



Selenoprotein-Biosynthese in *Archaea*:  
Biochemische und molekularbiologische Analyse

Dissertation  
der Fakultät für Biologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von  
**Michael Rother**

im Dezember 2001

1. Gutachter: Prof. A. Böck

2. Gutachter: Prof. R. Grosschedl

Tag der mündlichen Prüfung: 28. 02. 2002

# Inhaltsverzeichnis

<b>Einleitung</b>	4
<b>Material und Methoden</b>	14
1. Mikrobiologische Methoden	14
1. 1. Verwendete Mikroorganismen	14
1. 2. Medien und Anzucht von Mikroorganismen	15
1. 3. Techniken zur anaeroben Anzucht	16
1. 4. Transformation von Mikroorganismen	17
1. 5. Heterologe Überexpression von Genen im T7-Promotor/Polymerase System	17
1. 6. <i>In vivo</i> -Markierung von <i>M. maripaludis</i> mit [ <sup>75</sup> Se]-Selenit	17
2. Molekularbiologische Methoden	18
2. 1. Oligonukleotide	18
2. 2. Standardmethoden der Manipulation und Analyse von DNA	18
2. 3. Plasmide	19
2. 4. Polymerase Kettenreaktion	20
2. 5. Sequenzierung von DNA	20
2. 6. Klonierung des MJ0495 codierenden ORF in <i>E. coli</i>	20
2. 7. Klonierung des MJ0495-homologen Gens von <i>M. maripaludis</i> in <i>E. coli</i>	21
2. 8. Klonierung des MJ0041 codierenden ORF in <i>E. coli</i>	21
2. 9. Klonierung des Gens der Selenocystein-spezifischen tRNA (tRNA <sup>Sec</sup> ) von <i>M. jannaschii</i> in <i>E. coli</i>	21
2. 10. Klonierung des MJ0029 codierenden ORF in <i>E. coli</i>	21
2. 11. <i>In vitro</i> -Synthese von RNA	22
2. 12. [ <sup>32</sup> P]-Markierung von Nukleinsäuren	23
2. 13. RNA-Hybridisierungsexperimente	23

3. Methoden zur Proteinreinigung	24
3. 1. Standardmethoden	24
3. 2. Reinigung des MJ0495-Proteins	24
3. 3. Reinigung des MJ0041-Proteins	25
3. 4. Anreicherung SECIS-bindender Proteine von <i>M. jannaschii</i>	25
4. Szintillationsmessung	26
5. Gelelektrophoretische Methoden	26
5. 1. Elektrophorese von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen	26
5. 2. Zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese	26
5. 3. Gelelektrophorese von RNA in Polyacrylamid/Harnstoff Gelen	27
5. 4. Gelretardationsexperimente	27
6. Behandlung von Polyacrylamidgelen	28
6. 1. Färbung	28
6. 2. Trocknen von Polyacrylamidgelen	28
6. 3. Autoradiographie von Polyacrylamidgelen	28
6. 4. Abbildung von Polyacrylamidgelen	29
7. Konzentrationsbestimmungen	29
8. Biochemische Methoden	29
8. 1. Bestimmung der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität	29
8. 2. Bestimmung der Affinitätskonstanten für Guanin-Nukleotide	29
8. 3. Reinigung der Selenocystein-spezifischen tRNA (tRNA <sup>Sec</sup> ) von <i>M. jannaschii</i>	30
8. 4. Aminoacylierung der tRNA <sup>Sec</sup> von <i>M. jannaschii</i> mit L-Serin, Konversion der Ser-tRNA <sup>Sec</sup> zu Selenocysteyl-tRNA <sup>Sec</sup>	30
8. 5. Bestimmung der Interaktion des MJ0495-Proteins mit Aminoacyl-tRNA	31
8. 6. Bestimmung der Interaktion von MJ0495-Protein mit RNA-Modellsubstraten	31
9. Immunologische Methoden	32
10. Bioinformatische Methoden	33

<b>Ergebnisse</b>	34
1. Die Selenocystein-spezifische tRNA von <i>M. jannaschii</i>	34
2. Charakterisierung des MJ0495 Proteins	37
2. 1. Reinigung des rekombinanten MJ0495 Proteins	38
2. 2. Bestimmung der $K_D$ -Werte für Guanin-Nukleotide	39
2. 3. Interaktion zwischen MJ0495 und Aminoacyl-tRNAs	40
2. 4. Das mögliche SECIS-Element von <i>M. jannaschii</i>	43
2. 5. Versuch zur Identifizierung eines MJ0495-bindenden Proteins	51
3. Die Biosynthese von Selenoproteinen in <i>Methanococcus maripaludis</i>	53
3. 1. <i>M. maripaludis</i> : ein geeigneter Modellorganismus	53
3. 2. Analyse der Genomsequenz von <i>M. maripaludis</i>	56
4. Charakterisierung des archaeellen SECIS-Elements	60
5. Zwei Selenocystein-Reste im VhuD von <i>M. maripaludis</i> ?	63
6. Die Regulation der Selenoprotein-Synthese von <i>M. maripaludis</i>	67
<b>Diskussion</b>	71
<b>Zusammenfassung</b>	83
<b>Literaturverzeichnis</b>	84
<b>Anhang</b>	95

# Einleitung

## 1. Die verschiedenen Bedeutungen von Stopp-Codons

Die seit seiner Entschlüsselung in den sechziger Jahren des letzten Jahrhunderts herrschende Vorstellung, der genetische Code sei universell (Marshall et al. 1967), musste 1979 revidiert werden, als entdeckt wurde, dass in Mitochondrien die Triplets AUA für Methionin statt für Isoleucin, und UGA für Tryptophan statt für Translations-Stopp codierten (Barrell et al. 1979). Mit der wachsenden Zahl an untersuchten Organismen stellte sich heraus, dass gerade die Stopp-Codons (UAA, UAG und UGA) in ihrer Bedeutung von der des klassischen genetischen Codes abweichen können. So codieren in *Tetrahymena* UAG und UAA für Glutamin, UGA ist dort das einzige Stopp-Codon (Horowitz und Gorovsky 1985). UGA kann aber auch für Cystein stehen, wie in dem Ciliaten *Euplotes octocarinatus* (Meyer et al. 1991). In *Archaea* kommt alternative Codon-Verwendung ebenso vor. In mehreren *Methanosarcina*-Spezies existieren Methylamin-Methyltransferasen, deren nicht-homologe Gene Amber-Stopp-Codons (UAG) enthalten, die auf bisher ungeklärte Weise mit Lysin translatiert werden (James et al. 2001).

Die sicherlich bemerkenswerteste Abweichung vom genetischen Standard-Code ist die Translation von UGA mit Selenocystein. Diese Aminosäure wurde erstmals 1976 als Bestandteil eines Proteins nachgewiesen (Cone et al. 1976). Erst zehn Jahre später wurde die Annahme, Selenocystein entstehe durch posttranslationelle Modifikation (Stadtman 1980) widerlegt. Die unabhängige Sequenzbestimmung zweier Strukturgene, deren Produkte Selenocystein enthalten, zeigte, dass TGA (UGA) in diesen Genen für Selenocystein codiert (Chambers et al. 1986; Zinoni et al. 1986). Das "eigene" Codon auf der DNA und der co-translationelle Charakter des Selenocystein-Einbaus in Proteine führte zur Bezeichnung "21ste Aminosäure" (Böck et al. 1991).

## 2. Die Selenoproteine der drei Abstammungslinien

Selenoproteine kommen in allen drei Abstammungslinien - *Bacteria*, *Eukarya* und *Archaea* - vor. Stets ist dabei der Selenocystein-Rest durch UGA auf der mRNA codiert. In der Nachbarschaft des Selenocystein-Rests lässt sich kein Aminosäure-Konsensusmotiv ableiten, allerdings sind die meisten Selenoproteine an Redox-Reaktionen beteiligt, was an den chemischen Eigenschaften des

Selencysteins liegt; bei physiologischem pH-Wert ist die Selenolgruppe deprotoniert und deshalb ein starkes Nukleophil (Kang und Spears 1990; Stadtman 1996).

In *Escherichia coli* fand man drei Selenocystein enthaltende Isoenzyme der Formiat-Dehydrogenase (Fdh) (Sawers et al. 1991), und auch in anderen Vertretern der *Enterobacteriaceae* wurden entsprechende Gene gefunden (Heider et al. 1991). *Haemophilus influenzae* codiert zudem für ein Selenocystein enthaltendes Selenophosphat-Synthetase-Homolog (Fleischmann et al. 1995; Wilting et al. 1998). In Gram-positiven Organismen konnten neben selenabhängigen Fdhs (Andreesen und Ljungdahl 1973) vor allem Selenocystein enthaltende Glycin-Reduktasen nachgewiesen werden (Cone et al. 1976; Gräntzdörffer et al. 2001). Dieses typisch "clostridielle" Selenoprotein fand sich kürzlich auch in *Treponema denticola*, einem Gram-negativen Oral-Pathogenen (Rother et al. 2001b). Funktionell homolog, jedoch mit anderer Substrat-Spezifität sind die Betain-, Sarcosin- und Prolin-Reduktasen aus *Clostridium sticklandii* und *Eubacterium acidaminophilum* (Meyer et al. 1995; Kabisch et al. 1999), die ebenfalls Selenoproteine darstellen. Letzterer Organismus codiert zusätzlich für ein selenabhängiges Peroxiredoxin; solche Enzyme waren bisher als Antioxidantien in aeroben Organismen bekannt (Söhling et al. 2001). Einige Sulfatreduzierer der Gattung *Desulfovibrio* und *Desulfomicrobium* synthetisieren [NiFeSe]-Hydrogenasen, die zu den  $F_{420}$ -unabhängigen Hydrogenasen der *Archaea* (siehe unten) homolog sind (Teixeira et al. 1987; Fauque et al. 1988).

Die zunehmend anfallenden Sequenzdaten, vor allem aus Genomsequenzierungen, wie die von *Drosophila melanogaster* (Adams et al. 2000) oder des Menschen (Lander et al. 2001) führen zur Identifizierung immer neuer Selenoproteine (siehe Gladyshev 2001 für eine Übersicht). Mittlerweile sind 22 verschiedene eukaryontische Selenoproteine beschrieben, oder mit bioinformatischen Methoden identifiziert worden (Kryukov et al. 1999; Lescure et al. 1999; Castellano et al. 2001). Vielen der eukaryontischen Selenoproteine wird eine Schutzfunktion bei der Entgiftung reaktiver Sauerstoff-Spezies zugeschrieben (5 verschiedene Glutathion-Peroxidasen, 3 verschiedene Thioredoxin-Reduktasen), oder sie sind an der Aktivierung von Schilddrüsenhormonen beteiligt (3 verschiedene Dejodasen). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass eine der Glutathion-Peroxidasen (PHGPx) in der Spermatogenese eine wichtige Rolle spielt, indem es vom löslichen Enzym in ein unlösliches Strukturprotein transformiert wird (Ursini et al. 1999). Auch die Thioredoxin-Reduktase hat multiple Aufgaben, wie den Elektronen-Transfer auf essentielle biosynthetische Enzyme und die Redox-Regulation von

Transkriptionsfaktoren (zusammengefasst in Holmgren 2001). Ausser den genannten Enzymen kann nur noch den Selenocystein enthaltenden Homologen der Selenophosphat-Synthetase (SPS) eine biologische Funktion zugeordnet werden (siehe unten). Alle restlichen eukaryontischen Selenoproteine, SelW, SelT, SelR, SelN, Sp15, BthD und SelP, haben unbekannte Aufgaben. Bemerkenswert ist aber, dass Selenoprotein P (SelP) das einzige eukaryontische Selenoprotein ist, das mehr als einen Selenocystein-Rest enthält (Hill et al. 1991). Ihm wird eine Selen-Transportfunktion für den Schutz vor oxidativem Schaden zugeschrieben (Übersicht in Hill und Burk 2001).

Wenige Jahre nachdem Selenocystein erstmals als Bestandteil bakterieller Proteine beschrieben worden war, wurde aus *Methanococcus vannielii* eine Selenocystein enthaltende Formiat-Dehydrogenase isoliert (Jones et al. 1979). Kurz darauf konnte aus dem gleichen Organismus eine Hydrogenase isoliert werden, deren große Untereinheit ebenfalls Selenocystein enthält (Yamazaki 1982). Ein Enzym mit identischer Untereinheiten-Struktur wurde auch in *M. voltae* gefunden. Insgesamt hat dieser Organismus zwei "Sätze"  $F_{420}$ -abhängiger und  $F_{420}$ -unabhängiger Hydrogenasen; ein "Satz" enthält Selenocystein, der andere Cystein an den entsprechenden Aminosäure-Positionen (Halboth und Klein 1992). In *Mp. kandleri* konnten Isoenzyme der Formyl-Methanofuran-Dehydrogenase (Fwd) gefunden werden, deren große Untereinheit im einen Fall Selenocystein, im anderen Fall Cystein an den entsprechenden Positionen enthält (Vorholt et al. 1997). Das Wachstum dieser Organismen wird durch Selen im Medium stimuliert, was darauf hindeutet, dass die selenabhängigen Isoenzyme bessere Katalysatoren darstellen. Tabelle 1 fasst die Selenocystein enthaltenden archaellen Proteine zusammen, die entweder biochemisch identifiziert oder aus Genomsequenzen abgeleitet worden sind. Interessanterweise finden sich Selenoproteine unter den *Euryarchaeota* bislang ausschließlich bei den *Methanococcales* und den *Methanopyrales*. Die Analyse der Genomsequenz von *M. jannaschii* (Bult et al. 1996) führte zur Identifizierung von insgesamt sieben Selenoproteinen in diesem Organismus (Wilting et al. 1997). Bis auf eine Selenocystein enthaltende Selenophosphat-Synthetase (siehe unten) sind sie alle mittelbar oder unmittelbar am zentralen Energiestoffwechsel, der Methanogenese, beteiligt (Abb.1). Die Formiat-Dehydrogenase dient zur Bereitstellung von  $CO_2$  für die Methanogenese, da freies Formiat kein Intermediat dieses Stoffwechsels darstellt (Sparling und Daniels 1986). Die Selenocystein enthaltenden  $F_{420}$ -abhängigen und -unabhängigen Hydrogenasen (Fru und Vhu) dienen der Bereitstellung von

Tabelle 1: Selenoproteine in *Archaea*

Selenoprotein(-Komplex)	Gen	
<i>Methanococcus jannaschii</i>		
F <sub>420</sub> -abhängige Hydrogenase	MJ0029	<i>fruA</i>
Heterodisulfid-Reduktase	MJ1190	<i>hdrA</i>
F <sub>420</sub> -unabhängige Hydrogenase	MJ1190.1	<i>vhuD</i>
F <sub>420</sub> -unabhängige Hydrogenase	MJ1192.1	<i>vhuU</i>
Formylmethanofuran-Dehydrogenase	MJ1194	<i>fwdB</i>
Formiat-Dehydrogenase	MJ1353	<i>fdhA</i>
Selenophosphat-Synthetase	MJ1591	<i>seld</i>
<i>Methanococcus voltae</i>		
F <sub>420</sub> -unabhängige Hydrogenase		<i>vhuU</i>
F <sub>420</sub> -abhängige Hydrogenase		<i>fruA</i>
<i>Methanopyrus kandleri</i>		
Formylmethanofuran-Dehydrogenase		<i>fwuB</i>
<i>Methanococcus vannielii</i>		
Formiat-Dehydrogenase		—
F <sub>420</sub> -abhängige Hydrogenase		—

Für *M. jannaschii* sind die ORF-Nummern aus der Genom-Sequenz angegeben (Bult et al. 1996); Für die Selenoproteine von *M. vannielii* sind keine Sequenzdaten verfügbar.

"Reduktionsäquivalenten" in Form von reduziertem Koenzym F<sub>420</sub> (H<sub>2</sub>F<sub>420</sub>), das für einige Schritte dieses Stoffwechsels essentiell ist (Übersicht in Thauer et al. 1993). Die aus der Genomsequenz von *M. jannaschii* durch Aminosäure-Sequenzvergleiche abgeleitete CO<sub>2</sub>-Reduktion zu CH<sub>4</sub> läuft in sieben, in anderen Methanogenen gut charakterisierten Schritten von Koenzym gebundenen C1-Intermediaten ab. Der erste Schritt (①), die "Aktivierung" des CO<sub>2</sub> zu Formyl-Methanofuran (Formyl-MF), wird bei *M. jannaschii* durch die Selenocystein enthaltende und wolframabhängige Formyl-Methanofuran-Dehydrogenase (Fwd) katalysiert, von der es in anderen Organismen auch molybdänabhängige Isoenzyme gibt (Bertram et al. 1994). Die Formyl-Gruppe wird dann (②) durch die Formyl-Methanofuran:Tetrahydromethanopterin-Formyltransferase (Ftr) auf Tetrahydromethanopterin (H<sub>4</sub>MPT), einem zu Tetrahydrofolat ähnlichen Kofaktor, übertragen (Donnelly und Wolfe 1986). Die reversible Hydrolyse von Formyl-H<sub>4</sub>MPT zu Methenyl-H<sub>4</sub>MPT (③) wird durch die N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-Methenyl-H<sub>4</sub>MPT-Cyclohydrolase (Mch) katalysiert (Donnelly et al. 1985). Sowohl in *M. jannaschii* als auch in anderen Archaeen konnten zwei Enzyme identifiziert werden, die für die Reduktion von N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-Methenyl-H<sub>4</sub>MPT zu N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-Methylen-H<sub>4</sub>MPT (④)

verantwortlich sind (te Brömmelstroet et al. 1991; Zirngibl et al. 1992). Ein Isoenzym, die  $F_{420}$ -abhängige  $N^5,N^{10}$ -Methylen- $H_4$ MPT-Dehydrogenase (Mtd), benötigt diesen Kofaktor, das andere,

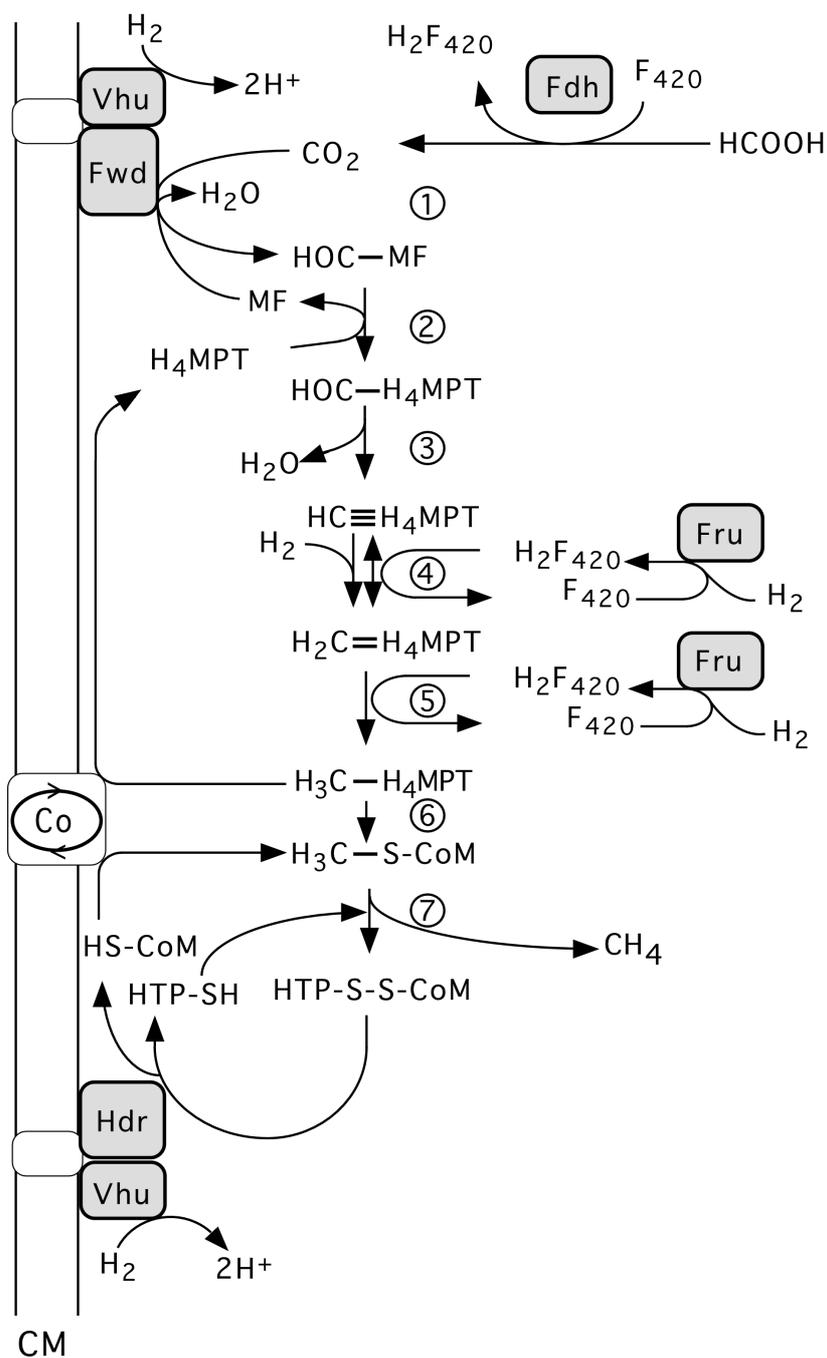


Abbildung 1: Die Methanogenese von *M. jannaschii*, abgeleitet aus der Genomsequenz (Bult et al. 1996); Selenoproteine sind hervorgehoben; Co, Corrinoid-Protein; CM, Cytoplasmamembran; Schema nach Müller et al. (1993, verändert); Einzelheiten im Text.

die  $H_2$ -bildende  $N^5,N^{10}$ -Methylen- $H_4$ MPT-Dehydrogenase (Hmd), nicht. Dagegen ist in allen untersuchten Organismen die darauf folgende Reaktion (⑤), die Reduktion von  $N^5,N^{10}$ -Methylen- $H_4$ MPT zu  $N^5$ -Methyl- $H_4$ MPT durch die  $N^5,N^{10}$ -Methylen- $H_4$ MPT-Reduktase (Mer) von  $F_{420}$

abhängig (Ma et al. 1991). Die Methylgruppe wird dann (⑥) von der  $N^5$ -Methyl- $H_4$ MPT:Methyl-Transferase (Mtr) auf Koenzym M (CoM) übertragen (Gärtner et al. 1993) und zuletzt (⑦) durch den Methyl-CoM-Reduktase-Komplex (MR) unter Oxidation von  $N$ -7-Mercaptoheptanoyl-O-Phospho-L-Threonin (HTP-SH) zu Methan reduziert (Ellermann et al. 1988). Die Selenocystein enthaltende Heterodisulfid-Reduktase (Hdr) reduziert das entstandene Heterodisulfid zu HTP-SH und HS-CoM (Bobik und Wolfe 1988); diese energieliefernde Reaktion dient auch dem Aufbau eines Ionengradienten über die Cytoplasma-Membran, der seinerseits wieder die ATP-Synthese durch ATP-Synthasen treibt (Übersicht in Müller et al. 1993).

### 3. Selenoprotein-Synthese in den drei Abstammungslinien

#### *Biosynthese und Einbau von Selenocystein in E. coli*

Der Mechanismus, der zum Einbau von Selenocystein in wachsende Polypeptidketten führt, ist am besten am Beispiel von *E. coli* untersucht worden. Durch Komplementation von Mutanten mit defektem Formiat-Dehydrogenase-Stoffwechsel konnten vier Gene identifiziert werden, deren Produkte die Fähigkeit zum Selenocystein-Einbau wieder herstellten (Leinfelder et al. 1988a). Es handelt sich dabei um die Gene *selA*, *selB*, *selC* und *selD*, deren Produkte zur Recodierung von UGA auf der mRNA zu Selenocystein benötigt werden (Leinfelder et al. 1988b; Forchhammer et al. 1989; Leinfelder et al. 1990; Forchhammer et al. 1991b).

Das *selC* Genprodukt, die Selenocystein-spezifische tRNA ( $tRNA^{Sec}$ ), stellt das zentrale Molekül der Selenocystein-Biosynthese dar, da alle Reaktionen tRNA-gebunden ablaufen. Sie ist mit 95 Nukleotiden die längste tRNA von *E. coli* und weist einzigartige Abweichungen von der Struktur der anderen Elongator-tRNAs auf (Übersicht in Baron und Böck 1995). Ihre wichtigsten Eigenschaften sind neben dem UCA-Anticodon ein auf acht Basenpaare verlängerter Aminoacyl-Akzeptor-Stamm, ein auf vier Basen verkleinerter D-"Loop" und neue Tertiär-Interaktionen (Baron et al. 1993b). Zunächst wird die  $tRNA^{Sec}$  von der kanonischen Seryl-tRNA-Synthetase (SerRS) mit Serin zur Ser- $tRNA^{Sec}$  beladen (Leinfelder et al. 1988b). Der Seryl-Rest wird anschließend durch die Selenocystein-Synthase (SS, das *selA* Genprodukt) in Selenocystein umgewandelt, einer Reaktion, die durch die prosthetische Gruppe von SS, Pyridoxal-5'-Phosphat, katalysiert wird (Forchhammer und Böck 1991). Nach der Bildung einer Schiff-Base zwischen der  $\alpha$ -Amino-Gruppe des Serins und der Carbonyl-Gruppe des Pyridoxal-5'-Phosphats, entsteht nach der 2,3-Eliminierung eines Wassermoleküls Dehydroalanyl- $tRNA^{Sec}$  (Forchhammer et al.

1991a). Die formale Addition von Selenid resultiert in freier Selenocysteyl-tRNA<sup>Sec</sup> (Sec-tRNA<sup>Sec</sup>). Die aktivierte Selen-Spezies, die für diese Reaktion benötigt wird, ist Seleno-Monophosphat (Glass et al. 1993), das durch die Selenophosphat-Synthetase (SPS, das *selD* Genprodukt) aus Selenid und ATP synthetisiert wird (Leinfelder et al. 1990; Ehrenreich et al. 1992). Die so korrekt aminoacylierte Sec-tRNA<sup>Sec</sup> wird dann vom Selenocystein-spezifischen Elongationsfaktor SelB zum Ort der UGA-Translation, der A-Bindungsstelle des Ribosoms transferiert.

SelB hat Eigenschaften, die die korrekte Insertion von Selenocystein an einem Codon erlauben, das normalerweise als Translations-Terminations-Signal fungiert. (1) In seinem N-terminalen Bereich (Domänen 1, 2 und 3) ist SelB zu EF-Tu, dem kanonischen Elongationsfaktor von *E. coli*, und zu anderen G-Proteinen der Translationsfaktor-Familie, homolog (Abb. 3). Wie EF-Tu bindet auch SelB GTP und GDP, allerdings hat es – anders als EF-Tu – eine höhere Affinität zu GTP, was die Funktion eines Nukleotid-Austauschfaktors wie EF-Ts für die Bildung der GTP-Form für den nächsten Elongationszyklus unnötig macht (Forchhammer et al. 1989; Kawashima et al. 1996). (2) SelB ist durch einen noch immer weitgehend unbekanntem Mechanismus in der Lage, die Selenol-Gruppe des Selenocysteyl-Rests der Sec-tRNA<sup>Sec</sup> von der Hydroxyl-Gruppe des Seryl-Rests der Ser-tRNA<sup>Sec</sup> zu unterscheiden (Forchhammer et al. 1989; Baron und Böck 1991). Kanonische Aminoacyl-tRNAs werden von SelB ebenfalls nicht gebunden (Forchhammer et al. 1991a). (3) SelB erkennt spezifisch eine Sekundärstruktur, die unmittelbar 3' vom UGA-Selenocystein-Codon auf der mRNA liegt (Baron et al. 1993a; Thanbichler et al. 2000). Dieses *cis*-aktive Element ist für die Recodierung des Stopp-Codons in ein Sinn-Codon verantwortlich (Zinoni et al. 1990) und wurde später SECIS-(selenocysteine insertion sequence)-Element genannt (Berry et al. 1991a). SelB ist im Vergleich zu EF-Tu C-terminal um etwa 30 kDa erweitert. Biochemische Analysen mit verkürzten SelB-Varianten zeigten, dass diese Extension in eine 14,5 kDa Domäne 4a und eine 17 kDa Domäne 4b unterteilt werden kann. Letztere ist ausreichend, um das SECIS-Element effektiv *in vivo* und *in vitro* zu binden (Kromayer et al. 1996; Thanbichler et al. 2000). Anhand dieser und anderer Ergebnisse konnte ein Modell für die Wechselwirkung von SelB mit seinen Liganden postuliert werden (zusammengefasst bei Thanbichler und Böck 2001). Die Interaktion der Sec-tRNA<sup>Sec</sup> mit der GTP-Form von SelB erhöht die Affinität dieses Ternärkomplexes zum SECIS-Element, was zur Bildung eines Quaternärkomplexes führt. Dieser nimmt eine Konformation ein, die es ihm erlaubt mit dem Ribosom zu interagieren und die Sec-tRNA<sup>Sec</sup> in dessen A-Bindungsstelle zu platzieren. Die

dadurch stimulierte GTP-Hydrolyse führt zu einer Verringerung der Affinität von SelB zum Ribosom, zur Sec-tRNA<sup>Sec</sup> und zum SECIS-Element, was zum Abdiffundieren von SelB führt. Durch die Affinitätsunterschiede kommt es zum spontanen Austausch von GDP gegen GTP.

### ***Selenoprotein-Synthese in Eukarya***

Zu Beginn dieser Arbeit war über eukaryontische Selenoprotein-Biosynthese relativ wenig bekannt (Übersicht in Low und Berry 1996). Die zu tRNA<sup>Sec</sup> homologe tRNA und eine Aminoacylierungsreaktion, die analog zu der in *E. coli* verläuft, konnten beschrieben werden (Lee et al. 1989); die zur SS homologe Enzymaktivität ist aber bis heute nicht identifiziert. Ebenso wenig konnte einem beobachteten O-Phosphoseryl-tRNA<sup>Sec</sup>-Intermediat eine Rolle zugewiesen werden. Die Aktivierung des Selens zu Selenophosphat durch ein SPS-Homolog lässt aber eine ähnliche Aminoacylierungsreaktion in Eukaryonten vermuten, wie sie für *E. coli* beschrieben wurde (Kim et al. 1997). Vergleichsweise gut untersucht waren die beiden *cis*-aktiven Elemente, das UGA (Selenocystein)-Codon und das SECIS-Element. Letzteres liegt - im Gegensatz zu *E. coli* - nicht unmittelbar 3' vom UGA auf der mRNA, sondern in zum Teil beträchtlicher Entfernung im 3'-nicht-translatierten Bereich (Berry et al. 1991a; Berry et al. 1993). In Analogie zum prokaryontischen System wurde auch für Eukaryonten ein Selenocystein-spezifischer Elongationsfaktor (SelB) gefordert (Berry et al. 1993).

### ***Selenoprotein-Synthese in Archaea***

Bis zur Veröffentlichung der Genomsequenz von *M. jannaschii* war abgesehen von der Existenz einiger Selenoproteine und der Identität des UGA-Codons als Selenocystein-Codon nichts bekannt (Jones et al. 1979; Halboth und Klein 1992; Vorholt et al. 1997). *In vivo*-Markierungsexperimente mit [<sup>75</sup>Se]-Selenit führten dann zur Identifizierung von sechs Selenoproteinen in *M. jannaschii*; auf der Suche nach Leserahmen in der Genomsequenz, die durch TGA unterbrochen sind, ansonsten aber bekannten Strukturgenen ähnelten, fanden sich sogar sieben potentielle Selenoprotein-Gene (siehe Tab. 1). Der Leserahmen eines dieser Gene, *vhuD*, wird durch zwei TGA-Triplets unterbrochen, das resultierende Protein sollte demnach zwei Selenocystein-Reste enthalten. Wie bei Eukaryonten konnten auch bei *M. jannaschii* keine konservierten Sekundärstrukturen innerhalb der codierenden Region der mRNA abgeleitet werden, die als SECIS-Elemente fungieren könnten. Vielmehr fand R. Wilting hoch konservierte Haarnadelstrukturen im nicht-translatierten Bereich der mRNA (Wilting et al. 1997; Abb. 2). Bei sechs der Gene befinden sie sich 3' von der codierenden Region, bei einem Gen (*fdhA*) 5' des Leserahmens.

Erneute Inspektion der Selenoprotein-Gene anderer methanogener *Archaea* zeigte, dass dort sehr ähnliche potentielle SECIS-Elemente in den 3'-nicht-translatierten Regionen lokalisiert sind (Wilting et al. 1997); es wurde daher ein Konsensus für dieses Element postuliert, der aus einem nicht konservierten Helix-Stamm, einem internen "Loop", der aus GAA und einem gegenüberstehenden A gebildet wird, einem darauf folgenden C/G-Triplett und einem nicht konservierten terminalen "Loop", besteht (Wilting 1997).

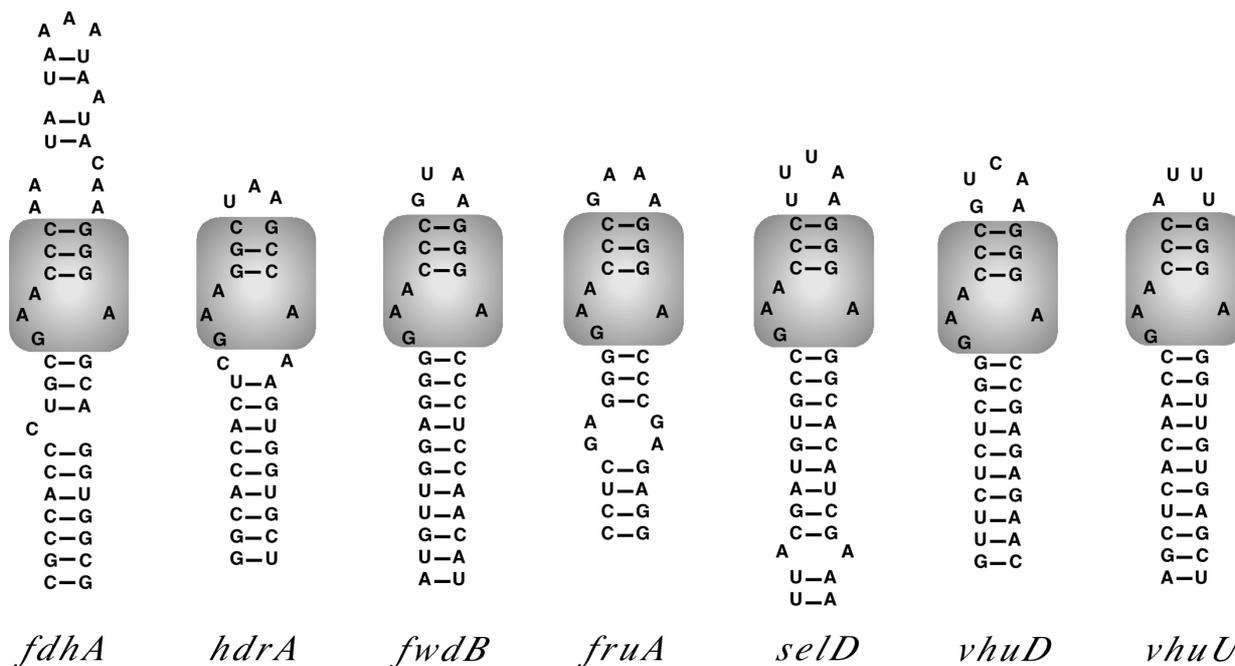


Abbildung 2: Die möglichen SECIS-Elemente von *M. jannaschii*. Der stark konservierte Bereich ist hinterlegt; Abb. aus Wilting et al. (1997) verändert.

Auch ein zu *selC* homologes Gen wurde in der Genomsequenz von *M. jannaschii* identifiziert (Bult et al. 1996), wobei sein Produkt der eukaryontischen tRNA<sup>Sec</sup> mehr gleicht als der bakteriellen. Die Suche nach dem Gen für einen Selenocystein-spezifischen Elongationsfaktor in der *M. jannaschii*-Genomsequenz mit *selB* als Sonde resultierte in der Identifizierung des ORF MJ0495 als bestem Kandidaten (Wilting 1997 und Abb. 3). Er weist Sequenz-Signaturen auf, die charakteristisch für G-Proteine aus der Translationsfaktor-Familie sind (G1-G5). Obwohl die Sequenzidentität nur 22% beträgt, ist MJ0495 der zu SelB ähnlichste ORF in *M. jannaschii*. Diese Ähnlichkeit ist am größten in den Domänen 1 und 2, schwach in Domäne 3 und nicht signifikant in Domäne 4 (Abb. 3). Dieser Bereich ist gegenüber Domäne 4 von SelB von *E. coli*, die für die Interaktion mit dem SECIS-Element verantwortlich ist, stark verkürzt (Kromayer et al. 1996).

	Domäne 1	G1	G2	G3	
<b>MJ0495</b>	-----MEMKNVNVGLFGHIDHGKTQLAKQLTEIAST-----SALDKPKESQKRGITIDLGFSSFTLDRYRI--TLVDAPGHSELIRTAIGAGNII				83
<b>SelB/E.c.</b>	-----MI IATAGHVDHGKTTLLQAITGV-----NADRLPEEKRRGMTIDLGYAYWPPDGRVPGFIDVPGHEKFLSNMLAGVGGI				75
<b>EF-Tu/E.c.</b>	MSKEKFERTKPHVNVGTIGHVDHGKTTLTAAITTVLAKTYGGAARAFQIDNAPEEKARGITINTSHVEYDTP--TRHYAHVDCPGHADYVKNMITGAAQM				99
		G4	G5	Domäne 2	
<b>MJ0495</b>	DAALLVVDAKEGPKTQTGEHLLVLDLLNIPTIVV--INKIDIANDEEIKRT--EMFMKQILNSTINLKNKSIKIS--AKTGEIGIGELKELKNLLDSDLTK				179
<b>SelB/E.c.</b>	DHALLVVACDDGVMAQTRHLLAILQLTGNPMLTVALTKADRVDEARVDEV--ERQVKEVLEREYGFAEAKLFITA----ATEGRMDALREHLL---QLPE				166
<b>EF-Tu/E.c.</b>	DGAILVVAATDGPMPQTRHILLGRQGVGPYIIVFLNKCVMVDDEELELELVEMEVRELLSQYDFPGDDPTVIRGSALKALEGDAEWEAKILELAGFLDSY				199
<b>MJ0495</b>	RDINSYL--KMPIDHAFKI-----KGVGTVVVTGTHKGVKVEVDNLRLLPINHEVVKVSIQCFKQDVSI--AYAGDRVGMALMGV--EPESLF--RGC				264
<b>SelB/E.c.</b>	REHASQHSFRLAIDRAFIV-----KGAGLVVTGTALSGEVKVGDLSLWLTGVNKPVRVRLHAQNPQPTET--ANAGQRI--ALNIAGDAEKEQINRGD				254
<b>EF-Tu/E.c.</b>	IPEP-----ERAIDKPFLLPIEDVFSISGRGTVVTVGRVERGI I KVGEEVEIVGKETQKSTCTGVEMFRKLLDEGRAGENVGVLLRGIKREEIE---RGQ				291
	Domäne 3				
<b>MJ0495</b>	ILTSEDTKLVVDKFI AKVKILE-----LFKYNLAPMKVHINIGLLTVPATII PYKIEKI--NDKEEPIILEEIKGGDSCYCFKLEERVVVDEGDKIL				357
<b>SelB/E.c.</b>	WLLADVPPEPFRVIVELQQT-----HTPLTQWQPLHIHHAASHVTGRVSLLEDNLAELVFDTPPLWADNDRVLVLRDISARNTLAGARVVM-----				339
<b>EF-Tu/E.c.</b>	VLAKPGTIKPHTKFESEVYLLSKDEGGRHTPFKGYRPFYFRTDVTGTIELEPEGVEMVMPGDNIKVVVTLIHP IAMDDGLRFAIREGGRTVGAG--VV				389
	Domäne 4				
<b>MJ0495</b>	IMRLDLPPTLLRICGFEVIDFGEVEVKIVVKEGKVVKKDKIYIEGLASSKTAGEK---LIGGKVIYPDKNIWGVIKGTFGTGKALIAEFDDEEVNGGE				454
<b>SelB/E.c.</b>	---LNPPRRRKRKPEYLQWLASLARAQSDADALS VHLERGA VNLADFAWARQLNGEGMRELLQPPGYIQAGYSLLNAPVAARWQRKILDTLATYHEQHR				435
<b>EF-Tu/E.c.</b>	AKVLS-----				394
<b>MJ0495</b>	KVVL--KRVRKWG-----				465
<b>SelB/E.c.</b>	DEPGPGRERLRMALPMEDEALVLLLEKMRSEGD I HSHHGWLHLPDHKAGFSEEQQAIWQKAEPFLFGDEPWWVRDLAKETGTDDEQAMRLTLRQAAQQGI				535
<b>EF-Tu/E.c.</b>	-----				394
<b>MJ0495</b>	-----				465
<b>SelB/E.c.</b>	ITAIVKDRYYRNDRIVEFANMIRDLQECGSTCAADFRDLRGVGRKLAIQILEYFDRIGFTRRRGNDHLLRDALLFPPEK				614
<b>EF-Tu/E.c.</b>	-----				394

Abbildung 3: Aminosäuresequenz-Vergleich von MJ0495 mit SelB und EF-Tu von *E. coli* (*E.c.*); Übereinstimmungen in wenigstens zwei der Sequenzen sind hinterlegt; Pfeile markieren die Domänen-Grenzen von SelB; G1-G5 bezeichnen die G-Boxen.

## Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit war es, die mögliche Rolle der *in silico* identifizierten potentiellen Komponenten der Selenoprotein-Biosynthese in *Archaea* näher zu charakterisieren. Sowohl das mögliche SECIS-Element, wie auch die *trans*-aktiven Elemente, das tRNA<sup>Sec</sup>-Homolog und MJ0495, waren bis dahin nur bioinformatisch untersucht worden. Sie sollten deshalb gereinigt und biochemisch charakterisiert werden. Auch für die Natur des archaeellen SECIS-Elements gab es bis dahin nur Hinweise aus Sequenzvergleichen. Die Fähigkeit dieser möglichen Strukturelemente, Selenocystein-Insertion zu gewährleisten, sollte deshalb untersucht werden. Die Lokalisation des vermuteten SECIS-Elements macht wahrscheinlich eine andere UGA-Recodierung notwendig, als sie für *E. coli* beschrieben wurde. Durch die Untersuchung dieser molekularen Mechanismen sollte auch die Möglichkeit eröffnet werden, in "einfachen" Organismen wie *Archaea* die Recodierungsereignisse durch Elemente im nicht-translatierten RNA-Bereich zu verstehen, die bei den viel komplexer organisierten *Eukarya* ebenso vorkommen.

# Material und Methoden

Wenn nicht anders angegeben, stammten die verwendeten Chemikalien in analysenreiner Form von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma (München), Serva (Heidelberg), Roth (Karlsruhe), Fluka (Neu-Ulm) und BioRad (München). Na-[<sup>75</sup>Se]-Selenit wurde vom RISØ National Laboratory (Roskilde, Dänemark) bezogen, andere Radiochemikalien waren von NEN (Zaventem, Belgien).

## 1. Mikrobiologische Methoden

### 1.1. Verwendete Mikroorganismen

Die in dieser Arbeit eingesetzten *E. coli* Stämme sind in Tabelle 2 aufgeführt, verwendete *Archaea* listet Tabelle 3 auf.

Tabelle 2: verwendete *E. coli* Stämme

Stamm	relevanter Genotyp	Referenz
BL21(DE3)	F <sup>-</sup> <i>hsdS gal</i> λDE3	Studier und Moffatt 1986
JM109	F <sup>'</sup> ( <i>traD36 proAB<sup>+</sup> lacI<sup>f</sup> lacZΔM15</i> ) <i>recA1 endA1 thi gyrA96 hsdR17</i> <i>relA1 supE44 Δlac- proAB</i>	Yanisch-Perron et al. 1985
FM433:λERM	<i>fdhF-lacZ</i> -Reportergenfusion in der λ-attachment site	Zinoni et al. 1990
PT91300	F <sup>'</sup> <i>araD139φ(argF-lac)U169 ptsF25</i> <i>deoC1 relA1 flbB5301 strA1 φ(srl-</i> <i>recA)306::Tn10 selB300::kan</i>	Tormay et al. 1996
WL81460	F <sup>'</sup> <i>araD139 φ(argF-lac)U169 ptsF25</i> <i>deoC1 relA1 flbB5301 rpsE13 φ(srl-</i> <i>recA)306::Tn10 selC400::kan</i>	Zinoni et al. 1990
XL1-Blue MRF <sup>'</sup>	Δ( <i>mcrA</i> )183 Δ( <i>mcrCB-hsdSMR-</i> <i>mrr</i> )173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1</i> <i>gyrA96 relA1 lac</i> [F <sup>'</sup> <i>proAB lacI<sup>f</sup></i> <i>ZΔM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)</i> ]	Stratagene
XL10-Gold(Kan)	XL1-Blue MRF <sup>'</sup> , Hte [F <sup>'</sup> <i>proAB</i> <i>lacI<sup>f</sup> ZΔM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>) Tn5 (Kan<sup>r</sup>)</i> Amy]	Stratagene

Tabelle 3: *Archaea*

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>Methanococcus jannaschii</i> DSM 2661	Wildtyp	Jones et al. 1983a
<i>Methanococcus maripaludis</i> JJ DSM 2067	Wildtyp	Jones et al. 1983b

DSM = DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig

## 1. 2. Medien und Anzucht von Mikroorganismen

### *E. coli*

*E. coli* wurde aerob in Erlenmeyer-Kolben entweder in LB Medium (Miller, 1972) oder in doppelt konzentriertem LB Medium kultiviert; dies diente der Steigerung der Zellausbeute. Anzuchten, die der Produktion von rekombinanten Proteinen dienten, wurden in 5 l Erlenmeyer-Kolben mit Schikanen, befüllt mit 2,5 l Medium, durchgeführt. Zur Reprimierung IPTG-induzierbarer Genexpression (siehe unten), wurde dem Medium zusätzlich 1% Glukose zugesetzt. Festes Medium enthielt 1,5% Agar-Agar.

Für Komplementationsversuche wurde der Stamm PT91300 mit pSMJ0495 transformiert. Transformanten wurden in stehenden Ragenzgläsern, die Gastestmedium (1% Pepton, 0,5% Hefeextrakt, 0,5% NaCl, 0,5% Glucose, 0,5 mM IPTG) enthielten, semianaerob über 2-3 Tage hinweg angezogen. Gasbildung während der Fermentation konnte mit Hilfe von Durham-Röhrchen festgestellt werden (Müller und Melchinger 1964).

### *Methanococcus jannaschii*

*Methanococcus jannaschii* wurde anaerob bei 85°C wie bei Jones et al. (1983a) beschrieben in 100 ml Serumflaschen, die 20 ml Medium enthielten, kultiviert. Als Kohlenstoff- und Energiequelle diente H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80:20).

### *Methanococcus maripaludis*

Die Kultivierung von *Methanococcus maripaludis* erfolgte anaerob bei 37° C entweder in McC-Komplexmedium (Whitman et al. 1986) oder in definiertem McSe-Medium. Dabei wurden alle Metall-Sulfate des McN-Mediums (Whitman et al. 1986) durch die entsprechenden Chloride ersetzt, die Konzentrationen der Kationen blieben identisch. Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> wurde aus einer separaten Stammlösung supplementiert.

Die Selenkonzentration in "selenfreiem" McSe-Medium wurde durch die Firma FLIPO (Turcianske Teplice, Slowakei) mit Hilfe eines Atom-Absorptionsspektrometers (Varian, Australien) nach Generierung von Se-Hydriden mit der vom Hersteller empfohlenen Prozedur bestimmt.

Es kamen drei Kultivierungsmaßstäbe zum Einsatz: 5 ml Kultur in 20 ml "Balch-Kulturröhrchen" (Balch und Wolfe 1976), 20 ml Kultur in 100 ml Serumflaschen oder 400 ml Kultur in 2 l Steilbrustflaschen. Als Kohlenstoff- und Energiequelle diente  $H_2/CO_2$  (80:20). Sollte auf festem Medium kultiviert werden, enthielt es 1% Bacto-Agar (Difco, Detroit, Michigan).

Antibiotika wurden auf folgende Konzentrationen zugegeben: Ampicillin, 100  $\mu g/ml$ ; Chloramphenicol, 30  $\mu g/ml$ ; Kanamycin, 50  $\mu g/ml$ ; Puromycin, 2,5  $\mu g/ml$ ; Tetracyclin, 15  $\mu g/ml$ . Die Zelldichte wurde optisch bei 600 nm bestimmt ( $OD_{600}$ ).

### 1.3. Techniken zur anaeroben Anzucht

Be- und Entgasung des Mediums erfolgte an einer Gasstation. Die Überimpfung bei Experimenten zur *in vivo*-Markierung von Kulturen wurde in einem Anaerobenzelt (Coy Laboratory Products, Michigan, USA) durchgeführt, welches mit Formiergas ( $N_2/H_2$ , 95:5) gefüllt war. Spuren von Sauerstoff wurden mittels eines Palladium-Katalysators durch Reduktion mit Wasserstoff entfernt. Den Wasserstoff- und Sauerstoffgehalt zeigte ein  $O_2/H_2$ -Sensor (Coy Laboratory Products) an. Generell wurden Medienkomponenten einzeln durch dreimaliges Begasen (1 atm Überdruck  $N_2$  für 1 min) und Entgasen (Vakuum, 20 min) von Sauerstoff befreit und dann mit 2 atm Überdruck  $H_2/CO_2$ , (80:20), oder  $N_2$ , autoklaviert. Nach der Vereinigung der einzelnen Komponenten wurden zur Reduktion des Mediums ad 0,03% Cystein und 0,03%  $Na_2S$  supplementiert.

Speziell für die 5 ml Kulturen wurde das Medium aus aeroben Stammlösungen zusammengesetzt, unter einem Strom  $N_2/CO_2$  (80:20) aufgeköcht, im Anaerobenzelt in die Kulturgefäße, die mindestens 16 h zuvor dorthin eingeschleust worden waren, aliquotiert und verschlossen. Die fertigen Medien wurden nach Ausschleusung aus dem Anaerobenzelt und Austausch der Gasatmosphäre in den Gefäßen gegen  $H_2/CO_2$  (80:20) autoklaviert. Kurz vor dem Inokulieren wurde es mit  $Na_2S$  ad 0,03% reduziert. McSe-Medien, die kein  $S^{2-}$  enthielten, wurden mit Cystein-HCl ad 0,2 % reduziert.

## 1. 4. Transformation von Mikroorganismen

### *Escherichia coli*

Für Transformationen von *E. coli* mit superhelikaler Plasmid-DNA oder Ligationsansätzen wurde die Elektroporations-Methode (Fiedler und Wirth 1988) angewandt.

### *Methanococcus maripaludis*

*M. maripaludis* wurde mit Plasmid-DNA nach einer Polyethylenglycol-Methode (Tumbula et al. 1994) transformiert. pWLG30-Derivate tragende Transformanten wurden auf McC-Agar, der Puromycin enthielt, selektiert. McC-Medium mit Puromycin wurde mit Einzelkolonien beimpft, 24 h bebrütet, und das Vorhandensein des transformierten Vektorkonstrukts durch PCR mit den Primer-Oligonukleotiden 30gene1 und 30gene2 überprüft.

## 1. 5. Heterologe Überexpression von Genen im T7-Promotor/Polymerase System

Heterologe Überexpression von *M. jannaschii*-Genen, die auf Plasmiden kloniert waren und unter der Kontrolle des  $\Phi 10$ -Promotors des Bakteriophagen T7 standen, erfolgte in doppelt konzentriertem LB Medium aerob im *E. coli* Stamm BL21(DE3), der mit pUBS520 vortransformiert worden war. Durch Induktion mit 100  $\mu\text{M}$  IPTG bei einer  $\text{OD}_{600}$  der Kultur von 1 und dreistündiger Inkubation wurden die Proteine überproduziert. Die Zellen wurden abzentrifugiert und in flüssigem Stickstoff gelagert.

## 1. 6. *In vivo*-Markierung von *M. maripaludis* mit [ $^{75}\text{Se}$ ]-Selenit

Für die Markierung mit  $^{75}\text{Se}$  wurden Kulturen über mindestens drei Passagen bis zur spätexponentiellen Wachstumsphase in McC-Medium angezogen, das nicht mit  $\text{NaSeO}_3$  supplementiert war. Sie wurden anschließend 1:20 - 1:50 in Medium verdünnt, das 0,4 bis 3  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{[}^{75}\text{Se]SeO}_3$  unterschiedlicher spezifischer Radioaktivität enthielt. Nach 48 h Inkubation wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet, zweimal in dem entsprechenden Medium (ohne Se) gewaschen und durch Resuspendieren in destilliertem Wasser lysiert. Das Lysat wurde gegebenenfalls mit RNase A (2  $\mu\text{g/ml}$ ) oder Proteinase K (1  $\mu\text{g/ml}$ ) behandelt, um markierte RNAs von markierten Proteinen unterscheiden zu können. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt.

## 2. Molekularbiologische Methoden

### 2.1. Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 4 aufgeführt. Restriktionsschnittstellen sind hervorgehoben.

Tabelle 4: Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz [5' → 3']
A16	ACGGGCGGTGTGTGTGCAAGGAGC
30gene1	GCCTAAATTAATTAATAAAAGACTCTCCAG
30gene2	TTTGAATAGTATATTACGAATAGGGCG
oMJ-fruA/5'	<b>GGAATTC</b> ATGCATGACCAATAGAATAGAAATTGCCCTACA ACCAGGCATGAAGG
oMJ-fruA/3'WT	GCT <b>CTAGATG</b> CCTCTCGGGTCCCTTTTCGGGTTTC
oMJ-fruA/3'Mut	GCT <b>CTAGATG</b> CCTCGTGGGCCCTGTTTTCACAGGGCCCACGA GGCTTATAACATTTTTCTAACTTC
oMJBT7-1c	<b>GGAATTC</b> CATATGGAAATGAAAAAATGTAAATGTTGGTTT
oMJBT7-2	<b>GGAATTC</b> CACAACCTCTCACCAAG
oMJ0041/5'	<b>GGAATTC</b> CATATGGCTAGTATAATAATAAGC
oMJ0041/3'	CGGGATCCTTAACCTTTTTCTAAAAGGTTGTTATC
oMMselB/5'	GAGAAAA <b>AGGCCTC</b> ATATGGACTTTAAAAATATTAATCTTG
oMMselB/3'	<b>GGAATTC</b> TTAACCCCATCTTCTAAGC
oT7-top	TAATACGACTCACTATAG

### 2.2. Standardmethoden der Manipulation und Analyse von DNA

Molekularbiologische Standardmethoden, wie Agarosegelelektrophorese von DNA oder enzymatische Manipulation von DNA, entsprachen, wenn nicht anders angegeben, denen von Sambrook et al. (1989), Ausubel et al. (1997), oder es wurde den Angaben der Hersteller (z.B. von Restriktionsenzymen) gefolgt.

Plasmid DNA wurde mit dem High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche, Penzberg) gewonnen, PCR-Produkte wurden mit dem QIAquickPCR Purification Kit (Quiagen, Hilden) von Matrizeresten und nicht inkorporierten Nukleotiden befreit. DNA-Fragmente wurden durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, aus dem Gel ausgeschnitten und durch Zentrifugation durch ein steriles Zellstoffbett eluiert. Reste von Agarose und Ethidiumbromid konnten mit dem

QIAquickPCR Purification Kit entfernt werden. Genomische DNA von *M. jannaschii* und *M. maripaludis* wurde mit der CTAB Methode (Murray und Thompson 1980) gewonnen.

### 2.3. Plasmide

Die verwendeten Plasmide sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5: verwendete Plasmide

Plasmid	relevanter Genotyp	Referenz/Bezugsquelle
pAMJEI62	pUC18, 2,2 kbp Genomfragment von <i>M. jannaschi</i> mit MJ0495	ATCC
pT7-7	Ap <sup>R</sup> , T7pΦ10	Tabor und Richardson 1985
pT7His	pT7-7, "in frame-5'-His-tag"	M. Thanbichler, nicht veröffentlicht
pUC18; pUC19	Ap <sup>R</sup> , lac 'IPOZ'	Yanisch-Perron et al. 1985
pET3a	Ap <sup>R</sup> , T7pΦ10, TΦ	Studier und Moffatt 1986
pSU2719	Cm <sup>R</sup> , lacZα	Martinez et al. 1988
pSMJ0495	pSU2719, MJ0495	diese Arbeit
pSJJselB	pSU2719, selB-homologes Gen von <i>M. maripaludis</i>	diese Arbeit
pSHisJJselB	pSU2719, selB-homologes Gen von <i>M. maripaludis</i> mit N-terminalem "His-tag"	diese Arbeit
p18MJC	pUC18, T7pΦ10, selC von <i>M. jannaschii</i>	Rother et al. 2000
pUC19JJC	pUC19, T7pΦ10, selC von <i>M. maripaludis</i>	A. Resch, nicht veröffentlicht
pUC19JJCGA	pUC19JJC, G37→A	A. Resch, nicht veröffentlicht
pTMJ005	pT7-7, MJ0495	diese Arbeit
pTJJselB	pT7-7, selB-homologes Gen von <i>M. maripaludis</i>	diese Arbeit
pTHisJJselB	pT7-7, selB-homologes Gen von <i>M. maripaludis</i> mit N-terminalem "His-tag"	diese Arbeit
pETMJ0041	pET3a, MJ0041	diese Arbeit
pWLG30	Ap <sup>R</sup> , Pur <sup>R</sup> , Expressions-"shuttle"-Vektor	Gardner und Whitman 1999
p19fruA-WT	pUC19, MJ0029 mit 3'-nicht-translatierter Region (Wildtyp)	diese Arbeit
p19fruA-Mut	pUC19, MJ0029 mit mutierter 3'-nicht-translatierter Region	diese Arbeit
pWLGfruA-WT	pWLG30, MJ0029 mit 3'-nicht-translatierter Region (Wildtyp)	diese Arbeit
pWLGfruA-Mut	pWLG30, MJ0029 mit mutierter 3'-nicht-translatierter Region (Mut)	diese Arbeit

(Fortsetzung Tab. 5)

pWLGfruA-del	pWLG30, <i>MJ0029</i> mit mutierter 3'-nicht-translatierter Region (del)	diese Arbeit
pWLGfruA-CG/AU	pWLG30, <i>MJ0029</i> mit mutierter 3'-nicht-translatierter Region (Basenpaaraustausch)	diese Arbeit
pWLGfruA-A/U	pWLG30, <i>MJ0029</i> mit mutierter 3'-nicht-translatierter Region (Basenaustausch)	diese Arbeit
pWLGfruA-A/G	pWLG30, <i>MJ0029</i> mit mutierter 3'-nicht-translatierter Region (Basenaustausch)	diese Arbeit
pUBS520	Km <sup>R</sup> , <i>lacI</i> <sup>H+</sup> , <i>dnaY</i>	Brinkmann et al. 1989

---

ATCC: American Type Culture Collection (Vanassas, Virginia, USA)

## 2. 4. Polymerase Kettenreaktion

DNA-Fragmente wurden mit der PCR-Methode amplifiziert (Mullis et al. 1986). Für die präparative PCR in 100  $\mu$ l Reaktionsvolumen wurde der Expand High Fidelity PCR Kit (Roche, Mannheim) verwendet, für die analytische PCR im 15  $\mu$ l-Maßstab kam, wie bei Saiki et al. (1988) angegeben, gereinigte Taq-Polymerase zum Einsatz. Dabei dienten in der Mikrowelle lysierte Zellen als Matrize.

## 2. 5. Sequenzierung von DNA

Die Überprüfung von DNA-Sequenzen erfolgte durch Sequenzierung der betreffenden Bereiche mit Hilfe der Dye Terminator Cycle-Sequenzierung mit einem automatischen ABI-Prism-Sequencer (Perkin Elmer).

## 2. 6. Klonierung des MJ0495 codierenden ORF in *E. coli*

Für die heterologe Überexpression wurde der ORF MJ0495 vom Plasmid pAMJEI62 mittels PCR amplifiziert, wobei durch die Primer-Oligonukleotide oMJBT7-1c und oMJBT7-2 eine *NdeI*-, bzw. *EcoRI*-Restriktionsschnittstelle am 5'-, bzw. 3'-Ende des ORF erzeugt wurde. Nach Isolierung des amplifizierten Fragments und Restriktion mit diesen beiden Enzymen wurde es in den durch *NdeI/EcoRI* linearisierten Vektor pT7-7 ligiert. JM109 wurde anschließend mit dem Ligationsansatz transformiert. Das erhaltene Plasmid war pTMJ005.

Für *in vivo* Komplementationsversuche wurde pTMJ005 mit den Restriktionsenzymen *XbaI* und *NdeI* fragmentiert und das den ORF MJ0495 enthaltene Fragment in den entsprechend

behandelten Vektor pSU2719 ligiert. Das in JM109 propagierte Plasmid wurde mit pSMJ0495 bezeichnet.

### **2. 7. Klonierung des MJ0495-homologen Gens von *M. maripaludis* in *E. coli***

Die Primer-Oligonukleotide oMMselB/5' und oMMselB/3' dienten zur Amplifikation des zum MJ0495-ORF homologen Gens von *M. maripaludis* mittels PCR, wobei chromosomale DNA als Matrize diente. Dabei wurde eine *NdeI*- und *StuI* 5'-seitig, und eine *EcoRI*-Restriktionsschnittstelle 3'-seitig erzeugt. Nach *StuI/EcoRI*-Restriktion wurde das DNA-Fragment in den ebenso behandelten Vektor pT7His ligiert und in JM109 propagiert. Das resultierende Plasmid war pTJHisselB. Zur Erzeugung von pTJselB wurde das 1,4 kbp *NdeI/EcoRI*-Fragment aus pTJHisselB in den mit *NdeI* und *EcoRI* behandelten pT7-7-Vektor ligiert. Für heterologe *in vivo*-Experimente in *E. coli* wurden die 1,5 kbp *SmaI/XbaI*-Fragmente dieser beiden Plasmide jeweils in den ebenso behandelten Vektor pSU2719 ligiert. Die erhaltenen Plasmide waren pSJJselB und pSJJHisselB.

### **2. 8. Klonierung des MJ0041 codierenden ORF in *E. coli***

Mit den Primer-Oligonukleotiden oMJ0041/5' und oMJ0041/3' wurde der ORF MJ0041 mittels PCR mit chromosomaler DNA von *M. jannaschii* als Matrize amplifiziert. Dabei wurden *NdeI*- bzw. *BamHI*-Restriktionsschnittstellen erzeugt. Nach Restriktion mit diesen beiden Enzymen wurde das DNA-Fragment in den ebenso behandelten Vektor pET3a ligiert und in JM109 propagiert. Das resultierende Plasmid war pETMJ0041.

### **2. 9. Klonierung des Gens der Selenocystein-spezifischen tRNA (tRNA<sup>Sec</sup>) von *M. jannaschii* in *E. coli***

Das im Rahmen der Genomsequenzierung von *M. jannaschii* identifizierte *selC* Gen (Bult et al., 1996) wurde *in vitro* durch Assemblierung von Oligonukleotiden synthetisiert und wie beschrieben in pUC18 ligiert (Rother et al. 2000). Das so erhaltene Plasmid war p18MJC.

### **2. 10. Klonierung des MJ0029 codierenden ORF in *E. coli***

Das Gen für MJ0029 (*fruA*) zusammen mit seiner 3'-nicht-translatierten Region wurde durch PCR mit chromosomaler *M. jannaschii*-DNA als Matrize amplifiziert. Dabei wurde 5'-seitig eine *EcoRI*- und eine *NsiI*-, und 3'-seitig eine *XbaI* Restriktionsschnittstelle erzeugt. Um die Wildtyp-

Sequenz der 3'-nicht-translatierten Region zu erhalten, wurden die Oligonukleotide ofruA/5' mit ofruA/3'WT verwendet, für die Erzeugung der "Mut"-Sequenz das Oligonukleotid-Paar oMJfruA/5' mit oMJfruA/3'Mut. Nach Restriktion des erhaltenen PCR-Fragments mit *EcoRI* und *XbaI* wurde es in das *EcoRI/XbaI* behandelte pUC19-Plasmid ligiert und in JM109 propagiert. Die erhaltenen Plasmide waren p19fruA-WT und p19fruA-Mut. Um p19fruA-del zu generieren, wurde p19fruA-WT mit *AvaI* behandelt und die 5'-Überhänge wurden mit Klenow-Fragment aufgefüllt und religiert. Die Plasmide mit Punktmutationen im SECIS-Element, p19fruA-A/U und p19fruA-A/G, bzw. mit einem Basenpaaraustausch, p19fruA-CG/AU, wurden durch Ligation des *AvaI*-fragmentierten p19fruA-WT mit *in vitro* assemblierten Oligonukleotiden (Meinzel et al. 1988), die die entsprechende Mutation und kohäsive *AvaI*-Überhänge trugen, erzeugt. Nach Überprüfung der Konstrukte auf ihre korrekte Sequenz, wurden diese nach partieller *NsiI/XbaI*-Restriktion in den ebenso behandelten *E. coli-M. maripaludis*-shuttle Vektor pWLG30 (Gardner und Whitman 1999) ligiert und die erhaltenen Plasmide (pWLGfruA-WT, pWLGfruA-Mut, pWLGfruA-del, pWLGfruA-CG/AU, pWLGfruA-A/U und pWLGfruA-A/G) in XL10-Gold(Kan) propagiert.

## 2. 11. *In vitro*-Synthese von RNA

Modell-RNAs wurden *in vitro* mit am Lehrstuhl gereinigter T7-RNA-Polymerase nach der Methode von Wyatt et al. (1991) synthetisiert. Kurze RNA-Moleküle (< 45 Nukleotide) wurden von partiell doppelsträngigen Oligonukleotiden als Matrize transkribiert. Ein Oligonukleotid umfasste dabei die komplementäre Sequenz zur Modell-RNA und zum  $\Phi 10$ -Promotor, das andere Oligonukleotid (oT7-top) codierte für den  $\Phi 10$ -Promotor und hybridisierte mit dem ersten Oligonukleotid. Je nach Bedarf kamen Transkriptionsansätze unterschiedlicher Größe (25  $\mu$ l-10 ml) zum Einsatz. Ein Ansatz enthielt dabei: 40 mM Tris-Cl (pH 8,1), 42 mM  $MgCl_2$ , 1 mM Spermidin, 0,01% Triton-X-100, 5 mM DTT, je 4 mM ATP, CTP, GTP und UTP, 8 mM GMP, 2 U Pyrophosphatase, 5 U RNase-Inhibitor, je 0,4  $\mu$ M Matrizen-Oligonukleotide und 0,05  $\mu$ g/ $\mu$ l T7-RNA-Polymerase. Nach 3 h bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 U RNase-freier DNase gestoppt. Die Transkripte wurden über Polyacrylamid/Harnstoff-Gelelektrophorese, Ausschneiden der Banden und passive Elution (300 mM Na-Acetat (pH 4,6), 5 mM EDTA, 0,67% Phenol, gesättigt mit 100 mM Na-Acetat, pH 4,6) gereinigt. Nach Extraktion mit saurem Phenol (Phenol, gesättigt mit 100 mM Na-Acetat) und Na-Acetat/Ethanol-Fällung (0,1 Volumen 3 M Na-Acetat und 3 Volumen Ethanol) für 1h bei -20°C und anschließender Sedimentation der

RNA durch Zentrifugation bei 30000 x g, wurde sie zur weiteren Verwendung in 1 mM Na-Acetat (pH 4,6) gelöst.

## 2.12. [<sup>32</sup>P]-Markierung von Nukleinsäuren

Für Hybridisierungsexperimente wurden 20 pmol doppelsträngige DNA-Sonde mit 30  $\mu$ Ci  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-ATP (6000 Ci/ mmol) 5'-seitig mit Hilfe der T4-Polynukleotid-Kinase (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) nach Angaben des Herstellers markiert. Freie Nukleotide wurden anschließend mit dem QIAquick Nucleotide Removal Kit (Quiagen, Hilden) entfernt. Kurze RNAs wurden in Gegenwart von 50  $\mu$ Ci  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]-CTP (3000 Ci/ mmol) pro 500  $\mu$ l-Ansatz synthetisiert.

## 2.13. RNA-Hybridisierungsexperimente

Für die Quantifizierung heterolog erzeugter *fruA*-mRNA in *M. maripaludis* wurde die Gesamt-mRNA von pWLG30-Derivaten tragenden Transformanten mit dem High Pure RNA Isolation Kit (Roche) nach den Angaben des Herstellers gereinigt. 0,1, 1 und 10  $\mu$ g der Gesamt-RNA wurden dann mit Hilfe einer Manifold II Slot-Blot-Apparatur (Schleicher und Schuell) auf eine Hybond-N-Nylon-Membran (Pharmacia) immobilisiert. Ein [<sup>32</sup>P]-markiertes *SacI*-Restriktionsfragment von p19*fruA*-WT diente als Sonde. Als Kontrolle wurde das [<sup>32</sup>P]-markierte, 16S rRNA-spezifische Oligonukleotid A16 auf einem separaten Blot verwendet. Die Hybridisierung wurde wie bei Sambrook et al. (1989) beschrieben durchgeführt. Die Quantifizierung der Autoradiogramme erfolgte mit Hilfe der ImageQuant-Software (Molecular Dynamics), wobei zunächst die Signale der *fruA*-spezifischen Sonde gegen die der A16-Sonde abgeglichen wurden. Wie bei der Quantifizierung der heterologen FruA-Synthese (siehe 6.3.) wurden die Werte der einzelnen SECIS-Varianten als Prozentsatz des Wildtyp-Konstrukts ausgedrückt, wobei dieses als 100% angesetzt wurde. Die Werte entsprachen dabei den Mittelwerten aus drei unabhängigen Experimenten.

### 3. Methoden zur Proteinreinigung

#### 3.1. Standardmethoden

##### *Zellaufbruch*

Zellen wurden im Zweifachen ihres Naßgewichts im jeweiligen Zellaufbruch-Puffer suspendiert. Nach Zugabe von 0,0001% (w/v) PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) wurden die Zellen durch dreimalige Passage durch eine French Pressure Zelle (Aminco, USA) bei 110 MPa aufgebrochen.

##### *Fraktionierung des Rohextrakts*

S30-Zentrifugation:

Der Rohextrakt wurde in SS34-Zentrifugenröhrchen (Sorvall) bei 16000 rpm für 30 min zentrifugiert, um nicht aufgebrochene ganze Zellen und Zelltrümmer zu sedimentieren.

S100-Zentrifugation:

Der Überstand der 30000 x g Zentrifugation (S30) wurde bei 100000 x g für 2 h zentrifugiert (Sorvall Ti 50.2 Rotor), wobei unlösliche Bestandteile des S30, wie etwa die Membranen, abgetrennt wurden.

##### *Säulenchromatographie*

Die Säulenchromatographische Auftrennung von Proteinen erfolgte an einer FPLC Anlage (Pharmacia, Freiburg) mit Säulen von Pharmacia, und, soweit nicht anders angegeben, mit Säulenmaterialien von Pharmacia. Die Chromatographien wurden bei 8°C durchgeführt.

##### *Einengung von Proteinlösungen*

Proteinlösungen von mehr als 5 ml wurden in einer Ultrazentrifugationszelle (Amicon, Modell 12) durch eine Ultrazentrifugationsmembran (Filtron, Ausschlußgröße etwa 1/5 des einzuengenden Proteins) eingeeengt. Kleine Volumina (ca. 1 ml) wurden durch Ultrafiltrationszentrifugation mit Mikrokonzentratoren (Pall Filtron, Dreieich) nach Angaben des Herstellers eingeeengt.

#### 3.2. Reinigung des MJ0495-Proteins

Die Zellen des Stammes BL21(DE3), transformiert mit pTMJ005, wurden nach Suspendierung im Zellaufbruchpuffer (50 mM HEPES (pH 7,0), 10 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 2 mM

DTT, 2  $\mu\text{g/ml}$  DNase I, 1  $\mu\text{g/ml}$  Lysozym) mit Hilfe der French Pressure Cell aufgebrochen. Der S30 wurde 20 min bei 80°C inkubiert, um nicht thermostabile Proteine zu denaturieren. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Bestandteile des so gewonnenen Extrakts mit Hilfe einer SP-Sepharose Säule chromatographisch aufgetrennt. MJ0495 eluierte in einem aufsteigendem linearen NaCl-Gradienten (0-500 mM) in Puffer A (50 mM HEPES (pH 7,0), 10 mM KCl, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM EDTA, 2 mM DTT ) zwischen 250 und 350 mM NaCl. Die MJ0495 enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und nach Dialyse gegen Puffer B (Puffer A mit 1M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) in einem absteigenden linearen  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Gradienten (1-0 M) mit einer Butyl-Sepharose Säule weiter aufgetrennt. Die MJ0495 enthaltenden Fraktionen (Elution zwischen 680 und 520 mM) wurden erneut vereinigt, gegen Puffer A dialysiert und durch einen linear steigenden K-Phosphat-Gradienten (0-400 mM) bis zur annähernden Homogenität (Elution zwischen 265 und 280 mM) durch Chromatographie mit einer Hydroxyapatit-Säule (BioRad, München) aufgereinigt. Einengung des Proteins erfolgte nach Dialyse gegen Puffer A. Nach erneuter Dialyse gegen Puffer C (50% (w/v) Glycerin in Puffer A) wurde das gereinigte Protein bei -20°C gelagert.

### 3. 3. Reinigung des MJ0041-Proteins

Die Zellen des Stammes BL21(DE3), transformiert mit pETMJ0041, wurden wie für MJ0495 beschrieben aufgebrochen. Der S30 wurde 20 min bei 65°C inkubiert, um nicht thermostabile Proteine zu denaturieren. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Bestandteile des so gewonnenen Extrakts mit Hilfe einer DEAE-Sepharose Säule chromatographisch aufgetrennt. MJ0041 eluierte in einem aufsteigendem linearen NaCl-Gradienten (0-500 mM) in Puffer A (siehe oben) bei etwa 400 mM NaCl. Die MJ0041 enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und nach Dialyse gegen Puffer A eingengt. Nach erneuter Dialyse gegen Puffer C (siehe oben) wurde das gereinigte Protein bei -20°C gelagert.

### 3. 4. Anreicherung SECIS-bindender Proteine von *M. jannaschii*

Für die Herstellung von *M. jannaschii*-Zellextrakten wurden Zellen im Zweifachen ihres Naßgewichts in Puffer A lysiert. Dem durch Zentrifugation geklärten Extrakt wurden dann 500 pmol 5'-biotinylierte *vhuU*-SECIS-RNA (MJWT, Interactiva, Ulm) und gegebenenfalls 2500 pmol Kompetitor-RNA zugegeben. Nach 20 min bei Raumtemperatur und leichter Agitation des Ansatzes erfolgte die Zugabe von 250  $\mu\text{l}$  in Puffer A äquilibrierter Streptavidin-Agarose (Sigma); anschließend wurde das Gemisch 30 min inkubiert. Das Gelbett wurde dann durch Zentrifugation

sedimentiert, und 6 mal mit je 0,5 ml Puffer A gewaschen. Die dann noch zurückgehaltenen Proteine wurden durch denaturierende Gelelektrophorese von Gelbett-Aliquots aufgetrennt.

#### **4. Szintillationsmessung**

Die Quantifizierung radioaktiver Proben wurde mit Hilfe eines Flüssigkeitsszintillations-Zählgeräts (Tri-Carb 2100TR, Packard Instruments, Illinois) durchgeführt. Hierzu wurde die Probe in 2 ml vorgelegte Szintillationsflüssigkeit (Ultima Gold, Packard Instruments) pipettiert und 30 min lang äquilibriert, um Chemolumineszenzeffekte zu minimieren. <sup>75</sup>Se-Aktivität wurde im <sup>32</sup>P-Kanal (Zähldauer 1 oder 5 min) gemessen. Radioaktivität, die auf Glasfaserfiltern immobilisiert war, wurde in 2 ml Szintillationsflüssigkeit (Ultima Gold F) wie oben ausgezählt.

#### **5. Gelelektrophoretische Methoden**

##### **5.1. Elektrophorese von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen**

Die Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen erfolgte nach der Methode von Laemmli (1970) oder von Schägger und von Jagow (1987) in diskontinuierlichen Polyacrylamidgelen.

Die aufzutrennende Probe wurde vor dem Auftragen auf das Gel in Probenauftragspuffer (80 mM Tris (pH 6,8), 100 mM DTT, 2% SDS, 10% Glycerin, 0,005% Bromphenolblau) für 1 min gekocht.

##### **5.2. Zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese**

###### ***Erste Dimension***

Die isoelektrische Fokussierung der Proteine erfolgte wie in der Bedienungsanleitung des Immobiline Dry Strip Kit beschrieben (siehe auch Görg et al. 1988), mit individuellen Modifikationen: Verwendet wurde eine Multiphor II Elektrophoreseeinheit (Pharmacia) in Verbindung mit dem Immobiline Dry Strip Kit (Pharmacia). Die Anlage wurde von einem Kryostaten (F4381, HAAKE, Berlin) auf konstant 18°C gekühlt, als Spannungsquelle diente ein EPS 3500 Hochspannungsgeber (Pharmacia). Es wurden Immobiline Dry Strips mit 180 mm Länge und pH Gradienten von 3-10 verwendet. Die Strips wurden über Nacht in der Rehydrierungslösung nach Angaben des Herstellers rehydriert. Vorfokussierung erfolgte für 30

min bei 150 V, bevor die Probe dann anodisch (pH ~ 5) mit Hilfe des Probenapplikators aufgetragen wurde; dem Probeneinlauf dienten 500 V für 1 h und die eigentliche Fokussierung fand bei 3500 V für 55-70 kWh statt. Nach der Fokussierung wurden die 180 mm langen Strips an beiden Enden gekürzt, um sie auf die zweite Dimension applizieren zu können. Ihre Länge betrug dann etwa 160 mm. Sie wurden entweder gleich auf die zweite Dimension aufgelegt oder in Frischhaltefolie gehüllt bei -70°C gelagert.

### ***Zweite Dimension***

Die Durchführung der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) erfolgte wie oben beschrieben, mit Anpassungen an die erste Dimension: Die Dry Strips wurden nacheinander jeweils 20 min in Äquibrierungslösung 1 (6 M Harnstoff, 50 mM Tris (pH 6,8), 30% Glycerin, 1% SDS, 10 mg/ml DTT) und Äquibrierungslösung 2 (wie Äquibrierungslösung 1, statt DTT 45 mg/ml Iodoacetamid und etwas Bromphenolblau) leicht bewegt, luftblasenfrei auf das Sammelgel aufgelegt und dort mit aufgeschmolzener 1% Agarose (in Laufpuffer) fixiert. Die Elektrophorese erfolgte stromstärkelimitiert bei 16 mA (Sammelgel) und 24 mA (Trenngel) über 4-5 h. Für die Vergleichbarkeit der Analysen von Extrakten aus selenverarmten und selenadäquaten *M. maripaludis*-Zellen mittels 2D PAGE wurden die entsprechenden Extrakte stets parallel analysiert.

### **5.3. Gelelektrophorese von RNA in Polyacrylamid/Harnstoff Gelen**

Für die denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese von RNA wurden 8-20%ige Polyacrylamidgele (Acrylamid/Bis-, 29:1 in TBE), die 7 M Harnstoff enthielten, verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei 250-500V.

### **5.4. Gelretardationsexperimente**

Um die Wechselwirkungen von Proteinen und Modell-RNAs zu untersuchen, wurden Gelretardationsexperimente durchgeführt. Unterschiedliche Proteinmengen (Rohextrakte oder gereinigte Proteine) wurden dazu mit konstanten Mengen (1-15 pmol) [<sup>32</sup>P]-markierten Transkripten in GR-Puffer (50 mM Tris-Acetat (pH 7,5), 5 mM Mg-Acetat, 1 mM DTT, 0,1 mM GTP) 10 min lang bei 37°C inkubiert. Der Nachweis von RNA-Protein-Komplexen erfolgte nach nicht denaturierender Polyacrylamidgelelektrophorese (4,5% Polyacrylamid/Bis- in GR-Puffer ohne DTT) bei 8°C durch Autoradiographie der getrockneten Gele.

## 6. Behandlung von Polyacrylamidgelen

### 6.1. Färbung

#### *Coomassie-Färbung*

Proteine wurden im Gel mit Coomassie-Färbelösung (0,05% Serva Brilliant Blue in 50% Methanol und 10% Essigsäure) fixiert und gefärbt; mit Entfärber (30% Methanol, 10% Essigsäure) wurde ungebundener Farbstoff wieder entfernt. Sollten Proteine aus dem Gel eluiert und weiter analysiert werden, enthielten weder Färber noch Entfärber Methanol.

#### *Silberfärbung*

Silberfärbung von Proteinen in Gelen erfolgte nach Blum et al. (1987). Die Gele konnten gegebenenfalls mit 1 % (w/v) K-Hexacyanoferrat-Lösung entfärbt und anschließend erneut gefärbt werden.

### 6.2. Trocknen von Polyacrylamidgelen

Mini-Polyacrylamidgele wurden für 30 min auf Filterpapier (Whatman 3 MM) bei 80°C in einem Gelrockner (BioRad) getrocknet.

2D-Gele wurden 2 h in Konservierungslösung (10% Ethanol, 5% Glycerin) eingelegt und zwischen in Konservierungslösung gequollenen Lagen Haushaltscellophan, die auf einen Rahmen gespannt wurden, bei 30°C über Nacht getrocknet.

### 6.3. Autoradiographie von Polyacrylamidgelen

Autoradiogramme von getrockneten Polyacrylamidgelen wurden mit Hilfe von Kodak Storage Phosphor Screens (Molecular Dynamics, Sunnyvale, USA) erstellt. Sie wurden digitalisiert (Storm 860 Laser Scanner, Molecular Dynamics) und mit den Programmen ImageQuant 2.1 (Molecular Dynamics) und Photoshop 5.0 (Adobe, Mountain View, USA) visualisiert. Für die Quantifizierung bei der heterologen *fruA*-Expression in *M. maripaludis* wurde der Anteil von heterolog produziertem, radioaktiv markiertem FruA-Protein an der Gesamt-Radioaktivität in einer Gelspur bestimmt. Für das Wildtyp-Konstrukt wurde dieser Wert als 100% festgelegt, die Werte der anderen SECIS-Konstrukte wurden als Prozentsatz des Wildtyp-Wertes ausgedrückt, wobei jeweils drei unabhängige Experimente gemittelt wurden.

## 6. 4. Abbildung von Polyacrylamidgelen

Auf Filterpapier getrocknete Gele oder zwischen Cellophan getrocknete 1D- und 2D-Gele wurden mit Hilfe eines Scanners (UMAX, UC 840) digitalisiert und mit dem Programm Photoshop 5.0 (Adobe) visualisiert.

## 7. Konzentrationsbestimmungen

### *Proteinkonzentrationen*

Die Bestimmung von Konzentrationen gereinigter Proteine erfolgte spektroskopisch nach der Methode von Whitaker und Granum (1980), für komplexe Proteingemische wurde die Methode von Bradford (1976) angewandt.

### *Nukleinsäure-Konzentrationen*

Die Konzentrationen von DNA- und RNA-Lösungen wurden durch Messung ihrer Absorption bei 260 und 280 nm bestimmt, wobei das 260/280 nm-Verhältnis ein Maß für die Reinheit der Nukleinsäure ist. Für DNA wurde eine Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$ , für RNA von 40  $\mu\text{g/ml}$ , pro  $E_{260}$  angenommen.

## 8. Biochemische Methoden

### 8. 1. Bestimmung der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität

Für die Bestimmung von  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten wurde der Stamm FM433: $\lambda$ ERM mit pSJJselB oder pSJJHisselB und gegebenenfalls auch noch mit p19JJCGA transformiert. Die Transformanten wurden wie bei Heider et al. (1992) beschrieben aerob bei 37°C in TP-Medium kultiviert, bevor die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität nach der Methode von Miller (1992) bestimmt wurde.

### 8. 2. Bestimmung der Affinitätskonstanten für Guanin-Nukleotide

Die Affinitätskonstanten des gereinigten MJ0495-Proteins für GTP und GDP wurden in Anlehnung an die Methode von Ormö und Sjöberg (1990) bestimmt. Dazu wurden in Reaktionsvolumen von je 200  $\mu\text{l}$  variable Nukleotidkonzentrationen, 0,05 - 10  $\mu\text{M}$  im Falle von GDP, 0,015 - 2  $\mu\text{M}$  im Falle von GTP, mit konstanten Proteinmengen (1, bzw. 0,5  $\mu\text{M}$ ) in

Gegenwart von radioaktiv markierten Nukleotiden (50 nCi [ $^3\text{H}$ ]GDP, 300 nCi [ $^{32}\text{P}$ ] GTP) 30 min bei 50°C in Puffer D (20 mM HEPES (pH 7,0), 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2mM DTT) inkubiert. Die spezifischen Aktivitäten betragen 33,5 Ci/mmol für [ $^3\text{H}$ ]GDP und 3810 Ci/mmol für [ $^{32}\text{P}$ ]GTP. 2 Proben von je 20  $\mu\text{l}$  wurden zur doppelten Bestimmung von freiem plus gebundenem Liganden (B+F) entnommen und die Radioaktivität wurde im Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen. Der Rest wurde rasch mit Hilfe von Ultrafiltrations-Mikrokonzentratoren durch Membranen mit 10 kDa Ausschlußgröße filtriert. Aus dem Filtrat wurde mit 2 Parallel-Proben von je 20  $\mu\text{l}$  nicht gebundener Ligand (F) durch Flüssigkeitsszintillationszählung bestimmt. Errechnet man B aus (B+F) - F und korrigiert B auf die eingesetzte Proteinkonzentration ([B]), kann die Dissoziationskonstante aus dem Scatchard-Plot ([B]/F gegen [B] aufgetragen) als der Kehrwert der Steigung der sich ergebenden Geraden ermittelt werden.

### 8. 3. Reinigung der Selenocystein-spezifischen tRNA ( $\text{tRNA}^{\text{Sec}}$ ) von *M. jannaschii*

Für die heterologe Überproduktion der  $\text{tRNA}^{\text{Sec}}$  von *M. jannaschii* wurde der *E. coli* Stamm WL81460 mit p18MJC transformiert. Die Expression des tRNA-Gens erfolgte über Nacht durch aerobe Kultivierung in doppelt konzentriertem LB, supplementiert mit 100  $\mu\text{g/ml}$  Ampicillin und 50  $\mu\text{g/ml}$  Kanamycin. Die Roh-tRNA wurde nach der Methode von von Ehrenstein (1967) präpariert, die Reinigung der  $\text{tRNA}^{\text{Sec}}$  von *M. jannaschii* entsprach der von *E. coli* (Leinfelder et al. 1990). Die selbe Methode fand Anwendung bei der Präparation des Serin inserierenden Isoakzeptor-Pools (Leinfelder et al. 1990) aus *M. jannaschii*.

### 8. 4. Aminoacylierung der $\text{tRNA}^{\text{Sec}}$ von *M. jannaschii* mit L-Serin, Konversion der Ser- $\text{tRNA}^{\text{Sec}}$ zu Selenocysteyl- $\text{tRNA}^{\text{Sec}}$

Die Beladung der gereinigten  $\text{tRNA}^{\text{Sec}}$  von *M. jannaschii* mit L-Serin erfolgte mit gereinigter Seryl-tRNA-Synthetase von *E. coli* (Härtlein et al. 1987) nach der Methode von Baron und Böck (1991). Für die Umwandlung zu Selenocysteyl- $\text{tRNA}^{\text{Sec}}$  wurde die aminoacylierte tRNA zunächst mit Phenol extrahiert und mit Natriumacetat/ Ethanol gefällt und dann direkt im Reaktionspuffer gelöst. Die Konversionsreaktion wurde mit gereinigter Selenocystein-Synthase (Forchhammer et al. 1991) und Selenophosphat-Synthetase (Ehrenreich et al. 1992) von *E. coli* nach Baron und Böck (1991) durchgeführt. Zur Erhöhung der Ausbeute an Sec-tRNA<sup>Sec</sup> wurde die Aminoacylierung und die Konversion in einem gemeinsamen 30-minütigen Reaktionsansatz durchgeführt, wobei SS und SPS erst 5 min nach der SerRS zugegeben wurden. Für den

Nachweis von SS-Aktivität in *M. jannaschii* wurde *E. coli*-SS durch S100 von *M. jannaschii* (480  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein) ersetzt. Die Reaktionen wurden entweder mit [ $^{14}\text{C}$ ]-L-Serin (171,6 mCi/mmol), oder mit  $\text{Na}_2$ -[ $^{75}\text{Se}$ ]-Selenit (unterschiedliche spezifische Aktivitäten) durchgeführt. Die Aminoacylierung der tRNA<sup>Sec</sup> wurde durch TCA-Präzipitation der RNA auf Glasfaserfilter und der anschließenden Bestimmung der Radioaktivität auf den Filtern verfolgt. Der Nachweis von Sec-tRNA<sup>Sec</sup> wurde durch dünnschichtchromatographische Auftrennung der Deacylierungsprodukte und Autoradiographie, wie beschrieben (Baron und Böck 1991), erbracht.

### 8. 5. Bestimmung der Interaktion des MJ0495-Proteins mit Aminoacyl-tRNA

Die Bindung zwischen MJ0495 und Sec-tRNA<sup>Sec</sup>, Ser-tRNA<sup>Sec</sup>, bzw. Ser-tRNA<sup>Ser</sup> (Pool) wurde durch Filterbindung bestimmt. Sie erfolgte durch 10-minütige Inkubation von 5-15 pmol der entsprechenden Aminoacyl-tRNA mit unterschiedlichen Mengen MJ0495-Protein (0-50 pmol) in 100  $\mu\text{l}$  Puffer E (50 mM HEPES (pH 7,0), 10 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 0,1 mM GTP) bei 55°C. Anschließend wurden die Ansätze durch Nitrocellulose Filter mit 0,45  $\mu\text{m}$  Porendurchmesser (Schleicher und Schuell) gesaugt, die Filter mit 3 ml Puffer E gewaschen und getrocknet. Die Radioaktivität auf den Filtern wurde durch Flüssigkeits-Szintillationszählung bestimmt.

Alternativ wurde die MJ0495-Aminoacyl-tRNA-Interaktion durch RNase-Schutzexperimente nach Baron und Böck (1991) untersucht. Dabei wurden gleiche Mengen [ $^{14}\text{C}$ ]-markierter tRNA<sup>Sec</sup> mit 230 pmol MJ0495 oder BSA 5 min bei 33°C inkubiert, bevor der Reaktionsansatz auf Eis abgekühlt, und mit 5  $\mu\text{g}$  RNase A versetzt wurde. TCA-Fällung der Proben erfolgte in 20 Sekunden-Abständen. Die Präzipitate wurden über Glasfaserfilter gesammelt und die Radioaktivität auf den Filtern wurde wie oben angegeben bestimmt.

### 8. 6. Bestimmung der Interaktion von MJ0495-Protein mit RNA-Modellsubstraten

Um die Bindung von MJ0495-Protein an das mögliche *vhuU*-SECIS-Element zu untersuchen, wurden Filterbindungsexperimente durchgeführt. 15 pmol [ $^{32}\text{P}$ ]-markiertes Transkript wurden dazu mit steigenden MJ0495-Mengen (0-50 pmol) 10 min bei 55°C in Puffer E (siehe oben) inkubiert und wie für die Aminoacyl-tRNA-MJ0495-Interaktion beschrieben weiterbehandelt.

## 9. Immunologische Methoden

### *Immunisierung*

Für die Gewinnung von MJ0495-spezifischen Immunglobulinen wurde ein Kaninchen über einen Zeitraum von zwei Monaten mit insgesamt 300  $\mu\text{g}$  gereinigtem MJ0495-Protein immunisiert (SEQLAB, Göttingen). Nach der Entblutung standen ca. 100 ml Rohserum zur Verfügung.

### *Affinitätsreinigung von Antikörpern*

Für die Reinigung von MJ0495-spezifischen Antikörpern aus Rohserum wurde 1 mg gereinigtes MJ0495-Protein an Cyanbromid (CNBr)-aktivierte Sepharose 4B (2 ml Gelvolumen, Pharmacia) nach Herstellervorschrift immobilisiert. Die so gewonnene "MJ0495-Sepharose" wurde in einem 1 ml FPLC-Säulenträger (HR 5/5, Pharmacia) weiterverwendet. 1,5 ml anti-MJ0495-Rohserum wurde in Puffer AP (25 mM K-Phosphat (pH 8), 10 mM Mg-Acetat, 1 mM EDTA) über die „MJ0495-Säule“ aufgetrennt, Elution der MJ0495-spezifischen Immunglobuline erfolgte mit 100 mM Na-Citrat (pH 3,2). Das Eluat wurde gegen Puffer AP dialysiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### *Immunologischer Nachweis von Proteinen*

Für den immunologischen Nachweis wurden Proteine mittels Nassblotverfahren (Schmid und Böck 1984) aus Polyacrylamidgelen auf BioTrace NT Nitrocellulose-Membranen (Pall, Dreieich) übertragen. Der Nachweis von MJ0495 erfolgte nach einstündiger Behandlung mit  $\alpha$ -MJ0495-Rohserum (1:1000 verdünnt) oder gereinigten Antikörpern (1:400 verdünnt) mit Hilfe von Meerrettich-Peroxidase konjugiertem Protein A von *Staphylococcus aureus* (BioRad, München) und dem ECL-System (Roche, Penzberg) nach Vorschrift der Hersteller.

### *Co-Immunpräzipitation von MJ0495-bindenden Proteinen*

Um MJ0495-bindende Proteine anzureichern, wurden zunächst durch Affinitätschromatographie gereinigte MJ0495-spezifische Antikörper (siehe oben) irreversibel an Protein A-Dynabeads (Dynal, Oslo) immobilisiert. Dies geschah nach der vom Hersteller empfohlenen Prozedur („Crosslinking of immunglobulins“). So hergestellte, in IP-Puffer (50 mM Tris-Acetat (pH 7,5), 5 mM Mg-Acetat, 5 mM KCl, 1 mM DTT, 0,1 mM GTP) resuspendierte "anti-MJ0495-Dynabeads" (ein Äquivalent von 200  $\mu\text{l}$  Protein A-Dynabeads) wurden zusammen mit 200  $\mu\text{l}$  in IP-Puffer hergestelltem S30 von *M. jannaschii* 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem

Waschen mit 50 mM Tris-Acetat (pH 7,5) wurden an die "anti-MJ0495-Dynabeads" bindende Proteine in zwei aufeinander folgenden Schritten mit je 20  $\mu$ l 300 mM NaCl (in 50 mM Tris-Acetat (pH 7,5) eluiert. Zur Identifizierung der angereicherten Proteine wurde die selbe Prozedur mit der dreifachen Menge an Materialien durchgeführt; die erhaltenen Proteinbanden wurden aus dem Gel ausgeschnitten, im Gel mit Trypsin abgebaut und massenspektroskopisch analysiert.

## **10. Bioinformatische Methoden**

### *Sequenzsuche*

Die Suche nach und Abfrage von Primärstrukturen erfolgte über das Internet, meist unter Einsatz des BLAST-Algorithmus (Altschul et al. 1997), wobei das NIH (National Institute of Health) der USA mit seinen Datenbanken ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) die Hauptbezugsquelle darstellte. Die Identifizierung von Proteinen durch die Zuordnung von Peptidmassen erfolgte über die Internet-Server SwissProt (<http://www.expasy.ch>) oder MS-Fit und MS-Digest (<http://prospector.ucsf.edu>).

### *Sequenzvergleiche*

Sequenzvergleiche wurden mit den Programmen GENWORKS 2.5 (IntelliGenetics, Kalifornien, USA) oder MegAlign (DNASTAR, Wisconsin, USA) mit anschließender manueller Korrektur durchgeführt.

### *Sekundärstrukturanalysen*

Sekundärstrukturen von Modell-RNAs wurden mit Hilfe von MulFold oder RNAFold (Jaeger et al. 1989) berechnet und gegebenenfalls per Hand korrigiert.

# Ergebnisse

Die Genomanalyse von *M. jannaschii* (Bult et al. 1996) lieferte die ersten experimentellen Daten dafür, dass dieses Archaeon die Fähigkeit zur Selenoprotein-Biosynthese besitzt (Wilting et al. 1997). *In silico*-Identifizierung der möglichen Komponenten des Selenocystein-Biosyntheseapparats (siehe Einleitung) diente dann als Ausgangspunkt einer weitergehenden Analyse des Selenocystein-Stoffwechsels in dieser Arbeit.

## 1. Die Selenocystein-spezifische tRNA von *M. jannaschii*

### *Beladung und Umwandlung der M. jannaschii-tRNA<sup>Sec</sup> mit E. coli-Enzymen*

Das im Rahmen der Genomanalyse identifizierte Gen der Selenocystein inserierenden tRNA (tRNA<sup>Sec</sup>) von *M. jannaschii* (Bult et al. 1996) wurde durch Assemblierung sich überlappender Oligonukleotide in *E. coli* kloniert (Rother et al. 2000). Die heterolog überproduzierte und gereinigte tRNA wurde biochemisch untersucht. Durch Bestimmung des Molekulargewichts mit

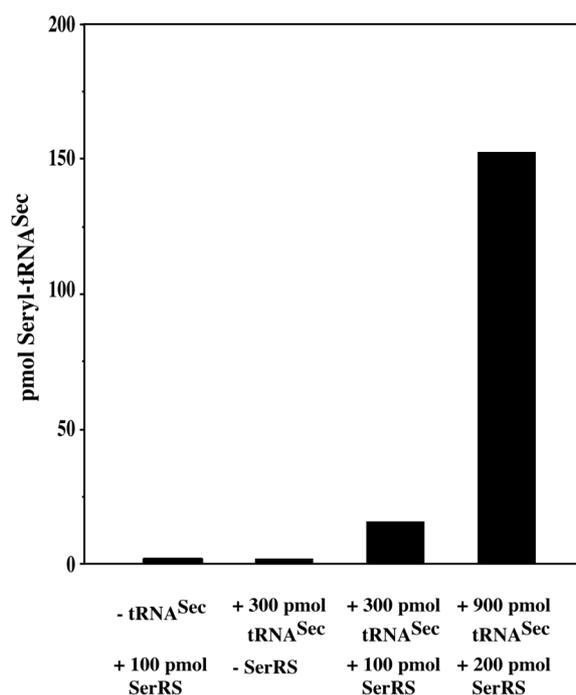


Abbildung 4: Serylierung der tRNA<sup>Sec</sup> von *M. jannaschii* mit L-[<sup>14</sup>C]-Serin durch die Seryl-tRNA-Synthetase (SerRS) von *E. coli*.

Hilfe von MALDI-TOF Massenspektrometrie im Labor von F. Lottspeich auf 29769 Da ( $\pm 84$  Da) konnte zunächst sowohl die Identität (durch Übereinstimmung des experimentell bestimmten und

des theoretischen Molekulargewichts von etwa 29800 Da), als auch die Intaktheit der tRNA<sup>Sec</sup> (ein abgespaltenes CCA-3' Ende hätte ein etwa 1000 Da geringeres Molekulargewicht der tRNA zur Folge) von *M. jannaschii* bestätigt werden (S. Commans, persönliche Mitteilung). Die gereinigte tRNA wurde dann auf ihre Aminoacylierbarkeit *in vitro* untersucht. Da Seryl-tRNA-Synthetase (SerRS) von *M. jannaschii* nicht zur Verfügung stand, wurde am Lehrstuhl vorhandene SerRS von *E. coli* eingesetzt. Der Nachweis der Beladung erfolgt dabei durch die Präzipitation der tRNA mit Trichloressigsäure (TCA), wobei veresterte Aminosäuren mit der tRNA präzipitieren, freie Aminosäuren dagegen nicht. Es konnte gezeigt werden, dass sich *M. jannaschii*-tRNA<sup>Sec</sup> mit Hilfe der SerRS von *E. coli* mit Serin aminoacylieren lässt. Abb. 4 zeigt die Menge an mit TCA präzipitierbarem [<sup>14</sup>C]-Serin in Gegenwart von unterschiedlichen Mengen tRNA<sup>Sec</sup> bzw. SerRS. Die Ausbeute an Ser-tRNA<sup>Sec</sup> belief sich dabei auf etwa 20% der eingesetzten tRNA. Im homologen *E. coli*-System ist die Ausbeute etwa 80% (K. Forchhammer, persönliche Mitteilung), was als Indiz dafür gewertet werden kann, dass tRNA<sup>Sec</sup> von *M. jannaschii* ein schlechteres Substrat für die SerRS von *E. coli* darstellt als die kognate tRNA<sup>Sec</sup>. Ein möglicher Grund könnte sein, dass das Reaktionsoptimum der SerRS von *E. coli* bei 37°C, das Wachstumsoptimum von *M. jannaschii* aber bei etwa 85°C liegt. Die tiefe Temperatur könnte zur Umfaltung der RNA

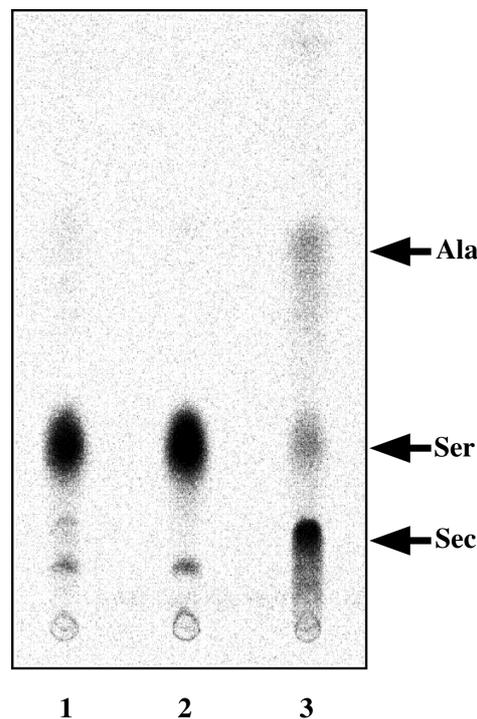


Abbildung 5: Umwandlung der Ser-tRNA<sup>Sec</sup> von *M. jannaschii* zu Sec-tRNA<sup>Sec</sup> durch SS und SPS von *E. coli*. Autoradiogramm eines Dünnschicht-Chromatogramms von Deacylierungsprodukten; [<sup>14</sup>C]Ser-tRNA<sup>Sec</sup> wurde inkubiert ohne (Spur 1) oder mit SeO<sub>3</sub><sup>2-</sup> und ohne (Spur 2) oder mit SS; Sec, Selenocystin; Ser, Serin; Ala, Alanin.

*in vitro* und somit zur verschlechterten Erkennung durch die SerRS geführt haben.

Auch die Umwandlung der Ser-tRNA<sup>Sec</sup> von *M. jannaschii* in Sec-tRNA<sup>Sec</sup> mit Hilfe der Selenocystein-Synthase und der Selenophosphat-Synthetase von *E. coli* war möglich (Abb. 5). Hierbei erfolgte der Nachweis der Umwandlung der [<sup>14</sup>C]-Seryl- in eine [<sup>14</sup>C]-Selenocysteyl-Gruppe durch dünnschichtchromatographische Auftrennung der Deacylierungsprodukte. Dabei zeigte sich, dass auch hier die Reaktion nicht quantitativ verlief (Abb. 5, Spur 3), was eine Ausbeute von *M. jannaschii*-Sec-tRNA<sup>Sec</sup> von nur etwa 10% zur Folge hatte. Um durch direktes Weiterreagieren der Ser-tRNA<sup>Sec</sup> zu Sec-tRNA<sup>Sec</sup> das Reaktionsgleichgewicht bei der Aminoacylierung zugunsten des Endprodukts zu verschieben, wurden als nächstes die Serylierungs- und die Konversionsreaktion in einem gemeinsamen Reaktionsansatz durchgeführt. Dadurch konnte die Ausbeute an Sec-tRNA<sup>Sec</sup> von *M. jannaschii* auf etwa 15% gesteigert werden (ohne Abb.).

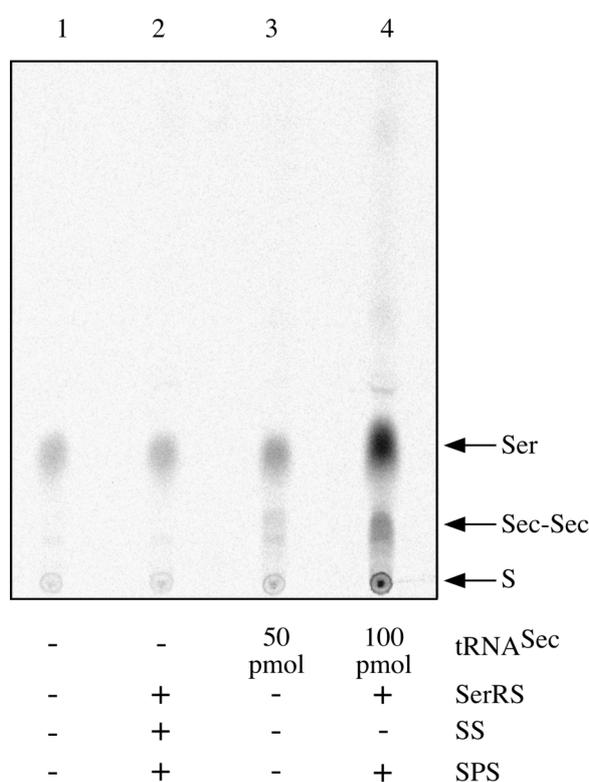


Abbildung 6: Umwandlung der Ser-tRNA<sup>Sec</sup> von *M. jannaschii* zu Sec-tRNA<sup>Sec</sup> durch einen Faktor im S100-Extrakt. Autoradiogramm eines Dünnschicht-Chromatogramms von Deacylierungsprodukten; [<sup>14</sup>C]Ser-tRNA<sup>Sec</sup> wurde mit 480  $\mu$ g Gesamtprotein von *M. jannaschii* und gereinigten Proteinen von *E. coli* wie angegeben inkubiert; S, Probenauftragsstelle; Sec-Sec, Selenocystin.; Ser, Serin; SS, Selenocystein-Synthase; SPS, Selenophosphat-Synthetase.

### ***Der S100 von M. jannaschii enthält Selenocystein-Synthase-Aktivität***

Die Tatsache, dass tRNA<sup>Sec</sup> von *M. jannaschii* mit Hilfe der heterologen Enzyme aus *E. coli* sowohl serylierbar als auch selenocysteylierbar ist, ließ einen zu *E. coli* analogen Mechanismus der Sec-tRNA<sup>Sec</sup>-Biosynthese für *M. jannaschii* vermuten. Um dieser Vermutung nachzugehen, wurden die Beladungs- und die Umwandlungsreaktion mit *M. jannaschii*-tRNA<sup>Sec</sup> und [<sup>14</sup>C]-L-Serin in Gegenwart von S100-Extrakt von *M. jannaschii* durchgeführt (Abb. 6). Es zeigte sich, dass der S100 von *M. jannaschii* ausreichend ist, kognate tRNA<sup>Sec</sup> zu selenocysteylieren (Abb. 6, Spur 3), wobei das Selenocystein aus Serin entstehen muss. Der Anteil von [<sup>14</sup>C]-Selenocystein an der Gesamtradioaktivität erhöht sich bei Zugabe von SerRS und SPS von *E. coli* deutlich (Abb. 6 Spur 4). Die geringe Selenocysteylierungseffizienz bei Verwendung des *M. jannaschii*-S100 kann an ungenügenden oder fehlerhaften Modifikation der tRNA<sup>Sec</sup> liegen, die heterolog in *E. coli* synthetisiert und bislang nicht auf ihre Modifikationen *in situ* untersucht wurde. Ob die Serin-Spots in den beiden Kontrollreaktionen ohne tRNA (Abb. 6, Spuren 1 und 2) aus verschlepptem [<sup>14</sup>C]-L-Serin herrühren, oder tatsächliche Deacylierungsprodukte endogener tRNAs im S100 darstellen, konnte nicht geklärt werden.

## **2. Charakterisierung des MJ0495 Proteins**

### ***Vorüberlegungen und Vorarbeiten***

Durch die Genomanalyse von *M. jannaschii* konnten keine Anhaltspunkte für die Existenz eines zu SelB homologen Genprodukts erhalten werden. Nur der ORF MJ0495 zeigte eine begrenzte Ähnlichkeit seiner abgeleiteten Aminosäuresequenz zu der von SelB; er wurde deshalb als möglicher Kandidat für ein zu *selB* homologes Gen angesehen. Da die Komplementation *in vivo* eines Gendefekts durch ein in *trans* bereitgestelltes Gen eine sehr aussagekräftige Methode zur Demonstration der Funktion eines unbekanntes Genprodukts darstellt, wurde der *selB*-Deletionsstamm PT91300 von *E. coli* mit pSMJ0495, das das MJ0495-Gen unter der Kontrolle des *lac*-Promotors enthält, transformiert. Komplementation des SelB-Defekts würde zur Restauration der Aktivität des Formiat-Hydrogen-Lyase Komplexes führen, dessen Formiat-Dehydrogenase-Komponente Selenocystein enthält. MJ0495 war nicht in der Lage, die Selenoprotein-Biosynthese in dem *E. coli selB*-Deletionsstamm wiederherzustellen (Daten nicht gezeigt).

Um die Rolle von MJ0495 im Selenocystein-Stoffwechsel *in vitro* zu demonstrieren, wurde das Protein heterolog in *E. coli* überproduziert und gereinigt. Da SelB von *E. coli* GTP, Sec-tRNA<sup>Sec</sup> und das SECIS-Element bindet, sollte das gereinigte MJ0495-Protein auf diese Eigenschaften hin untersucht werden.

## 2. 1. Reinigung des rekombinanten MJ0495 Proteins

Ausgangsmaterial für die Reinigung von MJ0495 waren Zellen des *E. coli*-Stammes BL21(DE3), die zum einen das T7-Expressionsplasmid pTMJ005, und zum anderen das die tRNA<sup>Arg</sup><sub>UCU</sub> codierende Plasmid pUBS520 enthielten. Co-Expression dieser tRNA hilft Fehlincorporation von

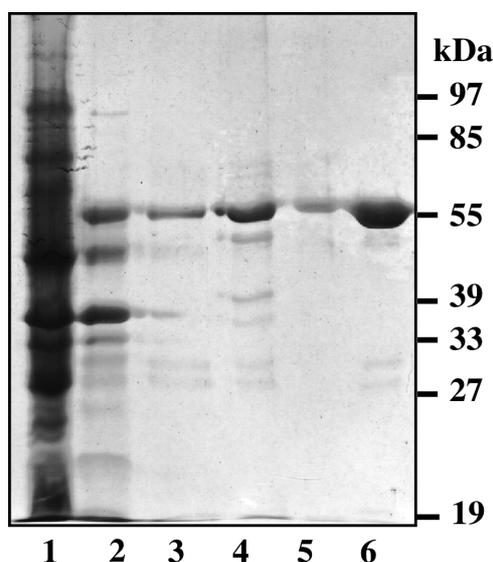


Abbildung 7: Reinigung des MJ0495-Proteins. Spur 1, S30; Spur 2, S30 nach Hitzebehandlung; Spur 3, SP-Sepharose-Fraktion; Spur 4, Butyl-Sepharose-Fraktion; Spur 5, Hydroxyapatit-Fraktion; Spur 6, gereinigtes MJ0495-Protein; das SDS-PAG wurde mit Coomassie gefärbt.

anderen Aminosäuren an den in *E. coli* selten vorkommenden AGA/AGG-Codons zu vermeiden. Das MJ0495-Gen enthält 13 der von dieser tRNA erkannten Arginin-Codons. Die einzelnen Reinigungsschritte sind in Abb. 7 dargestellt. Der erste Reinigungsschritt machte sich die Tatsache zu Nutze, dass viele Proteine aus thermophilen Organismen thermostabil bleiben, wenn sie in mesophilen Organismen überproduziert werden (Adams und Kelly 1998). Nach Herstellung des S30 konnte so das MJ0495-Protein durch einen Hitzeschritt, bei dem die meisten *E. coli*-Proteine denaturiert wurden, und durch anschließende Zentrifugation stark angereichert werden (Abb. 7, Spur 2). Der zweite Reinigungsschritt, eine Kationenaustauscher-Chromatographie mit Sulfopropyl-(SP)-Sepharose, ergab eine weitere starke Anreicherung des MJ0495-Proteins (Abb. 7, Spur 3). Eine hydrophobe Interaktions-Chromatographie mit Butyl-Sepharose (Abb.7, Spur 4)

und eine Hydroxyapatit-Chromatographie (Abb.7, Spur 5) führten zur annähernden Homogenität (Abb. 7 Spur 6). Die Identität des gereinigten Proteins wurde durch Bestimmung seiner N-terminalen Aminosäure-Sequenz bestätigt (F. Lottspeich, persönliche Mitteilung). Aus 40 g Zellen (Nassgewicht) resultierten etwa 3,6 mg gereinigtes Protein.

## 2. 2. Bestimmung der $K_D$ -Werte für Guanin-Nukleotide

Aus der Analyse seiner Aminosäuresequenz konnte vermutet werden, dass MJ0495 Guanin-Nukleotide bindet. Eine ausreichend genaue Methode um die Gleichgewichtskonstanten für die Bindung von Nukleotiden zu bestimmen, stellt die Ultrafiltration dar. Sie ist einfacher und schneller durchzuführen als die Gleichgewichtsdialyse, dabei aber fast ebenso genau. Die Dissoziationskonstanten von MJ0495 für GTP und GDP wurden bestimmt, indem man konstante Mengen Protein mit steigenden Mengen radioaktiv markierten Nukleotiden inkubierte und dann

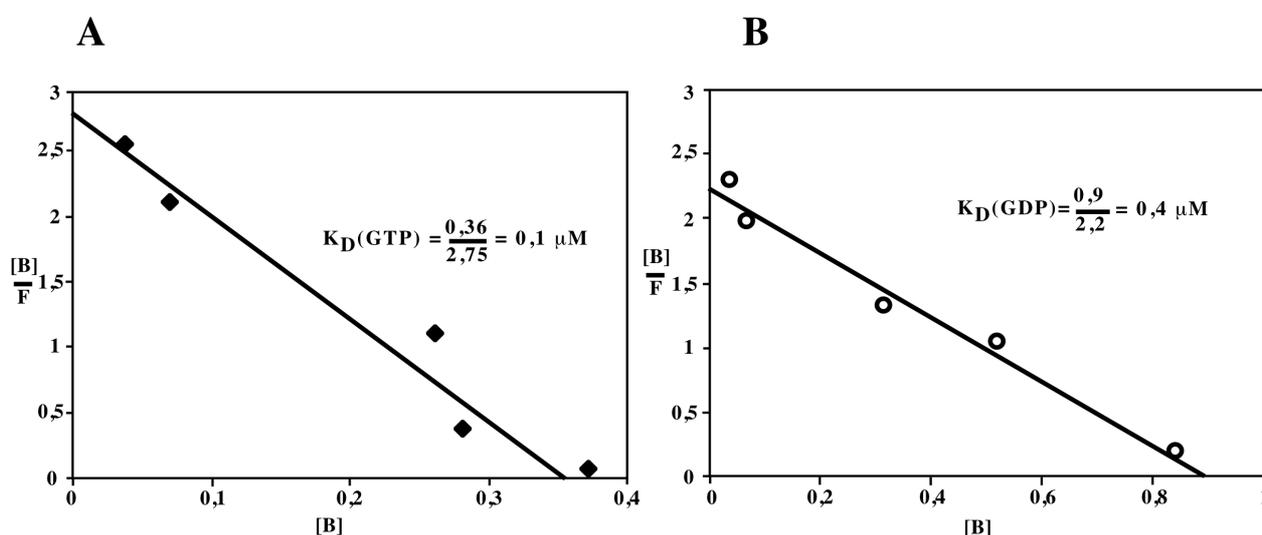


Abbildung 8: Bestimmung der Affinitätskonstanten ( $K_D$ ) von MJ0495 für GTP (A) und GDP (B) im Scatchard-Plot.  $[B]$ , molares Verhältnis von gebundenem Liganden und MJ0495;  $F$ , molare Konzentration von ungebundenem Liganden.

gebundene von nicht gebundenen Nukleotiden durch rasche Ultrafiltration abtrennte. Abb. 8 zeigt die graphische Ermittlung der Konstanten aus den jeweiligen Scatchard-Plots, wobei jeder Messpunkt dem Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten entspricht. Es ergab sich für GTP eine Dissoziationskonstante von etwa  $0,1 \mu\text{M}$  und für GDP von etwa  $0,4 \mu\text{M}$ . Das Verhältnis der beiden Konstanten von etwa 1:4 entspricht damit in etwa dem für SelB bestimmten (1,7:10; Forchhammer et al. 1989). Auffallend ist jedoch, dass der Graph für GTP die X-Achse bei 0,36 schneidet. Dieser Schnittpunkt ist ein Maß für die Stöchiometrie zwischen Protein und Ligand. Ein Wert von 1 (wie bei Abb. 8 B), deutet auf eine Liganden-Bindungsstelle pro Monomer

Protein hin. Ein Molekül MJ0495 bindet demnach ein Molekül GDP. Die Stöchiometrie der GTP-Bindung ist jedoch vom Wert her zu gering, um ein 1:1-Verhältnis zwischen Protein und Ligand zu schlussfolgern. Da das Protein für die Bindungsstudien für GTP und GDP aus unterschiedlichen Reinigungsansätzen stammte, erscheint es plausibel, dass die Protein-Charge, die für die Bestimmung des  $K_D$  für GTP MJ0495 eingesetzt wurde, teilweise inaktiv vorlag. Auf die Richtigkeit der erhaltenen Konstanten hat dies allerdings keinen Einfluss.

### 2.3. Interaktion zwischen MJ0495 und Aminoacyl-tRNAs

Die zweite wichtige Eigenschaft von SelB ist die Fähigkeit zur Diskriminierung zwischen der serylierten und der selenocysteylierten tRNA<sup>Sec</sup>, und die daraus resultierende Spezifität in der Bindung von Sec-tRNA<sup>Sec</sup> (Forchhammer et al. 1989). Deshalb sollte die Fähigkeit von MJ0495 untersucht werden, tRNA<sup>Sec</sup> zu binden.

#### *RNase-Schutzexperimente*

Eine Methode, die Interaktion von Elongationsfaktoren und Aminoacyl-tRNA zu untersuchen, stellt der Schutz der tRNA bei Komplexbildung mit dem Protein vor RNase A-Abbau dar (Knowlton und Yarus 1980). Sie bleibt durch Bindung an ein Protein mit TCA präzipitierbar, wohingegen freie tRNA sehr schnell abgebaut wird und nicht mehr präzipitierbar ist. Da die tRNA mit einer radioaktiv markierten Aminosäure beladen wird, kann die Präzipitierbarkeit der tRNA anhand der Präzipitierbarkeit der Radioaktivität verfolgt werden.

Gereinigte tRNA<sup>Sec</sup> von *M. jannaschii* wurde wie oben beschrieben mit [<sup>14</sup>C]-L-Serin seryliert, oder in einer kombinierten Aminoacylierungs- und Umwandlungsreaktion zu Sec-tRNA<sup>Sec</sup> selenocysteyliert. Nach Zugabe von RNase A wurden alle 20 Sekunden Proben entnommen und einer TCA-Präzipitation unterzogen. Der zeitliche Verlauf der Abnahme an TCA-präzipitierbarer Radioaktivität durch RNase A-Behandlung ist in Abb. 9 dargestellt. Das Bindungsverhalten von MJ0495 und Ser-tRNA<sup>Sec</sup> entspricht dem von BSA und Ser-tRNA<sup>Sec</sup> (Abb. 9 B), also der Negativkontrolle. Innerhalb weniger Sekunden ist fast keine Radioaktivität mehr mit TCA präzipitierbar. Im Falle von Sec-tRNA<sup>Sec</sup> (Abb. 9 A) bleibt ein signifikanter Teil der tRNA vor dem RNase-Abbau geschützt und damit mit TCA präzipitierbar. Anders als bei SelB von *E. coli* wird jedoch hier nicht der größte Teil der eingesetzten tRNA vor dem RNase-Abbau geschützt (Forchhammer et al. 1989; Baron und Böck 1991), sondern innerhalb der ersten 60 Sekunden nur etwa 35%, und auch dieser Anteil nimmt im weiteren Verlauf noch ab. Dieses Bindungsverhalten

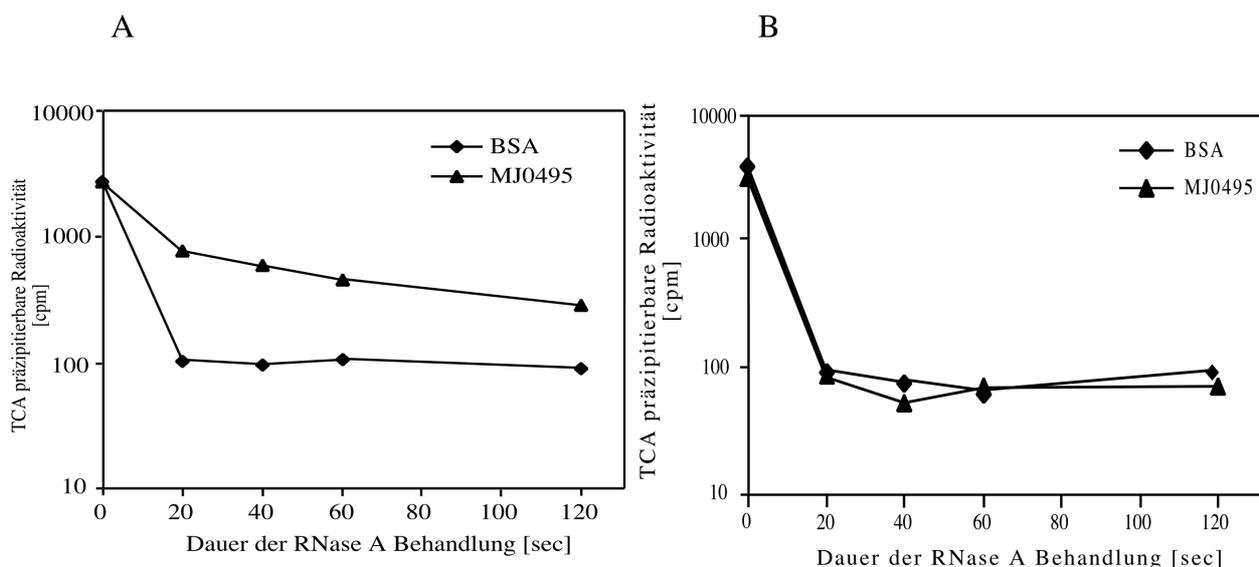


Abbildung 9: Interaktion von MJ0495 mit Aminoacyl-tRNAs nachgewiesen durch Schutz der tRNA vor RNase A-Abbau; dargestellt ist die Menge TCA-präzipitierbarer [ $^{14}\text{C}$ ]-Aminoacyl-tRNA<sup>Sec</sup>; ◆, BSA; ▲, MJ0495; sec, Sekunden; cpm, gemessene Zerfälle pro min.

von MJ0495 an Sec-tRNA<sup>Sec</sup> könnte wiederum daran liegen, dass der tRNA wegen ihrer heterologen Synthese möglicherweise Identitätsmerkmale für eine hochaffine Interaktion mit MJ0495 fehlen. Qualitativ kann jedoch mit Sec-tRNA<sup>Sec</sup> ein stärkerer Schutz vor RNase-Abbau als mit Ser-tRNA<sup>Sec</sup> beobachtet werden. Obwohl die Sec-tRNA<sup>Sec</sup>-Präparation nur zu einem Teil aus selenocysteylierter tRNA besteht, muss es sich bei der gebundenen Aminoacyl-tRNA um Sec-tRNA<sup>Sec</sup> handeln, da es ohne Umwandlungsreaktion zu keinem RNase-Schutz kommt (Abb. 9 B).

### Filterbindungsexperimente

Um die Resultate aus den RNase-Schutzexperimenten zu überprüfen und die Interaktion des MJ0495-Proteins mit der tRNA<sup>Sec</sup> von *M. jannaschii* direkt zu demonstrieren, wurden Filterbindungsexperimente durchgeführt. Gereinigte tRNA<sup>Sec</sup> von *M. jannaschii* wurde mit [ $^{14}\text{C}$ ]-L-Serin seryliert, oder zunächst mit nicht radioaktivem Serin aminoacyliert und dann zu Sec-tRNA<sup>Sec</sup> mit [ $^{75}\text{Se}$ ]-Selenit umgewandelt. Dadurch konnte man zwischen serylierter und selenocysteylierter Form der tRNA<sup>Sec</sup> unterscheiden. Trotz der nicht-quantitativen Umwandlungsreaktion bei der Präparation der Sec-tRNA<sup>Sec</sup> konnte dadurch ausschließlich deren Bindung an MJ0495 verfolgt werden. Steigende Mengen MJ0495 wurden bei 55°C mit [ $^{14}\text{C}$ ]-Ser-tRNA<sup>Sec</sup>, bzw. [ $^{75}\text{Se}$ ]-Sec-tRNA<sup>Sec</sup> für 10 min inkubiert und dann rasch durch Nitrocellulose-Filter gesaugt. Die Porengröße des Filters war dabei unerheblich, da das Protein nicht durch Größenausschluss, sondern durch hydrophobe Wechselwirkung auf dem Filter zurückgehalten wird. Als Kontrolle wurde der Serin inserierende Isoakzeptor-tRNA-Pool aus *M. jannaschii*

isoliert, mit [ $^{14}\text{C}$ ]-Serin beladen, und ebenso auf seine MJ0495-Bindung hin untersucht. Wie Abb. 10 zu entnehmen ist, wurden etwa 75% der Sec-tRNA<sup>Sec</sup> von 60 pmol MJ0495-Protein gebunden. Anders als für das *E. coli*-SelB beschrieben wurde auch Ser-tRNA<sup>Sec</sup> von MJ0495 gebunden, wenngleich mit geringerer Affinität. Die Tatsache, dass MJ0495 mit einem serylerten tRNA<sup>Ser</sup>-Pool nicht interagierte, lässt auf eine schwache, aber spezifische Erkennung von Ser-tRNA<sup>Sec</sup> durch MJ0495 schließen. Die Unterschiede in den Ergebnissen zwischen RNase-Schutzexperimenten und Filterbindungsexperimenten lassen sich mit unterschiedlichen "Nachweisgrenzen" der beiden Methoden erklären. Im ersten Ansatz wird schwach gebundene tRNA wegen des sofortigen RNase-Abbaus bei Dissoziation des RNA-Protein-Komplexes durch TCA-Präzipitation nicht mehr nachweisbar, im zweiten Verfahren erfolgt kein Abbau und das Bindungssystem bleibt länger im Gleichgewicht.

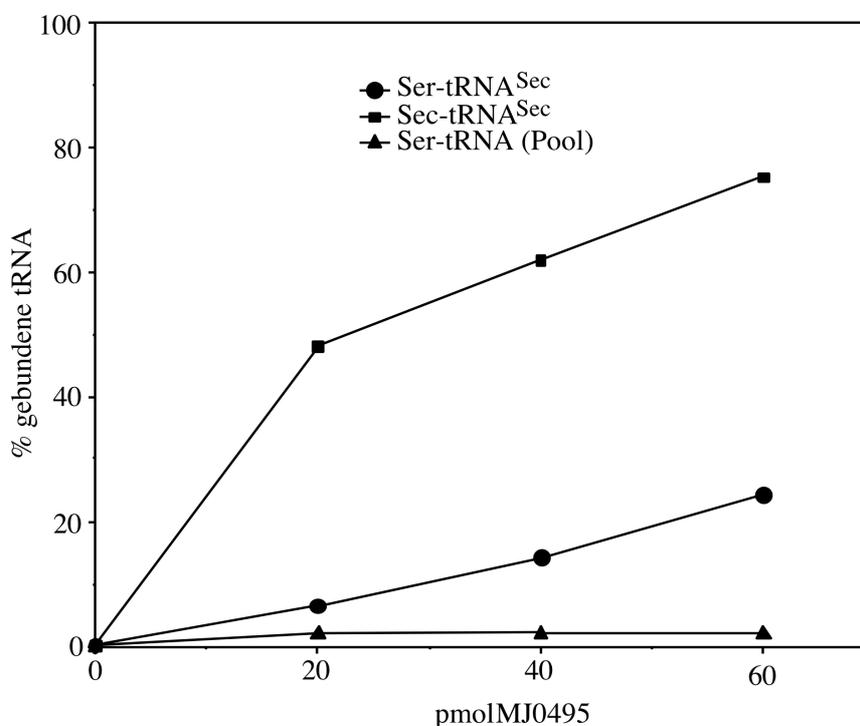


Abbildung 10: Interaktion von MJ0495 mit Aminoacyl-tRNAs nachgewiesen durch Nitrocellulose-Filter-Bindung; dargestellt ist der Prozentsatz retentierter [ $^{14}\text{C}$ ]Ser-tRNA<sup>Sec</sup> bzw. [ $^{75}\text{Se}$ ]Sec-tRNA<sup>Sec</sup>.

Die deutliche Diskriminierung von MJ0495 zwischen Sec-tRNA<sup>Sec</sup> und dessen Vorläufer Ser-tRNA<sup>Sec</sup> und die daraus resultierende spezifische Bindung von Sec-tRNA<sup>Sec</sup> beweist, dass MJ0495, was die Wechselwirkung mit Guanin-Nukleotiden und tRNA betrifft, funktionell ein zu SelB homologes Protein ist.

## 2. 4. Das mögliche SECIS-Element von *M. jannaschii*

Die Bindung der Sec-tRNA<sup>Sec</sup> an SelB führt im *E. coli*-System zu einer erhöhten Affinität zum SECIS-Element, das sich unmittelbar 3'-seitig vom Selenocystein-Codon auf der mRNA befindet. Dadurch wird die Sec-tRNA<sup>Sec</sup> in Nachbarschaft des UGA-Codons dem Translationsapparat zur Verfügung gestellt (Ringquist et al. 1994). In Selenoprotein mRNAs von *M. jannaschii* konnten keine solche SECIS-Elemente in unmittelbarer Umgebung des Selenocystein-Codons identifiziert werden; vielmehr fanden sich stark konservierte RNA-Sekundärstrukturen im 3'-nicht-translatierten Bereich der entsprechenden mRNAs. Es sollte deshalb die Rolle dieser möglichen SECIS-Elemente im Selen-Stoffwechsel von *M. jannaschii* biochemisch untersucht werden.

### *MJ0495 bindet das mögliche vhuU-SECIS-Element nicht*

Die erste Fragestellung war, ob das MJ0495-Protein in Analogie zum *E. coli*-SelB das kognate potentielle SECIS-Element in der 3'-nicht-translatierten Region der mRNA spezifisch bindet. Um diese mögliche Interaktion zu untersuchen, wurde das mRNA-Element des *vhuU*-Gens, das für

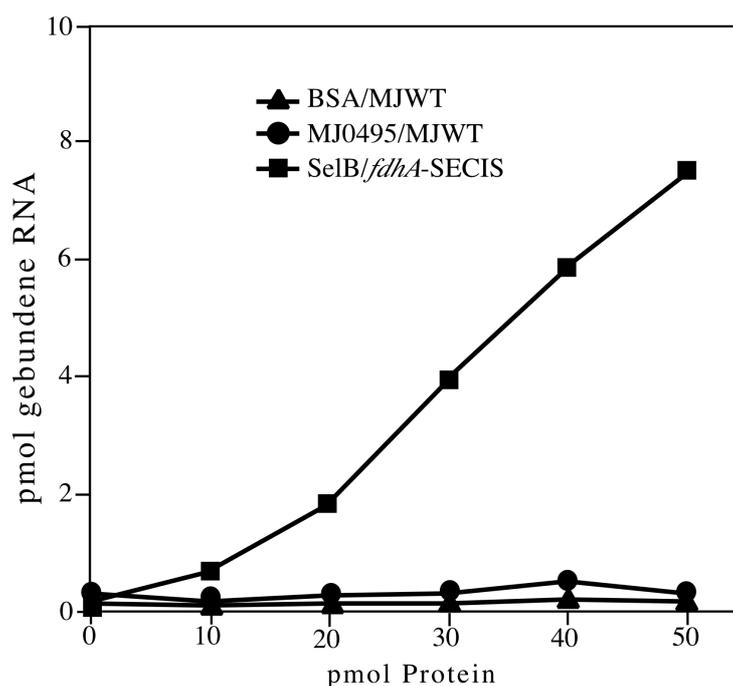


Abbildung 11: Interaktion von MJ0495 mit *in vitro*-Transkripten nachgewiesen durch Nitrocellulose-Filter-Bindung. ▲, [<sup>32</sup>P]-markiertes MJWT mit BSA inkubiert; ●, [<sup>32</sup>P]-markiertes MJWT mit MJ0495 inkubiert; ■, [<sup>32</sup>P]-markiertes *fdhF*-SECIS-Element mit SelB von *E. coli* inkubiert.

ein kleines Selenoprotein der F<sub>420</sub>-unabhängigen Hydrogenase codiert (Tab. 1), *in vitro* in Gegenwart von α-[<sup>32</sup>P]-CTP von partiell doppelsträngigen Oligonukleotiden ausgehend synthetisiert. Das so markierte Transkript wurde in Filterbindungsexperimente mit MJ0495

eingesetzt. Als Kontrolle diente zum einen BSA und zum anderen *E. coli*-SelB zusammen mit dem kognaten, [<sup>32</sup>P]-markierten *fdhF*-SECIS-Element (Thanbichler et al. 2000). Wie in Abb. 11 zu sehen ist, bindet unter den gegebenen Bedingungen SelB das *fdhF*-SECIS-Element deutlich, was durch eine von der SelB-Dosis abhängige Zunahme an Radioaktivität auf den Nitrocellulose-Filtern zum Ausdruck kommt. Dagegen binden MJ0495, wie auch BSA das mögliche *vhuU*-SECIS-Element (MJWT) nicht. Die Variation der Versuchsbedingungen (Pufferzusammensetzung, Inkubationstemperatur) änderte an diesem Befund nichts (ohne Abbildung).

***Das vermutliche vhuU-SECIS-Element wird von einer M. jannaschii-Komponente gebunden***

Die spezifische Interaktion von SelB aus *E. coli* mit dem kognaten SECIS-Element wurde ursprünglich mit Hilfe von Gelretardationsexperimenten bewiesen (Baron et al. 1993a). Dabei wird die Wanderungsgeschwindigkeit der radioaktiv markierten RNA-Sonde im nicht denaturierenden Polyacrylamidgel (PAG) durch Komplexierung mit SelB verringert, was zu einem "shift" der radioaktiven RNA-Bande im Autoradiogramm führt. Analoge Gelretardationsexperimente mit MJ0495 und dem vermutlichen *vhuU*-SECIS-Element von *M. jannaschii* ließen jedoch keine Interaktion erkennen (siehe Abb. 15, Spur 4). Allerdings sind die mit dieser Methode erhaltenen Ergebnisse schwer zu bewerten, da MJ0495 in einem physiologischen pH-Bereich (6,5-7,5) theoretisch positiv geladen sein sollte. Sein isoelektrischer Punkt (pI) wurde rechnerisch auf etwa 9,15 ([www.EMBL-Heidelberg.de/Services](http://www.EMBL-Heidelberg.de/Services)) bestimmt. Deshalb sollten MJ0495 und die markierte mRNA bei pH 7,5 (dem pH im PAG) im elektrischen Feld entgegengesetzte Migrationsrichtungen haben; das Protein würde daher in Richtung Kathode wandern. Andererseits könnte eine Interaktion mit der anionischen RNA den Komplex in Richtung Anode durch das PAG wandern lassen. Unter den gegebenen Bedingungen kam es jedoch zwischen dem möglichen *vhuU*-SECIS-Element und MJ0495 zu keiner durch Gelretardationsexperimente nachweisbaren Interaktion (Abb. 15).

Im Gegensatz dazu ist im S100 von *M. jannaschii* eine Komponente vorhanden, die das mögliche *vhuU*-SECIS-Element spezifisch bindet. *In vitro* synthetisierte, [<sup>32</sup>P]-markierte Modell-RNA-Spezies (Abb. 14) wurden in Gelretardationsexperimente mit einem S100-Extrakt von *M. jannaschii* eingesetzt. Neben der Widtyp-Struktur (MJWT) kam einmal eine Haarnadel-Struktur zum Einsatz, der das konservierte Motiv der möglichen *M. jannaschii*-SECIS-Elemente fehlte (MJMut1, Abb. 14), zum anderen zwei weitere Strukturen, in denen der interne "Loop" sowie die apikalen G-C Basenpaare verändert waren (Mut2 und Mut3, Abb. 14). Wie Abb. 12 zu entnehmen ist, führte die gelelektrophoretische Auftrennung des *M. jannaschii*-S100 nach Inkubation mit der

[<sup>32</sup>P]-markierten MJWT-Sonde zu zwei retardierten Banden, wobei die schneller wandernde (2) bereits durch mäßigen Überschuss eines nicht radioaktiv markierten Konkurrenzsubstrats (MJMut1) verschwand (Abb. 12, linke Seite). Im analogen Experiment mit [<sup>32</sup>P]-markierter MJMut1-Sonde und nicht radioaktiv markiertem MJWT-Transkript als Konkurrenzsubstrat, kam es nur zu der retardierten Bande 2, (Abb. 12, rechte Seite). Komplex 1 resultiert demnach aus einer spezifischen Interaktion zwischen dem möglichen *vhuU*-SECIS-Element und einem Protein oder Proteinen im S100-Extrakt.

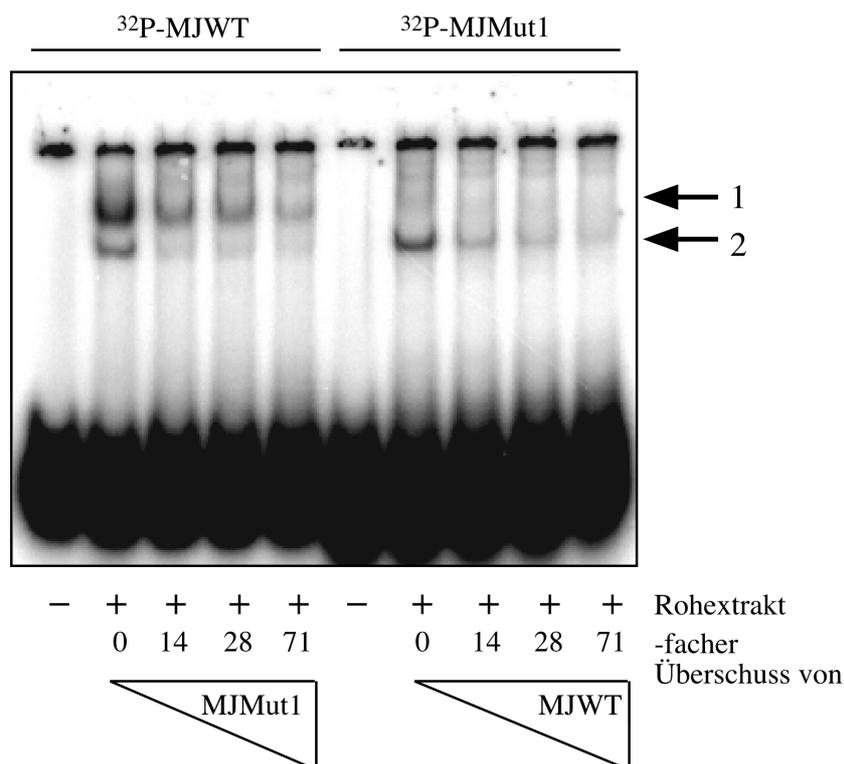


Abbildung 12: Interaktion von *in vitro*-Transkripten mit Komponenten im Rohextrakt (S100) von *M. jannaschii*, nachgewiesen durch Gelretardationsexperimente. MJWT, mögliches *vhuU*-SECIS-Element; MJMut1, Konkurrenzstruktur; Autoradiogramm eines nicht denaturierenden PAG.

Anhand der RNA-Strukturen MJMut2 und MJMut3 (Abb. 14) wurde im weiteren die Spezifität der Interaktion des Komplexes 1 untersucht. Die Bildung des mit der [<sup>32</sup>P]-markierten MJWT-Sonde entstehenden Komplexes wurde mit zunehmenden Überschüssen von MJMut2 oder MJMut3 kompetitiert. Wie aus Abb. 13 (linke Seite) hervorgeht, führt eine Zunahme an MJMut2 nur zu einer geringen Abnahme des Komplex 1, wohingegen Komplex 2 schon bei 15-fachem Überschuss von MJMut2 nahezu verschwunden ist. Das MJMut3-Transkript ist dagegen in viel stärkerem Maße in der Lage, mit dem MJWT-Komplex in Bande 1 zu konkurrieren (Abb. 13, rechte Seite), was durch eine deutliche Abschwächung der Bande schon bei 15-fachem Überschuss zum Ausdruck kommt.

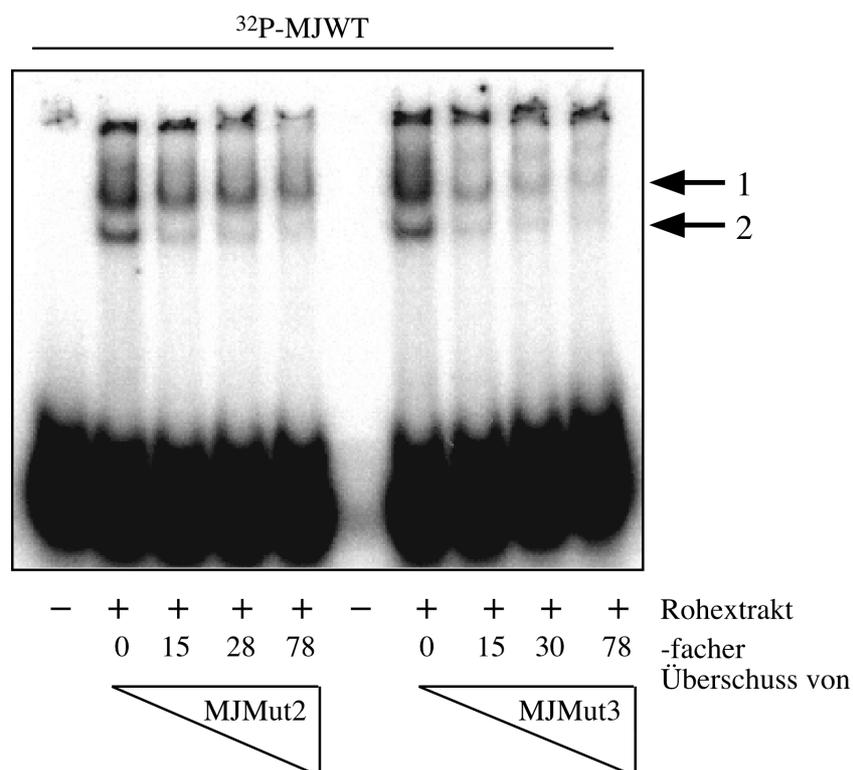


Abbildung 13: Interaktion von *in vitro*-Transkripten mit Faktoren im Rohextrakt (S100) von *M. jannaschii*, nachgewiesen durch Gelretardationsexperimente. MJWT, mögliches *vhuU*-SECIS-Element; MJMut2 und MJMut3, Konkurrenzstrukturen; Autoradiogramm eines nicht denaturierenden PAG.

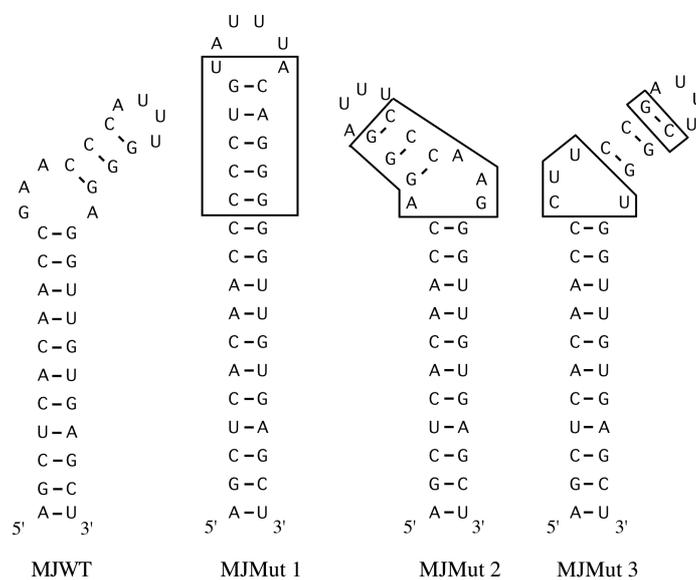


Abbildung 14: Sekundärstrukturvorhersagen von RNA-Transkripten, die in Gelretardationsexperimente eingesetzt wurden. Sequenzbereiche, die von der Wildtyp-Struktur (MJWT) abweichen, sind eingerahmt.

Nach Sekundärstrukturvorhersagen (MulFold oder RNAFold) ist von den eingesetzten Transkripten MJMut3 der Wildtyp-Struktur MJWT am ähnlichsten (Abb. 14). MJMut2, dessen

interner "Loop" mit den drei folgenden G-C Basenpaaren im Vergleich zum basalen "Stamm" und der apikalen Haarnadelschleife seitenverkehrt ist, kompetitiert am wenigsten mit MJWT um die Komplexbildung (Abb. 13, linke Seite). Die Kompetitionsversuche mit MJMut2 und MJMut3 und das Fehlen des Komplexes 1 in Gegenwart von MJMut1 zeigen, dass dieser Komplex das mögliche *vhuU*-SECIS-Element spezifisch erkennt.

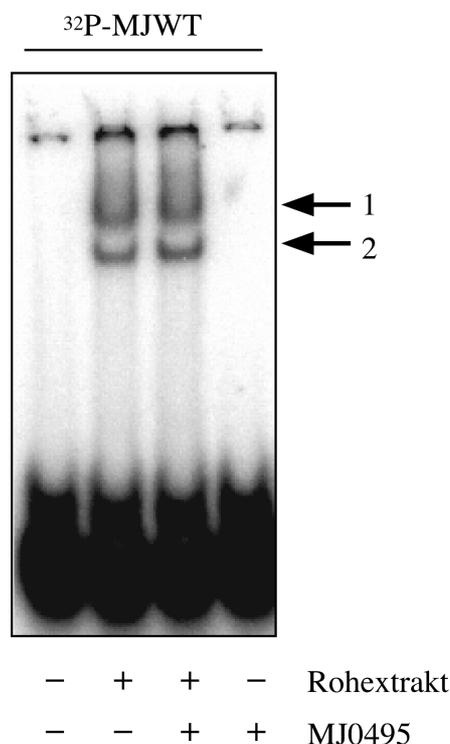


Abbildung 15: : Einfluss von MJ0495 auf die Interaktion von [<sup>32</sup>P]-markiertem *in vitro*-MJWT-Transkript mit Faktoren im Rohextrakt (S100) von *M. jannaschii*, nachgewiesen durch Gelretardationsanalyse; Autoradiogramm eines nicht denaturierenden PAG.

Im weiteren wurde untersucht, ob MJ0495 an diesem Komplex (Komplex 1, Abb. 12 und 13) beteiligt ist. Wie aus Abb. 15 zu entnehmen ist, führt eine Zugabe von MJ0495 in einem Gelretardationsexperiment mit *M. jannaschii*-S100 und [<sup>32</sup>P]-markiertem MJWT im Vergleich zum S100 alleine zu keiner Veränderung der Banden 1 und 2, was aber wie oben erwähnt mit dem basischen pI von MJ0495 zusammenhängen kann. Ob MJ0495 *in vivo* an der Erkennung der möglichen SECIS-Elemente von *M. jannaschii* beteiligt ist, lässt sich aus diesem Experiment deswegen nicht ableiten. *In vitro* jedoch ist MJ0495 kein Teil des spezifischen Komplex 1 (Abb. 12, 13 und 15).

### ***Identifizierung von möglichen SECIS-bindenden Proteinen***

Aus den bisher gewonnenen Erkenntnissen, nämlich dass (a) MJ0495 den Selenocystein-spezifischen Translationsfaktor von *M. jannaschii* darstellt und (b) dieser mit dem vermuteten SECIS-Element zumindest *in vitro* nicht interagiert, ergab sich die Frage nach den eigentlichen Interaktionspartnern dieser RNA-Struktur. Die SECIS-Elemente von *M. jannaschii* im 3'-nicht-translatierten Bereich der mRNA müssen mit dem Selenocystein-spezifischen Translationsfaktor kommunizieren, um am Ribosom das UGA Stopp-Codon zu einem Sinn-Codon (für Selenocystein) umzudeuten. Es ist anzunehmen, dass diese Kommunikation von einem oder mehreren Protein(en) vermittelt wird.

Um solche Proteine zu identifizieren, die das mögliche SECIS-Element von *M. jannaschii* binden, wurde ein S100-Extrakt von *M. jannaschii* durch Affinitätschromatographie aufgetrennt, wobei an Streptavidin immobilisiertes MJWT-Transkript (siehe oben) als Affinitätsmatrix diente. Prinzip dieser Methode ist, dass nur solche Moleküle zurückgehalten werden, die spezifisch an das am Säulenmaterial immobilisierte Substrat binden.

In Vorversuchen zeigte sich, dass die Zahl der Proteine, die an die Affinitätsmatrix binden, auch nach mehrmaligem Waschen des Säulenmaterials und Elution mit hohen Salzkonzentrationen, noch sehr hoch war. Viele Proteine von *M. jannaschii* binden an das Säulenmaterial (Streptavidin-Agarose) selbst, ohne dass zuvor RNA immobilisiert worden war. Dies erschwerte eine eindeutige Identifizierung spezifisch bindender Faktoren erheblich. Um dies dennoch zu erreichen, wurden die Ansätze vor der gelelektrophoretischen Auftrennung mit Überschüssen an Konkurrenzsubstraten behandelt. Ein Teil der Ansätze wurde mit einem Überschuss an MJMut1-Transkript (siehe oben) inkubiert, um Proteine von der Affinitätsmatrix zu lösen, die unspezifisch RNA erkennen. Mäßige Überschüsse (etwa 5-fach) sollten den spezifischen RNA-Protein Komplex nicht auflösen (siehe Abb. 12, linke Seite). Ein anderer Teil der Ansätze wurde mit einem Überschuss an MJWT-Transkript behandelt, was neben den unspezifischen auch die spezifisch an die Affinitätsmatrix bindenden Proteine lösen sollte. Ein weiterer Parallelansatz, bei dem kein RNA-Transkript immobilisiert wurde, diente zur Identifizierung solcher Proteine, die nur von dem Gelbett (Streptavidin-Agarose) zurückgehalten wurden. Der Vergleich der "Bandenmuster" nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der Ansätze ohne und mit immobilisierter RNA und ohne und mit MJWT bzw. MJMut1 als Konkurrenzsubstrat sollte eine Identifizierung von Proteinen, die spezifisch mit der MJWT-RNA interagieren, nach dem Ausschluss-Prinzip zulassen. Es konnten 5 Proteinbanden identifiziert werden, die im Kontrollansatz ohne immobilisiertes MJWT-

Transkript nicht auftauchen, im Ansatz ohne Konkurrenz vorhanden waren und bei Konkurrenz mit MJWT-Überschuss, nicht jedoch mit MJMut1-Überschuss, verschwanden (ohne Abbildung). Die 5 identifizierten Proteinbanden wurden im Labor von Dr. Lottspeich weiter untersucht. Sie wurden aus dem PAG ausgeschnitten, im Gel mit Endoproteinase Lys C abgebaut und die entstandenen Peptide wurden aus dem Gel eluiert. Nach ihrer Auftrennung mittels HPLC konnte ihre Masse durch MALDI-TOF-Analysen bestimmt werden.

Tabelle 6: SECIS-bindende Proteine, angereichert durch Affinitätschromatographie mit immobilisiertem *vhuU*-"SECIS" (MJWT) von *M. jannaschii*.

identifizierter ORF	theoretisches Molekulargewicht [kDa]	Funktion	Archaea mit homologem ORF
MJ0041	52,8	vermutetes archaeelles Zink-Finger-Domänen-Protein	<i>Mtb. thermoautotrophicum</i> <i>A. fulgidus</i>
MJ1667	48,7	nicht bekannt	<i>Mtb. thermoautotrophicum</i>
MJ1668	43,8	nicht bekannt	<i>P. horikoshii</i>
MJ1669	28,1	nicht bekannt	<i>Mtb. thermoautotrophicum</i> <i>P. horikoshii</i>
MJ1672	93,5	nicht bekannt	<i>Mtb. thermoautotrophicum</i> <i>P. horikoshii</i>
MJ1674	74,7	nicht bekannt	—

Die ORF-Nummern entsprechen denen aus der Genom-Sequenz (Bult et al. 1996).

Die Proteine wurden dann bioinformatisch durch Abgleich der erhaltenen Peptidmassen mit theoretischen Peptidmassen via Internet identifiziert. Dabei stellte sich heraus, dass eine der ursprünglichen Protein-Banden aus zwei Proteinen bestand (F. Lottspeich, persönliche Mitteilung). Die Ergebnisse der Identifizierung sind in Tabelle 6 zusammengefasst. Es fällt auf, dass keinem der Proteine eine Funktion zugeordnet ist und sich darüber hinaus homologe Proteine auch in anderen Archaeen mit verfügbarer Genomsequenz finden. Diese Organismen besitzen jedoch keine Gene für Selenoproteine oder für den Selenocystein-Biosyntheseapparat. Betrachtet man die Anordnung der identifizierten ORFs (ausser MJ0041) im Genom von *M. jannaschii* (Bult et al. 1996), so liegen die vier identifizierten ORFs MJ1674, MJ16742, MJ1669, MJ1668, und MJ1667, mit MJ1666 und MJ1665, hintereinander in einem möglichen Operon. Das legt den Schluss nahe, dass die Proteine dieses Operons zusammen eine heteromere, funktionelle Einheit bilden könnten.

Als nächster Versuch zur Charakterisierung dieser möglichen SECIS-bindenden Proteine wurde das Gen für MJ0041 in *E. coli* kloniert und überexprimiert. Bei der Reinigung des Proteins machte man sich wiederum die Thermostabilität zunutze (Abb. 16, Spur 2). Der nach Erhitzen stark mit MJ0041 angereicherte Extrakt konnte durch eine Anionenaustausch-Chromatographie weitgehend von Verunreinigungen befreit werden (Abb. 16, Spur 3). Das gereinigte Protein (Abb. 16, Spur 4) wurde auf seine Fähigkeit hin untersucht, das mögliche *vhuU*-SECIS-Element (MJWT) *in vitro* zu binden. Gelretardationsexperimente mit MJ0041 und [<sup>32</sup>P]-markiertem

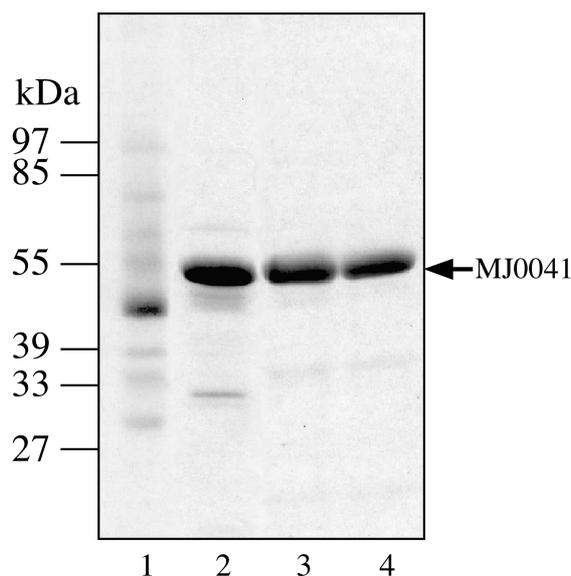


Abbildung 16: Reinigung von MJ0041. Spur 1, S30; Spur 2, S30 nach Hitzebehandlung; Spur 3, DEAE-Sephrose-Fraktion; Spur 4 gereinigtes MJ0041-Protein; das SDS-PAG wurde mit Coomassie gefärbt.

MJWT-Transkript zeigten jedoch, dass selbst bei hohem Proteinüberschuss nur ein geringer Anteil der RNA gebunden wird (Abb. 17). Der Komplex zwischen MJ0041 und MJWT (Abb. 17, Pfeil) entspricht im Migrationsverhalten in der nativen PAGE dem des spezifisch mit MJWT interagierenden Komplexes im S100 von *M. jannaschii* (siehe Abb. 12). Allerdings bindet MJ0041 auch das unspezifische MJMut1-Transkript (Abb. 17, rechte Seite) mindestens so affin wie MJWT. Der Faktor im S100 von *M. jannaschii* bindet MJMut1 dagegen nicht. Das heisst, es handelt sich bei MJ0041 entweder um ein unspezifisch mit dem möglichen SECIS-Element von *M. jannaschii* interagierendes Protein, oder MJ0041 zeigt als gereinigtes Protein nicht das exakt gleiche Verhalten wie im S100. Eine andere Möglichkeit wäre, dass MJ0041 nur im Zusammenspiel mit einem oder mehreren anderen Protein seine Spezifität ausbilden kann.

Eine Charakterisierung der Produkte des möglichen Operons (MJ1674-MJ1665) steht noch aus. Eine heterologe Überproduktion der einzelnen Proteine führt dazu wahrscheinlich nicht weiter, da

angenommen werden muss, dass ein funktionelles Gesamt-Protein aus mehreren der identifizierten Polypeptide besteht. In welcher Weise und Stöchiometrie diese sich konstituieren und ob dies *in vitro* mit gereinigten Komponenten überhaupt möglich ist, kann daher nicht abgeschätzt werden. Sinnvoller erscheint dagegen eine Expression des gesamten Operons. Dabei müssten allerdings etwa 12 kbp *M. jannaschii*-DNA kloniert werden, was bei dem niedrigen G-C-Gehalt (etwa 26%) im heterologen Wirt *E. coli* problematisch ist. Der Einsatz anderer Wirtsorganismen, zum Beispiel *Archaea* mit ähnlich niedrigem G-C-Gehalt in der DNA und manipulierbarem genetischen System (siehe unten), erscheint deshalb vielversprechender.

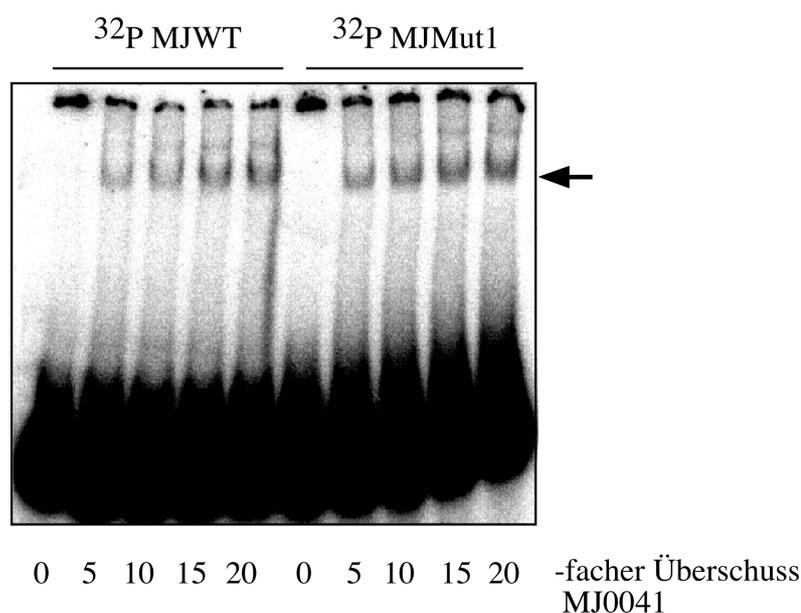


Abbildung 17: Interaktion von MJ0041 mit [ $^{32}\text{P}$ ]-markierten *in vitro*-Transkripten, nachgewiesen durch Gelretardationsexperimente. MJWT, mögliches *vhuU*-SECIS-Element; MJMut1, Konkurrenzstruktur; Autoradiogramm eines nicht denaturierenden PAG.

## 2. 5. Versuch zur Identifizierung eines MJ0495-bindenden Proteins

Eine weitere Strategie, um Faktoren zu identifizieren, die an der Selenocystein-Synthese und -Einbau in wachsende Polypeptidketten beteiligt sind, besteht nicht in der Suche nach SECIS-bindenden Proteinen (SBPs), sondern von SelB-bindenden Proteinen. Wie oben gezeigt ist MJ0495, das archaeele SelB-Homolog, im Vergleich zu *E. coli*-SelB C-terminal um etwa 17 kDa verkürzt und bindet auch *in vitro* das vermutliche SECIS-Element in der 3'-nicht-translatierten Region der mRNA nicht. Deshalb sollte nach Komponenten gesucht werden, die die Kommunikation zwischen MJ0495 und dem SECIS-Element vermitteln. Dazu wurde Co-Immünpräzipitation von MJ0495-bindenden Proteinen mit Hilfe von MJ0495-spezifischen

polyklonalen Antikörpern angewandt. Um Proteine anzureichern, die mit MJ0495 und nicht mit dem Antikörper interagieren, musste zunächst die Spezifität der Antikörper untersucht werden. Mittels Immunoblot-Analysen mit Rohantiseren und gereinigten Antikörpern konnte gezeigt werden, dass in Extrakten von *M. jannaschii* eine unspezifische Reaktion erst bei sehr großen Gesamtproteinmengen erfolgt (Abb. 18 A, Spur 3).

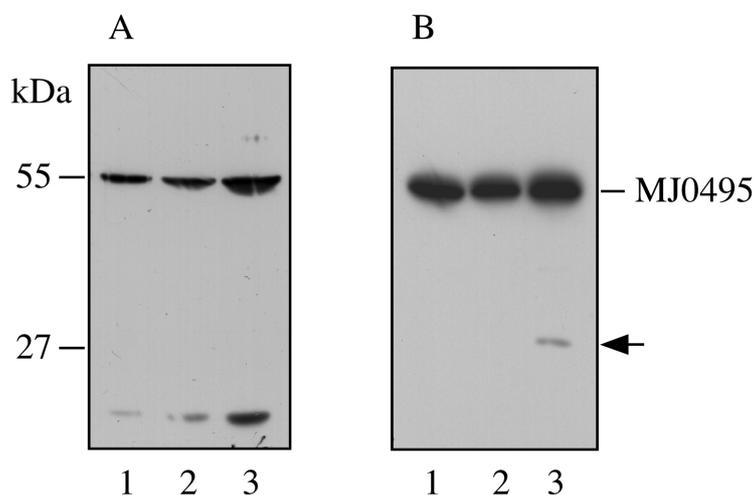


Abbildung 18: Immunologischer Nachweis von MJ0495. A, 240  $\mu\text{g}$  (Spur 1), 360  $\mu\text{g}$  (Spur 2) und 480  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein von *M. jannaschii* entwickelt mit gegen MJ0495 gerichtetem Rohantiserum; B, 480  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein von *M. jannaschii* (Spur 1), 0,08  $\mu\text{g}$  (Spur 2) und 0,2  $\mu\text{g}$  (Spur 3) gereinigtes MJ0495-Protein entwickelt mit gereinigten, gegen MJ0495 gerichtete Immunglobulinen.

Diese unspezifische Erkennung verschwindet bei Verwendung von Antikörpern, die zuvor affinitätschromatographisch gereinigt worden waren (Abb. 18 B, Spur 1). Bei Applikation sehr großer Mengen gereinigten MJ0495-Proteins wird auch hier ein schwaches, zusätzliches Signal sichtbar (Abb. 18 B, Pfeil). Dabei handelt es sich wahrscheinlich um ein Abbauprodukt von MJ0495. Nachdem sicher war, dass die gereinigten Antikörper nur mit MJ0495 in einem *M. jannaschii*-Extrakt reagieren, wurden sie über Protein A an paramagnetische Partikel (Dynabeads) immobilisiert und mit Extrakten von *M. jannaschii* behandelt. Nach wiederholtem Waschen (Abb. 19, Spur 2) wurden durch die Erhöhung der Salzkonzentration (300 mM NaCl) zunächst zu viele Proteine von den Antikörper tragenden Dynabeads eluiert, um spezifische Interaktionspartner von MJ0495 identifizieren zu können (Abb. 19, Spur 3). Erneute Elution unter Hochsalzbedingungen resultierte in nur zwei Proteinbanden im PAG, eine in Höhe von etwa 55 kDa und eine zweite bei etwa 30 kDa laufend (Abb. 199, Spur 4). Da vermutet wurde, dass es sich bei dem 55 kDa Protein um MJ0495 handelte, wurden die Fraktionen auf ihre Reaktivität mit den gereinigten MJ0495-spezifischen Antikörpern getestet. Lediglich der 55 kDa-Bande entsprach ein Signal auf dem

resultierenden Immunoblot, das kleinere 30 kDa-Protein reagierte mit den Antikörpern nicht (nicht gezeigt).

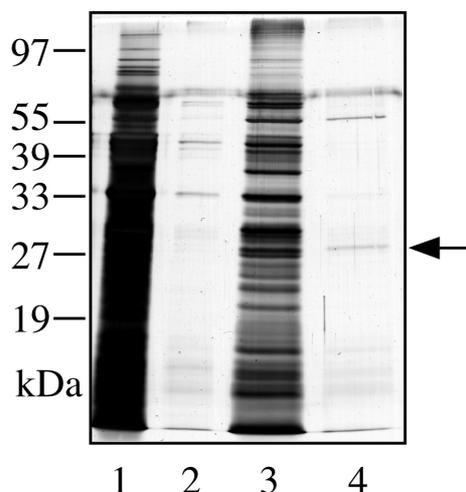


Abbildung 19: Isolierung eines MJ0495-bindenden Proteins aus einem *M. jannaschii*-Extrakt durch Co-Immunpräzipitation mit MJ0495-spezifischen Antikörpern. Spur 1, Rohextrakt, Spur 2, Überstand des Reinigungsansatzes nach 4-maligem Waschen mit IP-Puffer (siehe Material und Methoden); Spur 3, Überstand des Reinigungsansatzes nach Elution unter Hochsalzbedingungen; Spur 4, Überstand des Reinigungsansatzes nach erneuter Elution unter Hochsalzbedingungen; Pfeil, MJ1210; das denaturierende PAG wurde mit Silber gefärbt.

Beide Proteine konnten anschließend im Labor von Dr. Lottspeich identifiziert werden, bei dem größeren handelte es sich wie erwartet um MJ0495, bei dem kleineren um MJ1210. Der ORF MJ1210 codiert für ein 255 Aminosäuren langes Protein mit einem theoretischen Molekulargewicht von etwa 28,5 kDa, dem bisher keine Funktion zugeordnet worden war.

Eine biochemische Charakterisierung des MJ1210-Proteins wurde nicht durchgeführt. Vielmehr sollte nach geeigneten mesophilen Modellsystemen für die Erforschung des archaeellen Selenstoffwechsels gesucht werden. *In-vitro*-Untersuchungen mit *M. jannaschii*-Proteinen müssen bei hohen Temperaturen durchgeführt werden, ein mesophiles Modellsystem würde deshalb biochemische Untersuchungen vereinfachen.

### 3. Die Biosynthese von Selenoproteinen in *Methanococcus maripaludis*

#### 3.1. *M. maripaludis*: ein geeigneter Modellorganismus

Aufgrund der Verfügbarkeit der Genomsequenz wurde bisher hauptsächlich *M. jannaschii* als Modellorganismus zur Erforschung der Selen-Stoffwechsels bei Archaeen herangezogen. Auch

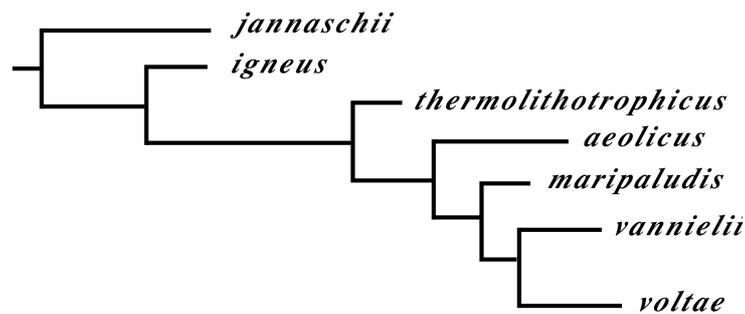


Abbildung 20: Phylogenetische Verwandtschaftsbeziehungen innerhalb der Gattung *Methanococcus*, wie sie sich aus dem Vergleich der 16S rRNA-Sequenzen ergibt; Abbildung nach Olsen et al. (1994), verändert.

die Thermostabilität der heterolog produzierten Proteine dieses Organismus war für ihre Reinigung oft hilfreich. Für biochemische als auch molekularbiologische Arbeiten ist *M. jannaschii* jedoch ein relativ ungeeigneter Organismus. Obwohl seine Wachstumsrate hoch ist, erreichen Kulturen nur eine optische Dichte ( $OD_{600}$ ) von etwa 0,2 (Jones et al. 1983a). Ausserdem hat *M. jannaschii* eine optimale Wachstumstemperatur von 85°C, was Routinearbeiten zusätzlich erschwert. Ein System zur genetischen Manipulation von *M. jannaschii*, welches Untersuchungen zum Selenstoffwechsel *in vivo* ermöglichen würde, ist auch nicht verfügbar.

Mit *M. jannaschii* phylogenetisch nahe verwandte methanogene *Archaea*, für die ein genetisches System etabliert wurde, stellen *M. voltae* und *M. maripaludis* (Abb. 23), beides mesophile Organismen, dar. Für *M. voltae* konnte sowohl das Vorhandensein von Selenoproteinen (Halboth und Klein 1992), wie auch die Transformierbarkeit mit "shuttle"-Vektoren gezeigt werden (Patel et al. 1994; Pfeiffer et al. 1998). Allerdings beruht der Transfer von genetischer Information bei *M. voltae* stets auf der Integration der Fremd-DNA in das Chromosom, was zum einen aufwändige Klonierungs-Vorarbeiten nötig macht, und zum anderen in der oft starken Variation der Zahl der integrierten DNA-Kopien resultiert (M. Pfeiffer, persönliche Mitteilung).

Für *M. maripaludis* konnte unter anderem ein "shuttle"-Vektor-System etabliert werden, bei dem das Plasmid autonom in den *M. maripaludis*-Zellen repliziert wird (Tumbula et al. 1997). Dieses genetische System wurde kürzlich um einige autonom replizierende Expressionsplasmide erweitert (Gardner und Whitman 1999). Das ließ *M. maripaludis* als den geeigneteren Modellorganismus erscheinen.

Zunächst musste geklärt werden, ob *M. maripaludis* in der Lage ist, Selenocystein in Proteine zu inserieren. dazu wurden Zellen mit [<sup>75</sup>Se]-Selenit *in vivo* markiert und die markierten Makromoleküle wurden analysiert. Durch Proteinase K- bzw. RNase A-Behandlung des radioaktiv markierten Proteinextrakts vor seiner gelelektrophoretischen Auftrennung konnten

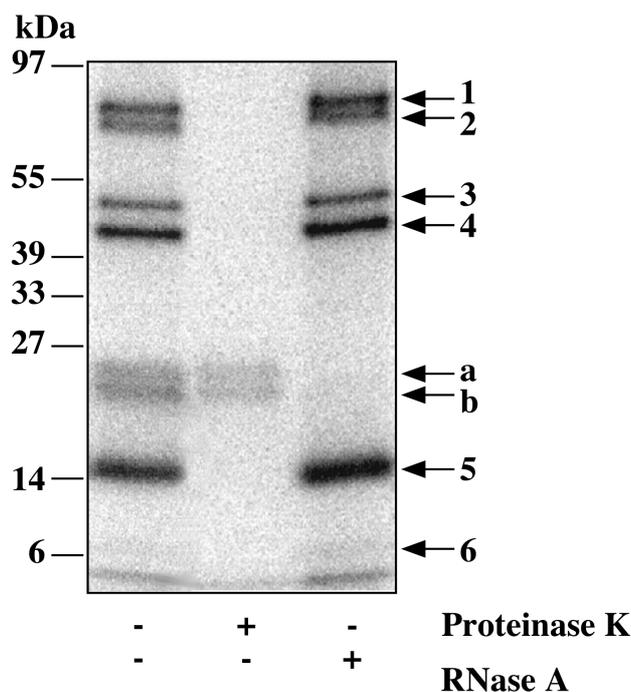


Abbildung 21: Inkorporation von  $[^{75}\text{Se}]$ -Selen in Makromoleküle von *M. maripaludis*. Autoradiogramm eines denaturierenden PAG nach elektrophoretischer Auftrennung von Zellysaten.

zwei mit  $[^{75}\text{Se}]$ -Selen markierte RNA-Spezies (Abb. 21, Banden a und b) und sechs Proteine (Abb. 21, Banden 1, 2, 3, 4, 5 und 6), die  $[^{75}\text{Se}]$ -Selen inkorporiert hatten, identifiziert werden. Bei den Selen-markierten RNAs handelt es sich wahrscheinlich um tRNAs, wie sie auch bei anderen Archaeen vorkommen (Politino et al. 1990). Eine Identifizierung der Selenoproteine ist spekulativ, allerdings entsprechen ihre graphisch ermittelten Molekulargewichte (Tab. 7) denen der Selenoproteine von *M. jannaschii* (Wilting et al. 1997) recht gut. Demnach handelt es sich um selenabhängige Untereinheiten einer Formiat-Dehydrogenase (Abb. 21, Bande 1), einer Heterodisulfid-Reduktase (Abb. 21, Bande 2), einer Formyl-Methanofuran-Dehydrogenase (Abb. 21, Bande 3), einer  $F_{420}$ -abhängigen Hydrogenase (Abb. 21, Bande 4) und einer  $F_{420}$ -unabhängigen Hydrogenase (Abb. 21, Banden 5 und 6). Laut Genomanalyse codiert das Gen für die Selenophosphat-Synthetase (*seld*) von *M. jannaschii* ebenfalls für ein Selenoprotein. Dieses konnte allerdings experimentell noch nicht nachgewiesen werden. Es wurde argumentiert, dass das entsprechende Protein nur in sehr geringem Maße synthetisiert wird und deshalb durch *in vivo*-Markierung mit  $[^{75}\text{Se}]$  nicht sichtbar gemacht werden kann (Wilting et al. 1997). Trägt man vom  $[^{75}\text{Se}]$ -markierten Extrakt von *M. maripaludis* jedoch etwa die dreifache Menge auf ein denaturierendes PAG auf und exponiert man drüber hinaus das resultierende Gel doppelt so lange, kann man auf der Höhe von etwa 36 kDa eine weitere, schwache Selenoprotein-Bande nachweisen (Abb. 22, Pfeil). Sein Molekulargewicht ist identisch mit dem für die SPS von *M.*

*jannaschii* berechnete. Der Schluss, dass es sich bei dem etwa 36 kDa schweren Selenoprotein von *M. maripaludis* um SPS handelt, liegt deshalb nahe.

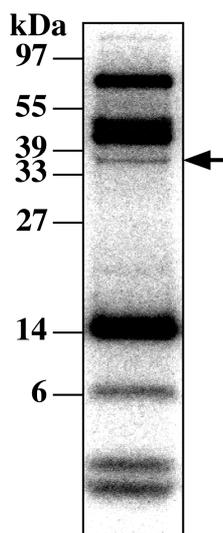


Abbildung 22: Nachweis eines schwach synthetisierten Selenoproteins von *M. maripaludis* durch Erhöhung der aufzutrennenden Proteinmenge und der Expositionszeit bei der resultierenden Autoradiographie (Einzelheiten im Text).

Der Besitz des selenierenden Systems, die Kultivierbarkeit bei 37°C und die genetische Manipulierbarkeit machen *M. maripaludis* zum geeigneten Modell-Organismus für die Erforschung der archaeellen Selenoprotein-Biosynthese.

### 3. 2. Analyse der Genomsequenz von *M. maripaludis*

Im April 2001 war die Sequenzierung des Genoms von *M. maripaludis* LL abgeschlossen worden, und J. A. Leigh stellte freundlicherweise die noch nicht veröffentlichten und nur teilweise annotierten Rohdaten zur Verfügung. Das Gen für die Selenocystein-spezifische tRNA (*selC*) konnte unter Verwendung der tRNA<sup>Sec</sup>-Sequenz von *M. jannaschii* als Sonde mit Hilfe des BLAST-Algorithmus identifiziert werden. Abb. 23 zeigt den Vergleich der abgeleiteten tRNA<sup>Sec</sup>-Sekundärstrukturen der beiden Organismen. Das die tRNA<sup>Sec</sup> von *M. maripaludis* JJ codierende Gen wurde mit Hilfe der *M. maripaludis* LL-Sequenz in den Vektor pUC19 kloniert (später stellte sich heraus, dass Sequenzen beider Stämme identisch sind). Die tRNA<sup>Sec</sup> von *M. maripaludis*, ist wie die von *M. jannaschii* nicht in der Lage, einen *selC*-Defekt in *E. coli* zu komplementieren (nicht gezeigt). Eine tRNA<sup>Sec</sup>-Variante, bei der das Guanin an Position 37 gegen ein Adenin ausgetauscht worden war (G37A), war hingegen in der Lage in *E. coli* Selenocystein zu inserieren (A. Resch, M. Rother und A. Böck, nicht veröffentlicht).

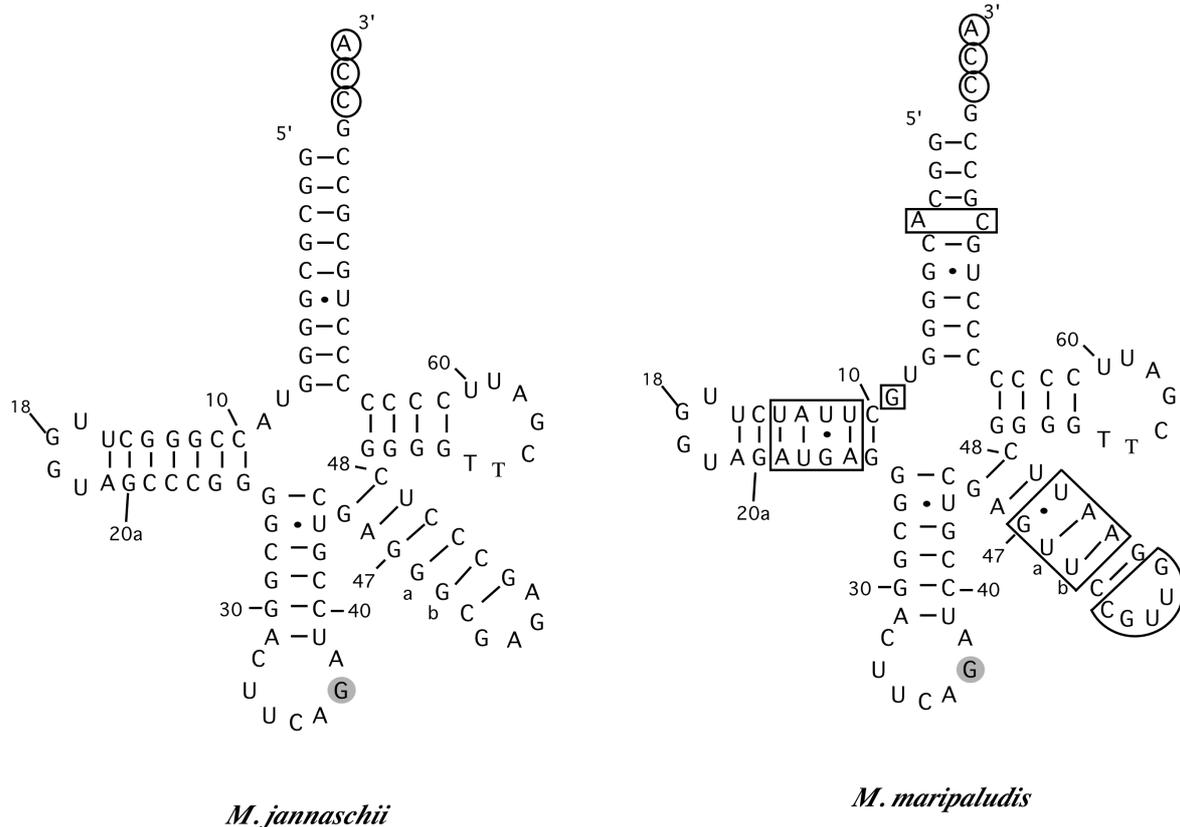


Abbildung 23: Vergleich der tRNA<sup>Sec</sup>-Spezies von *M. jannaschii* und *M. maripaludis*. Abweichungen von der *M. jannaschii*-Sequenz bei der tRNA<sup>Sec</sup> von *M. maripaludis* sind eingerahmt; G37 ist hinterlegt; das in beiden Fällen nicht auf der DNA codierte 3' CCA-Ende ist umkreist dargestellt.

Die Suche nach einem SelB-Homologen unter Verwendung von MJ0495 als Sonde führte zur Identifizierung eines Gens, dessen abgeleitete Aminosäuresequenz zu 62% identisch mit der MJ0495-Sequenz ist (Abb. 24). Auch hier ist der C-Terminus im Vergleich zum SelB von *E. coli* deutlich verkürzt. Die Funktionalität dieses SelB-Homologen von *M. maripaludis* soll in Zukunft *in vitro* und *in vivo* untersucht werden. Dafür wurde das entsprechende Gen zunächst in *E. coli* kloniert und das Genprodukt anschließend überproduziert. Es wurde in zwei Varianten erzeugt, einmal als Wildtyp-Protein und einmal als Protein mit einem N-terminalen "Hexa-Histidin-Tag" (Hochuli et al. 1988). Es zeigte sich, dass beide Proteine im heterologen *E. coli*-System sowohl mit der "kognaten" G37A-tRNA<sup>Sec</sup>-Variante von *M. maripaludis* interagieren, als auch mit der endogenen tRNA<sup>Sec</sup> von *E. coli*. Letztere stellt allerdings ein schlechteres Bindungs-Substrat dar (ohne Abb.). Beide Protein-Varianten zeigen darüber hinaus das gleiche Migrationsverhalten im 1D SDS-PAG und die gleiche Reaktivität gegenüber MJ0495-spezifischen Antikörpern wie ein Protein im *M. maripaludis*-Extrakt (siehe 6.), was ein weiteres Indiz dafür ist, dass es sich bei diesem Protein tatsächlich um das zum MJ0495-Protein homologe handelt.

MJ0495	MEMKNVNVGLFGHIDHGKTQLAKQLTEIASTASALDKPKESQKRGITIDLGFSSFTLDRYRITLVDAPGHSELIRTAIGAG	80
<i>M. marip.</i>	MDFKNINLGFHIDHGKTLSKVLTEIASTSAHDKLPESQKRGITIDIGFSAFKLENYRITLVDAPGHADLIRAVVSAA	80
MJ0495	NIIDAALLVVDAKEGPKTQTGEHLVLDLLNIPTIVVINKIDIANDEEIKRTEMFMKQILNSTINLKNKSIKISAKTGE	160
<i>M. marip.</i>	DIIDLALIVVDAKEGPKTQTGEHMLILDHFNIPVIVITKSDNAGTEEIKRTEMIMKSILQSTQNLKNSSIPIISAKTGF	160
MJ0495	GIGELKKELKNLLDSLDIRDINSYLKMPIDHAFKIKGVGTVVTGTIHKGVVEVDNLRILPINHEVKVKSIIQCFKQDVS	240
<i>M. marip.</i>	GVEELKNLIINTLNNAEIRNTESYFKMPLDHAFPIKAGTVVTGTINKGIVKVGDELKVLPINMSTKVRSIQCFKESVM	240
MJ0495	IAYAGDRVGMALMGVEPESLFRGCILTSEDTKLVVDKFIKVKILELKYNLAPKMKVHINIGLLTVPATIIPYKIEKI	320
<i>M. marip.</i>	EAKAGDRVGMALMGVESQIYRGCILTSKDTKLQTVDKIVAKIKISDIFKYNLTPKMKVHLNVGMLIVPAVAVPFKQVTF	320
MJ0495	NDKEEPIILEEIKGSDSCYCFKLEERVVDEGDKILIMRLDLPPTTLRIGCFGEVIDF---GEVEVKKIVVKEGKVVKK	397
<i>M. marip.</i>	GKSEENVILNEVISGNECYCAFELEEKVLAEVGDRVLITRLDLPPTTLRIGHGLIEEFKPINDLNIKKEVLRREGKVKID	400
MJ0495	KDKIYIEGLASSKTAGEKLIGGKVYIPDKNIWGVKGTFGTKGALIAEFDEEVNGGEKVVLKRVKRWG	465
<i>M. marip.</i>	KGRTVIDGLAQSKVAADKLIGEEISIDGKDVVGKIKGTFGTKGLTAEFSGTVENRDKVILNRLRRWG	468

Abbildung 24: Vergleich der Aminosäure-Sequenz von MJ0495 und seinem Homologen von *M. maripaludis* (*M. marip.*); Übereinstimmungen sind hinterlegt.

Das Genom von *M. maripaludis* LL wurde auch nach Genen für Selenoproteine durchsucht. Dazu wurden die Selenoprotein-Gene von *M. jannaschii* als Sonden verwendet. Auf diese Weise konnten sieben potentielle Selenoproteine in *M. maripaludis* identifiziert werden (Tab. 7). Ihre errechneten Molekulargewichte entsprechen dabei denen der [<sup>75</sup>Se]-markierten Proteine (Abb. 21) recht gut. Berechnet man von den abgeleiteten potentiellen Selenoproteinen darüber hinaus die isoelektrischen Punkte (pI, Tab. 7), ergibt sich wieder ein hohes Maß an Übereinstimmung mit den experimentell erhaltenen Werten (siehe Abb. 29 B). *M. maripaludis* hat demnach die gleichen Selenoproteine wie *M. jannaschii*.

Die Kriterien bei der Suche nach den Selenoproteinen von *M. maripaludis* beschränkten sich dabei nicht nur auf die Analyse der Sequenzähnlichkeiten zu *M. jannaschii*-Selenoproteinen, sondern zog auch das Vorhandensein von TGA-Triplets im Leserahmen und von Sekundärstrukturen im nicht-translatierten Bereich der entsprechenden mRNA in Betracht. In der nicht-translatierten Region von fünf der sieben möglichen Selenoprotein-Gene konnten Sekundärstrukturen gefunden werden, die eine hohe Ähnlichkeit zu den vermuteten SECIS-Elementen von *M. jannaschii* haben (vgl. Abb. 2 und Abb. 25, oberer Teil). Bei zwei der möglichen Selenoprotein-mRNAs von *M. maripaludis* weichen die SECIS-Elemente dagegen vom Konsensus ab. So bildet das SECIS-Element der *fdhA*-mRNA einen vergleichsweise labilen "Stamm" aus, zudem liegt es sehr weit stromaufwärts des Startcodons (mehr als 400 Nukleotide) in der codierenden Region des vorhergehenden ORF. Damit es als SECIS-Element funktionieren kann, müssten beide Gene als

Tabelle 7: Vergleich von experimentellen und genomischen Daten über die Selenoproteine von *M. maripaludis*.

(mögliches) Selenoprotein	theoretisches Molekulargewicht [kDa]	apparentes Molekulargewicht [kDa] <sup>1</sup>	theoretischer pI	apparenter pI <sup>2</sup>
FdhA (1)	74,2	80 ±8	5,5	~ 4,5
HdrA (2)	71,3	70 ±4	4,8	~ 5
FwuB (3)	48,2	50 ±3	6,6	~ 7
FruA (4)	46,7	44 ±2	5,9	~ 6
SPS	36,1	36±2	4,5	~ 4
VhuD (5)	14,6	14,5 ±2	8,5	~ 8,5
VhuU (6)	5,3	6,5 ±1	5,0	~ 4,5

Die Numerierung in Klammern entspricht der von Abb. 21; <sup>1</sup>): graphische Ermittlung aus 1D PAG (Abb. 21); <sup>2</sup>): graphische Ermittlung aus 2D PAG (Abb. 29).

transkriptionelle Einheit vorliegen; damit wäre dieses SECIS-Element das in Archaeen am weitesten von der codierenden Region entfernt lokalisierte. Beim möglichen SECIS-Element von *fwuB* weicht die Sequenz AAA des internen "Loops" von der in allen anderen archaellen SECIS-Elementen streng konservierten Sequenz GAA ab.

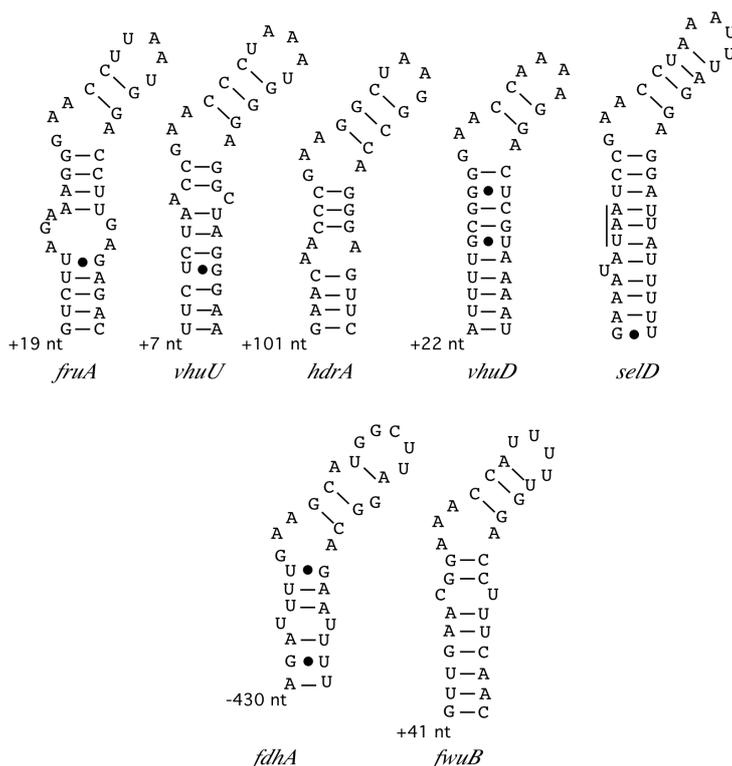


Abbildung 25: Mögliche SECIS-Elemente der Selenoprotein-mRNAs von *M. maripaludis*. Die Zahlen bezeichnen den Abstand zur ersten Base des Translations-Stopp-Codons (+) bzw. des Translations-Start-Codons (-); das UAA-Stoppcodon im *selD*-Element ist mit einem Balken markiert.

#### 4. Charakterisierung des archaeellen SECIS-Elements

Mit *M. maripaludis* als Modell-Organismus sollte nun die (im *M. jannaschii*-System) fehlende Interaktion zwischen dem möglichen SECIS-Element und dem Selenocystein-spezifischen Translationsfaktor (MJ0495) weiter untersucht werden. Es stellte sich die Frage, ob diese RNA-Strukturen von *M. jannaschii* *in vivo* an der Selenoprotein-Biosynthese beteiligt sind. Zwar spricht ihre starke strukturelle Konserviertheit und ihre ausschließliche Lokalisation im nicht-translatierten Bereich von Selenoprotein-mRNAs sehr dafür, experimentelle Beweise dafür gab es allerdings nicht. Für Eukaryonten konnte mit Hilfe eines *in vitro*-Translationssystems gezeigt werden, dass Selenoprotein-Biosynthese nur in Anwesenheit des SECIS-Elements stattfindet (Copeland et al. 2000). Ein solches System steht weder für *M. jannaschii* noch für *M. maripaludis* zur Verfügung. Es wurde daher versucht, die Natur der vermuteten archaeellen SECIS-Elemente durch genetische Analysen aufzuklären.

Ziel war es, ein Selenoprotein-Gen von *M. jannaschii* in Abhängigkeit vom möglichen SECIS-Element in *M. maripaludis* zu exprimieren, was durch den Einbau von [<sup>75</sup>Se] demonstriert werden sollte. Als "genetisches Werkzeug" wurde dazu das Plasmid pWLG30 verwendet (Gardner und Whitman, 1999). Mehrere Eigenschaften machen pWLG30 für die heterologe Expression in *M. maripaludis* geeignet (Abb. 26): (a) es repliziert selbstständig in *E. coli*; für die Replikation und Selektion in *E. coli* enthält es den ColE1-Replikationsursprung und die Ampicillin-Resistenzkassette (Abb. 26, *bla*) aus pUC19. Molekularbiologische Arbeiten sind in *E. coli* viel leichter und schneller auszuführen als in *M. maripaludis*; (b) die Replikation in *M. maripaludis* wird durch den Anteil von pURB500 (Tumbula et al. 1997), einem kryptischen Plasmid von

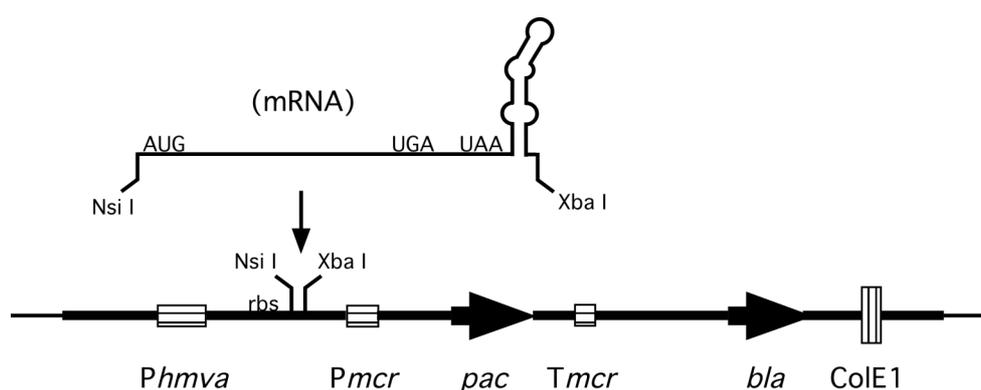


Abbildung 26: Der Expressionsvektor pWLG30. Gezeigt ist der für die Klonierungsarbeiten relevante Teil des Plasmids; die Klonierungsstrategie für die *fruA*-Expression ist auf mRNA-Ebene angedeutet (Einzelheiten im Text).

*M. maripaludis*, an pWLG30 gewährleistet; (c) selektierbar in *M. maripaludis* wird das Plasmid durch das *pac*-Gen, das die Puromycin-Transacetylase aus *Streptomyces alboniger* codiert, wobei die Expression dieses eubakteriellen Resistenzgens in *Methanococcus* durch Flankierung mit einem konstitutiven Promotor (*Pmcr*) und Terminator (*Tmcr*) erreicht wird (Gernhardt et al. 1990); (d) ein weiterer konstitutiver Promotor (*Phmva*) und die dazu gehörende Ribosomen-Bindestelle (Abb. 26, rbs) sorgen für die heterologe Expression von Genen, die mit Hilfe zweier eingeführter Restriktionsschnittstellen (*Nsi*I und *Xba*I) in den Vektor kloniert werden können. Die *Nsi*I-Schnittstelle überlappt dabei mit dem ATG-Startcodon des *hmva*-Gens. Der *mcr*-Promotor und -Terminator gehört natürlicherweise zum *mcr*-Lokus von *M. voltae*, dem stark exprimierten Gen der Methyl-CoM-Reduktase, einem zentralen Enzym in der Methanogenese (Hartzell und Wolfe 1986). Der *hmva*-Promotor kontrolliert die Expression des Gens für ein Histon-ähnliches Protein von *M. voltae* (Agha-Amiri und Klein 1993), welches dadurch konstitutiv exprimiert wird. Mit Hilfe dieses Vektors konnten bereits einige Gene heterolog überexprimiert werden, darunter zum Beispiel das Gen einer Untereinheit der Kohlenmonoxid-Dehydrogenase aus *Moorella thermoacetica* (Gardner 2000).

Das Gen eines Selenoproteins von *M. jannaschii* (MJ0029) wurde zusammen mit seiner 3'-nicht-translatierten Sequenz in pWLG30 kloniert. MJ0029 codiert für eine Untereinheit der  $F_{420}$ -abhängigen Hydrogenase (*FruA*), und wurde ausgewählt, da es mit einem berechneten Molekulargewicht von 46,6 kDa ein anderes Migrationsverhalten in der PAGE zeigen sollte als die endogenen Selenoproteine von *M. maripaludis*. Das SECIS-Element von *fruA* wurde in mehreren Varianten erzeugt (Abb. 27): Neben der Wildtyp-Sequenz (WT) wurde die 3'-nicht-translatierte Haarnadelstruktur einmal so verändert, dass sie um drei Basenpaare verlängert und durchgehend basengepaart war (Abb. 27 A, Mut). Desweiteren wurde eine verkürzte Bäumchenstruktur erzeugt, die nur noch den basalen "Stamm" und vier Schleifen-Nukleotide enthielt (Abb. 27 A, del). Ausserdem sollten Sekundärstrukturen, die entweder einen Basenpaar-Austausch oder einen Nukleotid-Austausch im Vergleich zur Wildtyp-Sequenz aufwiesen (Abb. 27 B), Aufschluss über die Spezifität der SECIS-Erkennung geben. *M. maripaludis* wurde mit den entsprechenden pWLG30-Derivaten transformiert und das Vorhandensein der Plasmid-DNA wurde nach Reisolation durch analytische PCR überprüft. Nach *in vivo*-Markierung der Transformanten mit [ $^{75}\text{Se}$ ]-Selenit und Auftrennung der markierten Proteine über denaturierende



Damit konnte gezeigt werden, dass die Synthese von FruA vom Vorhandensein des SECIS-Elements in der 3'-nicht-translatierten Region abhängig ist. In Gegenwart eines SECIS-Elements, bei dem das apikale C-G Basenpaar in ein A-U Basenpaar mutiert wurde, verringerte sich die heterologe FruA-Synthese im Vergleich zum Wildtyp um etwa die Hälfte (Tab. 8). Bei den SECIS-Elementen mit Punktmutationen fiel der Effekt noch stärker aus, nur noch etwa 30% relativ zum Wildtyp-Konstrukt im Falle von pWLGfruA-AU und nur 23% im Falle von pWLGfruA-AG (Tab. 8) der *M. jannaschii*-FruA-Menge wurden synthetisiert. Um sicherzustellen, dass die heterologe Selenoproteinsynthese von *M. maripaludis* nicht auf unterschiedlichen Expressionsstärken der verschiedenen *fruA*-Gene beruht, wurden die *fruA*-mRNA Mengen der einzelnen Transformanten mittels "Slot-Blot" Hybridisierungsexperimenten quantifiziert (Tab. 8). Es zeigte sich, dass eine unterschiedliche Expression der *fruA*-Gene nicht für die Unterschiede der Synthese der entsprechenden Proteine verantwortlich sein kann.

Tabelle 8: Relative Inkorporation von [<sup>75</sup>Se]-Selen in heterolog produzierte *fruA*-Genprodukte und relative Mengen heterolog exprimierter *fruA*-mRNA.

<i>fruA</i> SECIS-Varianten	relative heterologe Selenoprotein-Synthese (%)	relative <i>fruA</i> -mRNA Mengen (%)
<i>fruA</i> -WT	100	100
<i>fruA</i> -CG/AU	50,7 ± 7,3	85 ± 6
<i>fruA</i> -AU	31,9 ± 1,9	93 ± 10
<i>fruA</i> -AG	23,1 ± 2,3	106 ± 10
<i>fruA</i> -Mut	N.D.	88 ± 4
<i>fruA</i> -del	N.D.	108 ± 11

Die Quantifizierung radioaktiv markierter Proteinbanden im SDS PAG erfolgte wie in Material und Methoden beschrieben; N.D., keine heterologe Proteinbande detektierbar.

## 5. Zwei Selenocystein-Reste im VhuD von *M. maripaludis*?

Die heterologe Expression des *fruA*-Gens von *M. jannaschii* in *M. maripaludis* hatte eindeutig die Natur der 3'-nicht-translatierten Sekundärstruktur als SECIS-Element bewiesen. Dieser Ansatz war nun geeignet für weitere Untersuchungen: Eines der Selenoprotein-Gene von *M. jannaschii* enthält zwei TGA-Stopp-Codons in seiner codierenden Region und ein einziges archaelles SECIS-Element in seiner 3'-nicht-translatierten Region. Das Gen, *vhuD*, ist Teil des Operons, das die F<sub>420</sub>-unabhängige Hydrogenase Vhu (Thauer et al. 1993) codiert. Das VhuD-Protein enthält die beiden Selenocystein-Reste an Positionen, an denen sich bei dem homologen Protein aus *M. voltae* Cystein-Reste finden (Halboth und Klein 1992). Dass in einem Selenoprotein-Gen zwei

Stopp-Codons durch ein SECIS-Element zu Selenocystein-Codons recodiert werden, wäre einzigartig unter den Prokaryonten und würde an die Situation bei Eukaryonten erinnern, in denen Selenoproteine mit mehreren Selenocystein-Resten vorkommen (Hill et al. 1991).

Der Versuch, *vhuD* von *M. jannaschii* (MJ1190.1) heterolog in *M. maripaludis* zu exprimieren, war nicht erfolgreich, obwohl eine zur *fruA*-Expression analoge Strategie verfolgt wurde (Daten nicht gezeigt). Mögliche Gründe dafür können zum einen in der konstitutiven heterologen Expression unter der Kontrolle des *hmvA*-Promotors liegen, die möglicherweise zu einem Ungleichgewicht, entweder von VhuD-Untereinheiten relativ zu Vhu-Holoenzym oder von Vhu zu anderen Enzymen des zentralen Energiestoffwechsels führte. Eine induzierbare oder titrierbare Genexpression hätte hier möglicherweise zum Erfolg geführt, solche Expressionssysteme sind für Methanogene aber bisher nicht verfügbar. Zum anderen könnten sich Heteromere von *M. maripaludis*- und *M. jannaschii*-Vhu Untereinheiten gebildet haben, die inaktiv sind.

Sowohl die Analyse der vorläufigen Genomsequenz von *M. maripaludis* LL als auch die Sequenzierung des Gens aus dem Stamm *M. maripaludis* JJ zeigte, dass in der Tat das *vhuD*-Gen zwei "in frame" TGA-Triplets sowie eine dem archaeellen Konsensus gut entsprechende SECIS-Struktur im 3'-nicht-translatierten Bereich der mRNA enthält. Das Vorhandensein eines Gens mit zwei TGA-Triplets, eines konservierten SECIS-Elements und die Existenz eines radioaktiv markierten Proteins mit etwa dem passendem Molekulargewicht (siehe Abb. 21, Bande 5) sprechen dafür, dass *M. maripaludis* Selenoproteine mit mehr als einem Selenocystein-Rest synthetisieren kann. Um den direkten Beweis für die zwei Selenocysteine in VhuD von *M. maripaludis* auf biochemischem Wege zu erbringen, sollte es isoliert und massenspektroskopisch untersucht werden. Für die Isolierung von VhuD von *M. maripaludis* wurden [<sup>75</sup>Se]-markierte Rohextrakte mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese aufgetrennt. Wie das Autoradiogramm in Abb. 29 zeigt, löst das 2D PAG die gleiche Zahl an Selenoproteinen wie das 1D-Gel auf (vgl. Abb. 21 und Abb. 29 B). Dabei entspricht das Molekulargewicht von Selenoprotein 5 (~ 14 kDa) am besten dem für VhuD berechneten (14,6 kDa). Diesem "Spot" 5 auf dem Autoradiogramm konnte eindeutig ein mit Silbernitrat gefärbtes Protein im Polyacrylamidgel zugeordnet werden (Abb. 30). Es zeigte sich weiterhin, dass etwas unterhalb dieses prominenten Selenoproteins ein weiteres Signal zu sehen war, und zwar sowohl im Autoradiogramm (Abb. 30 B), als auch im

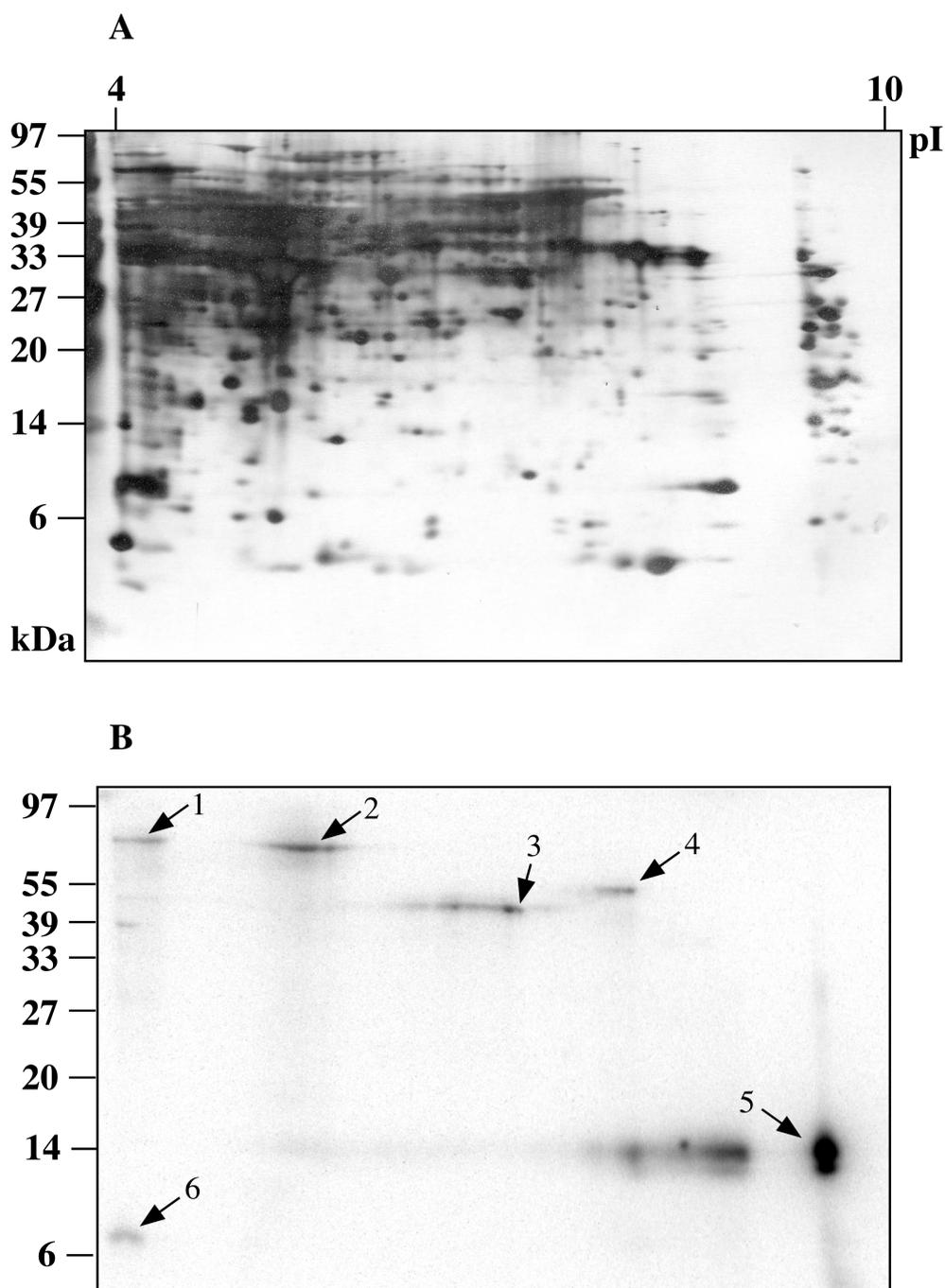


Abbildung 29: Die Selenoproteine von *M. maripaludis* im 2D-Gel. A, mit Silber gefärbtes 12,5% PAG (Schägger und von Jagow 1987) nach 2D PAGE eines mit  $[^{75}\text{Se}]$ -Selenit markierten Extrakts; B, Autoradiogramm von A; Nummerierung der Selenoproteine wie in Abb. 21; horizontal ist der pH-Bereich aus der ersten Dimension, vertikal sind die Positionen der Molekulargewichtsstandards der zweiten Dimension angezeigt.

PAG (Abb. 30 A). Die Tatsache, dass dieses zweite Selenoprotein den gleichen pI hat und dass es nicht bei allen 2D-Präparationen auftauchte, ließ vermuten, dass es sich um ein Degradationsprodukt des Haupt-Selenoproteins handelt. Durch Erhöhung der Menge an appliziertem Gesamtprotein gelang es, den entsprechenden Bereich im Gel mit kolloidalem

Coomassie anfärbbar zu machen. Diese Proteinmengen (10-100 pmol) sind für massenspektroskopische Analysen nötig (Lottspeich und Zorbas 1998). Zunächst wurde in der Arbeitsgruppe von F. Lottspeich die N-terminale Aminosäuresequenz, AEPVIMA, des Selenoproteins 5 ermittelt. Sie entspricht exakt der abgeleiteten Sequenz der Aminosäuren 2-9 von VhuD (siehe Anhang).

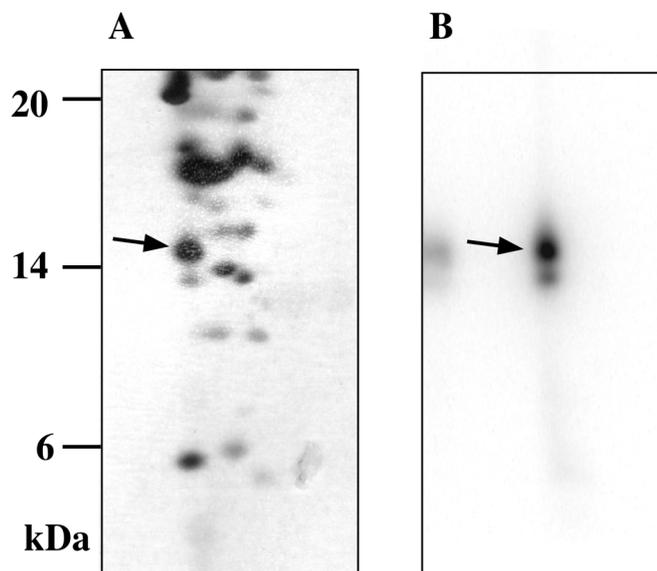


Abbildung 30: Lokalisation des vermuteten VhuD-Homologen von *M. maripaludis* im 2D-Gel. Der [<sup>75</sup>Se]-markierte Extrakt von *M. maripaludis* wurde durch 2D PAGE aufgetrennt. **A**, Ausschnitt des mit Silber gefärbten 2D-Gels aus Abb. 29; **B**, Autoradiogramm von **A**.

Das N-terminale Methionin wird demnach wahrscheinlich durch post-translationelle Prozessierung entfernt. Durch MALDI-TOF Analysen sollte dann die Masse von Selenoprotein 5 bestimmt werden. Es ergab sich, dass dies nicht möglich war, da in dem erhaltenen Massenspektrum das VhuD-Signal sehr "breit" war. Ein Grund dafür könnte in Heterogenitäten im Alkylierungsgrad der Cysteine/Selenocysteine durch Jodoacetamid (3 Cysteine und 2 Selenocysteine) und dem Oxidationsgrad der Methionine (5 Methionine) im VhuD-Protein liegen (F. Lottspeich, persönliche Mitteilung). Ein Volllängenprotein mit beiden Selenocysteinen ohne Modifikationen hätte eine Masse von 14516 Da, ein vollständig alkyliertes und oxidiertes VhuD dagegen 14882 Da; dies entspricht genau der Signalbreite des VhuD-Proteins im Massenspektrum (nicht gezeigt). Wären ein oder sogar beide Selenocystein-Positionen dagegen mit Cystein besetzt, müsste sich das Signal zu kleineren Massen hin verschieben. Das heißt, die Größenordnung des VhuD-Signals allein spricht für das Vorhandensein beider Selenocystein-Reste an den entsprechenden Positionen, obwohl der direkte Beweis dafür noch erbracht werden muss. Die Massenbestimmung für das kleinere Selenoprotein ergab 12221 Da. Dies könnte einem Fragment des VhuD-Proteins ab Position 14 (..TSR..., siehe Anhang) entsprechen, das noch einen der

beiden Selenocystein-Reste enthalten und deshalb im Autoradiogramm detektiert werden würde. Eine N-terminale Sequenzierung dieses möglichen Degradationsprodukts von VhuD wurde nicht durchgeführt.

## 6. Die Regulation der Selenoprotein-Synthese von *M. maripaludis*

Fast alle Selenoproteine von *M. jannaschii* sind am zentralen C1-Metabolismus zur Energiegewinnung beteiligt. In der Genomsequenz von *M. jannaschii* finden sich für einige dieser Enzyme keine Isoformen, die für selenfreie Proteine codieren (Bult et al 1996). Es ist daher anzunehmen, dass das Wachstum von *M. jannaschii* selenabhängig ist. *M. voltae* wächst unter Se-Mangelbedingungen (Se-Konzentration im Medium 3 nM), wenn auch mit geringerer Rate als unter Se-adäquaten (10  $\mu$ M Se im Medium) Bedingungen (Berghöfer und Klein 1995). Dies wird durch die Funktion selenfreier Isoenzyme ermöglicht, wobei durch Selenmangel die Expression ihrer Gene induziert wird (Berghöfer et al. 1994).

In der Genomsequenz von *M. maripaludis* LL konnten selenfreie Isoformen von Selenocystein enthaltenden Proteinen ausgemacht werden. Zu allen potentiellen Selenoprotein-Genen konnten Isogene identifiziert werden, die an der entsprechenden Position Cystein codieren (nicht gezeigt). Deren Expression würde *M. maripaludis* die Fähigkeit verleihen, in selenfreiem Medium zu wachsen. Die große Zahl an Selenoproteinen in *M. maripaludis* warf die Frage auf, ob dieser Organismus auf Supplementation von Selen im Medium angewiesen ist. Um dies zu klären wurde in Vorversuchen das Wachstumsverhalten von *M. maripaludis* bei unterschiedlichen Selenkonzentrationen im Medium untersucht. *M. maripaludis* zeigte dabei keine Unterschiede im Wachstumsverhalten in Abhängigkeit von der Selen-Supplementierung des Mediums (Daten nicht gezeigt). Um abschätzen zu können, inwieweit Kontaminationen in den Medien die Ergebnisse beeinflussten, wurde "Se-freies" McSe-Medium atomabsorptionsspektroskopisch auf das Vorhandensein von Selen-Verunreinigungen untersucht. Ein Wert von 0,2  $\mu$ M Selen wurde erhalten. Diese Menge, die etwa 1/10 der normalerweise supplementierten darstellt, kann als zu gering angesehen werden, um Zellen, die wie *M. maripaludis* mehrere Selenoproteine und Selenmodifizierte tRNAs besitzen, ausreichend mit Selen zu versorgen. Quantifizierbare Untersuchungen, zum Beispiel über selenabhängige Genexpression mit Hilfe von Transkriptionsanalysen, sind mit diesen basalen Selenkonzentrationen aber nicht möglich.

### Selenabhängige Proteinsynthese von *M. maripaludis*

Um den Einfluss von Selen auf den Stoffwechsel von *M. maripaludis* auf eine andere Weise zu untersuchen, wurde die Proteomanalyse durch zweidimensionale Gelelektrophorese eingesetzt, weil es damit möglich ist, nahezu alle Proteine, die zu einem bestimmten Zeitpunkt und bei bestimmten physiologischen Bedingungen in einer Zelle vorhanden sind, sichtbar zu machen (O'Farrell 1975). Extrakte aus *M. maripaludis*-Zellen, die entweder mit verringerten Selenmengen ( $0,2 \mu\text{M}$ ), oder adäquat mit Selen versorgt waren ( $2\text{-}10 \mu\text{M}$  Selenit in McSe-Medium), wurden

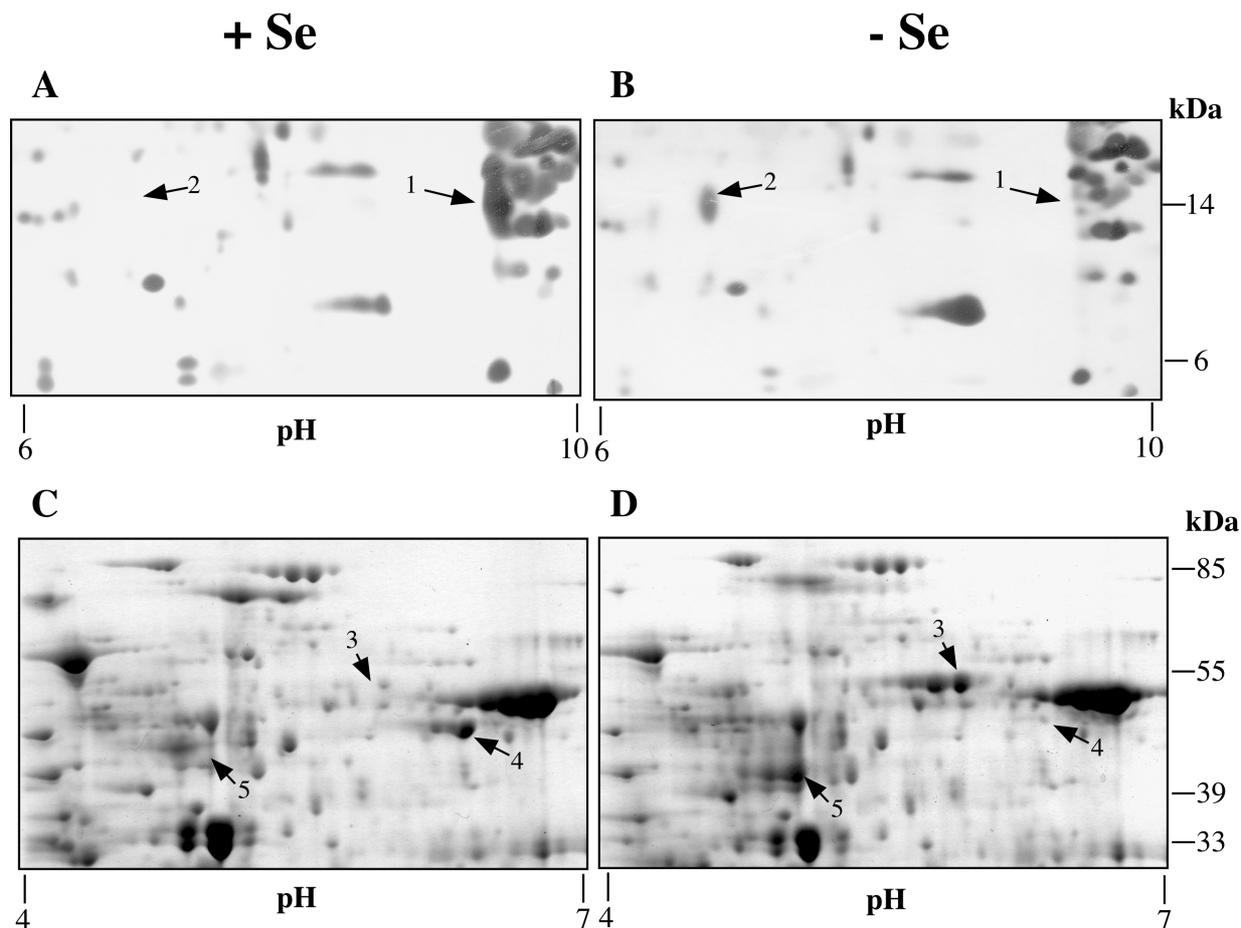


Abbildung 31: Selenabhängige Protein-Synthese in *M. maripaludis*. Extrakte wurden durch 2D PAGE aufgetrennt. A-D, Ausschnitte von gefärbten 2D-Gelen; A und C, Kultivierung in Gegenwart ( $2 \mu\text{M}$ ), B und D Kultivierung ohne Selenit; Die Gele wurden mit Silber (A und B) oder Coomassie (C und D) gefärbt; die in Abhängigkeit vom Selenangebot synthetisierten Proteine sind mit Pfeilen (1-5) markiert; horizontal ist der pH-Bereich des Gradienten aus der ersten Dimension, vertikal die Positionen der Molekulargewichtsstandards der zweiten Dimension angezeigt.

über zweidimensionale PAGE aufgetrennt. Abb. 31 zeigt, dass bei reduzierter Selenversorgung zum Teil andere Proteine synthetisiert werden als unter selenadäquaten Bedingungen und umgekehrt (A und B, bzw. C und D stellen die jeweiligen Vergleichsexperimente dar). Von den Proteinen, die bei Anwesenheit von Selen im Medium im 2D-Gel spezifisch synthetisiert wurden,

bei dessen Fehlen jedoch nicht, ist Protein 1 (Abb. 31 A) bereits als VhuD identifiziert worden (Abb. 30). Erwartungsgemäß war dieses Protein bei Selen-Verarmung nicht vorhanden, die geringe Menge Protein (Abb. 31 B, Pfeil 1) könnte durch die Spuren von Selen herrühren, die im "selenfreien" Medium nachgewiesen wurden. Noch ein weiteres Protein konnte identifiziert werden, das bei adäquater Selenversorgung synthetisiert wird und bei reduzierter Selenversorgung verschwindet (Abb. 31 C und D, Pfeil 4). Im Gegensatz dazu tauchte ein Protein mit ähnlichem Molekulargewicht aber niedrigerem pI als VhuD auf, wenn dem Medium kein Selen supplementiert wurde (Abb. 31 A und B, Pfeil 2); desweiteren konnte ein Protein von etwa 50 kDa, sowie eines mit etwa 43 kDa Molekulargewicht ausgemacht werden, die bei wenig Selen im Medium gebildet werden, bei adäquater Selenversorgung jedoch nicht (Abb. 31 C und D, Pfeil 3 und 5).

Tabelle 8: Proteine von *M. maripaludis*, die spezifisch unter Se-adäquaten bzw. Se-verarmten Bedingungen synthetisiert werden.

Se-Status der Kultur	Protein	N-terminale Sequenz	Funktion
+ Se	VhuD [1]	AEPVIMA (AF324438)	SeCys enthaltende Hydrogenase Untereinheit; Methanogenese
	VhuA [4]	GKVTIEPLSRLEGHGK (NP248187)	Se-freie Hydrogenase Untereinheit; Methanogenese
-Se	VhcD [2]	SEEWEPKIVGFCCNWCT (B59304)	Se-freie Hydrogenase Untereinheit; Methanogenese
	VhcA [3]	TKLSIEPVTRVEGHGK (S16727)	Se-freie Hydrogenase Untereinheit; Methanogenese
	<i>N</i> <sup>5</sup> , <i>N</i> <sup>10</sup> -Methylen- Tetrahydromethanopterin- Dehydrogenase (Hmd) [5]	MKVAILGAGCYRTHAASG (Q50840)	Methanogenese

Die Proteine wurden durch den Vergleich der erhaltenen N-terminalen Sequenzen mit Datenbank-Sequenzen durch den BLAST-Algorithmus identifiziert; Die Nummerierung der Proteine [1-5] entspricht der von Abb. 31; Die Zugangsnummer des jeweils ähnlichsten Proteins ist in Klammern angegeben; SeCys, Selenocystein.

Um die spezifisch synthetisierten Proteine zu identifizieren, wurden die Probenmengen für die 2D PAGE so weit erhöht, dass die Proteine 2-5 mit Coomassie-Färbung deutlich sichtbar gemacht werden konnten; sie wurden nach der gelelektrophoretischen Auftrennung auf silikonisierte Glasfaser-Membranen transferiert und N-terminal sequenziert. Die erhaltenen Aminosäuresequenzen sowie die daraus abgeleiteten Identitäten der einzelnen Proteine sind in Tabelle 8 zusammengefasst. Protein 2 konnte als VhcD identifiziert werden, der Cystein

enthaltenden Isoform von VhuD (Sorgenfrei et al. 1997). Bei Protein 3 handelt es sich wahrscheinlich um das Homologe von VhcA, der großen Untereinheit der selenfreien,  $F_{420}$ -abhängigen Hydrogenase von *M. voltae* (Halboth und Klein 1992). Die N-terminale Sequenz von Protein 4 ist ähnlich derjenigen von VhuA aus *M. jannaschii*, der großen Untereinheit von Vhu, deren Untereinheiten D und U Selenocystein enthalten (Bult et al. 1996). Überraschenderweise wurde Protein 5 nicht als eine weitere Cystein-Variante eines Selenoproteins von *M. maripaludis* identifiziert, sondern als das Homologe zur  $F_{420}$ -unabhängigen  $N^5,N^{10}$ -Methylen- $H_4$ MPT-Dehydrogenase (Hmd) von *M. voltae*, einem zentralen Enzyms in der Methanogenese (siehe Abb. 1 Schritt ④). Das bedeutet, dass nicht nur die Synthese der Selenoproteine und ihrer Cystein-Homologen in *M. maripaludis* abhängig vom Selenangebot reguliert werden, sondern auch die Synthese von Proteinen, deren Aktivitäten mit denen der Selenoproteine in Zusammenhang stehen.

### **Selenunabhängige Synthese des MJ0495-Homologen in *M. maripaludis***

Als nächstes wurde untersucht, auf welcher Ebene die Synthese der Selenoproteine in *M. maripaludis* reguliert ist. Extrakte aus Zellen, die mit und ohne zusätzlichem Selen im Medium kultiviert worden waren, wurden dazu durch 1D PAGE aufgetrennt und immunologisch untersucht. Abb. 32 zeigt, dass unabhängig vom Selen-Status der Kultur etwa die gleiche Menge

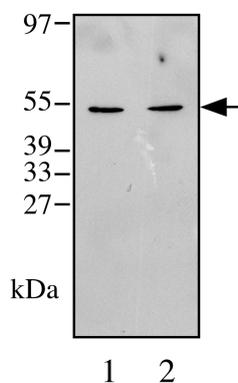


Abbildung 32: Nachweis eines Proteins von *M. maripaludis* mit gereinigten, MJ0495-spezifischen Antikörpern. Immunoblot-Analyse von Extrakten nach Auftrennung durch SDS PAGE; Spur 1, Kultivierung von *M. maripaludis* in Gegenwart ( $2 \mu\text{M}$ ); Spur 2, Kultivierung ohne Selenit.

eines Proteins mit etwa 52 kDa von MJ0495-spezifischen Antikörpern in *M. maripaludis* nachgewiesen wird (Pfeil). *M. maripaludis* besitzt demnach ein MJ0495-Homologes, das unabhängig vom Se-Status synthetisiert wird. Die Synthese der Selenoproteine von *M. maripaludis* wird daher wohl nicht über die intrazelluläre Konzentration des SelB-Homologen reguliert.

# Diskussion

## 1. Die Selenoprotein-Biosynthese in *Archaea*

### 1.1. Die Selenocystein-Biosynthese

Die Selenocystein-spezifische tRNA, tRNA<sup>Sec</sup>, ist die zentrale Komponente der Selenocystein-Biosynthese, denn alle Syntheseschritte laufen tRNA-gebunden ab. Der erste Schritt besteht in der Beladung der tRNA mit Serin durch die kanonische Seryl-tRNA Synthetase (SerRS). Diese Reaktion wurde sowohl in Eubakterien (Leinfelder et al. 1988b) wie auch in Eukaryonten nachgewiesen (Lee et al. 1989). Die erfolgreiche Serylierung der archaeellen tRNA<sup>Sec</sup> durch die *E. coli*-SerRS *in vitro* zeigt das Vorhandensein der gleichen Reaktion in *M. jannaschii* an, obwohl die Aminosäuresequenzen der SerRS von *M. jannaschii* und *M. maripaludis* einige Abweichungen vom SerRS-Konsensus aufweisen (Kim et al. 1998).

In *E. coli* wird der Seryl-Rest durch die Selenocystein-Synthase in einer von Pyridoxal-Phosphat abhängigen Reaktion zu einem Selenocysteyl-Rest umgewandelt (Forchhammer und Böck 1991), einer Reaktion, die formal auch in Eukaryonten abläuft (Lee et al. 1989). Hier wurde ein weiteres Intermediat, O-Phosphoseryl-tRNA<sup>Sec</sup> nachgewiesen, dessen biologische Rolle nicht bekannt ist (Hatfield et al. 1982). Weder die Seryl-tRNA<sup>Sec</sup>-Kinase noch die Selenocystein-Synthase sind bis jetzt aus Eukaryonten isoliert worden. Interessanterweise existiert in Extrakten von *M. jannaschii* ebenfalls ein Faktor, der Ser-tRNA<sup>Sec</sup> phosphoryliert (Nieraad 2000), auch hier ist die Rolle der O-Phosphoseryl-tRNA<sup>Sec</sup> jedoch nicht bekannt. Die Umwandlung von Ser-tRNA<sup>Sec</sup> in Sec-tRNA<sup>Sec</sup> konnte für *M. jannaschii in vitro* nachvollzogen werden, sowohl heterolog mit Hilfe der Selenocystein-Synthase von *E. coli* - unabhängig von der vorherigen Phosphorylierung der Ser-tRNA<sup>Sec</sup> -, als auch durch den Rohextrakt von *M. jannaschii* katalysiert. In Abb. 33 (A) ist das Modell dieser Biosynthese bei Archaeen dargestellt.

Die eukaryontische tRNA<sup>Sec</sup> konnte mit den Enzymen von *E. coli* ebenfalls *in vitro* selenocysteyliert werden (Baron et al. 1994). Die korrekte Aminoacylierung der tRNA<sup>Sec</sup>-Homologen aus den drei Organismenreichen mit bakteriellen Proteinen lässt auf identische Reaktionsmechanismen schließen. Allerdings konnte (bei bewiesenem Vorkommen von Selenoproteinen) weder in einer eukaryontischen (Consortium 1998; Adams et al. 2000), noch in

einer archaeellen Genomsequenz (Bult et al. 1996) ein zur SS homologes Genprodukt identifiziert werden. Der ORF MJ0158 von *M. jannaschii* wurde zwar als zu *selA* homologes Gen annotiert, biochemische Analysen konnten eine solche Funktion des Proteins aber bisher nicht bestätigen (S. Commans und A. Böck, nicht veröffentlicht). Da nur ein begrenzter Bereich der abgeleiteten Proteinsequenz um einen konservierten Lysin-Rest eine gewisse Ähnlichkeit zur SS zeigt, liegt die Annahme nahe, dass

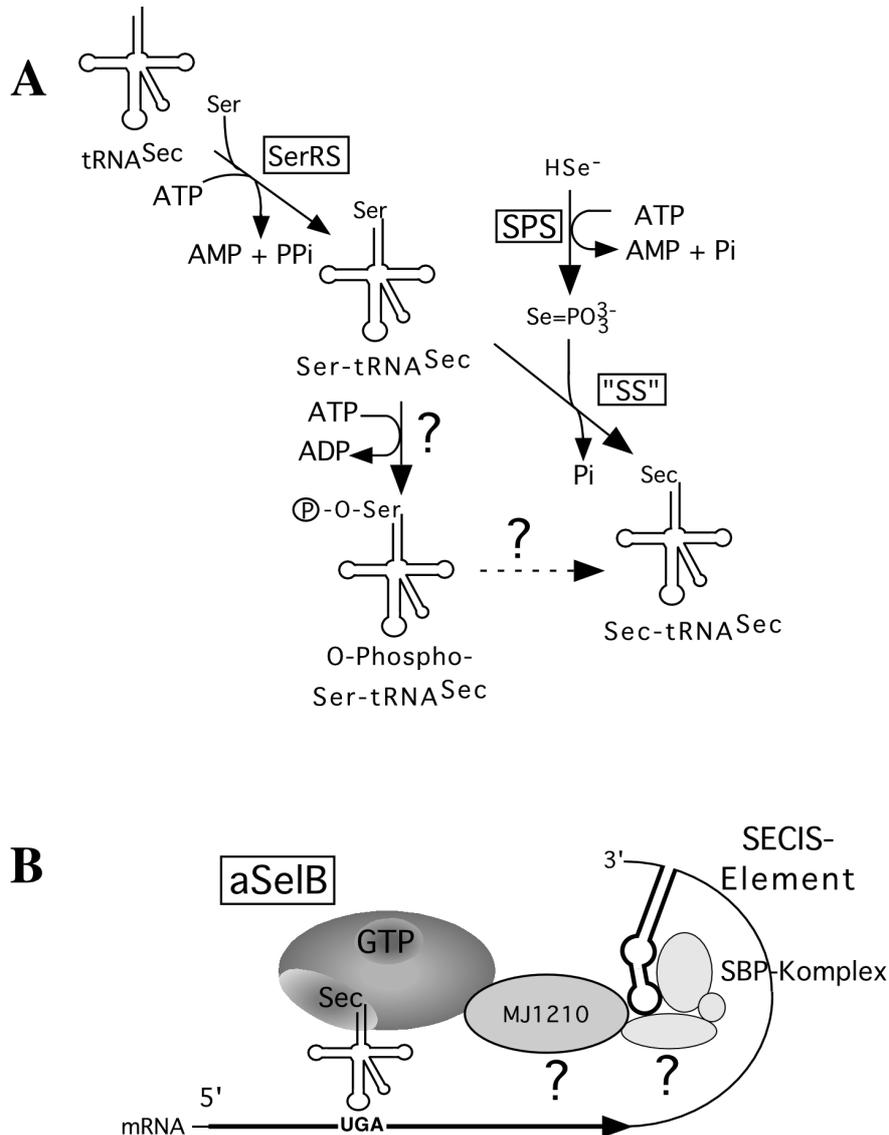


Abbildung: 33: Modell der archaeellen Biosynthese (A) und Inkorporation (B) von Selenocystein in Proteine. "SS", nachgewiesene nicht identifizierte Selenocystein-Synthase-Aktivität; SBP-Komplex, SECIS bindende Proteine; die spekulative Konversion von O-Phosphoseryl-tRNA<sup>Sec</sup> zu Sec-tRNA<sup>Sec</sup> ist durch den gestrichelten Pfeil angedeutet.

die Homologie nur das Motiv für die Pyridoxal-Phosphat-Bindung betrifft. Ausserdem konnte ein zu MJ0158 homologer ORF im Genom von *M. maripaludis* (synthetisiert Selenoproteine) nicht

gefunden werden (J.A. Leigh, persönliche Mitteilung), während ein entsprechendes Homolog im Genom von *Mtb. thermoautotrophicum* (synthetisiert keine Selenoproteine) vorhanden ist (Smith et al. 1997). Eine Rolle von MJ0158 in der Selenocystein-Biosynthese ist daher unwahrscheinlich.

In Patienten mit autoimmuner Hepatitis co-präzipitiert die tRNA<sup>Sec</sup> mit einem Autoimmunantigen (Gelpi et al. 1992), dessen Identität später geklärt wurde (Wies et al. 2000). Die Interaktion dieses Proteins mit der tRNA<sup>Sec</sup> und das Vorhandensein einer theoretischen Pyridoxal-Phosphat-Bindestelle, ließen es als guten Kandidaten für ein SS-Homologes erscheinen (Kernebeck et al. 2001). Ein zu diesem Protein homologes Genprodukt konnte auch im Genom von *M. jannaschii* gefunden werden. Biochemische Untersuchungen mit dem heterolog überproduzierten und gereinigten Protein bestätigten seine vermutete SS-Aktivität jedoch nicht (Nieraad 2000).

Der markanteste Unterschied zwischen den tRNA<sup>Sec</sup>-Spezies von Bakterien, Archaeen und Eukaryonten findet sich in den unterschiedlichen Sekundärstrukturen. tRNA<sup>Sec</sup> von *E. coli* hat in dem die Aminosäure bindenden Teil der L-förmigen tRNA (Akzeptor/T-Stamm) eine 8/5 Struktur (8 bp Akzeptor-Stamm und 5 bp T-Stamm (Baron et al. 1993b), für die entsprechende tRNA von *M. jannaschii* wurde eine 9/4 Struktur postuliert (Ioudovitch und Steinberg 1999). Die eukaryontische tRNA<sup>Sec</sup> aus *Xenopus laevis*, hat wahrscheinlich ebenfalls eine 9/4 Struktur (Sturchler et al. 1993; Hubert et al. 1998).

## 1. 2. Der Einbau von Selenocystein

### *Die Codon-Anticodon-Erkennung*

Das Gen der tRNA<sup>Sec</sup> von *M. jannaschii* ist nicht in der Lage, einen Defekt im *selC*-Gen von *E. coli in vivo* zu komplementieren (S. Commans und A. Böck, nicht veröffentlicht). Die Erklärung für die Diskrepanz, einerseits *in vitro* von *E. coli*-Enzymen selenocysteyliert zu werden und andererseits *in vivo* nicht aktiv zu sein, liegt wahrscheinlich in fehlenden oder falschen Basenmodifikationen. tRNA<sup>Sec</sup> von *E. coli* enthält unter anderem an Position 37 in der Anticodonschleife die modifizierte Base N<sup>6</sup>-Isopentenyladenosin (i<sup>6</sup>A37; Schön et al. 1989). Die eukaryontische tRNA<sup>Sec</sup> aus *Xenopus laevis*, die in *E. coli* einen tRNA<sup>Sec</sup>-Defekt komplementiert (Baron et al. 1994), hat eine identische Modifikation an der selben Stelle (Carlson et al. 2001). Mutiert man im Froschmodell die entsprechende Base auf DNA-Ebene zu einem G, kommt die Selenoprotein-Biosynthese dort nahezu zum Erliegen (Warner et al. 2000); auch im Mausmodell ist der Selenocystein-Einbau bei Überproduktion einer entsprechend veränderten tRNA<sup>Sec</sup>

drastisch reduziert (Moustafa et al. 2001). In Archaeen kommt  $i^6A37$  nicht vor (Björk 1995). Die tRNA<sup>Sec</sup>-Spezies, sowohl von *M. jannaschii*, als auch von *M. maripaludis*, tragen an dieser Position natürlicherweise ein (wahrscheinlich modifiziertes) Guanin (G37, siehe Abb. 23). Wird in der tRNA<sup>Sec</sup> von *M. maripaludis* das G37 gegen ein A ausgetauscht, so kann diese rekombinante tRNA einen *selC*-Defekt in *E. coli* komplementieren (A. Resch, M. Rother und A. Böck, nicht veröffentlicht). Da tRNAs mit  $i^6A37$ -Modifikation häufig UNN-Codons erkennen, wird dieser voluminösen und hydrophoben Modifikation sowohl die Verstärkung der schwachen A36-U Interaktion (Vacher et al. 1984), als auch die Vermeidung anderer Basenerkennung an dieser Position (Jukes 1973) zugeschrieben.

### ***Das SelB-Homolog***

Vergleicht man die Aminosäuresequenzen von MJ0495, EF-Tu und SelB, so besitzt MJ0495 zwei Eigenschaften, die es zu SelB ähnlicher machen als zu EF-Tu (Abb. 3). (a) MJ0495 enthält im Vergleich zu EF-Tu die gleichen Deletionen in der Aminosäuresequenz wie SelB, welche bei EF-Tu unter anderem für die Interaktion mit dem Nukleotid-Austauschfaktor EF-Ts verantwortlich sind (Hilgenfeld et al. 1996). (b) MJ0495 trägt eine C-terminale Verlängerung gegenüber EF-Tu, die im Vergleich zu bakteriellen SelBs mit 7,8 kDa allerdings wesentlich kürzer ist. Im Gegensatz zu SelB ist in MJ0495 jedoch ein für alle G-Proteine der Translationsfaktor-Familie (Dever et al. 1987) charakteristisches Asparagin vorhanden (N118 der MJ0495-Sequenz; siehe Abb. 3), welches in den bekannten prokaryontischen SelB-Sequenzen stets gegen ein Threonin ausgetauscht ist (Kromayer et al. 1996).

In *E. coli* wird die korrekt aminoacylierte Sec-tRNA<sup>Sec</sup> durch den Selenocystein-spezifischen Elongationsfaktor SelB zur Decodierungsstelle am Ribosom transferiert. Die Hydrolyse von gebundenem GTP wird vermutlich – in Analogie zu EF-Tu – durch eine Konformationsänderung, die durch Interaktion mit dem Ribosom ausgelöst wird, stimuliert (Hüttenhofer und Böck 1998). Alle untersuchten kanonischen prokaryontischen Elongationsfaktoren (EF-Tu in Eubakterien und EF-1 $\alpha$  in Archaeen) haben eine viel höhere Affinität zu GDP als zu GTP (Fasano et al. 1978; Masullo et al. 1991), was die Aktivität eines Nukleotid-Austauschfaktors (EF-Ts bzw. EF1 $\beta$ ) nach GTP-Hydrolyse nötig macht. Im Gegensatz zu EF-Tu benötigt SelB kein solches Protein, denn es hat eine höhere Affinität zu GTP als zu GDP. Das selbe Verhalten in der Guanin-Nukleotid-Bindung zeigt auch das MJ0495-Protein. Dabei liegen die bestimmten Dissoziationskonstanten

mit 0,1  $\mu\text{M}$  für GTP und 0,4  $\mu\text{M}$  für GDP in der gleichen Größenordnung wie die von SelB (1,7  $\mu\text{M}$  für GTP und 10  $\mu\text{M}$  für GDP; Forchhammer et al. 1989). Theoretisch ist somit für die Aktivität des MJ0495-Proteins ein Nukleotid-Austauschfaktor ebenfalls unnötig. MJ0495 bindet demnach in seiner GTP-Form die Sec-tRNA<sup>Sec</sup> und "liefert" sie an die A-Bindungsstelle des Ribosoms, von dem es nach GTP-Hydrolyse wieder abdissoziiert, um erneut GTP und Sec-tRNA<sup>Sec</sup> zu binden. Modellhaft ist dies in Abb. 33 (B) dargestellt.

Dieses Modell wird unterstützt durch den biochemischen Befund, dass MJ0495 Sec-tRNA<sup>Sec</sup> *in vitro* spezifisch bindet. Es diskriminiert dabei zwischen Ser-tRNA<sup>Sec</sup>, Sec-tRNA<sup>Sec</sup> und kanonischen Serin inserierenden tRNAs und stellt deshalb den Selenocystein-spezifischen Elongationsfaktor in *M. jannaschii* dar. Dieses aSelB ist damit bezüglich der Eigenschaften der Domänen 1, 2 und 3 von SelB zu diesem homolog. Diese Eigenschaften des aSelB konnten auch dadurch bestätigt werden, dass das Homolog aus *M. maripaludis* sowohl mit tRNA<sup>Sec</sup> von *E. coli* wie auch mit rekombinanter tRNA<sup>Sec</sup> von *M. maripaludis* (G37A) *in vivo* interagiert.

Die Interaktion von MJ0495 mit Ser-tRNA<sup>Sec</sup> *in vitro* wirft die Frage auf, wie signifikant diese für den Selenocystein-Einbau *in vivo* ist. Möglicherweise liegt in *M. jannaschii* das zahlenmäßige Verhältnis von tRNA<sup>Sec</sup> und von "SS" so weit auseinander, dass freie Ser-tRNA<sup>Sec</sup> praktisch nicht vorkommt. Für das *E. coli*-System wurde dies aufgrund der Stöchiometrie von tRNA<sup>Sec</sup> (Dong et al. 1996) und SS (Sawers et al. 1991) bereits postuliert (Böck 2001). Die Verschiedenheit zwischen SelB und MJ0495 in Domäne 3, in der die tRNA-Bindfunktion liegt (Kromayer et al. 1996), könnte mechanistische Unterschiede bei der Diskriminierung der beiden tRNA-Spezies reflektieren. Eine andere Erklärung ist, dass Interaktionen mit einem oder mehreren weiteren Protein-Faktoren nötig sein könnten, um die Interaktion von aSelB und Ser-tRNA<sup>Sec</sup> auszuschließen.

Ein basaler Unterschied zwischen SelB von *E. coli* und aSelB ist, dass SelB auch das SECIS-Element erkennt und spezifisch bindet, aSelB jedoch nicht. Dieser unerwartete Befund wurde mit verschiedenen Methoden bestätigt. Für SelB konnte gezeigt werden, dass die C-terminale Extension von 17 kDa (verglichen mit EF-Tu) für die SECIS-Bindung verantwortlich ist (Kromayer et al. 1996). Aus dem Sequenzvergleich von SelB und aSelB geht hervor, dass dieser, als Domäne 4 bezeichnete Teil aSelB zum großen Teil fehlt (Abb. 3). In *M. jannaschii* existiert ein Faktor, der die SECIS-RNA spezifisch erkennt, aber verschieden von aSelB ist. Die Funktion von SelB als Selenocystein-spezifischer Elongationsfaktor und SECIS-bindendem Protein scheinen demnach bei *Archaea* auf mindestens zwei Proteine verteilt zu sein.

### ***Das SECIS-Element***

Während in allen bisher untersuchten prokaryontischen Systemen die SECIS-Elemente innerhalb der codierenden Region der mRNA lokalisiert sind, befinden sie sich in Archaeen im 3'-nicht-translatierten Bereich der mRNA. Folgende Resultate unterstützen diese Tatsache: (a) Die postulierten SECIS-Elemente haben die Merkmale *in silico* stabile Sekundärstrukturen auszubilden, die stark konservierte Bereiche enthalten (siehe Abb. 2). Es konnte gezeigt werden, dass das *fruA*-SECIS-Element von *M. jannaschii* in der Tat *in vivo* auf der mRNA vorhanden ist, als auch, dass es die durch Vorhersagen erwartete Sekundärstruktur einnimmt (Rother et al. 2001a). (b) Die vermuteten SECIS-Elemente sind beschränkt auf den 3'-nicht-translatierten Bereich von potentiellen Selenoprotein-Genen; 3' von anderen Leserahmen finden sie sich nicht. (c) In anderen methanogenen *Archaea* lassen sich sehr ähnliche Strukturen im 3'-nicht-translatierten Bereich von mRNAs für Selenoproteine ableiten (Halboth und Klein 1992; Vorholt et al. 1997). (d) Die heterologe Expression eines Selenoprotein-Gens aus *M. jannaschii* in *M. maripaludis* war nur möglich, wenn das dazugehörige SECIS-Element im 3'-nicht-translatierten Bereich der mRNA vorhanden war. Damit konnte die Natur der archaeellen SECIS-Elemente bewiesen werden.

Dass sich Mutationen im archaeellen SECIS-Element im Vergleich zu ähnlichen Varianten im *E. coli*-System (Heider et al. 1992; Liu et al. 1998; Kromayer et al. 1999) nur vergleichsweise schwach auswirken, kann mehrere Gründe haben. Zum einen könnte das archaeelle SECIS bindende Protein mit dem SECIS-Element über mehrere Kontaktstellen interagieren. Eine Konsequenz wäre, dass die Eliminierung einzelner solcher Interaktionen die Funktionalität nicht voll blockieren würde. Zum anderen ist es möglich, dass die durch die Mutationen betroffenen Nukleotide für die Interaktion zwischen SECIS-bindendem Protein und SECIS-Element nicht entscheidend sind. Sowohl in Eubakterien wie auch in Eukaryonten hat der Austausch bestimmter Basen im SECIS-Element geringe Folgen auf seine Funktionalität; mutiert man dagegen andere, erlischt das vom SECIS-Element abhängige UGA-Durchlesen nahezu völlig (Heider et al. 1992; Kromayer et al. 1999; Berry et al. 1993). Oft sind dies Mutationen, die die Ausbildung der korrekten Sekundärstruktur stören. Die Punktmutationen, die in das archaeelle SECIS-Element eingeführt wurden, führen nach Vorhersagen nicht zu einer veränderten SECIS-Struktur. Das "Mut-SECIS"-Konstrukt dagegen hat eine drastisch veränderte Sekundärstruktur zur Folge und dient dem heterologen Selenocystein-Einbau nicht mehr.

Die Resultate der Experimente *in vitro* deuten ebenfalls an, dass die SECIS-Raumstruktur in Archaeen eine dominantere Rolle spielt als deren Primärstruktur. So kompetitierte ein auf Sequenzebene stark verändertes, aber nach Strukturvorhersagen der Wildtyp-Struktur ähnliches Transkript (MJMut3) im Gelretardationsexperiment mit der spezifischen SECIS-Erkennung deutlich, wohingegen strukturell verschiedene Transkripte (MJMut1 und MJMut2) kaum Einfluss auf die Bindung des SECIS-Elements durch einen Faktor im *M. jannaschii*-Extrakt hatten.

### **Kommunikation zwischen SECIS-Element und aSelB**

Die Lokalisation der SECIS-Elemente im 3'-nicht-translatierten Bereich der Selenoprotein mRNAs von *Archaea* und *Eukarya* macht einen ähnlichen Mechanismus bei der Recodierung von UGA durch ein entfernt liegendes SECIS-Element wahrscheinlich. In der Tat gelang ein Durchbruch in der Identifizierung des eukaryontischen SelB-Homologen, als aSelB bei der *in silico*-Suche als Sonde eingesetzt wurde (Fagegaltier et al. 2000; Tujebajeva et al. 2000). Das dabei identifizierte eSelB ist wie aSelB im Vergleich zu SelB von *E. coli* C-terminal verkürzt (Abb. 34). Die biochemische Charakterisierung des gereinigten Proteins ergab sehr ähnliche

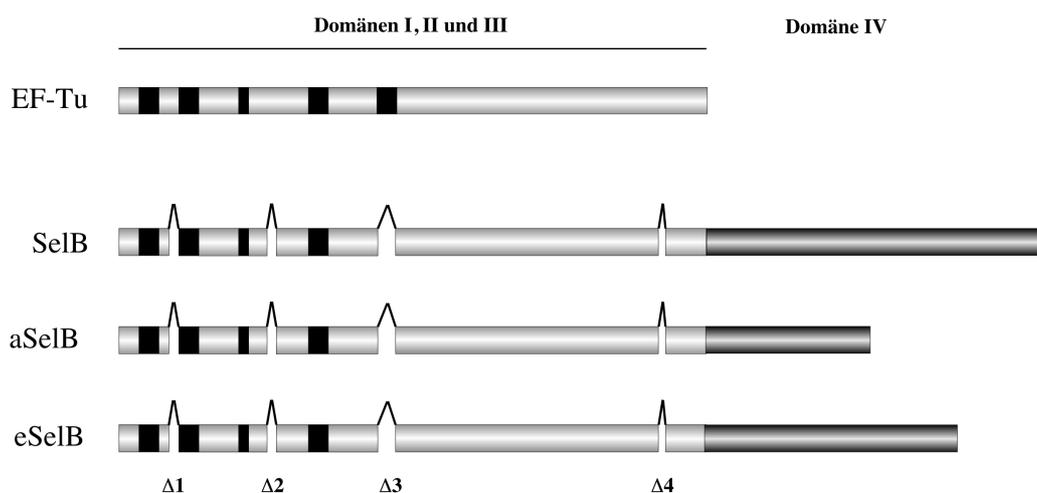


Abbildung 34: Schema der Domänenstruktur des bakteriellen SelB und seines archaeellen (aSelB) und eukaryontischen (eSelB) Homologs im Vergleich mit dem kanonischen bakteriellen Elongationsfaktor Tu (EF-Tu); Die G-Boxen sind durch schwarze Kästen, die charakteristischen Deletionen der SelB-Sequenzen relativ zu EF-Tu ( $\Delta 1$ - $\Delta 4$ ) durch Unterbrechungen im Schema angedeutet; Schema aus Böck (2001), verändert.

Eigenschaften zu aSelB. eSelB hat höhere Affinität zu GTP als zu GDP, es bindet Sec-tRNA<sup>Sec</sup> spezifisch, das SECIS-Element wird jedoch nicht erkannt. Für diese Funktion ist das "SECIS-binding protein 2" (SBP2) verantwortlich, das das SECIS-Element mit hoher Affinität bindet (Copeland et al. 2000). SBP2 interagiert *in vitro* auch mit eSelB (Tujebajeva et al. 2000), und ist

*in vivo* mit Ribosomen assoziiert (Copeland et al. 2001). Damit scheint die "Verbindung" zwischen SECIS-Element und dem Ort der Translation des UGA-Codons (Translationsfaktor/Ribosom) bei Eukaryonten gewährleistet. Die Funktionen des bakteriellen SelB sind hier auf zwei Proteine verteilt.

Die fehlende Ähnlichkeit ihrer SECIS-Elemente zu eukaryontischen oder bakteriellen SECIS-Elementen erklärt, warum in Archaeen die entsprechenden Bindeproteine bzw. –Proteindomänen (SBP2 bzw. Domäne 4b von SelB) nicht durch Sequenzvergleiche entdeckt werden konnten.

Mit der Identifizierung von SECIS-bindenden Proteinen (MJ0041, MJ1665-MJ1674) und eines mit MJ0495 interagierenden Proteins (MJ1210) konnte die Grundlage für die Untersuchung eben jener "Verbindung" in *Archaea* geschaffen werden (Abb. 33 B). Ob es sich dabei funktionell um den aSelB "fehlenden Teil", Domäne 4b vom *E. coli*-SelB, oder um akzessorische Komponenten der Selenocystein-Biosynthese handelt, bleibt zu klären. Sowohl biochemische Analysen *in vitro* als auch Analysen mit Hilfe des nun zur Verfügung stehenden genetischen Systems in *M. maripaludis* können zur Klärung der Mechanismen beitragen, die ein weit entferntes RNA-Element befähigen, die Translation in der codierenden Region zu beeinflussen.

## **2. Die Evolution des Selenocystein-Biosyntheseapparats und der Selenoproteine in *Archaea***

### ***Selenocystein: alte oder neue Erfindung?***

Die Frage, ob die Translation von UGA mit Selenocystein ein phylogenetisch altes System darstellt, oder erst in der jüngeren Evolutionsgeschichte "erfunden" wurde, wird seit längerem diskutiert. Für die Annahme, Selenocystein sei eine "moderne" Erfindung, werden folgende Argumente angeführt: (a) Selenocystein kommt selten vor. Mehr als die Hälfte aller komplett sequenzierten Genome enthalten keine Selenoprotein-Gene, das Genom von *E. coli* enthält 4289 für Proteine codierende Gene, davon nur drei für Selenoproteine. In allen drei Domänen zusammen wurden bis jetzt nur etwa 30 verschiedene Selenoproteine beschrieben (Übersicht in Gladyshev und Kryukov 2001). (b) Bei Eukaryonten wächst mit der evolutiven Entwicklung die Anzahl ihrer Selenoproteine und auch ihre Abhängigkeit von diesem Spurenelement. *C. elegans* enthält nur ein Selenoprotein (Gladyshev et al. 1999), das Genom von *D. melanogaster* vier Selenoprotein-Gene (Castellano et al. 2001), das des Zebrafisch *Danio rerio* 18 (Kryukov und Gladyshev 2000) und im Säugetier *Rattus norvegicus* konnten bisher schon 28 Selenoproteine

nachgewiesen werden (Behne et al. 1996). (c) Die katalytischen Effizienzen von Selenocystein enthaltenden Enzym-Isoformen ist bedeutend größer als die der entsprechenden Cystein enthaltenden Varianten (Berry et al. 1991b; Hazebrouck et al. 2000), weshalb die Einführung von Selenocystein als evolutiver Fortschritt gewertet wird.

Andererseits sprechen überzeugende Indizien für die Ursprünglichkeit des selenierenden Systems: (a) Der geringe Anteil an Selenoproteinen kann auch als Relikt einer anaeroben Welt mit reduzierender Atmosphäre erklärt werden. Die Anreicherung von Sauerstoff führte zu einer Gegenselektion gegen diese sauerstofflabile, sehr reaktive Aminosäure, wobei die geringere katalytische Aktivität des resultierenden Cystein enthaltenden Proteins in Kauf genommen werden musste. (b) In allen drei Abstammungslinien wird Selenocystein von UGA auf der mRNA codiert. Verwendung gerade des UGA-Codons läßt sich gut durch eine frühe Entstehung erklären. Eine Theorie zur Evolution des genetischen Codes geht von einer Co-Evolution der Codons und Aminosäuren aus, da "ähnliche" Aminosäuren von Basentriplett-Familien codiert werden (Übersicht in Atkins et al. 1999). Auch Selenocystein ist mit den Aminosäuren der "benachbarten" Codons verwandt. Cystein (UGU, UGC) und Tryptophan (UGG) werden wie Selenocystein (UGA) aus Serin synthetisiert. (c) Die Selenocystein-spezifische tRNA weist in allen drei Domänen die gleichen charakteristischen Sekundär- und Tertiärstrukturmotive auf, die sie von allen anderen Elongator-tRNAs unterscheiden. Dabei haben die archaeelle und eukaryontische tRNA-Spezies mehr Ähnlichkeit zueinander als zur bakteriellen tRNA<sup>Sec</sup> (Hubert et al. 1998). (d) Die Verwandtschaftsanalyse der Aminosäuresequenz von 13 SelB-Homologen (2 archaeelle, 9 bakterielle, 2 eukaryontische) resultiert in einem Stammbaum, der mit dem der 16S rRNA-Sequenzen vergleichbar ist (M. Thanbichler, persönliche Mitteilung). Die größere verwandtschaftliche Nähe der tRNA<sup>Sec</sup>-Spezies bzw. SelB-Homologen von *Archaea* und *Eukarya* im Vergleich zu *Archaea* und *Bacteria* oder *Bacteria* und *Eukarya* deckt sich mit der akzeptierten Hypothese, dass die Auftrennung von *Archaea* und *Eukarya* in der Evolution später als die Abspaltung der *Bacteria* erfolgte (Übersicht in Olsen und Woese 1997). Die Monophylie des selenierenden Systems lässt sich daraus folgern.

Eine Tatsache, die den gemeinsamen Ursprung des Selenoprotein-Biosyntheseapparats in Frage stellen könnte, ist die Lokalisation des SECIS-Elements in der 3'-nicht-translatierten Region der mRNA bei *Archaea* und *Eukarya*. Die mögliche Erklärung, dass im Lauf der Evolution vielleicht eine "Verschiebung" des SECIS-Elements aus der codierenden in die nicht-codierende Region der mRNA bei einem gemeinsamen Vorfahren stattgefunden haben könnte, wurde durch die

heterologe Synthese einer eukaryontischen Thioredoxin-Reduktase in *E. coli* erbracht (Arnèr et al. 1999). Dieses Selenoprotein enthält Selenocystein als vorletzte Aminosäure und wurde in *E. coli* korrekt gebildet, wenn ein SECIS-Element aus *E. coli* 3' an das Terminationscodon fusioniert wurde. Das SECIS-Element musste demnach in *E. coli* nicht translatiert werden, um funktionell zu sein. Dadurch werden Einschränkungen in der Primärstruktur aufgehoben, die durch die Notwendigkeit ein SECIS-Element innerhalb der codierenden Sequenz zu formen, entstehen (Berry et al. 1993). Ein einziges, nicht translatiertes SECIS-Element sollte darüber hinaus den Einbau von mehr als einem Selenocystein in ein Polypeptid erlauben, wie das bei Selenoprotein P der Fall ist (Hill et al. 1993). Die Evidenzen für das Vorhandensein eines Proteins mit zwei Selenocystein-Resten in *M. maripaludis* unterstützen diese Vorstellung.

### **Von Selenocystein zu Cystein?**

Von allen bisher untersuchten *Archaea* enthalten nur *M. vannielii*, *M. voltae*, *M. maripaludis* und *Mp. kandleri* Selenoproteine. Diese Organismen stehen sich phylogenetisch nahe (Olsen et al. 1994). Dies könnte als weiteres Indiz dafür gewertet werden, dass die Gene für die Selenoprotein-Synthese nicht einfach lateral transferiert werden und somit eine ursprüngliche Eigenschaft darstellen. Von den untersuchten *Archaea* ist *M. jannaschii* der einzige Organismus, der von einigen nur die entsprechenden Selenocystein enthaltenden Enzyme hat (Bult et al. 1996; siehe auch Tab. 1) und damit abhängig von Selen sein muss. Das ursprüngliche Habitat von *M. jannaschii* ist eine submarine vulkanische Quelle ("schwarzer Raucher"), die reich an Schwefel- und damit auch an Selen-Mineralien ist (Neumüller 1987). In *M. vannielii*, *M. voltae*, *M. maripaludis* und *Mp. kandleri* wurden dagegen für alle Selenoproteine zusätzlich Isoenzyme nachgewiesen, die an entsprechender Stelle Cystein enthalten.

Das VhuD-Protein von *M. maripaludis* enthält wahrscheinlich zwei Selenocystein-Reste, in *M. voltae* enthält das Protein an den entsprechenden Positionen Cysteine, ansonsten sind sie zu 88% identisch (siehe Anhang). Vergleicht man die 3'-nicht-translatierten Regionen von *vhuD* der beiden Organismen, fällt auch hier ein hohes Maß an Ähnlichkeit auf (A. Resch, M. Rother und A. Böck, nicht veröffentlicht). An der Position, an der in *M. maripaludis* das SECIS-Element lokalisiert ist (Rother et al. 2001a), lässt sich in der *M. voltae*-Sequenz eine dazu ähnliche Sekundärstruktur bilden (Abb. 35). Diese Struktur sollte, berücksichtigt man die Resultate der Mutationsanalysen des SECIS-Elements *in vivo* und die der Gelretardationsexperimente *in vitro*, nicht funktionell sein.

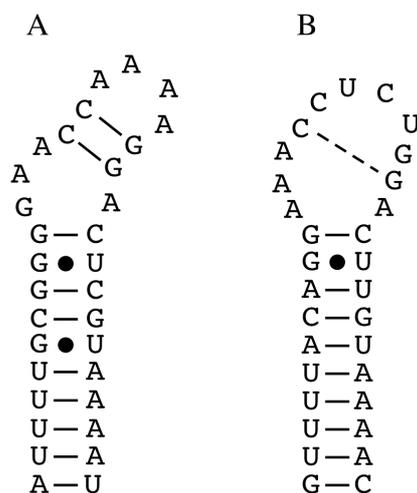


Abbildung 35: Sekundärstrukturvorhersagen der "SECIS"-Elemente von *M. maripaludis* (A) und *M. voltae* (B) im 3' nicht-translatierten Bereich des *vhuD*-Gens. Die gestrichelte Linie deutet die unwahrscheinliche Interaktion zwischen diesen Nukleotiden an.

Die VhuD-Situation in *M. maripaludis* und *M. voltae* kann möglicherweise als Beispiel für die Evolution von Cystein enthaltenden Enzymen aus Selenocystein enthaltenden Vorgängern angesehen werden. Nach der Mutation des Selenocystein-Codons in ein Cystein-Codon wird das SECIS-Element funktionslos und durch den Verlust des Selektionsdrucks veränderbar. Der selektive Vorteil einer Cystein-"Variante" könnte die resultierende Unabhängigkeit von Selen bei der Besiedlung neuer, zum Beispiel mariner Habitats sein, in denen die Selenkonzentration generell gering ist (Osawa et al. 1992).

### 3. Selenabhängige Genregulation in *Archaea*

Für *M. maripaludis* konnte gezeigt werden, dass Verringerung des Selengehalts im Medium nicht nur zu stark verringerter Synthese von Selenoproteinen wie VhuD führt, sondern dass auch andere Untereinheiten der selenabhängigen Hydrogenase Vhu, VhuA, in geringerem Maße gebildet werden. Im Gegenzug verstärkt sich die Synthese der entsprechenden selenunabhängigen Enzymkomplexe (VhcD und VhcA) dramatisch. In *M. voltae* ist dieses Phänomen auf Transkriptionsebene untersucht worden. Es wurde gezeigt, dass die Expression der untersuchten Selenoprotein-Gene konstitutiv ist und mit der Induktion Cystein codierender Isogene einher geht, die als Ersatz-System bei Selenmangel fungieren (Berghöfer und Klein 1995). Die bei Selenmangel auftretende Verringerung der Wachstumsraten und der erreichbaren Zelldichten bei *M. voltae* liegt wohl an der geringeren katalytischen Kraft, die Cystein enthaltende Enzyme im

Vergleich zu den entsprechenden Selenocystein-Varianten aufweisen (Axley et al. 1991; Berry et al. 1991b).

Über die physiologische Rolle der stark erhöhten Synthese der  $F_{420}$ -unabhängigen  $N^5, N^{10}$ -Methylen- $H_4$ MPT-Dehydrogenase (Hmd) bei Selenmangel kann nur spekuliert werden. Sie katalysiert einen zentralen Schritt in dem Metabolismus, an dem auch die meisten Selenoproteine von *M. maripaludis* beteiligt sind, der Methanogenese (siehe Abb. 1). Die verstärkte Synthese dieses Enzyms bei Selenmangel lässt sich allerdings mit einer für Hmd vorgeschlagenen Funktion gut in Einklang bringen, wonach sie ein Ersatz-System für die  $F_{420}$ -abhängige  $N^5, N^{10}$ -Methylen- $H_4$ MPT-Dehydrogenase (Mtd) bei Fe-, Ni- (und nun auch Se-) Mangel darstellt (Reeve et al. 1997). Unter diesen Bedingungen könnte die selenabhängige  $F_{420}$ -reduzierende Hydrogenase (Fru) nicht ausreichend reduziertes Koenzym  $F_{420}$  ( $H_2F_{420}$ ) für die Methanogenese generieren. Eine verstärkte  $F_{420}$ -unabhängige Synthese von Methylen- $H_4$ MPT (durch Hmd) könnte eine von Mtd katalysierte Rückreaktion von Methylen- $H_4$ MPT zu Methenyl- $H_4$ MPT ermöglichen, in der reduziertes  $F_{420}$  ( $H_2F_{420}$ ) generiert würde. Dadurch könnte die Methanogenese weiterlaufen, da  $H_2F_{420}$  für eine spätere Reaktion (Reduktion von Methylen- $H_4$ MPT zu Methyl- $H_4$ MPT; siehe Abb. 1) essentiell ist.

## Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, die aus der Genomsequenz von *M. jannaschii* identifizierten Komponenten der Biosynthese und Inkorporation von Selenocystein biochemisch und molekularbiologisch zu charakterisieren. Folgende Ergebnisse wurden erhalten:

- a) Die tRNA<sup>Sec</sup> von *M. jannaschii* konnte mit gereinigter Seryl-tRNA-Synthetase von *E. coli* korrekt *in vitro* mit L-Serin beladen werden. Die Umwandlung der Seryl-Gruppe in eine Selenocysteyl-Gruppe war mit gereinigter Selenocystein-Synthase und Selenophosphat-Synthetase von *E. coli* ebenfalls erfolgreich. In Extrakten von *M. jannaschii* konnte darüber hinaus die Selenocystein-Synthase-Aktivität nachgewiesen werden. Eine rekombinante tRNA<sup>Sec</sup> von *M. maripaludis*, bei der eine Base im Anticodon-"Loop"ausgetauscht worden war, konnte im heterologen Wirt *E. coli* Selenocystein inserieren.
- b) Die Natur und die Lokalisation des archaeellen SECIS-Elements konnte durch die heterologe Expression eines Selenoprotein-Gens von *M. jannaschii* in *M. maripaludis* bewiesen werden. Die heterologe Selenoprotein-Synthese war dabei abhängig vom Vorhandensein und der strukturellen Unversehrtheit des RNA-Elements in der 3'-nicht-translatierten Region der Selenoprotein-mRNA.
- c) Die biochemische Charakterisierung des heterolog in *E. coli* überproduzierten MJ0495-Proteins von *M. jannaschii* ergab Dissoziationskonstanten für Guanin-Nukleotide, wie sie für bakterielle SelB-Spezies typisch sind. Darüber hinaus diskriminiert das MJ0495-Protein zwischen der kognaten Ser-tRNA<sup>Sec</sup> und Sec-tRNA<sup>Sec</sup>; letztere wird mit höherer Affinität gebunden. MJ0495 stellt deshalb den Selenocystein-spezifischen Translationsfaktor in *Archaea* (aSelB) dar. Das in der nicht-translatierten mRNA-Region liegende SECIS-Element wird allerdings (im Unterschied zu SelB von *E. coli*) nicht von aSelB gebunden.
- d) Es konnten mehrere SECIS-bindende, und ein aSelB-bindendes Protein identifiziert werden, die möglicherweise für die notwendige Kommunikation zwischen aSelB und dem SECIS-Element sorgen.
- e) Durch die Proteomanalyse konnte gezeigt werden, dass in *M. maripaludis* einige Proteine in Abhängigkeit von der Selenversorgung gebildet werden. Dabei wurden auch solche Proteine selenabhängig synthetisiert, die kein Selenocystein enthalten.

# Literaturverzeichnis

- Adams, M. W. und Kelly, R. M. (1998). *Trends Biotechnol.* 16: 329-32.
- Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., Scherer, S. E., Li, P. W., Hoskins, R. A., Galle, R. F., George, R. A., Lewis, S. E., Richards, S., Ashburner, M., Henderson, S. N., Sutton, G. G., Wortman, J. R., Yandell, M. D., Zhang, Q., Chen, L. X., Brandon, R. C., Rogers, Y. H., Blazej, R. G., Champe, M., Pfeiffer, B. D., Wan, K. H., Doyle, C., Baxter, E. G., Helt, G., Nelson, C. R., et al. (2000). *Science* 287: 2185-2195.
- Agha-Amiri, K. und Klein, A. (1993). *Nucleic Acids Res.* 21: 1491.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. und Lipman, D. J. (1997). *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.
- Andreesen, J. R. und Ljungdahl, L. G. (1973). *J. Bacteriol.* 116: 867-873.
- Arnèr, E. S., Sarioglu, H., Lottspeich, F., Holmgren, A. und Böck, A. (1999). *J. Mol. Biol.* 292: 1003-1016.
- Atkins, J. F., Böck, A., Matsufuji, S. und Gesteland R.F. (1999). In: *The RNA World II* . (Ed.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, : pp. 637-673.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidmann, J. G., Smith, J. A. und Struhl, K. (1997). *Current protocols in molecular biology*. J. Wiley & sons, Inc., .
- Axley, M. J., Böck, A. und Stadtman, T. C. (1991). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 8450-8454.
- Balch, W. E. und Wolfe, R. S. (1976). *Appl. Environ. Microbiol.* 32: 781-791.
- Baron, C. und Böck, A. (1991). *J. Biol. Chem.* 266: 20375-20379.
- Baron, C. und Böck, A. (1995). In: *tRNA: Structure, Biosynthesis, and Function* . Söll, D. und Rajbhandary, U. L. (Ed.) ASM Press, Washington, D.C.: pp. 529-545.
- Baron, C., Heider, J. und Böck, A. (1993a). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*90: 4181-4185.
- Baron, C., Westhof, E., Böck, A. und Giegé, R. (1993b). *J. Mol. Biol.* 231: 274-292.
- Baron, C., Sturchler, C., Wu, X. Q., Gross, H. J., Krol, A. und Böck, A. (1994). *Nucleic Acids Res.* 22: 2228-2233.
- Barrell, B. G., Bankier, A. T. und Drouin, J. (1979). *Nature* 282: 189-194.

- Behne, D., Kyriakopoulou, A., Weiss-Nowak, C., Kalckloesch, M., Westphal, C. und Gessner, H. (1996). *Biol. Trace Elem. Res.* 55: 99-110.
- Berghöfer, Y., Agha-Amiri, K. und Klein, A. (1994). *Mol. Gen. Genet.* 242: 369-373.
- Berghöfer, Y. und Klein, A. (1995). *Appl. Env. Microbiol.* 61: 1770-1775.
- Berry, M. J., Banu, L., Chen, Y. Y., Mandel, S. J., Kieffer, J. D., Harney, J. W. und Larsen, P. R. (1991a). *Nature* 353: 273-276.
- Berry, M. J., Kieffer, J. D., Harney, J. W. und Larsen, P. R. (1991b). *J. Biol. Chem.* 266: 14155-14158.
- Berry, M. J., Banu, L., Harney, J. W. und Larsen, P. R. (1993). *EMBO J.* 12: 3315-3322.
- Bertram, P. A., Schmitz, R. A., Linder, D. und Thauer, R. K. (1994). *Arch. Microbiol.* 161: 220-228.
- Björk, G. R. (1995). In: *tRNA: Structure, Biosynthesis, and Function*. Söll, D. und Rajbhandary, U. L. (Ed.) ASM Press, Washington, D.C.: pp. 165-205.
- Blum, H., Beier, H. und Gross, H. J. (1987). *Electrophoresis* 8: 93-99.
- Bobik, T. A. und Wolfe, R. S. (1988). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 60-63.
- Böck, A., Forchhammer, K., Heider, J., Leinfelder, W., Sawers, G., Veprek, B. und Zinoni, F. (1991). *Mol. Microbiol.* 5: 515-520.
- Böck, A. (2001). In: *Selenium - its molecular biology and role in human health*. Hatfield, D. L. (Ed.) Kluwer Academic Publishers, Boston: pp. 7-22.
- Bradford, M. M. (1976). *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Brinkmann, U., Mattes, R. E. und Buckel, P. (1989). *Gene* 85: 109-114.
- Bult, C. J., White, O., Olsen, G. J., Zhou, L., Fleischmann, R. D., Sutton, G. G., Blake, J. A., FitzGerald, L. M., Clayton, R. A., Gocayne, J. D., Kerlavage, A. R., Dougherty, B. A., Tomb, J., Adams, M. D., Reich, C. I., Overbeek, R., Kirkness, E. F., Weinstock, K. G., Merrick, J. M., Glodek, A., Scott, J. L., Geoghagen, N. S., Weidman, J. F., Fuhrmann, J. L., Nguyen, D., Utterback, T. R., Kelley, J. M., Peterson, J. D., Sadow, P. W., Hanna, M. C. et al. (1996). *Science* 273: 1058-1073.
- Carlson, B. A., Martin-Romero, F. J., Kumaraswamy, E., Moustafa, M. E., Zhi, H. und Hatfield, D. L. (2001). In: *Selenium: its molecular biology and role in human health*. Hatfield, D. L. (Ed.) Kluwer Academic Publishers, Boston: pp. 23-32.

- Castellano, S., Morozova, N., Morey, M., Berry, M. J., Serras, F., Corominas, M. und Guigo, R. (2001). *EMBO Rep.* 2: 697-702.
- Chambers, I., Frampton, J., Goldfarb, P., Affara, N., McBain, W. und Harrison, P. R. (1986). *EMBO J.* 5: 1221-1227.
- Cone, J. E., Del Rio, R. M., Davis, J. N. und Stadtman, T. C. (1976). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73: 2659-2663.
- Consortium, T. C. e. S. (1998). *Science* 282: 2012-2018.
- Copeland, P. R., Fletcher, J. E., Carlson, B. A., Hatfield, D. L. und Driscoll, D. M. (2000). *EMBO J.* 19: 306-314.
- Copeland, P. R., Stepanik, V. A. und Driscoll, D. M. (2001). *Mol. Cell. Biol.* 21: 1491-1498.
- Dever, T. E., Glynias, M. J. und Merrick, W. C. (1987). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 1814-1818.
- Dong, H., Nilsson, L. und Kurland, C. G. (1996). *J. Mol. Biol.* 260: 649-663.
- Donnelly, M. I., Escalante-Semerena, J. C., Rinehart, K. L., Jr. und Wolfe, R. S. (1985). *Arch. Biochem. Biophys.* 242: 430-439.
- Donnelly, M. I. und Wolfe, R. S. (1986). *J. Biol. Chem.* 261: 16653-16659.
- Ehrenreich, A., Forchhammer, K., Tormay, P., Veprek, B. und Böck, A. (1992). *Eur. J. Biochem.* 206: 767-773.
- Ellermann, J., Hedderich, R., Bocher, R. und Thauer, R. K. (1988). *Eur. J. Biochem.* 172: 669-677.
- Fagegaltier, D., Hubert, N., Yamada, K., Mizutani, T., Carbon, P. und Krol, A. (2000). *EMBO J.* 19: 4796-4805.
- Fasano, O., Bruns, W., Crechet, J. B., Sander, G. und Parmeggiani, A. (1978). *Eur. J. Biochem.* 89: 557-565.
- Fauque, G., Peck, H. D., Jr., Moura, J. J., Huynh, B. H., Berlier, Y., DerVartanian, D. V., Teixeira, M., Przybyla, A. E., Lespinat, P. A., Moura, I. und et al. (1988). *FEMS Microbiol. Rev.* 4: 299-344.

- Fiedler, S. und Wirth, R. (1988). Anal. Biochem. 170: 38-44.
- Fleischmann, R. D., Adams, M. D., White, O., Clayton, R. A., Kirkness, E. F., Kerlavage, A. R., Bult, C. J., Tomb, J. F., Dougherty, B. A., Merrick, J. M. und et al. (1995). Science 269: 496-512.
- Forchhammer, K., Leinfelder, W. und Böck, A. (1989). Nature 342: 453-456.
- Forchhammer, K. und Böck, A. (1991). J. Biol. Chem. 266: 6324-6328.
- Forchhammer, K., Boesmiller, K. und Böck, A. (1991a). Biochimie 73: 1481-1486.
- Forchhammer, K., Leinfelder, W., Boesmiller, K., Veprek, B. und Böck, A. (1991b). J. Biol. Chem. 266: 6318-6323.
- Gardner, W. L. und Whitman, W. B. (1999). Genetics 152: 1439-1447.
- Gardner, W. L. (2000). Dissertation an der Graduate Faculty, University of Georgia, Athens, USA.
- Gärtner, P., Ecker, A., Fischer, R., Linder, D., Fuchs, G. und Thauer, R. K. (1993). Eur. J. Biochem. 213: 537-545.
- Gelpi, C., Sontheimer, E. J. und Rodriguez-Sanchez, J. L. (1992). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 9739-9743.
- Gernhardt, P., Possot, O., Foglino, M., Sibold, L. und Klein, A. (1990). Mol. Gen. Genet. 221: 273-279.
- Gladyshev, V. N., Krause, M., Xu, X. M., Korotkov, K. V., Kryukov, G. V., Sun, Q. A., Lee, B. J., Wootton, J. C. und Hatfield, D. L. (1999). Biochem. Biophys. Res. Commun. 259: 244-249.
- Gladyshev, V. N. (2001). In: *Selenium - its molecular biology and role in human health*. Hatfield, D. L. (Ed.) Kluwer Academic Publishers, Boston: pp. 99-114.
- Gladyshev, V. N. und Kryukov, G. V. (2001). BioFactors 14: 87-92.
- Glass, R. S., Singh, W. P., Jung, W., Veres, Z., Scholz, T. D. und Stadtman, T. C. (1993). Biochemistry 32: 12555-12559.
- Görg, A., Postel, W. und Gunther, S. (1988). Electrophoresis 9: 531-546.
- Gräntzdörffer, A., Pich, A. und Andreesen, J. R. (2001). Arch. Microbiol. 175: 8-18.
- Halboth, S. und Klein, A. (1992). Mol. Gen. Genet. 233: 217-224.

- Härtlein, M., Madern, D. und Leberman, R. (1987). *Nucleic Acids Res.* 15: 1005-1017.
- Hartzell, P. L. und Wolfe, R. S. (1986). *Syst. Appl. Microbiol.* 7: 376-382.
- Hatfield, D., Diamond, A. und Dudock, B. (1982). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 6215-6219.
- Hazebrouck, S., Camoin, L., Faltin, Z., Strosberg, A. D. und Eshdat, Y. (2000). *J. Biol. Chem.* 275: 28715-28721.
- Heider, J., Forchhammer, K., Sawers, G. und Böck, A. (1991). *Arch. Microbiol.* 155: 221-228.
- Heider, J., Baron, C. und Böck, A. (1992). *EMBO J.* 11: 3759-3766.
- Hilgenfeld, R., Böck, A. und Wilting, R. (1996). *Biochimie* 78: 971-978.
- Hill, K. E., Lloyd, R. S., Yang, J. G., Read, R. und Burk, R. F. (1991). *J. Biol. Chem.* 266: 10050-10053.
- Hill, K. E., Lloyd, R. S. und Burk, R. F. (1993). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 537-541.
- Hochuli, E., Bannwarth, W., Döbeli, H., Gentz, R. und Stüber, D. (1988). *Biotechnology* 6: 1321-1325.
- Hill, K. E. und Burk, R. F. (2001). In: *Selenium - its molecular biology and role in human health*. Hatfield, D. L. (Ed.) Kluwer Academic Publishers, Boston: pp. 123-135.
- Holmgren, A. (2001). In: *Selenium - its molecular biology and role in human health*. Hatfield, D. L. (Ed.) Kluwer Academic Publishers, Boston: pp. 179-188.
- Horowitz, S. und Gorovsky, M. A. (1985). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 2452-2455.
- Hubert, N., Sturchler, C., Westhof, E., Carbon, P. und Krol, A. (1998). *RNA* 4: 1029-1033.
- Hüttenhofer, A. und Böck, A. (1998). *Biochemistry* 37: 885-890.
- Ioudovitch, A. und Steinberg, S. V. (1999). *J. Mol. Biol.* 290: 365-371.
- Jaeger, J. A., Turner, D. H. und Zuker, M. (1989). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 7706-7710.
- James, C. M., Ferguson, T. K., Leykam, J. F. und Krzycki, J. A. (2001). *J. Biol. Chem.* 276: 34252-34258.
- Jones, J. B., Dilworth, G. L. und Stadtman, T. C. (1979). *Arch. Biochem. Biophys.* 195: 255-260.

- Jones, W. J., Leigh, J. A., Mayer, F., Woese, C. R. und Wolfe, R. S. (1983a). *Arch. Microbiol.* 136: 254-261.
- Jones, W. J., Paynter, M. J. B. und Gupta, R. (1983b). *Arch. Microbiol.* 135: 91-97.
- Jukes, T. H. (1973). *Nature* 246: 22-26.
- Kabisch, U. C., Gräntzdörffer, A., Schierhorn, A., Rücknagel, K. P., Andreesen, J. R. und Pich, A. (1999). *J. Biol. Chem.* 274: 8445-8454.
- Kang, S. I. und Spears, C. P. (1990). *J. Pharm. Sci.* 79: 57-62.
- Kawashima, T., Berthet-Colominas, C., Wulff, M., Cusack, S. und Leberman, R. (1996). *Nature* 379: 511-518.
- Kernebeck, T., Lohse, A. W. und Grotzinger, J. (2001). *Hepatology* 34: 230-233.
- Kim, I. Y., Guimaraes, M. J., Zlotnik, A., Bazan, J. F. und Stadtman, T. C. (1997). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 418-421.
- Kim, H. S., Vothknecht, U. C., Hedderich, R., Celic, I. und Söll, D. (1998). *J. Bacteriol.* 180: 6446-6449.
- Knowlton, R. G. und Yarus, M. (1980). *J. Mol. Biol.* 139: 721-732.
- Kromayer, M., Wilting, R., Tormay, P. und Böck, A. (1996). *J. Mol. Biol.* 262: 413-420.
- Kromayer, M., Neuhierl, B., Friebel, A. und Böck, A. (1999). *Mol. Gen. Genet.* 262: 800-806.
- Kryukov, G. V., Kryukov, V. M. und Gladyshev, V. N. (1999). *J. Biol. Chem.* 274: 33888-33897.
- Kryukov, G. V. und Gladyshev, V. N. (2000). *Genes Cells* 5: 1049-1060.
- Laemmli, U. K. (1970). *Nature* 227: 680-685.
- Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., Funke, R., Gage, D., Harris, K., Heaford, A., Howland, J., Kann, L., Lehoczky, J., LeVine, R., McEwan, P., McKernan, K. et al. (2001). *Nature* 409: 860-921.
- Lee, B. J., Worland, P. J., Davis, J. N., Stadtman, T. C. und Hatfield, D. L. (1989). *J. Biol. Chem.* 264: 9724-9727.

- Leinfelder, W., Forchhammer, K., Zinoni, F., Sawers, G., Mandrand-Berthelot, M. A. und Böck, A. (1988a). *J. Bacteriol.* 170: 540-546.
- Leinfelder, W., Zehelein, E., Mandrand-Berthelot, M. A. und Böck, A. (1988b). *Nature* 331: 723-725.
- Leinfelder, W., Forchhammer, K., Veprek, B., Zehelein, E. und Böck, A. (1990). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 543-547.
- Lescure, A., Gautheret, D., Carbon, P. und Krol, A. (1999). *J. Biol. Chem.* 274: 38147-38154.
- Liu, Z., Reches, M., Groisman, I. und Engelberg-Kulka, H. (1998). *Nucleic Acids Res.* 26: 896-902.
- Lottspeich, F. und Zorbas, H., Eds. (1998) In: *Bioanalytik* Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg pp. 227-228.
- Low, S. C. und Berry, M. J. (1996). *Trends Biochem. Sci.* 21: 203-208.
- Ma, K., Zirngibl, C., Linder, D., Stetter, K. O. und Thauer, R. K. (1991). *Arch. Microbiol.* 156: 43-48.
- Marshall, R. E., Caskey, C. T. und Nirenberg, M. (1967). *Science* 155: 820-826.
- Martinez, E., Bartolome, B. und de la Cruz, F. (1988). *Gene* 68: 159-162.
- Masullo, M., Raimo, G., Parente, A., Gambacorta, A., De Rosa, M. und Bocchini, V. (1991). *Eur. J. Biochem.* 199: 529-537.
- Meinzel, T., Mechulam, Y. und Fayat, G. (1988). *Nucleic Acids Res.* 16: 8095-8096.
- Meyer, F., Schmidt, H. J., Plümper, E., Hasilik, A., Mersmann, G., Meyer, H. E., Engstrom, A. und Heckmann, K. (1991). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 3758-3761.
- Meyer, M., Grandrath, K. und Andreesen, J. R. (1995). *Eur. J. Biochem.* 234: 184-191.
- Miller, J. H. (1972). In: *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Miller, J. H. (1992). In: *A short course in bacterial genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Moustafa, M. E., Carlson, B. A., El-Saadani, M. A., Kryukov, G. V., Sun, Q. A., Harney, J. W., Hill, K. E., Combs, G. F., Feigenbaum, L., Mansur, D. B., Burk, R. F., Berry, M. J., Diamond, A. M., Lee, B. J., Gladyshev, V. N. und Hatfield, D. L. (2001). *Mol. Cell. Biol.* 21: 3840-3852.

- Müller, J. und Melchinger, H. (1964). *Methoden der Mikrobiologie*. Franckh'sche Verlagshandlung, Stuttgart.
- Müller, V., Blaut, M. und Gottschalk, G. (1993). In: *Methanogenesis*. Ferry, J. G. (Ed.) Chapman & Hall, London: pp. 360-406.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. und Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harb Symp Quant Biol.
- Murray, M. G. und Thompson, W. F. (1980). *Nucleic Acids Res.* 8: 4321-4325.
- Neumüller, O.-A. (1987). *Römpps Chemie Lexikon*. Franckh'sche Verlagshandlung, Stuttgart.
- Nieraad, N. (2000). Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- O'Farrell, P. H. (1975). *J. Biol. Chem.* 250: 4007-4021.
- Olsen, G. J., Woese, C. R. und Overbeek, R. (1994). *J. Bacteriol.* 176: 1-6.
- Olsen, G. J. und Woese, C. R. (1997). *Cell* 89: 991-994.
- Ormö, M. und Sjöberg, B. M. (1990). *Anal. Biochem.* 189: 138-141.
- Osawa, S., Jukes, T. H., Watanabe, K. und Muto, A. (1992). *Microbiol. Rev.* 56: 229-264.
- Patel, G. B., Nash, J. H. E., Agnew, B. J. und Sprott, G. D. (1994). *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 903-907.
- Pfeiffer, M., Bingemann, R. und Klein, A. (1998). *Eur. J. Biochem.* 256: 447-452.
- Politino, M., Tsai, L., Veres, Z. und Stadtman, T. C. (1990). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 6345-6348.
- Reeve, J. N., Nölling, J., Morgan, R. M. und Smith, D. R. (1997). *J. Bacteriol.* 179: 5975-5986.
- Ringquist, S., Schneider, D., Gibson, T., Baron, C., Böck, A. und Gold, L. (1994). *Genes Dev.* 8: 376-385.
- Rother, M., Wilting, R., Commans, S. und Böck, A. (2000). *J. Mol. Biol.* 299: 351-358.

- Rother, M., Resch, A., Gardner, W. L., Whitman, W. B. und Böck, A. (2001a). *Mol. Microbiol.* 40: 900-908.
- Rother, M., Böck, A. und Wyss, C. (2001b). *Arch. Microbiol.* im Druck.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. und Erlich, H. A. (1988). *Science* 239: 487-491.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sawers, G., Heider, J., Zehelein, E. und Böck, A. (1991). *J. Bacteriol.* 173: 4983-4993.
- Schägger, H. und von Jagow, G. (1987). *Anal. Biochem.* 166: 368-379.
- Schmid, G. und Böck, A. (1984). *System. Appl. Microbiol.* 5: 1-10.
- Schön, A., Böck, A., Ott, G., Sprinzl, M. und Söll, D. (1989). *Nucleic Acids Res.* 17: 7159-165.
- Smith, D. R., Doucette-Stamm, L. A., Deloughery, C., Lee, H., Dubois, J., Aldredge, T., Bashirzadeh, R., Blakely, D., Cook, R., Gilbert, K., Harrison, D., Hoang, L., Keagle, P., Lumm, W., Pothier, B., Qiu, D., Spadafora, R., Vicaire, R., Wang, Y., Wierzbowski, J., Gibson, R., Jiwani, N., Caruso, A., Bush, D., Reeve, J. N. et al. (1997). *J. Bacteriol.* 179: 7135-7155.
- Söhling, B., Parther, T., Rücknagel, K. P., Wagner, M. A. und Andreesen, J. R. (2001). *Biol. Chem.* 382: 979-896.
- Sorgenfrei, O., Müller, S., Pfeiffer, M., Sniezko, I. und Klein, A. (1997). *Arch. Microbiol.* 167: 189-195.
- Sparling, R. und Daniels, L. (1986). *J. Bacteriol.* 168: 1402-1407.
- Stadtman, T. C. (1980). *Annu. Rev. Biochem.* 49: 93-110.
- Stadtman, T. C. (1996). *Annu. Rev. Biochem.* 65: 83-100.
- Studier, F. W. und Moffatt, B. A. (1986). *J. Mol. Biol.* 189: 113-130.
- Sturchler, C., Westhof, E., Carbon, P. und Krol, A. (1993). *Nucleic Acids Res.* 21: 1073-1079.
- Suppmann, S., Persson, B. C. und Böck, A. (1999). *EMBO J.* 18: 2284-2293.
- Tabor, S. und Richardson, C. C. (1985). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 1074-1078.

- te Brömmelstroet, B. W., Geerts, W. J., Keltjens, J. T., van der Drift, C. und Vogels, G. D. (1991). *Biochim. Biophys. Acta* 1079: 293-302.
- Teixeira, M., Fauque, G., Moura, I., Lespinat, P. A., Berlier, Y., Prickril, B., Peck, H. D., Jr., Xavier, A. V., Le Gall, J. und Moura, J. J. (1987). *Eur. J. Biochem.* 167: 47-58.
- Thanbichler, M. und Böck, A. (2001). *BioFactors* 14: 53-59.
- Thanbichler, M., Böck, A. und Goody, R. S. (2000). *J. Biol. Chem.* 275: 20458-20466.
- Thauer, R. K., Hedderich, R. und Fischer, R. (1993). In: *Methanogenesis*. Ferry, J. G. (Ed.) Chapman & Hall, London: pp. 209-252.
- Tormay, P., Sawers, A. und Böck, A. (1996). *Mol. Microbiol.* 21: 1253-1259.
- Tujebajeva, R. M., Copeland, P. R., Xu, X., Carlson, B. A., Harney, J. W., Driscoll, D. M., Hatfield, D. L. und Berry, M. J. (2000). *EMBO Rep.* 1: 158-163.
- Tumbula, D. L., Bowen, T. L. und Whitman, W. B. (1994). *FEMS Microbiol. Lett.* 121: 309-314.
- Tumbula, D. L., Bowen, T. L. und Whitman, W. B. (1997). *J. Bacteriol.* 179: 2976-2986.
- Ursini, F., Heim, S., Kiess, M., Maiorino, M., Roveri, A., Wissing, J. und Flohe, L. (1999). *Science* 285: 1393-1396.
- Vacher, J., Grosjean, H., Houssier, C. und Buckingham, R. H. (1984). *J. Mol. Biol.* 177: 329-342.
- von Ehrenstein, G. (1967). *Methods Enzymol.* 12a: 555-596.
- Vorholt, J. A., Vaupel, M. und Thauer, R. K. (1997). *Mol. Microbiol.* 23: 1033-1042.
- Warner, G. J., Berry, M. J., Moustafa, M. E., Carlson, B. A., Hatfield, D. L. und Faust, J. R. (2000). *J. Biol. Chem.* 275: 28110-9.
- Whitaker, J. R. und Granum, P. E. (1980). *Anal. Biochem.* 109: 156-159.
- Whitman, W. B., Shieh, J., Sohn, S., Caras, D. S. und Premachandran, U. (1986). *Appl. Environ. Microbiol.* 7: 235-240.
- Wies, I., Brunner, S., Henninger, J., Herkel, J., Kanzler, S., Meyer zum Buschenfelde, K. H. und Lohse, A. W. (2000). *Lancet* 355: 1510-1515.

- Wilting, R. (1997). Dissertation am Lehrstuhl für Mikrobiologie, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Wilting, R., Schorling, S., Persson, B. C. und Böck, A. (1997). *J. Mol. Biol.* 266: 637-641.
- Wilting, R., Vamvakidou, K. und Böck, A. (1998). *Arch. Microbiol.* 169: 71-75.
- Wyatt, J. R., Chastain, M. und Puglisi, J. D. (1991). *Biotechniques* 11: 764-769.
- Yamazaki, S. (1982). *J. Biol. Chem.* 257: 7926-7929.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. und Messing, J. (1985). *Gene* 33: 103-119.
- Zinoni, F., Birkmann, A., Stadtman, T. C. und Böck, A. (1986). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 4650-4654.
- Zinoni, F., Heider, J. und Böck, A. (1990). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 4660-4664.
- Zirngibl, C., Van Dongen, W., Schwörer, B., von Büнау, R., Richter, M., Klein, A. und Thauer, R. K. (1992). *Eur. J. Biochem.* 208: 511-520.

# Anhang

## Anhang 1: Verwendete Abkürzungen:

A.	<i>Archaeoglobus</i>
Abb.	Abbildung
Ap	Ampicillin
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
Da	Dalton
C-	carboxy-
Ci	Curie
DEAE-	Diethyl-Aminoethyl-
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
E	Extinktion
F <sub>420</sub>	8-Hydroxy-5-Deazaflavin
h	Stunde
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -Thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
kbp	Kilobasenpaare
<i>M.</i>	<i>Methanococcus</i>
MALDI	<i>matrix assisted laser desorption ionisation</i>
min	Minuten
MJWT	mögliches <i>vhuU</i> -SECIS-Element
<i>Mp.</i>	<i>Methanopyrus</i>
<i>Mtb.</i>	<i>Methanothermobacter</i>
N-	amino-
nt	Nukleotide
ORF	offener Leserahmen
<i>P.</i>	<i>Pyrococcus</i>
PAA	Polyacrylamid
PAG	Polyacrylamidgel
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Pur	Puromycin
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
SerRS	Seryl-tRNA-Synthetase
SPS	Selenophosphat-Synthetase
SS	Selenocystein-Synthase
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TOF	<i>time of flight</i>
U	Einheit(en)
vgl.	vergleiche

(Fortsetzung Anhang 1)  
 X x g X-fache Erdbeschleunigung  
 PCR Polymerase Kettenreaktion

Anhang 2: Vergleich der Aminosäuresequenzen von VhuD aus *M. voltae*, *M. jannaschii* und *M. maripaludis*

	↓		
<i>M. voltae</i>	MAEPIIMAFICYQCGYGAADLAGTSRMQYPASVRPIRVPCTGKFLYYLRI	50	
<i>M. jannaschii</i>	M-DPVIIAFCCYQUGYGAADLAGTSRMQYPATVRIVRLPCTGKFDITYAL	49	
<i>M. maripaludis</i>	MAEPVIMAFVCYQUGYGAADLAGTSRMQYPASVRAIRVPCTGKFDITYAL	50	
	↓		
<i>M. voltae</i>	KGIPKGADAVFVAGCKPNECAFETGNFSVEERVKMTKQILDDEMGIGGDRI	100	
<i>M. jannaschii</i>	RAFQKGADAVMVGUKKGECAJETGNLKAEEVRFAKQLLDELGIGGDRI	99	
<i>M. maripaludis</i>	RAFQKGADAVFVAGUKPNECAFETGNFKAEERVKFGKQILDDELGIGGERL	100	
<i>M. voltae</i>	EMFFMSGADAGKFTEAVNEMTDRAKKLGNPLKK	134	
<i>M. jannaschii</i>	DMFFMSAAEADKFVSAVNEMTARVEKLGPNPLKAQ	134	
<i>M. maripaludis</i>	EMFFMSGADAGKFTEAVKEMTDREVKKLGNPIKA	134	

Die Positionen der Selenocystein-Reste bei *M. jannaschii* und *M. maripaludis*, sowie der Cystein-Reste bei *M. voltae* sind durch Pfeile markiert.

# Danksagung

An erster Stelle danke ich natürlich meinem Doktorvater, Prof. August Böck, der mit seinem fast grenzenlosen Fachwissen und seinem wissenschaftlichen Spürsinn nicht nur diese Arbeit ermöglichte, sondern sie auch, wann immer es nötig war, zu beleben verstand.

Prof. Barny Whitman (UGA, Athens, GA) danke ich sehr für meine Aufnahme in seinem Labor und die Selbstverständlichkeit meiner Einbeziehung in alle Aktivitäten während meines Aufenthalts bei ihm. Seinen (damaligen) Doktoranden Warren Gardner und Winston Lin bin ich für ihre engagierte wissenschaftliche Zusammenarbeit und ihre Gastfreundschaft sehr dankbar.

Bei Dr. Friedrich Lottspeich (MPI, Martinsried) und seinen Mitarbeiterinnen Monica Zobawa und Isabella Mathes möchte ich mich für die stets gute Zusammenarbeit bei der Bearbeitung meiner diversen Proteinsequenzier-, MALDI-, etc.-Proben bedanken, ohne die viele der hier vorgestellten Arbeiten nicht möglich gewesen wären.

Prof. John A. Leigh (UW, Seattle, WA) stellte uns freundlicherweise die noch nicht veröffentlichte Genomsequenz von *M. maripaludis* LL zur Verfügung, wofür ich ihm sehr dankbar bin.

Dr. Elias Arnèr (Karolinska Institutet, Stockholm) brachte mir in seiner Zeit bei uns in München viel wissenschaftliches Grunddenken bei, später stand er mir wann immer nötig per e-mail zur Seite. Ausserdem wurde er ein guter Freund. Tack så mycket!

Armin danke ich als meinem (fast) einzigen Mitstreiter bei den "Archaeas" für die gute Zusammenarbeit.

Meinen Laborkollegen, allen voran Martin, Susanne und Smurf danke ich nicht nur für wissenschaftlichen und methodischen "Rückhalt", sondern auch für die unterhaltsamen Zeiten.

"Meiner" Diplomandin Nicole danke ich für ihre fleißige Arbeit, durch die etwas mehr Klarheit in das - durch vorhandene und nicht vorhandene Sequenzhomologien – bisweilen ein wenig trübe Archaeen-Modell gebracht werden konnte.

Ich danke auch unserer TA, Verena Mayr, für die exzellente Arbeit am aSelB von *M. maripaludis*.

Nicht zuletzt möchte ich mich noch herzlich bei den Mitgliedern der Werkstatt, Michi, Siggi, Peter und Christian, für ihre Mühen bei der Realisierung so mancher "Versuchs-Installation" bedanken.

# Lebenslauf

## Angaben zur Person:

Name: Michael Rother

Geburtsdatum: 15. September 1971

Geburtsort: Eggenfelden

Familienstand: ledig

## Ausbildung:

1977-1981 Grundschule an der Simmernstraße in München

1981-1991 Oskar-von-Miller-Gymnasium in München; Abitur

1991-1997 Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität in München;  
Diplom

1997-2001 Bearbeitung der vorliegenden Dissertation am Department I für Biologie,  
Bereich Mikrobiologie, der Ludwig-Maximilians-Universität in München  
unter der Leitung von Prof. Dr. August Böck

