Jan, E. (2006) 'Divergent IRES elements in invertebrates', *Virus Research*, 119(1), pp. 16–28. doi: 10.1016/j.virusres.2005.10.011.

Jan, E. and Sarnow, P. (2002) 'Factorless Ribosome Assembly on the Internal Ribosome Entry Site of Cricket Paralysis Virus', *Journal of Molecular Biology*, 324(5), pp. 889–902. doi: 10.1016/S0022-2836(02)01099-9.

Jansson, B. P. M., Malandrini, L. and Johansson, H. E. (2000) 'Cell Cycle Arrest in Archaea by the Hypusination Inhibitor N 1-Guanyl-1,7-Diaminoheptane', *Journal of Bacteriology*, 182(4), pp. 1158–1161. doi: 10.1128/JB.182.4.1158-1161.2000.

Jantzer, K. and Zerulla, K. (2011) 'Phenotyping in the archaea: optimization of growth parameters and'. doi: 10.1111/j.1574-6968.2011.02341.x.

Jeffery, C. J. (2016) 'What is Protein Moonlighting and Why is it Important?', *Moonlighting Proteins: Novel Virulence Factors in Bacterial Infections*, (figure 1), pp. 1–19. doi: 10.1002/9781118951149.ch1.

Jennings, M. D. *et al.* (2016) 'eIF2 $\beta$  is critical for eIF5-mediated GDP-dissociation inhibitor activity and translational control.', *Nucleic acids research*, 44(20), pp. 9698–9709. doi: 10.1093/nar/gkw657.

Jia, B., Cheong, G. W. and Zhang, S. (2013) 'Multifunctional enzymes in archaea: Promiscuity and moonlight', *Extremophiles*, 17(2), pp. 193–203. doi: 10.1007/s00792-012-0509-1.

Jiang, S. *et al.* (2016) 'Developing Protocols of Tricine-SDS-PAGE for Separation of Polypeptides in the Mass Range 1-30 kDa with Minigel Electrophoresis System', *International Journal of Electrochemical Science*, 11, pp. 640–649. doi: 10.1016/S0165-022X(99)00041-X.

Jiang, W., Hou, Y. and Inouye, M. (1997) 'CspA, the major cold-shock protein of *Escherichia coli*, is an RNA chaperone', *Journal of Biological Chemistry*, 272(1), pp. 196–202. doi: 10.1074/jbc.272.1.196.

Johnson, A. G. *et al.* (2017) 'Dynamics of IRES-mediated translation', *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372(1716), p. 20160177. doi: 10.1098/rstb.2016.0177.

Jun, S. H. *et al.* (2011) 'Archaeal RNA polymerase and transcription regulation', *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 46(1), pp. 27–40. doi: 10.3109/10409238.2010.538662.

Kaczowka, S. J. and Maupin-Furlow, J. A. (2003) 'Subunit Topology of Two 20S Proteasomes from *Haloferax volcanii*', *Journal of Bacteriology*, 185(1), pp. 165–174. doi: 10.1128/JB.185.1.165-174.2003.

Kähler, M. and Antranikian, G. (2000) 'Cloning and characterization of a family B DNA polymerase from the hyperthermophilic crenarchaeon *Pyrobaculum islandicum*', *Journal of Bacteriology*, 182(3), pp. 655–663. doi: 10.1128/JB.182.3.655-663.2000.

Kakuta, Y. *et al.* (2004) 'Crystal structure of the regulatory subunit of archaeal initiation factor 2B (aIF2B) from hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii* OT3: A proposed structure of the regulatory subcomplex of eukaryotic IF2B', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 319(3), pp. 725–732. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.05.045.

Kimball, S. R. *et al.* (1998) 'Regulation of Guanine Nucleotide Exchange through Phosphorylation of Eukaryotic Initiation Factor

eIF2 $\alpha$ ', *Journal of Biological Chemistry*, 273(21), pp. 12841–12845. doi: 10.1074/jbc.273.21.12841.

Kimball, S. R. (1999) 'Eukaryotic initiation factor eIF2', *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 31(1), pp. 25–29. doi: 10.1016/S1357-2725(98)00128-9.

Klenk, H.-P., Schwass, V. and Zillig, W. (1991) 'Nucleotide sequence of the genes encoding the L30, S12 and S7 equivalent ribosomal proteins from the archaeum *Thermococcus celer*', *Nucleic Acids Research*, 19(21), pp. 6047–6047. doi: 10.1093/nar/19.21.6047.

Knowlton, J. R. *et al.* (2003) 'A spring-loaded state of NusG in its functional cycle is suggested by X-ray crystallography and supported by site-directed mutants', *Biochemistry*, 42(8), pp. 2275–2281. doi: 10.1021/bi0272508.

Kobayashi, K. *et al.* (2012) 'Structural basis for translation termination by archaeal RF1 and GTP-bound EF1 $\alpha$  complex', *Nucleic Acids Research*, 40(18), pp. 9319–9328. doi: 10.1093/nar/gks660.

Koh, G. C. K. W. *et al.* (2012) 'Analyzing protein-protein interaction networks', *Journal of Proteome Research*, 11(4), pp. 2014–2031. doi: 10.1021/pr201211w.

Kohler, R. *et al.* (2017) 'Architecture of a transcribing-translating expressome', *Science*, 356(6334), pp. 194–197. doi: 10.1126/science.aal3059.

Komar, A. A., Mazumder, B. and Merrick, W. C. (2012) 'A new framework for understanding IRES-mediated translation', *Gene*. Elsevier B.V., 502(2), pp. 75–86. doi: 10.1016/j.gene.2012.04.039.

Korkhin, Y. *et al.* (2009) 'Evolution of complex RNA polymerases: The complete archaeal RNA polymerase structure', *PLoS Biology*, 7(5). doi: 10.1371/journal.pbio.1000102.

Korobeinikova, A. V., Garber, M. B. and Gongadze, G. M. (2012) 'Ribosomal Proteins: Structure, Function, and Evolution', *Biochemistry (Moscow)*, 77(6), pp. 562–574. doi: 10.1134/S0006297912060028 Key.

Korostelev, A. A. (2014) 'A deeper look into translation initiation', *Cell*. Elsevier Inc., 159(3), pp. 475–476. doi: 10.1016/j.cell.2014.10.005.

Kozak, M. (1999) 'Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes', *Gene*, 234(2), pp. 187–208. doi: S0378111999002103 [pii].

Kozak, M. (2002) 'Pushing the limits of the scanning mechanism for initiation of translation', *Gene*, pp. 1–34. doi: 10.1016/S0378-1119(02)01056-9.

Kozak, M. (2005a) 'A second look at cellular mRNA sequences said to function as internal ribosome entry sites', *Nucleic Acids Research*, 33(20), pp. 6593–6602. doi: 10.1093/nar/gki958.

Kozak, M. (2005b) 'Regulation of translation via mRNA structure in prokaryotes and eukaryotes', *Gene*, 361(1–2), pp. 13–37. doi: 10.1016/j.gene.2005.06.037.

Kraft, A. *et al.* (1999) 'Control of ribosomal protein L1 synthesis in mesophilic and thermophilic archaea.', *Genetics*, 152(4), pp. 1363–72. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10430567>.

Kramer, P. *et al.* (2014) 'Haloflex volcanii, a Prokaryotic Species that Does Not Use the Shine Dalgarno Mechanism for Translation Initiation at 5'-UTRs', *PLoS ONE*. Edited by V. de Crécy-Lagard, 9(4), p. e94979. doi: 10.1371/journal.pone.0094979.

Krishnamoorthy, T. and Pavitt, G. (2001) 'Tight binding of the phosphorylated  $\alpha$  subunit of initiation factor 2 (eIF2 $\alpha$ ) to the regulatory subunits of guanine nucleotide exchange factor eIF2B is required for inhibition of translation', *Molecular & Cellular Biology*, 21(15), pp. 5018–5030. doi: 10.1128/MCB.21.15.5018.

Krüger, K. *et al.* (1998) 'The transcriptional activator GvpE for the halobacterial gas vesicle genes resembles a basic region leucine-zipper regulatory protein', *Journal of Molecular Biology*, 279(4), pp. 761–771. doi: 10.1006/jmbi.1998.1795.

Kuhle, B. and Ficner, R. (2014a) 'eIF5B employs a novel domain release mechanism to catalyze ribosomal subunit joining', *The EMBO Journal*, 33(10), pp. 1177–1191. doi: 10.1002/embj.201387344.

Kuhle, B. and Ficner, R. (2014b) 'Structural insight into the recognition of amino-acylated initiator tRNA by eIF5B in the 80S initiation complex', *BMC Structural Biology*, 14(1), p. 20. doi: 10.1186/s12900-014-0020-2.

Kuzminov, A. (2014) 'The precarious prokaryotic chromosome', *Journal of Bacteriology*, 196(10), pp. 1793–1806. doi: 10.1128/JB.00022-14.

Kyrpides, N. C. and Woese, C. R. (1998a) 'Archaeal translation initiation revisited: The initiation factor 2 and eukaryotic initiation factor 2B - subunit families', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(7), pp. 3726–3730. doi: 10.1073/pnas.95.7.3726.

Kyrpides, N. C. and Woese, C. R. (1998b) 'Universally conserved translation initiation factors', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(1), pp. 224–228. doi: 10.1073/pnas.95.1.224.

Kyrpides, N. C., Woese, C. R. and Ouzounis, C. A. (1996) 'KOW: A novel motif linking a bacterial transcription factor with ribosomal proteins', *Trends in Biochemical Sciences*, 21(11), pp. 425–426. doi: 10.1016/S0968-0004(96)30036-4.

- Lamanna, A. C. and Karbstein, K. (2009) 'Nob1 binds the single-stranded cleavage site D at the 3'-end of 18S rRNA with its PIN domain', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(34), pp. 14259–14264. doi: 10.1073/pnas.0905403106.
- Lambert, J. P., Pawson, T. and Gingras, A. C. (2012) 'Mapping physical interactions within chromatin by proteomic approaches', *Proteomics*, 12(10), pp. 1609–1622. doi: 10.1002/pmic.201100547.
- Landau, G. *et al.* (2010) 'The role of polyamines in supporting growth of mammalian cells is mediated through their requirement for translation initiation and elongation', *Journal of Biological Chemistry*, 285(17), pp. 12474–12481. doi: 10.1074/jbc.M110.106419.
- Landick, R., Carey, J. and Yanofsky, C. (1985) 'Translation activates the paused transcription complex and restores transcription of the trp operon leader region.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(14), pp. 4663–4667. doi: 10.1073/pnas.82.14.4663.
- Langer, D. *et al.* (1995) 'Transcription in archaea: Similarity to that in eucarya', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(13), pp. 5768–5772. doi: 10.1073/pnas.92.13.5768.
- Lassak, J., Wilson, D. N. and Jung, K. (2016) 'Stall no more at polyproline stretches with the translation elongation factors EF-P and IF-5A', *Molecular Microbiology*, 99(2), pp. 219–235. doi: 10.1111/mmi.13233.
- Lecompte, O. *et al.* (2002) 'Comparative analysis of ribosomal proteins in complete genomes: An example of reductive evolution at the domain scale', *Nucleic Acids Research*, 30(24), pp. 5382–5390. doi: 10.1093/nar/gkf693.
- Lee, J. H. *et al.* (1999) 'Universal conservation in translation initiation revealed by human and archaeal homologs of bacterial translation initiation factor IF2', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(8), pp. 4342–4347. doi: 10.1073/pnas.96.8.4342.
- Lee, Y. B., Park, M. H. and Folk, J. E. (1995) 'Diamine and Triamine Analogs and Derivatives as Inhibitors of Deoxyhypusine Synthase: Synthesis and Biological Activity', *Journal of Medicinal Chemistry*, 38(16), pp. 3053–3061. doi: 10.1021/jm00016a008.
- Legault, L., Jeantet, C. and Gros, F. (1972) 'Inhibition of in vitro protein synthesis by ppGpp', *FEBS Letters*, 27(1), pp. 71–75. doi: 10.1016/0014-5793(72)80412-5.
- Li, W. and Hoffmann, D. W. (2001) 'Structure and dynamics of translation initiation factor aIF-1A from the archaeon *Methanococcus jannaschii* determined by NMR spectroscopy', pp. 2426–2438. doi: 10.1101/ps.18201.AUG.
- Li, Z. *et al.* (2010) 'Affinity Purification of an Archaeal DNA Replication Protein Network', *mBio*. Edited by S. Adhya, 1(5), pp. 1–10. doi: 10.1128/mBio.00221-10.
- Lin, K. Y. *et al.* (2018) 'Human eIF5 and eIF1A Compete for Binding to eIF5B', *Biochemistry*. American Chemical Society, 57(40), pp. 5910–5920. doi: 10.1021/acs.biochem.8b00839.
- Linder, P. and Fuller-Pace, F. (2015) 'Happy Birthday: 25 Years of DEAD-Box Proteins', in *RNA Remodeling Proteins: Methods and Protocols*, pp. 17–33. doi: 10.1007/978-1-4939-2214-7\_2.
- Linder, P. and Jankowsky, E. (2011) 'From unwinding to clamping — the DEAD box RNA helicase family', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group, 12(8), pp. 505–516. doi: 10.1038/nrm3154.
- Locker, N., Easton, L. E. and Lukavsky, P. J. (2007) 'HCV and CSFV IRES domain II mediate eIF2 release during 80S ribosome assembly', *EMBO Journal*, 26(3), pp. 795–805. doi: 10.1038/sj.emboj.7601549.
- Lomakin, I. B. *et al.* (2003) 'Position of eukaryotic initiation factor eIF1 on the 40S ribosomal subunit determined by directed hydroxyl radical probing', *Genes & Development*, 17(22), pp. 2786–2797. doi: 10.1101/gad.1141803.
- Londei, P. (2005) 'Evolution of translational initiation: New insights from the archaea', *FEMS Microbiology Reviews*, 29(2), pp. 185–200. doi: 10.1016/j.femsre.2004.10.002.
- Ludt, K. and Soppa, J. (2018) 'Influence of origin recognition complex proteins on the copy numbers of three chromosomes in *Haloferax volcanii*', *Journal of Bacteriology*, 200(17), pp. 1–13. doi: 10.1128/JB.00161-18.
- Luna, R. E. *et al.* (2013) 'The interaction between eukaryotic initiation factor 1A and eIF5 retains eif1 within scanning preinitiation complexes', *Biochemistry*, 52(52), pp. 9510–9518. doi: 10.1021/bi4009775.
- Luviano, A. *et al.* (2019) 'Cooperative energetic effects elicited by the yeast Shwachman-Diamond syndrome protein (Sdo1) and guanine nucleotides modulate the complex conformational landscape of the elongation factor-like 1 (Efl1) GTPase', *Biophysical Chemistry*. Elsevier, 247(January), pp. 13–24. doi: 10.1016/j.bpc.2019.02.003.
- MacNeill, S. A. (2011) 'Protein–protein interactions in the archaeal core replisome', *Biochemical Society Transactions*, 39(1), pp. 163–168. doi: 10.1042/bst0390163.
- Maki, Y. *et al.* (2007) 'Three Binding Sites for Stalk Protein Dimers Are Generally Present in Ribosomes from Archaeal Organism', *Journal of Biological Chemistry*, 282(45), pp. 32827–32833. doi: 10.1074/jbc.M705412200.
- Maone, E. *et al.* (2007) 'Functional analysis of the translation factor aIF2/5B in the thermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*', *Molecular Microbiology*, 65(3), pp. 700–713. doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.05820.x.
- Martinez-Salas, E. *et al.* (2018) 'Insights into structural and mechanistic features of viral IRES elements', *Frontiers in*



*Microbiology*, 8(JAN), pp. 1–15. doi: 10.3389/fmicb.2017.02629.

Maruyama, H. *et al.* (2011) 'Histone and TK0471/TrmBL2 form a novel heterogeneous genome architecture in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*', *Molecular Biology of the Cell*. Edited by W. P. Tansey, 22(3), pp. 386–398. doi: 10.1091/mbc.e10-08-0668.

Matelska, D., Steczkiewicz, K. and Ginalski, K. (2017) 'Comprehensive classification of the PIN domain-like superfamily', *Nucleic Acids Research*, 45(12), pp. 6995–7020. doi: 10.1093/nar/gkx494.

McGary, K. and Nudler, E. (2013) 'RNA polymerase and the ribosome: The close relationship', *Current Opinion in Microbiology*. Elsevier Ltd, 16(2), pp. 112–117. doi: 10.1016/j.mib.2013.01.010.

McKune, K. and Woychik, N. A. (1994) 'Halobacterial S9 operon contains two genes encoding proteins homologous to subunits shared by eukaryotic RNA polymerases I, II, and III.', *Journal of bacteriology*, 176(15), pp. 4754–6. doi: 10.1128/jb.176.15.4754-4756.1994.

McLennan, A. G. (2006) 'The Nudix hydrolase superfamily', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63(2), pp. 123–143. doi: 10.1007/s00018-005-5386-7.

Melnikov, S., Manakongtreecheep, K. and Söll, D. (2018) 'Revising the structural diversity of ribosomal proteins across the three domains of life', *Molecular Biology and Evolution*, 35(7), pp. 1588–1598. doi: 10.1093/molbev/msy021.

Mevarech, M., Frolow, F. and Gloss, L. M. (2000) 'Halophilic enzymes: Proteins with a grain of salt', *Biophysical Chemistry*, 86(2–3), pp. 155–164. doi: 10.1016/S0301-4622(00)00126-5.

Michael, A. J. (2016) 'Polyamines in eukaryotes, bacteria, and archaea', *Journal of Biological Chemistry*, 291(29), pp. 14896–14903. doi: 10.1074/jbc.R116.734780.

Milon, P. *et al.* (2006) 'The nucleotide-binding site of bacterial translation initiation factor 2 (IF2) as a metabolic sensor', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(38), pp. 13962–13967. doi: 10.1073/pnas.0606384103.

Miluzio, A. *et al.* (2009) 'Eukaryotic initiation factor 6 mediates a continuum between 60S ribosome biogenesis and translation', *EMBO Reports*, 10(5), pp. 459–465. doi: 10.1038/embor.2009.70.

Mitroshin, I. V., Garber, M. B. and Gabdulkhakov, A. G. (2016) 'Investigation of structure of the ribosomal L12/P stalk', *Biochemistry (Moscow)*, 81(13), pp. 1589–1601. doi: 10.1134/S0006297916130022.

Moazed, D. *et al.* (1995) 'Specific protection of 16 S rRNA by translational initiation factors', *Journal of Molecular Biology*, 248(2), pp. 207–210. doi: 10.1016/S0022-2836(95)80042-5.

Mojica, F. J. M. *et al.* (1997) 'Osmotically induced response in representatives of halophilic prokaryotes: The bacterium *Halomonas elongata* and the archaeon *Haloferax volcanii*', *Journal of Bacteriology*, 179(17), pp. 5471–5481. doi: 10.1128/jb.179.17.5471-5481.1997.

Moll, I. *et al.* (2002) 'Leaderless mRNAs in bacteria: Surprises in ribosomal recruitment and translational control', *Molecular Microbiology*, 43(1), pp. 239–246. doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.02739.x.

Moll, I. *et al.* (2004) 'Translation initiation with 70S ribosomes: An alternative pathway for leaderless mRNAs', *Nucleic Acids Research*, 32(11), pp. 3354–3363. doi: 10.1093/nar/gkh663.

Monestier, A. *et al.* (2018) 'Role of aIF1 in *Pyrococcus abyssi* translation initiation', *Nucleic acids research*, 46(20), pp. 11061–11074. doi: 10.1093/nar/gky850.

Mooney, R. A. *et al.* (2009) 'Two Structurally Independent Domains of *E. coli* NusG Create Regulatory Plasticity via Distinct Interactions with RNA Polymerase and Regulators', *Journal of Molecular Biology*. Elsevier Ltd, 391(2), pp. 341–358. doi: 10.1016/j.jmb.2009.05.078.

Moore, P. B. and Steitz, T. A. (2002) 'The Structural Basis of Large Ribosomal Subunit Function', *Annual Review of Biochemistry*, pp. 813–850. doi: 10.1146/annurev.biochem.71.110601.135450.

Morag, E. *et al.* (1995) 'Expression, Purification, and Characterization of the Cellulose-Binding Domain of the Scaffoldin Subunit from the Cellulosome of *Clostridium thermocellum*', *Applied and environmental microbiology*, 61(5), pp. 1980–1986.

Motz, M. *et al.* (2002) 'Elucidation of an archaeal replication protein network to generate enhanced PCR enzymes', *Journal of Biological Chemistry*, 277(18), pp. 16179–16188. doi: 10.1074/jbc.M107793200.

Mullakhanbhai, M. F. and Larsen, H. (1975) 'Halobacterium volcanii spec. nov., a Dead Sea halobacterium with a moderate salt requirement', *Archives of Microbiology*, 104(1), pp. 207–214. doi: 10.1007/BF00447326.

Murakami, R. *et al.* (2016) 'Crystal structure of translation initiation factor 5B from the crenarchaeon *Aeropyrum pernix*', *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 84(5), pp. 712–717. doi: 10.1002/prot.25009.

Murakami, R. *et al.* (2018) 'The Interaction between the Ribosomal Stalk Proteins and Translation Initiation Factor 5B Promotes Translation Initiation', *Molecular and Cellular Biology*, 38(16), p. MCB.00067-18. doi: 10.1128/MCB.00067-18.

Murzin, A. G. (1993) 'OB(oligonucleotide/oligosaccharide binding)-fold: common structural and functional solution for non-

homologous sequences', *The EMBO Journal*, 12(3), pp. 861–867. doi: 10.1002/j.1460-2075.1993.tb05726.x.

Nag, N. *et al.* (2016) 'EIF1A/eIF5B interaction network and its functions in translation initiation complex assembly and remodeling', *Nucleic Acids Research*, 44(15), pp. 7441–7456. doi: 10.1093/nar/gkw552.

Naji, S., Grünberg, S. and Thomm, M. (2007) 'The RPB7 Orthologue E' Is Required for Transcriptional Activity of a Reconstituted Archaeal Core Enzyme at Low Temperatures and Stimulates Open Complex Formation', *Journal of Biological Chemistry*, 282(15), pp. 11047–11057. doi: 10.1074/jbc.M611674200.

Nanda, J. S. *et al.* (2013) 'Coordinated movements of eukaryotic translation initiation Factors eIF1, eIF1A, and eIF5 trigger phosphate release from eIF2 in response to start codon recognition by the ribosomal preinitiation complex', *Journal of Biological Chemistry*, 288(8), pp. 5316–5329. doi: 10.1074/jbc.M112.440693.

Naveau, M. *et al.* (2013) 'Roles of yeast eIF2 $\alpha$  and eIF2 $\beta$  subunits in the binding of the initiator methionyl-tRNA', *Nucleic Acids Research*, 41(2), pp. 1047–1057. doi: 10.1093/nar/gks1180.

Nissen, P. *et al.* (2000) 'The Structural Basis of Ribosome Activity in Peptide Bond Synthesis', *Science*, 289(5481), pp. 920–930. doi: 10.1126/science.289.5481.920.

Nomura, N. *et al.* (2012) 'Archaeal ribosomal stalk protein interacts with translation factors in a nucleotide-independent manner via its conserved C terminus', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(10), pp. 3748–53. doi: 10.1073/pnas.1112934109.

Nunoura, T. *et al.* (2011) 'Insights into the evolution of Archaea and eukaryotic protein modifier systems revealed by the genome of a novel archaeal group', *Nucleic Acids Research*, 39(8), pp. 3204–3223. doi: 10.1093/nar/gkq1228.

O. L. Miller, J., Hamkalo, B. A. and C. A. Thomas, J. (1970) 'Visualization of Bacterial Genes in Action', *Science*, 169(3943), pp. 392–395. Available at: <https://www.jstor.org/stable/1729589?seq=1&cid=pdf-reference/analyze>.

O'Donnell, S. M. and Janssen, G. R. (2002) 'Leaderless mRNAs Bind 70S Ribosomes More Strongly than 30S Ribosomal Subunits in Escherichia coli', *Journal of bacteriology*, 184(23), pp. 1–5. doi: 10.1128/JB.184.23.6730–6733.2002.

O'Leary, S. E. *et al.* (2013) 'Dynamic Recognition of the mRNA Cap by *Saccharomyces cerevisiae* eIF4E', *Structure*, 21(12), pp. 2197–2207. doi: 10.1016/j.str.2013.09.016.

Oeffinger, M. (2012) 'Two steps forward-one step back: Advances in affinity purification mass spectrometry of macromolecular complexes', *Proteomics*, 12(10), pp. 1591–1608. doi: 10.1002/pmic.201100509.

Ogawa, T. *et al.* (2005) 'Comprehensive Analysis of Cytosolic Nudix Hydrolases in *Arabidopsis thaliana*', *Journal of Biological Chemistry*, 280(26), pp. 25277–25283. doi: 10.1074/jbc.M503536200.

Olsen, D. S. *et al.* (2003) 'Domains of eIF1A that mediate binding to eIF2, eIF3 and eIF5B and promote ternary complex recruitment in vivo', *EMBO Journal*, 22(2), pp. 193–204. doi: 10.1093/emboj/cdg030.

Oren, A. and Ventosa, A. (1999) 'Benjamin Elazari Volcani Dead Sea studies of the microbiology of the (1915–1999): Sixty–three years of Correspondence', *Internatl Microbiol.* (June), pp. 195–198. doi: [https://www.researchgate.net/publication/41953283\\_Benjamin](https://www.researchgate.net/publication/41953283_Benjamin).

Ortega, G., Diercks, T. and Millet, O. (2015) 'Halophilic Protein Adaptation Results from Synergistic Residue-Ion Interactions in the Folded and Unfolded States', *Chemistry and Biology*. Elsevier Ltd, 22(12), pp. 1597–1607. doi: 10.1016/j.chembiol.2015.10.010.

Osada, Y., Saito, R. and Tomita, M. (1999) 'Analysis of base-pairing potentials between 16S rRNA and 5' UTR for translation initiation in various prokaryotes', *Bioinformatics*, 15(7), pp. 578–581. doi: 10.1093/bioinformatics/15.7.578.

Osterman, I. A. *et al.* (2015) 'A bacterial homolog YciH of eukaryotic translation initiation factor eIF1 regulates stress-related gene expression and is unlikely to be involved in translation initiation fidelity', *RNA Biology*, 12(9), pp. 966–971. doi: 10.1080/15476286.2015.1069464.

Ouhammouch, M. *et al.* (2004) 'A fully recombinant system for activator-dependent archaeal transcription', *Journal of Biological Chemistry*, 279(50), pp. 51719–51721. doi: 10.1074/jbc.C400446200.

Palacios Moreno, J. M. *et al.* (2000) 'Macromolecular mimicry in translation initiation: A model for the initiation factor IF2 on the ribosome', *IUBMB Life*, 50(6), pp. 347–354. doi: 10.1080/152165400300089330.

Park, M. H. (2006) 'The Post-Translational Synthesis of a Polyamine-Derived Amino Acid, Hypusine, in the Eukaryotic Translation Initiation Factor 5A (eIF5A)', *The Journal of Biochemistry*, 139(2), pp. 161–169. doi: 10.1093/jb/mvj034.

Park, M. H. *et al.* (2010) 'Functional significance of eIF5A and its hypusine modification in eukaryotes', *Amino Acids*, 38(2), pp. 491–500. doi: 10.1007/s00726-009-0408-7.

Passmore, L. A. *et al.* (2007) 'The Eukaryotic Translation Initiation Factors eIF1 and eIF1A Induce an Open Conformation of the 40S Ribosome', *Molecular Cell*, 26(1), pp. 41–50. doi: 10.1016/j.molcel.2007.03.018.

Patel, P. H. *et al.* (2009) 'The *Drosophila* deoxyhypusine hydroxylase homologue nero and its target eIF5A are required for cell growth and the regulation of autophagy', *Journal of Cell Biology*, 185(7), pp. 1181–1194. doi: 10.1083/jcb.200904161.

- Pavitt, G. D. *et al.* (1998) 'eIF2 independently binds two distinct eIF2b subcomplexes that catalyze and regulate guanine-nucleotide exchange', *Genes and Development*, 12(4), pp. 514–526. doi: 10.1101/gad.12.4.514.
- Peat, T. S. *et al.* (1998) 'Structure of translation initiation factor 5A from *Pyrobaculum aerophilum* at 1.75 Å resolution', *Structure*, 6(9), pp. 1207–1214. doi: 10.1016/S0969-2126(98)00120-8.
- Pech, M. and Nierhaus, K. H. (2012) 'Identical Binding Sites–Nonidentical Functions in Eukarya and Archaea: The Complex of eIF6 with the Large Ribosomal Subunit', *Journal of Molecular Biology*, 418(3–4), pp. 131–133. doi: 10.1016/j.jmb.2012.02.033.
- Pedullà, N. *et al.* (2005) 'The archaeal eIF2 homologue: functional properties of an ancient translation initiation factor.', *Nucleic acids research*, 33(6), pp. 1804–12. doi: 10.1093/nar/gki321.
- Pelletier, J. and Sonenberg, N. (1988) 'Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA', *Nature*, 334(6180), pp. 320–325. doi: 10.1038/334320a0.
- Perez-Rueda, E. *et al.* (2018) 'Abundance, diversity and domain architecture variability in prokaryotic DNA-binding transcription factors', *PLoS ONE*, 13(4), pp. 1–16. doi: 10.1371/journal.pone.0195332.
- Perez-Rueda, E. and Janga, S. C. (2010) 'Identification and Genomic Analysis of Transcription Factors in Archaeal Genomes Exemplifies Their Functional Architecture and Evolutionary Origin', *Molecular Biology and Evolution*, 27(6), pp. 1449–1459. doi: 10.1093/molbev/msq033.
- Pestova, T. V. *et al.* (2000) 'The joining of ribosomal subunits in eukaryotes requires eIF5B', *Nature*, 403(6767), pp. 332–335. doi: 10.1038/35002118.
- Pestova, T. V. *et al.* (2008) 'eIF2-dependent and eIF2-independent modes of initiation on the CSFV IRES: A common role of domain II', *EMBO Journal*, 27(7), pp. 1060–1072. doi: 10.1038/emboj.2008.49.
- Peter Sørensen, Jakob Hedeg, H. (2001) 'Remarkable Conservation of Translation Initiation Factors: IF1/eIF1A and IF2/eIF5B are Universally Distributed Phylogenetic Markers', *IUBMB Life (International Union of Biochemistry and Molecular Biology: Life)*, 51(5), pp. 321–327. doi: 10.1080/152165401317190842.
- Pisarev, A. V. *et al.* (2008) 'Ribosomal position and contacts of mRNA in eukaryotic translation initiation complexes', *EMBO Journal*, 27(11), pp. 1609–1621. doi: 10.1038/emboj.2008.90.
- Plavner, N. and Eichler, J. (2008) 'Defining the topology of the N-glycosylation pathway in the halophilic archaeon *Haloferax volcanii*', *Journal of Bacteriology*, 190(24), pp. 8045–8052. doi: 10.1128/JB.01200-08.
- Pluchon, P. F. *et al.* (2013) 'An extended network of genomic maintenance in the archaeon *Pyrococcus abyssi* highlights unexpected associations between eucaryotic homologs', *PLoS ONE*, 8(11), pp. 1–15. doi: 10.1371/journal.pone.0079707.
- Pohlschroder, M. and Schulze, S. (2019) '*Haloferax volcanii*', *Trends in Microbiology*. Elsevier Ltd, 27(1), pp. 86–87. doi: 10.1016/j.tim.2018.10.004.
- Proshkin, S. *et al.* (2010) 'Cooperation Between Translating Ribosomes and RNA Polymerase in Transcription Elongation', *Science*, 328(5977), pp. 504–508. doi: 10.1126/science.1184939.
- Prunetti, L. *et al.* (2016) 'Deciphering the Translation Initiation Factor 5A Modification Pathway in Halophilic Archaea', *Archaea*, 2016, pp. 1–14. doi: 10.1155/2016/7316725.
- Qureshi, S. A. *et al.* (1995) 'Molecular cloning of the transcription factor TFIIB homolog from *Sulfolobus shibatae*', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(13), pp. 6077–6081. doi: 10.1073/pnas.92.13.6077.
- Rajkovic, A. and Ibba, M. (2017) 'Elongation Factor P and the Control of Translation Elongation', *Annual Review of Microbiology*, 71(1), pp. 117–131. doi: 10.1146/annurev-micro-090816-093629.
- Ramanathan, A., Robb, G. B. and Chan, S. H. (2016) 'mRNA capping: Biological functions and applications', *Nucleic Acids Research*, 44(16), pp. 7511–7526. doi: 10.1093/nar/gkw551.
- Ramírez, C. *et al.* (1993) 'The structure, function and evolution of archaeal ribosomes', *New Comprehensive Biochemistry*, 26(C), pp. 439–466. doi: 10.1016/S0167-7306(08)60263-X.
- Ray, B. K. *et al.* (1985) 'ATP-dependent unwinding of messenger RNA structure by eukaryotic initiation factors', *Journal of Biological Chemistry*, 260(12), pp. 7651–7658.
- Reibarkh, M. *et al.* (2008) 'Eukaryotic initiation factor (eIF) 1 carries two distinct eIF5-binding faces important for multifactor assembly and AUG selection', *Journal of Biological Chemistry*, 283(2), pp. 1094–1103. doi: 10.1074/jbc.M708155200.
- Richard, D. J., Bell, S. D. and White, M. F. (2004) 'Physical and functional interaction of the archaeal single-stranded DNA-binding protein SSB with RNA polymerase', *Nucleic Acids Research*, 32(3), pp. 1065–1074. doi: 10.1093/nar/gkh259.
- Richter, D. and Lipmann, F. (1970) 'Formation of a Ternary Complex between Formylatable Yeast Met-tRNA, GTP and Binding Factor T of Yeast and of *E. coli*', *Nature*, 228(October 17th), pp. 227–231.
- Rippa, V. *et al.* (2010) 'The ribosomal protein L2 interacts with the RNA polymerase  $\alpha$  subunit and acts as a transcription modulator in *Escherichia coli*', *Journal of Bacteriology*, 192(7), pp. 1882–1889. doi: 10.1128/JB.01503-09.

- Rogers, G. W. *et al.* (2001) 'Modulation of the Helicase Activity of eIF4A by eIF4B, eIF4H, and eIF4F', *Journal of Biological Chemistry*, 276(33), pp. 30914–30922. doi: 10.1074/jbc.M100157200.
- Roll-Mecak, A. *et al.* (2000) 'X-Ray Structures of the Universal Translation Initiation Factor IF2/eIF5B', *Cell*, 103(5), pp. 781–792. doi: 10.1016/S0092-8674(00)00181-1.
- Roll-Mecak, A. *et al.* (2004) 'X-ray Structure of Translation Initiation Factor eIF2y: Implications for tRNA and eIF2 $\alpha$  binding', *Journal of Biological Chemistry*, 279(11), pp. 10634–10642. doi: 10.1074/jbc.M310418200.
- Ron, D. and Harding, H. (2007) 'eIF2 Phosphorylation in Cellular Stress Responses and Disease', *Translational Control in Biology and Medicine*, pp. 349–372. doi: 10.1101/087969767.48.345.
- Saini, A. K. *et al.* (2009) 'Regulatory elements in eIF1A control the fidelity of start codon selection Met binding by modulating tRNA i to the ribosome', *Genes & Development*, (24), pp. 97–110. doi: 10.1101/gad.1871910.triplets.
- Saini, A. K. *et al.* (2014) 'Eukaryotic translation initiation factor eIF5 promotes the accuracy of start codon recognition by regulating Pi release and conformational transitions of the preinitiation complex', *Nucleic Acids Research*, 42(15), pp. 9623–9640. doi: 10.1093/nar/gku653.
- Saito, K. *et al.* (2010) 'Omnipotent role of archaeal elongation factor 1 alpha (EF1 ) in translational elongation and termination, and quality control of protein synthesis', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(45), pp. 19242–19247. doi: 10.1073/pnas.1009599107.
- Samson, R. Y., Abeyrathne, P. D. and Bell, S. D. (2016) 'Mechanism of Archaeal MCM Helicase Recruitment to DNA Replication Origins', *Molecular Cell*, 61(2), pp. 287–296. doi: 10.1016/j.molcel.2015.12.005.
- Samson, R. Y. and Bell, S. D. (2014) 'Archaeal Chromosome Biology', *J Mol Microbiol Biotechnol.*, 46(5), p. 795. doi: 10.6009/jjrt.KJ00003532530.
- Santos, H. and da Costa, M. S. (2002) 'Compatible solutes of organisms that live in hot saline environments', *Environmental Microbiology*, 4(9), pp. 501–509. doi: 10.1046/j.1462-2920.2002.00335.x.
- Schlesner, M. *et al.* (2012) 'The protein interaction network of a taxis signal transduction system in a halophilic archaeon', *BMC Microbiology*, 12, pp. 1–20. doi: 10.1186/1471-2180-12-272.
- Schmidt, C. *et al.* (2016) 'Structure of the hypusinylated eukaryotic translation factor eIF-5A bound to the ribosome', *Nucleic Acids Research*, 44(4), pp. 1944–1951. doi: 10.1093/nar/gkv1517.
- Schmidt, C., Beilsten-Edmands, V. and Robinson, C. V. (2016) 'Insights into Eukaryotic Translation Initiation from Mass Spectrometry of Macromolecular Protein Assemblies', *Journal of Molecular Biology*. The Authors, 428(2), pp. 344–356. doi: 10.1016/j.jmb.2015.10.011.
- Schmitt, E. *et al.* (1998) 'Crystal structure of methionyl-tRNA(f)(Met) transformylase complexed with the initiator formyl-methionyl-tRNA(f)(Met)', *EMBO Journal*, 17(23), pp. 6819–6826. doi: 10.1093/emboj/17.23.6819.
- Schmitt, E. *et al.* (2012) 'Structure of the ternary initiation complex aIF2–GDPNP–methionylated initiator tRNA', *Nature Structural & Molecular Biology*. Nature Publishing Group, 19(4), pp. 450–454. doi: 10.1038/nsmb.2259.
- Schmitt, E. *et al.* (2019) 'Start codon recognition in eukaryotic and archaeal translation initiation: A common structural core', *International Journal of Molecular Sciences*, 20(4). doi: 10.3390/ijms20040939.
- Schmitt, E., Blanquet, S. and Mechulam, Y. (2002) 'The large subunit of initiation factor aIF2 is a close structural homologue of elongation factors', *Embo Journal*, 21(7), pp. 1821–1832.
- Schmitt, E., Naveau, M. and Mechulam, Y. (2010) 'Eukaryotic and archaeal translation initiation factor 2: A heterotrimeric tRNA carrier', *FEBS Letters*. Federation of European Biochemical Societies, 584(2), pp. 405–412. doi: 10.1016/j.febslet.2009.11.002.
- Scholzen, T. and Arndt, E. (1991) 'Organization and nucleotide sequence of ten ribosomal protein genes from the region equivalent to the spectinomycin operon in the archaebacterium Halobacterium marismortui', *MGG Molecular & General Genetics*, 228(1–2), pp. 70–80. doi: 10.1007/BF00282450.
- Seino, A. *et al.* (2005) 'Translational control by internal ribosome entry site in *Saccharomyces cerevisiae*', *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression*, 1681(2–3), pp. 166–174. doi: 10.1016/j.bbaexp.2004.11.009.
- Sette, M. (1997) 'The structure of the translational initiation factor IF1 from *E. coli* contains an oligomer-binding motif', *The EMBO Journal*, 16(6), pp. 1436–1443. doi: 10.1093/emboj/16.6.1436.
- Shatsky, I. N. *et al.* (2010) 'Cap- and IRES-independent scanning mechanism of translation initiation as an alternative to the concept of cellular IRESs', *Molecules and Cells*, 30(4), pp. 285–293. doi: 10.1007/s10059-010-0149-1.
- Shin, B. S. *et al.* (2002) 'Uncoupling of initiation factor eIF5B/IF2 GTPase and translational activities by mutations that lower ribosome affinity', *Cell*, 111(7), pp. 1015–1025. doi: 10.1016/S0092-8674(02)01171-6.
- Shine, J. and Dalgarno, L. (1974) 'The 3'-Terminal Sequence of *Escherichia coli* 16S Ribosomal RNA: Complementarity to Nonsense Triplets and Ribosome Binding Sites', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 71(4), pp. 1342–1346. doi: 10.1073/pnas.71.4.1342.

- Simonetti, A. *et al.* (2009) 'A structural view of translation initiation in bacteria', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(3), pp. 423–436. doi: 10.1007/s00018-008-8416-4.
- Simonson, T. and Satpati, P. (2012) 'Nucleotide recognition by the initiation factor aIF5B: Free energy simulations of a neoclassical GTPase', *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 80(12), pp. 2742–2757. doi: 10.1002/prot.24158.
- Soppa, J. (2011) 'Functional genomic and advanced genetic studies reveal novel insights into the metabolism, regulation, and biology of *Haloferax volcanii*', *Archaea*, 2011, pp. 1–14. doi: 10.1155/2011/602408.
- Spivak, G. (2016) 'Transcription-coupled repair: an update', *Archives of Toxicology*, 90(11), pp. 2583–2594. doi: 10.1007/s00204-016-1820-x.
- Srinivasan, G., Krebs, M. P. and RajBhandary, U. L. (2006) 'Translation initiation with GUC codon in the archaeon *Halobacterium salinarum*: Implications for translation of leaderless mRNA and strict correlation between translation initiation and presence of mRNA', *Molecular Microbiology*, 59(3), pp. 1013–1024. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04992.x.
- Stantial, N. *et al.* (2016) 'Transcription-coupled repair of UV damage in the halophilic archaea', *DNA Repair*. Elsevier B.V., 41, pp. 63–68. doi: 10.1016/j.dnarep.2016.03.007.
- Steinchen, W. and Bange, G. (2016) 'The magic dance of the alarmones (p)ppGpp', *Molecular Microbiology*, 101(4), pp. 531–544. doi: 10.1111/mmi.13412.
- Stolboushkina, E. *et al.* (2013) 'Crystal Structure of the Archaeal Translation Initiation Factor 2 in Complex with a GTP Analogue and Met-tRNA<sup>fMet</sup>', *Journal of Molecular Biology*. Elsevier Ltd, 425(6), pp. 989–998. doi: 10.1016/j.jmb.2012.12.023.
- Stroud, A., Liddell, S. and Allers, T. (2012) 'Genetic and biochemical identification of a novel single-stranded DNA-binding complex in *Haloferax volcanii*', *Frontiers in Microbiology*, 3(JUN), pp. 1–14. doi: 10.3389/fmicb.2012.00224.
- Sudhakar, A. *et al.* (1999) 'Serine 48 in initiation factor 2 $\alpha$  (eIF2 $\alpha$ ) is required for high-affinity interaction between eIF2 alpha(P) and eIF2B.', *Biochemistry*, 38(46), pp. 15398–15405. doi: 10.1021/bi991211n.
- Tahara, M. *et al.* (2004) 'In Vitro Phosphorylation of Initiation Factor 2 $\alpha$  (aIF2 $\alpha$ ) from Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus horikoshii* OT3', *Journal of Biochemistry*, 135, pp. 479–485. doi: 10.1093/jb/mvh055vh055.
- Tanaka, S., Kihara, M. and Sugimoto, M. (2015) 'Structure and molecular characterization of barley nudix hydrolase genes', *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. Taylor & Francis, 79(3), pp. 394–401. doi: 10.1080/09168451.2014.978259.
- La Teana, A. *et al.* (2013) 'Translation initiation in the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus*: eukaryotic features but bacterial route.', *Biochemical Society transactions*, 41(1), pp. 350–5. doi: 10.1042/BST20120300.
- La Teana, A., Gualerzi, C. O. and Dahlberg, A. E. (2001) 'Initiation factor IF 2 binds to the  $\alpha$ -sarcin loop and helix 89 of *Escherichia coli* 23S ribosomal RNA', *Rna*, 7(8), pp. 1173–1179. doi: 10.1017/S1355838201010366.
- Tedin, K. *et al.* (1999) 'Translation initiation factor 3 antagonizes authentic start codon selection on leaderless mRNAs', *Molecular Microbiology*, 31(1), pp. 67–77. doi: 10.1046/j.1365-2958.1999.01147.x.
- Terenin, I. M. *et al.* (2008) 'Eukaryotic translation initiation machinery can operate in a bacterial-like mode without eIF2', *Nature Structural and Molecular Biology*, 15(8), pp. 836–841. doi: 10.1038/nsmb.1445.
- Thakur, A., Marler, L. and Hinnebusch, A. G. (2019) 'A network of eIF2 interactions with eIF1 and Met-tRNA<sup>i</sup> promotes accurate start codon selection by the translation preinitiation complex', *Nucleic Acids Research*. Oxford University Press, 47(5), pp. 2574–2593. doi: 10.1093/nar/gky1274.
- Thomm, M. (1996) 'Archaeal transcription factors and their role in transcription initiation', *FEMS Microbiology Reviews*, 18(2–3), pp. 159–171. doi: 10.1016/0168-6445(96)00009-5.
- Thommen, M., Holtkamp, W. and Rodnina, M. V. (2017) 'Co-translational protein folding: progress and methods', *Current Opinion in Structural Biology*. Elsevier Ltd, 42, pp. 83–89. doi: 10.1016/j.sbi.2016.11.020.
- Thompson, G. M. *et al.* (2000) 'Conserved sequences in the  $\beta$  subunit of archaeal and eukaryal translation initiation factor 2 (eIF2), absent from eIF5, mediate interaction with eIF2 $\gamma$ ', *Biochemical Journal*, 347(3), p. 703. doi: 10.1042/0264-6021:3470703.
- Tieg, B. and Krebber, H. (2013) 'Dbp5 — From nuclear export to translation', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*. Elsevier B.V., 1829(8), pp. 791–798. doi: 10.1016/j.bbagr.2012.10.010.
- Tishchenko, S. *et al.* (2008) 'Domain II of *Thermus thermophilus* Ribosomal Protein L1 Hinders Recognition of Its mRNA', *Journal of Molecular Biology*, 383(2), pp. 301–305. doi: 10.1016/j.jmb.2008.08.058.
- Toffano-Nioche, C. *et al.* (2013) 'RNA at 92 °C: The non-coding transcriptome of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus abyssi*', *RNA Biology*, 10(7), pp. 1211–1220. doi: 10.4161/rna.25567.
- Uchiomi, T., Wahba, A. J. and Traut, R. R. (1987) 'Topography and stoichiometry of acidic proteins in large ribosomal subunits from *Artemia salina* as determined by crosslinking.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(16), pp. 5580–5584. doi: 10.1073/pnas.84.16.5580.
- Ude, S. *et al.* (2013) 'Translation Elongation Factor EF-P Alleviates Ribosome Stalling at Polyproline Stretches', *Science*, 339(6115), pp. 82–85. doi: 10.1126/science.1228985.

- Ühlein, M. *et al.* (1998) 'Functional implications of ribosomal protein L2 in protein biosynthesis as shown by in vivo replacement studies', *Biochemical Journal*, 331(2), pp. 423–430. doi: 10.1042/bj3310423.
- Unbehaun, A. *et al.* (2004) 'The 40S subunit in 48S complexes formed at the initiation codon of mRNA is bound to eukaryotic initiation factor (eIF) 3, eIF1, eIF1A, and an eIF2/GTP/Met-tRNA', *Genes & Development*, pp. 3078–3093. doi: 10.1101/gad.1255704.eIF1.
- Valášek, L. *et al.* (2003) 'The yeast eIF3 subunits TIF32/a, NIP1/c, and eIF5 make critical connections with the 40S ribosome in vivo', *Genes & Development*, 17(6), pp. 786–799. doi: 10.1101/gad.1065403.
- Veith, T. *et al.* (2012) 'Structural and functional analysis of the archaeal endonuclease Nob1', *Nucleic Acids Research*, 40(7), pp. 3259–3274. doi: 10.1093/nar/gkr1186.
- Wagner, S. and Klug, G. (2007) 'An Archaeal Protein with Homology to the Eukaryotic Translation Initiation Factor 5A Shows Ribonucleolytic Activity', *Journal of Biological Chemistry*, 282(19), pp. 13966–13976. doi: 10.1074/jbc.M701166200.
- Wang, J. *et al.* (2014) 'CBD binding domain fused  $\gamma$ -lactamase from *Sulfolobus solfataricus* is an efficient catalyst for (-)  $\gamma$ -lactam production', *BMC Biotechnology*, 14(1), p. 40. doi: 10.1186/1472-6750-14-40.
- Wang, J., Dasgupta, I. and Fox, G. E. (2009) 'Many nonuniversal archaeal ribosomal proteins are found in conserved gene clusters', *Archaea*, 2(4), pp. 241–251. doi: 10.1155/2009/971494.
- Warner, J. R. and McIntosh, K. B. (2009) 'How Common Are Extraribosomal Functions of Ribosomal Proteins?', *Molecular Cell*. Elsevier Inc., 34(1), pp. 3–11. doi: 10.1016/j.molcel.2009.03.006.
- Wek, R. C. (2018) 'Role of eIF2 $\alpha$  Kinases in Translational Control and Adaptation to Cellular Stress', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(7), p. a032870. doi: 10.1101/cshperspect.a032870.
- Werner, F. (2007) 'Structure and function of archaeal RNA polymerases', *Molecular Microbiology*, 65(6), pp. 1395–1404. doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.05876.x.
- Werner, F. (2012) 'A nexus for gene expression-molecular mechanisms of Spt5 and NusG in the three domains of life', *Journal of Molecular Biology*. Elsevier Ltd, 417(1–2), pp. 13–27. doi: 10.1016/j.jmb.2012.01.031.
- Werner, F., Eloranta, J. J. and Weinzierl, R. O. . J. (2000) 'Archaeal RNA polymerase subunits F and P are bona fide homologs of eukaryotic RPB4 and RPB12', *Nucleic Acids Research*, 28(21), pp. 4299–4305. doi: 10.1093/nar/28.21.4299.
- Werner, F. and Weinzierl, R. O. J. (2002) 'A Recombinant RNA Polymerase II-like Enzyme Capable of Promoter-Specific Transcription', *Molecular Cell*, 10(3), pp. 635–646. doi: 10.1016/S1097-2765(02)00629-9.
- Wintermeyer, W. and Gualerzi, C. (1983) 'Effect of *Escherichia coli* initiation factors on the kinetics of N-AcPhe-tRNA<sup>Phe</sup> binding to 30S ribosomal subunits. A fluorescence stopped-flow study', *Biochemistry*, 22(3), pp. 690–694. doi: 10.1021/bi00272a025.
- Woese, C. R. and Fox, G. E. (1977) 'Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(11), pp. 5088–5090. doi: 10.1073/pnas.74.11.5088.
- Woese, C. R., Kandler, O. and Wheelis, M. L. (1990) 'Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(12), pp. 4576–4579. doi: 10.1073/pnas.87.12.4576.
- Wolff, E. C. *et al.* (2007) 'Posttranslational synthesis of hypusine: evolutionary progression and specificity of the hypusine modification', *Amino Acids*, 33(2), pp. 341–350. doi: 10.1007/s00726-007-0525-0.
- Wool, I. G., Chan, Y. L. and Glück, A. (1995) 'Structure and evolution of mammalian ribosomal proteins.', *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*, 73(11–12), pp. 933–947. doi: 10.1139/o95-101.
- Wurtzel, O. *et al.* (2010) 'A single-base resolution map of an archaeal transcriptome', *Genome Research*, 20(1), pp. 133–141. doi: 10.1101/gr.100396.109.
- Yamamoto, H. *et al.* (2014) 'Structure of the mammalian 80S initiation complex with initiation factor 5B on HCV-IRES RNA', *Nature Structural & Molecular Biology*, 21(8), pp. 721–727. doi: 10.1038/nsmb.2859.
- Yang, J., Wagner, S. A. and Beli, P. (2015) 'Illuminating spatial and temporal organization of protein interaction networks by mass spectrometry-based proteomics', *Frontiers in Genetics*, 6(DEC), pp. 1–7. doi: 10.3389/fgene.2015.00344.
- Yang, W. (2011) 'Nucleases: diversity of structure, function and mechanism', *Quarterly Reviews of Biophysics*, 44(1), pp. 1–93. doi: 10.1017/S0033583510000181.
- Yanofsky, C. (2000) 'Transcription attenuation: Once viewed as a novel regulatory strategy', *Journal of Bacteriology*, 182(1), pp. 1–8. doi: 10.1128/JB.182.1.1-8.2000.
- Yanofsky, C. and Ito, J. (1966) 'Nonsense codons and polarity in the tryptophan operon', *Journal of Molecular Biology*, 21(2), pp. 313–334. doi: 10.1016/0022-2836(66)90102-1.
- Yatime, L. *et al.* (2005) 'Structure - Function relationships of the intact aIF2 $\alpha$  subunit from the archaeon *Pyrococcus abyssi*', *Biochemistry*, 44(24), pp. 8749–8756. doi: 10.1021/bi050373i.

Yatime, L. *et al.* (2007) 'Structure of an archaeal heterotrimeric initiation factor 2 reveals a nucleotide state between the GTP and the GDP states', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(47), pp. 18445–18450. doi: 10.1073/pnas.0706784104.

Yoshimura, K. and Shigeoka, S. (2015) 'Versatile physiological functions of the Nudix hydrolase family in Arabidopsis', *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. Taylor & Francis, 79(3), pp. 354–366. doi: 10.1080/09168451.2014.987207.

Yu, Y. *et al.* (2009) 'Position of eukaryotic translation initiation factor eIF1A on the 40S ribosomal subunit mapped by directed hydroxyl radical probing', *Nucleic Acids Research*, 37(15), pp. 5167–5182. doi: 10.1093/nar/gkp519.

Zeman, J. *et al.* (2019) 'Binding of eIF3 in complex with eIF5 and eIF1 to the 40S ribosomal subunit is accompanied by dramatic structural changes', *Nucleic Acids Research*, 47(15), pp. 8282–8300. doi: 10.1093/nar/gkz570.

Zheng, A. *et al.* (2014) 'X-ray structures of eIF5B and the eIF5B-eIF1A complex: The conformational flexibility of eIF5B is restricted on the ribosome by interaction with eIF1A', *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 70(12), pp. 3090–3098. doi: 10.1107/S1399004714021476.

Zheng, X. *et al.* (2011) 'Leaderless genes in bacteria: Clue to the evolution of translation initiation mechanisms in prokaryotes', *BMC Genomics*. BioMed Central Ltd, 12(1), p. 361. doi: 10.1186/1471-2164-12-361.

## 6 Anhang

### 6.1 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Ausgeschrieben
aIF	Archaealer Translationsinitiationsfaktor
AK	Antikörper
A	<i>Aminoacyl-tRNA</i>
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BCA	Bicinchoninic acid
bideist.	bidestilliert
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CAS	Casaminsäuren
ca.	circa
cDNA	complementary DNA
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DNase	Desoxyribonuklease
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ECL	<i>Enhanced chemoluminescence</i>
E	<i>Exite</i>
eIF	Eukaryotischer Translationsinitiationsfaktor
EtOH	Ethanol
h	<i>hour/s</i> (Stunde/n)
HRP	<i>horse raddish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
IF	Translationsinitiationsfaktor
g	Gramm
GAP	GTPase aktivierende Proteine
GEF	Guanin-Nukleotid-Austausch-Faktoren
IgG	Immunglobulin G
GTPase	Enzym das Guanosintriphosphat hydrolysiert (gehört zur großen Familie der Hydrolaseenzyme)
IRES	<i>Internal ribosome entry site</i>
GTP	Guanosintriphosphat
GDP	Guanosindiphosphat
ITAF	<i>IRES transacting factors</i>
Kb	Kilobasen
H <sup>+</sup>	Wasserstoffionen
HCl	Salzsäure
µL	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromol
mA	Milliampere
mAU	<i>milli absorption units</i>
L	Liter
M	Mol



mg	Milligramm
min	Minute/n
mL	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	Messenger RNA
MTP	Mikrotiterplatte
Novo	Novobiocin
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nt	Nukleotid
OD	Optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i> (offener Leserahmen)
Ori	<i>origin of replication</i> (Replikationsursprung)
RNAPU	<i>RNA-Polymerase-Untereinheit</i>
rpL	<i>50S ribosomal subunit protein</i>
rpS	<i>30S ribosomal subunit protein</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (phosphatgepufferte Salzlösung)
PEG	Polyethylenglycol
P	<i>Peptidyl-tRNA</i>
P0	<i>50S ribosomal protein L10</i>
P1	<i>50S ribosomal protein L12</i>
<i>P-stalk</i>	<i>L12-stalk</i>
pmol	Picomol
RBS	Ribosomenbindestelle
pH	<i>Potentia Hydrogenii</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAPUs	<i>RNA-polymerase subunits</i>
RNase	Ribonuklease
rRNA	Ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde/n
SD	Shine-Dalgarno
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sRNA	<i>Small RNA</i>
SSC	<i>Saline sodium citrate</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TMAO	Trimethylaminoxid
TR	<i>transcriptional/transcription regulator</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
UE	Untereinheit
upm	Umdrehungen pro Minute
UTR	Untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
VE	Vollentsalzt
WT	Wildtyp
z.B.	Zum Beispiel







Hvo_aIF2Bdelta1	MDDRVHPEVRRATEIDTMEIRGAATIADAAARALRTQATESDAADAEAFRAELRATART	60
HVO_aIF2Bdelta2	-----MIDETIEEIREMQTHSSVAVKATRAL-AELTERDYATVEEFERDLERNVGA	52
	: . * ** * : : : : * * : * * * : * * * * * * : * . . . :	
Hvo_aIF2Bdelta1	LHETRPTAVSLPNALRYVLRDMSSTT--VEGLRQSVWDSADEFCARLERAQADLGQVGAN	118
HVO_aIF2Bdelta2	LKRANPASHASLYNALQOVLHVSVOGEADDLEARELTLSTIDRVVETVETGKRHAAQAAA	112
	* : : * : * * * * * : * : : : : * : : : * : * : * : * : * : * :	
Hvo_aIF2Bdelta1	RLRDGDTIMTHCHSDALACVEAAVEQGKHI EAVVKE TRPRNQGHITAKRLHEL G-VPVT	177
HVO_aIF2Bdelta2	TIEDGQTF LTHDYSSTVMEAVE LAVADGAQLTAYVTEARPRFLGRKFARELAAIDDDVEPH	172
	: * * * * * : * : : * * * * * : * : * * * * * : * : * : * :	
Hvo_aIF2Bdelta1	LIVDSAARRYLNDVHVLVGADAVAADGVSINKIGTSGLAVNARERGTPIMVAAQTLKLH	237
HVO_aIF2Bdelta2	LMVDGASGMFLPGCDRVIIGMDCIVE-ETLYNRIGTFPLVAAANEVGPVTVVSGGAKVV	231
	* : * * * * * : * : * * * * * : * : * * * * * : * : * * * * * :	
Hvo_aIF2Bdelta1	PGTMTGHTVDIEMRDTAEVDDTLADLGNPTVKNPADFVTPPRYVDAIVTERGQFPPE	297
HVO_aIF2Bdelta2	DGGF---RFENEIRSPSE---VMLEPVEGIELENPAYDATPVLDIDEVITDEGVIEF--	282
	* : : * : * : * * : * : : : * * * * * * * : * : * : * * :	
Hvo_aIF2Bdelta1	IVILMRELFEGGTSEPMAEPSRAEP 323	
HVO_aIF2Bdelta2	----- 282	

**Abbildung 71: Sequenz-Alignment von aIF2B $\delta$ -1 und aIF2B $\delta$ -2**

Das Sequenz-Alignment wurde mittels Clustal Omega mit den Sequenzen aIF2B $\delta$ -1 (HVO\_0966; L9USK7) und aIF2B $\delta$ -2 (HVO\_2706; D4GW08) durchgeführt. Die beiden Proteine sind zu 30,2 % identisch.

Sce_eIF5A	MSDEEHFTETADAGSSATYPMQCSALRKNGFVVIKSRPCKIVDMSTKTGKHGHAKVHLV	60
Sso_eIF5A	-----MSITYTTVGGELKVGSYVVIDGEPGRVVEVTKAKTGKHGSAKANVV	45
Hsal_eIF5A	-----MAKEQKEVRDLQEGNYVMMEDAACQINAYSTAKPGKHGSAKARIE	45
Hvo_aIF5A	-----MAKEQKQVRELQEGSYVMMEKPKINAYSTAKPGKHGSAKARVE	45
	: : * : : * : : * : : * : : * : : * * * * * * : :	
Sce_eIF5A	AIDIFTGKKLEDLSPSTHNMEVPPVVRKNEYQLLDIDD-GFLSLMNDGDTKDDVKAPEG-	118
Sso_eIF5A	AIGVFSGAKKTLMAPVDQQVEVPIIEKHIGQIIADMG-NKIQVMDLESYETFEIEKPTED	104
Hsal_eIF5A	AEGVFDGKKRSLSQPVDAKIHWPIVNRKQGQIVSKESDTVAQVMDLETYETVTMQIPGEL	105
Hvo_aIF5A	ARGVFDGKKRSLSQPVDAKVWVPIIERKQGQVSVTG-EDAQIMDLETYQTFMTRIPDEE	104
	* : * * * * * * : * : * * * * * * : * : : * : : * : : * :	
Sce_eIF5A	ELGDSLQTAFDGKDLMVTIISAMGEEAAISFKEAARD 157	
Sso_eIF5A	ELASKIKPN-----AELEYWEIMGRRKIVRVK----- 131	
Hsal_eIF5A	D----IQAD-----ENIEYLEFEGQRKILQE----- 127	
Hvo_aIF5A	D----LNPE-----DEIEYLEYEGQRKIV----- 124	
	: : : : : * : : :	

**Abbildung 72: Sequenz-Alignment von aIF5A aus *H. volcanii***

Das Sequenz-Alignment wurde für *S. cerevisiae* (eIF5A, P23301), *S. solfataricus* (eIF5A, Q97ZE8), *H. salinarum* (eIF5A, Q9HP78) und *H. volcanii* (aIF5A, D4GWG6) durchgeführt. Für aIF5A aus *H. volcanii* konnte mit eIF5A aus *S. cerevisiae* eine zu 26 % identische Aminosäuresequenz gezeigt werden. Für *S. solfataricus* konnte die Sequenzidentität mit 46,9 % und für *H. salinarum* mit 72,8 % bestimmt werden.

```
>Hvo_D4GTJ2_aIF5B
MSDSTDSTQSQDTRLTPIVAVLGRVDIGKTSLLDKIRGSVAVSEGEAGAITQIGATAVPLD
TVSQMAGSLVKPEDFDLPGLLFIDTPGHSFSTLRSRGGALADIAILVVDVNSDFQPQTE
EAIDILKRTGTPFIVAANKIDTTPGWNPEGAPIQKTYEEQSQRARSKLDEKLYEIIIGEL
SDRGFSSDFYWRVQNFQSNIGVVPVSALTGEGIPDLLGVLGMLSQRYMKDEMAIDVAGPG
SGTVLEVKEERFGATLDVVLYDGTIRAGDVTVVGGANDPIVTEVRALLQPRPNAEIRTE
KRFDKVEEVRAAGVKIAAPDLEDAMAGAPVRVVGDRDLDEVVREVEAELADIEVTTEEE
GVVVKADTLGSLAMANALQEAEPVILRAEVDVAPRDVAVASTAREPEKVLIGFNVDV
LSNAEAEALDKNDVKLFEDDVIYQLVEEYEDVNMEMKRAQQTILDKIVRPCRFRILQDQV
FRQNNPAVVGVEVMSGTKNNMNVVKWEDGEPNRVGLSGIQENGEDVSSARAGSRVSA
IDGPTVGRQIAEGDELWIELPEKAKILEQELRDDIPTDELEALSGYLEKRRRDPFWGK
```

**Abbildung 73: Sequenz-Alignment von aIF5B aus *H. volcanii***

Das Sequenz-Alignment wurde für aIF5B/eIF5B aus *S. cerevisiae* (P39730), *H. sapiens* (O60841), *H. volcanii* (G0LMM9), *H. walsbyi* (G0LMM9) und *H. salinarum* (A0A510N889) durchgeführt (A). Alle Histidine die in der natürlichen Aminosäure-Sequenz von aIF5B in *H. volcanii* enthalten sind wurden rot markiert (B).

**A**

Hvo_rpoD	-MVNDFQVEFIEREDRRARFVARGLTPALANGIRRAMVADVPTFSIDTVRFVENTSVMF	59
Sc_e_rpb3	MSEEGPQVKIREASKDNVDFILSNVDLAMANSLRRVMIAEIPTLAIDSVEVETNTTVLAD	60
	: : * : : * : : : * : : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : *	
Hvo_rpoD	EMIGRLGLVPLTTPLD-DFEPG-----DTVTVAL--EV---DGPATAYSGDIES	103
Sc_e_rpb3	EFIAHRLGLIPLQSMIDIEQLYSRDCFEDHCDKCSVVLTLQAFGESESTTNVYSKDLVI	120
	* : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
Hvo_rpoD	ADDIMV-----PADENIPIIELKEGORLEFEADAVLGHGKDHAKNQGGVAVGYR-	152
Sc_e_rpb3	VSNLMGRNIGHPIIQDKEGNGVLIICKLRKGQELKLTCAKKGIKAEHAKWGPAAAEFEFY	180
	: : : : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : *	
Hvo_rpoD	-HLQRVEVVGDAGEFDEQEPNILRGVIEAAAAEHAEGDAEDGDLVATETFGNDLTERYPG	211
Sc_e_rpb3	DPNMLKHK---TDYWYEQDS-----AKENPQS--KN-----CEYE---DPPNEG	216
	: : : : : : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : *	
Hvo_rpoD	KEVEHDVPGAFVFSVETDGSFDVDELVTRAVASLGDRAAELEEKVAL-----	259
Sc_e_rpb3	DPFDYKAQADTFYMNVESVGSIPVDQVVRGIDTLQKKVASILLALTQMDQDKVNFASGD	276
	: : : : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : *	
Hvo_rpoD	-----	259
Sc_e_rpb3	NNTASMLGSNEDVMMTGAEQDPYSNASQMGNTGSGGYDNAW	318

---

**B**

Hvo_rpoD	-----MVNDFQVEFIERED	14
Eco_rpoD	MEQNPSQLKLLVTRGKQGYLTYAEVNDHLPEDIVDSQIEDIIQMINDMGIQVMEEAP	60
	: : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : *	
Hvo_rpoD	RRARFVARG-----LT	25
Eco_rpoD	DADDMLAENTADEDAEAAAQVLSVSESEIGRTTDPVRMYMREMGTVELLTREGEDIA	120
	: : : : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : *	
Hvo_rpoD	PALANGIRRAM--VADVPTFSIDTVRFVENTSVMFDEMIGRLGLVPLTTPLDDEF	80
Eco_rpoD	KRIEDGINQVQCSVAEYPEAITYLLEQYDRVEAEEARL---SDLITGFVDPNA--EEDLAP	176
	: : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : *	
Hvo_rpoD	GDT-VTV----ALEVDGPATAYSGDIESADD--MVVPADENIPIIELKEGORLEFEADA	132
Eco_rpoD	TATHVGSLSQEDLDDEDEDEEDGDDSDADDNSIDPELAREKFAELRA--QYVTRDT	234
	* : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
Hvo_rpoD	VLGHGKDHAKNQGGVAVGYRHLQRVEVVGDAGEF-----DEQEPNILRGVIE-	179
Eco_rpoD	IKAKGRSHATAQEEILKLSSEVFKQFRLVPKQFDYLVNSMRVMMDRVRTQERLIMKLCVEQ	294
	: : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : *	
Hvo_rpoD	-----	179
Eco_rpoD	CKMPKKNFITLFTGNETSOTWFAAIAMNKPWSEKLDHVSSEVHRALQKLQIEEETGLT	354
Hvo_rpoD	-----	179
Eco_rpoD	IEQVKDINRRMSIGAKARRAKKEMVEANLRLVISIAKKYTNRGLQFLDLIQEGNIGLMK	414
Hvo_rpoD	-----	179
Eco_rpoD	AVDKFEYRRGYKFSYATWIRQAITRSIADQARTIRIPVHMIETINKLNIRISRQMLQEM	474
Hvo_rpoD	-----EAAAEHAEGDAED---GDL-----	195
Eco_rpoD	GREPTPEELAEERMLMPEDKIRKVLKIAKEPISMETPIGDDEDSHLGDFIEDTTLEPLDS	534
	: : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : *	
Hvo_rpoD	-----VATETFGNDLTERYPGKEVEVHDVPGAFVFSVETDGS	232
Eco_rpoD	ATTESLRAATHDVLGLTAREAKVLRMRFGIDMNTDYTLEEVG-----KQ	579
	* : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
Hvo_rpoD	FDVDELVTRAVASLGDRAAELEEKVA-L-----	259
Eco_rpoD	FDVTRERIRQIEAKALRKLHPSRSEVLRSFLDD	613
	* : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	

**Abbildung 74: Sequenz-Alignment von rpoD aus *H. volcanii***

Ein Sequenz-Alignment wurde für rpoD aus *H. volcanii* (D4GWY4) und *S. cerevisiae* (rpb3, P16370) durchgeführt. Die Sequenzen sind zu 24 % identisch (A). Das andere Sequenz-Alignment wurde für rpoD aus *H. volcanii* (D4GWY4) und *E. coli* (rpoD, P00579) durchgeführt. Die Sequenzen sind zu 17 % identisch (B).

## 6.3 Zusammenfassung MS-Daten aIFs

Tabelle 90: aIFs-MS-Daten Translation

			14 aIFs → Translation													
Genloci	Accession	Description	aIF1	aIF1A-1	aIF1A-2	aIF2α	aIF2β-1	aIF2β-2	aIF2γ	aIF2Bα	aIF2Bδ-1	aIF2Bδ-2	eIF4A-hom	aIF5A	aIF5B	aIF6
HVO_1946	D4GTH5	aIF1	B			*										
HVO_0136	D4GZ79	aIF1A-1		B												
HVO_A0637	D4GRU5	aIF1A-2	+		B											
HVO_0699	D4GT46	aIF2α				B	+	+	+		+				+	
HVO_1678	D4GZP2	aIF2β-1					B									
HVO_2242	L9VAS4	aIF2β-2				+		B	+		+					
HVO_1901	D4GTD4	aIF2γ				+	+	+	B		+					
HVO_1934	D4GTG3	aIF2Bα								B						
HVO_0966	L9USK7	aIF2Bδ-1	+	+	+	+			+	+	B			+	+	+
HVO_2706	L9V7F9	aIF2Bδ-2										+	B			
HVO_1333	D4GKX1	eIF4A-hom.												B		
HVO_2300	L9V7A1	aIF5A													B	
HVO_1963	D4GTJ2	aIF5B	+	+	+	+		+	+	+	+			+	+	B
HVO_0117	L9UI67	aIF6														B
HVO_2413	L9V6J4	aEF1α	+	+	+	+		+	+	+	+			+	+	+
HVO_2575	L9V605	aEF1α-like protein	+			+					+			+	+	+
HVO_0356	L9UK07	aEF2	+	+		+		+	+	+	+			+	+	+
HVO_2773	L9V5L7	30S rpS2												+		
HVO_2558	D4GTZ0	30S rpS3	+											+		
HVO_1145	D4GWA5	30S rpS3Ae						+						+		
HVO_2552	L9V7Y2	30S rpS4e	+											+	+	
HVO_2544	D4GTX6	30S rpS5				+								+		
HVO_0354	L9UJR0	30S rpS7	+											+		
HVO_0360	L9ULL7	30S rpS10	+													+
HVO_2782	L9V5R1	30S rpS11						+						+		
HVO_2784	L9V5M6	30S rpS13	+											+		
HVO_1148	L9UVI2	30S rpS15												+		
HVO_2555	D4GTY7	30S rpS17												+		
HVO_2560	L9V659	30S rpS19P	+	+										+		
HVO_1896	D4GTC9	30S rpS24e	+													
HVO_2757	P41199	50S rpL1	+			+					+	+	+	+	+	+
HVO_2561	D4GTZ3	50S rpL2	+	+				+	+	+	+			+	+	+
HVO_2564	L9V5K9	50S rpL3	+					+			+			+	+	+
HVO_2563	D4GTZ5	50S rpL4	+	+				+			+			+		+
HVO_2548	L9V5X7	50S rpL6									+			+		
HVO_2756	P41198	50S rpL10	+			+					+			+		
HVO_0484	D4GS24	50S rpL10e				+										
HVO_2778	D4GWY1	50S rpL13	+													
HVO_0561	L9UPT6	50S rpL15e				+										
HVO_2545	P50563	50S rpL18						+			+					
HVO_2779	D4GWY3	50S rpL18e	+					+			+					
HVO_2559	L9V5K3	50S rpL22	+					+		+	+			+	+	
HVO_2553	L9V5Y5	50S rpL24			+											
HVO_2543	L9V5X1	50S rpL30	+	+		+		+		+	+			+	+	
HVO_2547	D4GTX9	50S rpL32e	+													
HVO_2736	D4GW73	tRNA(Met) cytidine acetyl. TmcA	+			+								+		
HVO_0911	D4GUZ0	GTP-binding protein Drg											+			

Tabelle 91: aIFs-MS-Daten Transcription

			14 aIFs → Transcription													
Genloci	Accession	Description	aIF1	aIF1A-1	aIF1A-2	aIF2α	aIF2β-1	aIF2β-2	aIF2γ	aIF2Bα	aIF2Bβ-1	aIF2Bβ-2	eIF4A-hom	aIF5A	aIF5B	aIF6
HVO_0349	D4GZX6	rpoA1	+	+		+					+		+	+	+	
HVO_0350	D4GZX7	rpoA2	+			+					+		+			
HVO_0348	L9UJM2	rpoB1	+													
HVO_0347	L9UK99	rpoB2	+			+			+		+		+	+	+	
HVO_2781	L9V5W2	rpoD	+								+					
HVO_2748	D4GWA3	rpoF									+					
HVO_0346	D4GZX3	rpoH									+					
HVO_1042	D4GVL8	rpoL	+													
HVO_2029	L9VBJ7	AsnC family transcriptional regulator			+						+					
HVO_A0135	D4GQG4	HTH domain protein	+													
HVO_1133	D4GW85	HTH domain protein	+	+					+	+	+		+			
HVO_1695	D4H040	HTH domain protein	+	+										+	+	
HVO_A0121	D4GQF3	HTH-10 family transcription regulator	+			+							+		+	
HVO_1501	D4GYE7	HTH-type transcriptional regulator GlpR	+													+
HVO_B0114	D4GPB5	IcIR family transcription regulator	+								+		+		+	+
HVO_B0201	D4GPK2	IcIR family transcription regulator														+
HVO_A0583	D4GRP3	IcIR family transcription regulator	+											+	+	
HVO_2108	D4GUQ5	IcIR family transcription regulator	+	+	+	+	+	+		+	+		+	+	+	+
HVO_B0066	D4GP68	Lrp/AsnC family transcription regulator	+													+
HVO_1792	D4GSB6	Lrp/AsnC family transcription regulator	+		+	+				+	+		+		+	+
HVO_0240	D4GZL5	Lrp/AsnC family transcription regulator									+					
HVO_2869	D4GXH6	PadR family transcription regulator	+							+			+			
HVO_0730	D4GT98	PadR family transcription regulator RosR									+					
HVO_1090	D4GW09	Putative transcription factor									+					
HVO_0406	D4GRU7	RNA-binding protein AU-1														
HVO_2723	D4GW47	RNA-binding protein Lsm	+			+					+					+
HVO_0819	D4GUE2	SirR/DtxR family transcription regulator SirR	+										+	+	+	
HVO_1727	L9VGC6	TATA-box-binding protein	+			+					+		+			
HVO_B0382	D4GQ28	TATA-box-binding protein														
HVO_0158	D4GZA2	TATA-box-binding protein 1									+					
HVO_2067	D4GU80	TetR family transcription regulator	+													
HVO_A0161	L9V4Z6	TetR family transcriptional regulator	+													
HVO_0163	L9UFW5	Transcriptional regulator	+		+	+				+	+		+	+	+	+
HVO_0179	L9UGU5	Transcriptional regulator	+						+	+	+		+	+	+	+
HVO_2928	L9UK32	Transcriptional regulator	+	+	+	+	+			+	+	+	+		+	+
HVO_0568	L9UN99	Transcriptional regulator	+													
HVO_2636	L9V878	Transcriptional regulator				+										
HVO_1360	D4GXQ1	TrmB family transcription regulator	+													
HVO_2688	D4GVQ2	TrmB family transcription regulator TrmB									+					
HVO_1174	L9UT88	Transcription factor E	+								+					



Tabelle 92: aIFs-MS-Daten Protein folding

			14 aIFs → Protein folding													
Genloci	Accession	Description	aIF1	aIF1A-1	aIF1A-2	aIF2α	aIF2β-1	aIF2β-2	aIF2γ	aIF2Bα	aIF2Bβ-1	aIF2Bβ-2	eIF4A-hom	aIF5A	aIF5B	aIF6
HVO_0329	L9UK29	Branched-chain amino acid aminotransferase										+				
HVO_1590	L9VEI0	Chaperone protein DnaK	+											+		
HVO_0450	D4GRZ1	Hsp20-type molecular chaperone				+										
HVO_0321	D4GZV0	Peptide chain release factor subunit 1	+									+		+		

Tabelle 93: aIFs-MS-Daten Replication and Repair

			14 aIFs → Replication and Repair													
Genloci	Accession	Description	aIF1	aIF1A-1	aIF1A-2	aIF2α	aIF2β-1	aIF2β-2	aIF2γ	aIF2Bα	aIF2Bβ-1	aIF2Bβ-2	eIF4A-hom	aIF5A	aIF5B	aIF6
HVO_0853	D4GUK0	DNA double-strand break repair protein Mre11	+											+	+	
HVO_0854	D4GUK1	DNA double-strand break repair Rad50 ATPase	+											+	+	+
HVO_0551	L9UMB1	DNA mismatch repair protein MutL	+								+					
HVO_0552	D4GSE9	DNA mismatch repair protein MutS	+								+		+	+	+	
HVO_0104	Q48328	DNA repair and recombination protein RadA	+			+				+	+		+	+	+	+
HVO_2383	L9V6G6	DNA repair and recombination protein RadB	+	+		+				+	+		+	+	+	+
HVO_1723	L9VE99	Putative DNA helicase Rad25	+								+		+	+	+	
HVO_1573	D4GZ02	DNA gyrase subunit A	+								+		+			
HVO_0858	L9US19	DNA polymerase B1	+								+					
HVO_0175	D0VWY8	DNA polymerase sliding clamp									+					
HVO_0393	L9UJI6	Excinuclease ABC subunit A									+					
HVO_0283	L9UK77	Helicase AshA									+					
HVO_1537	D4GY11	Orc1-type DNA replication protein	+													+
HVO_0194	L9UGW2	ORC1-type DNA replication protein	+							+	+		+			+
HVO_3014	D4GYC9	Origin-associated GTP-binding protein	+								+					
HVO_0415	D4GRV6	Repair helicase UvrD				+					+					
HVO_0292	L9UJU8	Replication factor A				+					+					
HVO_2427	D4GSN1	Replication factor C large subunit									+					
HVO_0203	L9UG08	Replication factor C small subunit									+					
HVO_0519	D4GS55	Replication protein A									+					
HVO_1570	L9VEU6	Type 2 DNA topoisomerase 6 subunit A	+								+					
HVO_1571	L9VEG4	Type 2 DNA topoisomerase 6 subunit B				+					+		+			

Tabelle 94 aIFs-MS-Daten RNA turnover

			14 aIFs → RNA turnover													
Genloci	Accession	Description	aIF1	aIF1A-1	aIF1A-2	aIF2 $\alpha$	aIF2 $\beta$ -1	aIF2 $\beta$ -2	aIF2 $\gamma$	aIF2B $\alpha$	aIF2B $\delta$ -1	aIF2B $\delta$ -2	eIF4A-hom	aIF5A	aIF5B	aIF6
HVO_0783	L9UNA4	ATP-dependent protease Lon											+			
HVO_2438	L9V6L9	Ribonuclease H I				+										
HVO_2724	L9V5P6	Ribonuclease J	+	+				+			+					
HVO_1094	D4GW15	Ribonuclease P protein component 3	+											+	+	
HVO_0388	L9UJI9	Ribonuclease R	+							+	+			+	+	+
HVO_0144	L9UHH9	Ribonuclease Z	+		+									+	+	+

Tabelle 95: aIFs-MS-Daten Protein turnover

			14 aIFs → Protein turnover													
Genloci	Accession	Description	aIF1	aIF1A-1	aIF1A-2	aIF2 $\alpha$	aIF2 $\beta$ -1	aIF2 $\beta$ -2	aIF2 $\gamma$	aIF2B $\alpha$	aIF2B $\delta$ -1	aIF2B $\delta$ -2	eIF4A-hom	aIF5A	aIF5B	aIF6
HVO_0829	D4GUG3	Peptidase S9 family protein	+									+				+
HVO_1091	Q9V2V6	Proteasome subunit alpha 1										+				
HVO_2923	Q9V2V5	Proteasome subunit alpha 2										+				
HVO_1562	L9VFN7	Proteasome subunit beta											+			
	L9UQ37	Proteasome-activating nucleotid.												+		
HVO_0455	O30560	Thermosome subunit 2	+	+		+		+		+	+	+	+	+	+	+
HVO_0778	Q9HHA2	Thermosome subunit 3	+			+		+		+	+	+	+	+	+	+

## 6.4 Zusammenfassung MS-Daten RNAPUs

Tabelle 96: RNAPU-MS-Daten Transcription

7 RNAPUs → Transcription									
Genloci	Accession	Description	rpoA1	rpoA2	rpoB1	rpoB2	(rpoD)	rpoH	rpoL
HVO_0349	D4GZX6	rpoA1	bait	+	+	+	+	+	+
HVO_0350	D4GZX7	rpoA2	+	bait	+	+	+	+	+
HVO_0348	L9UJM2	rpoB1	+	+	bait	+		+	+
HVO_0347	L9UK99	rpoB2	+	+	+	bait	+	+	+
HVO_2781	L9V5W2	rpoD	+	+	+	+	(bait)	+	+
HVO_0346	D4GZX3	rpoH	+	+	+	+		bait	+
HVO_1042	D4GVL8	rpoL	+	+	+	+		+	bait
HVO_2776	D4GWX5	rpoN	+	+	+	+		+	+
HVO_0653	L9UMK6	rpoP	+		+	+		+	+
HVO_2748	D4GWA3	rpoF						+	
HVO_2110	L9V9M0	ArcR family transcription regulator	+						
HVO_1116	D4GW55	HTH domain protein			+		+		
HVO_1133	D4GW85	HTH domain protein	+		+	+	+	+	+
HVO_0962	D4GV69	HTH domain protein						+	
HVO_1695	D4H040	HTH domain protein	+		+	+		+	+
HVO_A0121	D4GQF3	HTH-10 family transcription regulator	+						
HVO_1501	D4GYE7	HTH-type transcriptional regulator GlpR	+					+	+
HVO_2108	D4GUQ5	lclR family transcription regulator	+	+	+	+	+	+	+
HVO_A0583	D4GRP3	lclR family transcription regulator	+					+	
HVO_B0114	D4GPB5	lclR family transcription regulator	+	+	+	+		+	+
HVO_B0201	D4GPK2	lclR family transcription regulator	+			+	+		
HVO_1792	D4GSB6	Lrp/AsnC family transcription regulator	+		+	+	+	+	+
HVO_B0066	D4GP68	Lrp/AsnC family transcription regulator						+	
HVO_2869	D4GXH6	PadR family transcription regulator	+			+			+
HVO_0819	D4GUE2	SirR/DtxR family transcription regulator SirR	+		+	+		+	+
HVO_0163	L9UFW5	Transcriptional regulator	+		+	+	+	+	+
HVO_0179	L9UGU5	Transcriptional regulator	+		+	+		+	+
HVO_1360	D4GXQ1	TrmB family transcription regulator						+	
HVO_0568	L9UN99	Transcriptional regulator	+						
HVO_2928	L9UK32	Transcriptional regulator	+		+	+	+	+	+
HVO_2636	L9V878	Transcriptional regulator						+	
HVO_2723	D4GW47	RNA-binding protein Lsm	+					+	
HVO_1727	L9VGC6	TATA-box-binding protein			+	+	+	+	

Tabelle 97: RNAPU-MS-Daten Translation

7 RNAPUs → Translation									
Genloci	Accession	Description	rpoA1	rpoA2	rpoB1	rpoB2	(rpoD)	rpoH	rpoL
HVO_0699	D4GT46	aIF2 $\alpha$						+	
HVO_1934	D4GTG3	aIF2B $\alpha$				+			
HVO_0966	L9USK7	aIF2B $\delta$ -1	+	+	+	+	+	+	+
HVO_1963	D4GTJ2	aIF5B	+	+	+	+		+	+
HVO_2575	L9V605	aEF1 $\alpha$ -like protein	+		+	+		+	+
HVO_2413	L9V6J4	aEF1 $\alpha$	+	+	+	+		+	+
HVO_0356	L9UK07	aEF2	+	+	+	+	+	+	+
HVO_2558	D4GTZ0	30S ribosomal protein S3						+	
HVO_2552	L9V7Y2	30S ribosomal protein S4e	+	+	+	+		+	
HVO_2544	D4GTX6	30S ribosomal protein S5			+				
HVO_2373	D4GWM1	30S ribosomal protein S8e					+		
HVO_0360	L9ULL7	30S ribosomal protein S10	+		+			+	
HVO_2784	L9V5M6	30S ribosomal protein S13				+			
HVO_2560	L9V659	30S ribosomal protein S19P			+	+		+	
HVO_1896	D4GTC9	30S ribosomal protein S24e					+		
HVO_2757	P41199	50S ribosomal protein L1	+		+	+	+	+	+
HVO_2561	D4GTZ3	50S ribosomal protein L2	+		+	+	+	+	+
HVO_2564	L9V5K9	50S ribosomal protein L3	+		+	+	+	+	+
HVO_2563	D4GTZ5	50S ribosomal protein L4			+	+			
HVO_2756	P41198	50S ribosomal protein L10			+	+		+	
HVO_0484	D4GS24	50S ribosomal protein L10e			+				
HVO_2758	P41200	50S ribosomal protein L11	+		+	+	+		+
HVO_2542	L9V7W8	50S ribosomal protein L15			+				
HVO_0561	L9UPT6	50S ribosomal protein L15e	+		+	+		+	+
HVO_2559	L9V5K3	50S ribosomal protein L22	+	+	+	+		+	+
HVO_2553	L9V5Y5	50S ribosomal protein L24					+		
HVO_2543	L9V5X1	50S ribosomal protein L30	+		+	+		+	+
HVO_2547	D4GTX9	50S ribosomal protein L32e			+	+	+		

Tabelle 98: RNAPU-MS-Daten RNA turnover

7 RNAPUs → RNA turnover									
Genloci	Accession	Description	rpoA1	rpoA2	rpoB1	rpoB2	(rpoD)	rpoH	rpoL
HVO_1703	D4H048	Putative DEAD/DEAH box helicase	+						
HVO_2438	L9V6L9	Ribonuclease H I	+			+	+	+	+
HVO_2724	L9V5P6	Ribonuclease J	+		+				+
HVO_1094	D4GW15	Ribonuclease P protein component 3	+			+	+	+	+
HVO_0388	L9UJ19	Ribonuclease R	+		+	+		+	+
HVO_0144	L9UHJ9	Ribonuclease Z	+		+	+		+	+

Tabelle 99: RNAPU-MS-Daten Replication and Repair

<i>7 RNAPUs → Replication and Repair</i>									
Genloci	Accession	Description	rp0A1	rp0A2	rp0B1	rp0B2	(rp0D)	rp0H	rp0L
HVO_1573	D4GZ02	DNA gyrase subunit A						+	+
HVO_0853	D4GUK0	DNA double-strand break repair protein Mre11	+			+		+	
HVO_0854	D4GUK1	DNA double-strand break repair Rad50 ATPase	+		+	+	+	+	+
HVO_0552	D4GSE9	DNA mismatch repair protein MutS	+		+	+		+	+
HVO_0858	L9US19	DNA polymerase B1	+						
HVO_0104	Q48328	DNA repair and recombination protein RadA	+	+	+	+	+	+	+
HVO_2383	L9V6G6	DNA repair and recombination protein RadB	+	+	+	+	+	+	+
HVO_A0441	L9VPT6	DNA repair helicase Rad25	+						
HVO_1723	L9VE99	Putative DNA helicase Rad25	+		+	+	+		+
HVO_3013	D4GYC7	Origin-associated protein						+	
HVO_0194	L9UGW2	ORC1-type DNA replication protein	+		+	+		+	+
HVO_1537	D4GY11	Orc1-type DNA replication protein				+			

Tabelle 100: RNAPU-MS-Daten Protein folding

<i>7 RNAPUs → Protein folding</i>									
Genloci	Accession	Description	rp0A1	rp0A2	rp0B1	rp0B2	(rp0D)	rp0H	rp0L
HVO_1590	L9VEI0	Chaperone protein DnaK					+		
HVO_0766	L9UNS7	Hsp20-type molecular chaperone	+						
HVO_0450	D4GRZ1	Hsp20-type molecular chaperone						+	

Tabelle 101: RNAPU-MS-Daten Protein turnover

<i>7 RNAPUs → Protein turnover</i>									
Genloci	Accession	Description	rp0A1	rp0A2	rp0B1	rp0B2	(rp0D)	rp0H	rp0L
HVO_0829	D4GUG3	Peptidase S9 family protein	+					+	
	L9UQ37	Proteasome-activating nucleotidase						+	
HVO_0321	D4GZV0	Peptide chain release factor subunit 1	+		+			+	+
HVO_0455	O30560	Thermosome subunit 2	+	+	+	+	+	+	+
HVO_0778	Q9HHA2	Thermosome subunit 3	+		+	+	+	+	